



# **Cristal·lització de la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa* 42A2 i estudi filogenètic de les subfamílies de les lipoxigenases**

Albert Garreta i Gambús

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.







UNIVERSITAT DE BARCELONA



**Facultat de Farmàcia**

**Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries**

**Cristal·lització de la lipoxigenasa de  
*Pseudomonas aeruginosa* 42A2 i estudi  
filogenètic de les subfamílies de les  
lipoxigenases**

**Albert Garreta i Gambús 2010**







UNIVERSITAT DE BARCELONA



**Facultat de Farmàcia**  
**Departament de Microbiologia i Parasitologia Sannitàries**

**Programa: Microbiologia Ambiental i Biotecnologia**  
**(Facultat de Biologia)**  
**Bienni: 2004-2006**

**Cristal·lització de la lipoxigenasa de *Pseudomonas***  
***aeruginosa* 42A2 i estudi filogenètic de les**  
**subfamílies de les lipoxigenases**

Memòria presentada per **Albert Garreta i Gambús** per optar al títol de doctor per la Universitat de Barcelona.

Dirigida per:

**Dra. Àngels Manresa i Presas**

Professora titular

Dpt. de Micobiologia i Parasitologia Sanitàries

Facultat de Farmàcia (UB)

**Dra. Montserrat Busquets Abio**

Professora titular

Dpt. de Bioquímica i Biologia Molecular

Facultat de Biologia (UB)

**Albert Garreta i Gambús 2010**

Aquesta tesi ha estat finançada per la Universitat de Barcelona a través d'una beca BRD concedida al doctorand i pel Ministerio de Educación y Ciencia a través del projecte "Biocatalizadores para la producción de emulsionantes poliméricos: optimización del sistema y desarrollo de nuevos productos, CTQ 2007-60749/PPQ".

## **Ítaca**

Quan surts per fer el viatge cap a Ítaca,  
has de pregar que el camí sigui llarg,  
ple d'aventures, ple de coneixença.  
Els Lestrígons i els Ciclops,  
l'airat Posidó, no te n'esfereixis:  
són coses que en el teu camí no trobaràs,  
no, mai, si el pensament se't manté alt, si una emoció escollida  
et toca l'esperit i el cos alhora.  
Els Lestrígons i els Ciclops,  
el feroç Posidó, mai no serà que els topis  
si no els portes amb tu dins la teva ànima,  
si no és la teva ànima que els dreça davant teu.

Has de pregar que el camí sigui llarg.  
Que siguin moltes les matinades d'estiu  
que, amb quina delectança, amb quina joia!  
entraràs en un port que els teus ulls ignoraven;  
que et puguis aturar en mercats fenicis  
i comprar-hi les bones coses que s'hi exhibeixen,  
corals i nacres, ambres i banussos  
i delicats perfums de tota mena:  
tanta abundor com puguis de perfums delicats;  
que vagis a ciutats d'Egipte, a moltes,  
per aprendre i aprendre dels que saben.

Sempre tingues al cor la idea d'Ítaca.  
Has d'arribar-hi, és el teu destí.  
Però no forcis gens la travessia.  
És preferible que duri molts anys  
i que ja siguis vell quan fondegis a l'illa,  
ric de tot el que hauràs guanyat fent el camí,  
sense esperar que t'hagi de dar riqueses Ítaca.

Ítaca t'ha donat el bell viatge.  
Sense ella no hauries pas sortit cap a fer-lo.  
Res més no té que et pugui ja donar.

I si la trobes pobra, no és que Ítaca t'hagi enganyat.  
Savi com bé t'has fet, amb tanta experiència,  
ja hauràs pogut comprendre què volen dir les Ítaques.

Konstantinos Kavafis, 1911  
Traduït per Carles Riba



## **Agraïments:**

Ara farà uns sis anys que vaig començar aquest periple que és fer un doctorat i, ni de bon tros, em podia imaginar el que això suposava... Han estat moltes hores, molta feina i també alguna que altre decepció, però ara amb la perspectiva que dóna haver-ho superat, crec que ha valgut la pena.

Aquesta tesi no hauria estat possible sense l'ajuda i suport de molta gent, és per això que aprofito aquestes ratlles per agrair-los-ho.

En primer lloc agrair a les directores d'aquesta tesi, la Dra. Àngels Manresa i la Dra. Montse Busquets, el seu suport i confiança, però sobretot el fet d'haver-me donat l'oportunitat de no només treballar en aquest laboratori sinó de col·laborar amb d'altres grups d'aquí i de fora.

En segon lloc, agrair l'oportunitat de realitzar aquest doctorat al Dr. Miquel Regué, Director del Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries, i per extensió agrair-ho a tota la gent del departament. En especial voldria donar les gràcies a la Dra. Marquès, que va dirigir el meu primer treball científic amb cara i ulls (el Màster), a la Dra. Espuny, amb qui sempre he pogut parlar de tota mena de problemes (científics o no), i a la Dra. Fusté sense la qual, l'últim capítol d'aquesta tesi hauria estat impossible. També vull donar les gràcies a la Dra. Berlanga amb qui he compartit despatx i xerrades durant l'última etapa de la tesi, i a la Lucía Muñoz que m'ha guiat a través de la "burrocràcia" que implica fer una tesi.

Però és clar que durant sis anys al Departament no només he fet ciència, també hi he fet amics. Amics d'aquells amb qui comparteixes els bons moments però que també t'ajuden a superar els dolents. Éscar, Minyana, Noelí i Mònica moltes gràcies, aquesta tesi també és vostre!!!

Una part molt important d'aquesta tesi s'ha realitzat al Parc Científic de Barcelona, al grup del Dr. Ignasi Fita del IBMB (Institut de Biologia Molecular de Barcelona, CSIC). A tota la gent que en forma part, els vull agrair el bon acolliment que em van donar i, especialment al Dr. Carpena, la paciència i dedicació que ha tingut amb mi. No em puc deixar de donar les gràcies a la

tècnic d'aquest grup, la Queralt Garcia, a qui tant he atabalat durant aquests anys (allò que vas dir de mi, que era tant alt, m'ha quedat gravat per sempre, jejejeje).

També vull donar les gràcies a tota aquella gent de fora de Catalunya que he anat coneixent. A la Rosa Maria (Mèxic), amb qui vaig compartit moments inoblidables al laboratori i a qui crec que, juntament amb RAC1, li vaig ensenyar una mica més de català. Al grup de la Dr. Eliana Lemos (Brasil), amb qui vaig estar mig any que no oblidaré mai (Simone e Maurício, para se um dia você ler estas linhas, muito obrigado por tudo). A la Dra. Betty Gaffney (Florida, USA), de qui he après molt més del que mai hauria imaginat, donar-li les gràcies per haver-me obert les portes del seu laboratori i donar-me l'oportunitat d'entrar en aquest món tant estrany que és l'EPR (Thanks for the patience you had with me and make me understand what, at first, thought it impossible to understand).

Vull agrair també als meus amics la paciència que han tingut amb mi. Sé que ha estat molta i els ho agraeixo. Brisa, Ru, Bros, Martes, Aitziber, Dídac, Gis... prometo no atabalar-vos més amb la maleïda lipoxigenasa !!!

I per acabar, donar les gràcies a la meva família que, tot i que crec que encara no entenen com es pot gaudir fent el que faig, sempre m'han donat suport. En especial als meus pares, que em serveixen de model per no defallir quan les coses es posen difícils.

## ÍNDEX

<b>1. INTRODUCCIÓ</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1.</b> Antecedents .....	<b>3</b>
<b>1.2.</b> Transformacions microbianes.....	<b>5</b>
1.2.1. Biotransformacions: definició i característiques.....	7
1.2.2. Biotransformacions microbianes .....	8
1.2.3. Biotransformació de lípids per microorganismes.....	11
1.2.4. Biotransformacions aplicades a la indústria .....	14
<b>1.3.</b> Gènere <i>Pseudomonas</i> .....	<b>16</b>
<b>1.4.</b> Lipoxigenases .....	<b>18</b>
1.4.1. Classificació i nomenclatura .....	19
1.4.2. Funció biològica .....	20
1.4.3. Mecanisme d'acció.....	23
1.4.4. Mètodes d'estudi: EPR i Difracció de raig X.....	25
1.4.4.1. EPR (Ressonància Paramagnètica Electrònica).....	25
1.4.4.2. Difracció de raig X.....	31
1.4.5. Estructura .....	33
1.4.5.1. Lligands del ferro – Centre actiu.....	35
1.4.5.2. Cavitat .....	38
1.4.6. Especificitat posicional i de substrat .....	40
1.4.7. Anàlisi filogenètic .....	46
<b>2. OBJECTIUS</b> .....	<b>49</b>
<b>3. CAPÍTOL 1: Estructura de la lipoxigenasa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 42A2</b> .....	<b>52</b>
<b>3.1.</b> Material i mètodes.....	<b>55</b>
3.1.1. Producció de la lipoxigenasa recombinant de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 42A2 .....	55
3.1.2. Purificació de la lipoxigenasa recombinant de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 42A2.....	55
3.1.3. Detecció de l'activitat lipoxigenasa. Mètode espectrofotomètric.....	56
3.1.4. Electroforèsi de proteïnes en gels de poliacrilamida .....	57
3.1.5. Cristal·lització de la lipoxigenasa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 42A2 .....	59
3.1.5.1. Mètode de difusió de vapor en gota pendent.....	59
3.1.5.2. Condicions de cristal·lització .....	60
3.1.6. Difracció del cristall de la lipoxigenasa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 42A2...62	
3.1.7. EPR: Ressonància Paramagnètica Electrònica .....	63
<b>3.2.</b> Resultats i discussió.....	<b>65</b>
3.2.1. Purificació de la lipoxigenasa i obtenció de cristalls.....	65



3.2.2.	Paràmetres del cristall.....	68
3.2.3.	Estructura general.....	71
3.2.4.	Esfera de coordinació del ferro. ....	75
3.2.5.	Cavitats i substrat .....	78
3.2.6.	EPR Ressonància Paramagnètica Electrònica.....	82
3.2.7.	Consideracions globals.....	84
<b>4. CAPÍTOL 2: Prospecció metagenòmica de noves lipoxigenases.....</b>		<b>91</b>
4.1.	Material i mètodes.....	93
4.1.1.	Recollida de mostres i extracció de DNA de sòls.....	93
4.1.2.	Construcció d'una llibreria metagenòmica amb còsmids .....	93
4.1.3.	Gels d'agarosa .....	94
4.1.4.	Disseny d'encebadors específics i degenerats .....	95
4.1.5.	PCR i PCR de seqüenciació.....	96
4.1.5.1.	PCR.....	96
4.1.5.2.	PCR de seqüenciació.....	97
4.1.6.	Extracció dels clons de DNA cosmídic de les plaques de cultiu de 96 pous ..	98
4.1.7.	Construcció d'un microarray usant DNA clonat en còsmids .....	100
4.1.8.	Disseny i producció de les sondes per a revelar el microarray .....	100
4.1.9.	Marcatge fluorescent de les sondes. ....	101
4.1.10.	Hibridació o revelat del microarray.....	102
4.1.11.	Obtenció d'imatges i anàlisi de dades .....	102
4.1.12.	SNR (Signal-to-Noise Ratio) .....	104
4.2.	Resultats i discussió.....	107
4.2.1.	Encebadors .....	107
4.2.2.	Resultat de les PCR dels pools de clons i plaques escollides per a la generació del microarray.....	108
4.2.3.	Producció de sondes i marcatge.....	111
4.2.4.	Hibridació.....	112
4.2.5.	Resultats del microarray: valoració estadística.....	115
4.2.6.	Classificació dels resultats.....	129
4.2.7.	Anàlisi amb SNR (Signal-to-Noise Ratio).....	131
4.2.8.	Seqüenciació dels clons candidats.....	133
4.2.9.	Consideracions globals .....	134
<b>5. CAPÍTOL 3: Filogènia de les lipoxigenases.....</b>		<b>141</b>
5.1.	Material i mètodes .....	143
5.1.1.	Seqüències de lipoxigenases utilitzades en l'anàlisi filogenètic.....	143
5.1.2.	Programes bioinformàtics .....	144
5.1.2.1.	Programes usats per a fer alineaments.....	144
5.1.2.2.	Programes i mètodes per a fer els arbres filogenètics. ....	144

5.1.2.3.	PAML 4.3: Anàlisi filogenètic per màxima versemblança ....	145
5.1.2.3.1.	CODEML: anàlisi dels models evolutius.....	146
<b>5.2.</b>	<b>Resultats i discussió.....</b>	<b>148</b>
5.2.1.	Anàlisi dels gens de lipoxigenases.....	148
5.2.2.	Arbres filogenètics.....	150
5.2.3.	Evolució de les lipoxigenases bacterianes.....	154
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>165</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>169</b>
<b>8.</b>	<b>ANNEXES.....</b>	<b>181</b>
<b>8.1.</b>	<b>Annex 1: Composició dels tampons provats per a la cristal·lització de la lipoxigenasa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....</b>	<b>183</b>
<b>8.2.</b>	<b>Annex 2: Taula de valors d'intensitat per a cada spot i altres paràmetres estadístics..</b>	<b>217</b>

# **1. INTRODUCCIÓ**



## 1.1. Antecedents

Aquesta tesi s'emmarca en els treballs iniciats per Jaume Vidal-Mas i Víctor Deroncelé en el si del *Grup de Biotransformacions de Residus Oleaginosos*. L'estudi de l'origen dels productes hidroxilats detectats com a resultat de la biotransformació de residus oleaginosos amb la soca de *Pseudomonas aeruginosa* 42A2 va portar a pensar en l'existència d'una lipoxigenasa com a responsable d'aquest tipus de transformació.

Les lipoxigenases pertanyen a la família de les oxidoreductases que estan àmpliament representades en els microorganismes, en les plantes, i en els animals (Brash RA 1999). Les oxidoreductases catalitzen l'intercanvi d'electrons o d'equivalents redox entre el donant i el receptor molecular en aquelles reaccions que impliquen una transferència d'electrons, l'abstracció d'un hidrogen, l'abstracció d'un protó, la inserció d'un oxigen o d'altres passos clau. Generalment es donen dues "mitges" reaccions, una oxidativa i l'altre reductora, i almenys dos substrats s'activen o es transformen (un reduint-se i l'altre oxidant-se). Així doncs, per acomplir la seva funció biològica, les oxidoreductases utilitzen diversos centres redox actius que estan protegits per la cadena polipeptídica de l'oxidoreductasa i que poden modular la seva selectivitat, potència redox, reactivitat i estabilitat (Munro AW, Taylor P et al. 2000). Els centres redox més comuns inclouen aminoàcids com la tirosina o la cisteïna, ions metàl·lics com el ferro, el coure o el molibdè, o complexos com pot ser un grup hemo o un cluster Fe-S, i coenzims (Feng X. 2005).

Les oxidoreductases es poden classificar en funció de la seva seqüència o estructura tridimensional, aquesta és molt informativa per a l'estudi de la relació estructura-funció, de l'evolució de l'enzim, de la genòmica funcional i, en estudis *in silico*, per a descobriments de nous enzims. Òbviament, per a la seva aplicació, també es poden classificar d'acord a la seva signatura catalítica i/o en funció de la seva coenzim-dependència. En funció de la seva aplicació podem parlar de quatre grans grups d'oxidoreductases: les oxidases, les peroxidases, les oxigenases/hidroxilases i les dehidrogenases/reductases (Feng X. 2005).

Tot i que no són moltes, algunes oxidoreductases ja s'estan utilitzant en la indústria alimentària i tèxtil. La seva aplicació tècnico-industrial es troba

habitualment en processos de síntesis química, en tractaments ambientals i en la indústria mèdica i alimentària. L'ús d'oxidoreductases com a biocatalitzadors biodegradables permet l'estalvi d'energia fet que encaixa perfectament amb el desenvolupament d'indústries eficients, sostenibles i ambientalment respectuoses (Feng X. 2005).

Les lipoxigenases són un tipus d'oxidoreductasa (oxigenases / hidroxilases) que es troben presents en el gènere *Pseudomonas*. Això va fer pensar en aquests tipus d'enzim com a candidat responsable de la biotransformació dels residus oleaginosos que estava tenint lloc i que fou detectada mitjançant l'observació i descripció d'àcids grassos hidroxilats. En l'article publicat l'any 2004 que porta per títol *Isolation and characterization of a lipoxxygenase from Pseudomonas 42A2 responsible of the biotransformation of oleic acid into (S)-(E)-10-hydroxy-8-octadecenoic acid* (Busquets M 2004) s'aïlla i es descriu un enzim amb activitat lipoxigenasa a partir de la soca de *Pseudomonas aeruginosa*. L'enzim és monomèric i es localitza en l'espai periplasmàtic i conté 0,55 mols de  $Fe^{2+}$  per cada mol de proteïna. Es descriu la bioquímica de l'enzim obtenint una activitat òptima entre 25 i 30 °C i mantenint el 44% de l'activitat als 55°C. Té un pH òptim de 8,5-9 i la presència d'ions de magnesi incrementen l'activitat de l'enzim. El substrat preferencial de l'enzim és l'àcid linoleic, un àcid gras poliinsaturat.

En l'article publicat l'any 2005 que porta per títol "*Cloning and expression of a lipoxxygenase from Pseudomonas aeruginosa 42A2*" (Vidal-Mas J 2005) es mostra la clonació i l'optimització de la sobreexpressió lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa* obtenint un alt rendiment en la producció de proteïna. L'optimització va requerir l'eliminació del pèptid senyal de la proteïna per evitar la formació de cossos d'inclusió que reduïen notablement la quantitat de proteïna obtinguda en cada producció i dificultava la purificació de la mateixa. Posteriorment això en permetrà la seva cristal·lització i un posterior estudi estructural que constitueix el cos central d'aquesta tesi.

Així doncs, partint de la necessitat de revalorar els residus que produeix la societat moderna per tal de reduir-ne el seu impacte ambiental, s'ha trobat un nou enzim capaç que reuneix les característiques necessàries per entrar a

formar part de la nova dinàmica industrial per a un desenvolupament sostenible i una producció neta.

## **1.2. Transformacions microbianes**

Durant les darreres dècades, el consum de recursos ha augmentat de manera descontrolada i, en conseqüència, també ho ha fet la generació de residus i emissions que van a parar al medi ambient.

No és fins la dècada dels noranta que l'home pren consciència de la problemàtica generada i decideix fer-hi front des de dues perspectives: el "desenvolupament sostenible" i la "producció neta". El desenvolupament sostenible és aquell capaç de satisfer les necessitats actuals sense comprometre els recursos i possibilitats de futures generacions, i per tant es basa en l'ús de recursos naturals renovables (Brundtland GH. 1991). La producció neta és aquella que es basa en l'ús de tecnologies que minimitzen l'impacte ambiental reduint l'emissió de residus (Clift R. 1997). Així doncs, l'aplicació de les tecnologies netes ha suposat i està suposant un canvi en la manera de produir que es tradueix en una actitud diferent de la societat enfront el medi ambient. La clau per entendre aquest canvi recau en la reutilització sistemàtica de residus que permet augmentar la producció de recursos i fer així, l'activitat humana sostenible (Clift R. 1997). Aquestes noves perspectives i possibilitats econòmiques, fan que l'estudi i l'ús d'eines biotecnològiques que permetin millorar les propietats de productes industrials, reduir-ne l'impacte ambiental i incrementar-ne la biodegradabilitat, siguin molt importants (Gámiz M. 2007).

El desenvolupament de la biotecnologia, la química i l'optimització dels processos industrials fan possible que la reutilització de residus sigui una activitat econòmicament viable i que s'estigui utilitzant com a solució a molts problemes derivats de la pressió generada pel desenvolupament humà (O'Brien C. 1999). Un clar exemple d'aplicació de tecnologies netes és el que afecta a la gestió dels residus oliosos. L'any 2005 es van generar a Catalunya unes 63.000 tones d'olis usats segons l'Agència de Residus de Catalunya (<http://www.arc-cat.net/ca/home.asp>). A aquests valors cal afegir-hi tots els olis minerals usats com a lubricants en la indústria i el transport terrestre i marítim, els olis

minerals usats per aïllament i transmissió de calor, emulsions olioses... (unes 45.000 tones/any a Catalunya). Tot això representa un 1'7% del total de residus produïts a Catalunya (Taula 1).

Descripció: tipus de residu	Especials	Inerts	No especials	Total	%
Dissolvents i residus líquids amb dissolvents	111.532	0	0	111.532	1,75
<b>Residus oliosos (olis, greixos i hidrocarburs)</b>	<b>58.164</b>	<b>0</b>	<b>5.017</b>	<b>63.181</b>	<b>0,99</b>
Productes químics i fitosanitaris	1.726	0	1.308	3.034	0,05
Líquids i banys residuals amb metalls	28.458	0	6.638	35.096	0,55
Líquids i banys residuals sense metalls	15.212	0	967	16.179	0,25
Residus líquids orgànics	63.706	0	14	63.720	1
Pintures, tintes, colorants i coles	21.113	0	13.440	34.553	0,54
Residus salins	2.238	0	34.097	36.335	0,57
Residus de descontaminació	187.073	0	441.022	628.095	9,86
Residus de combustió	127.540	0	545.946	673.486	10,57
Llots de depuració	35.855	0	1.087.271	1.123.127	17,63
Productes caducats i restes de fabricació orgànics	9.622	0	412.286	421.908	6,62
Residus animals	0	0	514.237	514.237	8,07
Residus sanitaris	27.346	0	6.155	33.501	0,53
Residus vegetals	0	0	552.736	552.736	8,68
Plàstics	0	0	126.442	126.442	1,99
Metalls	362	0	663.683	664.045	10,42
Productes minerals i ceràmics	8.563	0	391.775	400.338	6,28
Envasos industrials	42.171	0	72.574	114.745	1,8
Terres contaminades i sediments	1.348	0	17.747	19.095	0,3
Varis	44.058	0	690.421	734.479	11,53
<b>TOTAL</b>	<b>786.087</b>	<b>0</b>	<b>5.583.776</b>	<b>6.369.863</b>	<b>100</b>

**Taula 1.- Classificació dels residus produïts a Catalunya l'any 2005. Dades oficials de l'Agència de Residus de Catalunya**

Amb la reutilització d'aquests productes de rebuig no només s'evita la possible contaminació que puguin produir, sinó que també es poden obtenir productes amb valor afegit i amb interès biotecnològic com poden ser els tensoactius (Haba E, Espuny MJ et al. 2000), polihidroxicanoats (Füchtenbusch B., Wullbrandt D. et al. 2000) i lipases (Haba E, Espuny MJ et al. 2000). Per altre banda, es redueixen els costos del tractament d'aquests productes com a residus.

Els residus oliosos presenten una gran diversitat. Els petrolis i els hidrocarburs són els més preocupants, doncs les fuites d'oleoductes i els accidents marítims ocasionen grans desastres ecològics amb un impacte mediàtic evident. Això ha portat a desenvolupar processos de bioremediació on



s'utilitzen organismes vius per eliminar la contaminació i restablir l'equilibri ecològic amb el menor temps possible.

### **1.2.1. Biotransformacions: definició i característiques.**

Una biotransformació és la transformació d'un compost químic en un altre utilitzant un biocatalitzador com a mediador d'aquesta conversió. Aquest mediador pot ser un enzim o bé cèl·lules senceres, viables o no (Bains W. 1993). Aquesta conversió pot constar de més d'una etapa, ja que els microorganismes són molt útils per a fer transformacions que impliquin més d'una reacció enzimàtica en seqüència (Demain A. 2000).

Donat que els microorganismes poden catalitzar moltes de les reaccions de la química orgànica, la seva aplicació a nivell industrial esdevé molt interessant i fins i tot necessària per a determinades reaccions. Les característiques més interessants de les biotransformacions són tres: la capacitat de dur a terme reaccions que mitjançant la síntesi química són difícils i molt costoses, com pot ser la producció de productes quirals o la hidroxilació de carbonis no actius; la segona és que permeten evitar les condicions extremes (altes temperatures i pressions) i per últim, redueixen notablement els residus generats. D'altra banda, l'estereoespecificitat d'aquestes reaccions permet la producció d'un sol isòmer òptic d'un producte quiral i la regioespecificitat permet la modificació parcial de molècules grans (Bains W. 1993). Així doncs aquestes dues característiques són molt importants ja que permeten, mitjançant l'ús d'enzims o cèl·lules, evitar els passos de bloqueig i desbloqueig típics de la síntesi orgànica enantioselectiva i regioselectiva de compostos (Ishige T., Honda K. et al. 2005). Tot i què la tendència actual és la d'obtenir biocatalitzadors actius sobre un ampli rang de substrats (Faber K. and Kroutil W. 2005).

Malgrat que les bioconversions amb cèl·lules senceres són viables, les dificultats en la predicció dels resultats fan que la seva aplicació a la indústria sigui limitada. Els problemes de permeabilitat de substrats a través de membranes, l'acumulació de productes secundaris i les reaccions paral·leles que poden alterar els productes (Ishige T., Honda K. et al. 2005) o les dificultats en la recuperació i purificació del producte, fan més recomanable

treballar amb enzims purificats. Amb aquests, tot i què necessitin condicions de treball més restringides (pH ajustat, presència de cofactors...), les reaccions són més selectives i permeten treballar a concentracions més elevades i/o amb solvents orgànics.

Així doncs, i degut als nous avenços de la biotecnologia, el camp de les biotransformacions es troba en una fase de canvi i evolució constant que permet la millora i el desenvolupament de nous sistemes de biocatàlisi (Turner N. and Schneider M. 2000).

### 1.2.2. Biotransformacions microbianes

La diversitat de reaccions que poden dur a terme els microorganismes és molt àmplia i fins i tot poden transformar productes xenobiòtics. Els enzims i les reaccions que aquests podrien catalitzar amb més importància industrial segons el Consorci Suís de Biocatàlisi Industrial són, principalment, oxidoreductases i es mostren en la Taula 2 (Leresche J E 2006).

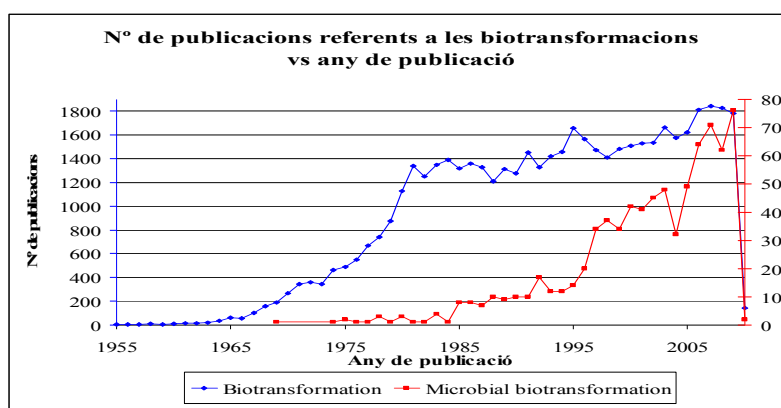
<b>Deshidrogenases</b>	Deshidrogenases NADH-dependents per a reduccions asimètriques de cetones, cetoàcids i olefins.
	Oxidacions d'alcohols amb deshidrogenases
<b>Oxigenases</b>	Monohidroxilacions, especialment hidroxilacions de centres no activats i de substrats no naturals. Millora de la robustesa i fiabilitat del sistema P-450 <i>in vitro</i> o desenvolupament de sistemes alternatius.
	Peroxidases
	Transformacions de ribonucleòtids, epoxidacions estereoespecífiques i oxidacions de cetones a èsters i lactones.
<b>Liases</b>	Formació d'enllaços C-C usant aldolases i hidroxinitril liases,
	Formació d'enllaços C-N (aminoliases) i C-O (hidratases)

**Taula 2: Enzims amb més interès industrial i reaccions que poden catalitzar (Leresche J E 2006).**

Hi ha, però, altres enzims d'importància industrial com són les transferases, les hidrolases o les isomerases. Les transferases catalitzen la transferència d'un grup funcional (acils o fosfats) d'una molècula a una altra. Un exemple n'és l'aminotransferasa present en *Vibrio fluvialis* (Shin J. and Kim B. 2001). Les hidrolases, com les cel·lulases o lipases, catalitzen reaccions

d'hidròlisi (Grogan G., Rippé C. et al. 1997) i les isomerases catalitzen reaccions de isomerització com ara la racemització d'aminoàcids (Kato D. and Mitshuda S. 2003).

Quan s'observa l'evolució de les publicacions científiques que fan referència a les biotransformacions en general i a les biotransformacions bacterianes en concret (Figura 1), s'observa un clar increment en l'estudi i posterior aplicacions de les biotransformacions microbianes durant els últims deu anys.



**Figura 1.- Gràfic que il·lustra l'evolució en quan a nombre de publicacions científiques referides a les biotransformacions (font: SciFinder Scholar).**

Així doncs, la necessitat de millorar els enzims ja coneguts i de trobar-ne de nous es fa evident si es vol treballar amb tecnologies sostenibles (química verda). Les estratègies que s'estan utilitzant actualment per a trobar nous enzims són dues; la metagenòmica (Steele HL 2009) i l'estudi de nous hàbitats d'on poder aïllar i cultivar nous microorganismes (Teske AP 2005).

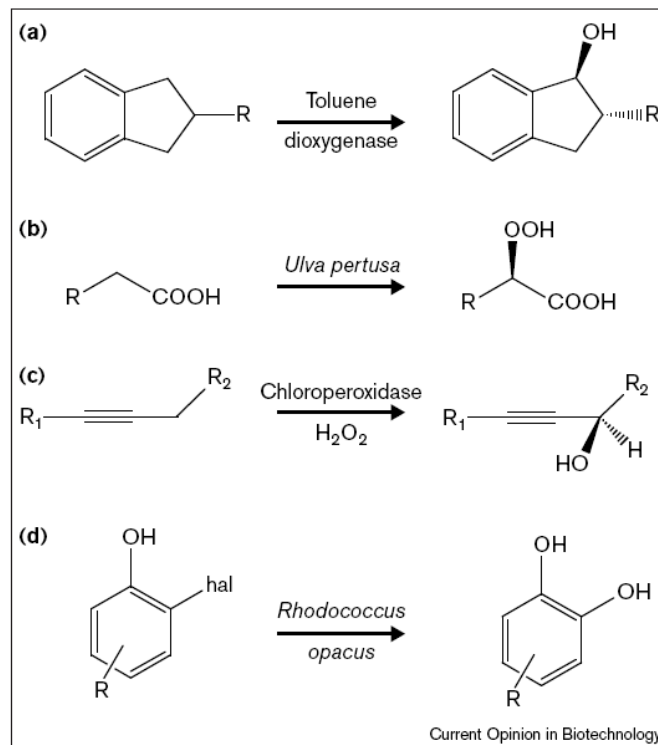
La metagenòmica, la ciència que es proposa investigar el genoma de comunitats senceres de microorganismes més que no pas la d'espècies individuals, neix de la necessitat d'estudiar els organismes procarotes que no són cultivables o que simplement no creixen en els medis actuals (els microbiòlegs parlen d'un 99 % d'espècies bacterianes no cultivades) (Cowan D 2005). La gran diversitat genètica que representa aquest 99 % és accessible ara, gràcies a la metagenòmica i a les diverses tècniques de rastreig basades en els xips de DNA i desenvolupades durant els últims quinze anys (Ferrer M 2007). Mentre que l'aproximació metagenòmica serveix per a trobar nous

enzims, l'evolució dirigida és una altra aproximació per assolir els mateixos objectius. Aquesta estratègia parteix d'un enzim conegut i, a través de repetits cicles de petites variacions i seleccions, s'obté un enzim amb una millora en les funcions desitjades. L'evolució dirigida combina diferents tècniques d'enginyeria genètica per obtenir diversitat genètica, un criatge d'alt rendiment i avançats mètodes d'anàlisi i de càlcul. En contrast amb la millora enzimàtica clàssica que és lineal, l'evolució dirigida és un procés ramificat que permet l'obtenció ràpida de nous variants de l'enzim escollit (Leresche J E 2006).

La varietat de compostos químics presents en la natura és molt àmplia, és per això que la variabilitat de biotransformacions i d'enzims que les catalitzen també ho és. Aquesta memòria es basa en un sol tipus de biotransformació, la hidroxilació, on un enllaç C-H es modifica per a obtenir, finalment, un enllaç C-OH. Aquesta activitat enzimàtica és una de les més esteses i es produeix en totes les formes de vida, des dels bacteris fins als humans.

La reacció d'hidroxilació és una part clau en el metabolisme oxidatiu de molts compostos orgànics i ja fa molt temps que s'utilitza, tant en la producció industrial de productes de química fina com en processos de bioremediació. Malgrat la seva ubiqüitat, les reaccions d'hidroxilació han estat de les menys enteses entre les reaccions enzimàtiques, ja que la major part dels enzims hidroxilasa formen part de complexos proteics associats a membranes, això en dificulta l'aïllament i, sovint, un cop es té la proteïna aïllada, aquesta és inestable (Holland HL 2000).

Per tal de mostrar la varietat de substrats i de catalitzadors que poden ser usats en els processos d'hidroxilació, en la figura 2 es mostren alguns dels exemples més coneguts d'aquest tipus de biotransformacions:



**Figura 2.- Diversitat d'hidroxilacions enzimàtiques (Holand HL et al, 2000) .**

En la figura 2(a) es mostra la conversió de l'indà (Benzocyclopentane) amb un substituent en posició 2 a un sol diastereòmer d'alcohol benzílic, aquesta reacció és catalitzada per la toluè dioxigenasa present en *Pseudomonas putida* UV4 (Bowers NI 1999). En la figura 2(b) es pot veure la conversió d'àcids grassos de cadena llarga a (R)-2-hidroperoxiacids amb alts nivells d'estereoselectivitat amb un preparat enzimàtic cru de l'alga verda *Ulva pertusa* usant oxigen molecular com a oxidant (Akakabe Y 1999). La figura 2(c) mostra com l'enzim cloroperoxidasa del fong marí *Caldariomyces fumago* usa peròxid d'hidrogen per catalitzar l'oxidació propargílica (referent al grup funcional alquil anomenat propargil i amb l'estructura HC≡C-CH<sub>2</sub>-) estereoselectiva d'acetilens donant (R)-alcohols de moderada a alta puresa enantiomèrica (Hu S. 1999), i en la figura 2(d) s'esquematitza la hidroxilació del C2 de fenols halogenats per *Rhodococcus opacus*, tot i ser inusual en aquest tipus de productes, es pot donar per halogenació oxidativa sobre C2 (Bondar VS 1999).

### 1.2.3. Biotransformació de lípids per microorganismes

Generalment, en les biotransformacions d'interès industrial, els substrats ideals són aquells barats i renovables dels quals se'n puguin obtenir productes

amb un valor afegit. Els factors que condicionen l'èxit de l'aplicació d'una biotransformació a nivell industrial són (Kelly DR 2000):

- Viabilitat econòmica de l'enzim o el microorganisme catalitzador de la biotransformació.
- Viabilitat d'escalat.
- Competitivitat amb els mètodes ja establerts (mètodes químics),
- Temps requerit per al procés.
- Tractament dels residus i disponibilitat del solvent.
- Aprovació legal del procés i del producte.
- Percepció i acceptació del consumidor.

Els olis vegetals en són un clar exemple ja que presenten aquestes característiques i, a més, els productes que s'obtenen de la seva biotransformació, són aplicables a una gran diversitat d'indústries (Kuo T. and Kaneshiro T. 2002). La composició majoritària dels olis vegetals està formada per quatre àcids grassos: àcid palmític (C16:0), àcid oleic (C18:1<sup>Δ9</sup>), àcid linoleic (C18:2<sup>ω6,9</sup>) i àcid linolènic (C18:3<sup>ω3,6,9</sup>), tot i que hi ha més de 200 àcids grassos vegetals descrits (Schultz DJ. and Ohlrogge JB. 2002). La millora en la reactivitat i funcionalitat dels productes de la biotransformació és l'objectiu desitjat. Així doncs es buscarà l'obtenció d'àcids grassos monohidroxilats, dihidroxilats, trihidroxilats, esfingolípid, amides grasses, polièsters, lactones entre d'altres. (Kuo T. and Kaneshiro T. 2002).

Les biotransformacions (oxidacions) que es poden donar sobre els àcids grassos poden ser en diferents posicions de la cadena, terminal, subterminal o central (Callaghan AV, Gieg LM et al. 2006). Les dues primeres estan involucrades en les rutes de biosíntesi i biodegradació dels propis àcids grassos, d'alcans i d'hidrocarburs, com ara en la posició 2, la α-hidroxilació de *Arthrobacter simplex* a l'àcid palmític, generant α-hidroxipalmític (Ikuya Y, Yoshiyaa F et al. 1971), la β-hidroxilació present en els polihidroxialcanoats que sintetitzen una gran varietat de microorganismes (Anderson AJ and Dawes EA 1990), o bé la ω-hidroxilasa de *Pseudomonas oleovorans* que actua sobre els àcids grassos saturats de 8, 10, 12, 14 i 18 àtoms de C (Kuo T. and Kaneshiro T. 2002).

Les reaccions que es donen enmig de la cadena són molt específiques per aquesta zona de la molècula i la disposició d'aquest substrat en el centre actiu de l'enzim que ha de catalitzar la biotransformació, és un pas delicat per a la reacció (Kühn H 2000). Les oxidoreductases catalitzen les que, segurament, són les reaccions més comunes, aquelles on es dona la transferència d'electrons d'una molècula a una altra. Les lipoxigenases i els citocroms P450 en són els enzims més representatius.

Els àcids grassos són força utilitzats com a substrats per a les hidroxilacions per tal d'obtenir derivats hidroxilats que presentin propietats tensioactives, antimicrobianes, o per al seu ús en la producció de lubricants, antibiòtics o fragàncies. S'ha descrit la formació de lactones quirals a partir d'àcid dodecanoic que, mitjançant *Mucor sp.*, és transformat en 11-hidroxi- $\gamma$ -dodecalactona (Meyer J and Ladner W 1989). Els àcids grassos insaturats també poden ser hidroxilats, com és el cas de l'àcid oleic que, usant *Pseudomonas sp.* pot ser transformat en àcid (R,R)-7,10-dihidroxi-8-(E)-octadecenoic (Hou CT and Bagby MO 1990) (Knothe G, Bagby MO et al. 1992). El fong *Gaeumannomyces graminis* pot hidroxilar diversos àcids grassos insaturats en el carboni 8 (Brodowsky ID and Oliw EH 1992). La formació de l'àcid 10-hidroxi-esteàric ha estat descrita a partir de la hidratació de l'àcid oleic en condicions d'anaerobiosi per *Pseudomonas sp.* Les condicions anaeròbiques fan que l'oxigen del grup alcohol derivi de l'aigua en comptes de l'oxigen molecular (Kuo T. and Kaneshiro T. 2002). Han estat descrites altres biotransformacions com la duta a terme per *Bacillus megaterium* mitjançant el citocrom P450, sobre l'àcid mirístic i el palmític en posicions  $\omega$ -1,  $\omega$ -2 i  $\omega$ -3 (Holland HL 2000), que actua de forma similar a l'epoxidació de l'àcid palmitoleic per *Pseudomonas oleovorans*, formant 9,10-epoxipalmitat (Kuo T. and Kaneshiro T. 2002).

En el propi grup de treball trobem un clar exemple de biotransformacions de lípids mitjançant microorganismes. La soca *Pseudomonas aeruginosa* 42A2 excreta al sobrenedant del cultiu l'àcid 10-hidroperòxid-8(E)-octadecenoic i l'àcid 10-hidroxi-8(E)-octadecenoic, compostos derivats de l'àcid oleic. Aquesta mateixa soca està produint l'àcid 7,10-dihidroxi-8(E)-octadecenoic durant la fase logarítmica de creixement i n'atura la producció a l'inici de la fase estacionaria (Guerrero, Casals et al. 1997). La soca *Pseudomonas* 44T1, aïllada

en el mateix grup de treball, produeix, a part de l'àcid dihidroxilat, dos glicolípidis (Mercadé, Robert et al. 1988), mentre que una altra soca, la *Pseudomonas aeruginosa* 47T2, hidroxila l'àcid oleic i l'incorpora, després de petits passos catabòlics, a la ruta de síntesi de ramnolípidis (Haba E, Espuny MJ et al. 2000).

#### **1.2.4. Biotransformacions aplicades a la indústria**

Basant-nos en el mecanisme, la major part dels enzims comercials són hidrolases (incloent proteases, carbohidratases i esterases), mentre que les oxidoreductases en representen una proporció minúscula. Això contrasta amb l'alta incidència d'oxidoreductases a la natura (Burton SG 2003), àmpliament distribuïdes entre microorganismes, plantes i animals. Aquestes catalitzen l'intercanvi d'electrons o equivalents redox entre el donant i el receptor de molècules, en reaccions que impliquen la transferència d'electrons, l'abstracció de protons, l'extracció d'hidrogen, la transferència d'hidrurs, la inserció d'oxigen, o adoptant altres mesures clau (Munro AW., Taylor P. et al. 2000).

Són poques les oxidoreductases presents al mercat. L'aplicació d'aquestes pot dividir-se en els camps tècnic-industrial, de síntesi de productes químics especials, al medi ambient, als aliments i als medicaments (Feng X. 2005). Les oxidoreductases que hi ha s'apliquen majoritàriament a la indústria tèxtil i a l'alimentària.

Pel que fa a les aplicacions tècnico-industrials, un clar exemple són els avantatges que les oxidoreductases han representat en els sistemes de deslignificació enzimàtica de la pasta de paper tradicionalment basada en compostos químics oxidants basats en el clor o l'oxigen que poden causar seriosos problemes a l'hora d'eliminar-ne els subproductes (Feng X. 2005). La derivatització de carbohidrats com per exemple la D-glucosa que es converteix en 2-keto-D-glucosa usant la glucosa 2-oxidasa i després la keto-glucosa es convertida en D-fructosa per hidrogenació química. Un altre exemple el trobem en l'elaboració de formatge on la lactosa és convertida a àcid lactobiónic, un valuós additiu alimentari, acidulant, quelant, coformulant de drogues, i precursor de polímer, per una carbohidrat-oxidasa (Koka R and et al. 2004).



També trobem aplicacions per a la indústria tèxtil (Rodríguez Couto S and Toca-Herrera JL 2006) i en la dels detergents (Galante YM and Formantici C 2003).

Les aplicacions a la indústria alimentària són moltes, ja que molts substrats de les oxidoreductases són hidrats de carboni, àcids grassos, fenols, tiols i proteïnes continguts en els aliments. La modificació d'aquests pot donar lloc a noves funcionalitats, millores de qualitat, o reducció en el cost de producció (Kirk O, Borchert TV et al. 2002). A més, l'oxigen pot ser perjudicial per a la qualitat de l'aliment o per al seu emmagatzematge, degut a les oxidacions no desitjades que poden modificar les característiques organolèptiques del producte. Així doncs, alguns enzims poden ser utilitzats per a immobilitzar l'oxigen per a un millor emmagatzematge i conservació (Andersson M, Andersson T et al. 2002).

Les oxidoreductases tenen molt potencial en aplicacions de protecció de medi ambient, juntament amb les hidrolases, les liases, i les transferases (Gianfreda L, Xu F et al. 1999) (Boyd DR, Sharma ND et al. 2001) (Ahuja SK, Ferreira GM et al. 2004), ja que molts microorganismes poden utilitzar hidrocarburs policíclics aromàtics, compostos clorats, i altres contaminants com a font de carboni, de nitrogen, o d'energia. Les reaccions de degradació catalitzada per aquests enzims inclouen la transferència d'electrons, l'extracció d'hidrogen, i la inserció d'oxigen, que pot induir l'obertura de l'anell, la despolimerització, la mineralització, i altres transformacions. Totes aquestes reacció són de gran interès a l'hora de biodegradar contaminants o en processos de biodetoxicació i biodescontaminació de sòls, aigües i altres ambients (Feng X. 2005).

Altres aplicacions que potser no siguin tant evidents però que no per això són menys importants són les d'usar enzims com a biosensors i/o bioreceptors (Feng X. 2005) o les d'aplicar biocatalitzadors en la síntesi orgànica de productes quirals, de molècules d'aplicació mèdica o en la síntesi de polímers. Això és degut a la gran versatilitat, estereoselectivitat, especificitat i a les condicions poc estrictes que demanen les oxidoreductases. El seu potencial d'aplicació en la síntesi asimètrica és molt gran (Boyd DR, Sharma ND et al. 2001) (Van Beilen JB, Duetz WA et al. 2003) (Schoemaker HE, Mink D et al. 2003).

### 1.3. Gènere *Pseudomonas*

El gènere *Pseudomonas*, proposat l'any 1894 per Migula, pertany a la família de les *Pseudomonadaceae* que està inclosa en les gammaproteobacteries. Actualment conté 185 espècies i 13 subespècies (Euzéby J.P.)

Les *Pseudomonas* són un grup de bacils gramnegatius rectes o lleugerament corbats, aeròbics i no formadors d'espores. Fan 1.5-5 µm de llarg i 0.5-1 µm d'ample. Posseeixen un metabolisme respiratori amb oxigen com a acceptor final d'electrons, tot i que algunes soques poden créixer sota condicions anaeròbies utilitzant nitrat o arginina com a acceptor final d'electrons. Poden presentar un o més flagels polars que atorguen capacitat de moviment al microorganisme. Els microorganismes aïllats de les mostres clíniques són oxidasa positius (majoritàriament), catalasa positius, creixen en agar Mac Conkey i no fermenten la lactosa. Moltes espècies oxiden la glucosa i converteixen el nitrat a nitrit o a nitrogen gas. És un grup divers pel que fa a la morfologia de la colònia i a la pigmentació. Nutricionalment és un grup versàtil amb capacitat d'usar gran varietat de carbohidrats simples o complexos, alcohols i aminoàcids com a font de carboni. Algunes espècies es poden multiplicar a 4 °C però la majoria són mesofíliques, amb temperatures òptimes de creixement d'entre 30 i 37 °C (Kiska D.L. and Gilligan P.H. 2003).

Les bacteries integrants del gènere *Pseudomonas* són ubiqües en la natura. Presenten alta variabilitat d'habilitats metabòliques fet que els permet utilitzar gran diversitat de compostos orgànics i colonitzar gran diversitat d'ambients (Spiers A.J. 2000 ). Són importants com a patògens de plantes i animals. Per tot això, l'ecologia del gènere *Pseudomonas* ha esdevingut una matèria d'interès remarcable (Yamamoto S. 2000).

El criteri classificatori recomanat per a espècies bacterianes és la hibridació DNA-DNA (L. G. WAYNE, D. J. BRENNER et al. 1987), tot i que s'utilitza l'anàlisi de seqüència de l'rRNA 16S com a complement per a l'estimació de distàncies gèniques entre espècies properes (Moore E.R.B. 1996) (Bennasar A. 1998).

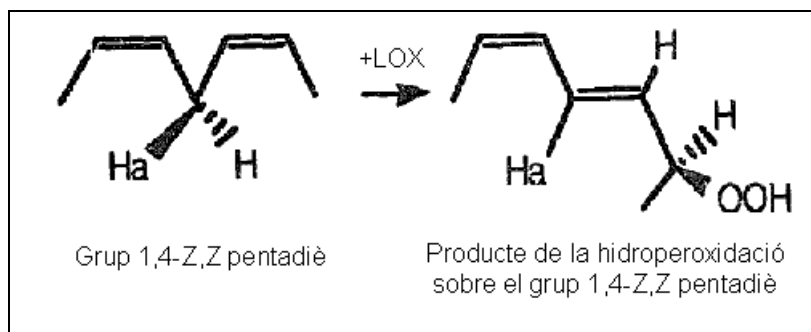
*Pseudomonas aeruginosa* presenta un flagel polar; pot produir pigments fluorescents i piocianina. No presenta carotenoids i pot créixer a 41 °C. És arginina dihidrolasa positiva, oxidasa positiva i denitrificant positiva. És positiva en l'ús de glucosa, 2-ketogluconat, geraniol, L-valina,  $\beta$ -alanina i DL-arginina i és negativa per l'ús de trehalosa i meso-inositol. És productor de pioverdina i piocianina i algunes soques poden produir pigment vermell fosc. La temperatura òptima de creixement és 37° C (Kiska D.L. and Gilligan P.H. 2003).

Es poden observar, principalment, dos tipus de colònies produïdes per aquest microorganisme en medi sòlid comú; una és allargada, suau, amb límits llisos i el centre elevat, i l'altre és petita rugosa i convexa. El material clínic és una bona font per al primer tipus de colònia mentre que el segon tipus sovint és obtingut de fonts ambientals. Un tercer tipus de colònia (mucosa) pot obtenir-se de les vies respiratòries i urinàries (Kiska D.L. and Gilligan P.H. 2003).

Es pot aïllar del sòl, de l'aigua i especialment de cultius enriquits per a bacteris desnitrificadors. És un patogen oportunista tant d'animals com de plantes. El percentatge Guanina-Citosina dels seu DNA és del 67.2% i la soca tipus és la ATCC 10145 (NCBI 8296; NCTC 10332) (Euzéby J.P.).

## 1.4. Lipoxigenases

Les lipoxigenases són una família d'enzims amb activitat dioxigenasa. Són metal·loproteïnes amb ferro, generalment, que no tenen un grup hemo i que oxigenen àcids grassos poliinsaturats amb una o vàries estructures (1Z,4Z)-pentadiè a àcids grassos hidroperoxidats amb grups diè conjugats en conformació *cis-trans* (Figura 3) com a productes principals (Oliw EH 2002).



**Figura 3.- Grup 1,4-Z,Z pentadiè sobre el qual reacciona la lipoxigenasa donant com a producte una hidroperoxidació.**

Són quatre les característiques d'aquests enzims que permeten parlar d'ells com a una família d'enzims:

- L'extracció anterofacial de l'hidrogen i l'addició de l'oxigen mostrada en la conversió dels dobles enllaços 1(Z), 4(Z) dels àcids grassos poliinsaturats a 1, 3 (E,Z) - dienil - 5 - hidroperòxid (Kühn H 1986).

- La identitat dels alineaments de seqüències per parelles és de 21 - 27% entre lipoxigenases de plantes i animals, de 43 - 86% entre lipoxigenases de plantes i del 39 - 93% entre lipoxigenases d'animals (Prigge ST 1996).

- Els residus que proveeixen els lligands del ferro catalític ( $Fe^{2+}$  -  $Fe^{3+}$ ) estan altament conservats (Vidal-Mas J 2005).

- Diverses lipoxigenases, tant animals com vegetals, presenten similituds importants en l'estructura genòmica (Chen X.S 1994).

Tot i que l'estudi de les lipoxigenases es va iniciar a la dècada dels seixanta, no va ser fins l'any 1993 que es va publicar la primera estructura per difracció de raig X d'una lipoxigenasa (Boyington JC., Gaffney BJ. et al. 1993) i el mateix any se'n publicava l'estructura del seu centre catalític (Minor W 1993). Actualment es poden trobar altres estructures de lipoxigenasa tant de

l'enzim natiu com de mutacions puntuals d'aquest mateix, com és el cas de la lipoxigenasa de reticulòcit de conill (Choi J. 2008) o la més recent, la lipoxigenasa del corall *Plexaura homomolla* (Oldham M.L. 2005).

Tot i que la bibliografia sobre els diferents rols biològics de les lipoxigenases és abundant (aspecte desenvolupat en apartats posteriors), aquestes funcions estan poc definides. Hi ha documentació relacionada amb l'oxidació, epoxidació, dessulfuració, sulfoxidació, i desalquilació de xenobiòtics per lipoxigenases, però encara són necessaris molts estudis per entendre plenament l'espectre de reaccions catalitzades per les diferents lipoxigenases i les implicacions biològiques de les mateixes (Kulkarni AP 2001).

#### **1.4.1. Classificació i nomenclatura**

El Comitè de Nomenclatura de la Unió Internacional de Bioquímica i Biologia Molecular va establir com a base per a la classificació de les lipoxigenases la seva especificitat posicional respecte a l'oxigenació de l'àcid araquidònic. Amb aquesta classificació es diferencien quatre famílies: 5-LOX, 8-LOX, 12-LOX i 15-LOX (Gaffney BJ 1996) (Brash RA 1999).

Aquest sistema però, presenta algunes deficiències que originen controvèrsia en la comunitat científica a mida que es van trobant i descrivint noves lipoxigenases. L'especificitat de posició no és una característica absoluta per a l'enzim ja que paràmetres com l'estructura del substrat, la interacció entre aminoàcids i substrat en el centre actiu, les condicions de reacció o bé les característiques fisicoquímiques del substrat poden afectar a la posició del grup hidroperòxid format. Per altra banda, les subfamílies que es creen a partir d'aquesta classificació ja són prou diverses i cal subclassificar-les per tal d'evitar confusions. Una de les característiques que es pot utilitzar per a classificar les subfamílies és la seva enantioselectivitat. Depenent de la posició relativa que ocupen l'hidrogen que s'elimina i l'oxigen que s'addiciona respecte al pla del doble enllaç entre carbonis, les lipoxigenases es poden subclassificar com a R o S (Kühn H 2000).

En el regne animal, l'àcid gras polinsaturat amb més importància fisiològica és l'àcid araquidònic (C20:4 insaturacions), però en plantes són l'àcid

linoleic i l'àcid linolenic els àcids grassos polinsaturats més comuns (18 carbonis amb 2 i 3 insaturacions respectivament). Per aquest motiu, la classificació de les lipoxigenases vegetals es basa en l'especificitat posicional respecte l'àcid linoleic, que és oxigenat en el carboni 9 (9-LOX), o bé en el carboni 13 (13-LOX) (Gaffney BJ 1996) (Brash RA 1999). Per altra banda, existeix una classificació específica per a les lipoxigenases vegetals basada en la similitud de seqüència i la presència de pèptids senyals en l'extrem N-terminal. En base a això, s'estableixen dos grups de lipoxigenases, les LOX tipus-1, que no tenen pèptid senyal i presenten elevada similitud de seqüència entre elles (més del 75%), i les LOX tipus-2, amb pèptid senyal a l'extrem N-terminal que els permet travessar la membrana dels cloroplasts, i una baixa similitud de seqüència entre elles (aproximadament d'un 35%) (Feussner I and Wasternack C 2002).

#### **1.4.2. Funció biològica**

Tot i què aquest aspecte de les lipoxigenases encara és objecte de discussió, s'han descrit diverses funcions biològiques per aquesta família d'enzims en funció de l'especificitat, la localització o l'organisme que la contingui.

##### **I.- Formació de mediadors biològics o de senyals moleculars.**

Generalment es caracteritza per la síntesi d'un hidroperòxid específic a partir d'un àcid gras lliure. El producte de la lipoxigenassa pot actuar tant com a intermediari o com a producte final d'una via metabòlica.

Alguns exemples on actua com a intermediari en una via metabòlica són: en plantes, la biosíntesi de l'àcid jasmònic o d'aldehids per a la senyalització (Grechkin A 1998) (Turner J.G. 2002), i en animals en la síntesi de leucotriens o lipoxines (Serhan CN 1997). En humans, l'activació de la 5-lipoxigenasa dels leucòcits produeix leucotriens i lípids conjugats de pèptids i dihidroxieicosanoids responsables dels processos de inflamació i broncoconstricció. Els medicaments actuals per a l'asma inclouen els inhibidors de la 5-lipoxigenasa i els antagonistes dels receptors de leucotriens (Drazen JM 1999). La síntesi d'aquests productes és la funció més ben establerta per a les lipoxigenases (Brash RA 1999).

Un exemple on els productes de la lipoxigenasa actuen com a producte final és la síntesi de 12-HETE (àcid hidroxieicosatetraènic) per part de la 12S-lipoxigenasa de plaqueta humana. Són moltes les activitats biològiques com a molècules de senyalització discreta que s'atribueixen a HETEs i a HEPTEs (àcid hidroperoxieicosatetraènic). El producte final pot provocar accions ràpides i potents o bé funcionar com a senyalitzador d'accions lentes.

Alguns exemples d'accions ràpides i potents que es donen als receptors o canals de les superfícies cel·lulars són els següents: El 12-HETE i els seus derivats intervenen en la modulació de la neurotransmissió (Piomelli D 1987 ). S'han descrit potents efectes del 12S-HETE en l'adhesió cel·lular, activitat vinculada a la metàstasi del carcinoma de pròstata (Tang DG 1994). També s'ha descrit la influència sobre els fluxos dels ions de calci a través de membrana (Dho S. 1990). Per altra banda, si bé la 12-lipoxigenasa de les plaquetes pot estar produint productes durant hores, les cicloxigenases d'aquestes mateixes cèl·lules generen ràfegues curtes de productes i després s'inactiven. Així doncs, els 12-HETE poden modular processos a llarg termini com efectes sobre la diferenciació cel·lular o la supervivència (Tang D.G. 1996) en lloc de respostes ràpides, com l'agregació plaquetària (Sekhar Rao K.C. and Krishnakantha T.P. 2002).

En el cas de les lipoxigenases amb localització nuclear, diversos autors suggereixen que tant la proteïna com el producte de transformació d'aquesta, juguen un paper important en la regulació de l'expressió gènica (Radmark O. 2002) (Brash RA 1999).

## **II.- Modificació d'estructures de membrana (reaccions de peroxidació).**

Normalment aquesta funció s'associa amb el metabolisme de substrats esterificats i sovint produeix una barreja de productes hidroperoxidats.

La peroxidació dels lípids de membrana catalitzada per les lipoxigenases indueix canvis estructurals. L'objectiu és induir canvis físics en la cèl·lula o canviar la composició de peròxids de la mateixa. L'estructura d'aquest hidroperòxid no és tan important com els seus efectes, provocant pertorbació en l'estructura de la membrana i provocant oxigenacions secundàries. La

hipòtesi de que una lipoxigenasa podria peroxidar lípids de la membrana i tenir un paper important en la maduració de glòbuls vermells induint una sèrie de canvis estructurals programats en la cèl·lula, fou desenvolupada sobre la 15-lipoxigenasa dels reticulòcits de mamífers (Schewe T. 1986) (Rapoport SM 1986 ). Podem trobar, en la bibliografia, conceptes similars per a lipoxigenases de plantes intervenint en processos de senescència (Hung K.T. 1997 ).

Per tal de determinar la funció de les lipoxigenases s'han realitzat mutants negatius pel gen de la lipoxigenasa en ratolins (Funk C.D. 1996) i en plantes (Narvel J.M. 1998), però els canvis observats són subtils i no s'observen problemes evidents. Per evidenciar aquests canvis cal treballar sota condicions d'estrès fisiològic o patològic (Brash RA 1999).

Paral·lelament a les funcions descrites anteriorment, hi ha una qüestió que no és gens clara. La mescla de productes originats per les lipoxigenases són fruit d'una catàlisi imperfecta, o bé es busca promoure l'alliberament lliure de radicals lliures intermediaris? Les 15-lipoxigenasa de reticulòcit catalitzen la peroxidació lipídica, aquest tipus d'activitat de les lipoxigenases dura un o dos minuts i després s'inactiva l'enzim. Per contra, les lipoxigenases que catalitzen la formació neta d'un sol producte poden funcionar amb una taxa lineal durant una hora o més (Brash RA 1999).

Una altre de les funcions descrites en plantes és la de la mobilització de lípids per al metabolisme. L'oxigenació d'àcids grassos insaturats esterificats en triglicèrids per part de les lipoxigenases, està implicat en el procés de germinació de plantes oleaginoses (Feussner I. 2001). Tot i que no s'ha trobat una funció equivalent en animals, el cas de les plantes podria servir com a model per tal d'explicar l'alt contingut de lipoxigenases en alguns ovòcits amb futures implicacions en el desenvolupament dels mateixos (Coffa G. 2000).

### **III.- Biotransformació d'endobiòtics i xenobiòtics.**

La majoria de les reaccions metabòliques disminueixen a mesura que augmenta la toxicitat de productes a transformar. Les biotransformacions representen un element clau a l'hora d'entendre l'eficàcia farmacològica dels medicaments i/o la toxicitat de pesticides, de productes químics industrials o ambientals i de substàncies tòxiques d'origen natural. Tot i que estan descrits



els rols desenvolupats pel citocrom P450 de mitocondris i la prostaglandina sintasa en l'oxigenació d'endobiòtics i xenobiòtics, durant els últims anys s'han establert les lipoxigenases com un altre dels principals enzims responsables de l'oxidació de xenobiòtics (Kulkarni AP 2001).

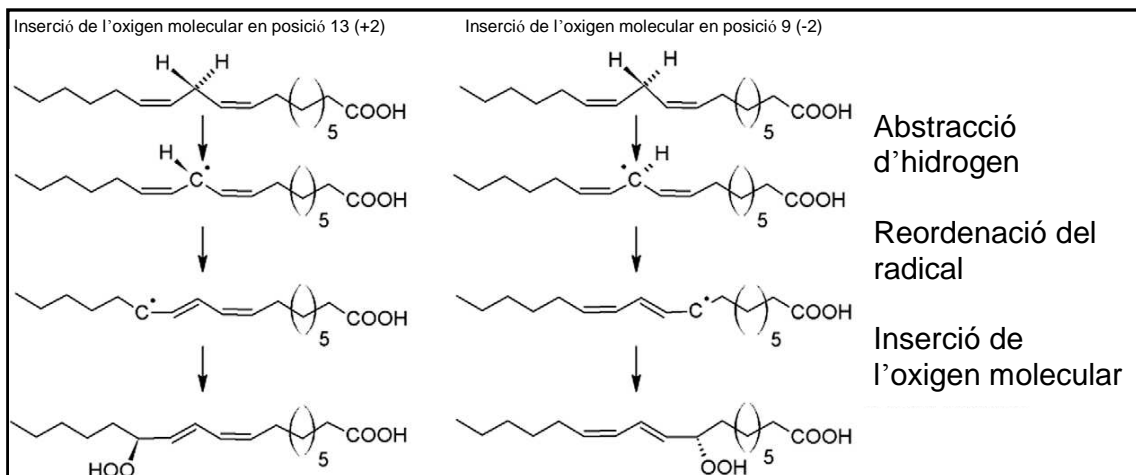
S'han descrit quatre mecanismes per a l'oxidació de xenobiòtics mediada per lipoxigenases: la reacció dependent d'hidroperòxid (Hover C.G. 2000), la reacció dependent de radicals peroxils (Naidu A.K. 1991), la reacció dependent de transferència d'electrons (Hu J. 2000) i la reacció d'oxidació directa (Novak M.J. 1999).

Malgrat què per a organismes procariotes no s'han descrit clarament les funcions biològiques de les lipoxigenases, alguns autors suggereixen que, en el cas de les lipoxigenases de microorganismes patògens, aquest enzim modula la defensa de l'hoste i la inflamació a través de l'alteració dels mediadors químics locals en animals (Vance R.E 2004) o, en el cas de les plantes, induir una resposta primerenca a la infecció d'un organisme patogen (Oliw EH 2002). D'altra banda, i coneixent les propietats tensioactives dels productes de la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa*, es podria pensar en una funció d'augmentar la biodisponibilitat de compostos lipòfils per al seu ús com a font de carboni i d'energia per part del microorganisme (Guerrero, Casals et al. 1997).

### **1.4.3. Mecanisme d'acció**

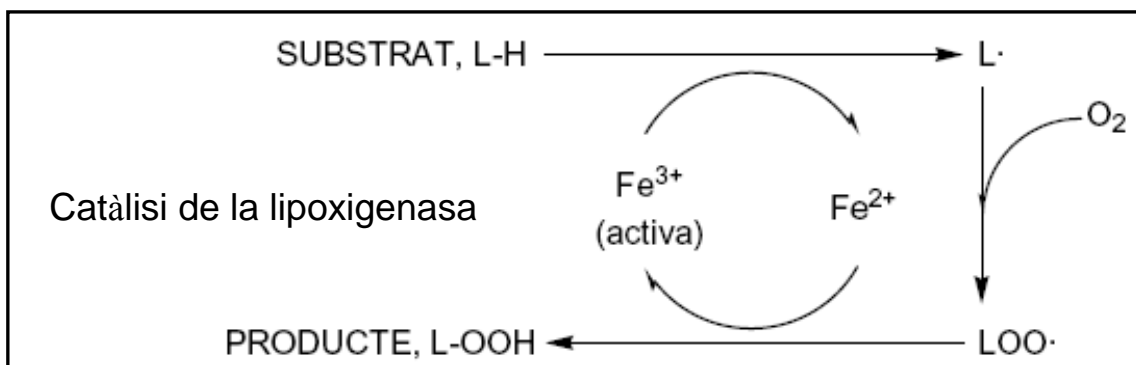
El mecanisme d'acció molecular de les lipoxigenases en basa en tres passos consecutius representats en la figura 4.

El primer pas consisteix en l'extracció estereoselectiva d'un hidrogen del grup 1,4-cis,cis-pentadiè per a formar un radical pentadienil. El segon pas és aquell on es produeix una redistribució dels electrons en una posició +2 (en direcció al metil-terminal), o bé -2 (en direcció al carboxil terminal) acompanyada de conjugació del grup diè en cis-trans. El tercer i últim pas és el de la inserció de l'oxigen molecular de forma estereoespecífica (S- o R-) i la conseqüent reducció del radical hidroperòxid (Prigge S., J. Boyington et al. 1997).



**Figura 4.- Mecanisme de la reacció i regio-especificitat de la lipoxigenasa. Adaptació de Andreou (Andreou A. and Feussner I. 2009).**

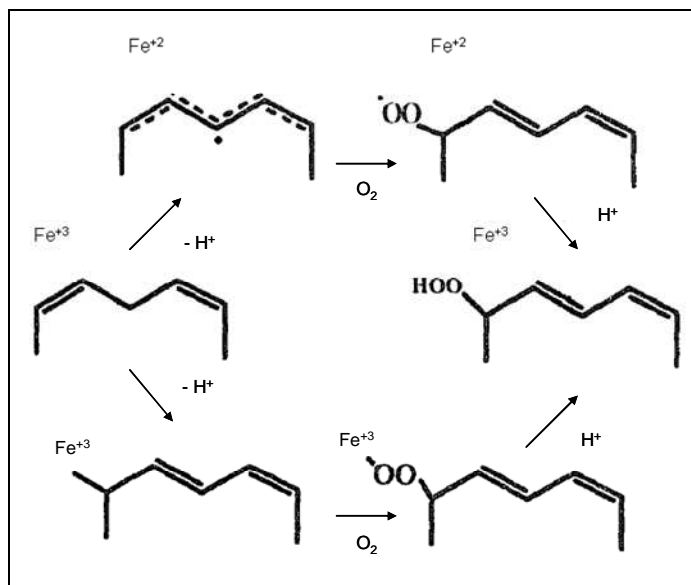
Durant la catàlisi hi ha una activació del substrat mitjançant una pèrdua d'un protó i una inserció de la molècula d'oxigen. Aquest procés d'oxidoreducció s'ajuda de l'ió de  $\text{Fe}^{3+}$  activat coordinat en l'enzim per a abstroure l'àtom d'hidrogen que passa a  $\text{Fe}^{2+}$  (inactiu). La inserció de l'oxigen fa que es formi un radical C-OO-, que serà el compost que regenerarà el  $\text{Fe}^{2+}$  el qual tornarà a passar a la forma de  $\text{Fe}^{3+}$ , la forma activa. Aquest mecanisme d'auto regeneració de la forma activa de l'àtom de Ferro de la lipoxigenasa es mostra en la figura 5.



**Figura 5.- Catàlisi de la lipoxigenasa. Adaptació de Brash (Brash RA 1999).**

S'han proposat dos mecanismes generals d'interacció del ferro amb el substrat (Prigge S., J. Boyington et al. 1997) (Figura 6). Tots dos mecanismes s'inicien amb la forma activa de la lipoxigenasa,  $\text{Fe}^{3+}$ . L'activació es dona per oxidació del  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  per producte, generant un radical lliure d'una molècula del producte (Corey EJ. and Nagata R. 1987).

En el mecanisme que es mostra en la figura 6 (via superior), el  $\text{Fe}^{3+}$  oxida el grup 1,4-pentadiè per formar un radical pentadienil. La reacció amb l'oxigen molecular produeix un radical peroxil que reoxida el  $\text{Fe}^{2+}$  i forma el producte hidroperoxidat. En el segon mecanisme (figura 6, via inferior) el  $\text{Fe}^{3+}$  ajuda a la desprotonació del diè fent un enllaç directe amb el carbanions resultant. La reacció continua amb la inserció de dioxigen a l'enllaç Fe-C seguida per la ruptura de l'enllaç Fe-O. Aquest mecanisme és interessant ja que permet explicar d'una manera natural la regioespecificitat i la estereoespecificitat de l'enzim. En ambdós casos, els dos mecanismes són similars. L'abstracció de l'hidrogen es produeix per la transferència de protons a un grup de base no mostrat en la figura 6, gràcies a la proximitat del  $\text{Fe}^{3+}$ , ja sigui mitjançant la formació d'un enllaç sigma ferro-carboni o a través de la transferència d'un electró al ferro (resultant en un radical lliure intermediari).



**Figura 6.- Esquema dels dos mecanismes d'interacció Ferro-Substrat proposats per Pridge i Nagata .**

#### **1.4.4. Mètodes d'estudi: EPR i Difracció de raig X**

##### **1.4.4.1. EPR (Ressonància Paramagnètica Electrònica)**

A partir de l'anàlisi dels diferents tipus d'espectres d'absorció molecular, podem obtenir coneixament de les estructures moleculars.

La tècnica anomenada Ressonància Paramagnètica Electrònica (EPR), sovint anomenada ressonància d'espín d'electrons (ESR), és una branca de l'espectroscòpia. Les transicions d'EPR sorgeixen de la interacció de la radiació electromagnètica amb els moments magnètics d'espín dels electrons no aparellats. Quan un camp magnètic extern s'aplica a una mostra, els nivells d'energia degenerada dels espins es separen. La ressonància paramagnètica electrònica serveix per a l'estudi de les transicions entre aquests estats energètics. Els espectres s'obtenen mesurant l'atenuació de la radiació electromagnètica en passar a través de la mostra i ser absorbida per aquesta.

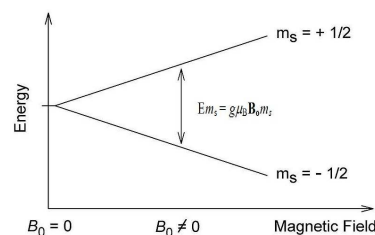
Un experiment d'EPR es porta a terme mitjançant l'aplicació d'un camp magnètic extern ( $B_0$ ) variable i la radiació electromagnètica ( $h\nu$ ) amb una freqüència fixa en el rang de les microones (GHz), que és responsable de les transicions d'un estat de l'electró a un altre. Aquesta energia és absorbida per la mostra (que conté electrons no aparellats) quan el camp magnètic separa els nivells d'energia amb una quantitat d'energia apropiada.

La banda obtinguda en un espectre representa la transició entre els nivells d'energia de l'espècie absorbent de la mostra. El camp magnètic de cada banda està relacionat amb la separació d'energia entre els dos nivells. És possible calcular un diagrama de nivells d'energia per a l'espectre i predir la intensitat de varies transicions en el rang de freqüència i camp magnètic de l'experiment.

### La teoria bàsica d'aquest fenomen s'explica a continuació:

Un sol electró té dos estats d'espín amb números quàntics  $m_s \pm 1/2$ . Les energies d'aquests estats d'espín en un camp magnètic estan donades per l'equació 1. L'energia d'aquesta transició donada per l'equació 1 és l'energia de Zeeman.

$$E_{m_s} = g\mu_B B_0 m_s \quad (\text{Eq. 1})$$



Aquí,  $\mathbf{B}_o$ , és la intensitat del camp magnètic extern, amb la unitat del sistema internacional tesla (T) o gauss (1 G = 0,0001 T),  $m_s$  és una projecció de l'espín en el camp ( $m_s = \pm 1 / 2$  per un electró lliure) i  $\mu_B$  és el magnetó de Bohr ( $\mu_B = |eh / 4\pi m_e| = 9.2740 \times 10^{-24}$  J/T, on  $e$  i  $m_e$  són la càrrega de l'electró i la massa, respectivament, i  $h$ , la constant de Planck). El paràmetre  $g$ , la relació entre  $\mathbf{B}_o$  i  $E_{m_s}$ , que per electrons lliures ( $g_e$ ) té el valor de 2,0023193. Quan hi ha altres interaccions dels electrons, el  $g$ -valor efectiu ( $g_{\text{eff}}$ ) serà diferent.

$$g_{\text{eff}} = (0.07144775 \times \text{freqüència (MHz)}) / \text{Camp magnètic (mT)}$$

Per a la majoria dels radicals orgànics i ions radicals, els valors de  $g_{\text{eff}}$  són propers a 2, però per als metalls de transició el càlcul d'aquest valor és més complicat ja que depenen dels camps elèctrics circumdants dels lligands.

Si la mostra d'interès conté més d'un electró desacoblat, cal considerar la interacció d'aquests electrons. Aquesta interacció es reflecteix en la incorporació d'un segon factor ( $\mathbf{S} \cdot \mathbf{E} \cdot \mathbf{S}$ ) a la fórmula descrita anteriorment per a l'espín hamiltonià de la següent manera:

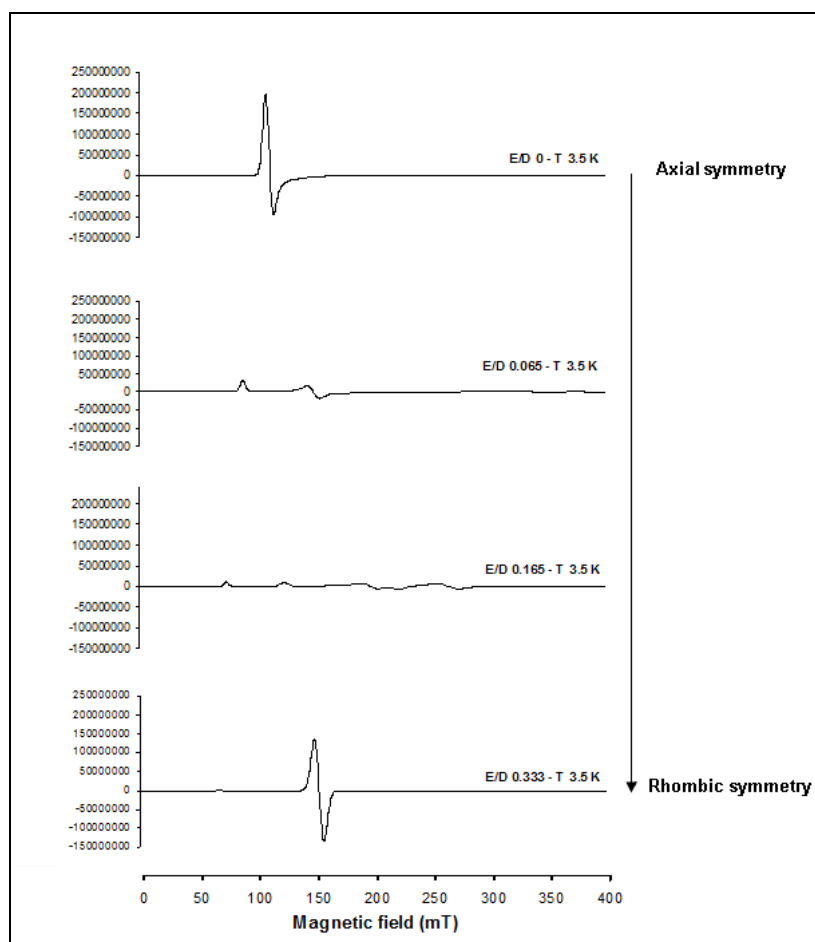
$$H_s = \beta \mathbf{B} \cdot \mathbf{g} \cdot \mathbf{S} + \mathbf{S} \cdot \mathbf{D} \cdot \mathbf{S} \quad (\text{Eq. 2})$$

El  $\text{Fe}^{3+}$  d'alt spín té la configuració de  $3d^5$  amb  $S = 5/2$ . L'equació 2 descriu aquest espín hamiltonià de primer ordre.

Pel que fa l'estudi del ferro de la lipoxigenasa i les histidines que actúen com a lligands, és important emfatitzar dos aspectes que afecten a aquesta equació.

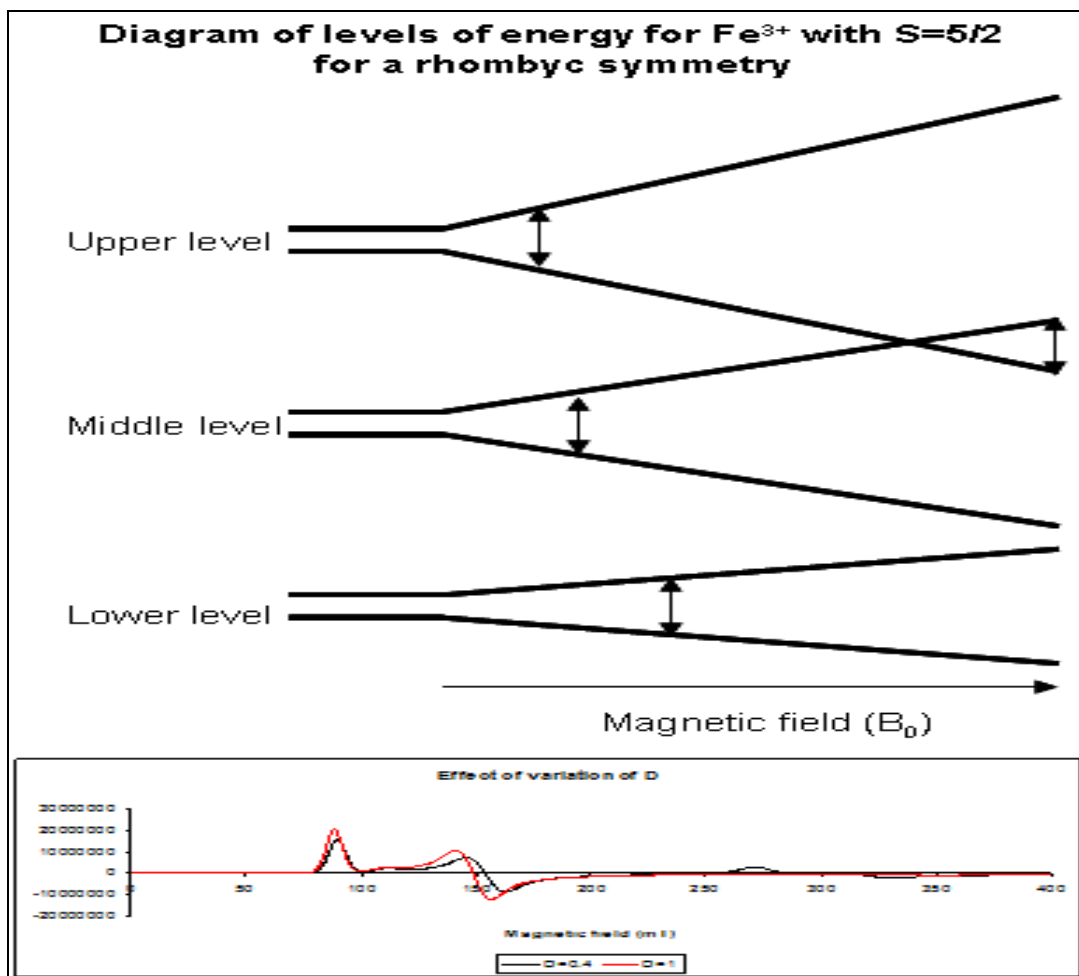
La primera és que el paràmetre  $D$  dóna informació sobre com de covalents són les interaccions entre el  $\text{Fe}^{3+}$  i els lligands. En altres paraules, aquest paràmetre mostra com n'és d'important la influència d'aquests lligands sobre els electrons del ferro. El paràmetre  $D$  i la relació  $E / D$ , defineix l'energia i la simetria del compost. La variació en aquesta relació canvia les energies i les probabilitats de cada transició i la forma dels espectres (Figura 7).

A la figura 7 es pot observar l'efecte de la relació E / D en la forma dels espectres. El rang de camp magnètic que es mostra és normal per a la majoria d'espectròmetres d'EPR que operen a  $9 \pm 0,4$  GHz.



**Figura 7.- Espectres obtinguts per simulació amb el programa XSophe, comercialitzat per Bruker i desenvolupat per GR Hanson i companys de treball, per Fe<sup>3+</sup> per S = 5/2 a 3,5 K i en diferents E/D.**

L'orientació de la molècula en l'espai es descriu per tres eixos, x, y i z. Una mostra congelada té totes les direccions possibles de x, y i z i els espectres que s'obtenen amb EPR són la suma dels espectres de totes les orientacions moleculars. Per a E/D igual a zero, podem observar un pic predominant ja que sota aquesta condició l'espín de l'electró està dominat per l'eix z, i els eixos x i y són iguals. Això s'anomena simetria axial a diferència de la simetria ròmbica (quan tots els eixos són diferents). Quan y i x no són iguals, es pot observar un pic per a cada eix i, com que el valor d'E/D augmenta, els pics es troben més separats. El valor màxim d'E/D és 1/3, i el pic que és dominant correspon a les transicions d'energia de nivell mitjà i totes les direccions molecular (eixos z, x, y) absorbeixen a la mateixa freqüència.

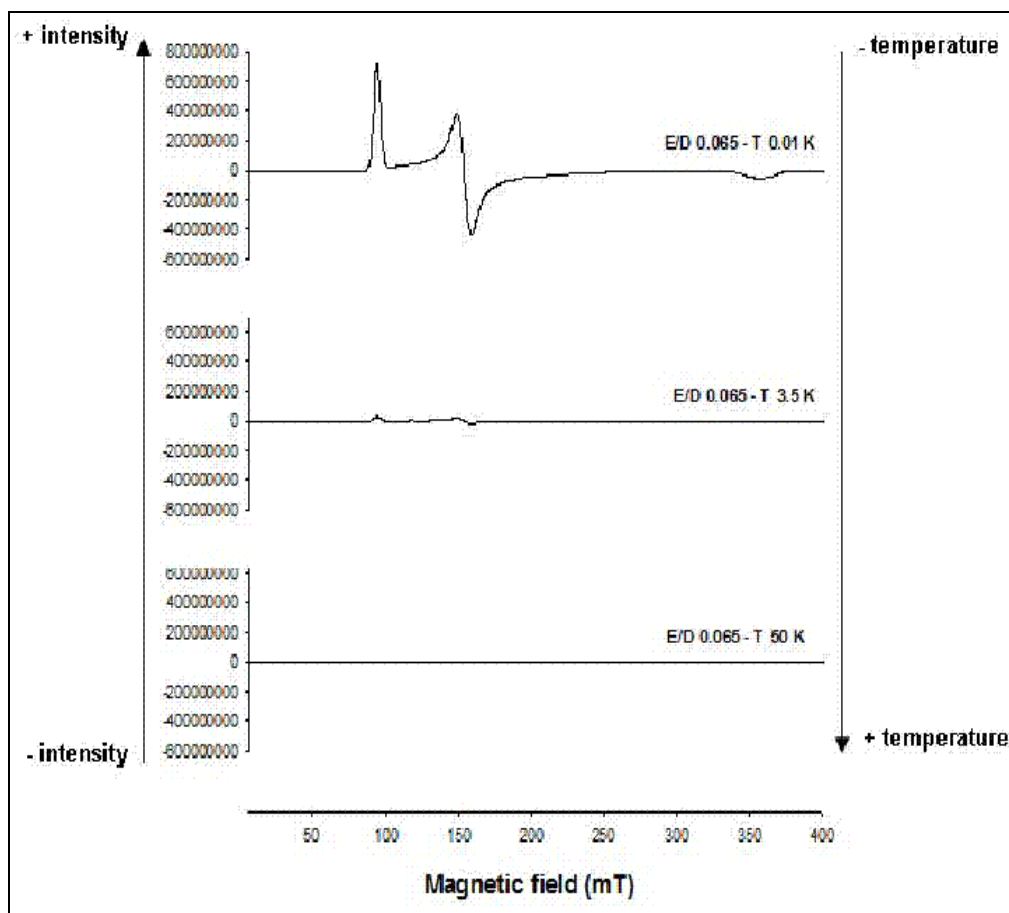


**Figure 8.- Diagrama de nivells d'energia per al Fe<sup>3+</sup> S=5/2 I espectre amb variacions del valor de D.**

Com que paràmetre D és una empremta única per a cada molècula, és interessant veure com afecta aquesta variació a l'espectre. Com es pot observar en l'espectre de la figura 8, la reducció del valor de D resulta en una major separació dels pics corresponents als eixos y i x i un canvi en la posició cap als camps magnètics més alts. Finalment, apareixen nous pics corresponents a transicions secundàries. Això és degut a que a valors de D menors, la separació dels estats dins de cada nivell d'energia es redueix i, per una mateixa freqüència, la transició tindrà lloc en un camp magnètic superior. Com es pot veure en l'esquema de la figura 8, la fletxa que representa la transició a una freqüència específica és sempre igual, però el camp magnètic en què s'observa la transició canvia.

Com que els experiments d'EPR en ions metàl·lics necessiten temperatures baixes, és interessant veure com afecta aquest paràmetre en l'espectre. La temperatura és inversament proporcional a la intensitat del senyal: a temperatures més baixes, la intensitat és més alta (Figura 9).

Com es pot veure a la figura 9, la intensitat del senyal (fletxes) disminueix a mesura que augmenta la temperatura.

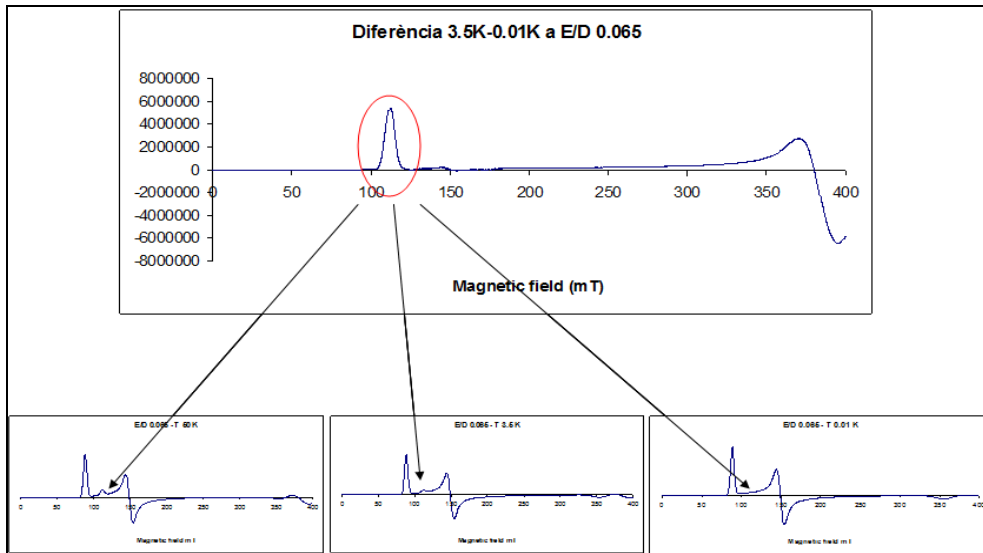


**Figure 9.- Espectre obtingut per simulació amb el programa XSophe, comercialitzat per Bruker i desenvolupat per GR Hanson i companys de treball, per  $\text{Fe}^{3+}$  amb  $S = 5/2$  i  $E/D 0.065$  a diferents temperatures.**

Això és interessant perquè a temperatures més altes és possible observar transicions d'ambdós nivells d'energia, mitjà i baix. En el cas de  $\text{Fe}^{3+}$  presents a la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa* a 3,5 K, s'observa un pic a 114 mT de camp magnètic corresponent a la transició del nivell mitjà de l'energia. Les transicions en els nivells més baixos cobreixen un ampli rang començant amb un màxim de 91 mT. Les diferències de les senyals obtingudes a 3,5 K i 0,01 K ressalten clarament el pic corresponent a la transició mitjana,



com es pot veure a la figura 10, ja que a temperatures baixes, els nivells d'energia mitjana es despoblen.



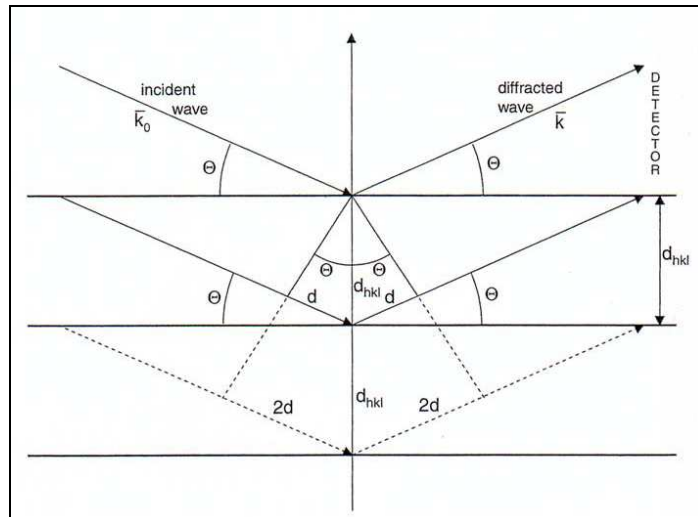
**Figure 10.- Substracció del senyal obtingut a 0.01 K al senyal obtingut a 3.5 K per a remarcar la presència de les transicions a nivells d'energia intermitjos.**

#### 1.4.4.2. Difracció de raig X

L'any 1912, Von Laue, Friedrich i Knipping, descobreixen la difracció de raigs X dels cristalls demostrant la naturalesa ondulatoria d'aquests raigs. W. L. Bragg va ser el primer en utilitzar aquesta tècnica per resoldre la primera estructura cristal·lina. Bragg va demostrar amb els seus estudis, que la distribució angular de la radiació dispersada es podia entendre considerant que els raigs difractats es comportaven com si fossin reflectits per plans, passant per punts de la xarxa cristal·lina (Figura 11). L'angle d'incidència de la radiació és igual a l'angle de reflexió d'on es deriva la llei de Bragg:

$$n \lambda = 2 d_{hkl} \sin \theta_{hkl}$$

on  $n$  = ordre de difracció,  $\lambda$  = longitud d'ona de la radiació incident,  $d_{hkl}$  = espaiat entre plans de difracció i  $\theta_{hkl}$  = angle d'incidència de la radiació.



**Figure 11.- Llei de Bragg. Difracció d'una família de plans amb índex de Miller hkl i espai inerplanar  $d_{hkl}$ .  $k_0$  és la direcció de l'ona incident i  $k$  és la direcció difractada (Mc Pherson A. 2003).**

Per tal d'obtenir i estudiar detalladament l'estructura d'una proteïna és necessari utilitzar una radiació de longitud d'ona comparable o més petita que les dimensions dels àtoms. Aquesta radiació són els raigs X, d'una longitud d'ona entre 0.1 i 100 Å, que poden ser difractats pels electrons. Quan els raigs X xoquen amb un àtom, el camp elèctric de la radiació posa els electrons de l'àtom en oscil·lació amb el seu nucli. Aquesta oscil·lació té la mateixa freqüència que la radiació incident i, quan aquesta és dispersada pels electrons, hi ha un desfasament de 180° a la radiació. Aquest desfasament és el mateix per a tots els àtoms del cristall.

Així doncs quan es fa incidir una radiació monocromàtica de raigs X sobre un cristall únic, la difracció observada serà només a uns angles d'incidència concrets. La xarxa on s'obtenen les reflexions s'anomena reticle recíproc. Cada punt del reticle recíproc o intensitat de difracció ve d'un pla de difracció específic amb uns únics índexs de Miller (hkl). Per entendre millor la relació entre la llei de Bragg i el cristall físic, Ewald, l'any 1921, va desenvolupar la construcció coneguda com l'esfera d'Ewald que permet saber quines reflexions de Bragg s'observaran coneixent l'orientació del cristall respecte el raig incident. Si durant aquesta rotació un punt del reticle recíproc toca la circumferència de l'esfera d'Ewald, es satisfà la llei de Bragg. Les ones de la radiació interfereixen de manera constructiva quan la llei de Bragg es compleix, detectant així una intensitat de radiació. Les diferents intensitats de les reflexions s'expliquen amb l'estructura atòmica de la proteïna. El patró de

difracció és la transformada de Fourier del cristall, expressió matemàtica que relaciona les ones difractades amb la distribució dels àtoms en el cristall.

Tot cristall presenta un ordre en les tres dimensions que el defineixen. Aquest ordre està definit per la simetria que conforma el cristall que es forma a partir d'una unitat asimètrica (conjunt d'àtoms de la molècula a estudiar a partir dels quals es pot construir tot el cristall aplicant les operacions de simetria) que, aplicant-hi una simetria donada pel grup espacial, conforma la cel·la unitat, el paral·lelepípede més petit que defineix els paràmetres de la cel·la:  $a$ ,  $b$  i  $c$  (eixos) i  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  (angles). Els espaiats entre les reflexions, el patró de difracció, indiquen el tipus de cel·la que es té i les dimensions d'aquesta. Per tant, la distribució de les reflexions i les seves intensitats donen tota la informació que es necessita del cristall.

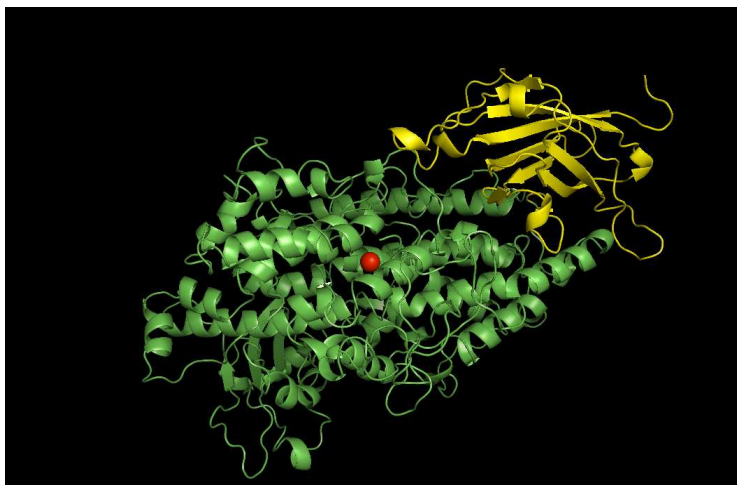
#### **1.4.5. Estructura**

Tot i que fa més de 60 anys que s'estan estudiant les lipoxigenases, no va ser fins l'any 1993 que es va cristal·litzar i difractar la primera lipoxigenasa (Boyington J.C., Gaffney B.J. et al. 1993), la "arachidonic acid 15-lipoxygenase" de soja. Posteriorment, a l'any 1996, es va refinar l'estructura fins a 1.4 Å (Minor W. 1996). Més recentment s'han anat cristal·litzant altres lipoxigenases de soja, com la 3-lipoxigenasa, i diversos complexos. L'any 1997 es publica l'estructura cristal·lina de la primera lipoxigenasa animal, la de reticulòcit de conill, que és una 15-lipoxigenasa (Gillmor S.A., Villasenor A. et al. 1997). L'última lipoxigenasa cristal·litzada és la del corall *Plexaura homomolla* l'any 2005 (Oldham M.L. 2005).

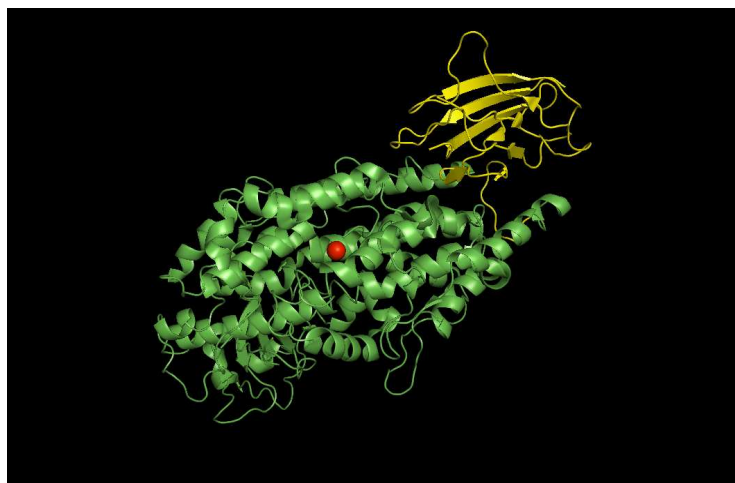
Les lipoxigenases presenten una sola cadena polipeptídica (són monomèriques) amb una massa molecular d'aproximadament 75-80 kDa per a les animals, entre 660 i 680 aminoàcids (Funk C.D. 1996), i de 94-104 kDa per a les vegetals (Brash R.A. 1999), entre 839 i 923 aminoàcids (Shibata D. and Axelrod B. 1995).

Les lipoxigenases tant d'origen animal com vegetal descrites fins avui, presenten dos dominis. El domini N-terminal és el més petit i consta de 8 fulles  $\beta$  disposades de forma antiparal·lela. Aquest domini es coneix com a domini

PLAT (polycystin-1, lipoxygenase i alpha-toxin) o LH2 (Lipoxygenase homology). En les lipoxigenases d'origen vegetal, aquest domini està format per, aproximadament, els primers 150 residus de la banda aminoterminal de la cadena polipeptídica (Boyington JC 1993) (Figura 12). En el cas de les lipoxigenases d'origen animal, aquest domini està format per uns 115 residus (Oldham M.L. 2005) (Figura 13). La funció d'aquest domini és desconeguda, però alguns autors han proposat funcions relacionades amb la membrana o amb l'adquisició del substrat (May C. 2000) (Tatulian S.A. 1998).



**Figura 12.- Estructura de la lipoxigenasa L-1 de soja (*Glycine max*) obtinguda a 1.4 Å de resolució (codi PDB 1YGE). De color groc el domini N-terminal i en verd el domini catalític carboxi terminal. L'esfera vermella representa l'àtom de ferro coordinat en el centre actiu de la proteïna.**

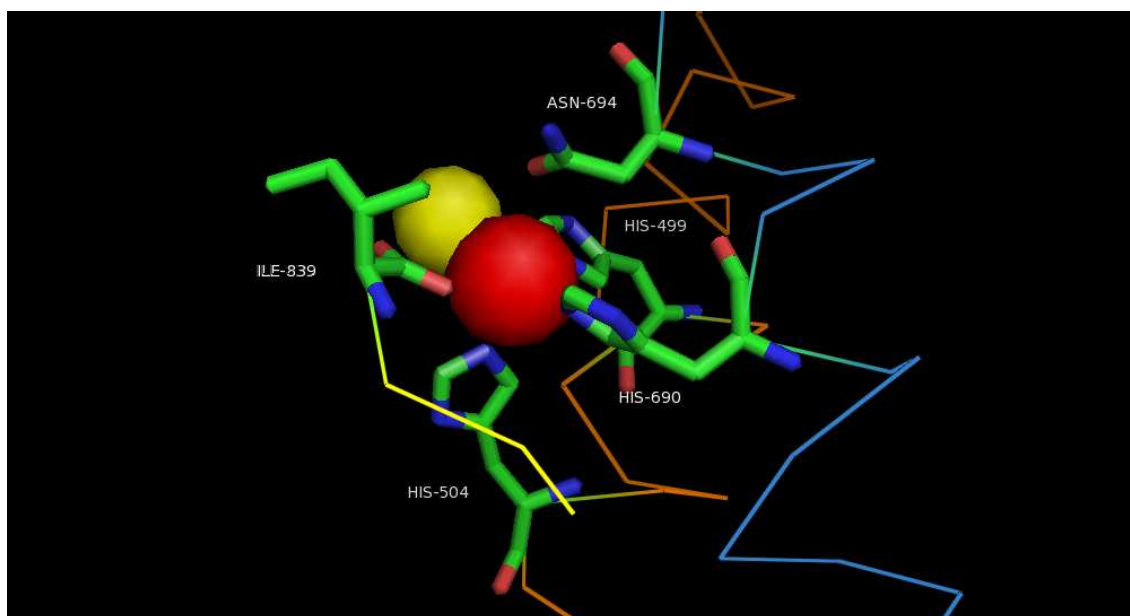


**Figura 13.- Estructura de la 8R-lipoxigenasa de *Plexaura homomolla* obtinguda a 3.2 Å de resolució (codi PDB 2FNQ). De color groc el domini N-terminal i en verd el domini catalític carboxi terminal. L'esfera vermella representa l'àtom de ferro coordinat en el centre actiu de la proteïna.**

L'altre domini és el més gran, és el que presenta l'activitat catalítica de l'enzim i el que conté el centre actiu del mateix. Consisteix en 23 hèlix  $\alpha$  i 2 fulles  $\beta$  antiparal·leles en el cas de la lipoxigenasa de soja (Youn B., Sellhorn GE. et al. 2006), la més representativa de les lipoxigenases vegetals, o en 18 hèlix  $\alpha$  interrompudes per una fulla  $\beta$  molt petita en el cas de les lipoxigenases d'origen animal (Kuhn H., Saam J. et al. 2005). En el nucli d'aquest domini hi ha dues hèlix llargues (hèlix  $\alpha$  9 i 18 en el cas de la lipoxigenasa de soja) que contenen les histidines que lligaran l'àtom de ferro a la proteïna (veure secció 1.4.5.1.) (Gaffney BJ 1996).

#### 1.4.5.1. Lligands del ferro - Centre actiu

El ferro està lligat a la proteïna mitjançant cinc aminoàcids i, en alguns casos, per un grup hidroxil. Per a les lipoxigenases vegetals, els cinc aminoàcids són tres histidines, una asparagina i el grup carboxil de la isoleucina terminal. En el cas de la lipoxigenasa de soja (*Glycine max*) aquests cinc aminoàcids són les histidines 499 i 504 de la hèlix  $\alpha$  9, la histidina 690 i l'asparagina 694 de la hèlix  $\alpha$  18 i la isoleucina 839 de l'extrem carboxi terminal (Figura 14) (Gaffney BJ 1996).



**Figura 14.- Esfera de coordinació de l'àtom de ferro de la lipoxigenasa L-1 de soja (*Glycine max*) obtinguda a 1.4 Å de resolució (codi PDB 1YGE). De color groc el grup hidroxil i en vermell l'àtom de ferro. En taronja l'hèlix 9, en blau l'hèlix 21 i en groc part de la cadena de residus que situa la isoleucina terminal en la posició adequada.**

En el cas dels mamífers, la lipoxigenasa té el ferro coordinat per quatre histidines i, de nou, per la isoleucina terminal (Andreou A. and Feussner I. 2009). Aquests aminoàcids i el grup hidroxil presenten un arranjament octaèdric formant una bipiràmide inclinada (Brash RA 1999).

Per estudiar la segona esfera de coordinació del ferro s'han fet estudis sobre la lipoxigenasa de soja. La segona esfera de coordinació consisteix en dos aminoàcids, la glutamina (Q) 495 i la glutamina (Q) 697, que formen una xarxa d'enllaços d'hidrogen entre la cavitat del substrat i la primera esfera de coordinació (asparagina 694). S'ha vist que mutants de la lipoxigenasa-1 de soja (figura 15) com Q495E, Q495A, Q697N i Q697E afecten l'activitat enzimàtica ja que la xarxa de ponts d'hidrogen es veu modificada afectant la ruptura de l'enllaç C-H (figura 15, b, c, d i e). Una ruptura eficient d'aquest enllaç s'aconsegueix mitjançant la correcta posició del substrat amb interaccions esteàriques amb la cadena lateral de la Gln495 (figura 15, a). La xarxa de ponts d'hidrogen definida per Gln495, Gln697 i Asn694 (figura 15, a) serà la responsable de la reordenació dels ponts d'hidrogen després de la unió del substrat (Tomchick DR, Phan P et al. 2001).

El nucli del domini catalític conté dues hèlixs llargues centrals una de les quals adopta una conformació d'hèlix  $n$  per a diversos residuos. Aquestes seccions helicoïdals contenen quatre dels cinc lligands de ferro de la lipoxigenasa (His 499, His 504, His 690, His 694).

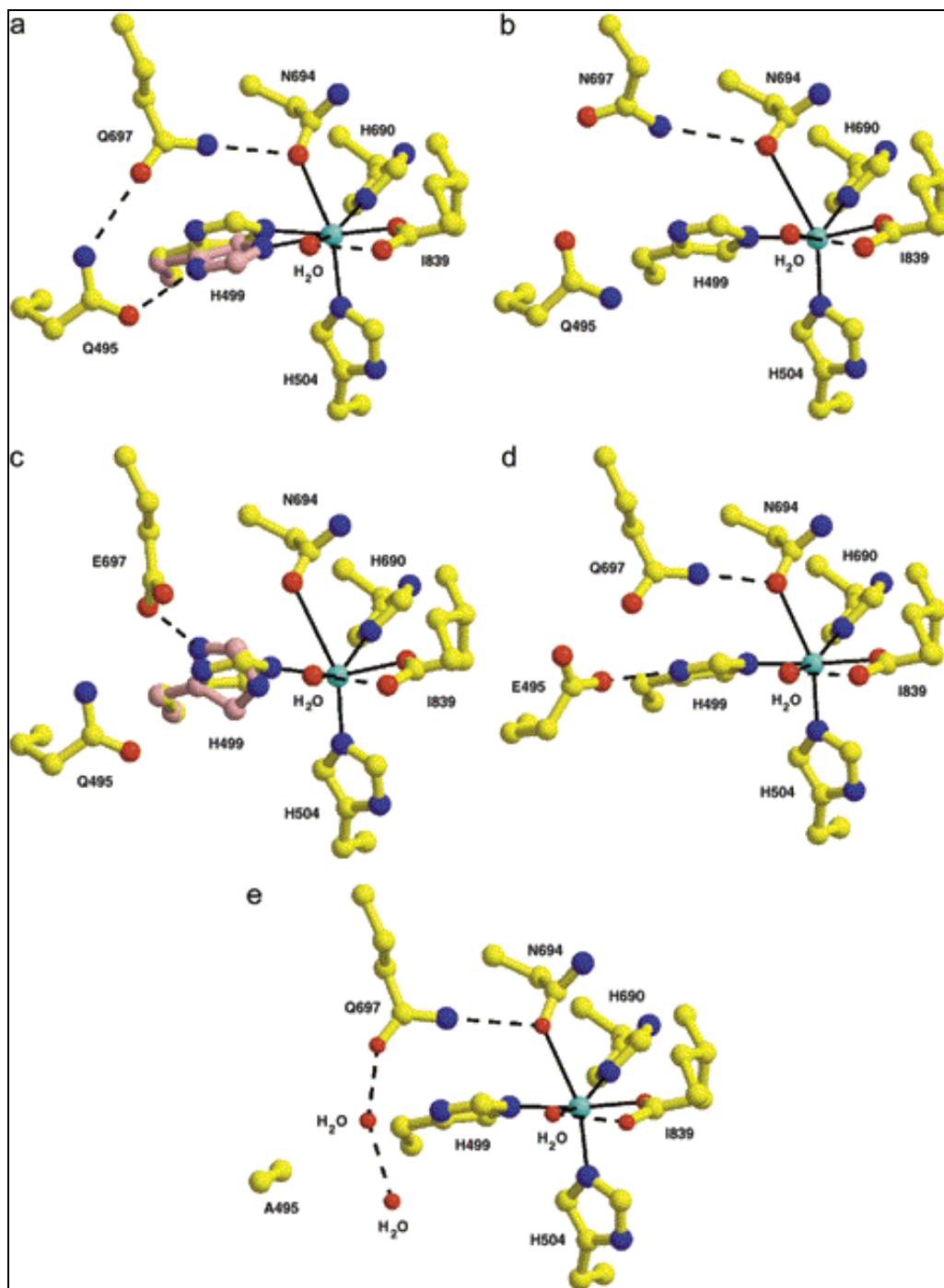
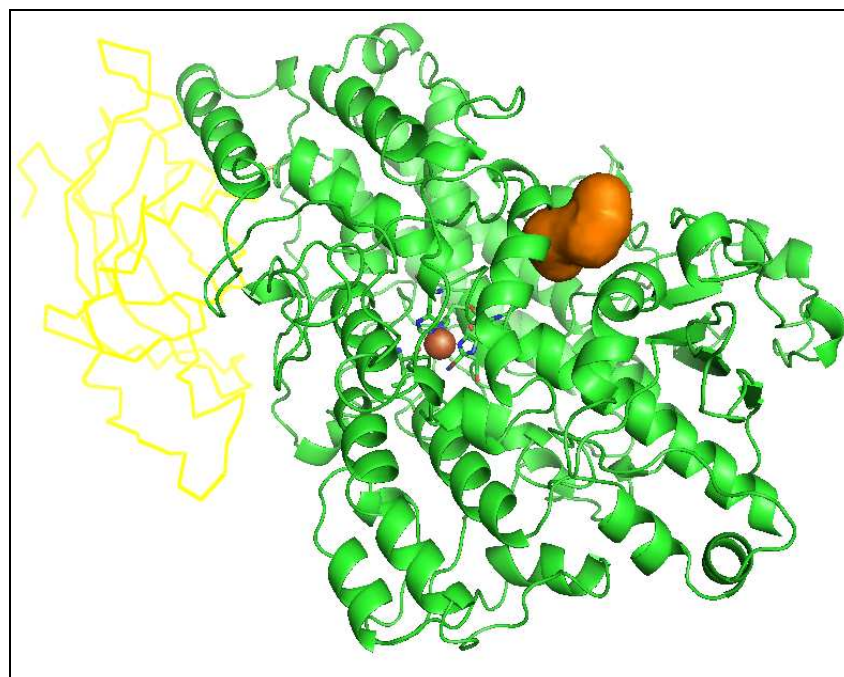


Figura 15: Geometria de la coordinació del  $\text{Fe}^{+2}$  de la lipoxigenasa-1 de soja (Sloane D. and Leung R.), lipoxigenasa nativa (a), Q697N (b), Q697E (c), Q495E (d), i Q495A (e). Els enllaços entre el ferro i la primera esfera de coordinació es dibuixen com línies contínues, i les interaccions amb hidrogen es dibuixen com línies discontinúes. Els àtoms d'oxigen es dibuixen en vermell, els de nitrogen en blau, i els de carboni en groc. L'àtom de ferro és de color cian. Les conformacions alternatives de la His 499 es mostren en color rosa (Tomchick DR, Phan P et al. 2001).

### 1.4.5.2. Cavitat

Com que la lipoxigenasa de soja (*Glicine max*) és la més ben estudiada d'entre totes les lipoxigenases, a l'hora d'introduir l'estudi d'aquesta zona de la proteïna el millor és prendre les cavitats de la lipoxigenassa de soja (*Glicine max*) com a referència. Aquesta proteïna presenta dues cavitats que varen ser identificades l'any 1993. Totes dues es troben en el domini carboxi terminal, el domini catalític de la proteïna (Boyington JC., Gaffney BJ. et al. 1993).

La cavitat I és una invaginació cònica amb una obertura d'uns 10Å a la superfície de la proteïna (Figura 16). Està definida pel grup carbonil de la serina 498 i les cadenes laterals de la treonina 503, la leucina 689 i la valina 693, en aquest punt la invaginació permet la presència d'una molècula d'aigua. Aquesta zona es troba a 8Å de l'àtom de ferro. La part final de la cavitat es trobaria en una línia que acaba a l'àtom de ferro i que talla la línia entre les histidines 499 i 690, a prop de l'esfera de coordinació de l'àtom de ferro (Minor W. 1996).



**Figura 16.- Estructura de la lipoxigenasa de soja (*Glicine max*). En taronja, la cavitat I; en groc, el domini N-terminal esquematitzat i en verd el domini C-terminal. En vermell el ferro amb els 5 residus que el coordinen.**

Els residus que defineixen aquesta cavitat són: Cys357, Val358, Ile359, Arg360, Tyr409, Ile412, Tyr493, Met497, Ser498, Leu501, Asn502, Thr503,



Val570, Asn573, Trp574, Val575, Asp578, Gln579, Leu581, Asp584, Lys587, Arg588, Tyr610, Trp684, Leu689 i Val693.

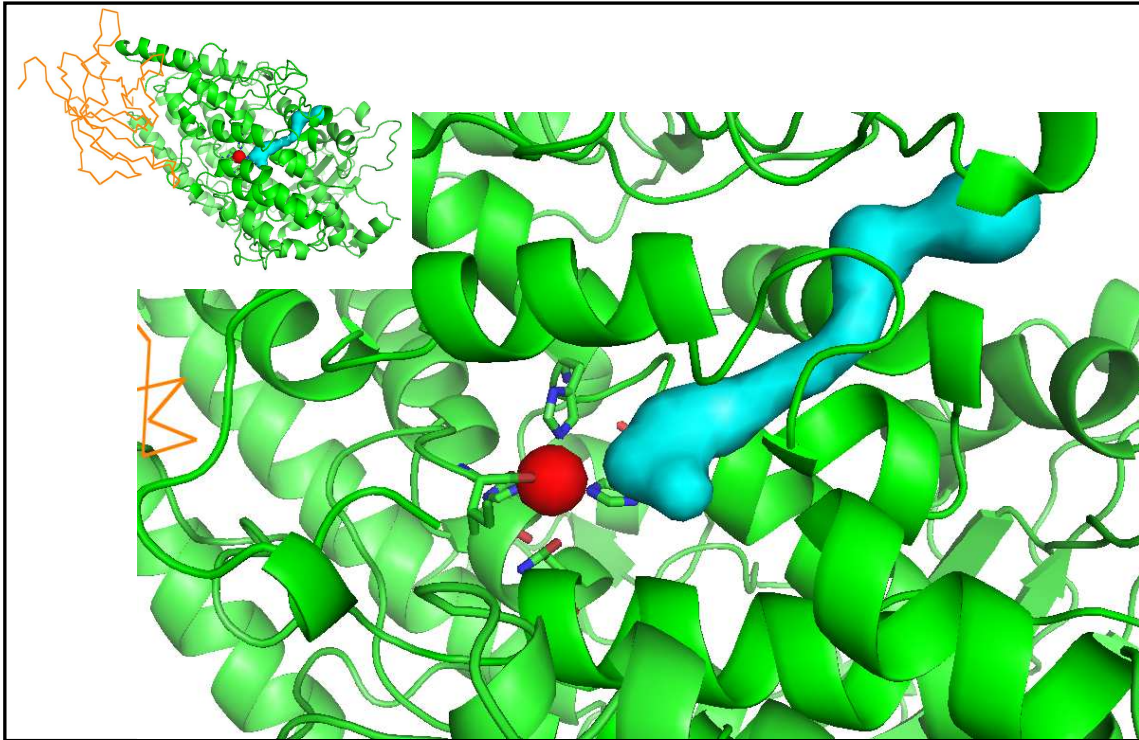
Tot i que en l'article de Boyington de l'any 1993 es comenta que la major part dels residus que defineixen la cavitat I són hidrofòbics, és un error creure que aquesta cavitat és hidrofòbica ja que s'hi han trobat molècules d'aigua formant ponts d'hidrogen amb la proteïna (Minor W. 1996). Segons Boyington, les característiques d'aquesta cavitat la fan ideal per a permetre el pas d'oxigen molecular de fora de la proteïna cap a un dels dos llocs de coordinació del ferro desocupats (Boyington J.C., Gaffney B.J. et al. 1993). Contràriament a les conclusions de Boyington, segons Minor, el pas d'aquest oxigen molecular necessitaria d'una reordenació substancial de l'estructura de la proteïna ja que no seria suficient una reorientació de la cadena lateral del residu Asn 694 per a facilitar l'accés al ferro.

De tot allò exposat anteriorment se'n dedueix que la cavitat I no és la ideal per a permetre el pas de l'oxigen molecular cap al centre actiu. La alternativa més plausible seria la cavitat II, que permet un accés directe al ferro (Minor W. 1996).

La cavitat II, de 40Å de longitud, s'estén en dues direccions (a i b) des de la zona propera a l'àtom de ferro (Figura 17). L'extrem més allunyat de la cavitat està definit per les cadenes laterals dels residus 341 (metionina) i 480 (leucina) que estan a una distància aproximada del ferro de 30Å.

La cavitat II té dues subunitats separades per un pas estret de 3'5Å determinat per l'arginina 707 i la valina 354. Així doncs, es parla de la cavitat IIa i la IIb, la primera és la més propera al ferro i probablement la que lliga l'àcid gras que actua com a substrat. Les dues es troben intercalades entre dues capes d'hèlix, la 9 i la 11 per un costat i la 2, la 6, la 18 i la 21 per l'altra.

Els residus que defineixen la cavitat IIa són: Tyr214, Leu255, Glu256, Gly258, Thr259, Leu496, His499, Trp500, His504, Ile538, Leu541, Ala542, Ile547, Ile553, Val564, Ser567, i Ile839.



**Figura 17.- Estructura de la lipoxigenasa de soja (*Glicine max*). Imatge superior: en taronja, domini N-terminal esquematitzat, en verd domini C-terminal. En cian, la cavitat IIa i en vermell el ferro amb els 5 residus que el coordinen.**

Els residus que defineixen la cavitat IIB són: Trp340, Met341, Glu345, Phe346, Glu349, Met350, Gly353, Val354, Asn355, Val358, Ile359, Leu407, Leu480, Lys483, Ala484, Val486, Ile487, Asn490, Tyr700, Met705, Asn706, Arg707, Pro708, i Tyr734 (Minor W. 1996).

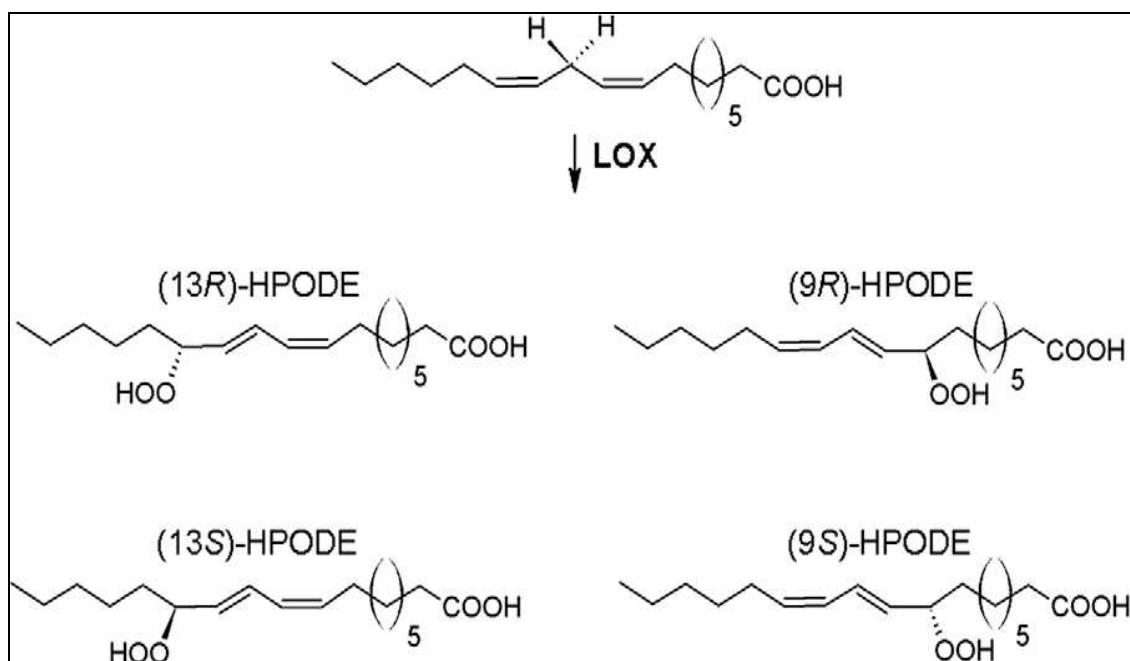
#### **1.4.6. Especificitat posicional i de substrat**

Hi ha dos aspectes de les lipoxigenases que determinen l'especificitat posicional i de substrat. El primer és degut a les característiques dels substrats d'aquests enzims i el segon és el mecanisme d'acció de l'enzim. En funció de l'hidrogen que sigui abstrèct en el primer pas de la reacció, de com tingui lloc el reordenament electrònic del segon pas de la reacció i de com s'insereixi l'oxigen molecular en el tercer pas. Podrem parlar doncs, de la regioespecificitat i estereoquímica de la reacció (Neau DB., Gilbert NC. et al. 2009).

La regioespecificitat vindrà definida en funció de quin dels dobles enllaços del grup 1,4-cis,cis-pentadiè es reordeni i canviï de posició. És a dir, depèn de la posició absoluta de l'abstracció de l'hidrogen i de la inserció de

l'oxigen. En el cas del linoleic, l'atac es dona sobre el carboni 11 i en funció del doble enllaç que es reordeni es formarà l'isomer 9-hidroperòxid o l'isòmer 13-hidroperòxid (Figura 18). En el cas de l'àcid linolènic que conté tres insaturacions. El radical es podria formar en el carboni 11 o en el carboni 14 (primer grau de regioespecificitat), el segon grau de regioespecificitat dependria del doble enllaç que es reordenés i de la posició de la inserció de l'oxigen molecular. Els isòmers possibles serien 9 o 13 en un cas i 12 o 16 en l'altre (Andreou A. and Feussner I. 2009).

El cas de l'àcid araquidònic (abundant en animals) que conté quatre insaturacions, presentaria tres possibles carbonis (7, 10 i 13) susceptibles de patir l'abstracció electrònica. Això faria possible la hidroperoxidació en sis carbonis diferents de la molècula, els que es troben en posició 5, 8, 9, 11, 12 i 15. Només les hidroperoxidacions en posició 5, 8, 12 i 15 són estables i han estat descrites (Kuhn H., Walther M. et al. 2002). Les hidroperoxidacions en posició 9 i 11 no s'han observat mai, degut segurament, a la inestabilitat de la unió enzim-substrat en la posició necessària per a què tingui lloc la reacció en aquesta posició.



**Figura 18.- Reacció de la lipoxigenassa sobre àcid linoleic que il·lustra la regioespecificitat i la estereoquímica del mecanisme.**

L'estereoquímica deriva de la formació del grup hidroperòxid que dona lloc a un centre quiral. La configuració d'aquest centre quiral pot ser R o S en

funció de la posició on hagi tingut lloc l'abstracció de l'oxigen i la inserció de l'oxigen molecular. Tot i que majoritàriament les lipoxigenases són S, enantiomèricament parlant, s'han descrit lipoxigenases R en mamífers (Boeglin WE., Kim RB. et al. 1998) (McDonnella M. 2001), en fongs (Su C. 1995) i en invertebrats marins (Brash AR. 1996).

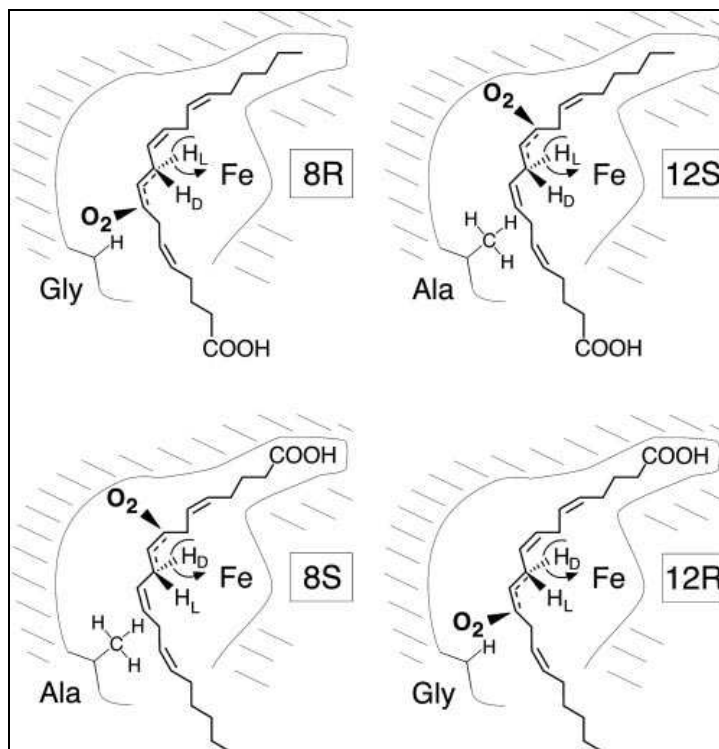
Estudis recents demostren que és un únic residu el que determina l'estereoselectivitat de la reacció. Una revisió acurada dels alineaments ha permès determinar la presència d'una diferència conservada a nivell de seqüència aminoacídica entre les lipoxigenases S i les R. Mentre que per a les lipoxigenases S en la posició determinada es presenta una alanina, per a les lipoxigenases R hi trobem una glicina. Això s'observa en la figura 19 on es presenta l'alineament de diverses lipoxigenases S i R i es remarca l'aminoàcid responsable de la estereoselectivitat de la reacció (Coffa G. 2004).

	Sequence	Name	GenBank Accession
407	I N T K <b>A</b> R E Q L I	Human 5(S)-LOX	J03600
399	I N T R <b>A</b> R T Q L I	Human 12(S)-LOX	M58704
399	I N V R <b>A</b> R T G L V	Human 15(S)-LOX-1	BC029032
412	I N T L <b>A</b> R E L L I	Human 15(S)-LOX-2	U78294
407	I N T K <b>A</b> R E Q L I	Mouse 5(S)-LOX	L42198
399	I N T L <b>A</b> R N N L V	Mouse ep 12(S)-LOX	X99252
400	I N V R <b>A</b> R S D L I	Mouse leu 12(S)-LOX	L34570
399	I N T R <b>S</b> R T Q L I	Mouse pl 12(S)-LOX	AK087724
413	I N T L <b>A</b> R E L L V	Mouse 8(S)-LOX	AK028724
400	I N V R <b>A</b> R N G L V	Rabbit 15(S)-LOX-1	P12530
558	I N A L <b>A</b> R Q I L I	Arabidopsis LOX-1	JQ2267
538	I N A L <b>A</b> R Q S L I	Soybean LOX-1	S25064
595	I N A L <b>A</b> R E A L I	Barley LOX-2	AJ507213
437	I N S I <b>G</b> R A V L L	Human 12(R)-LOX	AF038461
437	I N S I <b>G</b> R A L L L	Mouse 12(R)-LOX	Y14334
423	I D T I <b>G</b> R K E L I	Coral 8(R)-LOX domain	AF003692
447	V N S V <b>G</b> I K A L L	Coral 8(R)-LOX	U59223

**Figura 19.- Aliniament de lipoxigenases R i S i identificació d'un aminoàcid potencialment estereodeterminant (Coffa G. 2004).**

En la figura 20 es mostra la formació de quatre productes diferents en funció d'aquest aminoàcid que determina la estereoespecificitat de la reacció. En la lipoxigenasa 8R i en la 12S (part superior de la figura), l'orientació del substrat és la mateixa i l'abstracció de l'hidrogen es dona en la mateixa posició però, la presència de la glicina en la posició crítica a la zona proximal del lloc actiu, permet la reacció d'oxigenació anterofacial a l'extrem proximal de la

pentadiè en la configuració 8R (part superior esquerra). La substitució d'aquesta glicina per una alanina, que és un residu més gran, impedeix la inserció de l'oxigen al carboni 8 i l'oxigenació anterofacial es dona en una zona més profunda de la cavitat amb la configuració del 12S (part superior dreta). En les lipoxigenases 8S (part inferior esquerra) i 12R (part inferior dreta), el substrat entra a la cavitat amb l'extrem carboxil en primer lloc, cosa que permet l'abstracció de l'hidrogen del carboni 10. La presència d'una glicina permet l'oxigenació a l'extrem proximal del substrat donant com a resultat la configuració 12R (part inferior dreta), mentre que el residu més gran, l'alanina ho impedeix, i l'oxigenació anterofacial es produeix en una zona més profunda de la cavitat en la configuració de la 8S (part inferior esquerra) (Coffa G., Schneider C. et al. 2005).



**Figura 20.- Lipoxigenases R i S. Acció de l'aminoàcid estereodeterminant (Coffa 2005).**

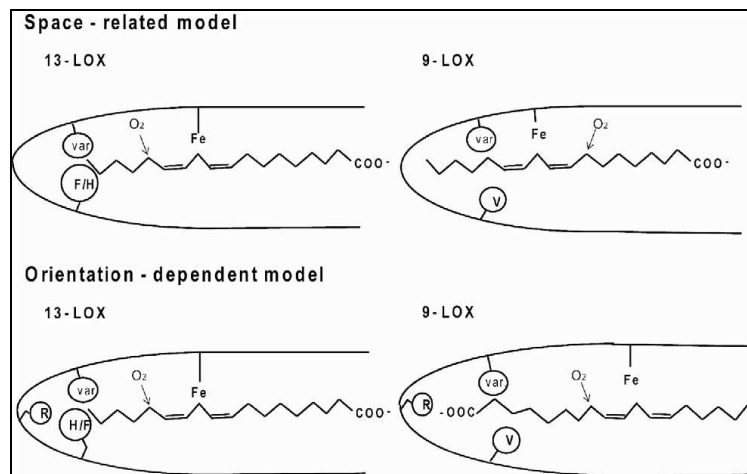
L'estudi de l'especificitat del substrat ha portat a definir tres idees bàsiques que determinen aquesta especificitat:

La primera és que la profunditat de la cavitat on s'introdueix el substrat per a la unió amb la proteïna és important per a l'especificitat posicional. Algunes prediccions estructurals pronostiquen una mida de la cavitat un 5%

més gran per a 12 lipoxigenases que per a les 15 lipoxigenases (Gillmor SA., Villasenor A. et al. 1997).

La segona idea és que l'orientació d'entrada del substrat a la cavitat té una influència directa sobre l'especificitat posicional (Kühn H 2000). L'orientació normal és la de l'entrada de l'extrem metil terminal a la cavitat, mentre que l'orientació invertida és la de l'entrada de l'extrem carboxil terminal a la cavitat.

La tercera idea deriva dels treballs dels últims anys que identifiquen una sèrie d'aminoàcids crítics per a l'especificitat posicional (Liavonchanka A. and I. 2006) (Schneider C., Pratt D.A. et al. 2007). En funció d'aquests s'estableixen dos models conceptuals per a explicar l'especificitat posicional de les lipoxigenases, el model dependent de l'orientació, i el model dependent de l'espai (Figura 21) (Andreou A. and Feussner I. 2009).



**Figura 21.- Comparació dels dos models existents per explicar l'especificitat posicional de substrat de les lipoxigenases.**

El model dependent de l'espai (Sloane D. and Leung R. 1995) diu que l'entrada de l'àcid gras a la cavitat sempre es dona per l'extrem metilterminal, d'aquesta manera és el volum de la cavitat, la profunditat, el que determina l'especificitat posicional ja que en funció d'aquesta profunditat serà un carboni o un altre el que quedarà exposat a la hidroxilació (Andreou A. and Feussner I. 2009). Així doncs, per a les 15-lipoxigenases amb una cavitat menys profunda, la hidroxilació es dona sobre un carboni més proper al costat metilterminal, mentre que per a les 5-lipoxigenases amb una cavitat més profunda, la reacció

es dona en un carboni més allunyat del costat metilterminal (figura 21, *Space-related model*).

D'altra banda, el model depenent de l'orientació diu que l'entrada de l'àcid gras a la cavitat es pot donar tant pel costat metilterminal com pel costat carboxiterminal (Kuhn H., Walther M. et al. 2002). D'aquesta manera, per a les 12 i 15 lipoxigenases, l'àcid araquidònic entra a la cavitat amb l'extrem metilterminal per davant, mentre que per a les 8 i 5 lipoxigenases entra amb el carboxiterminal per davant (figura 21, *Orientation-dependent model*).

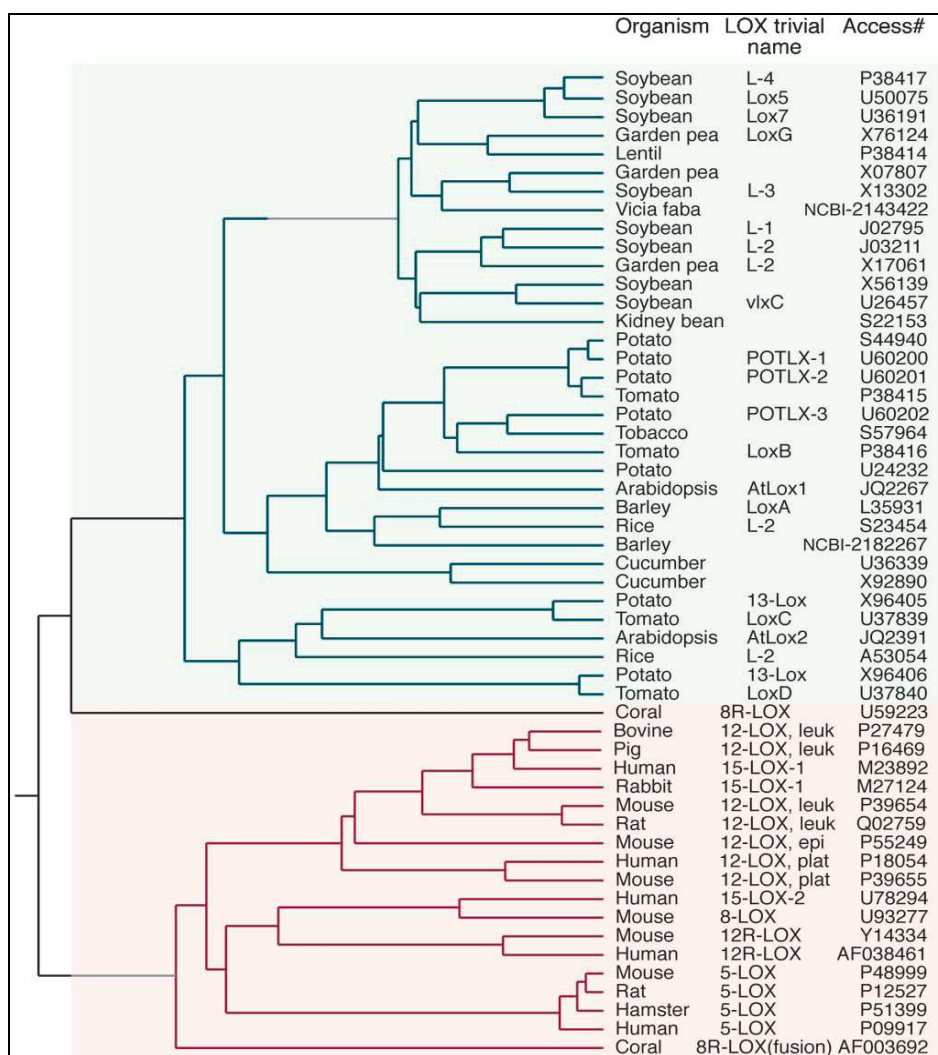
Tot i què aquest model s'ha estudiat en el cas de les lipoxigenases vegetals (Gardner 1989) amb l'àcid linoleic, durant els últims anys pren força un model que combini els dos models anteriors (model orientació - espai). En aquest cas, l'especificitat posicional s'explicaria tenint en compte tant l'espai de la cavitat com l'orientació del substrat (figura 21, columna de la dreta). Aquesta orientació es veuria condicionada tant per l'espai com per la càrrega dels residus que conformin la cavitat (Hornung E., Walther M. et al. 1999). Aquest model combinat explica que en treballs de mutagènesi dirigida en lipoxigenases vegetals s'observi que l'especificitat posicional estigui condicionada per diferents factors (Hughes RK, Lawson DM et al. 2001).

La diversitat de substrats sobre els quals poden treballar les lipoxigenases és àmplia en l'àmbit dels àcids grassos insaturats tot i què la preferència per a àcids grassos lliures és notable, sobretot en el cas de les lipoxigenases d'origen vegetal (Siedow JN. 1991). També s'observa activitat sobre àcids grassos poliinsaturats tant lliures com esterificats en fosfolípids (Hildebrand DF 1989) i en triglicèrids (Fuller MA, Weichert H et al. 2001) (Feussner I and Wasternack C 2002).

Hi ha altres substrats de les lipoxigenases que no són àcids grassos. És el cas de les lipoproteïnes de baixa densitat que són oxidades per 15 lipoxigenases de mamífers (Niki E. 2004) o l'exemple mostrat per Kulkarni (Kulkarni AP 2001) de co-oxidacions sobre compostos xenobiòtics que activen determinats compostos tòxics i en permeten la seva degradació.

### 1.4.7. Anàlisi filogenètic

La funció d'una proteïna està altament relacionada amb la seva estructura, per tant, la determinació de les seqüències aminoacídiques de moltes proteïnes hauria de permetre descriure les relacions evolutives entre aquestes. Idealment, els alineaments a realitzar per a fer estudis evolutius, haurien de fer-se amb la seqüència de la proteïna i respectant la disposició en l'espai d'aquesta mateixa per a comparar la seva estructura terciària. Ara bé, com que no disposem de l'estructura de la majoria de proteïnes, això no és possible i, per tant, l'anàlisi filogenètic cal fer-lo partint dels alineaments de les seqüències nucleotídiques o aminoacídiques de les diferents proteïnes descrites.



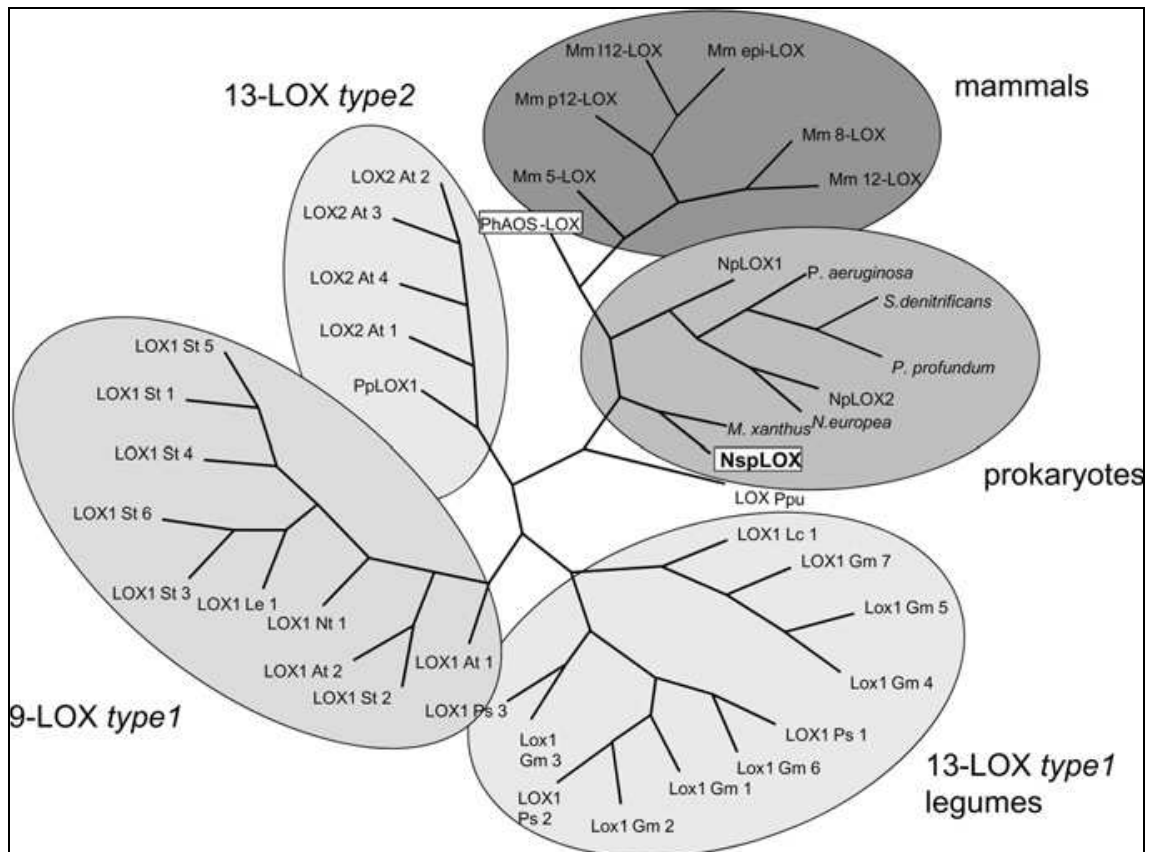
**Figura 22.-** Arbre filogenètic de lipoxigenases vegetals (fons blau) i de mamífers (fons rosa) (Brash RA 1999).



Per a realitzar l'anàlisi filogenètic o evolutiu d'una família de proteïnes s'analitzen les mutacions produïdes al llarg del temps sobre una seqüència. En els diferents estudis filogenètics realitzats amb la família de les lipoxigenases s'observen diferents agrupacions d'aquestes depenent del seu origen, de la seva localització o bé de la seva especificitat, ja que aquesta, en darrer terme, ve determinada per la seqüència de residus situada en el centre actiu.

En la figura 22, es presenta un arbre filogenètic per a les lipoxigenases vegetals i de mamífers on clarament s'observa la separació d'aquests dos grans grups i la formació de subgrups. És remarcable que la formació d'un producte concret de la catàlisi de la lipoxigenasa no necessàriament està associat a seqüències similars. Per contra, les proteïnes amb homologia funcional de diferents espècies situades en diferents subgrups, presenten identitats de seqüència d'entre el 70% i el 95% (Brash RA 1999).

Tot i que en les bases de dades de seqüències nucleotídiques apareixen diverses seqüències descrites com a possibles lipoxigenases o com a lipoxigenases per a organismes unicel·lulars (bacteris i fongs), són molt poques les publicacions fetes sobre aquest camp. La més recent posa de manifest la presència de lipoxigenases en organismes procariotes i suggereix que les lipoxigenases trobades en cianobacteries (*Nostoc punctiforme*) podrien ser les precursoras evolutives de les lipoxigenases 13-LOX dels plastidis de les plantes (Lang I., Göbel C. et al. 2008) i que els fenòmens de transferència horitzontal entre les cianobacteries i altres bacteris haurien estat els responsables de la dispersió d'aquest gen entre els bacteris (Lang I., Göbel C. et al. 2008).



**Figura 23.- Anàlisi filogenètic de les seqüències de NspLOX i de lipoxigenases de mamífers, plantes, coralls, algues i bacteris, usant el programa PHYLIP 3.5 (Lang I., Göbel C. et al. 2008). Accession numbers: (i) Mus musculus (Moore E.R.B.): 5-LOX AAC37673; 8-LOX CAA75003; 12R LOX CAA74714; I12-LOX AAA20658; p12LOX AAA20659; e12LOX NP663717; (ii) P. homomalla : PhAOS-LOX O16025; (iii) Arabidopsis thaliana type 2 LOX: LOX2 At1 Q06327; LOX2 At2 CAB56692; LOX2 At3 CAC19364; LOX2 At4 CAG38328; (iv) Physcomitrella patens (Pp): CAE47464; (v) Solanum tuberosum: St1 CAA5572; St2 AAD09202; St3 AAB31252; St4 CAA64766; St5 CAA64765; St6 AAB67860; (vi) A. thaliana type 1 9-LOX: LOX1 At1 NP175900; LOX1 At2 NP188879; (vii) Lycopersicon esculentum: Le1 P38415; (viii) Nicotiana tabacum: Nt1 CAA58859; (ix) Glycine max: Gm1 CAA47717; Gm2 P09439; Gm3 CAA31664; Gm4 P38417; Gm5 AAB67732; Gm6 AAA96817; Gm7 AAC49159; (x) Pisum sativum: Ps1 AAB71759; Ps2 CAA55318; (xi) Lens culinaris: Lc1 CAA50483; (xii) Porphyra purpureum: Ppu AAA61791; (xiii) Pseudomonas aeruginosa : AF479686; (xiv) Nitrosomonas europaea : BX321860; (xv) Shewanella denitrificans OS-217: Q3P217; (xvi) Photobacterium profundum 3TCK: ZP 01218321; (xvii) N. punctiforme (PCC73102): NpLOX1 ZP 00106490; NPLOX2 ZP 00107030; (xviii) Nostoc sp. SAG 25.82: NspLOX NP 478445.**

L'arbre filogenètic de la figura 23 posa de manifest l'agrupació filogenètica de les lipoxigenases vegetals (grups 13-LOX *type 2*, 9-LOX *type 1* i 13-LOX *type 1*), de les lipoxigenases animals representades només per les dels mamífers i per l'agrupació de les lipoxigenases d'origen procariota que formen un grup no gaire compacte que es troba entre les lipoxigenases animals i les vegetals (Lang I., Göbel C. et al. 2008). Aquests resultats concorden amb els obtinguts per Porta i Rocha-Sosa l'any 2001 (Porta H. and Rocha-Sosa M. 2001) en un estudi filogenètic menys detallat.

## **2. OBJECTIUS**



## **2. Objectius**

El present treball s'emmarca dins els projectes d'investigació "Biocatalizadores para la producción de emulsionantes poliméricos: optimización del sistema y desarrollo de nuevos productos, CTQ 2007-60749/PPQ" i "Aislamiento, caracterización de consorcios microbianos degradadores de hidrocarburos y prospección de genes en una genoteca metagenómica, PHB 2006-0038-PC" que tenen com a objectiu l'estudi de l'oxidació biològica de lípids, l'estudi de consorcis microbians, la prospecció de nous gens que intervenen en aquestes funcions i l'estudi dels mateixos. L'any 2005 es publica el clonatge i expressió de la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa* 42A2 (Vidal-Mas J 2005) sobre la que es desenvolupa l'estudi que es presenta en aquesta tesi. Donat que aquesta és la primera lipoxigenasa d'origen procariota que es clona i s'expressa, els objectius d'aquesta tesi se centren en aquesta proteïna. Els objectius plantejats per a la realització d'aquesta tesi són:

**1.-** Cristal·lització de la lipoxigenasa recombinant de *Pseudomonas aeruginosa* 42A2 i resolució de la seva estructura.

**2.-** Estudi de les característiques paramagnètiques de l'enzim.

**3.-** Aplicació de la tècnica dels microarrays al rastreig de noves lipoxigenases en mostres de sòls.

**4.-** Estudi evolutiu de les lipoxigenases bacterianes a partir d'anàlisis filogenètics mitjançant recursos bioinformàtics.



**3. CAPÍTULO 1: Estructura de la  
lipoxigenasa de *Pseudomonas  
aeruginosa* 42A2**





### **3.1. Material i mètodes**

#### **3.1.1. Producció de la lipoxigenasa recombinant de *Pseudomonas aeruginosa* 42A2.**

La sobreexpressió de la lipoxigenasa recombinant en *Escherichia coli* BL21 s'ha realitzat utilitzant matrassos Erlenmeyer d'un litre de capacitat amb osques i que contenen 200 ml de medi de cultiu LB (Luria-Bertani). S'han inoculat amb un volum del 2% (4 ml) de suspensió bacteriana d'*Escherichia coli* que conté la proteïna recombinant amb una densitat òptica de 2 mesurada a 580 nm. S'han incubat durant aproximadament 2 hores en agitació orbital (150 rpm) a 37°C fins que han assolit la fase exponencial primerenca (densitat òptica a 580nm entre 0'3 i 0'5).

La inducció de la sobreexpressió de la proteïna s'ha realitzat mitjançant l'addició al cultiu d'isopropil- $\beta$ -D-tiogalactòsid (IPTG) (Sigma) a una concentració final de 0'1 mM. El cultiu s'ha mantingut durant 18 hores en agitació orbital (150 rpm) a 18 °C per tal d'evitar la formació de cossos d'inclusió.

#### **3.1.2. Purificació de la lipoxigenasa recombinant de *Pseudomonas aeruginosa* 42A2.**

Amb l'objectiu de purificar la proteïna sobreexpressada, s'han recuperat les cèl·lules per centrifugació (10 minuts a 8000 rpm a 4 °C) i el sediment obtingut s'ha resuspès en 10 ml de tampó fosfat sòdic 20 mM a pH 7'5, que conté 100 mM de clorur sòdic i una mescla d'antiproteases (Complete mini EDTA free, Roche diagnostics, Mannheim, DE). Seguidament aquesta suspensió s'ha congelat a -30 °C durant una nit, després s'ha descongelat a temperatura ambient, i s'ha sotmès a un procés de sonicació de tres cicles de 30 segons a 60V a 4°C amb un processador ultrasònic (Branson Ultrasonics, Co, USA).

Per a les mostres d'EPR el procés de lisi cel·lular ha estat diferent. En aquest cas, després de la centrifugació del cultiu es resuspèn el sediment amb la solució BPer (BPer cell lysis detergent mixture, Pierce Chemical Co) i es torna a centrifugar a 14000 rpm durant 15 minuts i a 4°C. Al sobrenedant resultant

s'hi afegeix un 30 % (pes/volum) de sulfat d'amoni, es dissol bé i es sotmet de nou a una centrifugació en les mateixes condicions que abans. De nou s'afegeix sulfat d'amoni al sobrenedant, aquesta vegada fins assolir un 60 % de saturació. Es centrifuga de nou en les mateixes condicions i el sediment resultant es resuspèn en 10 ml de tampó fosfat sòdic 20 mM a pH 7,5, que conté 100 mM de clorur sòdic i una mescla d'antiproteases (Complete mini EDTA free, Roche diagnostics, Mannheim, DE).

Aquesta solució es filtra amb filtres de xeringa de 0.2 µm, s'aplica en una columna HiTrap Ni-Chelating de 1 ml (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrada amb una solució tampó 20 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a pH 7.4 amb 500 mM de NaCl (tampó A) i activada amb 2 ml de 0.1M NiSO<sub>4</sub>. Seguidament la columna és rentada amb 10 volums de tampó A que conté 10 mM d'imidazol. L'el·lució de la proteïna es fa a un flux de 1 ml/minut amb un gradient d'imidazol entre 10 i 500 mM. Es recullen fraccions d'un mil·lilitre que són analitzades per electroforesi en gels de poliacrilamida. Aquelles fraccions que presenten activitat lipoxigenasa són concentrades amb concentradors 10,000 MWCO HY (Vivaspin concentradors) fins a un volum de 500 µl.

A continuació, la proteïna concentrada (500 µl) s'aplica a una columna de gel filtració Superdex 200 (10/30 GL) equilibrada amb tampó fosfat potàssic 50 mM a pH 7.0 (KPi), amb NaCl 150 mM. Es recullen fraccions de 750 µl que s'analitzen amb gels d'electroforesi natus i desnaturalitzants. La concentració final de la proteïna és determinada pel mètode de Bradford usant sèrum d'albúmina bovina (BSA) com a estàndard.

### **3.1.3. Detecció de l'activitat lipoxigenasa. Mètode espectrofotomètric.**

També conegut com a "*low ethanol method*", és el mètode més utilitzat per a la determinació de l'activitat lipoxigenasa. Es basa en la mesura de l'increment d'absorbància a 234 nm. El grup diè conjugat hidroperòxid absorbeix a aquesta longitud d'ona. La velocitat de la reacció es pot determinar mesurant la formació del producte a través del canvi de l'absorbància a aquesta longitud d'ona. Es defineix una unitat lipoxigenasa (ULOX) com l'augment de 0,001 unitats d'absorbància per minut a l'utilitzar el substrat dissolt en tampó borat 0,2M a pH 9,0. Per a utilitzar aquesta metodologia, descrita per Ben-Aziz

(Ben-Aziz A., Grossman S. et al. 1970), és necessari preparar la solució de substrat (50 µl d'àcid linoleic, 50 µl d'etanol 95% en 50 ml finals de tampó borat 0,2M, pH 9.0). Aquesta solució es manté a 4°C protegida de la llum per evitar el fenomen de la fotooxidació de l'àcid linoleic. Per a l'assaig es prepara un solució fresca diluïda 6 vegades en tampó borat 0,2M, pH 9.0 S'han utilitzat cubetes de 1,5 ml de volum final i de 10mm de pas de llum. Com a control s'ha utilitzat una mescla de 0,660 ml de solució de substrat i 0,340 ml de tampó borat 0,2M, pH 9. Per a determinar l'activitat lipoxigenasa, s'addicionen 10 µl de la suspensió de proteïnes a la mescla de 0,66 ml de solució de substrat i 0,33 ml de tampó borat 0,2M. Es mesura la variació de l'absorbància a una longitud d'ona de 234 nm durant 3 minuts respecte la cubeta control. Al llarg de la zona lineal es calcula el pendent, a partir de la qual es podrà calcular les unitats lipoxigenasa presents en la mostra. Les mesures s'han realitzat en un espectrofotòmetre UVIKON 922 (Kottron Instruments, Itàlia) La concentració final d'àcid linoleic utilitzant el linoleic al 60% (Sigma, cat. nº L-1376) en la cubeta és de 213 µM i la concentració d'etanol, del 0,1%.

#### **3.1.4. Electroforesi de proteïnes en gels de poliacrilamida.**

Aquesta tècnica es basa en la separació de les proteïnes al llarg d'un gel de poliacrilamida, usat com a sedàs, mitjançant l'aplicació d'una diferència de potencial entre els dos extrems del gel. Són varis els factors que afecten a aquesta separació (mida, plegament, càrrega, proporció dels monòmers d'acrilamida, pH) al llarg del gel. S'ha utilitzat el sistema de gels MINIPROTEAN-II (BioRad SA) acoblat a una font d'energia Power Pac 300 (BioRad SA).

Hi ha dos tipus de gels de poliacrilamida, els gels desnaturalitzants i els nadius. Els primers contenen SDS (sodi dodecil sulfat), un detergent que desnaturalitza les proteïnes, mentre que els segons no en contenen.

Els gels desnaturalitzants separen les proteïnes basant-se en el seu pes molecular (Laemmli UK. 1970) ja que l' SDS s'uneix al llarg de tota la cadena aminoacídica de la proteïna fent que sigui proporcional al seu pes molecular (Bollag D. and Edelstein S. 1991). El procediment i les solucions necessàries per a preparar 10 ml d'aquests gels s'expliquen a continuació.

En primer lloc cal ajustar els volums d'aigua i de solució de poliacrilamida (Acrilamida 29% - bisacrilamida 1%) en funció de si estem preparant el gel d'apilament o de separació (taula 3), seguidament s'afegeix el tampó corresponent (Tampó de separació: Tris-HCl 1,5M a pH 8.8 o tampó d'apilament: Tris-HCl 1,0M a pH 6.8) i després s'afegeix 0.1 ml de solució de SDS al 10 % (pes/volum). A aquesta solució cal afegir-hi el TEMED (N,N,N',N'-tetra-methyl-ethylenediamine, iniciador de la polimerització) i la solució de persulfat d'amoni al 10% (pes/volum) per a catalitzar la polimerització. Per a carregar les mostres al gel s'utilitzarà un tampó de càrrega 5 vegades concentrat amb la següent composició: Tris-HCl 250mM pH 6.8; 500 mM DTT, 10% SDS, 1% blau de bromofenol; 50% glicerol.

Els gels usats per a electroforesis desnaturalitzants són de 0.75 mm de gruix al 5% de mescla d'acrilamida per al gel d'apilament, i del 12% per al gel de separació. La proporció d'aquests dos tipus de gels es poden veure en la taula RRR (Sambrook J., Fritsch E. et al. 1989).

<b>Gel apilador 5% (5 ml de gel)</b>		<b>Gel separador 12% (10 ml gel)</b>	
Solució d'acrilamida 30%	0,83 ml	Solució d'acrilamida 30%	4,0 ml
Tampó d'apilament	0,63 ml	Tampó de separació	2,5 ml
Solució SDS	50 µl	Solució SDS	100 µl
Persulfat amònic	50 µl	Persulfat amònic	100 µl
TEMED	5 µl	TEMED	4 µl
Aigua destil·lada	3,4 ml	Aigua destil·lada	3,3 ml

**Taula 3.-Proporció dels gels apiladors i separadors.**

Les mostres carregades als gels desnaturalitzants han estat mesclades amb tampó de càrrega (5X) i incubades a 96°C durant 5 minuts abans de la seva càrrega. L'electroforesi s'ha dut a terme a 200 V durant 50 minuts en tampó d'electroforesi amb un 0'1% de SDS (pes/volum). El marcador de pes molecular usat ha estat el SigmaMarker™ Wide Molecular Weight Range (Sigma), que permet veure bandes de 205; 116; 97; 84; 66; 55; 45 i 36 KDa.

La composició dels gels nadius només difereix dels desnaturalitzants en què en els gels apiladors i separadors els 50 i 100 µl de solució de SDS s'han substituït per aigua, el tampó de càrrega no conté SDS ni DTT (agents desnaturalitzants) i el tampó d'electroforesi no conté SDS.

Per tal de poder detectar les possibles bandes en que se separen les proteïnes cal tenyir-les. La tècnica més usada és la tinció amb Blau de Comassie, mètode que permet la fixació de les proteïnes en el gel amb metanol i àcid acètic glacial i, al mateix temps tenyir-les amb el colorant Comassie Brilliant Blue R250 (Sigma).

La tinció del gel es fa per immersió de 10 minuts, a temperatura ambient i en agitació lleugera, en una solució de tinció (10% àcid acètic glacial, 45% metanol, 0,1% blau de Comassie R250, en aigua destil·lada). L'eliminació de l'excés de colorant es fa amb una solució rentat (10% metanol, 10% àcid acètic glacial en aigua destil·lada) a temperatura ambient i en agitació fins a observar bé les bandes en el gel (Bollag D. and Edelstein S. 1991).

### **3.1.5. Cristal·lització de la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa* 42A2.**

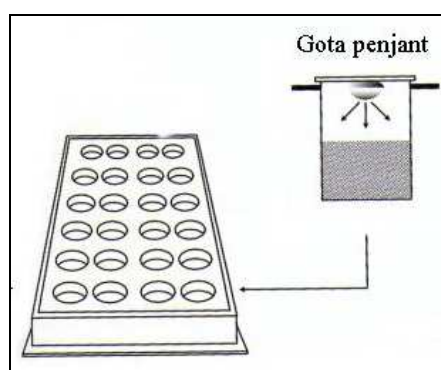
Per tal d'obtenir un cristall cal assolir una solució en situació de supersaturació. Aquesta situació s'obté quan la solució sobrepassa el límit de solubilitat de la proteïna (equilibri entre la fase sòlida i la dissolta del solut), la solució doncs, està en situació de no equilibri i tendirà a l'equilibri passant molècules en solució a estat sòlid. És sota aquestes condicions que poden créixer els cristalls. L'estratègia normal per aconseguir aquest estat de supersaturació passa per disminuir lentament la solubilitat del sistema a cristal·litzar, modificant la concentració de precipitant. En aquest cas s'ha utilitzat el mètode de difusió de vapor en gota pendent.

#### **3.1.5.1. Mètode de difusió de vapor en gota pendent**

Es disposa d'un sistema tancat en el qual hi ha un reservori (solució que conté el precipitant, 1 ml) i una gota (2  $\mu$ l) en la què hi ha la mostra a cristal·litzar juntament amb altres components com poden ser sals, tampó de base aquosa i precipitant. La gota sempre conté menys precipitant que el reservori i, com que es troba en un sistema tancat, aquest tendeix a equilibrar les concentracions de precipitant a través de la difusió de vapor que té lloc mitjançant l'evaporació d'aigua de la gota, en el cas de precipitants no volàtils

com el PEG (polietilenglicol); o bé a través de la difusió del propi precipitant en el cas de precipitants volàtils com poden ser l'etanol o l'isopropanol.

La tècnica de la gota pendent requereix tractar els cobreobjectes on es dipositaran les gotes submergint-los en un bany de silà (netejan't després amb banys d'aigua i finalment amb etanol per assecar) per tal d'inertitzar-los i que la seva superfície sigui hidrofòbica i la gota s'hi pugui quedar penjada. Les cristal·litzacions s'han dut a terme en plaques Linbro que disposen de 24 pous (s'hi poden fer 24 gotes). Les gotes tenen un volum de 2  $\mu\text{l}$  (1  $\mu\text{l}$  de solució de proteïna i 1  $\mu\text{l}$  de solució precipitant). La mescla es fa sobre el cobreobjectes, després es gira i es col·loca sobre el pou prèviament omplert amb 1 ml de solució precipitant. El sistema quedarà segellat amb l'ajuda de silicona (Figura 24).



**Figura 24.- Esquema de la difusió de vapor en gota pendent en plaques Linbro (Mc Pherson A. 1999).**

### **3.1.5.2. Condicions de cristal·lització.**

Com que és extremadament difícil poder predir les condicions apropiades per a la nucleació o el creixement de cristalls ben ordenats, en la pràctica es realitzen cribatges, assajant diverses condicions de cristal·lització. Això permet trobar una o més condicions en les quals s'afavoreixi la formació de cristalls de la proteïna. En aquests cribatges, es realitzen múltiples combinacions de la proteïna a estudiar amb mescles de diferents agents precipitants, com ara sals (fosfats, citrats, sulfat amònic...), alcohols (metilpentendiol, isopropanol...), tampons (Hepes, Tris...) i d'altres precipitants (polietilenglicol (PEG), glicerol...), ajustats a diferents pHs. Tots aquests compostos s'usen amb la finalitat de disminuir la solubilitat de les molècules a cristal·litzar. Durant la realització d'aquesta tesi s'han provat 760 condicions de cristal·lització diferents

que corresponen a diferents cribatges comercialitzats per l'empresa Hampton Research (Annex 1). El nom d'aquests diferents cribatges es mostren a la taula 4 juntament amb el número de condicions diferents que conté el cribatge.

<b>Nom del cribatge</b>	<b>Número de condicions del cribatge</b>
Ammonium sulfate grid screen	24
Crystal Screen Lite	48
Crystal Screen I	48
Crystal Screen II	48
Natrix	48
PEG 6000 Grid Screen	24
Wizard 1	48
Wizard 2	48
Complex Screen	40
MPD grid screen	24
PEG 6000/LiCl grid screen	24
PEG/Ion screen	48
MembFac	48
Quik phosphate grid screen	24
NaCl grid screen	24
Index	96
SaltRx	96

**Taula 4.- Nom dels diferents cribatges provats per a la cristal·lització de la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa* i numero de condicions de cristal·lització diferents que conté cada cribatge.**

Totes les cristal·litzacions que s'han dut a terme durant la realització d'aquesta tesi s'han realitzat a 20°C amb dues concentracions de proteïna, 15 mg/ml i 30 mg/ml, a la Plataforma Automatitzada de Cristal·lografia de l'Institut de Biologia Molecular de Barcelona (IBMB) i del *Institute for Research in Biomedicine* (IRB) del CSIC al Parc Científic de Barcelona (PCB) sota la supervisió del Dr. Fita (Investigador Principal) i del Dr. Carpena (PostDoc) usant el robot CARTESIAN Microsys 4000 XL, que permet la miniaturització a nivell de nanolitres del procés cristal·logràfic.

Un cop s'han obtingut els cristalls adequats es congelen amb nitrogen líquid. Per això s'ha utilitzat un criollaç o cryoloop (llaç de niló subjectat a una vareta metàl·lica). En funció de la mida del cristall s'usa un llaç d'una mida o una altra. Es captura el cristall amb el criollaç i ràpidament se submergeix en

nitrogen líquid quedant congelat instantàniament (Rudman R. 1976). Treballar a baixes temperatures comporta molts avantatges, permet la conservació dels cristalls durant molt de temps, minimitza els danys de la radiació, es redueix la dispersió i en pot millorar la resolució. Per altra banda, cal evitar l'aparició de gel en els espectres de difracció, per això s'usen crioprotectors com el glicerol. En aquest estudi s'ha utilitzat un criotampó consistent en la solució precipitant adient amb un 20% de glicerol.

### **3.1.6. Difracció del cristall de la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa* 42A2.**

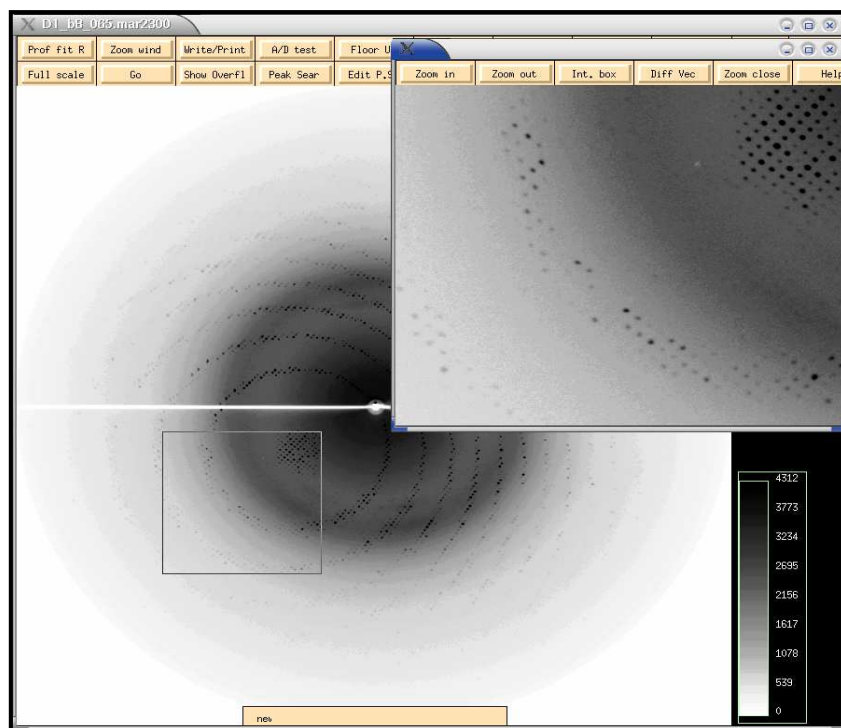
Per a obtenir les dades de difracció, s'ha disposat de rajos X durs, d'alta energia. S'ha usat radiació de sincrotró a l'ESRF (European Synchrotron Radiation Facility), a Grenoble (França).

Per tal d'obtenir una bona estructura d'un cristall cal superar diverses etapes:

- Recollida de dades
- Indexat, processat i escalat
- Reemplaçament molecular

Per a obtenir una bona difracció cal situar un detector en línia amb la sortida dels rajos X i del cristall. Això implica situar el cristall de manera que durant la seva rotació no es desalini. Al final de la recollida de les intensitats registrades s'obté una imatge digitalitzada que s'anomena difractograma (Figura 25).





**Figura 25.- Diffractograma i detall del mateix, obtinguts en difractar els cristalls de la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa* 42A2.**

Per a indexar i processar les dades obtingudes a partir dels diversos diffractograms obtinguts s'ha utilitzat el programa DENZO (Otwinowski Z and Minor W 1997) que permet determinar la simetria, les dimensions de la cel·la i el grup espacial del cristall. L'escalat de les dades s'ha fet amb el programa SCALEPACK (Otwinowski Z and Minor W 1997), un programa que corregeix el valor de les intensitats tenint present el soroll de fons, el factor de polarització, d'absorció i la possible malmesa del cristall.

El programa utilitzat per dur a terme el procediment de reemplaçament molecular ha estat el MOLREP (Vagin A and Teplyakov A 1997). La construcció manual de l'estructura s'ha realitzat amb el programa de gràfics COOT (Emsley P and Cowtan K 2004) i per afinar l'estructura s'ha utilitzat el programa REFMAC (Murshudov G N, Vagin A A et al. 1997).

### **3.1.7. EPR: Ressonància Paramagnètica Electrònica**

Per als experiments d'EPR, les mostres de lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa* 42A2 amb el ferro en estat +3 han estat preparades per addició de <sup>13</sup>S-HPODE.

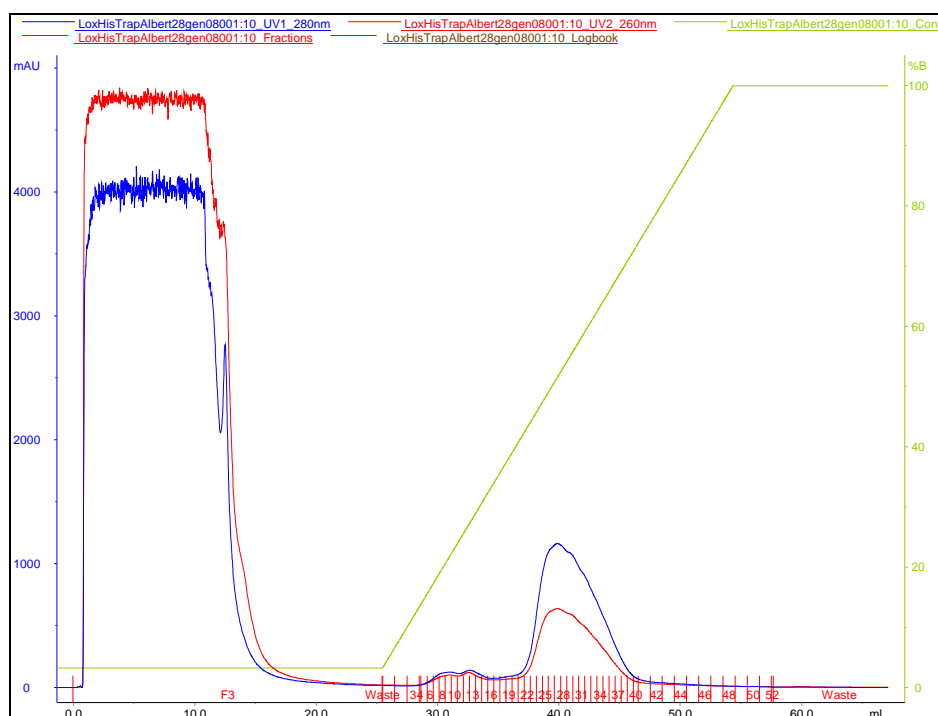
El 13S-HPODE, produït amb la lipoxigenasa de soja LOX-1, s'ha purificat en una columna Supelcosil LC-SI (5  $\mu$ m, 25 x 0.46 cm) eluïda a un flux de 1 ml/min amb hexà/iso-propanol/àcid acètic (100/2/0.1 en volum). El 13S-HPODE purificat ha estat dissolt a una concentració entre 10 i 30 mM en tampó borat sòdic 0.1 M a pH 9.1, una alíquota de volum apropiat ha estat afegida a la solució de proteïna just abans de realitzar l'experiment d'EPR. Les mostres van ser de concentracions d'entre 0,1 i 0,4 mM de proteïna dissolta en tampó fosfat de potassi 0,2 M sense crioprotector.

Els espectres d'EPR s'han obtingut en un espectròmetre Varian E 109 treballant a  $\sim$ 9.2 GHz (X-band) equipat amb una bomba Oxford Instruments ESR9/10, el flux d'heli líquid del criostat s'ha fixat a 3'5 K. La temperatura es mesura amb un sensor Cernox situat just sota el tub de quars de 4 mm de diàmetre que conté la mostra. La configuració estàndard dels instruments per a tots els espectres s'ha realitzat a 5 mW de potència de microones a un temps d'escaneig de 30 min/200G i un a constant de temps de 0,5 segons.

## 3.2. Resultats i discussió

### 3.2.1. Purificació de la lipoxigenasa i obtenció de cristalls

La solució de proteïna obtinguda de la sonicació del sediment del cultiu i del filtrat amb filtres de xeringa de 0.2 µm, és carregada en una columna HiTrap Ni-Chelating d'1 ml (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrada amb una solució tampó 20 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a pH 7.4 amb 500 mM de NaCl (tampó A) i activada amb 2 ml de 0.1M NiSO<sub>4</sub>. Seguidament la columna és rentada amb 10 volums de tampó A que conté 10 mM d'imidazole. L'elució de la proteïna es realitza amb un gradient d'imidazol que va de 10 mM a 300mM a un flux de 1 ml/min i recollint fraccions d'1 ml.

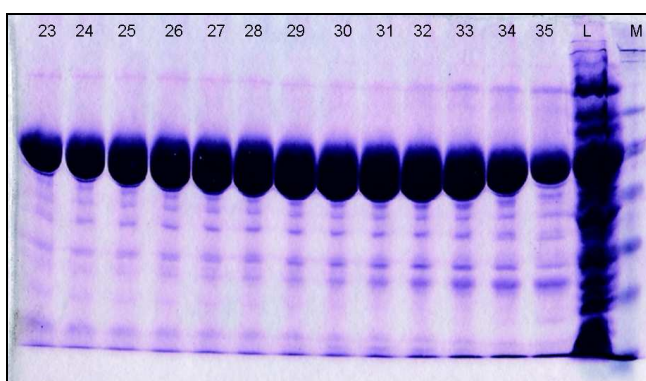


**Figura 26.- Perfil d'alliberació de la proteïna de la columna HiTrap Ni-Chelating amb gradient d'imidazol de 10 mM a 300mM, amb l'absorbància a 280 nm (blau) i a 260 nm (vermell). L'eix vertical blau indica les unitats d'absorbància (Moore E.R.B. 1996) i l'eix vertical verd indica el percentatge de tampó B (tampó A amb imidazol a una concentració de 300 mM).**

El perfil de proteïna eluïda en cada moment es mostra en la figura 26 on s'observa que la proteïna s'allibera a una concentració d'imidazol d'entre 135 mM i 210 mM. El màxim d'absorbància a 280 nm (màxima elució de proteïna) es dona a una concentració d'imidazol de 150 mM, s'obté una màxima

absorbància al centre del pic. Les lectures d'activitat lipoxigenasa per a les fraccions (23 - 35) corresponents al pic, són positives. Entre les fraccions 8 i 15 apareix un doble pic que no presenta activitat lipoxigenasa.

En la figura 27, es mostra un gel de poliacrilamida desnaturalitzant on es pot comprovar que la proteïna s'ha purificat pràcticament fins a l'homogeneïtat. S'han carregat mostres de les fraccions 23 a 35, una mostra de la solució de proteïna no purificada carregada a la columna (L) i un marcador de pes molecular (M) que mostra bandes de 205, 116, 97, 84, 66, 55, 45 i 36 KDa. Comparant les postres de les fraccions amb la mostra carregada a la columna es pot veure com el procés de purificació és altament efectiu ja que tot i que apareixen altres bandes a part de la corresponent a la de la lipoxigenasa, aquestes tenen una mida molt petita i no apareixen en el perfil d'alliberació de la proteïna de la columna.



**Figura 27.- Gel de poliacrilamida de les fraccions 23 a 35 que conformen el pic mostrant la puresa del mateix. En el carril L mostra carregada a la columna HisTrap i en el carril M marcador de pes molecular (de dalt a baix: 205, 116, 97, 84, 66, 55, 45 i 36 KDa).**

Tot i què aquesta lipoxigenasa és la primera d'un organisme procariota que se sobreexpressa, els resultats en quant a producció de proteïna són similars als obtinguts per a la lipoxigenasa de soja LOX-1 i per a la lipoxigenasa de *Gaeumannomyces graminis* que han estat sobreexpressades de forma heteròloga, la primera en *Escherichia coli* i la segona en el llevat *Pichia pastoris*. En ambdós casos la producció fou de 30 mg de proteïna per litre de cultiu, però amb la diferència que la primera era expressada al medi de cultiu (Cristea M., Engström A. et al. 2005), mentre que en la segona l'expressió era intracel·lular (Steczko J., Donoho GA. et al. 1991). S'han sobreexpressat lipoxigenases de

mamífers utilitzant altres sistemes com pot ser el cas de la 15-LOX d'origen humà, on el sistema d'expressió està basat en cèl·lules d'insecte (*Spodoptera frugiperda* Sf-9) transfectades amb un baculovirus que conté la seqüència de la proteïna obtenint entre 25-50 mg de proteïna soluble i activa per litre de cultiu. Aquest mètode però, necessita incubacions prèvies a la infecció amb el baculovirus de 24 hores, i 3 dies de incubació per a la producció de la proteïna (Kühn H., Barnett J. et al. 1993).

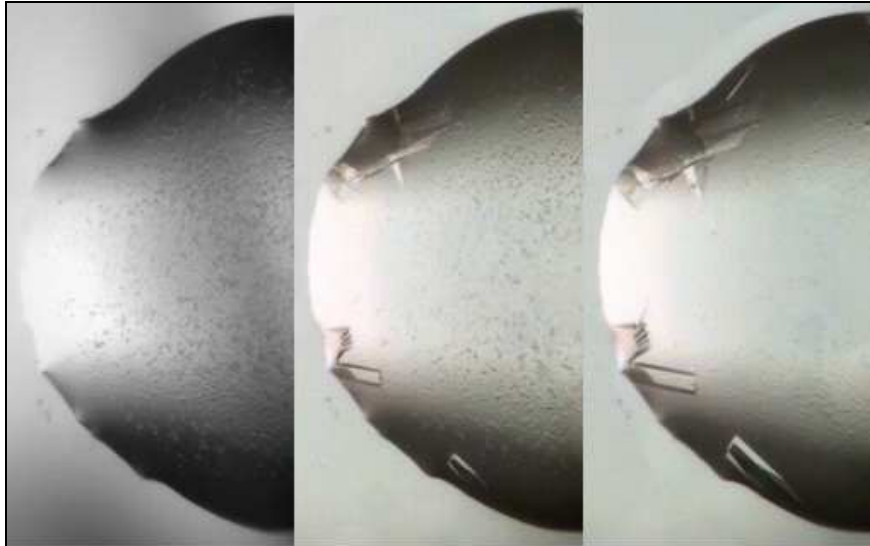
Les condicions a les que s'ha obtingut el cristall (Figura 28) que s'ha difractat són les següents:

Sal:	Cl <sub>2</sub> Mg 0.05M
Precipitant:	PEG 3350 10%
Tampó:	Hepes 7.5pH 0.1M
Concentració de proteïna:	15 mg/ml
Temps:	10 - 20 dies



**Figura 28.- Detall del cristall de la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa* obtingut sota les condicions anteriorment esmentades.**

El creixement del cristall resultant es pot observar en la sèrie d'imatges següents (Figura 29) on es pot veure com, al llarg del temps (els cristalls triguen a formar-se entre 10 i 20 dies) i a partir d'una gota sense cristalls, aquests s'hi formen i hi creixen.



**Figura 29.- Formació i creixament de cristalls de la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa* en una gota de cristal·lització. En la imatge es veu una mateixa gota a diferents temps des de la seva preparació. D'esquerra a dreta: dia 0, dia 10 i dia 20.**

Tot i que s'han obtingut cristall sota sis condicions diferents més (en tampó HEPES 0,1 M a pH 7,5 amb 0,2 M de citrat trisòdic deshidratat i 30% v/v de MPD o en tampó MES 0,1 M a pH 6,5 amb fosfat de sodi dihidrogenat 0,1 M i 12% pes/v de PEG 20.000 o en tampó HEPES 0,1 M a pH 7,5 amb 0,5 M de sulfat d'amoni i 30% v/v de MPD o en tampó MES 0,1 M a pH 6 i amb clorur de liti 1M o en citrat trisòdic deshidratat 0,1 M a pH 5 amb un 10 % v/v de MPD o en tampó TRIS 0,1 M a pH 8,5 amb clorur de magnesi hexahidratat 0.2 M amb un 25% v/v PEG 3350), tots els cristalls obtinguts eren més fràgils que el que es va decidir difractar. Aquesta és la raó principal per la qual es va escollir aquest cristall per a ser difractat. Cal tenir present que la manipulació del cristall és un pas crític del procés, com més fràgil és, més fàcil és que es trenqui i què, per tant no es pugui difractar bé.

### **3.2.2. Paràmetres del cristall.**

Per tal d'obtenir un bona estructura d'un cristall cal superar diverses etapes:

- Recollida de dades
- Indexat, processat i escalat
- Reemplaçament molecular

**Recollida de dades:** Per a una bona recollida de dades hi ha tres paràmetres que són importants conèixer: l'orientació del cristall, per tal d'aconseguir situar-lo en el centre del feix de raigs X i que no surti d'aquest durant la rotació, l'angle d'oscil·lació (oscil·lació que es dona en cada foto recollida al llarg de tot el rang recollit) i la distància al detector i el temps d'exposició. La distància al detector està molt lligada a la resolució de l'espectre (Dauter Z. 1997) i el temps d'exposició (temps de recollida de la foto) també afecte a la resolució ja que no totes les reflexions tenen la mateixa intensitat, això pot provocar que a un determinat temps algunes reflexions quedin saturades i no es puguin utilitzar. Una manera de resoldre aquest problema seria fer dues o més recollides de dades del mateix cristall, una a una distància llunyana del detector i un temps d'exposició curt (per recollir bé la baixa resolució) i una altra més a prop del detector i amb un temps d'exposició més llarg (per obtenir les taques d'alta resolució).

**Indexat, processat i escalat:** L'objectiu del pas anomenat indexat és determinar la simetria del cristall, les dimensions de la cel·la del cristall i el grup espacial. El programa utilitzat per predir la simetria és el DENZO (Otwinowski Z and Minor W 1997). En primer lloc es decideix el sistema cristal·lí o classe de cristall (triclínic, monoclínic, ortoròmbic, trigonal, tetragonal, hexagonal o cúbic) i com està centrada la cel·la (P, A, B, C, F, I ). Un cop sabent això es calculen les dimensions de la cel·la  $a$ ,  $b$ ,  $c$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ , es detecta el grup de simetria del cristall. Amb aquest anàlisi es determinarà la cel·la i grup espacial del cristall. Un cop s'ha obtingut aquesta informació, s'extreu la informació de les fotografies recollides i s'ha processat amb el programa DENZO i després s'ha escalat amb el programa SCALEPACK (Otwinowski Z and Minor W 1997). Aquest programa corregeix el valor de les intensitats tenint present el soroll de fons, el factor de polarització, d'absorció i la possible malmesa del cristall.

**Reemplaçament molecular:** El reemplaçament molecular, descrit per primer cop per Rossmann i Blow (1962), és un dels mètodes més utilitzats per a resoldre estructures de macromolècules. Aquest mètode es veu limitat per la necessitat de partir d'un model semblant al que es vol resoldre. En el cas d'aquesta tesi s'ha utilitzat l'estructura de la lipoxigenasa de *Plexaura homomolla* amb el domini N-terminal truncat (498-1066) com a model (codi

PDB: 2FNQ). L'objectiu és portar l'estructura coneguda del model al cristall de l'estructura desconeguda. Aquest mètode consta de dues etapes: una rotació on es determina l'orientació espacial de la molècula coneguda respecte la desconeguda, i una translació on la molècula correctament orientada es superposa a l'altra. El programa utilitzat per dur a terme aquest procediment ha estat el MOLREP (Vagin A and Teplyakov A 1997). La construcció manual de l'estructura s'ha realitzat amb el programa de gràfics COOT (Emsley P and Cowtan K 2004). Per afinar l'estructura s'ha utilitzat el programa REFMAC (Murshudov G N, Vagin A A et al. 1997).

En la taula següent (Taula 5) es mostren els paràmetres cristal·logràfics obtinguts de la difracció de raigs X del cristall de la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa*.

<b>Recol·lecció de dades i validació</b>	
<b>Data collection</b>	
Space group	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2
Cell dimensions	
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	132.7, 116.0, 42.6
α, β, γ (°)	90, 90, 90
Resolution (Å)	20 – 1.75 (1.81 -- 1.75)*
<i>R</i> <sub>sym</sub>	9.1 (63.0)
<i>I</i> / σ( <i>I</i> )	10.7 (2.5)
Completeness (%)	97.9 (97.0)
<b>Refinement</b>	
Resolution (Å)	20 – 1.75 (1.79 --1.75)
No. reflections	62,559 (4,440)
<i>R</i> <sub>work</sub> / <i>R</i> <sub>free</sub>	19.2 / 23.3 (25.7/29.3)
No. atoms	
Protein	4,890
Phospholipid	47
Glycerol	66
Water	600
<i>B</i> -factors (Å <sup>2</sup> )	
Protein	8.9
Phospholipid	15.1
Glycerol	29.4
Water	11.9
R.m.s. deviations	
Bond lengths (Å)	0.012
Bond angles (°)	1.54

**Taula 5.- Taula de paràmetres cristal·logràfics del cristall de la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa*. Els valors en parèntesi són per als valors amb alta resolució.**



El grup espacial assignat a aquest cristall,  $P2_12_12$  (la descripció de la simetria del cristall), correspon a un sistema de cristall ortoròmbic. Aquest sistema de cristall ortoròmbic és el resultat de l'extensió d'una xarxa cúbica al llarg de dos dels seus tres eixos per dos factors diferents, originant un prisma rectangular. Els tres eixos que defineixen el prisma són de diferent longitud i es creuen en angles de  $90^\circ$ . El cristall té una resolució de  $1.75 \text{ \AA}$ . Altres cristalls de lipoxigenases com és el cas de la lipoxigenasa de *Plexaura homomolla* o de *Glycine max*, presenten altres grups espacials ( $P2_1$ , sistema de cristall monoclínic), però això pot ser degut a les diferències en les condicions de cristal·lització. No és estrany que proteïnes de la mateixa família presentin grups espacials diferents podent-se donar el cas que, una mateixa proteïna cristal·litzada en diferents condicions, presenti grups espacials diferents.

### **3.2.3. Estructura general.**

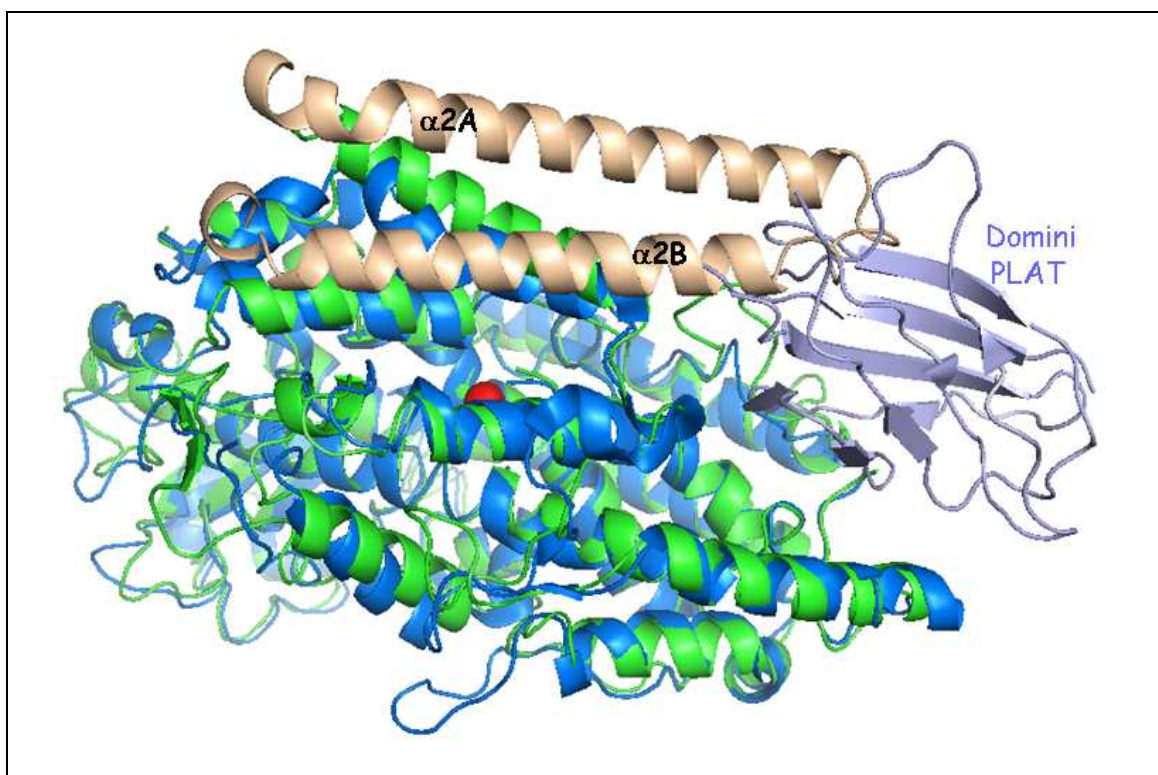
L'obtenció de l'estructura cristal·lina de la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa* permet fer un estudi fi de les cavitats que presenta, del centre actiu i dels residus que actuen com a lligands del ferro.

Les dades cristal·logràfiques indiquen que els 49 primers aminoàcids de l'extrem N-terminal de la seqüència no presenten estructura (estan altament desordenats) i no és fins l'aminoàcid 50, una isoleucina, on comença a estructurar-se la proteïna en forma de cristall. Aquest ordenament de l'estructura es manté fins a l'últim aminoàcid de la seqüència, la isoleucina en posició 685 de l'extrem carboxiterminal amb l'excepció de sis aminoàcids (Thr 201, Gln 202, Gly 203, Gly 204, Gln 205 i Gly 206).

Són vàries les diferències observades en aquest cristall respecte les altres estructures ja descrites de lipoxigenases.

La diferència més important a nivell d'estructura que presenta el cristall de la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa* respecte les lipoxigenases vegetals i animals descrites fins al moment (Figura 30), és l'absència del domini PLAT N-terminal format per 8 fulles  $\beta$  antiparal·leles, un domini no catalític present en totes les lipoxigenases eucariotes descrites fins el moment d'entre

110 i 150 residus (Neau DB., Gilbert NC. et al. 2009). La presència d'una inserció de 90 aminoàcids (des de l'Alanina 126 fins a la Valina 200) que s'estructura formant dues hèlix  $\alpha$  antiparal·leles (hèlix  $\alpha$  2A i hèlix  $\alpha$  2B) de 36 i 38 residus respectivament és el que modifica l'estructura general de la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa* fent-la una proteïna d'un sol domini, el domini catalític o C-terminal, ja que el domini PLAT N-terminal es perd (figura 30).



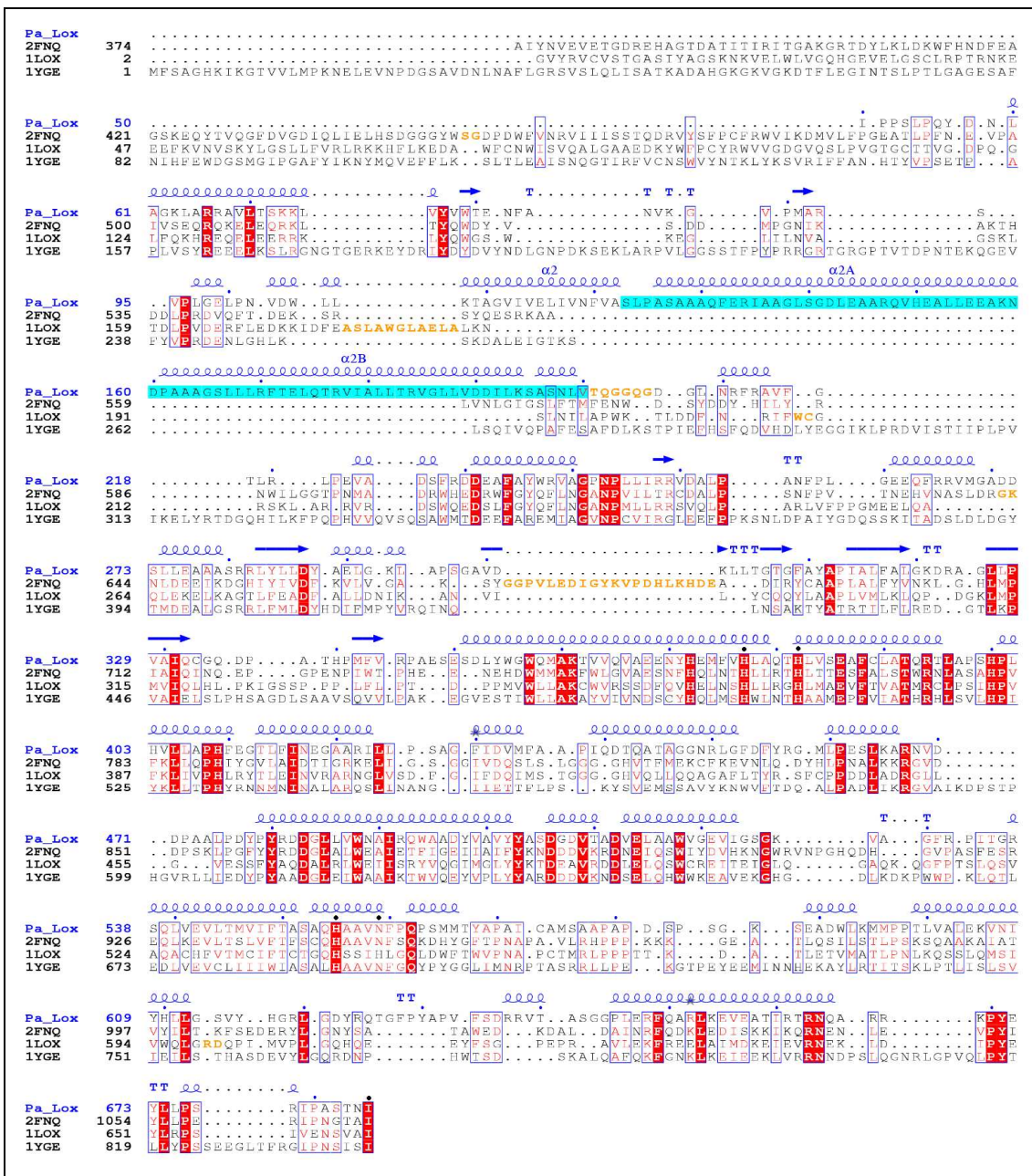
**Figura 30.- Sobreposició de les estructures de les lipoxigenases de *Plexaura homomolla* (2fnq), en color blau, i de *Pseudomonas aeruginosa* 42A2, en color verd, on s'observa com la part corresponent al domini catalític de la lox de *Plexaura homomolla* es sobreposa molt bé sobre la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa* 42A2. En color rosat es mostren les dues hèlix ( $\alpha$ 2A i  $\alpha$ 2B) formades per la inserció de 90 residus detectada en la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa* 42A2, en color blau turquesa es mostra el domini N-terminal PLAT present en la lipoxigenassa de *Plexaura homomolla* però absent en la de *Pseudomonas aeruginosa* 42A2.**

La presència d'aquesta inserció es pot observar perfectament en un alineament estructural de seqüència (figura 31) entre la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa* i les de *Plexaura homomolla* (2FNQ), reticulòcit de conill (1LOX) i la de *Glycine max* (1YGE). En la figura 31 es remarca en blau i sobre la seqüència de la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa* (Pa\_Lox) la part d'inserció corresponent a les hèlix  $\alpha$  2A i hèlix  $\alpha$  2B.

Un altra detall a destacar de l'estructura obtinguda és l'absència d'estructura des de l'aminoàcid 201 fins l'aminoàcid 206 (ambdós inclosos), aquests sis aminoàcids correspondrien a un "loop" d'unió entre l'hèlix  $\alpha$  2A i l'hèlix  $\alpha$  3 (Figura 31). Aquesta absència d'estructura indica que aquests residus tenen una gran mobilitat, això fa pensar que aquesta estructura de dues hèlix antiparal·leles pot moure's damunt la proteïna talment com una tapa que obre i tanca la cavitat per on s'introdueix el substrat per fer-lo arribar fins al centre actiu de la proteïna. És remarcable que aquests sis aminoàcids sense estructura no són comparables ni visibles en cap de les estructures ja descrites donat que no presenten aquestes dues hèlix  $\alpha$  antiparal·leles. En la figura 31 es poden veure marcats amb taronja aquests sis aminoàcids (TQGGQG), just després de les dues hèlix  $\alpha$  2A i 2B.

Un aspecte de l'alineament mostrat en la figura 31 i que mereix ser destacat, és la baixa homologia de seqüència (22%) entre la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa* i la de *Plexaura homomolla* (estructura utilitzada per a fer el reemplaçament molecular). Aquesta baixa homologia contrasta amb la gran homologia estructural (veure la sobreposició de les dues estructures en la figura 30) del domini catalític de les dues proteïnes, això fa pensar que aquesta estructura és la única possible que permet lligar un ferro i, a la vegada, permetre l'entrada d'un àcid gras poliinsaturat, ja sigui lliure o esterificat, per tal de modificar-lo introduint un grup hidroperòxid.

Per altra banda, el fet que en la coordinació de l'àtom de ferro hi intervingui l'aminoàcid carboxiterminal, requereix aquesta alta conservació de l'estructura ja que, com que la isoleucina terminal no forma part de cap estructura més "robusta", com podria ser una hèlix  $\alpha$  o un fulla  $\beta$ , la probabilitat de no situar correctament aquest residu en una estructura menys conservada seria molt elevada.



**Figura 31.- Alineament estructural de les lipoxigenases de *Pseudomonas aeruginosa* 42A2 (Pa\_Lox), de *Plexaura homomolla* (2FNQ), reticulòcit de conil (1LOX) i la de *Glycine max* (1YGE). Es mostra l'estructura secundària determinada per a la Pa\_Lox. Els residus mostrats en taronja són aquells que es perden en l'alineament respecte les altres estructures. L'absència del domini PLAT juntament amb la inserció (en blau) després de la hèlix  $\alpha 2$  es fa més que evident. Els punts negres indiquen els residus que coordinen l'àtom de ferro.**

Un altre aspecte novador d'aquesta estructura és l'observació d'un fosfolípid a l'interior de la proteïna, un fet inèdit fins el moment, doncs cap dels complexos de lipoxigenases descrits fins a l'actualitat contenen fosfolípids, i només en el cas de la lipoxigenasa de soja trobem un complex modelat amb àcid 13(S) hidroperòxid - 9(Z), 11(E) octadecenoic (Codi Protein Data Bank 1IK3) en el centre actiu (Skrzypczak-Jankun E, Bross RA et al. 2001). La relació enzim-substrat es tracta més profundament en l'apartat 4.2.5.

### **3.2.4. Esfera de coordinació del ferro.**

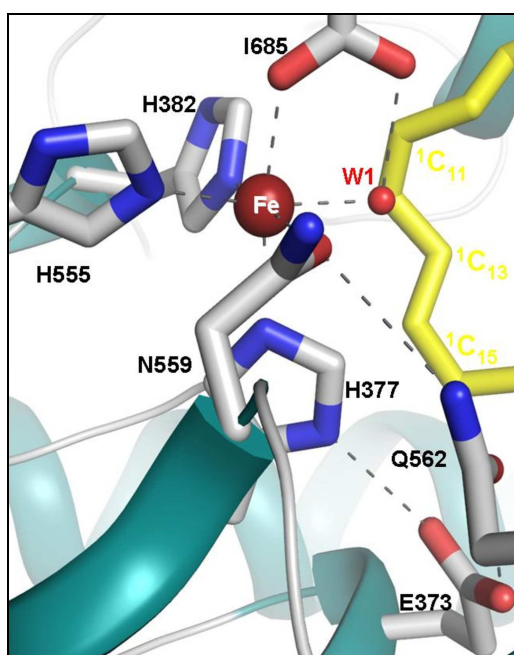
La coordinació de l'àtom de ferro és una estructura altament conservada en les lipoxigenases tant d'origen animal com d'origen vegetal, per tant, no ha de sorprendre que en aquesta lipoxigenasa d'origen bacterià, també resulti conservada.

Així doncs, el centre catalític en la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa* manté les característiques essencials descrites per a altres enzims lipoxigenasa (Brash RA 1999); (Boyington JC., Gaffney BJ. et al. 1993); (Minor W. 1996); (Choi J. 2008); (Neau DB., Gilbert NC. et al. 2009): un àtom de ferro no hemo amb una coordinació octaèdrica lleugerament distorsionada (figura 32). Els sis lligands de ferro corresponen als tres àtoms de nitrogen de les següents histidines: His377, His382 i His555 amb distàncies de coordinació de 2.24 Å, 2.18 Å and 2.15 Å, respectivament, a l'àtom d'oxigen de l'asparagina Asn559 a 2.37 Å, a un àtom d'oxigen del grup carboxilat de la isoleucina terminal Ile685 a 2.30 Å i a l'aigua (W1) a 2.26 Å (Figura 32). El segon oxigen carboxilat de la isoleucina Ile685 estableix un pont d'hidrogen amb l'aigua W1 molt fort i curt (2,46 Å), completant així la geometria característica de la primera esfera de coordinació de ferro en les lipoxigenases. Els angles d'unió dels lligands del ferro de la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa* són comparables amb els publicats per a altres lipoxigenases (taula 6).

	<i>P. aeruginosa</i> LOX	<i>G. max</i> 1-LOX
<b>Distàncies lligand-metall</b>		
Fe-His <sup>499</sup> N / Fe-His <sup>377</sup> N	2.29 Å	2.24 Å
Fe-His <sup>504</sup> N / Fe-His <sup>382</sup> N	2.13 Å	2.18 Å
Fe-His <sup>690</sup> N / Fe-His <sup>555</sup> N	2.19 Å	2.15 Å
Fe-Ile <sup>839</sup> O / Fe-Ile <sup>685</sup> O	2.07 Å	2.30 Å
<b>Angles lligand-metall-lligand</b>		
His <sup>499</sup> N-Fe-His <sup>504</sup> N / His <sup>377</sup> N-Fe-His <sup>382</sup> N	102,6 °	92,0 °
His <sup>499</sup> N-Fe-His <sup>690</sup> N / His <sup>377</sup> N-Fe-His <sup>555</sup> N	100,9 °	102,2 °
His <sup>504</sup> N-Fe-His <sup>690</sup> N / His <sup>382</sup> N-Fe-His <sup>555</sup> N	104,0 °	93,7 °
His <sup>690</sup> N-Fe-Ile <sup>839</sup> O / His <sup>555</sup> N -Fe-Ile <sup>685</sup> O	78,1 °	85,1 °
His <sup>504</sup> N-Fe-Ile <sup>839</sup> O / His <sup>382</sup> N -Fe-Ile <sup>685</sup> O	106,0 °	92,6 °
His <sup>499</sup> N-Fe-Ile <sup>839</sup> O / His <sup>377</sup> N -Fe-Ile <sup>685</sup> O	150,8 °	171,7 °

**Taula 6.- Comparació entre les distàncies dels lligands del ferro al ferro i els angles que formen entre la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa* i la de *Glycine max* (1-LOX).**

Els factors de temperatura atòmica i el mapa de densitat electrònica (comunicació personal del Dr. Carpena) suggereixen que l'àtom de ferro es troba en estat ferrós (Fe 2<sup>+</sup>).



**Figura 32.- Centre catalític de la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa*. Es mostren els 5 residus i l'aigua que coordinen l'àtom de ferro (H377, H382, H555, N559, I685 i W1) i els ponts d'hidrogen i de coordinació (línies discontinues) de la segona esfera de coordinació (Q562 i E373). També es mostra l'aproximació de cinc carbonis de la cadena 1 (groc) del fosfolípid, al ferro tot apilant-se a dues histidines de l'esfera de coordinació. En vermell es mostren els àtoms d'oxigen i en blau els de nitrogen.**



La conservació d'aquesta estructura es posa de manifest en l'alineament de les seqüències aminoacídiques que es poden observar en la figura 33 on es veu que els aminoàcids que coordinen l'àtom de ferro són els mateixos, a excepció de l'asparagina Asn559 de la lipoxigenasa de reticulòcit de conill que es veu modificada per una histidina, la His544.

Es pot veure com la distància en seqüència entre les dues primeres histidines de l'esfera de coordinació del ferro, es manté constant en les diferents seqüències (separació de quatre aminoàcids). El mateix passa en la segona parella d'aminoàcids de la coordinació del ferro (His-His per a la lipoxigenasa de conill o His-Asn per a la resta de lipoxigenases) que estan separats per a tres aminoàcids. Cal esmentar la intervenció de l'aminoàcid terminal en la coordinació de l'àtom de ferro com un aspecte també molt conservat.

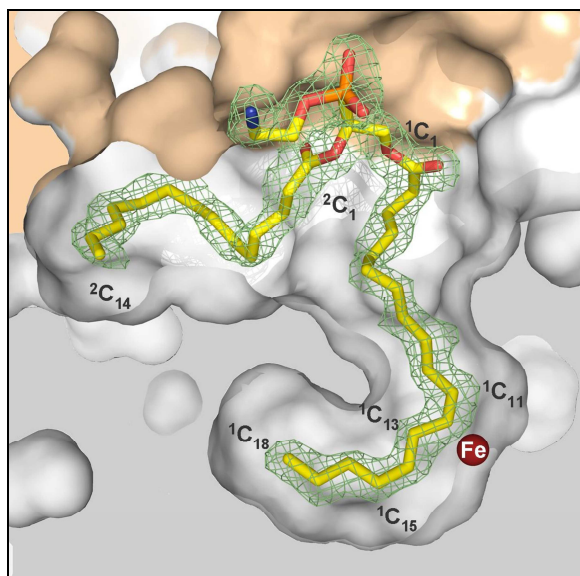
1LOX	LPTDPP-----MVWLLAKCWRSSDFQVHELNS <b>HLLRGHL</b> MAEVFTVATMRCLPSIHP	384
2FNQ	PHEENE-----HDWMAKFWLGVAESNFHQ <b>LNTHL</b> LR <b>THL</b> TTESFALSTWRNLA <b>SAHP</b>	414
NSPLOX	RPAESESDL---YWGQMAKTVVQVAEENYHEMFV <b>H</b> LAQ <b>TH</b> L <b>V</b> SEAFCLATQ <b>R</b> TLAP <b>SHP</b>	401
1YGE	SQVVLPAKEGVESTIWLLAKAYVIVNDSCY <b>H</b> QLMS <b>H</b> WL <b>N</b> TH <b>A</b> AAMEPFVIATHR <b>H</b> LSVL <b>H</b> PH	523
	* *	
1LOX	VFKLIVPHLRYTLEINVR <b>A</b> R <b>N</b> GLVSDFGIFDQIMSTGGGGHVQL <b>L</b> QOAGAF <b>L</b> TYR <b>S</b> FCPP	444
2FNQ	VFKLLQPHIYGVL <b>A</b> IDTIG <b>R</b> KELIGSGGI <b>V</b> DQSLSLGGGGHV <b>T</b> FMEKCFKEV <b>N</b> LQDY <b>H</b> LP	474
NSPLOX	LHVLLAPHFEGTLF <b>I</b> NEG <b>A</b> R <b>I</b> LLPSAGFIDVMFA <b>A</b> PIQDTQATAGGN <b>R</b> LGFDFY <b>R</b> GMLP	461
1YGE	IYKLLTPHYRNNMN <b>I</b> NAL <b>R</b> QSLINANG <b>I</b> IETTF <b>L</b> PS-KYSVEMSSAVYKN <b>V</b> FTDQ <b>A</b> LP	582
1LOX	DDLADRGLLG-----VESSFYAQDALRLWEIISRYVQ <b>G</b> IMGLY <b>K</b> TDEAVR <b>D</b> D	492
2FNQ	NALKKRGVDDPSK-----LPGFYR <b>D</b> DGLALWE <b>A</b> IET <b>F</b> IG <b>E</b> II <b>A</b> IF <b>Y</b> KNDD <b>D</b> VK <b>R</b> D	525
NSPLOX	ESLKARNVDDP <b>A</b> A-----LPDYPYR <b>D</b> DGLLVW <b>N</b> AIRQWAADY <b>V</b> VAVYASD <b>G</b> DVT <b>A</b> D	512
1YGE	ADLIKRGVAIKDPSTPHGV <b>R</b> LLIEDYPYA <b>A</b> DGLEIW <b>A</b> IK <b>T</b> WVQ <b>E</b> YVPLYAR <b>D</b> DDV <b>K</b> ND	642
1LOX	LELQSWCREITEIGLQ <b>G</b> ---AQKQGF <b>P</b> TS <b>L</b> Q <b>S</b> VAQACHF <b>V</b> TM <b>C</b> IF <b>T</b> CT <b>G</b> <b>O</b> <b>H</b> SS <b>I</b> <b>H</b> L <b>G</b> Q <b>L</b> D	549
2FNQ	NEIQSWIYDVHKNGWRV <b>N</b> PGHQDHG <b>V</b> PAS <b>F</b> ES <b>R</b> EQLKEV <b>L</b> TSLV <b>F</b> TF <b>S</b> C <b>O</b> <b>H</b> AA <b>V</b> <b>N</b> F <b>S</b> Q <b>K</b> D	585
NSPLOX	VELAAWVGEVIGSGK <b>V</b> AG-----FRPITGR <b>S</b> QLVEV <b>L</b> TM <b>V</b> I <b>F</b> T <b>A</b> S <b>A</b> <b>O</b> <b>H</b> AA <b>V</b> <b>N</b> F <b>P</b> Q <b>P</b> S	564
1YGE	SELQHWWKEAVEKG <b>H</b> GD <b>L</b> K---DKP <b>W</b> WPK <b>L</b> Q <b>T</b> LE <b>D</b> LVE <b>V</b> CL <b>I</b> II <b>W</b> IAS <b>A</b> L <b>H</b> AA <b>V</b> <b>N</b> F <b>G</b> Q <b>Y</b> P	699
	*	
1LOX	WFTWVPNAPCTMR <b>L</b> PP <b>P</b> TK-----DAT <b>L</b> ET <b>V</b> MA <b>T</b> L <b>P</b> N <b>L</b> K <b>Q</b> SS <b>L</b> Q <b>S</b> IM <b>S</b> IV <b>W</b> Q <b>L</b> GR <b>D</b> Q <b>P</b>	601
2FNQ	HYG <b>F</b> TP <b>N</b> AP <b>A</b> VL <b>R</b> H <b>P</b> PP <b>K</b> KG-----E <b>A</b> T <b>L</b> Q <b>S</b> IL <b>S</b> T <b>L</b> PS <b>K</b> S <b>Q</b> AA <b>K</b> A <b>I</b> AT <b>V</b> Y <b>I</b> L <b>T</b> K <b>F</b> S <b>E</b>	638
NSPLOX	MMTY <b>A</b> PA <b>I</b> C <b>A</b> MS <b>A</b> AP <b>A</b> PS <b>P</b> S-----G <b>K</b> SE <b>A</b> D <b>W</b> L <b>K</b> MM <b>P</b> PT <b>L</b> VA <b>L</b> E <b>K</b> V <b>N</b> I <b>Y</b> H <b>L</b> L <b>G</b> S <b>V</b> Y <b>H</b>	617
1YGE	Y <b>G</b> GL <b>I</b> MM <b>R</b> PT <b>A</b> SR <b>R</b> LL <b>P</b> E <b>K</b> GT <b>P</b> YE <b>E</b> MIN <b>N</b> HE <b>K</b> AY <b>L</b> RT <b>I</b> T <b>S</b> KL <b>P</b> TL <b>S</b> LV <b>I</b> E <b>I</b> L <b>S</b> TH <b>A</b> S	759
1LOX	----IMVPLGQH <b>Q</b> EEY <b>F</b> SG <b>P</b> ---E <b>P</b> RA <b>V</b> LE <b>K</b> FR <b>E</b> EL <b>A</b> IM <b>D</b> KE <b>I</b> EV <b>R</b> NE <b>K</b> -----L	644
2FNQ	----DER <b>Y</b> LGN <b>S</b> A <b>T</b> AW <b>E</b> D <b>K</b> ---D <b>A</b> L <b>D</b> A <b>I</b> N <b>R</b> F <b>D</b> K <b>L</b> E <b>D</b> I <b>S</b> K <b>K</b> I <b>K</b> Q <b>R</b> N <b>E</b> N-----L	681
NSPLOX	G <b>R</b> L <b>G</b> D <b>Y</b> R <b>Q</b> T <b>G</b> FP <b>Y</b> AP <b>V</b> FSD <b>R</b> RV <b>T</b> AS <b>G</b> PL <b>E</b> R <b>F</b> Q <b>A</b> R <b>L</b> KE <b>V</b> E <b>A</b> T <b>I</b> R <b>T</b> R <b>N</b> Q <b>A</b> -----R	667
1YGE	----DEV <b>Y</b> L <b>G</b> Q <b>R</b> D <b>N</b> PH <b>W</b> T <b>S</b> D---S <b>K</b> AL <b>Q</b> A <b>F</b> Q <b>K</b> F <b>G</b> N <b>K</b> L <b>K</b> E <b>I</b> E <b>E</b> K <b>L</b> V <b>R</b> R <b>N</b> ND <b>P</b> SL <b>Q</b> GN <b>R</b> L <b>G</b> P <b>V</b>	813
1LOX	D <b>I</b> PE <b>Y</b> LR <b>P</b> SI-----V <b>E</b> NS <b>V</b> A <b>I</b>	662
2FNQ	E <b>V</b> PY <b>I</b> Y <b>L</b> L <b>P</b> ER-----I <b>P</b> NG <b>T</b> A <b>I</b>	699
NSPLOX	R <b>K</b> PE <b>Y</b> Y <b>L</b> L <b>P</b> SR-----I <b>P</b> AST <b>N</b> I	685
1YGE	Q <b>L</b> PY <b>T</b> LL <b>Y</b> PS <b>S</b> EE <b>G</b> L <b>T</b> FR <b>G</b> IP <b>N</b> S <b>I</b>	839
	*	

**Figura 33.- Alineament de la seqüència aminoacídica de part del domini carboxiterminal de les lipoxigenases de *Pseudomonas aeruginosa* 42A2 (NSPLOX), de *Plexaura homomolla* (2FNQ), reticulòcit de conill (1LOX) i la de *Glycine max* (1YGE). Els residus mostrats en vermell indiquen els residus que coordinen l'àtom de ferro.**

### 3.2.5. Cavitats i substrat.

Donada l'alta resolució a la que s'ha obtingut el cristall, en la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa* es poden veure definides clarament dues cavitats. Una per al substrat (que està formada per dues subcavitats) i l'altra per a permetre l'arribada de l'oxigen molecular fins al centre catalític de la proteïna.

La primera és la cavitat del substrat que es subdivideix en dues cavitats perfectament definides per la presència d'un fosfolípid (Figura 34).



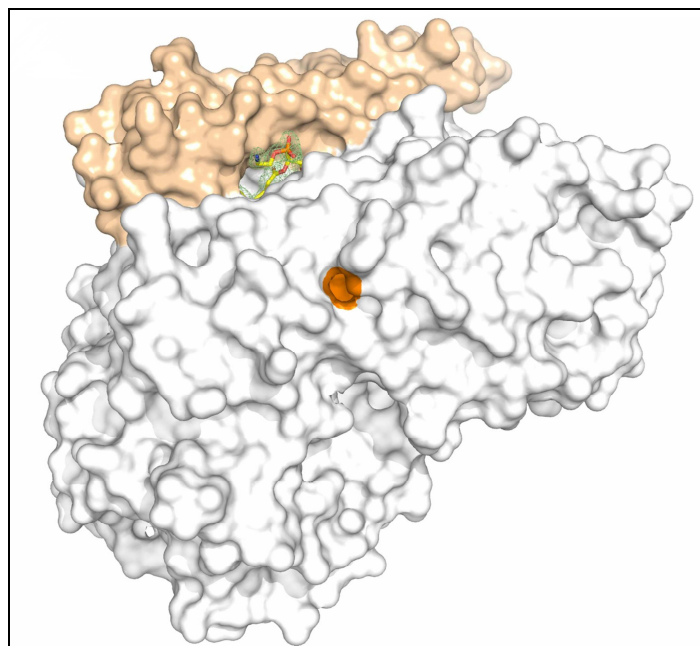
**Figura 34.-** Secció de la cavitat del substrat de la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa* mostrant el mapa de densitat electrònica de la fosfatidiletanolamina que defineix les dues subcavitats del substrat. Es pot observar com el cap polar del fosfolípid queda molt proper a les dues hèlix  $\alpha$ ,  $\alpha$ 2A i  $\alpha$ 2B (rosat).

Donada la bona qualitat del mapa de densitat electrònica obtingut del fosfolípid, aquest es pot identificar com a una fosfatidiletanolamina amb una cadena de 18 carbonis en la posició 1 i una altra de 14 carbonis en la posició 2 (Figura 34). La cadena de 18 carbonis podria correspondre a un àcid vaccènic ( $C_{18:1}$  *cis* 11) característic de les membranes d'*Escherichia coli* (Ratledge C. and Wilkinson SG. 1988).

Aquest fosfolípid s'ha d'haver incorporat a la lipoxigenasa durant la seva sobreexpressió en *Escherichia coli* i després, s'ha d'haver mantingut, amb

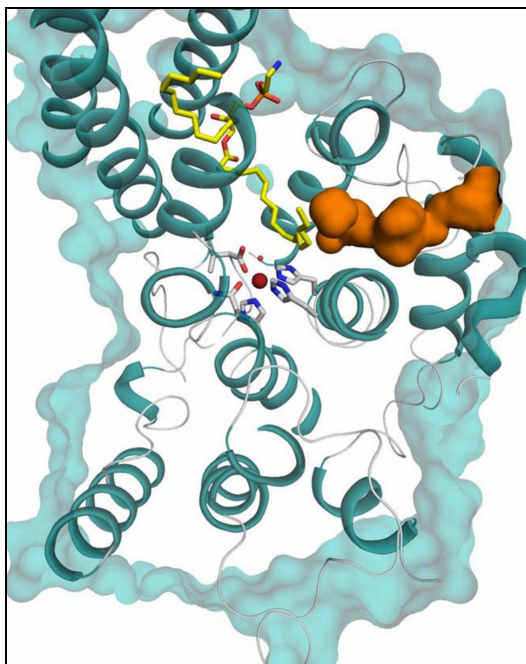


plena ocupació, durant tots els passos de la purificació i la cristallització. Cada una d'aquestes cadenes ocupa una de les subcavitats que conformen la cavitat del substrat. Aquesta cavitat és quasi completament hidròfoba a excepció de la presència de l'aigua W1, que actua com a lligand del ferro, i dels residus Tyr609 i Asn607 que es troben a la part inferior de les subcavitats 1 i 2 (respectivament) de la cavitat del substrat.



**Figura 35.- Representació de la superfície de la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa* on s'observa la cavitat de la fosfatidiletanolamina i el cap polar d'aquesta mateixa (entre la zona rosada que representa les dues hèlix  $\alpha$  ( $\alpha$ 2A i  $\alpha$ 2B) i la resta de la proteïna, en blanc). Marcat amb taronja es mostra l'entrada del canal que pot permetre l'entrada d'oxigen molecular fins al centre actiu.**

La següent cavitat que s'observa és un canal fortament hidrofòbic (no hi ha aigües visibles en el seu interior) que s'inicia a la superfície de la proteïna i arriba fins a la subcavitat 1, prop del carboni 15 de la cadena de 18 carbonis de la fosfatidiletanolamina (zona ataronjada de la figura 35 i de la figura 36). Aquest canal sembla molt adequat per permetre l'entrada d'oxigen al centre actiu de manera similar a la situació discutida per a altres lipoxigenases (Youn B., Sellhorn GE. et al. 2006). Els aminoàcids que defineixen aquest canal són: Val86, Gly88, Leu383, Glu386, Asn417, Ala421 i Gln443.



**Figura 36.- Representació de l'aproximació del canal (marró) que permet l'arribada de l'oxigen molecular al centre actiu de la lipoxigenassa des de la superfície d'aquesta (blau) fins la cavitat del substrat ocupada per la cadena 1 de la fosfatidiletanolamina (groc). Amb vermell es representa l'àtom de ferro i es mostren també els residus que el coordinen.**

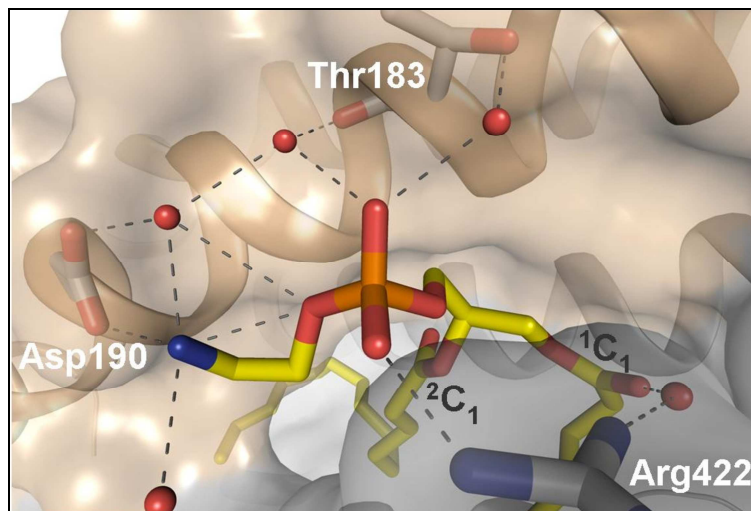
L'empaquetament observat en els extrems de les cadenes alifàtiques del fosfolípid suggereix que ambdues subcavitats podrien acomodar cadenes de dos o quatre carbonis més com és el cas de l'àcid araquidònic (C<sub>20:5,8,11,14</sub>). La cadena alifàtica en posició 1 (C1) presenta una conformació doblegada amb l'extrem metil corbat cap al cap polar del lípid (Figura 34), la distància entre el carboni 1 i el carboni 18 d'aquesta cadena és de 13,56 Å. Els cinc carbonis que es troben entre el carboni 10 i el carboni 14 equidisten del ferro uns 5,14 Å (de mitjana) i de l'aigua que coordina el ferro, uns 3,69 Å. La geometria determinada per aquesta cadena, tenint en compte que la posició dels dobles enllaços no ha estat directament observada degut a que la resolució del cristall no ho permet, suggereix que la cavitat on es troba, afavoreix una conformació *cis*, generalment associada amb els enllaços insaturats dels àcids grassos. Entre els carbonis en posició 11-12 i en posició 14-15, trobem una desviació del pla de 16° i 50° respectivament. El suposat doble enllaç entre els carbonis 11 i 12 és el més proper al ferro i els hidrògens associats a aquests carbonis es troben a la banda oposada a la del metall. Els carbonis 14 i 10 es situen sobre els anells dels residus His382 i His377 respectivament, a una distància de 3,9 Å del nitrogen d'aquests lligands del ferro. Pel que fa al suposat doble enllaç que hauria d'haver entre els carbonis 14 i 15 necessari per a formar el grup

pentadiè, els 50° de desviació del pla entre l'un i l'altre n'indiquen l'absència, això fa que el substrat no sigui l'adequat per a aquest enzim, el que explicaria per què seguim trobant aquest constructe enzim-substrat consolidat i sense reaccionar.

La geometria per a la segona cadena d'àcid gras de la fosfatidiletanolamina que està ocupant la subcavitat 2 de la cavitat del substrat, la cadena de 14 carbonis en posició 2, no ha estat descrita en cap altre estructura de lipoxigenasa. Aquesta geometria suggereix que la conformació *cis* entre els àtoms de carboni 5 i 6, seria la més afavorida tot i que en aquest cas, la desviació del pla entre l'un i l'altre és de 31°, cosa que, de nou, n'indicaria la seva absència.

Sobre aquestes bases, el fosfolípid unit a la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa* més probable és O-(sn-1-*cis*-vaccenil-sn-2-miristoil-sn-glicèric-3-fosforil) etanolamina, encara que una cadena sn-1-estearoil també és possible. L'àcid *cis*-vaccènic és un àcid gras d'*Escherichia coli* que pot ser particularment abundant en cultius incubats a baixa temperatura. Una cadena tan curta com l'observada de 14 carbonis ocupant la posició sn-2 del glicerolípid no és comú.

El cap polar de la fosfatidiletanolamina es troba parcialment exposat al dissolvent i també forma dos enllaços iònics amb la proteïna (figura 37). El primer, entre el grup fosfat de la fosfatidiletanolamina i el grup guanidina del residu Arg422, i el segon entre el grup amino terminal de la fosfatidiletanolamina i el grup carboxílic del residu Asp190 de l' $\alpha$  hèlix 2B. La presència de la contigüitat espacial dels residus Asp190 i Arg422 (Figura 37) semblaria indicar que aquesta lipoxigenasa és molt adequada per a captar fosfolípids zwitterions, en particular, amb petits grups carregats positivament en posició terminal com és el cas de la fosfatidiletanolamina observada en el cristall.

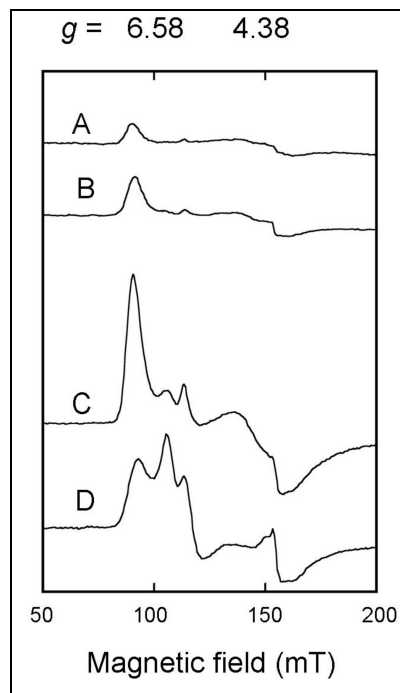


**Figura 37.- Enllaços iònics entre el cap polar del fosfolípid i els residus Asp190 i Arg422 de la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa* que suggereixen una especificitat per fosfolípids zwitterionics.**

La cadena lateral del residu Arg422 presenta flexibilitat cosa que ofereix versatilitat a l'hora d'unir-se als grups àcids dels diferents substrats. De fet, en la majoria de les seqüències de lipoxigenases, en la posició equivalent a l'arginina 422 de la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa*, o en el residu previ, sol haver-hi una arginina (figura 33), podent interactuar amb el grup carboxilat dels àcids grassos corresponents del substrat (Coffa G. 2004).

### **3.2.6. EPR: Ressonància paramagnètica electrònica.**

Les dues formes oxidades del ferro (ferrós  $\text{Fe}^{2+}$  i fèrric  $\text{Fe}^{3+}$ ) són intermediaris en la catàlisi de la lipoxigenasa. Mostres de la lipoxigenasa purificada a concentracions que van de 0.1mM a 0.4mM no presenten senyal d'EPR fet que recolza la idea que quan la lipoxigenasa està inactiva, la forma de ferro que conté és la de l'estat ferrós ( $\text{Fe}^{2+}$ ) que en el seu estat fonamental no és un paramagnètic i per tant no és detectable mitjançant la tècnica de l'EPR. En afegir a la mostra de proteïna 13S-HPODE (13S-hydroperoxy-9Z,11E-octadecadienoic àcid), s'observen senyals d'EPR de l'estat fèrric d'alt espin (figura 38) tot i que l'oxidació és relativament lenta i requereix uns deu minuts a temperatura ambient per a completar la reacció (figura 38A i B).

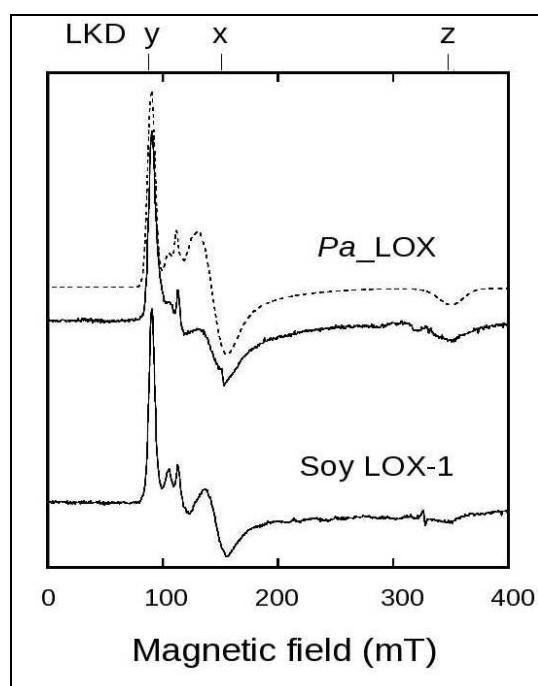


**Figura 38.- Espectre d'EPR del ferro en estat fèrric de la lipoxigenasa oxidada de *Pseudomonas aeruginosa*. Es mostra l'espectre d'EPR en la zona baixa del camp magnètic de la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa* del ferro en estat fèrric d'alt spin. L'agent oxidant és 13S HPODE. (A i B): espectre quan s'afegeix un sol equivalent de l'agent oxidant, la intensitat màxima del senyal s'obté als deu minuts a temperatura ambient (A: després d'1 min; B: després de 10 min), (C) amb deu vegades més agent oxidant (10 min) s'obté la màxima intensitat de senyal, que resulta en dos components de senyal d'EPR per a l'estat fèrric del ferro, (D) després de l'addició d'etanol a l'1%.**

L'oxidació completa del ferro (de  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$ ) ha estat confirmada per comparació (Figura 39) amb l'espectre de la lipoxigenasa LOX-1 de *Glycine max* (Gaffney BJ, Mavrophilipos DV et al. 1993). Es requereix un excés de 10 equivalents de HPODE per tal d'obtenir una intensitat de senyal màxima d'EPR (Fig 38C). Tot i que els espectres obtinguts són lleugerament diferents amb diferents buffers, s'observa un canvi notable quan s'afegeix etanol a la mostra (la mostra usada per a la figura 38C, dona la figura 38D quan s'hi afegeix etanol a l'1%). Els senyals d'EPR corresponen a dues espècies de  $\text{Fe(III)}$  amb simetries diferents, de les quals una d'elles, la de simetria ròmbica, és dominant. (figura 38 a-c). La transició entre els doblets de Kramers més baix i mitjà dona lloc a una ressonància a  $g = 7.23$  i  $g \sim 2$  pel doblet d'energia més baix (veure l'escala superior de la figura 38 i figura 39) i la banda ampla amb màxim a 136 mT i mínim a 160 mT, centrada a  $g = 4.2$ , pel doblet d'energia mitjà. L'addició d'etanol a la mostra dona com a resultat una alteració de

l'espectre (figura 38D). En el nou espectre apareixen amb una intensitat elevada dos nous pics a  $g \sim 103$  mT i  $g \sim 106$  mT, disminuint en part el pic corresponent a  $g = 7.23$ .

La interpretació d'aquests resultats és que el centre de l'àtom de ferro de la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa* té una simetria axial, amb diferents graus de distorsió ròmbica essent influenciada per la mateixa proteïna i per una feble afinitat amb alguns components del dissolvent. La presència del fosfolípid en la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa* usada per a fer experiments d'EPR ha estat confirmat per anàlisi d'ICP-MS de P/Fe obtenint una relació de 0,8 per a la lipoxigenasa de *Pseudomonas* i absència de P per a la lipoxigenasa LOX1 de soja (soroll de fons del tampó substret). És remarcable que l'espectre d'EPR per aquesta lipoxigenasa que conté un fosfolípid s'assembla molt als d'altres lipoxigenases que, inicialment, tenen les cavitats del substrat buides (Gaffney BJ, Mavrophilipos DV et al. 1993).



**Figura 39.- Comparació de l'espectre d'EPR del ferro en estat fèrric de la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa* (Pa\_LOX) i de la lipoxigenasa de *Glicine max* (Soy LOX-1). Totes dues mostres dels espectres estaven a una concentració de 0,118 mM en tampó fosfat potassi 0,2 M a pH 7,0. Ambdues proteïnes s'han oxidat amb 13S-HPODE, se n'ha utilitzat un equivalent per oxidar la LOX-1 i deu equivalents per a oxidar la Pa\_LOX**

### 3.2.7. Consideracions globals

La diferència més evident entre la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa* i les lipoxigenases d'organismes eucariotes descrites fins aquest moment és l'absència del domini PLAT N-terminal i la presència de dues hèlix  $\alpha$  antiparal·leles conformat una inserció de 90 aminoàcids no observada en cap altre lipoxigenasa. Aquestes dues hèlix se situen sobre el què, en les lipoxigenases eucariotes, és el domini catalític de la proteïna i; sobre l'obertura a la superfície de la cavitat del substrat. La situació d'aquestes dues hèlix, juntament amb l'absència d'estructura per al loop d'unió entre aquestes dues hèlix i la resta de la proteïna, fa pensar que aquesta inserció actua com a "tapa" de la cavitat del substrat ja que l'absència d'estructura en aquest loop està indicant que és una zona amb una alta mobilitat. Aquesta mobilitat permetria que, amb un moviment de rotació sobre la hèlix  $\alpha 2A$ , la cavitat del substrat quedés més exposada a l'exterior permetent, així, l'entrada del substrat a la cavitat. Aquesta hipòtesi es veu reforçada si tenim en compte que les interaccions d'aquestes dues hèlix es donen exclusivament entre elles mateixes i amb la hèlix 2 de manera que el moviment d'aquesta estructura està poc limitat.

Un altre aspecte molt interessant d'aquesta nova estructura descrita per aquesta lipoxigenasa d'origen procariota i que recolza la hipòtesi exposada anteriorment, és que el substrat observat, la branca alifàtica de 14 carbonis que ocupa la subcavitat més allunyada del centre actiu, interactua amb aquestes dues hèlix.

A més a més, la branca alifàtica de 14 carbonis del fosfolípid interactua amb l'hèlix  $\alpha 2$  mentre que el cap polar del fosfolípid es troba parcialment exposat al dissolvent i forma dos enllaços iònics amb la proteïna, un d'ells amb el residu Asp190 que forma part de l'hèlix  $\alpha 2B$ . Les interaccions entre la cadena alifàtica de 14 carbonis i la proteïna, permetrien "ancorar" el fosfolípid a la proteïna de manera que l'altre cadena alifàtica (cadena més llarga de 18 carbonis) tendria a entrar a l'altre subcavitat que s'acosta al centre catalític de l'enzim per tal que tingués lloc la reacció d'hidroperoxidació. Per altra banda, les unions del cap polar del fosfolípid amb l'hèlix  $\alpha 2B$  farien que, quan aquestes

dues hèlix antiparal·leles fessin el moviment d'“obertura”, tot el fosfolípid fos “estirat” cap a l'exterior de manera que aquestes interaccions ajudarien en el procés d'alliberació del substrat, un cop hidroperoxidat.

Així doncs, l'estructura descrita anteriorment i la presència dels residus Asp190 (carrega negativa) i Arg422 (càrrega positiva) amb una disposició espacial específica semblen indicar que aquesta lipoxigenasa permet perfectament l'acomodació d'un fosfolípid zwitterió (compost químic elèctricament neutre però que té càrregues formals positives i negatives en àtoms diferents) en la cavitat del substrat i particularment fosfolípids amb petits grups carregats positivament com pot ser el cas d'aquesta fosfatidiletanolamina observada en el cristall, amb una càrrega positiva en el grup amino terminal (formant un enllaç iònic amb l'àcid aspàrtic en posició 190).

L'absència del domini PLAT planteja diverses qüestions ja que, per aquest domini que és present en totes les lipoxigenases d'origen eucariota, s'ha suggerit una interacció depenent de  $\text{Ca}^{2+}$  directa amb la membrana per a lipoxigenases vegetals i altres interaccions proteïna-proteïna i proteïna-lípid per analogia amb les lipases (Ponting CP. and Aravind L. 1999). Així doncs, si aquesta lipoxigenasa no presenta cap estructura que l'associï a membranes o a proteïnes de membrana, quina funció o rol biològic té aquest enzim? La inserció observada en aquesta lipoxigenasa procariota pot ser present en altres lipoxigenases procariotes com és el cas de la de *Burkholderia thailandensis* E263 però el paper biològic d'aquesta lipoxigenasa tampoc ha estat descrit.

Un altre aspecte que planteja qüestions és l'alta conservació que es detecta en la primera esfera de coordinació del ferro. Això fa pensar que aquesta estructura és l'única que permet dur a terme la reacció d'hidroperoxidació sobre un grup pentadiè d'un àcid gras.

Les diferents lipoxigenases produeixen diverses addicions d'oxigen en cadenes poliinsaturades i de forma específica. El mecanisme d'addició implica un protó-electró acoblat a la transferència d'un hidrogen, pas que presenta un dels principals efectes isotòpics cinètics observats durant la reacció. S'ha fet un progrés considerable en la comprensió d'aquests aspectes de la catàlisi de les



lipoxigenases mitjançant el modelatge de substrats dins les diferents estructures de lipoxigenases i amb estudis cinètics i de mutació. No obstant això, no ha estat fins aquesta tesi que s'ha obtingut una estructura amb un àcid gras no oxidat ocupant totalment la cavitat del centre actiu.

La geometria determinada en la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa* del lípid de la cadena 1C del fosfolípid descrit (cadena de 18 carbonis) suggereix que un veritable substrat per a lipoxigenases, aquell que contingui un grup 1-4, Z-Z, pentadiè, podria reaccionar amb aquesta lipoxigenasa si fos activa ( $\text{Fe}^{3+}\text{-OH}$ ) per tal de formar un sistema intermediari radical deslocalitzat de cinc carbonis (pentadienil) amb el sistema  $\pi$  recolzat sobre els anells de dos histidines que es troben lligant el ferro a la proteïna. La planitud d'aquest radical intermediari forçaria que un dels extrems del radical pentadienil es trobés lluny del ferro cosa que facilitaria la posterior addició regioselectiva de l'oxigen.

El suposat doble enllaç en posició 11/12 de la cadena 1C es troba en la mateixa posició que el penúltim doble enllaç de l'àcid araquidònic i, amb l'àcid araquidònic com a substrat, l'hidrogen s'abstendria en el carboni 13. El mecanisme general acceptat de les lipoxigenases té l'hidroxil lligand del ferro (aigua) com a acceptor final de la transferència de l'hidrogen. En l'estructura obtinguda en aquesta tesi, els dos hidrògens del carboni 13 de la cadena 1C del fosfolípid s'estimen a una distància de 3,96 i 5,06 Å de l'aigua, que actua com a lligand del ferro, i a 5,80 i 6,52 Å de distància del ferro. Alternativament, i prenent el suposat doble enllaç C11/12 de la cadena 1C com a model del doble enllaç de C12/13 de l'àcid linoleic, els hidrògens del carboni 10 serien els del carboni 11 del linoleat que es troben a 2,97 i 3,48 Å de l'aigua (4,73 i 5,52 Å del ferro), distàncies notablement més curtes que les anteriorment esmentades i que permetrien que l'hidroxil de l'aigua acceptés l'hidrogen transferit. En el cicle catalític de les lipoxigenases generalment acceptat és inherent la necessitat que, en el cicle del ferro, fèrric-ferrós-fèrric, l'estat ferrós natiu ha de ser preactivat mitjançant el consum d'un equivalent de HPODE (Kulkarni AP 2001).

Els resultats dels estudis d'EPR de la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa* està d'acord amb aquestes premisses bàsiques, però s'observen

diferències quan es comparen amb els resultats obtinguts amb la lipoxigenasa de soja LOX-1 (Gaffney BJ, Mavrophilipos DV et al. 1993).

L'espectre d'EPR de la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa* té dos components amb uns paràmetres E/D (paràmetre que dóna informació sobre l'energia i la simetria del component) essencialment idèntiques a les trobades per la lipoxigenasa de la soja tot i que difereixen de dues maneres diferents.

En primer lloc, la forma de la línia en l'espectre d'EPR de la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa* s'obté d'igual manera ja sigui oxidant l'enzim amb HPODE o si reacciona amb l'àcid linoleic com a substrat (aquest espectre persisteix durant hores i hores d'emmagatzematge de mostres a 4°C). Amb la soja, un espectre similar, és a dir sense segon component substancial, només s'observa fent una ràpida congelació de les proteïnes a baixes concentracions ( $\leq 0,1$  mM), després de l'oxidació amb 13S HPODE pur.

En segon lloc, el nombre d'equivalents de HPODE necessaris per proporcionar la màxima intensitat de senyal de l'estat fèrric del ferro en l'EPR és d'1 per a la lipoxigenasa de soja i de 10 per a la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa*. Altres estudis d'espectroscòpia (Solomon EI., Zhou J. et al. 1997) han comparat els espectres d'EPR de la forma fèrrica del ferro de la lipoxigenasa de soja, amb compostos de ferro model, amb la conclusió que la forma de ferro amb una distorsió ròmbica més gran (la forma que s'observa en la figura 4 dels espectres 4 A, B i C) correspon a un ferro coordinat amb cinc lligands. L'enllaç entre el residu Asn559 i el ferro de la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa* té una longitud de 2,37 Å però en altres estructures de lipoxigenases de soja oscil·la entre 2.87-3.3 Å (Boyington JC., Gaffney BJ. et al. 1993);(Minor W. 1996; Youn B., Sellhorn GE. et al. 2006). A partir d'aquestes observacions es pot suggerir que l'espectre d'EPR característic (Figura 38C) és el resultat de que l'enllaç Fe-Asn559 en la primera forma fèrrica ( $Fe^{3+}$ ) de l'intermediari en la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa* que no pas en la lipoxigenasa inactiva en estat ferrós ( $Fe^{2+}$ ).

El fet que el ferro de la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa* pugui ser oxidat per un àcid gras HPODE planteja una qüestió interessant sobre la possible entrada de substrat o HPODE a la cavitat del substrat quan aquesta ja

està ocupada per una cadena de lípids. La baixa solubilitat dels fosfolípids en aigua fa poc probable que el fosfolípid present en la lipoxigenasa sigui completament eliminat de la proteïna quan s'està canviant l'estat del ferro de  $Fe^{2+}$  a  $Fe^{3+}$  (oxidació de ferrós a fèrric). S'ha discutit molt sobre com es dona l'entrada del substrat a la cavitat buida, si ho fa amb l'extrem metil per davant, o si ho fa amb l'extrem carbonil per davant. Doncs bé, vista la reactivitat que es dona quan s'ajunten la lipoxigenasa amb el fosfolípid en la cavitat i el 13S-HPODE (màxima intensitat de senyal d'EPR quan es treballa amb 10 equivalents de 13S-HPODE per un de lipoxigenasa amb fosfolípid) i la forma de la cavitat del substrat, que s'acosta al ferro i després fa un gir acostant-se a la superfície de la proteïna (Neau DB., Gilbert NC. et al. 2009); (Choi J. 2008); (Youn B., Sellhorn GE. et al. 2006), és fàcil suggerir que l'entrada del substrat es dona amb l'extrem metil terminal per davant.

La gran cavitat d'unió de substrat que presenta la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa* i que conté un fosfolípid sembla especialment dissenyada per a acceptar els fosfolípids zwitteriònics. A més a més, l'especificitat de les lipoxigenases cap a fosfolípids poliinsaturats, que poques vegades són presents en els bacteris, obre un nou marc d'estudi en la recerca de les funcions biològiques de les lipoxigenases procariotes. La secreció de les lipoxigenases de bacteris podria permetre la modificació dels fosfolípids de les cèl·lules eucariotes de les proximitats dels bacteris. Aquest nou rol funcional de les lipoxigenases procariotes, podria complementar les activitats atribuïdes a un grup especial de toxines microbianes enzimàtiques, en particular, fosfolipases bacterianes i esfingomielinases, actuant a nivell de membrana de la cèl·lula hoste (Montes LR, Ibarguren M et al. 2007).



## **4. CAPÍTOL 2: Prospecció metagenòmica de noves lipoxigenases**



## **4.1. Material i mètodes**

### **4.1.1. Recollida de mostres i extracció de DNA de sòls.**

Les mostres de sòl per a la generació de la biblioteca metagenòmica van ser recollides en una àrea propera al Departament de Tecnologia de l'escola de Ciències Agràries i de Medicina Veterinària de la Universitat de l'Estat de Sao Paulo (UNESP - Jaboticabal / Brasil). Aquesta àrea ha estat cultivada des de l'any 1996 amb *Eucalyptus* spp.

En total es van recollir 20 mostres de sòl en vint punts diferents (de 0 a 20 centímetres de profunditat). L'estratègia de mostreig fou per atzar en zig-zag. Les mostres varen ser homogenitzades resultant una única mostra representativa dels 20 punts de mostreig. Posteriorment, amb 0.5 grams d'aquesta mostra, es va procedir a l'extracció de DNA metagenòmic amb el *kit* Fast DNA Spin Kit for Soil (Q Bio gene), d'acord amb les instruccions del fabricant.

### **4.1.2. Construcció d'una llibreria metagenòmica amb còsmids.**

La llibreria metagenòmica utilitzada per a aquest estudi va ser construïda usant el *kit* pWEB-TNC™ Cosmid Cloning Kit (Epicentre Biotechnologies). El DNA metagenòmic es va fragmentar pipetejant-lo repetidament amb una pipeta P20 fins obtenir la mida desitjada d'insert, entre 20 i 40 Kb. Aquests fragments van ser separats per electroforesi en gel d'agarosa, es van extreure les bandes compreses entre els 20 i els 40 Kb, es va purificar el DNA i es va lligar en el vector còsmid pWEB-TNC™.

La mescla de lligació es va empaquetar en un fag lambda usant el *kit* MaxPlax Lambda Packaging Extracts (Epicentre). Seguidament es va transformar la soca *Escherichia coli* EPI100™-T1R, els transformants es van seleccionar en plaques d'agar Luria-Bertani amb 70 µg/ml d'ampicil·lina. Les colònies transformades es van transferir en plaques microtiter de 96 pous (Nalgene, Rochester, NY) amb medi Luria-Bertani amb 70 µg/ml d'ampicil·lina. Es van incubar durant 22 hores a 37°C i a 180 rpm, posteriorment es van

congelar a  $-80^{\circ}\text{C}$  prèvia addició de glicerol com a crioprotector. La mida final de la biblioteca metagenòmica és de 9024 clons (94 plaques x 96 clons).

#### **4.1.3. Gels d'agarosa**

S'ha utilitzat la electroforesi en gel d'agarosa per a separar els diferents fragments de DNA obtinguts en les extraccions de DNA de sòls, per a la seva fragmentació i per a la selecció de productes resultants de les reaccions de PCR en funció de la seva mida. Variant la concentració d'agarosa s'obté una major eficiència en la separació dels fragments de DNA (Sambrook J., Fritsch E. et al. 1989).

S'han utilitzat gels a l'1% d'agarosa (Pronadisa) i  $1\mu\text{g/ml}$  de bromur d'etidi (Sigma) en tampó TAE mitjançant una cubeta d'electroforesi *minisub DNA Cell* (BioRad SA, Madrid). El tampó TAE es prepara concentrat 50 vegades (1L: 242 g Tris, 57,1 ml àcid acètic glacial i 100 ml EDTA 0,5M a pH 8.0) i s'utilitza per diluir l'agarosa i com a tampó d'electroforesi a una concentració final de 40mM de Tris-Acètic i 1 mM d'EDTA.

Les mostres es mesclen amb un tampó de càrrega en proporció 5:1 (volum:volum), que conté un 30% de glicerol, un 0,25% de blau de bromofenol i un 0,25% de xilencianol. Per determinar la mida dels fragments de DNA es compara la seva mobilitat electroforètica amb uns marcadors "1Kb Ladder" (Promega) i "Analytical Marker DNA Wide Range" (Promega) en funció de la mida de banda buscada. El primer presenta bandes que van de 10000 fins a 250 parells de bases, mentre que el segon les presenta de 29950 fins a 702 parells de bases.

Un cop realitzada l'electroforesi, per visualitzar els fragments de DNA, els gels d'agarosa es submergeixen durant 15 minuts en una dissolució de bromur d'etidi (Sigma, EEUU) a una concentració de  $0,75\mu\text{g/ml}$  en aigua destil·lada. Passat aquest temps, mitjançant la llum ultraviolada d'un sistema d'ImageMaster® (Pharmacia Biotech, Suïssa), es poden observar els fragments de DNA ja que el bromur d'etidi té la capacitat d'intercalar-se entre les bases de l'àcid nucleic i emetre fluorescència en ser irradiat amb llum UV.



La concentració de DNA present en les mostres s'ha determinat mitjançant un espectrofotòmetre NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). La recuperació de les bandes de DNA s'ha fet amb el *kit* Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) basat en el principi d'adsorció del DNA a una resina de sílica, prèvia fusió de l'agarosa, i l'el·lució d'aquest per la diferència de pH i la concentració de sals dels tampons utilitzats (Volgestein B. and Gillespie D. 1979).

#### 4.1.4. Disseny d'encebadors específics i degenerats.

Els encebadors específics es van dissenyar amb el programa Gene Runner a partir de la seqüència de la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa* 42A2 (Accés GenBank AF479686.2 i GI:283788580) sense el pèptid senyal. Els encebadors degenerats es van dissenyar amb el programa DePict 2.0 a partir de les seqüències de lipoxigenases bacterianes extretes del GeneBank (taula 7) i sota les següents condicions:

- Seqüències alineades i carregades amb format Clustal
- Rang de longitud permesa de l'encebador: 18 – 25 pb
- Rang de longitud del producte de PCR permès: 300 a 5000 pb
- Encebadors produïts amb extrems cohesius
- Degeneració màxima acceptada: 1024

Organisme	Acc. Number - GI
<i>Myxococcus xanthus</i> DK 1622 Deltaproteobacteria	NC_008095.1 - 108756767
<i>Polyangium cellulorum</i> Deltaproteobacteria	AAAY32974.1 - 63099951
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 Gammaproteobacteria	NC_002516.2 - 110645304
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14 Gammaproteobacteria	CP000438.1 - 115583796
<i>Shewanella woodyi</i> ATCC 51908 Gammaproteobacteria	NZ_AAUO01000010.1 - 118072427
<i>Shewanella woodyi</i> ATCC 51908 Gammaproteobacteria	NZ_AAUO01000023.1 - 118073771
<i>Shewanella woodyi</i> ATCC 51908 Gammaproteobacteria	ZP_01543473.1 - 118075346
<i>Shewanella denitrificans</i> OS217 Gammaproteobacteria	NC_007954.1 - 91791369
<i>Photobacterium profundum</i> 3TCK Gammaproteobacteria	ZP_01218321.1 - 90410305
<i>Nitrosomonas europaea</i> ATCC 19718 Betaproteobacteria	NP_841292.1 - 30249222
<i>Nitrospira multififormis</i> ATCC 25196 Betaproteobacteria	NC_007614.1 - 82701135
<i>Burkholderia thailandensis</i> E264 Betaproteobacteria	CP000086.1 - 83652219
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120 Cyanobacteria	NP_478445.1 - 17227394
<i>Cyanothece</i> sp. CCY0110 Cyanobacteria	NZ_AAXW01000016.1 - 126658225

**Taula 7.- Lista de seqüències usades per al disseny dels encebadors degenerats**

#### 4.1.5. PCR i PCR de seqüenciació.

##### 4.1.5.1. PCR

La reacció en cadena de la polimerasa o PCR amb encebadors degenerats i específics, s'ha realitzat a un volum final de 20 µl en dos tipus de termocicladors diferents: el *2720 Thermal Cycler* (Applied Biosystems) i el *Veriti 96 Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems).

Per a les PCRs amb encebadors degenerats i amb encebadors específics s'han usat les següents condicions:

#### Mescla de reactius per a la PCR

Encebadors	100-200 pM
Tampó (x10)	2 µl
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	0,8 µl
dNTP's	0,4 µl
Taq Polimerasa 5U/µl	0,2 µl
DNA motlle	60-80 ng
Aigua Milli-Q autoclavada	fins a 20 µl

El programa de PCR aplicat en el termociclador en el cas de la reacció amb encebadors degenerats (taula 8) i el programa per a encebadors específics (taula 9) són els següents:

#### Programa de la reacció d'amplificació amb encebadors degenerats

Cicles	Temperatura	Temps
1	95 °C	5 min
40	95 °C	1 min
	48 °C	1,5 min
	72 °C	2 min
1	72 °C	5 min
1	4 °C	∞

**Taula 8.- Programa de la reacció d'amplificació amb encebadors degenerats.**

### **Programa de la reacció d'amplificació amb encebadors específics**

Cicles	Temperatura	Temps
1	95 °C	5 min
40	95 °C	1 min
	48 °C	1,5 min
	72 °C	2 min
1	72 °C	5 min
1	4 °C	∞

**Taula 9.- Programa de la reacció d'amplificació amb encebadors específics.**

#### **4.1.5.2, PCR de seqüenciació**

Durant la primera etapa de seqüenciació s'ha seguit el mètode de Sanger i modificat per Prober i col·laboradors. Aquest mètode consisteix en fer una reacció en cadena de la polimerasa amb un sol encebador i amb dideoxinucleòtids (ddNTP) barrejats amb els deoxinucleòtids. D'aquesta manera, quan la polimerasa incorpori a la cadena de DNA un ddNTP, aquesta no trobarà cap grup hidroxil 3' lliure sobre el qual afegir el següent nucleòtids per a continuar elongant la cadena, aturant així, la polimerització de la mateixa. Així doncs, al final de la reacció de PCR, obtindrem una població de cadenes de DNA de longituds diferents i amb increments d'una base cada cop, amb la característica comuna de que totes hauran incorporat un ddNTP en el seu extrem 3'.

La potència d'aquesta tècnica consisteix en que cada un dels quatre ddNTP's (ddA, ddT, ddC, ddG) està marcat amb un fluorocrom diferent, de manera que podem separar els fragments de DNA i detectar el color corresponent a cada fragment. Obtenim la seqüència del nostre DNA d'interès simplement llegint per ordre d'aparició les bandes de l'electroforesi capil·lar i traduint el color de cada banda al nucleòtid corresponent.

Per fer la PCR de seqüenciació s'ha utilitzat el kit de seqüenciació automàtica BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems, EEUU) que ja incorpora la DNA polimerasa termoestable, els dNTPs i els ddNTP's marcats en el tampó adequat. Les condicions emprades per a les diferents reaccions de PCR de seqüenciació han estat les següents:

### Mescla de reactius per a la PCR de seqüenciació

1 µl de *Ready reaction mix*  
1 µl de tampó *Big Dye® 10X*  
X µl d'ADN  
3.2 pmols d'encebador *forward* o *backward*  
Aigua milli-Q autoclavada fins a 10 µl

### Programa de la reacció d'amplificació

Cicles	Temperatura	Temps
1	94 °C	1 min
25	96 °C	30 seg
	T <sup>a</sup> d'hibridació específica per a l'encebador	15 seg
	60 °C	4 min
1	4 °C	∞

**Taula 9.- Programa de la PCR de seqüenciació.**

Quan ha acabat la reacció de seqüenciació (taula 9), són els Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona, situats a la Unitat de Genòmica del Parc Científic de Barcelona, els que s'encarreguen de la purificació i precipitació del DNA per a la posterior seqüenciació. La seqüència de nucleòtids s'obté mitjançant el sistema analític CEQ™ 8000 amb el seqüenciador ABI Prism® DNA377 (Perkin Elmer, EEUU).

#### **4.1.6. Extracció dels clons de DNA cosmic de les plaques de cultiu de 96 pous.**

Per tal d'extreure els còsmids cal, en primer lloc, tenir un cultiu de 3 ml de cada clon. Per això, cada clon de la llibreria metagenòmica es transfereix a un pou d'una placa de 96 pous de 3 ml de capacitat (*deep 96-well plate* de Nalgene, Rochester, NY) on s'incuba en medi líquid Luria-Bertani amb 70 µg/ml d'ampicil·lina en agitació a 180 rpm a 37°C durant una nit.

Un cop han crescut les cèl·lules, són centrifugades a 4000 rpm durant 5 minuts i els còsmids són extrets seguint els següents passos:

1er.- Resuspensió de les cèl·lules en 240 µl de solució GET (20 % de glucosa, EDTA 0,5 M a pH 8,0 i 1M Tris-HCl pH 7,4 esterilitzat) per a cada mil·lilitre de cultiu.

2on.- Centrifugació de la solució a 4000 rpm durant 8,5 minuts, descartar el sobrenadant i deixar la placa tombada sobre un paper absorbent durant 5 minuts.

3er.- Resuspendre les cèl·lules en 80 µl de GET i transferir 60 µl d'aquesta suspensió en un pou d'una placa de 96 pous (*96-well plate*, Nalgene, Rochester, NY). Afegir-hi 2,5 µl de RNase (10mg/ml) i 80 µl de solució de lisi (NaOH 0,2N i SDS 1%). Seguidament es segella la placa i s'agita per inversió 30 vegades.

4art.- S'incuba la placa 10 minuts a temperatura ambient i s'afegeix 80 µl d'una solució 3 M de KOAc a 4 °C. S'agita per inversió 20 vegades. S'incuba 10 minuts més a temperatura ambient i es centrifuga a 4000 rpm.

5è.- Es destapa la placa i s'incuba 30 minuts a 90 °C. Es segella de nou i es centrifuga a 4000 rpm durant 15 minuts a 20 °C.

6è.- Es filtren 170 µl de la solució en plaques "multi screen filter" que s'adapten a les plaques microtiter de 96 pous. La filtració es fa per centrifugació a 4000rpm durant 6 minuts a 20 °C.

7è.- S'afegeixen 100 µl d'isopropanol a la solució filtrada. Es segellen les plaques i es mescla la barreja per inversió. Seguidament es centrifuga a 20 °C durant 45 minuts i a 4000 rpm. El sobrenadant és descartat i el sediment es renta amb 200 µl d'etanol al 70%.

8è.- Es centrifuga la placa durant 5 minuts a 20 °C i a 4000 rpm. Es descarta el sobrenadant i es deixen assecar les plaques a temperatura ambient

en una cambra de flux laminar durant una hora. El DNA cosmic obtingut es dilueix en 50 µl d'aigua milli-Q estèril.

#### **4.1.7. Construcció d'un microarray usant DNA clonat en còsmids.**

La impressió del microarray s'ha fet amb un robot model GMS 417 Arrayer (Affymetrix Inc., Clear Saint, HERE, USES) del Departament de Tecnologia de l'Escola de Ciències Agràries i de Medicina Veterinària de la Universitat de l'Estat de Sao Paulo (UNESP-Jaboticabal/Brasil).

El microarray s'ha preparat sobre un portaobjectes prèviament tractat amb aminosilà (GMT-GAPS, Corning, Cat. nº 40004). Els punts d'impressió es troben separats per 250 µm. S'han imprès quatre plaques (6, 71, 85 i 89) i cada còsmid (cada clon) s'ha imprès per duplicat generant així un microarray amb 768 punts d'impressió (*spots*). El clon en posició 1A de la placa 85 ha estat substituït per el plàsmid que conté la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa* per usar-ho com a control positiu en el revelat de l'array.

Els còsmids impresos han estat rehidratats amb un bany de vapor amb aigua a 70°C durant 10 segons i, seguidament, sotmesos a 70 °C durant un minut. Després s'ha fixat el DNA al portaobjectes amb llum ultraviolada en un UV croslinker amb una energia de 1300 x 100 µJ/cm<sup>2</sup>. Un cop fixat el DNA es torna a sotmetre el microarray a 70°C durant dues hores i després es guarda al buit fins que s'hagi de fer la hibridació.

#### **4.1.8. Disseny i producció de les sondes per a revelar el microarray**

Per a revelar el microarray s'han utilitzat dues sondes generades a partir d'una PCR amb la seqüència gènica del gen de la lipoxigenasa com a DNA motlle i amb els encebadors específics en un cas i amb els degenerats en l'altre.

##### Encebadors específics:

Encebador *forward* LoxPAFWD: 5' TAATCCGCTGCTGATCCG 3'

Encebador *reverse* LoxPAREV: 5' CCAGGTGGACGAACATCTC 3'

#### Encebadors degenerats:

Encebador *forward* LoxF: 5' CCSGTRGCSATYCARTGC 3'

Encebador *reverse* LoxR: 5' GCRTTCCA VAYYAGBAGG 3'

Tant la sonda específica (la que ha estat produïda amb els primers específics) com la sonda degenerada (la que ha estat produïda amb els primers degenerats) s'han produït mitjançant una PCR feta sota les condicions exposades anteriorment en l'apartat 5.1.5.1.

La sonda específica té una longitud de 411 parells de bases i representa el 19,5 % del gen de la lipoxigenase de *Pseudomonas aeruginosa* mentre que la sonda degenerada té una longitud de 488 parells de bases i representa el 22,8 % del gen. Així doncs, les dues sondes cobreixen un 36,15 % del gen.

#### **4.1.9. Marcatge fluorescent de les sondes**

El marcatge de 100 ng del producte de la PCR s'ha realitzat usant el *kit* BioPrime DNA Labeling Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) seguint les instruccions del fabricant.

El producte de la PCR que produeix les sondes es dissol a 100 ng/ $\mu$ l i s'incuba a 95°C durant 5 minuts. Després es refreda ràpidament a 4 °C. Cada 25  $\mu$ l de mostra de DNA es mesclen amb 4  $\mu$ l de *first strand buffer 5X* (Invitrogen) que conté una mescla de *random primers*, amb 2  $\mu$ l de DTT 100 mM, amb 2  $\mu$ l de mescla de dNTPs (5 mM dATP, dGTP, dCTP i 2 mM dTTP), amb 1  $\mu$ l de Klenow i 1  $\mu$ l de Cy3-dUTP 25 mM (marcació fluorescent verda, 532 nm) o Cy5-dUTP 25 mM (marcació fluorescent vermella, 635 nm) (Amershan Pharmacia Biotech). Aquesta mescla es deixa incubar a 25°C durant 2 hores en absència de llum i després es neutralitza la reacció amb el tampó d'aturada del *kit*.

Les mostres que contenen els fragments de DNA marcat es purifiquen en dues etapes: primer s'afegeixen 400  $\mu$ l de tampó TE (10:1) i es centrifuga durant 10 minuts a 10°C i a 8000 r.p.m., la segona etapa és un rentat igual però amb 200  $\mu$ l de tampó TE (10:1). Després el filtre es canvia a un tub eppendorff net i s'hi afegeixen 20  $\mu$ l de TE (10:1) i es centrifuga durant 10

minuts a 10 °C a 12000 r.p.m. en una columna tipus Microcon YM-100 (Millipore).

#### **4.1.10. Hibridació o revelat del microarray**

Els experiments d'hibridació del microarray s'han fet per triplicat en totes les condicions d'hibridació assajades.

Les sondes, es mesclen a parts iguals i, a 67,5 µl d'aquesta mescla, se li afegeixen 32,5 µl de solució d'hibridació (8 µL de reactiu líquid de bloqueig RPN3601 (Amershan), 19 µL de SSC 20x (citrats trisòdic deshidratat) i 5,5 µl de Sodi Dodecil Sulfat (SDS) al 2 %), després es desnaturalitzen a 95°C durant 2 minuts (Rhee SK., Liu X. et al. 2004). La hibridació es du a terme en una estació d'hibridació "GeneTac Hybridization" (Genetic Microsystems), on els portaobjectes de vidre on hi ha impresos els microarrays, hi són dipositats. La solució d'hibridació es diposita directament al damunt dels microarrays que estan coberts amb uns cobreobjectes.

S'han realitzat tres hibridacions a diferents condicions. Dues s'han fet a 42°C i a 55°C durant 14 hores i a una concentració de sonda de 25 ng/ml. La tercera hibridació s'ha realitzat a 64°C durant 14 hores i a una concentració de sonda final de 100 ng/ml incorporant un rentat final únicament amb aigua.

Després de la hibridació, el microarray és sotmès a tres solucions de rentat de forma seqüencial. La primera és SSC 2x amb el 0,5% de SDS, la segona és SSC 0,5x i la tercera, SSC 0,05x. Tots tres rentats es duen a terme a 25°C. Cada rentat s'aplica durant 15 minuts amb 10 segons de flux i 20 segons d'incubació durant 10 cicles. Cada microarray es deixa assecar durant 15 minuts en absència de llum (Park SJ., Kang CH. et al. 2008).

#### **4.1.11. Obtenció d'imatges i anàlisi de dades**

Les imatges dels senyals fluorescents generats amb els marcatges fluorescent de les sondes amb els fluoròfors Cy3 i Cy5, s'han obtingut amb un escàner de microarrays *GMS-418 Array Scanner* (Affymetrix). Les lectures s'han fet a dues longituds d'ona diferents, per a permetre l'excitació dels dos



marcadors fluorescents de les sondes, a 532 nm (Verdnick D., Handran S. et al.) per excitar el fluoròfor Cy3 i a 635 nm (vermell) per excitar el fluoròfor Cy5. Les imatges resultants per a cada fluoròfor s'han tractat amb el programa informàtic *ImaGene 5.5* (Biodiscovery). Aquest programa permet la superposició d'imatges de manera que es pot generar una imatge que sigui el resultat de la combinació de les dues imatges escanejades a 532 nm i a 635 nm i analitzar i determinar la densitat de píxels (intensitat) per a cada *spot* (DNA d'un clon específic de la llibreria metagenòmica imprès en el microarray) del microarray.

Amb el programa *ImaGene 5.5* es crea una xarxa de cercles independents (*Grid*) que defineix cada *spot* del microarray per tal de poder assignar-li un valor d'intensitat específic que quantifiqui l'*spot*. Aquesta xarxa es grava en format *.gal* cosa que permet exportar-la a un altra programa d'anàlisi d'imatges, el *GenePix Pro 6*.

Amb el programa *GenePix Pro 6* s'aplica la xarxa *Grid* sobre les imatges sobreposades dels dos canals (532 nm i 635 nm) i quantifiquem cada *spot* calculant la intensitat mitjana de tots els píxels de l'*spot* del senyal d'hibridació. Aquells píxels irregulars (no circulars), són descartats, igual que aquells que tinguin un mida inferior al 50% o superior al 200% de la mida del control positiu. Es fa l'anàlisi i els *spots* que contenen menys de 100 píxels es marquen com a "no trobats" obtenint un arxiu *.gpr* que conté tots els valors descrits anteriorment per a cada *spot*.

Cal fer un anàlisi estadístic amb el programa informàtic *Bioconductor Limma* (Smyth GK. 2004), un paquet de programari per a l'anàlisi de dades de microarrays, de les dades contingudes en l'arxiu *.gpr*. L'eliminació del soroll de fons es realitza amb el mètode *normexp* (Ritchie ME., Silver J. et al. 2007) integrat en el paquet *Limma*. La normalització és el mecanisme que ens permet comparar dades d'origen diferent (un mateix experiment realitzat diverses vegades, en aquest cas, tres vegades). El factor de normalització usat en aquest estudi és aquell valor que, multiplicat a la mitjana d'intensitats per al canal verd del control positiu, faci que la relació d'intensitats "vermell/verd" sigui igual a 1, de manera que el logaritme amb base dos d'aquesta relació sigui 0. S'ha calculat un factor de normalització per a cada microarray

(experiment per triplicat) havent eliminat el soroll de fons a les dades d'intensitat. La intensitat de cada *spot* ha estat multiplicada pel factor de normalització de cada microarray.

Cal aplicar un filtratge a les dades obtingudes. En aquest cas, i donat que les dades generades són poques degut a que els microarrays són petits (només conté 768 *spots*), els filtres qualitius aplicats seran suaus. Aquest filtratge consisteix en fer complir a les dades les cinc obligacions següents:

- els *spots* no marcats (no trobats) o marcats com a molt bo (controls positius) són eliminats.
- els *spots* tenen més del 50% dels píxels saturats.
- la mitjana de la intensitat de cada canal, com a mínim, doble la mitjana de la intensitat del "background".
- la relació de les mitjanes i la relació de les regressions no pot presentar una diferència superior al 20%.
- la relació de regressions sigui superior a 0'5.

L'anàlisi es va dur a terme de tres maneres diferents: filtrant únicament les dades del canal vermell a complir les obligacions, filtrant únicament les dades del canal verd a complir les obligacions i filtrant els dos canals a complir les obligacions.

#### **4.1.12. SNR (Signal-to-Noise Ratio)**

A l'hora de determinar si un *spot* presenta o no una hibridació positiva, és a dir, si la intensitat observada és deguda o no a la presència d'una seqüència complementària (amb major o menor mesura) a la de les sondes aplicades, cal determinar un llindar de senyal a partir del qual es pugui classificar l'*spot* com a positiu o negatiu per a la hibridació.

El criteri comunament acceptat per a determinar el llindar de senyal d'intensitat (senyal mínim) o SNR (Signal-to-Noise Ratio) ha estat calculat segons el mètode de Verdnick (Verdnick D., Handran S. et al. 2002) on l'SNR és igual a la diferència entre la intensitat de senyal i el soroll de fons

(background) dividit entre la desviació mitjana del soroll de fons (Park SJ., Kang CH. et al. 2008).

$$\text{SNR} = (\text{Intensitat de senyal} - \text{Background}) / \text{SD background}$$

El valor llindar per a l'índex SNR és 3 tot i que cal tenir present que, factors com la mida del DNA imprès en el microarray o la quantitat de sonda marcada aplicada durant la hibridació, poden modificar aquests valors i per tant, el valor de SNR òptim, pot veure's modificat (Rhee SK., Liu X. et al. 2004).

L'anàlisi realitzat en base a l'índex SNR ha seguit els següents passos i premisses:

- Anàlisi del canal verd i del canal vermell de manera independent.
- Eliminació d'aquells *spots* que presentaven menys de 150 píxels.
- Com a mesura d'intensitat de cada *spot*, s'ha usat la mediana del senyal de l'*spot* menys la mediana del soroll de fons (per a cada *spot* hi ha sis rèpliques entre els tres microarrays).
- Per a calcular el *background* que s'ha d'aplicar a la fórmula per a determinar l'índex SNR (calculat de manera independent per a cada canal en cada microarray), s'han usat dos mètodes diferents:

1) El *background* és la mitjana de totes les intensitats dels *spots* de la placa 85 (escollida com a control negatiu ja que en les PCR amb un conjunt de clons d'aquesta placa, realitzades tant amb primers específics com degenerats, no es generava cap banda d'amplificació) excepte el control positiu. També s'ha calculat la desviació estàndard d'aquest *background*.

2) El *background* és la mitjana de totes les intensitats dels *spots* (de les quatre plaques) excepte el control positiu. També s'ha calculat la desviació estàndard d'aquest *background*.

- Càlcul de l'índex SNR per a cada *spot* usant la mitjana del *background* i la desviació estàndard corresponent a cada microarray i a cada canal.
- Comprovació que cap *spot* de la placa 85 té un valor de SNR superior a 3. No el té en cap cas.
- Càlcul de la mitjana i de la desviació estàndard de l'índex SNR pertanyents als punts amb el mateix nom (mateix clon), per a cada canal.
- Seleccionar aquells clons amb valors de l'índex SNR superiors a 3.

## 4.2. Resultats i discussió

La prospecció metagenòmica de noves lipoxigenases s'ha realitzat en el marc del projecte "Aislamiento, caracterización de consorcios microbianos degradadores de hidrocarburos y prospección de genes en una genoteca metagenomica, PHB 2006-0038-PC" al Departament de Tecnologia de l'Escola de Ciències Agràries i de Medicina Veterinària de la Universitat de l'Estat de Sao Paulo (UNESP - Jaboticabal / Brasil), sota la supervisió de la Dra. Lemos. La feina experimental que comporta aquesta part de la tesi, s'ha realitzat durant el segon semestre de l'any 2007 implicant una important limitació de temps.

La prospecció metagenòmica s'ha dut a terme de dues maneres diferents per a poder comparar-ne els resultats. Mitjançant l'ús de la reacció en cadena de la polimerassa i mitjançant el disseny i revelat de microarrays. En aquest últim cas, l'estudi estadístic realitzat sobre les dades obtingudes s'ha fet per dos mètodes diferents, definint i filtrant les dades obtingudes de manera que les podem categoritzar com a "vàlides" o "no vàlides", i mitjançant l'ús d'un índex (SNR, signal noise ratio) extret de les dades obtingudes i definint un valor llindar per aquest mateix índex.

### 4.2.1. Encebadors

Els encebadors específics dissenyats amb el programa *Gene Runner* utilitzats han estat els següents:

Encebador *forward* LoxPAFWD: **5' TAATCCGCTGCTGATCCG 3'**

Encebador *reverse* LoxPAREV: **5' GCCAGGTGGACGAACATCTC 3'**

L'encebador *forward* (LoxPAFWD) hibrida en la posició 674 de la seqüència nucleotídica AF479686.2 del GenBank corresponent a la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa* 42A2, mentre que l'encebador *reverse* (LoxPAREV) ho fa en la posició 1085 de la mateixa seqüència generant així, un producte de PCR de 411 parells de bases. Aquesta parella de primers presenten una temperatura de *melting* òptima de 60,3 °C.

Els encebadors degenerats dissenyats amb el programa *DePiCt* 2.0 utilitzats en aquesta tesi han estat els següents:

Encebador *forward* degFWD: **5' CCSGTRGCSATYCARTGC 3'**

Encebador *reverse* degREV: **5' GCRTTCCAVAYYAGBAGG 3'**

S'han obtingut a partir de cinc de les catorze seqüències que, de partida, es van aplicar al programa *DePiCt* 2.0. Aquest programa genera grups de seqüències en funció de la seva homologia i dissenya primers degenerats per a cada un dels grups obtinguts. D'aquesta manera, els primers resultants presenten menor degeneració respecte els que es generarien per al conjunt de seqüències inicial, tot i reduir la capacitat de detecció de seqüències més diverses. Aquestes cinc seqüències són les següents:

- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01	Nº d'accés a GenBank: NC_002516.2 GI:110645304
- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA14	Nº d'accés a GenBank: CP000438.1 GI:115583796
- <i>Burkholderia thailandensis</i> E246	Nº d'accés a GenBank: CP000086.1 GI:83652219
- <i>Photobacterium profundum</i> 3TCK	Nº d'accés a GenBank: ZP_01218321.1 I:90410305
- <i>Shewanella denitrificans</i> OS217	Nº d'accés a GenBank: NC_007954.1 GI:91791369

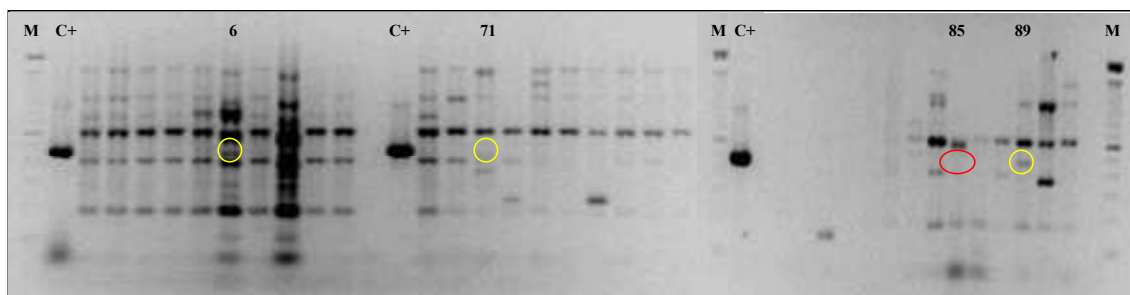
L'encebador degFWD hibrida en la posició 931 de la seqüència nucliotídica AF479686.2 del GenBank corresponent a la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa* 42A2, mentre que l'encebador degREV ho fa en la posició 1418 de la mateixa seqüència generant així, un producte de PCR de 488 parells de bases. La degeneració per a l'encebador *forward* és de 32 (S = C o G; Y = C o T; R = A o G), és a dir de  $2^2$ , mentre que per a l'encebador *reverse* és de 72 (R = A o G; V = A, C o G no T; Y = C o T; B = C, T o G no A), és a dir  $2^3 \times 3^2$ .

#### **4.2.2. Resultat de les PCR dels pools de clons i plaques escollides per a la generació del microarray.**

Donat que el procés d'extracció i purificació dels còsmids és molt laboriós i que el temps de que s'ha disposat al laboratori del Departament de Tecnologia de l'escola de Ciències Agràries i de Medicina Veterinària de la Universitat de l'Estat de Sao Paulo (UNESP-Jaboticabal/Brasil) ha estat tant limitat (sis mesos), es decideix fer una primera prospecció eliminatòria amb els primers degenerats sobre el

conjunt de clons (cada un dels hostes que conté un còsmid amb part del DNA metagenòmic clonat) que formen cada una de les plaques (*pool*) que conformen la biblioteca metagenòmica. Cada placa conté 96 clons. D'aquesta manera només caldrà fer 96 PCRs (la biblioteca metagenòmica consta de 96 plaques amb 96 clons cada una) i fer l'extracció de còsmids clon a clon, per aquelles plaques que més probabilitats tinguin de contenir noves lipoxigenases.

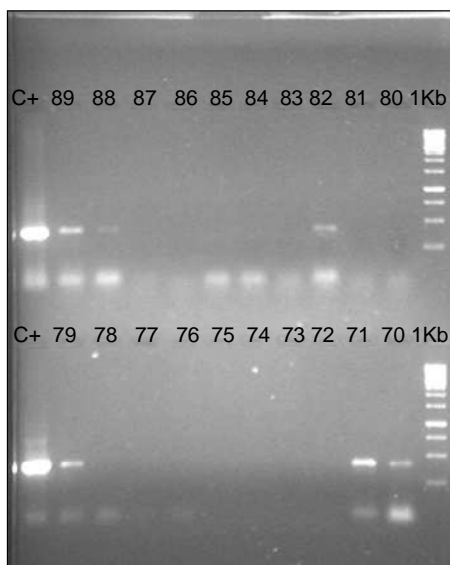
Els resultats d'aquesta prospecció preliminar es poden observar en la figura 40 on es poden veure diferents *pools* de placa amplificats amb els encebadors degenerats. Els *pools* 6, 71 i 89 presenten una banda de mida similar a la del control positiu (C+, producte resultant de la PCR amb encebadors degenerats usant la seqüència de la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa* 42A2 com a motlle) mentre que la del pool 85 no la presenta i per tant, aquests encebadors no amplifiquen una seqüència que, per longitud, coincidiria amb la d'una lipoxigenasa bacteriana. És per aquesta raó que la placa 85 es va incloure en el microarray, per tal de poder tenir un control negatiu de la hibridació, mentre que les altres plaques, la 6, la 71 i la 89 es van escollir com a possibles positius.



**Figura 40.- Amplificació amb encebadors degenerats dels pools de clons de les plaques 6, 71, 85 i 89. Les plaques 6, 71 i 89 presenten una banda a la mateixa alçada que el control positiu (cercle groc), mentre que la placa 85 no la presenta (cercle vermell). C+ control positiu (amb lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa*), CN control negatiu, M marcador de 1000 pb fins a 100 pb de Biotools.**

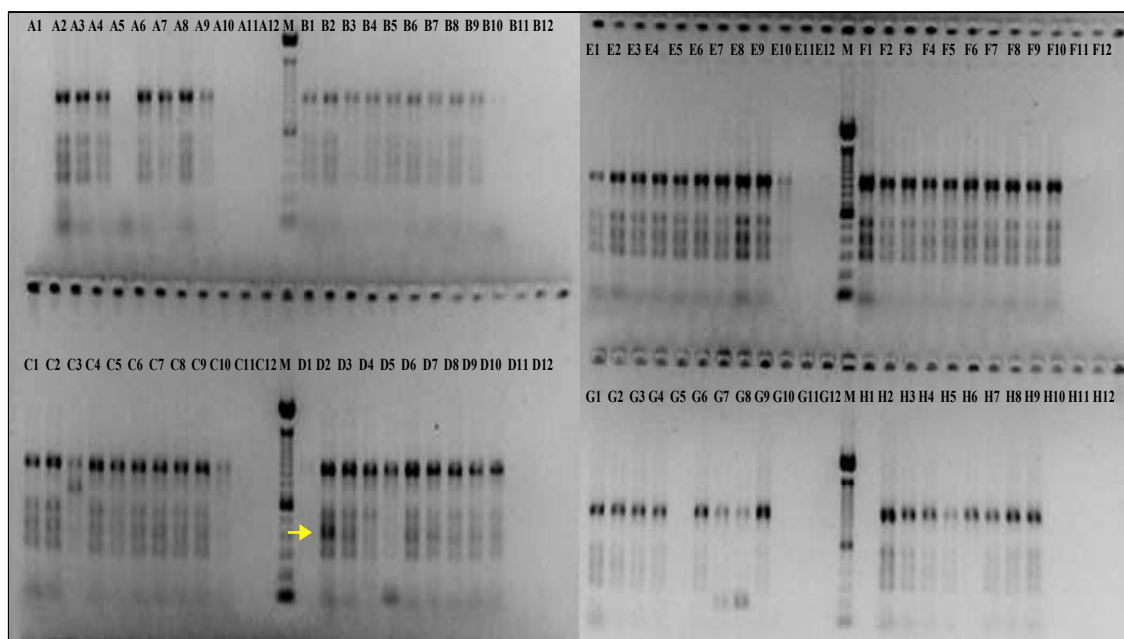
Les amplificacions de les plaques 6, 71, 85 i 89 amb encebadors específics (figura 41) mostren com l'elecció de la placa 85 com a control negatiu és correcte, doncs no presenta banda a l'alçada del control positiu i, en canvi, si que la presenten les plaques 89 i 71. És cert que altres plaques com la 88, la 82, la 79, la 70 i d'altres no mostrades en la figura, també presenten la

mateixa banda però, per qüestió de temps no ha estat possible processar tot el volum de clons que això suposava.



**Figura 41.- Amplificació amb encebadors específics dels pools de les plaques 70 a 89. C+, control positiu (amb lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa*); 1Kb, marcador 1000 bp DNA Ladder de 1Kb de Biotools.**

Pel que fa a la placa 6, la figura 42. mostra una amplificació amb encebadors específics de cada un dels clons que conformen aquesta placa. Aquest anàlisi en detall es va realitzar per tal de poder comparar resultats entre les dues metodologies de rastreig de la biblioteca metagenòmica utilitzades.



**Figura 42.- Amplificació de tots els clons de la placa 6 de la biblioteca metagenòmica amb encebadors específics. M, marcador de 100 pb DNA ladder (Invitrogen) de 2072 pb a 100pb. Fletxa groga, banda de la mateixa mida que l'obtinguda amb la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa*.**



Es pot observar com el clon D2 presenta una banda de la mida del control positiu, això ratifica el resultat obtingut anteriorment amb la PCR realitzada sobre el *pool* de clons d'aquesta placa amb els encebadors degenerats i a la vegada indica que és el clon D2 el que conté la seqüència buscada.

#### 4.2.3. Producció de sondes i marcatge

La sonda produïda amb els encebadors específics ha estat marcada amb el fluorocrom Cy5 que, al ser excitat amb una longitud d'ona de 635 nm, emet fluorescència vermella. Aquesta sonda és la següent:

```
TAATCCGCTGCTGATCCGCCGCGTCGATGCGCTGCCGGCCAACTTTCCGCTGGGCGAAGAGCAGTTC
CGCCGGGTGATGGGCGCCGACGACAGCTTGCTGGAAGCCGCCAGCCGCCGCTGTACCTGCTGG
ACTACGCCGAGCTGGGCAAGCTGGCGCCGTCGGGAGCGGTGGACAAACTGCTCACCGGGACGGGCTT
CGCCTATGCGCCGATCGCCCTGTTCCGCCCTTGGCAAGGATCGGGCGGGGCTGTTGCCGGTGGCCATC
CAGTGCGGCCAGGACCCCGCTACCCATCCGATGTTTCGTGCGTCCCGCGGAGTCGGAGAGTGATCTGT
ACTGGGGTTGGCAGATGGCCAAGACGGTGGTCCAGGTGCGCGAGGAGAACTACCACGAGATGTTTCGT
CCACCTGGC
```

La sonda produïda amb els encebadors degenerats ha estat marcada amb el fluorocrom Cy3 que, al ser excitat amb una longitud d'ona de 532 nm, emet fluorescència verda. Aquesta sonda és la següent:

```
CCGGTGGCCATCCAGTGCGGCCAGGACCCCGCTACCCATCCGATGTTTCGTGCGTCCCGCGGAGTCGG
AGAGTGATCTGTACTGGGGTTGGCAGATGGCCAAGACGGTGGTCCAGGTGCGCGAGGAGAACTACCA
CGAGATGTTTCGTCCACCTGGCCCAGACCCACCTGGTGAGCGAGGCGTTCTGCCTGGCCACCCAGCGC
ACCCTGGCGCCCAGCCATCCGCTGCACGTCTGCTCGCCCCGCACTTCGAGGGCACCCCTGTTTCATCA
ACGAGGGGGCGGCGCGGATCCTGTTGCCAGCGCGGGCTTCATCGACGTGATGTTCCCGCGCCGAT
CCAGGACACCCAGGCCACCGCCGGCGGCAACCGGCTGGGTTTTCGACTTCTACCGCGGCATGTTGCCG
GAGAGCCTGAAGGCGCGGAACGTGACGACCCGGCCGCGTTACCGGACTACCCCTACCGCGACGACG
GCCTGCTGGTGTGGAATGC
```

Les dues sondes juntes cobreixen un 36,15% del gen de la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa* 42A2, així doncs, i en el cas que existeixin altres lipoxigenases semblants a aquesta, aquestes dues sondes n'haurien de cobrir un percentatge similar. A falta de tenir una zona altament conservada en el gen que s'està estudiant, una major cobertura del gen per part de les sondes, fa

incrementar les possibilitats d'hibridació de les mateixes sobre possibles seqüències diana.

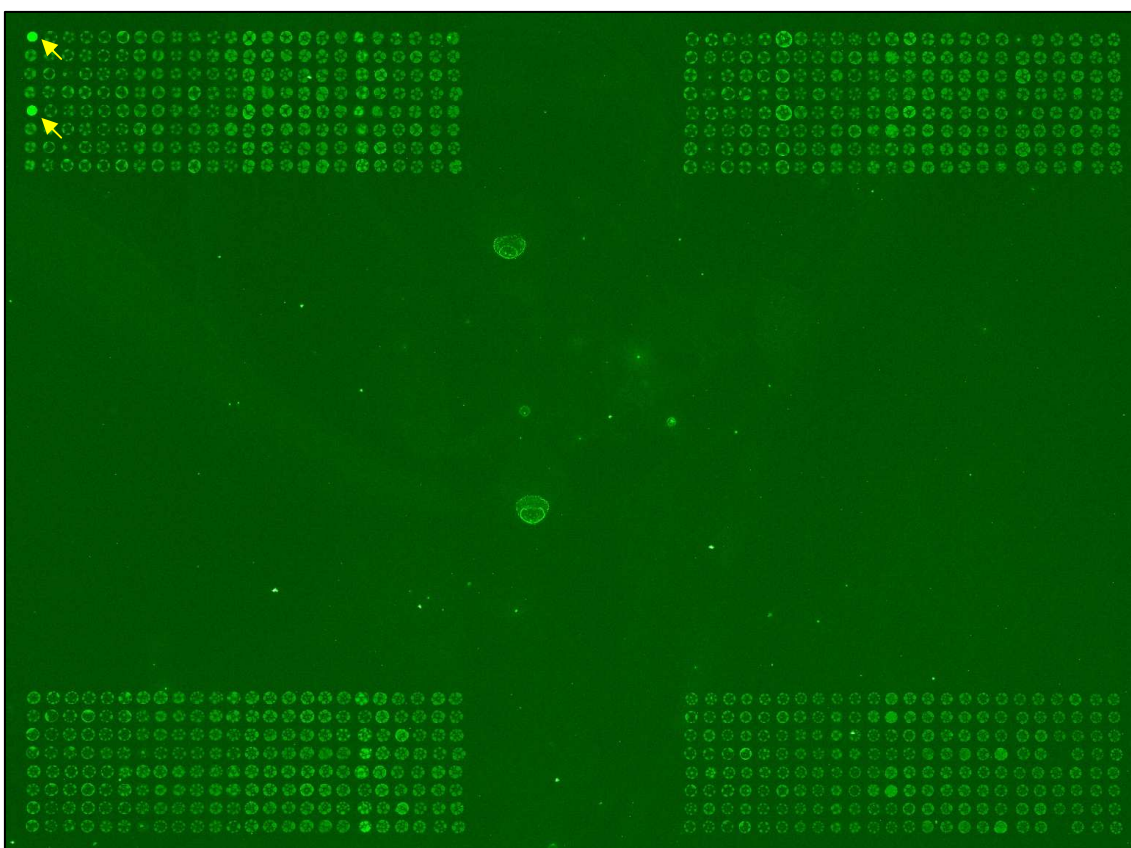
Donada la dificultat de trobar zones conservades en aquest tipus de seqüències de lipoxigenases, s'ha intentat que una part de la seqüència que correspon a la primera esfera de coordinació del ferro, (zona, estructuralment parlant, més conservada de les lipoxigenases) de la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa* 42A2, quedés coberta amb les sondes. Així doncs, els nucleòtids que cobreixen els dos primers aminoàcids d'aquesta esfera de coordinació (His 377 i His 382) són presents en la sonda verda que també cobreix el residu His 372 altament conservat. La sonda vermella cobreix únicament els aminoàcids His 372 i His 377.

#### **4.2.4. Hibridació**

S'han provat tres temperatures d'hibridació diferents, 42°C, 55°C i 64°C. La que millor ha funcionat ha estat la de 64°C que és la més astringent, això vol dir que és la que permet menys unions sonda-diana errònies i la que presentarà una menor intensitat de senyal per al soroll de fons. Respecte la durada del procés d'hibridació sempre ha estat de 14 hores (Wu L., Thompson DK. et al. 2004) que és un temps estàndard per les hibridacions dels microarrays. S'han provat dues concentracions de sonda per a la hibridació, 25 ng/ml i 100 ng/ml. La segona concentració és la que millor resultat ha donat. Tot i que els protocols estàndard de rentat dels microarrays. Un cop fetes les hibridacions, consten de tres rentats (amb una primera solució de SSC 2x amb el 0,5% de SDS, una segona solució de SSC 0,5x i una tercera de SSC 0,05x), en la optimització de la hibridació s'ha afegit un últim rentat amb aigua destil·lada esterilitzada.

En la majoria d'experiments amb microarrays on s'utilitzen dues sondes marcades amb diferents colorants fluorescents, el que es pretén és observar una expressió diferencial del gen per al qual s'ha dissenyat la sonda i detectar aquells *spots* que tenen unes relacions entre les dues sondes significativament diferents a 0 (Park SJ., Kang CH. et al. 2008). Aquest, però, no és el cas que es presenta. En aquest estudi, el que es vol, és trobar un gen determinat, un gen d'una lipoxigenasa.

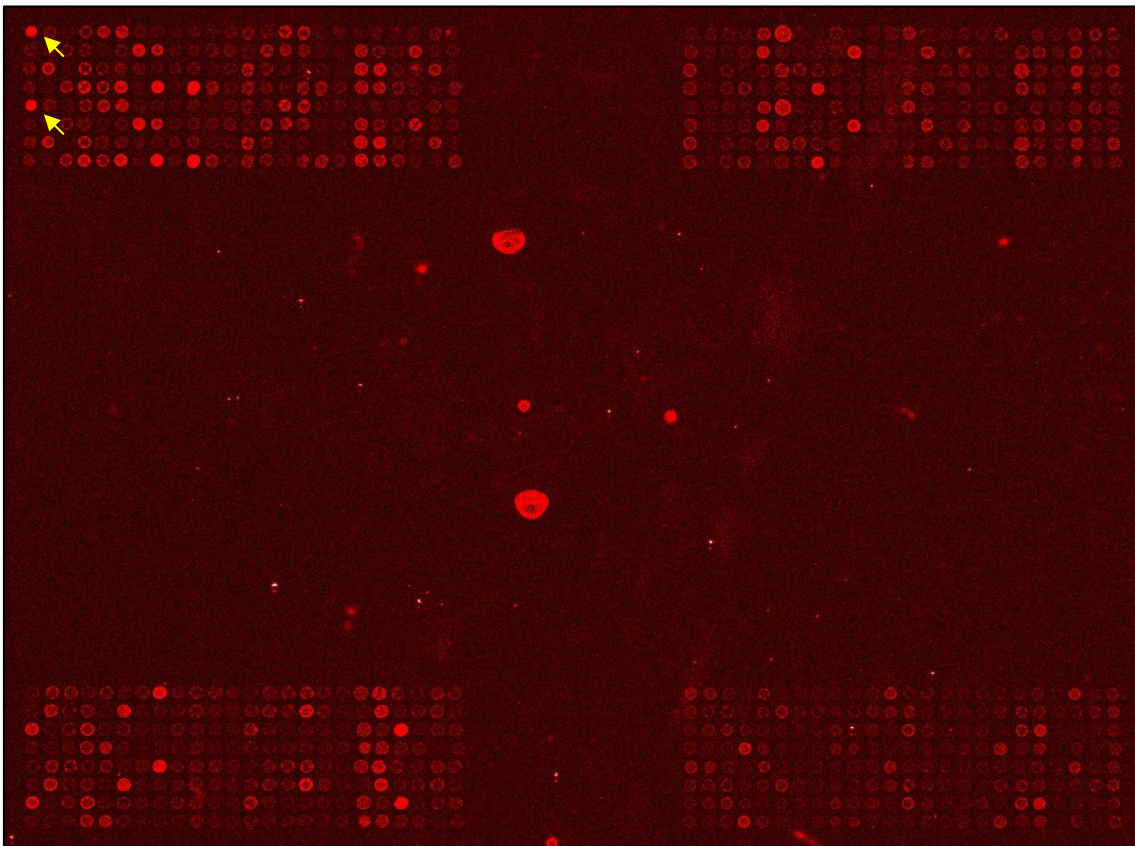
Per tal de detectar aquests gens, cal detectar aquells clons que tenen una hibridació similar per a les dues sondes dissenyades (la marcada amb fluorocrom verd i la marcada amb fluorocrom vermell), és per això que cal revelar l'array amb els dos canals (canal verd, figura 43; canal vermell, figura 44) i sobreposar les imatges d'aquets dos canals (figura 45). D'aquesta manera, aquells clons que presentin una hibridació similar de les dues sondes, emetran una fluorescència groga que serà el resultat de la combinació de les fluorescències observades quan s'excita l'array amb una radiació de 635 nm (fluorescència vermella) i amb una radiació de 532 nm (fluorescència verda). Això indica que el clon corresponent a l'*spot* groc, conté les dues seqüències o seqüències similars a les de les sondes i, per tant, que el còsmid conté una seqüència semblant a la de la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa* 42A2.



**Figura 43.- Imatge fluorescent del canal verd del microarray hibridat. El control positiu es pot observar a la primera columna d'*spots*, a la primera i cinquena fila (fletxes grogues).**

Una altra informació que ens aporta la observació de les imatges obtingudes amb la hibridació, és la forma i regularitat dels *spots*. Aquest factor

és important ja que, uns *spots* irregulars, com és el cas que aquí es presenta, fan més difícil l'aplicació de la xarxa (*grid*) que ha de definir els *spots* per tal d'extreure'n les dades d'intensitat d'hibridació. Tal com s'observa en la figura 45, molts dels *spots* no són rodons sinó que semblen tres o quatre *spots*. Aquest problema d'irregularitat en els *spots* pot comportar una menor qualitat en les dades obtingudes ja que, el nombre de píxels que defineixen cada *spot* pot variar molt fent incrementar la variància interna de cada *spot* i alterant el valor de soroll de fons de cada *spot*.

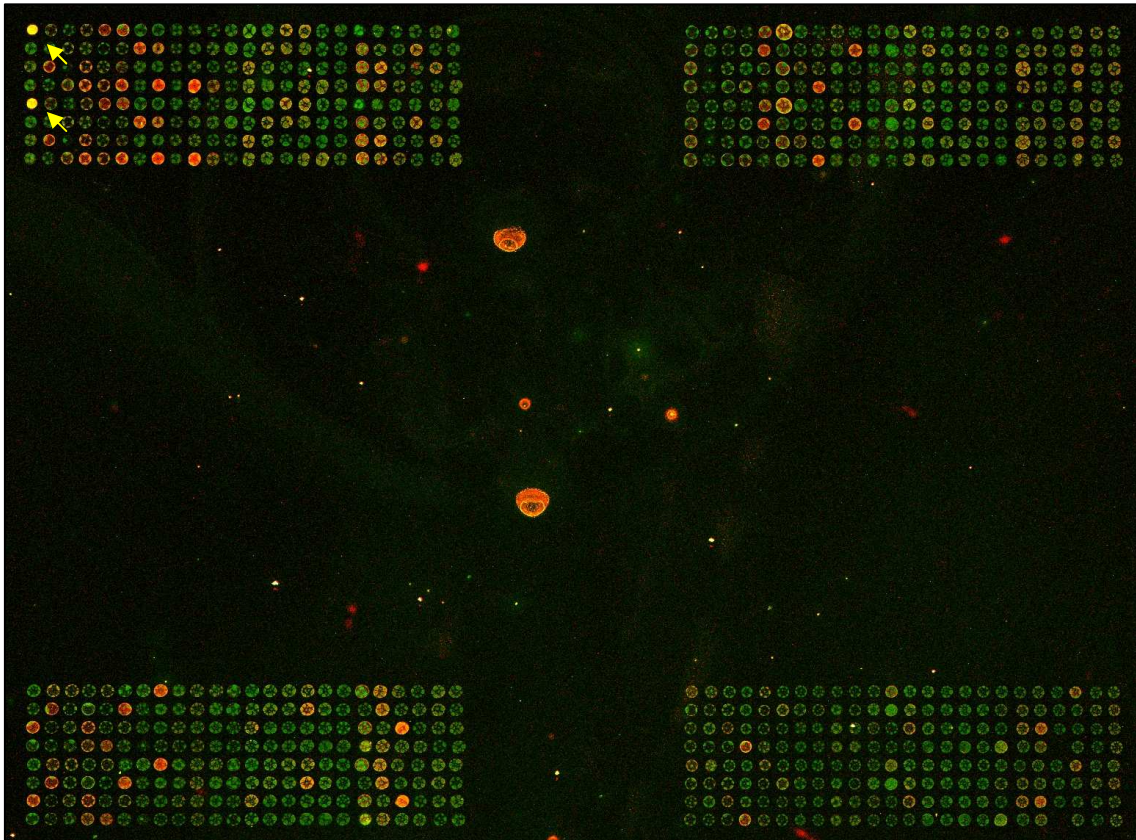


**Figura 44.- Imatge fluorescent del canal vermell del microarray hibridat. El control positiu es pot observar a la primera columna d'*spots*, a la primera i cinquena fila (fletxes grogues).**

Aquesta irregularitat observada en aquest microarray, molt probablement sigui deguda a un problema en les agulles del robot GMS 417 Arrayer (Affymetrix Inc., Clear Saint, HERE, USES) que, per una raó no coneguda, no han dipositat de manera regular la solució que conté el còsmid en el portaobjectes.



La xarxa de cercles independents (*grid*) que delimiten cada un dels *spots* del microarray, s'ha creat amb el programa *ImaGene 5.5*, i permet ajustar cada un d'aquest cercles a la mida de cada un dels *spots* per tal de poder assignar-li un valor d'intensitat específic que el quantifiqui. Aquesta xarxa es grava amb un format especial (*.gal*) que permet exportar-la a altres programes d'anàlisi d'imatges.



**Figura 45.- Imatge resultant de la superposició de les imatges obtingudes amb el canal vermell i el canal verd del microarray hibridat. El control positiu es pot observar a la primera columna d'*spots*, a la primera i cinquena fila (fletxes grogues).**

#### **4.2.5. Resultats del microarray: valoració estadística**

Així doncs, idealment, es pretén detectar aquells *spots* on hi ha una hibridació igual de la sonda marcada amb verd i de la sonda marcada amb vermell, això correspondria amb un *spot* que presenti igual intensitat per al canal verd com per al canal vermell i, per tant, que les dues sondes hi hagin hibridat en igual proporció. Aquest fet indica que el clon que correspon a aquell *spot*, conté una seqüència similar a la de les dues sondes i que, per tant, pot

contenir una lipoxigenasa. Cal però, tenir present que, donada l'alta diversitat de seqüències que presenta el grup de les lipoxigenases, es pot donar el cas que només una de les dues sondes hibridi bé amb el nou gen de lipoxigenasa detectat i, per tant, només es vegi intensitat suficient per a una de les dues sondes, és a dir per a un dels dos canals, verd o vermell. Hi ha, encara, una altra possibilitat que generi aquesta mateixa situació d'hibridació parcial, i és que és possible que a l'hora de generar la biblioteca metagenòmica, de la qual s'extrauran els còsmids que constituïran el material genètic que s'imprimirà al portaobjectes per a fer el microarray, la seqüència del gen de la nova lipoxigenasa hagi estat partit i, per tant, estigui incomplet i només una de les dues sondes hi hibridi. És degut a tot això que, durant la realització de l'anàlisi de les dades obtingudes del microarray, s'han definit els filtres descrits en el punt 4.1.11, i que cada *spot* ha estat imprès per duplicat en cada array podent, així, seleccionar aquells còsmids on els dos *spots* superen les condicions dels filtres imposats.

La figura 46 mostra les dades obtingudes (Annex 2) directament de l'escaneig del tres arrays hibridats (15, 16 i 20). Aquests tres array són idèntics entre ells, s'ha imprès per triplicat per tal de validar-ne els resultats. El número que els identifica, correspon al codi de barres que proporciona el fabricant per a la seva identificació. Així doncs, cada un dels arrays conté tots els clons per duplicat de les plaques 6, 71, 85 i 89.

La relació establerta entre les dues intensitats detectades (la del canal vermell i la del canal verd) és el logaritme amb base dos de la relació de la intensitat del canal vermell respecte el verd (R/G). Un valor positiu per a aquest índex indica una relació R/G de valor més gran que 1 i per tant una intensitat de senyal vermella superior a la verda. Un valor de zero indicaria una igual hibridació de la sonda verda i de la sonda vermella mentre que un valor negatiu representa una relació R/G de valor inferior a 1 i per tant una intensitat de senyal verda superior a la vermella.

En la figura 47 es pot observar la mateixa representació de les dades però amb l'eliminació del soroll de fons (background) en cada un dels *spots* de l'array.

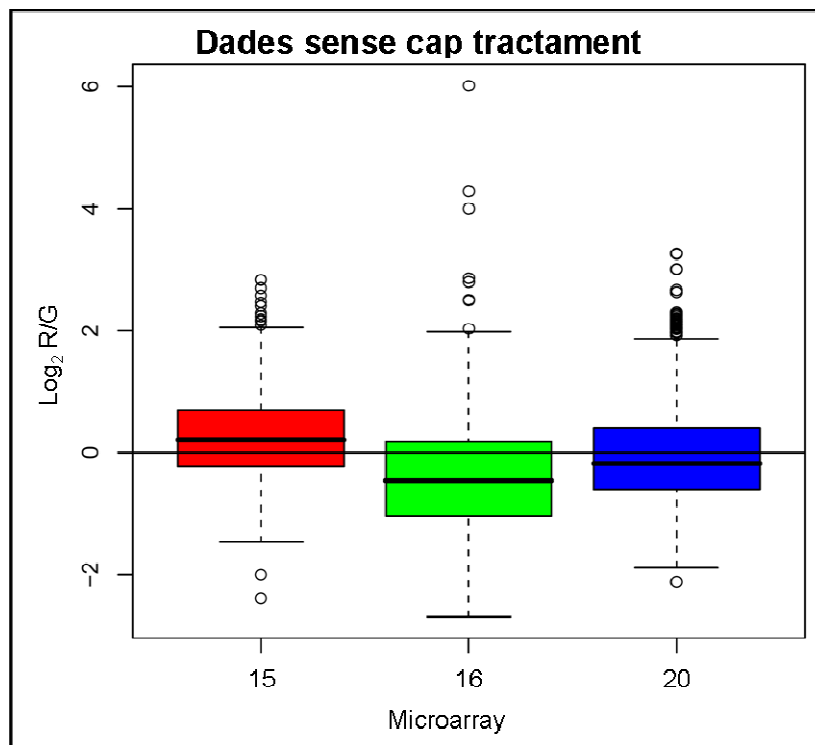


Figura 46.- Gràfica representativa de les dades per a cada un dels tres arrays (15, 16 i 20) hibridats sense cap tractament i amb les corresponents desviacions estàndard.

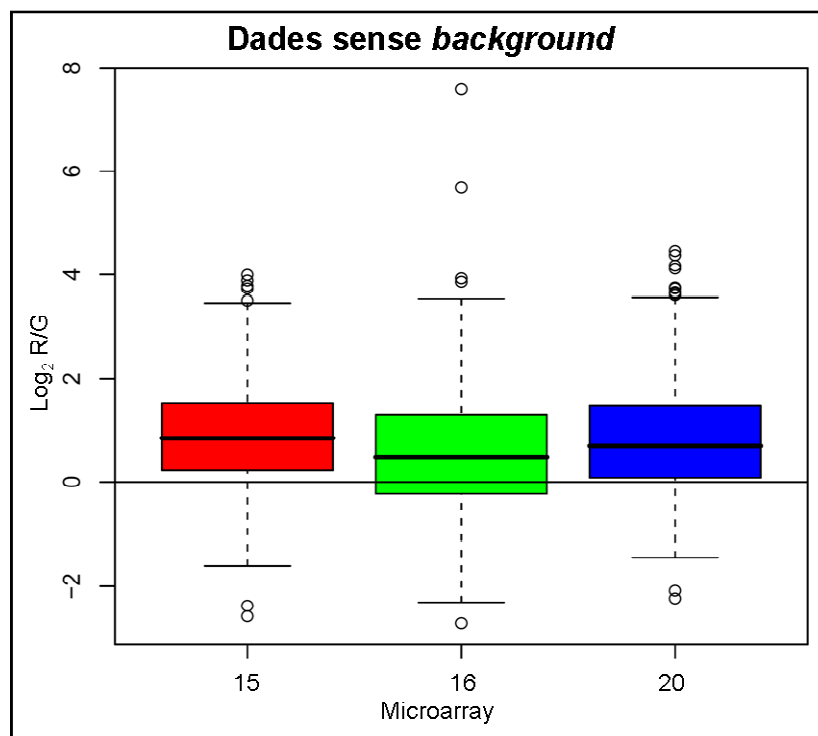


Figura 47.- Gràfica representativa de les dades per a cada un dels tres arrays (15, 16 i 20) hibridats amb l'eliminació del soroll de fons (*background*) i amb les corresponents desviacions estàndard.

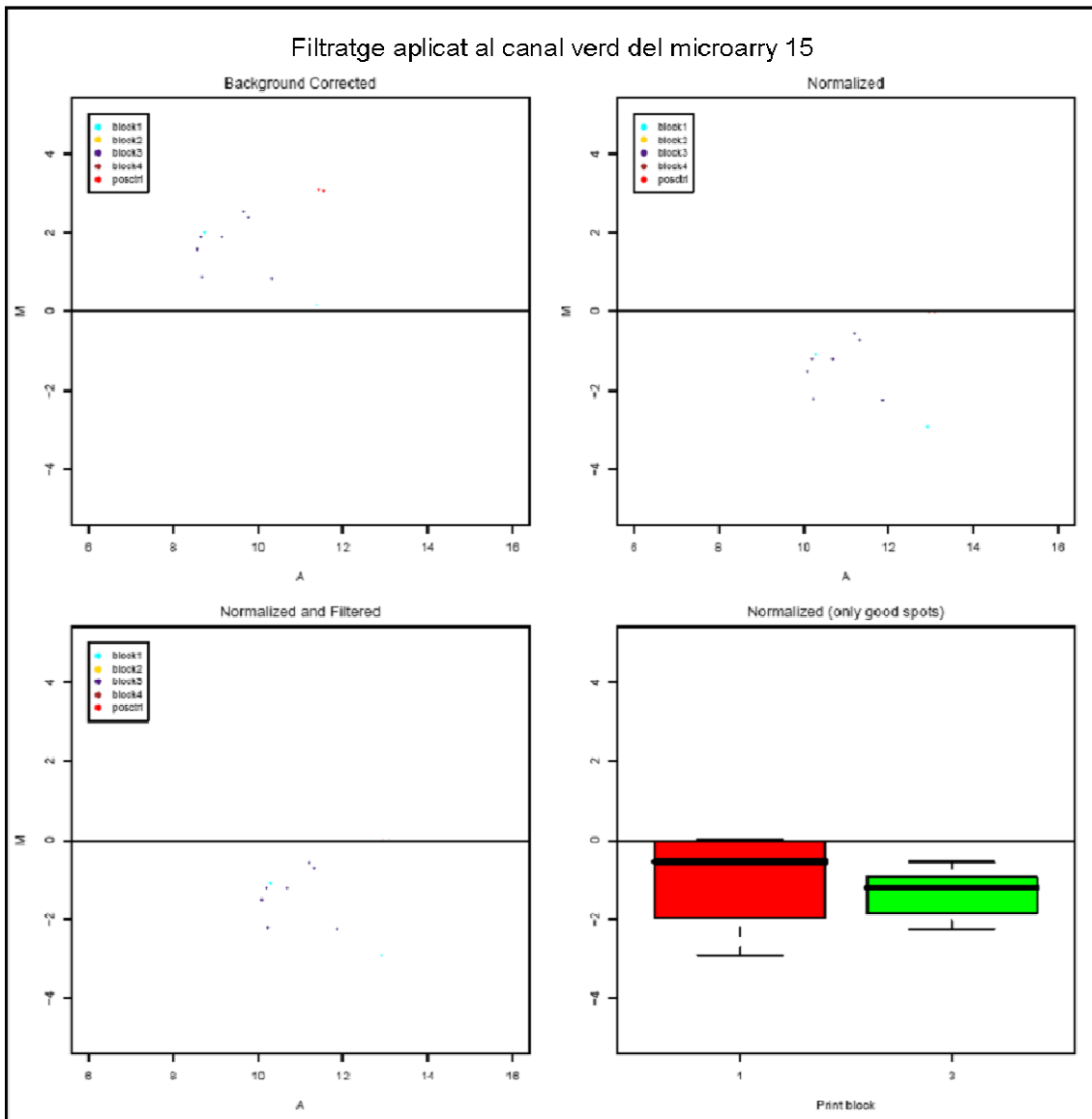
Aquestes gràfiques aporten informació sobre la homogeneïtat de la hibridació en cada un dels arrays indicant si hi ha o no repetibilitat en el resultat de l'experiment. Es pot observar que, en tots tres arrays, la hibridació ha estat força semblant. L'array 16 és el que més es diferencia però, la major desviació estàndard ja ens indica una major dispersió de les dades que explicaria aquesta petita diferència. El fet que aquestes diferències es mantinguin en la figura 46 indica que el soroll de fons és similar en els tres microarrays, fet que ja és normal i característic d'un mateix funcionament de la hibridació en els tres microarrays permetent, així, comparacions entre ells després d'un procés de normalització de les dades.

Tal com s'ha explicat anteriorment, aquestes dades han estat normalitzades i filtrades. Els filtres s'han aplicat de tres maneres diferents, només a les dades d'intensitat del canal vermell, només a les dades del canal verd i a les dades dels dos canals a la vegada. Aquestes dades es mostren, de forma gràfica, en les figures 48, 49 i 50 (les dades filtrades només pel canal verd), en les figures 51, 52 i 53 (les dades filtrades només pel canal vermell) i en les figures 54, 55 i 56 (les dades filtrades pels dos canals). En totes aquestes figures s'hi representen aquells *spots* que han superat els filtres de tres maneres diferents, únicament amb la correcció del soroll de fons, amb les dades normalitzades i amb les dades normalitzades i filtrades (aquestes dues representacions són iguals però els programes informàtics que tracten aquesta classe de dades expressen, per defecte, les dades d'aquesta manera). També es mostra la distribució dels *spots* que han superat el filtratge en funció del bloc on es troben.

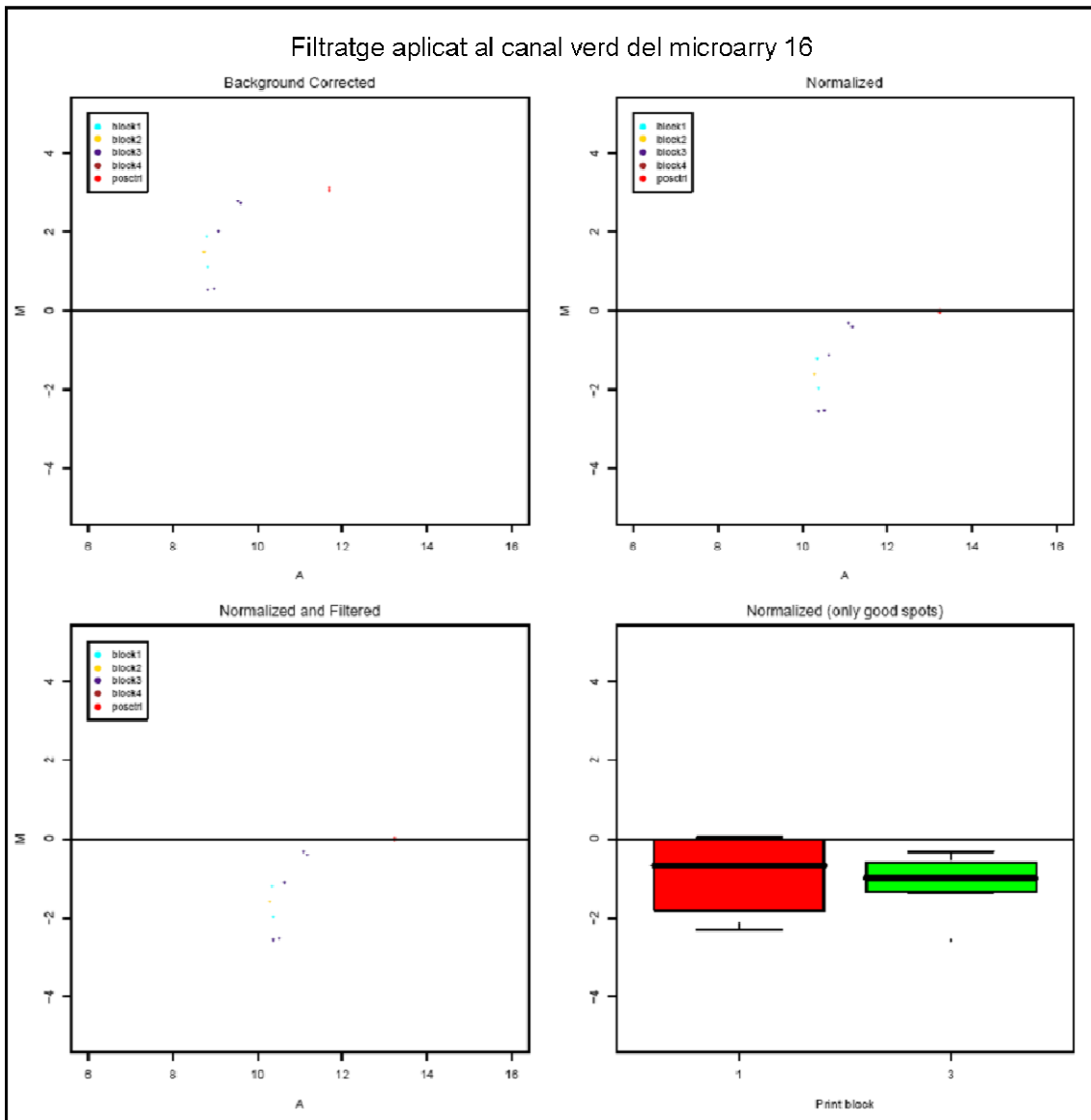
El factor de normalització aplicat a cada un dels arrays és aquell valor que permet igualar la ratio R/G del control positiu a 1 i és indiferent si s'aplica al canal verd o al vermell. En aquest cas s'ha aplicat al canal verd. Per a l'array 15 el factor de normalització és 8,43, per a l'array 16 és 8,56 i per a l'array 20, 11,79. Aquests valors dels factors de normalització indiquen una clara diferència en la hibridació de les dues sondes. La sonda vermella ha hibridat molt millor que no pas la verda i això pot indicar que la seqüència sobre la que està hibridant la sonda vermella és més conservada que no pas la de la sonda verda. Tal com mostren els tres microarrays, aquests valors dels factors de normalització es mantenen en les tres rèpliques descartant la possibilitat d'un



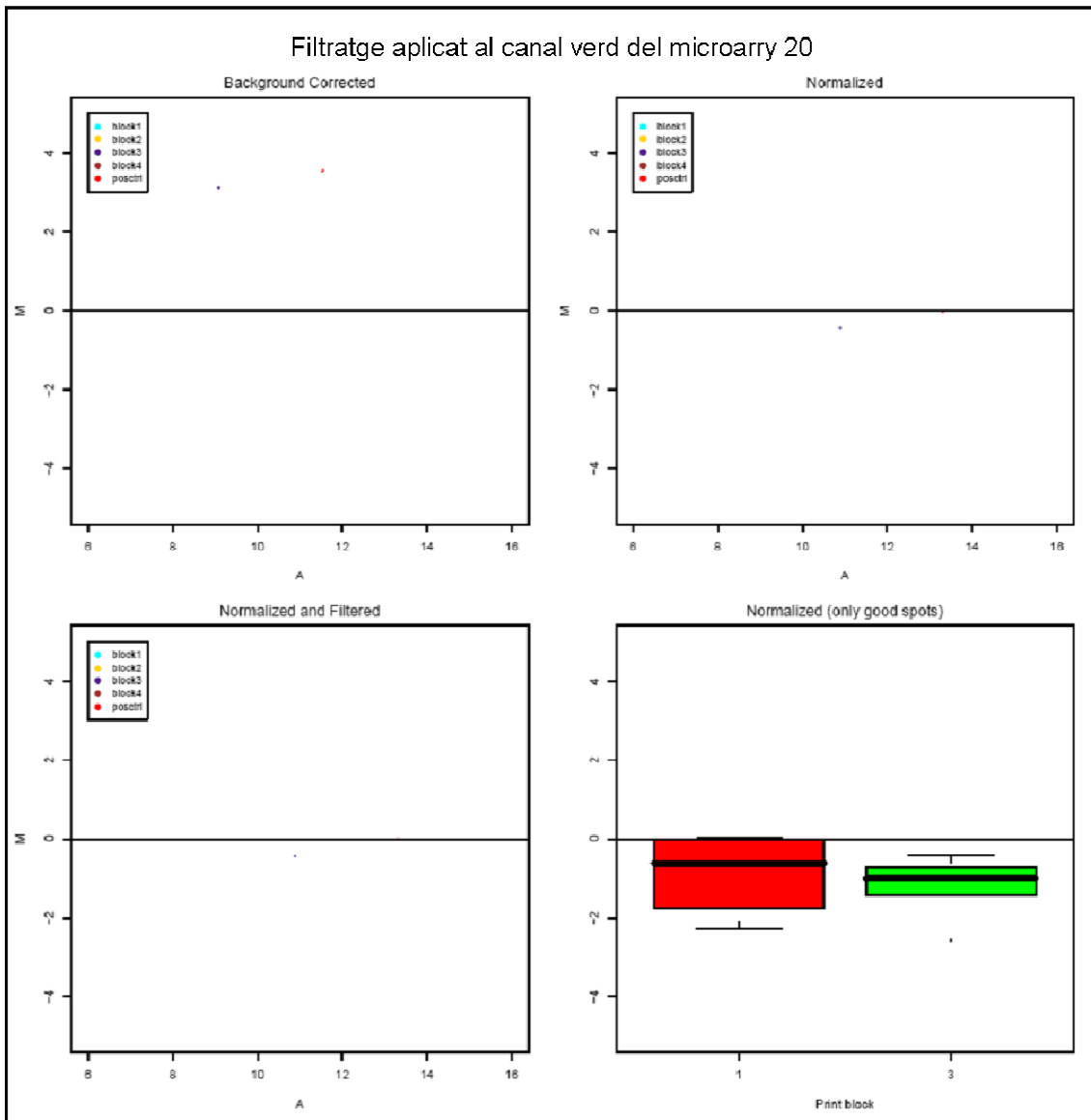
error en la hibridació. Altrament, observant les figures 43 i 44, ja s'intueix una major intensitat detectada per al canal vermell que no pas per al canal verd. Un altre factor que indica la repetitivitat de la hibridació, és el fet que la distribució dels *spots* que superen els filtratges de dades es manté igual entre els diferents arrays.



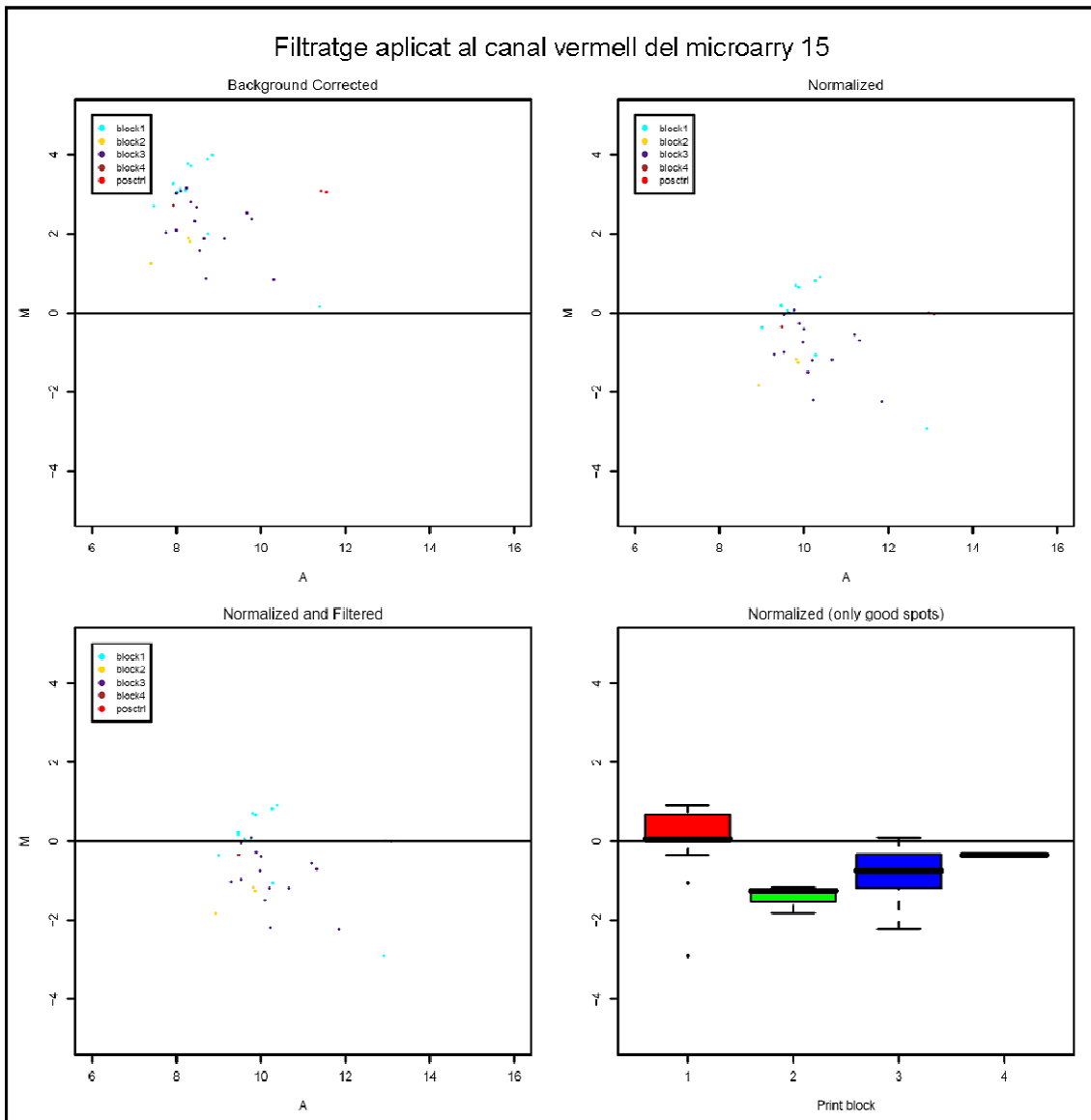
**Figura 48.- Dades del microarray 15 amb les intensitats del canal verd filtrades. *Background corrected:* Dades amb el soroll de fons eliminat, *Normalized:* Dades amb el soroll de fons eliminat normalitzades, *Normalized and Filtered:* Dades amb el soroll de fons eliminat normalitzades i filtrades, *Normalized (only good spots):* Representació de les dades del gràfic *Normalized and Filtered* en funció del bloc del microarray on es troben els *spots* corresponents.  $M = \log_2R - \log_2G$  i  $A = \frac{1}{2} \times (\log_2R + \log_2G)$  on R fa referència al canal vermell i G al canal verd.**



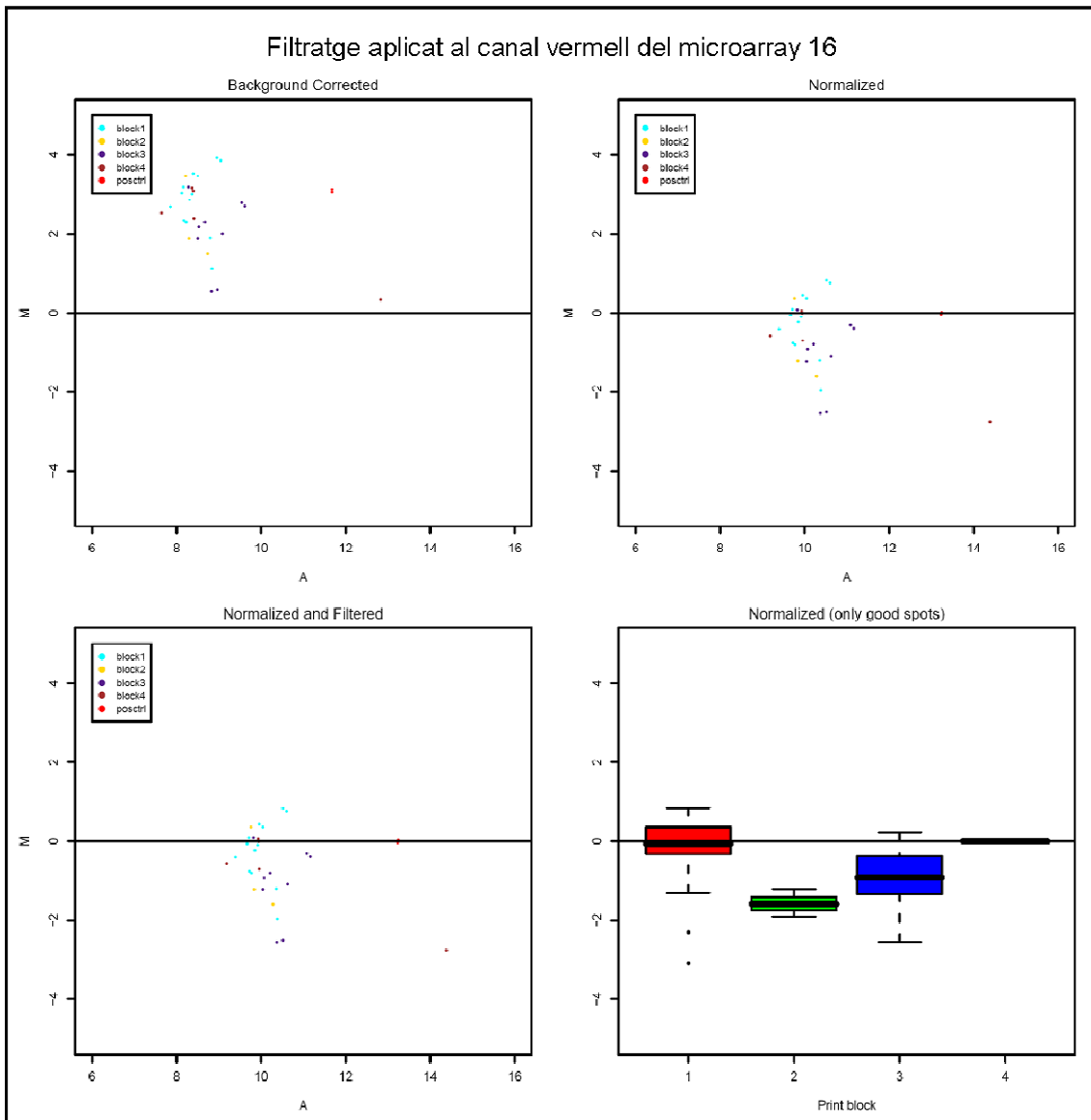
**Figura 49.- Dades del microarray 16 amb les intensitats del canal verd filtrades. *Background corrected:* Dades amb el soroll de fons eliminat, *Normalized:* Dades amb el soroll de fons eliminat normalitzades, *Normalized and Filtered:* Dades amb el soroll de fons eliminat normalitzades i filtrades, *Normalized (only good spots):* Representació de les dades del gràfic *Normalized and Filtered* en funció del bloc del microarray on es troben els *spots* corresponents.  $M = \log_2 R - \log_2 G$  i  $A = \frac{1}{2} \times (\log_2 R + \log_2 G)$  on R fa referència al canal vermell i G al canal verd.**



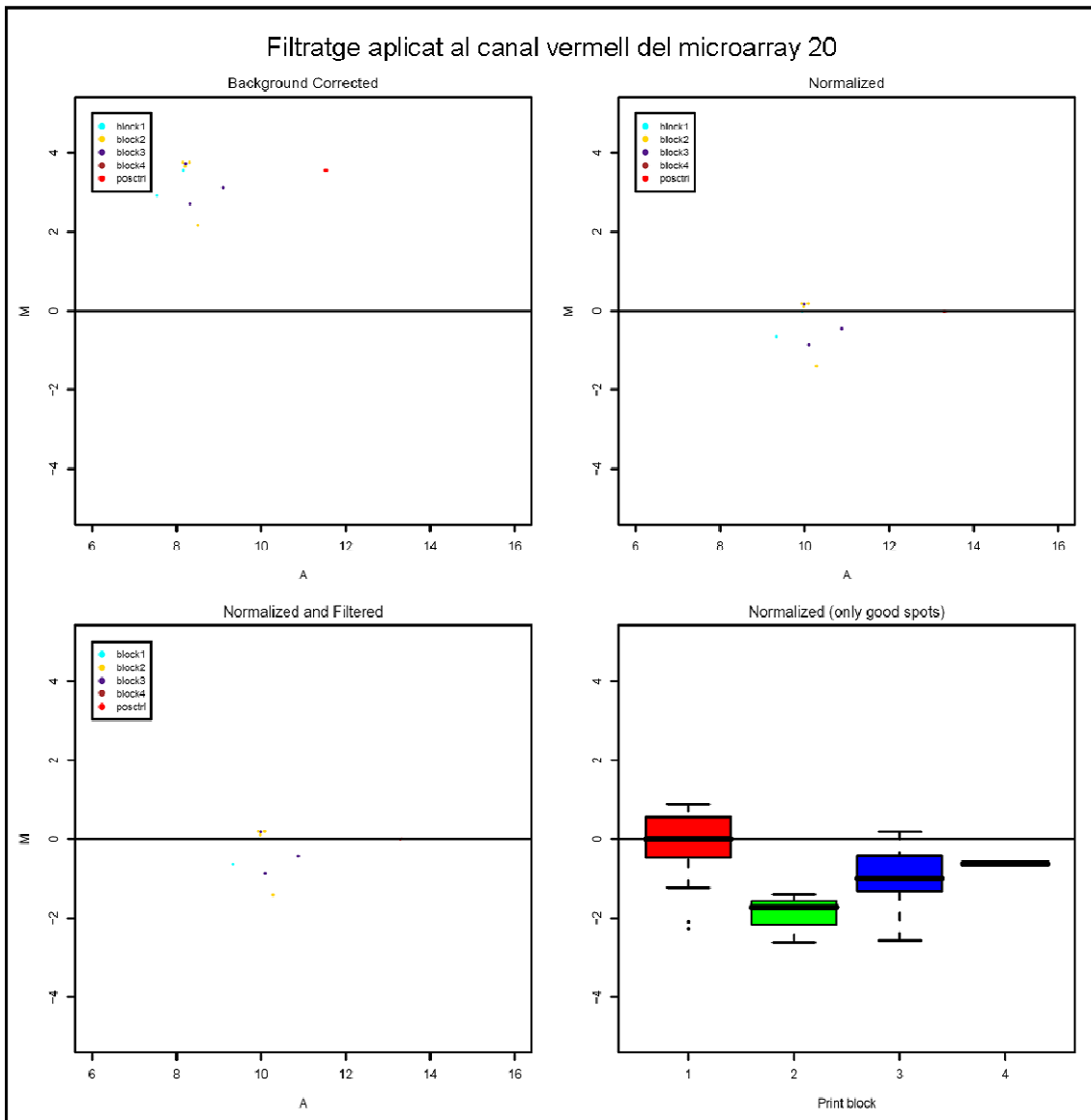
**Figura 50.- Dades del microarray 20 amb les intensitats del canal verd filtrades. *Background corrected:* Dades amb el soroll de fons eliminat, *Normalized:* Dades amb el soroll de fons eliminat normalitzades, *Normalized and Filtered:* Dades amb el soroll de fons eliminat normalitzades i filtrades, *Normalized (only good spots):* Representació de les dades del gràfic *Normalized and Filtered* en funció del bloc del microarray on es troben els *spots* corresponents.  $M = \log_2 R - \log_2 G$  i  $A = \frac{1}{2} \times (\log_2 R + \log_2 G)$  on R fa referència al canal vermell i G al canal verd.**



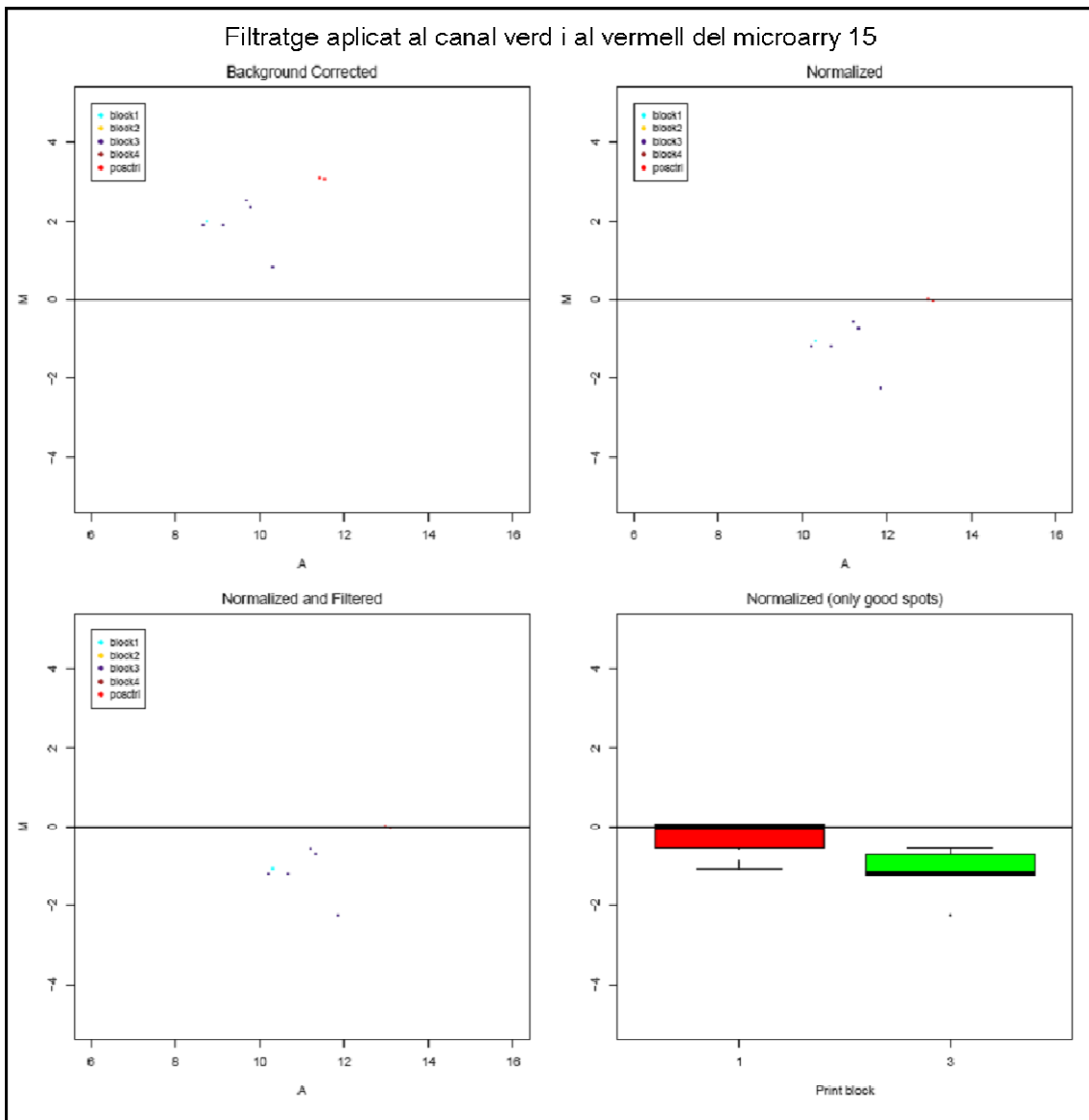
**Figura 51.- Dades del microarray 15 amb les intensitats del canal vermell filtrades. *Background corrected*: Dades amb el soroll de fons eliminat, *Normalized*: Dades amb el soroll de fons eliminat normalitzades, *Normalized and Filtered*: Dades amb el soroll de fons eliminat normalitzades i filtrades, *Normalized (only good spots)*: Representació de les dades del gràfic *Normalized and Filtered* en funció del bloc del microarray on es troben els *spots* corresponents.  $M = \log_2 R - \log_2 G$  i  $A = \frac{1}{2} \times (\log_2 R + \log_2 G)$  on R fa referència al canal vermell i G al canal verd.**



**Figura 52.- Dades del microarray 16 amb les intensitats del canal vermell filtrades. *Background corrected*: Dades amb el soroll de fons eliminat, *Normalized*: Dades amb el soroll de fons eliminat normalitzades, *Normalized and Filtered*: Dades amb el soroll de fons eliminat normalitzades i filtrades, *Normalized (only good spots)*: Representació de les dades del gràfic *Normalized and Filtered* en funció del bloc del microarray on es troben els *spots* corresponents.  $M = \log_2 R - \log_2 G$  i  $A = \frac{1}{2} \times (\log_2 R + \log_2 G)$  on R fa referència al canal vermell i G al canal verd.**

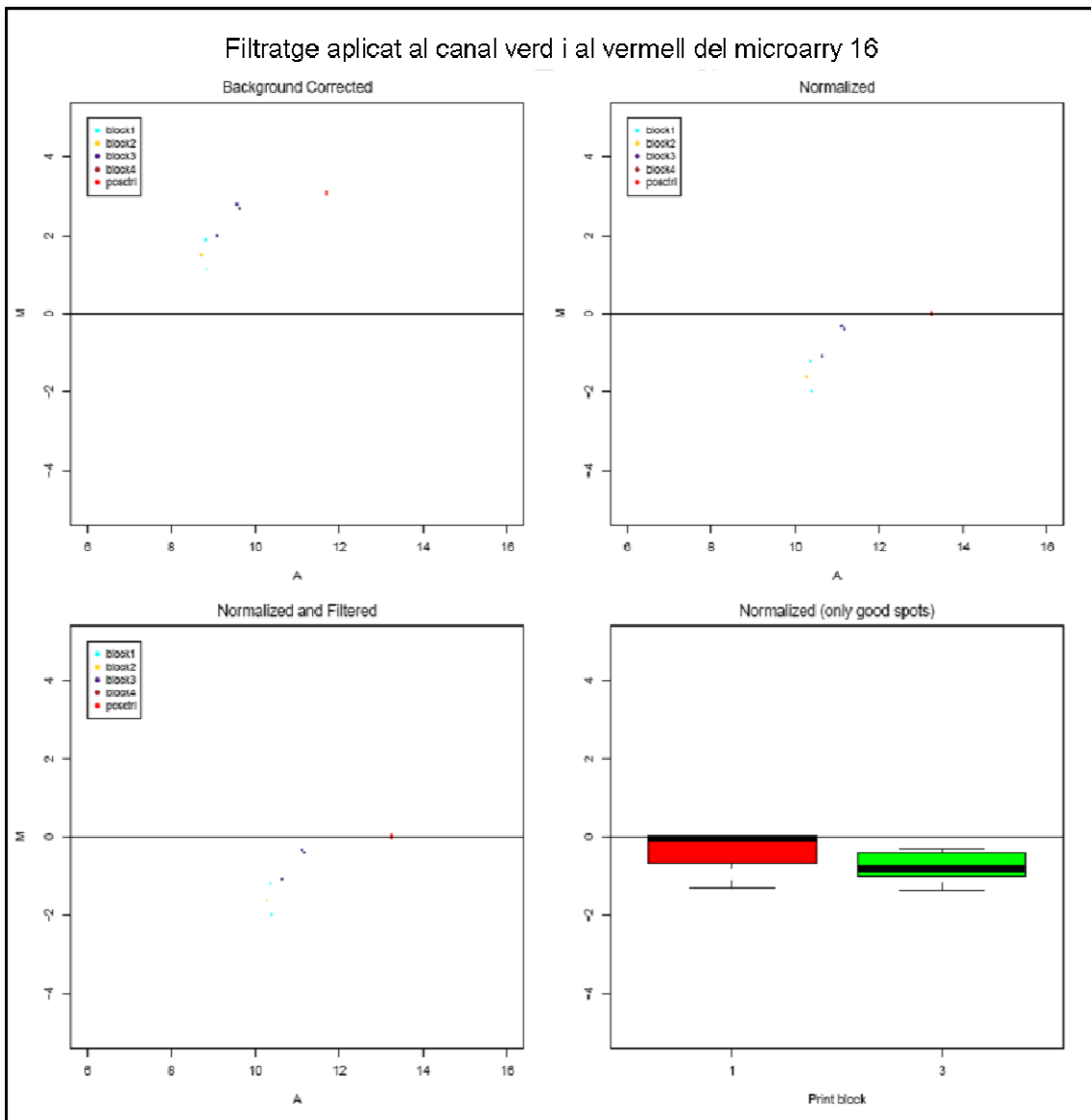


**Figura 53.- Dades del microarray 20 amb les intensitats del canal vermell filtrades. *Background corrected*: Dades amb el soroll de fons eliminat, *Normalized*: Dades amb el soroll de fons eliminat normalitzades, *Normalized and Filtered*: Dades amb el soroll de fons eliminat normalitzades i filtrades, *Normalized (only good spots)*: Representació de les dades del gràfic *Normalized and Filtered* en funció del bloc del microarray on es troben els *spots* corresponents.  $M = \log_2 R - \log_2 G$  i  $A = \frac{1}{2} \times (\log_2 R + \log_2 G)$  on R fa referència al canal vermell i G al canal verd.**

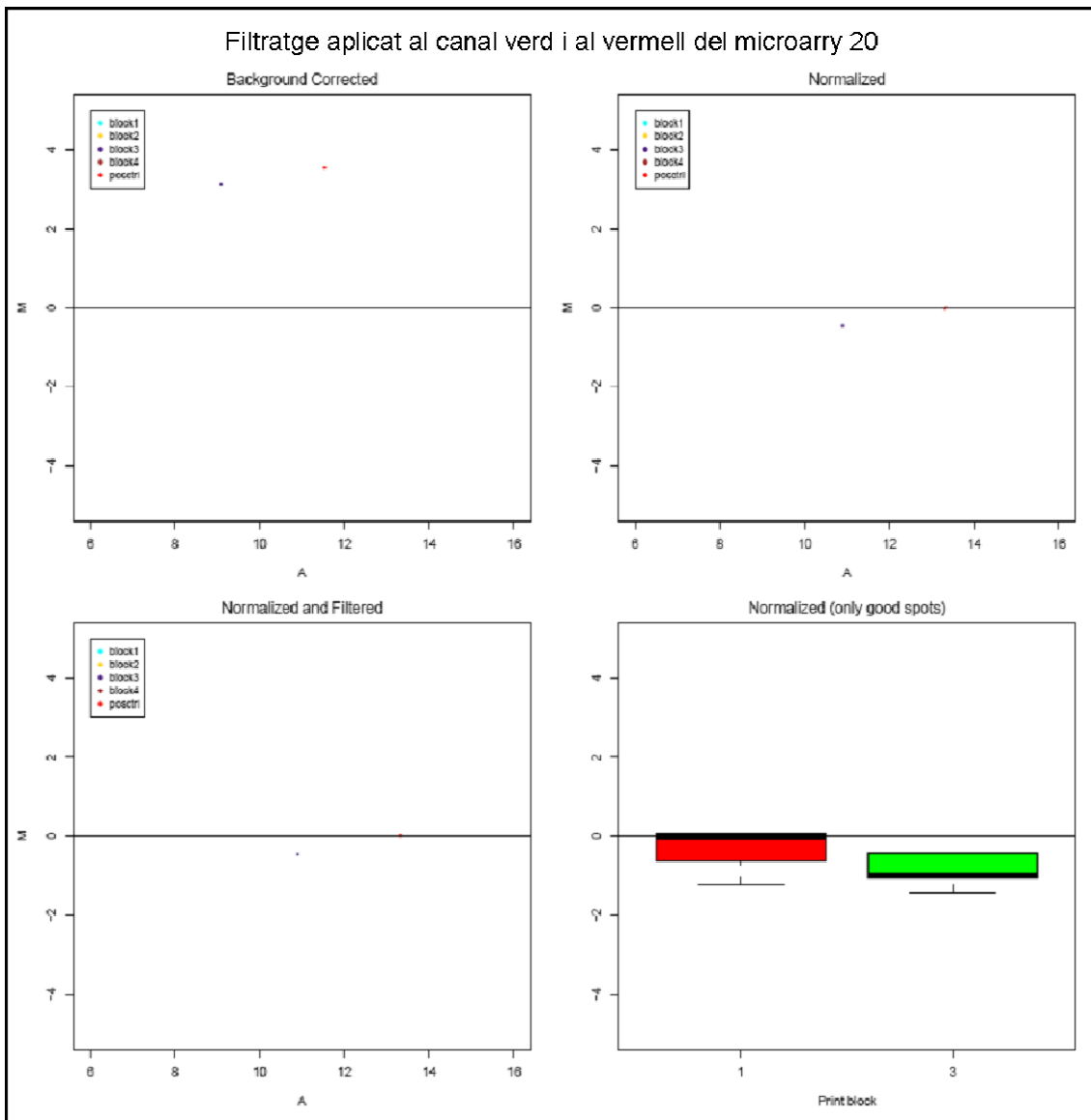


**Figura 54.- Dades del microarray 15 amb les intensitats dels dos canals filtrades. *Background corrected*: Dades amb el soroll de fons eliminat, *Normalized*: Dades amb el soroll de fons eliminat normalitzades, *Normalized and Filtered*: Dades amb el soroll de fons eliminat normalitzades i filtrades, *Normalized (only good spots)*: Representació de les dades del gràfic *Normalized and Filtered* en funció del bloc del microarray on es troben els *spots* corresponents.  $M = \log_2 R - \log_2 G$  i  $A = \frac{1}{2} \times (\log_2 R + \log_2 G)$  on R fa referència al canal vermell i G al canal verd.**





**Figura 55.- Dades del microarray 16 amb les intensitats dels dos canals filtrades. *Background corrected*: Dades amb el soroll de fons eliminat, *Normalized*: Dades amb el soroll de fons eliminat normalitzades, *Normalized and Filtered*: Dades amb el soroll de fons eliminat normalitzades i filtrades, *Normalized (only good spots)*: Representació de les dades del gràfic *Normalized and Filtered* en funció del bloc del microarray on es troben els *spots* corresponents.  $M = \log_2 R - \log_2 G$  i  $A = \frac{1}{2} \times (\log_2 R + \log_2 G)$  on R fa referència al canal vermell i G al canal verd.**



**Figura 56.- Dades del microarray 20 amb les intensitats dels dos canals filtrades. *Background corrected*: Dades amb el soroll de fons eliminat, *Normalized*: Dades amb el soroll de fons eliminat normalitzades, *Normalized and Filtered*: Dades amb el soroll de fons eliminat normalitzades i filtrades, *Normalized (only good spots)*: Representació de les dades del gràfic *Normalized and Filtered* en funció del bloc del microarray on es troben els *spots* corresponents.  $M = \log_2 R - \log_2 G$  i  $A = \frac{1}{2} \times (\log_2 R + \log_2 G)$  on R fa referència al canal vermell i G al canal verd.**

#### 4.2.6. Classificació dels resultats

Aquells *spots* que han superat els filtratges en qualsevol de les tres formes que s'han aplicat (sobre els dos canals, només sobre el canal verd o només sobre el canal vermell, Annex 2), s'han classificat com a 1 mentre que els que no els han superat han estat classificats com a 0. Els filtratges són:

- eliminació dels *spots* no marcats (no trobats) o marcats com a molt bo (controls positius).
- que els *spots* tinguin més del 50% dels píxels saturats.
- que la mitjana de la intensitat de cada canal, com a mínim, dobli la mitjana de la intensitat del "background".
- que la relació de regressions sigui superior a 0'5.
- que la relació de les mitjanes i la relació de les regressions no presenti una diferència superior al 20%.

Aquells clons que com a mínim tenen un 1 en qualsevol columna dels *spots* que han superat el filtratge en els dos canals (X\_BothOK) o un 1 en cada una de les rèpliques dels *spots* que han superat el filtratge en el canal verd i en el canal vermell per separat (X-RedOK i X-GreenOK), representats en groc en la taula 10, són els següents:

**85A1, 71F5, 89D7, 71E3, 85A12, 71D3, 71H1 i 71H3.**

Aquells clons que com a mínim tenen un 1 en cada una de les rèpliques dels *spots* per al filtratge en el canal vermell (X-RedOK), representats en vermell en la taula 10, són els següents:

**06G7, 06G3, 06B3, 06C1, 06G4, 85G7, 71F4, 85F1 i 85E3.**

Aquells clons que com a mínim tenen un 1 en alguna de les rèpliques dels clons per a algun dels tres tipus de filtratges que s'han realitzat, representats en blanc en la taula 10, són els següents:

**89G7, 85G11, 89A5, 85D3, 71C7, 85B3, 85A9, 71E10, 85E7, 06C3, 89F2, 85H8 i 06C8.**

Cal destacar l'absència de clons que únicament presentin un 1 en el filtratge realitzat en el canal verd. Això pot estar indicant, de nou, que la seqüència sobre la que es va dissenyar aquesta sonda realment és molt més variable que no pas la de l'altra sonda i que, per tant, la hibridació és molt més difícil.

Clon	15_BothOK	16_BothOK	20_BothOK	15_RedOK	16_RedOK	20_RedOK	15_GreenOK	16_GreenOK	20_GreenOK
85_A1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
85_A1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
71_F5	1	1	1	1	1	1	1	1	1
71_F5	1	1	0	1	1	0	1	1	0
89_D7	1	0	0	1	1	0	1	0	0
89_D7	0	1	0	1	1	1	0	1	0
71_E3	0	1	0	0	1	0	0	1	0
71_E3	1	0	0	1	0	0	1	0	0
85_A12	0	1	0	1	1	0	0	1	0
85_A12	0	0	0	1	1	1	0	0	0
71_D3	0	0	0	1	1	0	0	0	0
71_D3	1	0	0	1	0	0	1	0	0
71_H1	0	0	0	0	1	0	0	1	0
71_H1	0	0	0	1	1	0	1	1	0
71_H3	0	0	0	1	0	0	1	0	0
71_H3	1	0	0	1	0	0	1	0	0
06_G7	0	0	0	1	1	0	0	0	0
06_G7	0	0	0	1	1	0	0	0	0
06_G3	0	0	0	1	1	0	0	0	0
06_G3	0	0	0	1	1	0	0	0	0
06_B3	0	0	0	1	1	0	0	0	0
06_B3	0	0	0	1	0	1	0	0	0
06_C1	0	0	0	1	1	1	0	0	0
06_C1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
06_G4	0	0	0	0	0	1	0	0	0
06_G4	0	0	0	0	1	1	0	0	0
85_G7	0	0	0	1	1	0	0	0	0
85_G7	0	0	0	0	1	0	0	0	0
71_F4	0	0	0	0	1	0	0	0	0
71_F4	0	0	0	1	1	0	0	0	0
85_F1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
85_F1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
85_E3	0	0	0	1	0	0	0	0	0
85_E3	0	0	0	0	1	0	0	0	0
89_G7	0	0	0	1	0	0	1	0	0
85_G11	0	0	0	1	1	0	0	0	0
89_A5	0	1	0	0	1	0	0	1	0
85_D3	0	0	0	0	1	0	0	0	0
71_C7	0	0	0	0	1	0	0	0	0
85_B3	0	0	0	1	0	0	0	0	0
85_A9	0	0	0	1	0	0	0	0	0
71_E10	0	0	0	1	0	0	0	0	0
85_E7	0	0	0	0	0	1	0	0	0
06_C3	0	0	0	0	1	0	0	0	0
89_F2	0	0	0	0	1	0	0	0	0
85_H8	0	0	0	0	1	0	0	0	0
06_C8	0	0	0	0	0	1	0	0	0

**Taula 10.- Taula de classificació dels resultats del microarray. 1 = superació de les cinc condicions de filtratge, 0 = NO superació de les condicions de filtratge.**

#### 4.2.7. Anàlisi amb SNR (Signal-to- Noise Ratio)

Tal com ja s'ha comentat en l'apartat 4.1.12, l'anàlisi de les dades resultants de la hibridació dels microarrays s'ha fet calculant el *background* de dues maneres diferents. En el primer cas, s'ha agafat com a *background* la mitjana de la intensitat de senyal de tots els *spots* corresponents als clons de la placa 85 excepte el control positiu. La raó de l'elecció d'aquesta placa com a punt de partida per a calcular el *background* és que les PCR amb un conjunt de clons d'aquesta placa, realitzades tant amb primers específics com degenerats, no generaven cap banda d'amplificació de mida semblant a la de la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa*, és a dir, que la hibridació detectada en els *spots* corresponents a aquesta placa no hauria de correspondre a la detecció de cap seqüència homologa a les de les sondes, fent possible assimilar aquesta hibridació detectada, a la del *background*. En la figura 57 es presenten els resultats dels SNR calculats amb aquest *background* tant pel canal verd com pel canal vermell.

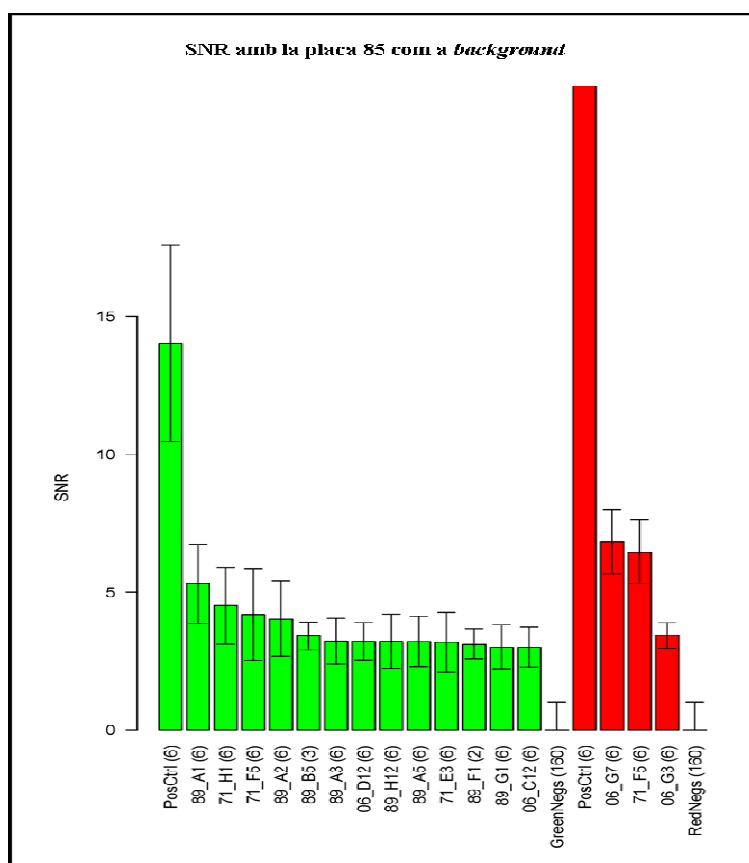
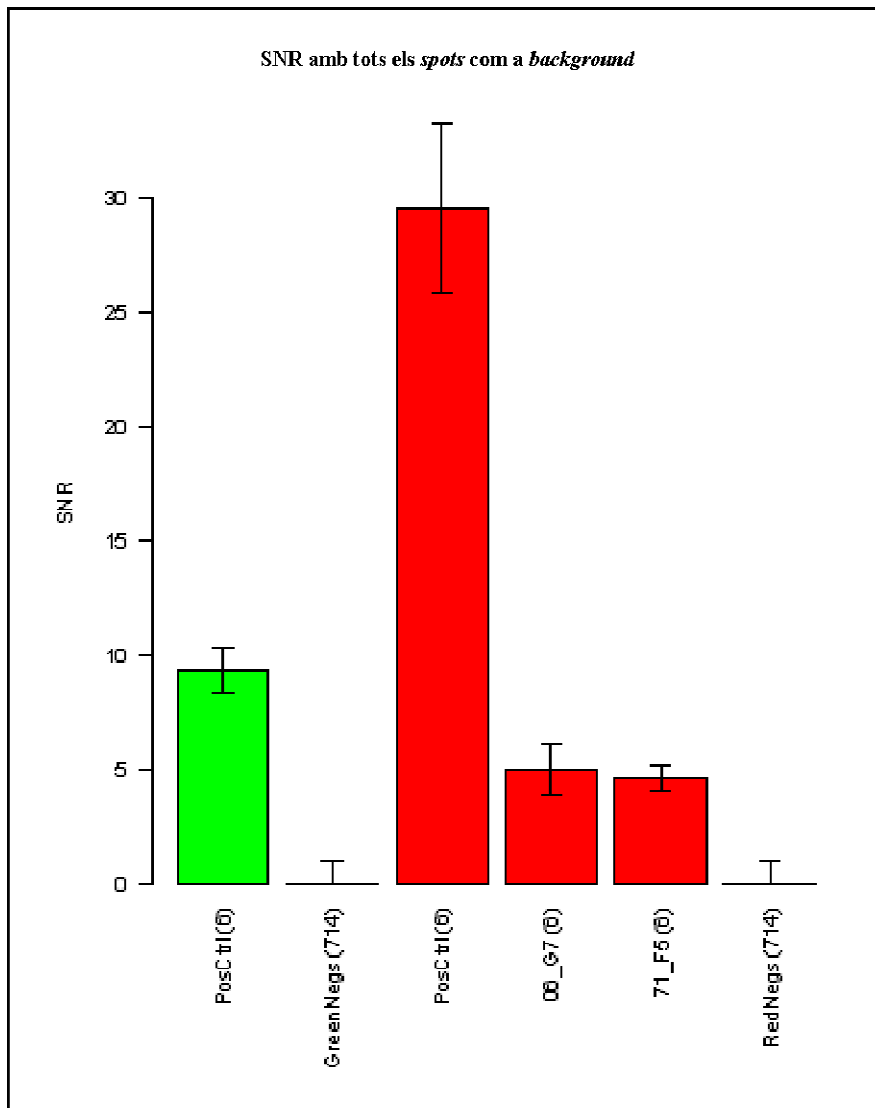


Figura 57.- Clons que presenten un valor de SNR superior a 3 tant per al canal verd (en verd) com per al canal vermell (en vermell). Entre parèntesis es mostra el número d'*spots* utilitzats en cada un dels clons per al càlcul d'aquest índex. Es mostra també la desviació estàndard.

En el segon cas s'ha calculat el *background* a partir de tots els *spots* impresos al microarray excepte el control positiu. En la figura 58 es presenten els resultats dels SNR calculats amb aquest *background* tant pel canal verd com pel canal vermell.



**Figura 58.-** Clons que presenten un valor de SNR superior a 3 tant per al canal verd (en verd) com per al canal vermell (en vermell). Entre parèntesis es mostra el número d'*spots* utilitzats en cada un dels clons per al càlcul d'aquest índex. Es mostra també la desviació estàndard.

Comparant els resultats entre la determinació de l'SNR calculat amb un *background* obtingut a partir dels clons de la placa 85 o a partir de tots els clons s'observa que, en el primer cas, el nombre d'*spots* que superen el valor llindar de 3 per a l'índex SNR és de tretze per al canal verd i de tres per al

canal vermell mentre que, per al segon cas, no n'hi ha cap per al canal verd i dos per al canal vermell. Això vol dir que la sonda verda ha hibridat sensiblement menys en els *spots* provinents de la placa 85 (control negatiu) que no pas respecte els altres. Aquest fet ja és lògic tenint en compte que la PCR feta sobre el grup de clons de la placa 85 amb els encebadors utilitzats per a sintetitzar aquesta sonda (encebadors degenerats) no genera cap banda de mida esperada en el cas de contenir lipoxigenases del tipus de la de *Pseudomonas aeruginosa*. El fet de no obtenir cap clon amb un SNR superior a 3 quan es treballa amb un *background* calculat a partir de tots els clons, fa pensar, de nou, que aquesta sonda s'ha dissenyat en una zona de la seqüència molt poc conservada.

Respecte a la sonda vermella, la situació és diferent ja que, en el cas del *background* obtingut a partir dels clons de la placa 85, s'obtenen tres clons amb un valor de SNR superior a 3 mentre que quan es realitza el mateix anàlisi amb el *background* obtingut a partir de tots els clons s'observa que són dos clons (coincidents amb dos dels tres anteriors) els que superen el valor de tres per a l'índex SNR. Aquests resultats indiquen que el *background* per aquesta sonda és més homogeni, és a dir, que no presenta moltes diferències si es calcula a partir de la placa 85 o a partir de totes les plaques, fet que indica que probablement la hibridació hagi estat més específica ja que la zona de la seqüència que cobreix aquesta sonda presenta més conservació que no pas l'altra.

#### **4.2.8. Seqüenciació dels clons candidats**

Els clons que, un cop aplicats els diferents anàlisis de dades, han estat classificats com a possibles candidats a presentar una lipoxigenasa del tipus de la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa*, trentanou en total, són els següents: 85A1, 71F5, 89D7, 71E3, 85A12, 71D3, 71H1, 71H3, 06G7, 06G3, 06B3, 06C1, 06G4, 85G7, 71F4, 85F1, 85E3, 89G7, 85G11, 89A5, 85D3, 71C7, 85B3, 85A9, 71E10, 85E7, 06C3, 89F2, 85H8, 06C8, 89A1, 89A2, 89A5, 89A3, 06D12, 89H12, 89F1, 89G1 i 06C12. Tot ells han estat seqüenciats i en tots els casos s'han obtingut seqüències que, un cop aplicades a la base de dades GenBank han donat com a resultat uns aliniaments amb identitats d'entre el 93

i el 99 % amb les lipoxigenases de diverses soques de *Pseudomonas aeruginosa* (PA01, PA7, LESB58, PA14 i PA42A2).

#### **4.2.9. Consideracions globals**

L'objectiu principal d'aquest estudi era el de fer una prospecció massiva de lipoxigenases per tal de trobar-ne de noves. Els resultats obtinguts indiquen que el baix nombre de seqüències classificades com a lipoxigenases presents al GenBank i la gran diversitat d'aquestes, han dificultat assolir l'objectiu proposat. Malgrat això, l'aplicació de la metodologia del microarray ha estat un èxit ja que els resultats positius detectats amb aquesta tècnica eren, efectivament, lipoxigenases.

Cal doncs, tenir present que quan es fa una prospecció metagenòmica per a cercar noves lipoxigenases, l'èxit de la mateixa dependrà, en gran mesura, de com de conservada estigui la seqüència de les lipoxigenases de les que es parteix (Park SJ., Kang CH. et al. 2008). En aquest cas, la conservació d'aquesta seqüència és molt baixa i hi ha el problema afegit de que el desconeixement sobre les lipoxigenases d'origen bacterià és important i la informació sobre aquestes, és escassa (Kuhn H. and Thiele BJ. 1999).

Per altra banda, hi ha molt poca bibliografia referent a estudis de rastreig de nous gens amb microarrays construïts amb còsmids. Un dels estudis més recents és el de Park i col·laboradors, de l'any 2008 (Park SJ., Kang CH. et al. 2008) i posterior a les dates de realització d'aquest l'estudi. Aquest estudi avalua l'especificitat i la sensibilitat d'aquesta metodologia i demostra que, aquest tipus d'arrays, poden ser utilitzat amb èxit per a la detecció de gens específics en una biblioteca metagenòmica oferint, així, una aplicació potencial molt interessant com a eina de detecció d'alt rendiment de noves seqüències.

El fet que per a dissenyar primers degenerats només s'hagin pogut dissenyar a partir de cinc de les catorze seqüències aplicades al programa DePiCt 2.0, ja indica que realment, la diversitat de seqüència d'aquest grup de lipoxigenases és elevada. Si bé és cert que aquest fet pot ser degut al baix nombre de seqüències de lipoxigenases presents a les bases de dades i a la gran diversitat de grups taxonòmics d'aquestes, no és casual que les cinc



seqüències a partir de les quals s'han dissenyat els primers degenerats siguin d'organismes dels gèneres *Pseudomonas*, *Photobacterium*, *Burkholderia* i *Shewanella* filogenèticament propers. Així doncs, aquests són els millors encebadors degenerats possibles i, per tant, són els que poden generar la sonda amb la que es pugui detectar major quantitat de seqüències semblants a les de les lipoxigenases. El fet que les sondes utilitzades cobreixin part de la seqüència corresponent a la part de la lipoxigenasa més conservada estructuralment (primera esfera de coordinació del ferro), ja indica que realment l'elecció dels primers ha estat la correcta i que les sondes són les més adequades tenint en compte l'alta diversitat de seqüència de les lipoxigenases bacterianes.

El problema de treballar amb primers degenerats es pot veure en la figura 40 on es mostra el resultat de l'amplificació de diversos grups de clons (plaques). Es pot veure com aquest tipus d'encebedors genera diverses bandes cosa que vol dir que estan hibridant en varies zones a la vegada. En la figura 42 però, podem veure que quan es treballa amb material metagenòmic aquest fenomen també es dona en el cas dels encebadors específics. En aquesta imatge s'observa com el clon D2 de la placa 6 presenta una banda a la mateixa alçada que la generada amb aquests mateixos primers sobre la seqüència de la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa*. El fet que també la presenta amb una amplificació amb encebadors degenerats (figura 40) és el motiu per al qual s'ha utilitzat aquesta placa com a control positiu en el disseny del microarray.

Les particularitats de l'experiment realitzat amb els microarrays han determinat els mètodes utilitzats per a identificar els *spots* positius. Cal tenir present que allò que es vol detectar en aquests microarrays són els còsmids que contenen seqüències complementàries de les sondes, però aquestes seqüències poden presentar diversos graus de degeneració respecte les sondes. Per altra banda, hi ha la possibilitat de trobar seqüències amb les dues sondes hibridades o amb una de sola i, a més a més, els nivells d'hibridació dependran dels graus de degeneració. Així doncs, la relació R/G ens pot indicar quina sonda ha hibridat en un còsmid determinat i també pot indicar el grau de degeneració de la seqüència.

Hi ha dos aspectes de l'experiment que cal tenir presents. Primerament, és difícil aplicar els mètodes de normalització quan el nombre d'*spots* on podem suposar que hi ha una relació R/G de 1, és baix i aquests no estan distribuïts a l'atzar (Verdnick D., Handran S. et al. 2002). En segon lloc, el fet que molts *spots* no siguin rodons, són com tres o quatre *spots* petits, dificulta molt la definició de l'*spot* per tal de calcular-ne la intensitat.

Tots aquests condicionants són els que han fet recomanable el doble anàlisi de les dades. Un anàlisi amb els valors d'intensitat dels dos canals vinculats ( $\log_2 R/G$ ) i un altre sense relació entre els dos canals (SNR).

Les figures 46 i 47 aporten informació sobre la homogeneïtat de la hibridació en cada un dels arrays indicant si hi ha o no repetibilitat en el resultat de l'experiment. Es pot observar que, en tots tres arrays, la hibridació ha estat força semblant. Tots tres arrays presenten una mitjana d'intensitat semblant, l'array 16 és el que més es diferencia, això s'explica per una major dispersió de dades que es tradueix en una major desviació estàndard en aquest grup de dades. El fet que aquestes diferències es mantinguin en la figura 46 està indicant que el soroll de fons és similar en els tres arrays, fet que és característic d'un funcionament equivalent de la hibridació en cada un dels microarrays i que aporta qualitat a la repetibilitat de l'experiment i, a la vegada, permet normalitzar les dades i fer-les comparables.

Els valors dels factors de normalització obtinguts (8.43, 8.56 i 11.79) indiquen, de forma inequívoca, una clara diferència entre la hibridació de les dues sondes. La sonda vermella ha hibridat molt millor que no pas la sonda verda i, donat que les condicions d'astringència eren les mateixes ja que la solució d'hibridació incloïa les dues sondes i, per tant, la hibridació era simultània, i que la relació molar entre aquestes era molt propera a 1, la causa real d'aquesta diferència observada entre les intensitats produïdes per les dues sondes, només pot ser deguda a una menor hibridació de la sonda verda (entre 8 i 10 vegades més hibridació de la sonda vermella que no pas de la verda). L'explicació més plausible per a aquesta diferència és que la sonda vermella presenta millor homologia de seqüència per a les lipoxigenases que no pas la verda i per tant, sota unes mateixes condicions d'hibridació, és la sonda vermella la que millor hibrida. El fet que la sonda verda hagi estat generada

amb encebadors degenerats dissenyats a partir de cinc seqüències de lipoxigenases bacterianes (anteriorment citades) podria explicar aquesta diferència ja que, si bé és cert que aquets primers representarien la part de les seqüències més conservades de les cinc lipoxigenases utilitzades, la part amplificada entre aquest dos encebadors no ha de perquè estar conservada.

Val la pena remarcar, de nou, dos aspectes d'aquest experiment. En primer lloc, observant les figures 43 i 44 ja s'intueix una major intensitat per al canal vermell que no pas per al canal verd, i en segon lloc un altra factor que indica la repetibilitat de la hibridació és el fet que la distribució dels *spots* que superen els filtratges de dades es manté igual entre els diferents arrays.

Cal destacar l'absència de clons que únicament presentin un 1 en el filtratge realitzat en el canal verd. Això pot estar indicant, de nou, que la seqüència sobre la que es va dissenyar aquesta sonda realment és molt més variable que no pas l'altre sonda i que per tant la hibridació és molt més difícil.

Els resultats dels anàlisis mitjançant l'índex SNR (Signal-to-Noise Ratio) presenten unes diferències clares en funció del *background* que utilitzem per a calcular l'índex. En el cas d'utilitzar els *spots* corresponents a la placa 85 per a calcular el *background* molts més clons superen el valor llindar de 3 per a l'índex SNR. Això és degut a que els valors de SNR amb un *background* calculat a partir dels *spots* provinents dels clons de la placa 85, són més elevats ja que el *background* és més petit per aquesta placa que no pas per el conjunt de totes les plaques, i la desviació estàndard d'aquest també ho és. El resultat d'això és que els valors de SNR són més elevats en el cas d'aplicar un *background* calculat a partir de la placa 85 i per tant, més clons superen el valor llindar de 3 que no pas si es calcula amb totes les plaques. Aquests resultats són perfectament raonables tenint en compte que la placa 85 va ser escollida com a control negatiu ja que en les PCR realitzades sobre el conjunt de còsmids dels clons que conformaven la placa, no es va observar l'amplificació de cap banda usant els encebadors dissenyats. Així doncs, ja és normal que la placa 85 presenti un *background* més petit i una desviació estàndard més petita comparada amb el *background* i la desviació estàndard calculada a partir de totes les plaques.

S'observa la mateixa tendència quan es miren els resultats obtinguts per al canal vermell, tot i que en aquest cas, amb menor evidència. Analitzant les dades amb un *background* calculat a partir de la placa 85, tres clons superen el valor llindar de 3 mentre que amb un *background* obtingut a partir de totes les plaques, són dos dels tres anteriors clons els que el superen. En aquest cas, la raó és la mateixa però aplicada al canal vermell. Els valors de SNR per a aquests clons són notablement més elevats que no pas per als clons del canal verd que superaven el valor llindar fet que, novament, indica una major hibridació atribuïble a una major homologia de seqüència entre la sonda vermella i les seqüències dels clons "positius" que no pas en el cas de la sonda verda.

Comparant els resultats entre els dos tipus d'anàlisi realitzats, l'anàlisi mitjançant el filtratge de les dades i l'anàlisi usant l'índex SNR, és interessant veure com aquells clons que presenten major intensitats superen els dos anàlisis. És el cas dels clons 71F5, 06G7 i 06G3. Aquest fet aporta credibilitat al resultat ja que, tant analitzant les dades d'una manera més objectiva, com és el cas de l'ús d'un índex numèric, com en el cas d'una manera més subjectiva, com és el cas de l'establiment d'uns criteris per a filtrar i seleccionar unes dades, els resultats són els mateixos i per tant més fiables.

La semblança en els resultats obtingut amb els dos tipus d'anàlisi es fa visible, també, en el fet que en l'anàlisi a partir de filtratges, cap clon supera aquests quan s'apliquen únicament sobre el canal verd. El mateix passa quan s'analitzen els SNR del canal verd imposant un *background* que respon a la realitat del conjunt de l'array i no pas únicament al *background* del que, inicialment, s'havia determinat com a control negatiu de l'experiment.

Els resultats de les seqüenciacions dels clons que han superat els anàlisis, resultats que en tots els casos mostren que aquella seqüència detectada correspon a la d'una lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa*, posen de manifest dues qüestions. En primer terme, demostren de forma inequívoca, l'efectivitat de la tècnica del microarray a l'hora de detectar gens específics en material metagenòmic, doncs cap dels clons seleccionats ha resultat ser un falç positiu. En segon terme, es posa de manifest la dificultat per aplicar aquesta tècnica en gens que presenten una baixa conservació de

seqüència. És cert que, altres estratègies com poden ser l'ús de més sondes de menor longitud, o l'ús de sondes molt més específiques per a cada tipus de gen present en les bases de dades, són opcions que encara no s'han provat però que, en cap cas, modifiquen l'essència de la tècnica del microarray tot i que suposin un major cost en materials, en temps experimental i en temps d'anàlisi de les dades.

Un altra aspecte interessant a comentar és el del valor llindar a aplicar en l'anàlisi de les dades a partir de l'SNR. Alguns estudis (Wu L., Thompson DK. et al. 2004) indiquen que el valor llindar pot variar en funció de la complexitat del genoma de l'espècie, del portaobjectes utilitzat per a imprimir l'array i/o de les condicions d'hibridació. Així doncs, el valor llindar de SNR de 3, utilitzat com a estàndard en aquests i en la majoria d'estudis, podria no ser un valor universal i per tant, es podria perdre informació. Aquest fet juntament amb la mida reduïda de l'array dissenyat en aquest experiment fan difícil poder modificar aquest paràmetre per a aquestes dades però en treballs futurs seria interessant definir un interval de valor SNR com a òptim, de manera que es poguessin excloure els clons amb valors superiors de SNR dels de l'interval, ja que la probabilitat d'estar detectant allò que ja coneixem és elevada, i excloure també els que presenten valors inferiors dels de l'interval. Aquest plantejament podria ser l'ideal a l'hora de detectar gens que presenten una diversitat de seqüència important.



## **5. CAPÍTOL 3: Filogènia de les lipoxigenases**





## 5.1. Material i mètodes

### 5.1.1. Seqüències de lipoxigenases utilitzades en l'anàlisi filogenètic

Per a l'estudi filogenètic de les lipoxigenases s'han utilitzat seqüències d'aquestes proteïnes d'origen animal, vegetal, de fongs, d'algues i de bacteris. El codi de la base de dades Genbank per a cadascuna d'aquestes seqüències i l'organisme que la conté es referencien seguidament:

Bacteris	Versió i GI	
<i>Myxococcus xanthus</i> DK 1622	NC_008095.1	GI:108756767
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	NC_002516.2	GI:110645304
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 42A2	AAL85880.2	GI:283788581
<i>Shewanella woodyi</i> ATCC 51908	ZP_01543473.1	GI:118075346
<i>Shewanella woodyi</i> ATCC 51908	NZ_AAUO01000023.1	GI:118073771
<i>Shewanella woodyi</i> ATCC 51908	NZ_AAUO01000010.1	GI:118072427
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14	CP000438.1	GI:115583796
<i>Nitrosomonas europaea</i> ATCC 19718	NP_841292.1	GI:30249222
<i>Photobacterium profundum</i> 3TCK	ZP_01218321.1	GI:90410305
<i>Shewanella denitrificans</i> OS217	NC_007954.1	GI:91791369
<i>Nitrospira multififormis</i> ATCC 25196	NC_007614.1	GI:82701135
<i>Burkholderia thailandensis</i> E264	CP000086.1	GI:83652219
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA7	NC_009656.1	GI:152988702
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LESB58	NC_011770.1	GI:218892867

Animals	Versió i GI	
<i>Bos taurus</i>	AAD39096.1	GI:5070263
<i>Homo sapiens</i>	NM_001141.2	GI:85067500
<i>Rattus norvegicus</i>	NP_695213.1	GI:23463277
<i>Canis familiaris</i>	XP_546603.1	GI:57086637
<i>Mus musculus</i>	NP_033791.1	GI:40363263
<i>Pan troglodytes</i>	XP_511865.2	GI:114669183
<i>Gallus gallus</i>	XP_423676.2	GI:118116654
<i>Danio rerio</i>	NP_001038796.1	GI:113673261
<i>Plexaura homomolla</i>	AAC47283.1	GI:1477763

Plantes	Versió i GI	
<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	NP_001067011.1	GI:115489048
<i>Populus deltoides</i>	AAZ57445.1	GI:71999171
<i>Cucumis sativus</i>	AAA79186.1	GI:1017772
<i>Medicago truncatula</i>	ABE89490.2	GI:140059856
<i>Zea mays</i>	AAL73499.1	GI:18481649
<i>Solanum tuberosum</i>	CAA65268.1	GI:1495802
<i>Citrus jambhiri</i>	BAB84352.1	GI:18461098
<i>Brassica napus</i>	AAO03559.1	GI:27372775
<i>Arabidopsis thaliana</i>	CAB56692.1	GI:6002055
<i>Pisum sativum</i>	CAA55318.1	GI:493730

Fongs	Versió i GI	
<i>Gibberella zeae</i>	XP_382392.1	GI:46110669
<i>Chaetomium globosum</i>	XP_001225066.1	GI:116198509
<i>Neurospora crassa</i>	CAD37061.1	GI:21622514
<i>Aspergillus fumigatus</i>	XP_746844.1	GI:70982632

### 5.1.2. Programes bioinformàtics

S'utilitzen diversos programes bioinformàtics per a fer els alineaments, els arbres filogenètics i els estudis evolutius de les seqüències a estudiar.

#### 5.1.2.1. Programes usats per a fer els alineaments

Per a fer els alineaments de les diverses seqüències emprades per a la realització d'aquesta tesi s'ha utilitzat el programa bioinformàtic Clustal W2 ([http://www.ebi.ac.uk/embnet.news/vol4\\_3/clustalw1.html](http://www.ebi.ac.uk/embnet.news/vol4_3/clustalw1.html)), programa d'alineació de seqüències nucleotídiques o aminoacídiques que produeix alineaments múltiples de seqüències divergents biològicament significatius. Aquest programa calcula el millor alineament per a les seqüències seleccionades, i mostra les identitats, similituds i diferències obtingudes en funció d'aquest.

Els alineaments aplicats al conjunt de programes PAML 4.3 (veure punt 6.1.2.3) han estat modificats eliminant de totes les seqüències, aquells codons que només codifiquen per a dues o menys seqüències (és a dir, que en la resta de seqüències, el programa d'alineament hi ha introduït *gaps*).

#### 5.1.2.2. Programes i mètodes per a fer els arbres filogenètics.

A partir de les seqüències alineades, mitjançant el programa MEGA 4 (Tamura K., Dudley J. et al. 2007) que té integrat el programa CLUSTAL W, es generen els arbres filogenètics per a les seqüències analitzades. S'han obtingut utilitzant la matriu de distàncies de Jukes-Cantor i el mètode d'agrupament Neighbour-Joining, de manera que els arbres no presenten arrel i només mostren les relacions genètiques entre les diferents seqüències. El nivell de confiança de l'arbre s'ha determinat mitjançant un anàlisi de "bootstrapping" de 1000 rèpliques (el programa mostra els valors obtinguts als nodes de la figura).

### **5.1.2.3. PAML 4.3: Anàlisi filogenètic per màxima versemblança.**

PAML (Phylogenetic Analysis by Maximum Likelihood) és un conjunt de programes bioinformàtics per a l'anàlisi de DNA o de seqüències aminoacídiques que utilitza el mètode de la màxima versemblança. Aquest sistema pot ser usat per estimar paràmetres i provar hipòtesis per a estudiar els processos evolutius als que han estat sotmesos un conjunt de seqüències (Yang Z. 2007).

PAML inclou BASEML, BASEMLG, CODEML, Evolved, PAMP, YN00, MCMCTREE, i CHI<sub>2</sub>. Aquests programes poden ser usats per a avaluar una col·lecció d'arbres obtinguts mitjançant altres programes com el MEGA (Tamura K., Dudley J. et al. 2007). La força de PAML és a la varietat i sofisticació dels models de substitució, característica molt útil quan es pretén entendre el procés d'evolució de les seqüències en estudi. Exemples d'anàlisi que es poden realitzar utilitzant PAML són (Yang Z. 2007):

- Comparació i anàlisi d'arbres filogenètics (BASEML i CODEML).
- Estimació de paràmetres en els models de substitució, inclosos models amb taxes variables entre diferents llocs i els models per a l'anàlisi combinat de diversos gens (BASEML i CODEML).
- Proves de raó de versemblança de les hipòtesis mitjançant la comparació dels models estadístics niuats (BASEML, CODEML, CHI<sub>2</sub>) que permeten el càlcul de LRTs (Likelihood ratio test).
- Estimació de les taxes de substitució sinònimes (dS) i no sinònimes (dN) i la detecció de la selecció darwiniana positiva en seqüències codificadores de proteïnes de l'ADN (YN00 i CODEML).
- Estimació de les matrius de substitució d'aminoàcids (CODEML).
- Estimació de temps de divergència d'espècies en virtut dels models de rellotge mundial i local usant el mètode de la màxima versemblança (BASEML i CODEML).
- Reconstrucció de seqüències ancestrals (BASEML i CODEML).

Els estudis filogenètics realitzats sobre les seqüències de lipoxigenases realitzats en aquesta tesi s'han dut a terme amb el programa CODEML.

### 5.1.2.3.1. CODEML: anàlisi dels models evolutius

El programa CODEML permet l'estudi de l'evolució d'una proteïna en funció de les substitucions acumulades durant el temps d'evolució. Hi ha un gran nombre de tipus de substitució de codons. A continuació s'introdueixen quatre d'aquest tipus on es poden aplicar diversos models estadístics: el bàsic, el de branques, el de *sites* i el de branques-*sites*.

El model bàsic més utilitzat és una versió simplificada del model de Goldman i Yang de l'any 1994 que especifica la taxa de substitució d'un codó  $i$  a un codó  $j$  ( $q_{ij}$ ) com (Yang Z. and Nielsen R. 1998):

$q_{ij} = 0$  si els dos codons difereixen en més d'una posició

$q_{ij} = \pi_j$  per a transversions sinònimes

$q_{ij} = \kappa\pi_j$  per a transicions sinònimes

$q_{ij} = \omega\pi_j$  per a transversions no sinònimes

$q_{ij} = \omega\kappa\pi_j$  per a transicions no sinònimes

La freqüència d'equilibri del codó  $j$  ( $\pi_j$ ) pot ser considerada un paràmetre lliure però també pot ser calculada a partir de les freqüències dels nucleòtids en les tres posicions del codó. Sota aquest model, la relació entre sinònims i no sinònims és  $\omega$  que és igual a dN/dS. La taxa  $\omega$  és una mesura de la selecció natural que està actuant en la proteïna. Bàsicament, uns valors de  $\omega < 1$ ,  $= 1$ , i  $> 1$  signifiquen selecció purificadora negativa, evolució neutra i selecció positiva respectivament. No obstant això, la proporció mitjana sobre tots els llocs i tots els llinatges gairebé mai és superior a 1 ja que, si bé la selecció positiva és probable que afecti a tot arreu, ho farà a través de temps molt prolongats. És per això que l'interès es centre en la detecció de la selecció positiva que afecta només a alguns llocs o llinatges.

El model de branques permet que la taxa  $\omega$  variï entre les diferents branques de l'arbre filogenètic i és útil per a detectar la selecció positiva actuant en llinatges particulars (Yang Z. 1998; Yang Z. and Nielsen R. 1998). El model 1 del model de branques (en el programa CODEML), assumeix un valor de  $\omega$  independent per a cada branca. En el model 2, es permet treballar amb

diverses  $\omega$  havent d'especificar amb quantes taxes diferents es vol treballar i a quines branques s'aplicaran.

El model de *sites* permet que  $\omega$  variï entre els diferents llocs (entre els codons o aminoàcids en les proteïnes) (Yang Z. and Nielsen R. 1998; Yang Z., Nielsen R. et al. 2000). Per a aquest model s'han ajustat els models d'hipòtesis ajustant els paràmetres per a cada hipòtesi (taula 11).

Model	NSsites	p	Parametres
M0 (hip. nul·la)	0	1	$\omega$
M1a (neutra)	1	2	$p0$ ( $p1 = 1 - p0$ ), $\omega_0 < 1, \omega_1 = 1$
M2a (selecció positiva)	2	4	$p0, p1$ ( $p2 = 1 - p0 - p1$ ), $\omega_0 < 1, \omega_1 = 1, \omega_2 > 1$
M7 ( $\omega$ general)	7	2	$p, q$
M8 ( $\omega > 1$ )	8	4	$p0$ ( $p1 = 1 - p0$ ), $p, q, \omega_s > 1$

**Taula 11.- on p és el nombre de paràmetres lliures en la distribució de  $\omega$  (entre parèntesis els paràmetres que no són lliures i que per tant no han de ser comptats com a tals.**

En aquest cas el model M0 és la hipòtesi nul·la contra la que comparar els altres models M1a (selecció neutre) i M2a (selecció positiva), mentre que els models M7 i M8 (selecció positiva amb distribució  $\beta$ ) es comparen entre ells. Dos parells de models semblen ser particularment útils. El primer compara M1a (Neutral) i M2a (Selecció positiva), mentre que el segon es compara M7 i M8. El programa CODEML utilitza el càlcul del valor BEB (Bayes empirical Bayes) per a determinar la probabilitat que un *site* estigui sotmès a selecció positiva sempre que l'LRT sigui significatiu (Yang Z., Wong WSW. et al. 2005).

El model branques-*sites* permet variar  $\omega$  tant entre els diferents *sites* de la proteïna com entre les diferents branques de l'arbre amb l'objectiu de detectar la selecció positiva que afecta a uns pocs *sites* de llinatges particulars.

La taxa de substitucions sinònimes (llocs sinònim, dS), la taxa de substitucions no sinònimes (lloc no sinònims, dN) i la relació dN / dS ( $\omega$ ) s'han calculat utilitzant el mètode de Nei-Gojobori (Nei M. and Gojobori T. 1986) implementat en el programa CODEML del paquet de programari PALM 4. Els models estàndard de substitució de codons s'han aplicat a les dades amb el programari PAML i les taxes de màxima versemblança (LRT) s'han utilitzat per a

determinar l'ajust dels models niats jeràrquicament. Els valors estadístics LRT ( $2\Delta l = 2 (l_1 - l_0)$ ) on  $l_1$  representa el logaritme de la LRT del model corresponent a la hipòtesi alternativa i  $l_0$  és el logaritme de la LRT conforme al model que s'utilitza com a hipòtesi nul·la, s'han comparat amb una distribució  $\chi^2$  on la diferència en el nombre de paràmetres de tots dos models dóna els graus de llibertat.

Els model que s'ha provat és el model branques-*sites* que inclou una combinació de la selecció en diferents *sites* dins de llinatges específics.

## 5.2. Resultats i discussió

### 5.2.1. Anàlisi dels gens de lipoxigenases

Per a la realització d'aquesta tesi s'han utilitzat 14 seqüències de lipoxigenases d'origen bacterià, 9 seqüències de lipoxigenases d'origen animal, 10 seqüències de lipoxigenases d'origen vegetal i 4 seqüències de lipoxigenases de fongs. Com que no totes aquestes seqüències de lipoxigenases han estat confirmades experimentalment, en el cas de les seqüències bacterianes i de fongs, s'ha confirmat la seva naturalesa de lipoxigenases detectant, mitjançant alineaments, els aminoàcids altament conservats que coordinen l'àtom de ferro (Solomon EI., Zhou J. et al. 1997) i una seqüència aminoacídica característica de les lipoxigenases, la W - - AK (Gaffney BJ 1996).

En les dues taules següents es mostren les posicions dels aminoàcids que conformen els lligands del ferro per a les seqüències de les lipoxigenases bacterianes i les de fongs i que queden ben alineats dins dels grups corresponents.

Espècie	accés al GenBank	pb gen	aa gen	W - - A K	Lligands del Fe
<i>Burkholderia thailandensis</i> E264	CP000086.1	2088	695	368 WQMAK 372	388 H, 393 H, 565 H, 569 N i 695 I
<i>Myxococcus xanthus</i> DK 1622	NC_008095.1	2028	675	346 WLAAC 350	366 H, 371 H, 549 H, 553 N i 675 V
<i>Nitrosomonas europaea</i> ATCC 19718	NP_841292.1	1698	565	244 WLAAC 248	264 H, 269 H, 445 H, 449 N i 565 V
<i>Nitrospira multififormis</i> ATCC 25196	NC_007614.1	1662	553	232 WLTAK 236	352 H, 357 H, 433 H, 437 H i 553 I
<i>Photobacterium profundum</i> 3TCK	ZP_01218321.1	1845	614	289 WQAAM 293	309 H, 314 H, 487 H, 491 N i 614 I
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 42A2	AAL85880.2	2058	685	357 WQMAK 361	377 H, 382 H, 555 H, 559 N i 658 I
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	NC_002516.2	2058	685	357 WQMAK 361	377 H, 382 H, 555 H, 559 N i 658 I
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14	CP000438.1	2058	685	357 WQMAK 361	377 H, 382 H, 555 H, 559 N i 658 I
<i>Shewanella denitrificans</i> OS217	NC_007954.1	1857	618	293 WQAAM 297	313 H, 318 H, 491 H, 495 N i 618 I
<i>Shewanella woodyi</i> ATCC 51908	ZP_01543473.1	2145	714	384 WQMAK 388	403 H, 407 H, 593 H, 597 R i 714 N
<i>Shewanella woodyi</i> ATCC 51908	NZ_AAUO01000023.1	2271	756	422 WKMAK 426	441 H, 445 H, 635 H, 639 N i 756 N
<i>Shewanella woodyi</i> ATCC 51908	NZ_AAUO01000010.1	2178	725	383 WQIAK 387	403 H, 408 H, 600 H, 604 N i 725 I

**Taula 12.- Alineament i posició dels aminoàcids que lliguen l'àtom de ferro i de la seqüència característica de les lipoxigenases (W- - AK) de totes les seqüències d'origen bacterià utilitzades en aquesta tesi.**

En el cas de les seqüències bacterianes cal remarcar algunes singularitats presents en les seqüències de *Shewanella woodyi* ATCC 51908. En aquest cas, el quart lligand que normalment pot variar entre una asparagina (N) o una histidina (H) és substituït, en el cas d'una de les tres possibles lipoxigenases codificades en el genoma de *Shewanella woodyi* ATCC 51908, per una arginina (R). El cinquè lligand, l'aminoàcid C-terminal, també es veu alterat en dues de les tres seqüències, en aquesta posició habitualment hi ha una isoleucina (I) o una valina (V) mentre que per a aquest organisme, en dos de les tres seqüències, hi trobem una asparagina (N) (Taula 12).

Respecte la seqüència característica de les lipoxigenases W - - A K s'observa clarament l'alta conservació dels residus W (triptòfan) i A (alanina) i, en menor mesura en el cas de les seqüències d'origen bacterià, de la K (lisina) que es pot veure modificada per una M (metionina) (Taula 12 i 13).

Espècie	accés al GenBank	pb gen	aa gen	W - - A K	Lligands del Fe
<i>Gibberella zeae</i>	XP_382392.1	2238	745	387 WRYAK 391	407 H, 412 H, 596 H, 600 N i 745 I
<i>Chaetomium globosum</i>	XP_001225066.1	2256	751	409 WRYAK 413	429 H, 434 H, 611 H, 615 N i 751 I
<i>Neurospora crassa</i>	CAD37061.1	2268	755	411 WRYAK 415	431 H, 436 H, 615 H, 619 N i 755 I
<i>Aspergillus fumigatus</i>	XP_746844.1	2235	744	398 WRYAK 402	418 H, 423 H, 603 H, 607 N i 744 I

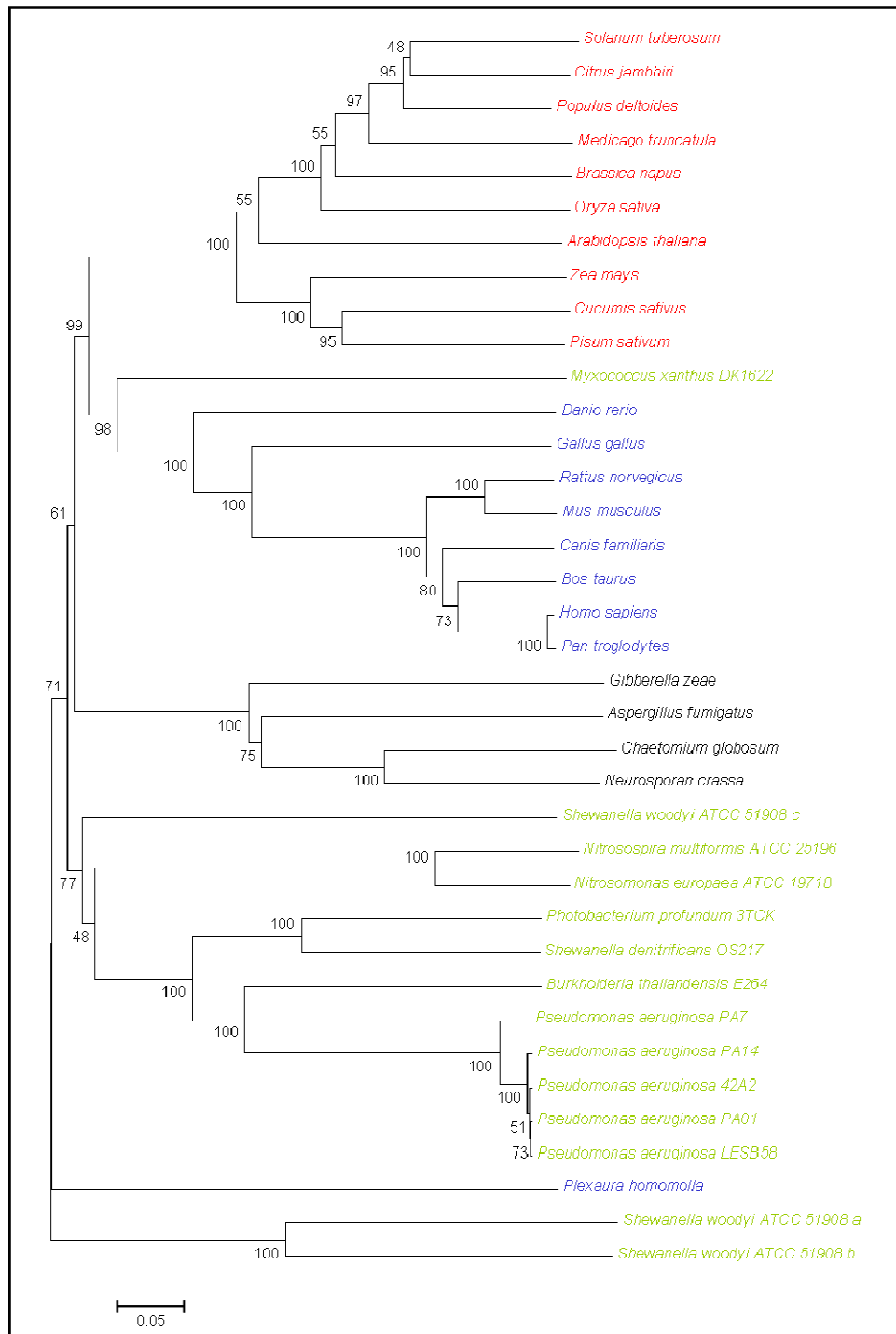
**Taula 13.- Alineament i posició dels aminoàcids que lliguen l'àtom de ferro i de la seqüència característica de les lipoxigenases (W- - AK) de totes les seqüències de fongs utilitzades en aquesta tesi.**

De la resta de seqüències, les d'origen animal i vegetal, no ha calgut fer-ne la comprovació de que són lipoxigenases ja que estan molt ben estudiades i, en alguns casos com és el de la lipoxigenasa de *Plexaura homomolla*, fins i tot se'n disposa de l'estructura cristal·lina (Brash AR. 1996).

## 5.2.2. Arbres filogenètics

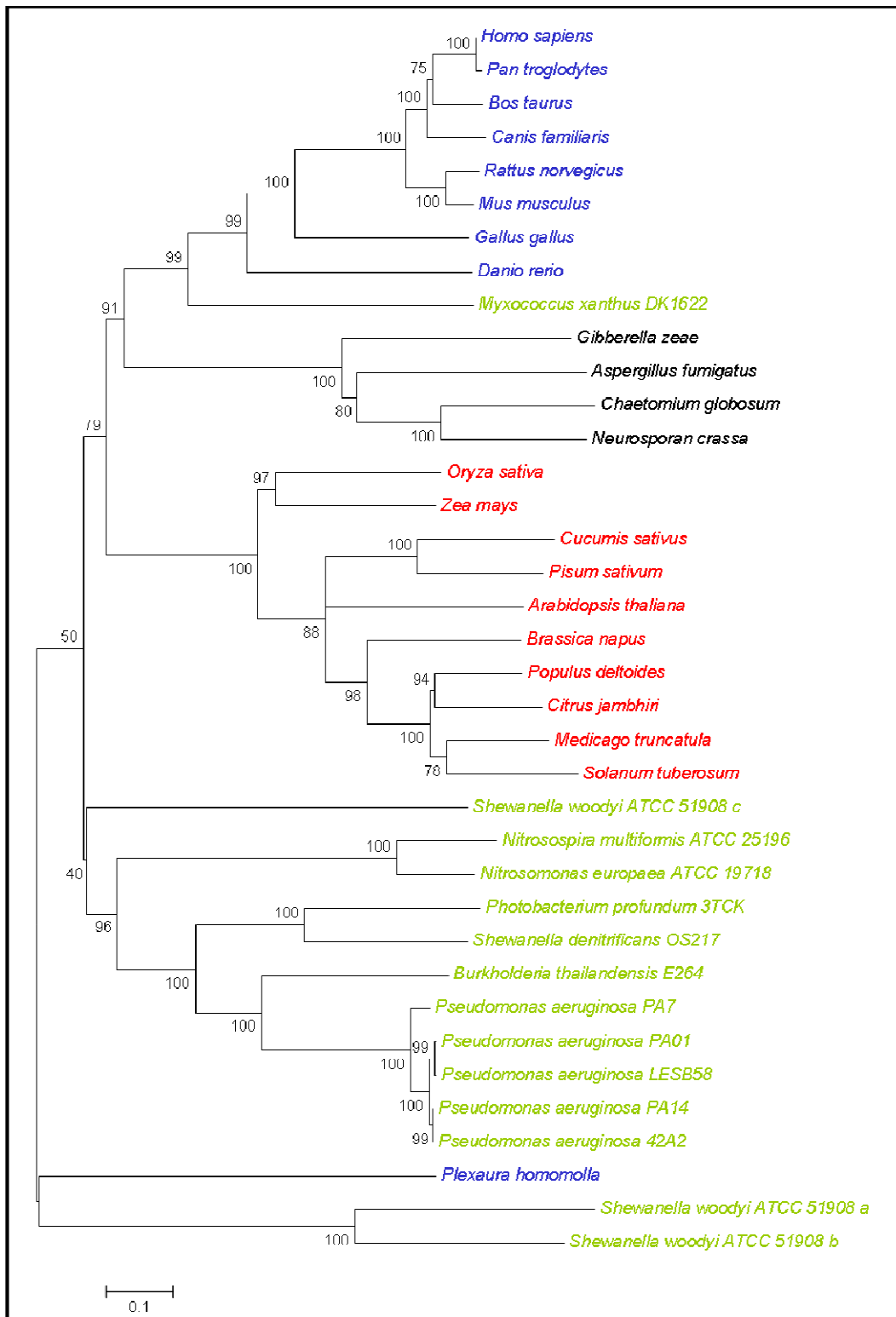
Com que les referències bibliogràfiques que parlen de la presència de lipoxigenases en procariotes són molt escasses, i per tal de situar la posició relativa de la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa* respecte a les d'altres orígens, s'han representat dos arbres filogenètics (figures 59 i 60) on es pot observar clarament com s'agrupen les lipoxigenases d'origen animal, les d'origen vegetal, les d'origen fúngic i les bacterianes per separat.





**Figura 59.-** Arbre filogenètic consens construït amb el programa MEGA4 amb el mètode Neighbor-Joining amb un bootstrap de 1000 repeticions i amb el model de p-Distance (càlcul de distància) a partir d'un alineament de les seqüències aminoacídiques. Les posicions que contenen *gaps* han estat eliminades del conjunt de dades (opció Complete deletion). Vermell, lipoxigenases vegetals; Blau, lipoxigenases animals; Negre lipoxigenases fúngiques i Verd lipoxigenases bacterianes.

Les diferències que s'observen quan es fa el mateix arbre però a partir les seqüències nucleotídiques no són significatives.



**Figura 60.-** Arbre filogenètic consens construït amb el programa MEGA4 amb el mètode Neighbor-Joining amb un bootstrap de 1000 repeticions i amb el model de Jukes-Cantor (càlcul de distància) a partir d'un alineament de les seqüències nucleotídiques. Totes les posicions que contenen *gaps* han estat eliminats del conjunt de dades (opció Complete deletion). En vermell, lipoxigenases vegetals; en blau, lipoxigenases animals; en negre lipoxigenases fúngiques i en verd lipoxigenases bacterianes.

Tal com es pot observar en els arbres filogenètics, les lipoxigenases formen una família heterogènia d'enzims amb subfamílies clarament diferenciades, corresponents a organismes animals, organismes vegetals, organismes fúngics i organismes bacterians. Aquest tipus d'agrupació entre lipoxigenases animals, vegetals i bacterianes ja va ser descrita l'any 2006 (Koeduka T., Kajiwara T. et al. 2007) i aquí es confirma amb l'addició de noves lipoxigenases bacterianes, les de *Nitrospira*, *Nitrosomonas*, *Photobacterium* i de *Shewanella woodyi*.

Hi ha diversos aspectes interessants a comentar respecte aquests dos arbres filogenètics. En primer lloc, els arbres estan fets a partir de diferents models de càlcul de distància (arbre de la figura 59, model *p-distance*, i arbre de la figura 60, model *Jukes-Cantor*) on en el cas del model *p-distance* la distància és la proporció (p) de nucleòtids diferents entre les dues seqüències comparades i, en el cas del model *Jukes-Cantor*, la distància es calcula amb la fórmula  $d = -3/4 \times \ln(1 - 4/3p)$ , suposant una igualtat de les taxes de substitució entre llocs i de les freqüències de nucleòtids. Aquesta diferència però, únicament es reflexa en el grup de les lipoxigenases fúngiques que, en el cas de l'arbre amb model de *p-distance*, equidista de les lipoxigenases animals i vegetals mentre que, en el cas del model calculat amb distància *Jukes-Cantor*, aquest grup és més proper a les lipoxigenases d'origen animal que no pas a les vegetals. En tot cas, aquesta diferència no és significativa ja que l'altíssima diversitat de seqüència fa que aquest gen no sigui prou conservat per a establir relacions filogenètiques.

Un altre aspecte a remarcar d'aquests arbres és, el cas de *Myxococcus xanthus* que, en els dos arbres, queda fora del grup de les lipoxigenases bacterianes situant-se en una posició més propera a les lipoxigenases animals que no pas de les vegetals, fenomen que ja s'havia publicat l'any 2008 (Lang I., Göbel C. et al. 2008) i podria fer pensar, tal com es va proposar l'any 2001, en un cas de transferència horitzontal (Porta H. and Rocha-Sosa M. 2001). El mateix cas es dona per a la lipoxigenasa de *Plexaura homomolla* que ja apareix fora del grup de les lipoxigenases animals en un arbre filogenètic publicat l'any 2006 (Koeduka T., Kajiwara T. et al. 2007).

El cas de les dues *Shewanella woodyi* (a i b) que apareixen clarament fora del grup de lipoxigenases bacterianes (en el primer cas) no ha estat mai publicat i sembla força raonable atribuir-ho a un cas d'error en l'anotació d'aquests gens, doncs tot i que conserven la seqüència típica (W - - A K) de les lipoxigenases, no presenten la valina o isoleucina terminal típica de la seqüència aminoacídica de les lipoxigenases.

El conjunt de les lipoxigenases de bacteris no presenten graus de similitud com els grups de les lipoxigenases animals i vegetals però el subgrup format per les lipoxigenases de *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Shewanella denitrificans* i *Photobacterium* sí que presenta una diversitat equiparable a la de les lipoxigenases animals i vegetals, i tots aquests organismes són proteobacteries.

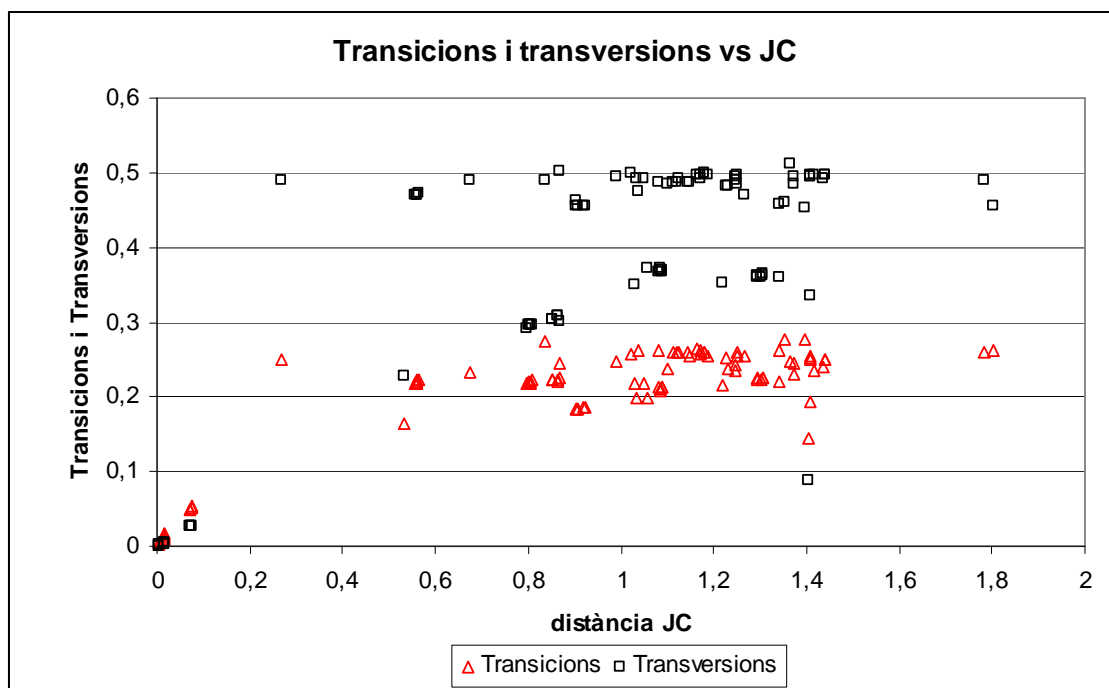
Cal doncs tenir en compte dos aspectes claus a l'hora de fer una anàlisi d'aquest tipus. En primer lloc, cal verificar la qualitat de les seqüències amb les que es vol treballar i en segon lloc, es recomanable disposar d'un elevat número de seqüències. En el cas d'aquesta tesi, aquest segon aspecte no és millorable donada les poques seqüències classificades com a lipoxigenases presents en les bases de dades i, pel que fa el primer aspecte es posa de manifest que, tot i que algunes seqüències compleixen amb les característiques més típiques de les seqüències de lipoxigenases, poden no ser-ho.

### **5.2.3. Evolució de les lipoxigenases bacterianes**

Per tal d'estudiar l'evolució de les lipoxigenases d'origen bacterià, s'ha realitzat un alineament de les 14 seqüències generant un alineament de 2670 *sites*. Tenint en compte que la seqüència més llarga és de 2271 nucleòtids (*Shewanella woodyi* ATCC 51908), aquesta diferència tant important en la longitud de l'alineament, ja indica una diversitat important entre les seqüències. Per analitzar aquest alineament amb el programa CODEML, cal eliminar el codó *stop* i, seguint les recomanacions del manual del programa, també s'han eliminat tots aquells *sites* on hi havia menys de tres seqüències que presentaven algun triplet de nucleòtids codificador d'aminoàcid. El resultat d'aquestes modificacions es tradueix en l'obtenció d'un alineament de 2457 *sites* que només representa la pèrdua d'un 8 % d'informació respecte la

longitud total de l'alineament. Aquest alineament modificat presenta 47 sites que no varien i un percentatge de G + C que va del 68'2 % en *Myxococcus xanthus* fins al 42'1 % en *Shewanella woodyi* (GI:118072427), amb una mitjana del 55'9 %. Pel que fa a les lipoxigenases de les cinc soques de *Pseudomonas aeruginosa*, el percentatge G + C és del 66'5 % amb una desviació estàndard de 0'38 mentre que pel conjunt de les 14 seqüències la desviació estàndard és de 5'45. Aquesta dada ens indica, de nou, una gran diversitat de seqüència dins del grup de les lipoxigenases bacterianes. Aquest procediment s'ha aplicat d'igual manera als altres grups de lipoxigenases (animals, vegetals i fongs).

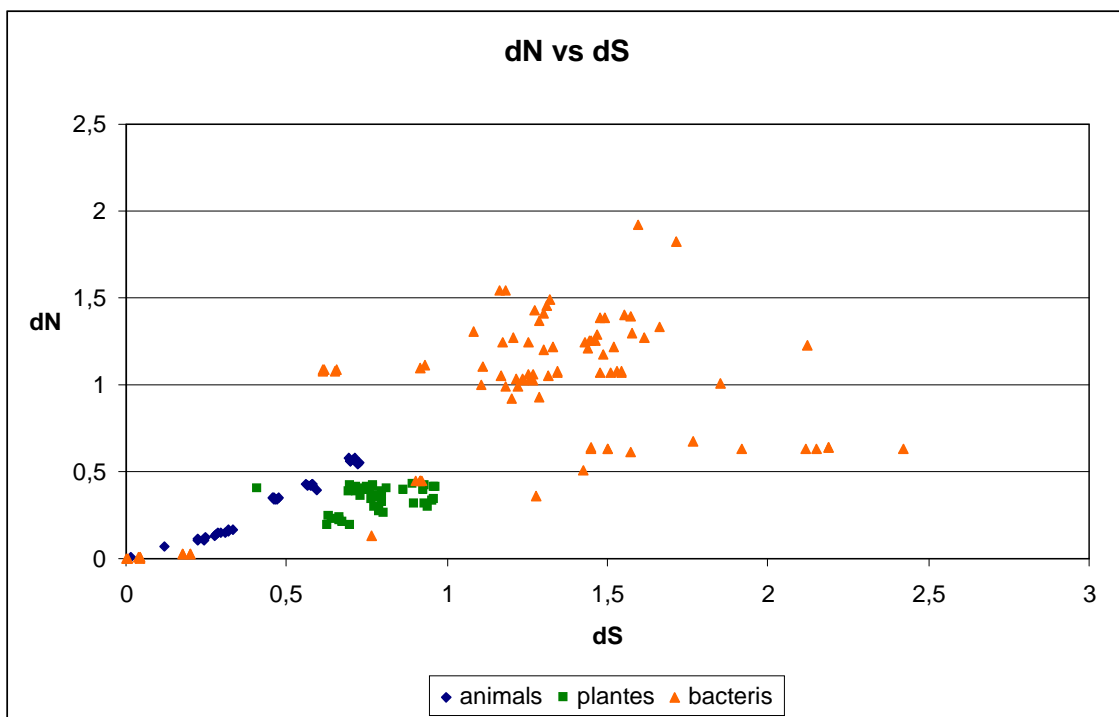
La taxa mitjana de transicions/transversions de l'alineament modificat és de 0'76, és a dir, hi ha més transversions (canvi d'una base púrica, adenina o guanina, per una base pirimidínica, citosina o timina) que no pas transicions (canvi d'una base púrica a una altra base púrica, o canvi d'una base pirimidínica a una altra base pirimidínica). La figura 61 mostra la taxa de substitucions (transversions i transicions) respecte a la distància calculada amb el mètode Jukes-Cantor (JC) per al grup de les lipoxigenases d'origen bacterià.



**Figura 61.- Gràfic que mostra la saturació de substitucions (transicions i transversions) respecte la distància filogenètica (Jukes-Cantor) de l'alineament de les lipoxigenases bacterianes estudiades.**

Aquest gràfic mostra una forta saturació de substitucions (quadrats, transicions; triangles, transversions) a partir de valors de divergència de 0'3 indicant l'ocurrència de múltiples substitucions i fins i tot de l'existència d'un fenomen d'homoplàsia (similituds entre espècies amb un ancestre diferent com a resultat d'una evolució convergent) (Farfán M., Miñana-Galbis D. et al. 2009).

Mitjançant el mètode de Jukes-Cantor i amb una comparació per parelles de seqüències, s'han estimat les taxes de substitucions sinònimes (dS) i les no sinònimes (dN) tant per a les lipoxigenases d'origen bacterià com les d'origen animal i vegetal. Aquests valors es mostren en la figura 62 on es pot observar clarament com el grup de les lipoxigenases procariotes (triangles taronges) queda clarament diferenciat de les eucariotes (rombes blaus, animals i quadrats verds, plantes).

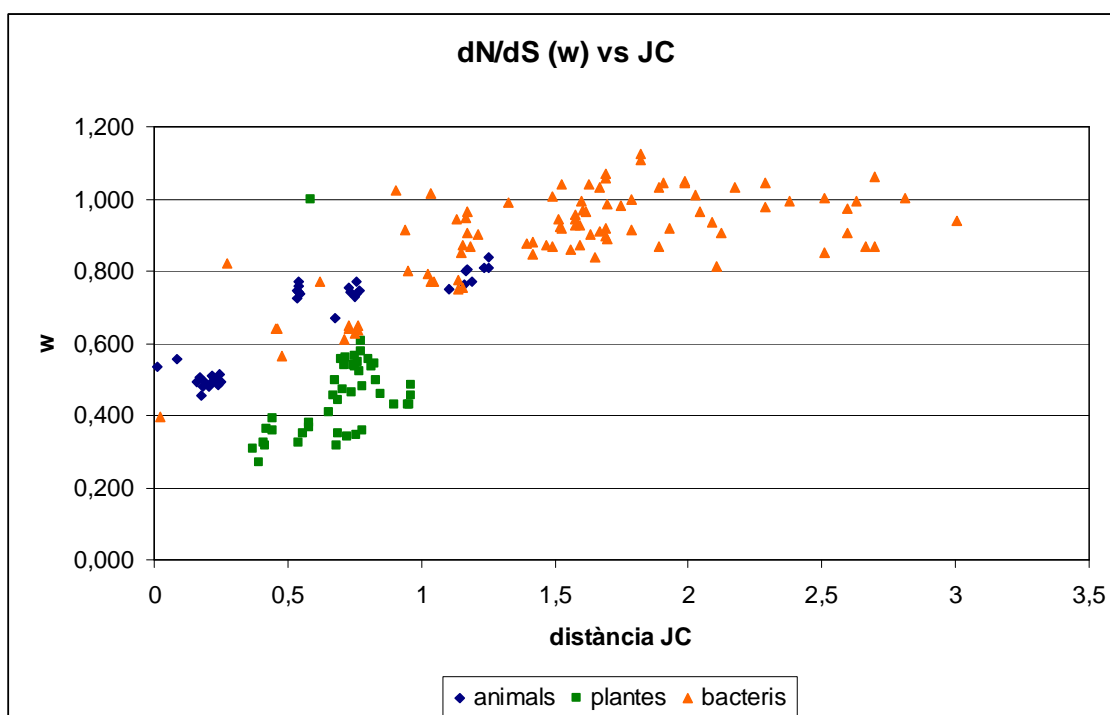


**Figura 62.- Gràfic de l'estimació de les taxes de substitució sinònimes (dS) versus les no sinònimes (dN) a partir d'un alineament realitzat mitjançant el mètode de la màxima versemblança. Els triangles taronges representen les lipoxigenases bacterianes, els quadrats verds, les de plantes i els rombes blaus, les d'animals.**

Aquests resultats encaixen perfectament amb els arbres filogenètics obtinguts en aquest estudi i mostrats en l'apartat 6.2.2 ja que confirmen que

les lipoxigenases d'origen procariota presenten diferències notables a nivell de seqüència nucleotídica respecte les d'origen eucariota.

A partir de les taxes de substitució sinònimes i no sinònimes es defineix la taxa  $\omega$  com el quocient entre la taxa de substitució no sinònima i la taxa de substitució sinònima (dN/dS). En la figura 63 es representa la relació entre  $\omega$  i la distància filogenètica obtinguda aplicant el mètode Jukes-Cantor (JC). Aquesta figura ens permet veure tres grups de dades diferenciats corresponents a les lipoxigenases animals, vegetals i bacterianes.



**Figura 63.- Gràfic de l'estimació de les  $\omega$  (dN/dS) versus la distància filogenètica calculada pel mètode de Jukes-Cantor a partir de l'alineament de les lipoxigenases estudiades. Els triangles taronges representen les lipoxigenases bacterianes, els quadrats verds, les de plantes i els rombes blaus, les d'animals.**

El comportament d'aquests grups de dades presenten diferències importants. En el cas de les lipoxigenases la recta de regressió (no mostrada en la figura 63) presenta un pendent de 0,1424 mentre que per a les lipoxigenases de plantes i animals és de 0,2789 i 0,2976 respectivament fet que indica que la taxa dN/dS ( $\omega$ ) ja s'ha saturat per a les lipoxigenases bacterianes i en canvi no ho ha fet per a les lipoxigenases animals i vegetals. Gràficament es pot observar clarament com a partir d'un valor 1,3 de distància Jakes-Cantor, els

valors d' $\omega$  per a les lipoxigenases d'origen bacterià, ja no varien gaire indicant que, tot i que la distància filogenètica entre aquestes seqüències incrementi, la relació entre canvis no sinònims i sinònims no varia i que per tant, l'acumulació de canvis s'ha saturat. Per altra banda, el major pendent dels altres grups de lipoxigenases, vegetals i animals, indica que encara no s'ha arribat a la saturació. És a dir que mentre que les lipoxigenases d'origen animal i vegetal encara estan acumulant canvis que influeixen en la seva evolució, les lipoxigenases d'origen bacterià, tot i poder patir canvis, aquests ja no afecten a la seva evolució.

La interpretació de saturació encaixa perfectament amb els elevats valors obtinguts per a dS i l'àmpli rang d'aquests mateixos (figura 62) i amb la figura 61 on es mostra una clara saturació de transicions i transversions per a valors de divergència superiors a 0,5.

Aquesta interpretació de les figures 62 i 63 però, està fortament condicionada per les seqüències amb que s'ha fet l'estudi, i és que aquest conjunt de seqüències de lipoxigenases no representa la diversitat real d'aquestes. Cal tenir present que les lipoxigenases més estudiades són les de mamífers (en el cas de les lipoxigenases animals) i les de plantes amb interès comercial. En el cas de les seqüències bacterianes atribuïdes a lipoxigenases, com ja s'ha dit anteriorment, la representativitat de la diversitat d'aquest grup és molt limitada i, a més a més, estan poc estudiades.

Per tal de verificar la naturalesa de la pressió selectiva que està actuant sobre l'alineament amb el qual s'ha treballat s'han utilitzat diversos models desenvolupats per Nielsen i Yang (Nielsen R. and Yang Z. 1998; Yang Z., Nielsen R. et al. 2000). Aquests models estan integrats en el programa CODEML del paquet PAML. Els models M0, M1, M2, M7 i M8 que assumeixen variacions d' $\omega$  entre *sites* però no entre llinatges, han estat aplicats a l'alineament. El model utilitzat, l'estimació dels paràmetres i el valor de *log-likelihood* es mostren a la taula 14.



<u>cleandata 1</u>						
Model	$p$	$\omega$	$l$	$k$	Estimació de paràmetres	Sites seleccionats positivament i $p$ ( $w > 1$ )
M0	1	0,08039	-13369,71177	1,65319	$w = 0.08039$	-
M1	2	1,0000	-13751,52324	2,19726	$p0 = 0.00001$ $w0 = 0$ $p1 = 0.99999$ $w1 = 1$	-
M2	4	0,92342	-13751,51963	2,19726	$p0 = 0; p1 = 1; p2 = 0$ $w0 = 0; w1 = 1; w2 = 1$	127 R 0.988
M7	2	0,04706	-13307,37354	1,70077	$p = 1.82107; q = 15.60717$	-
M8	4	0,93942	-13751,52324	2,19726	$p0 = 0.00001; p = 0.00500;$ $q = 1.88239;$ $p1 = 0.99999; w = 1$	127 R 0.992
<u>cleandata 0</u>						
Model	$p$	$\omega$	$l$	$k$	Estimació de paràmetres	Sites seleccionats Positivament i $p$ ( $w > 1$ )
M 0	1	0,10265	-25039,04654	1,6681	$w = 0,10265$	-
M 1	2	0,23539	-24968,70447	2,19726	$p0 = 0.00001$ $w0 = 0$ $p1 = 0.99999$ $w1 = 1$	-
M 2	4	0,326123	-24968,70447	1,86405	$p0 = 0,83; p1 = 0,0536;$ $p2 = 0.1163$ $w0 = 0,0788; w1 = 1; w2 = 1$	-
M 7	2	0,130452	-24914,88305	1,77087	$p = 1,48857; q = 9,62348$	-
M 8	4	0,200475	-24910,60091	1,79986	$p0 = 0,95910; p = 1,70908; q$ $= 13.34477$ $p1 = 0,04090; w = 1$	373 R 0.602* 554 L 0.715 576 A 0.632 768 R 0.691

**Taula 14.- Taula de resultats de l'aplicació del programa CODEML en funció del model aplicat.  $p$ , nombre de paràmetres lliures per a cada model.  $\omega$ , mitjana dels valors d' $\omega$  de tots els sites de l'alineament de les lipoxigenases bacterianes estudiades.  $l$ , log-likelihood per a cada model.  $k$ , taxa transicions/transversions.**

L'aplicació del programa CODEML s'ha realitzat de dues maneres diferents, en funció de si s'aplica el paràmetre *cleandata* 0 o 1. En el cas d'aplicar el programa amb *cleandata* 0, l'alineament utilitzat no pateix cap modificació, però quan es treballa amb un *cleandata* 1, aquest alineament pateix una modificació consistent en l'eliminació de tots aquells sites que presenten algun *gap*. Aquesta opció comporta l'eliminació de molta informació de l'alineament (passem de 2457 sites a 1083 sites) però el manual del programa en recomana la seva aplicació i a més a més, tal com es pot observar en la taula 14, només treballant d'aquesta manera s'obtenen sites amb una selecció positiva (és a dir, sites que presenten una  $\omega > 1$  amb una probabilitat superior a 0,95) ja que el programa tracta els *gaps* detectats com a dades ambigües i això fa disminuir molt els valors d' $\omega$ . És per aquesta raó que, quan es treballa amb un *cleandata* 0, els valors d' $\omega$  són més baixos que no pas si es treballa amb un *cleandata* 1, l'eliminació dels sites amb algun *gap* fa incrementar el valor de dS i per tant, la ratio dN/dS ( $\omega$ ) pren valors més baixos.

Els resultats de les proves LRT, restringides a models niats on el model més senzill és un cas especial del model més complex (Johnson JB. and Omland KS. 2004), es mostren en la taula 15. Amb aquestes proves es pot determinar quin dels dos models que s'estan provant s'ajusta millor a les dades aplicades al programa (és a dir a l'alineament aplicat al programa).

cleandata1				
Hipòtesi Alternativa	Hipòtesi Nul·la	$2\Delta l$	Graus de llibertat	$p$ -valor
M0	M2	763,615714	3	$3.3643 \times 10^{-165}$
M2	M1	0,00722	2	9,861800652
M7	M8	762,299396	2	$2.943 \times 10^{-166}$

**Taula 15.- Taula de valors de LRT (Likelihood Ratio Test) per a diversos models evolutius implementats en el programa CODEML.  $2\Delta l = 2 (l_1 - l_0)$ .  $p$ -valor obtingut a partir d'una  $\chi^2$  calculada amb els graus de llibertat mostrats en la taula.**

Aplicant el model més senzill (M0) que assumeix una  $\omega$  uniforme per a tots els codons de l'alineament, el valor  $l$  (logaritme del valor de màxima versemblança) que s'obté és de -3369,71177 amb una  $\omega$  estimada de 0,08039. El model M1 pressuposa una pressió selectiva variable entre els *sites* però no una selecció positiva. És el model M2 el que pressuposa una selecció positiva. Els valors de  $l$  per als models M1 i M2 són, respectivament, de -13751,52324 i de -13751,51963 i amb unes  $\omega$  de 1,0 i 0,92342 respectivament.

Els valors de  $k$  (taxa transicions/transversions) per als cinc models aplicats és constant, independentment de si s'ha aplicat un *cleandata* de 1 o de 0, i és que aquest paràmetre generalment es manté constant quan el gen es troba saturat (figura 61).

Per tal de determinar quin dels tres models (M0, M1, M2) s'ajusta millor a les dades, s'aplica la prova LRT ( $2\Delta l = 2 (l_1 - l_0)$ ) un test de bondat d'ajustament, una  $\chi^2$ , al valor obtingut de  $2\Delta l$ , el  $p$ -valor obtingut indicarà si s'accepta o no la hipòtesi alternativa (taula 2). Així doncs, el  $p$ -valor per a LRT ( $2\Delta l$ ) entre els models M1 (selecció casi neutre) i M2 (selecció positiva) que es pot veure en la taula 15 és de 9,861800652 que és molt superior a una significança de 0,001 fet que indica que s'accepta la hipòtesi alternativa, és a dir que el model que millor s'ajusta a les dades és el model M2 (selecció

positiva). Amb la mateixa prova realitzada entre els models M0 i M2 s'obté un  $p$ -valor de  $3,3643 \times 10^{-165}$ , molt inferior a 0,001 i per tant és la hipòtesi nul·la, el model M2, la que s'ajusta a les dades (taula 15).

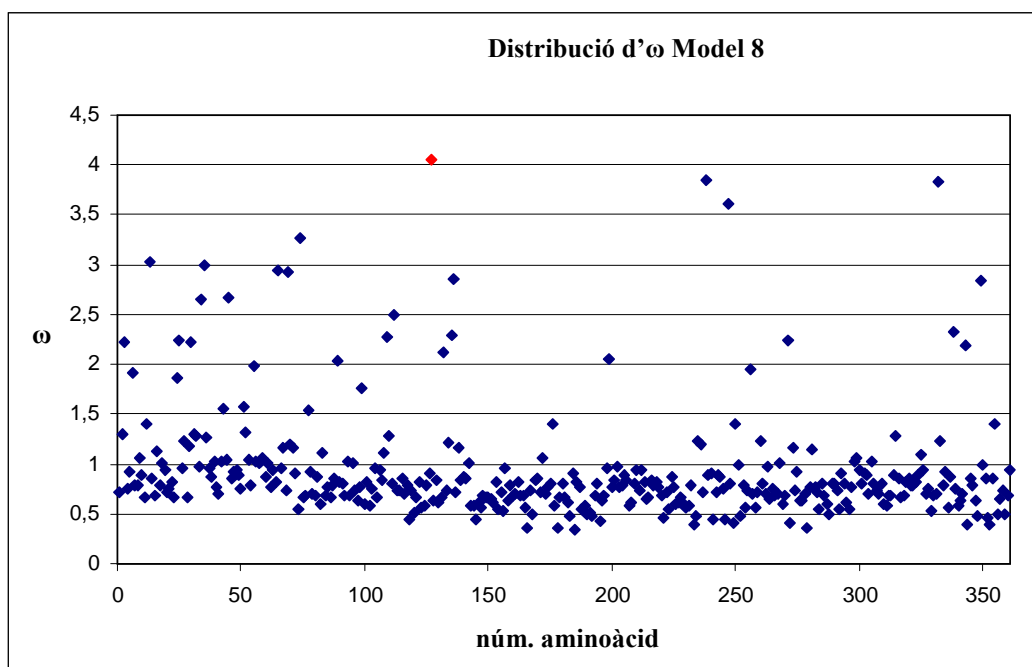
En el cas dels models M0 i M1, cap dels aminoàcids estudiats són seleccionats amb una probabilitat superior al 95%. Aquest fet és lògic ja que el model que millor s'ajusta és el model de selecció positiva (M2). En el cas d'aquest model, l'aminoàcid 127, que és una arginina (R), presenta una probabilitat del 0.988 d'haver evolucionat sota una pressió de selecció positiva (taula 14). Aquest mateix aminoàcid queda seleccionat també quan s'aplica el model M8 que assumeix una distribució beta amb una  $\omega$  superior a 1. Així doncs, es pot dir que només l'aminoàcid 127 segueix una evolució amb selecció positiva mentre que la resta d'aminoàcids estudiats segueixen una evolució amb selecció neutre o purificadora.

Com que les proves LRT només es poden aplicar entre models niats, cal determinar el valor  $2\Delta l$  comparant el model M8 contra el model M7 que únicament pressuposa una distribució beta (distribució de probabilitat contínua amb dos paràmetres  $a$  i  $b$  amb una funció de densitat amb valors entre 0 i 1). Els valors  $l$  per als models M8 i M7 són -13751,52324 i -13307,37354 respectivament, obtenint un  $p$ -valor per a LRT ( $2\Delta l$ ) entre els models M7 i M8 és de  $2,943 \times 10^{-166}$  (taula 15), aquest valor permet acceptar la hipòtesi nul·la, o sigui que les dades aplicades al programa s'ajusten millor al model M8.

Com que els models M2 i M8 no estan niuats no es pot aplicar una  $\chi^2$  per tal de determinar quin dels dos models s'ajusta millor a les dades. Cal, aleshores, fixar-se amb el valor  $l$  i aquell model que presenti un valor més alt per aquest paràmetre, serà el que millor s'hi ajusti. En aquest cas és el model M8, que presenta una probabilitat més alta (0,992) per a l'aminoàcid seleccionat tot i que no gaire diferent de la del model M2 (0,988).

Sota el model M8, la mitjana d' $\omega$  entre els 361 codons estudiats és de 0,9394 amb una variança de 0,1915. La figura 6 mostra la distribució d' $\omega$  en els 361 codons seguint una distribució  $\beta$  amb una  $\omega$  en la majoria de *sites* que es troba entre 0,5 i 1,0 suggerint que la força d'evolució predominant és la purificadora ( $\omega < 1$ ) o la neutre ( $\omega = 1$ ). De tots aquells *sites* que presenten

valor d' $\omega$  superiors a 1 només un (marcat en vermell en la figura 64) presenta una probabilitat de 0,992 que supera la significança del 99% i que indica que aquest *site* (aminoàcid 127 R) segueix una distribució  $\beta$  amb una  $\omega$  superior a 1 que vol dir que ha estat sotmès a una evolució de selecció positiva.



**Figura 64.- Distribució de les  $\omega$  obtingudes per a cada *site* de l'alineament de les lipoxigenases d'origen bacterià aplicat al programa CODEML sota el model M8 on s'utilitza una distribució beta. En vermell la  $\omega$  corresponent a l'aminoàcid 127.**

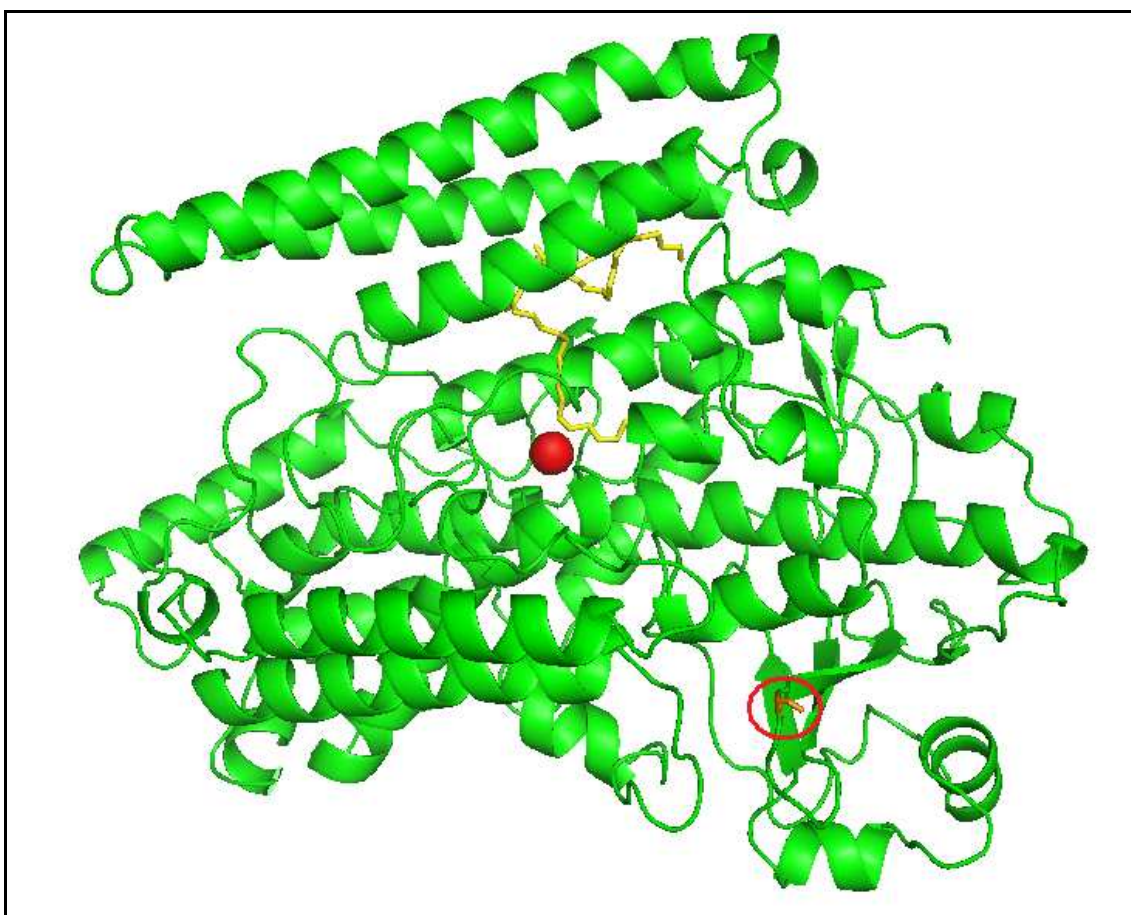
Aquest fet es veu recolzat per l'obtenció dels mateixos resultats amb l'aplicació del model M2, tot i que en aquest cas la probabilitat d'aquest fenomen (0,988) no superi la significança del 99% però si la del 95%.

Així doncs, aquests resultats confirmen la pressió de selecció neutre o purificadora per a la major part del gen i la selecció positiva per a l'aminoàcid 127. Aquest aminoàcid correspon a l'arginina 325 de la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa* 42A2.

Les diferències en els resultats obtinguts aplicant l'opció de *cleandata* 1 i 0 demostren que, tot i tenir cert impacte en l'estimació dels paràmetres del model (M8 en aquest cas), no semblen influir en la identificació dels *sites* sotmesos a selecció positiva. No obstant això, les insercions i delecions poden

tenir un paper important en la divergència dels diferents grups de lipoxigenases definits en aquest estudi (lipoxigenases animals, vegetals i bacterianes).

La detecció de l'aminoàcid 325 (figura 65) com a únic aminoàcid sotmès a una pressió de selecció positiva, obre noves preguntes sobre l'estructura de la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa* 42A2.



**Figura 65.- Localització de l'aminoàcid 325 (aminoàcid de color taronja encerclat amb vermell) en l'estructura de la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa* 42A2. L'esfera vermella representa el ferro i en groc es representa el fosfolípid situat en la cavitat del substrat de l'enzim.**

Aquest aminoàcid es troba en la superfície de la proteïna i força allunyat del centre actiu d'aquesta. Això fa pensar que, la funció d'aquest aminoàcid, està més relacionada amb l'estructura de la proteïna que no pas amb la seva activitat tot i que sempre és difícil separar aquests dos aspectes. Aquests resultats obren una sèrie de qüestions per tal d'explicar el sentit biològic d'aquesta singular selecció positiva localitzada en una situació, aparentment, sense influència previsible en l'estructura-funció de la lipoxigenasa. Tenint en

compte que la glicina és l'aminoàcid més petit possible, suggereix que probablement la mida de l'aminoàcid que ocupa aquest espai sigui clau en el moment del plegament de la proteïna i que, d'una altra manera, es vegi afectada la funció de l'enzim.

Per a resoldre aquestes qüestions, serien necessaris els estudis de mutagènesi dirigida per a poder veure com afecta un canvi sobre aquest aminoàcid en l'activitat d'aquesta lipoxigenasa o en l'estructura de la mateixa.

## **6. CONCLUSIONS**





## 6. Conclusions

**1.-** S'ha obtingut el primer cristall d'una lipoxigenasa bacteriana, i s'ha determinat un nou model cristal·logràfic per a les lipoxigenases. Les característiques generals d'aquest cristall amb sistema ortoròmbic són:

-Estructura formada per un sol domini a diferència de les lipoxigenases descrites fins al moment, que en presenten dos.

-Presència d'una estructura consistent en dues hèlix  $\alpha$  antiparal·leles adjacents a l'obertura de la cavitat del substrat que podria actuar com a "tapa" de la mateixa i que no s'havia descrit anteriorment.

-Presència d'una segona cavitat amb forma de canal que permetria l'accés de l'oxigen molecular al centre actiu de l'enzim.

**2.-** La determinació de l'estructura del cristall ha posat de manifest una forta interacció entre la cavitat catalítica de l'enzim i un molècula de fosfolípid (O-(sn-1-cis-vaccenil-sn-2-miristoil-sn-glicèric-3-fosforil) etanolamina). La cadena alifàtica de 18 carbonis del fosfolípid arriba fins al centre actiu de l'enzim mentre que l'altre cadena alifàtica (14 carbonis) interacciona amb la nova estructura de dues hèlix  $\alpha$  antiparal·leles.

**3.-** La lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa* 42A2 presenta uns senyals d'EPR iguals als d'altres lipoxigenases estudiades mitjançant aquesta tècnica però una velocitat d'oxidació més lenta, degut a les transicions més baixes, característica que fa molt atractiu aquest enzim per a futurs estudis sobre el mecanisme de reacció de les lipoxigenases.

**4.-** L'aplicació de la tècnica del microarray sobre les mostres de sòl, ha demostrat ser eficaç però molt sensible a les sondes dissenyades per a treballar en el cas de les lipoxigenases que presenten una alta diversitat de seqüència.

**5.-** S'ha confirmat l'existència d'una subfamília de lipoxigenases bacterianes. Aquesta subfamília presenta una diversitat més elevada que no pas en les corresponents a lipoxigenases eucariotes.

**6.-** L'estudi de l'evolució de les lipoxigenases bacterianes demostren una pressió de selecció majoritàriament purificadora o neutre en tot el gen de la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa* 42A2 excepte en el cas de l'aminoàcid 325 (una arginina) que s'hauria seleccionat després d'un episodi de selecció positiva.

## **7. BIBLIOGRAFIA**



## 7. Bibliografia

- Ahuja SK, Ferreira GM, et al. (2004). "Utilization of enzymes for environmental applications." *Crit Rev Biotechnol* **24**: 125-154.
- Akakabe Y, M. K., Kajiwaru T (1999). " Enantioselective  $\alpha$ -hydroperoxylation of long-chain fatty acids with crude enzyme of marine green alga *Ulva pertusa*. ." *Tetrahedron Lett* **40**: 1137-1140.
- Anderson AJ and Dawes EA (1990). "Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates." *Microbiol Rev.* **54 (4)**: 450-472.
- Andersson M, Andersson T, et al. (2002). "Toward an enzyme-based oxygen scavenging laminate. Influence of industrial lamination conditions on the performance of glucose oxidase." *Biotechnol Bioeng* **79 (1)**: 37-42.
- Andreou A. and Feussner I. (2009). "Lipoxygenases – Structure and reaction mechanism." *Phytochemistry* **70**: 1504-1510.
- Bains W. (1993). "Biotechnology, from A to Z."
- Ben-Aziz A., Grossman S., et al. (1970). "Linoleate oxidation induced by lipoxygenase and heme proteins: A direct spectrophotometric assay." *Analytical Biochemistry* **34**: 88-100.
- Bennasar A., G. J., Lalucat J. (1998). "Molecular methods for the detection and identification of *Pseudomonas stutzeri* in pure culture and environmental samples." *Microb Ecol* **35**: 22-53.
- Boeglin WE., Kim RB., et al. (1998). "A 12R-lipoxygenase in human skin: Mechanistic evidence, molecular cloning, and expression " *Proc Natl Acad Sci* **95(12)**: 6744-9.
- Bollag D. and Edelstein S. (1991). *Protein Methods*. New York.
- Bondar VS, B. M., van Berkel WJH, Finkelstein ZI, Golovlev EL, Baskunov BP, Vervoort J, Golovleva LA, Rietjens IM (1999). "Preferential oxidative dehalogenation upon conversion of 2-halophenols by *Rhodococcus opacus* 1G." *FEMS Microbiology Letters* **181**: 73-82.
- Bowers NI, B. D., Sharma ND, Goodrich PA, Grocock MR, Blacker AJ, Goode P, Dalton H (1999). "Stereoselective benzylic hydroxylation of 2-substituted indanes using toluene dioxygenase as biocatalyst." *J Chem Soc Perkin Trans 1*: 1453-1461.
- Boyd DR, Sharma ND, et al. (2001). "Aromatic dioxygenases: molecular biocatalysis and applications " *Curr Opin Biotechnol.* **12**: 564-573.
- Boyington JC, G. B., Amzel LM (1993). "The three-dimensional structure of an arachidonic acid 15-lipoxygenase." *Science* **260**: 1482-1486.
- Boyington JC., Gaffney BJ., et al. (1993). "The three-dimensional structure of an arachidonic acid 15-lipoxygenase." *Science* **260**: 1482-1486.
- Brash AR., B. W., Chang MS., Shieh BH. (1996). "Purification and molecular cloning of an 8R-lipoxygenase from the coral *Plexaura homomalla* reveal the related primary structures of R- and S-lipoxygenases." *J Biol Chem.* **271(34)**: 20949-57.
- Brash RA (1999). "Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate." *The journal of biological chemistry* **274(34)**: 23679-23682.
- Brodowsky ID and Oliw EH (1992). "Metabolism of 18:2(n-6), 18:(n-3), 20:4(n-6) and 20:5(n-3) by the fungus *Gaeumannomyces graminis*: identification of metabolites formed by 8-hydroxylation and by  $\omega$ 2 and  $\omega$ 3 oxygenation." *Biochim. Biophys. Acta* **1124**: 59-65.
- Brundtland GH. (1991). "Sustainable Development: A viable strategy for global change." *Int. J. Global Energy Issues* **2**: 113-116.

- Burton SG (2003). "Oxidizing enzymes as biocatalysts." TRENDS in Biotechnology **21**: 543-549.
- Busquets M, D. V., Vidal-Mas J, Rodríguez E, Guerrero A, Manresa A. (2004). "Isolation and characterization of a lipoxygenase from *Pseudomonas* 42A2 responsible for the biotransformation of oleic acid into (S)-(E)-10-hydroxy-8-octadecenoic acid." Antonie Van Leeuwenhoek. **85(2)**: 129-39.
- Callaghan AV, Gieg LM, et al. (2006). "Comparison of Mechanisms of Alkane Metabolism under Sulfate-Reducing Conditions among Two Bacterial Isolates and a Bacterial Consortium " Applied and Environmental Microbiology **72 (6)**: 4274-4282.
- Chen X.S, K. U., Nancy A. Jenkins, Neal G. Copelands, Colin D. FunkSn (1994). "cDNA Cloning, Expression, Mutagenesis of C-terminal Isoleucine, Genomic Structure, and Chromosomal Localizations of Murine 12-Lipoxygenase." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY **269(19)**: 13979-13987.
- Choi J., C. J. K., Kim S., Shin W. (2008). "Conformational flexibility in mammalian 15S-lipoxygenase: Reinterpretation of the crystallographic data." Proteins **70**: 1023-1032
- Clift R. (1997). "Lean technology - The idea and the practice." J. Chem. Tech. Biotechnol. **68**: 347-350.
- Coffa G., Schneider C., et al. (2005). "A comprehensive model of positional and stereo control in lipoxygenases." Biochemical and Biophysical Research Comunications **338**: 87 - 92.
- Coffa G., B. A. (2004). "A single active site residue directs oxygenation stereospecificity in lipoxygenases: Stereocontrol is linked to the position of oxygenation." PNAS **101 (44)**: 15579-15584.
- Coffa G., H. E. M. (2000). "Discovery of an 11(R)- and 12(S)-Lipoxygenase Activity in Ovaries of the Mussel *Mytilus edulis*." Lipids **35**: 1195-1204.
- Corey EJ. and Nagata R. (1987). "Evidence in favor of an organoiron-mediated pathway for lipoxygenation of fatty acids by soybean lipoxygenase." J. Am. Chem. Soc. **109 (26)**: 8107-8108.
- Cowan D, M. Q., Stafford W, Muyanga S, Cameron R, Wittwer P (2005). "Metagenomic gene discovery : past, present and future." Trends in biotechnology **23(6)**: 321-329.
- Cristea M., Engström A., et al. (2005). "Expression of manganese lipoxygenase in *Pichia pastoris* and site-directed mutagenesis of putative metal ligands." Archives of Biochemistry and Biophysics **434**: 201-211.
- Dauter Z. (1997). "Macromolecular Crystallography Part A " Methods in Enzymology **276**: 326-344
- Demain A. (2000). "Microbial biotechnology." Trends in Biotechnology **18**: 26-31.
- Dho S., G. S. (1990). "Hepoxilin A, induces changes in cytosolic calcium, intracellular pH and membrane potential in human neutrophils." Biochemical Journal **266**: 63-68.
- Drazen JM, I. E., O'Byrne PM (1999). "Treatment of Asthma with Drugs Modifying the Leukotriene Pathway." Engl. J. Med. **340 (3)**: 197-206.
- Emsley P and Cowtan K (2004). "Coot: model-building tools for molecular graphics." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **60 (Pt 12 Pt 1)**: 2126-32.
- Faber K. and Kroutil W. (2005). "New enzymes for biotransformations." Current Opinion in Chemical Biology **9**: 181-187.
- Farfán M., Miñana-Galbis D., et al. (2009). "Divergent evolution and purifying selection of the *flaA* gene sequences in *Aeromonas*." Biology Direct **4 (23)**.

- Feng X. (2005). "Applications of oxidoreductases: Recent progress." Industrial Biotechnology **1 (1)**: 38-50.
- Ferrer M, B. A., Golyshin PN (2007). "Microbial metagenomes: moving forward industrial biotechnology." Journal of Chemical Technology and Biotechnology **82**: 421-423.
- Feussner I and Wasternack C (2002). "The lipoxygenase pathway." Annual Review of Plant Biology **53**: 257-297.
- Feussner I., K. H., Wasternack C. (2001). "Lipoxygenase-dependent degradation of storage lipids." TRENDS in Plant Science **6 No.6** 268-273.
- Füchtenbusch B., Wullbrandt D., et al. (2000). "Production of polyhydroxyalkanoic acids by *Ralstonia eutropha* and *Pseudomonas oleovorans* from an oil remaining from biotechnological rhamnose production." Appl. Microbiol. Biotechnol. **53**: 167-172.
- Fuller MA, Weichert H, et al. (2001). "Activity of soybean lipoxygenase isoforms against esterified fatty acids indicates functional specificity. ." Arch. Biochem. Biophys. **388**: 146 - 54.
- Funk C.D. (1996). "The molecular biology of mammalian lipoxygenases and the quest for eicosanoid functions using lipoxygenase-deficient mice " Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism **1304**: 65-84.
- Gaffney BJ (1996). "Lipoxygenases: structural principles and spectroscopy." Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. **25**: 431-59.
- Gaffney BJ, Mavrophilipos DV, et al. (1993). "Access of Ligands to the Ferric Center in Lipoxygenase-1." Biophys. J. **64**: 773-783.
- Galante YM and Formantici C (2003). "Enzyme Applications in Detergency and in Manufacturing Industries." Current Organic Chemistry **7(13)**: 1399-1422.
- Gámiz M. (2007). "Tecnologías sostenibles para la gestión de residuos en Ventanilla (Lima). Aprovechamiento energético del Biogás (PFC)." Barcelona, Universitat Politècnica de Catalunya.
- Gardner, H. (1989). "Soybean lipoxygenase -1 enzymatically forms both 9(S)- and 13(S)-hydroperoxides from linoleic acid by a pH dependent mechanism." Biochimica et Biophysica Acta **1001**: 274-281.
- Gianfreda L, Xu F, et al. (1999). " Laccases: A useful group of oxidoreductive enzymes." Bioremediation J. **3**: 1-25.
- Gillmor SA., Villasenor A., et al. (1997). "The structure of mammalian 15-lipoxygenase reveals similarity to the lipases and the determinants of substrate specificity. ." Nat. Struct. Biol. **4** 1003-1009. .
- Grechkin A (1998). "Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway." Prog. Lipid Res. **37 (5)**: 317-352.
- Grogan G., Rippé C., et al. (1997). "Biohydrolysis of substituted styrene oxides by *Beauveria densa* CMC 3240." Journal of Molecular Catalysis B **3**: 253-257.
- Guerrero, A., I. Casals, et al. (1997). "Oxidation of oleic acid to (E)-10-hydroperoxy-8-octadecenoic acid and (E)-10-hydroxy-8-octadecenoic acids by *Pseudomonas sp.* 42A2." Biochimica et Biophysica Acta **1347**: 75-81.
- Haba E, Espuny MJ, et al. (2000). "Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oil." J. Appl. Microbiol. **88**: 379-387.
- Hildebrand DF (1989). "Lipoxygenases." Physiol. Plant **76** 249 - 53
- Holland HL, W. H. (2000). "Enzymatic hydroxylation reactions." Current Opinion in Biotechnology **11(6)**: 547-553

- Hornung E., Walther M., et al. (1999). "Conversion of cucumber linoleate 13-lipoxygenase to a 9-lipoxygenating species by site-directed mutagenesis." Proc. Natl. Acad. Sci. **96**: 4192 - 4197.
- Hou CT and Bagby MO (1990). "Microbial production of dihydroxy octadecenoic acid from oleic acid." Chem. Abstr. **114**: 205567j.
- Hover C.G., K. A. P. (2000). "Hydroperoxide specificity of plant and human tissue lipoxygenase: an in vitro evaluation using N-demethylation of phenothiazines." Biochim. Biophys. Acta **1475**: 256-264.
- Hu J., K. A. P. (2000). "Metabolic fate of chemical mixtures. I. Shuttle oxidant effect of lipoxygenase-generated radical of chlorpromazine and related phenothiazines of the oxidation of benzidine and other xenobiotics." Teratog. Care. Mut. **20**: 195-208.
- Hu S., H. L. P. (1999). "Highly enantioselective propargylic hydroxylations catalyzed by chloroperoxidase. ." J Am Chem Soc **121**: 872-873.
- Hughes RK, Lawson DM, et al. (2001). "Mutagenesis and modelling of linoleatebinding to pea seed lipoxygenase." European Journal of Biochemistry **268 (4)**: 1030-1040.
- Hung K.T. , K. C. H. (1997 ). "Senescence of rice leaves XXXV. Promotive effects of jasmonates." Bot. Bull. Acad. Sin. **89**: 85-89.
- Ikuya Y, Yoshiyaa F, et al. (1971). "α-Oxidation of long-chain fatty acids in cell-free extracts of *Arthrobacter simplex* " **239 (3)**: 513-516.
- Ishige T., Honda K., et al. (2005). "Whole organism biocatalysis." Current Opinion in Chemical Biology **9**: 174-180.
- Johnson JB. and Omland KS. (2004). "Model selection in ecology and evolution." Trends in Ecology and Evolution **19 (2)**: 101-108.
- Kato D. and Mitsuda S. (2003). "Microbial deracemization of α-substituted carboxylic acids: substrate specificity and mechanistic investigation." Journal of Organic Chemistry **68**: 7234-7242.
- Kelly DR, Ed. (2000). Biotransformations II. Biotechnology, Wiley-VCH).
- Kirk O, Borchert TV, et al. (2002). "Industrial enzyme applications " Curr Opin Biotechnol **13**: 345-351.
- Kiska D.L. and Gilligan P.H. (2003). "Pseudomonas. In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C."
- Knothe G, Bagby MO, et al. (1992). "7,10-Dihydroxy-8-(E)-octadecenoic acid: stereochemistry and a novel derivative, 7,10-dihydroxy octadecenoic acid." J. Am. Oil Chem. Soc. **69**: 367-371.
- Koeduka T., Kajiwara T., et al. (2007). "Cloning of Lipoxygenase Genes from a Cyanobacterium, *Nostoc punctiforme*, and Its Expression in *Escherichia coli* " CURRENT MICROBIOLOGY Vol. 54 (2007), pp. 315-319 **54**: 315-319.
- Koka R and et al. (2004). US Patent 20040151802-A1.
- Kühn H (2000). "Structural basis for the positional specificity of lipoxygenases." Prostaglandins and other lipid mediators **62**: 255-270.
- Kühn H, S. T., Rapaport SM (1986). "The stereochemistry of the reactions of lipoxygenase and their metabolites. Proposed nomenclature of lipoxygenases and related enzymes." Adv. Enzymol. **88**: 273-311.
- Kühn H., Barnett J., et al. (1993). "Overexpression, purification and characterization of human recombinant 15-lipoxygenase." Biochimica et Biophysica Acta **1169 (1)**: 80-89.
- Kuhn H., Saam J., et al. (2005). "Structural biology of mammalian lipoxygenases: Enzymatic consequences of targeted alterations of the



- protein structure." Biochemical and Biophysical Research Communications **338**: 93-101.
- Kuhn H. and Thiele BJ. (1999). "The diversity of the lipoxygenase family: Many sequence data but little information on biological significance " FEBS letters **449 (1)**: 7-11.
- Kuhn H., Walther M., et al. (2002). "Mammalian arachidonate 15-lipoxygenases: Structure, function, and biological implications." Prostaglandins & other Lipid Mediators **68 - 69**: 263 - 290.
- Kulkarni AP (2001). "Lipoxygenase – a versatile biocatalyst for biotransformation of endobiotics and xenobiotics." CMLS, Cell. Mol. Life Sci. **58**: 1805–1825.
- Kuo T. and Kaneshiro T. (2002). Microbiological conversions of fatty acids to value-added products. New York Marcel Dekker Inc.
- L. G. WAYNE, D. J. BRENNER, et al. (1987). "Report of the Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics." International Journal of Systematic Bacteriology **37 (4)**: 463-464.
- Laemmli UK. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophageT4." Nature **227**: 680-685.
- Lang I., Göbel C., et al. (2008). "A lipoxygenase with linoleate diol synthase activity from Nostoc sp. PCC 7120." Biochem J. **410**: 347-357.
- Leresche J E , M. H. P. (2006). "Chemocatalysis and Biocatalysis (Biotransformation): Some Thoughts of a Chemist and of a Biotechnologist." Organic Process Research & Development **10(3)**: 572-580.
- Liavonchanka A. and F. I. (2006). "Lipoxygenases: occurrence, functions and catalysis." J. Plant Physiol. **163**: 348-357.
- May C., H. M., Gnau P., Schwennesen K., Kindl H. (2000). "The N-terminal B-barrel structure of lipid body lipoxygenase mediates its binding to liposomes and lipid bodies." Eur. J. Biochem. **267**: 1100-1109.
- Mc Pherson A. (1999). "Crystallization of Biological Macromolecules. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York."
- Mc Pherson A. (2003). "Introduction to Macromolecular Crystallography. Wiley-Liss, Inc., New Jersey."
- McDonnella M., D. W., Lia H., Funke CD. (2001). "Characterization of the murine epidermal 12/15-lipoxygenase." Prostaglandins & other Lipid Mediators **63**: 93–107.
- Mercadé, M. E., M. Robert, et al. (1988). "New surfactant isolated from *Pseudomonas sp* 42A2." JAOCs **65**: 1915-1916.
- Meyer J and Ladner W (1989). "Microbial manufacture of 11-hydroxy- $\gamma$ -dodecalactone." Chem. Abstr. **112**: 196710e.
- Minor W, S. J., Bolin JT, Otwinowski Z, Axelrod B (1993). "Cristallographic determination of the active site iron and its ligands in soybean lipoxygenase-1." Biochemistry **32(6320-6323)**.
- Minor W., S. J., Stec B., Otwinowski Z., Bolin J.T., Walter R., et al., (1996). "Crystal structure of soybean lipoxygenase L-1 at 1.4 Å resolution." Biochemistry **35**: 10687-10701.
- Montes LR, Ibarguren M, et al. (2007). "Leakage-free membrane fusion induced by the hydrolytic activity of PlCHR2, a novel phospholipase C/sphingomyelinase from *Pseudomonas aeruginosa*." Biochimica et Biophysica Acta **1768**: 2365–2372.
- Moore E.R.B., M., M., Arnscheidt, A., Bosttger, E. C., Hutson, R. A., Collins, M. D., Van de Peer, Y., De Wachter, R. & Timmis, K. N. (1996). "The determination and comparison of the 16S rRNA gene sequence of species

- of the genus *Pseudomonas* (sensu stricto) and estimation of the natural intrageneric relationships. ." Syst Appl Microbiol **19**: 478-492.
- Munro AW, Taylor P, et al. (2000). "Structures of redox enzymes." Current Opinion in Biotechnology **11**: 369-376.
- Munro AW., Taylor P., et al. (2000). "Structures of redox enzymes." Curr Opin Biotechnol **11**: 369-376.
- Murshudov G N, Vagin A A, et al. (1997). "Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method." Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography **53**: 240-255.
- Naidu A.K., K. A. P. (1991). "Role of lipoxygenase in xenobiotic metabolism: sulfoxidation of thiobenzamide by purified soybean lipoxygenase." Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. **71**: 175-188.
- Narvel J.M., F. W. R., Welke G.A. (1998). "Agronomic and Seed Traits of Soybean Lines Lacking Seed Lipoxygenases." Crop Sci **38**: 926-928.
- Neau DB., Gilbert NC., et al. (2009). "The 1.85Å Structure of an 8R-Lipoxygenase Suggests a General Model for Lipoxygenase Product Specificity." Biochemistry **48**: 7906-7915.
- Nei M. and Gojobori T. (1986). "Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions." Mol Biol Evol **3**: 418-426.
- Nielsen R. and Yang Z. (1998). "Likelihood models for detecting positively amino acid sites and applications to the HIV-1 envelope gene." Genetics **148**: 929-936.
- Niki E. (2004). "Antioxidants and atherosclerosis." Biochemical Society Transactions **32 (1)**: 156 - 159.
- Novak M.J. (1999). "New minimal substrate structural requirements in the enzymic peroxidation of alkenes with soybean lipoxygenase." Bioorg. Med. Chem. Lett. **9**: 31-34.
- O'Brien C. (1999). "Sustainable production – a new paradigm for a new millennium." Int. J. Production Economics **60-61**: 1-7.
- Oldham M.L., B. A. R., Newcomer M.E. (2005). "Insights from the X-ray crystal structure of coral 8R-lipoxygenase: calcium activation via a C2-like domain and a structural basis of product chirality." J Biol Chem. **280(47)**: 39545-52.
- Oliw EH (2002). "Plant and fungal lipoxygenases." Prostaglandins and other lipid mediators **68-69**: 313-323.
- Otwinowski Z and Minor W (1997). Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode. Methods in Enzymology: Macromolecular Crystallography, part A. J. C.W. Carter and R. M. Sweet, Academic Press. **276**: 307-326.
- Park SJ., Kang CH., et al. (2008). "Metagenome microarray for screening of fosmid clones containing specific genes." FEMS Microbiol Lett. **284 (1)**: 28-34.
- Piomelli D, V. A., Dale N, Siegelbaum SA, Kandel ER, Schwartz JH, Belardetti F. (1987 ). "Lipoxygenase metabolites of arachidonic acid as second messengers for presynaptic inhibition of *Aplysia* sensory cells." Nature. **328(6125)**: 38-43.
- Ponting CP. and Aravind L. (1999). "The cytoplasmic helical linker domain of receptor histidine kinase and methyl-accepting proteins is common to many prokaryotic signaling proteins." FEMS Microbiol Lett. **176**: 111-116.
- Porta H. and Rocha-Sosa M. (2001). "Lipoxygenase in bacteria: a horizontal transfer event?" Microbiology **147**: 3199-3200.

- Prigge S., J. Boyington, et al. (1997). "Structure and mechanism of lipoxygenases." Biochimie **79**: 629-636.
- Prigge ST, B. J., Gaffney BJ, Amzel LM (1996). "Structure conservation in lipoxygenases: structural analysis of soybean lipoxygenase-1 and modeling of human lipoxygenases." Proteins. **24(3)**: 275-91.
- Radmark O. (2002). "Arachidonate 5-lipoxygenase." Prostaglandins and other lipid mediators **68-69**: 211-234.
- Rapoport SM, S. T. (1986 ). "The maturational breakdown of mitochondria in reticulocytes." Biochim Biophys Acta. **864(3-4)**: 471-95.
- Ratledge C. and Wilkinson SG. (1988). "Microbial lipids Volume 1, Chapter 7: Gram-negative bacteria."
- Rhee SK., Liu X., et al. (2004). "Detection of biodegradation and biotransformation genes in microbial communities using 50-mer oligonucleotide microarrays. ." Appl. Environ. Microol. **70**: 4303-4317.
- Ritchie ME., Silver J., et al. (2007). "A comparison of background correction methods for two-colour microarrays." Bioinformatics **23**: 2700-2707.
- Rodríguez Couto S and Toca-Herrera JL (2006). "Lacasses in the textile industry." Biotechnology and Molecular Biology Review **1(4)**: 115-120.
- Rudman R. (1976). "Low temperature X-ray diffraction. Plenum Press, New York."
- Sambrook J., Fritsch E., et al. (1989). "Molecular cloning: A laboratory Manual."
- Schewe T., R. S. (1986). "Enzymology and physiology of reticulocyte lipoxygenase. Comparison with other lipoxygenases." Advances in Enzymology **58**: 191-271.
- Schneider C., Pratt D.A., et al. (2007). "Control of oxygenation in lipoxygenase and cyclooxygenase catalysis." Chem. Biol. **14**: 473-488.
- Schoemaker HE, Mink D, et al. (2003). "Dispelling the Myths - Biocatalysis in Industrial Synthesis " Science **299 (5613)**: 1694-1697.
- Schultz DJ. and Ohlrogge JB. (2002). Metabolic engineering of fatty acid biosynthesis. New York Marcel Dekker Inc.
- Sekhar Rao K.C. , D. S., Appu Rao A.G., Karanth N.G., Suneetha W.J. , and S. A. P. Krishnakantha T.P. (2002). "Asperenone: an inhibitor of 15-lipoxygenase and of human platelet aggregation from *Aspergillus niger*." Biotechnology Letters **24**: 1967-1970.
- Serhan CN (1997). "Lipoxins and novel aspirin-triggered 15-epi-lipoxins (ATL): a jungle of cell-cell interactions or a therapeutic opportunity?" Prostaglandins. **53(2)**: 107-37.
- Shibata D. and Axelrod B. (1995). "Plant lipoxygenases." J. Lipid Mediators Cell Signalling **12**: 213 - 228.
- Shin J. and Kim B. (2001). "Comparison of the  $\omega$ -transaminases from different microorganisms and application to production of chiral amines." Bioscience Biotechnology and Biochemistry **65**: 1782-1788.
- Siedow JN. (1991). "Plant lipoxygenase - structure and function." Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **42**: 145-88.
- Skrzypczak-Jankun E, Bross RA, et al. (2001). "Three-dimensional structure of a purple lipoxygenase." J Am Chem Soc. **123(44)**: 10814-20.
- Sloane D. and Leung R. (1995). "Conversion of human 15-lipoxygenase to an efficient 12-lipoxygenase: the side-chain geometry amino acids 417 and 418 determine positional specificity." Protein Engineering **8**: 275-282.
- Smyth GK. (2004). "Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments." Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology **3 (1)**: Article 3.

- Solomon EI., Zhou J., et al. (1997). "New insights from spectroscopy into the structure/function relationships of lipoxygenases." Chemistry and Biology **4 (11)**: 795-808.
- Spiers A.J., B. A., Rainey P.B. (2000 ). "The causes of Pseudomonas diversity. Microbiology." Microbiology **146**: 2345-2350
- Steczko J., Donoho GA., et al. (1991). "Effect of ethanol and low-temperature culture on expression of soybean lipoxygenase L-1 in Escherichia coli." Protein Expression and Purification **2 (2-3)**: 221-227.
- Steele HL, J. K., Daniel R, Streit WR. (2009). "Advances in Recovery of Novel Biocatalysts from Metagenomes. ." J Mol Microbiol Biotechnol **16**: 25-37.
- Su C., B. I., Oliw EH. (1995). "Studies on linoleic acid 8R-dioxygenase and hydroperoxide isomerase of the fungus Gaeumannomyces graminis." Lipids. **30(1)**: 43-50.
- Tamura K., Dudley J., et al. (2007). "MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0." Molecular Biology and Evolution **24**: 1596-1599
- Tang D.G., C. Y. Q., Honn K.V. (1996). "Arachidonate lipoxygenases as essential regulators of cell survival and apoptosis." Proc. Natl. Acad. Sci. **93**: 5241-5246.
- Tang DG, H. K. (1994). "12-Lipoxygenase, 12(S)-HETE, and cancer metastasis." Ann N Y Acad Sci. **744**: 199-215.
- Tatulian S.A., S. J., Minor W. (1998). "Uncovering a calcium-regulated membrane-binding mechanism for soybean lipoxygenase-1." Biochemistry **37**: 15481-15490.
- Teske AP (2005). "The deep surfaces biosphere is alive and well." Trends in microbiology **13(9)**: 402-404.
- Tomchick DR, Phan P, et al. (2001). "Structural and Functional Characterization of Second-Coordination Sphere Mutants of Soybean Lipoxygenase-1." Biochemistry **40**: 7509-7517.
- Turner J.G., E. C., Devoto A. (2002). "The jasmonate signal pathway." The Plant Cell Supplement **2002**: 153-164.
- Turner N. and Schneider M. (2000). "Biocatalysis and biotransformation. Biocatalysis-molecular, structural and synthetic advances." Current Opinion in Chemical Biology **4**: 65-67.
- Vagin A and Teplyakov A (1997). "MOLREP: an automated program for molecular replacement." Journal of Applied Crystallography **30**: 1022-1025.
- Van Beilen JB, Duetz WA, et al. (2003). "Practical issues in the application of oxygenases " Trends in Biotechnology **21(4)**: 170-177
- Vance R.E, H. S., Gronert K., Serhan C.N., Mekalanos J.J. (2004). "The opportunistic pathogen Pseudomonas aeruginosa carries a secretable arachidonate 15-lipoxygenase." PNAS **101 (7)**: 2135-2139.
- Verdnick D., Handran S., et al. (2002). DNA Array Image Analysis - Chapter 5: Key Considerations for Accurate Microarray Scanning and Image Analysis., DNA Press).
- Vidal-Mas J, B. M., Manresa A (2005). "Cloning and expression of a lipoxygenase from Pseudomonas aeruginosa 42A2." Antonie van Leeuwenhoek **87**: 245-251.
- Volgestein B. and Gillespie D. (1979). "Preparative end analytical purification of DNA from agarose." Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America **76**: 615-619.
- Wu L., Thompson DK., et al. (2004). "Development and Evaluation of Microarray-Based Whole-Genome Hybridization for Detection of

- Microorganisms within the Context of Environmental Applications." Environ. Sci. Technol. **38**: 6775-6782.
- Yamamoto S., K. H., Arnold D.L., Jackson R.W., Vivian A., Harayama S. (2000). "Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes." Microbiology **146**: 2385-2394.
- Yang Z. (1998). "Likelihood ratio test for detecting positive selection and application to primate lysozyme evolution." Molecular Biology and Evolution **15**: 568-573.
- Yang Z. (2007). "PAML 4: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood." Mol Biol Evol **24**: 1586-1591.
- Yang Z. and Nielsen R. (1998). "Synonymous and nonsynonymous rate variation in nuclear genes of mammals." Journal of Molecular Evolution **46**: 409-418.
- Yang Z., Nielsen R., et al. (2000). "Codon-substitution models for heterogeneous selection pressure at amino acid sites." Genetics **155**: 431-449.
- Yang Z., Wong WSW., et al. (2005). "Bayes empirical Bayes inference of amino acid sites under positive selection." Molecular Biology and Evolution **22**: 1107-1118.
- Youn B., Sellhorn GE., et al. (2006). "Crystal structures of vegetative soybean lipoxygenase VLX-B and VLX-D, and comparisons with seed isoforms LOX-1 and LOX-3." Proteins **65(4)**: 1008-20.



## **8. ANNEXES**





**8.1.** Annex 1: Composició dels tampons provats per a la cristal·lització de la lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa*



### Ammonium sulfate grid screen

Number	[Buffer]	[Buffer] units	Buffer	pH	[Precipitant]	[Precipitant] units	Precipitant
A1	0,1	M	Tri-sodium citrate dihydrate	4	0,8	M	ammonium sulfate
A2	0,1	M	Tri-sodium citrate dihydrate	5	0,8	M	ammonium sulfate
A3	0,1	M	MES	6	0,8	M	ammonium sulfate
A4	0,1	M	HEPES	7	0,8	M	ammonium sulfate
A5	0,1	M	Tris	8	0,8	M	ammonium sulfate
A6	0,1	M	bicine	9	0,8	M	ammonium sulfate
A7	0,1	M	Tri-sodium citrate dihydrate	4	1,6	M	ammonium sulfate
A8	0,1	M	Tri-sodium citrate dihydrate	5	1,6	M	ammonium sulfate
A9	0,1	M	MES	6	1,6	M	ammonium sulfate
A10	0,1	M	HEPES	7	1,6	M	ammonium sulfate
A11	0,1	M	Tris	8	1,6	M	ammonium sulfate
A12	0,1	M	bicine	9	1,6	M	ammonium sulfate
B1	0,1	M	Tri-sodium citrate dihydrate	4	2,4	M	ammonium sulfate
B2	0,1	M	Tri-sodium citrate dihydrate	5	2,4	M	ammonium sulfate
B3	0,1	M	MES	6	2,4	M	ammonium sulfate
B4	0,1	M	HEPES	7	2,4	M	ammonium sulfate
B5	0,1	M	Tris	8	2,4	M	ammonium sulfate
B6	0,1	M	bicine	9	2,4	M	ammonium sulfate
B7	0,1	M	Tri-sodium citrate dihydrate	4	3,2	M	ammonium sulfate
B8	0,1	M	Tri-sodium citrate dihydrate	5	3,2	M	ammonium sulfate
B9	0,1	M	MES	6	3,2	M	ammonium sulfate
B10	0,1	M	HEPES	7	3,2	M	ammonium sulfate
B11	0,1	M	Tris	8	3,2	M	ammonium sulfate
B12	0,1	M	bicine	9	3,2	M	ammonium sulfate

### Crystal Screen Lite

N°	[Salt]	[Salt]units	Salt	[Buffer]	[Buffer]units	Buffer	pH	[Precipitant]	[Precipitant]units	Precipitant
A1	0,02	M	Calcium chloride dihydrate	0,1	M	Sodium acetate trihydrate	4,6	15	%v/v	MPD
A2								0,2	M	Potassium sodium tartrate tetrahydrate
A3								0,2	M	Ammonium dihydrogen phosphate
A4				0,1	M	Tris	8,5	1	M	Ammonium sulfate
A5	0,2	M	tri-Sodium citrate dihydrate	0,1	M	HEPES	7,5	15	%v/v	MPD
A6	0,2	M	magnesium chloride	0,1	M	Tris	8,5	15	%w/v	polyethylene glycol 4000
A7				0,1	M	Cacodylate	6,5	0,7	M	sodium acetate trihydrate
A8	0,2	M	tri-sodium citrate dihydrate	0,1	M	Cacodylate	6,5	15	%v/v	iso-propanol
A9	0,2	M	ammonium acetate	0,1	M	tri-sodium citrate dihydrate	5,6	15	%w/v	polyethylene glycol 4000
A10	0,2	M	ammonium acetate	0,1	M	Sodium acetate trihydrate	4,6	15	%w/v	polyethylene glycol 4000
A11				0,1	M	tri-sodium citrate dihydrate	5,6	0,5	M	Ammonium dihydrogen phosphate
A12	0,2	M	magnesium chloride	0,1	M	HEPES	7,5	15	%v/v	iso-propanol
B1	0,2	M	tri-Sodium citrate dihydrate	0,1	M	Tris	8,5	15	%v/v	polyethylene glycol 400
B2	0,2	M	Calcium chloride dihydrate	0,1	M	HEPES	7,5	14	%v/v	polyethylene glycol 400
B3	0,2	M	ammonium sulfate	0,1	M	Cacodylate	6,5	15	%w/v	polyethylene glycol 8000
B4				0,1	M	HEPES	7,5	0,75	M	lithium sulfate anhydride
B5	0,2	M	lithium sulfate anhydride	0,1	M	Tris	8,5	15	%	polyethylene glycol 4000
B6	0,2	M	magnesium acetate tetrahydrate	0,1	M	Cacodylate	6,5	10	%	polyethylene glycol 8000
B7	0,2	M	ammonium acetate	0,1	M	Tris	8,5	15	%v/v	iso-propanol
B8	0,2	M	ammonium sulfate	0,1	M	Sodium acetate trihydrate	4,6	12,5	%w/v	polyethylene glycol 4000
B9	0,2	M	magnesium acetate tetrahydrate	0,1	M	Cacodylate	6,5	15	%v/v	MPD
B10	0,2	M	sodium acetate trihydrate	0,1	M	Tris	8,5	15	%w/v	polyethylene glycol 4000
B11	0,2	M	magnesium chloride	0,1	M	HEPES	7,5	15	%v/v	polyethylene glycol 400
B12	0,2	M	Calcium chloride dihydrate	0,1	M	Sodium acetate trihydrate	4,6	10	%v/v	iso-propanol
C1				0,1	M	imidazole	6,5	0,5	M	sodium acetate trihydrate
C2	0,2	M	ammonium acetate	0,1	M	tri-sodium citrate dihydrate	5,6	15	%v/v	MPD
C3	0,2	M	tri-Sodium citrate dihydrate	0,1	M	HEPES	7,5	10	%v/v	iso-propanol
C4	0,2	M	sodium acetate trihydrate	0,1	M	Cacodylate	6,5	15	%w/v	polyethylene glycol 8000



## Crystal Screen I

number	[Salt]	[Salt]units	Salt	[Buffer]	[Buffer]units	Buffer	pH	[Precipitant]	[Precipitant] units	Precipitant
A1	0,02	M	Calcium chloride dihydrate	0,1	M	Sodium acetate trihydrate	4,6	30	%v/v	MPD
A2								0,4	M	Potassium sodium tartrate tetrahydrate
A3								0,4	M	Ammonium dihydrogen phosphate
A4				0,1	M	Tris	8,5	2	M	Ammonium sulfate
A5	0,2	M	tri-Sodium citrate dihydrate	0,1	M	HEPES	7,5	30	%v/v	MPD
A6	0,2	M	magnesium chloride hexahydrate	0,1	M	Tris	8,5	30	%w/v	polyethylene glycol 4000
A7				0,1	M	Cacodylate	6,5	1,4	M	sodium acetate trihydrate
A8	0,2	M	tri-sodium citrate dihydrate	0,1	M	Cacodylate	6,5	30	%v/v	iso-propanol
A9	0,2	M	ammonium acetate	0,1	M	tri-sodium citrate dihydrate	5,6	30	%w/v	polyethylene glycol 4000
A10	0,2	M	ammonium acetate	0,1	M	Sodium acetate trihydrate	4,6	30	%w/v	polyethylene glycol 4000
A11				0,1	M	tri-sodium citrate dihydrate	5,6	1	M	Ammonium dihydrogen phosphate
A12	0,2	M	magnesium chloride hexahydrate	0,1	M	HEPES	7,5	30	%v/v	iso-propanol
B1	0,2	M	tri-Sodium citrate dihydrate	0,1	M	Tris	8,5	30	%v/v	polyethylene glycol 400
B2	0,2	M	Calcium chloride dihydrate	0,1	M	HEPES	7,5	28	%v/v	polyethylene glycol 400
B3	0,2	M	ammonium sulfate	0,1	M	Cacodylate	6,5	30	%w/v	polyethylene glycol 8000
B4				0,1	M	HEPES	7,5	1,5	M	lithium sulfate anhydride
B5	0,2	M	lithium sulfate anhydride	0,1	M	Tris	8,5	30	%w/v	polyethylene glycol 4000
B6	0,2	M	magnesium acetate tetrahydrate	0,1	M	Cacodylate	6,5	20	%w/v	polyethylene glycol 8000
B7	0,2	M	ammonium acetate	0,1	M	Tris	8,5	30	%v/v	iso-propanol
B8	0,2	M	ammonium sulfate	0,1	M	Sodium acetate trihydrate	4,6	25	%w/v	polyethylene glycol 4000
B9	0,2	M	magnesium acetate tetrahydrate	0,1	M	Cacodylate	6,5	30	%v/v	MPD
B10	0,2	M	sodium acetate trihydrate	0,1	M	Tris	8,5	30	%w/v	polyethylene glycol 4000
B11	0,2	M	magnesium chloride hexahydrate	0,1	M	HEPES	7,5	30	%v/v	polyethylene glycol 400
B12	0,2	M	Calcium chloride dihydrate	0,1	M	Sodium acetate trihydrate	4,6	20	%v/v	iso-propanol
C1				0,1	M	imidazole	6,5	1	M	sodium acetate trihydrate
C2	0,2	M	ammonium acetate	0,1	M	tri-sodium citrate dihydrate	5,6	30	%v/v	MPD
C3	0,2	M	tri-Sodium citrate dihydrate	0,1	M	HEPES	7,5	20	%v/v	iso-propanol
C4	0,2	M	sodium acetate trihydrate	0,1	M	Cacodylate	6,5	30	%w/v	polyethylene glycol 8000



## Natrix

N°	[Salt]	[Salt]units	Salt	[Buffer]	[Buffer] units	Buffer	pH	[Precipitant]	[Precipitant]units	Precipitant
A1	0,01	M	magnesium chloride	0,05	M	MES	5,6	2	M	lithium sulfate monohydrate
A2	0,01	M	magnesium acetate tetrahydrate	0,05	M	MES	5,6	2,5	M	ammonium sulfate
A3	0,1	M	magnesium acetate tetrahydrate	0,05	M	MES	5,6	20	%v/v	MPD
A4	0,2	M	potassium chloride	0,05	M	MES	5,6	10	%v/v	polyethylene glycol 400
	0,01	M	magnesium sulfate							
A5	0,2	M	potassium chloride	0,05	M	MES	5,6	5	%w/v	polyethylene glycol 8000
	0,01	M	magnesium chloride							
A6	0,1	M	ammonium sulfate	0,05	M	MES	5,6	20	%w/v	polyethylene glycol 8000
	0,01	M	magnesium chloride							
A7	0,02	M	magnesium chloride	0,05	M	MES	6	15	%v/v	iso-propanol
A8	0,1	M	ammonium acetate	0,05	M	MES	6	0,6	M	sodium chloride
	0,005	M	magnesium sulfate							
A9	0,1	M	potassium chloride	0,05	M	MES	6	10	%v/v	polyethylene glycol 400
	0,01	M	magnesium chloride							
A10	0,005	M	magnesium sulfate	0,05	M	MES	6	5	%w/v	polyethylene glycol 4000
A11	0,01	M	magnesium chloride	0,05	M	sodium cacodylate	6	1	M	lithium sulfate monohydrate
A12	0,01	M	magnesium sulfate	0,05	M	sodium cacodylate	6	1,8	M	lithium sulfate monohydrate
B1	0,015	M	magnesium acetate tetrahydrate	0,05	M	sodium cacodylate	6	1,7	M	ammonium sulfate
B2	0,1	M	potassium chloride	0,05	M	sodium cacodylate	6	15	%v/v	iso-propanol
	0,025	M	magnesium chloride							
B3	0,04	M	magnesium chloride	0,05	M	sodium cacodylate	6	5	%v/v	MPD
B4	0,04	M	magnesium acetate tetrahydrate	0,05	M	sodium cacodylate	6	30	%v/v	MPD
B5	0,2	M	potassium chloride	0,05	M	sodium cacodylate	6	10	%w/v	polyethylene glycol 4000
	0,01	M	calcium chloride dihydrate							
B6	0,01	M	magnesium acetate tetrahydrate	0,05	M	sodium cacodylate	6,5	1,3	M	lithium sulfate monohydrate
B7	0,01	M	magnesium sulfate	0,05	M	sodium cacodylate	6,5	2	M	ammonium sulfate
B8	0,1	M	ammonium acetate	0,05	M	sodium cacodylate	6,5	10	%v/v	iso-propanol
	0,015	M	magnesium acetate tetrahydrate							



<b>B9</b>	0,2	M	potassium chloride	0,05	M	sodium cacodylate	6,5	10	%w/v	1,6-hexanediol
	0,005	M	magnesium chloride							
<b>B10</b>	0,08	M	magnesium acetate tetrahydrate	0,05	M	sodium cacodylate	6,5	15	%v/v	polyethylene glycol 400
<b>B11</b>	0,2	M	potassium chloride	0,05	M	sodium cacodylate	6,5	10	%w/v	polyethylene glycol 4000
	0,01	M	magnesium chloride							
<b>B12</b>	0,2	M	ammonium acetate	0,05	M	sodium cacodylate	6,5	10	%w/v	polyethylene glycol 4000
	0,01	M	calcium chloride dihydrate							
<b>C1</b>	0,08	M	magnesium acetate tetrahydrate	0,05	M	sodium cacodylate	6,5	30	%w/v	polyethylene glycol 4000
<b>C2</b>	0,2	M	potassium chloride	0,05	M	sodium cacodylate	6,5	10	%w/v	polyethylene glycol 8000
	0,1	M	magnesium acetate tetrahydrate							
<b>C3</b>	0,2	M	ammonium acetate	0,05	M	sodium cacodylate	6,5	30	%w/v	polyethylene glycol 8000
	0,01	M	magnesium acetate tetrahydrate							
<b>C4</b>	0,05	M	magnesium sulfate	0,05	M	HEPES	7	1,6	M	lithium sulfate monohydrate
<b>C5</b>	0,01	M	magnesium chloride	0,05	M	HEPES	7	4	M	lithium chloride
<b>C6</b>	0,01	M	magnesium chloride	0,05	M	HEPES	7	1,6	M	ammonium sulfate
<b>C7</b>	0,005	M	magnesium chloride	0,05	M	HEPES	7	25	%v/v	polyethylene glycol MME 550
<b>C8</b>	0,2	M	potassium chloride	0,05	M	HEPES	7	20	%w/v	1,6-hexanediol
	0,01	M	magnesium chloride							
<b>C9</b>	0,2	M	ammonium chloride	0,05	M	HEPES	7	30	%w/v	1,6-hexanediol
	0,01	M	magnesium chloride							
<b>C10</b>	0,1	M	potassium chloride	0,05	M	HEPES	7	15	%v/v	MPD
	0,005	M	magnesium sulfate							
<b>C11</b>	0,1	M	potassium chloride	0,05	M	HEPES	7	5	%v/v	polyethylene glycol 400
	0,01	M	magnesium chloride							
<b>C12</b>	0,1	M	potassium chloride	0,05	M	HEPES	7	10	%v/v	polyethylene glycol 400
	0,01	M	calcium chloride dihydrate							
<b>D1</b>	0,2	M	potassium chloride	0,05	M	HEPES	7	20	%v/v	polyethylene glycol 200
	0,025	M	magnesium sulfate							
<b>D2</b>	0,2	M	ammonium acetate	0,05	M	HEPES	7	5	%w/v	polyethylene glycol 4000
	0,15	M	magnesium acetate tetrahydrate							
<b>D3</b>	0,1	M	ammonium acetate	0,05	M	HEPES	7	5	%w/v	polyethylene glycol 8000
	0,02	M	magnesium chloride							

<b>D4</b>	0,01	M	magnesium chloride	0,05	M	7,5	1,6	M	ammonium sulfate
<b>D5</b>	0,1	M	potassium chloride	0,05	M	7,5	10	%v/v	polyethylene glycol MME 550
	0,015	M	magnesium chloride						
<b>D6</b>	0,01	M	magnesium acetate tetrahydrate	0,05	M	7,5	5	%v/v	iso-propanol
<b>D7</b>	0,05	M	ammonium acetate	0,05	M	7,5	10	%v/v	MPD
	0,01	M	magnesium chloride						
<b>D8</b>	0,2	M	potassium chloride	0,05	M	7,5	10	%w/v	polyethylene glycol 4000
	0,05	M	magnesium chloride						
<b>D9</b>	0,025	M	magnesium sulfate	0,05	M	8,5	1,8	M	ammonium sulfate
<b>D10</b>	0,005	M	magnesium sulfate	0,05	M	8,5	35	%w/v	1,6-hexanediol
<b>D11</b>	0,1	M	potassium chloride	0,05	M	8,5	30	%v/v	polyethylene glycol 400
	0,01	M	magnesium chloride						
<b>D12</b>	0,2	M	ammonium chloride	0,05	M	8,5	30	%w/v	polyethylene glycol 4000
	0,01	M	calcium chloride dihydrate						

### PEG 6000 Grid Screen

Number	[Buffer]	[Buffer] units	Buffer	pH	[Precipitant]	[Precipitant] units	Precipitant
A1	0,1	M	Tri-sodium citrate dihydrate	4	5	%w/v	polyethylene glycol 6000
A2	0,1	M	Tri-sodium citrate dihydrate	5	5	%w/v	polyethylene glycol 6000
A3	0,1	M	MES	6	5	%w/v	polyethylene glycol 6000
A4	0,1	M	HEPES	7	5	%w/v	polyethylene glycol 6000
A5	0,1	M	Tris	8	5	%w/v	polyethylene glycol 6000
A6	0,1	M	bicine	9	5	%w/v	polyethylene glycol 6000
A7	0,1	M	Tri-sodium citrate dihydrate	4	10	%w/v	polyethylene glycol 6000
A8	0,1	M	Tri-sodium citrate dihydrate	5	10	%w/v	polyethylene glycol 6000
A9	0,1	M	MES	6	10	%w/v	polyethylene glycol 6000
A10	0,1	M	HEPES	7	10	%w/v	polyethylene glycol 6000
A11	0,1	M	Tris	8	10	%w/v	polyethylene glycol 6000
A12	0,1	M	bicine	9	10	%w/v	polyethylene glycol 6000
B1	0,1	M	Tri-sodium citrate dihydrate	4	20	%w/v	polyethylene glycol 6000
B2	0,1	M	Tri-sodium citrate dihydrate	5	20	%w/v	polyethylene glycol 6000
B3	0,1	M	MES	6	20	%w/v	polyethylene glycol 6000
B4	0,1	M	HEPES	7	20	%w/v	polyethylene glycol 6000
B5	0,1	M	Tris	8	20	%w/v	polyethylene glycol 6000
B6	0,1	M	bicine	9	20	%w/v	polyethylene glycol 6000
B7	0,1	M	Tri-sodium citrate dihydrate	4	30	%w/v	polyethylene glycol 6000
B8	0,1	M	Tri-sodium citrate dihydrate	5	30	%w/v	polyethylene glycol 6000
B9	0,1	M	MES	6	30	%w/v	polyethylene glycol 6000
B10	0,1	M	HEPES	7	30	%w/v	polyethylene glycol 6000
B11	0,1	M	Tris	8	30	%w/v	polyethylene glycol 6000
B12	0,1	M	bicine	9	30	%w/v	polyethylene glycol 6000

### Wizard 1

N°	[Salt]	[Salt]units	Salt	[Buffer]	[Buffer]units	Buffer	pH	[Precipitant]	[Precip.]units	Precipitant
A1				0,1	M	CHES	9,5	20	%w/v	polyethylene glycol 8000
A2	0,2	M	sodium chloride	0,1	M	HEPES	7,5	10	%v/v	Iso-propanol
A3				0,1	M	CHES	9,5	15	%v/v	Ethanol
A4	0,2	M	magnesium chloride	0,1	M	imidazole	8	35	%v/v	MPD
A5				0,1	M	CAPS	10,5	30	%v/v	polyethylene glycol 400
A6				0,1	M	Tri-sodium citrate dihydrate	5,5	20	%w/v	polyethylene glycol 3000
A7	0,2	M	zinc acetate	0,1	M	MES	6	10	%w/v	polyethylene glycol 8000
A8				0,1	M	Tri-sodium citrate dihydrate	5,5	2	M	Ammonium sulfate
A9				0,1	M	sodium acetate trihydrate	4,5	1	M	di-ammonium hydrogen phosphate
A10				0,1	M	Tris	7	20	%w/v	polyethylene glycol MME 2000
A11	0,2	M	lithium sulfate anhydre	0,1	M	MES	6	20	%v/v	1,4-butanediol
A12	0,2	M	calcium acetate hydrate	0,1	M	imidazole	8	20	%w/v	polyethylene glycol 1000
B1				0,1	M	cacodylate	6,5	1,26	M	Ammonium sulfate
B2				0,1	M	cacodylate	6,5	1	M	Tri-sodium citrate dihydrate
B3	0,2	M	lithium sulfate anhydre	0,1	M	imidazole	8	10	%w/v	polyethylene glycol 3000
B4				0,1	M	Na/K phosphate	6,2	2,5	M	sodium chloride
B5	0,2	M	lithium sulfate anhydre	0,1	M	sodium acetate trihydrate	4,5	30	%w/v	polyethylene glycol 8000
B6	0,2	M	sodium chloride	0,1	M	imidazole	8	1	M	Potassium sodium tartrate tetrahydrate
B7				0,1	M	Tris	7	20	%w/v	polyethylene glycol 1000
B8	0,2	M	sodium chloride	0,1	M	imidazole	8	0,4	M	sodium dihydrogen phosphate
B9								1,6	M	di-potassium hydrogen phosphate
B10				0,1	M	HEPES	7,5	20	%w/v	polyethylene glycol 8000
B11	0,2	M	magnesium chloride	0,1	M	Tris	8,5	10	%v/v	Iso-propanol
B12	0,2	M	sodium chloride	0,1	M	imidazole	8	15	%v/v	Ethanol
C1	0,2	M	magnesium chloride	0,1	M	Tris	7	35	%v/v	MPD
C2				0,1	M	Tris	8,5	30	%v/v	polyethylene glycol 400
C3	0,2	M	lithium sulfate anhydre	0,1	M	CHES	9,5	10	%w/v	polyethylene glycol 3000
				0,1	M	CAPS	10,5	1,2	M	sodium dihydrogen phosphate

C4	0,2	M	sodium chloride	0,1	M	HEPES		7,5	0,8	M	di-potassium hydrogen phosphate
C5	0,2	M	sodium chloride	0,1	M	CHES		9,5	20	%w/v	polyethylene glycol 3000
C6	0,2	M	sodium chloride	0,1	M	sodium acetate trihydrate		4,5	10	%w/v	polyethylene glycol 8000
C7	0,2	M	sodium chloride	0,1	M	phosphate citrate		4,2	1,26	M	Ammonium sulfate
C8				0,1	M	Na/K phosphate		6,2	20	%w/v	polyethylene glycol 8000
C9	0,2	M	lithium sulfate anhydre	0,1	M	CAPS		10,5	2	M	polyethylene glycol 3000
C10				0,1	M	imidazole		8	1	M	Ammonium sulfate
C11				0,1	M	sodium acetate trihydrate		4,5	20	%v/v	di-ammonium hydrogen phosphate
C12				0,1	M	imidazole		8	1	M	1,4-butanediol
D1				0,1	M	imidazole		8	2,5	M	tri-sodium citrate dihydrate
D2	0,2	M	lithium sulfate anhydre	0,1	M	CHES		9,5	1	M	sodium chloride
D3	0,2	M	lithium sulfate anhydre	0,1	M	phosphate citrate		4,2	20	%w/v	Potassium sodium tartrate tetrahydrate
D4	0,2	M	calcium acetate hydrate	0,1	M	MES		6	10	%v/v	polyethylene glycol 1000
D5				0,1	M	CHES		9,5	30	%w/v	Iso-propanol
D6				0,1	M	Tris		7	15	%v/v	polyethylene glycol 3000
D7				0,1	M	Na/K phosphate		6,2	35	%v/v	ethanol
D8	0,2	M	calcium acetate hydrate	0,1	M	sodium acetate trihydrate		4,5	30	%v/v	MPD
D9				0,1	M	sodium acetate trihydrate		4,5	20	%w/v	polyethylene glycol 400
D10	0,2	M	calcium acetate hydrate	0,1	M	imidazole		8	10	%w/v	polyethylene glycol 3000
D11	0,2	M	lithium sulfate anhydre	0,1	M	Tris		8,5	1,26	M	polyethylene glycol 8000
D12	0,2	M	zinc acetate dihydrate	0,1	M	sodium acetate trihydrate		4,5	20	%w/v	Ammonium sulfate
											polyethylene glycol 1000

**COMPLEX SCREEN**

No	[Buffer]	[Buffer]units	Buffer	pH	[Precipitant]	[Precip.]units	Precipitant
E1	0,1	M	tri-sodium citrate dihydrate	5,6	10	%w/v	polyethylene glycol MME 5000
E2	0,1	M	MES	6,5	10	%w/v	polyethylene glycol MME 5000
E3	0,1	M	HEPES	7,5	10	%w/v	polyethylene glycol MME 5000
E4	0,1	M	tri-sodium citrate dihydrate	5,6	20	%w/v	polyethylene glycol MME 5000
E5	0,1	M	MES	6,5	20	%w/v	polyethylene glycol MME 5000
E6	0,1	M	HEPES	7,5	20	%w/v	polyethylene glycol MME 5000
E7	0,1	M	tri-sodium citrate dihydrate	5,6	10	%w/v	polyethylene glycol 3350
E8	0,1	M	MES	6,5	10	%w/v	polyethylene glycol 3350
E9	0,1	M	HEPES	7,5	10	%w/v	polyethylene glycol 3350
E10	0,1	M	tri-sodium citrate dihydrate	5,6	20	%w/v	polyethylene glycol 3350
E11	0,1	M	MES	6,5	20	%w/v	polyethylene glycol 3350
E12	0,1	M	HEPES	7,5	20	%w/v	polyethylene glycol 3350
F1	0,1	M	tri-sodium citrate dihydrate	5,6	15	%w/v	polyethylene glycol 400
F2	0,1	M	MES	6,5	15	%w/v	polyethylene glycol 400
F3	0,1	M	HEPES	7,5	15	%w/v	polyethylene glycol 400
F4	0,1	M	tri-sodium citrate dihydrate	5,6	30	%w/v	polyethylene glycol 400
F5	0,1	M	MES	6,5	30	%w/v	polyethylene glycol 400
F6	0,1	M	HEPES	7,5	30	%w/v	polyethylene glycol 400
F7	0,1	M	tri-sodium citrate dihydrate	5,6	15	%v/v	MPD
F8	0,1	M	MES	6,5	15	%v/v	MPD
F9	0,1	M	HEPES	7,5	15	%v/v	MPD
F10	0,1	M	tri-sodium citrate dihydrate	5,6	25	%v/v	MPD
F11	0,1	M	MES	6,5	25	%v/v	MPD
F12	0,1	M	HEPES	7,5	25	%v/v	MPD
G1	0,1	M	tri-sodium citrate dihydrate	5,6	10	%w/v	polyethylene glycol 6000
G2	0,1	M	MES	6,5	10	%w/v	polyethylene glycol 6000
G3	0,1	M	HEPES	7,5	10	%w/v	polyethylene glycol 6000
G4	0,1	M	tri-sodium citrate dihydrate	5,6	10	%w/v	polyethylene glycol 8000

<b>G5</b>	0,1	M	MES	6,5	10	%w/v	polyethylene glycol 8000
<b>G6</b>	0,1	M	HEPES	7,5	10	%w/v	polyethylene glycol 8000
<b>G7</b>	0,1	M	TRIS	8	10	%w/v	polyethylene glycol MME 5000
<b>G8</b>	0,1	M	TRIS	8	20	%w/v	polyethylene glycol MME 5000
<b>G9</b>	0,1	M	TRIS	8	10	%w/v	polyethylene glycol 3350
<b>G10</b>	0,1	M	TRIS	8	20	%w/v	polyethylene glycol 3350
<b>G11</b>	0,1	M	TRIS	8	15	%w/v	polyethylene glycol 400
<b>G12</b>	0,1	M	TRIS	8	30	%w/v	polyethylene glycol 400
<b>H1</b>	0,1	M	TRIS	8	15	%v/v	MPD
<b>H2</b>	0,1	M	TRIS	8	25	%v/v	MPD
<b>H3</b>	0,1	M	TRIS	8	10	%w/v	polyethylene glycol 6000
<b>H4</b>	0,1	M	TRIS	8	10	%w/v	polyethylene glycol 8000

## Crystal Screen II

N°	[Salt]	[Salt]units	Salt	[Buffer]	[Buffer] units	Buffer	pH	[Precipitant]	[Precip.]units	Precipitant
E1	2	M	sodium chloride					10	%	Polyethylene glycol 6000
E2	0,5	M	sodium chloride					0,01	M	hexadecyltrimethylammonium bromide
E3								25	%v/v	ethylene glycol
E4								35	%v/v	dioxane
E5	2	M	ammonium sulfate					5	%v/v	iso-propanol
E6								1	M	imidazole pH 7
E7								10	%w/v	polyethylene glycol 1000
E8	1,5	M	sodium chloride					10	%w/v	polyethylene glycol 8000
E9								10	%v/v	ethanol
E10	0,2	M	sodium chloride				4,6	2	M	sodium chloride
E11	0,01	M	cobaltous chloride hexahydrate			sodium acetate trihydrate	4,6	30	%v/v	MPD
E12	0,1	M	cadmium chloride dihydrate			sodium acetate trihydrate	4,6	1	M	1,6 hexanediol
F1	0,2	M	ammonium sulfate			sodium acetate trihydrate	4,6	30	%v/v	polyethylene glycol 400
F2	0,2	M	potassium sodium tartrate tetrahydrate			sodium acetate trihydrate	4,6	30	%w/v	polyethylene glycol monomethyl ether 2000
F3	0,5	M	ammonium sulfate			tri-sodium citrate dihydrate	5,6	2	M	ammonium sulfate
F4	0,5	M	sodium chloride			tri-sodium citrate dihydrate	5,6	1	M	lithium sulfate monohydrate
F5						tri-sodium citrate dihydrate	5,6	4	%v/v	ethylene imine polymer
F6	0,01	M	ferric chloride hexahydrate			tri-sodium citrate dihydrate	5,6	35	%v/v	tert-butanol
F7						tri-sodium citrate dihydrate	5,6	10	%v/v	jeffamine M-600
F8						tri-sodium citrate dihydrate	5,6	2,5	M	1,6 hexanediol
F9	0,1	M	sodium dihydrogen phosphate			MES	6,5	1,6	M	magnesium sulfate heptahydrate
F10						MES	6,5	2	M	sodium chloride
F11	1,6	M	ammonium sulfate			MES	6,5	12	%w/v	polyethylene glycol 20,000
F12	0,05	M	cesium chloride			MES	6,5	10	%v/v	dioxane
G1	0,01	M	cobaltous chloride hexahydrate			MES	6,5	30	%v/v	jeffamine M-600
G2	0,2	M	ammonium sulfate			MES	6,5	1,8	M	ammonium sulfate
G3	0,01	M	zinc sulfate heptahydrate			MES	6,5	30	%w/v	polyethylene glycol monomethyl ether 5000
							6,5	25	%v/v	polyethylene glycol monomethyl ether 550





**MPD grid screen**

Number	[Buffer]	[Buffer]_units	Buffer	pH	[Precipitant]	[Precipitant]_units	Precipitant
C1	0,1	M	Tri-sodium citrate dihydrate	4	10	%v/v	MPD
C2	0,1	M	Tri-sodium citrate dihydrate	5	10	%v/v	MPD
C3	0,1	M	MES	6	10	%v/v	MPD
C4	0,1	M	HEPES	7	10	%v/v	MPD
C5	0,1	M	Tris	8	10	%v/v	MPD
C6	0,1	M	bicine	9	10	%v/v	MPD
C7	0,1	M	Tri-sodium citrate dihydrate	4	20	%v/v	MPD
C8	0,1	M	Tri-sodium citrate dihydrate	5	20	%v/v	MPD
C9	0,1	M	MES	6	20	%v/v	MPD
C10	0,1	M	HEPES	7	20	%v/v	MPD
C11	0,1	M	Tris	8	20	%v/v	MPD
C12	0,1	M	bicine	9	20	%v/v	MPD
D1	0,1	M	Tri-sodium citrate dihydrate	4	40	%v/v	MPD
D2	0,1	M	Tri-sodium citrate dihydrate	5	40	%v/v	MPD
D3	0,1	M	MES	6	40	%v/v	MPD
D4	0,1	M	HEPES	7	40	%v/v	MPD
D5	0,1	M	Tris	8	40	%v/v	MPD
D6	0,1	M	bicine	9	40	%v/v	MPD
D7	0,1	M	Tri-sodium citrate dihydrate	4	65	%v/v	MPD
D8	0,1	M	Tri-sodium citrate dihydrate	5	65	%v/v	MPD
D9	0,1	M	MES	6	65	%v/v	MPD
D10	0,1	M	HEPES	7	65	%v/v	MPD
D11	0,1	M	Tris	8	65	%v/v	MPD
D12	0,1	M	bicine	9	65	%v/v	MPD

**PEG 6000/LiCl grid screen**

Number	[Salt]	[Salt] units	Salt	[Buffer]	[Buffer] units	Buffer	pH	[Precipitant]	[Precipitant] units	Precipitant
C1	1	M	lithium chloride	0,1	M	Tri-sodium citrate dihydrate	4	0	%w/v	polyethylene glycol 6000
C2	1	M	lithium chloride	0,1	M	Tri-sodium citrate dihydrate	5	0	%w/v	polyethylene glycol 6000
C3	1	M	lithium chloride	0,1	M	MES	6	0	%w/v	polyethylene glycol 6000
C4	1	M	lithium chloride	0,1	M	HEPES	7	0	%w/v	polyethylene glycol 6000
C5	1	M	lithium chloride	0,1	M	Tris	8	0	%w/v	polyethylene glycol 6000
C6	1	M	lithium chloride	0,1	M	bicine	9	0	%w/v	polyethylene glycol 6000
C7	1	M	lithium chloride	0,1	M	Tri-sodium citrate dihydrate	4	10	%w/v	polyethylene glycol 6000
C8	1	M	lithium chloride	0,1	M	Tri-sodium citrate dihydrate	5	10	%w/v	polyethylene glycol 6000
C9	1	M	lithium chloride	0,1	M	MES	6	10	%w/v	polyethylene glycol 6000
C10	1	M	lithium chloride	0,1	M	HEPES	7	10	%w/v	polyethylene glycol 6000
C11	1	M	lithium chloride	0,1	M	Tris	8	10	%w/v	polyethylene glycol 6000
C12	1	M	lithium chloride	0,1	M	bicine	9	10	%w/v	polyethylene glycol 6000
D1	1	M	lithium chloride	0,1	M	Tri-sodium citrate dihydrate	4	20	%w/v	polyethylene glycol 6000
D2	1	M	lithium chloride	0,1	M	Tri-sodium citrate dihydrate	5	20	%w/v	polyethylene glycol 6000
D3	1	M	lithium chloride	0,1	M	MES	6	20	%w/v	polyethylene glycol 6000
D4	1	M	lithium chloride	0,1	M	HEPES	7	20	%w/v	polyethylene glycol 6000
D5	1	M	lithium chloride	0,1	M	Tris	8	20	%w/v	polyethylene glycol 6000
D6	1	M	lithium chloride	0,1	M	bicine	9	20	%w/v	polyethylene glycol 6000
D7	1	M	lithium chloride	0,1	M	Tri-sodium citrate dihydrate	4	30	%w/v	polyethylene glycol 6000
D8	1	M	lithium chloride	0,1	M	Tri-sodium citrate dihydrate	5	30	%w/v	polyethylene glycol 6000
D9	1	M	lithium chloride	0,1	M	MES	6	30	%w/v	polyethylene glycol 6000
D10	1	M	lithium chloride	0,1	M	HEPES	7	30	%w/v	polyethylene glycol 6000
D11	1	M	lithium chloride	0,1	M	Tris	8	30	%w/v	polyethylene glycol 6000
D12	1	M	lithium chloride	0,1	M	bicine	9	30	%w/v	polyethylene glycol 6000

**PEG/Ion screen**

Number	[Salt]	[Salt] units	Salt	[Precipitant ]	[Precipitant] units	Precipitant
E1	0,2	M	sodium flouride	20	%w/v	polyethylene glycol 3350
E2	0,2	M	potassium flouride	20	%w/v	polyethylene glycol 3350
E3	0,2	M	ammonium flouride	20	%w/v	polyethylene glycol 3350
E4	0,2	M	lithium chloride anhydre	20	%w/v	polyethylene glycol 3350
E5	0,2	M	magnesium chloride hexahydrate	20	%w/v	polyethylene glycol 3350
E6	0,2	M	sodium chloride	20	%w/v	polyethylene glycol 3350
E7	0,2	M	Calcium chloride dihydrate	20	%w/v	polyethylene glycol 3350
E8	0,2	M	potassium chloride	20	%w/v	polyethylene glycol 3350
E9	0,2	M	ammonium chloride	20	%w/v	polyethylene glycol 3350
E10	0,2	M	sodium iodide	20	%w/v	polyethylene glycol 3350
E11	0,2	M	potassium iodide	20	%w/v	polyethylene glycol 3350
E12	0,2	M	ammonium iodide	20	%w/v	polyethylene glycol 3350
F1	0,2	M	sodium thiocyanate	20	%w/v	polyethylene glycol 3350
F2	0,2	M	potassium thiocyanate	20	%w/v	polyethylene glycol 3350
F3	0,2	M	lithium nitrate	20	%w/v	polyethylene glycol 3350
F4	0,2	M	magnesium nitrate hexahydrate	20	%w/v	polyethylene glycol 3350
F5	0,2	M	sodium nitrate	20	%w/v	polyethylene glycol 3350
F6	0,2	M	potassium nitrate	20	%w/v	polyethylene glycol 3350
F7	0,2	M	ammonium nitrate	20	%w/v	polyethylene glycol 3350
F8	0,2	M	magnesium formate	20	%w/v	polyethylene glycol 3350
F9	0,2	M	sodium formate	20	%w/v	polyethylene glycol 3350
F10	0,2	M	potassium formate	20	%w/v	polyethylene glycol 3350
F11	0,2	M	ammonium formate	20	%w/v	polyethylene glycol 3350
F12	0,2	M	lithium acetate dihydrate	20	%w/v	polyethylene glycol 3350
G1	0,2	M	magnesium acetate tetrahydrate	20	%w/v	polyethylene glycol 3350
G2	0,2	M	zinc acetate dihydrate	20	%w/v	polyethylene glycol 3350
G3	0,2	M	sodium acetate trihydrate	20	%w/v	polyethylene glycol 3350
G4	0,2	M	calcium acetate hydrate	20	%w/v	polyethylene glycol 3350

<b>G5</b>	0,2	M	potassium acetate	20	%w/v	polyethylene glycol 3350
<b>G6</b>	0,2	M	ammonium acetate	20	%w/v	polyethylene glycol 3350
<b>G7</b>	0,2	M	lithium sulfate monohydrate	20	%w/v	polyethylene glycol 3350
<b>G8</b>	0,2	M	magnesium sulfate heptahydrate	20	%w/v	polyethylene glycol 3350
<b>G9</b>	0,2	M	sodium sulfate decahydrate	20	%w/v	polyethylene glycol 3350
<b>G10</b>	0,2	M	potassium sulfate	20	%w/v	polyethylene glycol 3350
<b>G11</b>	0,2	M	ammonium sulfate	20	%w/v	polyethylene glycol 3350
<b>G12</b>	0,2	M	di-sodium tartate dihydrate	20	%w/v	polyethylene glycol 3350
<b>H1</b>	0,2	M	potassium sodium tartrate tetrahydrate	20	%w/v	polyethylene glycol 3350
<b>H2</b>	0,2	M	di-ammonium tartrate	20	%w/v	polyethylene glycol 3350
<b>H3</b>	0,2	M	sodium dihydrogen phosphate monohydrate	20	%w/v	polyethylene glycol 3350
<b>H4</b>	0,2	M	di-sodium hydrogen phosphate dihydrate	20	%w/v	polyethylene glycol 3350
<b>H5</b>	0,2	M	potassium dihydrogen phosphate	20	%w/v	polyethylene glycol 3350
<b>H6</b>	0,2	M	di-potassium hydrogen phosphate	20	%w/v	polyethylene glycol 3350
<b>H7</b>	0,2	M	ammonium dihydrogen phosphate	20	%w/v	polyethylene glycol 3350
<b>H8</b>	0,2	M	di-ammonium hydrogen phosphate	20	%w/v	polyethylene glycol 3350
<b>H9</b>	0,2	M	tri-lithium citrate tetrahydrate	20	%w/v	polyethylene glycol 3350
<b>H10</b>	0,2	M	tri-sodium citrate dihydrate	20	%w/v	polyethylene glycol 3350
<b>H11</b>	0,2	M	tri-potassium citrate monohydrate	20	%w/v	polyethylene glycol 3350
<b>H12</b>	0,2	M	di-ammonium hydrogen citrate	20	%w/v	polyethylene glycol 3350

**Wizard 2**

N°	[Salt]	[Salt]units	Salt	[Buffer]	[Buffer]units	Buffer	pH	[Precipitant]	[Precip.]units	Precipitant
E1	0,2	M	zinc acetate dihydrate	0,1	M	sodium acetate trihydrate	4,5	10	%w/v	polyethylene glycol 3000
E2	0,2	M	lithium sulfate anhydride	0,1	M	MES	6	35	%v/v	MPD
E3	0,2	M	magnesium chloride	0,1	M	Tris	8,5	20	%w/v	polyethylene glycol 8000
E4	0,2	M	sodium chloride	0,1	M	cacodylate	6,5	2	M	ammonium sulfate
E5	0,2	M	sodium chloride	0,1	M	HEPES	7,5	20	%v/v	1,4-butanediol
E6	0,2	M	lithium sulfate anhydride	0,1	M	phosphate citrate	4,2	10	%v/v	Iso-propanol
E7	0,2	M	sodium chloride	0,1	M	Tris	7	30	%w/v	polyethylene glycol 3000
E8	0,2	M	sodium chloride	0,1	M	Na/K phosphate	6,2	10	%w/v	polyethylene glycol 8000
E9				0,1	M	phosphate citrate	4,2	2	M	ammonium sulfate
E10				0,1	M	Tris	8,5	1	M	di-ammonium hydrogen phosphate
E11	0,2	M	zinc acetate dihydrate	0,1	M	cacodylate	6,5	10	%v/v	Iso-propanol
E12	0,2	M	lithium sulfate anhydride	0,1	M	cacodylate	6,5	30	%v/v	polyethylene glycol 400
F1	0,2	M	lithium sulfate anhydride	0,1	M	tri-sodium citrate dihydrate	5,5	15	%v/v	ethanol
F2	0,2	M	sodium chloride	0,1	M	Na/K phosphate	6,2	20	%w/v	polyethylene glycol 1000
F3				0,1	M	HEPES	7,5	1,26	M	ammonium sulfate
F4				0,1	M	CHES	9,5	1	M	tri-sodium citrate dihydrate
F5	0,2	M	magnesium chloride	0,1	M	Tris	7	2,5	M	sodium chloride
F6	0,2	M	calcium acetate hydrate	0,1	M	Tris	7	20	%w/v	polyethylene glycol 3000
F7				0,1	M	phosphate citrate	4,2	1,6	M	sodium dihydrogen phosphate
F8	0,2	M	zinc acetate dihydrate	0,1	M	MES	6	15	%v/v	di-potassium hydrogen phosphate
F9				0,1	M	sodium acetate trihydrate	4,5	35	%v/v	ethanol
F10				0,1	M	imidazole	8	10	%v/v	MPD
F11	0,2	M	magnesium chloride	0,1	M	HEPES	7,5	15	%v/v	Iso-propanol
F12	0,2	M	sodium chloride	0,1	M	imidazole	8	30	%w/v	ethanol
G1	0,2	M	sodium chloride	0,1	M	HEPES	7,5	35	%v/v	polyethylene glycol 8000
G2				0,1	M	CHES	9,5	30	%v/v	MPD
G3	0,2	M	magnesium chloride	0,1	M	cacodylate	6,5	10	%w/v	polyethylene glycol 400
										polyethylene glycol 3000

<b>G4</b>	0,2	M	calcium acetate hydrate	0,1	M	MES	6	20	%w/v	polyethylene glycol 8000
<b>G5</b>	0,2	M	sodium chloride	0,1	M	CHES	9,5	1,26	M	ammonium sulfate
<b>G6</b>	0,2	M	zinc acetate dihydrate	0,1	M	imidazole	8	20	%v/v	1,4-butanediol
<b>G7</b>	0,2	M	sodium chloride	0,1	M	Tris	7	1	M	tri-sodium citrate dihydrate
<b>G8</b>				0,1	M	Tris	8,5	20	%w/v	polyethylene glycol 1000
<b>G9</b>	0,2	M	sodium chloride	0,1	M	tri-sodium citrate dihydrate	5,5	1	M	di-ammonium hydrogen phosphate
<b>G10</b>				0,1	M	imidazole	8	10	%w/v	polyethylene glycol 8000
<b>G11</b>				0,1	M	sodium acetate trihydrate	4,5	0,8	M	sodium dihydrogen phosphate
								1,2	M	di-potassium hydrogen phosphate
<b>G12</b>	0,2	M	sodium chloride	0,1	M	phosphate citrate	4,2	10	%w/v	polyethylene glycol 3000
<b>H1</b>	0,2	M	lithium sulfate anhydride	0,1	M	Tris	7	1	M	potassium sodium tartrate tetrahydrate
<b>H2</b>	0,2	M	lithium sulfate anhydride	0,1	M	sodium acetate trihydrate	4,5	2,5	M	sodium chloride
<b>H3</b>	0,2	M	sodium chloride	0,1	M	CAPS	11	20	%w/v	polyethylene glycol 8000
<b>H4</b>	0,2	M	zinc acetate dihydrate	0,1	M	imidazole	8	20	%w/v	polyethylene glycol 3000
<b>H5</b>	0,2	M	lithium sulfate anhydride	0,1	M	Tris	7	2	M	ammonium sulfate
<b>H6</b>	0,2	M	sodium chloride	0,1	M	HEPES	7,5	30	%v/v	polyethylene glycol 400
<b>H7</b>	0,2	M	magnesium chloride	0,1	M	Tris	7	10	%w/v	polyethylene glycol 8000
<b>H8</b>	0,2	M	magnesium chloride	0,1	M	cacodylate	6,5	20	%w/v	polyethylene glycol 1000
<b>H9</b>				0,1	M	MES	6	1,26	M	ammonium sulfate
<b>H10</b>	0,2	M	sodium chloride	0,1	M	imidazole	8	1	M	di-ammonium hydrogen phosphate
<b>H11</b>	0,2	M	zinc acetate dihydrate	0,1	M	imidazole	8	2,5	M	sodium chloride
<b>H12</b>				0,1	M	MES	6	1	M	potassium sodium tartrate tetrahydrate

### MembFac

N°	[Salt]	[Salt]unt.	Salt	[Buf.]	[Buf]units	Buffer	pH	[Precipitant]	[Precip.]units	Precipitant
E1	0,1	M	sodium chloride	0,1	M	sodium acetate trihydrate	4,6	12	%v/v	MPD
E2	0,1	M	zinc acetate dihydrate	0,1	M	sodium acetate trihydrate	4,6	12	%w/v	polyethylene glycol 4000
E3	0,2	M	ammonium sulfate	0,1	M	sodium acetate trihydrate	4,6	10	%w/v	polyethylene glycol 4000
E4	0,1	M	sodium chloride	0,1	M	sodium acetate trihydrate	4,6	12	%v/v	iso-propanol
E5				0,1	M	sodium acetate trihydrate	4,6	12	%w/v	polyethylene glycol 4000
E6				0,1	M	sodium acetate trihydrate	4,6	1	M	ammonium sulfate
E7				0,1	M	sodium acetate trihydrate	4,6	1	M	magnesium sulfate heptahydrate
E8	0,1	M	magnesium chloride hexahydrate	0,1	M	sodium acetate trihydrate	4,6	18	%v/v	polyethylene glycol 400
E9	0,1	M	lithium sulfate monohydrate	0,1	M	sodium acetate trihydrate	4,6	1	M	ammonium dihydrogen phosphate
E10	0,1	M	sodium chloride	0,1	M	sodium acetate trihydrate	4,6	12	%w/v	polyethylene glycol 6000
E11	0,1	M	magnesium chloride hexahydrate	0,1	M	sodium acetate trihydrate	4,6	12	%w/v	polyethylene glycol 6000
E12	0,1	M	sodium chloride	0,1	M	tri-sodium citrate dihydrate	5,6	18	%v/v	polyethylene glycol 400
F1	0,1	M	lithium sulfate monohydrate	0,1	M	tri-sodium citrate dihydrate	5,6	12	%w/v	polyethylene glycol 4000
F2	0,1	M	tri-sodium citrate dihydrate	0,1	M	tri-sodium citrate dihydrate	5,6	10	%v/v	iso-propanol
F3	0,1	M	sodium chloride	0,1	M	tri-sodium citrate dihydrate	5,6	12	%v/v	MPD
F4				0,1	M	tri-sodium citrate dihydrate	5,6	1	M	magnesium sulfate heptahydrate
F5	0,1	M	sodium chloride	0,1	M	tri-sodium citrate dihydrate	5,6	12	%w/v	polyethylene glycol 4000
F6	0,1	M	lithium sulfate monohydrate	0,1	M	tri-sodium citrate dihydrate	5,6	12	%w/v	polyethylene glycol 6000
F7	0,1	M	magnesium chloride hexahydrate	0,1	M	tri-sodium citrate dihydrate	5,6	4	%v/v	MPD
F8				0,1	M	tri-sodium citrate dihydrate	5,6	0,1	M	sodium chloride
F9	0,1	M	lithium sulfate monohydrate	0,1	M	tri-sodium citrate dihydrate	5,6	4	%v/v	polyethylene glycol 400
F10				0,1	M	ADA	6,5	1	M	ammonium sulfate
F11	0,1	M	lithium sulfate monohydrate	0,1	M	ADA	6,5	12	%w/v	polyethylene glycol 4000
F12								2	%v/v	iso-propanol
G1	0,1	M	magnesium chloride hexahydrate	0,1	M	ADA	6,5	1	M	di-ammonium hydrogen phosphate
G2				0,1	M	ADA	6,5	12	%w/v	polyethylene glycol 6000
G3	0,1	M	lithium sulfate monohydrate	0,1	M	ADA	6,5	12	%v/v	MPD
				0,1	M	ADA	6,5	1	M	magnesium sulfate hydrate





### Quik phosphate grid screen

Number	[Buffer]	[Buffer] units	Buffer	Ph
E1	0,8	M	Na/K phosphate	5
E2	0,8	M	Na/K phosphate	5,6
E3	0,8	M	Na/K phosphate	6,3
E4	0,8	M	Na/K phosphate	6,9
E5	0,8	M	Na/K phosphate	7,5
E6	0,8	M	Na/K phosphate	8,2
E7	1	M	Na/K phosphate	5
E8	1	M	Na/K phosphate	5,6
E9	1	M	Na/K phosphate	6,3
E10	1	M	Na/K phosphate	6,9
E11	1	M	Na/K phosphate	7,5
E12	1	M	Na/K phosphate	8,2
F1	1,4	M	Na/K phosphate	5
F2	1,4	M	Na/K phosphate	5,6
F3	1,4	M	Na/K phosphate	6,3
F4	1,4	M	Na/K phosphate	6,9
F5	1,4	M	Na/K phosphate	7,5
F6	1,4	M	Na/K phosphate	8,2
F7	1,8	M	Na/K phosphate	5
F8	1,8	M	Na/K phosphate	5,6
F9	1,8	M	Na/K phosphate	6,3
F10	1,8	M	Na/K phosphate	6,9
F11	1,8	M	Na/K phosphate	7,5
F12	1,8	M	Na/K phosphate	8,2

### NaCl grid screen

Number	[Buffer]	[Buffer] units	Buffer	pH	[Precipitant]	[Precipitant] units	Precipitant
G1	0,1	M	Tri-sodium citrate dihydrate	4	1	M	Sodium Chloride
G2	0,1	M	Tri-sodium citrate dihydrate	5	1	M	Sodium Chloride
G3	0,1	M	MES	6	1	M	Sodium Chloride
G4	0,1	M	HEPES	7	1	M	Sodium Chloride
G5	0,1	M	Tris	8	1	M	Sodium Chloride
G6	0,1	M	bicine	9	1	M	Sodium Chloride
G7	0,1	M	Tri-sodium citrate dihydrate	4	2	M	Sodium Chloride
G8	0,1	M	Tri-sodium citrate dihydrate	5	2	M	Sodium Chloride
G9	0,1	M	MES	6	2	M	Sodium Chloride
G10	0,1	M	HEPES	7	2	M	Sodium Chloride
G11	0,1	M	Tris	8	2	M	Sodium Chloride
G12	0,1	M	bicine	9	2	M	Sodium Chloride
H1	0,1	M	Tri-sodium citrate dihydrate	4	3	M	Sodium Chloride
H2	0,1	M	Tri-sodium citrate dihydrate	5	3	M	Sodium Chloride
H3	0,1	M	MES	6	3	M	Sodium Chloride
H4	0,1	M	HEPES	7	3	M	Sodium Chloride
H5	0,1	M	Tris	8	3	M	Sodium Chloride
H6	0,1	M	bicine	9	3	M	Sodium Chloride
H7	0,1	M	Tri-sodium citrate dihydrate	4	4	M	Sodium Chloride
H8	0,1	M	Tri-sodium citrate dihydrate	5	4	M	Sodium Chloride
H9	0,1	M	MES	6	4	M	Sodium Chloride
H10	0,1	M	HEPES	7	4	M	Sodium Chloride
H11	0,1	M	Tris	8	4	M	Sodium Chloride
H12	0,1	M	bicine	9	4	M	Sodium Chloride

## Index

Nº	[Salt]	[S.]units	Salt	[Buffer]	[Buf.]units	Buffer	pH	[Precipitant]	[Precip.]units	Precipitant 1
A1				0,1	M	citric acid	3,5	2	M	ammonium sulfate
A2				0,1	M	sodium acetate trihydrate	4,5	2	M	ammonium sulfate
A3				0,1	M	bis-tris	5,5	2	M	ammonium sulfate
A4				0,1	M	bis-tris	6,5	2	M	ammonium sulfate
A5				0,1	M	HEPES	7,5	2	M	ammonium sulfate
A6				0,1	M	tris	8,5	2	M	ammonium sulfate
A7				0,1	M	citric acid	3,5	3	M	sodium chloride
A8				0,1	M	sodium acetate trihydrate	4,5	3	M	sodium chloride
A9				0,1	M	bis-tris	5,5	3	M	sodium chloride
A10				0,1	M	bis-tris	6,5	3	M	sodium chloride
A11				0,1	M	HEPES	7,5	3	M	sodium chloride
A12				0,1	M	tris	8,5	3	M	sodium chloride
B1				0,1	M	bis-tris	5,5	0,3	M	magnesium formate
B2				0,1	M	bis-tris	6,5	0,5	M	magnesium formate
B3				0,1	M	HEPES	7,5	0,5	M	magnesium formate
B4				0,1	M	tris	8,5	0,3	M	magnesium formate
B5								0,9	M	sodium dihydrogen phosphate
B6								0,1	M	di-potassium hydrogen phosphate
B7								0,35	M	sodium dihydrogen phosphate
B8								0,65	M	di-potassium hydrogen phosphate
B9								0,04	M	sodium dihydrogen phosphate
B10								0,96	M	di-potassium hydrogen phosphate
B11				0,1	M	HEPES	7,5	1,4	M	tri-sodium citrate dihydrate
B12								1,8	M	tri-ammonium citrate pH 7.0
C1								0,8	M	succinic acid pH 7.0
								1,5	M	Malonic Acid pH 7.0
								2,8	M	sodium acetate trihydrate pH 7.0
								3,5	M	sodium formate pH 7.0







### SaltRx

Nº	[Salt]	[Salt] units	Salt	[Buffer]	[Buffer] units	Buffer	pH
A1	0,8	M	Sodium Acetate trihydrate pH 7.0	0,1	M	Bis-Tris Propane	7
A2	2,8	M	Sodium Acetate trihydrate pH 7.0	0,1	M	Bis-Tris Propane	7
A3	0,5	M	Ammonium Chloride	0,1	M	Sodium Acetate trihydrate	4,6
A4	1,5	M	Ammonium Chloride	0,1	M	Bis-Tris Propane	7
A5	1,5	M	Ammonium Chloride	0,1	M	Tris	8,5
A6	3,5	M	Ammonium Chloride	0,1	M	Sodium Acetate trihydrate	4,6
A7	3,5	M	Ammonium Chloride	0,1	M	Bis-Tris Propane	7
A8	3,5	M	Ammonium Chloride	0,1	M	Tris	8,5
A9	2,2	M	Sodium Chloride	0,1	M	Sodium Acetate trihydrate	4,6
A10	2,2	M	Sodium Chloride	0,1	M	Bis-Tris Propane	7
A11	2,2	M	Sodium Chloride	0,1	M	Tris	8,5
A12	3,2	M	Sodium Chloride	0,1	M	Sodium Acetate trihydrate	4,6
B1	3,2	M	Sodium Chloride	0,1	M	Bis-Tris Propane	7
B2	3,2	M	Sodium Chloride	0,1	M	Tris	8,5
B3	1	M	di-Ammonium hydrogen Citrate	0,1	M	Sodium Acetate trihydrate	4,6
B4	1,8	M	di-Ammonium hydrogen Citrate	0,1	M	Sodium Acetate trihydrate	4,6
B5	1	M	tri-Ammonium Citrate pH 7.0	0,1	M	Bis-Tris Propane	7
B6	2	M	tri-Ammonium Citrate pH 7.0	0,1	M	Bis-Tris Propane	7
B7	0,7	M	tri-Sodium Citrate dihydrate	0,1	M	Bis-Tris Propane	7
B8	0,7	M	tri-Sodium Citrate dihydrate	0,1	M	Tris	8,5
B9	1,2	M	tri-Sodium Citrate dihydrate	0,1	M	Bis-Tris Propane	7
B10	1,2	M	tri-Sodium Citrate dihydrate	0,1	M	Tris	8,5
B11	0,4	M	Magnesium Formate	0,1	M	Sodium Acetate trihydrate	4,6
B12	0,4	M	Magnesium Formate	0,1	M	Bis-Tris Propane	7
C1	0,4	M	Magnesium Formate	0,1	M	Tris	8,5
C2	0,7	M	Magnesium Formate	0,1	M	Bis-Tris Propane	7
C3	2	M	Sodium Formate	0,1	M	Sodium Acetate trihydrate	4,6
C4	2	M	Sodium Formate	0,1	M	Bis-Tris Propane	7
C5	2	M	Sodium Formate	0,1	M	Tris	8,5



C6	3,5	M	Sodium Formate		0,1	M	Sodium Acetate trihydrate	4,6
C7	3,5	M	Sodium Formate		0,1	M	Bis-Tris Propane	7
C8	3,5	M	Sodium Formate		0,1	M	Tris	8,5
C9	1,2	M	DL-Malic Acid pH 7.0		0,1	M	Bis-Tris Propane	7
C10	1,2	M	DL-Malic Acid pH 7.0		0,1	M	Bis-Tris Propane	7
C11	1,4	M	Malonic Acid pH 7.0		0,1	M	Bis-Tris Propane	7
C12	2,4	M	Malonic Acid pH 7.0		0,1	M	Bis-Tris Propane	7
D1	2,5	M	Ammonium Nitrate		0,1	M	Sodium Acetate trihydrate	4,6
D2	2,5	M	Ammonium Nitrate		0,1	M	Bis-Tris Propane	7
D3	2,5	M	Ammonium Nitrate		0,1	M	Tris	8,5
D4	6	M	Ammonium Nitrate		0,1	M	Sodium Acetate trihydrate	4,6
D5	6	M	Ammonium Nitrate		0,1	M	Bis-Tris Propane	7
D6	6	M	Ammonium Nitrate		0,1	M	Tris	8,5
D7	1,5	M	Sodium Nitrate		0,1	M	Sodium Acetate trihydrate	4,6
D8	1,5	M	Sodium Nitrate		0,1	M	Bis-Tris Propane	7
D9	1,5	M	Sodium Nitrate		0,1	M	Tris	8,5
D10	4	M	Sodium Nitrate		0,1	M	Sodium Acetate trihydrate	4,6
D11	4	M	Sodium Nitrate		0,1	M	Bis-Tris Propane	7
D12	4	M	Sodium Nitrate		0,1	M	Tris	8,5
E1	1	M	Ammonium dihydrogen phosphate		0,1	M	Sodium Acetate trihydrate	4,6
E2	1,8	M	Ammonium dihydrogen phosphate		0,1	M	Sodium Acetate trihydrate	4,6
E3	1,5	M	di-Ammonium hydrogen phosphate		0,1	M	Tris	8,5
E4	2,4	M	di-Ammonium hydrogen phosphate		0,1	M	Tris	8,5
E5	1	M	Na/K Phosphate pH 5.0					
E6	1	M	Na/K Phosphate pH 6.9					
E7	1	M	Na/K Phosphate pH 8.2					
E8	1,8	M	Na/K Phosphate pH 5.0					
E9	1,8	M	Na/K Phosphate pH 6.9					
E10	1,8	M	Na/K Phosphate pH 8.2					
E11	0,5	M	Succinic acid pH 7.0		0,1	M	Bis-Tris Propane	7
E12	1	M	Succinic acid pH 7.0		0,1	M	Bis-Tris Propane	7
F1	1,5	M	Ammonium Sulfate		0,1	M	Sodium Acetate trihydrate	4,6

F2	1,5	M	Ammonium Sulfate		0,1	M	Bis-Tris Propane	7
F3	1,5	M	Ammonium Sulfate		0,1	M	Tris	8,5
F4	2,5	M	Ammonium Sulfate		0,1	M	Sodium Acetate trihydrate	4,6
F5	2,5	M	Ammonium Sulfate		0,1	M	Bis-Tris Propane	7
F6	2,5	M	Ammonium Sulfate		0,1	M	Tris	8,5
F7	0,8	M	Lithium Sulfate monohydrate		0,1	M	Sodium Acetate trihydrate	4,6
F8	0,8	M	Lithium Sulfate monohydrate		0,1	M	Bis-Tris Propane	7
F9	0,8	M	Lithium Sulfate monohydrate		0,1	M	Tris	8,5
F10	1,5	M	Lithium Sulfate monohydrate		0,1	M	Sodium Acetate trihydrate	4,6
F11	1,5	M	Lithium Sulfate monohydrate		0,1	M	Bis-Tris Propane	7
F12	0,5	M	Lithium Sulfate monohydrate		0,1	M	Tris	8,5
G1	1	M	Magnesium Sulfate monohydrate		0,1	M	Sodium Acetate trihydrate	4,6
G2	1	M	Magnesium Sulfate monohydrate		0,1	M	Bis-Tris Propane	7
G3	1	M	Magnesium Sulfate monohydrate		0,1	M	Tris	8,5
G4	1,8	M	Magnesium Sulfate monohydrate		0,1	M	Sodium Acetate trihydrate	4,6
G5	1,8	M	Magnesium Sulfate monohydrate		0,1	M	Bis-Tris Propane	7
G6	1,8	M	Magnesium Sulfate monohydrate		0,1	M	Tris	8,5
G7	0,7	M	di-Ammonium Tartrate		0,1	M	Sodium Acetate trihydrate	4,6
G8	0,7	M	di-Ammonium Tartrate		0,1	M	Bis-Tris Propane	7
G9	0,7	M	di-Ammonium Tartrate		0,1	M	Tris	8,5
G10	1,2	M	di-Ammonium Tartrate		0,1	M	Sodium Acetate trihydrate	4,6
G11	1,3	M	di-Ammonium Tartrate		0,1	M	Bis-Tris Propane	7
G12	1,4	M	di-Ammonium Tartrate		0,1	M	Tris	8,5
H1	0,6	M	Potassium Sodium Tartrate tetrahydrate		0,1	M	Bis-Tris Propane	7
H2	1,2	M	Potassium Sodium Tartrate tetrahydrate		0,1	M	Bis-Tris Propane	7
H3	0,6	M	Potassium Sodium Tartrate tetrahydrate		0,1	M	Tris	8,5
H4	1,2	M	Potassium Sodium Tartrate tetrahydrate		0,1	M	Tris	8,5
H5	0,5	M	Potassium Thiocyanate		0,1	M	Sodium Acetate trihydrate	4,6
H6	0,5	M	Potassium Thiocyanate		0,1	M	Bis-Tris Propane	7
H7	0,5	M	Potassium Thiocyanate		0,1	M	Tris	8,5
H8	4	M	Ammonium Acetate		0,1	M	Sodium Acetate trihydrate	4,6
H9	4	M	Ammonium Acetate		0,1	M	Bis-Tris Propane	7

<b>H10</b>	4	M	Ammonium Acetate	0,1	M	Tris	8,5
<b>H11</b>	35	%v/v	Tacsimate	0,1	M	Bis-Tris Propane	7
<b>H12</b>	60	%v/v	Tacsimate	0,1	M	Bis-Tris Propane	7



**8.2.** Annex 2: Taula de valors d'intensitat per a cada spot i altres paràmetres estadístics



Aquesta taula inclou els principals resultats de l'anàlisi estadístic realitzat sobre els microarrays hibridats amb les dues sondes. L'experiment s'ha realitzat per triplicat (tres microarrays iguals però independents identificats com a 15, 16 i 20). A continuació es mostra la llegenda per entendre el significat de cada columna:

**Block, Column i Row:** localització de l'*spot* en el microarray., **Name:** nom del clon corresponent a l'*spot*., **ID:** identificador únic per a cada *spot*., **Status:** descripció del bloc on es localitza l'*spot*., **X\_BooK:** l'*spot* supera els filtres de qualitat dels dos canals (1 supera, 0 no supera)., **X\_RoK:** l'*spot* supera els filtres de qualitat del canal vermell (1 supera, 0 no supera)., **X\_GoK:** l'*spot* supera els filtres de qualitat del canal verd (1 supera, 0 no supera)., **X NormRed:** intensitat normalitzada per al canal vermell., **R\_Mean:** mitjana de la intensitat normalitzada per a tots els *spots* en el canal vermell., **R\_SD:** desviació estàndard de la mitjana de la intensitat normalitzada per a tots els *spots* en el canal vermell., **X NormGreen:** intensitat normalitzada per al canal verd., **G\_Mean:** mitjana de la intensitat normalitzada per a tots els *spots* en el canal verd., **G\_SD:** desviació estàndard de la mitjana de la intensitat normalitzada per a tots els *spots* en el canal verd., **log2R/G:**  $\log_2(R\_Mean/G\_Mean)$ ., **sdlog2R/G:** desviació estàndard de  $\log_2(R\_Mean/G\_Mean)$ .

**Taula de valors d'intensitat normalitzats per a cada spot i altres paràmetres estadístics**

Block	Column	Row	Name	ID	Status	15_BooK	16_BooK	20_BooK	15_RoK	16_RoK	20_RoK	15_GoK	16_GoK	20_GoK	15 NormRed	16 NormRed	20 NormRed	R_Mean	R_SD	15 NormGreen	16 NormGreen	20 NormGreen	G_Mean	G_SD	log2R/G	sdlog2R/G
1	1	1	85_A1	1	posctrl	1	1	1	1	1	1	1	1	1	8684,5639	8685,5639	10058,2328	9503,9765	724,2047	8760,5476	9554,1322	10070,6731	9461,7843	659,9267	0,0059	0,0233
1	1	5	85_A1	97	posctrl	1	1	1	1	1	1	1	1	1	7986,5639	7987,5639	10319,2328	9267,9765	1183,2434	7917,8889	9716,7940	10306,5012	9313,7280	1244,2724	-0,0062	0,0237
1	16	8	89_G7	184	block1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	2828,5639	2829,5639	396,2328	1197,3098	1412,7824	21215,0436	1827,4593	1921,3567	8321,2865	11166,4199	-2,5000	0,3529
1	20	7	71_E3	164	block1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	2947,5639	2948,5639	912,2328	1575,3098	1188,6304	10108,8016	1979,1422	2254,7139	4780,8859	4616,1671	-1,4252	0,3107
3	20	4	71_H3	476	block3	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1700,5639	1701,5639	420,2328	891,3098	703,9778	8002,1548	1411,8654	1126,8613	3513,6272	3889,7901	-1,6698	0,4902
3	19	8	71_H1	571	block3	0	0	0	1	0	1	0	1	0	514,5639	515,5639	529,2328	552,9765	54,3264	2575,4329	3492,8385	4009,8919	3359,3878	726,4812	-2,5835	0,3066
3	19	4	71_F5	475	block3	0	0	1	1	0	1	1	0	1	560,5639	561,5639	522,2328	544,3098	19,8179	2567,0063	3210,3206	3090,1665	2955,8312	342,0494	-2,4350	0,2079
3	21	7	71_F5	549	block3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2009,5639	2010,5639	1616,2328	1875,9765	224,9753	3257,9861	2628,1747	2196,4509	2694,2039	533,8391	-0,5107	0,1633
3	21	3	71_F5	453	block3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1960,5639	1961,5639	1637,2328	1852,3098	186,2636	2853,5100	2431,3204	2184,8248	2489,8850	338,1676	-0,4231	0,1151
1	15	5	89_A5	111	block1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	693,5639	694,5639	665,2328	678,6432	14,2258	2027,8155	2628,1747	1989,1555	2215,0486	358,2995	-1,6949	0,2272
1	20	3	71_E3	68	block1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	864,5639	865,5639	843,2328	876,3098	40,2564	1800,9494	2277,3667	1977,7986	2018,7049	240,8285	-1,1982	0,1266





















































