

La ocurrencia y variación de la promiscuidad en rutas del metabolismo especializado son reveladas por herramientas bioinformáticas evolutivas.

Una tesis

presentada a

LANGEBIO-CINVESTAV

Para cumplir con los

requerimientos de la obtención del grado

de Doctor en Ciencias

Nelly Sélem

Enero 2019

Aprobado por el laboratorio
Evolución de la diversidad metabólica

Francisco Barona Gómez

Agradecimientos

Quiero agradecer por todas las enseñanzas a mis compañeros de trabajo César Aguilar, Pablo Cruz, Christian Eduardo, Hilda Ramos, Karina Verdel, Ernesto Verdúzco, Alan, Daniel, Lianet Noda, Adriana Espinosa y Abraham Avelar. A Manu por su interés en emprender proyectos. A Dany mi veranito, a Ernesto de keri, Langebio, Secretaría innovación, CONABIO, BetterLab, Strain y DNAbits. A Abraham Avelar por su impaciencia, sus enseñanzas, revisión, esfuerzo y aportaciones a la vida. A mi familia, papás por el largo camino recorrido juntos.

Prefacio

La promiscuidad ha redefinido cómo entendemos la función enzimática. Se ha transitado de considerar a todas las enzimas como altamente especialistas a entender que muchas de ellas pueden llevar a cabo más de una función metabólica. La promiscuidad parece parte del proceso evolutivo, provee material para que una posterior duplicación conlleve a la formación de nuevas familias enzimáticas. Esta tesis aborda el problema de promiscuidad distinguiendo entre familias de enzimas promiscuas y miembros promiscuos de una familia. A continuación generaliza el concepto de promiscuidad en una enzima a promiscuidad de un cluster biosintético (BGC). Para sugerir promiscuidad se desarrollan una serie de herramientas para estudiar el pangenoma de linajes taxonómicos. La primera herramienta Orthocore busca entender los genes conservados y sin expansiones entre organismos de un linaje. La segunda herramienta se ocupa al contrario de familias que sí tienen copias extra y propone como organizar esta variación en posibles destinos metabólicos. La tercera herramienta sube un nivel en la complejidad organizacional y busca entender la variación de grupos de genes (clusters biosintéticos) señalando una familia que presenta promiscuidad de producto. Finalmente estudiamos diversos aspectos de la familia PriA, una familia promiscua en Actinobacteria que no pasó por un proceso de duplicación reciente en Actinobacteria.

Índice general

Introducción	1
0.0.1. Función biológica de la promiscuidad enzimática	3
0.0.2. PriA como ejemplo de la dinámica evolutiva entre la especialización y la promiscuidad de una familia de enzimas.	3
0.0.3. Relacion del pangenoma con la promiscuidad enzimatica	6
0.0.4. Modelos bioinformaticos de promiscuidad	6
0.0.5. Promiscuidad in vitro y promiscuidad in vivo	7
0.0.6. El papel de la dinámica molecular en la promiscuidad	8
0.0.7. Modelo biológico: la diversidad de Actinobacteria	8
0.0.8. Modelo metabolico biosintesis de aminoacidos.	9
0.1. Modelos computacionales	10
Antecedentes	11
0.2. La promiscuidad puede abordarse a distintos niveles incluyendo enzima, familia y ruta de metabólica.	12
0.3. Antecedentes conceptuales	12
0.4. El establecimiento de un marco de conservación permite distinguir cambios	14
0.5. La genómica comparativa como herramienta en la distinción de familias y enzimas promiscuas que participan en el metabolismo especializado.	15
0.6. La genómica comparativa como herramienta en la priorización de clusters promiscuos	18
0.6.1. Expansión y contextos genómicos como herramienta de anotación funcional	18
0.6.2. Contexto y vecindades genomicas	19
0.7. Estudio de una familia PriA	20
0.7.1. Caracterizacion in vivo	20
0.7.2. Caracterizacion bioquimica in vitro.	20
0.7.3. Modelado de dinamica molecular	20
Objetivos	23
0.8. Objetivo General	23
0.9. Objetivos particulares	23
Estrategias	25

Obtener informacion genomica de diversos linajes genómicos.	25
0.9.1. Anotar consistentemente las secuencias codificantes de estos genomas.	25
Establecer las relaciones filogenéticas de los genomas colectados.	25
0.9.2. La promiscuidad en familias enzimaticas.	25
Promiscuidad in vitro dentro de miembros de una familia pro- miscua de enzimas.	26
Sistematizar Evomining para convertirla una plataforma descar- gable y utilizable en cualquier set de datos bacterianos relacionados taxonomicamente proporcionados por el usuario.	26
Seleccionar miembros homologos de la familia de enzimas para modelado molecular.	26
Medir cinéticas enzimaticas, contexto genómico y vecindad ge- nómica	26
Metodología	27
0.9.3. La promiscuidad en familias enzimaticas.	27
Actinobacteria genomica	27
Annotación	27
Filogenia de la base de datos genómica	27
Organización y presentación de familias extendidas mediante el desarrollo una plataforma bioinformática.	28
Algoritmo de reconstrucción filogenética y visualización	28
Algoritmo de visualización	28
0.9.4. Identificar cambios en la vecindad genomica en familias selectas de enzimas de metabolismo central.	29
Dinamica molecular	29
0.9.5. Consideraciones	29
Capítulo 1: Orthocore: una herramienta computacional para entender el pangenoma de un linaje genómico.	31
1.1. La distribución de la función metabólica de las familias del pangenoma depende de la variabilidad del linaje seleccionado.	32
1.2. El core conservado permite la reconstrucción de filogenias complicadas	36
1.3. El algoritmo de Orthocore	36
1.3.1. Los mejores hits multidireccionales definen los genes del <i>core</i> conservado	37
1.3.2. Ejecución de Orthocore	37
1.4. Aplicaciones de Orthocore, identificación del core conservado y de familias de genes marcadores.	39
1.4.1. Orthocore de <i>Actinomycetales</i> para mejorar el árbol de especies	39
1.4.2. Uso de Orthocore para entender la evolución de la patogénesis de <i>Salmonella</i> en México.	40

1.4.3. Las <i>Nostoc</i> provenientes del metagenoma de cíadas están en el mismo grupo filogenético	40
1.4.4. Identificación de genes marcadores de la bacteria del ‘cáncer del tomate’ <i>Clavibacter michiganensis</i>	42
Clavisual: Identificación de genes marcadores a un cierto porcentaje de grupos seleccionados	45
El pangenoma de <i>Clavibacter Michiganensis</i> es abierto	45
1.5. Relación entre genes marcadores, Orthocore y la promiscuidad enzimática.	46
Capítulo 2: EvoMining como herramienta para identificar el origen y el destino metabólico de familias enzimáticas	49
2.1. Introducción	49
2.1.1. Las copias extra de familias enzimáticas que son reclutadas para una nueva función están relacionadas con la promiscuidad.	49
2.1.2. EvoMining es un paradigma que permite ubicar copias extra de familias enzimáticas y organizarlas visualmente acorde a eventos evolutivos para encontrar BGC no tradicionales	50
2.2. Algoritmos y bases de datos de EvoMining 2.0	52
2.2.1. Algoritmo de expansión y clasificación de grupos de homólogos.	52
2.2.2. Algoritmo de reconstrucción filogenética y visualización	55
2.2.3. Actualizaciones de las bases de datos de EvoMining	57
2.3. EvoMining detecta distintas dinámicas evolutivas de las enzimas metabólicas que dependen de la familia enzimática y del linaje taxonómico.	58
2.3.1. Los perfiles de expansión de las proteínas dependen del linaje.	58
2.3.2. El shell genome posee expansiones en sus familias enzimáticas	60
2.3.3. GDH y ALS en el cluster escitonemina ejemplifican como familias pertenecientes a un mismo BGC pueden tener distintos patrones de expansión.	68
2.3.4. El cluster de escitonemina es una familia de clusters cuyas variantes en los genes accesorios muestran promiscuidad de producto.	71
2.4. EvoMining aplicado a TauD, enzima común de los BGC Rimosamide y Detoxin sugieren otra clase de clusters con promiscuidad de producto.	75
2.5. Consideraciones finales sobre el uso de EvoMining	76
Capítulo 3: Desarrollo de CORASON como herramienta para organizar clusters biosintéticos y otras vecindades genómicas conservadas.	79
3.1. Algoritmo y características de CORASON	79
3.2. Las familias de BGC son variantes del BGC de referencia.	81
3.3. Aplicaciones de CORASON en Actinobacteria y Pseudomonas	82
3.4. Detectamos variantes de sideróforos en Actinobacterias de vida libre .	83
3.5. Un BGC de metabolismo de arsénico tiene variantes que conforman una familia de BGCs	84

3.6. Combinamos CORASON y BiG-SCAPE para mejorar la clasificación de BGC y logramos predecir dos nuevos compuestos de la familia rimosamide-detoxin que fueron caracterizados experimentalmente	86
3.6.1. Identificamos nuevos productos variantes de la familia de BGCs Rimosamide - Detoxin en Actinobacteria integrando BiG SCAPE y CORASON	86
3.6.2. CORASON sugiere que las familias detoxin y rimosamide pertenecen a un amplio grupo de familias dedicadas a la síntesis de péptidos.	88
3.6.3. Algunos clados selectos del árbol de CORASON que contiene a las familias rimosamide/detoxin contienen diversidad génica que correlaciona con novedad química.	90
El clado P450/enoyl agrega una heptanamida al core molecular detoxin/rimosamide	90
El superclado spectinomycin/ detoxin-rimosamide produce cinco variantes de detoxin.	90
El clado <i>Amycolatopsis P450</i> produce cinco variantes de detoxin.	91
3.7. CORASON permitió explorar la promiscuidad de familias de BGCs de enzimas divergentes de metabolismo central.	91
Capítulo 4: La familia PriA/HisA	93
4.1. La familia PriA cambió su función y sus patrones de promiscuidad en los cuatro linajes analizados	94
4.1.1. Las expansiones no son condición necesaria para la promiscuidad	94
4.1.2. Las expansiones condujeron a la creación de la subfamilia HisF	95
4.1.3. Cada linaje tiene distintos destinos metabólicos de PriA	97
Homólogos de PriA han sido reclutados a clusters de metabolismo especializado	99
4.2. Análisis de contextos genómicos de PriA/HisA en distintos linajes utilizando CORASON como herramienta de visualización.	101
4.2.1. Contextos genómicos de HisA en Actinobacteria	101
4.2.2. Contextos genómicos de HisA en Archaea	102
4.2.3. Contextos genómicos de HisA en saxitoxin	103
4.3. Evolución molecular y estructural de PriA	104
4.3.1. Al transformar una subHisA en una PriA mediante mutaciones no se observó ninguna trayectoria creciente para ambos sustratos	104
4.3.2. Los residuos que covarián en el registro evolutivo de PriA permiten una reconstrucción aproximada de su estructura tridimensional	108
4.4. Afinidad de enzimas selectas por sustratos químicamente parecidos a PRA y PROFAR	114
4.4.1. Selección de secuencias de PriA o familias relacionadas para docking con sustratos similares a lo nativos	119
4.4.2. El análisis de PriA a nivel estructural sugiere que GTP es el sustrato más afín	121
4.5. PriA en cinéticas enzimáticas no tradicionales.	124

4.5.1. PriA puede metabolizar GTP	125
4.5.2. Cinéticas simultáneas para PRA y ProFAR	128
Perspectivas	131
Capítulo 5: Protocolos	135
5.1. Protocolos para usar Orthocore, myRAST, fastOrtho, Clavigenomics, y BPGA	135
5.2. Orthocore	136
Apéndice A: Figuras suplementarias de EvoMining	137
A.1. Figuras suplementarias de CORASON	137
A.1.1. El contexto de una rama divergente de <i>tauD</i> está conservado en Pseudomonas	137
Apéndice B: El tercer apéndice, comandos de Docker y Git y R . . .	143
B.1. Docker	143
B.2. Git	144
B.3. Connect GitHub and DockerHub	144
Apéndice C: Apéndice 3 Dinámica molecular vs datos experimentales	145
Apéndice D: El cuarto Apéndice, Protocolos experimentales utilizados en el estudio de PriA	149
D.1. Materiales	149
D.2. Purificación de proteínas utilizadas en los ensayos enzimáticos	149
D.2.1. Centrifugación	149
D.2.2. Sonicación.	150
D.3. Protein Quantification	152
D.3.1. Bradford calibration curve	152
D.3.2. Enzyme quantification	154
D.4. Concentration on microMolar	155
References	157

Índice de cuadros

2.1. Links de Microreact de árboles relacionados a escitonemina	74
2.2. Homólogos de <i>tauD</i> en BGC reportados en MIBiG.	75
4.1. Árboles EvoMining de PriA/HisA en MicroReact	99
4.2. Árboles EvoMining de PriA en MicroReact	111
4.3. Secuencias selectas de PriA y familias relacionadas para el análisis de docking	120
4.4. Estructuras cristalográficas disponibles de PriA y familias relacionadas	121
5.1. Formatos de descarga disponibles en myRAST	136
C.1. Enzymes docking	147

Índice de figuras

1.	PriA isomeriza los sustratos PRA y ProFAR	4
2.	La promiscuidad puede entenderse a distintos niveles metabólicos: enzima, familia enzimática y ruta biosintética	11
3.	Antecedentes conceptuales de promiscuidad metabólica	13
4.	El paradigma de EvoMining permitió localizar familias de enzimas de metabolismo central con copias extra que habían sido reclutadas para una nueva función en metabolismo especializado. Un ejemplo de ello es AroA, que cataliza una reacción similar pero sobre un sustrato diferente. La copia primaria cataliza una reacción sobre un metabolito con azufre y la secundaria sobre un metabolito con arsénico	16
1.1.	Orthocore calcula el <i>core genome</i> de un linaje y construye con él una filogenia	32
1.2.	El metabolismo en el Pangenoma	33
1.3.	Core y genes Marcadores	35
1.4.	Los mejores hits n-direccionales generalizan a los <i>Bidirectional Best Hits</i>	38
1.5.	Arbol filogenético de <i>Nostoc</i> construido utilizando la selección de genes del <i>core conservado</i>	41
1.6.	Los genes del cluster biosintético clv son marcadores de <i>Clavibacter</i> .	42
1.7.	El Cluster <i>clv</i> es un marcador de la especie <i>Clavibacter michiganensis</i> en el orden <i>Micrococcales</i>	43
1.8.	El <i>core genome</i> de <i>Micrococcales</i> ayuda a identificar genes marcadores	44
1.9.	Clavisual organiza cepas de <i>Clavibacter</i> con sus metadatos.	46
1.10.	El pangenoma de <i>Clavibacter</i> es abierto según el análisis de BPGA. .	47
1.11.	Diagrama de Venn del pangenoma de genomas selectos del género <i>Clavibacter</i>	48
2.1.	Existen cluster biosintéticos no clasificados (other) entre los reportados en MIBiG	51
2.2.	EvoMining Algorithm	53
2.3.	Construcción de la base de datos Enzyme DB de enzimas semilla. . . .	60
2.4.	Tamaño de genoma en órdenes de Actinobacteria y Cianobacteria y en clases De Archaea.	61
2.5.	Expansiones de las 42 enzimas comunes en Actinobacteria, Cyanobacteria, <i>Pseudomonas</i> y Archaea	63

2.6. Patrones de expansión de familias que participan en la síntesis de escitonemina	64
2.7. Árboles de EvoMining de glutamato deshidrogenasa en cuatro linajes genómicos	66
2.8. Escitonemina es un reclutamiento en las ramas divergentes de las familias GDH y ALS	67
2.9. Origen metabólico y destino de GDH / ScyA y ALS / ScyB en la biosíntesis de escitonemina	70
2.10. El cluster de scytonemina produce distintos metabolitos	72
2.11. AroB en Cianobacteria	73
2.12. Árbol de EvoMining de TauD en Actinobacteria muestra que esta enzima fue reclutada por una familia de BGCs	77
 3.1. La herramienta corason localiza familias de clusters biosintéticos en un linaje genómico partiendo de un cluster y un gen de referencia.	80
3.2. EvoMining Algorithm	83
3.3. EvoMining Algorithm	85
3.4. Algoritmo de CORASON Algorithm	87
3.5. Rimosamide	89
 4.1. La reacción que cataliza PriA es una isomerización donde abre un anillo de cinco carbonos.	93
4.2. Expansiones de PriA en Actinobacteria, Cyanobacteria, Pseudomonas y Archaea	95
4.3. Copias extras de PriA en Actinobacteria, Cyanobacteria, Pseudomonas y Archaea	96
4.4. Árboles de destino metabólico de PriA en Actinobacteria, Cyanobacteria, Pseudomonas y Archaea según EvoMining	98
4.5. PriA participa en la síntesis del antibiótico ada en Actinomadura . .	100
4.6. Contextos de PriA en Actinobacteria	101
4.7. Contextos de PriA en Archaea	103
4.8. HisA en saxitoxin, un cluster de Cyanobacteria	104
4.9. Rutas desde una subHisA hasta una variante con 9 mutaciones	105
4.10. Positive increments on PRA	107
4.11. Superposición de estructura de PriA generado por Folding con la estructura cristalográfica	110
4.12. Visualización de los acoplamientos en la familia PriA	112
4.13. Miembros de PriA que poseen variantes los residuos catalíticos D11, D130I13	
4.14. Substatos químicamente similares a los sustratos de PriA (parte 1) . .	115
4.15. Substatos químicamente similares a los sustratos de PriA (parte 2) . .	116
4.16. Substatos químicamente similares a los sustratos de PriA (parte 3) . .	117
4.17. Substatos químicamente similares a los sustratos de PriA (parte 4) . .	118
4.18. Heatplot del docking de enzimas relacionadas a PriA vs posibles substatos	123
4.19. gel	124
4.20. PriA de <i>S.coelicolor</i> y su mutante no funcional sobre dGTP	125

4.21. Homólogos de PriA y familias relacionadas no muestran actividad clara sobre dGTP	126
4.22. PriA no mostró actividad sobre GTP a diversas concentraciones	127
4.23. Se pueden medir las dos actividades de PriA simultáneamente.	129
A.1. Expansiones de las 42 enzimas en los cuatro linajes genómicos	138
A.2. HeatMap de EvoMining de enzimas relacionadas a escytonemina en el linaje Cyanobacteria	139
A.3. Árbol de GDH en Actinobacteria, Cyanobacteria, <i>Pseudomonas</i> y Archaea donde se muestra la transferencia horizontal ocurrida en esta familia.	140
A.4. Árbol de GDH en los cuatro linajes donde se muestra la alternancia en el uso de cofactores.	141
A.5. EvoMining Algorithm	142

Abstract

The preface pretty much says it all.

Second paragraph of abstract starts here.

Dedicatoria

A mis seres queridos.

Introducción

Las enzimas catalizan reacciones químicas transformando sustratos en productos. Durante el siglo XX, las enzimas fueron percibidas como catalizadores altamente específicos, sin embargo, esta percepción cambió con el descubrimiento de que pueden participar en varias reacciones [1]. Esta capacidad de catalizar varias funciones químicas se conoce como promiscuidad enzimática. Por ejemplo se ha calculado que *Escherichia coli* contiene al menos 404 enzimas promiscuas [2]. Otro estudio a mostrado que en mutantes sencillas de 104 genes esenciales de *E. coli* en el 20 % de la auxotrofía puede ser rescatada debido a la actividad promiscua de otra enzima[3]. La relevancia de la promiscuidad radica tanto en su papel como mecanismo de evolución de la función enzimática [1], así como en la necesidad de su detección para la corrección de modelos de flujo metabólico y la determinación de efectos secundarios en drogas farmacológicas. A pesar de su frecuencia e importancia aún se está en el proceso de entender las causas y las características observables de la promiscuidad enzimática.

Para estudiar la promiscuidad es necesario contar con una definición, algunos autores emplean el término promiscuidad para describir actividades enzimáticas distintas a la función principal conocida [5]. Otros lo ven como una actividad secundaria fortuita [6] que pudo aparecer de forma accidental o inducida artificialmente [7]. Otros más, cuando una enzima puede operar sobre un amplio rango de sustratos, prefieren llamarla multiespecífica [5]. A la acción de realizar distintas funciones catalíticas, ya sea al catalizar varias reacciones químicas o bien una misma reacción en sustratos diferentes se le conoce como promiscuidad enzimática [8]. Existen varios tipos de promiscuidad enzimática.

-Por sustrato cuando la reacción es la misma pero se lleva a cabo en distintos sustratos. Como ejemplo tenemos a la familia PriA, una isomerasa de Actinobacteria que actúa abriendo anillos de 5 carbonos en dos sustratos ProFAR y PRA [9]. Otro ejemplo es la familia de las betalactamasas [10].

-Catalítica cuando la enzima utiliza diferentes mecanismos de reacción y/o residuos catalíticos, e.g. la quimotripsina puede catalizar reacciones de amidasa y fosfotriesterasa en un mismo sitio activo. [8]

-Por condiciones del entorno, cuando la enzima cambia su conformación dependiendo de las condiciones químicas y físicas presentes como pH, temperatura, solventes orgánicos y salinidad e.g. algunas lipasas pueden actuar como sintetizadoras de esteres en lugar

de hidrolasas en presencia de solventes orgánicos [7].

La promiscuidad por sustrato es importante en términos evolutivos, por ejemplo la *enzyme commission number* (EC) separa las enzimas en clases, donde a cada enzima se asignan 4 dígitos, los tres primeros corresponden a la reacción y el último al sustrato; el mayor numero de sustratos (4306 clases) que de reacciones químicas (234 en el tercer nivel) sugiere que la mayor variación evolutiva se da a nivel de sustrato y no de reacción [12]. Otra evidencia de la importancia de la multiespecificidad por sustrato está en el descubrimiento de las superfamilias, enzimas mecanística y estructuralmente relacionadas que divergen en su afinidad por sustrato [13]

Si bien existen familias de enzimas con alta especificidad por sustrato, otras familias como el citocromo P450 [15] y las beta lactamasas [17] son promiscuas. Es posible que la visión previa de alta especificidad se deba a que las primeras rutas metabólicas estudiadas pertenecen al metabolismo central, donde la especificidad puede haber sido favorecida por presiones de selección [18]. En contraste en el metabolismo especializado o secundario, es decir aquel que no es esencial para la gran mayoría de procariontes, sino que funciona para producir metabolitos especializados que facilitan la adaptación del organismo a ciertos ambientes parece que la promiscuidad está presente [19]. Se favorece especialmente la capacidad de producir varios metabolitos, es decir la promiscuidad de producto, ya sea debida a la promiscuidad de sustrato de una enzima o bien a las diferencias en el contenido génico del cluster de genes al que pertenece dicha enzima de metabolismo especializado. Al ampliar las enzimas estudiadas, esta visión previa de alta especificidad ha cambiado dando paso al conocimiento de más enzimas con funcionalidad [20], sin que por ello se afecte la eficiencia catalítica por la función primaria [21]. En 1976 el interés por la promiscuidad comenzó por su influencia en la evolución de la función enzimática[1], las aproximaciones variaron desde la aparición de la síntesis funcional [22], cuando la disponibilidad de genomas permitió la combinación de análisis filogenéticos con técnicas de biología molecular, bioquímica y biofísica. En 2003 la biofísica de las proteínas entra en escena al postularse que la diversidad conformacional durante la dinámica molecular debe incidir en la aceptación de distintos sustratos. Recientemente se ha investigado su papel en efectos secundarios en drogas farmacológicas [23]. Entre 2005 y 2010 se avanza del estudio de una sola familia enzimática hacia el interés por propiedades globales, por ejemplo dado un genoma se investiga la distribución de familias promiscuas en subsistemas metabólicos[2]. En estos años, surge el desarrollo de índices que reflejan las características bioquímicas de enzimas promiscuas [25]. En 2010, comienzan los intentos por desarrollar un método computacional de predicción de promiscuidad [28]. Desde 2012 a la fecha, a la par que las aproximaciones bioinformáticas se multiplican[29], se desarrollan investigaciones de aspectos biofísicos[31], bioquímicos[32] y evolutivos[34] de enzimas promiscuas reafirmando que todos estos aspectos están relacionados al fenómeno. En las siguientes secciones se describirán trabajos importantes sobre la relación que guarda la promiscuidad con expansiones genómicas y flexibilidad molecular. Además se hablará sobre análisis bioquímicos y metabólicos para la descripción del fenómeno.

0.0.1. Función biológica de la promiscuidad enzimática

¿Por qué existe la promiscuidad enzimática? Se tiene evidencia de dos papeles biológicos: el primero proporcionar robustez a la red metabólica de un organismo mediante redundancia de reacciones de otras enzimas[3]; el segundo permitir plasticidad evolutiva, es decir materia prima para la adaptación a variaciones ambientales [21] mediante la adquisición de nuevas funciones químicas. Respecto a la robustez, se probó que sobre expresar enzimas promiscuas puede rescatar pérdidas génicas [3]. De 104 knockout sencillos de genes esenciales para *E.coli* K-12, 20 % de las auxotrofias pudieron ser suprimidas por la sobre expresión de plásmidos que contenían enzimas promiscuas. Otro ejemplo que aporta a la robustez es PriA, Figure 1 enzima de la ruta de histidina que realiza en la ruta del triptofano la reacción E.C. 5.3.1.24 [9]. En cuanto a la plasticidad se propone que para que la promiscuidad pueda dar origen a la aparición de nuevas funciones la actividad promiscua debe proveer una ventaja fisiológica inmediata para poder ser seleccionada positivamente, además una vez que una función promiscua se vuelva relevante se debe poder mejorar mediante pocas mutaciones derivando en el intercambio entre la actividad promiscua y la principal[5].

Aun cuando el producto de la promiscuidad genera metabolitos que no se integran al metabolismo central de la célula, su efecto es positivo ya que estos metabolitos podrían colaborar a la adaptación al entorno participando por ejemplo en una relación de simbiosis o de competencia con otros organismos. Este tipo de metabolitos, por lo general, no son dañinos [38] y pueden servir como bloques de construcción para vías metabólicas nuevas [41]. La respuesta inmediata de adaptación de un organismo podría ser una consecuencia de su grado de promiscuidad.

0.0.2. PriA como ejemplo de la dinámica evolutiva entre la especialización y la promiscuidad de una familia de enzimas.

Los operones *his* y *trp* de histidina [44] y triptofano [45] respectivamente, participantes del metabolismo de amino ácidos, están ampliamente distribuidos en los organismos bacterianos. En Actinobacteria la familia promiscua PriA participa simultáneamente en ambas rutas biosintéticas Figure 1 desarrollando el equivalente a la función TrpF en la ruta de histidina y a la función TrpF en la ruta de triptofano. Como HisA isomeriza el sustrato ProFAR y como PRA isomeriza el sustrato PRA. Para su estudio se han generado datos bioquímicos Figure 0.0.2, genómicos y estructurales. En bacterias gram negativas están presentes los operones *his* y *trp* y en lugar de PriA existen dos familias HisA y TrpF. PriA es homóloga de HisA y adquirió la función de TrpF en Actinobacteria coincidentemente con que en este phylum *trpF* está ausente de la mayoría de sus miembros. PriA se ha diversificado un conjunto de subfamilias en Actinobacteria, por ejemplo en *Streptomyces*, existe la subfamilia PriB disminuye su actividad de TrpF debido a la presencia de una copia de *trpF* en alguna parte del genoma [46]. En otras Actinobacterias *trpF* se pierde totalmente por ello PriA la

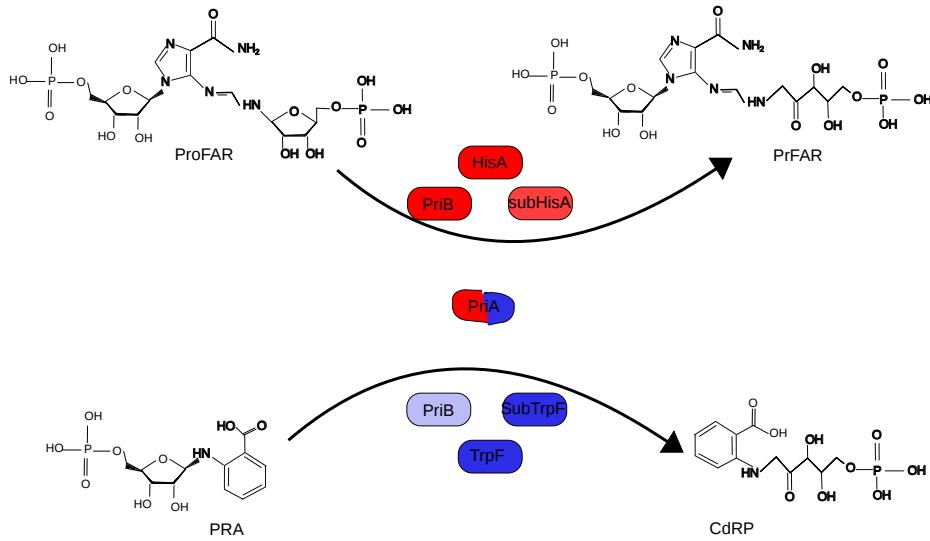


Figura 1: PriA cataliza la isomerización de los sustratos nativos ProFAR y PRA. Convertir ProFAR es un paso de la síntesis de histidina catalizado por hisA en otros linajes bacterianos. Analogamente la isomerización de PRA es catalizada por trpF en otros linajes. En Actinobacteria PriA se ha subdividido en subfamilias. Entre ellas subHisA, que se ha subfuncionalizado a la función HisA, subTrpF que se ha subfuncionalizado a la función TrpF y finalmente PriB, que aún retiene la función TrpF pero con baja actividad catalítica.

familia homóloga de HisA, se vuelve promiscua [9] realizando tanto la función química correspondiente a HisA como la de TrpF. Finalmente en la familia subHisA se pierde la función TrpF debido posiblemente a la ganancia del operón *trp* completo [31] y en la familia subtrpF se conserva solo a la función TrpF debido a la pérdida del operón *his* [47]. Existen al menos 43 familias de Actinobacteria sin explorar respecto a la funcionalidad de PriA. En la Figure 0.0.2 se muestran las constantes catalíticas de PriA estimadas en diferentes organismos para estos dos sustratos.

Table: Capacidad catalítica respecto a PRA y ProfAR de miembros de la familia PriA

Fuente	Familia	HisA	HisA <i>in vivo</i>	TpF <i>in vivo</i>	$K_{cat}^{ProfAR}[M^{-1}s^{-1}]$	$K_m^{ProfAR}[\mu M]$	$K_{cat}^{PRA}[M^{-1}s^{-1}]$	$K_m^{PRA}[\mu M]$	K_{cat}^{PRA}/K_m^{PRA}	Referencia
<i>Escherichia coli</i>			-	-	1.6	4.9	3.1	-	-	Henn-Sax 2002
<i>Escherichia coli</i>	TpF	-	-	-	-	0	12.2	34.5	2.82	Stern et al. 1996
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	PriA	-	-	19	0.23	12	21	3.6	0.17	Due 2011
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	PriA	*	*	2.6 ± 0.5	0.85 ± 0.04	0.33	7.9 ± 2.4	3.1 ± 0.43	0.39	Verduzco-Castro 2016
<i>Streptomyces globisporus</i>	PriA	*	*	4.2 ± 0.8	0.74 ± 0.03	0.18	11 ± 1.0	3.8 ± 0.2	0.34	Verduzco-Castro 2016
<i>Streptomyces coelicolor</i>	PriA	-	-	3.6 ± 0.7	1.3 ± 0.2	0.4	5.0 ± 0.08	3.4 ± 0.09	0.7	Noda-Garcia 2010
<i>Streptomyces ipomoeae</i>	PriB	*	*	3.8 ± 0.2	0.82 ± 0.02	0.21	60.8 ± 1.1	8.25 ± 0.4	0.14	Verduzco-Castro 2016
<i>Streptomyces</i> sp. Mg1	PriB	*	*	13.2 ± 3.4	0.92 ± 0.19	69	129.6 ± 34	0.29 ± 0.04	0.0022	Verduzco-Castro 2016
<i>Streptomyces</i> sp. C	PriB	*	*	11.4 ± 3.4	2.53 ± 0.74	0.22	149. 9 ± 29	1.4 ± 0.12	9	Verduzco-Castro 2016
<i>Streptomyces sphaeus</i>	PriB	*	*	3.9 ± 0.89	0.69 ± 0.04	0.18	24.5 ± 4.0	1.6 ± 0.29	67	Verduzco-Castro 2016
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	subHisA	-	-	4.4 ± 0.5	2.6 ± 0.3	0.59	-	-	0	Noda-Garcia 2013
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	PriA	-	-	2.3 ± 0.2	0.9 ± 0.08	0.39	5.1 ± 1.0	1.6 ± 0.16	0.31	Noda-Garcia 2013
<i>Corynebacterium striatum</i>	subHisA	-	-	6.9 ± 0.7	2.1 ± 0.5	0.3	-	-	0	Noda-Garcia 2013
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> La18-LT50-L-T80S	subHisA	*	*	4.5 ± 1.5	0.6 ± 0.08	0.13	133 ± 10	0.05 ± 0.01	0.0004	NNoda-Garcia 2013
<i>Actinomyces wogenstalii</i> DSM 15434	PriB	*	*	2.1 ± 0.5	1.8 ± 0.2	0.9	26.3 ± 6.3	0.37 ± 0.09	14	Verduzco-Castro 2016
<i>Actinomyces odontolyticus</i> ATCC 17982	subTpF	*	*	-	-	0	-	-	0.02	Juarez-Vazquez 2017
<i>Actinomyces oris</i> K20 BABY01	PriA					0.02			0.01	Juarez-Vazquez 2017
<i>Actinomyces</i> sp. oral taxon 171 str. F0337	PriA	*	*	-	-	0.01			4	Juarez-Vazquez 2017
<i>Actinomyces</i> sp. oral taxon 848 str. F0332	subTpF	*	*	-	-	0			0.0001	Juarez-Vazquez 2017
<i>Actinomyces wogenstalii</i> DSM 15434	PriA	*	*	-	-	0.01			0.02	Juarez-Vazquez 2017
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> L2-32	PriA	*	*	-	-	0.2			0.1	Juarez-Vazquez 2017
<i>Bifidobacterium gallicum</i> DSM 20093	PriA	*	*	-	-	0.1			0.04	Juarez-Vazquez 2017
<i>Bifidobacterium longum</i> ATCC 15697	PriA	*	*	1.7 ± 0.1	0.3 ± 0.03	0.2	40 ± 7	3.5 ± 0.04	0.3	Juarez-Vazquez 2017
Camera CAM1	Metagenoma			1.7 ± 0.2	0.1 ± 0.01	0.06	32.2 ± 1.7	1.9 ± 0.1	0.06	Noda-Garcia 2015
CAM1 AS1G	Metagenoma			4.0 ± 0.9	0.2 ± 0.03	0.04	23.5 ± 6.5	0.5 ± 0.1	0.02	Noda-Garcia 2015
CAM2	Metagenoma			n.d.	0	n.d.	-	-	0	Noda-Garcia 2015
PriA Ancestral	Ancestral			9.4±1.6	0.3±0.009	0.03	4.3±0.4	0.6±0.02	0.13	Verduzco, Noda, sin publicar
PriA SubHisA	Ancestral			3.7±1.01	0.5±0.03	0.1	-	-	0	Verduzco, Noda, sin publicar
SubHisA Ancestral	Ancestral			6.3±0.7	0.15±0.03	0.02	-	-	0	Verduzco, Noda, sin publicar
SubHisA PriA	Ancestral			27.7±3.4	0.05±0.005	2	167.82	0.03±0.002	0.0001	Verduzco*
<i>Streptomyces acidiscabies</i>				163.6	0.1					Juarez*
<i>A. visco</i>				46	1.37	36	3.4			

0.0.3. Relacion del pangenoma con la promiscuidad enzimática

El pangenoma es el contenido génico total de un linaje taxonómico. Las familias génicas de un pangenoma pueden clasificarse según su frecuencia de presencia/ausencia en cada genoma del linaje. De acuerdo a esta clasificación los principales grupos de familias génicas en un pangenoma son el *core*, el *shell* y el *cloud* también conocido como *dispensable* o *accessory genome*. El *core genome* es el conjunto de familias con presencia en todos los genomas del linaje. Por ejemplo, tanto la secuencia de la subunidad 16s de rRNA así como los diversos genes ribosomales suelen estar en el *core* de la gran mayoría de linajes bacterianos. El *shell genome* es el grupo de familias presentes en la mayoría de los genomas pero no en todos. En el *shell* se ubican por ejemplo familias que estaban en el *core genome* pero que algunas bacterias del linaje sufrieron una dinámica de pérdida génica. Mientras que el *cloud genome* o *dispensable genome* es aquel grupo de familias que sólo ocurre en unos cuantos genomas del linaje.

En el Dominio Bacteria se estima que alrededor de 200 familias de secuencias están altamente conservadas. Si bien no están en el *core*, estas secuencias están compartidas por 90 % de los genomas [48]. El *core* depende de los genomas seleccionados, entre menos amplio sea el rango filogenético elegido mayor será el tamaño del *core*. Dada su conservación el *core genome* puede utilizarse para trazar mejores relaciones filogenéticas que las obtenidas con el uso exclusivo de marcadores como la subunidad 16s del RNA ribosomal o la proteína RpoB. El *dispensable* y el *shell genome* son juntos el conjunto complemento del *core genome*, es decir todas aquellas secuencias que están ausentes de uno o más organismos del grupo y por lo tanto no son necesarias para todos, sino sólo posiblemente para el organismo que las posee. Como en estos grupos la presión de selección está relajada respecto al *core-genome* [18] es el conjunto ideal donde la plasticidad genómica tiene facilidades para desarrollarse.

Esta idea puede restringirse a subsistemas metabólicos para identificar genes cuyas enzimas están en proceso de cambio de función química, por ejemplo, en este trabajo se encontró que el gen *trpF* está presente en solo 49 de 290 genomas analizados del género *Streptomyces*. Por lo que *trpF* se encuentra en el *dispensable genome* de este género taxonómico, posiblemente adquiriendo una nueva función [41]. Para evitar problemas técnicos del cálculo del pangenoma existen modelos de medición de variabilidad del genómica entre especies bacterianas [49].

0.0.4. Modelos bioinformaticos de promiscuidad

Con el fin de reducir la inversión en el proceso de experimentación, se han implementado algoritmos computacionales para predecir promiscuidad enzimática [28]. Estos procedimientos cuentan con un conjunto de aprendizaje, unos descriptores del conjunto, una fase de ajuste de parámetros y finalmente una predicción. En 2010, Carbonell propone un algoritmo de soporte vectorial basado en subsecuencias de distinto tamaño que

llama huellas moleculares. En este trabajo aplicado sobre 500,000 proteínas reportadas en la enciclopedia de Kyoto de genes y genomas (KEGG) se reporta 85 % de éxito en detección de enzimas promiscuas anotadas en KEGG. En 2012, Cheng compara los métodos de random forest y soporte vectorial en 6799 proteínas provenientes de la base de datos *Universal Protein Resource* (UniProt). Las enzimas son descritas con subsecuencias de aminoácidos incorporando además características biofísicas como polaridad. Se utiliza como grupo de control a familias de enzimas donde nunca se ha reportado una enzima promiscua.

Un aspecto no considerado en estos métodos es que hay familias de enzimas con alta identidad de secuencia entre sus miembros, con cambios bruscos en promiscuidad, debidos por ejemplo a la dinámica genómica [31], o bien que ortólogos de la misma familia enzimática pueden variar en su grado de promiscuidad [15]. Esta característica dificulta considerar solo la secuencia conlleve a buenos predictores de promiscuidad. Obtener una predicción positiva utilizando los modelos existentes significa que dada esa secuencia, en su familia se conoce previamente un elemento promiscuo y que además sus subsecuencias de cierto tamaño son suficientemente similares. Estos enfoques no pueden predecir *de novo*, en familias donde la promiscuidad no ha sido previamente detectada experimentalmente, pues no consideran aspectos evolutivos ni mecanísticos de las enzimas.

Otra limitante a los enfoques descritos es que mezclan en su conjunto de entrenamiento fenómenos distintos de promiscuidad. Cheng p. g. incluye enzimas *moonlight* que si bien poseen funciones adicionales a la catalización, son distantes a las enzimas promiscuas [6]. Además en ambos casos mezclan en el mismo conjunto enzimas bacterianas y eucariotas, con lo que si existía una huella basada en secuencia entonces ésta puede diluirse por la gran distancia taxonómica entre estos grupos.

0.0.5. Promiscuidad *in vitro* y promiscuidad *in vivo*

La ganancia de promiscuidad no sólo puede entenderse como la capacidad de convertir más sustratos [28], sino también como la mejora de la capacidad catalítica respecto a ellos. El I-index [16], está definido como un rango de valores entre 0 y 1 que tiende a 1 entre más parecida sea la actividad de la enzima sobre distintos sustratos, la capacidad catalítica es medida en términos del cociente de *Michaelis - Menten* $\frac{K_{cat}}{K_m}$. El índice ha sido utilizado para predecir la afinidad por sustrato del citocromo P450 [25]. Una limitante del índice *I* es que se deben conocer los sustratos a los que la enzima es afín; sin embargo se puede sospechar que una enzima ha ganado promiscuidad aun sin conocer sus potenciales sustratos. Otro punto a señalar es que las variables K_{cat}, K_m son mediciones realizadas *in vitro* y no se consideran todos los sustratos presentes *in vivo*. Para solventar esta dificultad e investigar variaciones de sustratos nativos se pueden buscar productos similares a los ya conocidos por medio de análisis bioinformáticos o metabólicos [52] como los empleados en la detección de rutas no conservadas en la biosíntesis de productos naturales [53]. En particular para este fin

se ha utilizado espectroscopia de masas $\frac{MS}{MS}$, [52] combinada con molecular networking para identificar productos similares [55]

0.0.6. El papel de la dinámica molecular en la promiscuidad

La mayoría de las estructuras tridimensionales de proteína se han obtenido por cristalización de rayos X. Aunque mucho se ha hablado de la relación estructura función, al cristalizar se obtienen estados conformacionales homogéneos, que bien pueden no ser la única conformación que adopta la proteína en solución [57]. En particular en el problema de promiscuidad, se ha observado que la variación funcional no queda obviamente reflejada en la variación estructural, lo que sugiere un rol significativo para la dinámica molecular [58]. Se postula que un aspecto de la dinámica molecular relevante para la diversificación de especificidad por sustrato es el numero de confórmeros [59]. Por ejemplo, en la actinobacteria *Corynebacterium diphtheriae* parece que el contexto genómico correlaciona con pérdida de promiscuidad de PriA ya que al poseer el genoma una copia de *trpF*, la enzima perdió esta función química conservando solo la función EC 5.3.1.16 correspondiente a la ruta de histidina. Esta sub-funcionalización se refleja en la pérdida de estados conformacionales cambiando desde un estado en *C. diphtheriae* hasta 4 presentes en la dinámica de PriA de *M. tuberculosis* [31].

Las regiones rígidas de una enzima proporcionan orientación adecuada con respecto a los grupos catalíticos, mientras que las regiones flexibles permiten al sitio activo adaptarse a los sustratos con diferentes formas y tamaños [6]. Esta consideración sugiere que la flexibilidad del sitio activo es otra característica de la dinámica molecular a considerar para obtener información de la capacidad de ligación de una enzima a distintos sustratos [60]. Recientemente el índice de flexibilidad dinámica (dfi) se utilizó como una medida cuantitativa basado en la respuesta a perturbaciones de amino ácidos (PRS). Este indice se incrementó en regiones cercanas al sitio activo de beta lactamasas promiscuas respecto al correspondiente dfi de β -lactamasas especialistas existentes [17].

0.0.7. Modelo biológico: la diversidad de Actinobacteria

Al escoger un conjunto acotado para investigar familias de enzimas promiscuas se debe recordar que la funcionalidad es jerárquica por lo que para mejorar la anotación, es deseable reflejar el proceso evolutivo y restringirse a un grupo de organismos taxonómicamente relacionados [61]. Actinobacteria es un phylum que posee promiscuidad tanto en el metabolismo periférico como en el core metabólico. Entre datos públicos (NCBI) y privados están disponibles en 2014 alrededor de 1200 genomas no redundantes de especies de Actinobacteria. Como punto de partida, se han estudiado las relaciones filogenéticas y grupos de ortología [62], en particular en Actinobacteria para identificar

relaciones entre las familias del phylum, se han obtenido árboles multilocus de entre 100 y 157 genomas [64]. Estos estudios sugieren como separar los genomas disponibles para hacer el cálculo de grupos de ortología. Finalmente, se han realizado estudios de plasticidad genómica en *Streptomyces* considerando 5 y 17 organismos de los 300 genomas disponibles en la actualidad [66] donde reportan respectivamente 2,018 familias en el *core genome* y 32,574 en el pangenoma. Además de Actinobacteria, otros linajes con riqueza metabólica conocida en metabolitos secundarios como Cianobacteria y *Pseudomonas* también serán considerados en este trabajo. Finalmente un dominio desconocido pero del que comienza a haber genomas disponibles ~800 genomas públicos en NCBI en 2016. Todos estos linajes pueden ser considerados en la búsqueda de variación de promiscuidad.

0.0.8. Modelo metabólico biosíntesis de aminoácidos.

Al hacer el cálculo vemos que *Streptomyces*, un género del phylum Actinobacteria cuenta en su genoma con un promedio de 8316 secuencias codificantes según la especie. Gran parte de estas secuencias pueden ser agrupadas en subsistemas metabólicos como metabolismo de carbohidratos o de lípidos; de estos subsistemas uno de los más amplios es el metabolismo de aminoácidos con entre 429 y 910 secuencias según el organismo. La síntesis de aminoácidos es un subsistema presente en todas las especies pero con suficientes variaciones que permiten hacer observaciones evolutivas. En un gran número de Actinobacterias las rutas de histidina y triptófano de 7 y 11 pasos respectivamente convergen en una enzima funcional llamada PriA, que realiza tanto la función de HisA como la de TrpF [9]. La cantidad de familias en el subsistema de metabolismo de aminoácidos, su variabilidad, su conservación entre distintos grupos taxonómicos y la existencia de estos ejemplos en Actinobacteria posicionan al metabolismo de aminoácidos como un buen punto de partida para la búsqueda de promiscuidad tanto de familias promiscuas como de miembros promiscuos de las mismas.

En las cuatro décadas de estudio de la promiscuidad enzimática, hemos aprendido que es un fenómeno distribuido en distintos subsistemas metabólicos [2] y que su existencia puede deberse tanto al desarrollo de nuevas funciones para fines adaptativos [1], como al rescate de una función perdida [3]. Por ello la dinámica de pérdida y ganancia de genes asociada al contexto genómico en bacterias se relaciona con cambio en la función enzimática [68]. Precisando, respecto a la ganancia de genes, se postula que la funcionalidad precede la duplicación [69]. Lo que implica que dada una duplicación muy posiblemente previamente la promiscuidad estuvo presente. [70].

Se han desarrollado técnicas bioquímicas y metabólicas de medición [16], así como algoritmos computacionales de predicción de promiscuidad [28]. Un aspecto a mejorar dentro del modelado es la restricción del conjunto de estudio a un grupo taxonómico tan reducido que exista congruencia en las familias de ortología y a la vez tan amplio que permita observar efectos evolutivos; el phylum Actinobacteria ha probado tener ejemplos de promiscuidad. Si bien la secuencia no ha sido suficiente para la correcta predicción de promiscuidad [32], es posible que dentro de las técnicas computacionales,

incorporar consideraciones evolutivas o bien flexibilidad durante la dinámica molecular nos proporcionen sugerencias sobre promiscuidad de los miembros de una familia [57].

0.1. Modelos computacionales

Para desarrollar herramientas bioinformáticas relacionadas al estudio de la promiscuidad se adoptó el enfoque de los contenedores bioinformáticos, todo el código fue depositado y documentado en GitHub y distribuido a través de un contenedor Docker siguiendo las especificaciones generales de desarrollo de biocontenedores [72].

Antecedentes

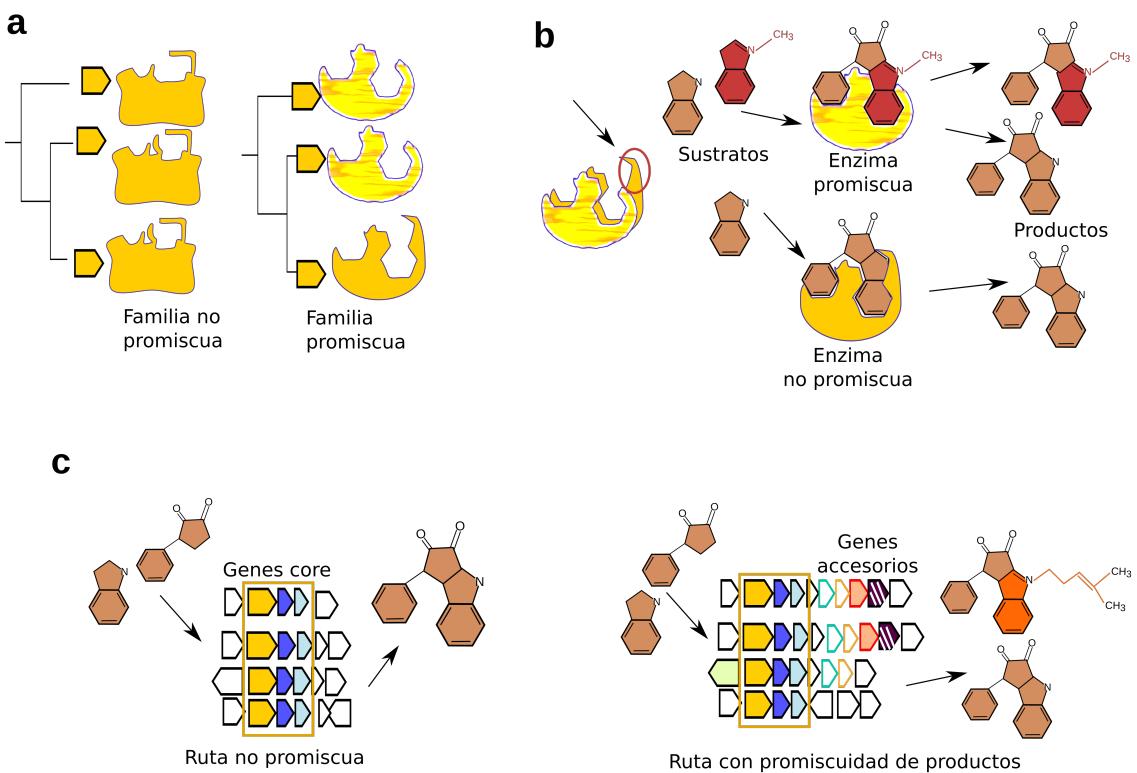


Figura 2: La promiscuidad puede entenderse a distintos niveles metabólicos: enzima, familia enzimática y ruta biosintética

0.2. La promiscuidad puede abordarse a distintos niveles incluyendo enzima, familia y ruta de metabólica.

Si se entiende a la promiscuidad como funciones alternativas de alguna unidad molecular, puede observarse promiscuidad a distintos niveles: desde un mismo gen que presenta splicing alternativo, una misma enzima con funciones alternativas, o bien una familia enzimática donde al menos algunos homólogos codifican enzimas promiscuas [23]. Existen también rutas que generan productos metabólicos alternativos [74], si se considera como la unidad de estudio a una ruta biosintética podemos generalizar la noción de promiscuidad al concepto de rutas promiscuas. La Figure 2 muestra tres niveles en los que se puede estudiar la promiscuidad: i) Distinguendo familias de enzimas promiscuas de familias especialistas, ii) Distinguendo enzimas específicas de enzimas especialistas en una familia enzimática promiscua y finalmente iii) encontrando promiscuidad en rutas de metabolismo especializado.

Para clarificar la diferencia entre identificar familias promiscuas y miembro de familias promiscua se propone el siguiente ejemplo: PriA en Actinobacteria y HisA en enterobacteria son ambas familias que isomerizan ProFAR en la ruta de síntesis de histidina pero solo la familia PriA es promiscua pues puede además isomerizar el sustrato PRA durante la síntesis de triptofano [9]. Sin embargo dentro de Actinobacteria, existen miembros no promiscuos de PriA. Cinéticas *in vitro* han mostrado que en algunas especies del género *Actinomyces* los homólogos de *priA* codifican para enzimas monofuncionales en alguno de los dos sustratos [47]. Así pues dentro de una familia promiscua no todos los miembros tienen esta propiedad [15]. En este trabajo se buscará encontrar marcas de promiscuidad a nivel familia, enzima y ruta biosintética en el metabolismo especializado.

0.3. Antecedentes conceptuales

Algunos autores han intentado identificar enzimas promiscuas mediante aprendizaje máquina utilizando únicamente la secuencia de aminoácidos. Estos enfoques no han distinguido entre los problemas identificación de familias promiscuas e identificación a nivel de enzima [28]. Hasta ahora utilizar únicamente la información de la secuencia de aminoácidos no ha sido suficiente para identificar una familia promiscua sin conocer previamente al menos un miembro promiscuo de ella. Por otra parte, diferenciar la promiscuidad a nivel de enzima una vez que se conoce una familia promiscua se dificulta cuando la identidad de secuencia es alta. Tal es el caso de las PriA que han perdido la promiscuidad en algunos miembros del género *Actinomyces* [47]. En este caso el establecimiento de las filogenia de los miembros del género permitió entender la distribución de la

Para mejorar nuestro entendimiento del fenómeno de promiscuidad, además de la

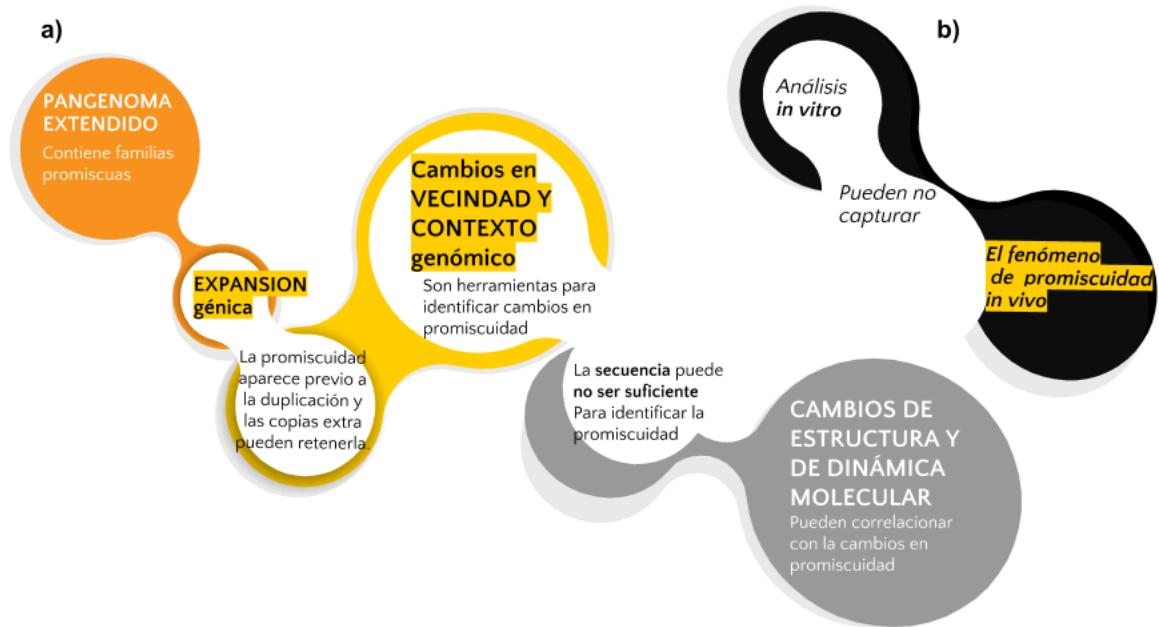


Figura 3: Antecedentes conceptuales de promiscuidad metabólica

comparación de secuencias es necesario integrar otros elementos al análisis, Figure 3. Es difícil medir la promiscuidad en términos absolutos, por ejemplo, no se puede aseverar que una enzima es “no promiscua” sin haber previamente descartado a todos los posibles sustratos del universo químico. Además incluso enzimas que resultan no promiscuas en análisis *in vitro* resulta que sí son promiscuas al examinarlas *in vivo* [75]. Sin embargo debido a que al adquirir una nueva función existe un umbral donde la función ancestral es conservada, es plausible intentar transformar el problema de “encontrar promiscuidad” al de “encontrar cambios en promiscuidad” al relacionar estos cambios con las huellas que dejan los cambios funcionales [43]. Entre los elementos relevantes que correlacionan con la adquisición de una función alternativa se encuentran además de divergencia de secuencia, diversidad en vecindad genómica [76], la pérdida o ganancia de genes [47], las expansiones génicas, i.e. el crecimiento del pangenoma dentro de un grupo taxonómico [37] y finalmente cambios estructurales o de flexibilidad durante la dinámica molecular [17]. Estos elementos tienen en común que reflejan un cambio en alguna propiedad genómica o biofísica observable en el registro evolutivo, de lo que se deriva que el buscar cambios en la promiscuidad de una enzima, familia o ruta, resulta más factible por ahora que la búsqueda intrínseca de promiscuidad.

Debido a la abundancia de datos genómicos los primeros capítulos de este trabajo se centran en encontrar variaciones en secuencia, distribución del pangenoma, y vecindades genómicas para encontrar candidatos de familias, enzimas y rutas promiscuas.

0.4. El establecimiento de un marco de conservación permite distinguir cambios

La función de una enzima es un concepto jerárquico, dependiente de la filogenia de un organismo [77]. Por ello, para poder encontrar marcas de cambio funcional, por ejemplo diferencias en número de copias de una familia, primero es importante trabajar en la construcción de un marco filogenético consistente que permita ordenar inclusive organismos de la misma especie. La dificultad de esta tarea consiste en que si los organismos que se desea ordenar son muy cercanos, marcadores clásicos como el gen de 16s son también muy parecidos en secuencia y no permiten resolver las relaciones entre ellos. Este caso dificultó la construcción de un árbol filogenético de *Actinomyces* y con ello se imposibilitaba encontrar patrones en la matriz de presencia / ausencia de genes [47].

Para solventar la falta de resolución de genes individuales en organismos cercanos puede utilizarse el conjunto de todos los genes comunes en un linaje. Este conjunto es conocido como el *core genome*. Se han desarrollado herramientas bioinformáticas para este problema, por ejemplo phyloPhlan [78] fija 400 genes comunes en bacteria y trata de localizarlos dado un conjunto de genomas sin importar su linaje. Este enfoque enfrenta que el contenido génico de genomas procariontes suele ser muy variable debido a mecanismos como transferencia horizontal y duplicación génica [79]. Esta variabilidad puede impedir encontrar muchos de estos 400 genes en un cierto linaje. Entre organismos de la misma especie pueden suceder fenómenos como que el *core* siempre se reduzca al aumentar un nuevo genoma y que el conjunto total de familias genéticas (pangenoma) siempre aumente. Aunado a esta observación biológica están también las limitaciones técnicas, hay genes que no aparecen en un genoma porque este fue mal secuenciado o ensamblado y por lo tanto estos genes disminuyen el tamaño del core. Para distinguir cambios en el contenido génico en un linaje de organismos es útil establecer primero un orden entre los genomas del linaje a analizar. Para ello, un camino que generaliza la propuesta de phyloPhlan es localizar los genes del *core* exclusivos de cada grupo de genomas. Al momento existe publicada *metaphor*, una herramienta de selección de ortólogos [81] pero al comenzar este trabajo no existía un método disponible para ello. Por ello el capítulo uno de esta tesis habla del desarrollo de Orthocore, que obtiene los genes del *core* y además los concatena y entrega un árbol filogenético.

0.5. La genómica comparativa como herramienta en la distinción de familias y enzimas promiscuas que participan en el metabolismo especializado.

Una parte del metabolismo especializado está compuesta por familias enzimáticas que evolucionaron de rutas de metabolismo central [82]. En las familias expandidas, ya sea por duplicación o por transferencia horizontal, las expansiones pueden retener la función química de las rutas centrales [83], así como también la función alternativa suele estar presente presente aún a bajos niveles antes de la divergencia o duplicación [43]. Por tanto las familias con expansiones en un linaje son candidatas a ser familias promiscuas en él. Se ha notado que en el linaje en que una familia enzimática es promiscua hay una zona de cambio en promiscuidad [50], Las expansiones de rutas centrales que participan en la síntesis de productos naturales son candidatos a presentar cambios en promiscuidad tanto a nivel familia como a nivel enzima. Por ello la observación de la retención de función ancestral al aparecer una función alternativa proporciona una zona favorable para la búsqueda de promiscuidad a nivel de enzima. En la familia existirá un gradiente de promiscuidad donde las más cercanas a la zona de duplicación o divergencia tienen más indicaciones de tener un cambio en promiscuidad que las más conservadas y cercanas al metabolismo central. Estas copias extra son candidatas a pertenecer a rutas de metabolismo especializado.

Como prueba de concepto esta idea de minar genomas incorporando información evolutiva permitió la identificación de la biosíntesis de arsenolipidos [61]. En este trabajo se desarrolló la idea de EvoMining, un método de minería genómica que permite localizar familias enzimáticas con copias extra en su linaje genómico que además presentan marcas de reclutamiento a metabolismo especializado. La aplicación de las ideas de EvoMining llevaron a identificar una expansión en el número de copias de la enzima AroA en Actinobacteria. Se demostró experimentalmente que la copia secundaria era parte de un cluster de síntesis de arsenolípidos, Figure 2 . Es interesante remarcar que las funciones tanto primaria como secundaria son similares, lo que cambia es la especificidad de sustrato en cada copia. En la copia primaria el sustrato tiene un átomo de fósforo, en la secundaria uno de arsénico. Otros genes del cluster biosintético también parecen ser expansiones de familias del metabolismo central. Este descubrimiento se realizó con la primera versión de EvoMining que contó con 200 genomas de Actinobacteria [61], una base de datos de secuencias de enzimas de productos naturales y otra base de datos de secuencias de enzimas de rutas centrales curada a mano. En esta primera versión quedaba pendiente poder utilizar EvoMining como plataforma de exploración de linajes personalizables con genomas provistos por el usuario, así como sistematizar la información del conjunto de enzimas consideradas como partícipes de BGC de productos naturales.

La búsqueda de productos naturales cuenta entre sus premisas que estos se producen en vecindades genomas llamadas clusters y que además clusters cercanos (ya sea

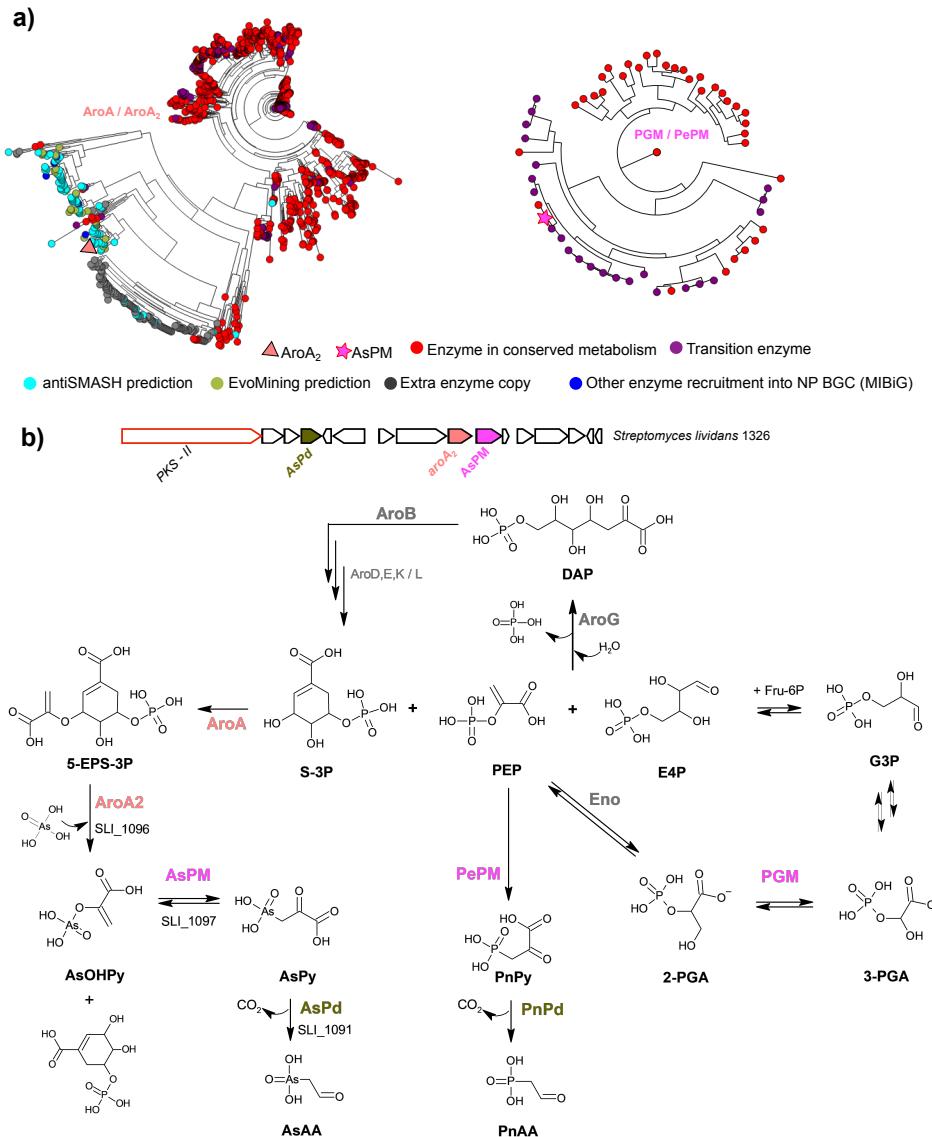


Figura 4: El paradigma de EvoMining permitió localizar familias de enzimas de metabolismo central con copias extra que habían sido reclutadas para una nueva función en metabolismo especializado. Un ejemplo de ello es AroA, que cataliza una reacción similar pero sobre un sustrato diferente. La copia primaria cataliza una reacción sobre un metabolito con azufre y la secundaria sobre un metabolito con arsénico

en contenido génico o en la secuencia de sus componentes), exploran variaciones metabólicas, es decir sus enzimas catalizan reacciones sobre sustratos parecidos aunque no idénticos [61]. Los clusters de genes biosintéticos (BGC) de productos naturales que han sido caracterizados experimentalmente están depositados gracias el esfuerzo de toda la comunidad en la base de datos *Minimal information about a biosynthetical gene cluster* MIBiG. Actualmente MIBiG cuenta con 1400 BGC.

EvoMining ha demostrado incorporar efectivamente premisas evolutivas para localizar enzimas pertenecientes a estos BGC aún cuando pertenezcan a clases no conocidas. Análogamente otra herramienta de minería genómica ha utilizado con éxito la búsqueda de copias extra para encaminar su búsqueda específicamente a BGC de resistencia a antibióticos [84]. Desarrollar EvoMining en combinación con algoritmos de búsqueda de cambios en la vecindad genómica la harán una plataforma ideal para abordar el problema de las familias, proporcionando una solución la dificultad de no tener conocimiento previo de un miembro promiscuo en la familia investigada. Respecto al problema de los miembros, se propone explorar variaciones en vecindad genómica, flujo génico y dinámica molecular, como candidatos a reflejar la variación en promiscuidad. Uno de los modelos modelo biológicos a explorar será el phylum Actinobacteria, un grupo de bacterias reconocido por su diversidad metabólica donde se ha probado la existencia de promiscuidad enzimática. Existen otros modelos interesantes como *Pseudomonas* y Cyanobacteria, linajes donde según MIBiG hay abundancia de BGC. En contraste Archaea no tiene más que un BGC reportado, esto puede deberse a un fenómeno biológico o bien a falta de exploración en dicho dominio. Aunque se ha avanzado tanto en el conocimiento de la promiscuidad en Archaea [85] como en la detección de productos naturales, sin necesariamente caracterizar los genes biosintéticos [86] EvoMining podría ayudar a entender los patrones de expansión reclutamiento y sugerir familias con promiscuidad enzimática en este dominio.

EvoMining es una plataforma bioinformática de análisis de expansión y reclutamiento de familias que puede ser utilizada para la identificación de enzimas que participan en clusters de síntesis de productos naturales. Si se combinara EvoMining con la premisa de que vecindades distintas son marcadoras de funciones químicas distintas, al encontrar una familia expandida con vecindades genomas diferentes se podría solventar la deficiencia de otros métodos bioinformáticos consistente en que para identificar familias promiscuas se debe conocer previamente un miembro promiscuo de la misma. Así pues al combinar EvoMining con herramientas de vecindad genómica tanto de comparación como de visualización estaremos mejorando su funcionalidad en la identificación de familias promiscuas.

0.6. La genómica comparativa como herramienta en la priorización de clusters promiscuos

La promiscuidad nos interesa por su producción de variantes. Si bien en rutas centrales rescata la función, en metabolismo secundario crea nuevas variantes moleculares que permiten adaptación, de hecho pangénomas grandes correlacionan con aparición de nuevas funciones enzimáticas. Considero que el concepto de promiscuidad puede ser extendido a un nuevo nivel considerando a los clusters de genes biosintéticos como una nueva unidad. Así pues existiría la promiscuidad de una enzima, promiscuidad de una familia y promiscuidad de un cluster.

0.6.1. Expansión y contextos genómicos como herramienta de anotación funcional

Al evaluar la herramienta de análisis de promiscuidad PROMISE [28] en un set de datos de la familia HisA/PriA [50] obtuve que en su mejor desempeño es (huella molecular de tamaño 6) clasifica correctamente casi todas las no promiscuas, (HisA) pero no sucede lo mismo con la familia PriA donde tiene éxito en 16 de 45 casos. Al aplicar el mismo tamaño de huella a 9 miembros promiscuos de la familia IlvC no consigue predecir correctamente ninguno de ellos reflejando tal vez que en su conjunto de entrenamiento no había miembros promiscuos *ilvC*. Por lo menos para estas familias el conjunto de entrenamiento o los descriptores no son suficientes para la anotación de promiscuidad.

La diversidad enzimática existente es el resultado de un proceso de expansión, mutación y selección que se ha desarrollado durante el transcurso de la historia evolutiva [5]. Existe evidencia de que cierto grado de promiscuidad o divergencia funcional precede a la duplicación génica [69]. Por este motivo detectar expansiones ya sea duplicaciones o transferencias horizontales [88], puede ser un buen punto de partida para determinar divergencia funcional y promiscuidad. No todas las expansiones denotan cambio de función enzimática, algunas pueden ser meros accidentes, sin embargo dado que la función de una enzima suele estar relacionada con sus vecinos [89], una expansión en una vecindad genoma diferente de la tradicional sera un referente de adquisición de una nueva función y entonces un indicador de existencia previa de promiscuidad.

Para sistematizar el estudio de contextos y vecindades genómicas se desarollo Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins STRING [90], que cuenta con una anotación de ortología jerárquica y consistente, realizada en 2000 organismos en cuyo marco interacciones de proteínas con implicaciones funcionales son predichas tanto de novo por información genómica de co-ocurrencia como por minería de datos en artículos publicados. STRING es una base de datos, y como tal no permite agregar nuevos genomas para su análisis. Sus 2000 organismos incluyen especies tanto bacterianas como eucariotas. Al existir tanta diversidad, los genomas disponibles para un genero o clase

específicos son escasos, p. g. de los mas de 300 genomas disponibles de *Streptomyces* solo 24 están incluidos.

Para resolver la baja cobertura de STRING hacia ciertos grupos taxonómicos se pueden desarrollar scripts de vecindad genómica utilizando RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology); un servicio interactivo de anotación automática de genomas de bacterias y arqueas [91] donde la función de cada gen se asigna de acuerdo a conocimiento previo de subsecuencias de organismos cercanos filogenéticamente, cuando es posible se incluye en un subsistema metabólico. Estamos en una era de explosión de datos genómicos, próximamente se espera contar con millones de genomas bacterianos incluso provenientes de bacterias no cultivables, por ello los algoritmos deben ser constantemente optimizados a los nuevos volúmenes de datos [53]. Ante esta expectativa sería muy útil desarrollar algoritmos de análisis genómico que sean de código libre o al menos interactivos para que cada laboratorio pueda personalizarlos para sus propios genomas.

Finalmente, no solo la vecindad genómica inmediata puede ser utilizada como distintivo en la búsqueda de promiscuidad, diferencias en el contexto genómico en genes relacionados con una enzima promiscua, sin importar su ubicación dentro del genoma también pueden ser relevantes para la perdida o ganancia de función química [31], [47].

0.6.2. Contexto y vecindades genómicas

En 2012 fueron analizados 102 genomas de 29 familias de Actinobacteria [75]. sugiriendo que al menos en *Corynebacteria* el contexto y la vecindad genómica incidían en la sub-funcionalización de PriA en subHisA [31]. Respecto a IlvC, otra familia involucrada en la síntesis de aminoácidos fue estudiada y caracterizada bioquímicamente en 1 *Corynebacterium* y 8 *Streptomyces* [32]. Para ampliar estos resultados, utilizando la anotación de RAST y una generalización de la definición de vecindad de STRING, se diseño un algoritmo para identificar vecindades similares así como uno de visualización de contexto, ambos disponibles como software libre en github nselem/perlas .

El algoritmo de clasificación de vecindades permite agruparlas en clusters y calificar estos clusters según su conservación dado un grupo de bacterias. La definición de vecindad y similitud de vecindad esta descrita posteriormente en los métodos. El algoritmo fue aplicado a la familia IlvC en 290 *Streptomyces* resultando 9 clusters Datos entre los mas poblados el primero cuenta con 279 elementos, otro con 9 elemento y dos mas con 7 miembros (Fig 3), resultados experimentales son congruentes con que existe divergencia funcional entre miembros de clusters distintos [32]

0.7. Estudio de una familia PriA

0.7.1. Caracterizacion in vivo

No todas las familias promiscuas provienen de expansiones, tal es el caso de PriA en Actinobacteria, donde no tiene expansiones y hasta el momento no se le conoce participación en rutas de metabolismo especializado. La promiscuidad de PriA parece debida al rescate de la función TrpF. Algunas enzimas PriA no han mostrado promiscuidad *in vitro* pero si *in vivo* ya que sobreviven en un medio sin triptofano, es decir *in vivo* complementan la función TrpF.

0.7.2. Caracterizacion bioquimica in vitro.

De la familia PriA y sus subfamilias se han caracterizado bioquímicamente miembros selectos de *Actinomycetaceae*, *Bifidobacteriaceae*, *Micrococcaceae*, *Acidimicrobiaceae*, *Corynebacterium*, *Mycobacteriaceae*, *Streptomycetaceae*, Camera (provenientes de metagenoma), reconstrucciones ancestrales, 80 mutantes de *Corynebacterium*, y 2 mutantes de Camera mediante cinéticas enzimáticas para calcular las constantes K_{cat} , K_m . El genero *Streptomyces*, el que cuenta con mayor cantidad de genomas disponibles representa una oportunidad muy poco explotada de explorar la influencia del contexto y la vecindad genómicas en secuencias de PriA.

0.7.3. Modelado de dinamica molecular

La dinámica es un método que permite hacer simulaciones de partículas que sirve para obtener información de propiedades macroscópicas de un conjunto de átomos [94]. Es útil en el marco de mi proyecto porque permite la exploración del espacio conformacional, y se ha visto que este esta relacionado con la actividad de la enzima [96], ademas dado un confórmero permite verificar su estabilidad. Resuelve la ecuación de movimiento de Newton con base a una configuración inicial, las fuerzas interatomicas como los enlaces covalentes, las fuerzas de Van der Waals y la carga de las partículas[54]. Entonces para generar una simulación de dinámica molecular, debe contarse con una estructura como punto de partida, ya sea esta cristalográfica o modelada de novo o por homología. El laboratorio de bioinformática y biofísica computacional ha desarrollado un protocolo de generación de modelos homólogos estructurales y dinámicas moleculares (Carrillo-Tripp in prep); con este pipeline se han generado dos estructuras de Camera [50], 30 estructuras y dinámicas de miembros de Actinobacteriaceae y Bifidobacteriaceae [47] y finalmente una estructura de sub-HisA de *Corynebacterium diphtheriae*. En el género *Streptomyces*, interesante debido a su variación en contexto genómico y en mediciones *in vitro* aun no se modelan dinámicas moleculares ni se habían realizado estructuras por homología previo a este trabajo.

En conclusión la promiscuidad enzimática es un fenómeno complejo debido a múltiples causas. Existe una gran variedad de estudios con enfoques puntuales sobre aspectos estructurales, dinámicos y evolutivos sin embargo hasta ahora no se han reportado trabajos multidisciplinarios que involucren a todas las partes involucradas

Objetivos

0.8. Objetivo General

Estudiar el fenómeno de promiscuidad tanto desarrollando estrategias para identificar familias promiscuas, miembros promiscuos en dichas familias o clusters biosintéticos promiscuos dentro de un grupo taxonómico, como comparando variaciones de promiscuidad *in vitro* con variaciones en contexto genómico y en propiedades relacionadas a la estructura tridimensional en miembros de una familia.

0.9. Objetivos particulares

1. Desarrollar Orthocore un método para entender cuáles son los genes más conservados en el *core genome* en un linaje taxonómico y aplicar este conocimiento.
2. Mejorar EvoMining como método de identificación de familias enzimáticas promiscuas aprovechando los cambios en vecindades genómicas como características informativas provenientes de datos filogenómicos.
3. Desarrollar CORASON una herramienta Optimizar el entendimiento de la evolución de clusters biosintéticos y vecindades genómicas diversas, para poder organizarlas jerárquicamente tal y como se pueden organizar las secuencias de enzimas. Con este conocimiento proponer y verificar mediante BGC promiscuo y verificar la hipótesis
4. Estudiar la relación entre historias filogenómicas y procesos biofísicos con la promiscuidad *in vitro*, a través de mediciones de ciertas características de la familia PriA.

Estrategias

Obtener informacion genomica de diversos linajes genómicos.

Colectar genomas de Actinobacteria, Cyanobacteria, *Pseudomonas* y Archaea de NCBI y de colecciones privadas.

0.9.1. Anotar consistentemente las secuencias codificantes de estos genomas.

Utilizar un anotador automatizado y desarrollar los scripts necesarios para automatizar la anotación de los genomas.

Establecer las relaciones filogenéticas de los genomas colectados.

Mediante el uso del *core genome* construir un arbol filogenomico que permita establecer un marco sobre el cual hablar de cambio.

0.9.2. La promiscuidad en familias enzimáticas.

Desarrollar Evomining hasta el punto de convertirla en una distribución funcional de código libre disponible para otros investigadores. Agregar características que faciliten la investigación como la visualización de la vecindad genomica de los miembros de una familia y otros metadatos como el número de copias por organismo.

Identificar cambios en la vecindad genomica en familias selectas de enzimas de metabolismo central. Identificar familias de metabolismo central en los linajes genómicos seleccionados.

Identificar mediante EvoMining las familias de metabolismo central con expansiones y reclutamientos que pueden presentar promiscuidad enzimática.

Desarrollar las herramientas bioinformáticas necesarias para entender la conservación y evolución de BGCs u otras vecindades genómicas a las que pertenecen las expansiones de las familias centrales previamente seleccionadas.

Promiscuidad in vitro dentro de miembros de una familia promiscua de enzimas.

Dados los sustratos conocidos de PriA investigar las posibles correlaciones entre mediciones de constantes catalíticas, contexto genómico, vecindad genómica, estructura tridimensional y cambio en el número de copias en diversos linajes.

Sistematizar Evomining para convertirla una plataforma descargable y utilizable en cualquier set de datos bacterianos relacionados taxonomicamente proporcionados por el usuario.

-Ampliar el contenido de Evomining para poder analizar nuevas bases de datos genómicas, agregando por ejemplo los nuevos genomas colectados de Actinobacteria, así como los genomas de Cyanobacteria, *Pseudomonas* y Archaea.

Sistematizar la base de datos de metabolismo central.

-Desarrollar la visualización e integrar la clasificación de vecindades genómicas como una herramienta adicional en la búsqueda de promiscuidad.

Seleccionar miembros homólogos de la familia de enzimas para modelado molecular.

Se escogieron 41 *Streptomyces* repartidos en un árbol de rpoB de 400 *Streptomyces* con genoma disponible. Esta selección incluye los seis *Streptomyces* de los que se cuenta con cinética enzimática de PriA, tres de ellos con estructura cristalográfica.

Medir cinéticas enzimáticas, contexto genómico y vecindad genómica

Estudiar la existencia de distintas vecindades genómicas. Determinar la cinética enzimática de PriA respecto a sustratos atípicos sugeridos por los estudios estructurales. Obtener mediante una colaboración 37 modelos estructurales por homología y modelar docking molecular.

Metodología

A continuación describiré la metodología para cada una de las estrategias expuestas previamente. Todos los scripts desarrollados fueron escritos en perl y están disponibles en github <https://github.com/nselem/perlas> y empacados como un contenedor de docker.

0.9.3. La promiscuidad en familias enzimáticas.

Actinobacteria genómica

Para obtener información genómica del phylum Actinobacteria mediante la colección de genomas de NCBI se revisaron todas las familias de Actinobacteria de la base genoma de NCBI y se seleccionaron los genomas con mínimo 5 genes por contig. Se crearon scripts para utilizar la interfaz e-utils de NCBI y descargar estos genomas desde la terminal a partir de una lista de identificadores. El mismo procedimiento se aplicó a Cyanobacteria, *Pseudomonas* y Archaea.

Anotación

Para anotar consistentemente las secuencias codificantes de estos genomas se utilizó el anotador automatizado RAST y se desarrollaron los scripts necesarios para anotar los genomas desde la terminal, conectado así NCBI y RAST. Se empacaron estos scripts en una distribución docker de myrast.

Filogenia de la base de datos genómica

Establecer las relaciones filogenéticas de los genomas colectados mediante el uso del *core genome* para construir un árbol filogenómico, y para encontrar genes marcadores de un linaje taxonómico. Para obtener el *core genome* y en base a él reclasificar los genomas se diseñó el algoritmo Orthocore que generaliza el concepto de Best Bidirectional Hits (blast all vs all).

Orthocore. Se realiza un blast all vs all de genomas deseados. Para cada secuencia, centrado en cada genoma se realiza una lista (estrella) de sus mejores hits bidireccionales. Si las listas de todos los genomas coinciden es un BBH multiple y se agrega la lista al core genome. Una vez con el *core genome* completo se puede reconstruir la filogenia. Este metodo fue exitoso en la detección de una familia marcadora de *Clavibacter michiganensis*.

Organización y presentación de familias extendidas mediante el desarrollo una plataforma bioinformática.

Se desarrolló EvoMining como una plataforma interactiva de consulta, se complementó con programas de visualización de árboles filogenéticos y contextos genómicos.

Algoritmo de reconstrucción filogenética y visualización

Las secuencias de las familias enzimáticas expandidas fueron alineadas con muscle v3.2[97] y curadas con Gblocks v0.91b[98]. Los parámetros de Gblocks fueron fijados en incluir 5 posiciones como el mínimo tamaño de un bloque y diez posiciones como el máximo de posiciones contiguas no conservadas. La selección de color de las hojas del árbol fue automatizada utilizando Newick Utilities una serie de programas llamados desde la terminal para manipular árboles en formato Newick[99]. La anotación funcional de RAST en su versión clásica[91] fue agregada al SVG.

Algoritmo de visualización

Para facilitar el análisis visual de una vecindad genómica y a la vez generar imágenes de alta calidad exportables para su uso en publicaciones, se desarrolló código cuya salida es el formato *Scalable Vector Graphics* (SVG). Este formato es básicamente un archivo de texto XML que contiene instrucciones para que navegadores como Chrome o firefox realicen un dibujo. Al ser vectores, las imágenes generadas en SVG no pierden resolución al ser escaladas y justamente por ser escalables permiten explorar con detalle grandes cantidades de datos organizados por ejemplo en árboles filogenéticos. Los scripts extraen para cada gen información necesaria como coordenadas, dirección, función química. La anotación de función proviene de la anotación de RAST, la visualización de vecindades genómicas fue desarrollada *de novo*. Los primeros análisis de EvoMining, antes de la existencia de esta plataforma fueron desarrollados en el lenguaje perl; este lenguaje cuenta con un modulo para facilitar la elaboración de SVG (perlmaven/SVG 2015) por lo que se decidió utilizarlo y continuar el desarrollo en Perl para no agregar nuevos requerimientos y facilitar su portabilidad.

Se amplificara Evomining de los 200 genomas con que contaba su versión inicial a los 880 colectados mudando la curación manual de su base de datos de rutas centrales a la anotación por subsistemas de RAST. Finalmente se presentará la variación en

vecindades genomicos como una herramienta adicional que ayude en la busqueda de promiscuidad en familias de enzimas pertenecientes al metabolismo central.

0.9.4. Identificar cambios en la vecindad genomica en familias selectas de enzimas de metabolismo central.

Dinamica molecular

Para generar dinamicas moleculares primer lugar se recolectaran las estructuras tridimensionales de miembros de PriA de Actinobacteria. Despues se procedera a modelar por homologia las estructuras tridimensionales faltantes utilizando el pipeline del laboratorio de bioinformatica y biofisica computacional. Este pipeline utiliza el software Rosetta para el modelado para las estructuras y GROMACS Groningen Machine for Chemical Simulation, [100] para el modelado de la dinamica molecular. Esta parte del trabajo se realizara en colaboracion con el laboratorio de bioinformatica y biofisica computacional.

0.9.5. Consideraciones

Falsos negativos respecto a promiscuidad estan muy extendidos en la literatura y en las bases de datos, en parte porque la mayoria de las funciones son asignadas por similitud de secuencia y dado un falso negativo el error se propaga en secuencias similares. Por otro lado es muy dificil demostrar un verdadero negativo a menos que se prueben todas las posibilidades de sustrato para la enzima. Sin embargo el espacio de sustratos puede acotarse gracias a tecnicas como el docking que esta intimamente relacionado con la dinamica molecular [54]. Limitar el espacio de sustratos puede retroalimentarse con el estudio de la promiscuidad *in vivo* y viceversa.

Con los metodos propuestos en este trabajo solo se podra detectar perdida o ganancia de promiscuidad entre enzimas de organismos respecto a otros miembros dentro un grupo taxonomico, no asi el estado de promiscuidad intrinseco a la enzima. Si dada una enzima no se detectan variaciones en contexto, vecindad genomicica o flexibilidad dentro de un grupo taxonomico cercano, entonces no podemos decir en principio nada acerca de la promiscuidad de la variante, posiblemente es promiscua pero al mantenerse constante en todos los parametros descritos, con estos metodos no se puede sugerir promiscuidad. Es posible que al mirar en un grupo taxonomico mas amplio se detecte una neofuncionalizacion de la familia aunque tambien es posible que exista una variable z como la flexibilidad de sustrato [23] que no se este considerando y que explique o sea el mejor indicador para esta familia de promiscuidad enzimatica.

Se debe considerar que si existe una correlacion vecindad genomicica-promiscuidad, esta no indica causa efecto, mas bien, es plausible que la vecindad sea un amplificacion de diferencias en secuencia, a un numero igual de variaciones en secuencia la existencia de

un cambio de vecindad indica un proceso mas largo y mas cambios, es una amplificacion de las marcas dejadas por transformaciones funcionales.

Si bien no se resuelve el problema de anotar promiscuidad automaticamente, este trabajo pretende aprovechar que los contextos genomicos ayudan a la identificacion de familias promiscuas para mejorar una plataforma de productos naturales, pretende tambien una confirmacion de que los cambios en la dinamica molecular ayudan a identificar los miembros mas promiscuos hacia actividades recien adquiridas, asi como tambien ser pionero en la investigacion de promiscuidad in vivo.

Capítulo 1

Orthocore: una herramienta computacional para entender el pangenoma de un linaje genómico.

La organización filogenética de un linaje genómico permite la observación de dinámicas de pérdida y ganancia de familias génicas en organismos cercanos. Si los organismos están desordenados taxonómicamente es difícil apreciar la dinámica de aparición-desaparición por genoma de ortólogos que son miembros de una familia génica. Así pues, ordenar los genomas de un linaje de acuerdo a su historia evolutiva facilita apreciar cambios en el número de copias de una familia. Esta consideración es relevante en el marco de esta tesis ya que cambios en la ocurrencia de promiscuidad pueden estar relacionados a copias extra de organismos cercanos[32]. Como se explicó previamente en la introducción, el pangenoma de un linaje taxonómico está dividido en el *core*, *shell* y *dispensable genome*. Orthocore es un algoritmo que se desarrolló para automatizar la obtención del *core conservado* de un linaje genómico. Con este *core* realiza una reconstrucción filogenética de los organismos del linaje Figure 1.1. En esta sección se explica el funcionamiento de Orthocore así como casos en donde fue utilizado, específicamente en casos de estudio de los órdenes *Actinomycetales*[47], *Micrococcales*[102] y *Nostocales*[103] y en el género *Salmonella* [104]. Finalmente se describen otros métodos implementados para entender el pangenoma de un linaje genómico que han sido utilizados en aplicaciones relacionadas al patógeno del tomate *Clavibacter michiganensis*[102].

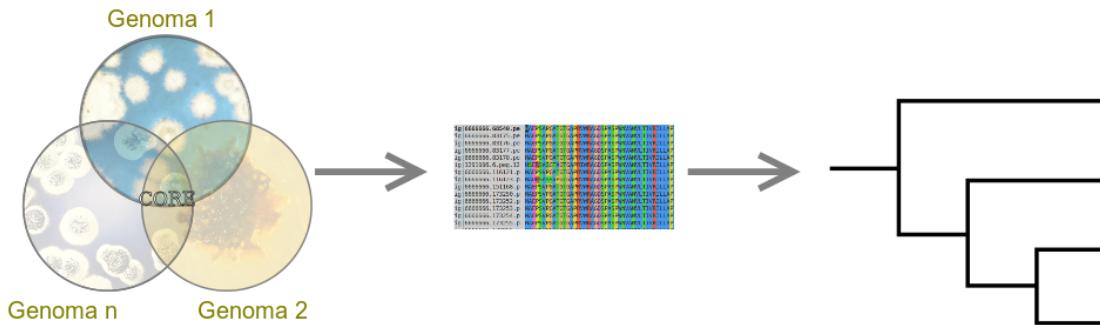


Figura 1.1: Orthocore calcula las familias génicas comunes de un linaje taxonómico. Después de un proceso de filtrado, alineamiento y curación, Orthocore concatena las secuencias de estas familias y entrega una reconstrucción filogenética.

1.1. La distribución de la función metabólica de las familias del pangenoma depende de la variabilidad del linaje seleccionado.

El número de familias génicas presentes en el pangenoma, así como su distribución en el *core*, *shell* y *dispensable genome* depende de la elección de los genomas y del linaje genómico. Para entender esto se puede pensar en un ejemplo extremo, consideremos una bacteria con 1000 familias de genes de la cual se secuencian diez genomas de la misma cepa. Estas secuencias deberían ser prácticamente idénticas y en ese caso el *core genome* sería 1000 familias, el *shell* y el *dispensable genome* serían cero. En este caso, todo el metabolismo, tanto el central como el especializado estarían conservados dentro del *core genome*, ya que el *shell* y el *dispensable genome* se encuentran vacíos. Sin embargo, si variamos el linaje taxonómico, y ahora estudiamos el pangenoma de 10 especies distintas del género *Streptomyces* ahora el *core genome* estará compuesto por aproximadamente un tercio de su tamaño. Dentro del *core genome* es donde se encontrarán muchas de las familias dedicadas al metabolismo central o conservado (por ejemplo, familias de la glicólisis o síntesis de aminoácidos). En cambio muchas de las familias dedicadas al metabolismo especializado y pertenecientes a clústers biosintéticos de productos naturales (BGCs) estarán en el *dispensable genome* pues *Streptomyces* es productor de una gran variedad de metabolitos especializados y cada especie suele tener su producto característico. Figure 1.2.

El *core genome* de un linaje se puede usar para encontrar familias marcadoras Figure 1.3 . Estos genes marcadores permiten realizar pruebas que diagnostiquen la presencia de organismos de ese linaje. A las familias que están presentes en el *core genome* de un linaje A, pero que están completamente ausentes de un linaje B se les llama marcadoras. Por ejemplo genes conservados en la especie *Streptomyces coelicolor* pero ausentes en *Streptomyces rimosus* son genes marcadores de *Streptomyces coelicolor* respecto

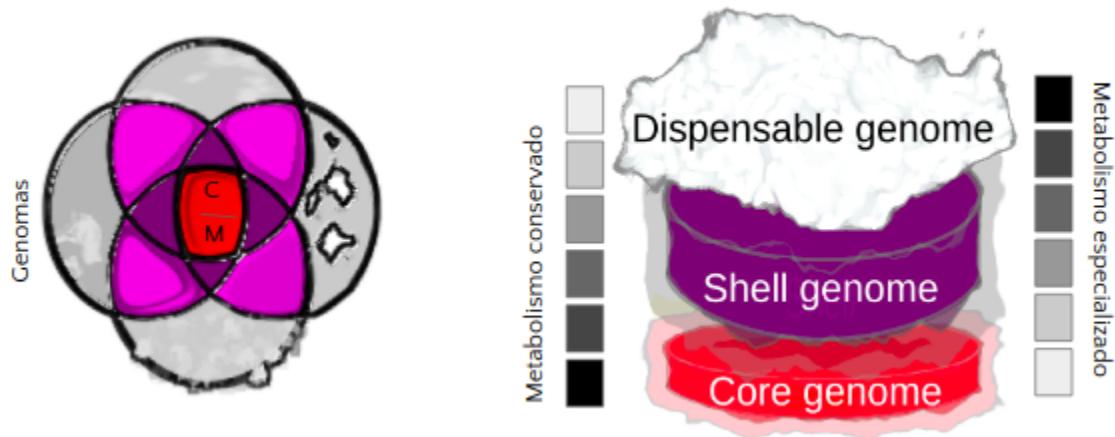


Figura 1.2: El pangenoma de un conjunto de genomas de un linaje puede ser clasificado en varios grupos. En este ejemplo, en el lado izquierdo de la figura se observa en gris el *genoma dispensable* compuesto por familias génicas presentes sólo en un genoma. En dos tonos de morado observamos el *shell genome*, familias que están presentes en la mayoría de los genomas del linaje, en este caso dos o tres genomas. Finalmente en rojo se muestra el *core*, aquellas familias presentes en todos los genomas del linaje. El *core* contiene tanto familias muy conservadas con una sola copia por genoma (C), como familias expandidas. Las familias marcadoras (M) pueden ser parte del *core* conservado o de las familias expandidas. Del lado derecho se muestra una representación del pangenoma para cualquier número de genomas. Familias de metabolismo conservado tenderán a estar concentradas entre el *core* y el *shell genome*, mientras que el metabolismo especializado tendrá más representantes en el dispensable que en el *core genome*. Sin embargo tanto el tipo de metabolismo como el tamaño del *core*, *shell* y *genoma dispensable* pueden variar según la diversidad de los organismos seleccionados.

de *Streptomyces rimosus*. Estos mismos marcadores tal vez no sean marcadores respecto de *Streptomyces lividans*, a pesar de la cercanía taxonómica entre estos organismos. La presencia de genes marcadores en el core depende de ambos linajes, y ya que es de interés científico y tecnológico encontrarlos en para identificar diferentes taxones es importante contar con algoritmos que permitan encontrarlos de forma automatizada.

El número de familias en el pangenoma, ya sea en el *core*, *shell* o *dispensable genome* no sólo depende de la divergencia o proximidad taxonómica de los organismos del linaje seleccionado, también depende de lo variable que sea el contenido génico en los genomas del linaje. A esta característica se le conoce como apertura. Hay especies, por ejemplo algunos patógenos, cuyo pangenoma se encuentra sumamente cerrado en el sentido de que no importa cuántos genomas se agreguen, el número de familias parece converger y ser asintótico rápidamente a una cota superior. En cambio especies o géneros que viven en una gran diversidad de hábitats suelen tener un pangenoma abierto. Esto significa que cada vez que se agrega un nuevo genoma aparecen otras familias que no estaban en los genomas anteriores. En los linajes con pangenoma abierto el número de familias nuevas al agregar un genomas seguirá una tendencia creciente y no asintótica. Además de la apertura, existen otros intentos de cuantificar la diversidad génica de un linaje. Está por ejemplo la fluidez, definida como el promedio de familias únicas entre familias totales por pares de genomas. El pangenoma bacteriano total, es decir el total de familias génicas en el dominio Bacteria es considerado abierto.

Finalmente, la distribución de las funciones metabólicas encontrada en los subconjuntos del pangenoma (*core*, *shell* o *dispensable genome* está relacionada a la proximidad filogenética de los organismos seleccionados en el estudio. Entre más diversos sean los organismos menos familias dedicadas exclusivamente a metabolismo especializado abundarán en el *core/shell genome*. La diversidad provocará que lo único que tengan los genomas de estos organismos en común sean funciones conservadas por una amplia variedad de especies bacterianas. Ahora bien, muchas familias de metabolismo especializado provienen de reclutamientos de copias extra de familias de metabolismo conservado. Así pues aunque decrezca el número de familias con exclusividad en metabolismo especializado en el *core y shell genome*, estos subconjuntos del pangenoma aún pueden contener familias conservadas que tengan copias extra en proceso de reclutamiento para algún *Cluster* biosintético de genes (BGC) de metabolismo especializado. Considerando las reflexiones anteriores, entre más diverso sea un linaje, más tenderá su *core genome* a contener exclusivamente familias de metabolismo conservado mientras que su *dispensable genome* estará formado mayormente por familias de enzimas del metabolismo especializado.

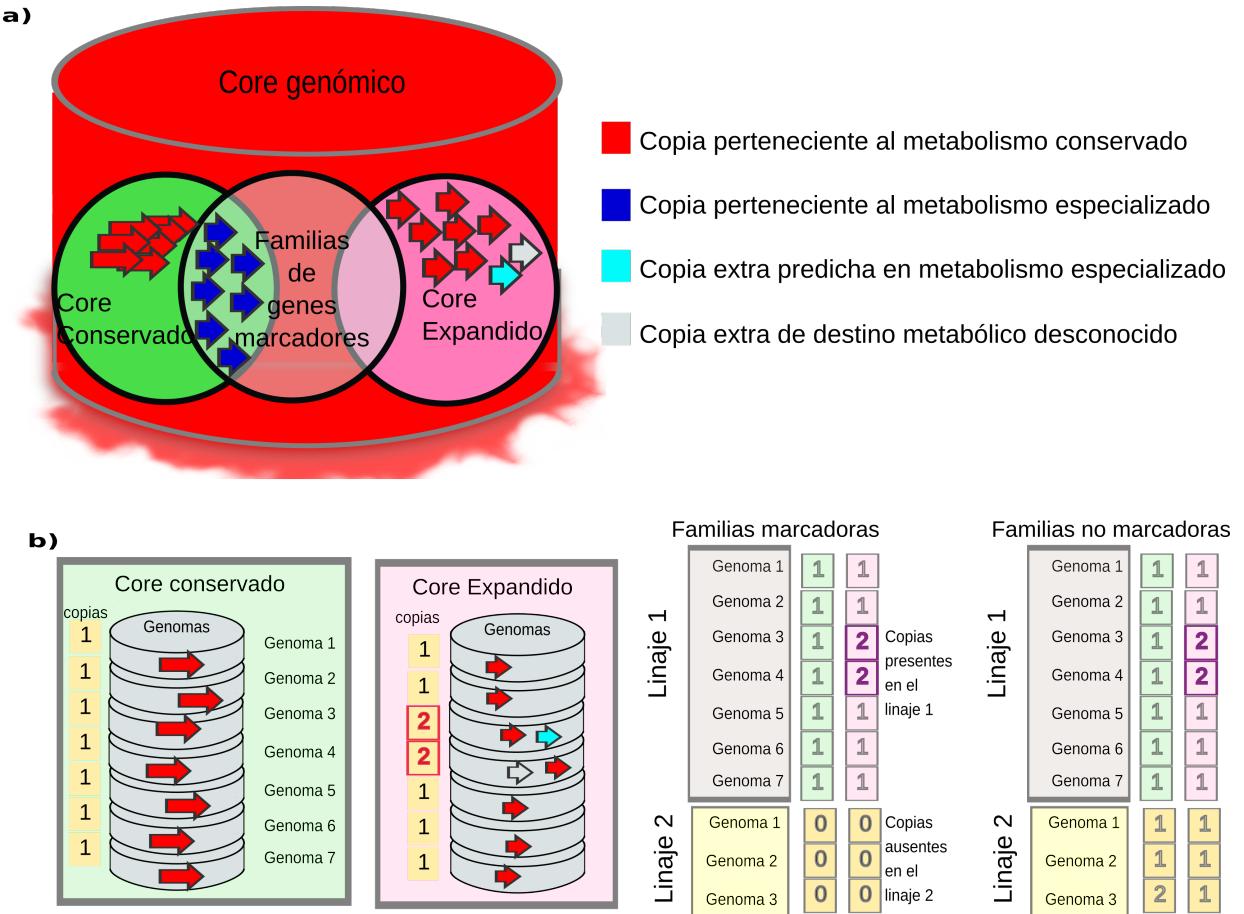


Figura 1.3: El core genome puede contener familias con funciones en distintos grupos metabólicos así como diversidad en el número de copias. Arriba se muestra que en el core pueden coexistir familias tanto de copia única como con expansiones. Las familias con funciones en el metabolismo conservado suelen concentrarse en el *core genome* (rojas), pero también dependiendo de los organismos seleccionados pueden encontrarse ya sea familias enteras o algunas copias dedicadas al metabolismo especializado (azul). No de todas las copias se conocerá su función, algunas pueden tener un destino metabólico desconocido (gris) o bien ser predichas por algún algoritmo como parte del metabolismo especializado (cian). Abajo a la izquierda se comparan familias del *core conservado* con exactamente una copia por genoma contra familias del *core expandido*. Ambas pertenecen al *core*, pero en el *core expandido* hay dos genomas que tienen una copia extra en esta familia, una cian y una gris, que podría dificultar la elección de los verdaderos ortólogos. A la derecha se ejemplifican familias de genes marcadores, útiles para identificar un linaje genómico. Tanto familias del *core conservado* como del *core expandido* pueden ser familias marcadoras, siempre que exista al menos una copia de cada familia en el linaje 1 y ninguna copia en el linaje 2. Las familias dejan de ser marcadoras cuando el linaje 2 contiene al menos una copia en algún genoma.

1.2. El core conservado permite la reconstrucción de filogenias complicadas

Orthocore es el desarrollo bioinformático que realicé para calcular las familias génicas más conservadas del *core genome*. Dos genes son homólogos si poseen un ancestro común, entre los principales grupos de homólogos están ortólogos y parálogos. Los ortólogos provienen de eventos de especiación de un ancestro común mientras que los parálogos evolucionan por eventos de duplicación. Orthocore obtiene un subconjunto del *core genome*: el *core conservado*, es decir, familias de ortólogos presentes en todos los genomas del grupo y que además son libres de parálogos de difícil identificación. El *core conservado* facilita la organización en árboles filogenéticos de organismos de un linaje genómico.

La comparación de la variación molecular entre ortólogos ha sido utilizada para establecer relaciones filogenéticas entre organismos. Esta técnica ha dado lugar a grandes descubrimientos. Por ejemplo comparar la secuencia de la subunidad 16S del gen RNA ribosomal (16S rRNA) condujo a Woese al descubrimiento del dominio Archaea en 1977 [105]. Un árbol de especies suele hacerse con secuencias de familias que pertenecen al *core genome* de un Dominio, por ejemplo las familias 16S rRNA o RpoB en los Dominios Bacteria y Archaea. Algunos autores realizan árboles multilocus para mejorar la resolución de árboles de especies realizados mediante la comparación de secuencias de 16S rRNA. Los genes seleccionados para los árboles multilocus deben estar en todos los organismos y no tener copias extra tan parecidas que puedan confundirse y entorpecer la reconstrucción filogenética, es decir, las familias seleccionadas deben ser parte del *core conservado*. Orthocore automatiza la identificación de estas familias.

Entre los factores importantes para establecer las relaciones filogenéticas que diferencian a las Archaeas de las Bacteria están los siguientes: 1) la presencia conservada de la subunidad de 16S en los dos dominios y 2) la suficiente divergencia entre estas secuencias en los organismos de dichos dominios. Ahora bien, establecer relaciones filogenéticas entre Archaea y Bacteria es en cierto sentido más sencillo que establecerlas entre organismos pertenecientes al mismo género o inclusive a la misma especie. En ocasiones, como en el caso del género *Streptomyces*, la secuencia de 16S rRNA por sí sola no posee la suficiente variación para resolver la filogenia [106]. En *Streptomyces* la variación entre estas secuencias suele ser menor al 1 %. Para resolver el problema de escasa variación en secuencias de 16S rRNA se pueden concatenar las secuencias de otros ortólogos, siempre que estos aparezcan en todos los organismos que se estén estudiando, es decir, siempre que sean parte del core genómico.

1.3. El algoritmo de Orthocore

Orthocore encuentra los genes del *core* conservado en todos los genomas que se le proveen. Para poder ejecutarlo, el usuario tiene que proveer como entrada un conjunto de secuencias genómicas que ya debieron haber sido procesados por RAST, es decir ya deben tener anotaciones funcionales de los genes presentes en dichos genomas. El algoritmo de Orthocore encuentra los genes que están conservados como ortólogos en todas las secuencias y proporciona como salida una matriz con todos los genes y secuencias del *core* es decir, todos los genes que resultaron mejores hits multidireccionales Figure 1.4. Una vez que tiene todas las secuencias realiza una reconstrucción filogenética con las secuencias de aminoácidos y entrega la segunda salida, que es un árbol en formato árbol en formato Newick. Con estas salidas se puede visualizar la filogenia de los organismos en cuestión, identificar cuáles genes son parte del *core*. Una parte central de este algoritmo consiste en determinar cuáles genes realmente son ortólogos confiables para reconstruir la filogenia.

1.3.1. Los mejores hits multidireccionales definen los genes del *core* conservado

Los ortólogos suelen identificarse por similitud de secuencia, pero si se realiza la identificación manualmente también se suelen capturar parálogos que pueden confundir la elucidación de eventos de especiación. Orthocore automatizó la búsqueda de ortólogos y el filtrado de parálogos en genomas procariontes mediante la generalización de la definición del mejor hit bidireccional (BBH por sus siglas en inglés) Figure 1.4. Dos secuencias son BBH si cada una es el mejor hit de un algoritmo de distancia (BLAST usualmente) en el genoma de origen de la otra. Una primera generalización para obtener el set de ortólogos de una familia del core es definir un genoma de referencia y tomar los BBH respecto a ese genoma. En la práctica, esta definición da como resultado distintos resultados según el genoma de referencia, haciendo que algunos parálogos no sean filtrados.

Para solventar esta dificultad se definió en Orthocore el concepto de mejores hits multidireccionales. Un conjunto de genes son mejores hits multidireccionales si todos entre sí son BBH por pares y cada uno de los miembros de ese conjunto de genes pertenece a cada una de las secuencias genómicas. Es decir si cada gen fuera un punto y ser mejor hit se expresara como una conexión con dirección todos los puntos estarían conectados por una flecha de ida y otra de regreso. Con este método se eliminó la dependencia de un genoma de referencia. Esta restricción también ocasiona que en grupos muy grandes por ejemplo más de 100 genomas de distintas especies, o muy diversos de distintos dominios, o muy fragmentados como con contigs de en promedio 3 Mbp, el *core conservado* puede quedar vacío.

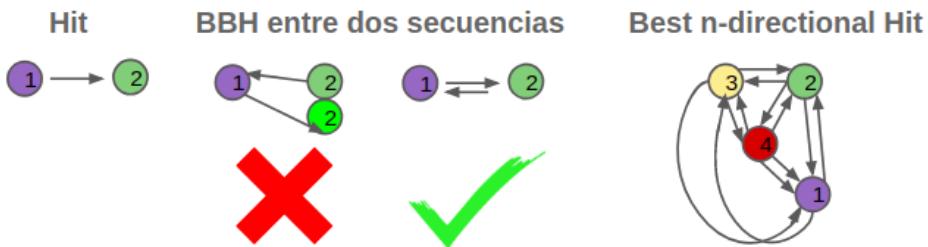


Figura 1.4: Orthocore utiliza los mejores hits n-direccionales para obtener grupos de ortólogos. Un hit es el mejor resultado de una secuencia en otro genoma. Un Bidireccional Best Hit es el mejor hit bidireccional. La secuencia 2 es el mejor hit de la secuencia 1 en el genoma 2 y recíprocamente, la secuencia 1 es el mejor hit de la secuencia 2 en el genoma 1. La existencia de una copia extra muy parecida a la secuencia 2 puede romper el BBH. Un mejor hit n-direccional debe ser BBH todos contra todos garantizando que estas secuencias están muy conservadas entre sí.

1.3.2. Ejecución de Orthocore

Orthocore es un tubería escrita en Perl que incorpora los hits multidireccionales permitiendo obtener y usar el *core conservado* para realizar una reconstrucción filogenética mediante los siguientes pasos:

- Obtiene el *core conservado*: los mejores hits multidireccionales (blastp).
- Alinea cada familia del *core conservado* (MUSCLE).
- Cura automáticamente cada familia del *core conservado* (Gblocks).
- Concatena las familias del *core conservado* formando una alineamiento multilocus de aminoácidos.
- Provee una reconstrucción filogenética que se genera a partir del alineamiento (FastTree). -Provee los genes del *core conservado* y su anotación funcional según RAST.

Existen otros algoritmos como OrthoMCL[62], y fastOrtho[107] que dividen pangénomas en clusters de familias de genes, get_homologues [108] y metaphor que obtienen el *core* y filtran buscando verdaderas relaciones de homología, y finalmente BPGA[109] que hace reconstrucciones filogenéticas tanto según el *core* como según el pangénoma. Sin embargo Orthocore resolvió en su momento la necesidad específica de proporcionar un alineamiento concatenada de genes del *core conservado* lista para utilizarse en un árbol multilocus. Adicionalmente, como Orthocore fue diseñado para trabajar con la anotación de la plataforma RAST, también se obtiene la anotación funcional tanto de familias del *core* como del complemento.

Orthocore incorpora todas las dependencias en un contenedor de docker disponible en <https://github.com/nselem/orthocore>. Además en este contenedor está un script que permite bajar genomas de NCBI masivamente y posteriormente anotarlos en RAST desde la terminal. Los protocolos de uso se encuentran al final de este capítulo.

1.4. Aplicaciones de Orthocore, identificación del *core conservado* y de familias de genes marcadores.

Cuatro aplicaciones de Orthocore serán presentadas en las siguientes secciones de este capítulo. En la primera aplicación el *core conservado* en *Actinomycetales* permitió organizar filogenéticamente a este orden. Esta organización facilitó el entendimiento en cambios de promiscuidad de la familia enzimática PriA mediante la distinción de patrones de pérdida y ganancia de genes en las rutas de síntesis de histidina y triptófano. En la segunda aplicación cepas de *Salmonella* fueron ordenadas filogenéticamente. La tercera aplicación permitió realizar una reconstrucción filogenética del orden *Nostocales* del phylum *Cyanobacteria* y comparar así patrones de presencia y ausencia de clusters de genes biosintéticos. Finalmente, en organismos del microbioma del tomate orthocore de utilizó para identificar genes marcadores que permitieran distinguir cepas de *Clavibacter Michiganensis* de otras especies de *Micrococcaceae*.

1.4.1. Orthocore de *Actinomycetales* para mejorar el árbol de especies

A pesar de que se sabía que miembros de la familia PriA habían sufrido cambios de promiscuidad y de especificidad entre la función HisA de la vía de síntesis de histidina y la función TrpF de la biosíntesis de triptófano [31], se desconocía cómo había ido cambiando la función de esta familia de genes durante los procesos de especiación en *Actinomycetales*. Para eso se necesitaba entender filogenéticamente al orden *Actinomycetales*, el camino que seguimos fue hacer una filogenia con las secuencias de su *core conservado*. Orthocore fue diseñado para resolver este problema. Con el resultado de Orthocore se realizó un árbol de especies donde se observaron patrones de pérdida y ganancia de genes en la vecindad genómica del gen que codifica para PriA. Se encontró que hay clados de *Actinomyces* donde los genes correspondientes a la síntesis de histidina no estaban en la vecindad genómica de PriA, y mediante la realización de cinéticas enzimáticas se comprobó que la actividad de catalizar la reacción correspondiente a HisA estaba perdida en estos organismos. A estas enzimas se les llamó subTrpF ya que sólo poseían la capacidad de catalizar la reacción correspondiente a la familia TrpF. Del mismo modo existían clados que perdieron los genes de síntesis de triptófano en la vecindad de PriA y estas enzimas se subfuncionalizaron a la familia subHisA. De estos datos se observa que en estos organismos la especiación coincidió con el cambio de promiscuidad en la familia PriA, acorde a la pérdida y ganancia de genes vecinos. Este caso es una muestra promiscuidad puede co-ocurrir con variaciones en el contexto genómico, pudiendo estos cambios ser una marca para sugerir cambio funcional en una familia. De esta forma, se pudo concluir que los perfiles de promiscuidad de PriA en el orden *Actinomycetales* se relacionan con la especiación [47].

1.4.2. Uso de Orthocore para entender la evolución de la patogénesis de *Salmonella* en México.

Los genomas conocidos de *Salmonella* en México están tan conservados en sus genes marcadores tradicionales que se dificultaba hacer una filogenia. Esta situación es común en cepas de la misma especie. En este caso era importante relacionar las especiaciones de cepas aparentemente no patogénicas y la evolución de las islas de patogenicidad que se sabía estaban presentes en la mayoría de los aislados.

Por ello, como primer paso se desarrolló una distribución de myRAST en un contenedor de Docker que pudiera usarse en cualquier servidor. Esta tubería prepara los datos para Orthocore al realizar la anotación automática de genomas ensamblados en RAST. El protocolo de myRAST está disponible en github y además puede encontrarse en los apéndices de esta tesis. Después, con los genomas ya anotados, Orthocore fue usado para reconstruir la filogenia de esos aislados de *Salmonella*. Además se buscó cómo fue la evolución de las islas de patogenicidad de esas cepas mediante un análisis de CORASON [110], en el que visualizamos las islas de patogenicidad organizadas filogenéticamente. En este caso se observó una alta conservación de toxinas tifoidales en islas de patogenicidad de *Salmonella*. Éstas fueron identificadas en 76 % de las cepas analizadas. Este análisis se publicó como parte de un trabajo donde además se mostró que las islas de patogenicidad no pueden ser marcadoras de la enfermedad ya que se encontró ganado sin síntomas de la enfermedad pero que sí contenía bacterias con estas islas [104].

1.4.3. Las *Nostoc* provenientes del metagenoma de cíadas están en el mismo grupo filogenético

Cyanobacteria es un phylum de bacterias que se han adaptado a diversos ambientes. Aunque muchas de ellas son marinas algunas Cyanobacterias viven como simbiontes de plantas. En particular las cíadas han desarrollado un tipo especial de raíz donde se sabe que vive como simbionte el género *Nostoc*. La presencia de *Nostoc* en la raíz coraloide de las cíadas es fácilmente distinguible por la formación de un anillo verde conocido como anillo cyanobacterial. En la Figure 1.5 se muestra la filogenia de 76 Cyanobacterias de 7 órdenes distintos construida con 198 proteínas del *core conservado* obtenidas por Orthocore. En esta reconstrucción se puede observar que los *Nostoc* asociados a plantas tienden a agruparse en la filogenia [103] lo que sugiere que entre las cianobacterias de nuestro set de datos pudiera ser que las 3 *Nostoc* provenientes de raíz coraloide provengan de un evento de colonización. Queda por mostrar si esta filogenia corresponde a la de las cíadas simbiontes, lo que sugeriría una estrecha coevolución entre ambos organismos.

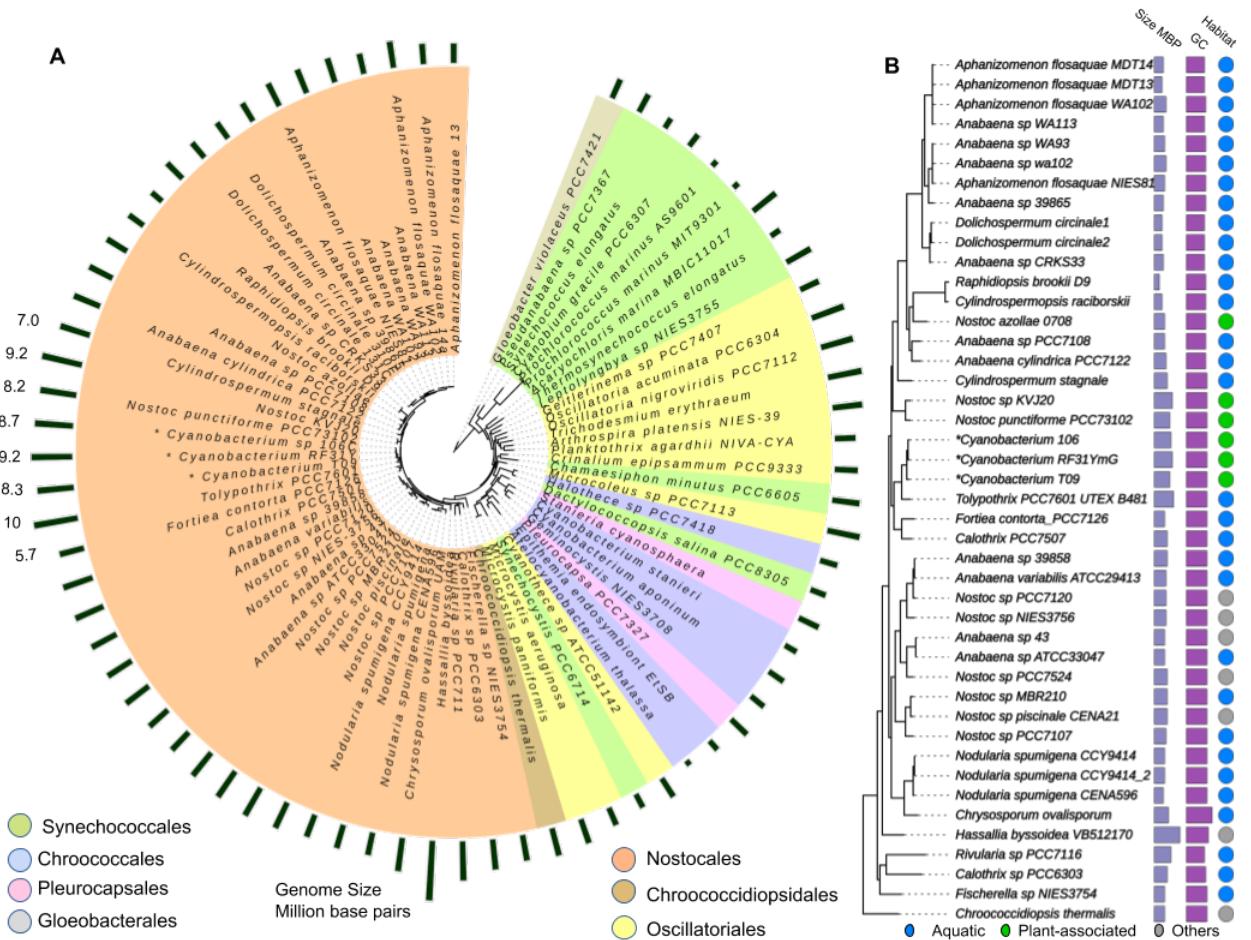


Figura 1.5: Reconstrucción de 76 taxa provenientes de 7 órdenes de Cyanobacteria. La matriz final incluyó 45,475 aminoácidos curados de 198 familias de proteínas pertenecientes al *core conservado*. A la derecha se muestra un zoom sobre el orden *Nostocales*. En este orden se incluyen algunas bacterias simbiontes de cíadas. Metadatos como el tamaño de genoma, contenido de GC y hábitat de origen muestran una posible tendencia de incremento de tamaño en los genomas provenientes del microbioma de plantas.

1.4.4. Identificación de genes marcadores de la bacteria del ‘cáncer del tomate’ *Clavibacter michiganensis*

Los *Micrococcales* es un orden de Actinobacteria que contiene a *Clavibacter*, *Micrococcus* y *Microbacterium*, entre otros microorganismos. El género *Clavibacter* comprende especies que pueden causar enfermedades en diversas plantas. En particular la especie *Clavibacter michiganensis* es una bacteria causante de la enfermedad del cáncer del tomate. *Clavibacter michiganensis* ha sido frecuentemente aislada en compañía de otros *Micrococcales* morfológicamente parecidos. La distinción entre microorganismos debida a la comparación de la secuencia de 16S rRNA no era suficiente para distinguir entre *Micrococcales* del microbioma del tomate, por lo que una prueba de diagnóstico se hacía necesaria. Se habían utilizado como marcadores genes como *tomA*, *ppaC* y *celA* entre otros, sin embargo estas elecciones en ocasiones resultaban en falsos positivos según árboles de especies de 16S rRNA, por lo que nuevos marcadores eran necesarios.

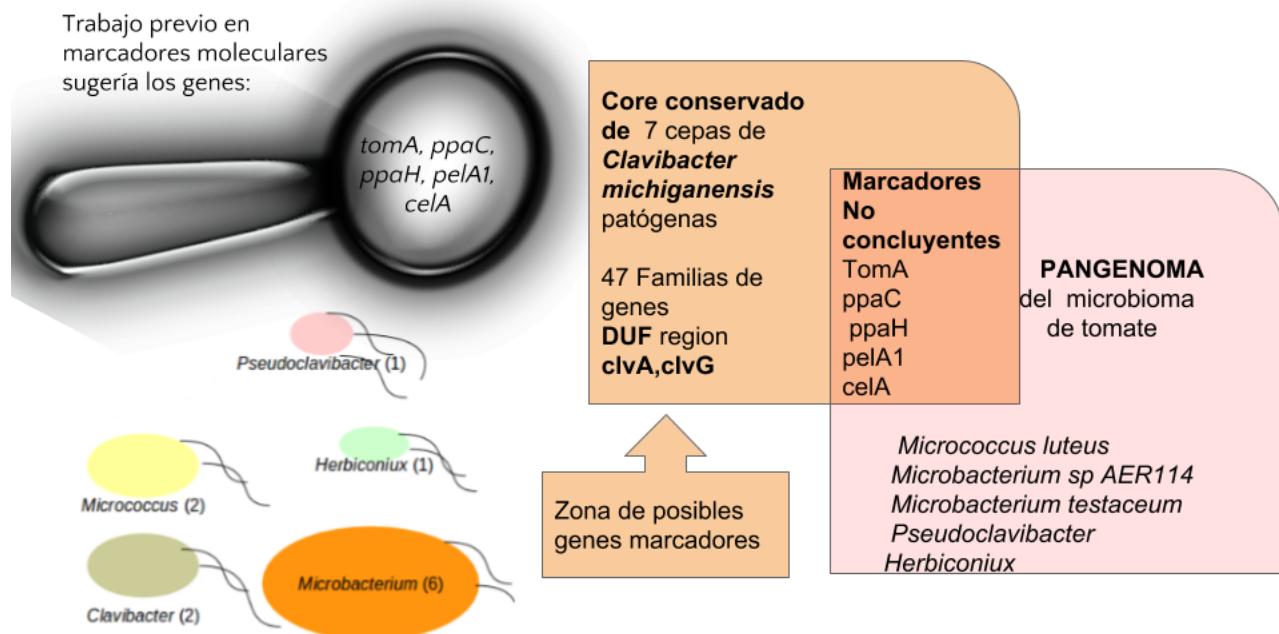


Figura 1.6: Los marcadores moleculares previos a este trabajo no permitían diferenciar correctamente a *Clavibacter michiganensis* respecto al microbioma del tomate en invernaderos mexicanos. Arriba a la izquierda se muestran los antiguos marcadores *tomA*, *ppaC*, *ppaH*, *pelA1*, *celA*. Abajo organismos pertenecientes al microbioma del tomate. Orthocore obtuvo el core conservado de siete cepas de *Cmm* patógenas, y este core se utilizó para definir nuevos marcadores. Aunque *tomA* pertenecía al core conservado de *Cmm*, estaba también incluido en el pangenoma del microbioma del tomate. Después de calcular la intersección core conservado de *Cmm* y pangenoma del microbioma se obtuvieron entre las familias marcadoras genes *clv* parte del cluster biosintético de clavidicina (michiganina).

Al analizar en Orthocore genomas de *Microbacterium* y *Micrococcus* aislados de tomate se encontró que *tomA* y los otros marcadores propuestos previamente no eran exclusivos de *Clavibacter michiganensis* (*Cmm*). Al utilizar Orthocore en siete genomas de *Cmm* encontramos que varios genes del cluster biosintético de michiganina (BGC0000528 en MIBiG) codificado por los genes *clvAFGLKM* pertenecían al core conservado, pero que al agregar los genomas no *Cmm* del resto del microbioma del tomate los genes *clv* se pierden. El descubrimiento de que *clv* pertenecía al core de *Cmm* se realizó con secuencias de genomas muy fragmentados, en la Figure 1.6 se muestran las cepas originales que fueron analizadas.

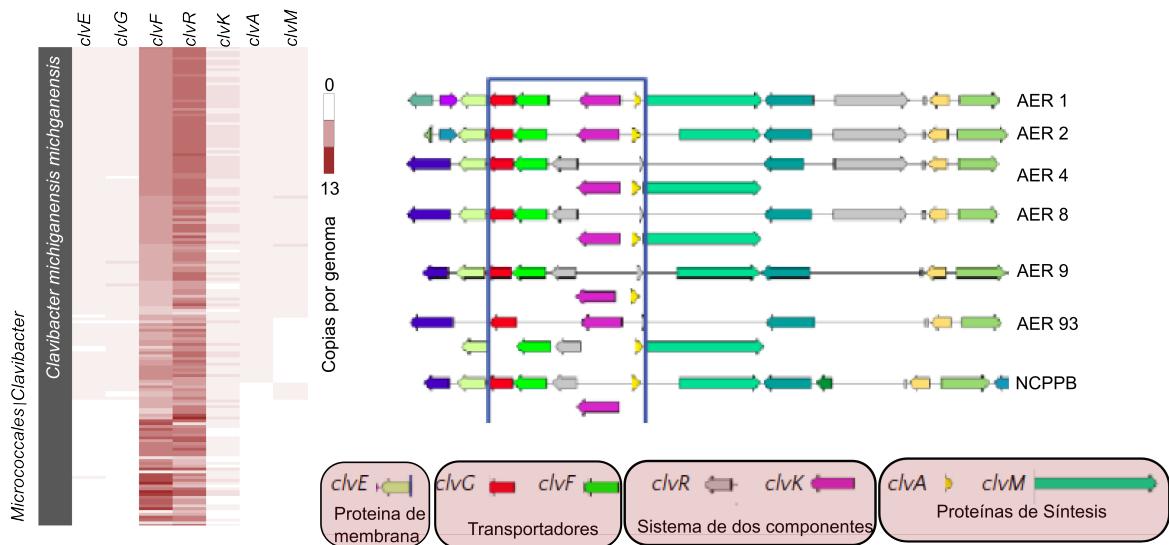


Figura 1.7: El Cluster *clv* es un marcador de la especie *Clavibacter michiganensis* en el orden *Micrococcales*. Los genes *clvEGAM* que son una proteína de membrana, un transportador y dos proteína de síntesis del BGC *clv* están muy conservados en la especie *Clavibacter michiganensis*. *clvFRK*, es decir un transportador y el sistema de dos componentes están presentes en otros *Micrococcales* pero con baja identidad de secuencia y nunca en el contexto del BGC de clavidicina

Esta observación se corroboró con más genomas, Figure 1.7 en este caso se muestran como ejemplo 10 genomas de bacterias del microbioma del tomate, entre ellas siete *Clavibacter*, seis de tomates de invernadero y uno *Clavibacter* proveniente de tomate silvestre y *Clavibacter RA1B*. Con Orthocore vemos que el tamaño del core decrece al ir agregando genomas de *Clavibacter* y decrece aún más rápido al agregar los genomas de *Micrococcus* y *Microbacterium*. La reconstrucción filogenética de este microbioma, ubica a *Clavibacter RA1B* cerca de los otros *Cmm* pero no en un clado junto con ellos. Una búsqueda por blast revela que los genes marcadores de *Cmm*: *clvF*, *clvR* son también marcadores de *Clavibacter RA1B* pero no así *clvA* y *clvG* que solamente están presentes en el core de *Cmm*. Sin embargo *clvF* y *clvR* no están en el contexto del cluster de michiganina en RA1B y su similitud de secuencia es menor que la que se observa entre los otros *Cmm*.

De hecho al considerar más genomas dentro del microbioma del tomate, la familia

clvF no solo no está en el core conservado de *Microbacterium* y *Micrococcus*, sino que no está presente en ningún otro genoma distinto a *Clavibacter*. Con distintos niveles de conservación de secuencia los genes *clv* son un buen marcador para distinguir *Cmm* de otras especies, por esta razón estos genes aún se encuentran en uso como genes marcadores de *Cmm*. Previamente se reportó que las familias *clvA*, *clvF* y *clvG* son exclusivas de *Cmm*, de acuerdo a evidencia experimental [111] pero sin análisis genómicos que confirmaran que esos genes no estaban presentes en otras especies sin ser expresados. Este descubrimiento ha permitido bajar los costos de identificación de *Clavibacter*, ya que ahora en lugar de enviar a secuenciar el genoma es suficiente identificar por PCR *clvF* en conjunto con otros marcadores.

Con Orthocore además de obtener los genes marcadores podemos obtener también la matriz del core conservado para realizar la reconstrucción filogenética de especies cercanas de *Clavibacter* Figure 1.8 . Ya que los productores querían conocer de dónde provienen las bacterias que infectan al tomate con el fin de evitarlas, se determinó la organización taxonómica de cepas de *Cmm* y de otras bacterias del microbioma de tomate. Para esto se han secuenciado y mantenido como datos privados unos doscientos genomas provenientes del microbioma del tomate y se han analizado con Orthocore para obtener matrices multilocus que pueden diferenciar entre cepas de *Clavibacter* de la misma o de diferente especie.

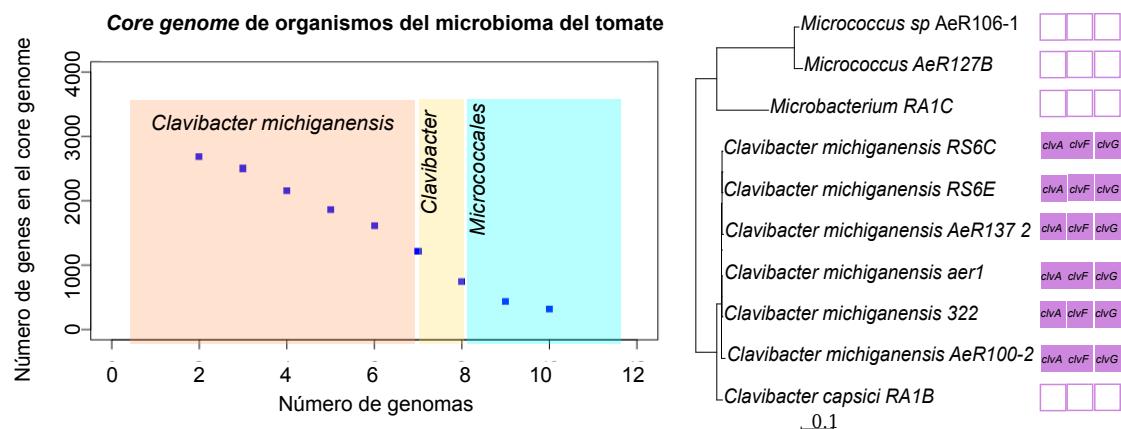


Figura 1.8: El *core genome* de *Micrococcaceae* ayuda a identificar genes marcadores. El *core genome* de siete organismos del microbioma del tomate muestra de

Debido al intercambio génico por transferencia horizontal en las bacterias, es posible que los genes marcadores actuales alguna vez aparezcan en otros organismos. También las bacterias pierden continuamente genes, por lo que es posible que algún gen marcador de *Cmm* se pierda en una cierta cepa . Esto hace que la definición de estar presentes en el core del grupo de interés y ausentes totalmente de cada uno de los genomas de otro linaje ya no funcione completamente. Sin embargo, en estas dos situaciones presentadas, ganancia de genes marcadores de organismos externos al linaje original o pérdida de genes marcadores en algunas cepas, se sigue cumpliendo que los ex genes marcadores, estarán presentes en la mayoría de los organismos del linaje de interés y ausentes de la mayoría de los organismos del linaje externo. Por ello, se pensó que esta definición de genes marcadores se podía generalizar clasificando a grupos de

genes ortólogos acorde a sus porcentajes de ocurrencia. Esta idea se desarrolló en la herramienta Clavvisual, explicada en la siguiente sección.

Clavvisual: Identificación de genes marcadores a un cierto porcentaje de grupos seleccionados

La idea de que Orthocore puede ser usado para obtener los genes marcadores de un grupo taxonómico frente a otro fue generalizada en el software Clavvisual. Ya se ha explicado previamente que el core puede salir vacío por diversas razones, entre ellas baja calidad de los genomas, o que éstos provengan de organismos muy divergentes, verdaderas razones biológicas como dinámica génica o un core no convergente. Así pues, es posible que si sólo se utiliza el core no se obtengan marcadores. Pero el core puede relajarse de varias maneras una de ellas es el Pseudocore, donde en lugar de multidireccional hits se toman BBH a un genoma de referencia. Otra forma es establecer un porcentaje de presencia /ausencia de interés. El pseudocore consiste en utilizar información previa específica del core de un linaje para obtener los genes de y la metodología está depositada en github integrada en el repositorio clavigenomics. El blast fue optimizado cambiando hacer un blast todos contra todos por archivos genómicos individuales *genomai_vs_genomaj.blast* que luego son concatenados según se necesiten.

Los porcentajes de genomas son diferentes porque al no bastar los mejores hits bidireccionales conservados, todo el pangenoma es decir todos los genes contenidos en los genomas del grupo de interés necesitan ser clasificados por familias, para de ahí obtener las familias que tienen presencia en un porcentaje %p y ausencia en un porcentaje a % del grupo externo. Estos perfiles fueron desarrollados para Clavvisual Figure 1.9 utilizando FastOrtho para clasificar las familias y de ahí obtener los grupos. Con ellos se consiguieron marcadores para *Kurtobacterium*.

Finalmente Clavvisual despliega un árbol realizado con el Pseudocore respecto a un conjunto de genes de *Cmm* NCPP previamente seleccionados. En este árbol clavvisual permite la visualización de metadatos, como año, género de la bacteria, estado de salud de la planta e invernadero donde fue aislada.

El pangenoma de *Clavibacter Michiganensis* es abierto

Después de desarrollar métodos de identificación de genes marcadores y generalizarlo a obtener grupos con patrones de presencia/ausencia definidos por el usuario, quedaba por responder la pregunta cómo es el pangenoma de *Cmm*. Algunos autores consideran que el pangenoma de patógenos es reducido porque sus genomas suelen sufrir proceso de reducción de tamaño debido a la pérdida de genes. Como *Cmm* es un patógeno de planta quedaba por investigar cómo es su pangenoma. ¿Es posible saturar el contenido génico de *Cmm* con sólo secuenciar más genomas?. Aunque actualmente existen ya herramientas web para el análisis de pangenoma, en su momento se utilizó el software

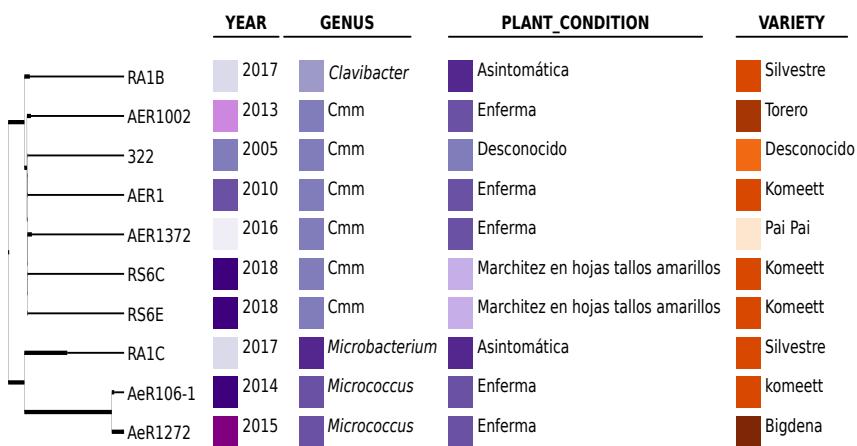


Figura 1.9: Clavisual organiza filogenéticamente cepas de *Clavibacter* y generaliza orthocore. Clavisual no se restringe a la búsqueda del core conservado, permite la identificación de familias conservadas sólo en un cierto porcentaje. Además puede filtrar estas familias permitiendo sólo las que estén ausentes en una proporción mínima de un grupo de genomas de interés. Además orthocore optimiza el funcionamiento de Clavisual ya que fue utilizado para proveer un conjunto de familias génicas conservadas en el género *Clavibacter*. Estas familias son buscadas cada vez que ingresa un genoma nuevo y con ellas se construye un árbol filogenético. Los metadatos disponibles son desplegados al lado de la cepa correspondiente del árbol.

Bacterial PanGenome Analysis Tool que se corre desde la terminal. Para facilitar su instalación se desarrolló un contenedor Docker (ver abajo, descripciones técnicas). Como ejemplo de su funcionamiento, se analizó el pangenoma de los mismos diez genomas del tomate utilizados en la visualización de clavisual Figure 1.10 . Tomando otros siete genomas del género *Clavibacter*, utilizando OrthoVenn tenemos la misma observación, el número de familias de genes agregadas al adicionar genomas, es después de siete genomas casi tan grande como su core Figure 1.11.

1.5. Relación entre genes marcadores, Orthocore y la promiscuidad enzimática.

Orthocore es pues una herramienta para detectar el *core conservado*, es decir los genes del *core genome* que o bien no tienen copias extra o éstas son tan diferentes de la copia primaria que no pueden ser confundidas con ella. En este capítulo aprendimos que los genes marcadores son parte del *core conservado* de un grupo taxonómico, pero no necesariamente se dedican a lo que se entiende como metabolismo central en procariotes. Es decir el *core conservado* no sólo está compuesto por rutas centrales como la síntesis de aminoácidos o la glicólisis. Como ejemplo de ello se mostraron familias pertenecientes al cluster de clavidicina *clvABCDEF* que pertenecen al *core conservado* de la especie *Clavibacter michiganensis* pero que salen del core cuando se considera todo el linaje de *Micrococcales*, i.e. no son parte del metabolismo central de ese orden. Estas consideraciones nos explican que no hay una relación uno a

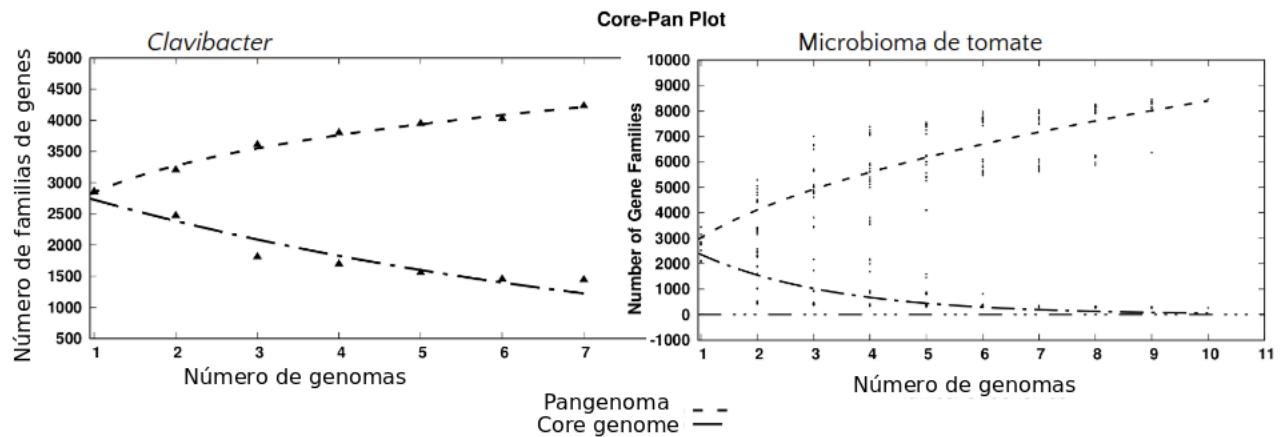


Figura 1.10: El pangenoma de *Clavibacter* es abierto según el análisis de BPGA. En este ejemplo el pangenoma de *Clavibacter* se mantiene creciente mientras que el core no alcanza el cero. En contraste, al ampliar el rango taxonómico el *core genome* sí se acerca a cero según BPGA

uno entre metabolismo central y genes del core. Según el linaje que se considere existen genes del core que no son esenciales, y existen también genes de metabolismo conservado en Bacteria que no están en el core de un linaje, como por ejemplo TrpF en Actinobacteria.

Así pues en este capítulo aprendimos que con Orthocore podemos detectar los genes del *core genome* que no tienen copias extra. En oposición, en el siguiente capítulo veremos qué pasa con los otros genes del core, los que sí tienen copias extra. Estas familias de genes como se mencionó en la introducción son interesantes porque pueden presentar promiscuidad enzimática debido a la retención de la función ancestral. Sin embargo, las familias expandidas no necesariamente tienen que provenir del core. El siguiente capítulo veremos que el *shell genome* también puede presentar expansiones y que varias de ellas han sido reclutadas al metabolismo especializado. Esta búsqueda y clasificación de familias que han sido expandidas mediante copias extra fue sistematizada en el desarrollo de la herramienta EvoMining que es de lo que trata el siguiente capítulo.

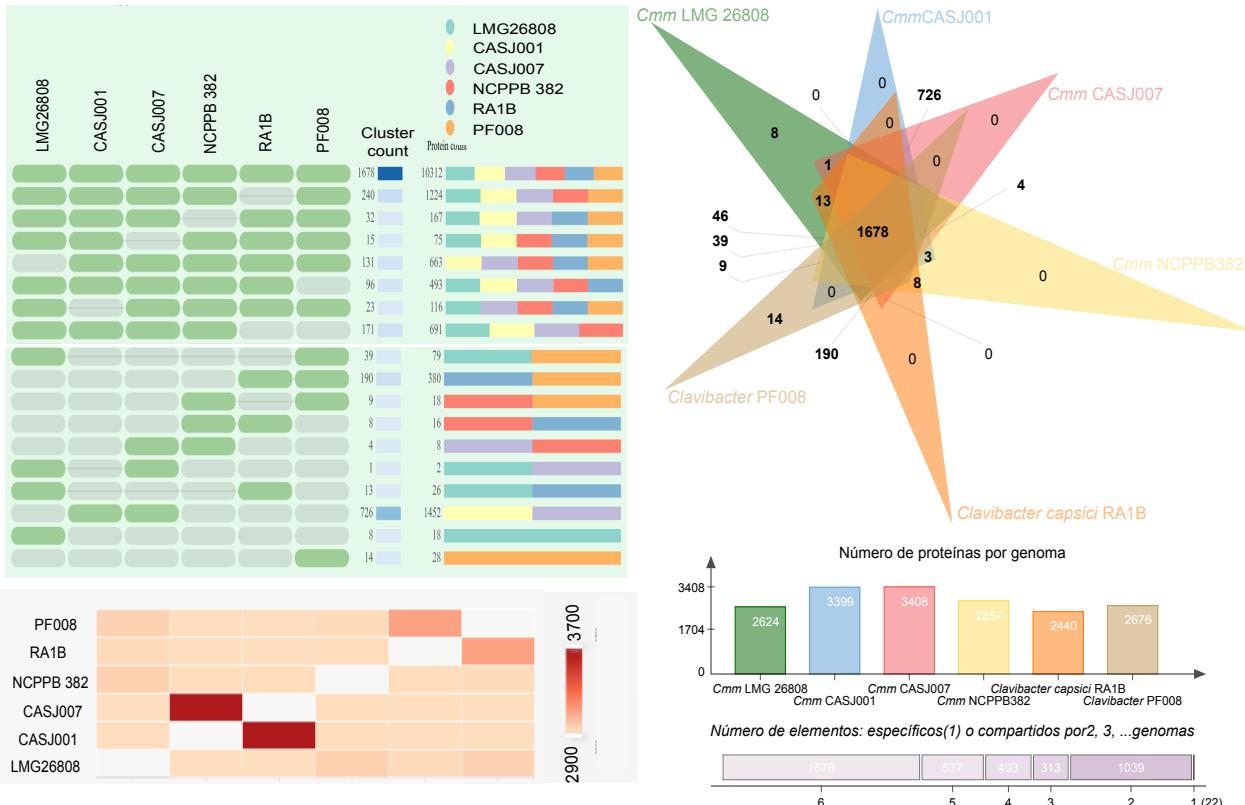


Figura 1.11: Diagrama de Venn del pangenoma de genomas selectos del género *Clavibacter*. Venn-Chart permite visualizar la distribución de las familias génicas mediante un diagrama de Venn siempre que sean pocos genomas. En la parte superior izquierda se muestra el número de familias compartidas entre distintos grupos de genomas. Por ejemplo existen 1678 familias génicas compartidas entre los seis genomas. Entre los grupos de cinco genomas, el más abundante es el que no contiene a RA1B con 243 familias, así pues RA1B es de los genomas más divergentes de este grupo.

Capítulo 2

EvoMining como herramienta para identificar el origen y el destino metabólico de familias enzimáticas

2.1. Introducción

2.1.1. Las copias extra de familias enzimáticas que son reclutadas para una nueva función están relacionadas con la promiscuidad.

La promiscuidad enzimática puede buscarse en familias envueltas en procesos de divergencia funcional [1]. Uno de dichos procesos es la expansión de familias pertenecientes a rutas metabólicas conservadas y su posterior reclutamiento hacia nuevo metabolismo [82]. Dentro de cada familia los niveles de promiscuidad pueden variar en cada ortólogo [40]. Cuando se identifica que en una misma familia de enzimas existe un subgrupo de homólogos con una función del metabolismo central bien caracterizada y al menos otro homólogo con evidencia experimental de poseer otra función bioquímica, se puede inferir que la neofuncionalización probablemente ocurrió a través de promiscuidad enzimática. Los homólogos con la función ‘secundaria’ suelen ser producto de expansiones previas de genes con la función ‘primaria’ [71]. Muchas mutaciones son neutrales a la función primaria[15], por lo que esta puede ser retenida temporalmente cuando se está ganando una nueva función. EvoMining es un algoritmo que sigue esta estrategia para sugerir cambios en la promiscuidad de una familia de enzimas dentro de un linaje definido por el usuario. Al cambiar la familia de enzimas en la que se buscan neofuncionalizaciones se puede encontrar cuáles familias han sido más frecuentemente promiscuas dentro de un linaje, mientras que si se busca cómo han evolucionado las funciones conocidas de una misma familia en distintos linajes se pueden descubrir

los patrones característicos de cada grupo de organismos. Además de que EvoMining permite analizar los orígenes y destinos metabólicos de las familias enzimáticas para entender la evolución del metabolismo, también permite la identificación de rutas de metabolismo especializado que frecuentemente conduce al descubrimiento de nuevos productos naturales.

Los productos naturales o metabolitos especializados son sintetizados generalmente por *clusters* de genes distribuidos en un pequeño porcentaje de los organismos de un linaje taxonómico. Estos *clusters*, conocidos como BGC (*Biosynthetic Gene Clusters*), contienen copias extras de genes de familias que pertenecen al metabolismo conservado. En este trabajo aprovechamos que en la actualidad es posible predecir nuevos BGC mediante estrategias bioinformáticas gracias a la gran cantidad de secuencias disponibles públicamente así como la facilidad para secuenciar nuevos genomas. La similitud de secuencia de los genes que pertenecen a los BGC así como su sintenia en diversos organismos de un linaje hacen que genómica comparativa sea de utilidad para intentar localizarlos.

En este capítulo se explica el desarrollo de EvoMining como plataforma bioinformática dedicada a presentar una visualización del origen y destino de todas las copias de familia escitonemina enzimáticas provenientes del metabolismo conservado. Se discutirá también la evolución de las expansiones de familias génicas en cuatro linajes genómicos Actinobacteria Cyanobacteria, *Pseudomonas* y Archaea. Finalmente se analizarán BGC que fueron detectados a partir del uso de EvoMining con énfasis en el de la escitonemina.

2.1.2. EvoMining es un paradigma que permite ubicar copias extra de familias enzimáticas y organizarlas visualmente acorde a eventos evolutivos para encontrar BGC no tradicionales

Existen varias clases de BGC que son arquetipos de los productos naturales. Entre ellas se encuentran las clases *non ribosomal peptide synthetase* (NRPS), *poliketide synthase* (PKS), terpenos, péptidos ribosomales modificados post-traduccionalmente (RIPPs), alcaloides, etc. En estas clases, hay enzimas cuya presencia lleva a la detección de los BGC. Por ejemplo, las sintetasas no ribosomales son las que al encontrarlas dan nombre a los BGC tipo NRPS y las policétido sintetasas son las que dan nombre a los BGC de la clase PKS. No todos los productos naturales están dentro de los BGC clásicos. Dentro de MIBiG v1.3 (la base de datos de BGC caracterizados experimentalmente) hay 231 BGC [112] (12,7 %) clasificados como “otros”, que de hecho carecen de PKS, NRPS o cualquiera de las otras clases de enzimas características del metabolismo especializado. Como ejemplo se muestra la Figure 2.1 donde se aprecia que un porcentaje de los BGC reportados tanto en Actinobacteria como en Cyanobacteria pertenece al grupo “otros”. La ausencia de enzimas biosintéticas conocidas hace que estos BGC sean “atípicos”, difíciles de identificar. Los BGC no tradicionales suelen pasar desapercibidos porque

no hay conocimiento previo de ellos que permita reconocerlos.

EvoMining implementa una estrategia de búsqueda de divergencia del metabolismo conservado en lugar de la estrategia de búsqueda de similitud con metabolismo especializado, lo que permite identificar BGC que no pertenecen a ninguna categoría del metabolismo secundario previamente descritos. Para ello facilita la identificación de las ramas divergentes en el registro de secuencias de una familia de enzimas analizada a través de la evolución y las utiliza como una marca que sugiere funciones divergentes del metabolismo conservado. De esta forma se puede localizar alguna enzima de un BGC no clasificado. Como ya se mostró en EvoMining 1.0 encontramos una enzima que ya no hace la reacción sobre el metabolito con fósforo sino con un análogo que tiene arsénico en su lugar Figure 4. Luego de identificar esta enzima divergente de su homóloga de metabolismo central pudimos identificar que era parte de una región que además mantiene la sintesis en un clado de los *Streptomyces*. Este descubrimiento constituyó el primer caso de un BGC con química nueva predicho a partir de secuencias de enzimas que eran divergentes de sus homólogas de metabolismo central [113]. Otro ejemplo de este escenario es el BGC de la escitonemina [114], un pigmento cianobacteriano que absorbe luz UV. Su biosíntesis requiere de ScyB y ScyA, dos enzimas que sostienen la síntesis de este metabolito especializado [115]. Curiosamente, ScyB y ScyA son homólogos distantes de la glutamato deshidrogenasa (GDH) y la acetolactato sintasa (ALS), que participan en la desaminación oxidativa reversible del glutamato a α -ketoglutarato y amoníaco [117] y en la síntesis de aminoácidos de cadena ramificada [118], respectivamente. Una descripción amplia del origen y destino de las enzimas del BGC de escitonemina será provista en este capítulo.

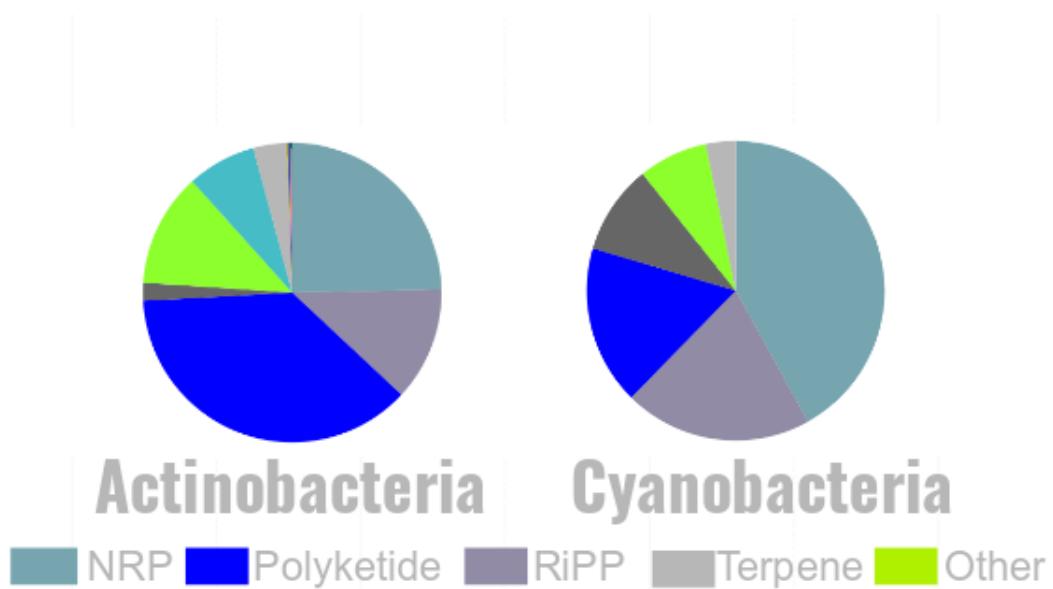


Figura 2.1: Existen cluster biosintéticos no clasificados (other) entre los reportados en MIBiG

2.2. Algoritmos y bases de datos de EvoMining 2.0

EvoMining está compuesto de dos algoritmos: el primero que utiliza a la familia semilla para encontrar todos miembros de la familia entre todos los genomas blanco para así detectar genomas donde haya habido expansiones e identificar a todos los miembros de la Familia Expandida (FE) y luego busca cuáles homólogos seguramente tienen la misma función que las secuencias semilla y cuales otros miembros de la familia son más similares a genes que han sido reclutados por BGCs de acuerdo a reportes previos. El segundo algoritmo permite la visualización de todas las copias de una familia expandida en un árbol clasificadas según sus posibles destinos metabólicos. Para ello, los algoritmos EvoMining necesitan tres bases de datos: i) los genomas blanco, ii) las secuencias de enzimas semilla, y iii) la de productos naturales verificados.

2.2.1. Algoritmo de expansión y clasificación de grupos de homólogos.

La primera parte de la minería genómica evolutiva de EvoMining consiste en detectar las expansiones de la familia semilla y clasificar los homólogos que son muy similares a la secuencia de las enzimas con la función primaria separándolos de los que son más similares a genes que han sufrido reclutamientos a BGC. Este algoritmo requiere las siguientes entradas:

- a) Secuencia semilla (Enzyme DB). Es una secuencia o un conjunto de secuencias de la misma familia que serán interpretadas como las enzimas con una función primaria. Por esta razón es importante que el usuario haga una curación minuciosa en la que se sugiere que utilice genes con evidencia experimental que sí sean de una familia enzimática única y conservada. La implementación actual de EvoMining 2.0 permite que se introduzcan en el archivo de entrada varias familias bien identificadas simultáneamente, sin embargo el algoritmo procesa una familia a la vez.
- b) Base de datos de genomas blanco (Genome DB). Son las secuencias genómicas de todos los organismos en los que se quiera realizar el análisis. Se recomienda que los genomas incluidos pertenezcan a un mismo linaje taxonómico.
- c) Base de datos de genes reclutados a BGC (NP DB). La versión actual utiliza MIBiG, que contiene genes de BGC que se han demostrado experimentalmente.

La primera parte de este algoritmo consiste en identificar las Familias Expandidas (FE). Una FE consiste en todas las copias detectadas mediante una búsqueda con BLASTp, e-value de 0.001 y bitscore de 100, usando como *query* las secuencias de aminoácidos de las enzimas semilla (Enzyme DB) y como base de datos de búsqueda las secuencias de genomas blanco de un linaje taxonómico (Genome DB). En la primera versión de nuestro trabajo definimos que un organismo poseía una expansión si el

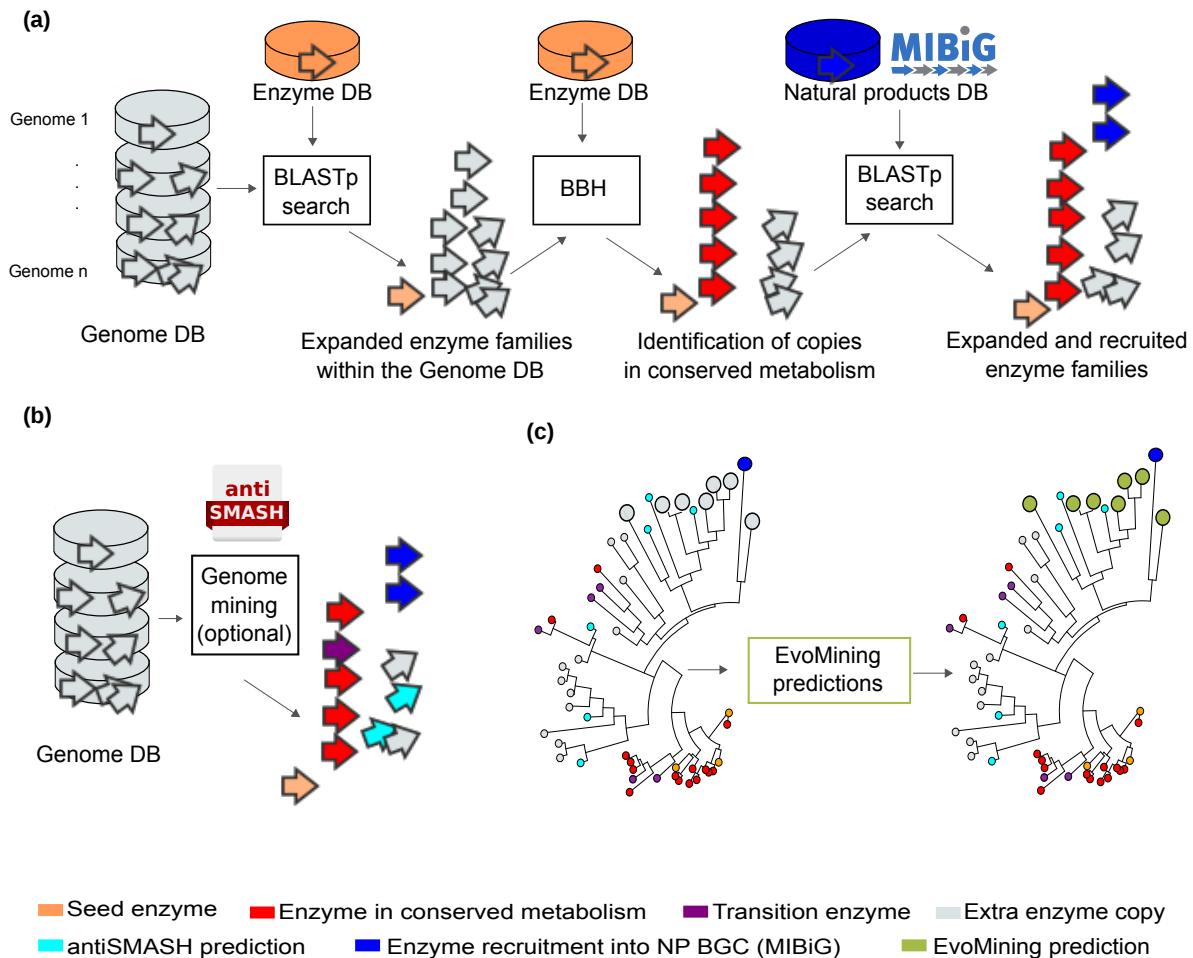


Figura 2.2: Representación de la tubería bioinformática de los dos algoritmos que componen EvoMining. a) Algoritmo de expansión - clasificación/reclutamiento. Se ingresan la Enzima DB (cilindro anaranjado) y la Genome DB (cilindros grises) para identificar por medio de BlastP a todos los que sean miembros de la Familia de las enzimas en Enzima DB, luego se identifican los ortólogos de la base de datos de enzimas (Flechas rojas), finalmente se buscan homólogos de la familia similares a genes reclutados a BGC (Flechas azules), b) EvoMining toma en cuenta las predicciones de antiSMASH. Cuando un gen es encontrado como miembro de un BGC predicho por antiSMASH se colorea de cian, o bien de morado si había sido detectado también como parte del metabolismo central (rojo). c) El Algoritmo de visualización muestra un árbol donde cada homólogo de la familia expandida tiene una código de color que lo clasifica como se describe en la leyenda

número de copias de una familia estaba por encima del promedio mas dos desviaciones estándar. Siguiendo esta definición EvoMining colorea en un heat plot las expansiones de las familias enzimáticas respecto a un linaje taxonómico, señalando explícitamente el número de copias de cada familia que se haya agregado como semilla (Figure 2.6 panel b).

Una vez detectados todos los homólogos de la FE sigue encontrar a los ortólogos más parecidos a las enzimas semilla de la Enzyme DB mismos que son identificados por *Best Bidirectional Hit* (BBH). Estos ortólogos serán considerados parte del metabolismo conservado y serán posteriormente identificados con color rojo en la visualización. Se infiere que son enzimas que tienen la misma función que las semillas. Por otra parte, las copias extra de la familia expandida hasta este punto son enzimas de las que no se conoce el destino metabólico. Es posible que en los pasos subsecuentes de EvoMining sean reconocidas como posibles reclutamientos a metabolismo especializado con el uso de antiSMASH y MIBiG. En otro caso permanecerán como copias extra con destino metabólico desconocido.

El último paso de este algoritmo consiste en encontrar miembros de la familia que se encuentren reclutados a BGC reportados anteriormente. En este paso definimos un reclutamiento como una copia extra de una familia de metabolismo conservado que ahora participa en un *cluster* de metabolismo especializado. Ejemplos de reclutamientos conocidos han sido observados en BGC reportados en MIBiG. En esta parte, los homólogos de la FE que tengan alta similitud con algún gen de MIBiG se clasifican como casos de reclutamiento. Una vez obtenidas las FEs expandidas e identificado los ortólogos del metabolismo central, se conduce una nueva búsqueda con BLASTp, E-value 0.001, utilizando las EFs como *queries* contra la base de datos NP DB, la de enzimas biosintéticas presentes en BGC. Podrían utilizarse otras bases de datos que contengan enzimas con un destino metabólico conocido en lugar de NP DB. Hasta este punto se tienen clasificados los genes con la función primaria y en este paso se designan los que tendrían una función divergente. Es posible agregar un análisis opcional en el que se agregan predicciones de los genes que están en BGC de acuerdo a las predicciones de antiSMASH. AntiSMASH busca secuencias con dominios conocidos de BGC tradicionales en la base de datos de genomas blanco (Genome DB) y además busca entre los genes circundantes la presencia de otras enzimas que ya hayan sido reclutadas a BGC conocidos. Si alguna enzima de la FE es detectada por antiSMASH nos será también útil para identificarla como el producto de una expansión que está en proceso o se ha neofuncionalizado. La minería genómica tradicional realizada por antiSMASH no es parte de la tubería de EvoMining, pero las predicciones de antiSMASH pueden ser calculadas previamente por el usuario y utilizadas por EvoMining. En este trabajo antiSMASH 3.0[119] fue utilizado en los secuencias de los genomas de la Genome DB Figure 2.2 panel (b).

Los usuarios de EvoMining, por lo tanto, deben definir de antemano las familias enzimáticas semilla más apropiadas para un determinado grupo taxonómico. El Enzyme DB seleccionado debe contener un conjunto de familias donde se puedan detectar los patrones de expansión. A su vez, las familias con una distribución restringida a

un pequeño porcentaje de genomas no son adecuados para el análisis de EvoMining, situación que se puede detectar en el heat plot en el primer paso del primer algoritmo de EvoMining. También es importante determinar qué familias enzimáticas están compartidas por la mayoría de los genomas dentro de los linajes genómicos de interés, y si esto es importante para el tipo de análisis de EvoMining que se realizarán. El EvoMining DB original incluía las familias curadas manualmente que solo incluían enzimas metabólicas centrales, pero éstas no representaban el repertorio enzimático central de Actinobacteria. Esto se relaciona con la dificultad de definir qué es el metabolismo central; por lo tanto, preferimos utilizar el término enzimas centrales en diferentes umbrales de conservación. En nuestro caso, usamos 50 % para definir las enzimas del *shell*. Esta noción implica la posibilidad de automatizar la integración de Enzyme DB mediante la selección de familias enzimáticas en cualquier linaje genómico dado, evitando la necesidad de definir arbitrariamente qué es el metabolismo central.

En conclusión el algoritmo de expansión - clasificación/reclutamiento trabaja para identificar tres clases de copias en las familias enzimáticas expandidas y tiene como resultado tres salidas. La primera es una matriz que contiene el número de genes de cada familia semilla por cada genoma que se haya provisto y que puede ser visualizado e interpretado independientemente de los otros resultados y procesos de EvoMining. La segunda es una tabla por cada FE que enlista todos los homólogos pertenecientes a ella así como su identificador de a qué categoría pertenece, (i) copias altamente conservadas con algún miembro en el metabolismo conservado; (ii) reclutamientos conocidos en BGC de productos naturales; y (iii) copias extra que no son reclutamientos conocidos ni parte obvia del metabolismo conservado, quedando por definir su destino metabólico. La última salida son las secuencias de los genes de la FE, que servirán para hacer un análisis de su evolución mediante una filogenia en el siguiente algoritmo de visualización.

2.2.2. Algoritmo de reconstrucción filogenética y visualización

Una vez que se tienen definidos los genes de una familia expandida (FE) de enzimas y que ya se conoce cuáles de los homólogos realizan la función primaria así como los que han sido reclutados a BGC para realizar una función divergente, en este algoritmo se visualiza esa información junto con la inferencia de los genes que no han sido clasificados todavía. Para eso se alinean las secuencias de la FE y se construye un árbol filogenético para luego visualizar cada uno de los homólogos como una hoja del árbol con un código de color que clasifica de acuerdo a la inferencia de origen-destino.

Las secuencias de la FE detectadas por el algoritmo de búsqueda - clasificación/reclutamiento se alinean con muscle v3.2 y son curadas con Gblocks. Las posiciones ausentes en más del 50 % de las secuencias se filtran y remueven del alineamiento final. Para reconstruir filogenéticamente la historia de las enzimas

se utiliza FastTree 2,1[120] que es un método muy rápido pensado para miles de secuencias que utiliza un algoritmo definido como “aproximadamente máxima verosimilitud”. Así se obtiene un árbol en formato newick, mismo que puede ser utilizado con el software de visualización de Microreact[121] y que también es usado por EvoMining para ser visualizado en su propia plataforma.

Los árboles visualizados en EvoMining diferencian entre la función metabólica de cada miembro de una familia génica mediante un código de color Figure 2.2 panel (b, c) . Las secuencias más conservadas se identifican mediante BBH contra la Enzyme DB, los hits de este proceso son considerados copias de metabolismo central, y son marcadas en rojo. En el otro extremo están los reclutamientos conocidos con alguna evidencia experimental que fueron reportados en MIBiG[112]. Estos reclutamientos son marcados en azul. Una vez definidos estos dos grupos, una predicción de EvoMining es definida como aquellas hojas sin una categoría definida en el primer algoritmo y que están más cerca de una hoja azul que de una hoja roja. Es decir, son los homólogos que están en ramas del árbol que contienen genes descritos como reclutados por BGC y que no están en ramas de los homólogos con la función primaria. Estas predicciones consideradas con más posibilidades de pertenecer al metabolismo especializado que al conservado, son coloreadas en verde Figure 2.2 panel (c).

Además de los tres destinos metabólicos descritos marcados respectivamente en rojo, azul y verde, se puede opcionalmente agregar información predicha por antiSMASH. Cuando el usuario provee resultados de antiSMASH sobre qué genes pertenecen a un BGC que contiene una enzima típica de metabolismo especializado, estos se colorean en cían y son llamados predicciones antiSMASH. Si una secuencia es al mismo tiempo predicción EvoMining y predicción antiSMASH se colorea cían y se ignora el verde para enfatizar en los verdes las posibles novedades químicas. Cuando una secuencia está en la intersección de las reconocidas como metabolismo conservado marcada como roja y predicción de antiSMASH es decir color cían entonces es coloreada de púrpura. Estas enzimas de intersección entre metabolismo conservado y metabolismo especializado son definidas como enzimas de transición ya que se podrían pertenecer al metabolismo conservado, al especializado o a ambos. Además las enzimas de transición suelen estar en ramas intermedias entre ramas de metabolismo conservado y ramas de metabolismo especializado. Finalmente para todas las copias extra que no fueron marcadas como rojas, azules, verdes, cianes o púrpuras se les asigna el color gris. Así pues gris son aquellas hojas del árbol de las que no se tiene un clave sobre su destino metabólico, estas secuencias son llamadas de destino metabólico desconocido.

En este trabajo se diseñó e implementó el código para hacer el visualizador de EvoMining que permite hacer zoom en las ramas de interés además de que tiene links en las hojas azules que llevan al BGC en la página de MIBiG. También tiene la función de que cuando se seleccionan hojas de otro color se expande un recuadro que muestra un mapa del contexto genómico de ese homólogo. Finalmente, este algoritmo también produce archivos de salida con otros metadatos como el número de copias por organismo y para que los árboles producidos por EvoMining sean compatible con la visualización de Microreact[121].

2.2.3. Actualizaciones de las bases de datos de EvoMining

Tres bases de datos son requeridas como variables de inicio de EvoMining, la primera es el conjunto de secuencias de genomas de un linaje, esta base fue llamada Genome DB. La segunda es un grupo de secuencias de enzimas de metabolismo conservado llamada Enzyme DB. La base de datos se secuencias de genes que pertenecen a un cluster biosintético de metabolismo especializado es abreviada como base de datos de productos naturales o por sus siglas en inglés NP DB. Las transformaciones que sufrieron estas bases de datos desde la primera versión de EvoMining hasta este trabajo están resumidas en la tabla uno y serán descritas a continuación.

-**Genome DB** La primera versión tenía 230 genomas de Actinobacteria, incluyendo 50 géneros diferentes. Gracias a la explosión de datos genómicos disponibles, en EvoMining 2.0 ahora tiene 1245 genomas, incluyendo 193 géneros diferentes. Así pues, adicional a la actualización de Actinobacteria donde fue la primera vez que una prueba de concepto de EvoMining fue probada, tres nuevas bases de datos Genome DBs fueron integradas, incluyendo Cianobacteria (416 genomas), *Pseudomonas* (219 genomas) y Archaea (876 genomas). estas bases están disponibles en el repositorio de datos público Zenodo con identificador [DOI 10.5281/zenodo.1219709](https://doi.org/10.5281/zenodo.1219709). Estos taxa fueron elegidos por su diversidad de exploración respecto a BGC, por ejemplo Actinobacteria posee 602 MIBiG BGC, Cianobacteria cuenta con 60 MIBiG BGC y *Pseudomonas* 53 MIBiG BGC. Estos tres taxa han sido ampliamente explorados experimentalmente y su riqueza metabólica está fuera de duda; en contraste Archaea sólo posee 1 BGC en la nueva versión MIBiG (v.1.4), y no había ninguno al tiempo de la realización de este trabajo (v.1.3). Por esta razón, incluir el dominio Archaea en los análisis permitía explorar espacios metabólicos previamente ignorados en la minería genómica.

Las predicciones de EvoMining se basan en identificar expansiones de familias de enzimas en lugar de buscar BGC completos, por esta razón los borradores de genomas con un promedio de al menos 5 genes por contig también pudieron ser incluidos en la base de datos Genome DB. Los genomas elegidos fueron recopilados de la base de datos pública NCBI tal y como estaba disponible en Enero de 2017. Las secuencias de DNA de estos genomas fueron anotadas como aminoácidos por la plataforma RAST[92] que a su vez realiza anotaciones funcionales basadas en la homología con otras secuencias con funciones descritas. Estos genomas, previo al análisis de EvoMining fueron minados por antiSMASH[119] con un parámetro `cf_threshold` de 0.7. Estos resultados fueron suministrados como una base de datos interna, la antiSMASH DB para finalmente esta información ser incorporada a los árboles de EvoMining.

-**Enzyme DB** La versión previa de la base de datos de EvoMining Enzyme DB comprendía 106 FEs, de metabolismo central de acuerdo a reconstrucciones metabólicas de los organismos *Streptomyces coelicolor*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Corynebacterium glutamicum* [61]. Estos 106 EFs comprenden 339 secuencias de aminoácidos de Actinobacteria, que fueron usadas como secuencias semilla. En la versión actual,

las 106 familias fueron filtradas hasta quedar sólo 42 que están presentes en Cianobacteria, *Pseudomonas* y Archaea. Durante el proceso de selección se escogieron genomas semilla que estuvieran contenidos en un sólo contig para evitar excluir familias debido a huecos debidos a problemas técnicos relacionados a la secuenciación o al ensamble de los genomas. Los genomas semillas son los proveedores de las secuencias semilla que conforman la base de datos Enzyme DB. Para Cyanobacteria, los genomas seleccionados son *Cianothece* sp. ATCC 51142 , *Synechococcus* sp. PCC 7002 y *Synechocystis* sp. PCC 6803; para el género *Pseudomonas*, se escogieron *Pseudomonas fluorescens* pf0-1, *Pseudomonas protegens* Pf5, *Pseudomonas syringae* y *Pseudomonas fulva* 12-X; y para el dominio Archaea, los elegidos son *Natronomonas pharaonis*, *Methanosarcina acetivorans*, *Sulfolobus solfataricus* y *Nanoarchaeum equitans* Kin4-M. Las enzimas semilla que conforman la base Enzyme DB, fueron determinadas en los genomas semilla de cada linaje mediante BBH contra la base de datos de secuencias de metabolismo conservado original de EvoMining, la Actinobacteria Enzyme DB [61]. La herramienta Metaphor [81] fue implementada para obtener los BBH, se filtraron aquellas secuencias con menos del 30 % de identidad en un alineamiento del 80 % de la secuencia de las dos proteínas. Como resultado, las 106 familias de Actinobacteria quedaron reducidas a 42 FEs, compartidas por los genomas semilla de Actinobacteria, Cianobacteria, *Pseudomonas* y Archaea. Las bases de datos Enzyme DBs de todos los linajes están disponibles en Zenodo con número de identificación

DOI [10.5281/zenodo.1219709](https://doi.org/10.5281/zenodo.1219709)

-NP DB (Base de datos de genes biosintéticos de productos naturales). Los primeros análisis realizados con EvoMining incluían una base de datos de productos naturales NP DB de 226 BGC reunidos de la literatura y curados manualmente [61]. En este trabajo la base NP DB que se utilizó para los análisis es MIBiG v1.3[112]. La base que viene incluida con el contenedor de EvoMining fue actualizada a la siguiente versión MIBiG v.1.4 liberada en Agosto de 2018. Esta nueva versión comprende 1813 NP BGC y un total de 31,023 secuencias de proteínas.

2.3. EvoMining detecta distintas dinámicas evolutivas de las enzimas metabólicas que dependen de la familia enzimática y del linaje taxonómico.

2.3.1. Los perfiles de expansión de las proteínas dependen del linaje.

Para entender la evolución de las enzimas y rutas metabólicas se seleccionaron cuatro linajes de diversas características los phyla Actinobacteria y Cianobacteria , el género *Pseudomonas* y el dominio Archaea. Todos los resultados en las figuras son presentados

en este orden. Estos taxa fueron seleccionados para tener un espectro de análisis que abarcara tanto microorganismos ampliamente reconocidos como productores de NP, es decir Actinobacteria (602 MIBiG BGC), Cyanobacteria (60 MIBiG BGC) y *Pseudomonas* (53 MIBiG BGC); como también Archaea (0 BGC en MIBiG versión 1.3), que representa un dominio poco explorado en lo que respecta a los genes que forman parte de metabolismo especializado [122].

Basándonos en estas bases de datos de genomas blanco (Genome DB), como es explicado en la Figure 2.3 panel (a), un conjunto de familias enzimáticas comunes fue identificado. Notablemente, de las 106 familias actinobacteriales menos del 50% están conservadas en los nuevos taxa. Cada base de datos, una para cada taxon, contiene sólo 42 FEs (Table S1). La observación de que 64 FEs no están conservadas en los cuatro taxa refleja lo específico del metabolismo en cada linaje con respecto a los otros [123].

Ya que la cantidad de expansiones de un gen en un organismo sería proporcional al tamaño de su genoma, verificamos cómo cambia el número de copias de los genes que pertenecen a las 42 FEs conservadas con respecto al tamaño de los genomas en los cuatro linajes. Todos los linajes tienen patrones de expansión similares en las 42 FEs analizadas hasta un tamaño de genoma 5 Mbp. En genomas más grandes, el número total de secuencias crece más en *Pseudomonas* que en el phylum Actinobacteria, que a su vez es más grande que el phylum Cianobacteria y que el dominio Archaea Figure 2.3 panel(b). Se observa cómo *Pseudomonas* es el linaje en el que su tamaño de genoma crece tanto como el número de copias de genes de familias muy conservadas (Glucólisis, síntesis de aminoácidos, Ciclo de Krebs, etc.). El resultado en Archaea se debe a que no se han descubierto organismos tamaños de genoma Archaea de tamaño comparable a los de *Streptomyces* o *Pseudomonas* (> 5Mbp). Actinobacteria y Cianobacteria aunque tienen genomas > 5Mbp, el incremento en tamaño podría ser porque tienen expansiones de genes que no son del metabolismo más conservado, porque obtienen más genes por transferencia horizontal u otros mecanismos por los que se incremente el tamaño del genoma. Cianobacteria a pesar de tener genomas grandes no tiene tantas expansiones en estas FEs Esta observación, es posible que sea generalizable a todas las FEs de metabolismo conservado o bien que se deba a un sesgo en la selección de las familias que componen a las FEs.

Los órdenes con mayor número de copias fueron en las expansiones de las familias de la Enzyme DB fueron *Streptomycetales* y *Nostocales*, en Actinobacteria y Cianobacteria respectivamente. Esta observación es congruente con que estos órdenes tienen un tamaño de genoma grande en sus linajes correspondientes, y además están ampliamente representados en MIBiG como sintetizadores de productos naturales. Interesantemente la clase Halobacteria es la que muestra mayor número de expansiones en Archaea, aunque no es la clase con mayor tamaño de genoma en promedio Figure 2.4.

Esta observación es congruente con que las archaeocinas, dicetopiperazinas, carotenoides y otros productos naturales de Archaea fueron aislados de especies de Halobacteria, los genes, probablemente en BGC, que sintetizan de estos metabolitos no han sido caracterizados [86]. Por ello EvoMining una herramienta de minería genómica que

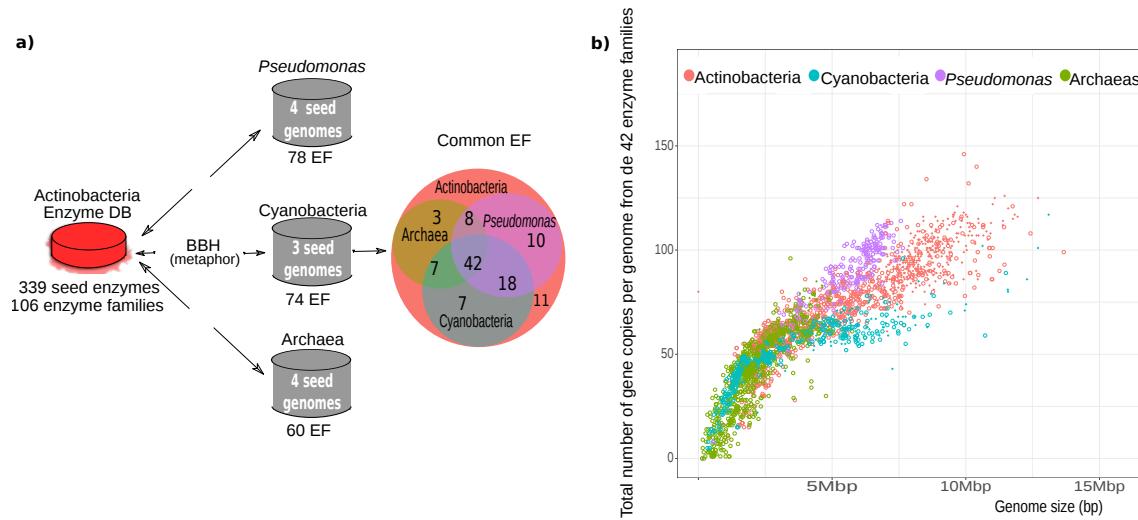


Figura 2.3: EvoMining Enzyme DB. (a) La base de datos de enzimas de la versión previa de EvoMining se filtró para establecer un conjunto común de 42 familias enzimáticas conservadas para los phyla Actinobacteria y Cyanobacteria, el género *Pseudomonas* y el dominio Archaea. (b) Todos los taxones muestran expansiones de familias enzimáticas que correlacionan con el tamaño del genoma. Las diferencias en las tasas de expansión entre los taxones se observan principalmente después de un tamaño de genoma superior a 5 Mbp. En este umbral, *Pseudomonas* supera las expansiones de Actinobacteria, que a su vez supera a Cyanobacteria en las 42 familias seleccionadas.

puede ayudar a explorar linajes poco minados con el potencial de descubrir nuevas rutas metabólicas.

Es claro que en las familias conservadas seleccionadas el número de copias extra correlaciona con el tamaño de genoma los perfiles de expansiones son diferentes en cada grupo taxonómico y que este incremento parece cambiar su patrón en todos los linajes a partir de 5Mbp Figure 2.3 (2b). Por ello se concluye que para ensamblar una base de datos genómica para EvoMining se debe considerar que las expansiones dependen tanto de los distintos linajes taxonómicos como de la diversidad del tamaño de genoma.

2.3.2. El *shell genome* posee expansiones en sus familias enzimáticas

La figura muestra que *Pseudomonas* posee en promedio más copias por genoma que los otros taxa. De las 42 familias analizadas el 54,8% tiene su máximo número promedio de copias por genoma en este linaje. Figure A.1 . En contraste, Actinobacteria es el máximo en 26,2% de las FEs, mientras que Archaea y Cianobacteria empataan en ser el linaje con expansiones sólo en el 9,5 % de los casos. Aunque existen familias como la acetylornitino aminotransferasa o la acetolactato sintasa (ALS) que están expandidas en todos los linajes (coordenadas A1 y E1, Figure A.1, Figure 2.5). En

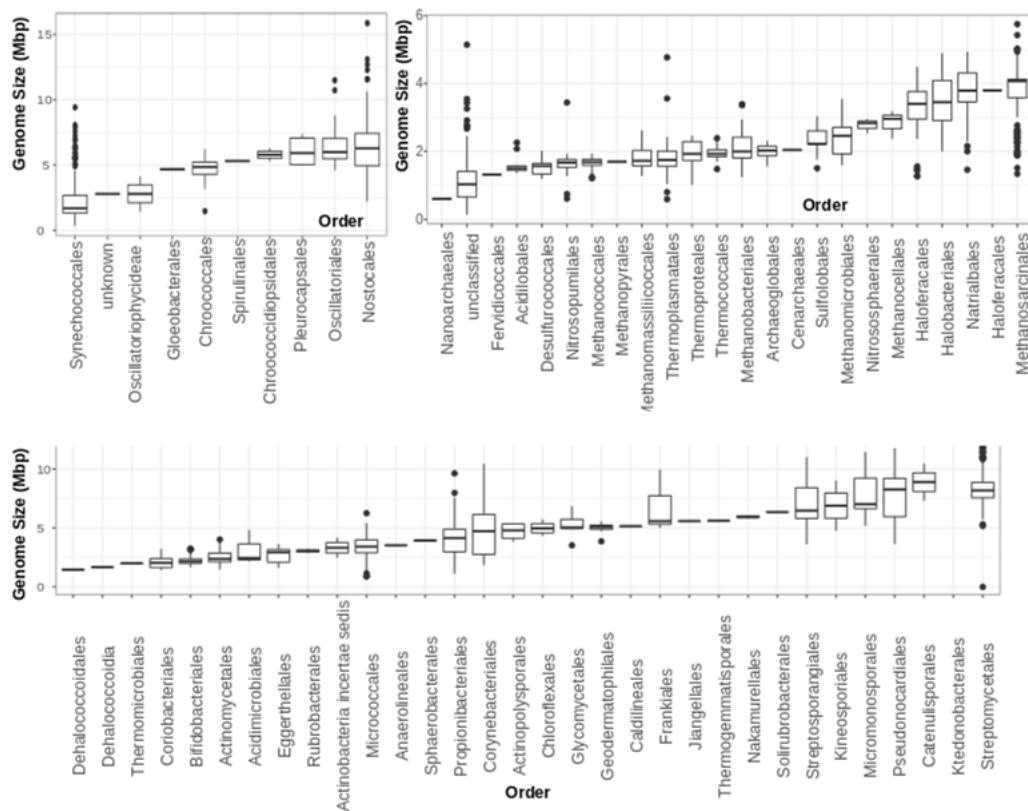


Figura 2.4: Tamaño de genoma en órdenes de Actinobacteria y Cianobacteria y en clases De Archaea. Actinobacteria y Cianobacteria tienen algunos genomas con tamaños superiores a 6 Mbp, que es el máximo que se encuentra en Archaea. El tamaño promedio en el género *Pseudomonas* es de 5.8 MBbp con un máximo de 7.6Mbp entre los genomas utilizados en este trabajo. (no se muestra en la figura)

esta figura, para cada familia en los ejes horizontales siempre se muestran en orden cuatro barras: Actinobacteria, Cianobacteria, *Pseudomonas* y Archaea. El código de color es el mismo que el de los árboles de *EvoMining*, con excepción del verde, pues aun no hay árbol filogenético. Así pues es como sigue: rojo para el metabolismo conservado, azul para los reclutamientos anotados en MIBiG, cían para predicciones de antiSMASH de pertenencia a un BGC de metabolismo especializado, púrpura para la intersección entre el metabolismo conservado y predicciones antiSMASH y gris para expansiones sin destino metabólico conocido. La letra en la parte inferior y los números a la izquierda son coordenadas para facilitar la identificación de la familia en la Tabla S1. Los triángulos indican el linaje con el mayor número de copias por genoma en promedio, y los círculos representan la menor cantidad de copias. Aunque Archaea tiende a ser los taxones menos expandidos, esta tendencia revierte en las familias A4, C4, G4 (GDH) y B5. GDH y ALS (E1) están encerradas en una cuadro, estas enzimas son el origen de los reclutamientos en el BGC de escitonemina. Muchas otras familias exhiben expansiones sólo en ciertos linajes. Tal es el caso de la fumarato reductasa subunidad de hierro-azufre, cordenada C3 de la figura, muy expandida en Actinobacteria pero con menos de una copia por genoma en promedio en Cianobacteria.

No todas las FEs están expandidas, aunque las 42 familias conservadas están presentes en alguno de los genomas semilla de cada linaje, varias de ellas no se encuentran en la mayoría de los genomas del resto de su base de datos. Este es el caso de AroB en Archaea, donde tiene muy poca representación. Sin embargo, un gran porcentaje de familias muestra perfiles de expansión acordes a la tendencia del número total de copias extra, Figure A.1. Por familia, *Pseudomonas* suele ser el linaje con el mayor número de expansiones mientras que Archaea suele ser el linaje menos expandido. Entre las excepciones a esta tendencia está GDH una familia incluida dentro de los ocho casos seleccionados. Para ilustrar esta diversidad que son mostrados en la figura Figure 2.6

panel (a). En esta figura los máximos están marcados con un círculo mientras que los mínimos con un triángulo, los colores de estas formas geométricas representan los mismos linajes que los mostrados en la Figure 2.3. Del total de las 42 familias, GDH es una de las cuatro FEs en las que el mayor número de expansiones se encuentra en Archaea. De hecho, GDH tiene menos de una copia por genoma en promedio en los otros taxa, probando que no se encuentra dentro del *core* genómico de estos linajes. Esto contrasta con AroB, que muestra una tendencia opuesta, no es parte del *core* de Archaea pero muestra copias extra y una presencia mayor que uno en promedio en los otros tres taxa analizados Figure 2.6 panel (b). Los ocho casos mostrados en la figura son todos parte de un cluster biosintético de Cianobacteria, descrito en las secciones posteriores de este trabajo.

Con estas observaciones sospechamos que GDH es miembro del *shell genome* (Ver capítulo 1) [124] en los taxa Actinobacteria , Cianobacteria y *Pseudomonas*, ya que en promedio está cerca de tener una copia promedio por genoma. El promedio no es suficiente para decir que una familia pertenece al *shell*, podrían suceder casos sobre

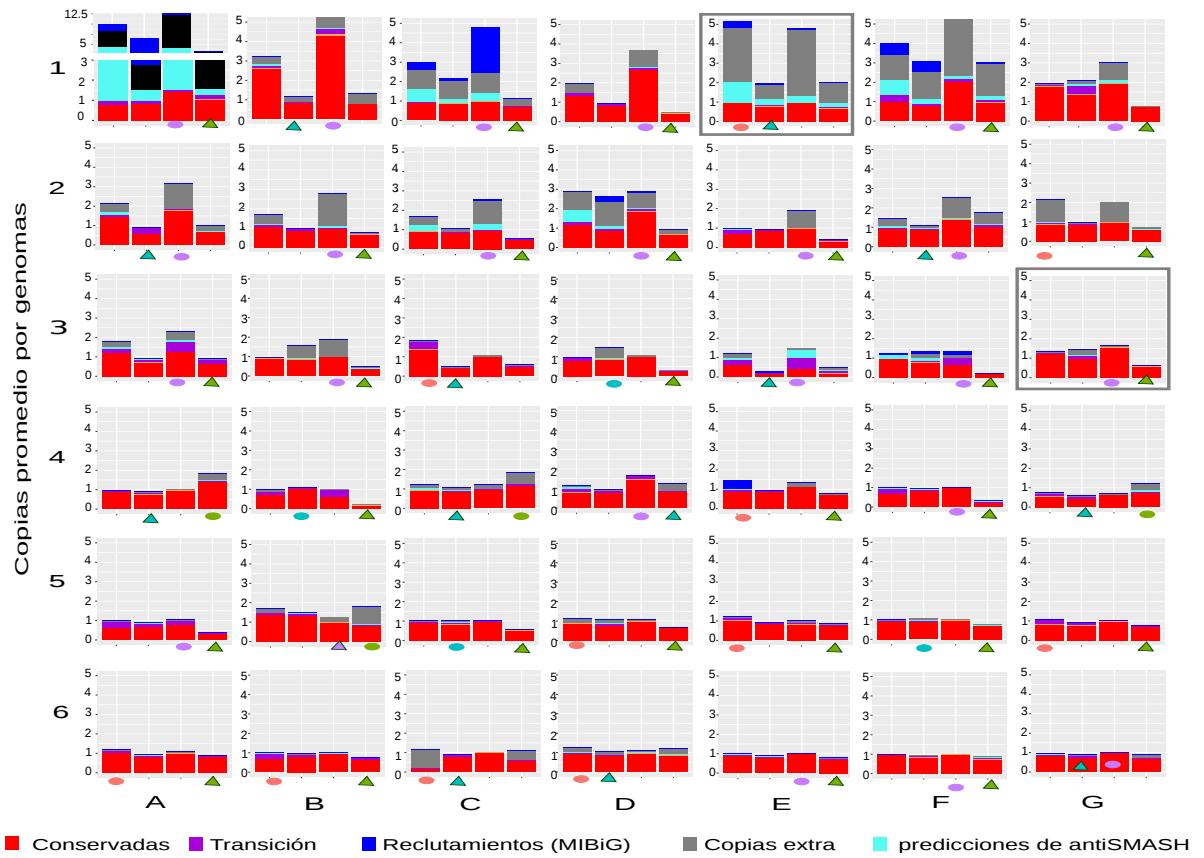


Figura 2.5: Perfiles de EvoMining de las 42 enzimas conservadas en linajes genómicos seleccionados. Las coordenadas en forma de letras A-G y los números 1-6 se muestran en esta figura para Localice fácilmente la familia y sus propiedades en la Tabla S1.

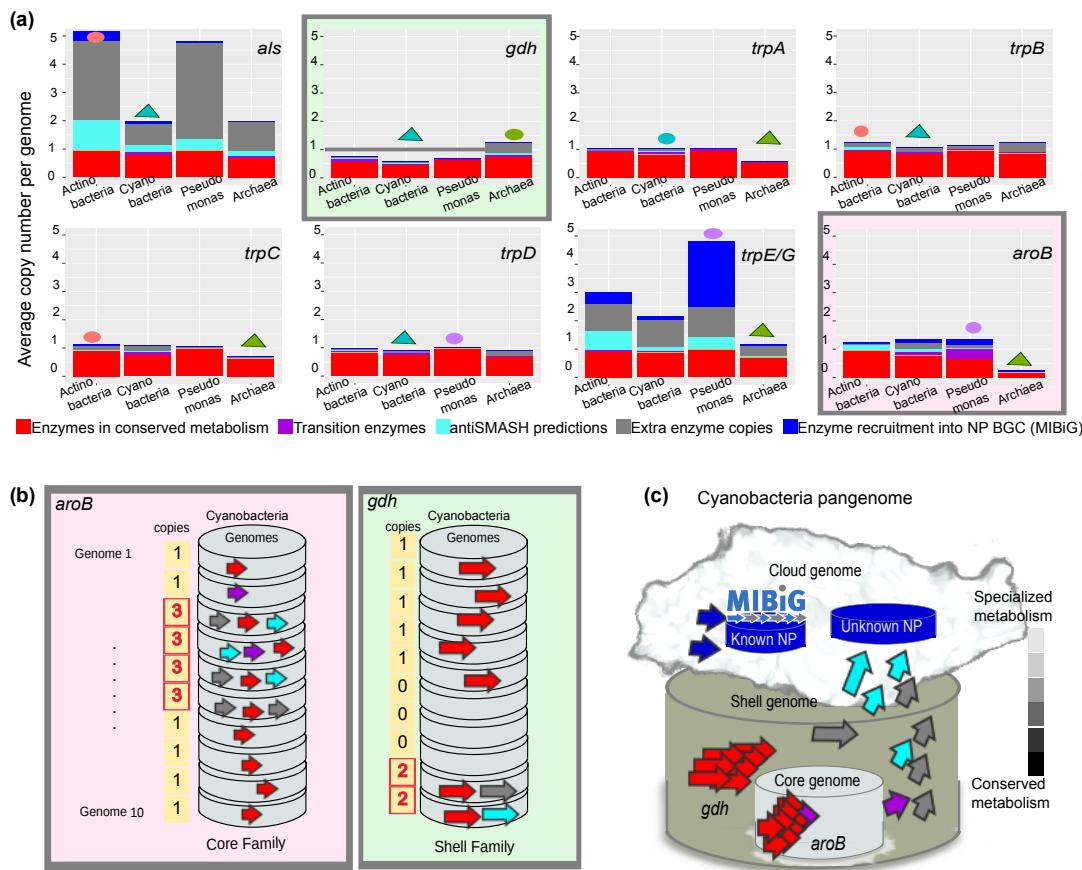


Figura 2.6: Perfiles de expansiones de EvoMining de enzimas conservadas seleccionadas. (a) Patrones de expansión de las ocho familias conservadas cuyas copias adicionales participan en la biosíntesis de escitonemina. El conjunto completo de 42 EF se muestra en la figura anterior. La codificación de colores es la siguiente: rojo para el metabolismo conservado, azul para los reclutamientos anotados en MIBiG, cian para las predicciones antiSMASH de metabolismo especializado, púrpura para la intersección entre el metabolismo conservado y las predicciones antiSMASH, y gris para las expansiones sin destino metabólico conocido. El orden en el eje x es Actinobacteria, Cianobacteria, *Pseudomonas* y Archaea. Los triángulos indican el linaje con el mayor número de copias por genoma en promedio, y los círculos representan el linaje menos expandido. Aunque Archaea tiende a ser los taxones menos expandidos, esta tendencia se revierte en la familia GDH. (b) Se proporciona un ejemplo de un *core* frente a una familia enzimática *shell*. AroB es un EF básico porque tiene al menos una copia por genoma, mientras que GDH es un familia del *shell* debido a su ausencia en tres genomas. A pesar de ser una familia *shell*, GDH tiene copias adicionales que pueden ser reclutadas en un metabolismo especializado. (c) Modelo para la *nube* o genoma variable compuesto parcialmente por enzimas que pertenecen a BGC de productos naturales. En este modelo, el metabolismo conservado se compone de familias tanto del *shell* como del *core genome*. Estas familias pueden sufrir eventos de expansión, y algunas de las copias adicionales son reclutadas para realizar nuevas funciones en el metabolismo especializado.

todo cuando hay mucha variación en un taxón como en el caso de un domino o un phylum en contraposición con taxones conservados como géneros en los que para una cierta familia la mitad de los genomas de un linaje tuviera dos copias y la otra mitad cero. Sin embargo en el caso de la GDH si es consistente en que está presente en más del 50 % de los genomas de cada linaje Figure 2.6 panel (a). Las modas de número de copias también son informativas, una sola copia extra puede ser la que sea reclutada en metabolismo especializado.

En la figura Figure 2.6 se muestra un ejemplo donde AroB es una enzima *core* en oposición a GDH que es una enzima *shell*. En este esquema conceptual, en algunos de los genomas que contienen a AroB existen copias que se dedican al metabolismo especializado marcadas en color cian, otras copias no tienen un destino metabólico conocido por lo que están marcadas en gris, y otras más marcadas en púrpura son enzimas de transición que están llevando a cabo simultáneamente una función en metabolismo central y otra en metabolismo especializado. En contraste a AroB se muestra GDH, que a pesar de no tener copias en algunos genomas y con un promedio de copias por genoma menor a uno y una moda de uno en esta muestra, GDH existe por duplicado en dos genomas. En uno de esos genomas donde GDH tiene una copia extra, más allá de la moda, esa copia se muestra como un reclutamiento al metabolismo especializado en cian. Figure 2.6 panel (b) .

Las expansiones encontradas por EvoMining en la familia GDH incluían predicciones de antiSMASH para Actinobacteria, Cianobacteria y Archaea, no así para *Pseudomonas*. La secuencia del reclutamiento de GDH por los *clusters* biosintéticos escitonemina y el policétido pactamycin [125], es suficientemente parecida como para que EvoMining la detecte como expansión en Actinobacteria, Cianobacteria y Archaea, pero es tan divergente respecto a la familia GDH en *Pseudomonas* que EvoMining lo deja fuera de la familia expandida en este linaje. Los árboles donde puede apreciarse esta observación pueden consultarse más adelante en la Figure 2.7 de la siguiente sección.

Los resultados anteriores sugieren que la evolución del metabolismo especializado es linaje dependiente, y más aún que tal y como ya se conocía en las FEs del *core genome* las enzimas del *shell* como GDH también poseen el potencial de ser reclutadas en NP BGC. A partir de estos resultados Figure 2.6 paneles (a,b), se realizó un esquema conceptual para explicar cómo en linajes genómicos diversos las familias de enzimas con origen en el metabolismo central que forman parte del *core genome* o bien las familias en el metabolismo conservado que incluye tanto al *core* como al *shell genome*, evolucionan al metabolismo especializado que tiene una mayor representación en el *cloud genome* Figure 2.6 panel (c) . Este modelo es relevante porque establece el papel de las familias del *shell genome*, que no fue considerado en la primera iteración que explotó las capacidades de EvoMining como herramienta de minería genómica para encontrar BGC novedosos[110].

En la siguiente sección se analizarán los patrones de expansión reclutamiento de GDH provistas por EvoMining para GDH y se describirán los árboles filogenéticos de cada linaje mostrados en la ?? , así como un árbol que incluye conjuntamente secuencias de todos los linajes Figure A.3 . En Archaea, GDH tiene en promedio 1.23 copias por

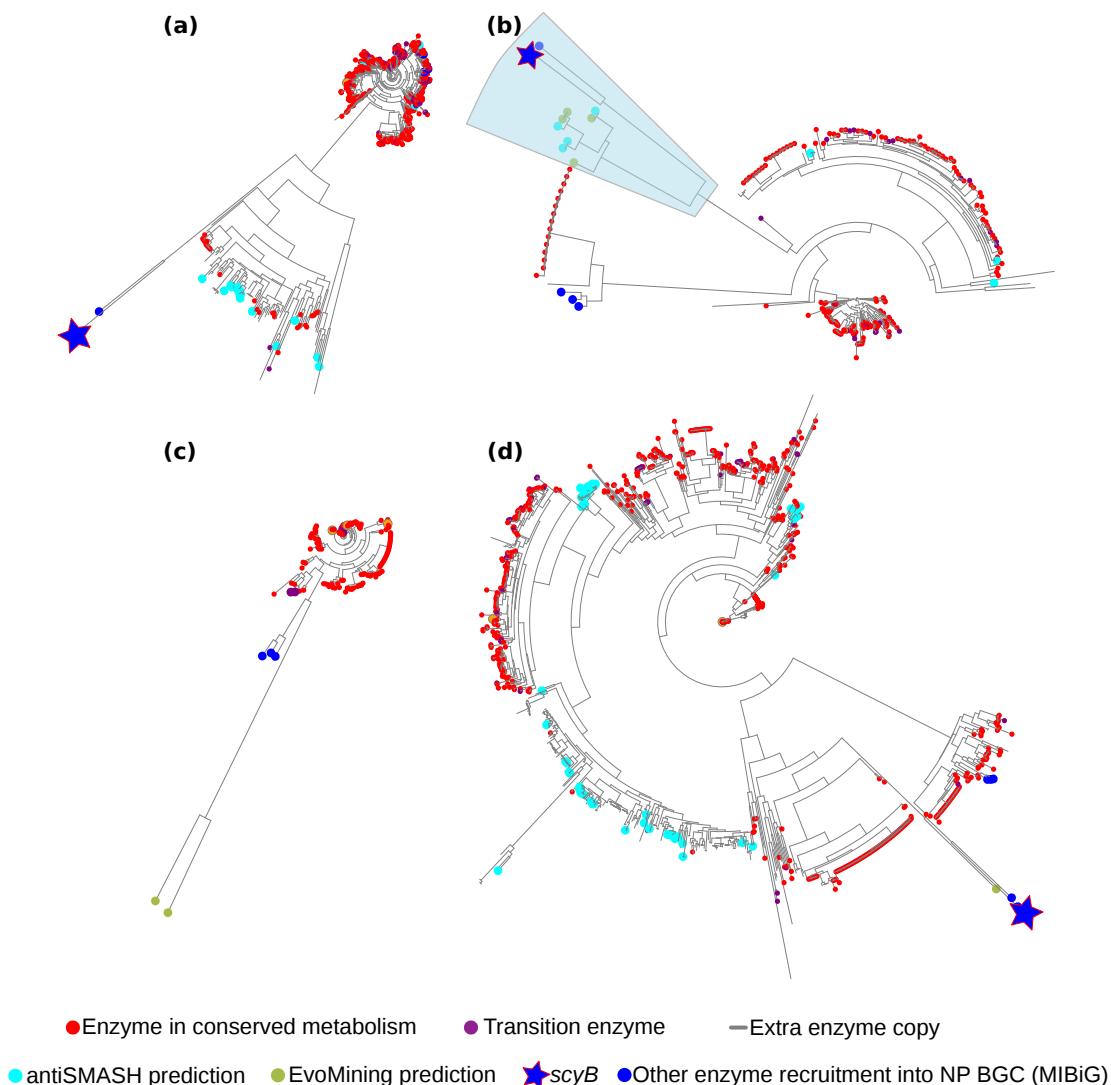


Figura 2.7: Árboles de EvoMining de glutamato deshidrogenasa en cuatro linajes genómicos. (a) Reconstrucciones filogenéticas específicas del linaje que muestran claras diferencias en los perfiles de expansión en Actinobacteria, Cyanobacteria, *Pseudomonas* y Archaea. Actinobacteria no tiene predicciones de EvoMining, ya que su rama de expansión principal carece de reclutamientos de MIBiG. Sin embargo, es posible que se produzca un metabolito especializado dentro de esas copias de destino desconocido (gris). (b) El árbol de Cyanobacteria posee cuatro predicciones de EvoMining y cuatro de antiSMASH. *scyB* se encuentra junto a esta rama del metabolismo especializado. (c) La mayoría de las copias de *Pseudomonas* están etiquetadas como metabolismo conservado, con solo dos predicciones de EvoMining ubicadas en una rama divergente. *Pseudomonas* tiene un promedio de copias por genoma menor que uno en esta familia lo que se refleja en que casi todas las copias fueron etiquetadas como metabolismo central. (d) Archaea, el taxón más expandido, tiene una rama poblada con expansiones etiquetadas como hits de antiSMASH (cian), pero sin ninguna predicción de EvoMining. Los cuatro linajes tienen reclutamientos de MIBiG, pero *scyB* solo fue reconocido por Actinobacteria, Cyanobacteria y Archaea.

genoma, mientras en Actinobacteria, Cianobacteria y *Pseudomonas* esta media es de 0.74, 0.56 y 0.65, respectivamente. En estos tres taxa GDH es parte del *shell genome* Figure A.1. Además de GDH se estudiaron las expansiones y los árboles filogenéticos de TrpA, TrpB, TrpC, TrpD, TrpEG, AroB y ALS, todas ellas parte de las 42 FEs conservadas entre los cuatro linajes y a la vez reclutadas en escitonemina [115] un cluster biosintético de Cyanobacteria.

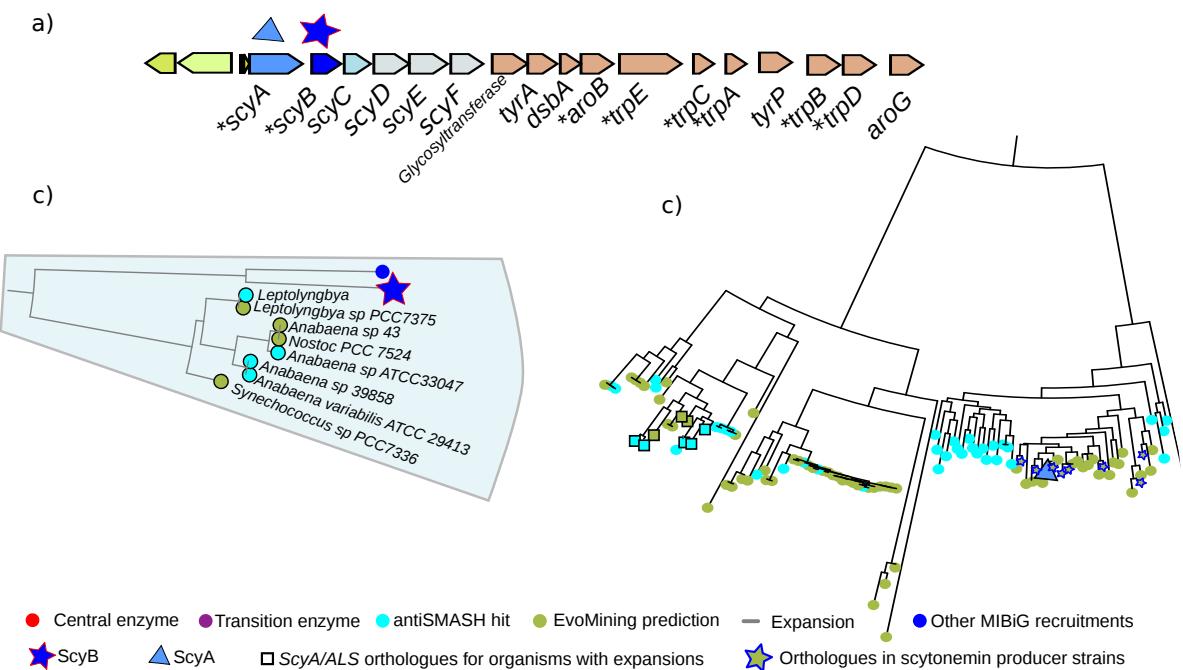


Figura 2.8: Reclutamientos de GDH y ALS por el cluster biosintético de escitonemina. (a) El BGC de escitonemina de *Nostoc punctiforme* se compone de genes reguladores (verde), genes que participan en la biosíntesis de escitonemina (azul) y de genes dedicados al suministro de precursores (marrón). Se encontró que ocho familias enzimáticas del BGC de escitonemina tienen su origen dentro de las 42 familias enzimáticas conservadas. Estas ocho familias comunes están marcadas con asteriscos. (b) Acercamiento de la rama de expansión de Cyanobacteria GDH cerca de ScyB. Inesperadamente, muchos de los productores conocidos de escitonemina no se encuentran en esta rama. (c) Acercamiento de la rama ScyA, que muestra las expansiones de ALS correcta y exclusivamente marcadas por EvoMining como un destino en el metabolismo especializado. Los productores de escitonemina conocidos están marcados con estrellas. Los cuadrados indican expansiones dedicadas al metabolismo especializado ubicado en la vecindad genómica de las expansiones de GDH que coinciden con la rama ScyB. Los árboles de EvoMining de TrpA, TrpB, TrpC, TrpD, TrpE y AroB de Cyanobacteria están disponibles en Microreact.

2.3.3. GDH y ALS en el cluster escitonemina ejemplifican como familias pertenecientes a un mismo BGC pueden tener distintos patrones de expansión.

La enzima GDH, se encuentra presente en muchos linajes debido tanto a su origen ancestral como a la transferencia horizontal [126] Figure A.3. GDH cataliza la reacción reversible de desaminación oxidativa de glutamato en α -cetoglutarato y amonio. De acuerdo al uso de cofactores, la GDH puede dividirse en tres clases, la primera usa NAD⁺ y es nombrada como GDH(NAD⁺). La segunda clase utiliza NADP⁺ y es conocida como GDH(NADP⁺). La tercera clase utiliza ambos cofactores NAD⁺ y NADP⁺; por lo que se le conoce como GDH(NAD⁺ y NADP⁺)[117].

Aunque existen otras clasificaciones de la diversidad de enzimas GDH esta fue seleccionada porque se relaciona con la historia evolutiva de la enzima. GDH(NAD⁺) es utilizada para la oxidación del glutamato mientras que GDH(NADP⁺) para fijar amonio, algunas enzimas de Archaea funcionan bien con ambos cofactores, es decir tienen promiscuidad de cofactores[117]. La especificidad por NAD⁺ o NADP⁺ probablemente emergió en repetidas ocasiones, una evidencia a favor de esta hipótesis es que se ha mostrado que algunas mutaciones pueden revertir la especificidad[127]. Esto sugiere que en los cofactores análogamente al caso de promiscuidad por sustrato, la similitud de secuencia no siempre es suficiente para evidenciar la especificidad. En ocasiones la divergencia o cercanía filogenética de los organismos productores de la enzima es una información adicional a la similitud de secuencia, esta consideración es importante al analizar enzimas en linajes muy divergentes.

La familia GDH muestra expansiones aunque no muy abundantes en Actinobacteria Figure 2.7 panel (a) ,y en Cyanobacteria Figure 2.7 panel(b). Las expansiones están prácticamente ausentes en *Pseudomonas* Figure 2.7 panel (c). En contraste, un número significativo de expansiones es encontrado en Archaea Figure 2.7 panel(d) . El árbol de EvoMining de la familia GDH en Archaea fue enraizado con la secuencia semilla de *Sulfolobus*, que fue predicha por RAST como una enzima dual en el uso de cofactores NAD(P)⁺[128]. En Archaea las tres clases de GDH alternan en las ramas del árbol Figure A.4.

Muchas de las secuencias clasificadas como de metabolismo conservado se concentran volviendo rojas las ramas basales del árbol. Se observa otro clado más grande y diverso compuesto casi exclusivamente por enzimas específicas para NAD(P)[129], incluyendo muchas predicciones de antiSMASH, y sólo dos marcadas como metabolismo conservado. Estas dos marcas pueden deberse a la pérdida real de una enzima de metabolismo central en las ramas centrales o bien a huecos debidos a la calidad del ensamblado y la secuenciación de los genomas. La anotación funcional de estos ortólogos de GDH apunta hacia reclutamientos en el metabolismo especializado. Estos reclutamientos fueron identificados en organismos de los genera *Haladaptatus*, *Haloterrigena* , *Natrialba* , *Natrinema* , *Natrialbaceae* y *Natronococcus*. Los genes se encuentran un contexto de posible síntesis de terpenos. Este contexto incluye enzimas relacionadas al geranil pirofosfato, un precursor de todos los terpenos y

terpenoides[130]. Este árbol tiene también casos de divergencia reciente. Hay una pequeña rama indistinguible en la figura pero explorable en la plataforma microreact donde los parálogos aparecen junto a las secuencias de metabolismo central. Finalmente a pesar de la divergencia las últimas ramas corresponden a enzimas de metabolismo conservado, es decir son las copias más parecidas en esos organismos a las semillas provistas en la Enzyme DB Figure 2.7 panel(d).

En contraste con la amplia expansión de GDH relacionada a las adaptaciones metabólicas en Archaea, el árbol de Cianobacteria tiene copias extra sólo en el 4,5% de sus genomas (Figure 2.7 panel(b) , Figure A.1). En esta rama expandida se encontraron cuatro predicciones de antiSMASH y cuatro predicciones de EvoMining en la rama que contiene a ScyB el homólogo de GDH que fue reclutado por el BGC escitonemina. ScyB es pues parte de la síntesis de escitonemina, un pigmento amarillo producido por muchas Cyanobacterias como protección contra la radiación UV-A solar[131]. *Nostoc punctiforme* PCC 73102 es el organismo productor de escitonemina cuyo BGC fue caracterizado y anotado en MIBiG. EvoMining sólo unas pocas secuencias GDH copias extra de especies de *Nostoc* aún cuando se conoce que homólogos de *scyB* pueden encontrarse en estos genomas. Esta observación puede deberse a la gran divergencia de secuencia entre copias de metabolismo central y de metabolismo especializado en estos organismos.

En la vecindad genómica de algunas expansiones de GDH se observó la secuencia de ALS, un gen identificado en la literatura como homólogo de *scyA*. además, en los BGC conocidos de escitonemina se observó que *scyB* se conserva cerca del gen *scyA* Figure 2.8 panel (a). *scyA* es homólogo de la subunidad larga de ALS. Esta familia tiene un número promedio de copias de 1,87% en la base de datos Genome DB de Cyanobacteria. La media es de hecho de 2,1 copias en organismos que contienen al menos una copia ALS, pero la moda del número de copias es 1. Estos datos indican que muchos organismos tienen más de dos copias de ALS lo que puede correlacionar con que esta familia es más dispersa alrededor de la moda.

Al generar el árbol de EvoMining de ALS en Cyanobacteria, se observó que *scyA* es un reclutamiento que se localiza en una rama repleta de secuencias de ALS provenientes de *Nostoc spp.*, que fueron etiquetadas como predicciones de EvoMining Figure 2.8 (c). Estas predicciones incluyen más de veinte organismos conocidos como productores de escitonemina [115]. Además, ramas cercanas muestran secuencias de ALS que son predicciones de antiSMASH, reforzando la sugerencia de que esta sección del árbol se dedica al metabolismo especializado. Una última rama contiene a los mismos organismos encontrados en el árbol de EvoMining de la familia GDH. Estos organismos son mostrados en el zoom de la rama de *scyB* Figure 2.8 panel(b).

Esta observación sugiere co-diversificación, vía un evento de expansión reclutamiento de ScyA y ScyB a partir de su origen en ALS y GDH, respectivamente. Los perfiles de expansión de estas familias difieren ya que a diferencia de la muy poblada rama de *scyA* en el árbol de ALS, la similitud entre homólogos de la FE de GDH y homólogos de ScyB no fue suficiente para reconstruir una rama de *scyB* con todas las expansiones sugeridas por la ocurrencia del cluster de escitonemina. Estas observaciones son una

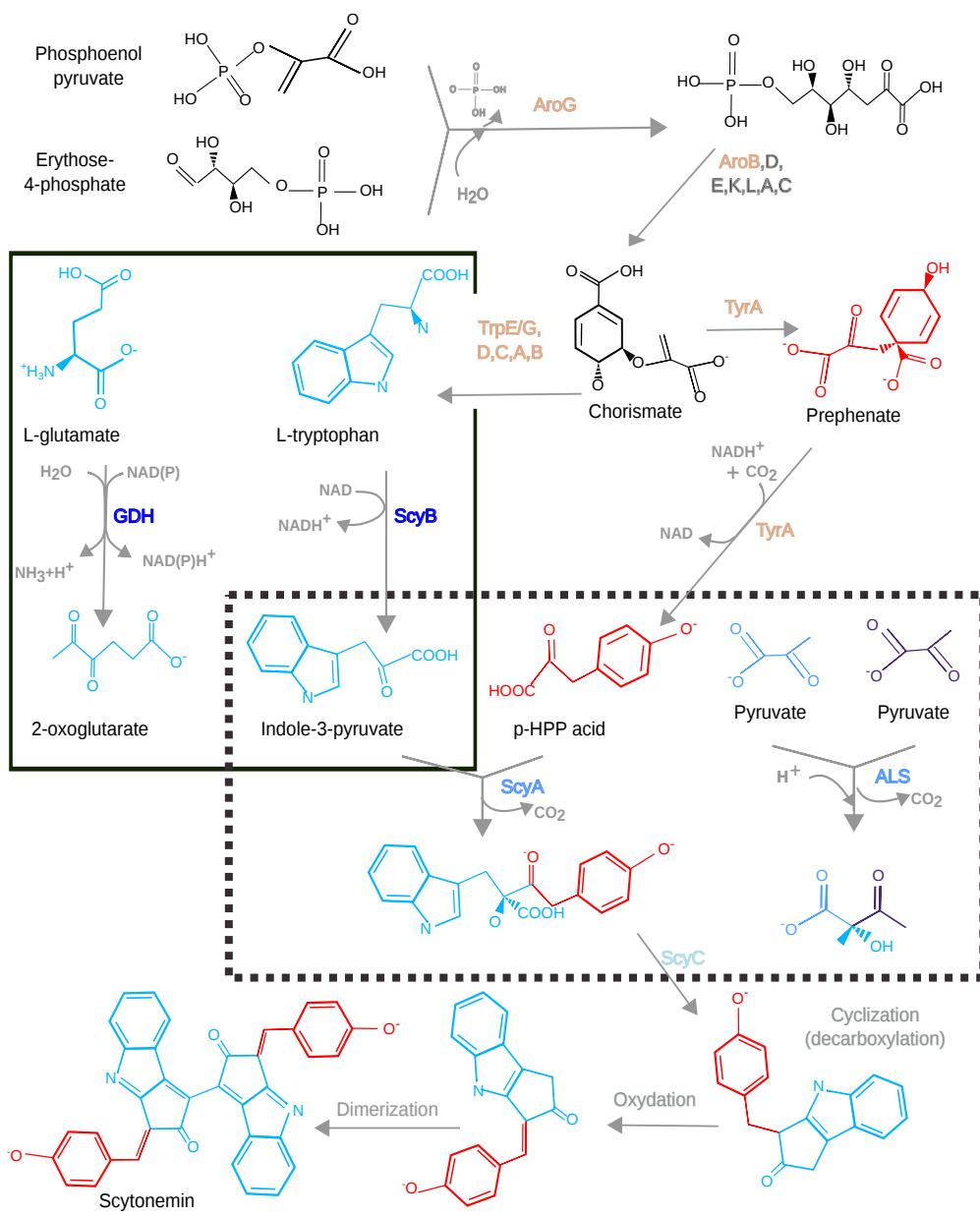


Figura 2.9: Origen metabólico y destino de GDH / ScyA y ALS / ScyB en la biosíntesis de escitonemina. AroG y AroB participan en la síntesis de corismato, un intermediario que se transforma en los precursores que conducen a sustratos de ScyA, es decir, l-triptófano y prefenato. La reacción catalizada por ScyB que convierte el triptófano en indol-3-piruvato es similar a la conversión de l-glutamato en 2-oxoglutarato, catalizada por GDH (cuadrado con un contorno sólido). ScyA催化iza la descarboxilación de indol-3-piruvato y ácido p-hidroxi-fenil-pirúvico (p-HPP) para formar un dipéptido que sirve como un precursor de escitonemina. Esta reacción es análoga a la descarboxilación de dos piruvatos por la enzima ALS original (rectángulo con un contorno de puntos). ScyC realiza una ciclación seguida de pasos de oxidación y dimerización que concluyen con la ruta de scytonemin. Las enzimas del BGC de escitonemina dedicadas a la síntesis de precursores están coloreadas en marrón y las enzimas biosintéticas en azul.

lección a usar EvoMining como herramienta de minería genómica, que enzimas cercanas pueden co-diversificarse en ocasiones formando parte de un mismo BGC pero a la vez estar sujetas a distintas restricciones evolutivas.

2.3.4. El cluster de escitonemina es una familia de clusters cuyas variantes en los genes accesorios muestran promiscuidad de producto.

Definimos *cluster promiscuo* como una familia de BGC homólogos cuyos miembros sintetizan distintos productos naturales con la misma estructura base pero con algunas modificaciones que son específicas de cada organismo incluyendo aquellos BGC que en un mismo organismo pueden producir varias moléculas muy similares. Un cluster puede ser promiscuo ya sea por la promiscuidad de alguna de sus enzimas o por la diversidad en los genes accesorios particulares a cada organismo. En oposición tenemos los clusters u operones del metabolismo central, donde la selección ya ha actuado siempre obtener el mismo producto, por ejemplo algún aminoácido en particular. Como veremos más adelante el BGC de escitonemina presenta diversidad de productos.

El *cluster* de la escitonemina reportado en MIBiG y mostrado en la figura Figure 2.8 panel (a) y en Figure 2.9 comprende 18 genes [116]. Además de genes reguladores, este BGC incluye a los genes biosintéticos *scyABC*, los genes conservados con función desconocida *scyDEF* y los proveedores de precursores: *tyrA*, *dsbA*, *aroB*, *trpE/G*, *trpC*, *trpA*, *tyrP*, *trpB*, *trpD*, *aroG*. Las familias enzimáticas TrpABCDEG y AroB son parte de las rutas de los aminoácidos aromáticos y del ácido shikímico, parecen haber sido reclutadas para proveer de los precursores L-triptofano y prefrenato, que son necesarios para la síntesis de escitonemina. En oposición a las enzimas del operón de triptofano y a AroB que siguen realizando su función de metabolismo conservado aún como parte de una ruta de metabolismo especializado están ScyA y ScyB. Estas dos familias también tienen un origen en el metabolismo conservado, ya se ha explicado que tienen su origen en las familias ALS y GDH, pero en este caso sí ha cambiado la especificidad por sustrato al momento de la incorporación al metabolismo especializado Figure 2.9. ALS une dos piruvatos, transformándolos en S-2-acetolactato [118], mientras que ScyB cataliza la unión de indol-3-piruvato con ácido p-hidroxi-fenil pirúvico. De forma análoga, GDH convierte L-glutamato en 2-oxoglutarato [117], mientras que ScyA cataliza una desaminación oxidativa de triptofano. El producto de estas dos enzimas actuando secuencialmente e un dipéptido, el cual es cyclado por ScyC. La ruta metabólica culmina con una serie de oxidaciones y dimerizaciones hasta llegar al producto escitonemina, aún no es claro como se llevan a cabo estos últimos pasos[115].

Además de GDH y ALS el BGC de escitonemina tiene seis familias que son parte de las 42 FEs analizadas aquí, es decir 8 de los genes que participan en la síntesis de escitonemina tienen un origen en metabolismo conservado y fueron reclutados en el cluster de escitonemina (Figure 2.6, Figure 2.8. De estas familias, seis de los

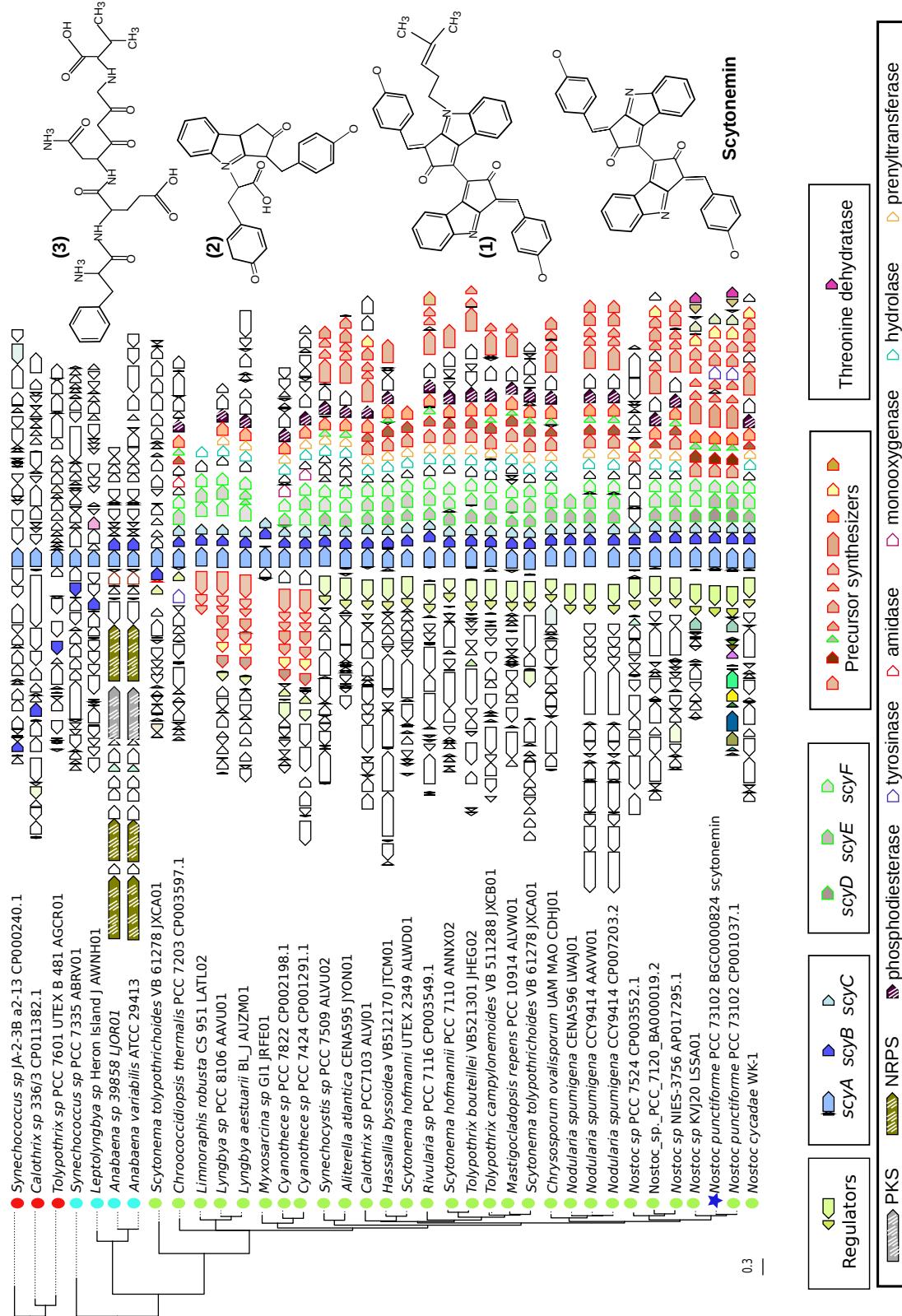


Figura 2.10: El análisis filogenómico de *scyA* y *scyB* mostró una diversidad química en torno a la scytonemin BGC. Las proximidades genómicas que contienen tanto *scyA* como *scyB* en Cyanobacterias se muestran junto a una reconstrucción filogenética utilizando las secuencias de proteínas de estos dos genes.

siete árboles de EvoMining contienen copias extras identificadas como predicciones de EvoMining, debido a que en su rama de expansión se encuentra el correspondiente gen de escitonemina del cluster reportado en MIBiG. Los reclutamientos incluyen AroB y todos los genes de la ruta del L-triptofano excepto *trpF*. Estos árboles pueden ser consultados interactivamente, los links de microreact están anotados en la Table 2.1.

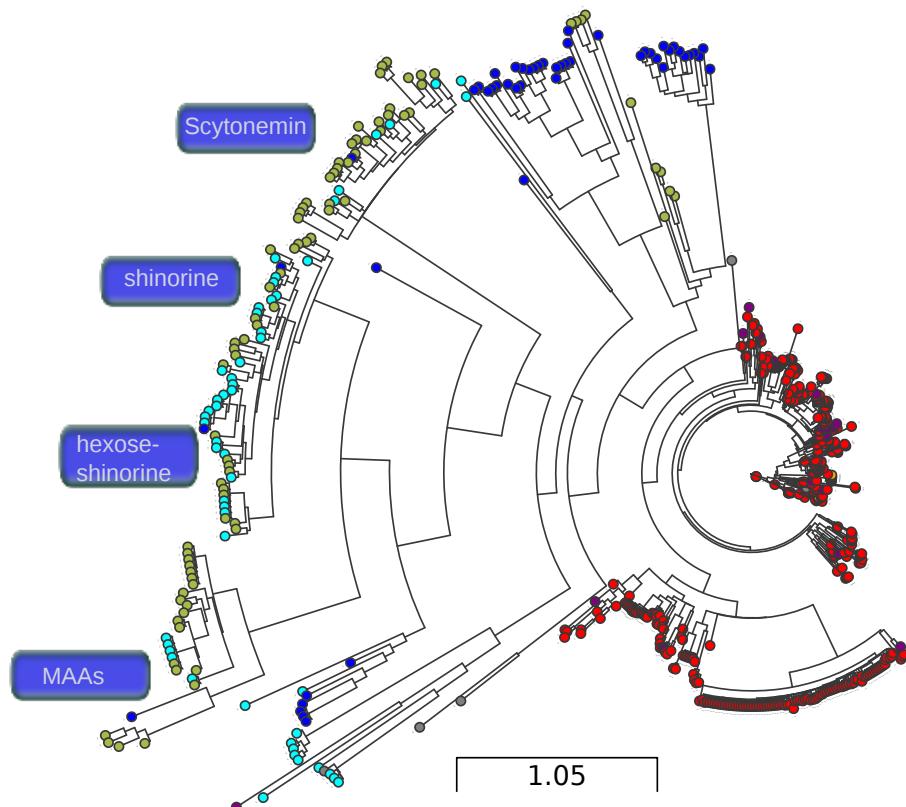


Figura 2.11: Árbol de EvoMining de AroB. El número promedio de copias de esta familia es 1.3, la moda es uno con 29.5 porciento del total de los genomas superando este umbral. Estas características se reflejan en tres ramas llenas de copias adicionales marcadas ya sea como predicciones de antiSMASH o como predicciones de EvoMining. La primera rama de abajo hacia arriba tiene los compuestos MAA como reclutamientos. La segunda rama fue reclutada para la síntesis de shinorine y la tercera rama para la de escitonemina. Estos tres productos naturales MAAs, shinorine y escitonemina son protectores solares. En contraste a las familias del operón de triptofano, AroB no tiene Welwitindolinone, Ambiguine o fischerindoline como reclutamientos

Los árboles de EvoMining de estas familias incluyen ramas marcadas por reclutamientos que son enzimas que forman parte de las rutas de síntesis de otros pigmentos protectores solares. Entre ellos la shinorina y los aminoácidos de tipo mycosporina (MAAs) Figure 2.11 [131]. Entre los reclutamientos también están otros no relacionados a la protección solar, como la welwitindolinona [132], la ambiguina [133] y la fischerindolina [134]. Estos resultados ilustran como EvoMining puede complementar a antiSMASH mediante la identificación de secuencias que pertenecen de BGC no

tradicionales.

Cuadro 2.1: Links de Microreact de árboles relacionados a escitonemina

Enzima	Familia
TrpA	https://microreact.org/project/SyZMprKum?tt=cr
TrpB	https://microreact.org/project/H1jW0rFdX?tt=cr
TrpC	https://microreact.org/project/rkN1THFum?tt=cr
TrpE/G	https://microreact.org/project/rkv20SF0m?tt=cr
TrpD	https://microreact.org/project/H1UuQE0qm?tt=cr
AroB	https://microreact.org/project/SkT1Wp_dm?tt=cr
GDH	https://microreact.org/project/HyjYUN7pQ?tt=cr
ALS	https://microreact.org/project/B11HkUtdm?tt=cr

Para investigar la coocurrencia de ScyA y ScyB, que son necesarias juntas para producir escitonemina, reconstruimos su historia evolutiva conjunta. Para ello se obtuvieron las secuencias de los genomas donde ambas tenían presencia, se concatenaron sus secuencias y se realizó una filogenia con ellas. Las variantes de la vecindad genómica del BGC de escitonemina fueron visualizadas mediante el uso de CORASON [110]. En el siguiente capítulo será explicado con más detalle este software de visualización y organización de vecindades genómicas. Los análisis filogenómicos resultaron en 34 Cyanobacterias con diversidad química en el BGC de escitonemina. Es decir en conclusión escitonemina es un ejemplo de cluster promiscuo, ya que parece haber un *core conservado*, pero diversidad en enzimas accesorias y por tanto en sus productos finales.

Se pudieron predecir cinco estructuras putativas que son variantes de escitonemina y correlacionan con episodios de pérdida y ganancia de genes en este locus Figure 2.10. En esta figura la clasificación de EvoMining para la familia ALS se muestra en un círculo acorde con los colores de EvoMining. Al *core* de genes *scyABCD* se incorporan genes que realizan ornamentos como hidrolasas, prenil-transferasas , fosfodiesterasas y monooxigenasas , para formar congéneres de escitonemina como los compuestos 1 y 2. La pérdida de los genes *scyDEF* y la aparición de otras enzimas como la tyrosinasa y o la amidasa pueden derivar en la síntesis de los compuestos 3 y 4. Además encontramos que homólogos de *scyA* y *scyB* son parte de otro BGC que contiene un híbrido NRPS-PKS. Siguiendo las reglas biosintéticas de estas enzimas se propuso el compuesto 5. La diversidad química sugerida en estas predicciones sólo puede ser validada mediante trabajo experimental, sin embargo si existen variantes reportadas de la molécula de escitonemina [135]. Las variantes producidas por la dinámica evolutiva del metabolismo especializado fueron sugeridas mediante el sólo uso de ScyA y ScyB como semillas de búsqueda. Estos resultados sugieren el poder predictivo de EvoMining para explorar espacios metabólicos típicamente ignorados por métodos de búsqueda tradicionales de BGC que no consideran la evolución dentro de sus algoritmos de minería genómica.

2.4. EvoMining aplicado a TauD, enzima común de los BGC Rimosamide y Detoxin sugieren otra clase de clusters con promiscuidad de producto.

Además del ejemplo de las familias del BGC de escitonemina ampliamente discutido en este capítulo, y de las 42 familias de metabolismo conservado aplicué EvoMining para estudiar las expansiones de otras familias enzimáticas. Una de ellas es TauD una enzima del *shell genome* de Actinobacteria que cuya contraparte homóloga en Enterobacteria forma parte del operón de *E. coli* metabolismo de taurina. En Actinobacteria una copia de *tauD* pertenece a este operón que está parcialmente conservado, mientras que otras copias, cuyo destino metabólico nos muestra EvoMining aparecen en una rama marcada por reclutamientos de MIBiG, Figure 2.12. EvoMining también encuentra expansiones de esta familia en *Pseudomonas* donde además el contexto genómico de la copia secundaria se conserva cerca de una PKS, sugiriendo la pertenencia de *tauD* a BGC de productos naturales. En Actinobacteria *tauD* es parte de 15 BGCs Table 2.2, entre ellos los *clusters* que producen los metabolitos rimosamide y detoxin. Estos metabolitos comparten un *core* molecular y difieren en ornamentaciones. Esta observación y el hecho de que estos BGC comparten más genes además de la rimosamide, nos pueden sugerir que los BGC de rimosamide y detoxin, también pueden considerarse como parte de una sola clase de BGCs que presentan promiscuidad de producto. El estudio de las variantes de rimosamide-detoxin BGC será objeto del siguiente capítulo donde cambiaremos de estudiar las variaciones a nivel secuencia de enzimas a estudiar variantes de clusters biosintéticos.

Cuadro 2.2: Homólogos de *tauD* en BGC reportados en MIBiG.

MIBiG BGC	Compuesto	Clase	Organismo productor
653_ADO85576	pentalenolactone	Terpene	<i>Streptomyces arenae</i>
678_BAC70706	pentalenolactone	Terpene	<i>Streptomyces avermitilis</i> NBRC 14893
163_ACR50790	tetronasin	Polyketide	<i>Streptomyces longisporoflavus</i>
961_ABC36162	bactobolin	NRP-Polyketide	<i>Burkholderia thailandensis</i> E264
287_AAG05698	2-amino-4-methoxy-trans-3- butenoic acid	NRP	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1
846_ctg1_orf9	tabtoxin	Other	<i>Pseudomonas syringae</i>
1183_AGC09526	lobophorin	Polyketide	<i>Streptomyces</i> sp. FXJ7.023
1156_ADD83004	platencin	Terpene	<i>Streptomyces platensis</i>

MIBiG BGC	Compuesto	Clase	Organismo productor
1140_ACO31277	platensimycin-platencin	Terpene	<i>Streptomyces platensis</i>
1140_ACO31282	platensimycin-platencin	Terpene	<i>Streptomyces platensis</i>
715_ABW87795	spectinomycin	Saccharide	<i>Streptomyces spectabilis</i>
1205_KGO40485	communesin	Polyketide	<i>Penicillium expansum</i>
1205_KGO40482	communesin	Polyketide	<i>Penicillium expansum</i>
1183_AGC09525	lobophorin	Polyketide	<i>Streptomyces</i> sp. FXJ7.023
654_ABB69741	phenalinolactone	Saccharide-Terpene	<i>Streptomyces</i> sp. Tu6071
1070_CAN89617	kirromycin	NRP - Polyketide	<i>Streptomyces collinus</i> Tu 365

2.5. Consideraciones finales sobre el uso de Evo-Mining

EvoMining fue desarrollado como una herramienta de minería genómica descargable que puede ser aplicada a bases de datos de secuencias de metabolismo conservado (Enzyme DB) provenientes de familias enzimáticas de distintos phyla. Nuestros análisis llevaron a la conclusión de que los patrones de expansión reclutamiento dependen tanto de la familia enzimática como del linaje genómico en el que se analiza. Una consideración importante al usar EvoMining es que el tamaño de genoma correlaciona con el número de copias extra de familias expandidas. Aunque el tamaño de genoma es importante, también encontramos excepciones donde EvoMining pudo predecir enzimas de BGC no tradicionales en genomas relativamente pequeños, sugiriendo que hacen falta más análisis para estudiar esta relación. En este sentido, optamos por comparar linajes genómicos que no solo son altamente divergentes y, en algunos casos, poco conocidos con respecto a la biosíntesis de NP, sino también desproporcionados en cuanto a su resolución taxonómica y distancias. Por lo tanto, es posible que estos factores hayan impuesto un sesgo al establecer relaciones entre el tamaño del genoma, la tasa de expansión de genes y la diversidad metabólica.

Es interesante observar que las familias más expandidas según los análisis de prueba de concepto anteriores de EvoMining [61] fueron asparagina sintasa, 2-dehidro-3-deoxifosfoheptanoato aldolasa y 3-fosfoglutamato-1-carboxivinil transferasa, que son las que llevaron al descubrimiento de enzimas biosintéticas de arsenolípidos. Cabe destacar que ninguna de estas enzimas formaba parte de los 42 FE analizados en el presente documento, lo que refuerza la idea de que no solo las enzimas conservadas, sino también las enzimas del *shell* con copias adicionales, pueden servir como semillas para el descubrimiento de nuevos BGC. Después de observar que la familia de la GDH tiene numerosas expansiones en Archaea pero no en otros taxones, proporcionamos

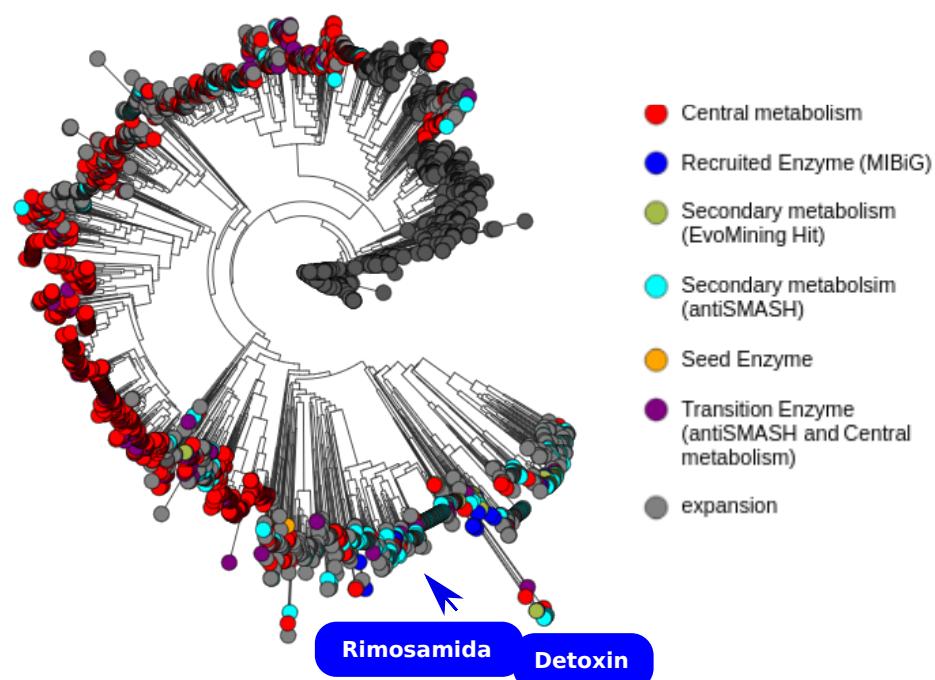


Figura 2.12: Análisis de EvoMining de las expansiones de la familia *TauD*. En Actinobacteria existe una rama dedicada al metabolismo especializado. Dentro de esta rama hay copias extra en géneros como *Streptomyces*, *Rhodococcus*, *Frankia* y *Amycolatopsis*. Esta figura muestra un clado dentro de las expansiones de la familia que contiene quince homólogos de *tauD* que pertenecen a clusters biosintéticos experimentalmente caracterizados y depositados en MIBiG, incluyendo los de detoxin y rimosamidas. La variedad de BGC mostrada en este clado abre la posibilidad de encontrar variantes moleculares de estas familias.

un ejemplo de un reclutamiento de una enzima metabólica central por un BGC en Cianobacteria, donde no hay tantas expansiones, lo que sugiere que las predicciones en Arhea deben ser exploradas experimentalmente. Estas observaciones enfatizan la naturaleza predictiva de EvoMining.

En este punto conviene enfatizar cómo fue clave el papel de MIBiG [112] para esta versión de EvoMining ya que permite incrementar consistentemente y sin esfuerzo de curación manual a los BGC reportados por investigadores de todo el mundo. La versión previa de EvoMining no incluía por ejemplo ningún BGC de Cianobacteria o de Archaea. Gracias a esta actualización que la nueva versión de EvoMining pudo identificar correctamente secuencias de genes del BGC de la escitonemina. Sin la presencia de la señal de los BGC de Cianobacteria en MIBiG estas hojas habrían sido catalogadas como de destino metabólico desconocido.

En este capítulo se describió el funcionamiento de EvoMining y sus aplicaciones como una herramienta de minería genómica que permite relacionar la historia evolutiva de familias enzimáticas con su función. Específicamente, lo empleamos para señalar familias de genes con expansiones que sugieren la presencia de elementos con promiscuidad. También, EvoMining fue utilizado para ubicar a los homólogos de familias expandidas que probablemente forman parte de BGC. Estos últimos seguramente producen nuevos productos naturales, razón por la cual, abordaremos el estudio de la conservación de estos BGC a partir de estas enzimas en el siguiente capítulo. Se mostró también que el metabolismo se puede expandir a partir de genes de metabolismo conservado considerando tanto el metabolismo *shell*, como el metabolismo *core*. Se ilustró con el ejemplo de escitonemina que en un BGC se encuentran genes provenientes de la expansión de distintas familias de enzimas, que una misma expansión puede ser utilizada para producir distintos análogos con estructuras similares y que los patrones de expansión son específicos de cada familia y linaje. Queda por explorar los patrones de neofuncionalización de forma exhaustiva con todas las familias del *shell genome* así como el determinar de los BGCs conocidos en MIBiG qué familias del metabolismo conservado fueron las que les dieron origen. En el siguiente capítulo retomaremos el ejemplo de *tauD* para describir el descubrimiento de 3 nuevos BGC cuyo producto natural fue sido demostrado por colaboradores.

Capítulo 3

Desarrollo de CORASON como herramienta para organizar clusters biosintéticos y otras vecindades genómicas conservadas.

En este capítulo presento CORASON, *CORe Analysis of Syntenic Orthologs to prioritize Natural products biosynthetic gene clusters*, una herramienta para explorar la diversidad en el contenido de los *Clusters* de Genes Biosintéticos (BGC por sus siglas en inglés) así como su distribución en un linaje proporcionado por el usuario. CORASON es una herramienta en línea de comandos para organizar filogenéticamente la variación de una familia de clusters, Figura Figure 3.1. Ya que sabemos que hay variantes de BGC que producen productos naturales similares dentro de los linajes genómicos. Otros métodos de minado de genomas han acelerado el descubrimiento de nuevos BGC. Casi cada nueva bacteria que es secuenciada aporta alguna novedad al pangenoma bacteriano conocido. Una fracción de estos genes descubiertos formará parte de variantes de BGC previamente conocidos aportando diversidad a las familias de clusters biosintéticos. La diversidad genética que existe en las familias de BGCs está relacionada con cambios moleculares, incluso pequeñas variantes en un metabolito pueden ocasionar diferencias en su función biológica por lo que es de interés identificar análogos de productos naturales tanto como entender su evolución. Se diseñó CORASON que identifica el *core* génico de un BGC y genera una visualización de las variantes de la familia organizadas filogenéticamente.

3.1. Algoritmo y características de CORASON

La herramienta corason, como se muestra en la Figure 3.1 localiza familias de BGC en un linaje genómico partiendo de un *cluster* y un gen de referencia. Para ello el usuario debe proveer una base de datos de genomas (Genome DB) de un linaje definido

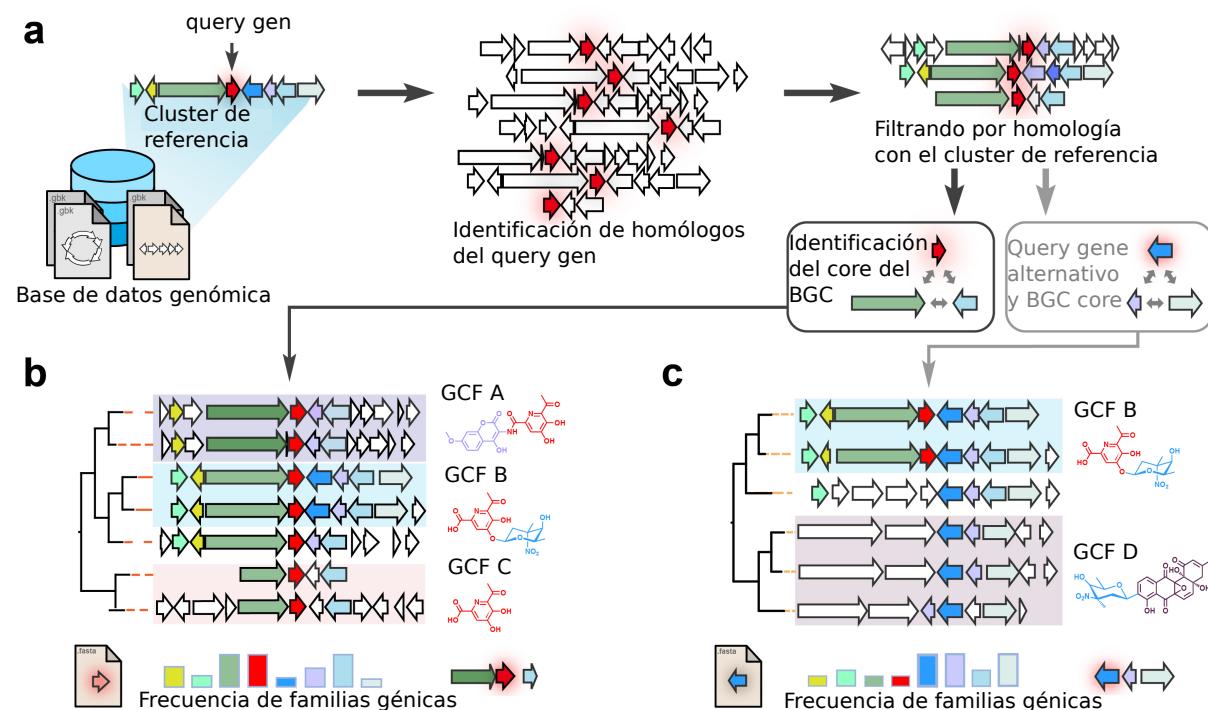


Figura 3.1: La herramienta corason localiza familias de clusters biosintéticos en un linaje genómico partiendo de un cluster y un gen de referencia. Todos los contextos genómicos que contengan ese gen y algún otro gen del cluster de referencia serán encontrados en el linaje seleccionado por el usuario. CORASON identifica el *core* génico de la familia. La información del *core* se utiliza para organizar filogenéticamente todos los miembros de la familia del BGC, es decir todas las variantes del BGC serán organizadas. El core génico está relacionado con el *core* de la molécula, la parte variable del BGC codifica enzimas accesoriales que producen ornamentos. Al cambiar de gen de referencia CORASON permite explorar otras familias de BGC que contengan las mismas modificaciones. Los resultados se presentan en una visualización que permite al mismo tiempo apreciar variación a nivel de presencia-ausencia de genes entre miembros de una familia de BGCs, como también apreciar variación a nivel de secuencia a través de un gradiente de color entre genes conservados entre una variante y el BGC de referencia.

con las mismas características y precauciones descritas para EvoMining el capítulo anterior. También debe poner como entrada un BGC y un gen de referencia que sea parte de ese BGC. El algoritmo de CORASON busca los homólogos de ese gen en cada genoma de la base de datos y luego también detecta a los otros genes del BGC de referencia si es que se encuentran en la vecindad del gen de referencia. Esto lo repite para todas las secuencias del linaje seleccionado por el usuario. Posteriormente, CORASON identifica el *core* génico de la familia con el algoritmo de Orthocore. La información del *core* se utiliza para organizar filogenéticamente todos los miembros de la familia del BGC. Ya que el *core* génico está relacionado con el *core* de la molécula, CORASON permite detectar en la parte variable del BGC a las enzimas accesorias que producen ornamentos i.e. variantes moleculares. Los resultados son un árbol en formato Newick junto con una visualización que permite al mismo tiempo apreciar variación a nivel de presencia-ausencia de genes entre miembros de una familia de BGCs así como la divergencia a nivel de secuencia entre genes conservados entre una variante y el BGC de referencia, mismo que se distingue con un código de color.

CORASON fue diseñado con las siguientes características: (i) Se implementa en una interfaz de línea de comando simple. (ii) Identificación de todos los homólogos de un gen de referencia en una base de datos de genomas. (iii) Identificación del *core* génico del BGC. (iv) Reconstrucción filogenética de la familia de BGCs utilizando la información del *core*. (v) Salida visual en formato SVG, que muestra tanto la anotación funcional de los genes como como la distancia respecto a sus ortólogos del *cluster* de referencia.

3.2. Las familias de BGC son variantes del BGC de referencia.

Así como existen familias génicas, un gen y todos sus homólogos, incluidos parálogos, ortólogos y xenólogos, también existen familias de BGCs. Sin embargo no es trivial definir los límites de un BGC porque no tiene un codón de inicio y un codón de paro como un gen. En algunas ocasiones como en el caso de escitonemina todos los genes del BGC se expresan al recibir un estímulo, como los rayos UV en este caso. Otras veces en la producción del metabolito participan genes que no son necesariamente contiguos, y por ello al cambiar el BGC de organismo y realizar expresión heteróloga no se obtiene el mismo metabolito.

Así pues, cuando se habla de un BGC no se debe pensar que este es igual en todos los organismos del linaje, es decir que tiene el mismo contenido génico. Hay variación tanto a nivel de contenido génico como a nivel de secuencia entre los genes ortólogos. Esta variación produce la promiscuidad de producto, una familia de BGC produce distintos productos a partir de precursores similares. En este trabajo tomamos como BGC de referencia a los anotados en MIBiG, que son de los que se tienen productos reportados con datos experimentales. Para CORASON consideramos como parte de

la familia del BGC todas las variantes de BGC que contengan al menos dos genes en común, uno de referencia seleccionado por el usuario y otro cualquiera pero común con el BGC de referencia.

Como ejemplo de familias de BGC conviene pensar en analogía con los operones. Un operón es el conjunto de genes dedicados a la síntesis de un mismo proceso que regulan de forma coordinada su propia expresión, estos genes suelen ser contiguos y transcribirse simultáneamente desde un solo promotor. Ejemplos de estos operones son los que producen los aminoácidos histidina y triptófano. Estos “BGC” hace millones de años fueron posiblemente parte del metabolismo especializado y debido a su éxito se fijaron en lo que ahora vemos como BGCs conservados en ciertos linajes genómicos. En estos casos las fronteras son claras y la variación génica es poca. Aún así existen otros ejemplos donde puede constatarse variación en las rutas de síntesis de mecanismos centrales de metabolismo procariota. En el caso de histidina y triptófano, como hablaremos en el siguiente capítulo, es la variación a nivel de secuencia y no tanto a nivel de composición génica la que produce diversidad de producto. En oposición a los BGCs u operones de metabolismo conservado, están los BGCs del metabolismo especializado, así como se encuentran familias con mucha variación génica pueden encontrarse otras muy conservadas.

En las siguientes secciones presento cuatro ejemplos que ilustran como CORASON puede ser utilizado tanto para priorizar nuevos BGCs como para ligar la variación génica de familias de BGCs con diversidad estructural. Asimismo se describe cómo este algoritmo es una expansión de las habilidades de EvoMining para encontrar enzimas en el proceso de diversificación funcional. En resumen, CORASON encuentra familias de BGCs, y presenta una rápida visualización de sus variantes. Con esta herramienta podemos expandir nuestro conocimiento sobre nuevas variantes químicas mediante la genómica comparativa. CORASON está disponible en su contenedor de docker en github <https://github.com/nselem/corason>.

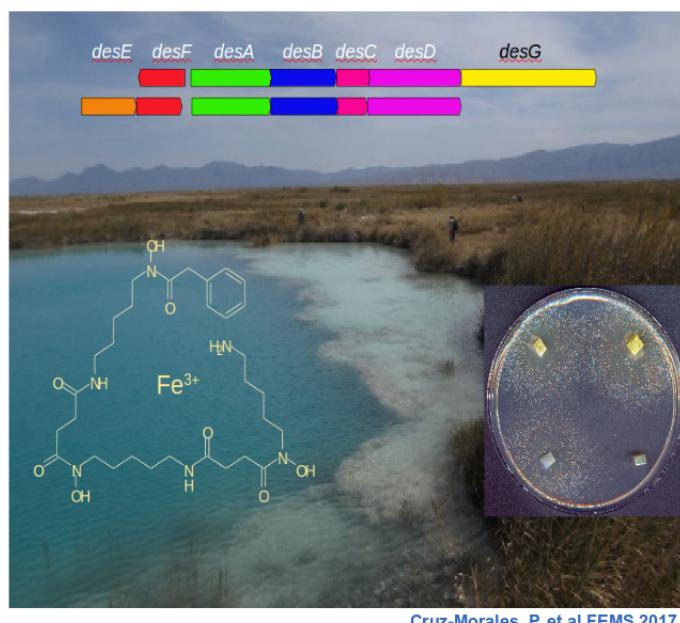
3.3. Aplicaciones de CORASON en Actinobacteria y Pseudomonas

En el capítulo anterior las variantes del BGC escitonemina en Cyanobacteria fueron encontradas al aplicar CORASON a dicho linaje. En este capítulo presento ejemplos del uso de CORASON para investigar los patrones de conservación/variación en familias de BGCs en los linajes Actinobacteria y *Pseudomonas*. Primero, las versiones iniciales de CORASON fueron usadas junto con cromatografía y espectrometría de masas (LC-MS) para estudiar la ecología y evolución de los sideróforos del tipo desferroxiaminas en Actinobacteria[136]. En un segundo ejemplo, CORASON fue utilizado para investigar la existencia de variantes en Actinobacteria del cluster productor de arsenolípidos que se encuentra en *Streptomyces lividans*. Finalmente, un tercer ejemplo es presentado: el de los contextos genómicos del metabolismo secundario de *tauD*. Esta enzima proviene

de una dioxigenasa involucrada en el metabolismo de taurina en su papel de enzima del metabolismo conservado. En Actinobacteria *tauD* es parte de 15 BGC reportados en MIBiG, aunque en *Pseudomonas* no existen BGCs reportados EvoMining predice expansiones en este linaje genómico y CORASON predice conservación en los contextos genómicos de estas copias extra que guardan cierta similitud con variantes de los BGC conocidos en Actinobacteria Figure A.5 .

3.4. Detectamos variantes de sideróforos en Actinobacterias de vida libre

El hierro es necesario en el metabolismo de muchos seres vivos. Para poder utilizarlo las bacterias han desarrollado moléculas captadoras de hierro llamadas sideróforos. Un ejemplo de sideróforo es la molécula de desferroxiamina sintetizada por los genes *des* en Actinobacteria. Usamos CORASON para identificar variantes del cluster biosintético de desferroxiamina Figure 3.2 Actinobacterias de cuatro ciénegas. En particular, encontramos una variante del BGC que se diferencia del cluster reportado por la ganancia de un miembro de la familia penicilina-amidasa. Al gen que codifica esa función se le llamó *desG* y es responsable de la arilación de desferroxiaminas en actinomicetos acuáticos [136]. Ya fue verificado que la variación génica está ligada con la variación molecular.



Cruz-Morales, P. et al FEMS 2017

Figura 3.2: Variantes del cluster biosintético de desferroxiamina fueron identificadas por CORASON en Actinobacterias de cuatro ciénegas. Una variante del BGC de desferroxiamina fue identificada. Esta variante se diferencia del cluster reportado por la ganancia de una penicilina amidasa. A este gen extra se le llamó *desG*.

3.5. Un BGC de metabolismo de arsénico tiene variantes que conforman una familia de BGCs

Analizamos los patrones de expansión-reclutamiento de la 3-fosfoshikimato-1-carboxivinyl transferasa (AroA) en el linaje de *Streptomyces* usando EvoMining. Se encontró un cambio de función en esta familia tal que en una de las ramas de expansiones se detectó específicamente una arsenoenol piruvato sintasa. Estudios de mutagénesis y de expresión diferencial génica en presencia de arsénico confirmaron que en *Streptomyces coelicolor* y en *Streptomyces lividans* esta enzima pertenece a un BGC que sintetiza arsenolípidos [61]. Mediante curación manual se descubrió por la diversidad en las secuencias de aminoácidos que el contexto genómico de AroA en estos organismos incluye una enzima PKS localizada a seis genes de distancia. AntiSMASH predice los BGCs tipo PKS de estas enzimas pero no incluye en ellos a la arsenoenol piruvato sintasa. El valor de EvoMining fue descubrir que esta copia extra de AroA estaba dedicada al metabolismo especializado y por tanto bien podía tener su propio BGC o dada la cercanía con las PKS podía ser parte de estos PKS-BGCs. Nos preguntamos si la diversidad de secuencia a nivel de BGC, si se encuentran variantes con distintos patrones de presencia/ausencia en los genes que componen al BGC de *S. coelicolor*. O más aun, quedaba por investigar si el BGC tenía cierto grado de conservación o era exclusivo de estos dos organismos *S. coelicolor* y *S. lividans*.

El contexto genómico conservado en las expansiones de AroA puede apreciarse en la Figure 3.3. La arsenoenol piruvato sintasa fue descubierta en un árbol de EvoMining como parte de una rama de expansiones de AroA en Actinobacteria. El contexto genómico de la arsenoenol piruvato sintasa de *S. coelicolor* tiene un *core conservado* en Actinobacteria. Este BGC está dedicado a la síntesis de metabolitos secundarios de tipo arsenolípidos. Primero se identificaron en otras secuencias genómicas contextos que contengan el homólogo de AroA y algún otro gen de su vecindad en *S. coelicolor*. A continuación, se ordenaron manualmente los contextos obtenidos y se pudo identificar al menos cuatro diferentes subclases de BGC. La primera clase mostrada en un rectángulo morado no contiene PKS o NRPS, la segunda enmarcada en verde contiene una PKS-NRPS híbrida. Los otros dos subgrupos solo contienen una PKS, en un caso está río arriba y en otro río abajo de AroA. La tercera clase incluye una PKS a la izquierda y a más de cinco genes de distancia de la arsenoenol piruvato sintasa; finalmente la última clase contiene una PKS a la derecha a sólo un gen de distancia de esta enzima. Así, se muestra que existen variantes de un BGC que contienen un *core* común, presumiblemente pueden producir variantes de arseno compuestos.

Hasta esta versión de CORASON la visualización realizada para los arsenolípidos no incluía ningún tipo de orden y era difícil distinguir grupos de BGCs. Por esta razón se pensó que el orden filogenético ya no de una enzima sino del *core* del BGC ordenaría las variantes del BGC. Este orden mostraría en un continuo la dinámica genómica del BGC establecida por los procesos evolutivos. En el caso de los arsenolípidos se

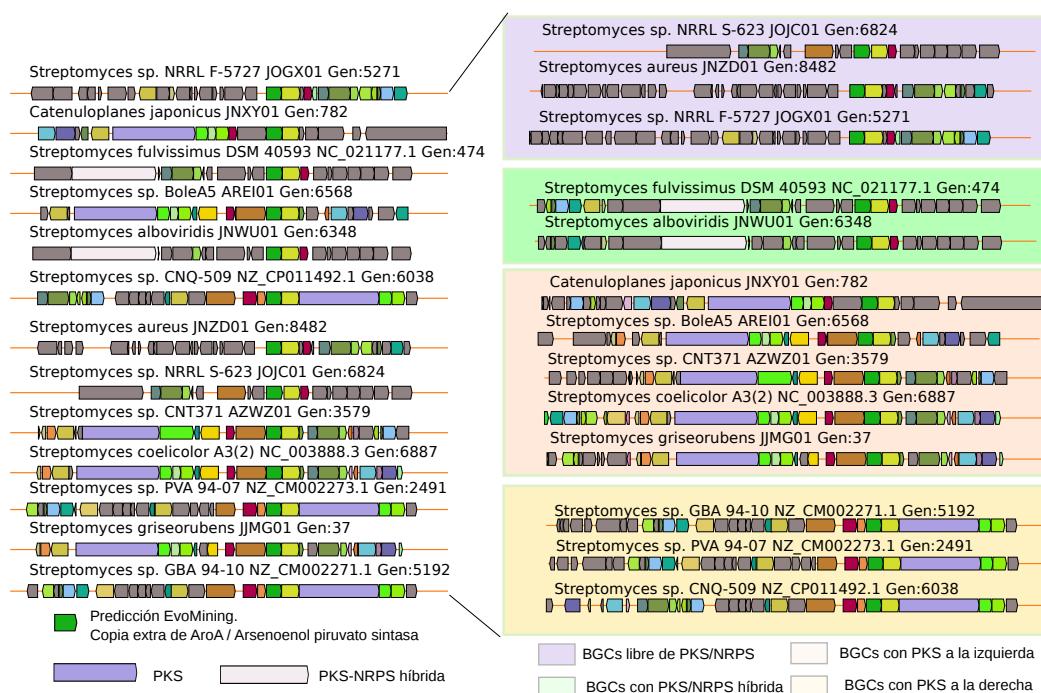


Figura 3.3: El contexto genómico conservado en las expansiones de AroA sugiere que es una familia de BGC con promiscuidad de productos. El contexto genómico de la arsenoenol piruvato sintasa de *S. coelicolor* tiene un *core conservado* en Actinobacteria que produce arsenolípidos. Se identificaron cuatro clases de BGCs. La primera clase en morado no contiene PKS o NRPS, la segunda enmarcada en verde contiene una PKS-NRPS híbrida. La tercera clase incluye una PKS a la izquierda y a más de cinco genes de distancia de la Arsenoenol piruvato sintasa y finalmente la última clase contiene una PKS a la derecha y a sólo un gen de distancia de esta enzima.

utilizó Orthocore para la identificación del *core* del BGC. En las siguientes versiones de CORASON esta característica fue implementada como parte del algoritmo.

3.6. Combinamos CORASON y BiG-SCAPE para mejorar la clasificación de BGC y logramos predecir dos nuevos compuestos de la familia rimosamide-detoxin que fueron caracterizados experimentalmente

BIG-SCAPE es una herramienta bioinformática para clasificar un conjunto de BGC en familias de acuerdo al contenido, conservación y distribución de sus dominios [110]. Un dominio es una región conservada de una proteína que evoluciona y funciona independientemente del resto de la proteína. La identificación de dominios es particularmente importante en los BGC porque las modificaciones químicas que catalizan los genes de los BGC frecuentemente están codificadas en dominios que pueden o no ser parte del mismo gen conservado pero que de cualquier forma repiten la misma reacción. Es decir un dominio con la función conservada, puede realizar el mismo paso de una ruta biosintética formando parte de genes que no son homólogos. BIG-SCAPE usa la conservación de dominios (no de genes) para agrupar BGC en diferentes familias de *clusters*, sin embargo no permite una visualización eficiente su evolución. Por ello se utilizó una parte del algoritmo de CORASON que al proporcionar un algoritmo para ordenar la diversidad dentro de la familia usando el *core* de dominios conservados Figure 3.4 . Así se consigue proponer la filogenia de los BGC y en ocasiones conectar mediante la evolución a familias de BGC aparentemente separadas por BiGSCAPE.

3.6.1. Identificamos nuevos productos variantes de la familia de BGCs Rimosamide - Detoxin en Actinobacteria integrando BiG SCAPE y CORASON

Ya que el TauD fue sugerida por un análisis de EvoMining como una familia con expansiones reclutadas a productos naturales de distintas subfamilias en Actinobacterias, en esta sección utilizamos CORASON y BIG-SCAPE para analizar una base de datos de miles de genomas. Con estas herramientas se organizó la diversidad biosintética de las familias de BGC detoxin y rimosamide [137]. El análisis reveló diversidad tanto en los géneros de los organismos que contienen a esta familia, y en la composición génica del BGC. Entre los géneros con alguna variante del BGC están *Amycolatopsis*, *Streptomyces*. El *core conservado* de los BGCs detoxin y rimosamide está compuesto por una NRPS, una NRPS/PKS híbrida, y un homólogo de *tauD*. En *E.coli* *tauD* se encuentra en el operón *tauABCD*. La ruta de síntesis de rimosamide difiere de la de

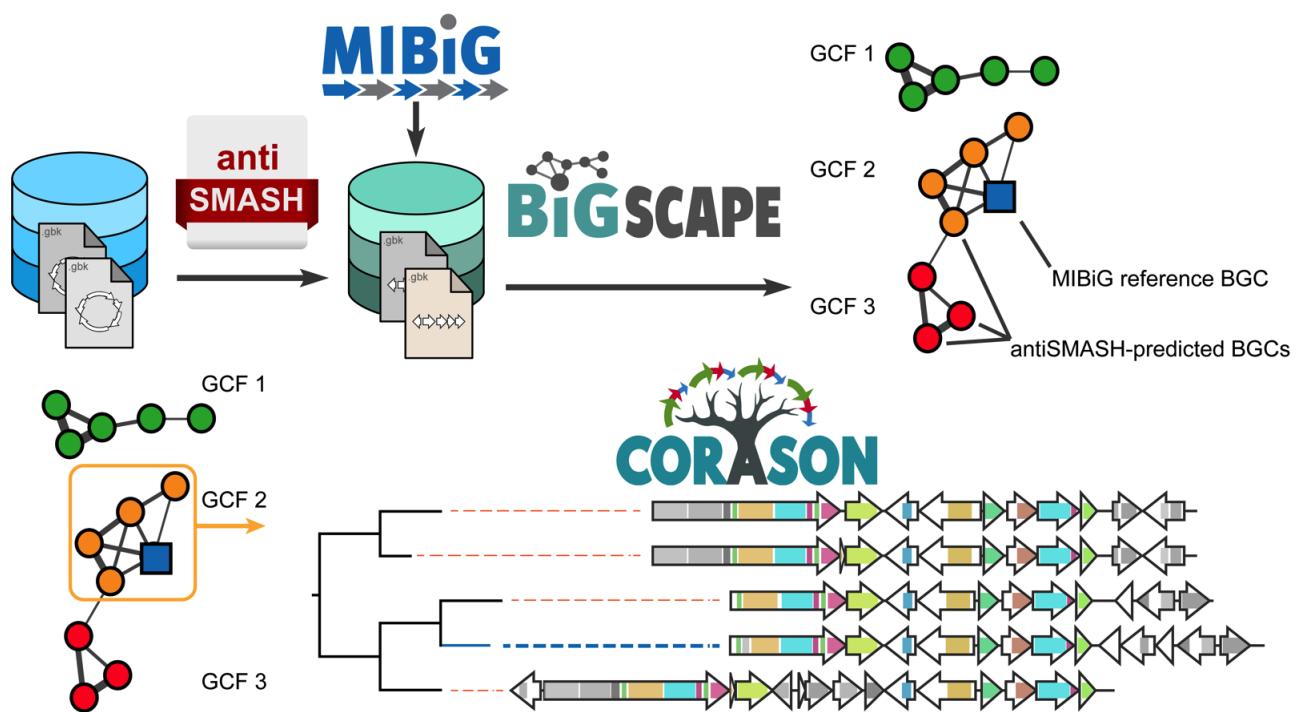


Figura 3.4: CORASON permite ordenar visualizar las familias de genes propuestas por BiG SCAPE. BiG SCAPE toma BGC que pueden provenir de MIBiG, de AntiSMASH y los clasifica en familias (GCF1, GCF2 y GCF3) que comparten dominios conservados. Con corason encontramos el *core* de dominios para hacer la filogenia de los BGC con ellos y visualizar su evolución

detoxins porque tiene una NRPS adicional, que codifica para una modificación del *core* de molécula detoxin/rimosamide con isobutirato y glicina.

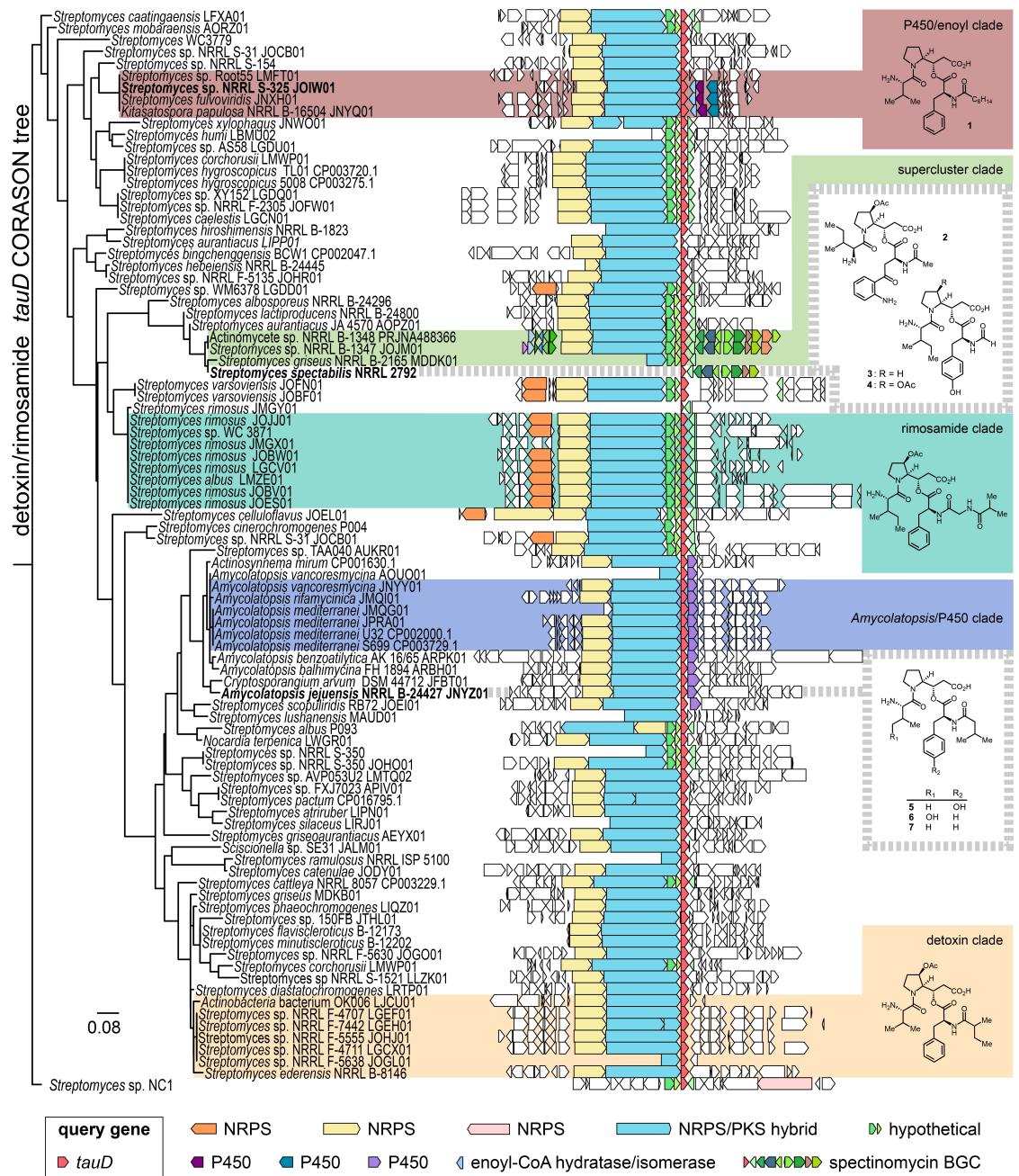
El hecho de que el gen *tauD* estuviera presente en todos los miembros de la familia Figure 3.5 captó nuestra atención. El TauD pertenece a la super familia de enzimas hidroxilasas dependientes de Fe(II)/ α -ketoglutarato. En particular *tauD* codifica una taurina dioxigenasa dependiente de α -ketoglutarato involucrada en la asimilación de sulfito por la liberación oxigenolítica del aminoácido taurina. Interesantemente, esta familia también está presente en linajes como hongos, bacterias y plantas. Dichas enzimas catalizan hidroxilaciones, desaturaciones, expansiones y formaciones de anillos entre otras transformaciones químicas. A la fecha, el rol de TauD en la biosíntesis de los metabolitos detoxin y rimosamide aún es desconocido, se ha sugerido que es responsable de la oxidación de la prolina observada en algunos análogos.

Para identificar variantes de los BGC relacionados a detoxin y rimosamide dentro de la rama de metabolismo especializado los 1175 BGC que contenían un homólogo de *tauD* se pasaron por un análisis combinado de BiG-SCAPE/CORASON. Se uso *tauD* como gen de referencia en CORASON ya que es el único gen miembro del ‘BGC core’ que está presente en todos los genomas. Es importante notar que el *core* del BGC podría contener hasta 3 genes porque la NRPS, y la NRPS-PKS híbrida quedan fuera en este ejemplo debido a que algunos genomas no están completamente secuenciados y justamente hay huecos a los extremos de los contigs que contienen estos BGC. Este es el caso de los organismos *Streptomyces humi*, *Streptomyces spectabilis* y *Amycolatopsis vancoresmycina*]

3.6.2. CORASON sugiere que las familias detoxin y rimosamide pertenecen a un amplio grupo de familias dedicadas a la síntesis de péptidos.

El análisis de CORASON reveló que las familias de los BGC detoxin y rimosamide identificados en BiG-SCAPE eran parte de una familia expandida de BGC de biosíntesis de péptidos que incluía clados inexplorados del phylum Actinobacteria Figure 3.5. La organización filogenética de los BGCs provista por CORASON, reveló familias de BGCs que fueron omitidas debido al umbral utilizado por el algoritmo de clustering de BiG-SCAPE. Esto debido a la cercanía de genes biosintéticos detectados por antiSMASH como suficientemente diferentes como para ser clasificados en otras familias.

Hipotetizamos que las toxins codificadas por los BGCs en los clados inexplorados contendrán cierta novedad química relacionada con las variaciones genéticas. Afortunadamente, 40 de las 152 cepas identificadas como portadoras de un BGC estaban representadas en nuestros datos metabolómicos de 363–cepas por LC-MS/MS. Los análisis de redes moleculares de estos datos indicaron la presencia de tres detoxin conocidas, cuatro rimosamide conocidas y otras 103 variantes de detoxin o rimosamide, el basto universo químico sugerido por el análisis BiG-SCAPE/CORASON.



3.6.3. Aglunos clados selectos del árbol de CORASON que contiene a las familias rimosamide/detoxin contienen diversidad génica que correlaciona con novedad química.

Tres de los clados que codifican para detoxin BGC fueron identificados por BiG-SCAPE dentro del árbol de CORASON capturaron nuestro interés (ver las cajas coloreadas de la Figure 3.5). En esta sección se describe el trabajo experimental realizado por Michael Mulloney del grupo de colaboradores de West Chicago, de los tres clados y específicamente de los organismos que seleccioné como candidatos a presentar diversidad química.

El clado P450/enoyl agrega una heptanamida al core molecular detoxin/rimosamide

El primer clado es el ‘P450/enoyl clade’ contiene genes como el citocromo P450 y una enoil-CoA hidratasa/isomerasa dentro de cada uno de sus BGC. Este clado está marcado en rojo Figure 3.5. Análisis de datos por tandem MS de extractos de *Streptomyces* sp. NRRL S-325, que se encuentra dentro de este clado, llevó al descubrimiento de la detoxin S1. Este nuevo análogo contiene una cadena lateral de heptanamide, una estructura única entre las detoxins y rimosamides cuya instalación posiblemente depende de la enzima enoyl-CoA hidratase/isomerasa.

El superclado spectinomycin/ detoxin-rimosamide produce cinco variantes de detoxin.

El segundo clado de interés,fue nombrado el ‘supercluster clade’ (Figure 3.5, en verde claro), comprende los BGCs con genes de detoxin adyacentes al cluster que produce espectinomycina. El cluster de espectinomycina (MIBiG BGC0000715) contiene en su periferia al gen *tauD* como se muestra en la línea gris punteada de la Figure 3.5. La secuencia del cluster de spectinomycin depositada en MIBiG es la única secuencia disponible de *Streptomyces spectabilis* NRRL 2792. Como no se sabe que *tauD* participe en la síntesis de spectinomycin se hipotetizó que pueden existir los genes del cluster de detoxin al lado de los genes del BGC de espectinomycina en *S. spectabilis* NRRL 2792. Adquirimos esta cepa para determinar si el análisis de CORASON podía ayudar a la predicción de detoxin basado solamente en la presencia del gen de referencia pero en ausencia completa de la secuencia del BGC de detoxin. El análisis en tandem de espectrometría de masas de extracto *S. spectabilis* NRRL 2792 reveló la presencia de cinco compuestos tipo detoxin.

Los tiempos de retención de iones y los patrones de fragmentación de los últimos dos compuestos también fueron observados en extractos de *Streptomyces* sp. NRRL B-1347 parte del clado del supercluster. Esto confirma la habilidad de CORASON para guiar

un descubrimiento mediante la utilización de la filogenia a pesar de lo limitado de los datos en la cepa NRRL-2792. El análisis de LC-MS de cultivos de NRRL-2792 suplementados con isotopos estables etiquetados de amino ácidos corroboraron las predicciones estructurales basadas en los análisis de la cepa cercana *Streptomyces* sp. NRRL B-1347. Aunque los datos de MS fueron insuficientes para desenmascarar esta estructura, el compuesto 2 fue producido por *S. spectabilis* NRRL 2792 en suficiente abundancia para el aislamiento y la elucidación estructural por NMR.

El clado *Amycolatopsis P450* produce cinco variantes de detoxin.

El tercer clado que se estudió es al que pertenecen las familias rimosamide-detoxin, contiene BGCs casi enteramente provenientes del género *Amycolatopsis*. Este clado está marcado en morado en la (Figure 3.5. Este clado de BGCs también contienen un gen P450 único entre los BGCs del árbol, así que fue llamado el clado ‘*Amycolatopsis /P450 clade*’. Aunque no se contaba con datos metabolómicos de las cepas del clado de BGC definidos por BiG-SCAPE como una *Gen Cluster Family* (GCF), la visualización filogenética de CORASON permitió la selección de una cepa de *Amycolatopsis* de la que se tenían datos metabolómicos con un BGC muy similar, y que también contiene el gen P450 ((Figure 3.5, línea gris cerca del clado *Amycolatopsis/P450*). Los análisis de los datos de tandem MS de extracto fermentado de *Amycolatopsis jejuensis* NRRL B-24427 reveló isómeros de detoxins P1 que contienen tirosina, P2 mostrando fenilalanina y una valina hidroxilada, así como la detoxin P3, un análogo cercano libre de hidroxilación. Además se consiguió validar la asignación de aminoácidos observados en los patrones de fragmentación de MS/MS mediante el uso de experimentos de incorporación de isotopos estables etiquetados de aminoácidos.

3.7. CORASON permitió explorar la promiscuidad de familias de BGCs de enzimas divergentes de metabolismo central.

Nuestros resultados ilustran como BiG-SCAPE puede identificar conjuntos de BGCs relacionados, en un gran número de secuencias de genomas. Además al usar CORASON para reconstruir las filogenias de BGC para ordenar visualmente la evolución de un cluster biosintético y su diversidad proveen herramientas poderosas para el descubrimiento de nuevos clados de BGC que codifican en consecuencia para nueva química. Respecto a los BGCs detoxin/rimosamide, CORASON mostró habilidad para ayudar a minar bases de datos genómicas y descubrir siete nuevas detoxins. Específicamente, la organización de las variantes de los BGC facilitó la identificación de los correspondientes variaciones en la estructura química -la presencia de un enoyl-CoA hidratasa/isomerasa corresponde a la familia de amida ácido graso detoxin S1 y la presencia de un gen P450 corresponde a la presencia de hidroxilaciones en detoxins

P1–P3.

Estos resultados demuestran una forma alternativa en la que la minería genómica permite identificar cómo se genera la diversidad de funciones ahora a nivel de BGC. Al identificar cómo es la evolución de los genes conservados de los *clusters* y diferenciarlos de los cambios en los genes accesorios de los rodean fue posible guiar el descubrimiento de nuevos productos naturales. También este análisis nos permitió observar que existen distintos niveles de variación que generan diversidad química y que pueden ser entendidos como promiscuidad. Dicha variación se puede originar debido a la divergencia a nivel de secuencia de dominios proteicos pasando por variación a nivel de la variación entre genes de la misma familia enzimática y llega hasta grupos de genes que varían en cuanto a presencia/ausencia de algunos los genes que los componen. Por si esto fuera poco, además detectamos que hay familias de BGC que a su vez forman superfamilias de BGC o que están compuestas por subfamilias de BGC y cuya diversidad a todos esos niveles correlaciona con la diversidad de los productos naturales que producen.

Capítulo 4

La familia PriA/HisA

PriA es la familia de enzimas de Actinobacteria homóloga a la familia HisA existente en Enterobacteria, Cyanobacteria, *Pseudomonas* y Archaea. Según las definiciones de este trabajo PriA es una familia promiscua ya que se ha encontrado que varios miembros de PriA *in vitro* tienen la capacidad de catalizar tanto la reacción correspondiente a su homólogo HisA en la síntesis de histidina como la isomerización que cataliza TrpF cuya reacción está involucrada en la producción de triptofano. Es decir, se ha mostrado mediante cinéticas enzimáticas y análisis de complementación genética que en varias Actinobacterias PriA participa a la vez en las rutas de síntesis de histidina y triptofano mediante la isomerización de un anillo de cinco carbonos Figure 4.1. Los primeros miembros caracterizados como promiscuos en esta familia fueron *Streptomyces coelicolor* y *Mycobacterium tuberculosis* [9] en 2003. La mayoría de las actinobacterias han perdido el gen *trpF* aunque su actividad es esencial. Además conservan el resto del operón de triptofano, por lo que se cree que la promiscuidad de PriA está extendida en un gran subconjunto de Actinobacteria. En la ruta de histidina PriA isomeriza el sustrato ProFAR en PRFAR, realizando la función HisA. En la ruta de triptofano PriA lleva a cabo la isomerización de PRA en CdRP catalizando la reacción de TrpF en la ruta del triptofano. La vecindad genómica de PriA en *Streptomyces coelicolor* y en otras Actinobacterias contiene genes tanto del operón de histidina como del de triptofano.

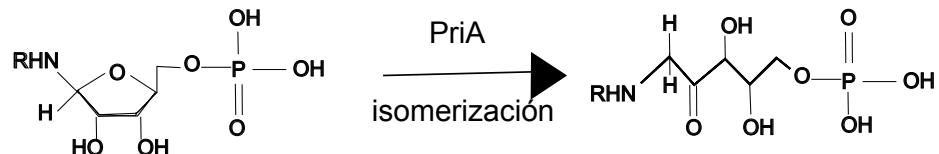


Figura 4.1: La reacción que cataliza PriA es una isomerización donde abre un anillo de cinco carbonos.

En este capítulo usamos como modelo de una familia promiscua la familia de PriA/HisA porque además PriA ha mostrado un gradiente funcional en Actinobacteria. Esta variación divide a la familia en varias subfamilias según su capacidad catalítica en los

sustratos ProFAR y PRA. La evolución de las subfamilias de PriA y sus funciones es compleja y muestra dinámicas distintas en cada linaje (ver introducción). Por ejemplo incluye a los de miembros de PriB, la subfamilia ubicada en el género *Streptomyces* con baja capacidad de catálisis para la función TrpF. Varios *Streptomyces* con un ortólogo en la familia PriB, se diferencian de otras Actinobacterias en que contienen en su genoma un gen *trpF* localizado fuera del contexto genómico inmediato de los operones de histidina y triptófano. Otra subfamilia de PriA es subHisA, que ha perdido totalmente la actividad TrpF, existen miembros de subHisA en *Corynebacteria* y en *Actinomycetes*. Finalmente en *Actinomycetes* también encontramos la subfamilia *subTrpF* que ha perdido la actividad de HisA.

En este capítulo se exploran cuatro aspectos de la familia PriA. *i)* La distribución y el contexto genómico de PriA en diversos linajes genómicos. *ii)* La información contenida a nivel de aminoácidos en variantes de PriA como medio de estudio de rutas evolutivas y su relación con la reconstrucción de su estructura tridimensional. *iii)* Las posibles afinidades de PriA por otros sustratos con métodos bioinformáticos, y finalmente *iv)* La validación experimental de la actividad de PriA con sus sustratos PRA, ProFAR o combinaciones de los dos.

4.1. La familia PriA cambió su función y sus patrones de promiscuidad en los cuatro linajes analizados

4.1.1. Las expansiones no son condición necesaria para la promiscuidad

Para explorar PriA en diversos linajes genómicos se utilizaron las herramientas EvoMining y CORASON descritas en los capítulos previos. Se investigaron las expansiones de la familia PriA en los linajes Actinobacteria, Cyanobacteria, *Pseudomonas* y Archaea. En la Figure 4.2 se muestra el número promedio de copias por genoma en los linajes genómicos seleccionados. En Actinobacteria, donde se sabe que PriA es promiscua no se detectaron copias extra. Según EvoMining en Actinobacteria no hay expansiones, prácticamente todas las copias son reconocidas como de metabolismo central (rojo o morado) aunque algunas PriA además son marcadas por antiSMASH como parte de algún cluster biosintético (morado). En cambio en Cyanobacteria, *Pseudomonas* y Archaea la figura muestra en negro las copias extra de las que no se conoce su destino metabólico. El caso de Archaea es llamativo porque las copias de metabolismo central llegan en promedio hasta .5 copias por genoma, es decir muchos genomas de Archaea no cuentan con una copia de PriA, y en cambio, contrario a Actinobacteria, un 50 % de las copias es marcado en negro, es decir varios de los genomas que tienen al menos una copia de PriA en realidad tienen dos copias. Esta figura muestra que en Actinobacteria PriA constituye un ejemplo de familia promiscua mayoritariamente

distribuida con una sola copia por genoma por lo que es evidente que para que una familia sea promiscua no es imperativo tener copias extra con marcas de reclutamiento en metabolismo especializado. Aunque las copias extra suelen ser una indicación de promiscuidad, no son una condición necesaria. Tanto EvoMining como CORASON mostraron que existen excepciones de organismos donde PriA tiene doble copia, tanto en Actinobacteria como en otros linajes genómicos.

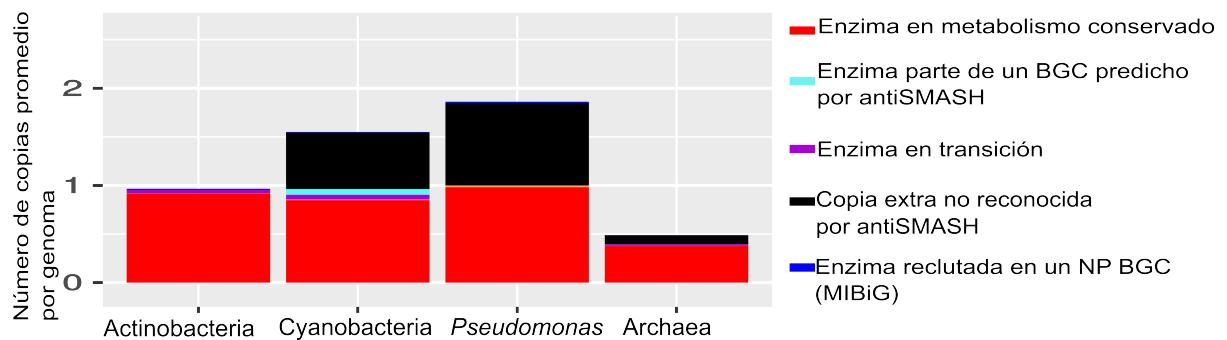


Figura 4.2: Número promedio de copias por genoma de PriA en Actinobacteria, Cyanobacteria, Pseudomonas y Archaea. Los colores muestran el destino metabólico asignado a cada copia según EvoMining. En rojo están los BBH a las enzimas semilla de metabolismo central. En morado las enzimas de metabolismo central también reconocidas por antiSMASH como parte de unBGC y en negro las copias sin un destino metabólico conocido.

4.1.2. Las expansiones condujeron a la creación de la subfamilia HisF

Después del conteo de número de copias promedio, se analizaron los árboles de PriA de EvoMining coloreados de acuerdo al número de copias, Figure 4.3En Actinobacteria la mayoría de las hojas son verdes mostrando que existe sólo una copia por genoma en ese organismo. Sin embargo, existen varias hojas de color amarillo, lo que indica que hay dos copias en algunos genomas. En Cyanobacteria, *Pseudomonas* y Archaea en contraste con Actinobacteria, se muestran una mezcla entre organismos que poseen una (verdes) o dos copias (amarillos) de PriA. Sin embargo al analizar detalladamente los árboles producidos por EvoMining en los distintos linajes, tanto en Cyanobacteria como en *Pseudomonas* la copia extra está en una rama divergente y muy poblada del árbol de esta Familia Expandida, lo que indica que esas copias extra son en realidad miembros de otra subfamilia enzimática que aun guarda cierta similitud de secuencia con PriA. Esta segunda copia está en su mayoría anotada por RAST como imidazol glicerol fosfato sintasa ciclase en ambos linajes. En Archaea sin embargo, diversas especies de la clase Methanomicrobia sí tienen dos copias cercanas a PriA.

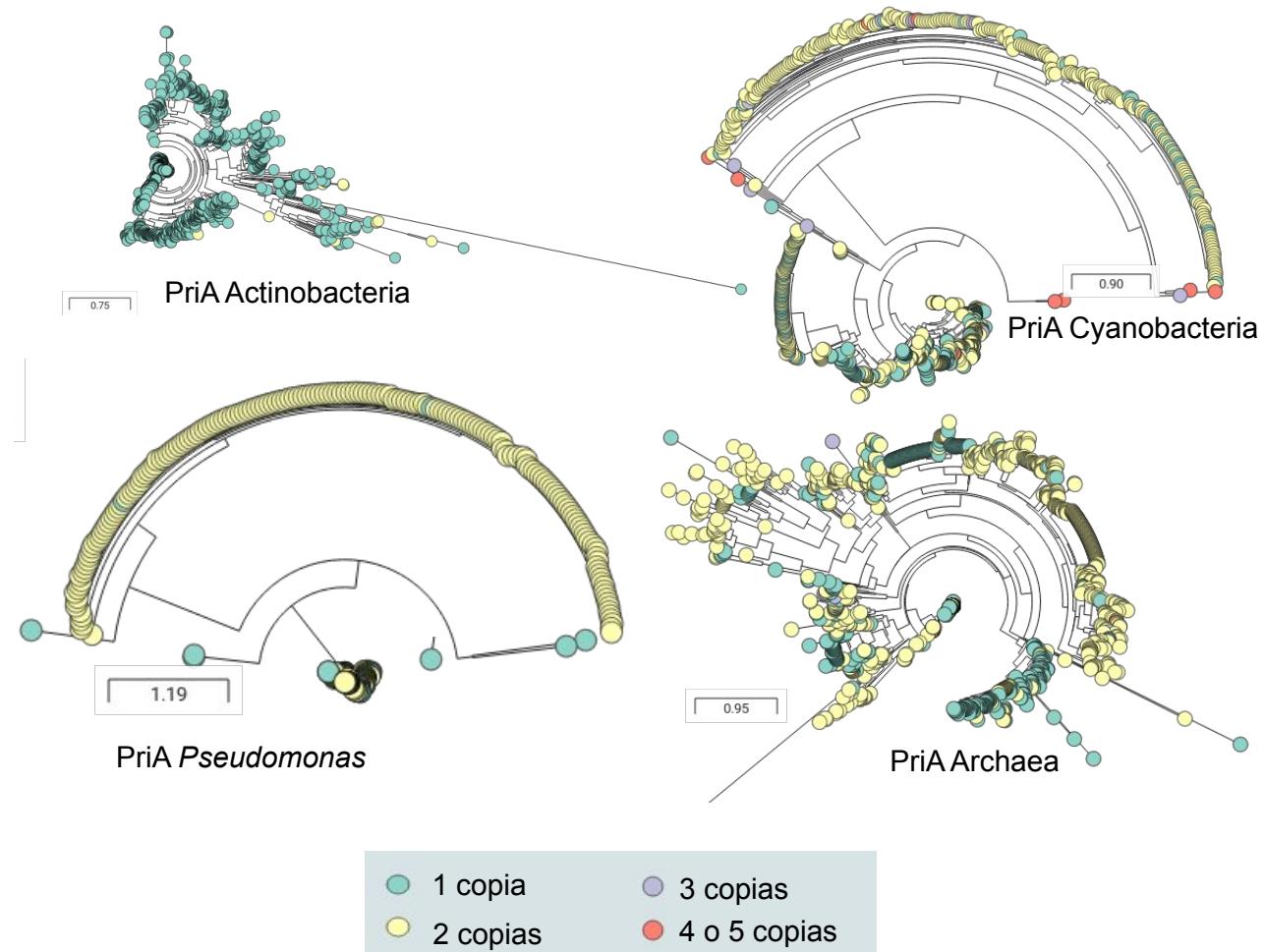


Figura 4.3: Número de copias de PriA en Actinobacteria, Cyanobacteria, Pseudomonas y Archaea. En Actinobacteria, donde se ha comprobado su promiscuidad enzimática la moda en el número de copias es uno (verde). En Cyanobacteria y Archaea se observa una mezcla de hojas verdes y hojas amarillas, donde las amarillas son nodos que pertenecen a organismos con dos copias. También en estos linajes algunos organismos poseen tres copias (morado) y cuatro o cinco (rojo). En Pseudomonas la mayoría de los organismos muestran dos copias

4.1.3. Cada linaje tiene distintos destinos metabólicos de PriA

Después de explorar cuáles organismos tienen expansiones de PriA, analizamos el posible destino metabólico de las copias extra de la familia como se muestra en la Figure 4.4. El árbol de Actinobacteria está poblado de hojas rojas Figure 4.4, es decir de PriA dedicadas al metabolismo conservado, en este caso relacionado a las rutas de Histidina y Triptofano. Sin embargo hay algunas hojas grises, como es el caso de los dos *Serenicoccus*. Es posible que estas PriA puedan tener funciones alternativas o ser otros eventos con cambio de promiscuidad. Además, en Actinobacteria la PriA de *Janibacter hoilley*, la rama más larga del árbol, es muy divergente. Esto se debe a que existe una fusión de PriA con HisH. La fusión de genes bacterianos es un mecanismo común para formar proteínas multidominio [138]. De hecho, dentro del operón de histidina existen fusiones reportadas HisNB y HisIE con proteínas bifuncionales en ciertas proteobacterias [139]. La fusión aquí presentada no parece ser un artefacto de anotación ya que hay otros genomas de *Janibacter* con secuencias de PriA más grandes que el promedio. Los árboles que se produjeron por EvoMining están disponibles para exploración interactiva en Microreact en los links de la Table 4.1:

En Cyanobacteria hay pocas predicciones de EvoMining, lo que se muestra en escasas hojas verdes Figure 4.4 que además no están localizadas cerca de su reclutamiento la HisA de saxitoxin, el BGC proveniente de Cyanobacteria. Varias de las copias extra de Cyanobacteria corresponden a HisF, la subunidad enzimática imidazol glicerol fosfato sintasa parte también del operón de histidina. HisA proviene de una duplicación de un ancestro común de la mitad de su tamaño y HisF proviene de la duplicación de HisA [140]. Por ello puede considerarse que EvoMining en efecto está encontrando una expansión de HisA que consiste en la familia HisF en el linajes Cyanobacteria, lo mismo ocurre en *Pseudomonas*. En su momento HisF fue parte del *dispensable genome*, no todos los organismos poseían esta expansión, posteriormente, al parecer antes del último ancestro común de Archaea, Bacteria y Eukarya, la síntesis de histidina fue fijada [44]. Este es un caso donde lo que alguna vez fue *dispensable genome* / metabolismo secundario, se ha vuelto *shell genome* / metabolismo conservado y donde se muestra que en estos linajes Cyanobacteria y *Pseudomonas* EvoMining aún es capaz detectar esa marca de expansión. De hecho se ha reconstruido una HisF ancestral con el objetivo de probar si retenía la actividad de HisA, es decir si poseía promiscuidad enzimática [142]. LUCA-HisF mostró no ser promiscua para los sustratos de HisA ni tampoco para su similar el sustrato TrpF.

En *Pseudomonas* hay una gran población de predicciones de EvoMining, pero el árbol tiene similitudes con Cyanobacteria, la rama divergente corresponde en su mayoría a copias de HisF. De hecho, el reclutamiento que hace que el árbol de *Pseudomonas* tenga una rama verde está anotado funcionalmente no como una HisA, sino como una HisF parte de un BGC que produce un lipopolisacárido en la Proteobacteria *Legionella pneumophila*. En Archaea, la rama central con una mezcla de hojas grises y rojas Figure 4.4 contiene también copias de HisF provenientes de genomas de *Sulfolobus*. Al

verificar en el árbol interactivo en Microreact Table 4.1 el número de copias presente en organismos con un homólogo clasificado como HisF se comprobó que los *Sulfolobus* sólo poseen una copia en este árbol. Sin embargo, tanto al explorar manualmente los genomas de *Sulfolobus*, como al revisar la literatura sobre metabolismo de histidina en Archaea se encontró que sí se han encontrado homólogos de PriA en genomas de *Sulfolobus* [44]. Por tanto este árbol sugiere que aunque existe tanto PriA como su expansión HisF en el género *Sulfolobus*, la copia HisF es la más parecida a la semilla con que se generó este árbol. Además la similitud de secuencia del homólogo de HisA no fue suficiente para recuperar copias de HisA en este experimento computacional. Algunas de las hojas grises del árbol sin destino metabólico conocido serán exploradas en la siguiente sección.

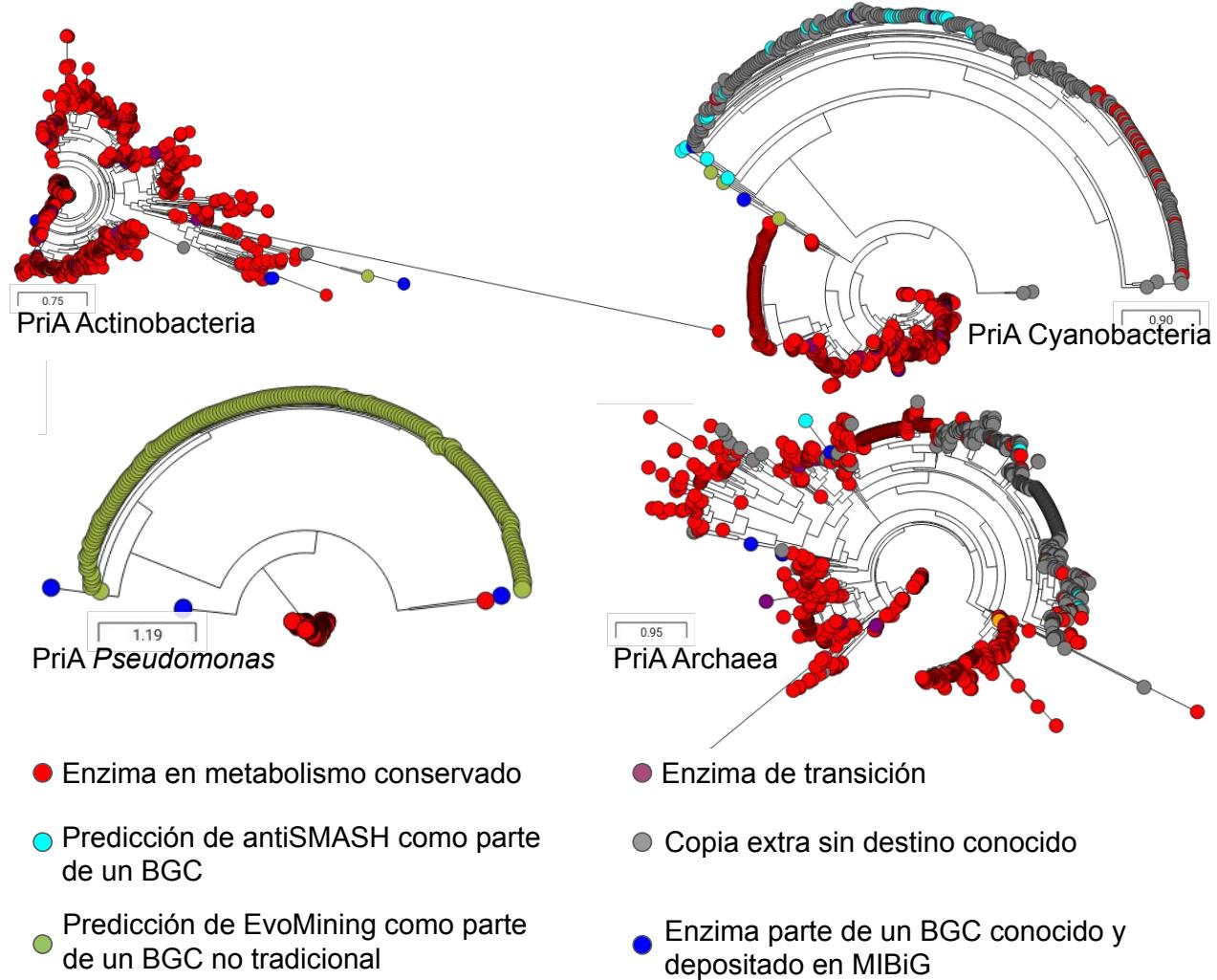


Figura 4.4: Árboles de destino metabólico de PriA en Actinobacteria, Cyanobacteria, Pseudomonas y Archaea según EvoMining

Cuadro 4.1: Árboles EvoMining de PriA/HisA en MicroReact

Linaje	Link al árbol de EvoMining en Microreact
Actinobacteria	7g2IGfkv9
Cyanobacteria	qF6jWRMox
<i>Pseudomonas</i>	ydff6DWqs
Archaea	Ig-m9Cm6f

Homólogos de PriA han sido reclutados a clusters de metabolismo especializado

Se encontraron algunos homólogos reclutados a BGC conocidos, marcados en azul en el árbol, que son miembros de la familia expandida PriA/HisA en estos linajes genómicos. La información de dichos BGC está listada en la tabla Section 4.1.3. Entre ellos se encuentran dos toxinas de Cyanobacteria [143], un lipopolisacárido producido por una Proteobacteria y un BGC productor de cloro-pentostatina producido en Actinobacteria [144].

Table: Reclutamientos de expansiones de PriA en MIBiG

Compuesto	Organismo	BGC origen	Clase
Pentostatina	<i>Actinomadura</i> sp. ATCC 39365	Actinobacteria	Otros
Saxitoxina	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> T3	Cyanobacteria	Alcaloide
Toxina	<i>Dolichospermum circinale</i> AWQC131C	Cyanobacteria	Otros
Lipopolisacárido	<i>Legionella pneumophila</i>	Proteobacteria	Sacárido

La pentostatina es un antibiótico nucleosídico derivado de adenosina, cuyo cluster es llamado *ada*. La PriA del cluster *ada* es llamada *adaK* y sí parece participar del cluster, ya que muestra una isomerización sobre un sustrato similar a los nativos de PriA, Figure 4.5, con un anillo de 5 carbonos, dos OH, un oxígeno y un grupo fosfato. Esta isomerización es muy parecida a la que realiza PriA sobre ProFAR y PRA. Esta PriA no es una copia extra, sino la copia única de este organismo. Este contexto genómico no se encuentra conservado en las copias vecinas en el árbol. Es relevante mencionar que la mutante de PriA no suprime la producción de este antibiótico en *Actinomadura* sp. ATCC 39365, por lo que los autores especulan que otra enzima podría estar realizando la isomerización redundantemente. *Actinomadura* no posee una copia de TrpF que sería el candidato inmediato.

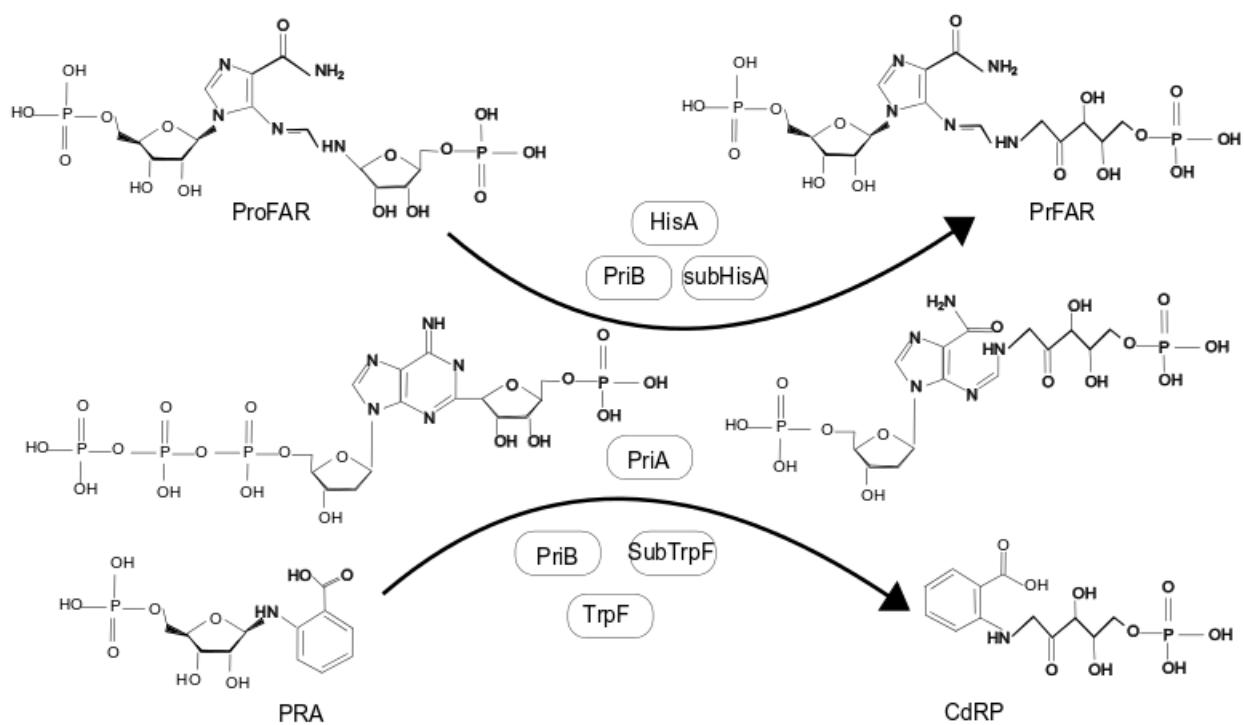


Figura 4.5: PriA participa en la síntesis del antibiótico ada en *Actinomadura*. Los sustratos nativos de Pria, ProFAR y PRA son isomerizados de manera muy similar a un paso en la ruta de síntesis de ada

4.2. Análisis de contextos genómicos de PriA/HisA en distintos linajes utilizando CORASON como herramienta de visualización.

4.2.1. Contextos genómicos de HisA en Actinobacteria

En Actinobacteria, se observó que todos los *Streptomyces* tienen el cluster de PriA parcialmente conservado con respecto al BGC de *Streptomyces coelicolor*. Ejemplos de ello son *S. roseous*, *S. sviceus*, *S. sp C* y *S. Mg1* donde genes tanto de la ruta de histidina como de triptofano rodean a PriA. Otros como *S rimosus*, *S HmicA12* y *S. sp CT34* tienen los genes de triptofano más alejados Figure 4.6 . Como ya se describió en la sección de EvoMining, el único organismo de este género con una copia extra de PriA es *Streptomyces* CT34. Esta copia parece deberse a transferencia horizontal dado que su mejor hit en NCBI proviene de una *Lentzea*. Aún así parece ser un homólogo lejano ya que tuvo 50 % de identidad en 98 % de cobertura con respecto a la copia de *Lentzea*. Otro caso interesante en Actinobacteria son las Actinomaduras, ya que CORASON muestra que el cluster *ada* no está conservado en ellas (datos no mostrados). Además, también en Actinobacteria CORASON muestra en *Sporichthya polymorpha* DSM 43042 una PriA precedida por una NRPS, una enzima por excelencia de productos naturales. En otros organismos antiSMASH predice que PriA forma parte de clusters putativos, por ejemplo en *Modestobacter marinus* NC_0179551, *Geodermatophilus obscurus*, y en *Streptacidiphilus jeojiense*. Los contornos de los genes reconocidos por antiSMASH como parte de un BGC son marcados en azul en las figuras de CORASON.

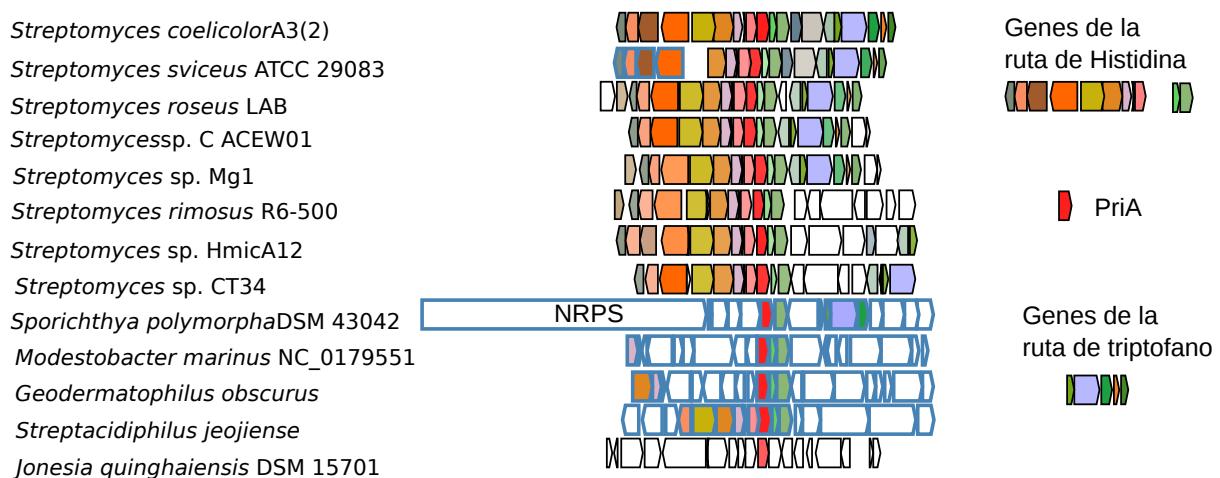


Figura 4.6: Contextos de PriA en Actinobacteria

4.2.2. Contextos genómicos de HisA en Archaea

En cuanto al contexto de HisA en Archaea la Figure 4.7 muestra que existen contextos como los de *Thermococcus kodakarensis KOD1* y *Thermococcus sp JCM 11816* donde *hisA* está rodeada de genes tanto de histidina como de triptofano. Sin embargo esta configuración conjunta no es la generalidad. En Archaea, se conocen tres escenarios para la organización de los genes de síntesis de histidina. En el primero los genes de síntesis están dispersos en el genoma. El segundo escenario es la existencia de suboperones pequeños como *hisHAF* y finalmente el tercer escenario es el operón con la mayoría de los genes juntos aunque no siempre en el mismo orden [44].

En efecto en Euryarchaeota están presentes los tres escenarios, en *Archaeoglobales* y *Halobacteriales* los genes del operón *his* están distribuidos en el genoma, como muestran los contextos de *hisA* en *Halorubrum tebenquichense* y *Halonotius sp.* sin ningún otro gen del operón cerca. En *Thermosarcinales* donde ya se conocía la existencia del suboperón *hisGBA*, se observó que éste se encuentra conservado en la mayoría de los miembros del orden como ejemplifica el contexto correspondiente a *Methanosarcina lacustris*. En *Thermococcales* se conocía la configuración *hisGDBHAFIEC* que es confirmada por los tres *Thermococcus* de la Figure 4.7, donde además se muestran dos contextos acompañados del su operón de triptofano *trpCDEGF*, resultando un contexto total de *hisGDBHAFIECXtrpCDEGF*. En el phylum Thaumarchaeota se habían estudiado sólo dos organismos y estos presentaban la configuración *hisGDCXBHAI*. En contraste en este trabajo encontramos en el orden *Nitrosopumilales* la configuración *hisDCXBHAFIE*, donde además la *hisX* es una fosfatasa homóloga a la *hisX* presente en *T. kodakarensis*. Este patrón es común en Thaumarchaeota, aunque también se muestra la existencia del suboperón *hisAF* en *Aigarchaeota* así como la configuración de genes dispersos en el genoma en *Thaumarchaeota archaeon JGI OTU-1*. En Crenarchaeota *hisCGABFDEHI* está presente según la anotación funcional de RAST, aunque no todos los genes aparecen en color en la figura debido a la baja identidad de secuencia que conservan con respecto al contexto de referencia de *T. kodakarensis*. En *Pyrobaculum neutrophilum* está parcialmente conservado el operón con la configuración *hisCEDFBA*, nuevamente con algunos genes con baja identidad de secuencia respecto a *T. kodakarensis*. La configuración genes dispersos en el cromosoma en el phylum Crenarchaeota es mostrada en el contexto de *Ignicoccus islandicus*. Finalmente fue analizado el contexto de *hisA* en Bathyarchaeota un phylum donde no se contaba con información previa. En Bathyarchaeota se conserva como en Thaumarchaeota el ordenamiento *hisGDCXBHAI*, aunque existen otras configuraciones como muestra *Bathyarchaeota archaeon B25*.

Otra característica interesante de la visualización de los contextos de HisA en Archaea es que los tamaños de *hisA* son más variados que en Actinobacteria. Esta característica se debe tanto a variación intrínseca del tamaño de *hisA* como a diversas fusiones. Por ejemplo en *Halotius sp J07HN6* *hisA* se encuentra fusionada con *flaJ* una proteína relacionada con la construcción de flagelos en Archaea. En *Candidatus Bathyarchaeota archaeon B26-1* *hisA* se muestra fusionada con *hisF*.

En conclusión, no encontramos una configuración conservada que prevalezca en todo Archaea. Esto puede deberse a que Archaea es un dominio, no un phylum como Actinobacteria, y por tanto hay una mayor distancia entre los organismos que la conforman. Queda por

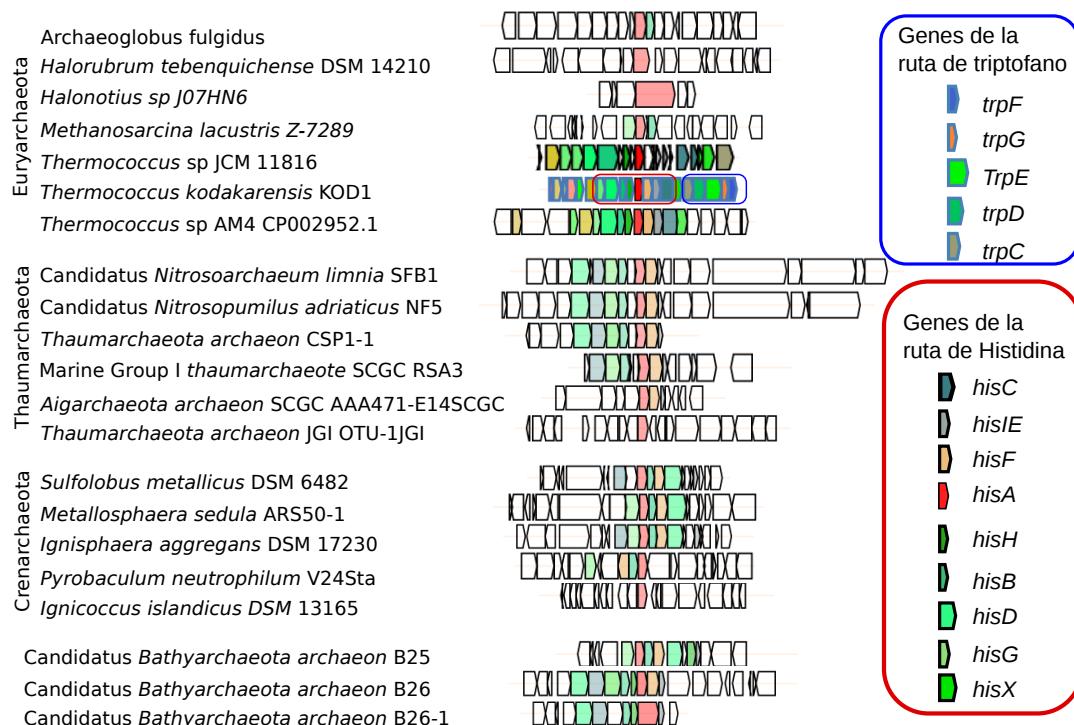


Figura 4.7: Contextos de PriA en Archaea

4.2.3. Contextos genómicos de HisA en saxitoxin

Como se mostró en la sección de análisis de expansiones de HisA con EvoMining en Cyanobacteria, *hisA* aparece dentro del cluster reportado como productor de saxitoxina en MIBiG. El contexto que rodea al reclutamiento de *hisA* en el cluster de saxitoxina no está conservado en Cyanobacteria según la visualización de contextos producida por CORASON. Tomando como semilla la secuencia de HisA del BGC de saxitoxina y como referencia el cluster de saxitoxina, se muestra que si bien los reguladores del BGC saxitoxina sí están conservados en la vecindad genómica de HisA en otros organismos, este no es el caso para las enzimas biosintéticas del cluster. Además en el lado izquierdo de la Figure 4.8 se muestra que la HisA del BGC saxitoxina no está ubicada en una rama de PriA divergente, al contrario está embebida en la parte más conservada. Por estas razones es posible que PriA esté en la orilla del BGC de saxitoxina y más bien no participe en la síntesis de este compuesto o bien que mantenga su función primaria y a la vez tenga una función aún desconocida teniendo un papel en la regulación de la producción de saxitoxina.

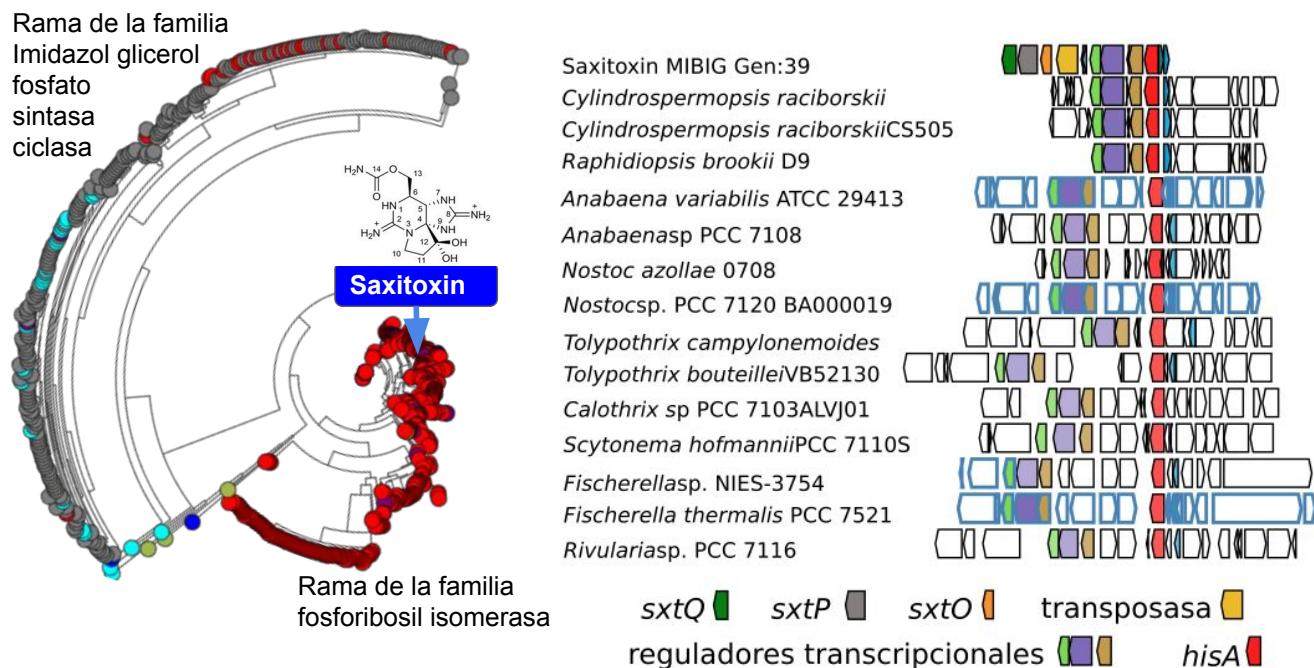


Figura 4.8: HisA en saxitoxin, un cluster de Cyanobacteria

4.3. Evolución molecular y estructural de PriA

En esta segunda sección concerniente a la familia PriA se busca información contenida en la secuencia de aminoácidos. En la primera parte se discute cómo en datos de evolución dirigida en el laboatorio no se encontró ninguna trayectoria en donde algún paso incrementara la actividad de PriA en sus dos sustratos nativos. En la segunda parte se muestra una reconstrucción de la estructura tridimensional de PriA basada en la covarianza de sus aminoácidos en secuencias del registro evolutivo.

4.3.1. Al transformar una subHisA en una PriA mediante mutaciones no se observó ninguna trayectoria creciente para ambos sustratos

En esta sección analizamos cómo cambia la capacidad catalítica de PriA sobre un sustrato mientras se varía la del otro. Para ello se utilizaron datos de mutantes de subHisA de *Corynebacterium diphtheriae*. Estas mediciones de cinéticas enzimáticas fueron obtenidos del trabajo de tesis de Lianet Noda [75]. A partir de la secuencia original que se mostró es una subHisA, se realizaron mutantes con el objetivo de alcanzar la promiscuidad, es decir de convertir la enzima subHisA en una PriA. Se comenzó con diferentes mutantes puntuales adicionando una mutación cada vez, hasta

llegar a una con 11 mutaciones. En esta colección de mutantes varias ganaron la función de PRA isomerasa, a distintos niveles. La que alcanzó mayor actividad PRA isomerasa fue la 9,3, una variante con nueve mutaciones. En estos datos quedaba pendiente la exploración de los caminos mutacionales, es decir cómo es el camino desde una mutante sencilla hasta una múltiple ¿cuántas rutas son posibles? ¿Existe alguna tendencia en ciertos momentos de la ruta sobre el incremento/decremento de alguna de las dos funciones?

Así pues se desarrolló un programa utilizando recursividad para reconstruir todas las rutas posibles. El total de rutas calculadas hasta la mutación 11 fue de 2928 caminos, las rutas posibles hasta la mutante 9.3 son 790. Estas rutas son mostradas en la Figure 4.9.

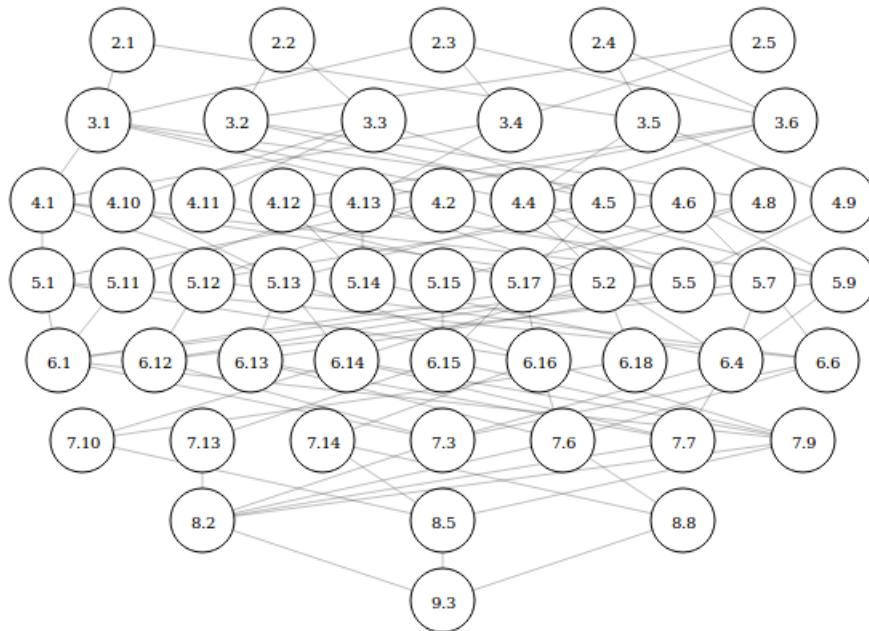


Figura 4.9: Rutas desde una subHisA hasta una variante con 9 mutaciones. En cada círculo el primer dígito indica el número de mutaciones

Al analizar todas las rutas que llevan a 9,3 se descubrió que no existe en ellas una trayectoria en la que todos los pasos incrementen la actividad de TrpF. Por otra parte, se observa que a pesar de que la primera mutación siempre decrece la actividad de HisA, en pasos subsecuentes se observa que esta actividad se incrementa, lo que muestra que hay epistasia positiva o amortiguadora. Esto es que los efectos negativos que de las mutaciones sobre SubHisA pueden ser menos negativos o hasta positivos cuando las mismas mutaciones ocurren en una proteína que ya tiene otras mutaciones. Como ejemplo, en la Figure 4.9 se muestran las rutas donde cada mutante mantiene un

nivel mínimo de actividad de ProFAR isomerasa ($\frac{K_{cat}}{K_m} \text{PriA}_{\text{ProFAR}} \geq ,004$). En azul sólido se ven los incrementos en PRA y en rojo sólido los incrementos en ProFAR. Las líneas punteadas indican que la actividad decreció en ese paso de la ruta. Entre una y cuatro mutaciones el azul sólido es predominante, es decir se incrementa la actividad para PRA, pero entre 4 y 5 mutaciones ningún paso incrementa la actividad de PRA y en cambio sí se incrementa la actividad para ProFAR, esta figura sugiere que al mejorar una actividad se compromete el mejoramiento de la otra. En este ejemplo, las mutaciones puntuales que llevan a una enzima monofuncional a adquirir promiscuidad no mantienen una tendencia no decreciente de principio a fin sobre ninguna ruta en ninguna de las dos reacciones isomerización de PRA e isomerización de ProFAR. Este tipo de trayectorias se conoce como no darwiniana ya que siempre existe algún paso donde decrece alguna de las actividades.

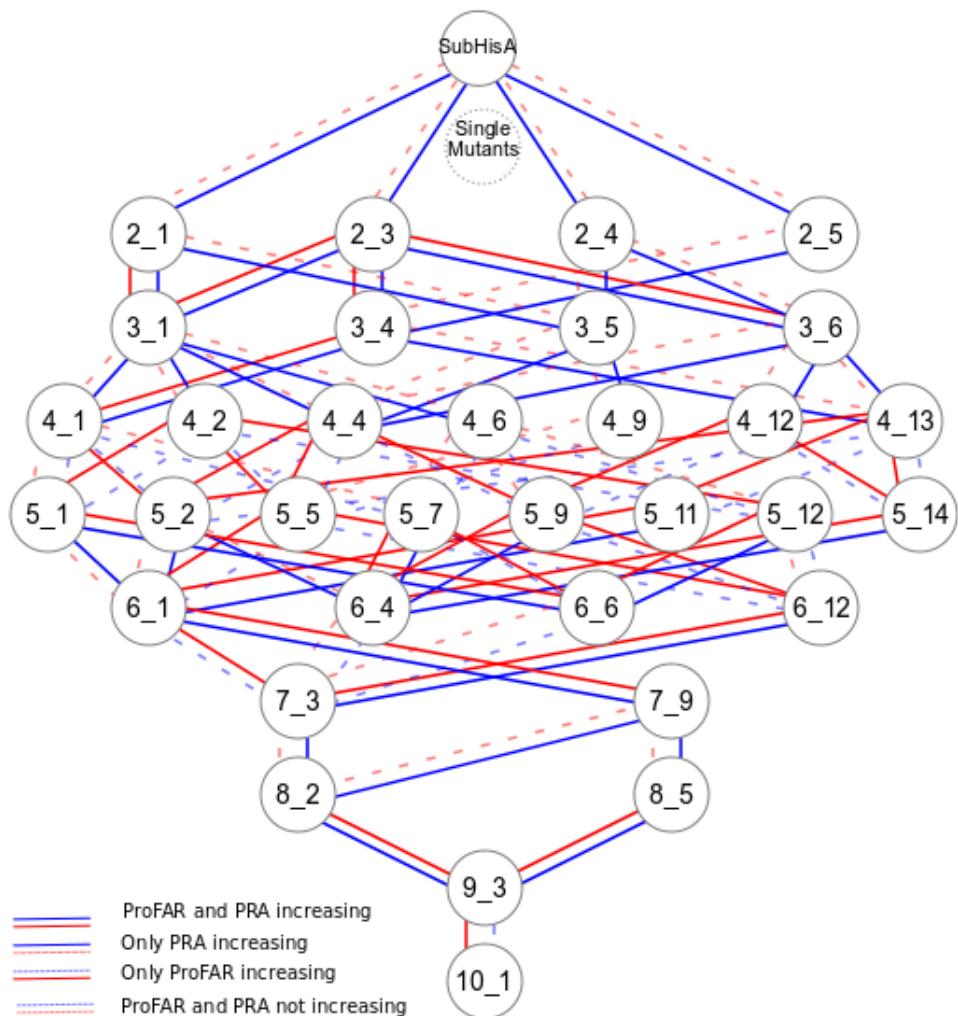


Figura 4.10: Rutas de evolución dirigida para ganar la función PRA. En la figura se muestra como la mayoría de los pasos que incrementan una función hacen decrecer la capacidad catalítica de la otra. El primer número de cada nodo indica cuántas mutaciones tiene esa variante y el segundo número es el identificador de esa combinación específica.

4.3.2. Los residuos que covariarán en el registro evolutivo de PriA permiten una reconstrucción aproximada de su estructura tridimensional

El estudio de la evolución de PriA en la sección anterior nos proporcionó el aprendizaje de que para adquirir una actividad el camino no es estrictamente creciente. En cambio, suele haber pasos donde alguna de las dos actividades baja. En esta sección utilizaremos el registro evolutivo resultado de millones de años, tomaremos miles de homólogos de PriA para inferir la estructura tridimensional de una secuencia. EVcouplings es un método que considera las secuencias génicas existentes como experimentos exitosos de la naturaleza. Con esta información obtiene la covariación entre pares de aminoácidos de las secuencias existentes en el registro evolutivo. Los pares fuertemente relacionados se denominan acoplamientos, estos acoplamientos a menudo están cerca físicamente en la estructura terciaria de la proteína. Se ha demostrado que muchas proteínas contienen suficientes acoplamientos distribuidos ampliamente en toda la secuencia, de forma que con ellos es posible la reconstrucción de su estructura tridimensional [145]. En esta sección se aplicará EVcouplings para reconstruir la estructura tridimensional de PriA.

Las diferencias a nivel estructural pueden amplificar la información proporcionada por variaciones a nivel de secuencia. Una métrica común de distancia entre dos estructuras de proteínas es el *root mean squared deviation* (RMSD). Esta distancia se obtiene después de alinear las estructuras calculando el promedio de las distancias al cuadrado entre los átomos de carbono primarios [146]. La información de las covariación entre residuos es suficiente para que el método EVcouplings genere estructuras con un error de 2.7–4.8 Å respecto a la estructura cristalográfica conocida [145]. Por este motivo se decidió implementar EVcouplings y aplicarlo a la familia PriA. Este método es de difícil instalación ya que requiere varias dependencias. Por ello, desarrollé un contenedor Docker donde dependencias, software y base de datos quedan instalados. Este desarrollo fue incluido por los autores de EVcouplings como sugerencia de instalación. El contenedor docker implementa el *EVcouplings python framework* [147] que comprende cinco etapas para estudiar el análisis de coevolución de residuos de una familia de proteínas. Dichas etapas son i) Alineado, ii) análisis de acoplamiento, iii) plegamiento basado en acoplamientos iv) análisis de mutación y v) comparación con estructuras conocidas.

EVcouplings fue aplicado a la secuencia de PriA de *Streptomyces coelicolor* obtenida de la base de datos Uniprot con identificador HIS4_STRCO. Los parámetros de EVcouplings se dejaron con su configuración inicial incluyendo el umbral de recuperación para las secuencias utilizadas en el alineamiento. Con este alineamiento, utilizando la información de los acoplamientos de sus aminoácidos, se obtuvo el modelo *PriAEV* de la estructura tridimensional de PriA de *S. coelicolor*.

Ahora bien, 1VZW es una estructura de PriA de *S. coelicolor* obtenida mediante cristalográfia [148]. En esta tesis calculé que el RMSD entre PriA (1VZW) y su homólogo lejano HisF (2A0N proveniente de *Thermotoga maritima*) es de 7.34Å. Así

mismo la distancia obtenida entre PriA (1VZW) y el modelo de TrpF 5LHE de *Thermococcus kodakaraensis* es de 12.088 Å. Por tanto cualquier modelo existoso de PriA debe tener un RMSD menor que estas distancias con respecto al modelo 1VZW. La distancia entre la estructura PriAEV y HisF es de 5.603 Å y el RMSD entre PriAEV y TrpF es de 12.554 Å. Además, la distancia entre estas 1VZW y PriAEV medida utilizando el RSMD (pymol 2.2.3) entre ellas es de 3.362 Å. Así pues PriAEV consigue diferenciarse de HisF y TrpF y estar a una distancia de 3.362 Å de 1VZW. Esta distancia es menor que el 3.730 Å el RMSD entre la estructura de PriA 1VZW de *S. coelicolor* y la estructura de PriA *Streptomyces svieceus ATCC 29083* con identificador de PDB 4TX9. Además, las estructuras cristalográficas tienen una resolución de 1-3 Å como puede verse en la Table 4.4, por tanto un RMSD de 3 Å es aceptable para decir que las estructuras son similares. Sin embargo los RMSD entre otras estructuras cristalográficas de *Streptomyces coelicolor* son menores a 2 Å, por ejemplo el (RMSD (2VEP, 1VZW) = 0.449 Å, RMSD (1VZW, 2X30)= 1.929 Å, RMSD (1VZW, 5DN1)=2.802 Å). Así pues EVcouplings obtuvo una estructura de PriA de *S. coelicolor* similar a la cristalográfica 1VZW, pero aparentemente no mejor que otras estructuras cristalográficas de *S. coelicolor*. La comparación de la estructura PriAEV lograda por EVcouplings con respecto a 1VZW es mostrada en la Figure 4.11.

La importancia de haber montado EVcouplings en el Laboratorio de Evolución de la diversidad metabólica es que ahora puede obtenerse un modelo tridimensional para cada secuencia de PriA disponible en horas, en contraste con otros métodos computacionales que pueden tardar días. Con estas secuencias se podría corroborar si diferenciar a nivel familia mediante la información de estructuras tridimensionales es posible para PriA en Actinobacteria. Sin embargo, es posible que el RMSD de la estructura de toda la proteína no sea suficiente para diferenciar por familia, ya sea porque las diferencias estructurales no son suficientes, porque los métodos de construcción de las estructuras necesiten mejorarse, porque se deba refinar la selección de proteínas en el alineamiento diferenciando entre secuencias conocidas de PriA, subHisA, PriB y subTrpF, o bien porque deban considerarse para el RMSD solo las regiones de la estructura con más diferencias conocidas incluyendo todos los átomos de esas regiones en lugar de sólo los átomos de carbono alfa. . En la siguiente sección mediante una colaboración se aborda un poco la dinámica molecular de la familia PriA que es un paso más allá de la comparación estructural.

Finalmente los aminoácidos utilizados en la evolución dirigida de la sección anterior fueron comparados con los provistos por EVcouplings como altamente partícipes en la covariación. Los 10 aminoácidos con más acoplamientos fueron 90L, 117V, 127V, 48W, 208I, 87D, 135T, 21V, 109E. El número indica la posición de la secuencia y la letra es el código de los aminoácidos. Por ejemplo 87D es la posición 87 el aminoácido ácido aspártico. Sólo el 21V es parte los aminoácidos mutados en el estudio previamente descrito. En la Table 4.2 se muestra en la primera columna los aminoácidos variados en el estudio de mutación dirigida en *Corynebacterium*, en la segunda columna el aminoácido correspondiente en la secuencia de *Streptomyces coelicolor* y finalmente su correspondiente acoplamiento más significativo.

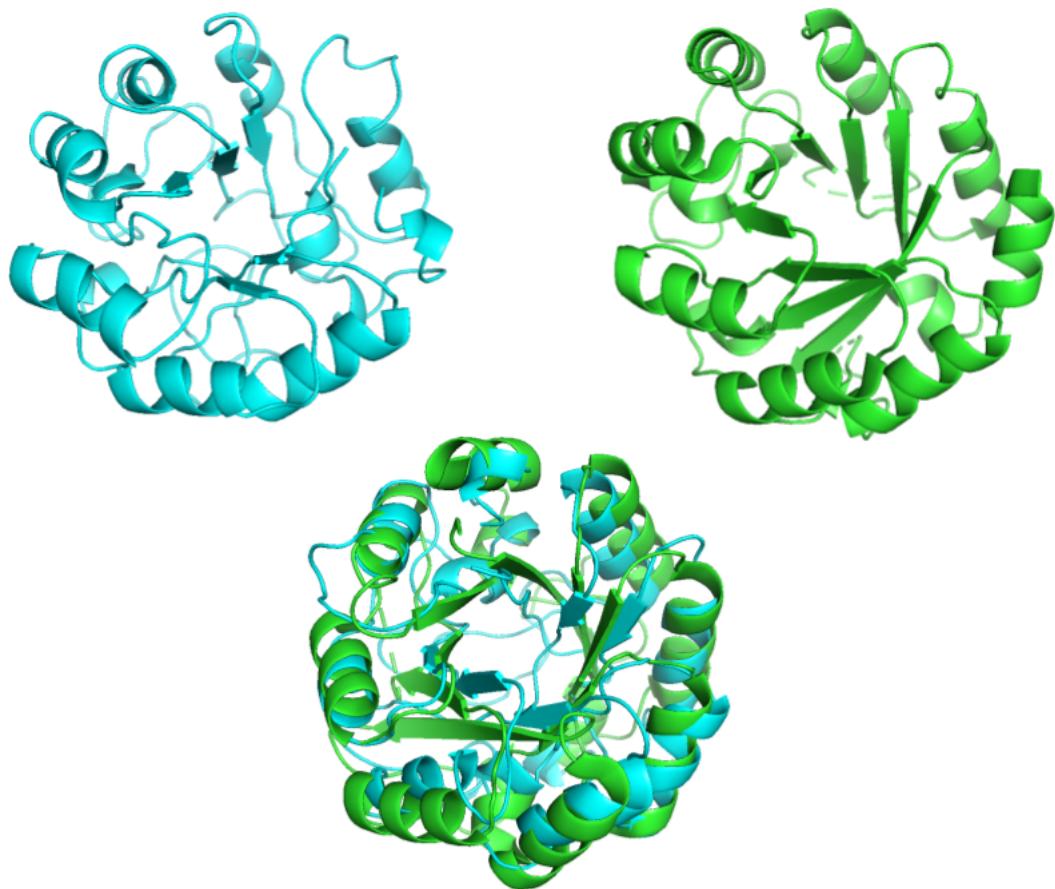


Figura 4.11: Comparación de estructura tridimensional de PriA generada por EVcouplings con una estructura cristalográfica de *Streptomyces coelicolor*. En azul se muestra la estructura generada considerando acoplamientos de los aminoácidos de PriA según el registro evolutivo. En verde está la estructura 1vzw obtenida experimentalmente. En la parte inferior de la figura se muestran las dos estructuras alineadas. Su RMSD es de 3.362 Å

Cuadro 4.2: Árboles EvoMining de PriA en MicroReact

<i>Corynebacterium</i>	<i>Streptomyces</i>	Acoplamiento más relevante
D20V	21V	173T
L48I	49L	76I
F50L	51L	70V
M66I	67I	80L
T80S	81S	102N
A97C	98C	107A
D127A	128G	164V
A129D	130D	168I
T139L	136L	151T
Y214L	211Y	-
E230A	227A	234E

Una forma gráfica de ver esta tabla es la Figure 4.12. Esta figura es simétrica porque los acoplamientos son simétricos. Los puntos negros indican acoplamientos entre pares de aminoácidos. Entre más cerca de la diagonal hay más acoplamientos porque son residuos cercanos en la secuencia lineal de la proteína. En las líneas naranjas muestro cómo el aminoácido 21D tiene un acoplamiento con el 173T, que está muy cerca del 175D que ha sido asociado con la actividad de isomerización de PRA, pero no de ProFAR. A futuro, para obtener resultados más precisos sobre la covariación de residuos en Actinobacteria, se debe proveer un alineamiento exclusivo de Actinobacteria.

Finalmente se investigó también la variación individual de los aminoácidos catalíticos D11, D130 [149] y D175 reportados en *Mycobacterium tuberculosis*[46]. Estas posiciones corresponden en *S coelicolor* a D11, D131 y D171. En este trabajo se econtró que existe un conjunto de secuencias donde estos residuos presentan variantes Figure 4.13. Los homólogos más relevantes de PriA/HisA abordados en este capítulo junto con las secuencias seleccionadas divergentes en los residuos mencionados fueron alineadas para mostrar la diversidad de las familias PriA/HisA a nivel de aminoácidos. Aunque existen variantes de 131D fuera del phylum Actinobacteria, como en *Pseudomonas*, Cyanobacteria, Enterobacteria, Proteobacteria y Chloroflexi también en Actinobacteria se encontraron 159 *Corynebacterium*, 49 *Streptomyces* y 2 *Actinokineospora* con un residuo diferente al aspártico en la posición 131. Están depositados en la base pública NCBI hasta Enero de 2019, 349 genomas públicos de *Streptomyces* 2019, así pues aproximadamente un 14 % tiene una variante en la posición 131. Entre estos *Streptomyces* están el ya mencionado *Streptomyces* CT 34 que posee dos copias de PriA una de ellas muy divergente y el *Streptomyces rimosus* del que se habló en en capítulo anterior porque sintetiza rimosamidas. Es llamativo que las variantes de 131D se encuentran principalmente en *Corynebacterium* y en *Streptomyces* que corresponden a los géneros donde se han ubicado a la familia subHisA y a la familia PriB respectivamente. La variabilidad mostrada en estos géneros podría estar relacionada con la existencia de estas familias. Otros los *Streptomyces* con una variante en 131D

son *S. oceani*, *S. scabiei*, *S. fradiae*, *S. rimosus*, *S. sp. CT34* y *S. MUSC 14* y *S. D11H*. De ellos los tres últimos son además los únicos *Streptomyces* con la variante D11H que comparten con *Actinokineospora auranticolor*. De hecho las tres posiciones conservadas en la mayoría de las PriA presentan variantes en estos cuatro organismos, por lo que sería interesante caracterizarlos bioquímicamente. Entre los organismos con doble copia de PriA están *Serinicoccus marinus*, *Serinicoccus profundus* y *Ornithinimicrobium pekingense*, ambas copias fueron incluidas en el alineamiento. Estas seis secuencias de PriA tienen aspártico en las tres posiciones conservadas, las diferencias que muestran en otras posiciones indican que las copias primarias y las secundarias de cada organismo se agrupan entre sí. La secuencia de *Actinomadura sp.* ATCC 39365 involucrada en el BGC *ada* es similar a la PriA de *S. coelicolor* por lo que posiblemente PriA de *S. coelicolor* también podría presentar esta actividad. Se incluyó en el análisis una secuencia reconstruida del ancestro común de HisA en Bacteria [33], esta secuencia muestra el aspártico en las tres posiciones. En Cyanobacteria la HisA del BGC saxitoxina es prácticamente igual a la de *Cylindrospermopsis raciborskii* CS50 y ambas conservan el aspártico en las tres posiciones. En Archaea las PriA más grandes encontradas *Halorubrum tebenquichense* y *Halonotius sp J07HN6* tienen la variante en D171E, que comparten con los *Streptomyces* y la *Actinokineospora* con variante D11H y con los *Streptomyces* con la variante D130E. Finalmente también en Archaea *Thermococcus sp JCM 11816* que comparte el contexto genómico con genes de triptofano presenta los tres reíduos conservados.

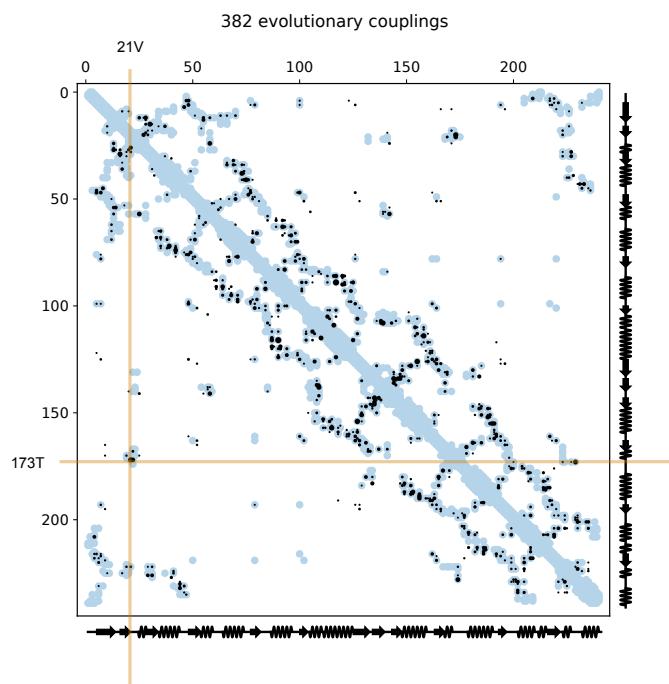


Figura 4.12: Visualización de los acoplamientos en la familia PriA

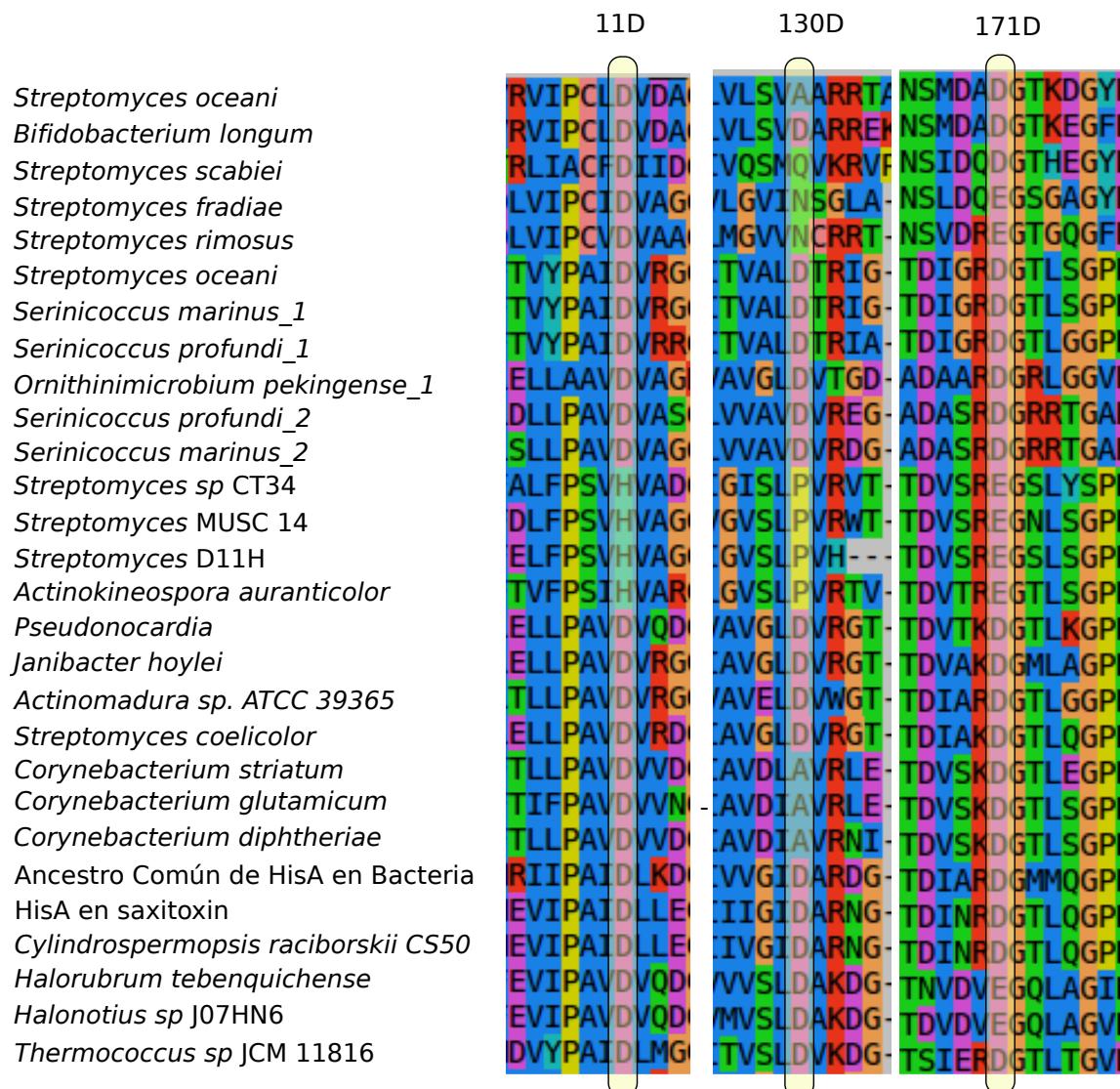
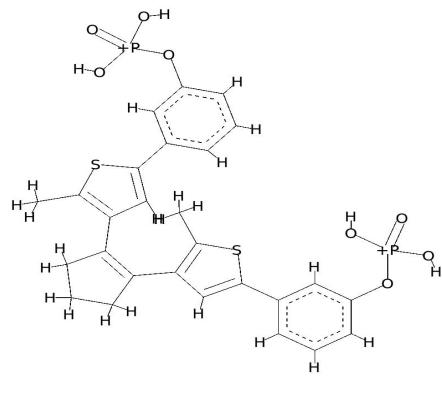


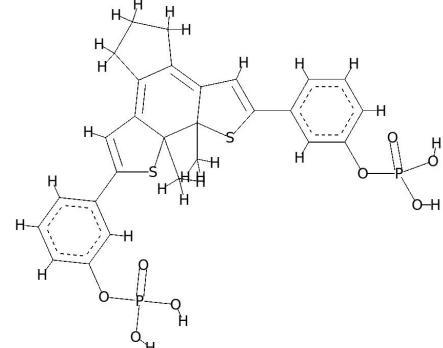
Figura 4.13: Miembros de PriA que poseen variantes los residuos catalíticos D11, D130

4.4. Afinidad de enzimas selectas por sustratos químicamente parecidos a PRA y PROFAR

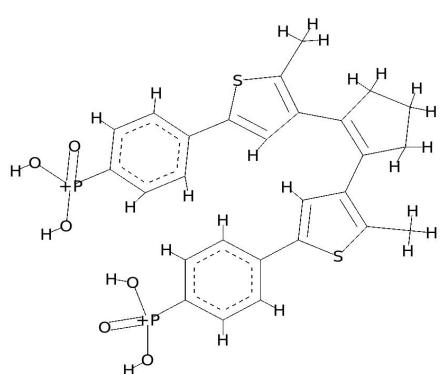
Además de los sustratos conocidos ProFAR y PRA en los que PriA es capaz de realizar una isomerización, es posible que PriA pueda ser promiscua en otros sustratos. De hecho, como se vio en la sección de EvoMining de este capítulo PriA parece participar en la síntesis del antibiótico pentostaina (*ada* BGC). Tomando este ejemplo como inspiración, se buscaron sustratos químicamente parecidos a ProFAR y PRA. Esta sección buscará probar la afinidad de sustratos parecidos a los nativos de PriA para posteriormente probar alguno en copias selectas de PriA provenientes de diversos organismos. Veinte sustratos (S1, S2, ... S20) fueron recolectados tanto de la literatura [42] como de predicciones químicoinformáticas [151]. Estos sustratos son mostrados en Figure 4.14, Figure 4.15,Figure 4.16,Figure 4.17. Los sustratos nativos son PRA (S3) y el sustrato PROFAR es S7. Por otra parte, S13-S16 son sustratos activados por luz. Los sustratos S17 (PRAP) y S18 (Compuesto V) se encontraron en la literatura, mientras que S6 (GMP), S11 (GTP) y otros fueron sugeridos por el grupo del dr. Chris Henry debido a sus similitudes químicoinformáticas. En la siguiente sección, posteriormente a la selección de sustratos seleccionaremos las secuencias de PriA con las cuales se realizará el docking enzima-sustrato.



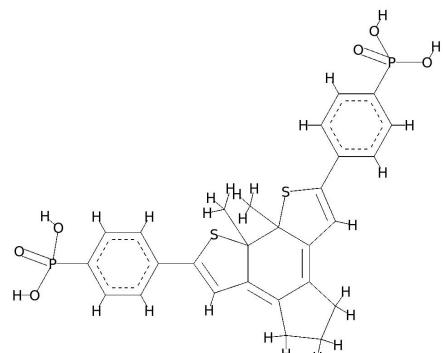
13
DTE-meta-phosphate(dte6_open form)



14
DTE-meta-phosphate(dte6_Closed form)



15
DTE-Para-Phosphonate(dte13_closed form)



16
DTE-para-phosphonate(dte13_closed form)

Figura 4.14: Substatos químicamente similares a los sustratos de PriA (parte 1)

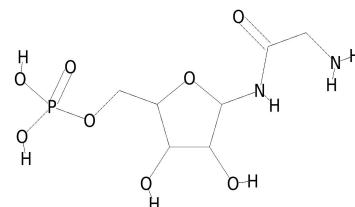
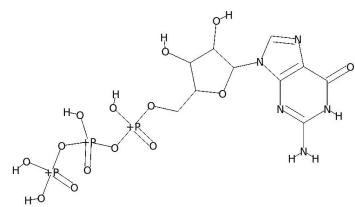
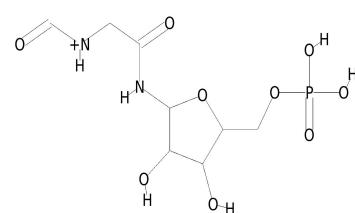
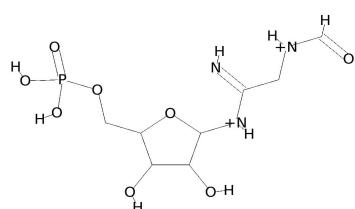
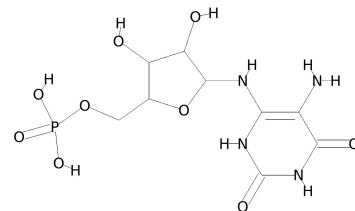
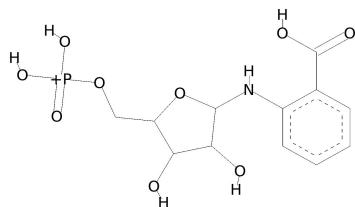
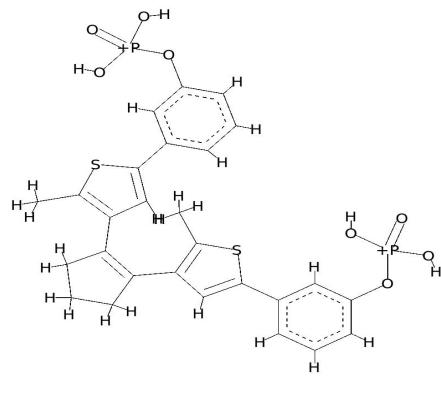
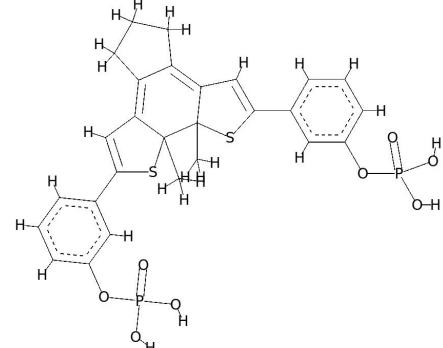


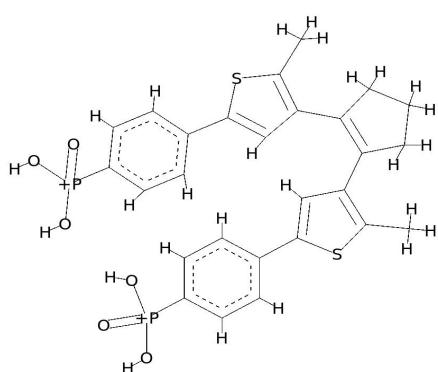
Figura 4.15: Substatos químicamente similares a los sustratos de PriA (parte 2)



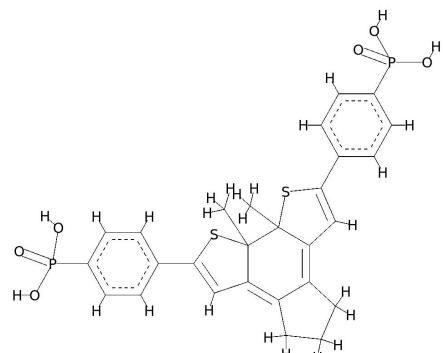
13
DTE-meta-phosphate(dte6_open form)



14
DTE-meta-phosphate(dte6_Closed form)

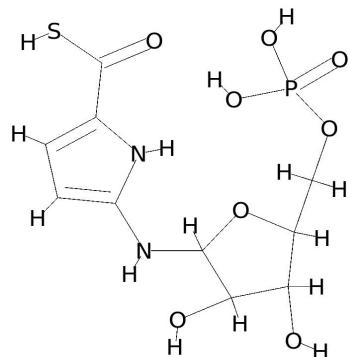


15
DTE-Para-Phosphonate(dte13_closed form)

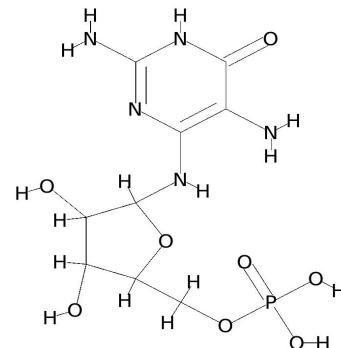


16
DTE-para-phosphonate(dte13_closed form)

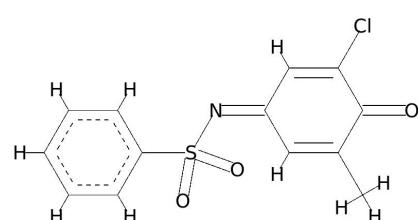
Figura 4.16: Substatos químicamente similares a los sustratos de PriA (parte 3)

**17**

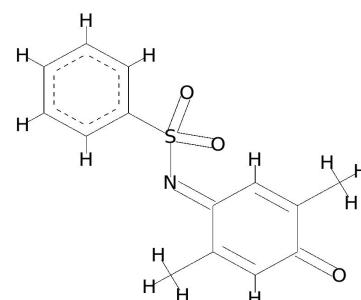
4N'-(5'-phosphoribosyl) 4-aminopyrrole-2-carboxilate

**18**

2,5-di-amino-6-ribosylamino-4(3H)-pyrimidinone 5'-phosphate

**19**

(E)-N-(3-chloro-5-methyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienylidene)benzenesulfonamide

**20**

2,5 dimethyl-N-(4-oxocyclohexa-2,5-dienylidene)benzenesulfonamide

Figura 4.17: Substatos químicamente similares a los sustratos de PriA (parte 4)

4.4.1. Selección de secuencias de PriA o familias relacionadas para docking con sustratos similares a lo nativos

Una vez escogidos los sustratos quedaban por definir las secuencias con las que se llevaría a cabo el análisis bioinformático de acoplamiento enzima-sustrato, lo que hicimos en colaboración con el grupo del dr. Carillo-Trip. Para ello seleccioné 39 secuencias de la familia PriA y sus subfamilias, entre ellas incluí varios *Streptomyces* para tener tanto secuencias pertenecientes a PriA y como a la subfamilia PriB. Estas secuencias seleccionadas de PriA / PriB están uniformemente distribuidas en *Streptomyces* de acuerdo a un árbol de especies de *Streptomyces* basado en la proteína RpoB. Además estos *Streptomyces* tienen variedad en cuanto a la presencia / ausencia de *trpF* en su genoma. Se incluyeron además otros homólogos de PriA que han sido caracterizados químicamente y finalmente se con el mismo criterio de caraterización bioquímica se agregaron secuencias de HisA de *Escherichia coli*, *Arthrobacter Aurescens*, *Salmonella enterica* y *Acidimicrobium ferrooxidans* y secuencias TrpF provenientes *Jonesia denitrificans* y *Streptomyces sp Mg1* para ser utilizadas como controles.

Para realizar el docking se requieren estructuras cristalográficas. Cuando existían estructuras cristalográficas de la secuencia específica de PriA del organismo se utilizó dicha estructura. En caso contrario, el grupo del Dr Carrillo-Tripp generó estructuras homólogas utilizando la técnica de modelado por homología mediante el software Rosetta. Para cada secuencia decidí usar como plantilla la estructura tridimensional del homólogo de PriA más cercano que sí contara estructura con estructura cristalográfica. Los organismos con estructura cristalográfica de alguna familia relacionada a PriA están descritos en la Table 4.4. Para este análisis fueron las secuencias con estructura(s) cristalográfica(s) seleccionadas fueron: para la familia HisA la Enterobacteria *Salmonella enterica* (PDB:5AHE), para la familia subHisA la Actinobacteria *Actinomyces urogenitalis* (PDB:4X2R), la estructura que representa a subTrpF es la de *Arthrobacter aurescens* (PDB:4WD0). En cuanto a la familia PriA, varias estructuras cristalográficas de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtub PDB:2Y88,2Y89,2Y85,3ZS4) y *Streptomyces coelicolor* (Scoe PDB:2VEP,2X30,1VZW) fueron incluidas. Las estructuras de PriB consideradas fueron las de *Streptomyces sviceus* (PDB:4U28,4TX9) y las de *Streptomyces sp Mg1* (4W9T, 4X9S). Finalmente la estructura cristalográfica de TrpF corresponde a *Jonesia denitrificans* (PDB:4WUI). Table 4.3.

Se incluyeron también enzimas TrpF provenientes de *Streptomyces Mg1*, *Jonesia denitrificans*. Las estructuras cristalográficas disponibles de PriB provienen de de . . *Streptomyces globisporus*, *Actinomyces urogenitalis* (4X2R) y *Corynebacterium jeikeum*. De la familia subHisA se muestran *Corynebacterium efficiens* y . y finalmente, *Chlamidya thrachomatis*, *Streptomyces sp. Mg1* y *Actinomyces odontolyticus*. Las representantes de la familia TrpF son las Actinobacterias *Jonesia denitrificans* y *Streptomyces sp Mg1*. A continuación se muestra una tabla con las estructuras cristalográficas disponibles de PriA y familias relacionadas.

Cuadro 4.3: Secuencias selectas de PriA y familias relacionadas para el análisis de docking

Abreviatura	Organismo
Save	<i>Streptomyces avellaneus</i>
Scar	<i>Streptomyces carneus</i>
Spur	<i>Streptomyces purpeofuscus</i>
Smeg	<i>Streptomyces megasporus</i>
Sfrad	<i>Streptomyces fradiae</i>
Svar	<i>Streptomyces varsoviensis</i>
Satra	<i>Streptomyces atratus</i>
Srim	<i>Streptomyces rimosus</i> R6-500
SCT34	<i>Streptomyces sp.</i> CT34
S1813	<i>Streptomyces sp.</i> NRRL S-1813
Ssul	<i>Streptomyces sulphureus</i> DSM 40104
Scla	<i>Streptomyces clavuligerus</i> ATCC 27064
Stsu	<i>Streptomyces tsukubaensis</i> NRRL18488
Sbik	<i>Streptomyces bikiniensis</i>
Sven	<i>Streptomyces venezuelae</i> ATCC 10712
Sful	<i>Streptomyces fulvoviridis</i>
Scal	<i>Streptomyces californicus</i>
Sbaa	<i>Streptomyces baarnensis</i>
Salb	<i>Streptomyces albus</i> J1074
Siak	<i>Streptomyces iakyruis</i>
Sgha	<i>Streptomyces ghanaensis</i> ATCC 14672
Sbic	<i>Streptomyces bicolor</i>
Sipo	<i>Streptomyces ipomoeae</i> 91-03
Sbot	<i>Streptomyces bottropensis</i> ATCC 25435
SspC	<i>Streptomyces sp.</i> C
SMg1	<i>Streptomyces sp.</i> Mg1
Sxan	<i>Streptomyces xanthophaeus</i>
Skat	<i>Streptomyces katrae</i>
Slav	<i>Streptomyces lavendulae</i> subsp. <i>lavendulae</i>
Sery	<i>Streptomyces erythrocromogenes</i>
Sniv	<i>Streptomyces niveus</i> NCIMB 11891
Ssvi	<i>Streptomyces sviceus</i> ATCC 29083
Sfla	<i>Streptomyces flaveus</i>
Save	<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680 = NBRC 14893
Scoe	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)
ArTC1	<i>Arthrobacter aurescens</i> TC1
Sglob	<i>Streptomyces globisporus</i> C-1027
Sgri	<i>Streptomyces griseolus</i>
S34	<i>Streptomyces sp.</i> CT34 (paralogo)

Cuadro 4.4: Estructuras cristalográficas disponibles de PriA y familias relacionadas

Organismo	PDB	Familia	Resolución Å	Fecha
<i>Salmonella enterica</i>	5AHE	HisA	1.7	2015
<i>Salmonella enterica</i>	5AB3	HisA	1.8	2016
<i>Salmonella enterica</i>	5ABT	HisA	1.65	2016
<i>Salmonella enterica</i>	5AC7	HisA	1.9	2016
<i>Salmonella enterica</i>	5AC8	HisA	1.7	2016
<i>Salmonella enterica</i>	5AC6	HisA	1.99	2016
<i>Salmonella enterica</i>	5A5W	HisA	1.6	2015
<i>Salmonella enterica</i>	5AHF	HisA	2.2	2012
<i>Thermotoga maritima</i>	2W79	HisA	1.85	2008
<i>Thermotoga maritima</i>	1QO2	HisA	1.85	2000
<i>Streptomyces sp.</i> Mg1	4X9S	PriB	1.6	2014
<i>Streptomyces sviceus</i>	4TX9	PriB	1.6	2014
<i>Streptomyces sviceus</i>	4U28	PriB	1.33	2014
<i>Streptomyces sp.</i> Mg1	4W9T	PriB	1.57	2014
<i>Arthrobacter aurescens</i>	4WD0	subTrpF	1.5	2014
<i>Streptomyces coelicolor</i>	5DN1	PriA	1.95	2015
<i>Streptomyces coelicolor</i>	1VZW	PriA	1.8	2004
<i>Streptomyces coelicolor</i>	2VEP	PriA	1.8	2007
<i>Streptomyces coelicolor</i>	2X30	PriA	1.95	2010
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	2Y85	PriA	2.4	2011
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	2Y88	PriA	1.33	2011
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	2Y89	PriA	2.5	2011
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	3ZS4	PriA	1.9	2012
<i>Actinomyces urogenitalis</i>	4X2R	SubHisA	1.05	2014
<i>Corynebacterium efficiens</i>	4AXK	SubHisA	2.25	2013
<i>Thermococcus kodakaraensis</i>	5LHE	TrpF	1.85	2016
<i>Thermococcus kodakaraensis</i>	5LHF	TrpF	1.75	2016
<i>Thermus thermophilus</i>	1V5X	TrpF	2	2003
<i>Thermotoga maritima</i>	1DL3	TrpF	2.7	1999
<i>Thermotoga maritima</i>	1LBM	TrpF	2.8	2002
<i>Thermotoga maritima</i>	1NSJ	TrpF	2	1996
<i>Jonesia denitrificans</i>	4WUI	TrpF	1.09	2014
<i>Pyrococcus furiosus</i>	4AAJ	TrpF	1.75	2012

4.4.2. El análisis de PriA a nivel estructural sugiere que GTP es el sustrato más afín

Con las estructuras de las enzimas seleccionadas de PriA se realizaron simulaciones de docking respecto a los veinte sustratos descritos. El procedimiento puede ser consultado

en Docking Protocols. En la Figure 4.18 presento una visualización de los resultados obtenidos. En esta figura se marcan en color los organismos de los que se tiene una caracterización bioquímica, en azul están las secuencias correspondientes a TrpF, en rojo las de HisA, en rosa las secuencias de PriA y subHisA y en verde las de PriB y subTrpF. Con un asterisco fueron marcadas las secuencias de las que se cuenta con estructura cristalográfica. En el caso de las secuencias que no contaban con estructura cristalográfica, la estructura que sirvió como base está anotada después de la abreviatura del organismo. Las abreviaturas corresponden a los organismos de la Table 4.3. Los cuadrados grises son datos que faltaron de simular. Entre más azul es mayor la afinidad del sustrato por la secuencia, entre más rojo menor la afinidad de la enzima por este sustrato. Se requieren más controles para este experimento, pero una tendencia general es que la columna correspondiente a S11 (GTP) es el sustrato que tiene mayor afinidad. Por ello, aunque afinidad no tiene porque corresponder con capacidad catalítica, se decidió investigar la capacidad de secuencias de PriA para catalizar alguna reacción sobre el GTP, esa investigación es el objeto de la última sección de este capítulo.

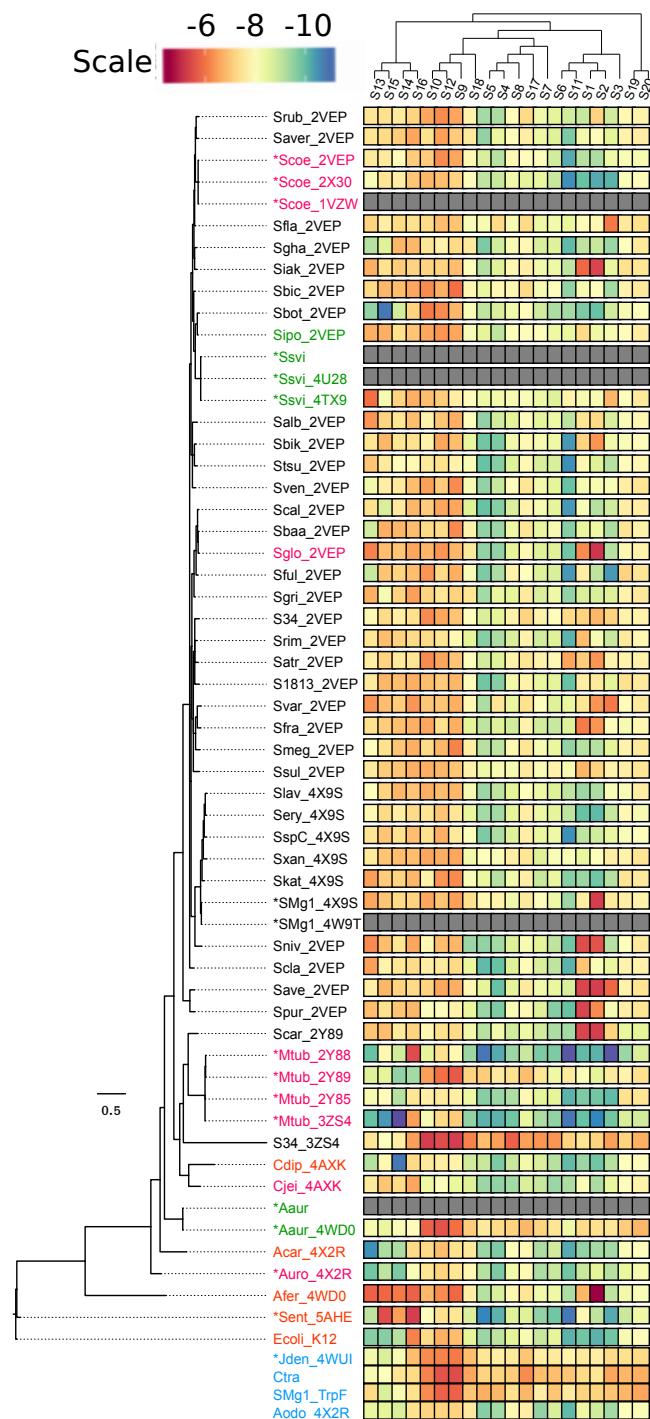


Figura 4.18: Heatplot del docking de enzimas relacionadas a PriA vs posibles substratos

4.5. PriA en cinéticas enzimáticas no tradicionales.

Después de la exploración genómica de PriA/HisA se trabajó en caracterizaciones experimentales no tradicionales de PriA. No se tuvo el tiempo ni la experiencia para tener réplicas de los resultados descritos a continuación, sin embargo se incluyen en esta tesis porque pueden ser un buen comienzo para luego retomar este trabajo. Los protocolos fueron cuidadosamente descritos y se encuentran incluidos en los anexos. Este capítulo se enfoca en el montaje de dos experimentos, el primero sugerido por la sección anterior: *i) Cinéticas de PriA en GTP*. Mientras que el segundo está motivado por la curiosidad sobre el cambio en la capacidad catalítica según se provea primero un sustrato u otro, este experimento consiste en la *ii) Medición simultánea de la actividad de PriA sobre ProFAR y PRA*.

Lo primero que se realizó fue la sobre-expresión heteróloga de PriA. La secuencia de PriA fue clonada en cepas de *E. coli* V68 donde se indujo la sobre expresión. A partir de este cultivo productor de PriA se purificó la proteína. Se corroboró el éxito de esta actividad mediante un gel de proteína en la que puede verse expresión en la barra correspondiente al tamaño de PriA Figure 4.19. La proteína purificada fue almacenada a -80° en esferas de proteína selladas con nitrógeno líquido para su mejor preservación, tal y como se describe en el anexo de los procedimientos. Con este *stock* de proteína se realizaron cinéticas enzimáticas *in vitro*.



Figura 4.19: Gel de proteína donde se muestra la banda correspondiente a PriA después de ser sobre-expresada y purificada

4.5.1. PriA puede metabolizar GTP

Como se sugirió en la sección anterior PriA puede tener actividad sobre GTP. Ahora bien, la actividad de PriA en ProFAR es medida en un ensayo estandarizado mediante la detección de cambio de fluorescencia. Para esta medición por fluorimetría se coloca la enzima en placas de 96 pozos (Nuc 96-Well Optical Botto Plates), se agrega el sustrato y utilizando un lector de fluorescencia de placas (TECAN infinite M1000) se mide el cambio de fluorescencia en el tiempo. Una variación de este ensayo permitió obtener información sobre la actividad PriA sobre dGTP. Los parámetros utilizados para la medición fueron tomados del trabajo no publicado de Verduzco-Castro en este laboratorio (excitación a 255 nm y emisión a 334 nm). Para comenzar esta investigación se utilizó primero dGTP en lugar de GTP esto debido a que el dGTP es un sustrato siempre disponible en cualquier laboratorio ya que es necesario para la reacción de PCR. Así pues, ensayos preliminares de actividad de PriA sobre este dGTP se realizaron en la proteína purificada de PriA de *Streptomyces coelicolor*, activa en ambos sustratos nativos utilizando como control su mutante inactiva que sustituye en la posición 11 el ácido aspártico por una alanina (D11A). La Figure 4.20 muestra el resultado de este experimento donde se aprecia un decrecimiento mayor en la fluorescencia del pozo que contiene la proteína activa respecto del pozo que contiene a la mutante.

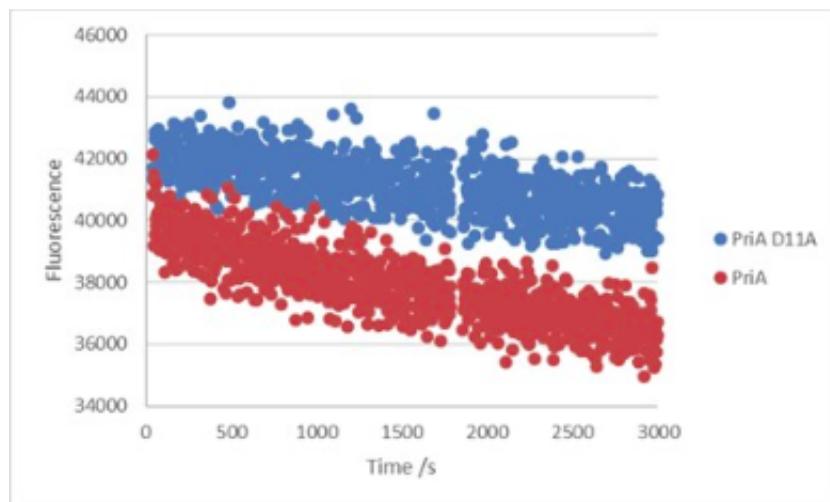


Figura 4.20: PriA de *S.coelicolor* y su mutante no funcional sobre dGTP

Este experimento de detección de actividad de dGTP fue ampliado incluyendo ahora proteínas provenientes de otros organismos. Para ello se utilizaron los stocks disponibles de PriA provenientes de *Streptomyces roseus*, *Thermomonospora curvata* y *Mycobacterium smegmatis*; los stocks de PriB provenientes de *Streptomyces sp C*, *Streptomyces sviceus* y de *Streptomyces sp Mg1* y finalmente el stocks de TrpF de *Jonesia denitrificans*. El ensayo descrito arriba fue realizado en estas enzimas y el resultado es mostrado en Figure 4.21. En la parte inferior derecha vemos que como debe ser el control negativo, el pozo con Buffer y sustrato no muestra ningún cambio en la fluorescencia. Sin embargo no es claro que exista una tendencia claramente decreciente

en los pozos que contienen enzima. Posiblemente la pendiente que se observa en los datos de *Thermomonospora curvata*, indique cierta actividad sobre dGTP. Este comportamiento también puede deberse a que las proteínas llevaban tiempo almacenadas. Los experimentos deben ser repetidos con proteína recién purificada.

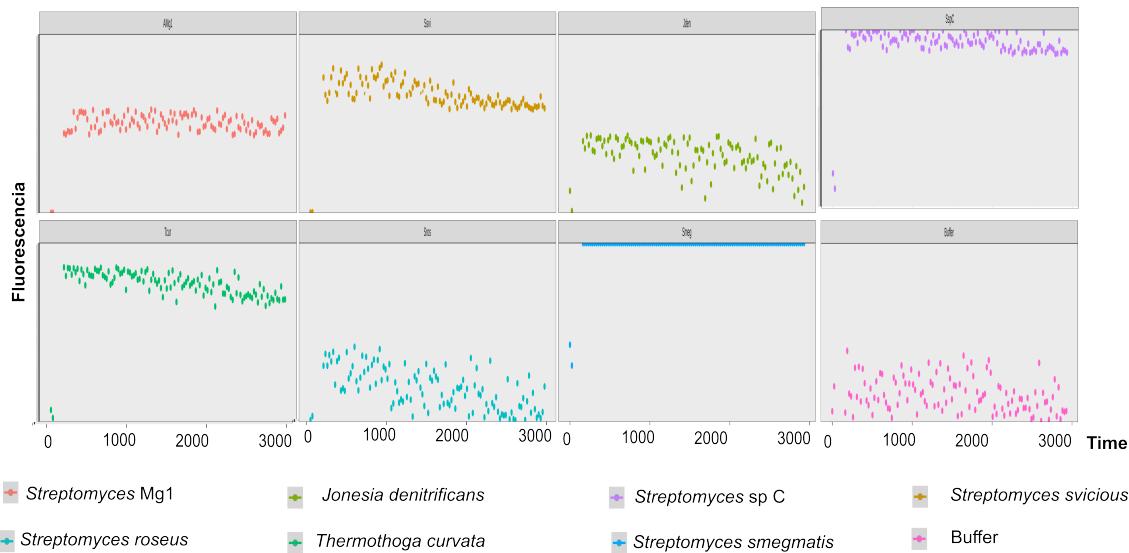


Figura 4.21: Actividad de PriA y familias relacionadas de distintos organismos sobre dGTP. Este experimento no muestra disminución de fluorescencia en las enzimas seleccionadas lo que implicaría que no existe actividad importante sobre dGTP, excepto posiblemente en el caso de *Thermomonospora curvata*

Finalmente se probó con los mismos parámetros la actividad de PriA de *Streptomyces coelicolor* sobre GTP. Se comprobó que la enzima estuviera activa mediante ensayos enzimáticos exitosos en sus otros dos sustratos. Sin embargo, no se pudo detectar cambio en la fluorescencia de GTP debido a la actividad de PriA. Es posible que la PriA de *S. coelicolor* no pueda catalizar ninguna reacción sobre el GTP por lo que una variante que a futuro podría aportar a este experimento es utilizar análogos fluorescentes de GTP.

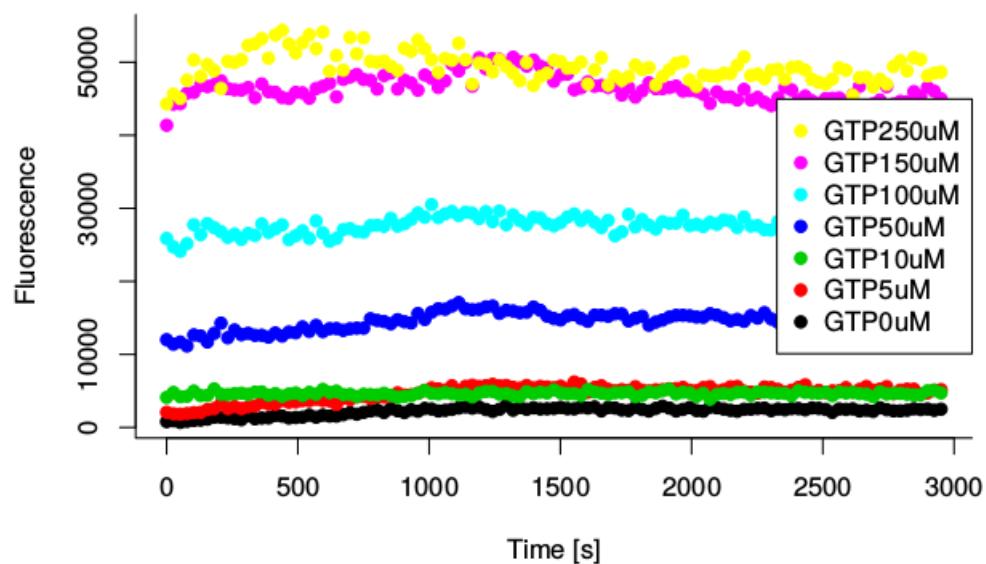


Figura 4.22: PriA no mostró actividad sobre GTP. El ensayo enzimático de PriA de *Streptomyces coelicolor* sobre GTP a distintas concentraciones no mostró cambios en la fluorescencia de GTP.

4.5.2. Cinéticas simultáneas para PRA y ProFAR

Otra pregunta que me surgió al investigar la promiscuidad enzimática es si esta es una propiedad de la población o de cada una de las enzimas existentes en la célula. En PriA esta pregunta puede traducirse a ¿cómo saber si cada molécula de PriA cataliza PRA y ProFAR *in vivo*? o si en cambio, existe una subpoblación que cataliza la isomerización de PRA y otra subpoblación de moléculas que cataliza isomerización de ProFAR. Una buena aproximación *in vitro* a este problema sería poder medir el comportamiento de una sola molécula en un medio con ambos sustratos. Una serie de estos experimentos mostraría si existen subpoblaciones dedicadas a la catálisis de uno u otro substrato, o bien si todas las enzimas de una población son igualmente promiscuas. La existencia de subpoblaciones podría deberse a interacciones de la enzima con el sustrato, como por ejemplo que agregar PRA primero al medio sesgue el comportamiento de la enzima y la haga mejor para catalizar PRA que ProFAR o visceversa.

Para empezar a abordar este problema quisimos medir la actividad de una población de PriA sobre PRA y ProFAR. or separado, ambos ensayos están montados, pero nunca se ha intentado un ensayo simultáneo. Las constantes catalíticas de PriA para la isomerización de ProFAR se mide utilizando absorbancia mientras que el ensayo enzimático de isomerización de PRA se realiza mediante la medición de fluorescencia. En esta sección se empezó a desarrollar un método para medir simultáneamente las actividades de Pra y ProFAR. Primero intentamos medir ambas actividades secuencialmente pero monitorieando que la señal de la otra actividad no se viera afectada. Para esto agregamos la enzima entre los segundos 100 y 400 en los pozos que ya tienen todo para que se lleve a cabo la catálisis de PRA y observamos cómo la fluorescencia baja a todas las concentraciones mientras que la absorbancia se mantiene casi constante (FIGURA-N). Luego cerca del segundo 1500 agregué el sustrato ProFAR y se observa que la absorbancia cae mientras que la fluorescencia en los mismos pozos permanece casi constante. El siguiente paso fue medir simultáneamente la actividad de una población de PriA sobre PRA y ProFAR y aunque si lo medimos no pudimos optimizarlo lo suficiente para medir las constantes catalíticas (datos no mostrados). Las pruebas piloto sugieren que es posible cuantificar la catálisis de ProFAR y PRA simultáneamente y en el caso de los homólogos que también toman a GTP se podrían medir incluso las tres actividades catalíticas para identificar si hay interacciones entre los sustratos.

En este capítulo estudiamos la familia PriA en varios niveles tanto su variación enzimática como la variación del contexto genómico. Vimos que PriA no habría sido sugerida por EvoMining como una familia promiscua ya que no tiene una marca de expansión por número de copias, y sin embargo sí es promiscua en Actinobacteria. EvoMining nos proporcionó en Cyanobacteria y Archaea un ejemplo donde recupera la historia de HisF como expansión ancestral de HisA, mostrando que no todas las expansiones van al metabolismo secundario, algunas expansiones son reclutadas por el metabolismo conservado. Sin embargo vale la pena reflexionar que en su momento HisF fue metabolismo especializado, ya que sólo los organismos con la expansión de

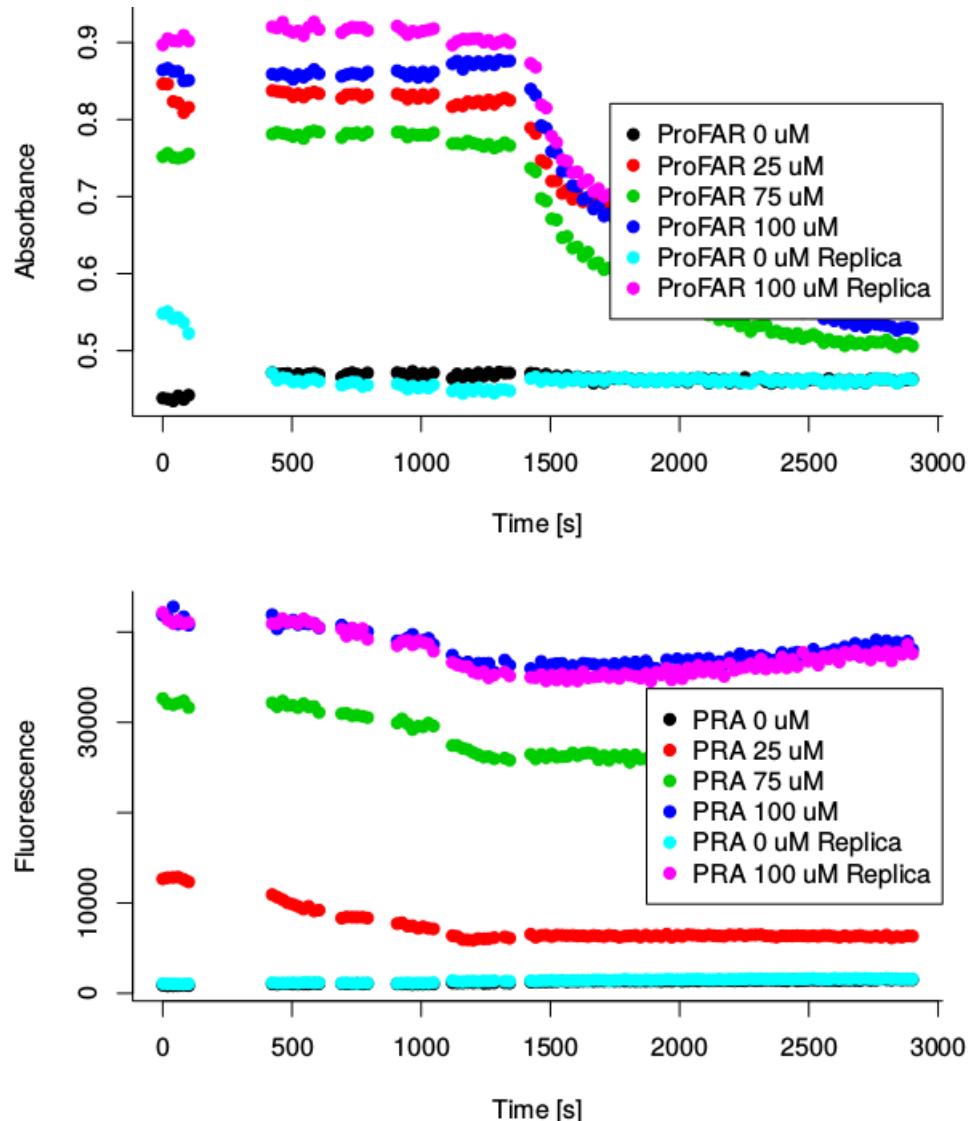


Figura 4.23: Se pueden medir las dos actividades de PriA simultáneamente. Se midió secuencialmente la actividad de ProFAR isomerasa y de PRA isomerasa en la misma población de enzimas PriA. Se cuantificó la absorbancia (arriba) y la fluorescencia (abajo) durante casi 3000 segundos. entre los segundos 100 y 400 se agregó la enzima a un buffer que ya tenía PRA y al segundo 1400 se agregó el sustrato ProFAR a la misma preparación.

PriA poseían esta copia que posteriormente fue fijada por la evolución. De esta forma tenemos un caso donde es el metabolismo “secundario” el que alimenta al metabolismo conservado. Otras estrategias deben abordarse para identificar familias promiscuas donde no sea claro un proceso de expansión. Finalmente encontramos las variantes más interesantes de PriA en los linajes seleccionados y analizamos residuos importantes de cada una de ellas. Finalmente se intentó caracterizar tanto nuevas actividades para PriA como la medición simultánea de las actividades nativas, aunque se avanzó en este camino, estos experimentos deben ser replicados para mayor validez.

Perspectivas

La promiscuidad ha redefinido cómo entendemos la función enzimática. Se ha transitado de considerar a todas las enzimas como altamente especialistas a entender que muchas de ellas pueden llevar a cabo más de una función metabólica. La promiscuidad parece parte del proceso evolutivo, provee material para que una posterior duplicación conlleve a la formación de nuevas familias enzimáticas. En este trabajo traté de entender la promiscuidad a diferentes escalas. Primero diferencié entre la existencia de familias promiscuas y la de ortólogos promiscuos miembros de dichas familias. Ahora bien, las enzimas suelen formar parte de clusters biosintéticos productores de metabolitos. Por ello generalicé el concepto de promiscuidad enzimática al de promiscuidad de una familia de BGC, es decir consideré ahora a una familia de BGC como una unidad de síntesis y me pregunté si podía ser promiscua en el sentido de que variantes del BGC, ya sea en la secuencia de los genes del core o en el contenido de genes accesorios, produjeran variantes del metabolito. Es decir me pregunte si un cluster podría tener promiscuidad por producto. Con estos tres niveles en mente: enzima, familia enzimática, y cluster biosintético desarrollé Orthocore, EvoMining y CORASON, tres herramientas de genómica comparativa con el objetivo de entender mejor la promiscuidad enzimática en los niveles descritos.

Con Orthocore pude resolver la filogenia del orden *Actinomycetales* utilizando los genes del *core conservado* y esto permitió entender que en dicho orden los patrones de especiación están relacionados con la pérdida y ganancia de promiscuidad de la familia PriA. Además pude utilizar Orthocore para encontrar genes marcadores de la especie *Clavibacter michiganensis* que permiten diagnosticar la presencia de esta especie en plantas de tomate. Una lección de este capítulo es que el *core genome* no sólo contiene genes del core metabólico, también puede contener genes productores de metabolitos especializados, y este contenido incrementará entre más cercanos sean filogenéticamente los organismos del linaje seleccionado. Una vez desarrollado Orthocore quedaban por investigar las familias enzimáticas contrarias al *core conservado* es decir aquellas que sí tienen marcas de cambio en el número de copias de su gen codificante en al menos algunos organismos de un linaje genómico. El cambio ya podía ser observado porque aplicando Orthocore pueden organizarse filogenéticamente organismos de genomas cercanos, por ejemplo los del género *Streptomyces*.

Así pues para estudiar no sólo los patrones de expansión sino también los de neofuncionalización, en particular los de reclutamiento a metabolismo especializado desarrolle a

continuación la herramienta EvoMining. Las familias señaladas por EvoMining como expandidas y reclutadas son candidatos a ser familias promiscuas, y los miembros intermedios entre ortólogos dedicados a la función primaria y ortólogos dedicados al metabolismo especializado son candidatos, aunque no exclusivos a ser miembros promiscuos de la familia. En esta sección entendí que las familias del *shell genome* también tienen reclutamientos y expansiones, que este comportamiento no es exclusivo de ciertas familias del *core genome*. Después de esta observación queda pendiente realizar un estudio con todas las enzimas del *shell genome* de un linaje para entender cómo son las tendencias generales por ejemplo por subsistema metabólico. Con EvoMining desarrollé dos ejemplos donde en efecto enzimas de metabolismo conservado (*shell o core*) mostraban miembros reclutados en el metabolismo especializado. El primer ejemplo fueron familias del cluster de síntesis de escitonemina en Cyanobacteria. A la fecha este BGC no ha sido predicho por otros métodos bioinformáticos ya que está compuesto exclusivamente por familias que provienen de expansiones del metabolismo primario y no posee ninguna enzima catalogada como exclusivamente dedicada al metabolismo especializado. El segundo ejemplo es la familia TauD común en los BGC de Rimodamide y Detoxin. Este ejemplo tiene expansiones y reclutamientos tanto en Actinobacteria como en *Pseudomonas*. El estudio de las variantes de estos BGC fue resuelto con el desarrollo de CORASON, una herramienta especializada en identificar variantes de contextos genómicos.

Así pues desarrollé CORASON para ver el continuo de variantes de un BGC en un linaje genómico. Con esta herramienta, al observar la amplia variación en cuanto a presencia y ausencia de genes accesorios en Actinobacteria de la familia rimosamide-detoxin BGC pensé que esta familia de clusters debía ser promiscua. Además esta observación estaba soportada por el hecho de que rimosamide y detoxin compartían un core molecular común posiblemente relacionado con el core génico de la familia, pero tenían las moléculas se diferenciaban en ciertos ornamentos, probablemente debidos a los genes accesorios de la familia. Propuse pues que esta familia de BGC es promiscua, y que al seleccionar genomas de diversos clados del árbol del BGC se deberían encontrar nuevas variantes moleculares. Exitosamente, nuestro grupo de colaboradores pudo caracterizar dos nuevas variantes al core molecular rimosamide - detoxin comprobando así la amplia promiscuidad de esta familia.

En este punto quedó pendiente tener una medida de la diversidad de los clusters, pienso que así como un pangenoma de un linaje se puede clasificar como abierto o cerrado según pueda o no saturarse el número de familias génicas al agregar más genomas del linaje, este concepto podemos generalizarlo a una medida de la variabilidad génica del *pancluster*. Entre más familias de genes distintos aparezcan en la vecindad del core del cluster mayor será la apertura de esta familia de BGC. Clusters muy conservados con poca variación en los genes accesorios tendrán un “pancluster” cerrado, como ejemplo de este caso está el operón de histidina en ciertas clases de Archaea. Las mismas medidas de apertura de pangenoma pueden aplicarse al *pancluster*, entre más abierto sea un cluster es posible que presente mayor promiscuidad por producto por concepto de variación en sus genes accesorios. Otra posibilidad para que un BGC sea promiscuo a pesar de tener muy poca variación en los genes accesorios es que alguna

de las enzimas conservadas sea promiscua.

Finalmente, estudiamos diversos aspectos de la familia PriA, una familia promiscua en Actinobacteria que en ese phylum no pasó por un proceso de duplicación reciente y por tanto no sería sugerida por EvoMining como una familia promiscua. En este último capítulo vimos el ejemplo de HisF como resultado de una expansión de HisA y su posterior reclutamiento reclutamiento en el cluster de síntesis de histidina. Con ello EvoMining nos revelaba que el destino metabólico de una nueva función no tiene que permanecer en el metabolismo especializado, ese destino también puede ser fijado en metabolismo conservado. Además también en Actinobacteria encontramos una PriA que parece catalizar una reacción de un sustrato parecido a sus sustratos nativos en un cluster de síntesis de la pntostatina. Esta secuencia es similar a la de *S coelicolor* por lo que posiblemente hemos dado con una nueva ganancia de promiscuidad de PriA que podemos probar en los critales de proteína ya producidos. Con CORASON vimos que a pesar de la nueva disponibilidad de genomas, los patrones del operón his observados en los primeros estudios de Archaea se mantienen. Después estudiamos PriA a nivel de aminoácidos, montamos un método para aprovechar el registro evolutivo para generar estructuras tridimensionales de PriA. Quedó pendiente generar estructuras para todos las secuencias de la familia PriA para buscar diferencias que correlacionen con las subfamilias. Con las tres herramientas EvoMining, CORASON y EVcouplings seleccioné homólogos interesantes de PriA, ya sea porque tienen dos copias en su genoma de origen, porque poseen contextos genómicos atípicos o bien porque tienen variantes en los aminoácidos catalíticos. Queda pendiente la caracterización bioquímica de esta selección.

Además una mezcla entre Orthocore y EvoMining me permitió descubrir que PriA no sólo no está expandida en Actinobacteria sino que ni siquiera es parte del *core genome*. Debido a la ausencia tanto de PriA como del resto de los genes de la ruta ciertos grupos de Actinobacteria parecen ser auxótrofos para histidina. Entre ellos están *Atopobium*, *Molibuncus* y *Tropheryma*, así como ciertos *Bifidobacterium* y *Actinomyces* e incluso algunos *Corynebacterium*. Los géneros *Molibuncus* y *Tropheryma* carecen de la mayoría de genes de síntesis tanto de histidina como de triptofano. Los *Corynebacterium* en cambio sí poseen genes de síntesis de triptofano, lo que sugiere que podría estar subfuncionalizándose reteniendo sólo la función TrpF. Esto es una novedad para *Corynebacterium* donde ya se conoce la ocurrencia de homólogos pertenecientes a subHisA pero no se ha detectado hasta ahora la presencia de la familia subtrpF. Además en *Saccharomonospora halophila*, *Streptomyces sp. NRRL B-2790*, *Streptomyces sp. NRRL S-1777*, *Streptomyces sp. NRRL WC-3549* y *Streptomyces sp. NRRL WC-3704* tampoco fue encontrada PriA y sí genes de los operones de histidina y triptofano. En los últimos tres se localiza una doble copia de HisF. Esto puede deberse tanto a problemas técnicos de secuenciación como a una verdadera observación biológica donde se sugiere que HisF puede ser multifuncional rescatando al menos la función de HisA y posiblemente la de TrpF.

Posteriormente en PriA parece que detecté una nueva interacción con el sustrato dGTP, aunque estos experimentos no son conclusivos ya que no fueron replicados.

Finalmente una pregunta obligada es si así como la promiscuidad varía entre ortólogos de una familia, también varía entre cada una de las moléculas provenientes del mismo gen del mismo organismos. Es decir si la promiscuidad es una propiedad de cada molécula, o si es una propiedad de una población de moléculas, donde unas se dedican a un sustrato y otras a la catálisis de otro. Esta pregunta se debe abordar con una técnica de medición molécula por molécula. Di un primer paso intentando medir la actividad de una población de PriA simultáneamente tanto sobre ProFAR como sobre PRA.

Considero que con los desarrollos pude abordar la búsqueda de familias de enzimas candidatas a tener cambios en promiscuidad acotandome a aquellas cuyo cambio de estado era debido a un proceso de neofuncionalización que dejó como huella un cambio en el número de copias respecto a organismos cercanos. CORASON como herramienta de vecindad genómica ayudó a identificar cambios en las vecindades en el sentido de que no sólo la secuencia de la copia secundaria de la enzima era divergente de la copia central, sino también la vecindad genómica de la nueva copia era divergente de la vecindad genómica de la copia primaria. Estas herramientas, además de tratar la promiscuidad enzimática me ayudaron también a minar el pangenoma de linajes genómicos en busca de nueva química en clusters biosintéticos de metabolitos secundarios.

Capítulo 5

Protocolos

\setcounter{section}{1}

5.1. Protocolos para usar Orthocore, myRAST, fastOrtho, Clavigenomics, y BPGA

Anotación genómica con el docker myRAST

Esta es una distribución de myRAST en un contenedor de docker. Para usarla se necesita una cuenta del anotador genómico RAST. El docker myRAST permite hacer anotación genómica y funcional masiva mediante el uso de la terminal en el anotador RAST. Después de anotar los resultados pueden descargarse y procesarse en una terminal.

Descargar myrast docker distribution

Una vez con docker instalado en la computadora, se hace pull al docker myrast.

docker pull nselem/myrast

Abrir myRast en la terminal

```
docker run -i -t -v $(pwd):/home/nselem/myrast /bin/bash
```

Usar myRast

-Ejemplo subir un archivo fasta

```
svr_submit_RAST_job -user -passwd -fasta -domain Bacteria -bioname "Organism name" -genetic_code 11 -gene_caller rast
```

-Para bajar un archivo de anotación genómica funcional:

```
svr_retrieve_RAST_job table.txt > $ID.txt
```

Una lista completa de archivos puede ser procesada usando bash. Por ejemplo para bajar una lista de archivos de RAST se deben guardar los identificadores de RAST en una columna de un archivo, (Rast_ID en este ejemplo) y usar un while para obtenerlos:

En este caso la variable “line” contendrá el identificador RAST Id, y cada archivo fasta de aminoácidos podrá ser obtenido mediante su identificador de RASTy será guardado en el archivo “\$line.faa”

```
cut -f1 Rast_ID | while read line; do svr_retrieve_RAST_job $line amino_acid > $line.faa ; done
```

Formatos de RAST para descargar archivos

Puedes cambiar el formato table_txt por el que tú necesites.

Cuadro 5.1: Formatos de descarga disponibles en myRAST

Atributo	Descripción
genbank	GenBank (con funciones y enriquecimiento de SEED)
genbank_stripped	Genbank con EC-numbers removidos de las funciones
embl	EMBL (con funciones y enriquecimiento de SEED)
embl_stripped	EMBL con EC-numbers removidos de las funciones
gff3	GFF3
gff3_stripped	GFF3 con EC-numbers removidos de las funciones
gtf	GTF
gtf_stripped	GTF con EC-numbers removidos de las funciones
rast_tarball	Archivo comprimido (gzipped) con todo el directorio de las anotaciones de RAST sobre el genoma
nucleic_acid	Fasta de DNA de genes
amino_acid	Fasta de DNA de aminoácidos
table_txt	Gene data in tab-separated format
table_xls	Preserve the original gene calls and use RAST

Referencia Table 5.1.

5.2. Orthocore

El umbral de e-value de Orthocore es por default 1e-6. Todas las secuencias son alineadas usando MUSCLE v3.8.31 con los parámetros default y curadas utilizando Gblocks con 5 posiciones como longitud mínima del bloque, 10 como máximo número de posiciones contiguas no conservadas y sólo considerando posiciones con gaps menores que el 50 % de las secuencias en el alineamiento final. Después de esta curación las secuencias son concatenadas en una matriz final

Apéndice A

Figuras suplementarias de EvoMining

A.1. Figuras suplementarias de CORASON

A.1.1. El contexto de una rama divergente de *tauD* está conservado en Pseudomonas

En Pseudomonas el gen *tauD* tiene un contexto que incluye genes de metabolismo especializado. Variantes de este contexto están distribuidas en varios organismos. Parecen ser diferentes de los rimosamides y detoxins reportados en Actinobacteria.

Table S1. Function and average copy number in enzyme families in Enzyme DB

Key	Enzyme Family	Average copy per genome in each database				Maximum	Minimum
		Actino bacteria	Cyano bacteria	Pseudo monas	Archaea		
A1	Acetylornithine aminotransferase	8.24	2.72	12.03	3.12	Pseudomonas	Archaea
B1	Glutamine synthetase	3.21	1.17	6.46	1.29	Pseudomonas	Cyanobacteria
C1	Anthranilate synthase component 1	2.58	2.01	2.42	1.1	Pseudomonas	Archaea
D1	Fumarate hydratase	1.93	0.92	3.61	0.45	Pseudomonas	Archaea
E1	Acetolactate synthase large subunit	4.81	1.87	4.69	1.97	Actinobacteria	Cyanobacteria
F1	Aspartate transaminase	3.38	2.52	5.53	2.96	Pseudomonas	Archaea
G1	Imidazole glycerol phosphate synthase H	1.90	2.05	2.89	1.81	Pseudomonas	Archaea
A2	Dihydro picolinate synthase	2.09	0.9	3.1	1.01	Pseudomonas	Cyanobacteria
B2	Dihydroxy acid dehydratase	1.68	0.96	2.73	0.75	Pseudomonas	Archaea
C2	Diaminopimelate decarboxylase	1.68	1.02	2.43	0.54	Pseudomonas	Archaea
D2	Cysteine synthase	2.84	2.34	2.71	0.89	Pseudomonas	Archaea
E2	Acetylglutamate kinase	0.98	0.92	1.84	0.41	Pseudomonas	Archaea
F2	3-isopropylmalate dehydrogenase	1.43	1.05	2.45	1.76	Pseudomonas	Cyanobacteria
G2	Citrate synthase	2.14	0.92	1.97	0.71	Actinobacteria	Archaea
A3	Glycine hydroxymethyltransferase	1.76	0.89	2.24	0.91	Pseudomonas	Archaea
B3	Phosphoribosyl isomerase A	0.95	1.53	1.81	1.12	Pseudomonas	Archaea
C3	Fumarate reductase iron sulfur subunit	1.81	0.47	1.04	0.57	Actinobacteria	Cyanobacteria
D3	Glutamate 5 semialdehyde dehydrogenase	0.96	1.43	1.05	0.26	Cyanobacteria	Archaea
E3	Glutamine 2 oxoglutarate aminotransferase	1.18	0.23	1.46	0.5	Pseudomonas	Cyanobacteria
F3	3 dehydroquinate synthase	1.17	1.22	1.13	0.2	Pseudomonas	Archaea
G3	Pyruvate kinase	1.34	1.44	1.6	0.6	Pseudomonas	Archaea
A4	Imidazoleglycerol phosphate dehydratase	0.94	0.87	0.94	0.74	Archaea	Cyanobacteria
B4	Glutamate synthase	0.96	1.08	0.96	0.19	Cyanobacteria	Archaea
C4	Isopropylmalate isomerase large subunit	1.21	1.03	1.2	1.83	Archaea	Cyanobacteria
D4	Ornithine carbamoyltransferase	1.15	0.9	1.63	1.23	Pseudomonas	Cyanobacteria
E4	Argininosuccinate lyase	1.05	0.92	1.27	0.75	Actinobacteria	Archaea
F4	N acetylglutamate synthase	0.99	0.93	0.97	0.3	Pseudomonas	Archaea
G4	glutamate dehydrogenase	0.74	0.56	0.65	1.23	Archaea	Cyanobacteria
A5	Pyrroline 5 carboxylate reductase	0.97	0.89	0.99	0.39	Pseudomonas	Archaea
B5	Threonine synthase	1.67	1.48	1.21	1.79	Archaea	Pseudomonas
C5	Tryptophan synthase alpha	1.00	1.03	1	0.56	Cyanobacteria	Archaea
D5	Indole-3-glycerol phosphate synthase	1.10	1.06	1.02	0.67	Actinobacteria	Archaea
E5	Ribose phosphate pyrophosphokinase	1.23	0.93	1	0.84	Actinobacteria	Archaea
F5	Histidinol dehydrogenase	1.03	1.06	1	0.75	Cyanobacteria	Archaea
G5	Argininosuccinate synthase	1.06	0.92	0.99	0.77	Actinobacteria	Archaea
A6	Enolase	1.18	0.93	1.05	0.89	Actinobacteria	Archaea
B6	N acetyl gamma glutamyl phosphate reductase	1.02	0.93	0.97	0.75	Actinobacteria	Archaea
C6	Phosphoribosylanthranilate isomerase	1.12	0.87	0.98	0.48	Actinobacteria	Cyanobacteria
D6	Tryptophan synthase beta	1.22	1.02	1.08	1.22	Actinobacteria	Cyanobacteria
E6	Ketoacid reductoisomerase	1.00	0.89	0.98	0.8	Pseudomonas	Archaea
F6	Phosphoglycerate kinase	0.98	0.92	0.96	0.87	Pseudomonas	Archaea
G6	Anthranilate phosphoribosyltransferase	0.95	0.88	0.97	0.89	Pseudomonas	Cyanobacteria

Figura A.1: Función y número de copias promedio en los cuatro linajes taxonómicos de las enzimas de las 42 familias de la base de datos de enzimas de EvoMining

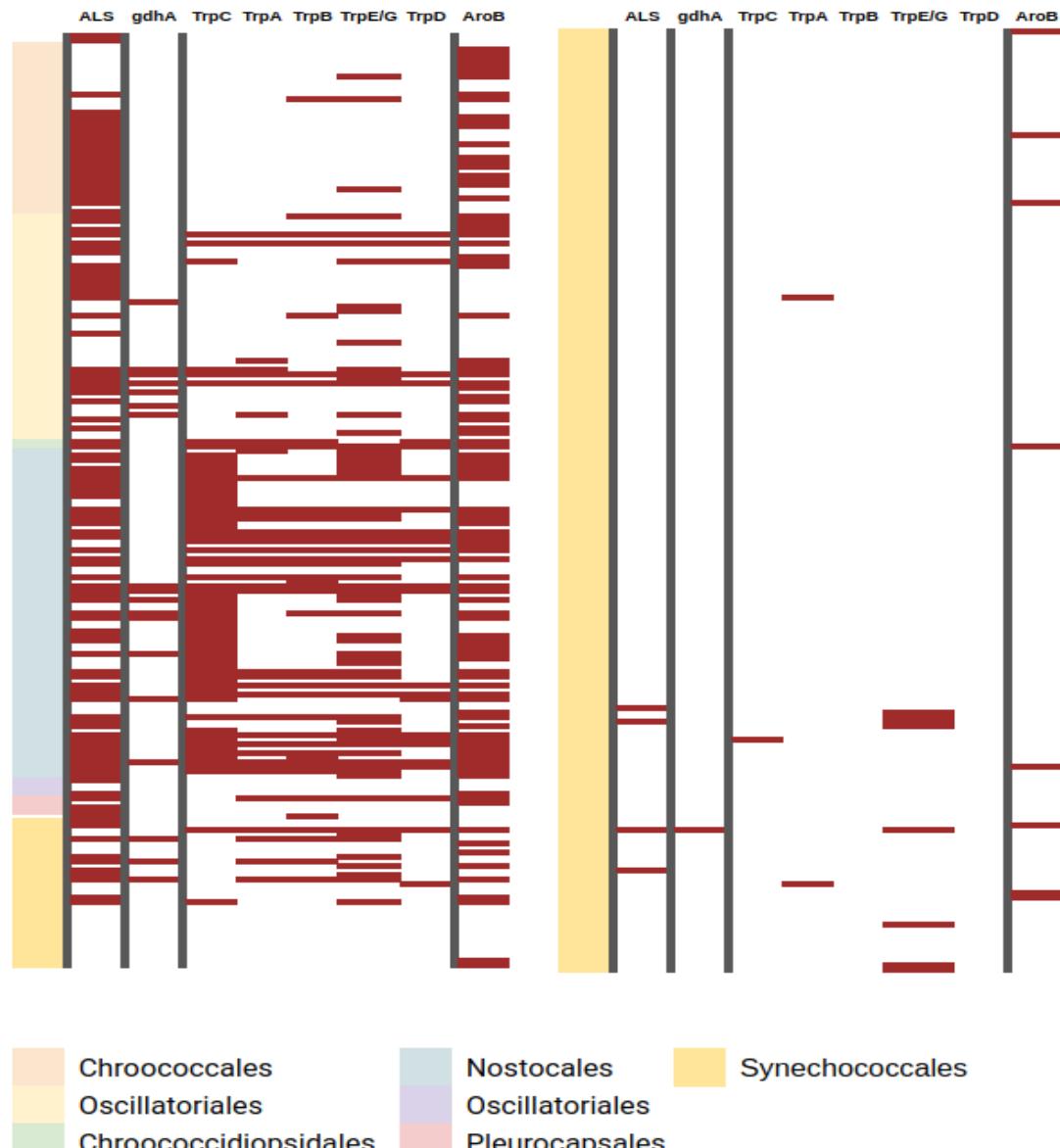


Figura A.2: HeatMap de EvoMining de enzimas relacionadas a escytonemina en el linaje Cyanobacteria



Figura A.3: Árbol de GDH en Actinobacteria, Cyanobacteria, *Pseudomonas* y Archaea donde se muestra la transferencia horizontal ocurrida en esta familia.

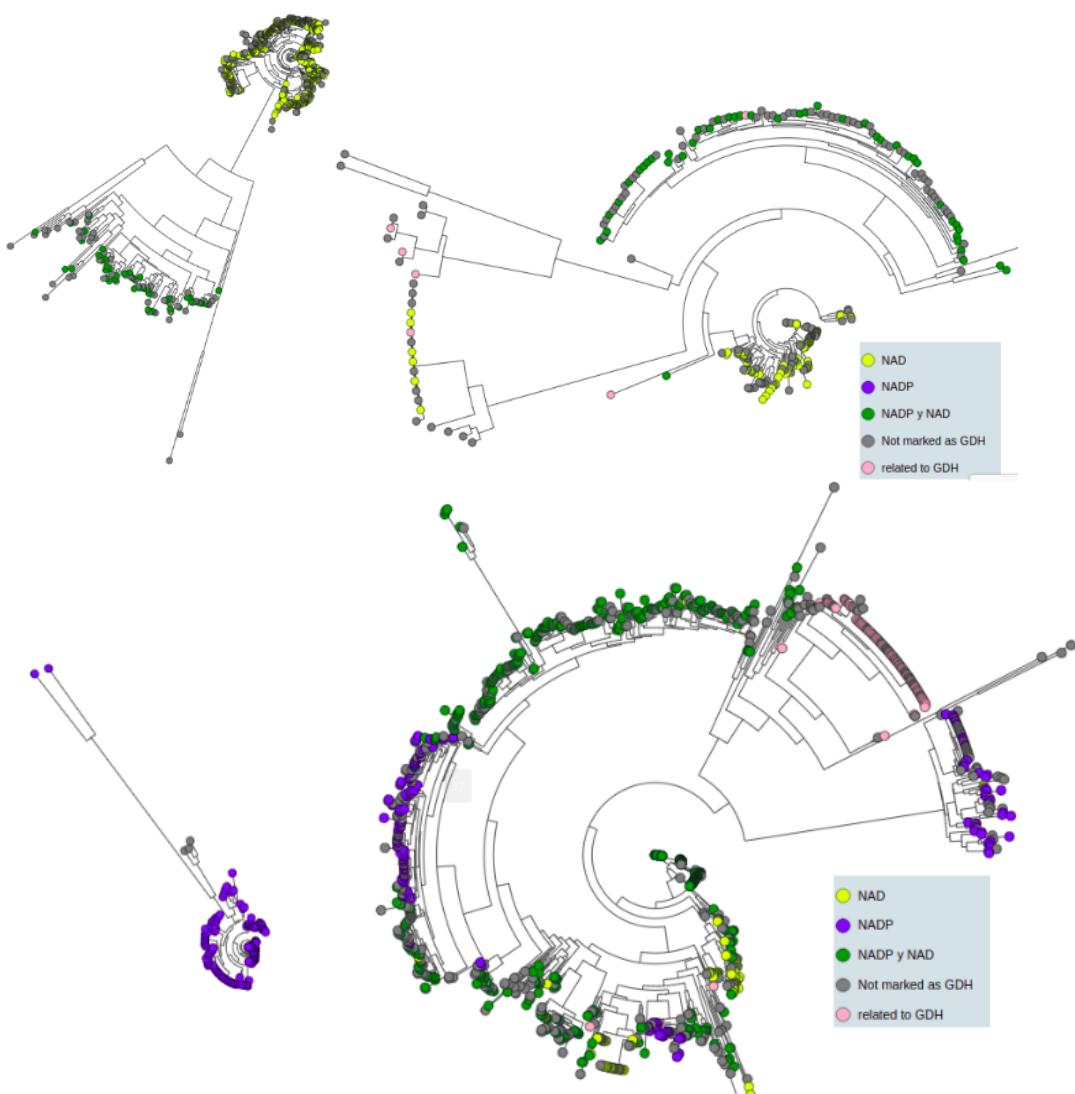


Figura A.4: Árbol de GDH en los cuatro linajes donde se muestra la alternancia en el uso de cofactores.

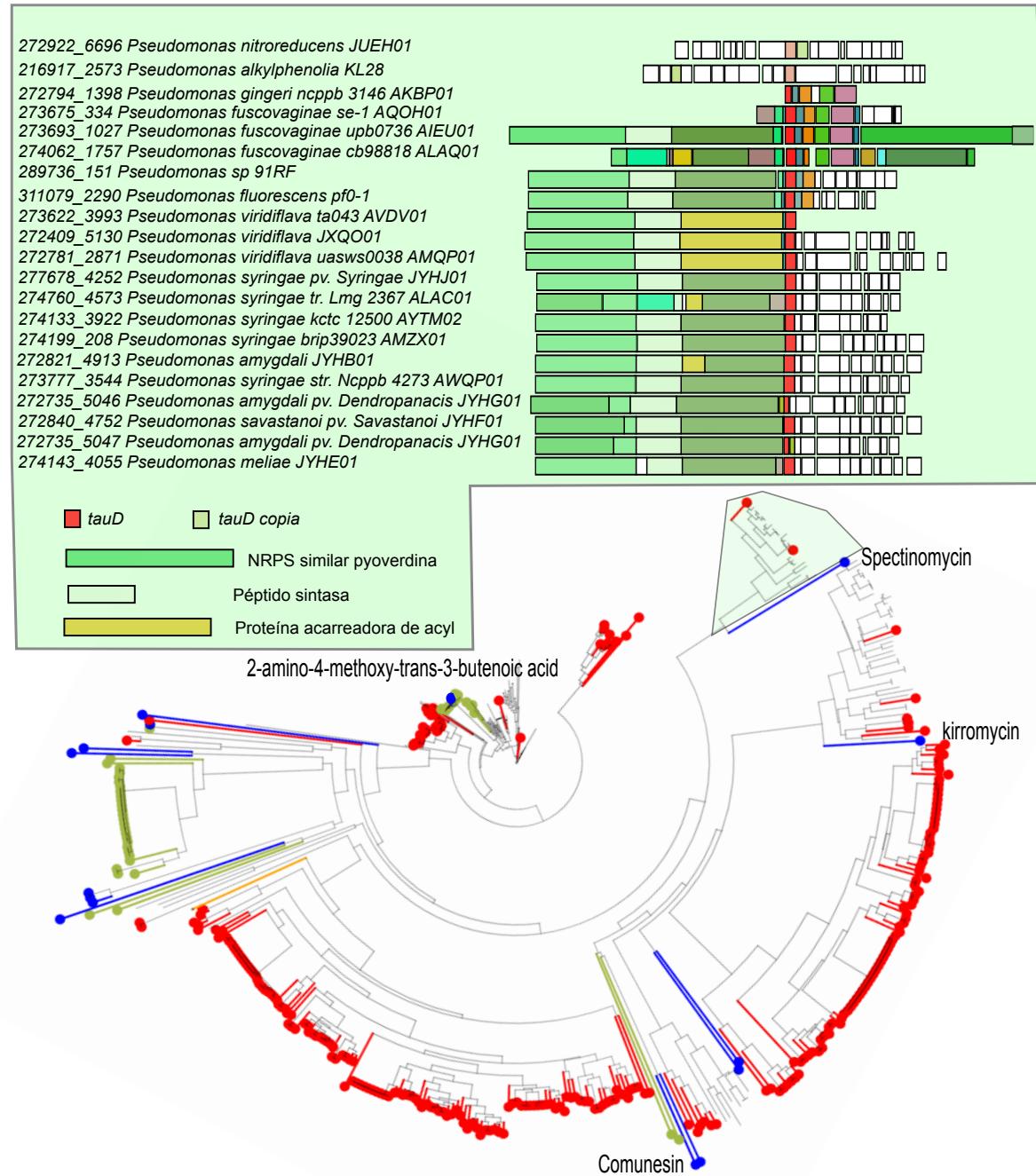


Figura A.5: En *Pseudomonas* el gen *tauD* tiene un contexto que incluye genes de metabolismo especializado. Variantes de este contexto están distribuidas en varios organismos. En particular

Apéndice B

El tercer apéndice, comandos de Docker y Git y R

B.1. Docker

-Create a new repository

```
docker build . -t evomining  
docker push nselemevomining
```

Restart docker and free all ports

```
sudo service docker restart
```

list containers

```
docker ps -a
```

ssh or bash into a running docker container

```
sudo docker exec -i -t romantic_brahmagupta /bin/bash  
<mycontainer> bash
```

Stop all containers

```
docker rm $(docker ps -a -q)
```

Remove stopped containers

```
docker rm $(docker ps -q -f status=exited)
```

Remove all images

```
docker rmi $(docker images -q)
```

uninstall docker from ubuntu (Fresh start)

```
sudo apt-get purge docker-engine  
sudo apt-get autoremove --purge docker-engine  
rm -rf /var/lib/docker # This deletes all images, containers, and volumes
```

Run Evomining container using nselem/newevomining image

```
docker run -i -t -v /home/nelly/GIT/EvoMining:/var/www/html/EvoMining/exchange
-p 80:80 nselem/newevomining /bin/bash
```

Start evomining inside this container

```
perl startevomining
```

Vizualice a tree

```
http://10.10.100.234/EvoMining/cgi-bin/color_tree.pl?9&&/var/www/html/EvoMining/exchange
file 9.new must be on folder volume CyanosBBH_MiBIG_DB.faa_CYANOS
```

Find a perl module

```
perl -MList::Util -e'print $_ . " => " . $INC{$_} . "\n" for keys %INC'
```

EvoMining notes

Gblocks only runs inside folder /var/www/html/EvoMining

B.2. Git

```
git add --all
git commit -m "Some message"
git push -u origin master
git clone
```

B.3. Connect GitHub and DockerHub

automated builds The Dockerfile is available to anyone with access to your Docker Hub repository. Your repository is kept up-to-date with code changes automatically.

Apéndice C

Apendice 3 Dinámica molecular vs datos experimentales

En las tablas Appendix C , Appendix C se muestra a detalle la comparación entre las dinámicas moleculares de PriA respecto a PRA y ProFAR. Estos datos sugirieron que GTp es el sustrato con mayor afinidad y por ello en la última sección se avanzó en la realización de cinéticas enzimáticas con GTP.

Table: Actividad de PriA en S3 PRA

organism	Family	K_M	k_{cat}	$\frac{k_{cat}}{K_M}$	Pre MD	Pos MD	Reference
Afer	HisA	$1,1 \pm 0,2$	$0,05 \pm 0,001$	0.045	-10.1	-12.3	Noda-García L et al 2015
Ecoli	HisA	1,6	4,9	3.1	-9.9	-16	Henn-Sax et al. (2002)
Sent	HisA	$17,0 \pm 0,1$	$7,8 \pm 2,4$	$4,5 \times 10^5$	-10.3	-20.1	Söderholm A et al (2015)
Aaur	PriB	$2,1 \pm 0,5$	$1,8 \pm 0,2$	0.9	-7.4		verduzco-castro 2016
Sipo	PriB	$3,8 \pm 0,2$	$0,82 \pm 0,02$	0.21	-8.2	-14.7	verduzco-castro 2016
SspC	PriB	$11,4 \pm 3,4$	$2,53 \pm 0,74$	0.22	-8.5	-12.7	verduzco-castro 2016
SMg1	PriB	$13,2 \pm 3,4$	$0,92 \pm 0,19$	0.069	-8	-15.2	verduzco-castro 2016
Ssvi	PriB	$3,9 \pm 0,89$	$0,69 \pm 0,04$	0.18	-8.2	-16.7	verduzco-castro 2016
Scoe	PriA	$3,6 \pm 0,7$	$1,3 \pm 0,2$	0.4	-8.4	-15	Noda-García et al (2010)
Sglob	PriA	$4,2 \pm 0,8$	$0,74 \pm 0,03$	0.18	-9.2	-16.7	verduzco-castro
Mtub 2Y85	priA	190,23	$0,012 - 9,7$				Due et al 2011
Mtub 3ZS4	priA	?	-9,9				Due et al 2011 (To be published)
Auro	priA	$4,0 \pm 0,9$	$0,2 \pm 0,03$	0.04	-9.2		Vazquez-Juarez (2016)
Cjei	PriA	$2,3 \pm 0,2$	$0,9 \pm 0,08$	0.39	-8.5		Noda-García et al (2013)
Cdip	subHisA	$4,4 \pm 0,5$	$2,6 \pm 0,3$	0.59	-9.2		Noda-García et al (2013)
SMg1 TrpF	TrpF3	-	-	-	-6.9	-9.6	verduzco-castro 2016
Jden	TrpF3	-	-	-7.2	-9.4	$16,8 \pm 3,3$	Verduzco-Castro E et al 2016
Acar	SubHisA	0.02					
Aodo	SubTrpF	-	-	-			

La siguiente tabla es análoga a la anterior pero con el sustrato ProFAR

Table: Actividad de PriA en S7 ProFAR

organism	Family	K_M	k_{cat}	$\frac{k_{cat}}{K_M}$	Pre MD	Pos MD	Reference
Afer	HisA	- -	-	-9.2	-9		Noda-García L et al. (2015)
Ecoli	HisA	- -	-	-9	-11.1		Henn-Sax et al. (2002)
Sent	HisA	- -	-	-9.6	-10.2		Söderholm A et al (2015)
Aaur	PriB	$26,3 \pm 6,3$	$0,37 \pm 0,09$	0.014	-7.1	-	verduzco-castro 2016
Sipo	PriB	$60,8 \pm 1,1$	$8,25 \pm 0,4$	0.14	-8	-8.5	verduzco-castro 2016
SspC	PriB	$149,9 \pm 29$	$1,4 \pm 0,12$	0.009	-8.5	-10.8	verduzco-castro 2016
SMg1	PriB	$129,6 \pm 34$	$0,29 \pm 0,04$	0.0022	-7.5	-11	verduzco-castro 2016
Ssvi	PriB	$24,5 \pm 4,0$	$1,6 \pm 0,29$	0.067	-8	-9.7	verduzco-castro 2016
ScOE	PriA	$5,0 \pm 0,08$	$3,4 \pm 0,09$	0.7	-8	-9.4	Noda-García et al (2010)
Sglob	PriA	$11 \pm 1,0$	$3,8 \pm 0,2$	0.34	-8.7	-9.4	verduzco-castro 2016
Mtub2Y85	priA	21	3.6	0.17	-8.6		Due et al 2011
Mtub3ZS4	priA			-9.3			Due et al 2011 (To be published)
Auro	priA	$23 \pm 6,5$	$0,5 \pm 0,05$	0.02	-9.3		Vazquez-Juarez (2016)
Cjei	PriA	$5,1 \pm 1,0$	$1,6 \pm 0,16$	0.31	-9		Noda-García et al (2013)
Cdip	subHisA	- -	-	-8.8			Noda-García et al (2013)
SMg1 TrpF	TrpF3	$8,4 \pm 1,7$	$10,5 \pm 2,4$	1.25	-7.6	-9	verduzco-castro
Jden	TrpF3	$16,8 \pm 3,3$	$27 \pm 1,6$	1.6	-7.6	-7.7	verduzco-castro
Acar	SubHisA	Na	Na	0.02	Na	Na	Na
Aodo	SubTrpF	- -	-	-	Na	Na	Na

Cuadro C.1: Enzymes docking

Enzima	S13	S15	S14	S16	S10	S12	S9	S18	S5	S4	S8	S17	S7	S6	S11	S1	S2	S3	S19	S20
Scrub_2VEP	-7.4	-7.3	-7.5	-7.1	-6.5	-6.2	-6.5	-7.7	-9.4	-9.3	-7.9	-7.2	-8.3	-8.6	-8.9	-9.0	-7.1	-8.9	-7.8	-7.7
Saver_2VEP	-7.4	-7.2	-7.0	-6.5	-7.3	-6.4	-7.0	-7.5	-9.6	-8.5	-7.9	-7.6	-8.4	-8.7	-9.8	-8.3	-7.9	-8.6	-7.7	-7.6
Scoe_2VEP	-7.5	-7.5	-7.9	-7.0	-7.0	-6.2	-6.5	-7.8	-8.8	-9.2	-7.8	-7.9	-8.0	-8.9	-10.3	-9.2	-9.3	-8.4	-8.1	-8.2
Scoe_2X30	-8.1	-7.4	-7.6	-6.9	-6.7	-6.8	-7.1	-7.9	-9.1	-9.0	-8.3	-8.6	-8.5	-9.0	-10.6	-10.0	-10.3	-10.2	-8.1	-7.9
Scoe_1VZW	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Sfla_2VEP	-7.1	-7.6	-7.2	-7.3	-7.2	-6.8	-6.9	-8.1	-8.2	-7.2	-8.2	-7.2	-8.4	-8.3	-8.5	-7.9	-7.8	-6.0	-7.5	-7.3
Sgha_2VEP	-9.2	-8.7	-6.7	-6.7	-7.4	-7.7	-7.2	-7.5	-9.8	-8.9	-8.2	-7.8	-8.8	-8.7	-10.1	-9.1	-9.0	-9.5	-8.0	-7.5
Siaik_2VEP	-6.6	-7.3	-7.0	-7.1	-7.1	-6.8	-8.0	-9.2	-8.7	-7.8	-7.6	-8.3	-8.4	-9.1	-5.8	-5.3	-8.5	-7.3	-7.4	
Sbic_2VEP	-7.2	-6.7	-6.8	-6.5	-6.2	-6.6	-5.9	-7.8	-8.5	-7.8	-7.8	-7.2	-8.2	-8.0	-9.6	-8.2	-8.0	-9.4	-7.7	-7.5
Sbot_2VEP	-9.6	-10.9	-8.9	-7.1	-6.0	-6.2	-6.7	-8.1	-9.1	-8.8	-8.3	-7.9	-8.9	-9.3	-9.4	-9.8	-10.0	-8.9	-8.2	-8.0
Sipo_2VEP	-6.6	-6.6	-7.3	-6.9	-6.5	-6.3	-6.5	-8.1	-8.6	-9.1	-8.0	-7.9	-8.0	-8.4	-8.5	-7.2	-8.4	-8.2	-7.9	-7.6
Ssvi	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Ssvi_4U28	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Ssvi_4TX9	-5.9	-8.2	-7.1	-6.6	-6.8	-7.0	-7.6	-7.9	-8.4	-8.3	-8.2	-8.1	-8.4	-8.7	-7.7	-8.2	-8.2	-6.7	-8.0	-7.5
Salb_2VEP	-6.3	-7.1	-7.4	-6.8	-7.7	-6.9	-6.6	-8.0	-9.6	-8.9	-8.6	-7.9	-8.6	-8.4	-9.1	-7.4	-7.2	-8.8	-8.1	-7.8
Sblk_2VEP	-7.4	-6.7	-7.4	-7.3	-7.7	-6.5	-6.8	-8.5	-9.9	-9.8	-8.3	-7.8	-8.2	-8.4	-10.5	-7.1	-6.3	-8.3	-8.1	-7.9
Stsu_2VEP	-6.9	-7.5	-7.9	-7.8	-7.5	-7.3	-7.7	-8.1	-10.0	-9.7	-8.7	-7.8	-8.8	-8.8	-10.6	-7.8	-8.7	-9.2	-7.9	-7.8
Sven_2VEP	-8.3	-7.6	-7.5	-6.8	-6.4	-7.0	-6.2	-8.2	-9.6	-9.0	-7.9	-7.4	-8.3	-8.6	-10.0	-8.2	-8.2	-8.1	-7.6	-7.4
Scal_2VEP	-7.3	-8.8	-7.5	-6.7	-7.0	-6.5	-6.5	-8.7	-10.0	-9.7	-8.8	-7.7	-8.2	-8.6	-10.5	-8.1	-9.2	-8.9	-7.6	-7.6
Sbaa_2VEP	-8.9	-6.6	-6.7	-6.8	-7.2	-7.2	-6.2	-7.7	-9.6	-9.5	-8.4	-7.4	-8.5	-8.2	-9.7	-8.5	-8.4	-9.3	-7.4	-7.7
Sglo_2VEP	-6.1	-6.8	-6.9	-6.5	-6.7	-6.3	-6.7	-7.5	-9.6	-9.6	-8.6	-7.8	-8.7	-8.7	-9.9	-6.2	-5.1	-9.2	-7.8	-7.7
Sful_2VEP	-9.0	-6.9	-7.1	-6.8	-6.3	-7.2	-6.6	-8.1	-9.8	-9.3	-7.7	-8.0	-8.7	-8.8	-10.5	-7.6	-9.1	-10.5	-7.1	-7.4
Sgri_2VEP	-6.6	-8.2	-7.1	-6.4	-7.1	-7.4	-7.1	-7.4	-9.4	-8.5	-8.6	-7.5	-8.8	-8.4	-9.6	-8.8	-8.8	-8.7	-7.7	-7.5
S34_2VEP	-7.8	-7.2	-7.6	-7.3	-6.2	-6.5	-6.9	-8.0	-8.8	-8.6	-7.7	-7.1	-7.7	-7.9	-7.2	-7.1	-6.7	-7.1	-7.7	-7.7
Srim_2VEP	-7.4	-6.8	-7.1	-7.2	-7.2	-7.4	-7.8	-8.6	-9.7	-9.3	-8.8	-7.7	-8.9	-8.7	-10.2	-6.8	-8.2	-9.0	-7.5	-7.8
Satr_2VEP	-7.6	-7.1	-7.5	-7.4	-6.2	-6.5	-6.9	-8.0	-8.9	-8.7	-7.7	-7.4	-7.7	-7.8	-6.5	-7.0	-6.3	-7.7	-7.7	-7.7
S1813_2VEP	-7.5	-6.7	-6.8	-6.6	-6.8	-7.0	-6.7	-7.9	-9.9	-9.7	-8.3	-7.7	-8.5	-8.6	-10.0	-7.6	-7.5	-8.6	-7.3	-7.5
Svar_2VEP	-6.3	-6.8	-7.0	-6.3	-6.9	-6.9	-6.6	-7.8	-9.3	-7.4	-8.5	-8.5	-7.3	-8.0	-8.7	-8.5	-7.4	-6.3	-6.0	-7.5
Sfra_2VEP	-7.3	-7.0	-6.8	-6.6	-6.5	-7.3	-6.6	-8.6	-9.1	-8.7	-8.9	-7.7	-8.9	-9.0	-8.7	-6.0	-6.3	-7.9	-8.2	-7.8
Smeg_2VEP	-8.0	-7.3	-6.9	-6.6	-7.2	-6.7	-6.1	-7.6	-9.2	-9.1	-8.7	-7.8	-7.4	-8.2	-8.5	-9.6	-9.2	-9.2	-8.6	-7.7
Sssl_2VEP	-7.5	-7.0	-6.9	-6.6	-6.6	-6.7	-6.9	-7.7	-8.4	-8.2	-8.2	-7.5	-8.1	-7.7	-8.2	-6.7	-7.1	-7.7	-7.6	-7.4
Slav_4X9S	-8.0	-7.1	-6.7	-6.9	-6.6	-6.8	-6.7	-8.2	-9.5	-9.1	-8.6	-8.0	-8.4	-8.7	-9.1	-9.5	-9.3	-8.1	-8.1	-7.6
Sery_4X9S	-7.8	-7.2	-7.6	-7.2	-7.4	-6.9	-7.4	-8.5	-9.4	-9.4	-8.6	-7.6	-8.4	-8.6	-9.1	-10.0	-9.0	-7.8	-8.2	
SspC_4X9S	-7.4	-6.9	-7.3	-6.8	-7.3	-6.6	-7.5	-8.0	-9.8	-9.3	-8.7	-7.6	-8.5	-8.4	-10.6	-9.1	-8.9	-8.5	-8.1	-8.0
Sxan_4X9S	-7.5	-6.9	-6.8	-6.8	-6.5	-6.6	-6.5	-8.3	-8.0	-8.1	-7.6	-7.4	-8.7	-8.1	-8.5	-8.0	-7.6	-7.7	-7.4	
Skat_4X9S	-6.4	-7.0	-7.1	-6.7	-7.7	-6.3	-6.2	-8.1	-8.5	-9.2	-8.3	-7.6	-9.0	-8.5	-9.7	-9.5	-9.9	-9.2	-7.4	-7.5
SMg1_4X9S	-6.5	-6.9	-7.2	-7.1	-6.5	-6.9	-6.4	-7.3	-7.8	-7.7	-8.3	-7.5	-7.9	-8.4	-9.5	-7.6	-5.2	-7.5	-7.6	-7.7
SMg1_W9T	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Sniv_2VEP	-6.2	-6.8	-7.4	-6.5	-7.8	-6.8	-6.7	-9.5	-9.6	-9.4	-8.7	-8.2	-8.6	-9.1	-9.9	-5.4	-5.5	-9.2	-8.0	-7.5
Scla_2VEP	-6.4	-7.7	-7.4	-7.2	-7.6	-7.5	-7.2	-8.5	-10.1	-10.0	-8.7	-7.9	-8.8	-9.1	-10.2	-6.9	-8.1	-8.5	-7.7	-7.7
Save_2VEP	-7.6	-6.7	-7.1	-7.2	-7.1	-6.5	-6.6	-7.8	-8.6	-10.0	-8.6	-7.5	-8.3	-8.5	-8.8	-5.3	-5.2	-5.8	-7.7	-7.4
Spur_2vEP	-6.8	-7.3	-6.9	-6.7	-8.0	-7.9	-7.7	-8.5	-9.5	-9.8	-8.1	-7.8	-8.7	-9.7	-10.0	-5.3	-6.2	-8.2	-7.6	-7.4
Scar_2Y89	-6.9	-6.8	-7.5	-7.1	-7.8	-7.3	-7.2	-8.3	-9.2	-8.3	-8.9	-8.4	-8.9	-9.3	-9.4	-5.3	-5.2	-7.1	-8.5	-8.6
Mtub_2Y88	-10.0	-7.8	-8.9	-5.4	-8.6	-7.3	-7.8	-9.5	-10.9	-10.3	-9.5	-9.0	-9.8	-9.8	-11.3	-10.1	-10.2	-11.3	-9.5	-8.8
Mtub_2Y89	-8.7	-8.6	-9.6	-9.4	-6.4	-5.9	-5.6	-7.1	-7.0	-7.5	-7.3	-6.8	-7.4	-8.4	-7.5	-8.1	-8.6	-7.5	-7.7	-7.3
Mtub_2Y85	-8.2	-7.9	-9.2	-7.4	-7.6	-7.5	-7.6	-8.4	-9.7	-9.5	-9.3	-7.8	-8.6	-8.6	-10.2	-9.8	-9.9	-10.1	-7.3	-7.4
Mtub_3ZS4	-10.0	-10.5	-11.4	-6.4	-8.2	-7.2	-7.0	-9.6	-10.2	-10.2	-9.9	-8.5	-9.3	-9.6	-10.9	-10.0	-10.7	-9.9	-8.8	-8.9
S34_3ZS4	-7.4	-8.0	-7.6	-6.4	-5.2	-5.4	-5.2	-6.1	-6.8	-6.4	-5.7	-6.4	-6.3	-6.3	-7.1	-7.4	-7.1	-6.4	-7.1	-6.6
Cdip_4AXK	-9.2	-7.8	-10.9	-7.2	-7.5	-7.6	-7.7	-8.9	-9.0	-9.8	-9.0	-8.3	-8.8	-9.2	-10.1	-9.5	-9.9	-9.2	-8.0	-7.9
Cjei_4AXK	-7.5	-6.9	-7.2	-6.5	-8.4	-8.0	-8.5	-8.7	-9.5	-9.6	-9.4	-8.8	-9.0	-9.5	-9.3	-8.1	-9.3	-8.5	-7.9	-7.7
Aaur	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Aaur_4WD0	-8.2	-8.5	-8.1	-7.9	-5.7	-5.5	-5.9	-7.0	-7.5	-7.2	-7.1	-6.7	-7.1	-7.4	-8.4	-7.2	-7.3	-7.4	-7.0	-6.7
Acar_4X2R	-10.6	-9.3	-9.3	-7.2	-7.2	-6.8	-7.3	-7.5	-9.5	-9.8	-8.0	-7.8	-9.3	-8.9	-10.3	-9.6	-9.4	-9.4	-8.1	-8.0
Auro_4X2R	-9.9	-9.1	-9.8	-8.1	-7.4	-7.1	-7.4	-7.8	-9.2	-9.8	-8.3	-7.8	-9.3	-9.0	-9.9	-9.0	-8.6	-9.2	-8.5	-8.2
Afer_4WD0	-5.7	-5.8	-6.0	-5.7	-6.7	-6.2	-5.8	-7.6	-9.2	-8.8	-7.8	-7.4	-8.3	-8.4	-9.3	-6.7	-4.5	-9.1	-8.3	-8.1
Sent_5AHE	-9.1	-5.4	-6.4	-5.2	-8.0	-7.3	-7.4	-8.8	-10.7	-10.2	-8.7	-8.7	-9.6	-9.9	-10.9	-7.8	-9.1	-10.3	-9.0	-8.4
Ecoli_K12	-9.7	-9.7	-9.2	-6.1	-7.2	-6.6	-6.8	-8.6	-9.5	-9.1	-8.6	-8.2	-9.0	-8.6	-10.2	-9.9	-10.2	-9.9	-8.2	-7.9
Jden_4WUI	-8.3	-8.8	-8.2	-6.8	-6.2	-6.1	-6.0	-6.8	-7.4	-7.6	-7.5	-6.9	-7.6	-7.5	-7.7	-7.5	-7.6	-7.2	-7.3	-7.2
Ctra	-8.2	-8.0	-7.4	-7.2	-6.1	-5.5	-5.4	-6.5	-7.1	-7.1	-7.0	-6.2	-6.8	-6.8	-6.9	-7.2	-7.4	-6.5	-6.7	-6.6
SMg1_trpF	-7.2	-8.8	-8.2	-7.3	-6.2	-5.7	-5.7	-6.9	-6.6	-6.7	-7.3	-6.7	-7.6	-6.9	-7.5	-7.1	-7.1	-6.9	-6.7	-6.5
Aodo_4X2R	-8.5	-8.6	-8.8	-7.3	-7.1	-7.1	-7.5	-9.7	-9.4	-7.8	-7.6	-9.6	-8.8	-10.1	-8.4	-8.9	-9.4	-8.0	-8.1	

Apéndice D

El cuarto Apéndice, Protocolos experimentales utilizados en el estudio de PriA

D.1. Materiales

- Incubadora
- Centrifugadora refrigerada
- Sonicador
- Columna HisTrapHP
- Columna AKTA-FPLC
- Columna Vivapure Mini
- Fluorímetro

D.2. Purificación de proteínas utilizadas en los ensayos enzimáticos

TrpC y TrpD se purificaron mediante cromatografía de níquel utilizando AKTA-FPLC, mientras que PriA y D11A de *Sc coelicolor* se purificaron mediante cromatografía de níquel utilizando columnas vivapure.

D.2.1. Centrifugación

1. Centrifugar en botes de ,5L (Botellas tan grandes como sea posible) utilizando el rotor para botes (En ,5L el código del rotor es 03)
Se han utilizado las siguientes velocidades:

Verdel-Aranda: $6000\text{rpm} / 10\text{min}$

Vázquez-Juárez: $7000\text{rpm} / 10\text{min}$

En este punto, el experimento se puede interrumpir y el pellet se puede almacenar a -80° en tubos falcon de 50 ml o, mejor aún se puede ejecutar el ensayo el mismo día. Para reiniciar este protocolo, vuelve a suspender el sedimento en $\$ 25\text{ ml}$ $\$$ de Buffer de lisis manteniendo en hielo todos los pasos siguientes.

D.2.2. Sonicación.

A continuación se debe sonicar el pellet para romper las células y obtener las proteínas. Todos los reactivos deben enfriarse previamente y mantenerse en hielo. El sonicador debe tocar el tubo falcon, que siempre debe mantenerse en hielo.

Agregar componentes nuevos al Buffer de lisis: -Aregar mezcla de inhibidor de proteasas $2\mu\text{l}$ (caja de proteínas) -Añadir DTT , $125\mu\text{l}$ -Verdel-Aranda: Agregue Lysozyme $\frac{2\text{mg}}{\text{ml}}$ $100\mu\text{l}$ -Vazquez-Juárez: Agregue Lysozyme $\frac{10\text{mg}}{\text{ml}}$ ($\$ 1000 \times \$$) $100\mu\text{l}$

2. Resuspensión. Agregue el buffer de lisis $\$ 25\text{ml}$ $\$$ para volver a suspender el pellet y coloque los tubos en una vajilla de vidrio pequeña con hielo
3. Sonicación. Después de la adición de Buffer hay que sonicar: $\$ 7\text{ \$}$ ciclos de sonicaciones de $\$ 20\text{s}$ $\$$ con $\$ 1\text{min}$ $\$$ de descanso entre cada ciclo de sonicación. Solo se debe ingresar el tiempo total de sonicación en el dispositivo de sonicación ($\$ 140\text{s}$ $\$$).
4. Centrifugación. Despues de la sonicación, centrifugar en una centrífuga refrigerada a 4°C $\$ 25\text{ min}$ $\$$ a $\$ 8000$ rpm $\$$
5. Inyectar lo colectado en el AKTA-FPL previamente balanceado con Buffer A (o vivapure balanceado con bufferA) Cuando se usa vivapure, el sobrenadante debe filtrarse en los filtros de $.45\text{ }\mu\text{l}$ para evitar daños en la columna.
6. Wash with 5% Buffer B and subsequently with an imidazol gradient (Buffer B) from 5% to 60% on 16 vol of the column with a flux of 1ml/min. Conserve each elution tube properly labeled. 2000rpm 5 min
What we did to purify Scoe PriA was an imidazol gradient:

Flask each one with a 100ml were prepared. columns were washed with 20ml of this tubes at 2000rpm 5 min

Imidazol concentration=x

v: (x=)100ml/500mM

Flask	BufferB (mM)	BufferB (ml)	Buffer A ml	Buffer B
1	50	10	90	10
2	100	20	80	20
3	150	30	70	30
4	300	60	40	60
5	500	100	0	100

Flask must be kept cold.

7. Recover the fractions that contain the protein that elutes approximately at 150-200 mM imidazol. (TrpC, TrpD) or 300mM imidazol (must PriA). Collect the relevant fractions. At this point a protein gel can be run to check protein elution.
8. Concentrate the protein using AMICON tubes 10kDa (all molecules below this weight will be discarded, molecules with weight above 10kDa such as PriA will be kept inside the tube) until an approximate concentration of $90 \frac{\mu g}{\mu l}$ (1ml vol approx). Because imidazol>200mM reacts with Bradford, protein on amicon must be washed with 10 ml of buffer A to eliminate imidazol (4ml each time on amicon tube). Finally, after protein concentration, 100 ul sample must be recovered with 900 ul Buffer A (free of imidazol) (8000 rpm 10 min) when AMICON are stored for long periods leave on ethanol at 20 %, to reuse them throw ethanol out and wash many times with miliQ water.
9. Check purity by SDS-PAGE gel
on *S coelicolor* PriA molecular weight is around 25.7 kDa (length 240 aminoacids),
on *T maritima* TrpC molecular weight is around 27.5 kDa (length 242 aminoacids)
10. Add glycerol at a final concentration of 15 % and quantify using Bradford. Store at -80C

TrpC important before step 5

After centrifuge step 4 :

Heat supernatant by 15 min at 65C

Centrifuge at 10000rpm by 20min. Recover the supernatant.

Continue with steps 5-10 as in trpD purification.

On protein activity is more important to be pure than to have protein abundance.

D.3. Protein Quantification

D.3.1. Bradford calibration curve

Mix well while pipeting. Holes with protein content must become blue.
Incubate 5 min.

Measure at 595 abs (TECAN). clear box.

5 ul y 50ul of protein. Take measures inside the curve range.

BSA on ug/ml

\$\$

BSA μl por ml	BSA μl	Bradford μl	Other
0	0	40	H_2O 160 μl
10	160	40	-
20	160	40	-
40	160	40	-
60	160	40	-
100	160	40	-
0	0	40	PriA 5 μl H_2O 155 μl
0	0	40	PriA 20 μl H_2O 130 μl

\$\$

```
## 160 ul of BSA on this concentrations on ug/ml were added to a 40 ul of Bradford
## BSA concentration on ug/ml
BSAConcentrationStock<-c(0,10,20,40,60,100)

#adding .16 ml on plates
vol<-160
Bradford_df = data.frame(BSAConcentrationStock,vol)

## quantity of microgrammes on .16 ml
Bradford_df["Quantity"]<-BSAConcentrationStock*.160
## concentration after added 40 ul bradford (total 200 ul)
Bradford_df["Concentration200"]<-Bradford_df["Quantity"]/.2

## This are the absorbance measures for the different BSA concentrations
Abs1BSA<-c(0.2649999857,0.4329000115,0.6754000187,0.9449999928,1.24240005,1.432000041)
Abs2BSA<-c(0.2948000133,0.4298999906,0.7348999977,0.9965000153,1.225999951,1.494899988)
```

```
Bradford_df["Abs1BSA"]<-Abs1BSA
Bradford_df["Abs2BSA"]<-Abs2BSA

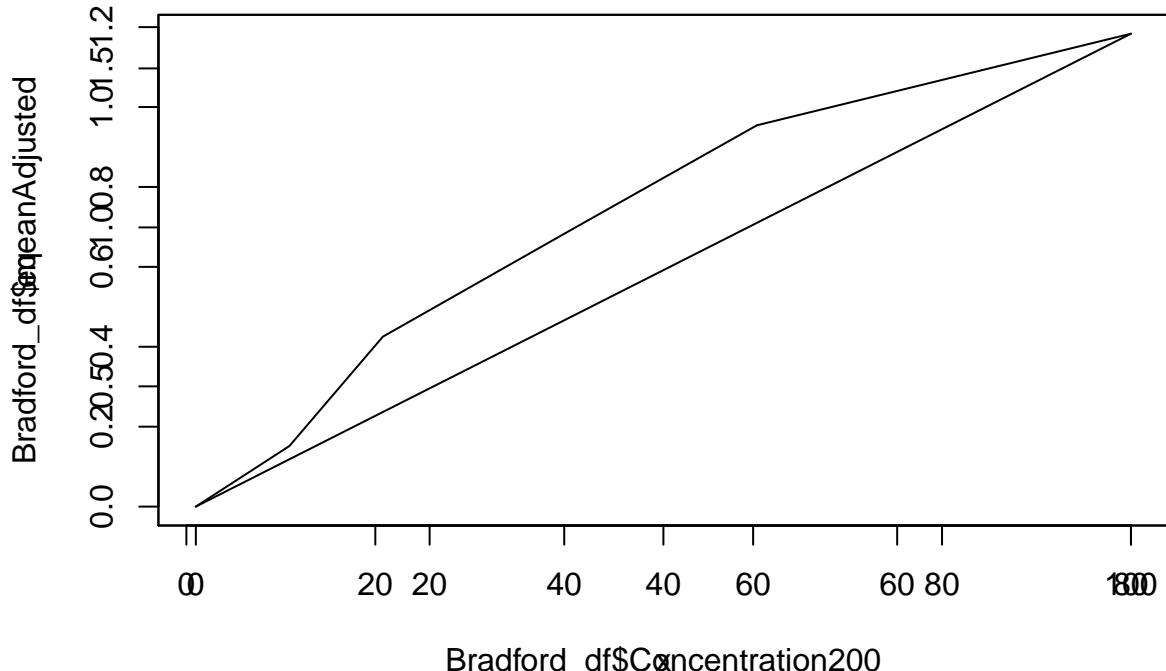
## mean value of measures
Bradford_df$mean<-rowMeans(subset(Bradford_df, select = c(Abs1BSA, Abs2BSA)), na.rm=TRUE)

#adjusting blank
Bradford_df$meanAdjusted<-Bradford_df$mean-Bradford_df$mean[1]
BSA.lm = lm(meanAdjusted ~ Concentration200, data=Bradford_df)
coeffs = coefficients(BSA.lm); coeffs

(Intercept) Concentration200
0.10688027      0.01502265

b=coeffs[1]
m=coeffs[2]

eq = function(x){x*m+b}
plot(Bradford_df$Concentration200,Bradford_df$meanAdjusted,type="l")
par(new=TRUE)
plot(eq, 1,100)
```



D.3.2. Enzyme quantification

For Bradford to work properly After protein concentration, 900 ul Buffer A (free of imidazol) must be added to 100 μ l sample

```
## ul of
vol=5
type="Scoe"
ABS1=0.932099998
ABS2=1.048400044
Pria_df=data.frame(vol,type,ABS1,ABS2)
Pria_df$type<-as.character(Pria_df$type)
data2=c(20,"Scoe",1.639400005,1.569700003)
data3=c(5,"D11A",0.575600028, 0.576099992)
data4=c(20,"D11A",1.039499998, 1.067399979)
data5=c(160,"test",.69085, .69085)

## add data to dataframe Pria_df
Pria_df=rbind(Pria_df,data2)
Pria_df=rbind(Pria_df,data3)
Pria_df=rbind(Pria_df,data4)
Pria_df=rbind(Pria_df,data5)

Pria_df$mean<-rowMeans(cbind(as.numeric(Pria_df$ABS1),as.numeric(Pria_df$ABS2)))

## Pasando absorbancia a concentration de proteina en 200 ul (ug/ml)
## kari values
#m=0.004679534923
#b=0.103674687

inter = function(y){(y-b)/m}
Pria_df$concentration200<-inter(Pria_df$mean)

## protein quantity on ug on 200 ul
Pria_df["Quantity"]=Pria_df$concentration200*.2

### Inicial concentration C200_vol200=Cinicial_Vinicial
Pria_df["ConcentrationInitial"]=Pria_df$Quantity/(.001*as.numeric(Pria_df$vol))

kable(Bradford_df)
```

BSAConcentrationStock	vol	Quantity	Concentration200	Abs1BSA	Abs2BSA	mean
0	160	0.0	0	0.2650	0.2948	0.27990
10	160	1.6	8	0.4329	0.4299	0.43140
20	160	3.2	16	0.6754	0.7349	0.70515
40	160	6.4	32	0.9450	0.9965	0.97075
60	160	9.6	48	1.2424	1.2260	1.23420
100	160	16.0	80	1.4320	1.4949	1.46345

```
kable(Pria_df)
```

vol	type	ABS1	ABS2	mean	concentration200	Quantity	Concentration
5	Scoe	0.932099998	1.048400044	0.99025	58.80251	11.760502	2352
20	Scoe	1.639400005	1.569700003	1.60455	99.69408	19.938816	996
5	D11A	0.575600028	0.576099992	0.57585	31.21750	6.243500	1248
20	D11A	1.039499998	1.067399979	1.05345	63.00948	12.601897	630
160	test	0.69085	0.69085	0.69085	38.87261	7.774521	48

Since $1\text{kDa} = 1\text{Kg/mol}$ and PriA Scoe molecular weight is 25.7kDa we have that

$$M \times V = \frac{g}{mw}$$

$$M = \frac{g}{V} \times \frac{1}{mw}$$

```
## mas on Kda = kg/mol
mw<-25.7
# converting to g/mol
mwgram<-mw*1000
## concentration on g/L (after convert ug/ml)
concentScoe<-2.352
concentD11A<-1.248
## Concentration on uM (10**6M)
molar = function(x){(10**6)*x/mwgram}
molar(concentScoe)
```

```
[1] 91.51751
```

```
molar(concentD11A)
```

```
[1] 48.56031
```

D.4. Concentration on microMolar

So Scoe concentration is 91.5175097 and D11A is $48.5603113 \mu M$

```
## we want final concentration 2.4uM on a final volume of 160 ul
## ciVi=CfVf
## Vi =CfVf/Vi
## Cf= 80uM Vf=5ul Vi=?ul Ci=x
```

```
adjustMol = function(x){2.5*160/x}
## this are the ul need from stock cristal enzyme that will be diluted on buffer to comp
adjustMol(molar(concentScoe))

[1] 4.370748

adjustMol(molar(concentD11A))

[1] 8.237179
```

References

1. Jensen. Enzyme Recruitment in Evolution of New Function. *Annual Review of Microbiology* [Internet]. 1976 [cited 2017 Feb 8];30(1):409–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.mi.30.100176.002205>
2. Nam H, Lewis NE, Lerman JA, Lee D-H, Chang RL, Kim D, et al. Network Context and Selection in the Evolution to Enzyme Specificity. *Science* [Internet]. 2012 Aug [cited 2017 Feb 9];337(6098):1101–4. Available from: <http://science.sciencemag.org/content/337/6098/1101>
3. Patrick WM, Quandt EM, Swartzlander DB, Matsumura I. Multicopy Suppression Underpins Metabolic Evolvability. *Molecular Biology and Evolution* [Internet]. 2007 Dec [cited 2017 Feb 9];24(12):2716–22. Available from: <https://academic.oup.com/mbe/article/24/12/2716/978039/Multicopy-Suppression-Underpins-Metabolic>
4. Pandya C, Farelli JD, Dunaway-Mariano D, Allen KN. Enzyme Promiscuity: Engine of Evolutionary Innovation. *Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 2014 Oct [cited 2017 Feb 9];289(44):30229–36. Available from: <http://www.jbc.org/content/289/44/30229>
5. Khersonsky O, Tawfik DS. Enzyme promiscuity: A mechanistic and evolutionary perspective. *Annual Review of Biochemistry*. 2010;79:471–505.
6. Copley SD. Enzymes with extra talents: Moonlighting functions and catalytic promiscuity. *Current Opinion in Chemical Biology* [Internet]. 2003 Apr [cited 2017 Feb 8];7(2):265–72. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1367593103000322>
7. Hult K, Berglund P. Enzyme promiscuity: Mechanism and applications. *Trends in Biotechnology* [Internet]. 2007 May [cited 2017 Feb 8];25(5):231–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016777990700073X>
8. O'Brien PJ, Herschlag D. Catalytic promiscuity and the evolution of new enzymatic activities. *Chemistry & Biology* [Internet]. 1999 Apr [cited 2017 Feb 9];6(4):R91–R105. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/>

- S1074552199800337
9. Barona Gómez F, Hodgson DA. Occurrence of a putative ancient like isomerase involved in histidine and tryptophan biosynthesis. *EMBO reports* [Internet]. 2003 Mar [cited 2017 Feb 8];4(3):296–300. Available from: <http://embor.embopress.org/content/4/3/296>
 10. Risso VA, Gavira JA, Gaucher EA, Sanchez Ruiz JM. Phenotypic comparisons of consensus variants versus laboratory resurrections of precambrian proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* [Internet]. 2014 Jun [cited 2017 Feb 9];82(6):887–96. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/prot.24575/abstract>
 11. Kumari V, Shah S, Gupta MN. Preparation of Biodiesel by Lipase-Catalyzed Transesterification of High Free Fatty Acid Containing Oil from Madhuca indica. *Energy & Fuels* [Internet]. 2007 Jan [cited 2017 Feb 8];21(1):368–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/ef0602168>
 12. Li C, Henry CS, Jankowski MD, Ionita JA, Hatzimanikatis V, Broadbelt LJ. Computational discovery of biochemical routes to specialty chemicals. *Chemical Engineering Science* [Internet]. 2004 Nov [cited 2017 Feb 8];59(22–23):5051–60. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009250904006669>
 13. Glasner ME, Gerlt JA, Babbitt PC. Evolution of enzyme superfamilies. *Current Opinion in Chemical Biology* [Internet]. 2006 Oct [cited 2017 Feb 9];10(5):492–7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1367593106001177>
 14. Baier F, Copp JN, Tokuriki N. Evolution of Enzyme Superfamilies: Comprehensive Exploration of Sequence–Function Relationships. *Biochemistry* [Internet]. 2016 Nov [cited 2017 Feb 8];55(46):6375–88. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00723>
 15. Bloom JD, Romero PA, Lu Z, Arnold FH. Neutral genetic drift can alter promiscuous protein functions, potentially aiding functional evolution. *Biology Direct* [Internet]. 2007 [cited 2017 Feb 8];2:17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/1745-6150-2-17>
 16. Nath A, Atkins WM. A Quantitative Index of Substrate Promiscuity. *Biochemistry* [Internet]. 2008 Jan [cited 2017 Feb 9];47(1):157–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/bi701448p>
 17. Zou T, Risso VA, Gavira JA, Sanchez-Ruiz JM, Ozkan SB. Evolution of Conformational Dynamics Determines the Conversion of a Promiscuous Generalist into a Specialist Enzyme. *Molecular Biology and Evolution* [Internet]. 2015 Jan [cited 2017 Feb 9];32(1):132–43. Available from: <https://academic.oup.com/mbe/article/32/>

- 1/132/2925568/Evolution-of-Conformational-Dynamics-Determines
18. Firn RD, Jones CG. A Darwinian view of metabolism: Molecular properties determine fitness. *Journal of Experimental Botany* [Internet]. 2009 Mar [cited 2017 Feb 8];60(3):719–26. Available from: <https://academic.oup.com/jxb/article/60/3/719/452667/A-Darwinian-view-of-metabolism-molecular>
 19. Weng J-K, Noel JP. The Remarkable Pliability and Promiscuity of Specialized Metabolism. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* [Internet]. 2012 Jan [cited 2019 Jan 24];77:309–20. Available from: <http://symposium.cshlp.org/content/77/309>
 20. Jia B, Cheong G-W, Zhang S. Multifunctional enzymes in archaea: Promiscuity and moonlight. *Extremophiles* [Internet]. 2013 Mar [cited 2017 Feb 8];17(2):193–203. Available from: <http://link.springer.com/article/10.1007/s00792-012-0509-1>
 21. Aharoni A, Gaidukov L, Khersonsky O, Gould SM, Roodveldt C, Tawfik DS. The 'evolvability' of promiscuous protein functions. *Nature Genetics* [Internet]. 2005 Jan [cited 2017 Feb 8];37(1):73–6. Available from: <http://www.nature.com/ng/journal/v37/n1/full/ng1482.html>
 22. Dean AM, Thornton JW. Mechanistic approaches to the study of evolution. *Nature reviews Genetics* [Internet]. 2007 Sep [cited 2017 Feb 8];8(9):675–88. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2488205/>
 23. Nobeli I, Favia AD, Thornton JM. Protein promiscuity and its implications for biotechnology. *Nature Biotechnology* [Internet]. 2009 Feb [cited 2017 Feb 9];27(2):157–67. Available from: <http://www.nature.com/nbt/journal/v27/n2/full/nbt1519.html>
 24. Hopkins AL. Drug discovery: Predicting promiscuity. *Nature* [Internet]. 2009 Nov [cited 2017 Feb 8];462(7270):167–8. Available from: <http://www.nature.com/nature/journal/v462/n7270/full/462167a.html>
 25. Nath A, Zientek MA, Burke BJ, Jiang Y, Atkins WM. Quantifying and Predicting the Promiscuity and Isoform Specificity of Small-Molecule Cytochrome P450 Inhibitors. *Drug Metabolism and Disposition* [Internet]. 2010 Dec [cited 2017 Feb 9];38(12):2195–203. Available from: <http://dmd.aspetjournals.org/content/38/12/2195>
 26. Eichborn J von, Murgueitio MS, Dunkel M, Koerner S, Bourne PE, Preissner R. PROMISCUOUS: A database for network-based drug-repositioning. *Nucleic Acids Research* [Internet]. 2011 Jan [cited 2017 Feb 9];39(suppl_1):D1060–6. Available from: https://academic.oup.com/nar/article/39/suppl_1/D1060/2506056/PROMISCUOUS-a-database-for-network-based-drug
 27. Zhang W, Dourado DFAR, Fernandes PA, Ramos MJ, Mannervik B. Multidimensional epistasis and fitness landscapes in enzyme evolution. *Biochemistry*

- cal Journal [Internet]. 2012 Jul [cited 2017 Feb 9];445(1):39–46. Available from: <http://www.biochemj.org/content/445/1/39>
28. Carbonell P, Faulon J-L. Molecular signatures-based prediction of enzyme promiscuity. Bioinformatics [Internet]. 2010 Aug [cited 2017 Feb 8];26(16):2012–9. Available from: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/26/16/2012/215921/Molecular-signatures-based-prediction-of-enzyme>
29. Nagao C, Nagano N, Mizuguchi K. Prediction of Detailed Enzyme Functions and Identification of Specificity Determining Residues by Random Forests. PLOS ONE [Internet]. 2014 Jan [cited 2017 Feb 8];9(1):e84623. Available from: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0084623>
30. Cheng X-Y, Huang W-J, Hu S-C, Zhang H-L, Wang H, Zhang J-X, et al. A Global Characterization and Identification of Multifunctional Enzymes. PLoS ONE [Internet]. 2012 Jun [cited 2017 Feb 8];7(6). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3377604/>
31. Noda-García L, Camacho-Zarco AR, Medina-Ruiz S, Gaytán P, Carrillo-Tripp M, Fülöp V, et al. Evolution of Substrate Specificity in a Recipient’s Enzyme Following Horizontal Gene Transfer. Molecular Biology and Evolution [Internet]. 2013 Sep [cited 2017 Jan 31];30(9):2024–34. Available from: <https://academic.oup.com/mbe/article/30/9/2024/1000280/Evolution-of-Substrate-Specificity-in-a-Recipient>
32. Verdel-Aranda K, López-Cortina ST, Hodgson DA, Barona-Gómez F. Molecular annotation of ketol-acid reductoisomerases from Streptomyces reveals a novel amino acid biosynthesis interlock mediated by enzyme promiscuity. Microbial Biotechnology [Internet]. 2015 Mar [cited 2017 Feb 9];8(2):239–52. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1751-7915.12175/abstract>
33. Plach MG, Reisinger B, Sterner R, Merkl R. Long-Term Persistence of Bi-functionality Contributes to the Robustness of Microbial Life through Exaptation. PLOS Genetics [Internet]. 2016 Jan [cited 2017 Feb 13];12(1):e1005836. Available from: <http://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1005836>
34. Copley SD. An Evolutionary Biochemist’s Perspective on Promiscuity. Trends in biochemical sciences [Internet]. 2015 Feb [cited 2017 Feb 8];40(2):72–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4836852/>
35. Espinosa-Cantú A, Ascencio D, Barona-Gómez F, DeLuna A. Gene duplication and the evolution of moonlighting proteins. Frontiers in Genetics [Internet]. 2015 Jul [cited 2017 Feb 8];6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4493404/>
36. Sanchez-Ruiz JM. On promiscuity, changing environments and the possibility of replaying the molecular tape of life. Biochemical Journal [Internet]. 2012 Jul [cited

- 2017 Feb 9];445(1):e1–3. Available from: <http://www.biochemj.org/content/445/1/e1>
37. Martínez-Núñez MA, Rodríguez-Vázquez K, Pérez-Rueda E. The lifestyle of prokaryotic organisms influences the repertoire of promiscuous enzymes. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* [Internet]. 2015 Sep [cited 2017 Feb 8];83(9):1625–31. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/prot.24847/abstract>
38. Notebaart RA, Szappanos B, Kintses B, Pál F, Györkei Á, Bogos B, et al. Network-level architecture and the evolutionary potential of underground metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [Internet]. 2014 Aug [cited 2017 Feb 9];111(32):11762–7. Available from: <http://www.pnas.org/content/111/32/11762>
39. Linster CL, Van Schaftingen E, Hanson AD. Metabolite damage and its repair or pre-emption. *Nature Chemical Biology* [Internet]. 2013 Feb [cited 2017 Feb 8];9(2):72–80. Available from: <http://www.nature.com/nchembio/journal/v9/n2/full/nchembio.1141.html>
40. Khanal A, Yu McLoughlin S, Kershner JP, Copley SD. Differential Effects of a Mutation on the Normal and Promiscuous Activities of Orthologs: Implications for Natural and Directed Evolution. *Molecular Biology and Evolution* [Internet]. 2015 Jan [cited 2017 Feb 8];32(1):100–8. Available from: <https://academic.oup.com/mbe/article/32/1/100/2925554/Differential-Effects-of-a-Mutation-on-the-Normal>
41. Ma H-M, Zhou Q, Tang Y-M, Zhang Z, Chen Y-S, He H-Y, et al. Unconventional Origin and Hybrid System for Construction of Pyrrolopyrrole Moiety in Kosinostatin Biosynthesis. *Chemistry & Biology* [Internet]. 2013 Jun [cited 2017 Feb 8];20(6):796–805. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074552113001701>
42. Adams NE, Thiaville JJ, Proestos J, Juárez-Vázquez AL, McCoy AJ, Barona-Gómez F, et al. Promiscuous and Adaptable Enzymes Fill “Holes” in the Tetrahydrofolate Pathway in Chlamydia Species. *mBio* [Internet]. 2014 Jul [cited 2017 Jan 31];5(4). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4161248/>
43. Soskine M, Tawfik DS. Mutational effects and the evolution of new protein functions. *Nature Reviews Genetics* [Internet]. 2010 Aug [cited 2017 Feb 9];11(8):572–82. Available from: <http://www.nature.com/nrg/journal/v11/n8/full/nrg2808.html>
44. Fondi M, Emiliani G, Liò P, Gribaldo S, Fani R. The evolution of histidine biosynthesis in archaea: Insights into the his genes structure and organization in LUCA. *Journal of Molecular Evolution*. 2009 Nov;69(5):512–26.
45. Merino E, Jensen RA, Yanofsky C. Evolution of bacterial trp operons and their

- regulation. Current opinion in microbiology [Internet]. 2008 Apr [cited 2017 Feb 10];11(2):78–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2387123/>
46. Verduzco-Castro EA, Michalska K, Endres M, Juárez-Vazquez AL, Noda-García L, Chang C, et al. Co-occurrence of analogous enzymes determines evolution of a novel $\beta\alpha_8$ -isomerase sub-family after non-conserved mutations in flexible loop. Biochemical Journal [Internet]. 2016 May;473(9):1141–52. Available from: <http://www.biochemj.org/content/473/9/1141>
47. Juárez-Vázquez AL, Edirisinghe JN, Verduzco-Castro EA, Michalska K, Wu C, Noda-García L, et al. Evolution of substrate specificity in a retained enzyme driven by gene loss. eLife [Internet]. [cited 2018 Jan 16];6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5404923/>
48. Halachev MR, Loman NJ, Pallen MJ. Calculating Orthologs in Bacteria and Archaea: A Divide and Conquer Approach. PLOS ONE [Internet]. 2011 Dec [cited 2016 Sep 16];6(12):e28388. Available from: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0028388>
49. Kislyuk AO, Haegeman B, Bergman NH, Weitz JS. Genomic fluidity: An integrative view of gene diversity within microbial populations. BMC Genomics [Internet]. 2011 [cited 2017 Jan 26];12:32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-12-32>
50. Noda-García L, Juárez-Vázquez AL, Ávila-Arcos MC, Verduzco-Castro EA, Montero-Morán G, Gaytán P, et al. Insights into the evolution of enzyme substrate promiscuity after the discovery of $\beta\alpha_8$ isomerase evolutionary intermediates from a diverse metagenome. BMC Evolutionary Biology [Internet]. 2015 Jun [cited 2017 Jan 31];15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4462073/>
51. Garcia-Seisdedos H, Ibarra-Molero B, Sanchez-Ruiz JM. Probing the Mutational Interplay between Primary and Promiscuous Protein Functions: A Computational-Experimental Approach. PLOS Computational Biology [Internet]. 2012 Jun [cited 2017 Feb 8];8(6):e1002558. Available from: <http://journals.plos.org/ploscompbiol/article?id=10.1371/journal.pcbi.1002558>
52. Nesvizhskii AI, Vitek O, Aebersold R. Analysis and validation of proteomic data generated by tandem mass spectrometry. Nature Methods [Internet]. 2007 Oct [cited 2017 Feb 9];4(10):787–97. Available from: <http://www.nature.com/nmeth/journal/v4/n10/abs/nmeth1088.html>
53. Medema MH, Fischbach MA. Computational approaches to natural product discovery. Nature Chemical Biology [Internet]. 2015 Sep [cited 2017 Jan 24];11(9):639–48. Available from: <http://www.nature.com/ncchembio/journal/v11/n9/full/ncchembio.1884.html>
54. Campbell I. Biophysical Techniques - Paperback - Iain D. Campbell - Oxford

- University Press. 2012.
55. Yang JY, Sanchez LM, Rath CM, Liu X, Boudreau PD, Bruns N, et al. Molecular Networking as a Dereplication Strategy. *Journal of Natural Products* [Internet]. 2013 Sep [cited 2017 Feb 9];76(9):1686–99. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/np400413s>
 56. Köcher T, Superti-Furga G. Mass spectrometry-based functional proteomics: From molecular machines to protein networks. *Nature Methods* [Internet]. 2007 Oct [cited 2017 Feb 10];4(10):807–15. Available from: <http://www.nature.com/nmeth/journal/v4/n10/full/nmeth1093.html>
 57. James LC, Tawfik DS. Conformational diversity and protein evolution – a 60-year-old hypothesis revisited. *Trends in Biochemical Sciences* [Internet]. 2003 Jul;28(7):361–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096800040300135X>
 58. Parisi G, Zea DJ, Monzon AM, Marino-Buslje C. Conformational diversity and the emergence of sequence signatures during evolution. *Current Opinion in Structural Biology* [Internet]. 2015 Jun [cited 2017 Feb 9];32:58–65. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S09594440X15000147>
 59. Javier Zea D, Miguel Monzon A, Fornasari MS, Marino-Buslje C, Parisi G. Protein Conformational Diversity Correlates with Evolutionary Rate. *Molecular Biology and Evolution* [Internet]. 2013 Jul;30(7):1500–3. Available from: <https://academic.oup.com/mbe/article/30/7/1500/972515/Protein-Conformational-Diversity-Correlates-with>
 60. Gatti-Lafranconi P, Hollfelder F. Flexibility and Reactivity in Promiscuous Enzymes. *ChemBioChem* [Internet]. 2013 Feb [cited 2017 Feb 8];14(3):285–92. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbic.201200628/abstract>
 61. Cruz-Morales P, Kopp JF, Martínez-Guerrero C, Yáñez-Guerra LA, Selem-Mojica N, Ramos-Aboites H, et al. Phylogenomic Analysis of Natural Products Biosynthetic Gene Clusters Allows Discovery of Arseno-Organic Metabolites in Model Streptomycetes. *Genome Biology and Evolution* [Internet]. 2016 Jun [cited 2017 Jan 24];8(6):1906–16. Available from: <http://gbe.oxfordjournals.org/content/8/6/1906>
 62. Li L, Stoeckert CJ, Roos DS. OrthoMCL: Identification of Ortholog Groups for Eukaryotic Genomes. *Genome Research* [Internet]. 2003 Sep [cited 2017 Feb 8];13(9):2178–89. Available from: <http://genome.cshlp.org/content/13/9/2178>
 63. Waterhouse RM, Tegenfeldt F, Li J, Zdobnov EM, Kriventseva EV. OrthoDB: A hierarchical catalog of animal, fungal and bacterial orthologs. *Nucleic Acids Research* [Internet]. 2013 Jan [cited 2017 Feb 9];41(D1):D358–65. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article/41/D1/D358/1060216/OrthoDB-a->

- hierarchical-catalog-of-animal-fungal
64. Gao B, Gupta RS. Phylogenetic Framework and Molecular Signatures for the Main Clades of the Phylum Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR* [Internet]. 2012 Mar [cited 2017 Feb 8];76(1):66–112. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3294427/>
 65. Sen A, Daubin V, Abrouk D, Gifford I, Berry AM, Normand P. Phylogeny of the class Actinobacteria revisited in the light of complete genomes. The orders “Frankiales” and Micrococcales should be split into coherent entities: Proposal of Frankiales ord. nov., Geodermatophilales ord. nov., Acidothermales ord. nov. and Nakamurellales ord. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [Internet]. 2014 [cited 2017 Feb 9];64(11):3821–32. Available from: <http://ijs.microbiologypublishing.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijs.0.063966-0>
 66. Zhou Z, Gu J, Li Y-Q, Wang Y. Genome plasticity and systems evolution in Streptomyces. *BMC Bioinformatics* [Internet]. 2012 [cited 2017 Feb 9];13(10):S8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-13-S10-S8>
 67. Kim J-N, Kim Y, Jeong Y, Roe J-H, Kim B-G, Cho B-K. Comparative Genomics Reveals the Core and Accessory Genomes of Streptomyces Species. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2015 Oct;25(10):1599–605.
 68. Zhao S, Kumar R, Sakai A, Vetting MW, Wood BM, Brown S, et al. Discovery of new enzymes and metabolic pathways by using structure and genome context. *Nature* [Internet]. 2013 Oct [cited 2017 Feb 9];502(7473):698–702. Available from: <http://www.nature.com/nature/journal/v502/n7473/full/nature12576.html>
 69. Hughes AL. The Evolution of Functionally Novel Proteins after Gene Duplication. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* [Internet]. 1994 May;256(1346):119–24. Available from: <http://rspb.royalsocietypublishing.org/content/256/1346/119>
 70. Divergent Evolution of Enzymatic Function: Mechanistically Diverse Superfamilies and Functionally Distinct Suprafamilies. *Annual Review of Biochemistry* [Internet]. 2001 [cited 2017 Feb 8];70(1):209–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.70.1.209>
 71. Huang R, Hippauf F, Rohrbeck D, Haustein M, Wenke K, Feike J, et al. Enzyme functional evolution through improved catalysis of ancestrally nonpreferred substrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [Internet]. 2012 Feb;109(8):2966–71. Available from: <http://www.pnas.org/content/109/8/2966>
 72. Schulz WL, Durant TJS, Siddon AJ, Torres R. Use of application containers and workflows for genomic data analysis. *Journal of Pathology Informatics* [Internet]. 2016 Dec [cited 2018 Oct 9];7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

- pmc/articles/PMC5248400/
73. Gruening B, Sallou O, Moreno P, Veiga Leprevost F da, Ménager H, Søndergaard D, et al. Recommendations for the packaging and containerizing of bioinformatics software. *F1000Research* [Internet]. 2018 Jun [cited 2018 Jun 27];7:742. Available from: <https://f1000research.com/articles/7-742/v1>
 74. Lamble HJ, Heyer NI, Bull SD, Hough DW, Danson MJ. Metabolic Pathway Promiscuity in the Archaeon *Sulfolobus solfataricus* Revealed by Studies on Glucose Dehydrogenase and 2-Keto-3-deoxygluconate Aldolase. *Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 2003 Sep [cited 2019 Jan 25];278(36):34066–72. Available from: <http://www.jbc.org/content/278/36/34066>
 75. Noda-Garcia L. Estudio de la evolución molecular de la función enzimática susando como modelo una enzima con características ancestrales [PhD thesis]. [Irapuato, GTO]: Langebio, CINVESTAV; 2012.
 76. Zhao S, Sakai A, Zhang X, Vetting MW, Kumar R, Hillerich B, et al. Prediction and characterization of enzymatic activities guided by sequence similarity and genome neighborhood networks. *eLife* [Internet]. 2014 Jun [cited 2017 Feb 9];3:e03275. Available from: <https://elifesciences.org/content/3/e03275v2>
 77. Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, et al. STRING v10: Protein–protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Research* [Internet]. 2015 Jan [cited 2017 Feb 9];43(D1):D447–52. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article/43/D1/D447/2435295/STRING-v10-protein-protein-interaction-networks>
 78. Segata N, Börnigen D, Morgan XC, Huttenhower C. PhyloPhlAn is a new method for improved phylogenetic and taxonomic placement of microbes. *Nature Communications* [Internet]. 2013 Aug [cited 2019 Jan 24];4:2304. Available from: <https://www.nature.com/articles/ncomms3304>
 79. Land M, Hauser L, Jun S-R, Nookaew I, Leuze MR, Ahn T-H, et al. Insights from 20 years of bacterial genome sequencing. *Functional & Integrative Genomics* [Internet]. 2015 [cited 2017 Jan 28];15(2):141–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4361730/>
 80. Koonin EV. The Turbulent Network Dynamics of Microbial Evolution and the Statistical Tree of Life. *Journal of Molecular Evolution* [Internet]. 2015 [cited 2017 Jan 28];80(5-6):244–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4472940/>
 81. Veen BE van der, Harris HM, O'Toole PW, Claesson MJ. Metaphor: Finding Bi-directional Best Hit homology relationships in (meta)genomic datasets. *Genomics* [Internet]. 2014 Dec [cited 2018 Jul 3];104(6, Part B):459–63. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0888754314002092>
 82. Caetano-Anollés G, Yafremava LS, Gee H, Caetano-Anollés D, Kim HS, Mit-

- tenthal JE. The origin and evolution of modern metabolism. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* [Internet]. 2009 Feb [cited 2018 Jul 3];41(2):285–97. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1357272508003373>
83. Schniete JK, Cruz-Morales P, Selem-Mojica N, Fernández-Martínez LT, Hunter IS, Barona-Gómez F, et al. Expanding Primary Metabolism Helps Generate the Metabolic Robustness To Facilitate Antibiotic Biosynthesis in Streptomyces. *mBio* [Internet]. 2018 Mar [cited 2018 Aug 10];9(1):e02283–17. Available from: <http://mbio.asm.org/content/9/1/e02283-17>
84. Alanjary M, Kronmiller B, Adamek M, Blin K, Weber T, Huson D, et al. The Antibiotic Resistant Target Seeker (ARTS), an exploration engine for antibiotic cluster prioritization and novel drug target discovery. *Nucleic Acids Research* [Internet]. 2017 Jul [cited 2018 Jan 16];45(W1):W42–8. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article/45/W1/W42/3787867>
85. Martínez-Núñez MA, Rodríguez-Escamilla Z, Rodríguez-Vázquez K, Pérez-Rueda E. Tracing the Repertoire of Promiscuous Enzymes along the Metabolic Pathways in Archaeal Organisms. *Life* [Internet]. 2017 Jul [cited 2019 Jan 24];7(3). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5617955/>
86. Charlesworth JC, Burns BP. Untapped Resources: Biotechnological Potential of Peptides and Secondary Metabolites in Archaea. *Archaea* [Internet]. 2015 Oct [cited 2016 Sep 27];2015:e282035. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/archaea/2015/282035/abs/>
87. Pearson H. Prehistoric proteins: Raising the dead. *Nature News* [Internet]. 2012 Mar [cited 2017 Feb 9];483(7390):390. Available from: <http://www.nature.com/news/prehistoric-proteins-raising-the-dead-1.10261>
88. Treangen TJ, Rocha EPC. Horizontal Transfer, Not Duplication, Drives the Expansion of Protein Families in Prokaryotes. *PLOS Genetics* [Internet]. 2011 Jan [cited 2017 Feb 9];7(1):e1001284. Available from: <http://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1001284>
89. Overbeek R, Fonstein M, D’Souza M, Pusch GD, Maltsev N. The use of gene clusters to infer functional coupling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [Internet]. 1999 Mar [cited 2017 Feb 9];96(6):2896–901. Available from: <http://www.pnas.org/content/96/6/2896>
90. Snel B, Lehmann G, Bork P, Huynen MA. STRING: A web-server to retrieve and display the repeatedly occurring neighbourhood of a gene. *Nucleic Acids Research* [Internet]. 2000 Sep [cited 2017 Feb 9];28(18):3442–4. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC110752/>
91. Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, et al. The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics* [Internet]. 2008 Feb [cited 2017 Feb 7];9:75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

- pmc/articles/PMC2265698/
92. Overbeek R, Olson R, Pusch GD, Olsen GJ, Davis JJ, Disz T, et al. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Research* [Internet]. 2014 Jan [cited 2017 Feb 7];42(Database issue):D206–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3965101/>
 93. Harvey AL, Edrada-Ebel R, Quinn RJ. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nature Reviews Drug Discovery* [Internet]. 2015 Feb [cited 2016 Sep 16];14(2):111–29. Available from: <http://www.nature.com/nrd/journal/v14/n2/full/nrd4510.html>
 94. Petrenko R, Meller J. Molecular Dynamics. In: eLS [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2001. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470015902.a0003048.pub2/abstract>
 95. Molecular Modeling of Proteins Andreas Kukol Springer [Internet]. [cited 2017 Feb 8]. Available from: <http://www.springer.com/us/book/9781588298645>
 96. Sikosek T, Chan HS. Biophysics of protein evolution and evolutionary protein biophysics. *Journal of The Royal Society Interface* [Internet]. 2014 Nov [cited 2017 Feb 9];11(100):20140419. Available from: <http://rsif.royalsocietypublishing.org/content/11/100/20140419>
 97. Edgar RC. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* [Internet]. 2004 [cited 2018 May 27];32(5):1792–7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC390337/>
 98. Castresana J. Selection of Conserved Blocks from Multiple Alignments for Their Use in Phylogenetic Analysis. *Molecular Biology and Evolution* [Internet]. 2000 Apr [cited 2018 Jul 3];17(4):540–52. Available from: <https://academic.oup.com/mbe/article/17/4/540/1127654>
 99. Junier T, Zdobnov EM. The Newick utilities: High-throughput phylogenetic tree processing in the Unix shell. *Bioinformatics* [Internet]. 2010 Jul [cited 2018 Jul 3];26(13):1669–70. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2887050/>
 100. Van Der Spoel D, Lindahl E, Hess B, Groenhof G, Mark AE, Berendsen HJC. GROMACS: Fast, flexible, and free. *Journal of Computational Chemistry* [Internet]. 2005 Dec [cited 2017 Feb 9];26(16):1701–18. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcc.20291/abstract>
 101. Odokonyero D, Sakai A, Patkovsky Y, Malashkevich VN, Fedorov AA, Bonanno JB, et al. Loss of quaternary structure is associated with rapid sequence divergence in the OSBS family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [Internet]. 2014 Jun [cited 2017 Feb 9];111(23):8535–40. Available

- from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4060685/>
102. Rodríguez-Orduña L. Microbioma del jitomate: Determinante en la infección por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* [PhD thesis]. [Irapuato, GTO]: Langebio, CINVESTAV; 2016.
103. Gutiérrez-García K, Bustos-Díaz ED, Corona-Gómez JA, Ramos-Aboites HE, Sélem-Mojica N, Cruz-Morales P, et al. Cycad Coralloid Roots Contain Bacterial Communities Including Cyanobacteria and *Caulobacter* spp. That Encode Niche-Specific Biosynthetic Gene Clusters. *Genome Biology and Evolution* [Internet]. 2019 Jan;11(1):319–34. Available from: <https://academic.oup.com/gbe/article/11/1/319/5238076>
104. Delgado-Suárez EJ, Sélem-Mojica N, Ortiz-López R, Gebreyes WA, Allard MW, Barona-Gómez F, et al. Whole genome sequencing reveals widespread distribution of typhoidal toxin genes and VirB/D4 plasmids in bovine-associated nontyphoidal *Salmonella*. *Scientific Reports* [Internet]. 2018 Jun;8(1):9864. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28169-4>
105. Woese CR, Fox GE. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [Internet]. 1977 Nov [cited 2017 Jan 23];74(11):5088–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC432104/>
106. Labeda DP, Dunlap CA, Rong X, Huang Y, Doroghazi JR, Ju K-S, et al. Phylogenetic relationships in the family Streptomycetaceae using multi-locus sequence analysis. *Antonie van Leeuwenhoek* [Internet]. 2017 Apr [cited 2019 Mar 13];110(4):563–83. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10482-016-0824-0>
107. Wattam AR, Abraham D, Dalay O, Disz TL, Driscoll T, Gabbard JL, et al. PATRIC, the bacterial bioinformatics database and analysis resource. *Nucleic Acids Research* [Internet]. 2014 Jan;42(Database issue):D581–91. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3965095/>
108. Contreras-Moreira B, Vinuesa P. GET_HOMOLOGUES, a Versatile Software Package for Scalable and Robust Microbial Pan-genome Analysis. *Applied and Environmental Microbiology* [Internet]. 2013 Dec;79(24):7696–701. Available from: <https://aem.asm.org/content/79/24/7696>
109. Chaudhari NM, Gupta VK, Dutta C. BPGA- an ultra-fast pan-genome analysis pipeline. *Scientific Reports* [Internet]. 2016 Apr [cited 2016 Dec 7];6:24373. Available from: <http://www.nature.com/srep/2016/160413/srep24373/full/srep24373.html>
110. Navarro-Muñoz J, Sélem-Mojica N, Mullowney M, Kautsar S, Tryon J, Parkinson E, et al. A computational framework for systematic exploration of biosynthetic diversity from large-scale genomic data. *bioRxiv* [Internet]. 2018 Oct;445270. Available

- from: <https://www.biorxiv.org/content/early/2018/10/17/445270>
111. Yasuhara-Bell J, Marrero G, Alvarez AM. Genes clvA, clvF and clvG are unique to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and highly conserved. European Journal of Plant Pathology [Internet]. 2014 Dec [cited 2019 Mar 13];140(4):655–64. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0495-5>
 112. Medema MH, Kottmann R, Yilmaz P, Cummings M, Biggins JB, Blin K, et al. Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster. Nature Chemical Biology [Internet]. 2015 Sep [cited 2017 Feb 12];11(9):625–31. Available from: <http://www.nature.com/nchembio/journal/v11/n9/full/nchembio.1890.html>
 113. Noda-Garcia L. Genómica funcional y evolutiva del metabolismo de *Streptomyces* [PhD thesis]. [Irapuato, GTO]: Langebio, CINVESTAV; 2013.
 114. Garcia Pichel F, Sherry ND, Castenholz RW. Evidence for an ultraviolet sunscreen role of the extra cellular pigment scytonemin in the terrestrial cyanobacterium *Chlorogloeopsis* sp. Photochemistry and Photobiology [Internet]. 1992 Jul;56(1):17–23. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1751-1097.1992.tb09596.x>
 115. Balskus EP, Walsh CT. Investigating the Initial Steps in the Biosynthesis of Cyanobacterial Sunscreen Scytonemin. Journal of the American Chemical Society [Internet]. 2008 Nov;130(46):15260–1. Available from: <https://doi.org/10.1021/ja807192u>
 116. Soule T, Palmer K, Gao Q, Potrafka RM, Stout V, Garcia-Pichel F. A comparative genomics approach to understanding the biosynthesis of the sunscreen scytonemin in cyanobacteria. BMC Genomics [Internet]. 2009 Jul [cited 2018 Jun 27];10:336. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2726228/>
 117. Engel PC. Glutamate Dehydrogenases: The Why and How of Coenzyme Specificity. Neurochemical Research [Internet]. 2014 Mar;39(3):426–32. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11064-013-1089-x>
 118. Liu Y, Li Y, Wang X. Acetohydroxyacid synthases: Evolution, structure, and function. Applied Microbiology and Biotechnology [Internet]. 2016 Oct;100(20):8633–49. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7809-9>
 119. Weber T, Blin K, Duddela S, Krug D, Kim HU, Bruccoleri R, et al. antiSMASH 3.0—a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. Nucleic Acids Research [Internet]. 2015 Jul [cited 2017 Feb 7];43(W1):W237–43. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article/43/W1/W237/2467910/antiSMASH-3-0-a-comprehensive-resource-for-the>
 120. Price MN, Dehal PS, Arkin AP. FastTree 2 – Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments. PLOS ONE [Internet]. 2010 Mar [cited 2018 Jul 3];5(3):e9490. Available from: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=>

- 10.1371/journal.pone.0009490
121. Argimón S, Abudahab K, Goater RJE, Fedosejev A, Bhai J, Glasner C, et al. Mi-croreact: Visualizing and sharing data for genomic epidemiology and phylogeography. *Microbial Genomics*. 2016 Nov;2(11).
122. Charlesworth JC, Burns BP. Untapped Resources: Biotechnological Potential of Peptides and Secondary Metabolites in Archaea. *Archaea* [Internet]. 2015 Oct [cited 2016 Sep 27];2015:e282035. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/archaea/2015/282035/abs/>
123. Jordan IK, Makarova KS, Spouge JL, Wolf YI, Koonin EV. Lineage-Specific Gene Expansions in Bacterial and Archaeal Genomes. *Genome Research* [Internet]. 2001 Apr;11(4):555–65. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC311027/>
124. Koonin EV, Wolf YI. Genomics of bacteria and archaea: The emerging dynamic view of the prokaryotic world. *Nucleic Acids Research* [Internet]. 2008 Dec [cited 2017 Jan 26];36(21):6688–719. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article/36/21/6688/2410005/Genomics-of-bacteria-and-archaea-the-emerging>
125. Kudo F, Kasama Y, Hirayama T, Eguchi T. Cloning of the Pactamycin Biosynthetic Gene Cluster and Characterization of a Crucial Glycosyltransferase Prior to a Unique Cyclopentane Ring Formation. *The Journal of Antibiotics* [Internet]. 2007 Aug;60(8):492–503. Available from: <https://www.nature.com/articles/ja200763>
126. Andersson JO, Roger AJ. Evolution of glutamate dehydrogenase genes: Evidence for lateral gene transfer within and between prokaryotes and eukaryotes. *BMC evolutionary biology*. 2003 Jun;3:14.
127. Lilley KS, Baker PJ, Linda Britton K, Stillman TJ, Brown PE, Moir AJG, et al. The partial amino acid sequence of the NAD⁻dependent glutamate dehydrogenase of Clostridium symbiosum: Implications for the evolution and structural basis of coenzyme specificity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* [Internet]. 1991 Nov;1080(3):191–7. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016748389190001G>
128. Consalvi V, Chiaraluce R, Politi L, Gambacorta A, Rosa MD, Scandurra R. Glutamate dehydrogenase from the thermoacidophilic archaebacterium Sulfolobus solfataricus. *European Journal of Biochemistry* [Internet]. 1991 Mar;196(2):459–67. Available from: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1432-1033.1991.tb15837.x>
129. Ferrer J, Pérez-Pomares F, Bonete MJ. NADP-glutamate dehydrogenase from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*: Enzyme purification, N-terminal

- sequence and stability. *FEMS microbiology letters*. 1996 Jul;141(1):59–63.
130. Tholl D. Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Current Opinion in Plant Biology* [Internet]. 2006 Jun;9(3):297–304. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369526606000537>
131. Balskus EP, Walsh CT. The genetic and molecular basis for sunscreen biosynthesis in cyanobacteria. *Science (New York, NY)* [Internet]. 2010 Sep;329(5999):1653–6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3116657/>
132. Hillwig ML, Fuhrman HA, Ittiamornkul K, Sevco TJ, Kwak DH, Liu X. Identification and Characterization of A Welwitindolinone Alkaloid Biosynthetic Gene Cluster in Stigonematalean Cyanobacterium Hapalosiphon welwitschii. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* [Internet]. 2014 Mar;15(5):665–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4382313/>
133. Li S, Lowell AN, Yu F, Raveh A, Newmister SA, Bair N, et al. Hapalindole/Ambiguine Biogenesis Is Mediated by a Cope Rearrangement, C–C Bond-Forming Cascade. *Journal of the American Chemical Society* [Internet]. 2015 Dec;137(49):15366–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4681624/>
134. Li S, Lowell AN, Newmister SA, Yu F, Williams RM, Sherman DH. Decoding cyclase-dependent assembly of hapalindole and fischerindole alkaloids. *Nature chemical biology* [Internet]. 2017 May;13(5):467–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5391265/>
135. Grant CS, Louda JW. Scytonemin-imine, a mahogany-colored UV/Vis sunscreen of cyanobacteria exposed to intense solar radiation. *Organic Geochemistry* [Internet]. 2013 Dec;65:29–36. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0146638013002179>
136. Cruz-Morales P, Ramos-Aboites HE, Licona-Cassani C, Selem-Mójica N, Mejía-Ponce PM, Souza-Saldívar V, et al. Actinobacteria phylogenomics, selective isolation from an iron oligotrophic environment and siderophore functional characterization, unveil new desferrioxamine traits. *FEMS Microbiology Ecology* [Internet]. 2017 Sep;93(9). Available from: <https://academic.oup.com/femsec/article/93/9/fix086/3934648>
137. McClure RA, Goering AW, Ju K-S, Baccile JA, Schroeder FC, Metcalf WW, et al. Elucidating the Rimosamide-Detoxin Natural Product Families and Their Biosynthesis Using Metabolite/Gene Cluster Correlations. *ACS Chemical Biology* [Internet]. 2016 Dec;11(12):3452–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/acscchembio.6b00779>
138. Pasek S, Risler J-L, Brézellec P. Gene fusion/fission is a major contributor to evolution of multi-domain bacterial proteins. *Bioinformatics* [Inter-

- net]. 2006 Jun;22(12):1418–23. Available from: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/22/12/1418/207642>
139. Fani R, Brilli M, Liò P. The Origin and Evolution of Operons: The Piecewise Building of the Proteobacterial Histidine Operon. *Journal of Molecular Evolution [Internet]*. 2005 Mar;60(3):378–90. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0198-1>
140. Fani R, Liò P, Chiarelli I, Bazzicalupo M. The evolution of the histidine biosynthetic genes in prokaryotes: A common ancestor for the hisA and hisF genes. *Journal of Molecular Evolution [Internet]*. 1994 May;38(5):489–95. Available from: <https://doi.org/10.1007/BF00178849>
141. Fani R, Tamburini E, Mori E, Lazcano A, Liò P, Barberio C, et al. Paralogous histidine biosynthetic genes: Evolutionary analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* HIS6 and HIS7 genes. *Gene [Internet]*. 1997 Sep;197(1):9–17. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378111997001467>
142. Merkl R, Sterner R. Reconstruction of ancestral enzymes. *Perspectives in Science [Internet]*. 2016 Dec;9:17–23. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213020916302336>
143. Moustafa A, Loram JE, Hackett JD, Anderson DM, Plumley FG, Bhattacharya D. Origin of Saxitoxin Biosynthetic Genes in Cyanobacteria. *PLOS ONE [Internet]*. 2009 Jun [cited 2016 Sep 16];4(6):e5758. Available from: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0005758>
144. Gao Y, Xu G, Wu P, Liu J, Cai Y-s, Deng Z, et al. Biosynthesis of 2*I*-Chloropentostatin and 2*I*-Amino-2*I*-Deoxyadenosine Highlights a Single Gene Cluster Responsible for Two Independent Pathways in *Actinomadura* sp. Strain ATCC 39365. *Applied and Environmental Microbiology [Internet]*. 2017 May;83(10). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5411499/>
145. Marks DS, Colwell LJ, Sheridan R, Hopf TA, Pagnani A, Zecchina R, et al. Protein 3D Structure Computed from Evolutionary Sequence Variation. *PLOS ONE [Internet]*. 2011 Dec;6(12):e28766. Available from: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0028766>
146. Kufareva I, Abagyan R. Methods of protein structure comparison. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ) [Internet]*. 2012;857:231–57. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4321859/>
147. Hopf TA, Green AG, Schubert B, Mersmann S, Schärfe CPI, Ingraham JB, et al. The EVcouplings Python framework for coevolutionary sequence analysis. *Bioinformatics [Internet]*. 2019 May;35(9):1582–4. Available from: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/35/9/1582/5124274>
148. Kuper J, Doenges C, Wilmanns M. Two fold repeated $(\beta\alpha)_4$ half barrels may provide a molecular tool for dual substrate specificity. *EMBO reports [Internet]*.

- 2005 Feb;6(2):134–9. Available from: <https://www.embopress.org/doi/abs/10.1038/sj.embor.7400330>
149. Due AV, Kuper J, Geerlof A, Kries JP von, Wilmanns M. Bisubstrate specificity in histidine/tryptophan biosynthesis isomerase from *Mycobacterium tuberculosis* by active site metamorphosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [Internet]. 2011 Mar [cited 2017 Jan 31];108(9):3554–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3048130/>
150. Reisinger B, Kuzmanovic N, Löffler P, Merkl R, König B, Sterner R. Exploiting Protein Symmetry To Design Light-Controllable Enzyme Inhibitors. *Angewandte Chemie International Edition* [Internet]. 2014 [cited 2017 Feb 3];53(2):595–8. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/anie.201307207/abstract>
151. Jeffryes JG, Colastani RL, Elbadawi-Sidhu M, Kind T, Niehaus TD, Broadbelt LJ, et al. MINEs: Open access databases of computationally predicted enzyme promiscuity products for untargeted metabolomics. *Journal of Cheminformatics* [Internet]. 2015 Dec [cited 2016 Sep 16];7(1). Available from: <http://www.jcheminf.com/content/7/1/44>
152. Angel E. Interactive computer graphics : A top-down approach with opengl. Boston, MA: Addison Wesley Longman; 2000.
153. Angel E. Batch-file computer graphics : A bottom-up approach with quicktime. Boston, MA: Wesley Addison Longman; 2001.
154. Angel E. Test second book by angel. Boston, MA: Wesley Addison Longman; 2001.