

La familia PriA

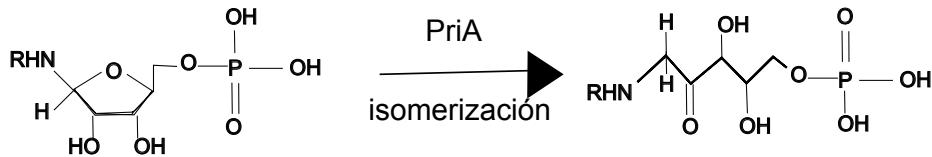


Figure 1: La reacción que cataliza PriA es una isomerización donde abre un anillo de cinco carbonos.

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 varios miembros de PriA han demostrado mediante cinéticas enzimáticas *in vitro*, su capacidad de catalizar tanto la reacción correspondiente a su homólogo HisA como la isomerización que cataliza TrpF. Como ya se explicó en la introducción TrpF es una reacción involucrada en la producción de triptofano. Es decir, se ha mostrado que en varias Actinobacterias PriA participa a la vez en las rutas de síntesis de histidina y triptofano. Los primeros miembros caracterizados como promiscuos en esta familia fueron *Streptomyces coelicolor* y *Mycobacterium tuberculosis* [@baronagomez_occurrence_2003] durante el año 2003.

La mayoría de las actinobacterias han perdido el gen *trpF* aunque 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 actuando análogamente a la función 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.

Además, en Actinobacteria PriA ha mostrado un gradiente funcional. Esta variación divide a la familia en varias subfamilias según su capacidad catalítica en los sustratos ProFAR y PRA. En la introducción mostramos datos que ejemplifican las subfamilias de PriA, incluyendo ejemplos 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 triptofano. 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* encontramos la subfamilia subTrpF que ha perdido la actividad de HisA.

En este capítulo en las siguientes secciones 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 PriA en sustratos diferentes de PRA y ProFAR o bien en combinaciones de los mismos.

PriA como modelo de familia enzimática donde las expansiones no son condición necesaria para la promiscuidad.

PriA en EvoMining

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 Actinobacteria, donde se sabe que PriA es promiscua no se detectaron copias extra. En la Figure 2 se muestra el número promedio de copias por genoma en los linajes genómicos seleccionados. 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. Esta observación demuestra 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.

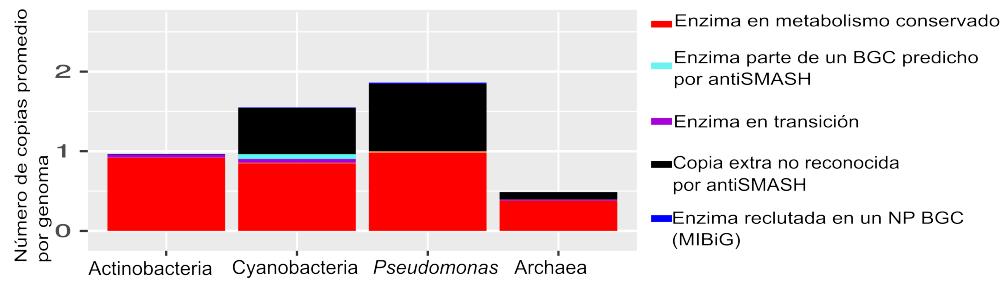


Figure 2: Número promedio de copias por genoma de PriA en Actinobacteria, Cyanobacteria, *Pseudomonas* y Archaea. Los colores muestran el destino metabólico asignado a cada copia según EvoMining. En rojo están las BBH a las enzimas semilla de metabolismo central. En morado las enzimas de metabolismo central también reconocidas por antiSMASH como parte de unBGC y en negro las copias sin un destino metabólico conocido.

Después del conteo de número de copias promedio, se analizaron los árboles de PriA de EvoMining, tanto los coloreados de acuerdo al número de copias, Figure 3, como los coloreados según el destino metabólico, Figure 4. En Actinobacteria la mayoría de las hojas son verdes reafirmando que existe sólo una copia por genoma en ese organismo. Sin embargo, existen varias hojas de color amarillo, indicando de dos copias en ese genoma. Las Actinobacterias con dos copias son *Ornithinimicrobium pekingense* DSM 21552, *Pseudonocardia* sp. P2, *Serinicoccus marinus* DSM 15273, *Serinicoccus profundi* MCCC 1A05965, *Sphaerotilus thermophilus* DSM 20745 y *Streptomyces* sp. CT34.

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, observamos que las copias extra tanto de Cyanobacteria como de *Pseudomonas* son en realidad miembros de otras familias enzimáticas, que guardan cierta similitud de secuencia con PriA. En Cyanobacteria y *Pseudomonas* la copia extra está en una rama divergente y muy poblada del árbol. En ambos casos esta segunda copia está en su mayoría anotada por RAST como imidazol glicerol fosfato sintasa ciclase. En Archaea sin embargo, diversas especies de la clase Methanomicrobia sí tienen dos copias de PriA.

Después de explorar cuáles organismos tienen expansiones de PriA, a continuación se muestra en la Figure 4 el posible destino metabólico de las copias extra de la familia. El árbol de Actinobacteria está poblado de hojas rojas Figure 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* mencionados previamente. Es posible que estas PriA puedan tener funciones alternativas. Además, en Actinobacteria la PriA de *Janibacter Hoiley*, 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 [@pasek_gene_2006]. De hecho, dentro del operón de histidina existen fusiones reportadas HisNB y HisIE con proteínas bifuncionales en ciertas proteobacterias [@fani_origin_2005]. 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

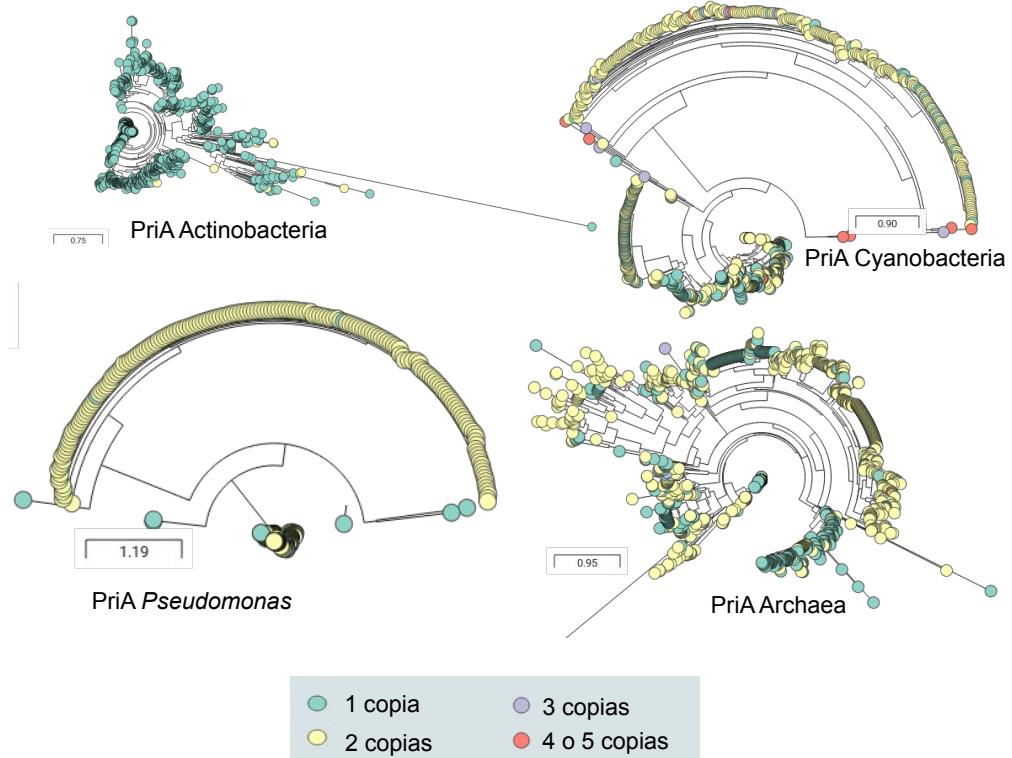


Figure 3: Número de copias de PriA en Actinobacteria, Cyanobacteria, Pseudomonas y Archaea. En Actinobacteria, donde se ha comprobado su promiscuidad enzimática la moda en el número de copias es uno (verde). En Cyanobacteria y Archaea se observa una mezcla de hojas verdes y hojas amarillas, donde las 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

disponibles para exploración interactiva en Microreact en los links de la Table 1:

Table 1: Árboles EvoMining de PriA en MicroReact

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

En Cyanobacteria hay pocas predicciones de EvoMining, lo que se muestra en escasas hojas verdes Figure 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 [@fani_evolution_1994,@fani_paralogous_1997]. 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 [@fondi_evolution_2009]. 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 [@merkl_reconstruction_2016]. 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 contiene también copias de HisF provenientes de genomas de *Sulfolobus*. Al verificar en el árbol interactivo en Microreact Table 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* [@fondi_evolution_2009]. 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.

Los reclutamientos conocidos, marcados en azul en el árbol, que tuvo la familia expandida PriA/HisA en estos linajes genómicos están listados en la tabla Figure . Entre ellos se encuentran dos toxinas de Cyanobacteria [@moustafa_origin_2009], un lipopolisacárido producido por una Proteobacteria y un BGC productor de cloro-pentostatina producido en Actinobacteria [@gao_biosynthesis_2017].

Table: Reclutamientos de expansiones de PriA en MIBiG

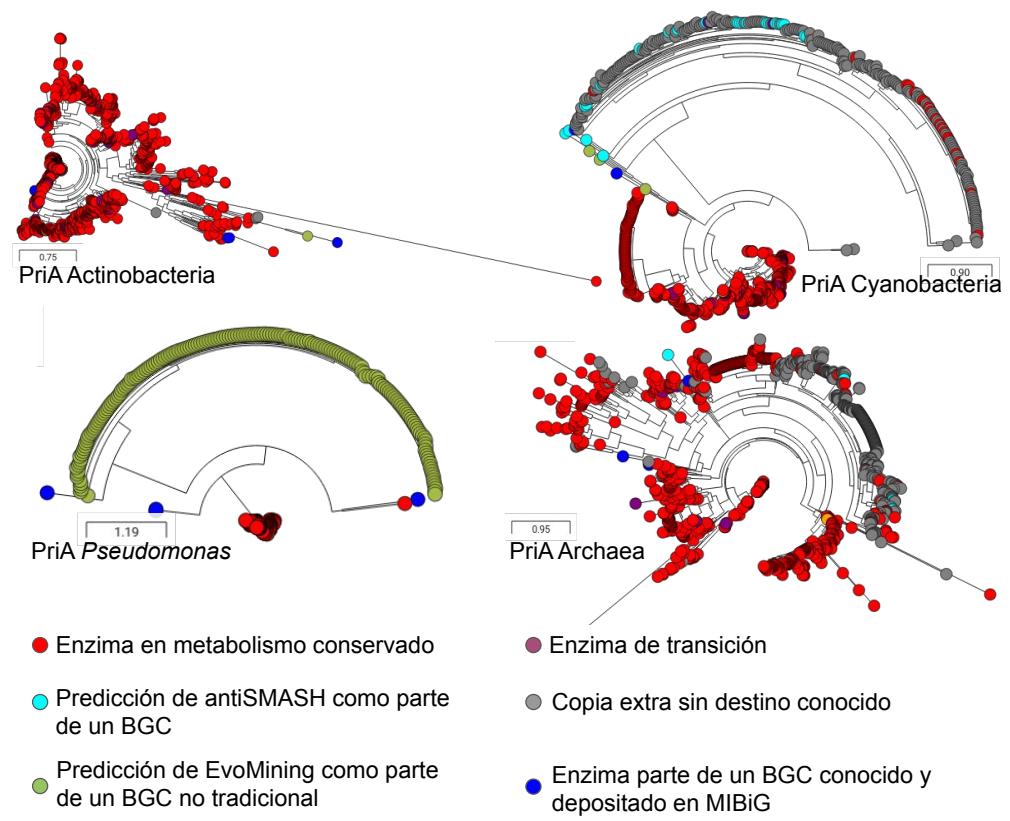


Figure 4: Árboles de destino metabólico de PriA en Actinobacteria, Cyanobacteria, Pseudomonas y Archaea según EvoMining

Compuesto	Organismo	BGC origen	Clase
ada	<i>Actinomadura</i> sp. ATCC 39365	Actinobacteria	Otros
saxitoxin	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> T3	Cyanobacteria	Alcaloide
toxin	<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 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.

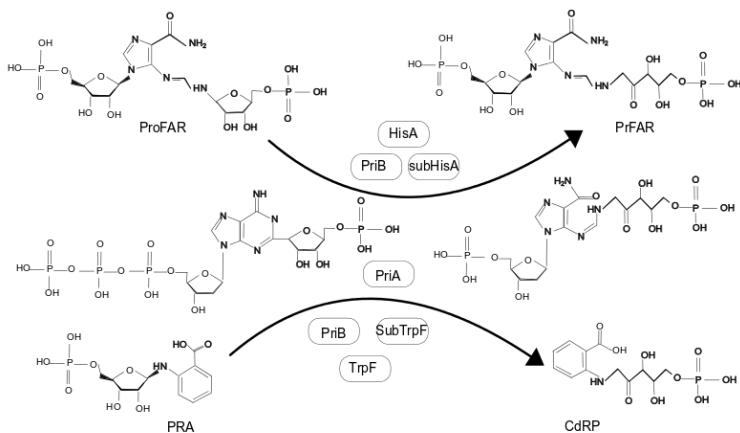


Figure 5: PriA participa en la síntesis del antibiótico ada en *Actinomadura*. Los sustratos nativos de PriA, ProFAR y PRA son isomerizados de manera muy similar a un paso en la ruta de síntesis de ada

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

Contextos genómicos de HisA en Actinobacteria

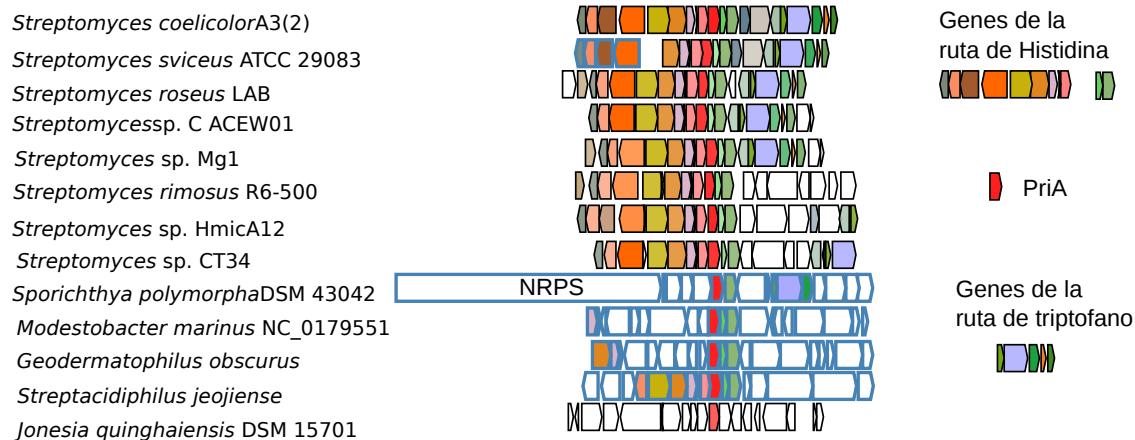


Figure 6: Contextos de PriA en Actinobacteria

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 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.

Contextos genómicos de HisA en Archaea

En cuanto al contexto de HisA en Archaea la Figure 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 el operón de histidina, el primero es la no existencia del operón, con los genes de síntesis 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 [@fondi_evolution_2009].

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 *Halototius 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

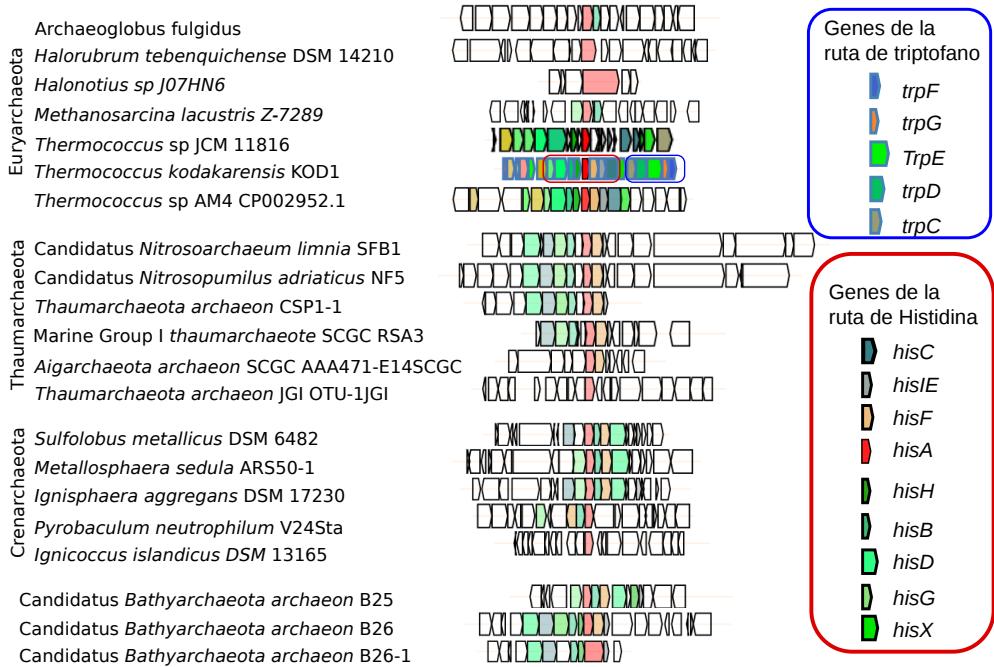


Figure 7: Contextos de PriA en Archaea

la Figure 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 *hisCEDFBBA*, 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 *Halorubrum tebenquichense DSM 14210* *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*.

No existe 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.

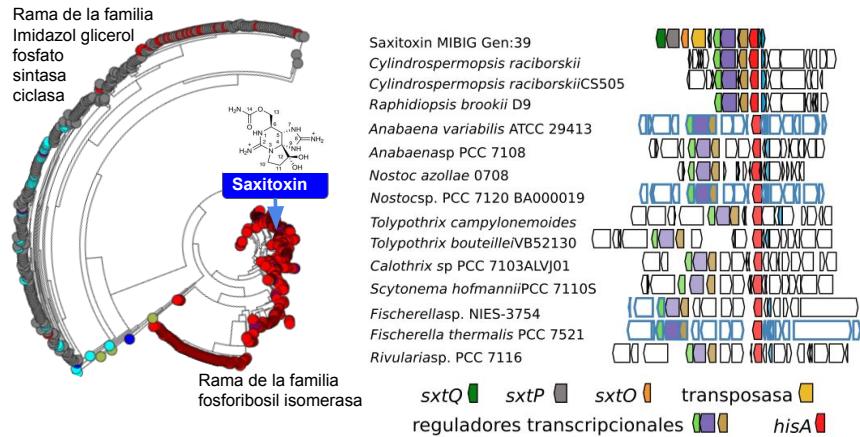


Figure 8: HisA en saxitoxin, un cluster de Cyanobacteria

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 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 saxitosina y más bien no participe en la síntesis de este compuesto o bien que mantenga su función primaria y a la ve tenga una función aún desconocida teniendo un papel en la regulación de la producción de saxitosina.

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.

Al transformar una subHisA en una PriA mediante mutaciones no se observó ninguna trayectoria creciente para ambos sustratos (darwiniana)

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 [@noda_tesis_2012]. 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 las rutas, 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 9.

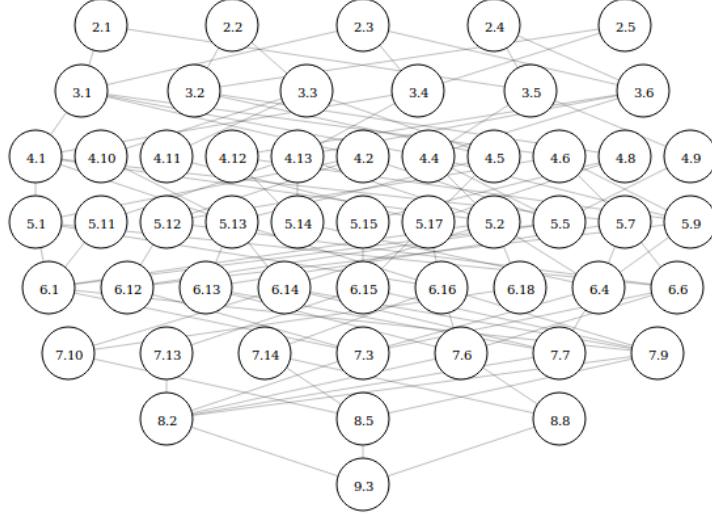


Figure 9: Rutas desde una subHisA hasta una variante con 9 mutaciones. En cada círculo el primer dígito indica el número de mutaciones

Al analizar los cambios sufridos en cada actividad en cada paso de cada ruta se descubrió que no existe en ellas una trayectoria no decreciente para ningún sustrato. Como ejemplo, en la Figure 9 se muestran las rutas donde cada mutante mantiene un nivel mínimo de actividad de ProFAR isomerasa ($\frac{K_{cat}}{K_m} P_{riA} P_{roFAR} \geq .004$). 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.

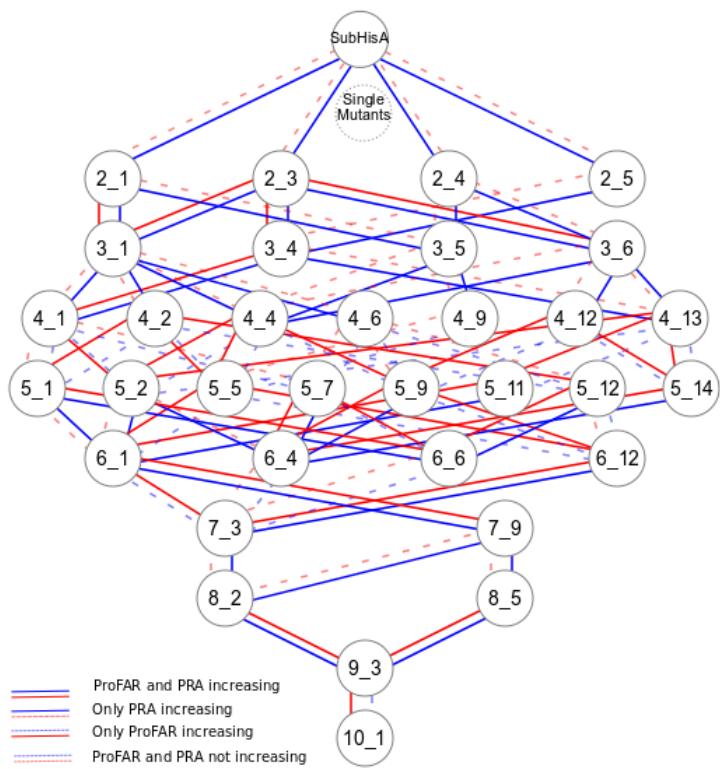


Figure 10: Rutas de evolución dirigida para ganar la función PRA. En la figura se muestra como la mayoría de los pasos que incrementan una función hacer decrecer la capacidad catalítica de la otra.

Los residuos que covariarían 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 [@marks_protein_2011]. En esta sección se aplicará EVcouplings para reconstruir la estructura tridimensional de PriA. El RMSD es una técnica usual de comparación de estructuras.

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 [@kufareva_methods_2012]. La información comprendida en las covariaciones ha sido suficiente en distintas proteínas para que el método EVcouplings genere estructuras con un error de 2.7–4.8 Å respecto a la estructura cristalográfica conocida [@marks_protein_2011]. 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* [@hopf_evcouplings_2019] 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 cristalografía [@kuiper_twofold_2005]. En esta tesis calculé que el RMSD entre PriA (1VZW) y su homólogo lejano HisF (2A0N proveniente de *Thermotoga maritima*) es de 7.34 Å. 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 sviceus ATCC 29083* con identificador de PDB 4TX9. Además, las estructuras cristalográficas tienen una resolución de 1-3 Å como puede verse en la Table 3, 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 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.

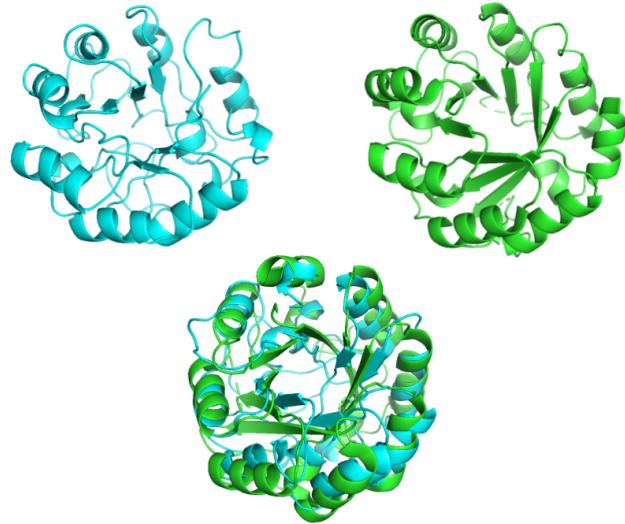


Figure 11: Comparación de estructura tridimensional de PriA generada por EVcouplings con una estructura cristalográfica de *Streptomyces coelicolor*. En azul se muestra la estructura generada considerando acoplamientos de los aminoácidos de PriA según el registro evolutivo. En verde está la estructura 1vzw obtenida experimentalmente. En la parte inferior de la figura se muestran las dos estructuras alineadas. Su RMSD es de 3.362 Å

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 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.

Table 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

<i>Corynebacterium</i>	<i>Streptomyces</i>	Acoplamiento más relevante
T139L	136L	151T
Y214L	211Y	-
E230A	227A	234E

Una forma gráfica de ver esta tabla es la Figure 12. En las líneas naranjas se muestra como 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. Además se investigaron los aminoácidos catalíticos D130 [due_bisubstrate_2011] y D175 reportados en *Mycobacterium tuberculosis*[verduzco-castro_co-occurrence_2016] que corresponden a en *S coelicolor* D11, D131 y D171. En este trabajo se econtró que existe un conjunto de secuencias donde estos posiciones tienen variación en dichos residuos Figure 13. Las secuencias más relevantes de PriA/HisA abordadas en este capítulo junto con secuencias seleccionadas divergentes en los residuos mencionados fueron alineadas para mostrar la diversidad a nivel aminoácidos de la familias PriA/HisA.

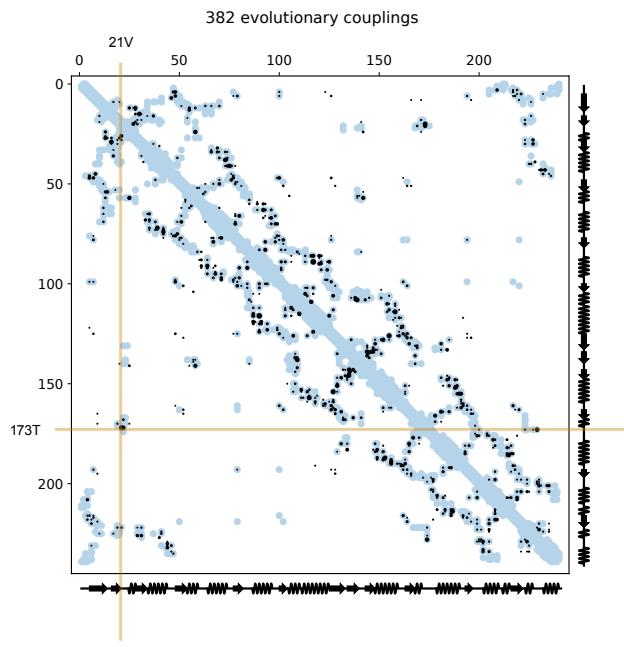


Figure 12: Visualización de los acoplamientos en la familia PriA

Secuencias fuera del phylum Actinobacteria, como *Pseudomonas*, Cyanobacteria, Enterobacteria, Proteobacteria y Chloroflexi muestran variantes del residuo 131D. Sin embargo, en Actinobacteria se encontraron 159 *Corynebacterium*, 49 *Streptomyces* y 2 *Actinomycetospora* sin 131D. Entre los *Streptomyces* está el ya mencionado *Streptomyces* CT 34 y *Streptomyces rimosus*. En *Corynebacterium* se encuentra localizada la familia subHisA y en *Streptomyces* la familia PriB, la variabilidad mostrada en estos géneros podría estar relacionada con la existencia de estas familias. A futuro, para obtener resultados exclusivos sobre la covariación de residuos en Actinobacteria, se debe proveer un alineamiento exclusivo de Actinobacteria.

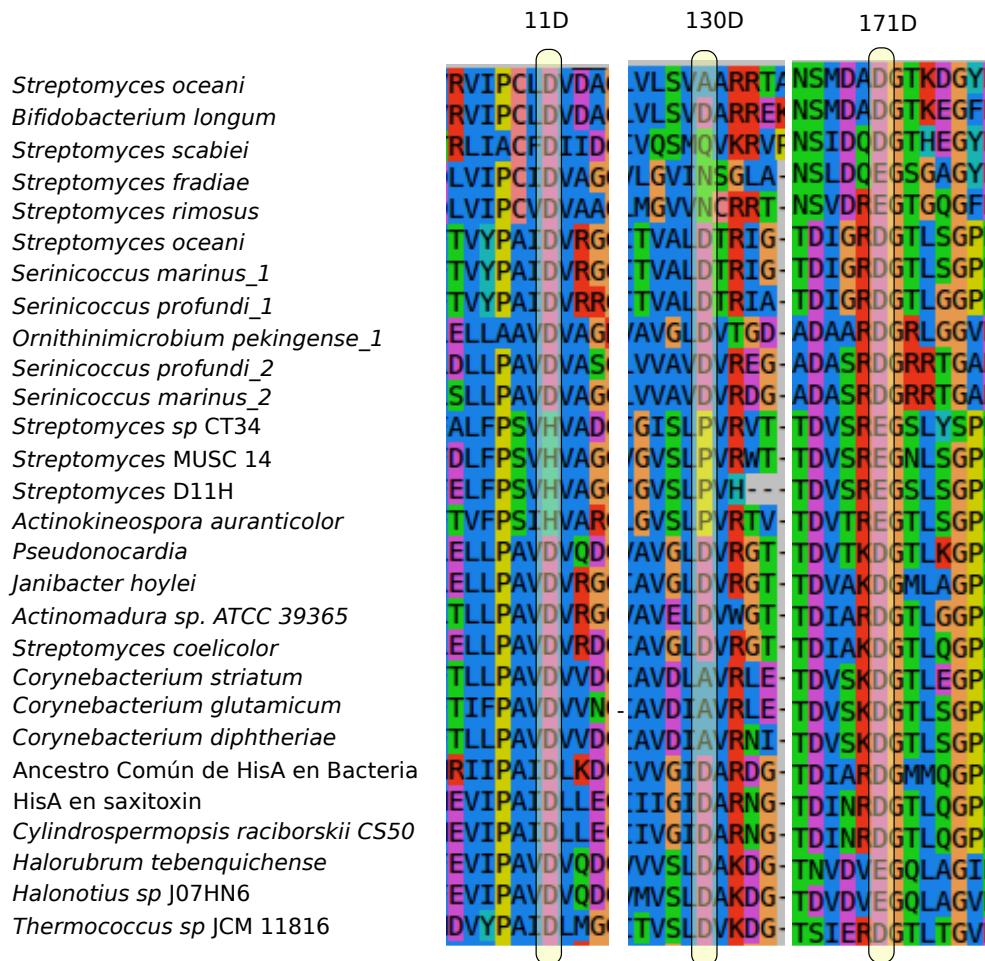


Figure 13: Miembros de PriA que poseen variantes los residuos catalíticos D11, D130

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. Como se vio en la sección de EvoMining de este capítulo, PriA parece participar en la síntesis del antibiótico pentostaina *ada*. Tomando este ejemplo como inspiración, se colectaron en la literatura sustratos químicamente parecidos a ProFAR y PRA Figure 15, Figure 16, Figure 17, Figure 18. Así pues, esta sección buscará mostrar sustratos parecidos a los nativos de PriA para posteriormente probar alguno en copias selectas de PriA provenientes de diversos organismos.

Se seleccionaron veinte sustratos para realizar docking entre ellos y las estructuras de las secuencias de PriA S1, S2, ... S20 sustratos fueron recolectados de la literatura y las predicciones de la químicoinformática. S3 PRA y S7 PROFAR son sustratos nativos, S13-S16 son sustratos activados por la luz, S17 PRAP, S18 Compuesto V, se encontraron en la literatura, S6 GMP, S11 GTP y otros fueron sugeridos por chemoinformatics. Para tener una idea de la diversidad de estos sustratos, se realizó entre ellos, un cálculo de distancias de Tanimoto.

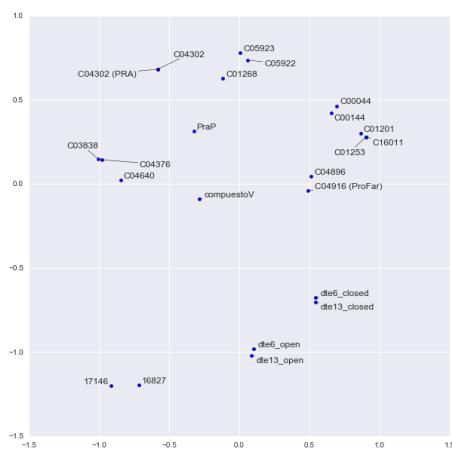
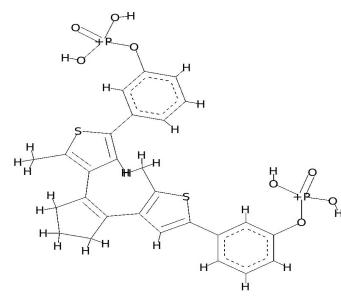
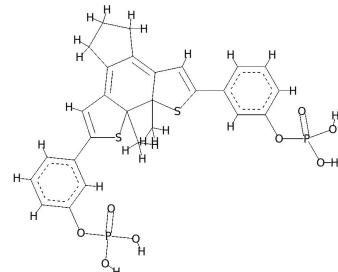


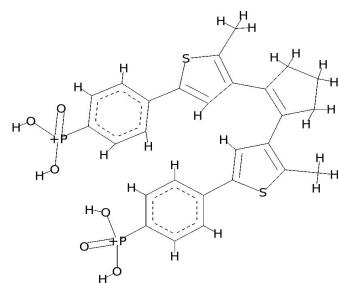
Figure 14: Clustering de sustratos de acuerdo a sus distancias de Tanimoto



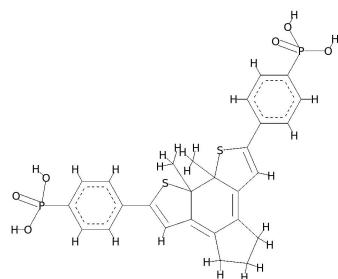
13
DTE-meta-phosphate(dte6_Open form)



14
DTE-meta-phosphate(dte6_Closed form)



15
DTE-Para-Phosphonate(dte13_closed form)



16
DTE-para-phosphonate(dte13_closed form)

Figure 15: Substatos químicamente similares a los sustratos de PriA (parte 1)

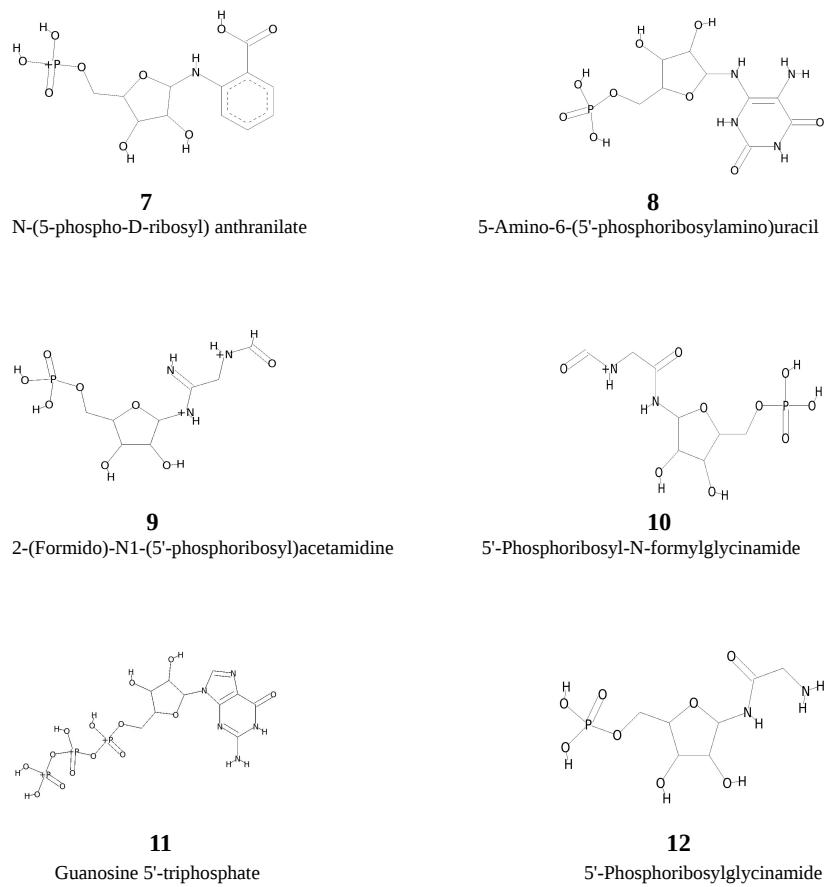
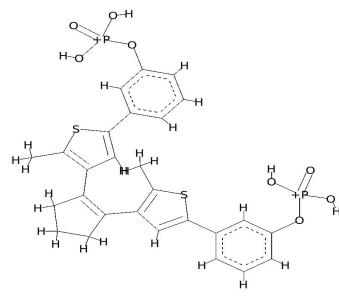
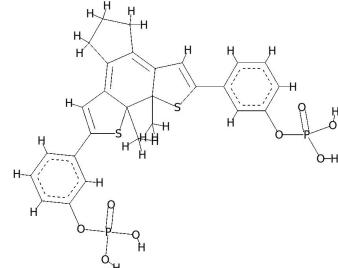


Figure 16: Substatos químicamente similares a los sustratos de PriA (parte 2)



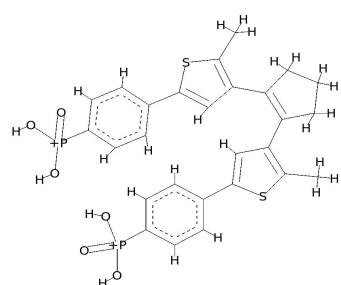
13

DTE-meta-phosphate(dte6_Open form)



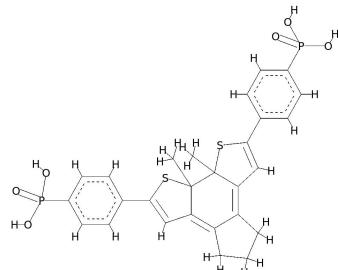
14

DTE-meta-phosphate(dte6_Closed form)



15

DTE-Para-Phosphonate(dte13_Closed form)



16

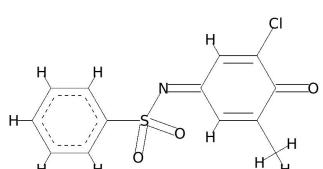
DTE-para-phosphonate(dte13_Closed form)

Figure 17: Substatos químicamente similares a los sustratos de PriA (parte 3)

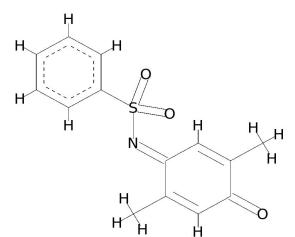


17
4N'-(5'-phosphoribosyl) 4-aminopyrrole
-2-carboxilate

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

Figure 18: Substatos químicamente similares a los sustratos de PriA (parte 4)

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

Seleccioné 39 secuencias de la familia PriA para en colaboración con el grupo del Dr Carillo-Trip realizar el análisis bioinformático de acoplamiento enzima-sustrato. entre ellas varios *Streptomyces* dado que en ese género existen al menos dos familias, PriA y PriB. Estas secuencias seleccionadas de PriA / PriB están uniformemente distribuidas en un árbol de especies de *Streptomyces* basado en la proteína RpoB. Estos *Streptomyces* tienen variedad en cuanto a la presencia / ausencia de TrpF. En esta sección se incluyeron otros homólogos de PriA de Actinobacteria caracterizados químicamente, finalmente se agregaron secuencias de HisA de *Escherichia coli*, *Arthrobacter Aurescens*, *Salmonella enterica* y *Acidimicrobium ferrooxidans* y para TrpF *Jonesia denitrificans* y *Streptomyces sp Mg1* como controles.

Cuando existían estructuras cristalográficas se utilizó esa estructura, de lo contrario, se generaron estructuras homólogas utilizando como plantilla la estructura de la enzima más cercana que contara estructura de cristalográfica. Los organismos que cuentan con estructura cristalográfica de alguna familia relacionada a PriA están descritos en la Table 3. Entre ellos están ejemplos de la familia HisA de Enterobacteria como *Salmonella enterica* (PDB:5A-) y *Thermotoga maritima* (2W79, 1QO2). Los representantes de TrpF son las Actinobacterias *Jonesia denitrificans* y *Streptomyces sp Mg1*. Entre las Actinobacterias caracterizadas con estructura cristalográfica de PriA están *Mycobacterium tuberculosis* (Mtub PDB:2Y88,2Y89,2Y85,3ZS4), *Streptomyces coelicolor* (Scoe PDB:2VEP,2X30,1VZW), *Streptomyces globisporus*, *Actinomyces urogenitalis* (4X2R) y *Corynebacterium jeikeum*. De la familia subHisA se muestran *Corynebacterium efficiens* y *Actinomyces urogenitalis* (PDB:4X2R). Las estructuras cristalográficas disponibles de PriB provienen de *Streptomyces ipomoeae*, *Streptomyces sviceus* (PDB:4U28,4TX9). La estructura que representa a subTrpF es la de *Arthrobacter aurescens* (PDB:4WD0) y finalmente, las estructuras de TrpF corresponden al las de los organismos *Jonesia denitrificans* (PDB:4WUI) *Chlamidya trachomatis*, *Streptomyces sp. Mg1* y *Actinomyces odontolyticus*.

A continuación se muestra una tabla con las estructuras cristalográficas disponibles de PriA y familias relacionadas.

Table 3: 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. Mg1</i>	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. Mg1</i>	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

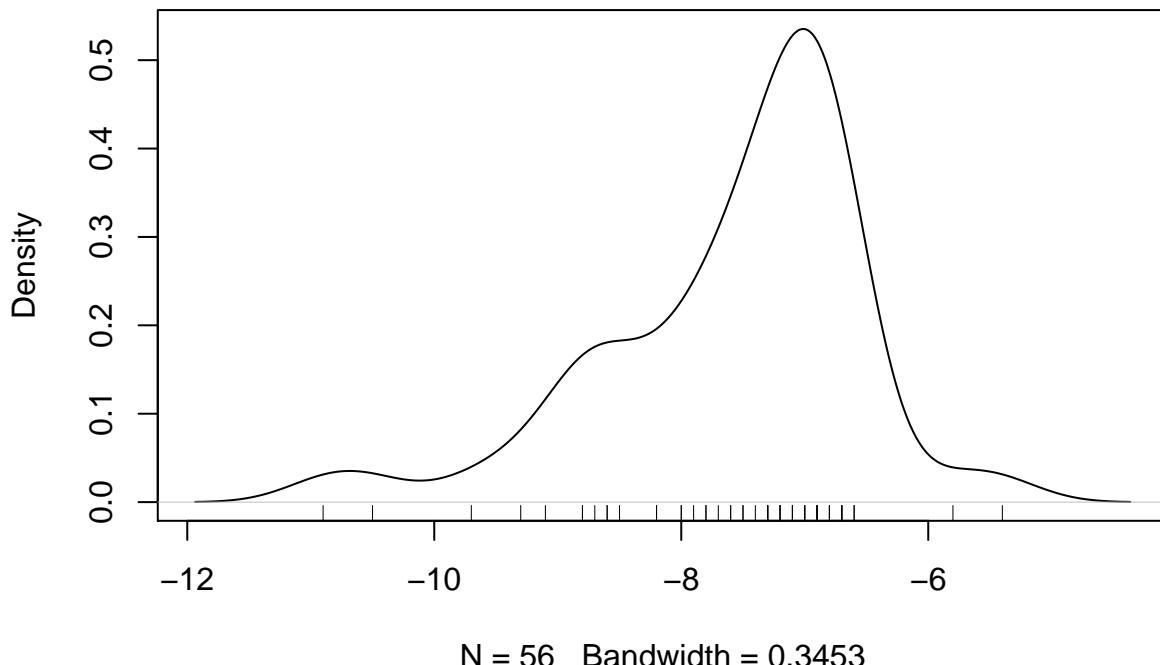
Organismo	PDB	Familia	Resolución Å	Fecha
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	2Y89	PriA	2.5	2011
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	3ZS4	PriA	1.9	2012
<i>Actinomyces urogenitalis</i>	4X2R	SubHisA	1.05	2014
<i>Corynebacterium efficiens</i>	4AXK	SubHisA	2.25	2013
<i>Thermococcus kodakaraensis</i>	5LHE	TrpF	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

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

Con las enzimas seleccionadas de PriA se realizaron simulaciones de docking. Se incluyeron también como controles enzimas TrpF provenientes de *Streptomyces Mg1*, *Jonesia denitrificans*. Los procedimientos pueden ser consultados en Docking Protocols. Como resultado podemos ver Figure 19 que el GTP es el que tiene mayor afinidad.

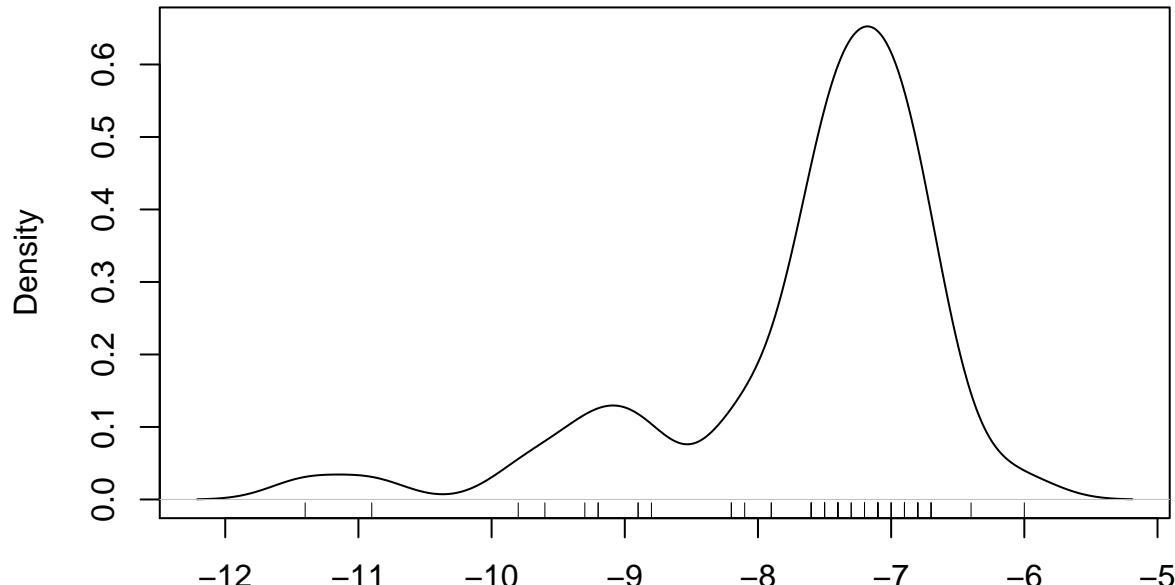
```
## Called from: eval(expr, envir, enclos)    ## debug en <text>#4: plot(density(docking[, i], na.rm = T))
```

```
density.default(x = docking[, i], na.rm = T)
```



```
## debug en <text>#4: rug(docking[, i])    ## debug en <text>#4: browser()    ## debug en <text>#4: plot(density(docking[, i], na.rm = T))
```

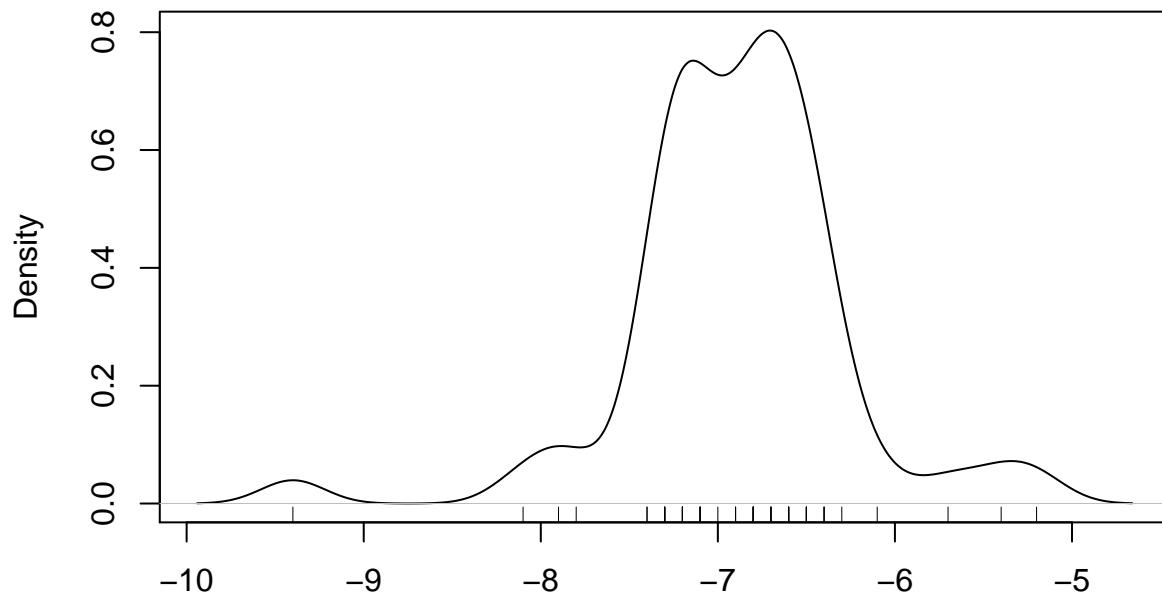
```
density.default(x = docking[, i], na.rm = T)
```



N = 56 Bandwidth = 0.2702

```
## debug en <text>#4: rug(docking[, i]) ## debug en <text>#4: browser() ## debug en
<text>#4: plot(density(docking[, i], na.rm = T))
```

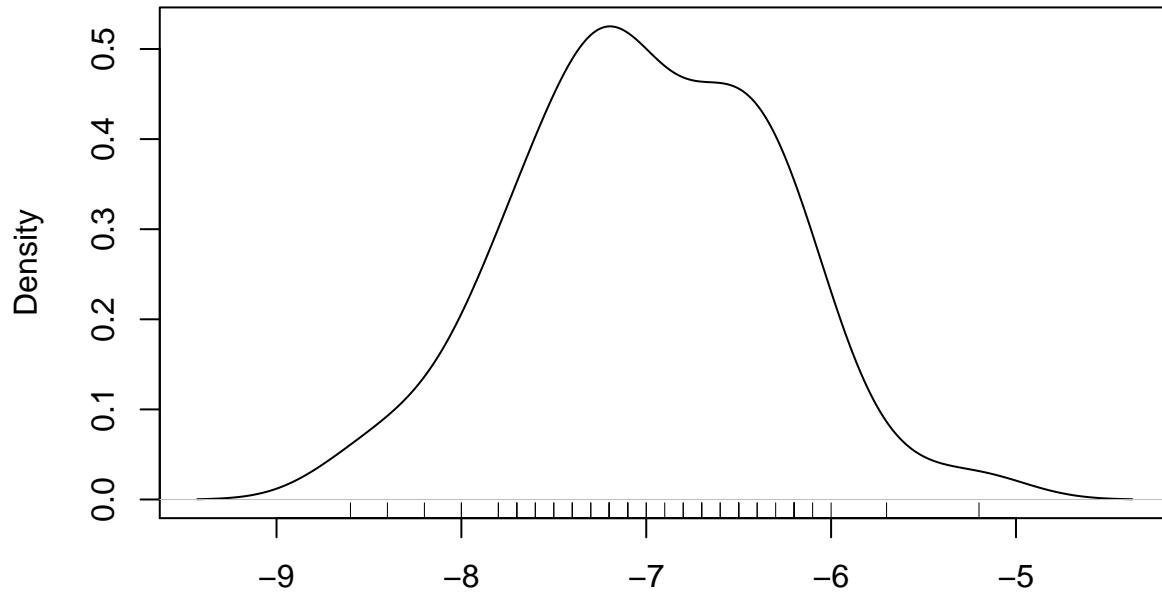
```
density.default(x = docking[, i], na.rm = T)
```



N = 56 Bandwidth = 0.1802

```
## debug en <text>#4: rug(docking[, i]) ## debug en <text>#4: browser() ## debug en
<text>#4: plot(density(docking[, i], na.rm = T))
```

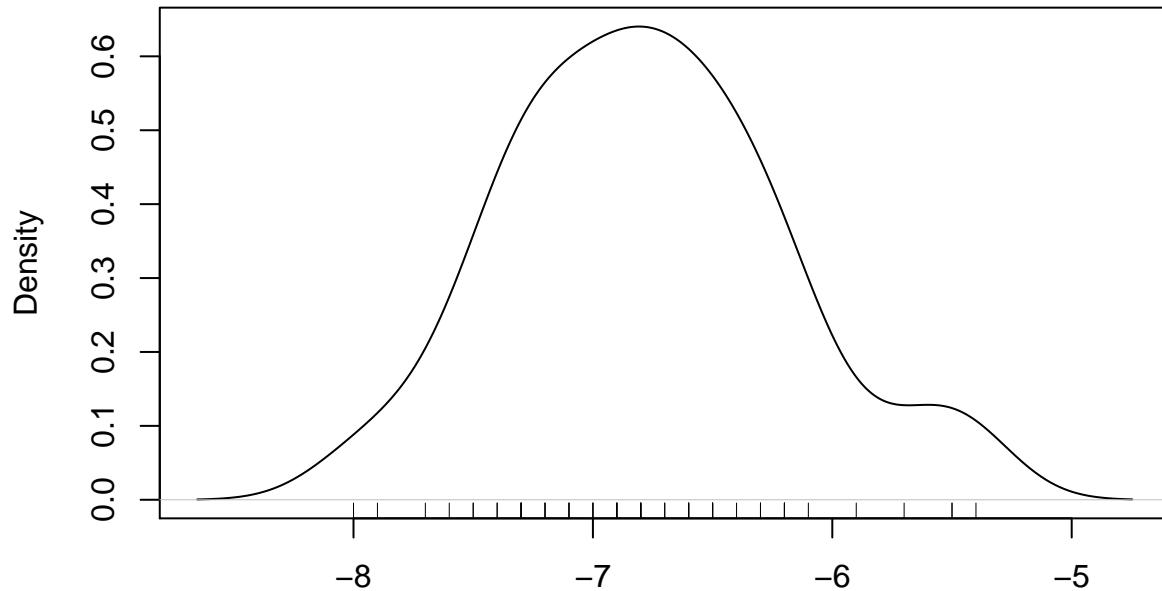
```
density.default(x = docking[, i], na.rm = T)
```



N = 56 Bandwidth = 0.2764

```
## debug en <text>#4: rug(docking[, i]) ## debug en <text>#4: browser() ## debug en
<text>#4: plot(density(docking[, i], na.rm = T))
```

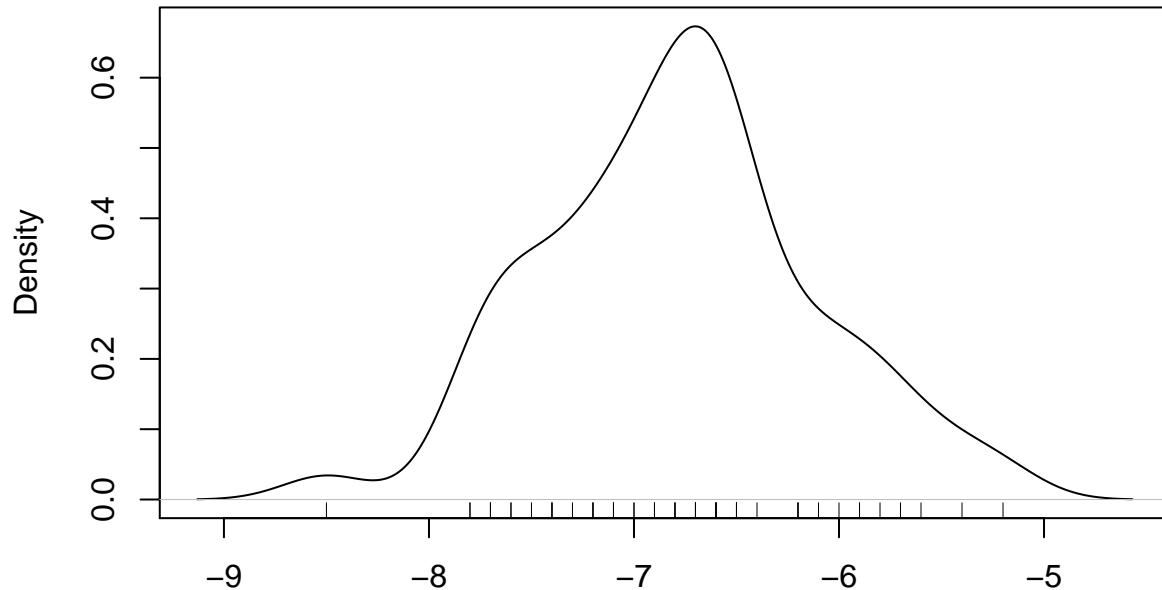
```
density.default(x = docking[, i], na.rm = T)
```



N = 56 Bandwidth = 0.2177

```
## debug en <text>#4: rug(docking[, i]) ## debug en <text>#4: browser() ## debug en
<text>#4: plot(density(docking[, i], na.rm = T))
```

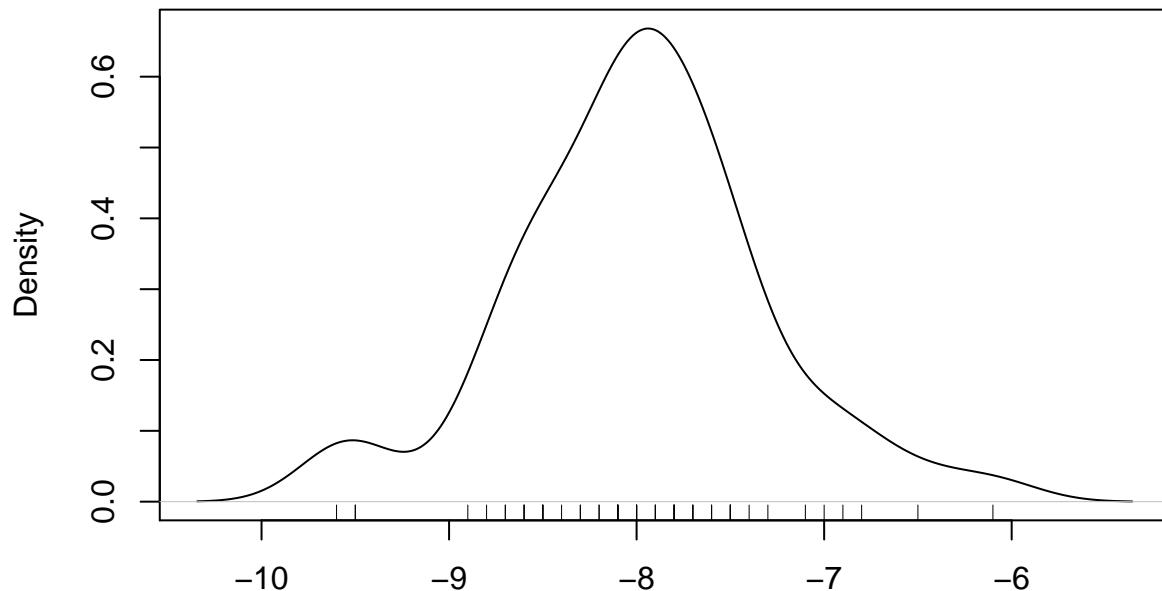
```
density.default(x = docking[, i], na.rm = T)
```



N = 56 Bandwidth = 0.2102

```
## debug en <text>#4: rug(docking[, i]) ## debug en <text>#4: browser() ## debug en
<text>#4: plot(density(docking[, i], na.rm = T))
```

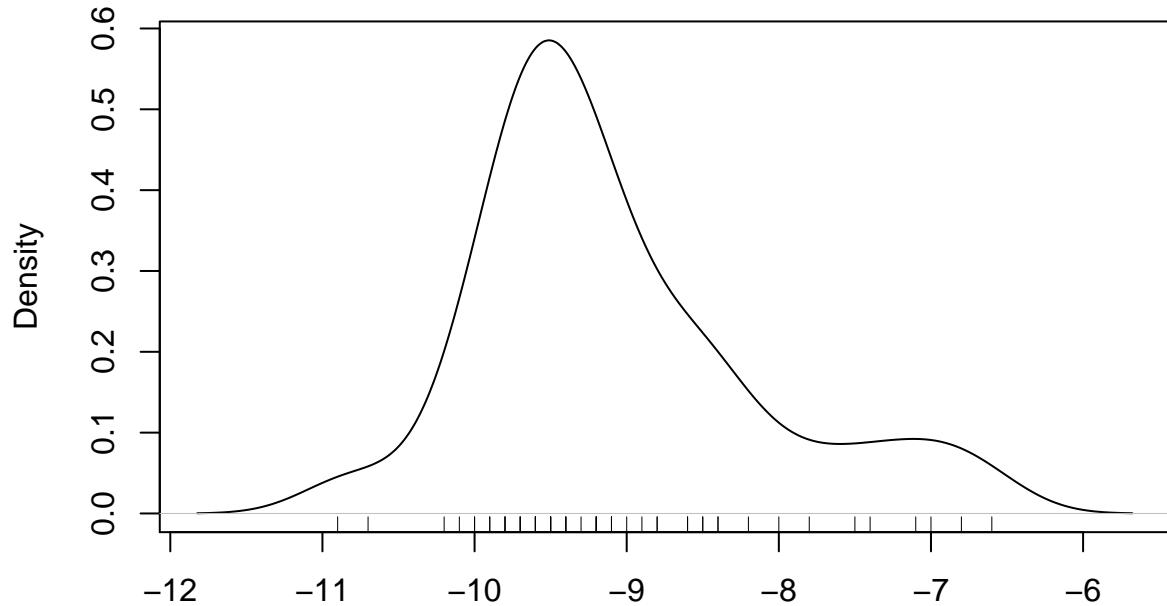
```
density.default(x = docking[, i], na.rm = T)
```



N = 56 Bandwidth = 0.2477

```
## debug en <text>#4: rug(docking[, i]) ## debug en <text>#4: browser() ## debug en
<text>#4: plot(density(docking[, i], na.rm = T))
```

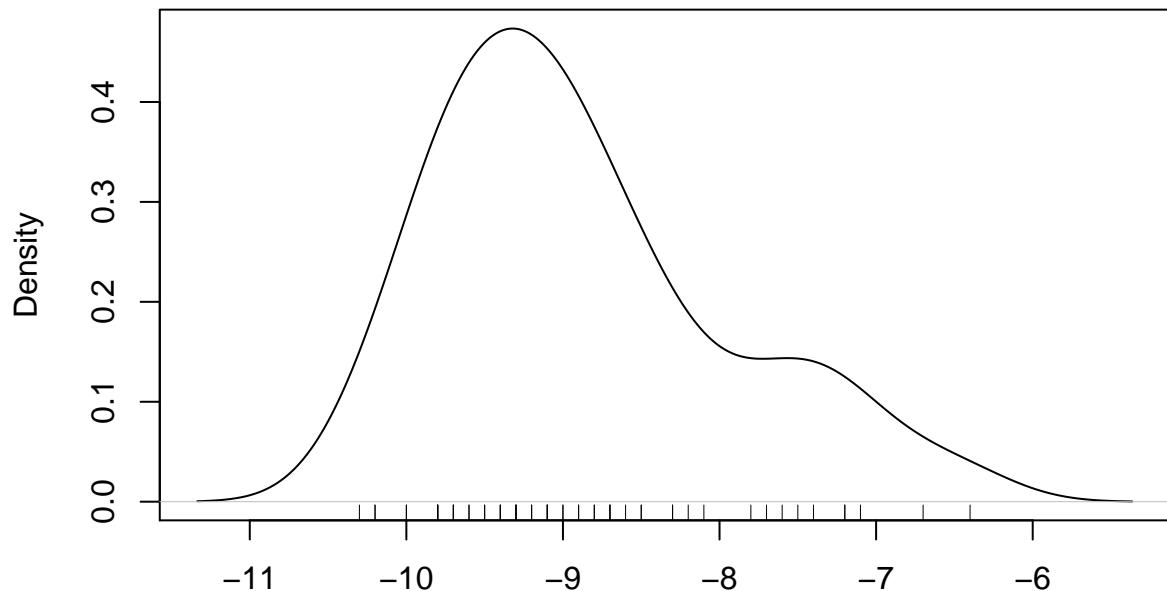
density.default(x = docking[, i], na.rm = T)



N = 56 Bandwidth = 0.3078

```
## debug en <text>#4: rug(docking[, i]) ## debug en <text>#4: browser() ## debug en
<text>#4: plot(density(docking[, i], na.rm = T))
```

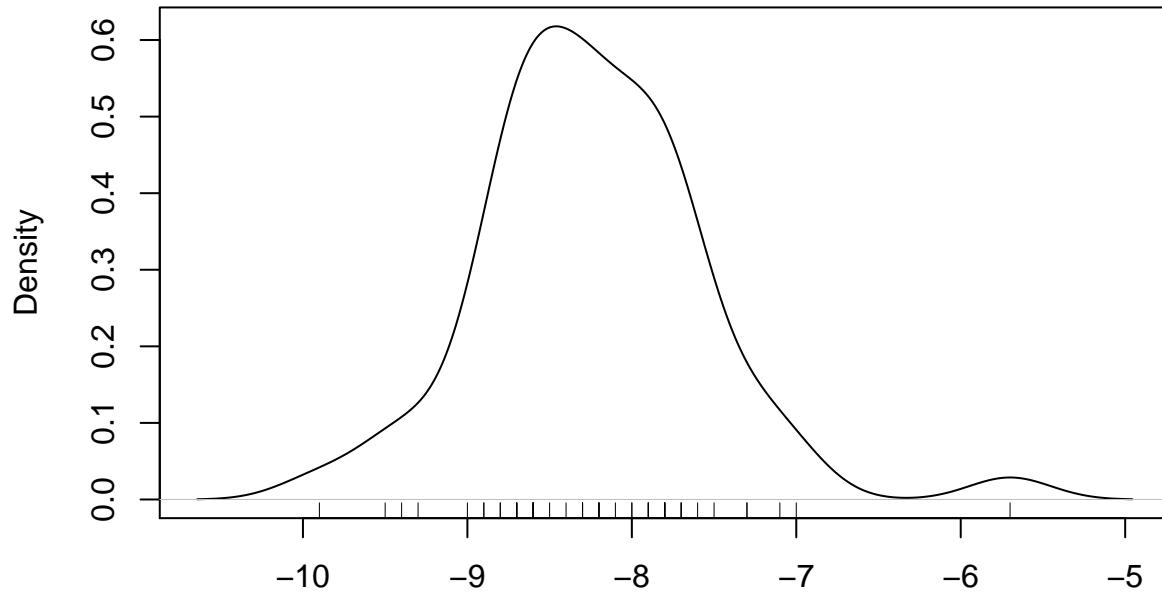
density.default(x = docking[, i], na.rm = T)



N = 56 Bandwidth = 0.3453

```
## debug en <text>#4: rug(docking[, i]) ## debug en <text>#4: browser() ## debug en
<text>#4: plot(density(docking[, i], na.rm = T))
```

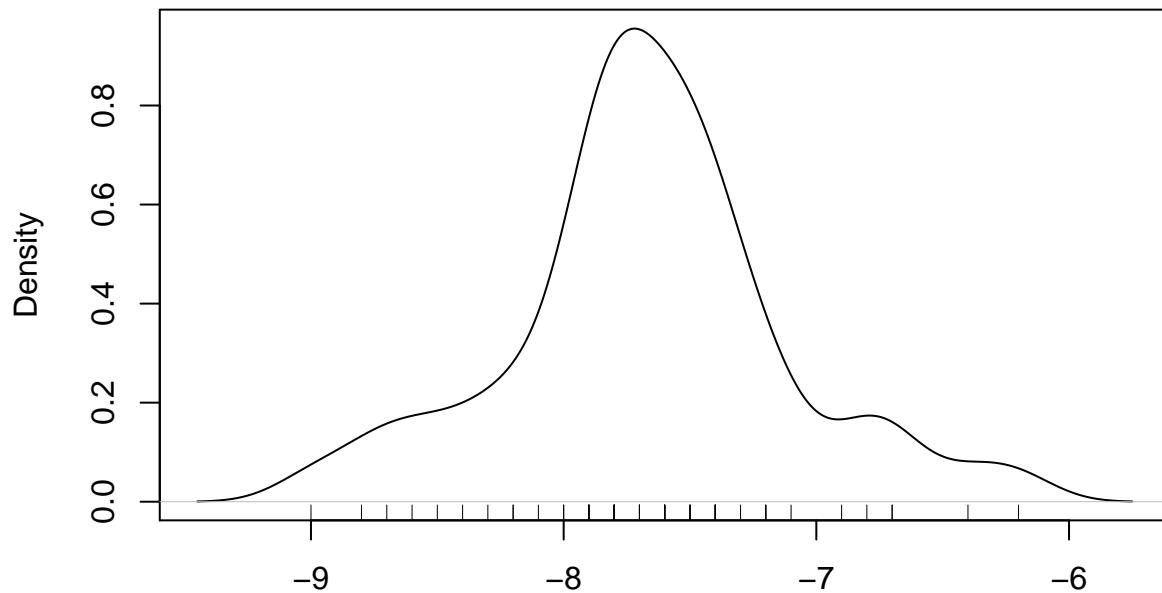
```
density.default(x = docking[, i], na.rm = T)
```



N = 56 Bandwidth = 0.2477

```
## debug en <text>#4: rug(docking[, i]) ## debug en <text>#4: browser() ## debug en
<text>#4: plot(density(docking[, i], na.rm = T))
```

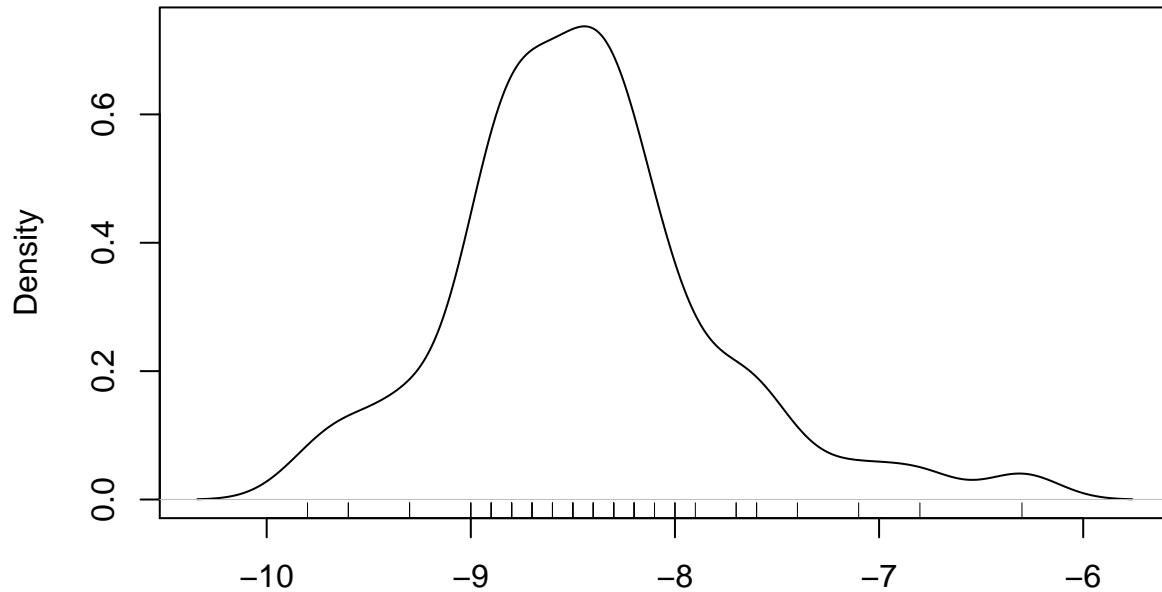
```
density.default(x = docking[, i], na.rm = T)
```



N = 56 Bandwidth = 0.1501

```
## debug en <text>#4: rug(docking[, i]) ## debug en <text>#4: browser() ## debug en
<text>#4: plot(density(docking[, i], na.rm = T))
```

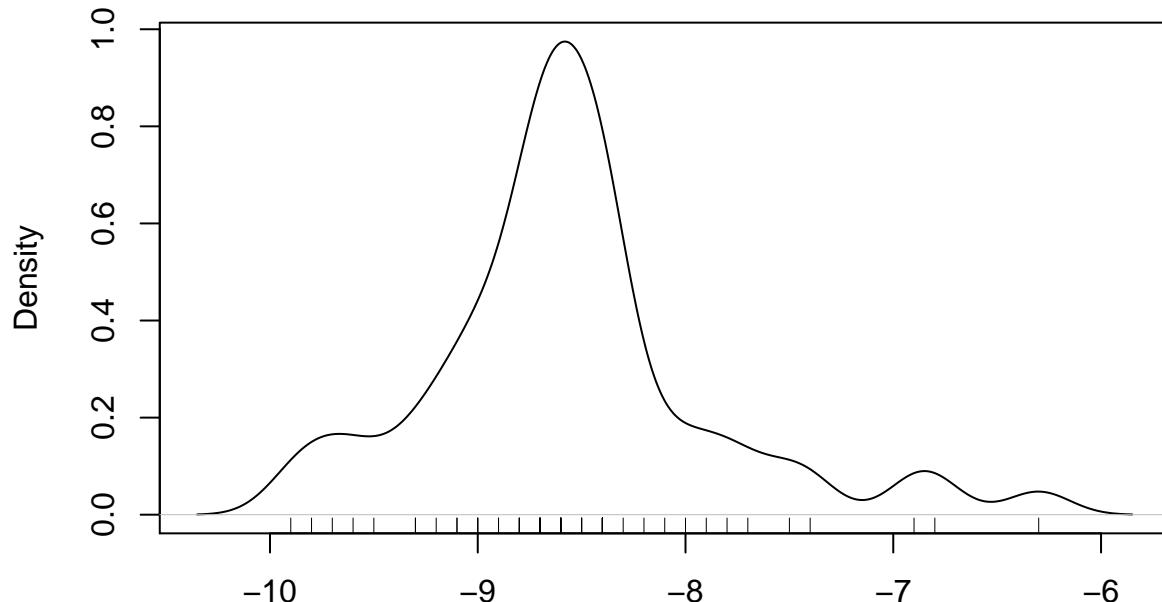
density.default(x = docking[, i], na.rm = T)



N = 56 Bandwidth = 0.1802

```
## debug en <text>#4: rug(docking[, i]) ## debug en <text>#4: browser() ## debug en
<text>#4: plot(density(docking[, i], na.rm = T))
```

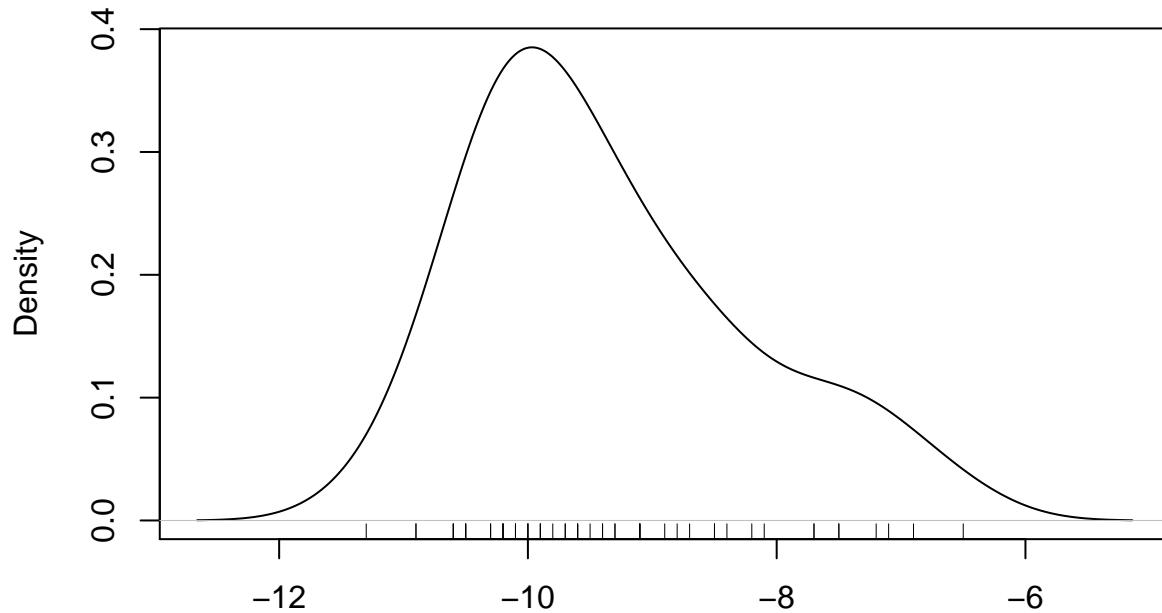
density.default(x = docking[, i], na.rm = T)



N = 56 Bandwidth = 0.1501

```
## debug en <text>#4: rug(docking[, i]) ## debug en <text>#4: browser() ## debug en
<text>#4: plot(density(docking[, i], na.rm = T))
```

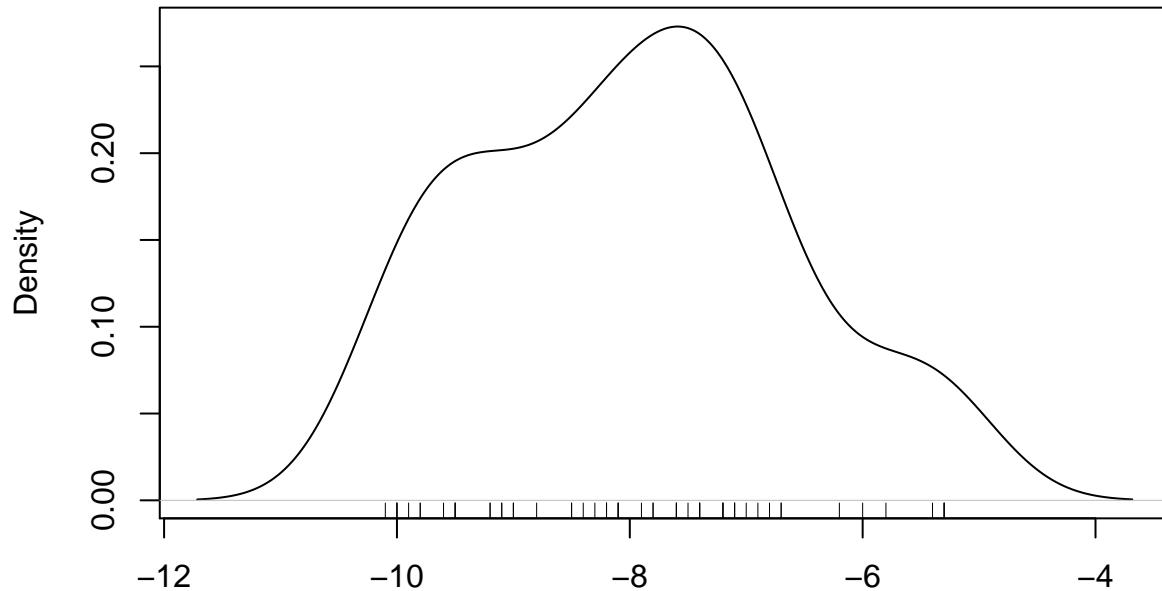
density.default(x = docking[, i], na.rm = T)



N = 56 Bandwidth = 0.453

```
## debug en <text>#4: rug(docking[, i]) ## debug en <text>#4: browser() ## debug en
<text>#4: plot(density(docking[, i], na.rm = T))
```

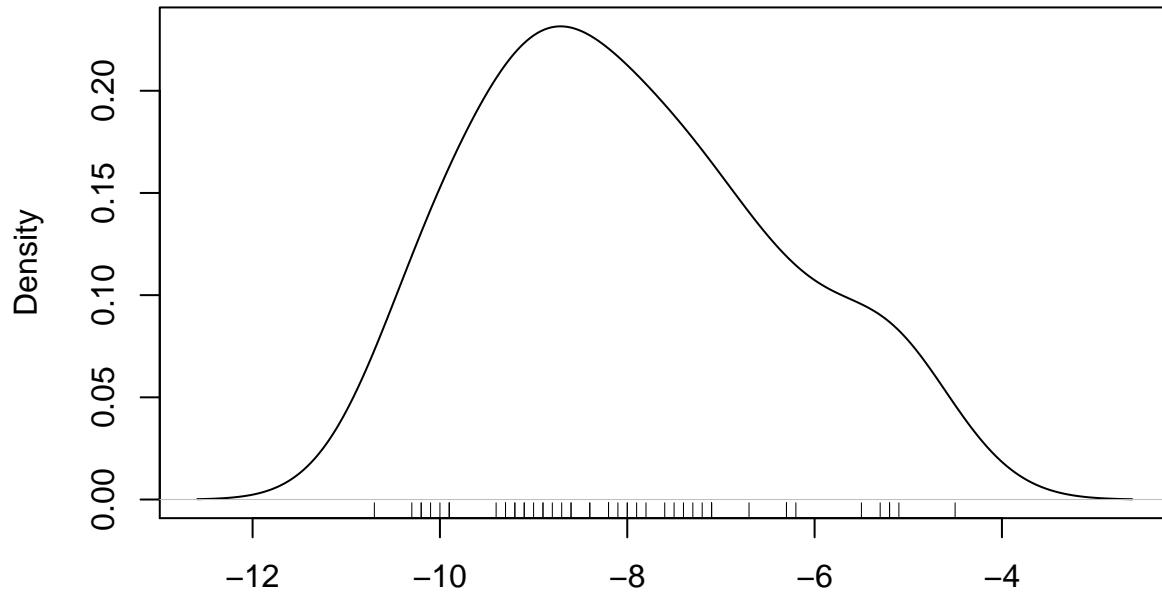
density.default(x = docking[, i], na.rm = T)



N = 56 Bandwidth = 0.5386

```
## debug en <text>#4: rug(docking[, i]) ## debug en <text>#4: browser() ## debug en
<text>#4: plot(density(docking[, i], na.rm = T))
```

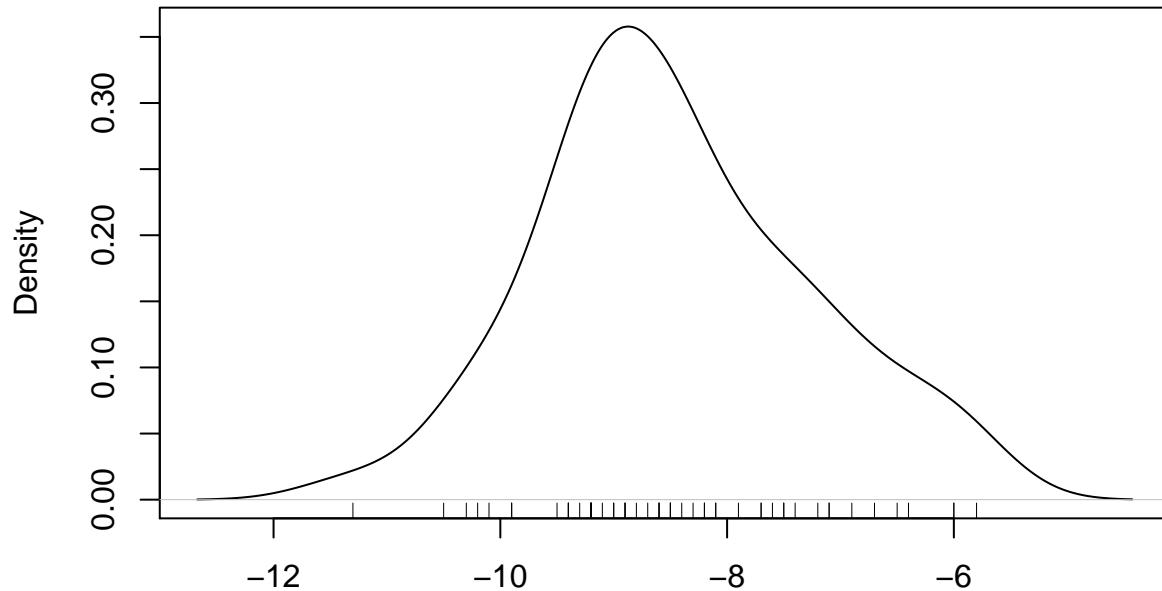
density.default(x = docking[, i], na.rm = T)



N = 56 Bandwidth = 0.6305

```
## debug en <text>#4: rug(docking[, i]) ## debug en <text>#4: browser() ## debug en
<text>#4: plot(density(docking[, i], na.rm = T))
```

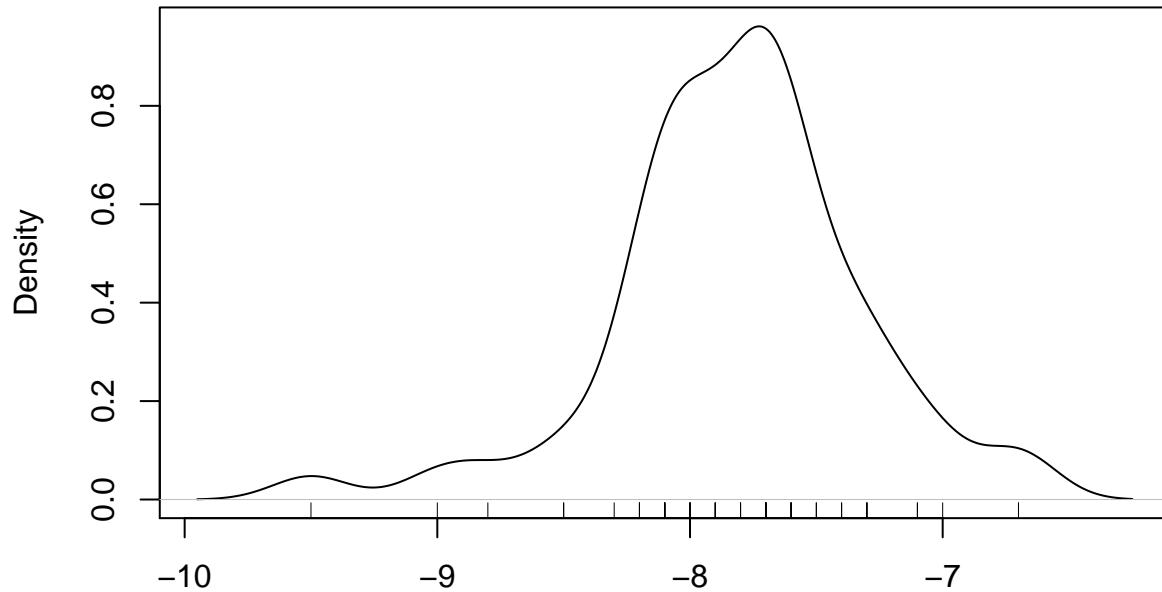
density.default(x = docking[, i], na.rm = T)



N = 56 Bandwidth = 0.4579

```
## debug en <text>#4: rug(docking[, i]) ## debug en <text>#4: browser() ## debug en
<text>#4: plot(density(docking[, i], na.rm = T))
```

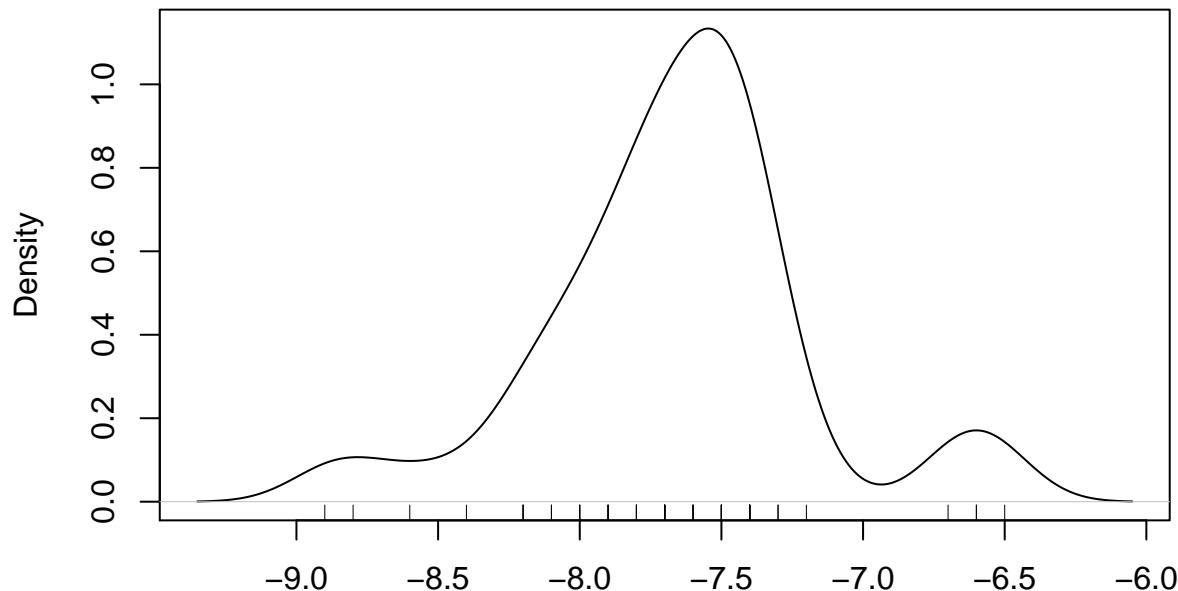
```
density.default(x = docking[, i], na.rm = T)
```



N = 56 Bandwidth = 0.1501

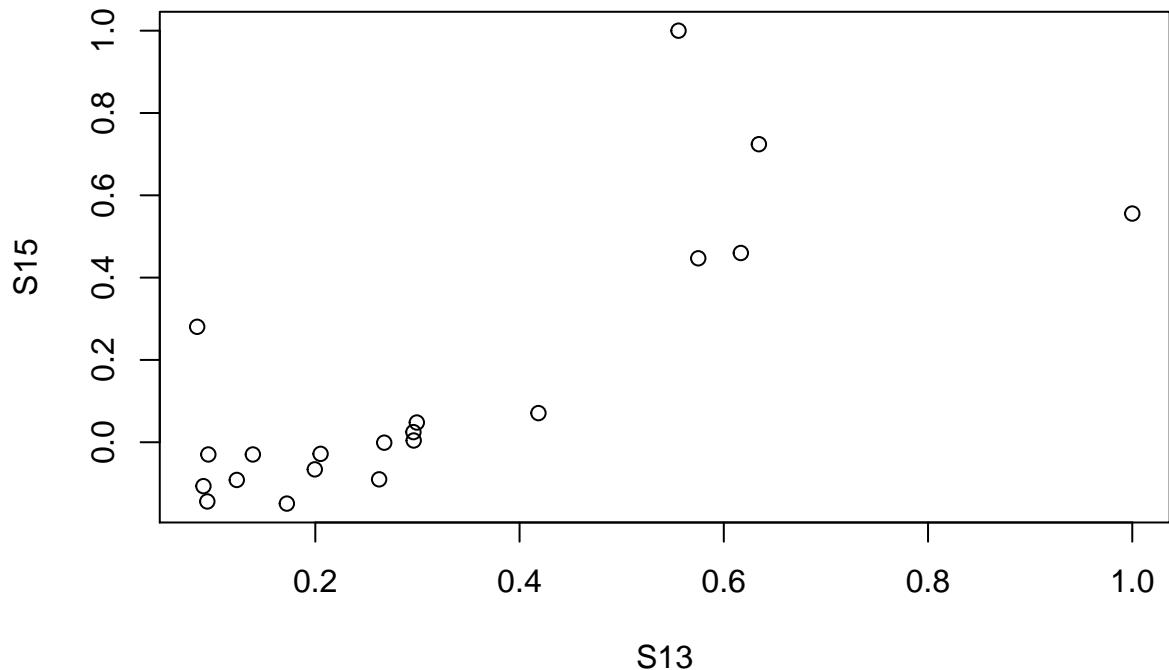
```
## debug en <text>#4: rug(docking[, i]) ## debug en <text>#4: browser() ## debug en
<text>#4: plot(density(docking[, i], na.rm = T))
```

```
density.default(x = docking[, i], na.rm = T)
```



N = 56 Bandwidth = 0.1501

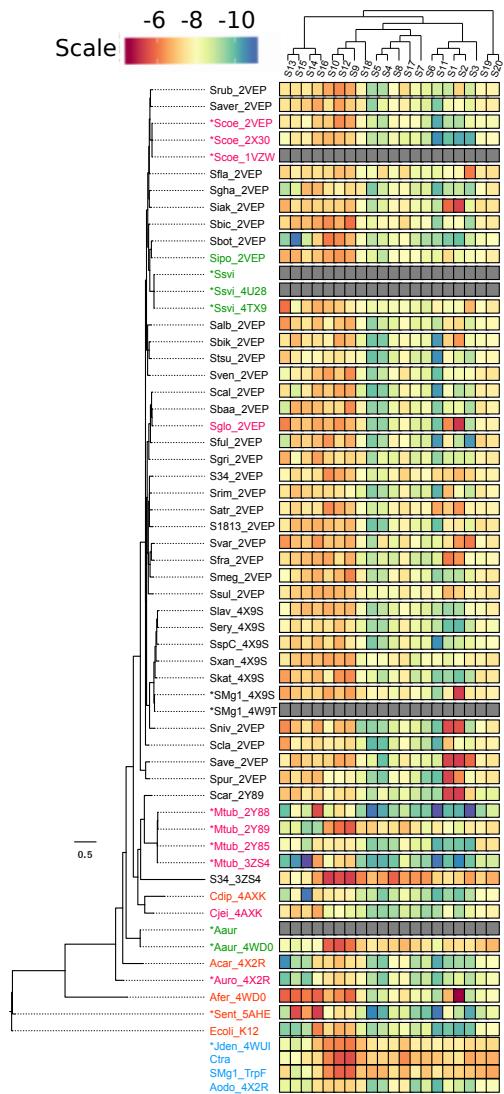
```
## debug en <text>#4: rug(docking[, i]) ## debug en <text>#4: browser()
r plot(cor(docking[-c(5,12,13,38,51),-1]))
```

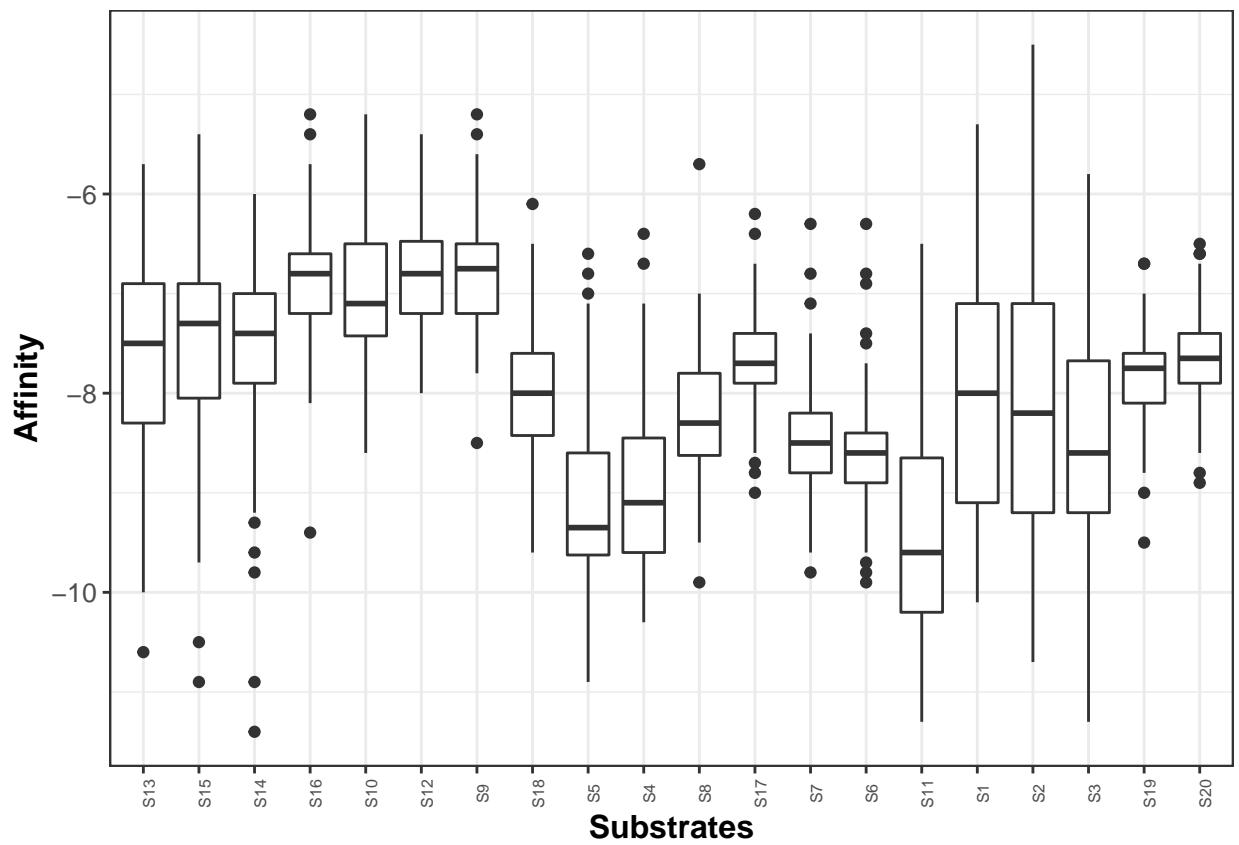


```
r ## Leer sobre la incertidumbre del 2 y explicarla      ## Y leer el paper de Julian y
el de mauricio sobre reportes de docking ->
```

GTP es el sustrato por el que PriA muestra mayor afinidad

```
## boxplot de los sustratos
ggplot(docking.m, aes(x=variable, y=value)) + labs(x = "Substrates", y = "Affinity",text = element_text
## Warning: Removed 100 rows containing non-finite values (stat_boxplot).
```





Dinámica molecular vs datos experimentales

En las tablas section , section 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 ± 0.2	0.05 ± 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 ± 0.1	7.8 ± 2.4	4.5×10^5	-10.3	-20.1	Söderholm A et al (2015)
Aaur	PriB	2.1 ± 0.5	1.8 ± 0.2	0.9	-7.4		verduzco-castro 2016
Sipo	PriB	3.8 ± 0.2	0.82 ± 0.02	0.21	-8.2	-14.7	verduzco-castro 2016
SspC	PriB	11.4 ± 3.4	2.53 ± 0.74	0.22	-8.5	-12.7	verduzco-castro 2016
SMg1	PriB	13.2 ± 3.4	0.92 ± 0.19	0.069	-8	-15.2	verduzco-castro 2016
Ssvi	PriB	3.9 ± 0.89	0.69 ± 0.04	0.18	-8.2	-16.7	verduzco-castro 2016
Scoe	PriA	3.6 ± 0.7	1.3 ± 0.2	0.4	-8.4	-15	Noda-García et al (2010)
Sglob	PriA	4.2 ± 0.8	0.74 ± 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 ± 0.9	0.2 ± 0.03	0.04	-9.2		Vazquez-Juarez (2016)
Cjei	PriA	2.3 ± 0.2	0.9 ± 0.08	0.39	-8.5		Noda-García et al (2013)
Cdip	subHisA	4.4 ± 0.5	2.6 ± 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 ± 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 ± 6.3	0.37 ± 0.09	0.014	-7.1	-	verduzco-castro 2016
Sipo	PriB	60.8 ± 1.1	8.25 ± 0.4	0.14	-8	-8.5	verduzco-castro 2016
SspC	PriB	149.9 ± 29	1.4 ± 0.12	0.009	-8.5	-10.8	verduzco-castro 2016
SMg1	PriB	129.6 ± 34	0.29 ± 0.04	0.0022	-7.5	-11	verduzco-castro 2016
Ssvi	PriB	24.5 ± 4.0	1.6 ± 0.29	0.067	-8	-9.7	verduzco-castro 2016
Scoe	PriA	5.0 ± 0.08	3.4 ± 0.09	0.7	-8	-9.4	Noda-García et al (2010)
Sglob	PriA	11 ± 1.0	3.8 ± 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 ± 6.5	0.5 ± 0.05	0.02	-9.3		Vazquez-Juarez (2016)
Cjei	PriA	5.1 ± 1.0	1.6 ± 0.16	0.31	-9		Noda-García et al (2013)
Cdip	subHisA	-	-	-	-8.8		Noda-García et al (2013)
SMg1 TrpF	TrpF3	8.4 ± 1.7	10.5 ± 2.4	1.25	-7.6	-9	verduzco-castro
Jden	TrpF3	16.8 ± 3.3	27 ± 1.6	1.6	-7.6	-7.7	verduzco-castro
Acar	SubHisA	Na	Na	0.02	Na	Na	Na
Aodo	SubTrpF	-	-	-	-	Na	Na

Con actividad de FolE i.e activa para el compuesto V Adams et al (2014)

Table 4: 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
Siak_2VEP	-6.6	-7.3	-7.0	-7.1	-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
Seal_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	-7.3	-8.0	-8.7	-8.5	-7.4	-6.3	-6.0	-7.9	-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	-7.8	-7.4	-8.2	-8.5	-9.6	-9.2	-9.2	-8.6	-7.7	-7.5
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	-10.1	-9.0	-7.8	-8.2	-8.0
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	-8.0	-8.8	-8.1	-7.6	-7.4	-8.7	-8.1	-8.0	-7.6	-7.7	-7.4	-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
Sniiv_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
Sela_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	-6.9	-6.7	-6.5	-6.5
Aodo_4X2R	-8.5	-8.6	-8.8	-7.3	-7.1	-7.1	-7.5	-9.7	-9.4	-8.8	-7.8	-7.6	-9.6	-8.8	-10.1	-8.4	-8.9	-9.4	-8.0	-8.1

PriA en cinéticas enzimáticas no tradicionales.

Además de la exploración genómica de PriA se realizaron caracterizaciones experimentales. No se tuvo el tiempo ni la experiencia para tener réplicas de los resultados descritos a continuación, sin embargo pueden ser un buen comienzo para futuros estudiantes que deseen retomarlos. Todos los protocolos fueron cuidadosamente descritos y se encuentran en los anexos. Este capítulo se enfoca en el montaje de dos experimentos. *i)* Cinéticas de PriA en GTP . *ii)* Medición simultánea de la actividad de PriA sobre ProFAR y PRA.

Lo primero que se realizó fue la sobre expresión heteróloga de PriA y su respectiva purificación para poder realizar *in vitro* cinéticas enzimáticas. Las enzimas fueron clonadas en cepas de *E. coli* V68 se indujo sobre expresión y se purifico 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 20.



Figure 20: Gel de proteína donde se muestra la banda correspondiente a PriA después de ser sobre-expresada y purificada

Con la proteína purificada y almacenada a -80° en esferas de proteína selladas con nitrógeno líquido como se describe en el anexo de los procedimientos se procedió a realizar cinéticas enzimáticas.

PriA puede tener actividad en GTP

La actividad fue medida fluorometricamente en placas de 96 (Nuc 96-Well Optical Botto Plates) en un lector de placas TECAN infinite M1000 (con exitación a 286 nm y emisión a 386 nm). Ensayos preliminares de actividad se realizaron en una PriA activa respecto a los otros substratos y proveniente de *Streptomyces coelicolor* y en la mutante inactiva D11A.

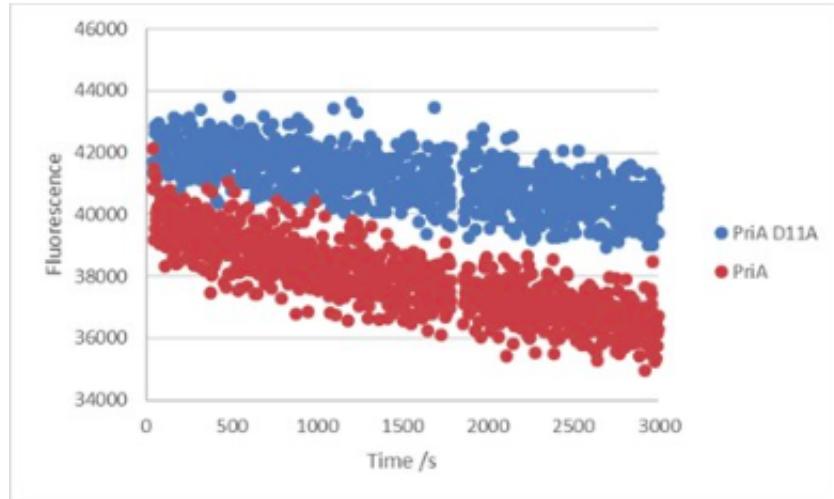


Figure 21:

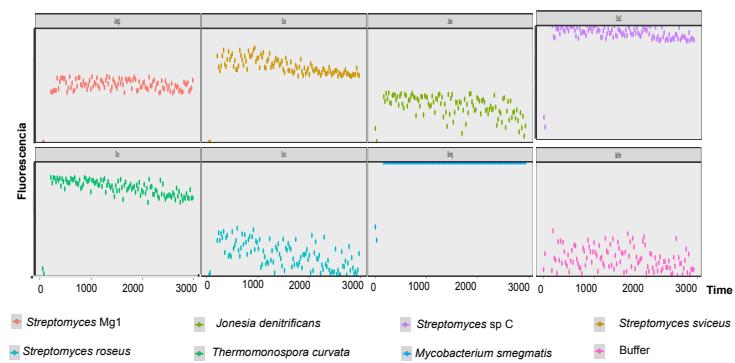


Figure 22:

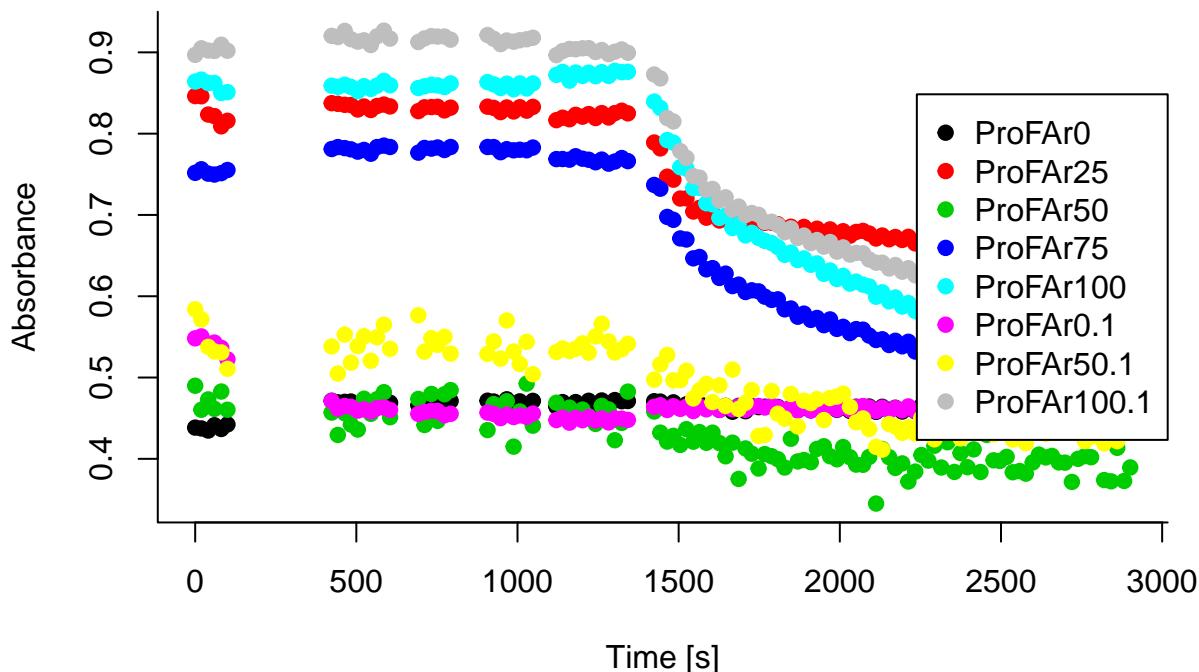
Entre las enzimas donde se aprecia actividad está *Thermomonospora curvata* que es una Actinobacteria termofílica de la familia *Thermomonosporaceae* y que puede ser encontrada encompostas ya que participa en la degradación de celulosa [@chertkov_complete_2011]. La trpF de *Jonesia denitrificans* no mostró actividad. Esta bacteria está clasificada como un organismo patogénico para animales, su genoma fue originalmente aislado de sangre [@pukall_complete_2009].

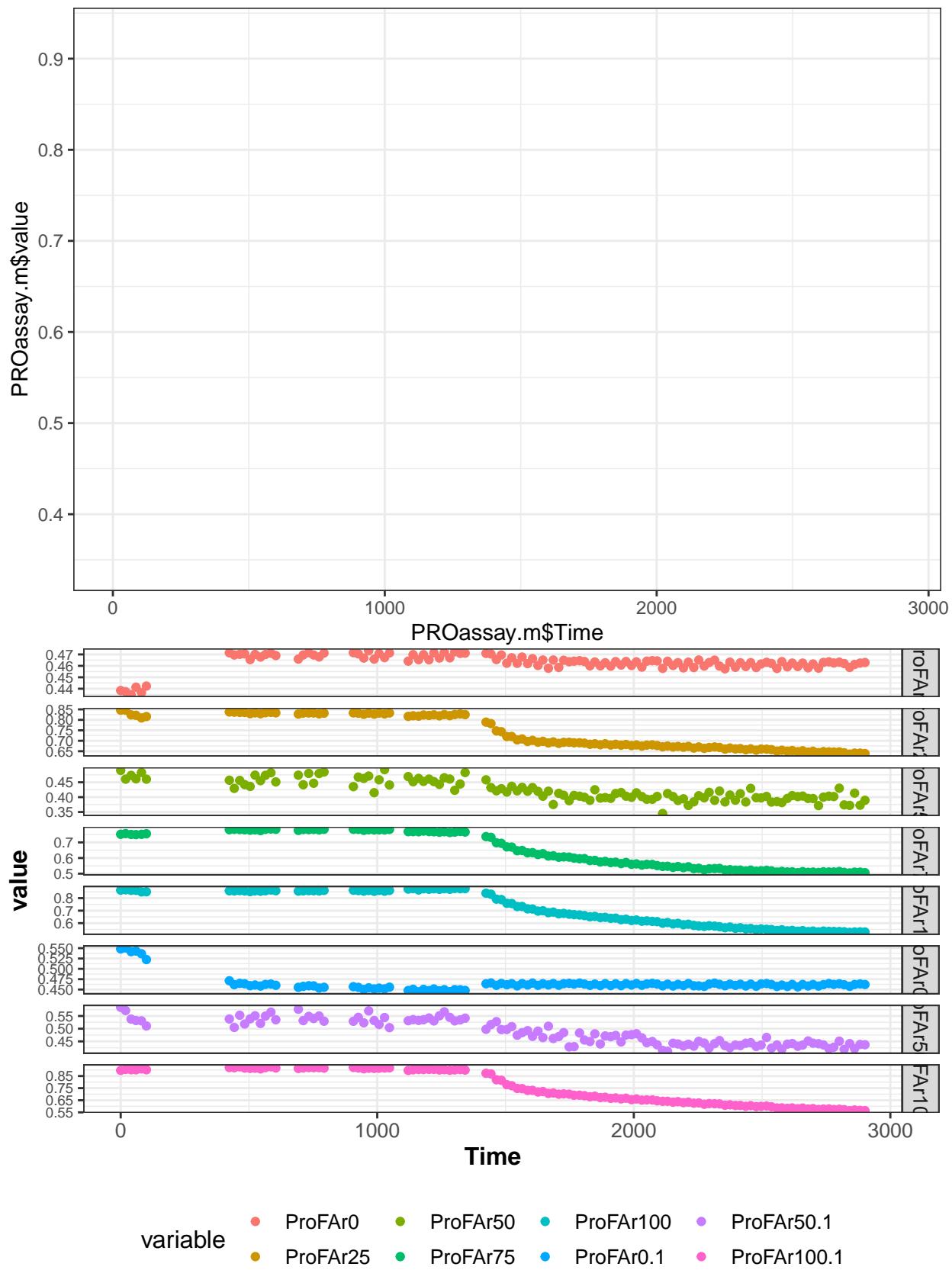
Cinéticas simultáneas para PRA y ProFAR

En esta sección se trata de medir simultáneamente las actividades de Pra y ProFAR.

Cinéticas

```
## [1] 0.00 19.15 40.50 59.65 81.00 100.15 423.50 442.65
## [9] 464.00 483.15 504.50 523.65 545.00 564.15 585.50 604.65
## [17] 692.40 711.55 732.90 752.05 773.40 792.55 907.00 926.15
## [25] 947.50 966.65 988.00 1007.15 1028.50 1047.65 1120.70 1139.85
## [33] 1161.20 1180.35 1201.70 1220.85 1242.20 1261.35 NA NA
## [41] 1282.80 1301.95 1323.30 1342.45 1424.00 1443.15 1464.50 1483.65
## [49] 1505.00 1524.15 1545.50 1564.65 1586.00 1605.15 1626.50 1645.65
## [57] 1667.00 1686.15 1707.50 1726.65 1748.00 1767.15 1788.50 1807.65
## [65] 1829.00 1848.15 1869.50 1888.65 1910.00 1929.15 1950.50 1969.65
## [73] 1991.00 2010.15 2031.40 2050.55 2071.90 2091.05 2112.50 2131.65
## [81] 2153.00 2172.15 2193.50 2212.65 2234.00 2253.15 2274.50 2293.65
## [89] 2315.00 2334.15 2355.50 2374.65 2396.00 2415.15 2436.50 2455.65
## [97] 2477.00 2496.15 2517.50 2536.65 2558.00 2577.15 2598.50 2617.65
## [105] 2639.00 2658.15 2679.50 2698.65 2720.00 2739.15 2760.50 2779.65
## [113] 2801.00 2820.15 2841.50 2860.65 2882.00 2901.15
```

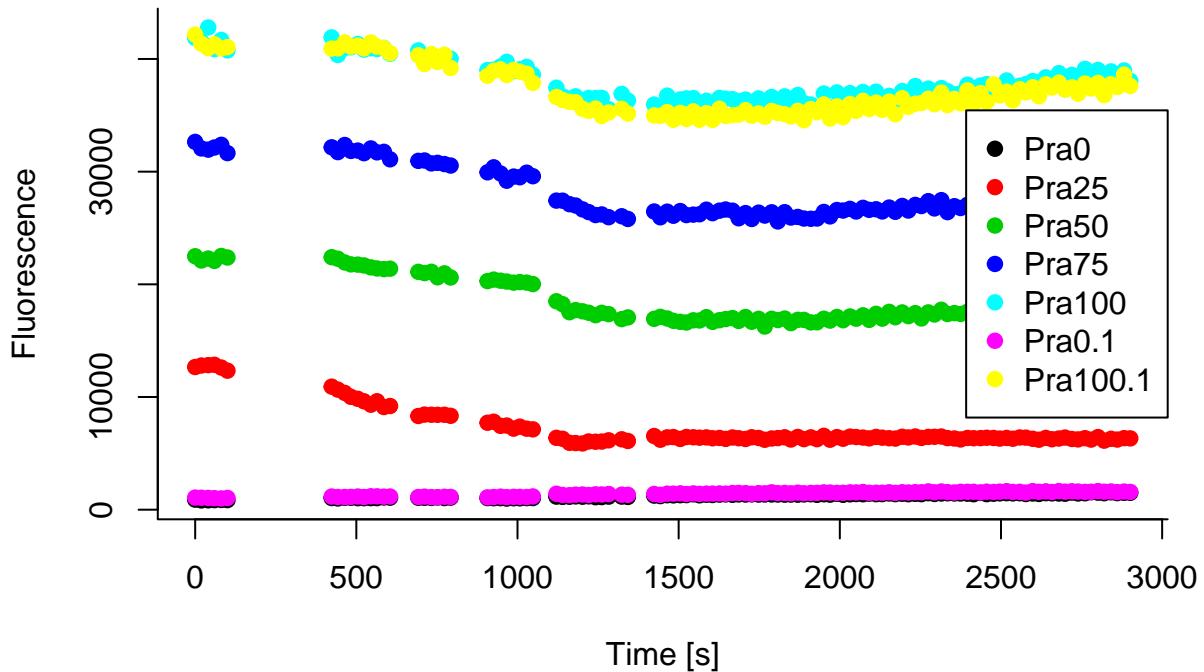




```

## [9] 464.00 483.15 504.50 523.65 545.00 564.15 585.50 604.65
## [17] 692.30 711.45 732.80 751.95 773.40 792.55 907.00 926.15
## [25] 947.50 966.65 988.00 1007.15 1028.50 1047.65 1120.70 1139.85
## [33] 1161.20 1180.35 1201.70 1220.85 1242.20 1261.35 1282.80 1301.95
## [41] 1323.30 1342.45 1424.00 1443.15 1464.50 1483.65 1505.00 1524.15
## [49] 1545.50 1564.65 1586.00 1605.15 1626.50 1645.65 1667.00 1686.15
## [57] 1707.50 1726.65 1748.00 1767.15 1788.50 1807.65 1829.00 1848.15
## [65] 1869.50 1888.65 1910.00 1929.15 1950.40 1969.55 1991.00 2010.15
## [73] 2031.50 2050.65 2071.90 2091.05 2112.50 2131.65 2153.00 2172.15
## [81] 2193.50 2212.65 2234.00 2253.15 2274.50 2293.65 2315.00 2334.15
## [89] 2355.50 2374.65 2396.00 2415.15 2436.50 2455.65 2477.00 2496.15
## [97] 2517.50 2536.65 2558.00 2577.15 2598.50 2617.65 2639.00 2658.15
## [105] 2679.50 2698.65 2720.00 2739.15 2760.50 2779.65 2801.00 2820.15
## [113] 2841.50 2860.65 2882.00 2901.15

```



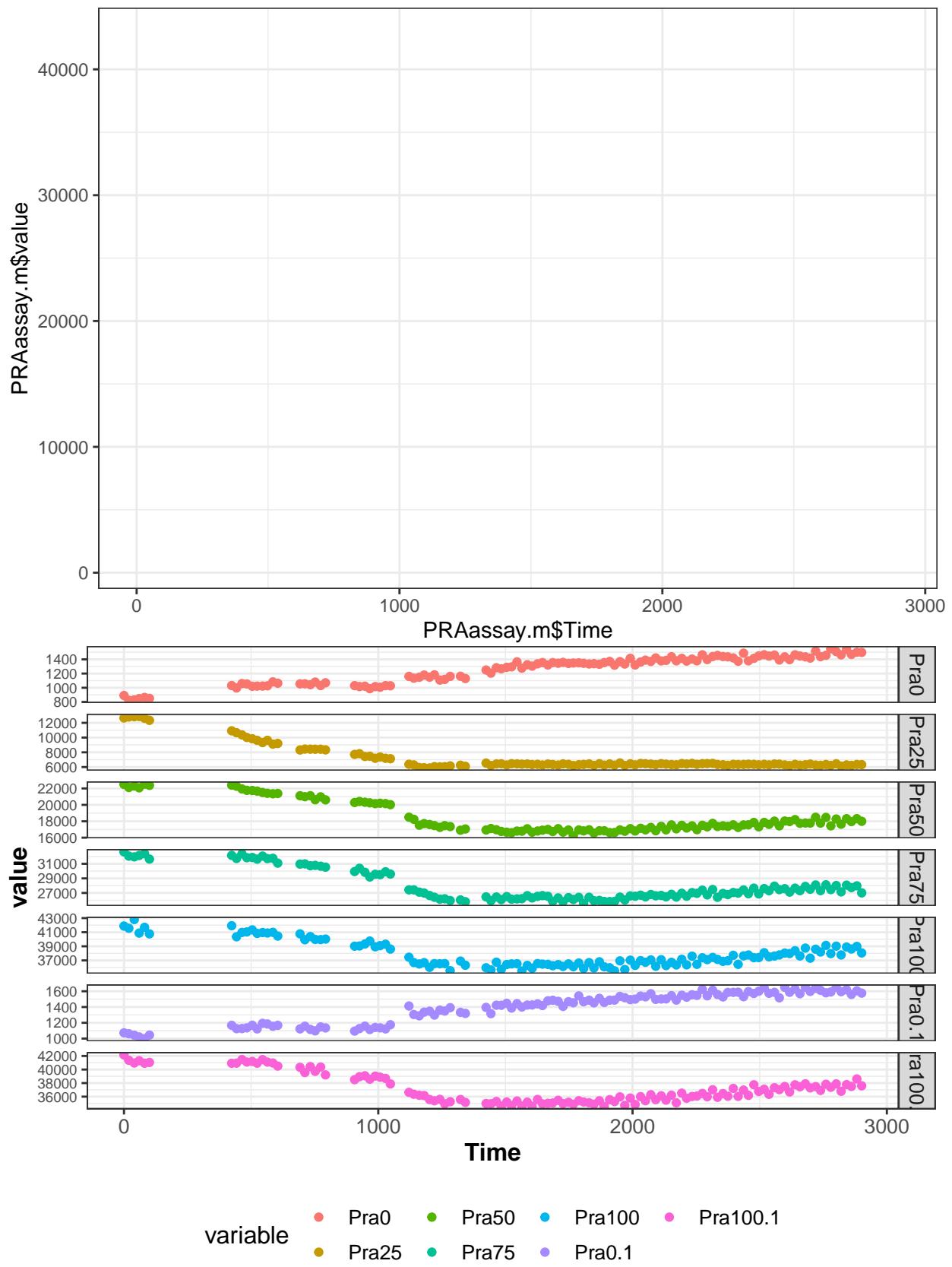
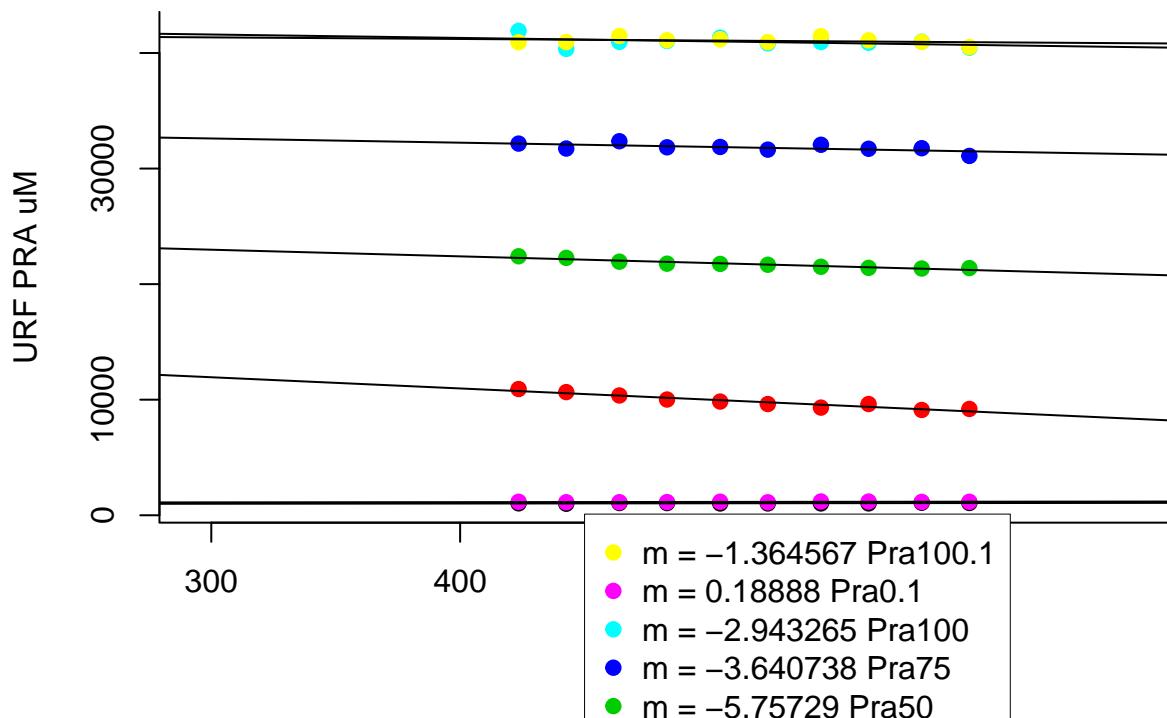


Gráfico de pendientes

```
## NULL
```



```
## [1] 0.196328 -9.695510 -5.757290 -3.640738 -2.943265 0.188880 -1.364567
```

```
## [1] 0.196328 -9.695510 -5.757290 -3.640738 -2.943265 0.188880 -1.364567
```

```
## [1] 1031 10920 22410 32161 41918 1168 40922
```

Interpolación con Michaelis Menden

```
#sessionInfo()
```