

# Enzymatic Promiscuity

---

A Thesis  
Presented to  
The Division of Mathematics and Natural Sciences  
Reed College

---

In Partial Fulfillment  
of the Requirements for the Degree  
Bachelor of Arts

---

Nelly Selem

May 2016



Approved for the Division  
(Mathematics)

---

Francisco Barona Gomez



# Acknowledgements

I want to thank a few people.



# Preface

This is an example of a thesis setup to use the reed thesis document class.





# Table of Contents

<b>Background</b>		<b>1</b>
0.1	1 Introduction	2
0.1.1	1.2. Relacion del pangenoma con la promiscuidad enzimatica	4
0.1.2	1.3 Expansion y contextos genomicos como herramienta de anotacion funcional	4
0.1.3	1. 4. Modelos bioinformaticos de promiscuidad	5
0.1.4	1.5. Promiscuidad in vitro y promiscuidad in vivo	6
0.1.5	1.6. El papel de la dinamica molecular en la promiscuidad	7
0.1.6	1.7 Modelo biologico diversidad de Actinobacteria	7
0.1.7	1.8 Modelo metabolico biosintesis de aminoacidos.	8
0.2	2. Antecedentes	8
0.2.1	2.1 Modelo biologico	9
0.2.2	2.2 Subsistemas metabolicos	9
0.2.3	2.3 Contexto y vecindades genomicas	9
0.2.4	2.4 Metodos bioinformaticos	10
0.2.5	2.5 Evomining	10
0.2.6	2.6 Caracterizacion in vivo	11
0.2.7	2.7 Caracterizacion bioquimica in vitro.	11
0.2.8	2.8 Modelado de dinamica molecular	11
0.3	3. Objetivo General	12
0.4	4. Objetivos particulares	12
0.5	5. Estrategias	13
0.5.1	5.1 La promiscuidad en familias enzimaticas.	13
	5.1.1. Obtener informacion genomica del phylum Actinobacteria.	13
	5.2 Promiscuidad in vitro dentro de miembros de una familia promiscua de enzimas.	13
	5.2.1. Seleccionar miembros homologos de la familia de enzimas.	14
	5.2.3. Determinar posibles correlaciones entre los datos producidos.	14
0.5.2	5.3 Desarrollar una metodologia para la deteccion in vivo de promiscuidad enzimatica.	14
	5.3.1.Crear cepas geneticamente modificadas con variantes funcionales no nativas de PriA y enzimas asociadas.	14
0.6	6. Metodologia	15
0.6.1	6.1 La promiscuidad en familias enzimaticas.	15

6.1.1.	Actinobacteria genomic . . . . .	15
6.1.2	Annotation . . . . .	15
6.1.3	Genomic DB phylogeny . . . . .	15
0.6.2	6.1.4 Identificar cambios en la vecindad genomica en familias selectas de enzimas de metabolismo central. . . . .	16
	6.1.5 Organizar y presentar los datos en una plataforma. . . . .	17
0.6.3	6.2 Promiscuidad in vitro . . . . .	18
	6.2.1 Datos cineticos: . . . . .	18
	6.3.2 Dinamica molecular . . . . .	18
0.6.4	6.3 Promiscuidad in vivo . . . . .	19
0.6.5	7. Consideraciones . . . . .	19
<b>Chapter 1: EvoMining . . . . .</b>		<b>21</b>
1.1	Introduction . . . . .	21
1.2	Gen families expansions on genomes . . . . .	21
	1.2.1 Pangenomes . . . . .	21
1.3	EvoMining . . . . .	21
1.4	Pangenome . . . . .	22
1.5	EvoMining Implementation . . . . .	22
1.6	EvoMining Databases . . . . .	23
	Genome DB . . . . .	24
	Phylogeny . . . . .	24
	Central DB . . . . .	25
	Natural Products DB . . . . .	25
1.6.1	AntisMASH optional DB . . . . .	25
1.6.2	Otras estrategias para los clusters Argon context Idea . . . . .	25
1.6.3	Inline code . . . . .	26
1.7	Recomendaciones de Luis . . . . .	26
1.8	CORASON: Other genome Mining tools context-based . . . . .	27
	1.8.1 CORASoN . . . . .	27
1.9	Loading and exploring data . . . . .	28
<b>Chapter 2: PriA Family . . . . .</b>		<b>33</b>
2.1	Math . . . . .	33
2.2	Chemistry 101: Symbols . . . . .	41
	2.2.1 Typesetting reactions . . . . .	41
	2.2.2 Other examples of reactions . . . . .	42
2.3	Physics . . . . .	42
2.4	Biology . . . . .	42
<b>Chapter 3: {r chapter3, child = 'chap3.Rmd'} # . . . . .</b>		<b>43</b>
<b>Chapter 4: {r chapter4, child = 'chap4.Rmd'} # . . . . .</b>		<b>45</b>
<b>Chapter 5: {r chapter5, child = 'chap5.Rmd'} . . . . .</b>		<b>47</b>

<b>Conclusion</b> . . . . .	<b>49</b>
More info . . . . .	49
<b>Appendix A: The First Appendix</b> . . . . .	<b>51</b>
In the main Rmd file: . . . . .	51
In : . . . . .	51
<b>Appendix B: The Second Appendix, Open source code on this docu-</b>	
<b>ment</b> . . . . .	<b>53</b>
B.1 R markdown . . . . .	53
B.2 Docker . . . . .	53
B.3 Git . . . . .	54
B.4 Connect GitHub and DockerHub . . . . .	54
B.5 Additional resources . . . . .	54
<b>References</b> . . . . .	<b>55</b>



# List of Tables

1.1	Maximum Delays by Airline . . . . .	30
2.1	Enzymes docking . . . . .	38



# List of Figures

2.1	Heat Plot PriA Streptomyces vs other subtrates . . . . .	40
2.2	Heat Plot TrpF Streptomyces vs other subtrates . . . . .	40
2.3	Combustion of glucose . . . . .	41





# Abstract

The preface pretty much says it all.

Second paragraph of abstract starts here.



# Dedication

You can have a dedication here if you wish.



# Background

Enzymes catalice chemical reactions transforming substrates into products. During 20th century enzymes were perceived as highly specific catalizer, nevertheless this perception changed with the discovery that they can . This ability to catalice several chemical functions is known as enzyme promiscuity. *Escherichia coli* contains at least 404 promiscuous enzymes. La relevancia de la promiscuidad radica tanto en su papel como mecanismo de evolucion de la funcion enzimatica, asi como en la necesidad de su deteccion para la correccion de modelos de flujo metabolico y la determinacion de efectos secundarios en drogas farmacologicas. A pesar de su frecuencia e importancia aun se esta en el proceso de entender las causas y las características observables de la promiscuidad enzimatica.

Para estudiar la promiscuidad esta propuesta discierne entre dos problemas. El primero es el de ubicar cuales familias tienen enzimas promiscuas, al que llamaremos problema de las familias. El segundo es el de los miembros: una vez identificada una familia promiscua, como distinguir entre sus miembros enzimas con distinto nivel de promiscuidad. Se ha intentado identificar enzimas promiscuas, a nivel de secuencia, sin pasar por experimentacion mediante aprendizaje maquina. Estos enfoques son incapaces de identificar una familia promiscua si no se conoce previamente al menos un miembro promiscuo de ella. Por otra parte, en el problema de los miembros se presentan dificultades cuando la identidad de secuencia es alta, e.g. en la familia PriA-HisA se sabe que la enzima HisA de *E. coli* no es promiscua, pero PriA de *Streptomyces coelicolor* si lo es.

Para mejorar nuestro entendimiento del fenomeno, ademas de la comparacion de secuencias es necesario integrar otros elementos de analisis. Se debe notar que es practicamente imposible decir que una enzima no es promiscua ya que para ello se deberian haber descartado todos los posibles sustratos. Sin embargo, para el estudio de cambios en promiscuidad se han detectado como elementos relevantes a los cambios en vecindad genomica, los cambios en flexibilidad durante la dinamica molecular, la perdida de genes centrales, y finalmente a las expansiones genicas dentro de un grupo taxonomico. Estos elementos tienen en comun que reflejan un cambio en alguna propiedad genomica o biofisica, de lo que se deriva que el buscar cambios en la promiscuidad de una enzima resulta mas factible que la busqueda intrinseca de promiscuidad, a lo que aspiran los metodos basados en comparaciones de secuencias.

Evomining es una plataforma bioinformática pensada para la búsqueda de expansiones de familias genicas de metabolismo central. Desarrollarla 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 a 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 genico y dinámica molecular, como candidatos a reflejar la variación en promiscuidad. Finalmente, he detectado que a pesar de que pruebas *in vivo* son más sensibles a niveles bajos de promiscuidad que mediciones *in vitro*, esta última suele ser la única estudiada. *In vivo*, la metabolómica aplicada en genes biosintéticos de productos naturales ha ayudado en la identificación de sustratos, por lo que esta técnica podría ayudar a revelar el nuevo sustrato de una enzima en la que se sospecha ganancia de promiscuidad. En resumen, el objetivo de mi trabajo será abordar los dos problemas de promiscuidad considerando la diferenciación *in vitro* e *in vivo* tomando como modelo biológico el phylum Actinobacteria, un grupo de bacterias reconocido por su diversidad metabólica donde se ha probado la existencia de promiscuidad enzimática.

## 0.1 1 Introduction

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 [4] otros lo ven como una actividad secundaria fortuita [5] que pudo aparecer de forma accidental o inducida artificialmente [6]. Otros más, cuando una enzima puede operar sobre un amplio rango de sustratos, prefieren llamarla multiespecífica [4]. 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 [7]. Existen varios tipos de promiscuidad enzimática.

Por sustrato cuando la reacción es la misma pero se lleva a cabo en distintos sustratos ejemplo la familia PriA [8] y la familia de betalactamasas [9]

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. [7] 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 ésteres en lugar de hidrolasas en presencia de solventes orgánicos [6].

Este trabajo se enfocará a la promiscuidad por sustrato, entendiendo así que la enzima es capaz de catalizar la misma reacción química en al menos dos sustratos. La promiscuidad por sustrato es importante en términos evolutivos, por ejemplo la enzyme commission number (EC) separa las enzimas en clases, a cada enzima se

asignan 4 digitos, los tres primeros corresponden a la reaccion y el ultimo al sustrato; el mayor numero de sustratos (4306 clases) que de reacciones quimicas (234 en el tercer nivel) sugiere que la mayor variacion evolutiva se da a nivel de sustrato y no de reaccion [11]. Otra evidencia de la importancia de la multiespecificidad por sustrato esta en el descubrimiento de las superfamilias, enzimas mecanistica y estructuralmente relacionadas que divergen en su afinidad por sustrato [12]

Si bien existen familias de enzimas con alta especificidad por sustrato, otras familias como el citocromo P450 [14] y las beta lactamasas [16] son promiscuas. Es posible que la vision previa de alta especificidad se deba a que las primeras rutas metabolicas estudiadas pertenecen al metabolismo central, donde la especificidad puede haber sido favorecida por presiones de seleccion [17]. Esta vision ha cambiado debido al conocimiento de mas enzimas con multifuncionalidad [18], sin afectar la eficiencia catalitica por la funcion primaria [19]. En 1976 el interes por la promiscuidad comenzo por su influencia en la evolucion de la funcion enzimatica[20], las aproximaciones variaron desde la aparicion de la sintesis funcional [22], cuando la disponibilidad de genomas permitio la combinacion de analisis filogeneticos con tecnicas de biologia molecular, bioquimica y biofisica (Fig 1). En 2003 la biofisica de las proteinas entra en escena al postularse que la diversidad conformacional durante la dinamica molecular debe incidir en la aceptacion de distintos sustratos. Recientemente se ha investigado su papel en efectos secundarios en drogas farmacologicas [23]. Entre 2005 y 2010 se avanza del estudio de una sola familia enzimatica hacia el interes por propiedades globales, por ejemplo dado un genoma se investiga la distribucion de familias promiscuas en subsistemas metabolicos. En estos años, surge el desarrollo de indices que reflejen las caracteristicas bioquimicas de enzimas promiscuas. En 2010, comienzan los intentos por desarrollar un metodo computacional de prediccion de promiscuidad. Desde 2012 a la fecha, a la par que las aproximaciones bioinformaticas se multiplican, se desarrollan investigaciones de aspectos biofisicos, bioquimicos y evolutivos de enzimas promiscuas reafirmando que todos estos aspectos estan relacionados al fenomeno. En las siguientes secciones se describiran trabajos importantes sobre la relacion que guarda la promiscuidad con expansiones genomicas y flexibilidad molecular. Ademas se hablara sobre analisis bioquimicos y metabolicos para la descripcion del fenomeno.

TeX or L<sup>A</sup>TeX ### 1.1. Funcion biologica de la promiscuidad enzimatica

¿Por que existe la promiscuidad enzimatica? Se tiene evidencia de dos papeles biologicos: el primero proporcionar robustez a la red metabolica de un organismo mediante redundancia de reacciones de otras enzimas; el segundo permitir plasticidad evolutiva, es decir materia prima para la adaptacion a variaciones ambientales [19] mediante la adquisicion de nuevas funciones quimicas. Respecto a la robustez, se probó que sobreexpresar enzimas promiscuas puede rescatar perdidas genicas [30]. De 104 knockout sencillos de genes esenciales para E. coli K-12, 20% de las auxotrofias pudieron ser suprimidas por la sobreexpresion de plasmidos que contenian enzimas promiscuas. Otro ejemplo que aporta a la robustez es PriA, enzima de la ruta de histidina que realiza en la ruta del triptofano la reaccion E.C. 5.3.1.24 [8]. En cuanto a la plasticidad se propone que para que la promiscuidad pueda dar origen a la aparicion de nuevas funciones la actividad promiscua debe proveer una ventaja fisiologica 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[4].

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 [31] y pueden servir como bloques de construcción para vías metabólicas nuevas [34]. La respuesta inmediata de adaptación de un organismo podría ser una consecuencia de su grado de promiscuidad.

### **0.1.1 1.2. Relación del pangenoma con la promiscuidad enzimática**

El core genome de un grupo taxonómico es el conjunto de secuencias codificantes presentes en todos los organismos del grupo. En el Dominio Bacteria el core está estimado entre 200 y 300 secuencias [37]. 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 el gen *rpoB*. El pangenoma es el conjunto complementario 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 solo posiblemente para el organismo que las posee. Como en el pangenoma la presión de selección está relajada respecto al core-genome [17] es el conjunto 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 se encuentra en el pangenoma de triptófano de este género taxonómico, posiblemente adquiriendo una nueva función [34]. Para evitar problemas técnicos del cálculo del pangenoma existen otros modelos de medición de variabilidad del genómica entre especies bacterianas [38].

### **0.1.2 1.3 Expansión y contextos genómicos como herramienta de anotación funcional**

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 [4]. Existe evidencia de que cierto grado de promiscuidad o divergencia funcional precede a la duplicación genética [40]. Por este motivo detectar expansiones ya sea duplicaciones o transferencias horizontales [41], puede ser un buen punto de partida para determinar divergencia funcional y promiscuidad. No todas las expansiones denotan cambio de



funcion enzimatica, algunas pueden ser meros accidentes, sin embargo dado que la funcion de una enzima suele estar relacionada con sus vecinos [42], una expansion en una vecindad genomica diferente de la tradicional sera un referente de adquisicion de una nueva funcion y entonces un indicador de existencia previa de promiscuidad.

La funcion de una enzima es un concepto jerarquico, dependiente de la filogenia de un organismo [46]. Para sistematizar el estudio de contextos y vecindades genomicas se desarrollo Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins STRING [47], que cuenta con una anotacion de ortologia jerarquica y consistente, realizada en 2000 organismos en cuyo marco interacciones de proteinas con implicaciones funcionales son predichas tanto de novo por informacion genomica de co-ocurrencia como por mineria de datos en articulos publicados. STRING es una base de datos, y como tal no permite agregar nuevos genomas para su analisis. Sus 2000 organismos incluyen especies tanto bacterianas como eucariotas. Al existir tanta diversidad, los genomas disponibles para un genero o clase especificos son escasos, p. g. de los mas de 300 genomas disponibles de *Streptomyces* solo 24 estan incluidos.

Para resolver la baja cobertura de STRING hacia ciertos grupos taxonomicos se pueden desarrollar scripts de vecindad genomica utilizando RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology); un servicio interactivo de anotacion automatica de genomas de bacterias y arqueas [48] donde la funcion de cada gen se asigna de acuerdo a conocimiento previo de subsecuencias de organismos cercanos filogeneticamente, cuando es posible se incluye en un subsistema metabolico. Estamos en una era de explosion de datos genomicos, proximamente 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 [50]. Ante esta expectativa seria muy util desarrollar algoritmos de analisis genomico que sean de codigo libre o al menos interactivos para que cada laboratorio pueda personalizarlos para sus propios genomas.

Finalmente, no solo la vecindad genomica inmediata puede ser utilizada como distintivo en la busqueda de promiscuidad, diferencias en el contexto genomico en genes relacionados con una enzima promiscua, sin importar su ubicacion dentro del genoma tambien pueden ser relevantes para la perdida o ganancia de funcion quimica [51], (Juarez Vazquez et al 2015).

### 0.1.3 1. 4. Modelos bioinformaticos de promiscuidad

Con el fin de reducir la inversion en el proceso de experimentacion, se han implementado en los ultimos años algoritmos computacionales para predecir promiscuidad enzimatica [52]. Estos procedimientos cuentan con un conjunto de aprendizaje, unos descriptores del conjunto, una fase de ajuste de parametros y finalmente una prediccion. 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 proteinas 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 [51], lo que dificulta que considerar solo la secuencia conlleve a buenos predictores de promiscuidad. Cuando se obtiene una predicción positiva utilizando los modelos existentes, lo que significa es 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 [5]. Además en ambos casos mezclan en el mismo conjunto enzimas bacterianas y eucariotas, con lo que si existía una huella basada en secuencia entonces esta puede diluirse por la gran distancia taxonómica entre estos grupos (Tabla 1).

#### 0.1.4 1.5. Promiscuidad in vitro y promiscuidad in vivo

La ganancia de promiscuidad no solo puede entenderse como la capacidad de convertir más sustratos [52], sino también como la mejora de la capacidad catalítica respecto a ellos. El I-index [15], 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 metabólicos [57] como los empleados en la detección de rutas no conservadas en la biosíntesis de productos naturales [50]. En particular para este fin se ha utilizado espectrometría de masas MS/MS, [57] combinada con molecular networking para identificar productos similares [59]

### 0.1.5 1.6. El papel de la dinamica molecular en la promiscuidad

La estructura tridimensional de una proteina es obtenida mediante previa purificacion y cristalizacion. Aunque mucho se ha hablado de la relacion estructura funcion, al cristalizar se obtienen estados conformacionales homogeneos, que bien pueden no ser la unica conformacion que adopta la proteina en solucion. [61]. En particular en el problema de promiscuidad, se ha observado que la variacion funcional no queda obviamente reflejada en la variacion estructural, lo que sugiere un rol significativo para la dinamica molecular [62]. Se postula que un aspecto de la dinamica molecular relevante para la diversificacion de especificidad por sustrato es el numero de conformeros [63]. Por ejemplo, en la actinobacteria *Corynebacterium diphtheriae* parece que el contexto genómico correlaciona con perdida de promiscuidad de PriA ya que al poseer el genoma una copia de *trpF*, la enzima perdio esta funcion quimica conservando solo la funcion EC 5.3.1.16 correspondiente a la ruta de histidina. Esta sub-funcionalizacion se refleja en la perdida de estados conformacionales cambiando desde 1 estado en *C. diphtheriae* hasta 4 presentes en la dinamica de PriA de *M. tuberculosis* [51].

Las regiones rigidas de una enzima proporcionan orientacion adecuada con respecto a los grupos cataliticos, mientras que las regiones flexibles permiten al sitio activo adaptarse a los sustratos con diferentes formas y tamaños [5]. Esta consideracion sugiere que la flexibilidad del sitio activo es otra caracteristica de la dinamica molecular a considerar para obtener informacion de la capacidad de ligacion de una enzima a distintos sustratos [64]. Recientemente el indice de flexibilidad dinamica (dfi) se utilizo como una medida cuantitativa basado en la respuesta a perturbaciones de aminoacidos (PRS). Este indice se incremento en regiones cercanas al sitio activo de beta lactamasas promiscuas respecto al correspondiente dfi de  $\beta$ -lactamasas especialistas existentes [16].

### 0.1.6 1.7 Modelo biologico diversidad de Actinobacteria

Al escoger un conjunto acotado para investigar familias de enzimas promiscuas se debe recordar que la funcionalidad es jerarquica por lo que para mejorar la anotacion, es deseable reflejar el proceso evolutivo y restringirse a un grupo de organismos taxonomicamente relacionados [65]. Actinobacteria es un phylum que posee promiscuidad tanto en el metabolismo periferico como en el core metabolico. Entre datos publicos (NCBI) y privados estan disponibles alrededor de 1200 genomas no redundantes de especies de Actinobacteria. Como punto de partida, se han estudiado las relaciones filogeneticas y grupos de ortologia [66], en particular en Actinobacteria para identificar relaciones entre las familias del phylum, se obtuvieron arboles multilocus de entre 100 y 157 genomas [68]. Estos estudios sugieren como separar los genomas disponibles para hacer el calculo de grupos de ortologia. Finalmente, se han realizado estudios de plasticidad genómica en *Streptomyces* considerando 5 y 17 organismos de los 300

genomas disponibles en la actualidad [70] donde reportan 2,018 familias en el core genome y 32,574 en el pangenoma.

### 0.1.7 1.8 Modelo metabolico biosintesis de aminoacidos.

Al hacer el calculo vemos que *Streptomyces*, un genero del phylum Actinobacteria cuenta en su genoma con un promedio de 8316 secuencias codificantes segun la especie. Gran parte de estas secuencias pueden ser agrupadas en subsistemas metabolicos como metabolismo de carbohidratos o de lipidos; de estos subsistemas uno de los mas amplios es el metabolismo de aminoacidos con entre 429 y 910 secuencias segun el organismo. La sintesis de aminoacidos es un subsistema presente en todas las especies pero con suficientes variaciones que permiten hacer observaciones evolutivas. En un gran numero de Actinobacterias las rutas de histidina y triptofano de 7 y 11 pasos respectivamente convergen en una enzima bifuncional llamada PriA, que realiza tanto la funcion de HisA como la de TrpF [8]. La cantidad de familias en el subsistema de metabolismo de aminoacidos, su variabilidad, su conservacion entre distintos grupos taxonomicos y la existencia de estos ejemplos en Actinobacteria lo posicionan como un buen punto de partida para la busqueda de promiscuidad tanto de familias promiscuas como de miembros promiscuos de las mismas.

## 0.2 2. Antecedentes

En las cuatro decadas de estudio de la promiscuidad enzimatica, hemos aprendido que es un fenomeno distribuido en distintos subsistemas metabolicos [72] y que su existencia puede deberse tanto al desarrollo de nuevas funciones para fines adaptativos [20], como al rescate de una funcion perdida [30]. Por ello la dinamica de perdida y ganancia de genes asociada al contexto genómico en bacterias se relaciona con cambio en la funcion enzimatica [44]. Precisando, respecto a la ganancia de genes, se postula que la bifuncionalidad precede la duplicacion [40]. Lo que implica que dada una duplicacion muy posiblemente previamente la promiscuidad estuvo presente [74].

Se han desarrollado tecnicas bioquimicas y metabolicas de medicion [15], asi como algoritmos computacionales de prediccion de promiscuidad [52]. Un aspecto a mejorar dentro del modelado es la restriccion del conjunto de estudio a un grupo taxonomico tan reducido que exista congruencia en las familias de ortologia 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 prediccion de promiscuidad [45], es posible que dentro de las tecnicas computacionales la flexibilidad durante la dinamica molecular este correlacionada con la promiscuidad de los miembros de una familia [61].

### 0.2.1 2.1 Modelo biologico

De los mas de mil genomas actualmente disponibles de Actinobacterias, se seleccionaron 888 (correspondientes a 49 familias), que no estan excesivamente fragmentados; es decir con un estimado de al menos 5 genes por contig (Tabla 2). Estos genomas fueron divididos en tres grupos ([http://pubseed.theseed.org/wc.cgi?request=show\\_otus&base=/homes/nselem/Data/CS](http://pubseed.theseed.org/wc.cgi?request=show_otus&base=/homes/nselem/Data/CS)), uno de ellos correspondiente a Streptomycetaceae, la familia con la mayor cantidad de genomas disponibles; los otros dos grupos siguieron la taxonomia propuesta por Gao & Gupta en 2012. En el grupo de 290 genomas de Streptomycetaceae 2,126,832 ORFS fueron clasificados en 288,390 familias; de las 919,292 ORF del grupo I de Actinobacteria resultaron 269,406 familias. Las relaciones taxonomicas fueron corroboradas con algoritmos propios basados en best bidirectional hits (BBH).

### 0.2.2 2.2 Subsistemas metabolicos

Los operones his y trp de histidina [76] y triptofano [77] respectivamente, participantes del metabolismo de aminoacidos estan ampliamente distribuidos en los organismos bacterianos. En Actinobacteria la familia promiscua PriA participa en ambas rutas biosinteticas, para su estudio se han generado datos bioquimicos, genomicos y estructurales (Tabla 3). En bacterias gram negativas estan presentes los operones his y trp y en lugar de PriA su familia homologa HisA. PriA comprende un conjunto de subfamilias en Actinobacteria. En Streptomyces, el gen trpF se desplaza de la vecindad genomica de trp, con lo que el homologo de hisA gana promiscuidad aunque con baja actividad de TrpF, a esta subfamilia se le llama PriB [78]. En otras Actinobacterias trpF se pierde totalmente y la familia homologa de HisA, se vuelve promiscua [8] realizando tanto la funcion quimica correspondiente a HisA como la de TrpF. Finalmente en la familia subHisA se pierde la funcion TrpF debido posiblemente a la ganancia del operon trp completo [51] y en la familia subtrpF se conserva solo a la funcion TrpF debido a la perdida del operon his [Juarez vazquez et al 2015 in prep]. Existen al menos 43 familias de Actinobacteria sin explorar respecto a la funcionalidad de PriA.

### 0.2.3 2.3 Contexto y vecindades genomicas

En 2012 fueron analizados 102 genomas de 29 familias de Actinobacteria (Noda-Garcia 2012). sugiriendo que al menos en Corynebacteria el contexto y la vecindad genomica incidian en la sub-funcionalizacion de PriA en subHisA (Noda-Garcia et al 2013). Respecto a IlvC, otra familia involucrada en la sintesis de aminoacidos fue estudiada y caracterizada bioquimicamente en 1 Corynebacterium y 8 Streptomyces (Verdel-Aranda et al 2014). Para ampliar estos resultados, utilizando la anotacion de RAST y una generalizacion de la definicion 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 <https://github.com/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 está descrita posteriormente en los métodos. El algoritmo fue aplicado a la familia IlvC en 290 *Streptomyces* resultando 9 clusters (Datos: [http://148.247.230.43/nselem/CONTEXTS/REL\\_St275/ilvC/Contextos.php](http://148.247.230.43/nselem/CONTEXTS/REL_St275/ilvC/Contextos.php)) entre los más poblados el primero cuenta con 279 elementos, otro con 9 elementos y dos más con 7 miembros (Fig 3), resultados experimentales son congruentes con que existe divergencia funcional entre miembros de clusters distintos (Verdel-Aranda 2015).

#### 0.2.4 2.4 Métodos bioinformáticos

Al evaluar PROMISE (Carbonell & Faulon 2010) en un set de datos de la familia HisA/PriA (Noda-García et al 2015) obtuve que su mejor desempeño es con huella molecular de tamaño 6, donde 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. Por lo menos para estas familias el conjunto de entrenamiento o los descriptores no son suficientes para la anotación de promiscuidad.

#### 0.2.5 2.5 Evomining

Evomining es una plataforma bioinformática pensada para la identificación de productos naturales que tiene entre sus éxitos la identificación de la biosíntesis de arsenolipidos (Cruz-Morales 2015 in press). La búsqueda de productos naturales cuenta entre sus premisas que estos se producen en vecindades genómicas llamadas clusters y que además clusters cercanos (ya sea en contenido genico o en la secuencia de sus componentes), exploran variaciones metabólicas, es decir sus enzimas catalizan reacciones sobre sustratos parecidos aunque no idénticos (Cruz-Morales 2015, Medema & Fischbach 2015). La base de evomining es que las enzimas de metabolismo secundario son expansiones distantes de enzimas de rutas centrales, lo que da idea de la química que realizan dichas expansiones dejando por identificar el sustrato sobre el que trabajan. La primera versión de evomining cuenta con 200 genomas de Actinobacteria, 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. Evomining está ligada con el problema de la promiscuidad porque en estas familias expandidas ya sea por duplicación o por transferencia horizontal, las expansiones pueden retener la función química de las rutas centrales y viceversa, la función química expandida suele estar presente antes de la duplicación.

Si se combinara evomining con la premisa de que vecindades distintas son marcadoras de funciones quimicas distintas, al encontrar una familia expandida con vecindades genomicas diferentes se podria solventar la deficiencia de otros metodos bioinformaticos consistente en que para identificar familias promiscuas se debe conocer previamente un miembro promiscuo de la misma. (Fig 4) Asi pues al combinar evomining con herramientas de vecindad genomica tanto de comparacion como de visualizacion estaremos mejorando su funcionalidad en la identificacion de familias promiscuas.

### 0.2.6 2.6 Caracterizacion in vivo

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 funcion *trpF*. Para la construccion de cepas de *Streptomyces* con variantes no nativas de *priA* minimizando la modificacion genomica y el efecto de sobreexpresion, se planea utilizar *E. coli* como intermediario para realizar seleccion por auxotrofia. Se cuenta con un conjunto de plasmidos para transformar a *E. coli* asi como con las mutantes sencillas de *E. coli* para *trpF* y *hisA* que permiten realizar seleccion por auxotrofias. Ademas tenemos una coleccion de cepas nativas de *Streptomyces* asi como un mutante de PriA de *S. coelicolor*. Se optimizo una reaccion de PCR para la amplificacion de un segmento de DNA de *S. coelicolor* que contiene a *priA*.

### 0.2.7 2.7 Caracterizacion bioquimica in vitro.

De la familia PriA y sus subfamilias se han caracterizado bioquimicamente 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 cineticas enzimaticas 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 genomicas en secuencias de PriA (Tabla 3, Figura 5).

### 0.2.8 2.8 Modelado de dinamica molecular

La dinamica es un metodo que permite hacer simulaciones de particulas que sirve para obtener informacion de propiedades macroscopicas de un conjunto de atomos (Meller 2001, Kukol 2015). Es util en el marco de mi proyecto porque permite la exploracion del espacio conformacional, y se ha visto que este esta relacionado con la actividad de la enzima (Sikosek et al 2014), ademas dado un conformero permite verificar su estabilidad. Resuelve la ecuacion de movimiento de Newton con base a una configuracion inicial, las fuerzas interatomicas como los enlaces covalentes, las fuerzas de Van der Waals y la carga de las particulas (Campbell et al 2012).

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 et al 2015 in prep); con este pipeline se han generado dos estructuras de Camerá (Noda-García et al 2015), 30 estructuras y dinámicas de miembros de Actinobacteriaceae y Bifidobacteriaceae (Vázquez-Juárez et al in prep.) y finalmente una estructura de subHisA de *Corynebacterium diptheriae*. En la familia *Streptomyces*, interesante debido a su variación en contexto genómico y en mediciones in vitro aun no se modelan dinámicas moleculares aunque 40 estructuras por homología están en proceso.

En un estudio de subHisA (Noda-García et al 2013) se utilizó el método de dinámica molecular y se comparó el número de conformeros entre miembros de subHisA y PriA, resultando mayor el de PriA como corresponde a una enzima promiscua. El estudio sobre la relación dinámica-flexibilidad de  $\beta$ -lactamasas utiliza replica exchange, una variación de dinámica molecular que corre réplicas en paralelo a distintas temperaturas (Zhou 2007). Una desventaja de este método es que por el costo computacional de las réplicas agregar explícitamente otras moléculas a la simulación como el solvente no es posible en tiempo razonable. Una vez generadas las dinámicas moleculares se procederá a calcular tanto el número de conformeros como el índice de flexibilidad dsi (Zou et al 2015). Se está desarrollando PEDB, promiscuous enzyme database, una base de datos genómicas, evolutivas, bioquímicas y estructurales y de metabolismo de PriA en Actinobacteria donde se procederá al análisis de los mismos (<http://148.247.230.43/nselem/PHP/queries.html>).

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 de familias de enzimas promiscuas, sin embargo hasta ahora no se han reportado trabajos multidisciplinarios que involucren a todas las partes involucradas (Fig 6)

## 0.3 3. Objetivo General

Estudiar el fenómeno de promiscuidad enzimática tanto desarrollando estrategias para identificar familias promiscuas dentro de un grupo taxonómico, como comparando variaciones de promiscuidad in vitro e in vivo con variaciones en contexto genómico y flexibilidad en miembros de una familia. (Figura 7)

## 0.4 4. Objetivos particulares

Mejorar evomining como método de identificación de familias enzimáticas promiscuas aprovechando los cambios en vecindades genómicas como características informativas



provenientes de datos filogenomicos. Estudiar la relacion entre historias filogenomicas y procesos biofisicos con la promiscuidad in vitro, a traves de mediciones de ciertas características de la familia PriA. Caracterizar cambios de promiscuidad enzimatica in vivo mediante perfiles metabolomicos de actividades de PriA y enzimas asociadas.

## 0.5 5. Estrategias

### 0.5.1 5.1 La promiscuidad en familias enzimaticas.

Mejorar Evomining mediante la identificacion de cambios de vecindad genomica en familias selectas de metabolismo central convirtiendola en una plataforma de codigo libre disponible para otros investigadores.

#### 5.1.1. Obtener informacion genomica del phylum Actinobacteria.

Colectar genomas de Actinobacteria de NCBI y de colecciones privadas.

### 5.1.2. Anotar consistentemente las secuencias codificantes de estos genomas.

Utilizar un anotador automatizado y desarrollar los scripts necesarios para anotar los genomas.

#### 5.1.3. Establecer las relaciones filogeneticas 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 y que facilite reclasificar los genomas mal nombrados.

##### 5.1.4. Identificar cambios en la vecindad genomica en familias selectas de enzimas de metabolismo central. Clasificar sistematicamente las secuencias de familias codificantes segun su similitud en familias enzimaticas.

Desarrollar las herramientas bioinformaticas necesarias para separar clusters de vecindades genomicas.

#### 5.1.5 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 al integrar los genomas colectados de Actinobacteria. Sistematizar la base de datos de metabolismo central.

Desarrollar la visualizacion e integrar la clasificacion de vecindades genomicas como una herramienta adicional en la busqueda de promiscuidad.

### 5.2 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 cataliticas, contexto genomico, vecindad genomica, numero

de conformeros e indice de flexibilidad.

### **5.2.1. Seleccionar miembros homologos de la familia de enzimas.**

Se escogieron 41 Streptomyces repartidos en un arbol de rpoB de 400 Streptomyces con genoma disponible. Esta seleccion incluye los seis Streptomyces de los que se cuenta con cinetica enzimatica de PriA, tres de ellos con estructura cristalografica.

### 5.2.2. Medir cineticas enzimaticas, contexto genómico, vecindad genómica, flexibilidad y numero de conformeros.

Determinar la pertenencia a uno de cuatro posibles contextos genómicos respecto al gen trpF. Estudiar la existencia de distintas vecindades genómicas. Determinar la cinetica enzimatica de 9 enzimas mas buscando variabilidad en contexto genómico (sugeridas en la tabla 4). Obtener mediante una colaboracion 37 modelos estructurales por homologia y modelar dinamica molecular.

La siguiente tabla contiene la diversidad de contextos y vecindades genómicas de 41 Streptomyces respecto al gen trpF.

### **5.2.3. Determinar posibles correlaciones entre los datos producidos.**

Numero de conformeros e indice de promiscuidad.

indice de flexibilidad y numero de conformeros.

Numero de conformeros y contexto genómico.

indice de flexibilidad y contexto genómico.

Contexto genómico e indice de promiscuidad I.

Analizar las vecindades genómicas e indice de promiscuidad I.

## **0.5.2 5.3 Desarrollar una metodologia para la deteccion in vivo de promiscuidad enzimatica.**

Debido a cambios en flexibilidad o cambios de contexto genómico, se puede sospechar de diferencias en la funcion quimica de dos miembros de una familia de enzimas, sin conocer las diferencias a nivel de sustratos. Para investigar estos cambio in vivo se propone estudiar diferencias en perfiles metabolomicos de una coleccion de cepas en condiciones diversas.

### **5.3.1. Crear cepas geneticamente modificadas con variantes funcionales no nativas de PriA y enzimas asociadas.**

Dado un organismo modelo sustituir su homologo nativo de priA por una variante no nativa ya sea de priA o trpF de Actinobacterias selectas de las que se sospecha cambio en promiscuidad.

#### 5.3.2. Separar posibles productos y minimizar los falsos positivos debidos a perturbaciones metabolicas no relacionadas a PriA.

Separar los metabolitos mediante cromatografia dirigida por tamaño. Obtener un espectro de masas antes y despues de la sustitucion de la variante y sobre las diferencias en el espectro realizar espectrometria de masas en tandem (MS/MS) es decir refragmentar y analizar que los fragmentos contengan partes parecidas a los sustratos conocidos.

## 0.6 6. Metodologia

A continuacion describire la metodologia para cada una de las estrategias expuestas previamente. Todos los scripts desarrollados fueron escritos en perl y estan disponibles en github <https://github.com/nselem/perlas>.

### 0.6.1 6.1 La promiscuidad en familias enzimaticas.

#### 6.1.1. Actinobacteria genomic

Para obtener informacion genomica del phylum Actinobacteria mediante la coleccion de genomas de NCBI se revisaron todas las familias de Actinobacteria de la base genoma de NCBI y se seleccionaron los genomas con minimo 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.

#### 6.1.2 Annotation

Para anotar consistentemente las secuencias codificantes de estos genomas se utilizo el anotador automatizado RAST y se desarrollaron los scripts necesarios para anotar los genomas desde la terminal, conectado asi NCBI y RAST.

#### 6.1.3 Genomic DB phylogeny

Establecer las relaciones filogeneticas de los genomas colectados. Mediante el uso del core genome para construir un arbol filogenomico, para reclasificar los genomas mal nombrados.

Para obtener el core genome y en base a el reclasificar los genomas se diseño el algoritmo estrellas basado en Best Bidirectional Hits (blast all vs all).

Estrellas. 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. (Fig 9) Una vez con el core genome completo se puede reconstruir la filogenia. Este metodo fue exitoso en la deteccion de una familia marcadora de *Clavibacter michiganensis* (2014 Rodriguez-Orduña in prep).

## 0.6.2 6.1.4 Identificar cambios en la vecindad genomica en familias selectas de enzimas de metabolismo central.

Clasificar sistematicamente las secuencias de familias codificantes segun su similitud en familias enzimaticas.

Como se menciona en los antecedentes, se han separado 888 genomas de Actinobacteria en 3 grupos taxonomicos utilizando para la anotacion la tecnologia de sub-sistemas de RAST. Para la separacion en familias iso funcionales (ortologos, paralogos y expansiones) n se utilizo RAST, especificamente el script What Changed (WC) que asigna un numero a cada familia, esta herramienta esta basada en k-mers, su codigo esta disponible en github: ([https://github.com/kbase/kbseed/blob/master/service-scripts/svr\\_CS.pl](https://github.com/kbase/kbseed/blob/master/service-scripts/svr_CS.pl)). Ademas de en los tres grupos ya mencionados, tambien se realizara una clasificacion para trescientos genomas de Actinobacteria distribuidos en todas sus familias taxonomicas.

Para desarrollar las herramientas bioinformaticas necesarias para separar clusters de vecindades genomicas a continuacion se describe detalladamente como se definio vecindad genomica y la relacion implementada de similitud.

1. Un conjunto expandido es un conjunto que contiene secuencias homologas asi como sus expansiones: paralogos y transferencias horizontales. Dado un conjunto de genomas, se pueden calcular y enumerar todos sus contextos extendidos utilizando WC.
2. Un PEG es un elemento de un conjunto expandido. Dado un PEG  $p$ , se define  $CE(p)$  el numero del conjunto expandido de  $p$ , como el numero asignado por WC al conjunto expandido a que  $p$  pertenece.
3. La vecindad de un PEG es el conjunto de PEGs cercanos a el. Dado un umbral en terminos de distancia de pares de bases entre puntos medios para precisar la definicion de cercano, se pueden calcular todos los contextos de un genoma.
4. Una vecindad  $A$  es  $n$ -similar a otra vecindad  $B$  si  $C = \{a \in A \mid \exists b \in B, CE(b) = CE(a)\}$  tiene al menos cardinalidad  $n$ . Es decir si existen al menos  $n$  elementos de  $A$  que pertenecen al mismo conjunto expandido que algun elemento de  $B$ .
5. Un conjunto de vecindades es un conjunto de PEGs clusterizado segun la relacion  $n$ -similaridad. Si  $A$  es  $n$ -similar a  $B$  y  $B$  es  $n$ -similar a  $C$  entonces, aun si  $A$  no fuese  $n$ -similar a  $C$ , los PEGs generadores de  $A, B, C$  son agrupados dentro del mismo conjunto de vecindades.
6. Un cluster es un conjunto de conjunto de vecindades.

7. Los clusters son evaluados segun el numero y la cardinalidad de sus conjuntos de vecindades.

Sea Cl un cluster, donde CCi es un conjunto de contextos y ni es la cardinalidad de CCi  $Cl = \{CC1, CC2, \dots, CCk\}$

Sean M la cardinalidad maxima de un conjunto de contextos y m la cardinalidad maxima sin considerar M.

$$M \leq \max_{i \in \{1, 2, \dots, k\}} n_i \quad m \leq \max_{i \in \{1, 2, \dots, k\}} n_i \neq M$$

$$\sum_{j=1}^n (\delta\theta_j)^2 \leq \frac{\beta_i^2}{\delta_i^2 + \rho_i^2} \left[ 2\rho_i^2 + \frac{\delta_i^2 \beta_i^2}{\delta_i^2 + \rho_i^2} \right] \equiv \omega_i^2$$

M representa el contexto mas difundido de la enzima, dentro del grupo taxonomico considerado; mas relevante porque si m es grande significa que hay un segundo contexto genómico conservado en dicho grupo taxonomico, y entonces posiblemente una ganancia de funcion.

La evaluacion de Cl esta dada por una combinacion lineal de k,m y M  
 $S(Cl) = f(k, m, M) = c_1k + c_2m + c_3M$

Este algoritmo se puede mejorar considerando la orientacion de los genes del cluster asi como clusters de los vecinos.

### 6.1.5 Organizar y presentar los datos en una plataforma.

Para contribuir al desarrollo de la plataforma Evomining se desarrollaran scripts de visualizacion de arboles filogeneticos y contextos genomicos.

Para facilitar el analisis visual de una vecindad genomica ya la vez generar imagenes de alta calidad facilmente exportables para su uso en publicaciones, se desarrollaran scripts de visualizacion que utilizaran el formato Scalable Vector Graphics (SVG), dicho formato es basicamente un archivo de texto XML que contiene instrucciones para que el navegador realice un dibujo (W3school/SVG 2015). Al ser vectores, las imagenes generadas en SVG no pierden resolucion al ser escaladas y justamente por ser escalables permiten explorar con detalle grandes cantidades de datos organizados por ejemplo en arboles filogeneticos. Los scripts a desarrollar extraeran para cada gen informacion necesaria como coordenadas, direccion, funcion quimica, etc, proveniente de la anotacion de RAST y de los scripts de comparacion de vecindades genomicas. La primera version de evomining fue desarrollada en el lenguaje perl; este lenguaje cuenta con un modulo para facilitar la elaboracion de SVG (perlmaven/SVG 2015) por lo que al utilizar SVG no se agregan nuevos requerimientos a su desarrollo y se facilita su portabilidad.

Se amplificara Evomining de los 200 genomas con que contaba su version inicial a los 880 colectados mudando la curacion manual de su base de datos de rutas centrales

a la anotación por subsistemas de RAST. Finalmente se presentará la variación en vecindades genómicas como una herramienta adicional que ayude en la búsqueda de promiscuidad en familias de enzimas pertenecientes al metabolismo central.

### 0.6.3 6.2 Promiscuidad in vitro

#### 6.2.1 Datos cinéticos:

En todos los ensayos enzimáticos se busca medir una señal que permita una distinción clara entre sustrato y producto (Bisswanger 2011). La cinética enzimática de PriA proveniente del género *Streptomyces* será determinada como ya se ha reportado previamente, mediante el monitoreo de cambios en fluorescencia (isomerización del sustrato PRA) o en absorbancia (isomerización del sustrato PROFAR). En el caso de la isomerización de PRA, debido a que contiene un anillo de antranilato, la fluorescencia del sustrato PRA es 50 veces mayor que la del producto 1-(2-carboxyphenylamino)-1-deoxy-D-ribulose 5-phosphate (CdRP) por lo que se utiliza la disminución en fluorescencia como medida de la conversión del sustrato en producto (Hommel 1995). Se mandarán sintetizar estas variantes para posteriormente sobreexpresarlas en *E. coli*. Se crecerán cepas modificadas de *E. coli* (W-, H-) en medio mínimo M9 enriquecido con una mezcla de aminoácidos excepto L-histidina y L-triptófano y se seleccionarán por rescate de auxotrofia. Para obtener la enzima necesaria para los ensayos enzimáticos se utilizarán plásmidos disponibles para construcciones de sobreexpresión de proteína, después de la producción la enzima se purificará utilizando cromatografía por afinidad a níquel (Verduzco-Castro et al in press).

Finalmente se recopilarán datos cinéticos de PriA tanto privados como los públicos reportados a la fecha en la BRAunschweig ENzyme DAtabase (BRENDA, Scheer et al 2011). Una vez colectados los datos se anotarán en PEDB, nuestra base de datos ad hoc, y se tomará como medida de promiscuidad el I-index (Nath & Atkins 2008) que se define como:  $I = 1/\ln N_i = 1/N_{pi}(\pi)$  donde  $\pi = K_{cat} \text{ Kim} / i = 1/N_{K_{cat} \text{ Kim}}$

#### 6.3.2 Dinámica molecular

Para generar dinámicas moleculares primer lugar se recolectarán las estructuras tridimensionales de miembros de PriA de Actinobacteria. Después se procederá a modelar por homología las estructuras tridimensionales faltantes utilizando el pipeline del laboratorio de bioinformática y biofísica computacional. Este pipeline utiliza el software Rosetta para el modelado para las estructuras y GROMACS (Groningen Machine for Chemical Simulation, Van Der Spoel et al 2005) para el modelado de la dinámica molecular. Esta parte del trabajo se realizará en colaboración con el laboratorio de bioinformática y biofísica computacional.

### 0.6.4 6.3 Promiscuidad in vivo

Se realizaran construcciones con variantes no nativas de *priA* y/o *trpF* en *Streptomyces coelicolor*. Para las construcciones se amplificara mediante PCR un fragmento alrededor de *PriA* que se insertara en un vector. Este vector recombinara en *E. coli* con un casete provisto de un gen marcador de resistencia a antibiotico y este gen recombinado se pasara por conjugacion a *S. coelicolor* donde se espera que realice una doble recombinacion. El paso por *E. coli* es llevado a cabo porque *Streptomyces* no se puede transformar por electroporacion. Se seleccionaran las cepas de *Streptomyces* resistentes al antibiotico como prueba de que ya no poseen su *priA* nativa. Posteriormente, mediante un procedimiento analogo se sustituiria el gen marcador, por variantes no nativas de *priA*/*trpF*.

La cromatografia se refiere a un conjunto de metodos que separan y analizan mezclas de moleculas. Basicamente estos metodos se basan en diferencias en el tamaño, intercambio de iones y afinidad. (Campbell Iain D. 2012) Posteriormente se combinan con espectrometria de masas que es una tecnica que mide el radio masa-carga de las particulas fragmentadas en iones. (Campbell Iain D. 2012). Los datos obtenidos de espectrometria de masas se procesaran utilizando redes moleculares, que consiste en agrupar los productos segun la similitud de sus partes. Plan: 3 replicas tecnicas, 2 replicas biologicas de 5 cepas.

### 0.6.5 7. 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 (Campbell 2012, Kukol A et al 2015). 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 genomica 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 (Nobeli et al 2009, Odokonyero

et al 2014) 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 genomica-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 recién adquiridas, así como tambien ser pionero en la investigacion de promiscuidad in vivo.



# Chapter 1

## EvoMining

### 1.1 Introduction

Enzyme promiscuity on metabolic families, can be looked on enzymes that are over a divergent process.

### 1.2 Gen families expansions on genomes

#### 1.2.1 Pangenomes

Expansions are located on pangenome, Tools to analyse pangenome BPgA

### 1.3 EvoMining

EvoMining looks expansions on prokariotic pangenome.  
Biological idea.

EvoMining was available as a consult website with 230 members of the Actinobacteria phylum as genomic data base, 226 unclassified nBGCs, and not interchangeable central database 339 queries for nine pathways, including amino acid biosynthesis, glycolysis, pentose phosphate pathway, and tricarboxylic acids cycle. [65] EvoMining was proved on Actinobacteria Arseno-lipids

## 1.4 Pangenome

The sequenced genome of an individual in some species is just a partial print of the species genetic repertoire. Individuals can gain and lose genes.

[79] Pangenome is the total sequenced gene pool in a taxonomically related group. Supergenome all the possible extant genes. About 10 times genomes. There are open, closed pangenomes. Most genomes have a core, a shell and unique genes.

Gene history is a tree history

HGT doubles mutation rate on prokaryotes.

Maybe HGT is a selected feature, if is the case, so could be NP production.

Some archaea has open pangenome. [37]

HGT doubles mutation rate on prokaryotes. [79] Maybe HGT is a selected feature, if is the case, so could be NP production.

Some archaea has open pangenome. [37] Shell trees converge to core trees [80]

## 1.5 EvoMining Implementation

**EvoMining** was expanded from a website (<http://evodivmet.langebio.cinvestav.mx/EvoMining/index.html>) with limited datasets to an easy to install distribution that allows flexibility on genomic, central and natural product databases. EvoMining user distribution was developed on Perl on Ubuntu-14.04 but wrapped on Docker. Docker is a software containerization platform that allows repetibility regardless of the environment. Docker engine is available for Linux, Cloud, macOS 10.10.3 Yosemite or newer and even 64bit Windows 10.

Dependencies that were packaged at EvoMining Docker app are Apache2, muscle3.8.31, newick-utils-1.6, quicktree, blast-2.2.30, Gblocks\_Linux64\_0.91b Perl and from cpan CGI, SVG and Statistics::Basic modules.

GitHub defines itself as an online project hosting using Git. It's free for open source-code hosting and facilitates team work. Includes source-code browser, in-line editing, and wikis.

Dockerhub is an apps project hosting.

Dockerhub nselem

EvoMining code is open source and it is available at a GitHub repository [github/EvoMining](https://github.com/EvoMining)

GitHub and Dockerhub can be connected by the use of repositories automatically built. Among the advantages of automated builds are that the DockerHub repository is automatically kept up-to-date with code changes on GitHub and that its Dockerfile is available to anyone with access to the Docker Hub repository. EvoMining is stored on

a DockerHub automated build repository linked to github EvoMining repository so that code is always actualized.

To download EvoMining image from docker Hub once Docker engine is installed its necessary to run the following command at a terminal:

```
docker pull nselem/newevomining
```

To run EvoMining container

```
docker run -i -t -v /home/nelly/docker-evomining:/var/www/html -p
80:80 evomining /bin/bash
```

To start evoMining app `perl startEvomining`

“ Detailed tutorial, EvoMining description, pipeline and user guide are available at a wiki on github at EvoMining wiki.

Other genomic apps were containerized to docker images during this work.

- *myRAST* docker- <https://github.com/nselem/myrast>

RAST is a bacterial and Archaeal genome annotator [48] This app allows myRAST functionality to upload

It allows EvoMining genome database annotation.

-*Orthocores* docker-<https://github.com/nselem/orthocore>

Helps to obtain genomic core paralog free and construct genomic trees

-*CORASON* docker-<https://github.com/nselem/EvoDivMet/wiki>

-PseudoCore github- <>

Genomic Core with a reference genome has the advantage of more genomes, but it is not paralog free

-RadiCal docker image

To detect core differences on a set of genomes

-BPGA to analyze pangenome

EvoMining Dockerization was chosen to avoid future compatibility problems, for example dependencies unavailability, or incompatibility between future versions of its software components. As much as reproducible research was a concern while developing EvoMining app, reproducibility is also important on data analysis, for that reason this document was written using R-markdown and latex template from Reed College [82]. While R-markdown allows to write and run R code and interpolate text paragraph to explain scripts and analysis.

## 1.6 EvoMining Databases

Evomining containerized app is a user-interactive genomic tool dedicated to the study of protein function[].

1. Genomes DB
2. Natural Products DB

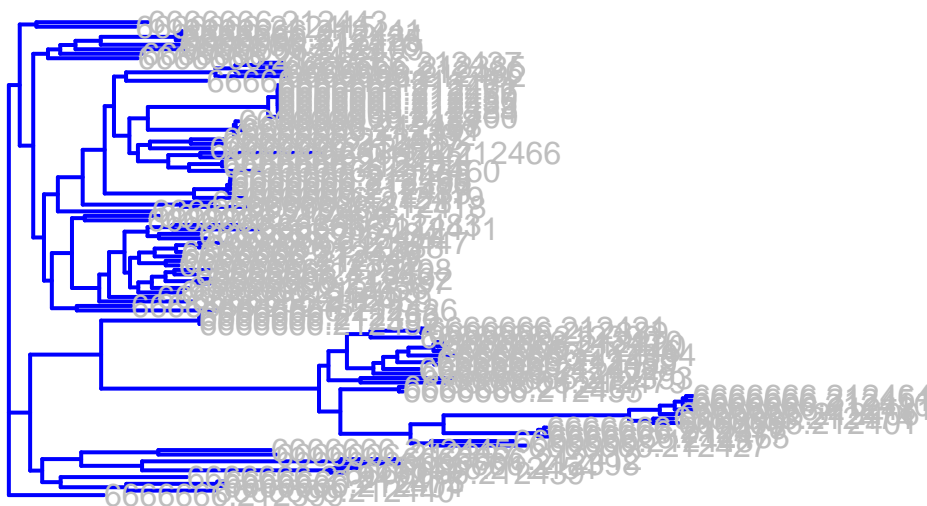
### 3. Central Pathways DB

*Archaea*, *Actinobacteria*, *Cyanobacteria* were used as genome DB, MIBiG was used as Natural Product DB and different Central Pathways were used.

### Genome DB

RAST annotation of genomes was done.

### Phylogeny



To capture differences on genomes we sort them phylogenetically. Phylogenies can be constructed using different paradigms as Parsimony, Maximum Likelihood, and Bayesian inference. Short descriptions of the main phylogeny methods are included below.

Why is a tree useful {Book reference} why trees are useful for?

\* Distance methods

\* Parsimony \* Maximum Likelihood \* Mr bayes

General Trees

Actinobacteria Tree, ArchaeaTree, CyanobacteriaTree.

It's easy to create a list. It can be unordered like

To create a sublist, just indent the values a bit (at least four spaces or a tab). (Here's one case where indentation is key!)

1. Item 1
2. Item 2
3. Item 3
  - Item 3a
  - Item 3b

## Central DB

We chose central pathways from [83]

\* BBH Best Bidirectional Hits with studied enzymes from Central Actinobacterial pathways were selected.

- By abundance
- By expansions on genomes

[largefiles, <https://help.github.com/articles/installing-git-large-file-storage/>]

## Natural Products DB

Natural products was improved from previous version

### 1.6.1 AntisMASH optional DB

AntiSMASH is [84]

### Archaeas Results Archaea is a kingdom of recent discovery were not many natural products has been known. On Actinobacteria, evoMining has proved its value to find new kinds of natural products. The clue to this discovery was that Actinobacteria has genomic expansions. Now Archaea has genomic expansions, even more has central pathways genomic expansions. Are this expansions derived from a genomic duplication?

Has Archaea natural products detected by antismash, and if not, where are this NP's or may Archaea doesn't have NP's.

applying EvoMining to Archaea

### 1.6.2 Otras estrategias para los clusters Argon context Idea

Argon When you click the **Knit** button above a document will be generated that includes both content as well as the output of any embedded **R** code chunks within the document. You can embed an **R** code chunk like this (`cars` is a built-in **R** dataset):

```
summary(cars)
```

speed	dist
Min. : 4.0	Min. : 2.00
1st Qu.: 12.0	1st Qu.: 26.00
Median : 15.0	Median : 36.00

Mean	:15.4	Mean	: 42.98
3rd Qu.	:19.0	3rd Qu.	: 56.00
Max.	:25.0	Max.	:120.00

### 1.6.3 Inline code

If you'd like to put the results of your analysis directly into your discussion, add inline code like this:

The `cos` of  $2\pi$  is 1.

Another example would be the direct calculation of the standard deviation:

The standard deviation of `speed` in `cars` is 5.2876444.

One last neat feature is the use of the `ifelse` conditional statement which can be used to output text depending on the result of an **R** calculation:

The standard deviation is less than 6.

Note the use of `>` here, which signifies a quotation environment that will be indented.

As you see with `$2 \pi$` above, mathematics can be added by surrounding the mathematical text with dollar signs. More examples of this are in [Mathematics and Science] if you uncomment the code in Math.

## 1.7 Recomendaciones de Luis

Para evoMining

Probar distintos métodos de filogenia y después hacer la coloración.

maximum likelihood, Protest phym

Atracción de ramas largas.

raxml

trim all vs Gblobs (Tony Galvado)

Comparar dos árboles

Para ver si la evolución de los genes concatenados ha sido simultánea

Robinson and foulds

Joe Felsenstein

Phylip

2. dist tree

quarter descomposition

peter gogarten fendou Mao

Sets de experimentos.

Para el experimento de los streptomyces con ruta centrales el core, analizar el problema de dominios múltiples.

Dominios

Nan Song, Dannie durand

Después del blast

Para obtener

Pablo Vinuesa: Get Homologues

Burkholdelias y su toxina (Preguntar a Beto)

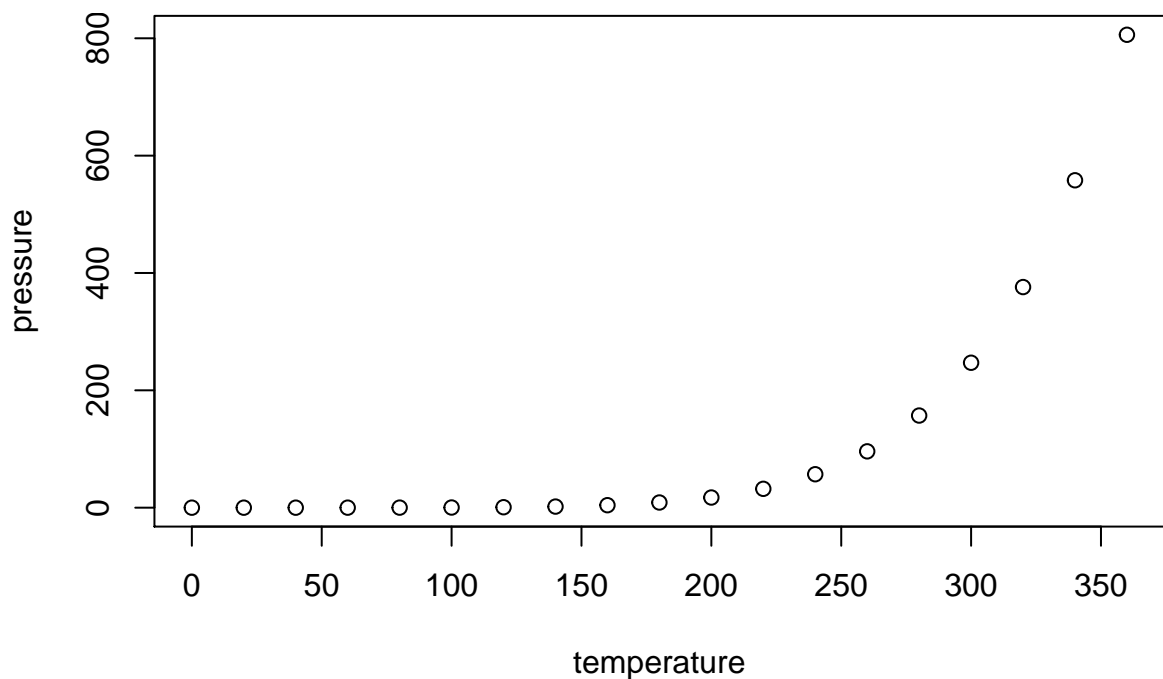
Cianobacterias y la ruta de fijación de nitrógeno.

Servidor Viernes a las 12:00

## 1.8 CORASON: Other genome Mining tools context-based

### 1.8.1 CORASoN

You can also embed plots. For example, here is a way to use the base **R** graphics package to produce a plot using the built-in `pressure` dataset:



Note that the `echo = FALSE` parameter was added to the code chunk to prevent printing of the **R** code that generated the plot. There are plenty of other ways to

add chunk options. More information is available at <http://yihui.name/knitr/options/>.

Another useful chunk option is the setting of `cache = TRUE` as you see here. If document rendering becomes time consuming due to long computations or plots that are expensive to generate you can use knitr caching to improve performance. Later in this file, you'll see a way to reference plots created in **R** or external figures.

## 1.9 Loading and exploring data

Included in this template is a file called `flights.csv`. This file includes a subset of the larger dataset of information about all flights that departed from Seattle and Portland in 2014. More information about this dataset and its **R** package is available at <http://github.com/ismayc/pnwflights14>. This subset includes only Portland flights and only rows that were complete with no missing values. Merges were also done with the `airports` and `airlines` data sets in the `pnwflights14` package to get more descriptive airport and airline names.

We can load in this data set using the following command:

```
flights <- read.csv("data/flights.csv")
```

The data is now stored in the data frame called `flights` in **R**. To get a better feel for the variables included in this dataset we can use a variety of functions. Here we can see the dimensions (rows by columns) and also the names of the columns.

```
dim(flights)
```

```
[1] 52808    16
```

```
names(flights)
```

```
[1] "month"      "day"        "dep_time"   "dep_delay"
[5] "arr_time"   "arr_delay"  "carrier"    "tailnum"
[9] "flight"     "dest"       "air_time"   "distance"
[13] "hour"       "minute"     "carrier_name" "dest_name"
```

Another good idea is to take a look at the dataset in table form. With this dataset having more than 50,000 rows, we won't explicitly show the results of the command here. I recommend you enter the command into the Console *after* you have run the **R** chunks above to load the data into **R**.

```
View(flights)
```

While not required, it is highly recommended you use the `dplyr` package to manipulate and summarize your data set as needed. It uses a syntax that is easy to understand using chaining operations. Below I've created a few examples of using `dplyr` to get



information about the Portland flights in 2014. You will also see the use of the `ggplot2` package, which produces beautiful, high-quality academic visuals.

We begin by checking to ensure that needed packages are installed and then we load them into our current working environment:

```
# List of packages required for this analysis
pkg <- c("dplyr", "ggplot2", "knitr", "devtools")
# Check if packages are not installed and assign the
# names of the packages not installed to the variable new.pkg
new.pkg <- pkg[!(pkg %in% installed.packages())]
# If there are any packages in the list that aren't installed,
# install them
if (length(new.pkg))
  install.packages(new.pkg, repos = "http://cran.rstudio.com")
# Load packages
library(dplyr)
library(ggplot2)
library(knitr)
```

The example we show here does the following:

- Selects only the `carrier_name` and `arr_delay` from the `flights` dataset and then assigns this subset to a new variable called `flights2`.
- Using `flights2`, we determine the largest arrival delay for each of the carriers.

```
flights2 <- flights %>% dplyr::select(carrier_name, arr_delay)
max_delays <- flights2 %>% group_by(carrier_name) %>%
  summarize(max_arr_delay = max(arr_delay, na.rm = TRUE))
```

We next introduce a useful function in the `knitr` package for making nice tables in *R Markdown* called `kable`. It produces the  $\text{\LaTeX}$  code required to make the table and is much easier to use than manually entering values into a table by copying and pasting values into Excel or  $\text{\LaTeX}$ . This again goes to show how nice reproducible documents can be! There is no need to copy-and-paste values to create a table. (Note the use of `results = "asis"` here which will produce the table instead of the code to create the table. You'll learn more about the `\label` later.) The `caption.short` argument is used to include a shorter version of the title to appear in the List of Tables at the beginning of the document.

```
kable(max_delays, col.names = c("Airline", "Max Arrival Delay"),
      caption = "Maximum Delays by Airline \\label{tab:max_delay}",
      caption.short = "Max Delays by Airline")
```

Table 1.1: Maximum Delays by Airline

Airline	Max Arrival Delay
Alaska Airlines Inc.	338
American Airlines Inc.	1539
Delta Air Lines Inc.	651
Frontier Airlines Inc.	575
Hawaiian Airlines Inc.	407
JetBlue Airways	273
SkyWest Airlines Inc.	421
Southwest Airlines Co.	694
United Air Lines Inc.	472
US Airways Inc.	347
Virgin America	366

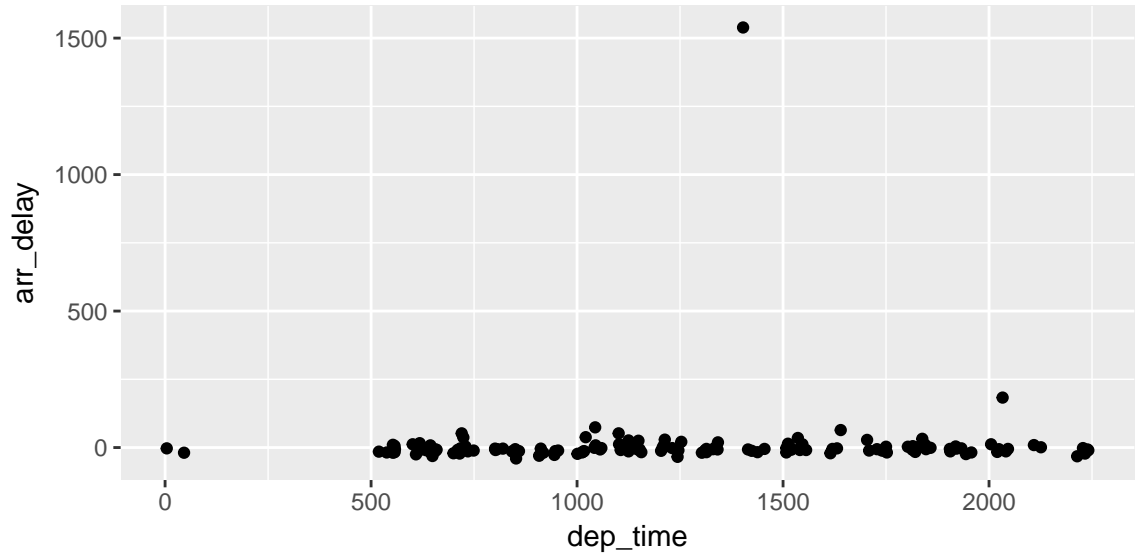
We can further look into the properties of the largest value here for American Airlines Inc. To do so, we can isolate the row corresponding to the arrival delay of 1539 minutes for American in our original `flights` dataset.

```
flights %>% dplyr::filter(arr_delay == 1539,
                        carrier_name == "American Airlines Inc.") %>%
  dplyr::select(-c(month, day, carrier, dest_name, hour,
                  minute, carrier_name, arr_delay))
```

```
  dep_time dep_delay arr_time tailnum flight dest air_time distance
1    1403      1553    1934  N595AA   1568  DFW       182      1616
```

We see that the flight occurred on March 3rd and departed a little after 2 PM on its way to Dallas/Fort Worth. Lastly, we show how we can visualize the arrival delay of all departing flights from Portland on March 3rd against time of departure.

```
flights %>% dplyr::filter(month == 3, day == 3) %>%
  ggplot(aes(x = dep_time, y = arr_delay)) +
  geom_point()
```





# Chapter 2

## PriA Family

- Julian simulation
- Who has TrpF

```
# List of packages required for this analysis
pkg <- c("dplyr", "ggplot2", "knitr", "devtools", "reshape", "RColorBrewer")
# Check if packages are not installed and assign the
# names of the packages not installed to the variable new.pkg
new.pkg <- pkg[!(pkg %in% installed.packages())]
# If there are any packages in the list that aren't installed,
# install them
if (length(new.pkg))
  install.packages(new.pkg, repos = "http://cran.rstudio.com")
```

Warning: package 'reshape' is not available (for R version 3.3.2)

```
# Load packages
library(dplyr)
library(plyr)
library(reshape )
library(ggplot2)
library(knitr)
library(RColorBrewer)
hm.palette <- colorRampPalette(rev(brewer.pal(11, 'Spectral'))), space='Lab')
```

### 2.1 Math

Docking simulation were calculated for Streptomyces enzymes

Procedures can be found at Docking Protocols

1. Phylogenetic Tree 39 Streptomyces sequences, as outgroup E coli, Arthrobacter

Aureus, Salmonella enterica and Acidimicrobium ferrooxidans PriA's were included.

CORASON PriA All streptomyces have a partially conserved PriA cluster. CT34 has a secondary copy whose Best hit on NCBI is Lentzea's PriA with 50% identity 98% coverage

TrpF1 TrpF1 queries gave hits with TrpC enzyme present on every Streptomyces, additionally S rimosus, S coelicolor, S venezuelae and S. NRRL S-1813 had an extra copy. S rimosus TrpC vicinity has PKS and siderophore genes.

TrpF2 Conserved cluster with NRPS sequences flanking TrpF2

TrpF3 Non conserved cluster

TrpF4 purpeofuscus and S bikiniensis 2. Heatmap Additionally to the sequences selected by phylogeny, Jonesia denitrificans and Streptomyces sp Mg1 TrpF sequences were added as control .

```
library(genstats)
library(devtools)
library(Biobase)
```

Loading required package: BiocGenerics

Loading required package: parallel

Attaching package: 'BiocGenerics'

The following objects are masked from 'package:parallel':

```
clusterApply, clusterApplyLB, clusterCall, clusterEvalQ,
clusterExport, clusterMap, parApply, parCapply, parLapply,
parLapplyLB, parRapply, parSapply, parSapplyLB
```

The following objects are masked from 'package:dplyr':

```
combine, intersect, setdiff, union
```

The following objects are masked from 'package:stats':

```
IQR, mad, xtabs
```

The following objects are masked from 'package:base':

```
anyDuplicated, append, as.data.frame, cbind, colnames,
do.call, duplicated, eval, evalq, Filter, Find, get, grep,
grepl, intersect, is.unsorted, lapply, lengths, Map, mapply,
match, mget, order, paste, pmax, pmax.int, pmin, pmin.int,
Position, rank, rbind, Reduce, rownames, sapply, setdiff,
```

```
sort, table, tapply, union, unique, unsplit, which, which.max,
which.min
```

Welcome to Bioconductor

```
Vignettes contain introductory material; view with
'browseVignettes()'. To cite Bioconductor, see
'citation("Biobase")', and for packages 'citation("pkgname")'.
```

```
sessionInfo()
```

```
R version 3.3.2 (2016-10-31)
Platform: x86_64-pc-linux-gnu (64-bit)
Running under: Ubuntu 14.04.5 LTS
```

locale:

```
[1] LC_CTYPE=en_US.UTF-8      LC_NUMERIC=C
[3] LC_TIME=es_MX.UTF-8      LC_COLLATE=en_US.UTF-8
[5] LC_MONETARY=es_MX.UTF-8  LC_MESSAGES=en_US.UTF-8
[7] LC_PAPER=es_MX.UTF-8     LC_NAME=C
[9] LC_ADDRESS=C             LC_TELEPHONE=C
[11] LC_MEASUREMENT=es_MX.UTF-8 LC_IDENTIFICATION=C
```

attached base packages:

```
[1] parallel stats      graphics grDevices utils      datasets methods
[8] base
```

other attached packages:

```
[1] Biobase_2.34.0      BiocGenerics_0.20.0 genstats_0.1.02
[4] RColorBrewer_1.1-2  reshape_0.8.6      plyr_1.8.4
[7] knitr_1.15.1        ggplot2_2.2.1      dplyr_0.5.0
[10] ape_4.0             reedtemplates_0.1  devtools_1.12.0
```

loaded via a namespace (and not attached):

```
[1] Rcpp_0.12.9      magrittr_1.5      munsell_0.4.3     colorspace_1.3-2
[5] lattice_0.20-34 R6_2.2.0          highr_0.6         stringr_1.1.0
[9] tools_3.3.2      grid_3.3.2        nlme_3.1-129      gtable_0.2.0
[13] DBI_0.5-1        withr_1.0.2       htmltools_0.3.5   lazyeval_0.2.0
[17] yaml_2.1.14      rprojroot_1.2     digest_0.6.12     assertthat_0.1
[21] tibble_1.2       memoise_1.0.0     evaluate_0.10     rmarkdown_1.3
[25] labeling_0.3     stringi_1.1.2     scales_0.4.1      backports_1.0.5
```

```
#vignette(package="genstats")
#vignette("01_06_three-tables")
```

```
# phenoData:
```

```
tmp <- read.csv("chapter2/ProteinData", row.names = 1,header=TRUE,sep="\t")
pdata <- AnnotatedDataFrame(tmp)

# featureData:
tmp <- read.csv("chapter2/Substrate.data", row.names = 1,sep="\t")
fdata <- AnnotatedDataFrame(tmp)

# expression data:
tmp <- read.table("chapter2/EnzymeVsSubstrate.data",row.names = 1,header=TRUE,sep="\t")
m <- as.matrix(tmp)
#dim(m)
#class(m)
#colnames(m)
#rownames(m)
## Names should not start on numbers never
## create ExpressionSet object:
eset <- new("ExpressionSet", exprs = m, phenoData = pdata, featureData = fdata)

#pData(eset)
#fData(eset)
#pData(eset)
#fData(eset)

docking <- read.csv("chapter2/Heat.data", header=TRUE, sep="\t")
docking.m <- melt(docking,id = "Enzima")
#docking.m<- ddply(docking.m, .(docking.m$variable), transform, rescale=scale(value))
## NEcesito escalar!!!

ggplot(docking.m, aes(x=docking.m$variable, y=docking.m$Enzima)) + labs(x = "Substrates")
```





Enzima	dte6_open	dte13_open	dte6_closed	dte13_closed	C04376	C03838	C04640
5AHE_Senterica	-9.1	-5.4	-6.4	-5.2	-8	-7.3	-7.4
Coli_K12	-9.7	-9.7	-9.2	-6.1	-7.2	-6.6	-6.8
Acidimicrobium	-5.7	-5.8	-6	-5.7	-6.7	-6.2	-5.8
JOAQ01	-7.4	-7.3	-7.5	-7.1	-6.5	-6.2	-6.5
2VEP	-7.5	-7.5	-7.9	-7	-7	-6.2	-6.5
2X30	-8.1	-7.4	-7.6	-6.9	-6.7	-6.8	-7.1
1VZW	na	na	na	na	na	na	na
JOFS01	-7.2	-6.7	-6.8	-6.5	-6.2	-6.6	-5.9
BAVY01	-7.4	-7.2	-7	-6.5	-7.3	-6.4	-7
JOCU01	-7.1	-7.6	-7.2	-7.3	-7.2	-6.8	-6.9
ABYA01	-9.2	-8.7	-6.7	-6.7	-7.4	-7.7	-7.2
JNXI01	-6.6	-7.3	-7	-7.1	-7.1	-7.1	-6.8
ABYC01	-6.3	-7.1	-7.4	-6.8	-7.7	-6.9	-6.6
JOFG01	-7.3	-8.8	-7.5	-6.7	-7	-6.5	-6.5
JNZV01	-8.9	-6.6	-6.7	-6.8	-7.2	-7.2	-6.2
AJUO01	-6.1	-6.8	-6.9	-6.5	-6.7	-6.3	-6.7
JNXH01	-9	-6.9	-7.1	-6.8	-6.3	-7.2	-6.6
JOFC01	-6.6	-8.2	-7.1	-6.4	-7.1	-7.4	-7.1
JNWL01	-7.4	-6.7	-7.4	-7.3	-7.7	-6.5	-6.8
AJSZ01	-6.9	-7.5	-7.9	-7.8	-7.5	-7.3	-7.7
10712	-8.3	-7.6	-7.5	-6.8	-6.4	-7	-6.2
JSFP01	-7.8	-7.2	-7.6	-7.3	-6.2	-6.5	-6.9
JJNO01	-7.4	-6.8	-7.1	-7.2	-7.2	-7.4	-7.8
JQJU01	-7.6	-7.1	-7.5	-7.4	-6.2	-6.5	-6.9
JOHB01	-7.5	-6.7	-6.8	-6.6	-6.8	-7	-6.7
JOBF01	-6.3	-6.8	-7	-6.3	-6.9	-6.9	-6.6
JNAD01	-7.3	-7	-6.8	-6.6	-6.5	-7.3	-6.6
ARLC01	-7.5	-7	-6.9	-6.6	-6.6	-6.7	-6.9
JODL01	-8	-7.3	-6.9	-6.6	-7.2	-6.7	-6.1
ADGD01	-6.4	-7.7	-7.4	-7.2	-7.6	-7.5	-7.2
ARTP01	-9.6	-10.9	-8.9	-7.1	-6	-6.2	-6.7
AEJC01	-6.6	-6.6	-7.3	-6.9	-6.5	-6.3	-6.5
ABJJ02	-5.9	-8.2	-7.1	-6.6	-6.8	-7	-7.6
4U28	na	na	na	na	na	na	na
4TX9	na	na	na	na	na	na	na
JOBU01	-8	-7.1	-6.7	-6.9	-6.6	-6.8	-6.7
JNZG01	-7.8	-7.2	-7.6	-7.2	-7.4	-6.9	-7.4
JNZY01	-6.4	-7	-7.1	-6.7	-7.7	-6.3	-6.2
JNZH01	-7.5	-6.9	-6.8	-6.8	-6.5	-6.6	-6.5
ACEW01	-7.4	-6.9	-7.3	-6.8	-7.3	-6.6	-7.5
ATCJ01	-6.5	-6.9	-7.2	-7.1	-6.5	-6.9	-6.4

Enzima	dte6_open	dte13_open	dte6_closed	dte13_closed	C04376	C03838
4X9S	na	na	na	na	na	na
4W9T	na	na	na	na	na	na
AWQW01	-6.2	-6.8	-7.4	-6.5	-7.8	-6.8
JOFK01	-7.6	-6.7	-7.1	-7.2	-7.1	-6.5
JODS01	-6.8	-7.3	-6.9	-6.7	-8	-7.9
TC1	-8.2	-8.5	-8.1	-7.9	-5.7	-5.5
4WD0_TC1	na	na	na	na	na	na
Auro 4X2R	-9.9	-9.1	-9.8	-8.1	-7.4	-7.1
Acardi_b2	-10.6	-9.3	-9.3	-7.2	-7.2	-6.8
JNZF01	-6.9	-6.8	-7.5	-7.1	-7.8	-7.3
2Y88	-10	-7.8	-8.9	-5.4	-8.6	-7.3
2Y89	-8.7	-8.6	-9.6	-9.4	-6.4	-5.9
2Y85	-8.2	-7.9	-9.2	-7.4	-7.6	-7.5
3ZS4	-10	-10.5	-11.4	-6.4	-8.2	-7.2
diphtheriae	-9.2	-7.8	-10.9	-7.2	-7.5	-7.6
jeikeium	-7.5	-6.9	-7.2	-6.5	-8.4	-8
JSFP01_2	-7.4	-8	-7.6	-6.4	-5.2	-5.4
TrpF Jonesia 4WUI	-8.3	-8.8	-8.2	-6.8	-6.2	-6.1
trachomatis	-8.2	-8	-7.4	-7.2	-6.1	-5.5
mg1	-7.2	-8.8	-8.2	-7.3	-6.2	-5.7
Aodo_b12	-8.5	-8.6	-8.8	-7.3	-7.1	-7.1

We can further look into the properties of the largest value here for American Airlines Inc. To do so, we can isolate the row corresponding to the arrival delay of 1539 minutes for American in our original `flights` dataset.

```
#flights %>% dplyr::filter(arr_delay == 1539, carrier_name == "American Airlines")
#dplyr::select(-c(month, day, carrier, dest_name, hour, minute, carrier_name, ...))
```

We see that the flight occurred on March 3rd and departed a little after 2 PM on its way to Dallas/Fort Worth. Lastly, we show how we can visualize the arrival delay of all departing flights from Portland on March 3rd against time of departure.

```
#flights %>% dplyr::filter(month == 3, day == 3) %>%
# ggplot(aes(x = dep_time, y = arr_delay)) +geom_point()
```

Genome size vs Total antismash cluster coloured by order

Docker simulation were calculated for Streptomyces enzymes

Genome size vs Total antismash cluster coloured by order

$\text{\TeX}$  is the best way to typeset mathematics. Donald Knuth designed  $\text{\TeX}$  when he got frustrated at how long it was taking the typesetters to finish his book, which contained a lot of mathematics. One nice feature of *R Markdown* is its ability to read  $\text{\LaTeX}$  code directly.

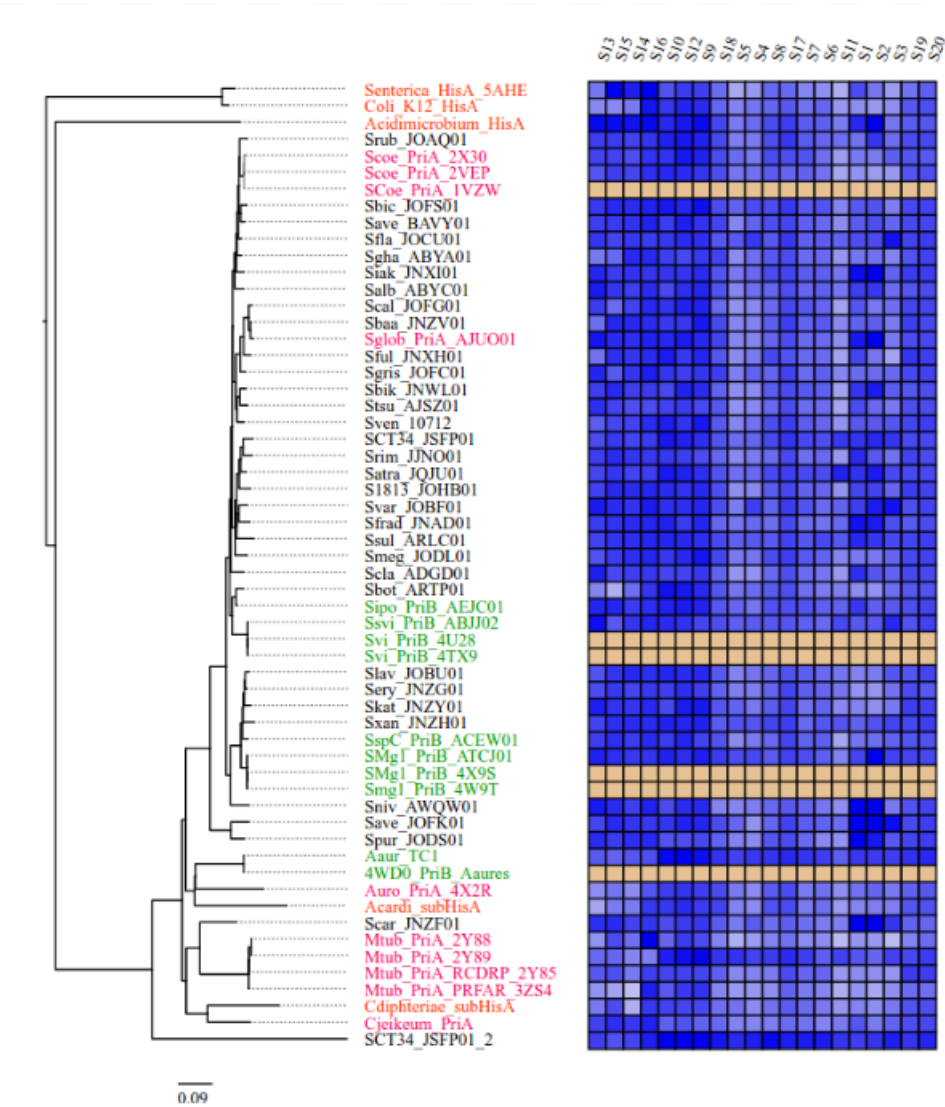


Figure 2.1: Heat Plot PriA Streptomyces vs other substrates

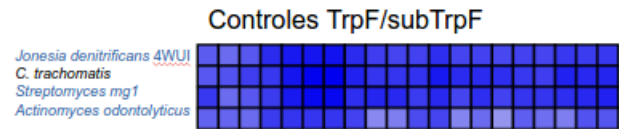


Figure 2.2: Heat Plot TrpF Streptomyces vs other substrates

If you are doing a thesis that will involve lots of math, you will want to read the following section which has been commented out. If you're not going to use math, skip over or delete this next commented section.

## 2.2 Chemistry 101: Symbols

Chemical formulas will look best if they are not italicized. Get around math mode's automatic italicizing in L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X by using the argument  `$\mathrm{formula here}$` , with your formula inside the curly brackets. (Notice the use of the backticks here which enclose text that acts as code.)

So, Fe<sub>2</sub><sup>2+</sup>Cr<sub>2</sub>O<sub>4</sub> is written  `$\mathrm{Fe_2^{2+}Cr_2O_4}$` .

Exponent or Superscript: O<sup>−</sup>

Subscript: CH<sub>4</sub>

To stack numbers or letters as in Fe<sub>2</sub><sup>2+</sup>, the subscript is defined first, and then the superscript is defined.

Angstrom: Å

Bullet: CuCl • 7H<sub>2</sub>O

Double Dagger: ‡

Delta: Δ

Reaction Arrows:  $\longrightarrow$  or  $\xrightarrow{\text{solution}}$

Resonance Arrows:  $\leftrightarrow$

Reversible Reaction Arrows:  $\rightleftharpoons$  or  $\xrightleftharpoons{\text{solution}}$  (the latter requires the `chemarr` L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X package which is automatically loaded in this template)

### 2.2.1 Typesetting reactions

You may wish to put your reaction in a figure environment, which means that L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X will place the reaction where it fits and you can have a figure caption. You'll see further description of this `\Rlabel` function in . (Note the use of the double backslash here as well as the `echo = FALSE` which hides the code from the output.)

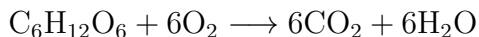
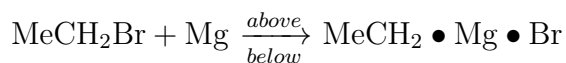


Figure 2.3: Combustion of glucose

### 2.2.2 Other examples of reactions



## 2.3 Physics

Many of the symbols you will need can be found on the math page <http://web.reed.edu/cis/help/latex/math.html> and the Comprehensive L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X Symbol Guide (<http://mirror.utexas.edu/ctan/info/symbols/comprehensive/symbols-letter.pdf>).

## 2.4 Biology

You will probably find the resources at <http://www.lecb.ncifcrf.gov/~toms/latex.html> helpful, particularly the links to bst's for various journals. You may also be interested in TeXShade for nucleotide typesetting (<http://homepages.uni-tuebingen.de/beitz/txe.html>). Be sure to read the proceeding chapter on graphics and tables.

## Chapter 3

```
{r chapter3, child = 'chap3.Rmd'}  
#
```





## Chapter 4

```
{r chapter4, child = 'chap4.Rmd'}  
#
```



## Chapter 5

```
{r chapter5, child =  
'chap5.Rmd'}
```



# Conclusion

Idea de Rosario -ver dell cluster de saxitoxin cuantos pasos se necesitan para llegar ahi.

-A donde se iria el resultado de abrir el GMP

-Otra vez, que Actinos tienen FolE

If we don't want Conclusion to have a chapter number next to it, we can add the `{.unnumbered}` attribute. This has an unintended consequence of the sections being labeled as 3.6 for example though instead of 4.1. The  $\LaTeX$  commands immediately following the Conclusion declaration get things back on track.

## More info

And here's some other random info: the first paragraph after a chapter title or section head *shouldn't be* indented, because indents are to tell the reader that you're starting a new paragraph. Since that's obvious after a chapter or section title, proper typesetting doesn't add an indent there.



# Appendix A

## The First Appendix

This first appendix includes all of the R chunks of code that were hidden throughout the document (using the `include = FALSE` chunk tag) to help with readability and/or setup.

In the main Rmd file:

```
# This chunk ensures that the reedtemplates package is  
# installed and loaded. This reedtemplates package includes  
# the template files for the thesis and also two functions  
# used for labeling and referencing  
if(!require(devtools))  
  install.packages("devtools", repos = "http://cran.rstudio.com")  
if(!require(reedtemplates)){  
  library(devtools)  
  devtools::install_github("ismayc/reedtemplates")  
}  
library(reedtemplates)
```

In :





# Appendix B

## The Second Appendix, Open source code on this document

### B.1 R markdown

Thanks to Rmakdown Thesis  
Appendix one Useful docker commands  
-Create a new repository  
`docker build . -t evomining`  
`docker push nselemevomining`

### B.2 Docker

Reinicie docker para liberar puertos  
`sudo service docker restart`  
`docker stop $(docker ps -a -q)`  
Detener todos los contenedores `docker rm $(docker ps -a -q)`  
Remover contenedores detenidos `docker rm $(docker ps -q -f status=exited)`  
Remove all images `docker rmi $(docker images -q)`  
Gblocks only runs inside folder `/var/www/html/EvoMining`  
lista contenedores  
`docker ps -a`  
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`

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

## B.3 Git

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

## B.4 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.

## B.5 Additional resources

- *Markdown* Cheatsheet - <https://github.com/adam-p/markdown-here/wiki/Markdown-Cheatsheet>
- *R Markdown* Reference Guide - <https://www.rstudio.com/wp-content/uploads/2015/03/rmarkdown-reference.pdf>
- Introduction to dplyr - <https://cran.rstudio.com/web/packages/dplyr/vignettes/introduction.html>
- ggplot2 Documentation - <http://docs.ggplot2.org/current/>

# References

1. Angel E. Interactive computer graphics : A top-down approach with openGL. Boston, MA: Addison Wesley Longman; 2000.
2. Angel E. Batch-file computer graphics : A bottom-up approach with quickTime. Boston, MA: Wesley Addison Longman; 2001.
3. Angel E. Test second book by angel. Boston, MA: Wesley Addison Longman; 2001.
4. Khersonsky O, Tawfik DS. Enzyme promiscuity: A mechanistic and evolutionary perspective. *Annual Review of Biochemistry*. 2010;79: 471–505. doi:10.1146/annurev-biochem-030409-143718
5. Copley SD. Enzymes with extra talents: Moonlighting functions and catalytic promiscuity. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2003;7: 265–272. doi:10.1016/S1367-5931(03)00032-2
6. Hult K, Berglund P. Enzyme promiscuity: Mechanism and applications. *Trends in Biotechnology*. 2007;25: 231–238. doi:10.1016/j.tibtech.2007.03.002
7. O’Brien PJ, Herschlag D. Catalytic promiscuity and the evolution of new enzymatic activities. *Chemistry & Biology*. 1999;6: R91–R105. doi:10.1016/S1074-5521(99)80033-7
8. Barona Gómez F, Hodgson DA. Occurrence of a putative ancient like isomerase involved in histidine and tryptophan biosynthesis. *EMBO reports*. 2003;4: 296–300. doi:10.1038/sj.embor.embor771
9. 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*. 2014;82: 887–896. doi:10.1002/prot.24575
10. 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*. 2007;21: 368–372. doi:10.1021/ef0602168
11. Li C, Henry CS, Jankowski MD, Ionita JA, Hatzimanikatis V, Broadbelt LJ.

- Computational discovery of biochemical routes to specialty chemicals. *Chemical Engineering Science*. 2004;59: 5051–5060. doi:10.1016/j.ces.2004.09.021
12. Glasner ME, Gerlt JA, Babbitt PC. Evolution of enzyme superfamilies. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2006;10: 492–497. doi:10.1016/j.cbpa.2006.08.012
  13. Baier F, Copp JN, Tokuriki N. Evolution of Enzyme Superfamilies: Comprehensive Exploration of Sequence–Function Relationships. *Biochemistry*. 2016;55: 6375–6388. doi:10.1021/acs.biochem.6b00723
  14. Bloom JD, Romero PA, Lu Z, Arnold FH. Neutral genetic drift can alter promiscuous protein functions, potentially aiding functional evolution. *Biology Direct*. 2007;2: 17. doi:10.1186/1745-6150-2-17
  15. Nath A, Atkins WM. A Quantitative Index of Substrate Promiscuity. *Biochemistry*. 2008;47: 157–166. doi:10.1021/bi701448p
  16. 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*. 2015;32: 132–143. doi:10.1093/molbev/msu281
  17. Firm RD, Jones CG. A Darwinian view of metabolism: Molecular properties determine fitness. *Journal of Experimental Botany*. 2009;60: 719–726. doi:10.1093/jxb/erp002
  18. Jia B, Cheong G-W, Zhang S. Multifunctional enzymes in archaea: Promiscuity and moonlight. *Extremophiles*. 2013;17: 193–203. doi:10.1007/s00792-012-0509-1
  19. Aharoni A, Gaidukov L, Khersonsky O, Gould SM, Roodveldt C, Tawfik DS. The ‘evolvability’ of promiscuous protein functions. *Nature Genetics*. 2005;37: 73–76. doi:10.1038/ng1482
  20. Jensen. Enzyme Recruitment in Evolution of New Function. *Annual Review of Microbiology*. 1976;30: 409–425. doi:10.1146/annurev.mi.30.100176.002205
  21. Pandya C, Farelli JD, Dunaway-Mariano D, Allen KN. Enzyme Promiscuity: Engine of Evolutionary Innovation. *Journal of Biological Chemistry*. 2014;289: 30229–30236. doi:10.1074/jbc.R114.572990
  22. Dean AM, Thornton JW. Mechanistic approaches to the study of evolution. *Nature reviews Genetics*. 2007;8: 675–688. doi:10.1038/nrg2160
  23. Nobeli I, Favia AD, Thornton JM. Protein promiscuity and its implications for biotechnology. *Nature Biotechnology*. 2009;27: 157–167. doi:10.1038/nbt1519
  24. Hopkins AL. Drug discovery: Predicting promiscuity. *Nature*. 2009;462: 167–168. doi:10.1038/462167a
  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*. 2010;38: 2195–2203. doi:10.1124/dmd.110.034645
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*. 2011;39: D1060–D1066. doi:10.1093/nar/gkq1037
27. Zhang W, Dourado DFAR, Fernandes PA, Ramos MJ, Mannervik B. Multidimensional epistasis and fitness landscapes in enzyme evolution. *Biochemical Journal*. 2012;445: 39–46. doi:10.1042/BJ20120136
28. Sanchez-Ruiz JM. On promiscuity, changing environments and the possibility of replaying the molecular tape of life. *Biochemical Journal*. 2012;445: e1–e3. doi:10.1042/BJ20120806
29. 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*. 2015;83: 1625–1631. doi:10.1002/prot.24847
30. Patrick WM, Quandt EM, Swartzlander DB, Matsumura I. Multicopy Suppression Underpins Metabolic Evolvability. *Molecular Biology and Evolution*. 2007;24: 2716–2722. doi:10.1093/molbev/msm204
31. Notebaart RA, Szappanos B, Kintsés 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*. 2014;111: 11762–11767. doi:10.1073/pnas.1406102111
32. Linster CL, Van Schaftingen E, Hanson AD. Metabolite damage and its repair or pre-emption. *Nature Chemical Biology*. 2013;9: 72–80. doi:10.1038/nchembio.1141
33. 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*. 2015;32: 100–108. doi:10.1093/molbev/msu271
34. 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*. 2013;20: 796–805. doi:10.1016/j.chembiol.2013.04.013
35. 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*. 2014;5. doi:10.1128/mBio.01378-

14

36. Soskine M, Tawfik DS. Mutational effects and the evolution of new protein functions. *Nature Reviews Genetics*. 2010;11: 572–582. doi:10.1038/nrg2808
37. Halachev MR, Loman NJ, Pallen MJ. Calculating Orthologs in Bacteria and Archaea: A Divide and Conquer Approach. *PLOS ONE*. 2011;6: e28388. doi:10.1371/journal.pone.0028388
38. Kislyuk AO, Haegeman B, Bergman NH, Weitz JS. Genomic fluidity: An integrative view of gene diversity within microbial populations. *BMC Genomics*. 2011;12: 32. doi:10.1186/1471-2164-12-32
39. Pearson H. Prehistoric proteins: Raising the dead. *Nature News*. 2012;483: 390. doi:10.1038/483390a
40. Hughes AL. The Evolution of Functionally Novel Proteins after Gene Duplication. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 1994;256: 119–124. doi:10.1098/rspb.1994.0058
41. Treangen TJ, Rocha EPC. Horizontal Transfer, Not Duplication, Drives the Expansion of Protein Families in Prokaryotes. *PLOS Genetics*. 2011;7: e1001284. doi:10.1371/journal.pgen.1001284
42. 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*. 1999;96: 2896–2901. doi:10.1073/pnas.96.6.2896
43. 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*. 2014;3: e03275. doi:10.7554/eLife.03275
44. 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*. 2013;502: 698–702. doi:10.1038/nature12576
45. 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*. 2015;8: 239–252. doi:10.1111/1751-7915.12175
46. 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*. 2015;43: D447–D452. doi:10.1093/nar/gku1003
47. 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*. 2000;28: 3442–3444. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/>

PMC110752/

48. Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, et al. The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics*. 2008;9:75. doi:10.1186/1471-2164-9-75
49. 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*. 2014;42: D206–D214. doi:10.1093/nar/gkt1226
50. Medema MH, Fischbach MA. Computational approaches to natural product discovery. *Nature Chemical Biology*. 2015;11: 639–648. doi:10.1038/nchembio.1884
51. 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*. 2013;30: 2024–2034. doi:10.1093/molbev/mst115
52. Carbonell P, Faulon J-L. Molecular signatures-based prediction of enzyme promiscuity. *Bioinformatics*. 2010;26: 2012–2019. doi:10.1093/bioinformatics/btq317
53. 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*. 2012;7. doi:10.1371/journal.pone.0038979
54. Nagao C, Nagano N, Mizuguchi K. Prediction of Detailed Enzyme Functions and Identification of Specificity Determining Residues by Random Forests. *PLOS ONE*. 2014;9: e84623. doi:10.1371/journal.pone.0084623
55. 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*. 2015;15. doi:10.1186/s12862-015-0378-1
56. 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*. 2012;8: e1002558. doi:10.1371/journal.pcbi.1002558
57. Nesvizhskii AI, Vitek O, Aebersold R. Analysis and validation of proteomic data generated by tandem mass spectrometry. *Nature Methods*. 2007;4: 787–797. doi:10.1038/nmeth1088
58. Campbell I. *Biophysical Techniques - Paperback - Iain D. Campbell - Oxford University Press* [Internet]. 2012. Available: <https://global.oup.com/ushe/product/biophysical-techniques-9780199642144?cc=mx&lang=en>
59. Yang JY, Sanchez LM, Rath CM, Liu X, Boudreau PD, Bruns N, et al. Molecular Networking as a Dereplication Strategy. *Journal of Natural Products*. 2013;76:

- 1686–1699. doi:10.1021/np400413s
60. Köcher T, Superti-Furga G. Mass spectrometry–based functional proteomics: From molecular machines to protein networks. *Nature Methods*. 2007;4: 807–815. doi:10.1038/nmeth1093
61. James LC, Tawfik DS. Conformational diversity and protein evolution – a 60-year-old hypothesis revisited. *Trends in Biochemical Sciences*. 2003;28: 361–368. doi:10.1016/S0968-0004(03)00135-X
62. Parisi G, Zea DJ, Monzon AM, Marino-Buslje C. Conformational diversity and the emergence of sequence signatures during evolution. *Current Opinion in Structural Biology*. 2015;32: 58–65. doi:10.1016/j.sbi.2015.02.005
63. Javier Zea D, Miguel Monzon A, Fornasari MS, Marino-Buslje C, Parisi G. Protein Conformational Diversity Correlates with Evolutionary Rate. *Molecular Biology and Evolution*. 2013;30: 1500–1503. doi:10.1093/molbev/mst065
64. Gatti-Lafranconi P, Hollfelder F. Flexibility and Reactivity in Promiscuous Enzymes. *ChemBioChem*. 2013;14: 285–292. doi:10.1002/cbic.201200628
65. 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 Arsenic-Organic Metabolites in Model Streptomyces. *Genome Biology and Evolution*. 2016;8: 1906–1916. doi:10.1093/gbe/evw125
66. Li L, Stoeckert CJ, Roos DS. OrthoMCL: Identification of Ortholog Groups for Eukaryotic Genomes. *Genome Research*. 2003;13: 2178–2189. doi:10.1101/gr.1224503
67. Waterhouse RM, Tegenfeldt F, Li J, Zdobnov EM, Kriventseva EV. OrthoDB: A hierarchical catalog of animal, fungal and bacterial orthologs. *Nucleic Acids Research*. 2013;41: D358–D365. doi:10.1093/nar/gks1116
68. Gao B, Gupta RS. Phylogenetic Framework and Molecular Signatures for the Main Clades of the Phylum Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : MMBR. 2012;76: 66–112. doi:10.1128/MMBR.05011-11
69. 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*. 2014;64: 3821–3832. doi:10.1099/ijs.0.063966-0
70. Zhou Z, Gu J, Li Y-Q, Wang Y. Genome plasticity and systems evolution in *Streptomyces*. *BMC Bioinformatics*. 2012;13: S8. doi:10.1186/1471-2105-13-S10-



S8

71. 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;25: 1599–1605. doi:10.4014/jmb.1504.04008
72. 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*. 2012;337: 1101–1104. doi:10.1126/science.1216861
73. Copley SD. An Evolutionary Biochemist's Perspective on Promiscuity. *Trends in biochemical sciences*. 2015;40: 72–78. doi:10.1016/j.tibs.2014.12.004
74. Divergent Evolution of Enzymatic Function: Mechanistically Diverse Superfamilies and Functionally Distinct Suprafamilies. *Annual Review of Biochemistry*. 2001;70: 209–246. doi:10.1146/annurev.biochem.70.1.209
75. 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*. 2012;109: 2966–2971. doi:10.1073/pnas.1019605109
76. 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;69: 512–526. doi:10.1007/s00239-009-9286-6
77. Merino E, Jensen RA, Yanofsky C. Evolution of bacterial trp operons and their regulation. *Current opinion in microbiology*. 2008;11: 78–86. doi:10.1016/j.mib.2008.02.005
78. 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*. 2016;473: 1141–1152. doi:10.1042/BJ20151271
79. Koonin EV. The Turbulent Network Dynamics of Microbial Evolution and the Statistical Tree of Life. *Journal of Molecular Evolution*. 2015;80: 244–250. doi:10.1007/s00239-015-9679-7
80. Narechania A, Baker RH, Sit R, Kolokotronis S-O, DeSalle R, Planet PJ. Random Addition Concatenation Analysis: A Novel Approach to the Exploration of Phylogenomic Signal Reveals Strong Agreement between Core and Shell Genomic Partitions in the Cyanobacteria. *Genome Biology and Evolution*. 2012;4: 30–43. doi:10.1093/gbe/evr121
81. Brettin T, Davis JJ, Disz T, Edwards RA, Gerdes S, Olsen GJ, et al. RASTtk: A modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. *Scientific Reports*. 2015;5:

8365. doi:10.1038/srep08365
82. chesterismay. Updated R Markdown thesis template [Internet]. Chester's R blog. 2016. Available: <https://chesterismay.wordpress.com/2016/09/01/updated-r-markdown-thesis-template/>
83. Barona-Gómez F, Cruz-Morales P, Noda-García L. What can genome-scale metabolic network reconstructions do for prokaryotic systematics? *Antonie van Leeuwenhoek*. 2012;101: 35–43. doi:10.1007/s10482-011-9655-1
84. Weber T, Blin K, Duddela S, Krug D, Kim HU, Brucoleri R, et al. antiSMASH 3.0—a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. *Nucleic Acids Research*. 2015;43: W237–W243. doi:10.1093/nar/gkv437
85. Medema MH, Blin K, Cimermancic P, Jager V de, Zakrzewski P, Fischbach MA, et al. antiSMASH: Rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Research*. 2011;39: W339–W346. doi:10.1093/nar/gkr466