

Usmjerena evolucija kao metoda u dizajnu novih katalitičkih aktivnosti enzima

Zubčić, Ivan

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:279245>

Rights / Prava: [In copyright](#)/Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-27**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Ivan Zubčić

**Usmjerena evolucija kao metoda u dizajnu
novih katalitičkih aktivnosti enzima**

Završni rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Ivan Zubčić

**Directed evolution as a method in the design
of new catalytic activities of enzymes**

Bachelor thesis

Zagreb, 2022.

Ovaj završni rad je izrađen u sklopu studijskog programa Molekularna biologija na Zavodu za biokemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom (prof. dr. sc., Ita Gruić Sovulj).

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Završni rad

Usmjerena evolucija kao metoda u dizajnu novih katalitičkih aktivnosti

Ivan Zubčić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Usmjerena evolucija je relativno nova metoda u dizajniranju već postojećih proteina. Metoda se temelji na uvođenju promjena u slijedu nukleotida DNA koja kodira za željeni protein. Nakon uvođenja promjena u željeni slijed nukleotida, pokušava se nekom metodom selekcije ili probira identificirati protein s promjenjenim svojstvima koja mogu sezati od od afiniteta eznama prema supstratu do termostabilnosti samog proteina. Važno je konstruirati pogodan sustav za probir ili selekciju koji omogućuje pronalaženje modificiranog proteina. Usmjerena evolucija je omogućila modifikaciju proteina u vidu kataliziranja novih reakcija, kataliziranju nastanka novih kemijskih veza, sintezi određenih molekula poput biogoriva i mnogih drugih mogućnosti.

Ključne riječi: usmjerena evolucija, biblioteka mutanti, ekspresijski sustavi, citokromi, biogoriva (21 stranica, 7 slika, 0 tablica, 55 literaturnih navoda, jezik izvornika: Hrvatski jezik)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: Ita Gruić Sovulj

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Bachelor thesis

Directed evolution as a method in the design of new catalytic activities of enzymes

Ivan Zubčić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Directed evolution is a relatively new method in designing already existing proteins. The method is based on the introduction of a change in the DNA sequence that codes for the desired protein. After the DNA sequence has been altered, an attempt is made by some method of selection to try to identify a protein with changed properties ranging from the affinity of enzymes to the substrate to the thermostability of the protein itself. It is important to construct a suitable screening/selection system that allows finding the modified protein. Directed evolution has made it possible to modify proteins in a way of catalyzing new reactions, catalyzing the formation of chemical bonds, synthesizing certain molecules such as biofuels and many other possibilities.

Keywords: directed evolution, library mutant, expression systems, cytochromes, biofuels
(21 pages, 7 figures, 0 tables, 55 references, original in: Croatian)
Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Ita Gruić Sovulj

Sadržaj

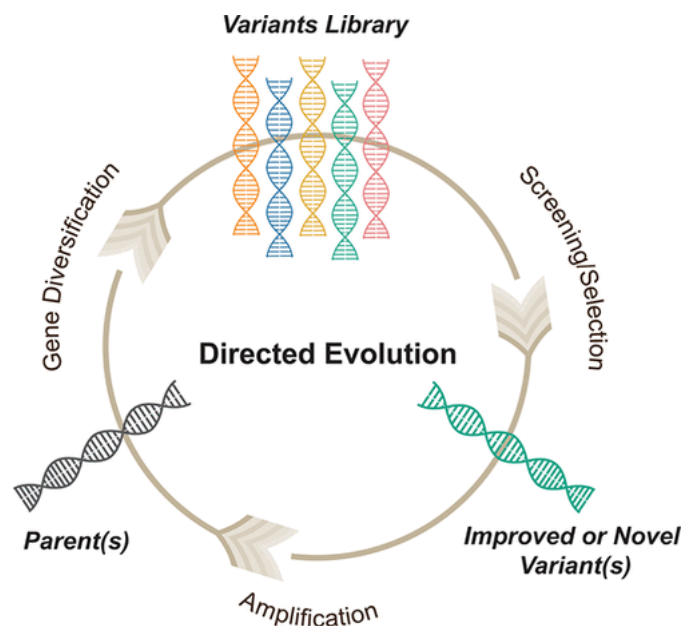
1 Uvod	1
2 Tijek rada usmjerene evolucije	2
2.1. Metode za diverzifikaciju proteinskih sekvenci.....	2
2.2. Analiza biblioteke mutanti	3
2.3. Funkcionalni ekspresijski sutavi	4
3. Usmjereni evolucija u dizajnu nekih proteina	6
3.1. Kataliza novih kemijskih reakcija – na primjeru citokroma P450	6
3.2. Sintaza biogoriva u rekombinantnoj <i>E. coli</i>	9
3.3. Sintaza novih kemijskih veza – na primjeru citokroma c	13
3. Zaključak	14
4. Literatura	15

1 Uvod

Prirodna evolucija enzima pojavljuje istodobno s prvom pojavom života na zemlji. Geni u živim organizmima mutiraju s vremenom što dovodi do promjene u proteinima za koje kodiraju (H. Allen Orr 2005). Neke promjene u proteinima mogu u konačnici dovesti do bolje adaptivne vrijednosti ili fitnesa organizma (Camps 2007). Tisućama godinama su ljudi selektivno križali životinje i biljke kako bi stvorili željena svojstva u njima. Selektivnim križanjem životinja i biljaka kroz mnogo generacija su ljudi nesvjesno optimizirali enzime i proteine koji nemaju nužno katalitičku aktivnost, već vežu druge molekule na sebe (vezujući proteini) u svoju korist. Usmjereni evolucija enzima je postupak utemeljen na molekulskim spoznajama koji omogućuje ubrzano odvijanje procesa evolucije proteina u laboratorijskim uvjetima (Wang i sur. 2021). Procedura usmjerene evolucije temelji se na generiranju različitih varijanti genomske sekvence pri određenoj razini nasumičnosti (Kuchner i sur. 1997). Dobivene varijante se probiru i izdvajaju selektivnim metodama. Usmjereni evolucija je iterativna metoda koja uključuje identifikaciju prvobitnog stanja nekog proteina, diverzifikaciju njegovog gena, ekspresiju i strategiju probira, ponovnu diverzifikaciju, ponovni probir i tako sve do zadovoljavajuće razine brzine nekog enzima ili afiniteta prema ciljanom ligandu vezujućeg proteina (S. Packer i R. Liu 2015). Usmjereni evolucija dodatno omogućuje rad proteina u novim reakcijskim uvjetima, optimiziranje katalize prema novim supstratima te katalizu novih kemijskih reakcija (Arnold H. 2018). Usmjereni evolucija enzima uvelike je proširila repertoar korisnih biokatalizatora. Promijenjeni enzimi predstavljaju učinkovitu i ekološki prihvatljivu alternativu prema metalima i organskim katalizatorima u kemijskoj i biotehnološkoj industriji (Arnold H. 2018). Usmjereni evolucija vezujućih proteina učinkovit je način stvaranja proteinskih varijanti koje imaju visok afinitet prema nekoj određenoj meti. Najbolji primjer za to su humana antitijela koja se koriste u današnjoj biomedicini (Amon i sur. 2020).

2 Tijek rada usmjerene evolucije

Usmjereni evolucija se može generalno podijeliti na dva glavna koraka što je vidljivo na Slici 1: (1) diverzifikaciju gena općom mutagenozom, rekombinacijom gena ili nekom drugom metodom kako bi se stvorila raznolika biblioteka proteinskih sekvenci ; te (2) ispitivanje i probir dobivenih mutanti na željena svojstva (Wang i sur. 2021). Bitan aspekt usmjerene evolucije je odabir prikladnog organizma domaćina u kojem je omogućena funkcionalna ekspresija ciljanog gena. Do danas, većina istraživanja povezana s usmjerenom evolucijom provedena su na bakteriji *E. coli* i *Saccharomyces cerevisiae*, međutim, uspješno su korištene i druge vrste bakterija i kvasaca kao i stanične linije sisavaca i kukaca (Pourmir i Johannes 2012).



Slika 1. Koraci unutar metode usmjerene evolucije. Prvo se roditeljska genomska sekvenca diverzificira nekom metodom kako bi se dobila biblioteka genomskih sekvenci. Nakon toga slijedi probir genomskih sekvenci koje daju željeni fenotip i njihova amplifikacija. Prilagođeno prema Wang i sur. 2021.

2.1. Metode za diverzifikaciju proteinskih sekvenci

Zamjenom nukleotida u samo jednoj genomskoj sekvenci može se dobiti golem broj različitih proteina. Taj je koncept poznat kao prostor sekvenci te opisuje ukupan broj varijanti koji se može dobiti iz jedne genomske sekvence duljine n (n predstavlja broj nukleotida u toj sekvenci) (Currin i sur. 2015). Prostor sekvenci je golem i eksperimentalno se ne može ispitati čak ni za vrlo male genomske sekvence. Prostor sekvenci malog proteina od 100 aminokiselina je $1,3 \times 10^{130}$ (20^{100} , s obzirom da postoji 20 proteinogenih aminokiselina), broj koji je veći od ukupnog broja atoma u

svemiru (Kondrashov i Kondrashov 2015). Zbog toga je potrebno ograničiti se na podskup ukupnog prostora sekvenci nad kojim se može izvršiti učinkovit probir u laboratoriju (Romero i Arnold 2013). Potrebno je stoga prije diverzifikacije same genomske sekvence znati na kojem mjestu i kako mutirati sekvencu od interesa, u čemu može pomoći prethodno znanje, podaci o karakterizaciji i strukturi proteina te računalni alati (Milton i Tokuriki 2016). Metode koje se mogu koristiti za uvođenje promjena u ishodišnoj proteinskoj sekvenci ili predviđanja u kojem dijelu sekvence je najpovoljnije uvesti mutaciju dijele se u nekoliko skupina: (1) Mutagene metode, (2) Rekombinacijske metode i (3) Računalni alati (Mate i sur. 2017). Učestala mutagena metoda je mutageni PCR. Mutageni PCR se temelji na upotrebi DNA-polimeraza koje su sklone greškama i kemikalijama koje interferiraju u radu DNA polimeraza. DNA polimeraza iz termofilne bakterije *Thermus aquaticus* (poznata kao Taq polimeraza) je često korištena u pokusima jer posjeduje visoku stopu mutacije tijekom replikacije što je uzrokovano nedostatkom 3'→5' egzonukleazne aktivnosti (Ishino i Ishino 2014). Glavna mana korištenja DNA polimeraza sklonih pogreškama je da vrlo rijetko uvode uzastopne mutacije (uvode jednu točkastu mutaciju po kodonu) (Zhao i sur. 2014). Ovaj nedostatak se može zaobići korištenjem druge mutagene metode, saturacijske mutagenze (SM), pri čemu se pojedinačni kodoni u nekoj sekvenci zamjenjuju s jednim od 20 kodona koji generiraju proteinogene aminokiseline (Georgescu i sur. 2003). Metoda miješanja DNA i njene izvedenice popularne su rekombinacijske metode za dobivanje različitih genomskih sekvenci *in vitro*. Postupak miješanja DNA odvija se u nekoliko koraka. Ishodišne roditeljske sekvence se fragmentiraju DNazom I nakon čega se fragmenti iz različitih roditeljskih sekvenci ponovno sastavljaju u ciklusima denaturacije, sljepljivanja i produljenja uz pomoć polimeraze (Stemmer 1994). Rekombinacija se događa kada fragmenti iz različitih roditeljskih sekvenci prijanjaju na području visoke homologije. Kombinacija računalnih algoritama s umjerenom evolucijom omogućuje učinkovitiju provedbu metoda poput DNA miješanja ili mutagenog PCR-a na jer se smanjuje potreba za probirom. Posljednih godina pojavile su se različite računalne metode koje iskorištavaju prednosti tisuća sekvenci i struktura pohranjenih u bazama podataka gena i proteina (Verma i sur. 2012).

2.2. Analiza biblioteke mutanti

Uz stvaranje genetske raznolikosti među genomskim sekvencama i funkcionalne ekspresije biblioteke mutanata, uspjeh eksperimenata ovisi o razvoju pouzdanih metoda za istraživanje,

selekciju ili probir željenih svojstava enzima. Metode genske selekcije omogućavaju pretragu velikih biblioteka mutanata i ne zahtijevaju posebne instrumente. Većina metoda genske selekcije funkcioniraju na način da osiguravaju rast ili preživljenje domaćina koji posjeduje enzim s evoluiranim katalitičkim profilom (Lin i Cornish 2002). Metode genske selekcije specifično su dizajnirane za prepoznavanje enzimskih aktivnosti koje su spregnute s preživljavanjem domaćina (Leemhuis i sur. 2009) te su stoga ograničene na detekciju detoksikacijskih enzima ili enzima uključenih u metabolizam domaćina (Retz i sur. 2008). Među prvim pokusima u kojima je genska selekcija upotrijebljena je pokus koji uključuje potragu za aktivnim mutantima esteraze na agar pločicama. Bakterijske kolonije koje su sintetizirale evoluiranu varijantu esteraze mogle su hidrolizirati jedan 3-hidroksi ester. Ta reakcija je popraćena stvaranjem crvene boje oko kolonije zbog pada pH vrijednosti (Bornscheuer i sur. 1998). U drugom primjeru iskorištena je usmjerena evolucija radi promjene enzima TEM-1 β -laktamaze. Cilj je bio metodom DNA miješanja dobiti promijenjenu proteinsku sekvencu TEM-1 β -laktamaze koja ima puno veći afinitet prema cefotaksimu, antibiotiku iz skupine cefalosporina. One bakterije koje su sadržavale promijenjenu genomsku sekvencu TEM-1 β -laktamaze, sintetizirale su varijantu tog enzima koji hidrolitički cijepa cefotaksim i na taj način čini bakteriju otpornom na antibiotik. U ovom primjeru je antibiotska rezistencija uzeta kao osnova genske selekcije (Stemmer 1994). U drugom pokusu je poboljšana enantioselektivnost epoksid-hidrolaze iz *Agrobacterium radiobacter* poslužila kao temelj genske selekcije. Napravljen je sustav za probir koji može detektirati aktivnu epoksid hidrolazu na agar pločicama. Agar pločice su inkubirane u prisutnosti para epoksibutana. One kolonije koje su sintetizirale novu varijantu epoksid hidrolaze mogle su konvertirati epoksibutan u pripadajući diol koji je bio potreban za vizualizaciju (Loo i sur. 2004).

2.3. Funkcionalni ekspresijski sustavi

Odabir odgovarajućeg domaćina ključan je za postizanje funkcionalne ekspresije ciljnog gena, ali često je izazovan i zahtijeva pažljivo razmatranje mnogih faktora čije je djelovanje teško predvidjeti (Butler i sur. 2003). Ekspresija stranog gena u nenativnom domaćinu često je ograničena razlikama ekspresijskog sustava nenativnog domaćina. Te razlike mogu uključivati uporabu drugih kodona, razlike u aktivnim šaperonima, drugačije posttranslacijske modifikacije poput glikozilacije ili disulfidnih mostova (Mate i sur. 2011). Neke inkompatibilnosti između

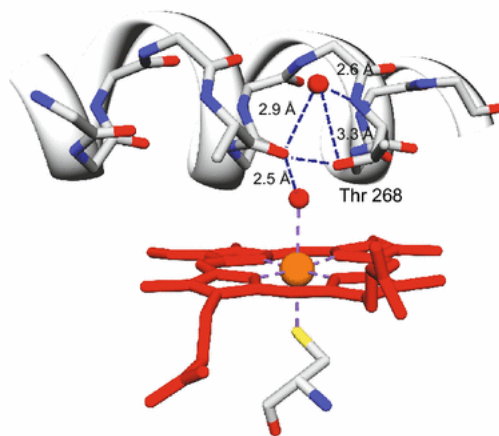
ciljnog gena i heterolognog domaćina poput prepoznavanja signalne sekvence ili uporabe kodona mogu se premostiti optimizacijom kodona u ciljnom genu (Angov i sur. 2008). Iako u teoriji svaki organizam može poslužiti kao funkcionalni ekspresijski sustav samo su neki organizmi iskorišteni u praksi. Daleko najpopularniji organizmi domaćini u istraživanjima vezana za usmjerenu evoluciju su *E. coli* i *S. cerevisiae* zbog visoke sposobnosti transformacije, brze stope rasta, dobro definiranih alata za manipulaciju i sposobnosti održavanja stabilnih plazmida (Gruchattka i sur. 2013). U zadnja dva desetljeća je gram-negativna bakterija *E. coli* definitivno najviše upotrebljen organizam u istraživanjima vezana za usmjerenu evoluciju zbog svoje relativne jednostavnosti, dobro rastumačene genetike, dostupnih vektora za kloniranje, kolekcije mutantnih sojeva i brze stope rasta (Bulter i sur. 2003). *E. coli* posjeduje visoku efikasnost transformacije ($>10^9$ transformanata po 1 μg plazmidne DNA) što je važan faktor u pripremanju velikih biblioteka mutanti (Zhang i Zhang 2011). *E. coli* nije uvijek najbolji izbor domaćina pogotovo kada se radi s enzimima čiji supstrati ne mogu biti transportirani preko stanične membrane (Zhang i Zhang 2011). U takvom slučaju, alternativni domaćin poput gram-pozitivne bakterije *Bacillus subtilis* više je prikladan. *B. subtilis* je korišten kao funkcionalni ekspresijski sustav u situacijama kad su ciljani geni kodirali za proteaze, lipaze i celulaze (Vojcic i sur. 2012). *S. cerevisiae* je najkorišteniji domaćin za evoluciju eukaritoskih proteina. *S. cerevisiae* omogućava ekspresiju biblioteke mutanata u citosolu (Maris i sur. 2004), sekreciju sintetiziranih proteina izvan stanice ili lokalizaciju proteina na površinu stanice (Traxlmayr i Obinger 2012). *S. cerevisiae* posjeduje efikasnu rekombinacijsku mašineriju koja omogućava širok spektar genetičke manipulacije što omogućava efikasnu ugradnju biblioteke mutanti u genom kvasca i njenu ekspresiju (Bulter i sur. 2003). Stanične linije sisavaca također su korištene u svrhu usmjerene evolucije za stvaranje rekombinantnih proteina koji moraju proći posttranslacijsku modifikaciju za pravilno funkcioniranje. U takve proteine se ubrajaju antitijela, hormoni i citokini (Dietmair i sur. 2012). U usporedbi s bakterijama i kvascima, stanične linije sisavaca imaju slabu produktivnost zbog niske stope rasta i tendencije prema programiranoj staničnoj smrti (apoptozi) (Dietmair i sur. 2012). Uz navedene nedostatke, upotreba staničnih linija sisavaca otežana je zbog niske efikasnosti integracije ciljnog gena, tendenciji višestruke insercije ciljnog gena u genom domaćina i relativno slabe mogućnosti kontrole ekspresije gena (Majors i sur. 2009).

3. Usmjereni evolucija u dizajnu nekih proteina

U idućim potpoglavljima biti će opisan proces usmjerene evolucije na primjerima nekolicine enzima s ciljem prikaza svestranosti same metode.

3.1. Kataliza novih kemijskih reakcija – na primjeru citokroma P450

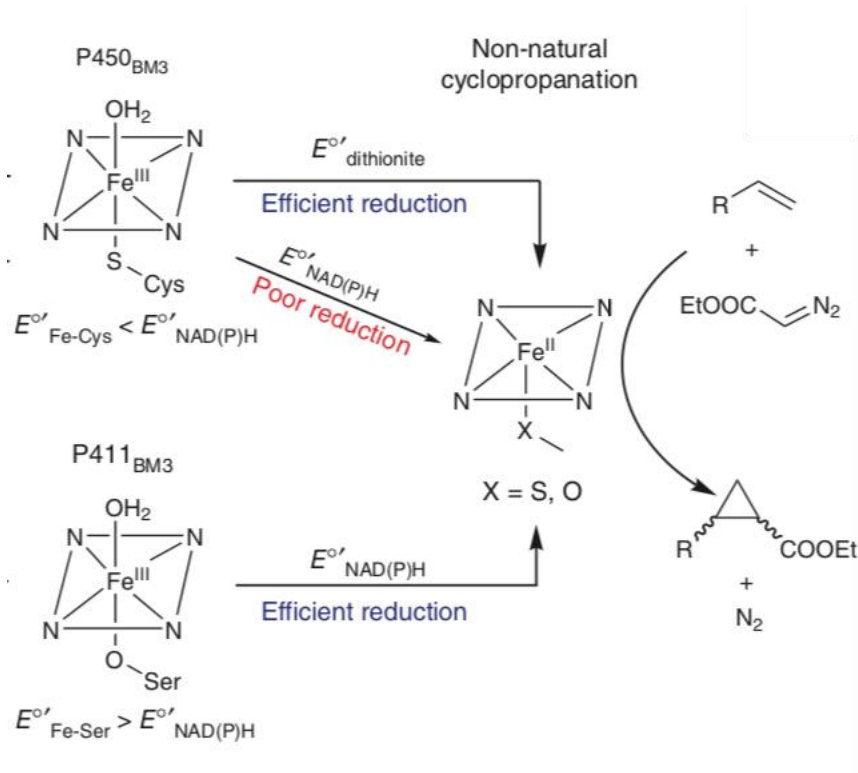
Citokrom P₄₅₀ enzimi sačinjavaju veliku obitelj proteina unutar hemoproteina koja uključuje enzime sa širokim spektrom katalitičkih aktivnosti (Nelson i sur. 1993). Važni su u biološkim sustavim jer metaboliziraju mnoge fiziološki važne spojeve. Enzimi iz skupine citokrom P450 mogu biti hidroksilaze, oksidaze miješanih funkcija i monooksigenaze. Njihova glavna funkcija je aktivirati molekularni kisik radi stvaranja reaktivne specije koja može nukleofilno napasti relativno inertne dijelove kemijskih spojeva kako bi u tim dijelovima unijela hidroksilnu skupinu. Spojevi koji su hidroksilirani podložni su konjugaciji s nekom drugom biomolekulom i na taj način se inače inertni kemijski spoj može u organizmu dalje metabolizirati. Osim hidroksilacije, citokromi P₄₅₀ kataliziraju dodatne reakcije u biološkim sustavima poput: deaminacija, dehalogenacija, epoksidacija, N-, S-, i O-dealkilacija, N-oksidacija, peroksidacija i sulfoksidacija (Pb 2002). U novije vrijeme su citokromi P450 promijenjeni usmjerenom evolucijom kako bi katalizirali reakcije za koje u prirodi nisu pronađeni enzimi. Poznato je da citokromi P450 u prirodi pokazuju kemo-, regio- i stereoselektivnost pri umetanju kisika na C–H i C=C veze pa se stoga nametnulo pitanje mogu li se citokromi P450 promijeniti na način da mimikriraju istu kemiju, ali za prijenos karbena (izvor karbena su diazoesteri) na olefine (Coehlo i sur., 2013). Za pokus je uzet P450_{BM3} iz *Bacillus megaterium*. Napravljen je panel od 92 varijante P450_{BM3} i 10 katalitički najaktivnijih su uzete za daljnju analizu. Uspostavilo se da pet od deset selektiranih P450 pokazuju bolju sposobnost katalize od divljeg tipa. Varijanta H2-5-F10 posjeduje 16 aminokiselinskih supstitucija u odnosu na divlji tip te vrši 50 puta efikasniju katalizu nego divlji tip (Coehlo i sur. 2013). Poznato je da citokromi P450 u svom aktivnom mjestu posjeduju prostetičku skupinu hem. Na Slici 2 je prikazan hem u citokromu P450.



Slika 2. Detalji kristalne strukture hem domene bakterijskog citokroma P450_{BM3}. Vidljivo je da hemsko željezo stvara šest koordinacijskih veza: četiri s dušicima iz protoporfirina, jednu s molekulom vode (crvena sfera) te jednu s proksimalnim cisteinom (žuti štapić). Preuzeto prema Denisov i sur., 2005.

U drugom pokusu je cilj bio pokušati napraviti varijantu citokrom P450_{BM3} čija se aktivnost može inducirati s endogenim staničnim reducensom NADPH-om. Citokrom P450_{BM3} katalizirana ciklopropanacija zahtijeva prisutnost određene količine reducensa. Mogu se dobiti dva aktivna katalizatora za ciklopropanaciju iz P450_{BM3}: (1) koji sadrži katalitički aktivnu hem domenu fuzioniranu s NADPH ovisnom P450 reduktaznom domenom ili (2) samo izolirana hem domena (P450_{BM3}-hem). Oba katalizatora su pokazala urednu katalitičku aktivnost u prisutnosti jakog reducensa ditionita ($E^{\circ'} = -660$ mV, svi elektrodni potencijali skalirani su prema vodikovom elektrodnom potencijalu). Katalitička aktivnost se dosta smanjila kada su katalizatori reducirani s NADPH-om ($E^{\circ'} = -320$ mV), umjesto ditionitom. Smanjena katalitička aktivnost u prisutnosti NADPH-a ukazuje na nisku supstrat induciranu promjenu P450 željeza iz stanja niskog spina ($E^{\circ'} \text{Fe}^{\text{III/II}} = -430$ mV) u stanje visokog spina ($E^{\circ'} \text{Fe}^{\text{III/II}} = -290$ mV). Vidljivo je iz svih vrijednosti elektrodnih potencijala da ako željezo nije u stanju visokog spina ($E^{\circ'} \text{Fe}^{\text{III/II}} = -290$ mV), nego u stanju niskog spina ($E^{\circ'} \text{Fe}^{\text{III/II}} = -430$ mV) da NADPH nije dovoljno jak reducens ($E^{\circ'} = -320$ mV), koji može donirati elektron željezu (Ost i sur. 2001). Smatralo se da je razlog zašto NADPH slabo inducira promjenu P450 željeza iz stanja niskog u visoki spin zato što enzim P450_{BM3} ima niski afinitet prema neprirodnim supstratima (slabo vezanje supstrata implicira $K_M \sim 5$ mM) (Coelho i sur. 2013). Pretpostavka je bila da ako se poveća elektrodni potencijal željeza u stanju niskog spina da bi NADPH mogao reducirati enzim i omogućiti katalizu. Elektrodni

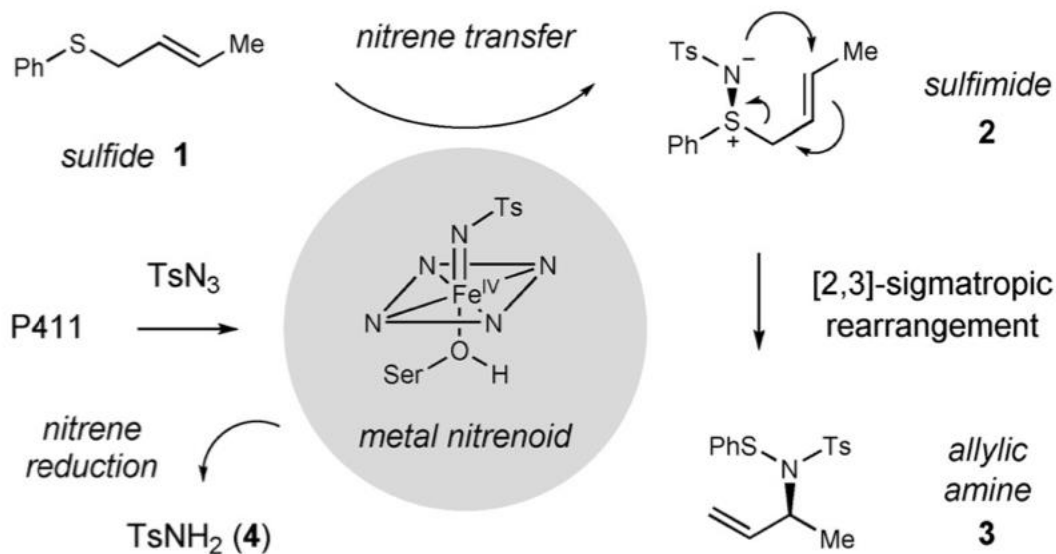
potencijal hem proteina može se moduirati mutacijom aksijalnog liganda (Wuttke i Gray 1993). Cilj je bio mutirati u P450_{BM3} aksijalni cistein (Slika 2) u slabiju Lewisovu kiselinu koja bi u ovom slučaju bila serin. Takva mutacija bi za uzrok imala povišeni elektrodni potencijal u željezu niskog spinskog stanja. Na Slici 3 su vidljive hem skupine iz P450_{BM3} koje su jednom primjeru kompleksirane cisteinom, a u drugom s serinom. Varijanta proteina P450_{BM3} koja posjeduje aminokiselinsku supstituciju Cys → Ser dobiva naziv P411_{BM3} zato što apsorpcijski maksimum ostvaruje pri valnoj duljini od 411 nm kada je enzim kompleksiran ugljikovim monoksidom. Rezultati pokusa su pokazali da je P411_{BM3} uspješno reduciran od strane NADPH i da je time omogućena in vivo ciklopropanacija spojeva (Coehlo i sur., 2014).



Slika 3. Vidljive su dvije varijante citorkoma: P450_{BM3} i P411_{BM3}. NADPH jedino može efikasno reducirati P411_{BM3} dok se P450_{BM3} slabo reducira. Jednom kada se Fe(III) reduciralo u Fe(II) može doći do ciklopropanacije.

Prilagođeno prema Steck i sur., 2020.

U jednom drugom primjeru pokazano je da hemproteini (specifično P411) mogu katalizirati prijenos nitrena, također klasa reakcije koja nije pronađena u prirodi (Singh i sur. 2015). Na slici 4 je vidljiv mehanizam kojim hemproteini katalitički djeluju i prenose nitrensku skupinu.



Slika 4. Hemprotein (P411) katalizirani prijenos nitrenske skupine. Prilagođeno prema Prier i sur., 2016.

Vidljivo je na Slici 4 da željezo iz hema prvo reagira s nitrenskim prekursorom (ovdje je to TsN₃ = sulfonilski azid) kako bi se stvorio željezni nitrenoid. Taj reaktivni intermedijer nadalje reagira s nukleofilom (u ovom primjeru sulfid) što za posljedicu ima stvaranje sulfimida. Sulfimid zatim proživljava intramolekularno [2,3]-sigmatropno pregrađivanje što rezultira aminiranim spojem (alilni amin) (Pirer i sur. 2016). Na ovaj način je dobiven novi biokatalitički put za dobivanje alilnih amina, spojeva koji su biološki aktivni (Choi i sur. 2002) i vrijedni sintetski intermedijeri (Steck i sur. 2020).

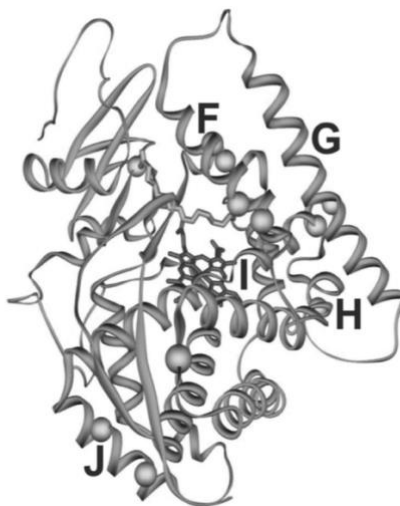
3.2. Sinteza biogoriva u rekombinantnoj *E. coli*

Jedan od dugoročnih izazova za budućnost je pronalaženje odgovarajućih zamjena za fosilna goriva koja se mogu proizvesti na održiv i ekološki prihvatljiv način. Jedna ekološki prihvatljiva solucija bila bi konverzija alkana u alkohol. Pretvorba alkana u alkohol jest reakcija oksidacije odnosno uvođenja kisika u alkan, međutim takva selektivna oksifunkcionalizacija ugljikovodika predstavlja i u današnjici veliki izazov u kemiji. Za takav poduhvat je opet uzeta P450_{BM3} koja je podvrgnuta koracima usmjerene evolucije: (1) općoj mutagenezi, (2) *in vitro* rekombinaciji i (3) visokoprotočnom probiru kako bi se ova monooksigenaza, koja u staničnim uvjetima uvodi kisik u masne kiseline, konvertirala u enzim koji hidroksilira heksan i druge alkane podjednako dobro

(Glieder i sur. 2002). Nakon 5 generacija mutageneze i probira dobivena je mutanta P450_{BM3-139-3} s visokom aktivnošću hidroksilacije. Stope hidroksilacije P450_{BM3-139-3} tekućih alkana je viša od one koju pokazuje divlji tip P450_{BM3} prema svojim supstratima (masne kiseline). Kao što je prije već navedeno, hem skupina unutar enzima može biti u dva stanja: stanje visokog i niskog spina. Prijelaz iz niskog u visoko stanje spina povećava elektrodni potencijal hema što omogućava hidroksilaciju. Prijelaz je u mutantni induciran vezanjem supstrata (u ovom slučaju različiti alkani), dok je u divljem tipu induciran vezanjem masne kiseline. Kristalna struktura divljeg tipa P450_{BM3} u kompleksu sa supstratom i bez supstrata ukazuje na velike konformacijske promjene u aktivnom mjestu tijekom vezanja supstrata (Haines i sur. 2001). Kristalna struktura bez supstrata pokazuje otvoreni kanal u kojem je smješteno 17-21 uređenih molekula vode. Vezanje supstrata služi kao konformacijski okidač koji zatvara kanal, dehidrira aktivno mjesto, povisuje elektrodni potencijal hema i omogućava vezanje kisika. Na Slici 5 prikazana je kristalna struktura P450_{BM3-139-3} sa svojih 11 supstitucijskih mutacija.

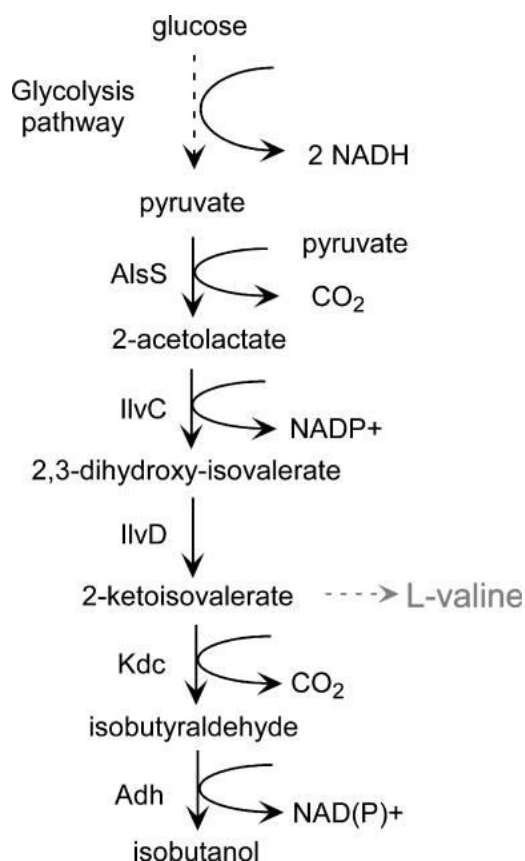
**Mutant
BM-3 139-3**

V78A
H138Y
T175I
V178I
A184V
H236Q
E252G
R255S
A290V
A295T
L353V



Slika 5. Pozicije aminokiselinskih supstitucija u P450_{BM3-139-3} mutanti (mutacije su označene sivim sferama). 5 od 11 mutacija nalazi se na fleksibilnoj F-G heliks-petlja-heliks strukturi i I heliksu. Prilagođeno prema Bastian i sur., 2011.

F i G heliksi koji su vidljivi na Slici 5 imaju funkciju poklopca koji se zatvara uslijed vezanja supstrata. Za promjenu katalitičke specifičnosti potrebno je mutirati aminokiseline koje su uključene u prepoznavanju i vezanju supstrata. Samo je jedna aminokiselina koja je u direktnom kontaktu sa supstratom u divljem tipu enzima supstituirana u mutanti P450_{BM3-139-3} (V78A). Smatralo se da aminokiseline Arg47, Tyr51, Phe42 i Phe87 imaju esencijalnu ulogu u prepoznavanju masnih kiselina u divljem tipu enzima (Noble i sur. 1999). Arg47, Tyr51 i Phe42 nalaze se na ulazu supstrat-vezujućeg džepa. Arg47 i Tyr51 ostvaruju elektrostatske što s karboksilnom skupinom nadolazeće masne kiseline dok Phe42 služi kao vratašca supstrat-vezujućeg džepa. Sve ove aminokiseline sačuvane su u P450_{BM3-139-3} što ukazuje da njihove interakcije nisu specifične prema masnim kiselinama. Ionski most između Arg225 i Asp217 u kristalnoj strukturi divljeg tipa bez supstrata narušen je R225S mutacijom u P450_{BM3-139-3}. Ova mutacija može biti uzrok konformacijskoj promjeni koja uzrokuje veći afinitet prema vezanju alkana. Saznanje da mali broj mutaciju u proteinskoj sekvenci enzima P450 može stvoriti nespecifičnu (širok spektar supstrata) hidroksilazu s visokom aktivnošću ukazuje na to da nema selektivne prednosti u prirodi za maksimiziranjem aktivnosti ovog enzima. Postoji mogućnost da enzim koji katalizira pretvorbu širokog spektra supstrata s visokom aktivnošću može biti toksičan za domaćina kao što je to u *E. coli*. Vidljivo je da prirodna selekcija nije maksimizirala aktivnosti mnogih citokrom P450, pogotovo onih u sisavaca, koje imaju aktivnost slabiju za 2 reda veličine u odnosu na bakterijski analog P450_{BM3}. Čak P450_{BM3} enzim ne operira pri svom maksimalnom katalitičkom potencijalu. Usmjerenja evolucija enzima u laboratoriju koji ne katalizira reakcije u svom prirodnom okolišu može dovesti do novih funkcija i svojstava u enzimu koja nisu biološki relevantna i potencijalno ta nova svojstva mogu biti štetna za organizam koji ih sintetizira, međutim, ta nova svojstva mogu biti od biotehnoškog značaja. Još jedno ekološki prihvatljivo biogorivo je izobutanol. Izobutanol je visokoenergetski spoj, posjeduje nizak tlak pare i visoki oktanski broj. Izgara poput benzina u motoru s unutrašnjim izgaranjem, međutim za razliku od benzina ne utječe negativno na rad i performanse motora (Bruno i sur. 2010). Metaboličkim inženjeringom napravljen je biosintetski put u bakteriji *E. coli* (Atsumi i sur. 2010) koji je prikazan na Slici 6.



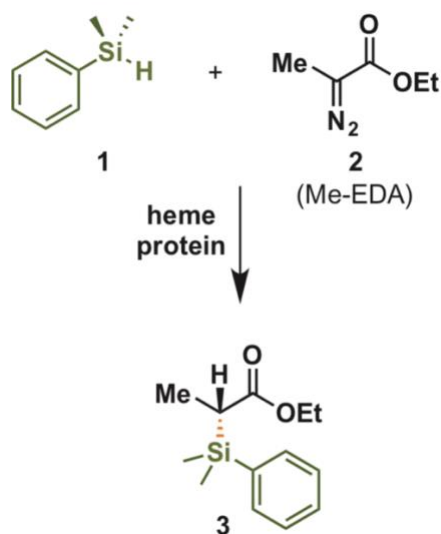
Slika 6. Biosintetski put proizvodnje izobutanola iz glukoze u rekombinantnoj *E. coli*. Prilagođeno prema Atsumi i sur., 2010.

Biosintetski put sa Slike 6 uspješno je iskorišten u proizvodnji izobutanola u aerobnim uvjetima dok je proizvodnja u anaerobnim uvjetima bila nezadovoljavajuća. Za veliku proizvodnju izobutanola potrebni su anaerobni uvjeti jer se tako postižu manji troškovi proizvodnje i veće teoretsko iskorištenje. Pretpostavlja se da je ograničena proizvodnja izobutanola u anaerobnim uvjetima uzrokovana neravnotežom kofaktora NADH i NADPH. Dva od pet enzima iz metaboličkog puta su NADPH ovisni: (1) IlvC (ketol-kisela reduktoizomeraza) i (2) Adh (alkohol dehidrogenaza) (Slika 6). Konverzija glukoze u izobutanol stoga zahtijeva dva ekvivalenta NADPH-a. U anaerobnim uvjetima jedini metabolički put koji proizvodi NADPH u bakteriji *E. coli* jest glikoliza. Ova neravnoteža kofaktora se ne može riješiti putem pentoze fosfata (PPP) ili ciklusom limunske kiseline (TCA) jer su ti metabolički putevi funkcionalni u bakteriji samo u prisutnosti kisika. Ponuđeno je rješenje da se enzimi koji su ovisni o NADPH-u zamijene s analogima koji ovise o NADH-u. Zamjena alkohol-dehidrogenaze s homologom koji ovisi o NADH izvediva je s obzirom na broj poznatih alkohol dehidrogenaza u prirodi koje ovise o NADH-

u (Jornvall i sur. 1987). Na primjer, AdhA iz *Lactococcus lactis* pokazala se kompatibilnom s biosintetskim putem izobutanola (Atsumi i sur. 2010). Provođenjem iterativne mutagenze nad enzimom IlvC uspješno su dobivene varijante koje ovise o NADH-u. Kombiniranjem najbolje varijante IlvC s AdhA iz *L. lactis* u biosintetskom putu izobutanola dobiveno je 100% teoretsko iskorištenje u anaerobnim uvjetima (Bastian i sur. 2011).

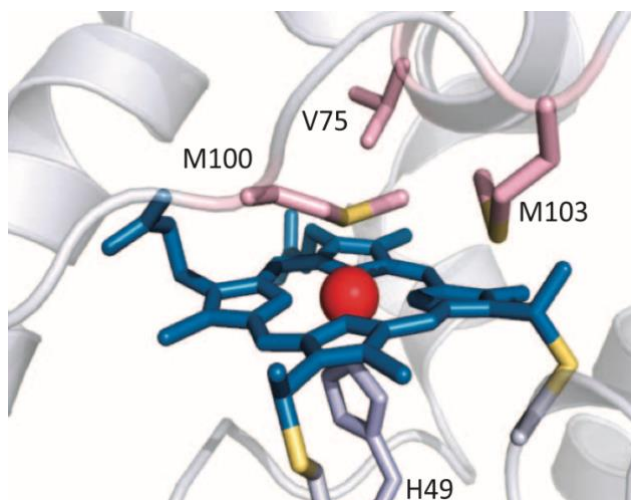
3.3. Sinteza novih kemijskih veza – na primjeru citokroma c

Iako u prirodi ne postoje enzimi koji kataliziraju stvaranje ugljik-silicij veze (C-Si), proteinske mašinerije živih bića često su „promiskuitetne“, odnosno sposobne katalizirati reakcije koje nisu dio njihovih bioloških funkcija. Evolucija, bilo da je usmjerena ili prirodna, može modulirati taj katalitički „promiskuitet“ u enzimima. Na primjer, hemproteini mogu katalizirati niz neprirodnih insercija karbena u N-H i S-H veze (Tyagi i sur. 2015). Postavljena je hipoteza da bi hemproteini mogli katalizirati inserciju karbena u silicij-vodik veze (Kan i sur. 2016). Nekoliko citokrom P450 varijanti je ispitano na formiranje C-Si veze i pronađeno je da citokrom c iz bakterije *Rhodotermus marinus* (Rma cyt c) katalizira nastajanje C-Si veze između fenildimetilsilana i 2-diazopropanoata s 97% enantiomernog suviška (ee) što je prikazano na Slici 7. Rma cyt c pokazuje izvrsnu enantioselektivnost prilikom reakcije insercije karbena te je stoga uzet kao polazišna točka za daljnje usavršavanje katalize putem usmjerene evolucije (Kan i sur. 2016)



Slika 7. Reakcija između (1) fenildimetilsilana i (2) 2-diazopropanoata katalizirana Rma cyt c. Produkt (3) sadržava C-Si vezu. Preuzeto prema Kan i sur., 2016.

Na Slici 7 je prikaza kristalna struktura prostetičke skupine hem u divljeg tipa Rma cyt c (Stelter i sur. 2008). Vidljivo je na Slici 7 da je prostetička skupina hem smještena u hidrofobnom džepu. Željezo hem skupine aksijalno je koordinirano s proksimalnim histidinom (H49) i distalnim metioninom (M100).



Slika 7. Kristalna struktura prostetičke skupine hem u divljeg tipa Rma cyt c. Željezo hema je koordinirano s proksimalnim histidinom (H49) i distalnim metioninom (M100). U blizini hema nalaze se još aminokiseline valin (V75) i metionin (M103). Preuzeto prema Kan i sur., 2016.

Pretpostavka je bila da M100 smeta pri formiranju željeznog karbenoida zbog čega se mora mutirati u drugu aminokiselinu. Mutacija M100D (metionin mutiran u aspartat) pokazala se kao izrazito aktivirajuća mutacija: uspješno se sintetizira kiralna C-Si veza s TTN-om (totalni obrtni broj) = 550. Totalni obrtni broj je bezdimenzijska veličina koja pokazuje ukupan broj molova produkta dobivenih po molu enzima tijekom vremena u kojem je enzim katalitički aktivan. TTN = 550 je je 12 puta bolja kataliza nego u divljem tipu. Daljnjom usmjerenom evolucijom M100D mutanta otkriven je trostruki mutant (M100D, V75T, M103E) koji katalizira stvaranje C-Si veze s TTN > 1500 i s >99% ee. Ta razina katalitičke aktivnosti je 15 puta bolja od najboljih sintetskih katalizatora za tu klasu reakcije.

3. Zaključak

Usmjerena evolucija enzima postala je vrlo učinkovit protokol za razvoj biokatalizatora visoke specifičnosti, tolerantne na različite reakcijske uvjete i niske pojave nusprodukata u kataliziranoj

reakciji. Usmjerena evolucija je svestran i učinkovit put dobivanja optimiranih enzima i enzima s novim funkcijama. Glavni zaključak koji proizlazi iz istraživanja usmjerene evolucije je da se enzimi mogu podesiti za katalizu novih reakcija uključujući reakcije koje su vrlo različite od onih koje kataliziraju enzimi u prirodi. Vjerojatno se nalazimo jako daleko od granice do koje se enzimi mogu modificirati za provedbu različitih funkcija – postoji puno prostora za daljnja otkrića.

4. Literatura

- lAmon, R., Rosenfeld, R., Perlmutter, S., Grant, O. C., Yehuda, S., Borenstein-Katz, A., Alcalay, R., Marshanski, T., Yu, H., Diskin, R., Woods, R. J., Chen, X., & Padler-Karavani, V. (2020). Directed Evolution of Therapeutic Antibodies Targeting Glycosylation in Cancer. *Cancers*, 12(10), E2824. <https://doi.org/10.3390/cancers12102824>
- Angov, E., Hillier, C. J., Kincaid, R. L., & Lyon, J. A. (2008). Heterologous Protein Expression Is Enhanced by Harmonizing the Codon Usage Frequencies of the Target Gene with those of the Expression Host. *PLoS ONE*, 3(5), e2189. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002189>
- Arnold, F. H. (2017). Directed Evolution: Bringing New Chemistry to Life. *Angewandte Chemie International Edition*, 57(16), 4143–4148. <https://doi.org/10.1002/anie.201708408>
- Atsumi, S., Wu, T.-Y., Eckl, E.-M., Hawkins, S. D., Buelter, T., & Liao, J. C. (2009). Engineering the isobutanol biosynthetic pathway in *Escherichia coli* by comparison of three aldehyde reductase/alcohol dehydrogenase genes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(3), 651–657. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2085-6>
- Bastian, S., Liu, X., Meyerowitz, J. T., Snow, C. D., Chen, M. M. Y., & Arnold, F. H. (2011). Engineered ketol-acid reductoisomerase and alcohol dehydrogenase enable anaerobic 2-methylpropan-1-ol production at theoretical yield in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*, 13(3), 345–352. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2011.02.004>
- Bornscheuer, U. T., Altenbuchner, J., & Meyer, H. H. (1998). Directed evolution of an esterase for the stereoselective resolution of a key intermediate in the synthesis of epothilones. *Biotechnology and Bioengineering*, 58(5), 554–559. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0290\(19980605\)58:5<554::aid-bit12>3.0.co;2-b](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0290(19980605)58:5<554::aid-bit12>3.0.co;2-b)

- Bruno, T. J., Wolk, A., & Naydich, A. (2010). Composition-Explicit Distillation Curves for Mixtures of Gasoline and Diesel Fuel with γ -Valerolactone. *Energy & Fuels*, 24(4), 2758–2767. <https://doi.org/10.1021/ef100133a>
- Bulter, T., Alcalde, M., Sieber, V., Meinhold, P., Schlachtbauer, C., & Arnold, F. H. (2003). Functional Expression of a Fungal Laccase in *Saccharomyces cerevisiae* by Directed Evolution. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(2), 987–995. <https://doi.org/10.1128/aem.69.2.987-995.2003>
- Bulter, T., Sieber, V., & Alcalde, M. (2003). Screening mutant libraries in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 230, 99–107. <https://doi.org/10.1385/1-59259-396-8:99>
- Camps, M., Herman, A., Loh, E., & Loeb, L. A. (2007). Genetic constraints on protein evolution. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 42(5), 313–326. <https://doi.org/10.1080/10409230701597642>
- Choi, S., Storici, P., Schirmer, T., & Silverman, R. B. (2002). Design of a conformationally restricted analogue of the antiepilepsy drug Vigabatrin that directs its mechanism of inactivation of gamma-aminobutyric acid aminotransferase. *Journal of the American Chemical Society*, 124(8), 1620–1624. <https://doi.org/10.1021/ja011968d>
- Coelho, P. S., Brustad, E. M., Kannan, A., & Arnold, F. H. (2012). Olefin Cyclopropanation via Carbene Transfer Catalyzed by Engineered Cytochrome P450 Enzymes. *Science*, 339(6117), 307–310. <https://doi.org/10.1126/science.1231434>
- Coelho, P. S., Wang, Z. J., Ener, M. E., Baril, S. A., Kannan, A., Arnold, F. H., & Brustad, E. M. (2013). A serine-substituted P450 catalyzes highly efficient carbene transfer to olefins in vivo. *Nature Chemical Biology*, 9(8), 485–487. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1278>
- Currin, A., Swainston, N., Day, P. J., & Kell, D. B. (2015). Synthetic biology for the directed evolution of protein biocatalysts: navigating sequence space intelligently. *Chemical Society Reviews*, 44(5), 1172–1239. <https://doi.org/10.1039/c4cs00351a>
- Dietmair, S., Nielsen, L. K., & Timmins, N. E. (2011). Mammalian cells as biopharmaceutical production hosts in the age of omics. *Biotechnology Journal*, 7(1), 75–89. <https://doi.org/10.1002/biot.201100369>
- Georgescu, R., Bandara, G., & Sun, L. (2003). Saturation mutagenesis. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 231, 75–83. <https://doi.org/10.1385/1-59259-395-X:75>

- Glieder, A., Farinas, E. T., & Arnold, F. H. (2002). Laboratory evolution of a soluble, self-sufficient, highly active alkane hydroxylase. *Nature Biotechnology*, *20*(11), 1135–1139. <https://doi.org/10.1038/nbt744>
- Gruchattka, E., Hädicke, O., Klamt, S., Schütz, V., & Kayser, O. (2013). In silico profiling of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* as terpenoid factories. *Microbial Cell Factories*, *12*(1), 84. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-84>
- Haines, D. C., Tomchick, D. R., Machius, M., & Peterson, J. A. (2001). Pivotal role of water in the mechanism of P450BM-3. *Biochemistry*, *40*(45), 13456–13465. <https://doi.org/10.1021/bi011197q>
- Ishino, S., & Ishino, Y. (2014). DNA polymerases as useful reagents for biotechnology – the history of developmental research in the field. *Frontiers in Microbiology*, *5*(465). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00465>
- JORNVALL, H., PERSSON, B., & JEFFERY, J. (1987). Characteristics of alcohol/polyol dehydrogenases. The zinc-containing long-chain alcohol dehydrogenases. *European Journal of Biochemistry*, *167*(2), 195–201. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1987.tb13323.x>
- Kan, S. B. J., Lewis, R. D., Chen, K., & Arnold, F. H. (2016). Directed evolution of cytochrome c for carbon-silicon bond formation: Bringing silicon to life. *Science (New York, N.Y.)*, *354*(6315), 1048–1051. <https://doi.org/10.1126/science.aah6219>
- Kondrashov, D. A., & Kondrashov, F. A. (2015). Topological features of rugged fitness landscapes in sequence space. *Trends in Genetics*, *31*(1), 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.09.009>
- Kuchner, O., & Arnold, F. H. (1997). Directed evolution of enzyme catalysts. *Trends in Biotechnology*, *15*(12), 523–530. [https://doi.org/10.1016/s0167-7799\(97\)01138-4](https://doi.org/10.1016/s0167-7799(97)01138-4)
- Leemhuis, H., Kelly, R. M., & Dijkhuizen, L. (2009). Directed evolution of enzymes: Library screening strategies. *IUBMB Life*, *61*(3), 222–228. <https://doi.org/10.1002/iub.165>
- Li, G., Wang, J., & Reetz, M. T. (2018). Biocatalysts for the pharmaceutical industry created by structure-guided directed evolution of stereoselective enzymes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *26*(7), 1241–1251. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.05.021>

- Lin, H., & Cornish, V. W. (2002). Screening and Selection Methods for Large-Scale Analysis of Protein Function. *Angewandte Chemie International Edition*, 41(23), 4402–4425. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20021202\)41:23<4402::aid-anie4402>3.0.co;2-h](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20021202)41:23<4402::aid-anie4402>3.0.co;2-h)
- Majors, B. S., Chiang, G. G., & Betenbaugh, M. J. (2009). Protein and Genome Evolution in Mammalian Cells for Biotechnology Applications. *Molecular Biotechnology*, 42(2), 216–223. <https://doi.org/10.1007/s12033-009-9156-x>
- Mate, D. M., Gonzalez-Perez, D., Mateljak, I., Gomez de Santos, P., Vicente, A. I., & Alcalde, M. (2017, January 1). Chapter 8 - The Pocket Manual of Directed Evolution: Tips and Tricks (G. Brahmachari, Ed.). ScienceDirect; Academic Press. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012803725600008X?via%3Dihub>
- Mate, D., Garcia-Ruiz, E., Camarero, S., & Alcalde, M. (2011). Directed Evolution of Fungal Laccases. *Current Genomics*, 12(2), 113–122. <https://doi.org/10.2174/138920211795564322>
- Miton, C. M., & Tokuriki, N. (2016). How mutational epistasis impairs predictability in protein evolution and design. *Protein Science*, 25(7), 1260–1272. <https://doi.org/10.1002/pro.2876>
- Nelson, D. R., Kamataki, T., Waxman, D. J., Guengrich, F. P., Estarbrook, R. W., Feyereisen, R., Gonzalez, F. J., Coon, M. J., Gunsalus, I. C., Gotoh, O., Okuda, K., & Nebert, D. W. (1993). The P450 Superfamily: Update on New Sequences, Gene Mapping, Accession Numbers, Early Trivial Names of Enzymes, and Nomenclature. *DNA and Cell Biology*, 12(1), 1–51. <https://doi.org/10.1089/dna.1993.12.1>
- Noble, M. A., Miles, C. S., Chapman, S. K., Lysek, D. A., MacKay, A. C., Reid, G. A., Hanzlik, R. P., & Munro, A. W. (1999). Roles of key active-site residues in flavocytochrome P450 BM3. *The Biochemical Journal*, 339 (Pt 2), 371–379. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10191269/>
- Orr, H. A. (2005). The genetic theory of adaptation: a brief history. *Nature Reviews Genetics*, 6(2), 119–127. <https://doi.org/10.1038/nrg1523>
- Ost, T. W. B., Miles, C. S., Munro, A. W., Murdoch, J., Reid, G. A., & Chapman, S. K. (2001). Phenylalanine 393 Exerts Thermodynamic Control over the Heme of Flavocytochrome P450 BM3. *Biochemistry*, 40(45), 13421–13429. <https://doi.org/10.1021/bi010716m>

- P.B. Danielson, B. S. P. (2002). The Cytochrome P450 Superfamily: Biochemistry, Evolution and Drug Metabolism in Humans. *Current Drug Metabolism*, 3(6), 561–597. <https://doi.org/10.2174/1389200023337054>
- Packer, M. S., & Liu, D. R. (2015). Methods for the directed evolution of proteins. *Nature Reviews Genetics*, 16(7), 379–394. <https://doi.org/10.1038/nrg3927>
- Pourmir, A., & Johannes, T. W. (2012). DIRECTED EVOLUTION: SELECTION OF THE HOST ORGANISM. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2(3), e201209012. <https://doi.org/10.5936/csbj.201209012>
- Prier, C. K., Hyster, T. K., Farwell, C. C., Huang, A., & Arnold, F. H. (2016). Asymmetric Enzymatic Synthesis of Allylic Amines: A Sigmatropic Rearrangement Strategy. *Angewandte Chemie (International Ed. In English)*, 55(15), 4711–4715. <https://doi.org/10.1002/anie.201601056>
- Rakestraw, J. A., Sazinsky, S. L., Piatasi, A., Antipov, E., & Wittrup, K. D. (2009). Directed evolution of a secretory leader for the improved expression of heterologous proteins and full-length antibodies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 103(6), 1192–1201. <https://doi.org/10.1002/bit.22338>
- Reetz, M. T., Höbenreich, H., Soni, P., & Fernández, L. (2008). A genetic selection system for evolving enantioselectivity of enzymes. *Chemical Communications*, 43, 5502. <https://doi.org/10.1039/b814538e>
- Romero, P. A., Krause, A., & Arnold, F. H. (2013). Navigating the protein fitness landscape with Gaussian processes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(3), E193–E201. <https://doi.org/10.1073/pnas.1215251110>
- Singh, R., Kolev, J. N., Sutura, P. A., & Fasan, R. (2015). Enzymatic C(sp³)-H Amination: P450-Catalyzed Conversion of Carbonazidates into Oxazolidinones. *ACS Catalysis*, 5(3), 1685–1691. <https://doi.org/10.1021/cs5018612>
- Steck, V., Carminati, D. M., Johnson, N. R., & Fasan, R. (2020). Enantioselective Synthesis of Chiral Amines via Biocatalytic Carbene N–H Insertion. *ACS Catalysis*, 10(19), 10967–10977. <https://doi.org/10.1021/acscatal.0c02794>
- Stelter, M., Melo, A. M. P., Pereira, M. M., Gomes, C. M., Hreggvidsson, G. O., Hjorleifsdottir, S., Saraiva, L. M., Teixeira, M., & Archer, M. (2008). A Novel Type of Monoheme Cytochrome: Biochemical and Structural Characterization at 1.23 Å Resolution of

- Rhodothermus marinus Cytochrome c†‡. *Biochemistry*, 47(46), 11953–11963. <https://doi.org/10.1021/bi800999g>
- Stemmer, W. P. C. (1994). Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature*, 370(6488), 389–391. <https://doi.org/10.1038/370389a0>
- Traxlmayr, M. W., & Obinger, C. (2012). Directed evolution of proteins for increased stability and expression using yeast display. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 526(2), 174–180. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.04.022>
- Tyagi, V., Bonn, R. B., & Fasan, R. (2015). Intermolecular carbene S-H insertion catalysed by engineered myoglobin-based catalysts†. *Chemical Science*, 6(4), 2488–2494. <https://doi.org/10.1039/C5SC00080G>
- van Loo, B., Spelberg, J. H. Lutje., Kingma, J., Sonke, T., Wubbolts, M. G., & Janssen, D. B. (2004). Directed Evolution of Epoxide Hydrolase from A. radiobacter toward Higher Enantioselectivity by Error-Prone PCR and DNA Shuffling. *Chemistry & Biology*, 11(7), 981–990. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2004.04.019>
- van Maris, A. J. A., Geertman, J.-M. A., Vermeulen, A., Groothuizen, M. K., Winkler, A. A., Piper, M. D. W., van Dijken, J. P., & Pronk, J. T. (2004). Directed Evolution of Pyruvate Decarboxylase-Negative Saccharomyces cerevisiae, Yielding a C2-Independent, Glucose-Tolerant, and Pyruvate-Hyperproducing Yeast. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(1), 159–166. <https://doi.org/10.1128/aem.70.1.159-166.2004>
- Vojcic, L., Despotovic, D., Martinez, R., Maurer, K.-H., & Schwaneberg, U. (2012). An efficient transformation method for Bacillus subtilis DB104. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94(2), 487–493. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-3987-2>
- Wang, Y., Xue, P., Cao, M., Yu, T., Lane, S. T., & Zhao, H. (2021a). Directed Evolution: Methodologies and Applications. *Chemical Reviews*. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00260>
- Wang, Y., Xue, P., Cao, M., Yu, T., Lane, S. T., & Zhao, H. (2021b). Directed Evolution: Methodologies and Applications. *Chemical Reviews*. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00260>
- Wuttke, D. S., & Gray, H. B. (1993). Protein engineering as a tool for understanding electron transfer. *Current Opinion in Structural Biology*, 3(4), 555–563. [https://doi.org/10.1016/0959-440x\(93\)90083-w](https://doi.org/10.1016/0959-440x(93)90083-w)

- Zhang, X.-Z., & Zhang, Y.-H. . P. (2010). Simple, fast and high-efficiency transformation system for directed evolution of cellulase in *Bacillus subtilis*. *Microbial Biotechnology*, *4*(1), 98–105. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2010.00230.x>
- Zhao, H., Giver, L., Shao, Z., Affholter, J. A., & Arnold, F. H. (1998). Molecular evolution by staggered extension process (StEP) in vitro recombination. *Nature Biotechnology*, *16*(3), 258–261. <https://doi.org/10.1038/nbt0398-258>

