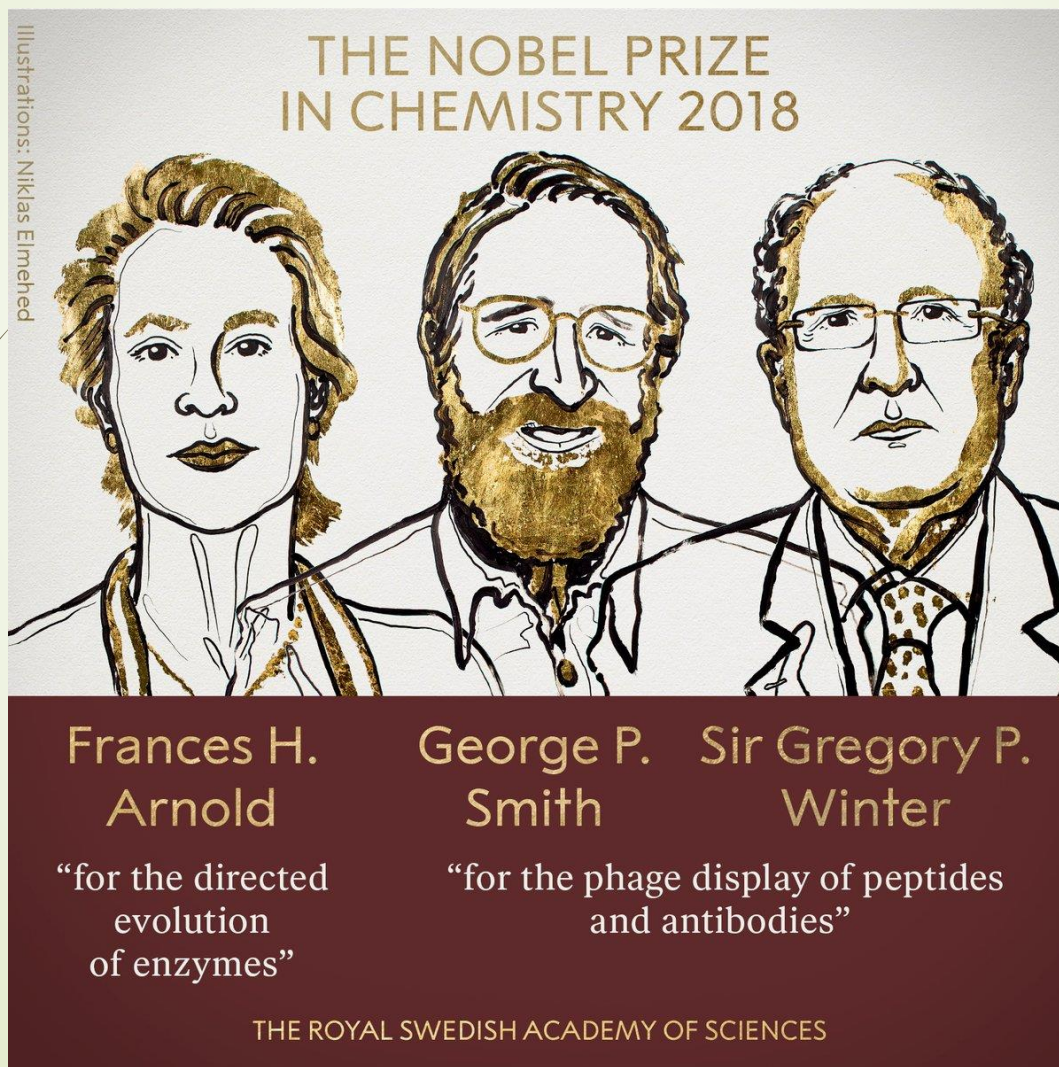


Az evolúció revolúciója

***Forradalmian gyors módszerek
új fehérjék előállítására***



2018 N obel díj, Kémia

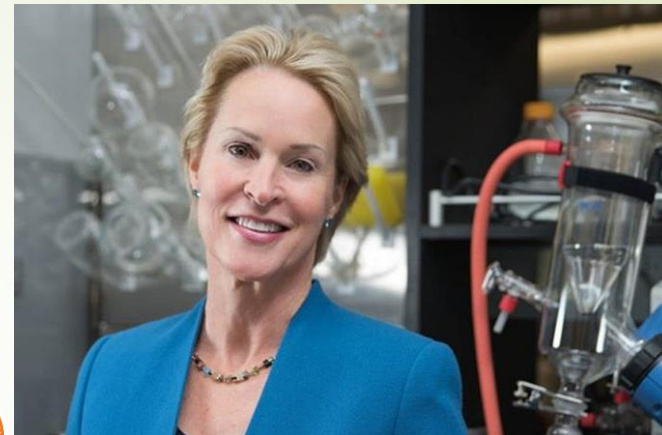
Frances H. Arnold / George P. Smith / Gregory P. Winter



3

2018 Nóbél díj (kémia)

- Született:** 1956. július 26
Pittsburgh, USA
- BSc:** 1979
(gépész/űrmérnök)  Princeton University
napenergia kutatás
- PhD:** 1985
(vegyésmérnök)  University of California
biokémia/affinitás kromatográfia
- 1985-86: biofizikai kémiai posztdoktori kutatások (Berkeley).
1986-: California Institute of Technology (1986- assitant , 1992-
associate, 1996- full professor).
- 2000: Dick and Barbara Dickinson Professor of Chemical
Engineering, Bioengineering and Biochemistry
- 2013: Igazgató (Caltech - Donna and Benjamin M. Rosen
Bioengineering Center)
- 2017: Linus Pauling Professor of Chemical Engineering,
Bioengineering and Biochemistry



Frances H. Arnold

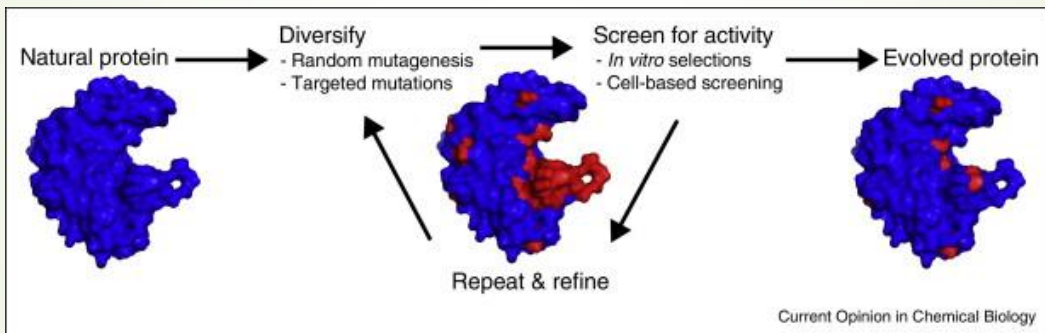
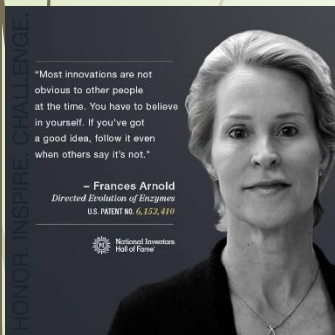


Tagja a Joint BioEnergy Intitute Tanácsadó Testületének és a Packard Fellowships of Science és Engineering-nek, a King Abdullah University of Science and Technology (KAUST) elnöki tanácsadó testületének, a Queen Elisabeth Prize for Engineering bíráló testületének. A Nemzeti Tudományos Akadémia (USA) Tudomány és Szórakoztatás Testületében segít a hollywoodi forgatókönyvíróknak a tudományos témák pontos bemutatásában.

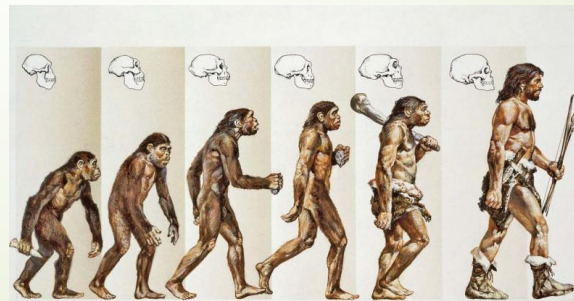
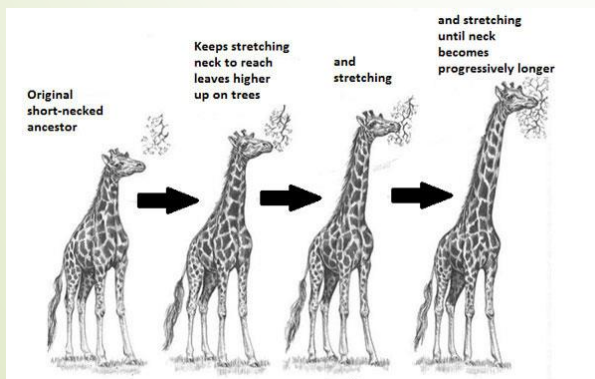
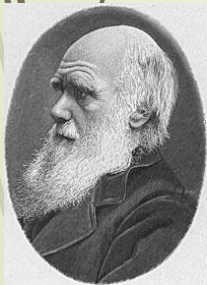
Több mint **600 közlemény**, 40 amerikai szabadalom társszerzője. **Hivatkozásainak száma 45 000, H-indexe 115 felett van.** Ő alapította a Gevo Inc.-t (2005-ben), amely üzemanyagokat és vegyi anyagokat állít elő megújuló erőforrásokból. 2013-ban két korábbi diákjával (Peter Meinhold és Pedro Coelho) 2013-ban megalapították a Provivi céget, amely a peszticidek alternatíváit kutatja a növényvédelemben. 2016-tól az Illumina Inc. genomikai cég igazgató testületének tagja.

Kutatási területe

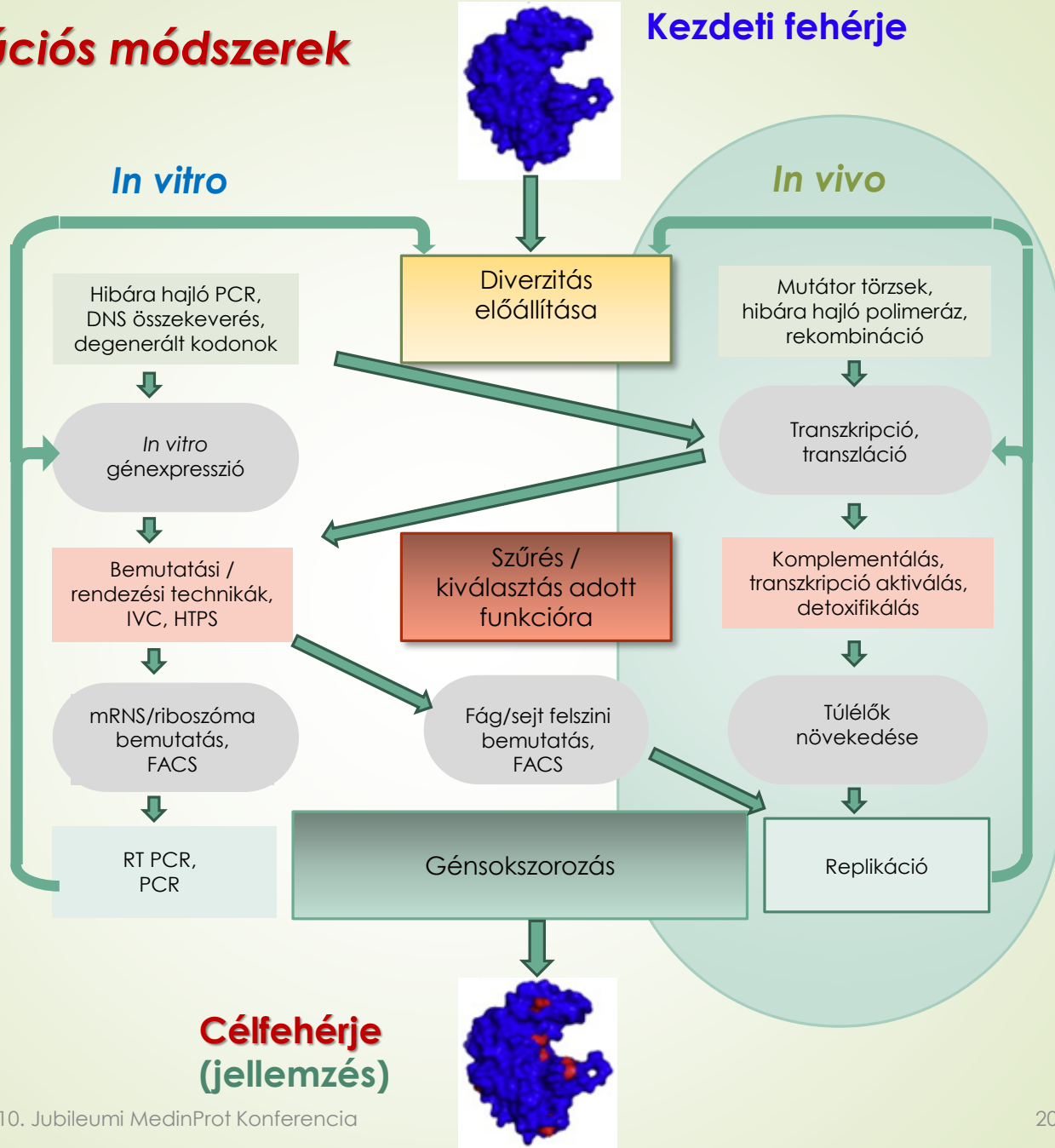
Frances Arnold úttörő szerepet játszott az enzimek **irányított evolúciós módszerekkel** történő módosításának kidolgozásában. A módszer segítségével az **enzimek funkciói javíthatóak és / vagy azokban akár új funkciók alakíthatóak ki.**



Hónapok



Év milliók



**Célfehérje
(jellemezés)**

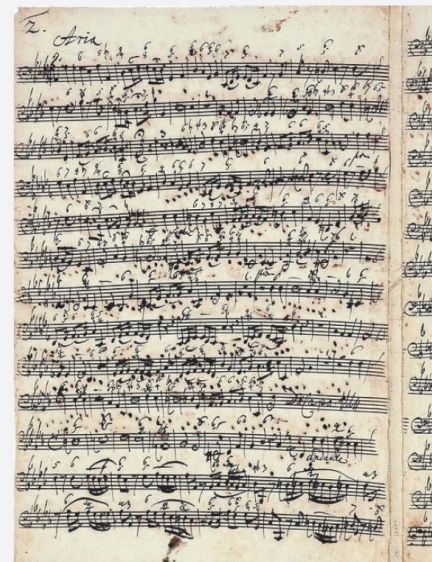
Enzymes by Evolution: Bringing New Chemistry to Life*

Frances H. Arnold¹

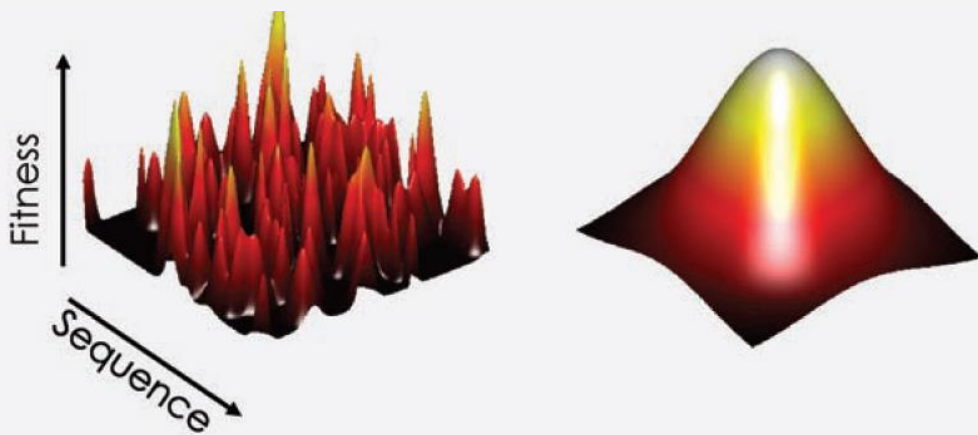
```

AATAGCCGTTATTTCCGGATGTGCATA
GCTGATTTGACCCATCCGGTACACCA
ATDACAAATCCCGATTTGATCGTGTGC
GCGACATGTCTTCCGGCGACACATGT
GTCTCTCACTCCGAGAGATCGGTTAG
AGTCTCGGTTAACCACACGTCCCAGGA
TATATTTAATTGGCCGGAGAGTCTCCC
GCGCGACATAAGGAGTCCTCGTTTCG
AGATACGTACGGCATGGTGACACCAG
TTGCCCTCTGATTCCCGGAGCCTCTT
GAAAACGTCCGAGTCCAATCGAAGTTC
GAACCCCGGATCGGGTCCACCAACTT
:GTGTGCGCTGACTCAGTC
CCATCCGGTACACCAATGG
AAATCCCGATTTGATCGTGT
ATGTCTTCCGGCGACACAT
CACTCCGAGAGATCGGTT
:GGTTAACCACACGTCCC
:AATTGGCCGGAGAGTCTC
:GTTATTTCCGGATGTGCAT
TGACCCATCCGGTACACC
:GGACAAATCCCGATTTGA
:GCGACATGTCTTCCGGCG
:GTCTCTCACTCCGAGAGA
:AGTCTCGGTTAACCACAC

```



Az irányított evolúció a többdimenziós "fitness" domborzati térképen végzett molekuláris optimalizációs eljárás, ahol a "fitness" a felhasználó által definiált hatást jelenti

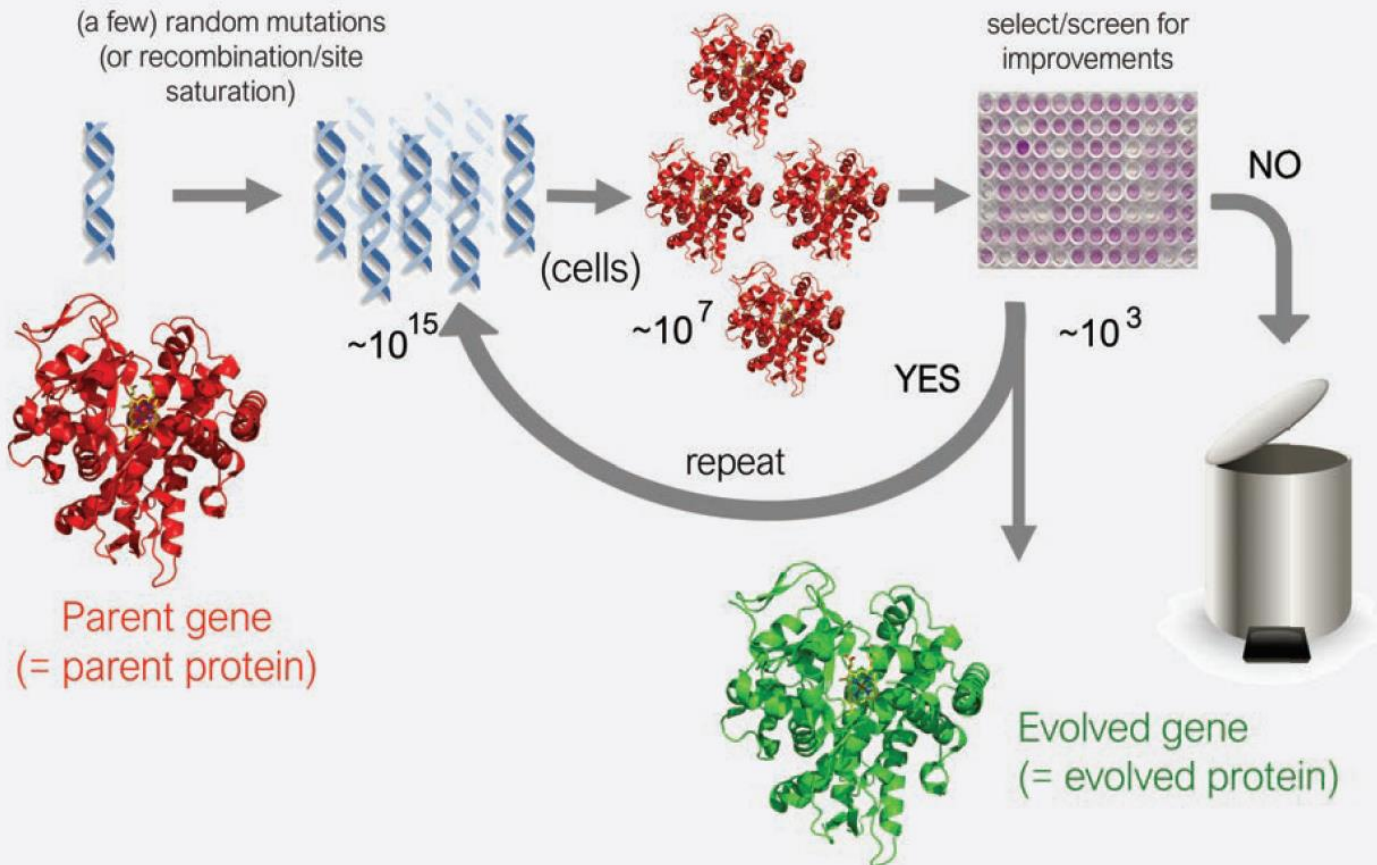


A felhasználó által definiált hatás lehet egy javított tulajdonság (pl. oldószertűrés, magasabb hőstabilitás) vagy akár egy adott új típusú enzimaktivitás

Enzymes by Evolution: Bringing New Chemistry to Life*

Frances H. Arnold¹

Az irányított evolúció a többdimenziós "fitness" domborzati térképen a "síma" felfelé vezető útvonalakat használja ki

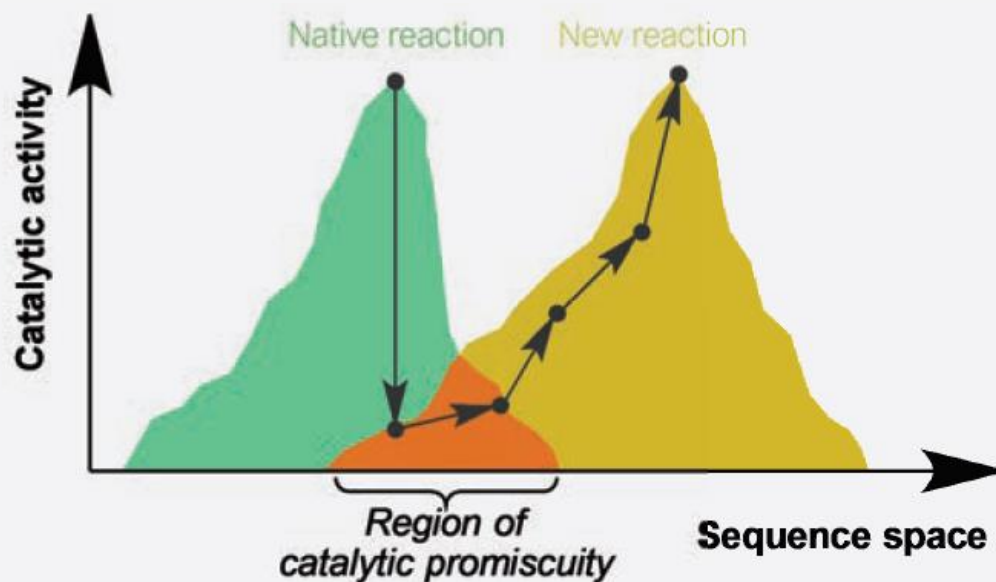


Enzymes by Evolution: Bringing New Chemistry to Life*

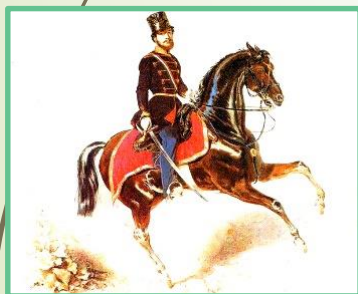
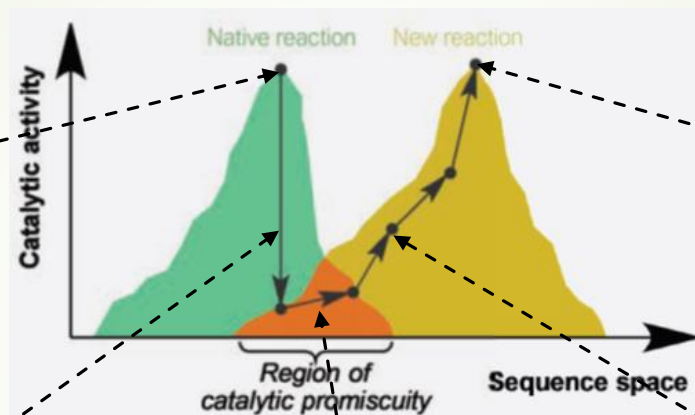
Frances H. Arnold¹

Az "újdonság" sokszor már a természetben is jelen van. A "promiszkuitás" igen sok enzimre jellemző, így ezek képesek "új" reakciók katalízisére (bár alacsony aktivitással).

Az új funkciók elérhetősége azon az (sokszor kicsiny) átlapoláson alapul, amelyből ez a funkció optimalizálást követően elérhető.



Natív és új funkció fejlesztése



Lómeghajtás



Lovaskocsi



Motorhajtás

Exploring protein fitness landscapes by directed evolution

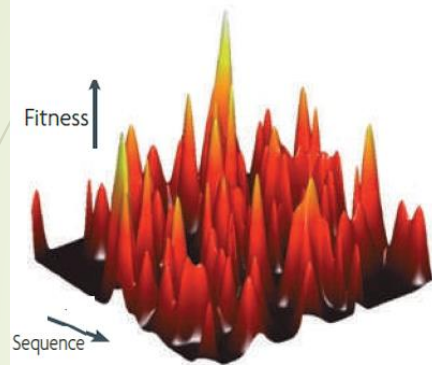
10

Philip A. Romero and Frances H. Arnold 866 | DECEMBER 2009 | VOLUME 10

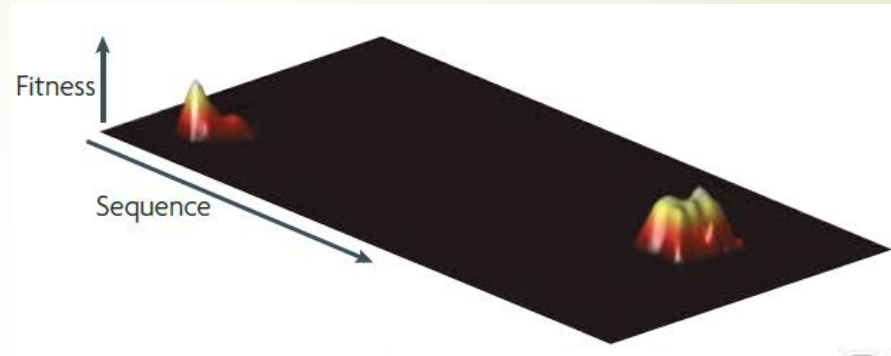
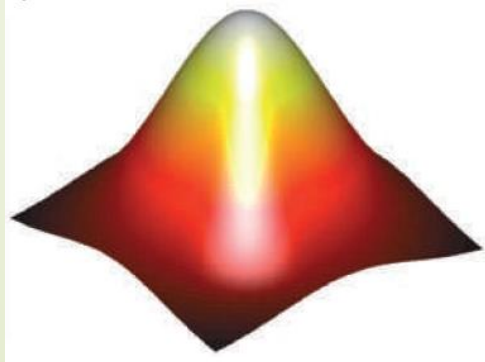


Darwin200

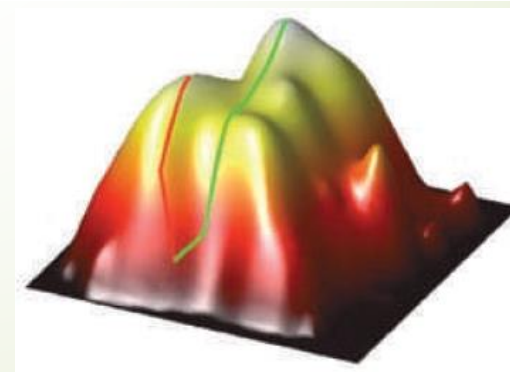
Abstract | Directed evolution circumvents our profound ignorance of how a protein's sequence encodes its function by using iterative rounds of random mutation and artificial selection to discover new and useful proteins. Proteins can be tuned to adapt to new functions or environments by simple adaptive walks



Az irányított evolúció a többdimenziós "fitness" domborzati térképen a "síma" felfelé vezető útvonalakat használja ki



A túl nagy funkció nélküli tér vagy a helyi minimumok kedvezőtlen helyzete problémákat okozhat az optimalizálás során



Dynamic Pattern Formation in a Vesicle-Generating Microfluidic Device

Todd Thorsen,¹ Richard W. Roberts,¹ Frances H. Arnold,¹ and Stephen R. Quake²

¹*Division of Chemistry and Chemical Engineering, California Institute of Technology, Pasadena, California 91125*

²*Department of Applied Physics, California Institute of Technology, Pasadena, California 91125*

(Received 9 January 2001)

Az optimalizálás nagy
áteresztőképességű szűrőmódszerek
kidolgozását igényelte –
a legidézettebb cikkek: mikrofluidika

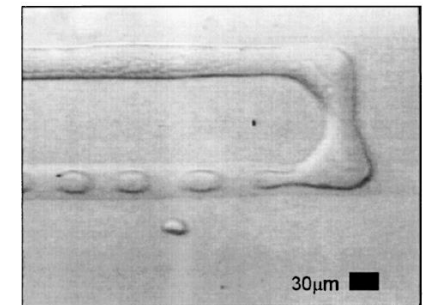
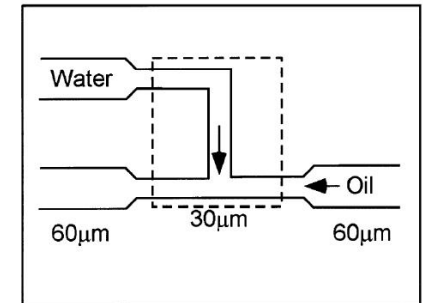
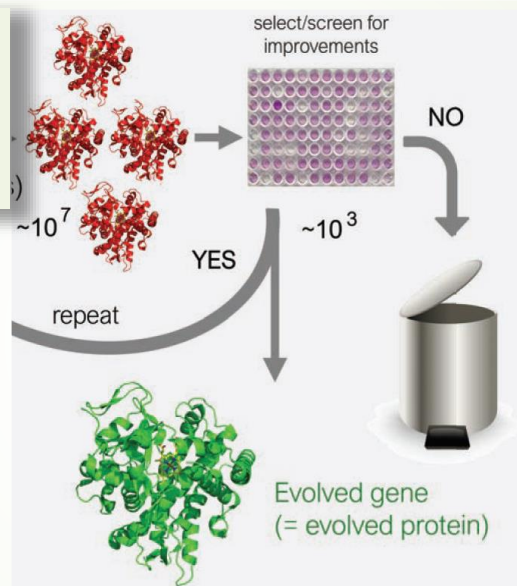


FIG. 1. Microfabricated channel dimensions at the point of crossflow and photomicrograph of the discontinuous water phase introduced into the continuous oil phase. Dashed rectangle indicates area in photomicrograph.

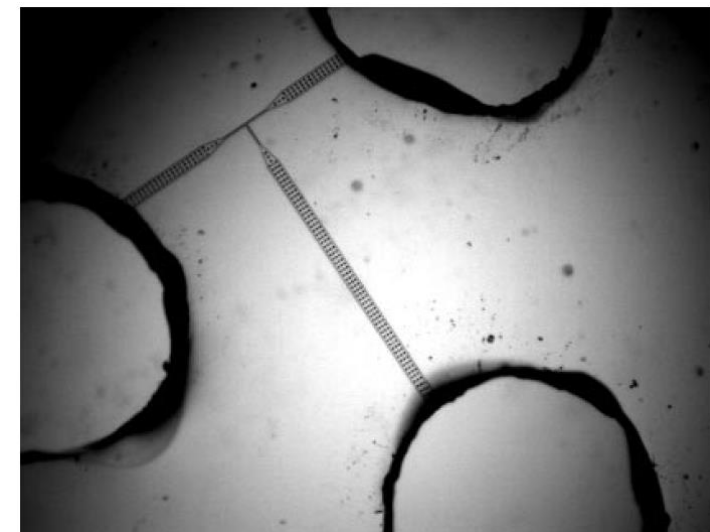


Figure 1. Optical micrograph of the μl shown has channels that are $100\ \mu\text{m}$ wide $3\ \mu\text{m}$ at the sorting junction. The channels are $2\ \text{mm}$ in diameter.

A microfabricated fluorescence-activated cell sorter

NATURE BIOTECHNOLOGY VOL 17 NOVEMBER 1999 1109

Anne Y. Fu^{1,2}, Charles Spence¹, Axel Scherer¹, Frances H. Arnold², and Stephen R. Quake^{1*}

Tuning the activity of an enzyme for unusual environments: Sequential random mutagenesis of subtilisin E for catalysis in dimethylformamide

12

(peptide synthesis/biocatalysis/molecular evolution/serine protease)

KEQIN CHEN AND FRANCES H. ARNOLD*

Proc. Natl. Acad. Sci. USA
Vol. 90, pp. 5618–5622, June 1993

Hibára hajlamos PCR reakciókkal véletlenszerű mutációkat végeztek négy egymást követő ciklusban (mutáció – szűrés – izolálás/szekvenálás).

A szűréseket 35% DMF / kazein „plate” segítségével végezték.

Megállapították, hogy a mutációk hatása nem additív.

A legjobb mutáns **10 mutációt** tartalmazott és **256 x hatékonyabb volt 60% DMF-ben**, mint a vad típus.

CONCLUSIONS

A significant fraction of the catalytic activity lost by subtilisin E in the presence of DMF has been recovered by accumulating 10 effective mutations in surface loops surrounding the active site and substrate binding pocket. The resulting PC3 subtilisin is almost as efficient in 60% DMF as the wild-type enzyme is in water; PC3 also exhibits unique synthetic capabilities. This result was achieved despite the fact that the PCR mutagenesis technique can access only a limited subset of all possible amino acid substitutions. Initial solutions to the

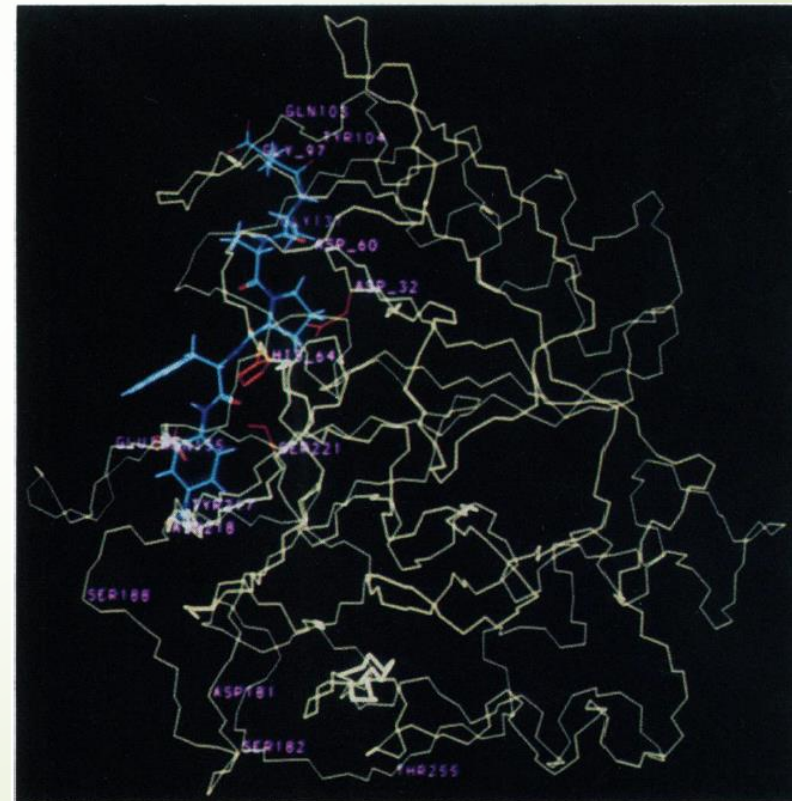


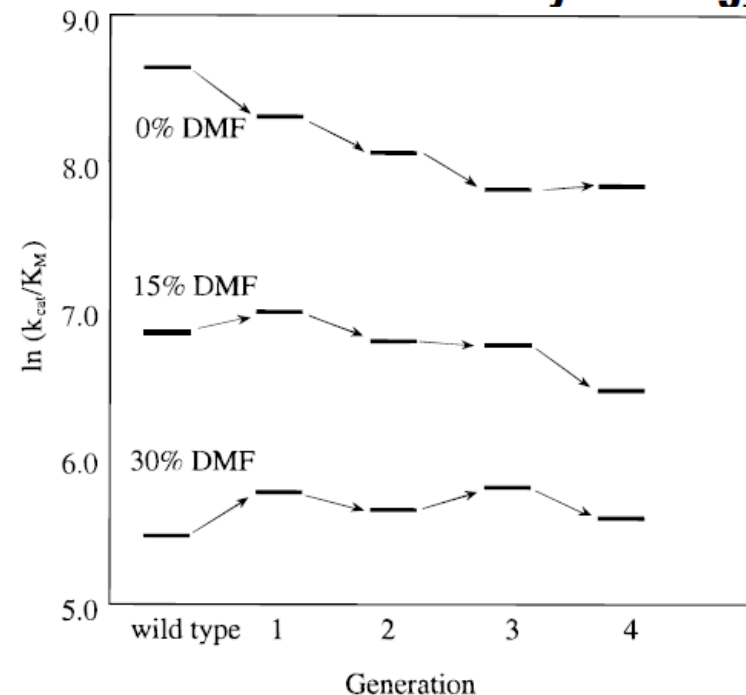
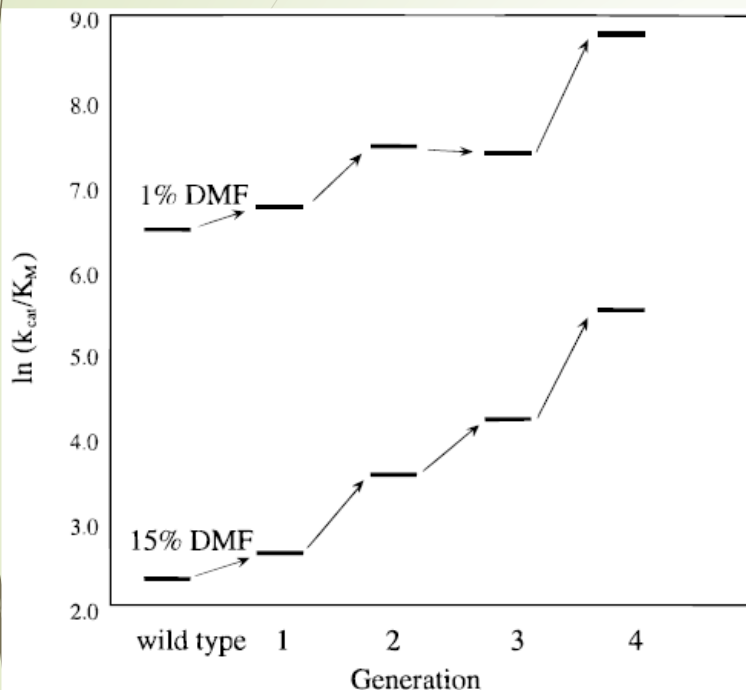
FIG. 2. Subtilisin structure showing bound substrate sAAPF-pna and locations of 10 amino acid substitutions in PC3 subtilisin E (structure is that of subtilisin BPN').

Design by Directed Evolution

FRANCES H. ARNOLD*

collapse the time scale for evolution from years to months or even weeks.

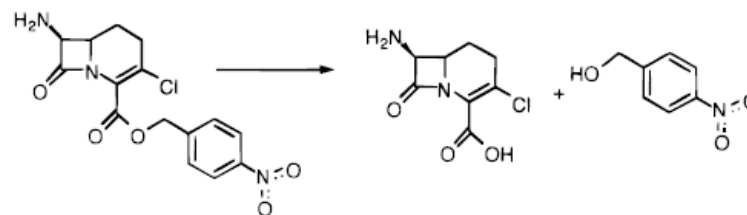
An Evolutionary Strategy



Hibára hajlamos PCR reakciókkal végzett véletlenszerű mutációk négy egymást követő ciklusa javította a **p-nitrobenzil észteráz** katalitikus aktivitását **loracarbef pNB-észter DMF-víz rendszerben végzett hidrolízisében:**



Ugyanazok a mutációk nem javítottak a **p-nitrobenzil észteráz** katalitikus aktivitásán **p-nitrofenil acetát hidrolízisékor**



2018.11.16.

Combinatorial and computational challenges for biocatalyst design

Frances H. Arnold

NATURE | VOL 409 | 11 JANUARY 2001

253

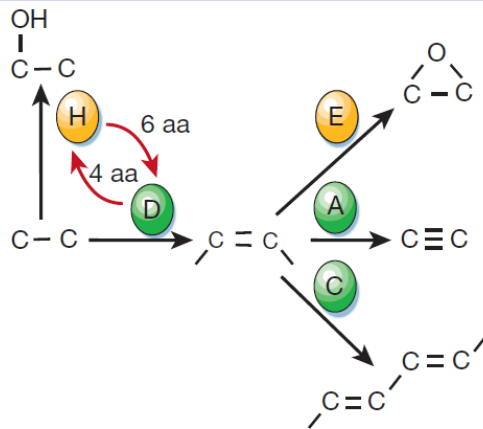


Figure 1 Catalytic plasticity in a family of fatty-acid synthesis enzymes. A family of closely related (>50% amino-acid identity) Fad2-desaturase-like lipid-modification enzymes can mediate a range of functional outcomes. Enzymes: D, oleate desaturase; H, oleate hydroxylase; E, linoleate epoxigenase, A, linoleate acetylenase; C, linoleate conjugase. Yellow enzymes denote oxygen transfer; green enzymes denote hydrogen abstraction. Red arrows indicate the number of amino-acid (aa) substitutions shown to substantially affect reaction outcome^{13,14}.

A zsírsav-szintézis enzimeinek plaszticitása:

A Fad2-deszaturáz-szerű zsírsav módosító enzimek igen hasonlóak (>50% szekvencia-azonosság).

Alkalmasság a DNS-összekeverés alapú génvariánsok előállítására

Combinatorial and computational challenges for biocatalyst design

Frances H. Arnold

NATURE | VOL 409 | 11 JANUARY 2001

253

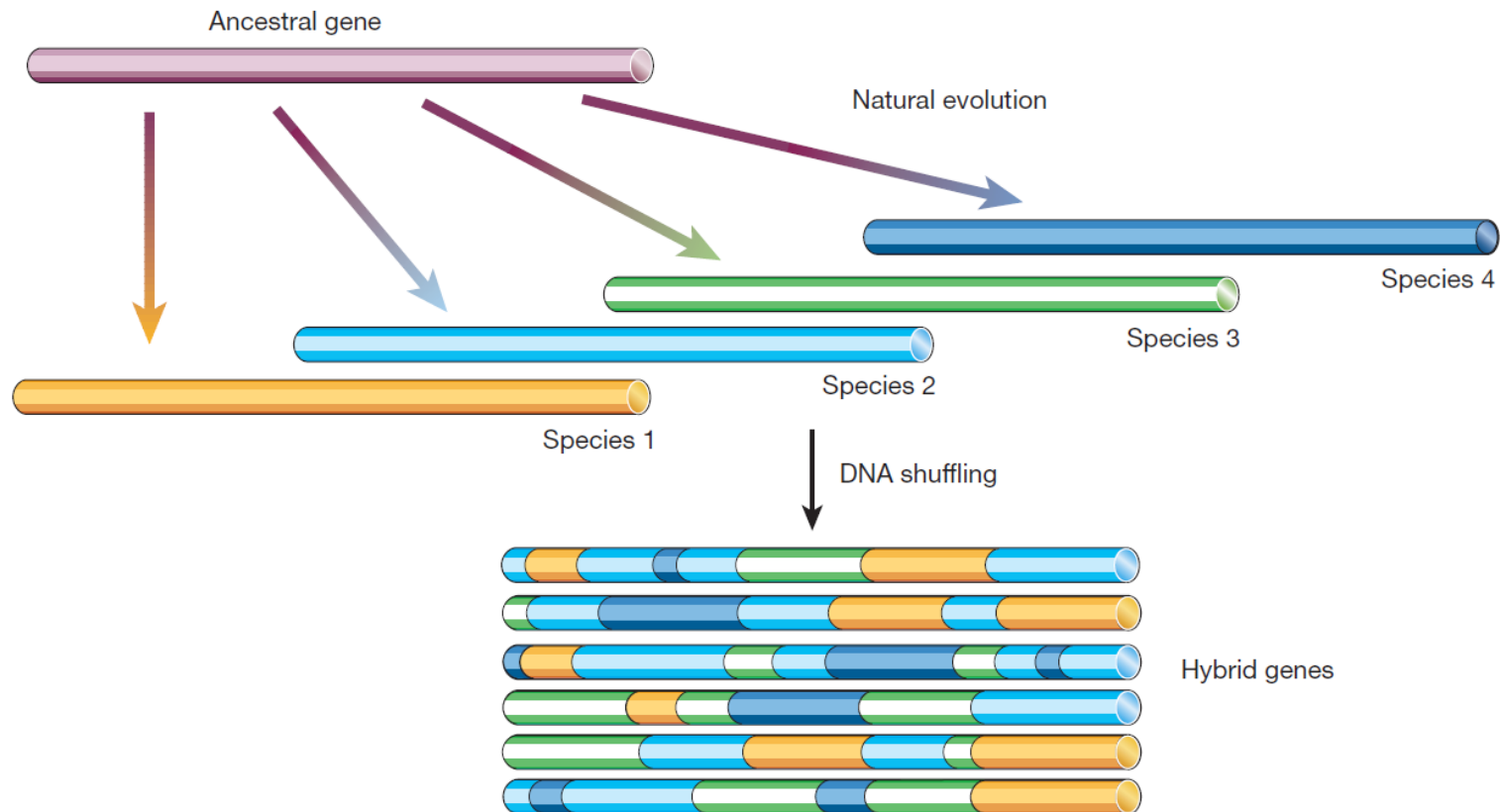


Figure 2 Molecular breeding by DNA shuffling. Diverse gene libraries for laboratory evolution can be created by recombination of related genes³¹. This approach generates highly diverse sequences, but conserves function. Improved or altered enzymes have been identified by screening such hybrid protein libraries.

Combinatorial and computational challenges for biocatalyst design

Frances H. Arnold

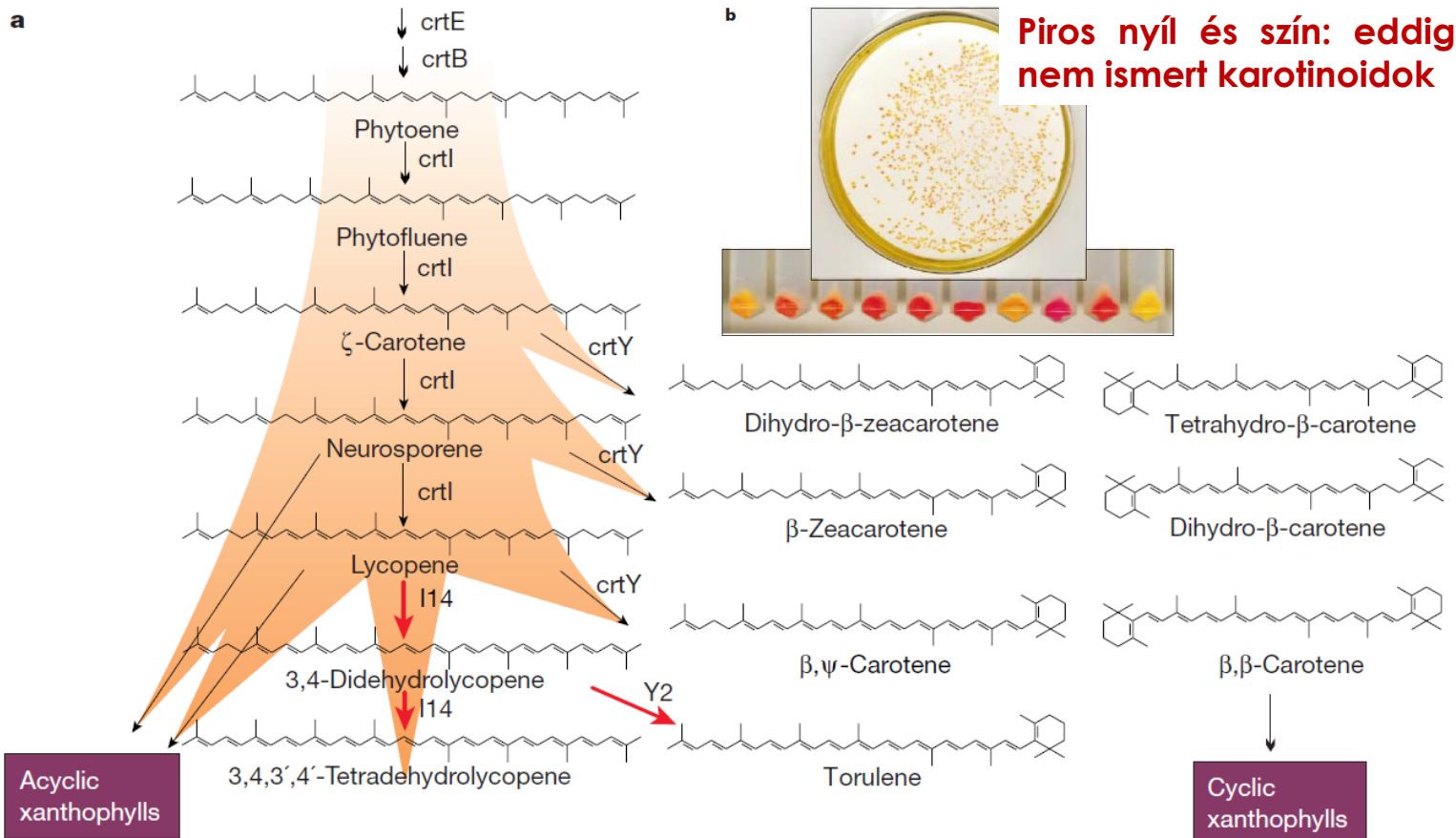
NATURE | VOL 409 | 11 JANUARY 2001

253

Figure 3 Evolution of pathways that synthesize carotenoid pigments.

a, Diversity of carotenoid structures produced by molecular breeding of carotenoid biosynthetic genes from *Erwinia* sp.³⁴. C₄₀ carotenoid biosynthesis branches into a variety of pathways to acyclic and cyclic carotenoids for which biosynthetic genes from bacteria have been cloned. Red arrows indicate how molecular breeding of the desaturase extended the central desaturation pathway to generate fully conjugated 3,4,3',4'-tetrahydrolycopene.

Diverse sequences, but conserved function. Improved or altered enzymes have been identified by screening such hybrid protein libraries.

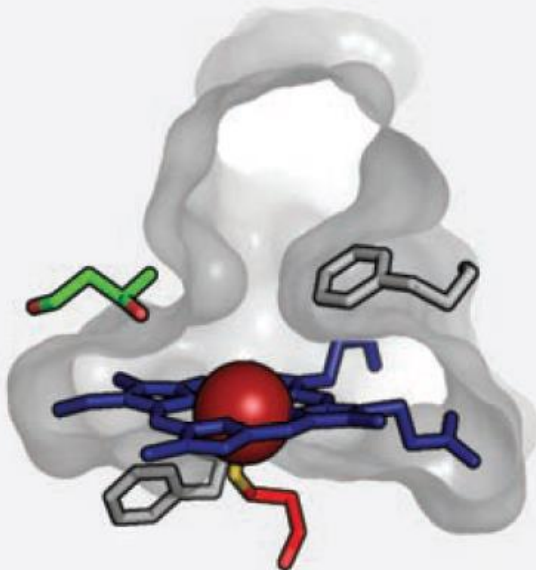


Enzymes by Evolution: Bringing New Chemistry to Life*

Frances H. Arnold¹

Mechanizmus-inspirált mutagenézis

A hem protein egy **önszerveződő, DNS-kódolt királis fémkomplex**, melynek szerkezeti és elektronikus tulajdonságai mutációkkal hangolhatóak

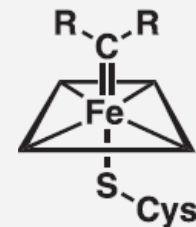


A citokróm P450 alapú oxigenáz enzimek Fe-O kötésrendszere módosítható

Meg tudja egy hem enzim ezt tenni?

Evolválható?

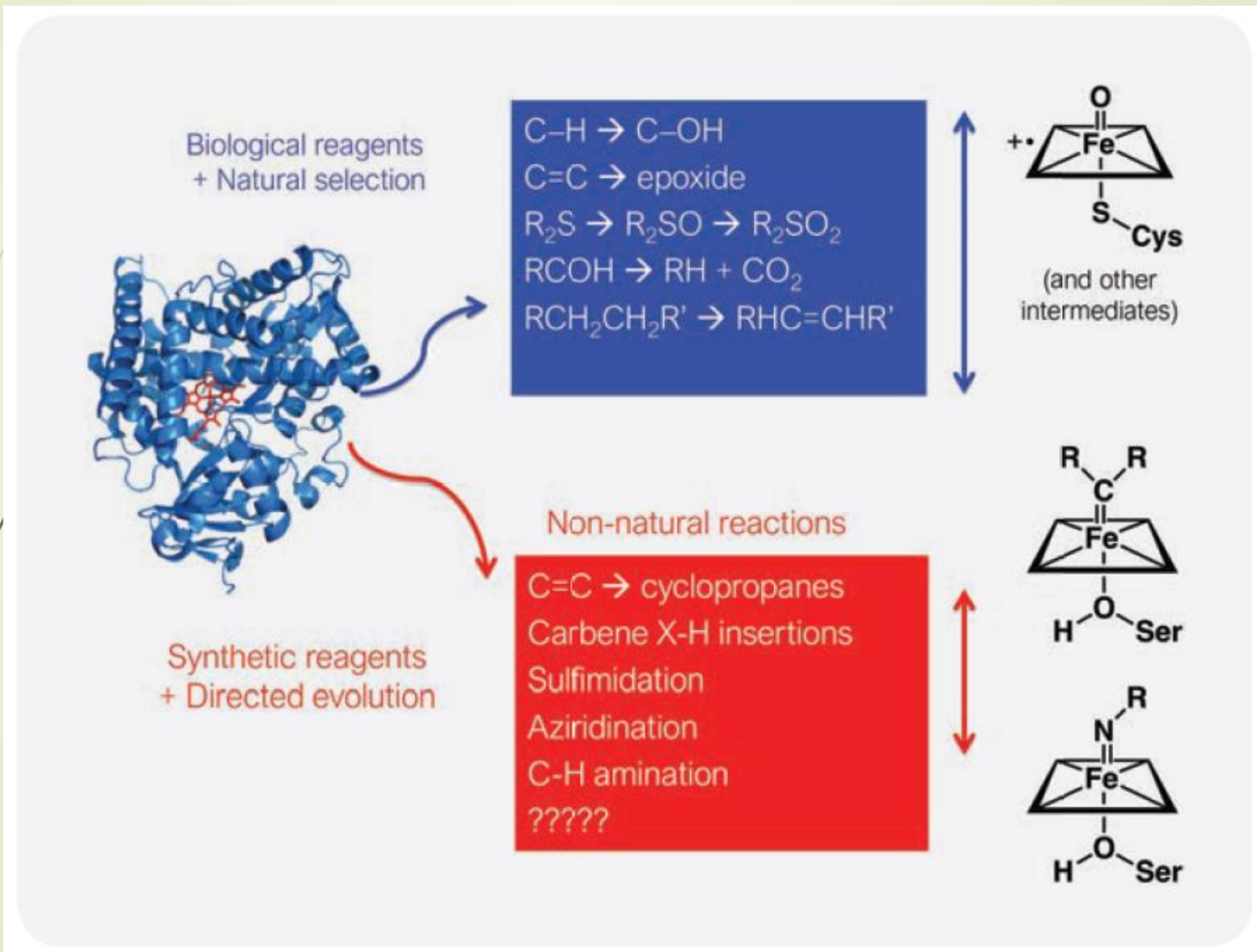
A Fe-karbenoid intermedierről



átvihető-e a karbén egy második szubsztrátra?

Mechanizmus-inspirált mutagenézis

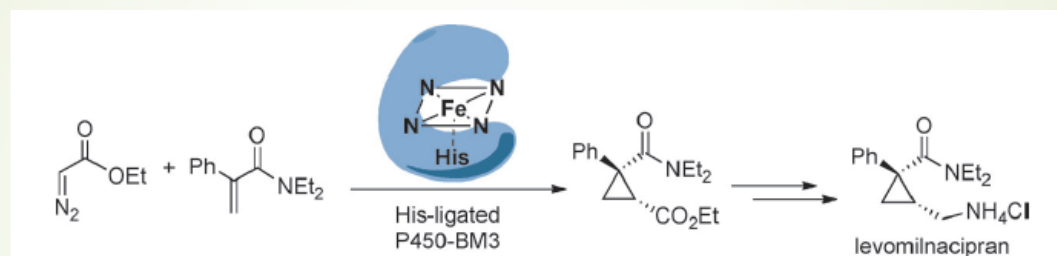
18





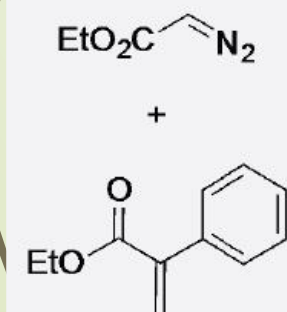
Improved Cyclopropanation Activity of Histidine-Ligated Cytochrome P450 Enables the Enantioselective Formal Synthesis of Levomilnacipran**

Z. Jane Wang, Hans Renata, Nicole E. Peck, Christopher C. Farwell, Pedro S. Coelho, and Frances H. Arnold*

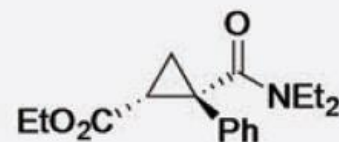


Old cytochrome, new tricks: Mutation of the proximal Cys residue in the cytochrome P450 enzyme from *Bacillus megaterium* (P450-BM3) leads to highly active, oxygen tolerant, and enantio-

selective catalysts for the cyclopropanation of N,N-diethyl-2-phenylacrylamide. Directed evolution of a histidine-ligated P450-BM3 enabled the enantioselective formal synthesis of levomilnacipran.



(His-ligated) P450

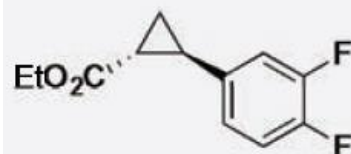
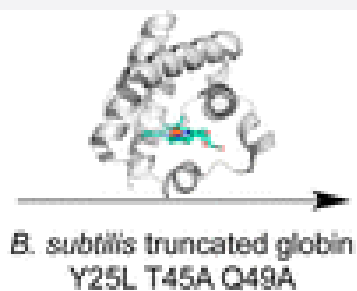
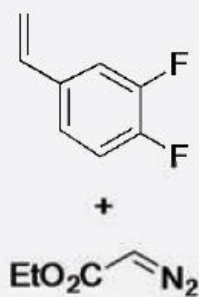


86% yield
90:10 *cis/trans*, 99% ee
preparative scale, aerobic



Highly Stereoselective Biocatalytic Synthesis of Key Cyclopropane Intermediate to Ticagrelor

Kari E. Hernandez, Hans Renata, Russell D. Lewis, S. B. Jennifer Kan, Chen Zhang, Jared Forte, David Rozzell, John A. McIntosh, and Frances H. Arnold



99% trans, 99% ee
70% yield

**BRILINTA**
ticagrelor tablets
(Key intermediate)

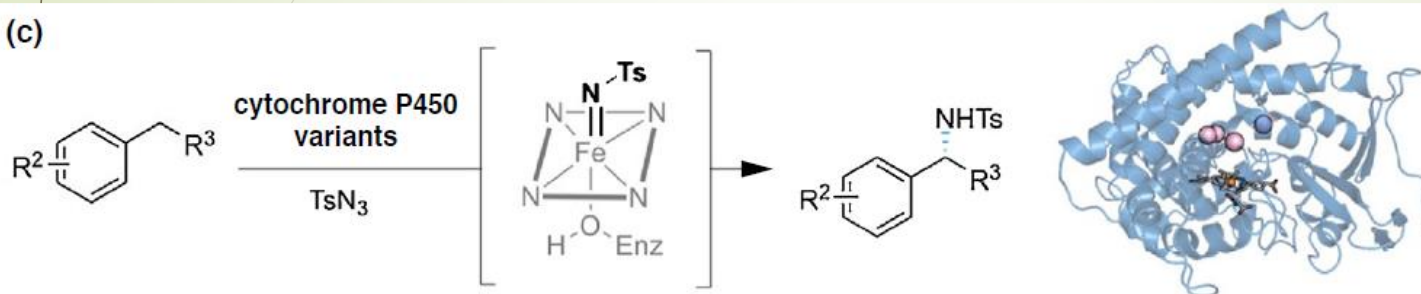
 **provivi**

Enantioselective, intermolecular benzylic C-H amination catalysed by an engineered iron-haem enzyme

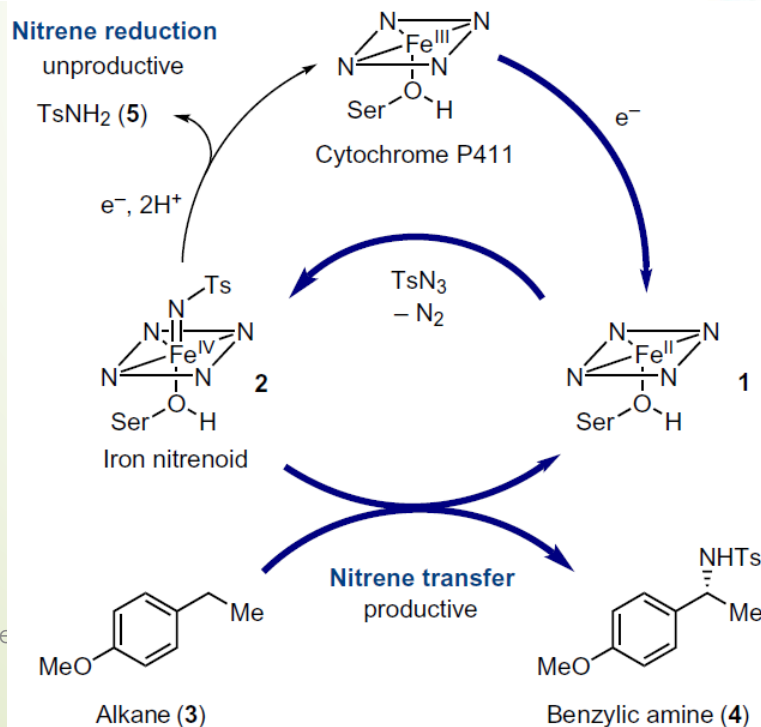
Nature Chemistry (2017) **9**, 629–634

Christopher K. Prier[†], Ruijie K. Zhang[†], Andrew R. Buller, Sabine Brinkmann-Chen and Frances H. Arnold^{*}

(c)



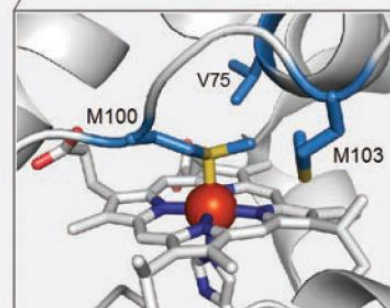
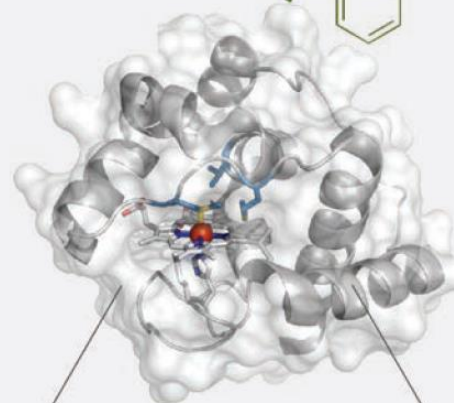
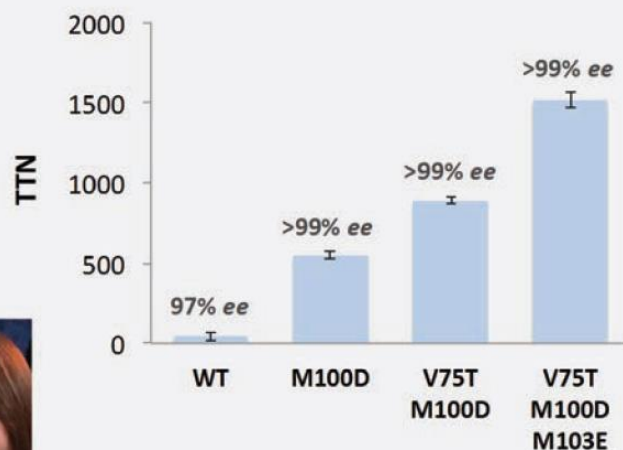
evolved in 4 mutational steps from initial protein[†]
up to 1,300 turnovers and > 99% *e.e.*
substrate scope: 17 examples



Directed evolution of cytochrome c for carbon–silicon bond formation: Bringing silicon to life

S. B. Jennifer Kan, Russell D. Lewis, Kai Chen, Frances H. Arnold*

Directed evolution increased activity 40-fold in just three generations



Jennifer Kan and Rusty Lewis
Kan et al., *Science* 354, 1048 (2016)

Összefoglalás

- **Frances Arnold** munkássága és a rekombináns DNS technológiák fejlődése mára lehetővé tette, hogy a természetes evolúció mintájára a fehérjéket gyakorlatilag tetszőleges felhasználási célra laboratóriumi körülmények között évmilliók helyett rövid idő alatt kiválasztott tulajdonságuk vagy akár tulajdonságaik együttese irányába továbbfejlesszük.
- Az irányított evolúció kivitelezhető *in vitro*, vagy *in vivo* rendszerekben, vagy ezek együttes felhasználásával, módszerei alapulhatnak pontmutációkon, DNS keverésen, ötvözhető szerkezet-alapú illetve számítógépesen segített eljárásokkal.
- Az irányított evolúció az alapkutatásban és az alkalmazott biotechnológia számos területén egyaránt felhasználható, segítségével enzimek, biokatalizátorok, metabolikus útvonalak tulajdonságai javíthatóak vagy akár természetben eddig nem létező funkciók hozhatóak létre.