

Supplemental Data

Diversification of Catalytic Function in a

Synthetic Family of Chimeric Cytochrome P450s

Marco Landwehr, Martina Carbone, Christopher R. Otey, Yougen Li, and Frances H. Arnold

Table S1. Pairwise Correlations of Normalized Activities for Monooxygenases (R1, R2, R3) and Peroxygenases (R0) of Fourteen Chimeras and the A1 and A2 Parents

R² values are reported. Bold and underlined=0.7-1.0; underlined=0.4-0.7; regular=0.0-0.4.

Heme sequence	R0/R1	R0/R2	R0/R3	R1/R2	R1/R3	R2/R3
11111111	<u>0.49</u>	0.00	<u>0.53</u>	0.21	<u>0.66</u>	0.11
22222222	<u>0.70</u>	<u>0.53</u>	<u>0.49</u>	<u>0.75</u>	<u>0.83</u>	<u>0.66</u>
11113311	<u>0.61</u>	<u>0.65</u>	<u>0.49</u>	<u>0.90</u>	<u>0.59</u>	<u>0.78</u>
12112333	0.11	0.04	0.00	<u>0.91</u>	0.11	0.10
21113312	0.14	0.01	0.00	<u>0.73</u>	<u>0.76</u>	<u>0.77</u>
21313111	0.24	0.19	0.05	<u>0.84</u>	0.15	0.39
21313311	0.25	0.28	0.00	<u>0.41</u>	0.01	0.34
21333233	<u>0.90</u>	<u>0.64</u>	<u>0.87</u>	<u>0.72</u>	<u>0.95</u>	<u>0.66</u>
22132231	<u>0.80</u>	<u>0.85</u>	<u>0.56</u>	<u>0.98</u>	<u>0.64</u>	<u>0.60</u>
22213132	<u>0.46</u>	0.08	0.37	0.11	0.01	<u>0.54</u>
22312333	0.01	0.02	0.00	<u>0.69</u>	<u>0.69</u>	0.25
22313233	0.17	0.01	0.08	0.02	<u>0.85</u>	0.07
23132233	<u>0.96</u>	<u>0.89</u>	<u>0.97</u>	<u>0.90</u>	<u>0.99</u>	<u>0.90</u>
32312231	0.14	0.06	0.02	0.07	0.04	0.21
32312333	0.33	<u>0.41</u>	0.02	<u>0.97</u>	<u>0.40</u>	0.33
32313233	0.15	<u>0.44</u>	0.09	<u>0.74</u>	<u>0.60</u>	0.38

Table S2. Average Activity in Absorbance Units for Each Substrate-Construct Pair

Maximal value for each substrate in bold/italic.

	2-phenoxyethanol	ethoxybenzene	ethyl phenoxyacetate	3-phenoxytoluene	ethyl 4-phenylbutyrate	diphenyl ether	2-amino-5-chloro-benzoxazole	propranolol	chlorzoxazone	tolbutamide	12-pNCA
11111111-R0	0.105	0.000	0.000	0.000	0.013	0.027	0.000	0.011	0.013	0.011	0.178
11111111-R1	0.152	0.115	0.136	0.053	0.202	0.177	0.055	0.037	0.032	0.033	0.302
11111111-R2	0.484	0.179	0.157	0.118	0.200	0.114	0.146	0.029	0.026	0.029	0.114
11111111-R3	0.048	0.000	0.038	0.000	0.059	0.030	0.054	0.023	0.019	0.022	0.132
22222222-R0	0.054	0.000	0.000	0.000	0.013	0.009	0.000	0.010	0.014	0.011	0.026
22222222-R1	0.042	0.000	0.038	0.000	0.027	0.031	0.020	0.021	0.016	0.020	0.064
22222222-R2	0.039	0.000	0.045	0.000	0.027	0.083	0.022	0.020	0.016	0.018	0.037
22222222-R3	0.065	0.000	0.040	0.000	0.048	0.031	0.055	0.028	0.024	0.024	0.079
33333333-R3	0.049	0.000	0.033	0.000	0.046	0.026	0.056	0.030	0.022	0.024	0.063
11113311-R0	0.463	0.000	0.046	0.000	0.011	0.031	0.000	0.013	0.012	0.009	0.190
11113311-R1	0.448	0.238	0.160	0.072	0.135	0.225	0.061	0.029	0.028	0.027	0.364
11113311-R2	0.329	0.145	0.087	0.000	0.091	0.159	0.051	0.030	0.024	0.024	0.277
11113311-R3	0.118	0.000	0.033	0.000	0.032	0.028	0.047	0.022	0.017	0.019	0.155
12112333-R0	0.544	0.053	0.048	0.000	0.013	0.038	0.000	0.012	0.014	0.013	0.056
12112333-R1	0.513	0.282	0.163	0.091	0.124	0.414	0.038	0.020	0.017	0.019	0.170
12112333-R2	0.511	0.334	0.163	0.116	0.135	0.462	0.063	0.025	0.024	0.025	0.143
12112333-R3	0.129	0.044	0.039	0.000	0.043	0.058	0.080	0.025	0.019	0.022	0.053
21113312-R0	0.522	0.135	0.078	0.000	0.017	0.034	0.000	0.017	0.017	0.013	0.069
21113312-R1	0.269	0.107	0.084	0.000	0.063	0.056	0.046	0.038	0.045	0.034	0.065
21113312-R2	0.213	0.085	0.073	0.046	0.066	0.047	0.055	0.033	0.038	0.031	0.050
21113312-R3	0.179	0.063	0.058	0.000	0.049	0.034	0.075	0.034	0.037	0.033	0.031
21313111-R0	0.731	0.105	0.073	0.000	0.016	0.058	0.000	0.018	0.012	0.013	0.000
21313111-R1	0.617	0.313	0.173	0.167	0.089	0.370	0.044	0.024	0.024	0.024	0.033
21313111-R2	0.560	0.282	0.139	0.152	0.102	0.332	0.079	0.029	0.027	0.028	0.000
21313111-R3	0.767	0.256	0.258	0.207	0.260	0.518	0.137	0.102	0.089	0.076	0.000
21313311-R0	0.365	0.000	0.046	0.000	0.009	0.038	0.000	0.012	0.011	0.012	0.000
21313311-R1	0.343	0.082	0.109	0.061	0.089	0.202	0.017	0.019	0.015	0.019	0.000
21313311-R2	0.306	0.074	0.092	0.000	0.086	0.149	0.050	0.030	0.029	0.029	0.000
21313311-R3	0.190	0.109	0.098	0.097	0.115	0.150	0.136	0.072	0.071	0.060	0.000
21333233-R0	0.113	0.000	0.036	0.000	0.020	0.016	0.023	0.025	0.020	0.020	0.000
21333233-R1	0.046	0.000	0.035	0.000	0.029	0.026	0.022	0.024	0.019	0.022	0.000
21333233-R2	0.180	0.104	0.119	0.000	0.070	0.090	0.039	0.036	0.034	0.031	0.062
21333233-R3	0.057	0.000	0.035	0.000	0.036	0.028	0.040	0.026	0.025	0.024	0.000
22132231-R0	0.034	0.000	0.000	0.000	0.009	0.006	0.000	0.005	0.008	0.007	0.000
22132231-R1	0.025	0.000	0.024	0.000	0.023	0.018	0.000	0.018	0.014	0.018	0.000
22132231-R2	0.045	0.000	0.035	0.000	0.026	0.033	0.000	0.018	0.016	0.020	0.000
22132231-R3	0.022	0.000	0.000	0.000	0.016	0.015	0.025	0.014	0.012	0.015	0.000
22213132-R0	0.269	0.051	0.061	0.000	0.010	0.017	0.020	0.010	0.019	0.013	0.000
22213132-R1	0.584	0.217	0.238	0.076	0.081	0.172	0.068	0.031	0.040	0.030	0.133
22213132-R2	0.377	0.289	0.253	0.169	0.153	0.206	0.152	0.122	0.130	0.126	0.000
22213132-R3	0.172	0.070	0.077	0.000	0.038	0.043	0.051	0.026	0.025	0.024	0.015
22312333-R0	0.103	0.000	0.024	0.000	0.008	0.017	0.000	0.009	0.006	0.009	0.000
22312333-R1	0.080	0.000	0.044	0.000	0.058	0.132	0.082	0.015	0.015	0.018	0.000
22312333-R2	0.172	0.067	0.084	0.049	0.121	0.356	0.117	0.019	0.012	0.017	0.000
22312333-R3	0.034	0.000	0.000	0.000	0.022	0.019	0.093	0.012	0.011	0.015	0.000
22313233-R0	0.185	0.000	0.050	0.000	0.011	0.029	0.000	0.008	0.009	0.010	0.000
22313233-R1	0.064	0.000	0.036	0.000	0.033	0.044	0.023	0.021	0.018	0.021	0.000
22313233-R2	0.260	0.204	0.150	0.137	0.089	0.415	0.049	0.022	0.016	0.019	0.000
22313233-R3	0.077	0.000	0.041	0.000	0.034	0.031	0.053	0.026	0.020	0.023	0.000
23132233-R0	0.024	0.000	0.000	0.000	0.019	0.019	0.022	0.025	0.021	0.021	0.000
23132233-R1	0.044	0.000	0.043	0.000	0.051	0.037	0.035	0.042	0.039	0.036	0.000
23132233-R2	0.049	0.000	0.055	0.046	0.054	0.044	0.043	0.043	0.041	0.038	0.000
23132233-R3	0.030	0.000	0.031	0.000	0.034	0.024	0.025	0.031	0.026	0.028	0.000
32312231-R0	0.354	0.065	0.085	0.000	0.016	0.067	0.000	0.015	0.013	0.018	0.000
32312231-R1	0.067	0.053	0.055	0.000	0.051	0.156	0.063	0.021	0.016	0.021	0.139
32312231-R2	0.204	0.245	0.277	0.154	0.090	0.448	0.063	0.019	0.016	0.020	0.048
32312231-R3	0.064	0.000	0.035	0.000	0.025	0.024	0.044	0.018	0.015	0.018	0.000
32312333-R0	1.101	0.338	0.236	0.076	0.025	0.297	0.067	0.019	0.019	0.019	0.000
32312333-R1	1.030	0.860	0.803	0.320	0.167	0.664	0.233	0.022	0.048	0.023	0.034
32312333-R2	0.907	0.712	0.653	0.246	0.133	0.538	0.174	0.018	0.023	0.022	0.044
32312333-R3	0.212	0.189	0.264	0.178	0.066	0.561	0.145	0.023	0.023	0.023	0.000
32313233-R0	0.796	0.383	0.276	0.095	0.036	0.389	0.121	0.009	0.023	0.023	0.000
32313233-R1	0.249	0.471	0.476	0.280	0.163	0.742	0.261	0.044	0.048	0.039	0.018
32313233-R2	0.535	0.566	0.454	0.197	0.153	0.485	0.229	0.029	0.037	0.029	0.017
32313233-R3	0.147	0.123	0.125	0.081	0.056	0.304	0.153	0.034	0.032	0.031	0.000

Table S3. Standard Deviations/Average of Absorbance for Each Substrate-Construct Pair

Blanks indicate where the average absorbance equals zero.

	2-phenoxyethanol	ethoxybenzene	ethyl phenoxyacetate	3-phenoxytoluene	ethyl 4-phenylbutyrate	diphenyl ether	2-amino-5-chloro-benzoxazole	propranolol	chlorzoxazone	tolbutamide	12-pNCA
11111111-R0	0.091				0.233	0.735		0.162	0.148	0.098	0.052
11111111-R1	0.093	0.183	0.058	0.128	0.033	0.118	0.364	0.054	0.128	0.106	0.076
11111111-R2	0.039	0.020	0.118	0.135	0.041	0.030	0.112	0.113	0.120	0.067	0.159
11111111-R3	0.054		0.031		0.029	0.066	0.189	0.092	0.082	0.118	0.083
22222222-R0	0.089				0.156	0.264		0.261	0.005	0.159	0.125
22222222-R1	0.128		0.074		0.077	0.119	0.255	0.076	0.144	0.144	0.040
22222222-R2	0.071		0.054		0.113	0.081	0.251	0.085	0.108	0.099	0.011
22222222-R3	0.053		0.111		0.084	0.070	0.058	0.155	0.123	0.086	0.096
33333333-R3	0.134		0.126		0.017	0.094	0.082	0.110	0.155	0.088	0.068
11113311-R0	0.092		0.097		0.086	0.370		0.117	0.083	0.000	0.058
11113311-R1	0.045	0.158	0.124	0.092	0.159	0.032	0.622	0.084	0.127	0.079	0.007
11113311-R2	0.046	0.018	0.113		0.035	0.079	0.177	0.130	0.102	0.038	0.012
11113311-R3	0.103		0.093		0.033	0.065	0.110	0.110	0.176	0.022	0.102
12112333-R0	0.012	0.046	0.045		0.159	0.034		0.193	0.114	0.067	0.073
12112333-R1	0.092	0.014	0.114	0.107	0.029	0.104	0.065	0.177	0.137	0.069	0.075
12112333-R2	0.054	0.118	0.094	0.021	0.024	0.081	0.115	0.160	0.019	0.073	0.129
12112333-R3	0.039	0.016	0.057		0.020	0.035	0.064	0.082	0.066	0.115	0.133
21113312-R0	0.129	0.076	0.126		0.074	0.176		0.156	0.053	0.156	0.118
21113312-R1	0.065	0.049	0.060		0.045	0.046	0.075	0.156	0.051	0.058	0.250
21113312-R2	0.024	0.190	0.114	0.150	0.064	0.182	0.183	0.182	0.088	0.051	0.379
21113312-R3	0.094	0.147	0.087		0.051	0.044	0.005	0.350	0.121	0.110	0.080
21313111-R0	0.078	0.177	0.142		0.038	0.092		0.138	0.167	0.107	
21313111-R1	0.116	0.046	0.019	0.088	0.055	0.032	0.239	0.135	0.107	0.083	0.095
21313111-R2	0.012	0.084	0.076	0.039	0.037	0.069	0.424	0.083	0.106	0.088	
21313111-R3	0.038	0.200	0.092	0.034	0.034	0.107	0.195	0.035	0.145	0.127	
21313311-R0	0.065		0.143		0.162	0.078		0.041	0.168	0.105	
21313311-R1	0.026	0.051	0.166	0.178	0.086	0.024	0.448	0.029	0.097	0.072	
21313311-R2	0.137	0.141	0.169		0.018	0.049	0.020	0.183	0.084	0.049	
21313311-R3	0.012	0.053	0.038	0.075	0.010	0.111	0.131	0.148	0.091	0.040	
21332333-R0	0.062		0.242		0.110	0.188	0.377	0.159	0.133	0.128	
21332333-R1	0.095		0.049		0.038	0.192	0.189	0.085	0.074	0.120	
21332333-R2	0.036	0.183	0.135		0.016	0.044	0.026	0.119	0.117	0.062	0.105
21332333-R3	0.043		0.044		0.044	0.182	0.067	0.043	0.082	0.041	
22132231-R0	0.002				0.180	0.398		0.677	0.060	0.189	
22132231-R1	0.052		0.041		0.051	0.077		0.183	0.166	0.110	
22132231-R2	0.063		0.067		0.019	0.092		0.063	0.148	0.073	
22132231-R3	0.080				0.061	0.014	0.137	0.142	0.160	0.044	
22213132-R0	0.153	0.128	0.058		0.081	0.147	0.156	0.166	0.073	0.137	
22213132-R1	0.077	0.118	0.104	0.053	0.066	0.058	0.339	0.098	0.147	0.030	0.048
22213132-R2	0.065	0.091	0.059	0.075	0.050	0.039	0.070	0.124	0.120	0.005	
22213132-R3	0.097	0.061	0.116		0.061	0.052	0.119	0.144	0.111	0.114	0.000
22312333-R0	0.023		0.173		0.181	0.387		0.151	0.132	0.170	
22312333-R1	0.103		0.110		0.046	0.068	0.266	0.098	0.085	0.076	
22312333-R2	0.060	0.191	0.108	0.050	0.047	0.059	0.042	0.160	0.091	0.016	
22312333-R3	0.101				0.077	0.127	0.153	0.121	0.264	0.038	
22313233-R0	0.100		0.158		0.080	0.134		0.334	0.246	0.127	
22313233-R1	0.055		0.023		0.158	0.034	0.154	0.101	0.079	0.104	
22313233-R2	0.076	0.245	0.144	0.062	0.079	0.019	0.118	0.006	0.134	0.106	
22313233-R3	0.028		0.005		0.036	0.141	0.155	0.040	0.081	0.104	
23132233-R0	0.056				0.013	0.095	0.058	0.092	0.182	0.086	
23132233-R1	0.050		0.109		0.045	0.050	0.060	0.012	0.116	0.078	
23132233-R2	0.042		0.009	0.178	0.076	0.067	0.078	0.122	0.091	0.118	
23132233-R3	0.061		0.052		0.028	0.047	0.146	0.053	0.089	0.098	
32312231-R0	0.119	0.119	0.019		0.085	0.034		0.167	0.105	0.177	
32312231-R1	0.114	0.046	0.133		0.108	0.074	0.531	0.050	0.102	0.064	0.190
32312231-R2	0.088	0.061	0.062	0.146	0.107	0.058	0.174	0.096	0.191	0.088	0.085
32312231-R3	0.036		0.014		0.031	0.118	0.054	0.055	0.117	0.051	
32312333-R0	0.081	0.074	0.089	0.034	0.071	0.015	0.056	0.137	0.077	0.125	
32312333-R1	0.068	0.111	0.045	0.020	0.056	0.113	0.014	0.052	0.102	0.042	0.457
32312333-R2	0.051	0.107	0.035	0.019	0.049	0.097	0.150	0.173	0.023	0.068	0.139
32312333-R3	0.107	0.070	0.079	0.133	0.030	0.075	0.095	0.050	0.078	0.069	
32313233-R0	0.090	0.149	0.049	0.120	0.031	0.140	0.050	1.863	0.074	0.067	
32313233-R1	0.143	0.105	0.036	0.011	0.063	0.089	0.184	0.147	0.078	0.044	0.062
32313233-R2	0.064	0.053	0.033	0.020	0.083	0.113	0.102	0.122	0.072	0.035	0.346
32313233-R3	0.064	0.093	0.073	0.034	0.013	0.034	0.005	0.132	0.133	0.039	

Table S4. Summary of Error Statistics for Collected Absorbance Data Sorted by Substrates

The percent of the standard deviation divided by the average value and the percentage of data points retained for the analysis are measures of data quality. For each substrate, 65 data points were collected. The Triplicates/Duplicates column indicates how many of those data points were used for the analysis performed here.

Substrate	% SD/avg (mean)	% points retained	Triplicates/ Duplicates
2-phenoxyethanol (PE)	7.1	99	63/2
ethoxybenzene (EB)	10.2	87	39/26
ethyl phenoxyacetate (PA)	8.5	95	56/9
3-phenoxytoluene (PT)	8.0	94	53/12
ethyl 4-phenylbutyrate (PB)	6.7	100	65/0
diphenyl ether (DP)	10.9	95	56/9
zoxazolamine (ZX)	16.0	87	40/25
propranolol (PR)	15.6	90	45/20
chlorzoxazone (CH)	11.2	99	63/2
tolbutamide (TB)	8.5	99	63/2
12-p-nitrophenoxy-carboxylic acid (PN)	11.8	87	40/25

Table S5. Summary of Most Active Chimeric Proteins for Each Substrate

Pairwise correlation matrix of the activities on all substrates. R^2 values are reported. Bold and underlined=0.7-1.0; Underlined=0.4-0.7; Regular=0.0-0.4

Protein	PE	EB	PA	PT	PB	DP	ZX	PR	CH	TB	PN	
32312231-R0	PE	N.A.	<u>0.61</u>	<u>0.48</u>	0.37	0.18	0.35	0.15	0.01	0.05	0.02	0.01
32312231-R1	EB		N.A.	<u>0.92</u>	<u>0.80</u>	<u>0.41</u>	<u>0.73</u>	<u>0.56</u>	0.04	0.13	0.06	0.00
32312231-R1	PA			N.A.	<u>0.81</u>	0.39	<u>0.71</u>	<u>0.62</u>	0.04	0.14	0.06	0.00
32312231-R1	PT				N.A.	<u>0.56</u>	<u>0.85</u>	<u>0.66</u>	0.14	0.24	0.16	0.00
21313111-R3	PB					N.A.	<u>0.49</u>	<u>0.49</u>	0.36	0.37	0.33	0.08
32313233-R1	DP						N.A.	<u>0.58</u>	0.05	0.10	0.06	0.00
32313233-R1	ZX							N.A.	0.18	0.29	0.21	0.00
22213132-R2	PR								N.A.	<u>0.91</u>	<u>0.95</u>	0.00
22213132-R2	CH									N.A.	<u>0.94</u>	0.00
22213132-R2	TB										N.A.	0.00
11113311-R1	PN											N.A.

Figure S1. Examples of the Correlation of Absorbances Values Measured within Substrate Group A and Group B

Panel (A) shows the correlation between diphenyl ether (DP) and ethyl phenoxyacetate (PA) with a $R^2=0.71$. Panel (B) shows the correlation between tolbutamide (TB) activity and chlorzoxazone (CH) activity with $R^2=0.94$.

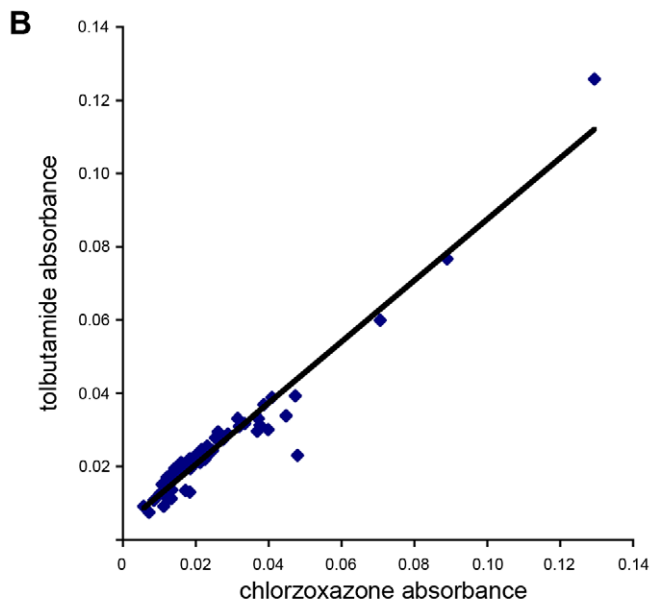
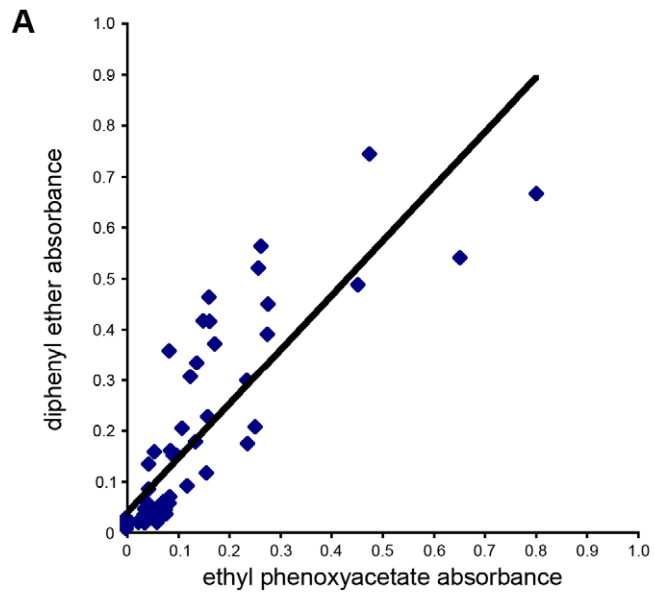
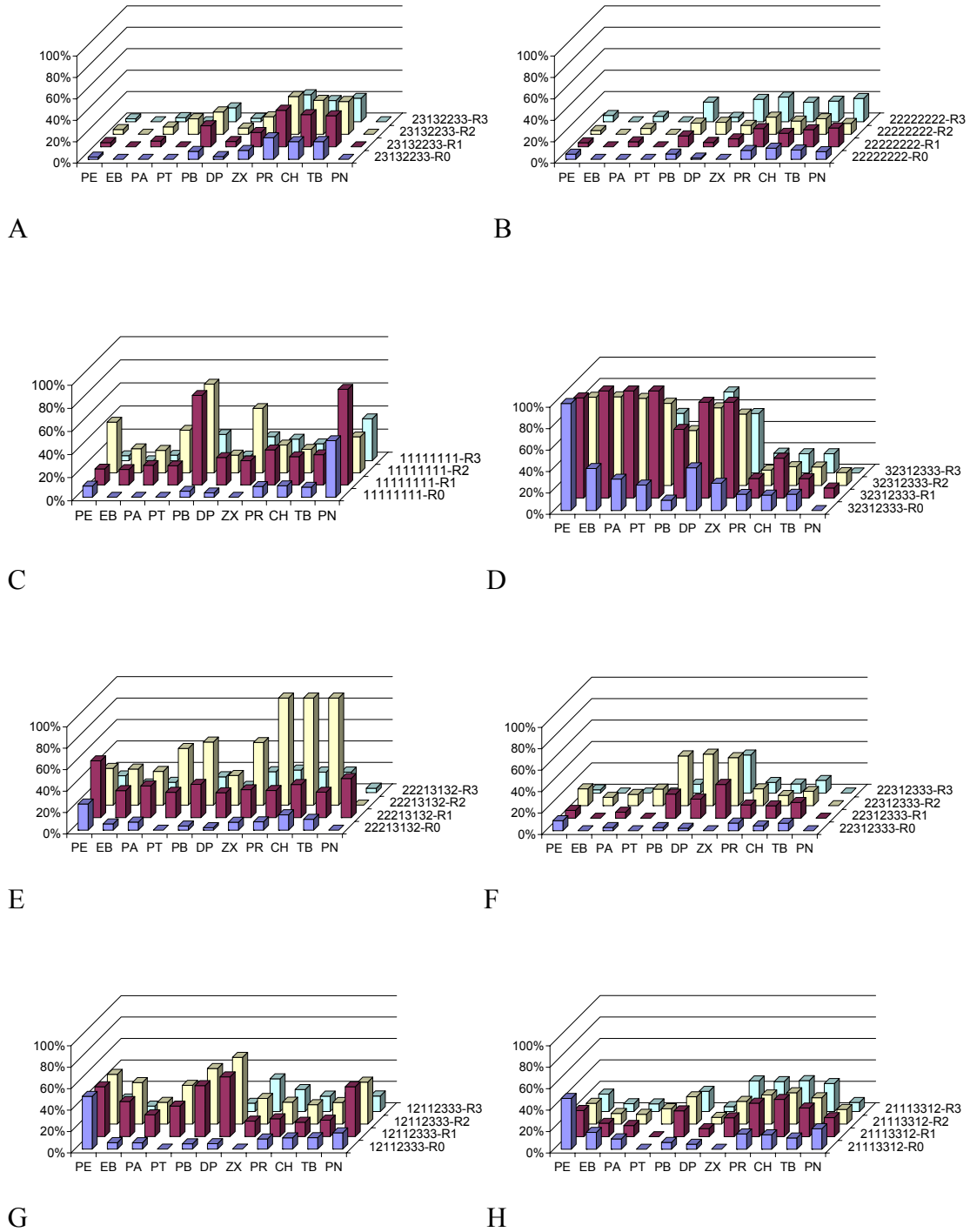
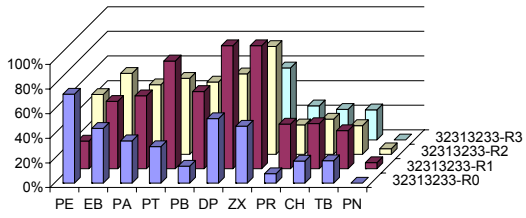


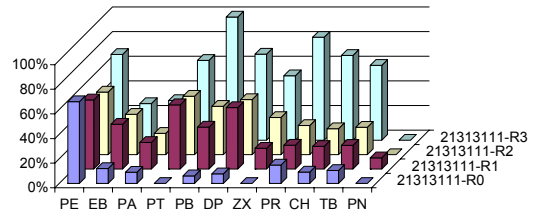
Figure S2. Substrate-Activity Profiles of All Chimeras

The columns are color coded as follows: heme domain (R0, blue), R1- (purple), R2- (yellow), R3-fusion (turquoise) protein.

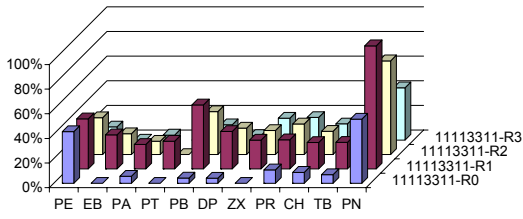




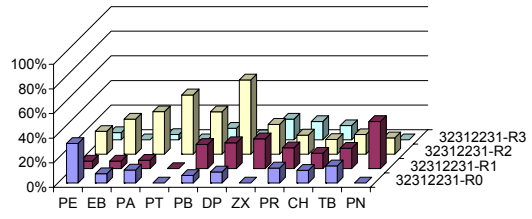
I



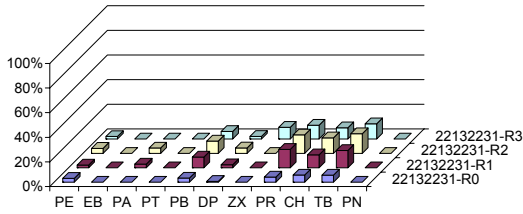
J



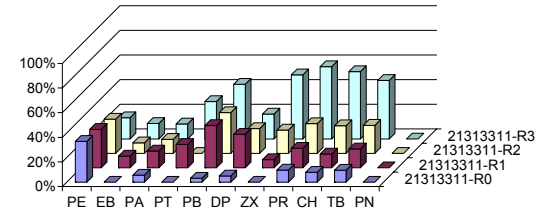
K



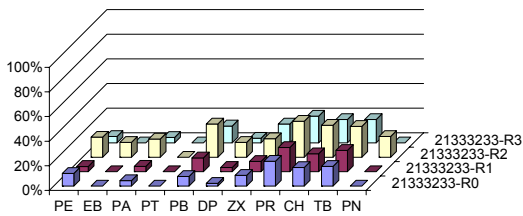
L



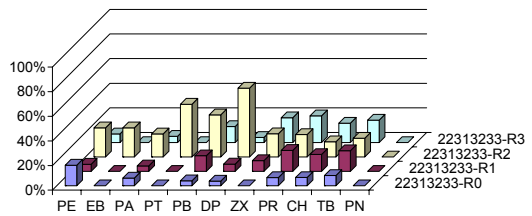
M



N



O



P