



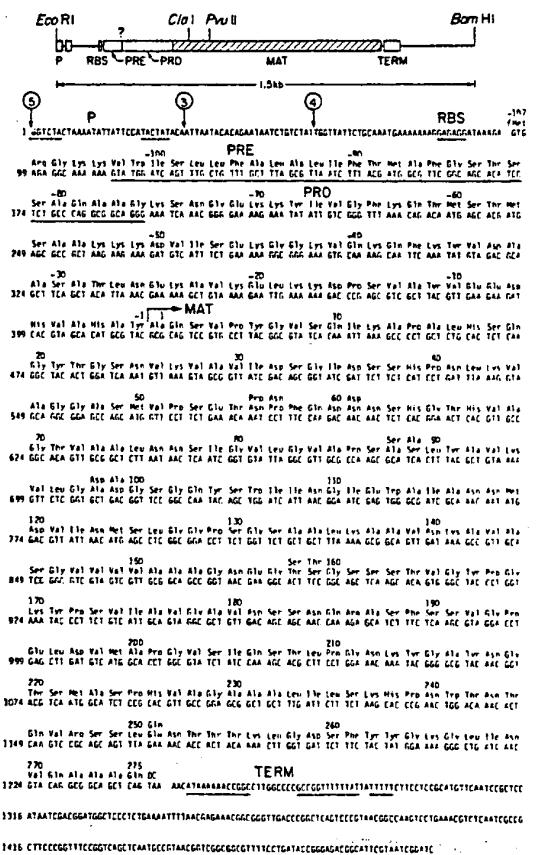
(12) PATENTSKRIFT

Patent- og
Varemærkestyrelsen

- (51) Int.Cl⁷: C 12 N 15/00 C 12 N 1/00 C 12 N 9/54
- (21) Patentansøgning nr: PA 1987 02217
- (22) Indleveringsdag: 1987-04-30
- (24) Løbedag: 1987-04-30
- (41) Alm. tilgængelig: 1987-10-31
- (45) Patentets meddelelse bkg. den: 2004-11-22
- (30) Prioritet: 1986-04-30 US 858594 1987-04-06 US 035652
- (73) Patenthaver: Genentech Inc., 460 Point San Bruno Blvd., South San Francisco, California 94080, USA
- (72) Opfinder: James Allen Wells, 65 Otay Avenue, San Mateo, Californien 94403, USA
Brian C. Cunningham, 24 Olive Avenue, Piedmont, Californien 94611, USA
Robert Mark Caldwell, 1828 Broadway, NO.101, San Francisco, Californien 94109, USA
David Aaron Estell, 250 Diablo Avenue, Mountain View, Californien 94043, USA
Scott Douglas Power, 732 Olive Court, San Bruno, Californien 94066, USA
Richard Ray Bott, 3032 Hillside Drive, Burlingame, California 94010, USA
- (74) Fuldmægtig: Chas. Hude A/S, H.C. Andersens Boulevard 33, 1780 København V, Danmark

- (54) Benævnelse: Ikke-humane carbonylhydrolasemutanter, DNA-sekvenser og vektorer der koder for sådanne og værter der er transformert med sådanne vektorer
- (56) Fremdragne publikationer:
Ingen
- (57) Sammendrag:

Carbonylhydrolasemutanter afledt af aminosyresekvensen fra naturligt forekommende eller rekombinerede ikke-humane carbonylhydrolaser og DNA-sekvenser, som koder for samme. Mutantcarbonylhydrolaserne opnås sædvanligvis ved in vitro-modifikation af en forstadie-DNA-sekvens, som koder for den naturligt forekommende eller rekombinerede carbonylhydrolase til at kode for substitutionen, indsættelsen eller deletionen af en eller flere aminosyrer i forstadiecarbonylhydrolasens aminosyresekvens. Sådanne mutanter har en eller flere egenskaber, som er forskellige fra den samme egenskab hos forstadiehydrolasen.



Den seneste udvikling af forskellige in-vitro-teknikker til manipulering af de DNA-sekvenser, som koder for naturligt forekommende polypeptider, samt de seneste udviklinger i den kemiske syntese af relativt korte sekvenser af enkelt- og dobbeltstrenget DNA har fremkaldt den tanke, at sådanne teknikker kan anvendes til at modifcere enzymer for at forbedre en eller anden funktionel egenskab på en forudsigelig måde. K.M. Ulmer (1983) Science 219, 666-671. Det eneste deri beskrevne udførelseseksempel er substitutionen af en enkelt aminosyre i det aktive sted hos tyrosyl-tRNA-syntetase (Cys35-Ser), som fører til en reduktion i enzymatisk aktivitet, se G. Winther et al. (1982) Nature 299, 756-758; og A.J. Wilkinson et al. (1983) Biochemistry 22, 3581-3586 (Cys35-Gly-mutation resulterede ligeledes i formindsket aktivitet).

Når den samme t-RNA-syntetase blev modificeret ved at substi-
tuere en anden aminosyre i det aktive sted med to forskellige
aminosyrer, viste en af mutanterne (Thr51-Ala) ifølge rapporten
en forudsagt moderat forøgelse i k_{cat}/K_m , mens en anden
mutant (Thr51-Pro) viste en massiv forøgelse i k_{cat}/K_m , som ikke
kunne forklares med sikkerhed, A.H. Wilkinson et al., (1984) Nature 307, 187-188.

Et andet rapporteret eksempel på en enkelt substitution af en aminosyrerest er substitutionen af isoleucin med cystein i den tredje rest i T4-lysozym. L.J. Perry et al. (1984) Science 226, 555-557. Det resulterende muterede lysozym blev oxideret mildt til dannelse af en disulfidbinding mellem den nye cysteinrest i position 3 og den native cystein i position 97. Denne tværbundne mutant blev oprindeligt beskrevet af forfatteren som værende enzymatisk identisk med, men mere termisk stabil end vildtype-enzymet. I en "Note Added in Proof" angav forfatteren imidlertid, at den observerede forøgede stabilitet sandsynligvis skyldtes en kemisk modifikation af cystein ved rest 54, eftersom mutant-lysozymet med en fri thiol ved Cys54 har en termisk stabilitet, som er identisk med vildtypelysozymets stabilitet.

Tilsvarende er det blevet rapporteret, at en modificeret dihydrofolatreduktase fra E. coli er blevet modificeret på tilsva-

- rende måder til indførelse af en cystein, som kunne tværbindes med en naturligt forekommende cystein i reduktasen, D.E. Villafranca et al. (1983) Science 222, 782-788. Forfatteren angiver, at denne mutant er fuldt reaktiv i den reducerede tilstand, men har signifikant formindsket aktivitet i den oksiderede tilstand. Desuden rapporteres to andre substitutioner af specifikke aminosyrerester, som resulterede i mutanter, der er havde formindsket eller ingen aktivitet.
- I EP publikation nr. 0130756 beskrives substitutionen af specifikke rester i B. amyloliquefaciens-subtilisin med specifikke aminosyrer. Således er Met222 blevet substitueret med alle 19 andre aminosyrer, Gly166 med 9 forskellige aminosyrer og Gly169 med Ala og Ser.
- Som angivet nedenfor har flere laboratorier også rapporteret om anvendelse af stedsrettet mutagenese til fremkaldelse af mutationen af mere end en aminosyrerest i et polypeptid.
- Den aminoterminale region af signalpeptidet for prolipoproteinet i den ydre E. coli-membran blev angivet som værende ændret ved substitutionen eller deletionen af resterne 2 og 3 til fremkaldelse af en ladningsændring i den region af polypeptidet, S. Inoyye et al. (1982) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 79, 3438-3441. Det samme laboratorium har også beskrevet substitutionen og deletionen af aminosyreresterne 9 og 14 for at bestemme virkningerne af en sådan substitution på den hydrofobe region af den samme signalsekvens, S. Inouye et al. (1984) J. Biol. Chem. 259, 3729-3733.
- Dobbeltsmutanter i det aktive sted i tyrosyl-tRNA-syntetase er også blevet rapporteret, P.J. Carter et al. (1984) Cell 38, 835-840. I denne rapport blev den forbedrede affinitet af den tidligere beskrevne Thr51-Pro-mutant over for ATP undersøgt ved frembringelse af en anden mutation i enzymets aktive sted. En af dobbeltsmutanterne Gly35/Pro51, viste ifølge rapporten et uventet resultat, idet den bandt ATP i overgangstilstanden bedre end hvad der var forventet ud fra de to enkelte mutanter. Desuden gør forfatteren opmærksom på, at det, i det mind-

ste for en dobbeltmutant, ikke nemt kan forudsiges, hvordan en substitution ændrer den virkning, der forårsages af den anden substitution, og at man må være forsiktig med at fortolke sådanne substitutioner.

5

I US patentskrift nr. 4.532.207 er beskrevet en mutant, hvor en polyargininhale blev knyttet til den C-terminale rest af β -urogastron ved at modificere den DNA-sekvens, som koder for polypeptidet. Som beskrevet ændrede polyargininhalen urogastron-polyargininhybridens elektroforetiske mobilitet, hvilket muliggjorde selektiv oprensning. Polyargininen blev derefter fjernet, ifølge patenthaveren med en polyargininspecifik exopeptidase til fremstilling af den oprensede urogastron. Korrekt fortolket beskrives i denne reference hybridpolypeptider, som ikke udgør mutantpolypeptider indeholdende substitutionen, indsættelsen eller deletionen af en eller flere aminosyrer af et naturligt forekommende polypeptid.

10

15

Der er også blevet rapporteret om enkelte mutanter og dobbeltmutanter af rottepankreas-trypsin, C.S. Craik et al. (1985) Science 228, 291-297. Som rapporteret blev glycinrester i positionerne 216 og 226 erstattet med alaninrester til fremstilling af tre trypsinmutanter (to enkelte mutanter og en dobbeltmutant). Når det drejer sig om enkeltmutanterne, angav forfatterne, at man måtte forvente en differentiel virkning på Km. De rapporterede i stedet en ændring i specifitet (kcat/Km), som primært var resultatet af en formindskelse af kcat. I modsætning hertil viste dobbeltmutanten ifølge rapporten en differentiel forøgelse i Km for lysyl- og arginylsubstrater sammenlignet med vildtypetrypsin, men havde praktisk talt ingen katalytisk aktivitet.

20

25

30

De ovenfor diskuterede referencer er udelukkende medtaget af hensyn til deres beskrivelse før den foreliggende sags indleveringsdato, og intet heri skal opfattes som en tilkendegivelse af, at opfinderne ikke er berettiget til at foruddatere en sådan beskrivelse i form af en tidligere opfindelse eller prioritet baseret på tidligere indleverede ansøgninger.

Baseret på de ovenstående referencer fremgår det imidlertid, at modifikationen af vildtype-enzymers aminosyresekvens ofte resulterer i formindskelse eller ødelæggelse af biologisk aktivitet.

5

Det er derfor et formål heri at tilvejebringe carbonylhydrolasemutanter, som har mindst en egenskab, som er forskellig fra den samme egenskab hos det carbonylhydrolaseforstadium, hvorfra denne mutants aminosyre hidrører.

10

Det er et yderligere formål at tilvejebringe mutant-DNA-sekvenser, som koder for sådanne carbonylhydrolasemutanter samt ekspressionsvektorer indeholdende sådanne mutant-DNA-sekvenser.

15

Endnu et yderligere formål med den foreliggende opfindelse er at tilvejebringe værtsceller, som er transformerede med sådanne vektorer samt værtsceller, som er i stand til at udtrykke sådanne mutanter enten intracellulært eller ekstracellulært.

20

Opfindelsen omfatter carbonylhydrolasemutanter, fortrinsvis med mindst en egenskab, som er væsentligt forskellig fra den samme egenskab hos den ikke-humane forstadiecarbonylhydrolase, hvorfra mutantens aminosyresekvens hidrører. Disse egenskaber omfatter oxidativ stabilitet, substratspecificitet, katalytisk aktivitet, termisk stabilitet, alkalistabilitet, pH-aktivitetsprofil og modstandsdygtighed over for proteolytisk nedbrydning. Forstadiecarbonylhydrolasen kan være naturligt forekommende carbonylhydrolaser eller rekombinerede carbonylhydrolaser. Carbonylhydrolasemutantens aminosyresekvens er afledt ved substitution, deletion eller indsættelse af en eller flere aminosyrer fra forstadiecarbonylhydrolaseaminosyresekvensen.

30

Opfindelsen omfatter også mutant-DNA-sekvenser, som koder for sådanne carbonylhydrolasemutanter. Opfindelsen angår endvidere ekspressionsvektorer indeholdende sådanne mutant-DNA-sekvenser samt værtsceller, som er transformerede med sådanne vektorer, og som er i stand til at udtrykke disse carbonylhydrolasemutanter.

35

Fig. 1 viser nukleotidsekvensen af den kodende streng, korreleret med aminosyresekvensen af *B. amyloliquefaciens*-subtilisingenet. DNA-sekvensens promotor (p)-, ribosombindingssteds (rbs)- og terminerings (term)-regioner samt sekvenser, som kodder for hydrolasens præsekvens (PRE), formodede prosekvens (PRO) og fuldt udviklede form (MAT) er ligeledes vist.

Fig. 2 er et skematisk diagram, som viser subtilisins substratbindingskløft sammen med substrat.

Fig. 3 er et stereobillede af S-1-bindingsunderstedet hos *B. amyloliquefaciens*-subtilisin, visende et lysin-P-1-substrat bundet til stedet på to forskellige måder. Fig. 3A viser lysin-P-1-substrat bundet til dannelsen af en saltbro med en Glu ved position 156. Fig. 3B viser lysin-P-1-substrat bundet til dannelsen af en saltbro med Glu i position 166.

Fig. 4 er et skematisk diagram af det aktive sted i subtilisin-Asp32, -His64 og -Ser221.

Figurerne 5A og 5B afbilder aminosyresekvensen af subtilisin, opnået fra forskellige kilder. Resterne direkte under hver rest fra *B. amyloliquefaciens*-subtilisin er ækvivalente rester som (1) kan muteres på tilsvarende måde som den, der er beskrevet for *B. amyloliquefaciens*-subtilisin eller (2) kan anvendes som en erstatningsaminosyrerest i *B. amyloliquefaciens*-subtilisin. Fig. 5C afbilleder bevarede rester af *B. amyloliquefaciens*-subtilisin sammenlignet med andre subtilisin-sekvenser.

Figurerne 6A og 6B afbilder inaktiveringen af mutanterne Met222L og Met222Q, når de udsættes for forskellige organiske oxidationsmidler.

Fig. 7 afbilder det ultraviolette spektrum for Met222F-subtilisin og det differensspektrum, der dannes efter inaktivering med diperdodecansyre (DPDA).

Fig. 8 viser mønsteret af cyanogenbromidfordøjelser af ubehandlet og DPDA-oxideret subtilisin-Met222F på SDS-pyridinpeptidgeler med høj opløsningsevne.

Fig. 9 afbilder et kort af cyanogenbromidfragmenterne fra fig. 8 rettet ind efter sekvensen af substitilisin-Met222F.

5 Fig. 10 afbilder konstruktionen af mutationer mellem codonerne 45 og 50 i B. amyloliquefaciens-subtilisin.

Fig. 11 afbilder konstruktionen af mutationer mellem codonerne 122 og 127 i B. amyloliquefaciens-subtilisin.

10 Fig. 12 viser DPDA's virkning på aktiviteten af subtilisinmutanter i positionerne 50 og 124 i subtilisin-Met222F.

Fig. 13 afbilder konstruktionen af mutationer ved codon 166 af B. amyloliquefaciens-subtilisin.

15 Fig. 14 afbilder virkningen af P-1-substratsidekædens hydrofobicitet på vildtype-B. amyloliquefaciens-subtilisins kinetiske parametre.

20 Fig. 15 afbilder virkningen af sidekædesubstitutioner i position 166 på P-1-substratspecificitet. Fig. 15A viser subtilisiner, som er muteret i position 166 indeholdende ikke-forgrenede alkylsubstitutioner og aromatiske sidekædesubstitutioner arrangeret i rækkefølge med stigende molekylvolumen. Fig. 15B viser en serie mutantenzymmer, som går frem gennem β - og γ -forgrenede alifatiske sidekædesubstitutioner med stigende molekylvolumen.

25 Fig. 16 afbilder virkningen af sidekædevolumenet på position 166 på log kcat/Km for forskellige P-1-substrater.

30 Fig. 17 viser substratspecificitetsforskellene mellem Ile166- og vildtype (Gly166)-B. amyloliquefaciens-subtilisin mod en serie alifatiske og aromatiske substrater. Hver stang repræsenterer forskellen i log kcat/Km for Ile166- minus vildtype (Gly166)-subtilisin.

35 Fig. 18 afbilder konstruktionen af mutationer ved codon 169 fra B. amyloliquefaciens-subtilisin.

Fig. 19 afbilder konstruktionen af mutationer ved codon 104 fra B. amyloliquefaciens-subtilisin.

Fig. 20 afbilder konstruktionen af mutationer ved codon 152 fra *B. amyloliquefaciens*-subtilisin.

Fig. 21 afbilder konstruktionen af enkelte mutationer ved codon 156 og dobbelte mutationer ved codonerne 156 og 166 fra *B. amyloliquefaciens*-subtilisin.

Fig. 22 afbilder konstruktionen af mutationer ved codon 217 fra *B. amyloliquefaciens*-subtilisin.

Fig. 23 afbilder k_{cat}/K_m mod pH-profil for mutationer ved codon 156 og 166 i *B. amyloliquefaciens*-subtilisin.

Fig. 24 afbilder k_{cat}/K_m mod pH-profil ved mutationer ved codon 222 i *B. amyloliquefaciens*-subtilisin.

Fig. 25 afbilder konstruktionen af mutanter ved codonerne 94, 95 og 96.

Fig. 26 og 27 afbilder forskellige vildtype- og mutantsubtilisins substratspecificitet over for forskellige substrater.

Fig. 28A, B, C og D afbilder virkningen af ladning i P-1-bindingsstederne på grund af substitutioner ved codon 156 og 166.

Fig. 29A og B er et stereobillede af P-1-bindingsstedet i subtilisin-BPN' visende et lysin-P-1-substrat bundet til stedet på to måder. I 29A bygges lysin-P-1-substrat til dannelsen af en saltbro med en Glu ved codon 156. I 29B bygges lysin-P-1-substrat til dannelsen af en saltbro med Glu ved codon 166.

Fig. 30 viser resterende enzymaktivitet mod temperaturkurver for oprenset vildtype (panel A), C22/C87 (panel B) og C24/C87 (panel C).

Fig. 31 afbilder strategien for dannelsen af punktmutationer i subtilisin-kodningssekvensen ved misinkorporering af α -thiol-deoxynukleotidtriphosphater.

Fig. 32 afbilder den autolytiske stabilitet af oprenset vildtype- og mutantsubtilisin 170E, 107V, 213R og 107V/213R ved alkalisk pH-værdi.

Fig. 33 afbilder den autolytiske stabilitet af oprenset vild-type- og mutantsubtilisin V50, F50 og F50/V107/R213 ved alkalisk pH-værdi.

5 Fig. 34 afbilder strategien for konstruktion af plasmider indeholdende tilfældig kassettemutagenese over resterne 197 til 228.

10 Fig. 35 afbilder de oligodeoxynukleotider, der anvendes til tilfældig kassettemutagenese og resterne 197 til 228.

Fig. 36 afbilder konstruktionen af mutanter ved codon 204.

Fig. 37 afbilder de oligodeoxynukleotider, der anvendes til syntese af mutanter ved codon 204.

15 Opfinderne har opdaget, at forskellige enkelte og multiple in-vitro-mutationer, som involverer substitutionen, deletionen eller indsættelsen af en eller flere aminosyrer i en ikke-human hydrolaseaminosyresekvens kan bibringe sådanne mutanter fordelagtige egenskaber sammenlignet med den ikke-muterede carbonylhydrolase.

25 Specifikt er *B. amyloliquefaciens*-subtilisin, en alkalisk bakteriel protease, blevet muteret ved at modificere den DNA, som koder for subtilisinen, til at kode for substitutionen af en eller flere aminosyrer ved forskellige aminosyrerester i den fuldt udviklede form af subtilisinmolekylet. Disse in-vitro-mutant-subtilisiner har mindst en egenskab, som er anderledes, sammenlignet med den samme egenskab hos forstadie-subtilisinen. Disse modificerede egenskaber falder i flere kategorier, 30 herunder: oxidativ stabilitet, substratspecificitet, termisk stabilitet, alkalistabilitet, katalytisk aktivitet, pH-aktivitetsprofil, modstandsdygtighed over for proteolytisk nedbrydning, Km, kcat og Km/kcat-forholdet.

35 Carbonylhydrolaser er enzymer, som hydrolyserer forbindelser

O

||

indeholdende C-X-bindinger, hvori X er oxygen eller nitrogen.

De omfatter naturligt forekommende carbonylhydrolaser og rekombinerede carbonylhydrolaser. Naturligt forekommende carbonylhydrolaser omfatter principielt hydrolaser, f.eks. lipaser og peptidhydrolaser, f.eks. subtilisiner eller metalloproteaser. Peptidhydrolaser omfatter α -aminoacylpeptidhydrolase, peptidylaminosyrehydrolase, acylaminohydrolase, serincarboxypeptidase, metallocarboxypeptidase, thiolproteinase, carboxylproteinase og metalloproteinase. Serin-, metallo-, thiol- og syreproteaser er inkluderet, lige så vel som endo- og exoproteaser.

"Rekombineret carbonylhydrolase" refererer til en carbonylhydrolase, hvori den DNA-sekvens, som koder for den naturligt forekommende carbonylhydrolase, er modifieret til fremstilling af en mutant-DNA-sekvens, som koder for substitutionen, indsættelsen eller deletionen af en eller flere aminosyrer i carbonylhydrolaseaminosyresekvensen. Egnede modifikationsmetoder er beskrevet heri og i EP publikation nr. 0130756 publisert 9. januar 1985.

Subtilisiner er bakterielle carbonylhydrolaser, som sædvanligvis virker ved at spalte proteiners eller peptiders peptidbindinger. Anvendt heri betyder "subtilisin" en naturligt forekommende subtilisin eller en rekombineret subtilisin. En serie naturligt forekommende subtilisiner vides at blive produceret og ofte udskilt af forskellige bakteriearter. Aminosyresekvenser af medlemmerne af denne serie er ikke fuldstændigt homologe. Subtilisinerne i denne serie udviser imidlertid den samme eller en tilsvarende type proteolytisk aktivitet. Denne klasse af serinproteaser deler en fælles aminosyresekvens, som definerer en katalytisk trehed, som adskiller dem fra den chymotrypsinbeslægtede klasse af serinproteaser. Subtilisinerne og chymotrypsinbeslægtede serinproteaser har begge en katalytisk trehed omfattende aspartat, histidin og serin. I de subtilisinbeslægtede proteaser er den relative rækkefølge af disse aminosyrer, når man læser fra amino- til carboxyenden, as-

partat-histidin-serin. I de chymotrypsinbeslægtede proteaser er den relative rækkefølge imidlertid histidin-aspartat-serin. Subtilisin referer heri således til en serinprotease med subtilisinbeslægtede proteasers katalytiske trehed.

5 "Rekombineret subtilisin" refererer til en subtilisin, hvori den DNA-sekvens, som koder for subtilisinen, er modifieret til fremstilling af en mutant-DNA-sekvens, som koder for substitutionen, deletionen eller indsættelsen af en eller flere 10 aminosyrer i den naturligt forekommende subtilisinaminosyresekvens. Egnede metoder til fremstilling af sådan modifikation omfatter metoder, som er beskrevet heri og i EP publikation nr. 0130756. F.eks. kan den heri beskrevne multiple subtilisinmutant indeholdende substitutionen af methionin ved aminosyreresterne 50, 124 og 222 med henholdsvis phenylalanin, isoleucin og glutamin opfattes som hidrørende fra den rekombinerede subtilisin indeholdende substitutionen af glutamin ved rest 222 (Q222), som er beskrevet i EP publikation nr. 0130756. Den multiple mutant er således fremstillet ved at 15 erstatte methionin med phenylalanin ved rest 50 og methionin med isoleucin ved rest 124 i den rekombinerede Q222-subtilisin.

20

25 "Carbonylhydrolaser" og deres gener kan opnås fra mange prokaryote og eukaryote organismer. Egnede eksempler på prokaryote organismer omfatter gramnegative organismer, såsom *E. coli* eller *pseudomonas* og grampositive bakterier, såsom *mikrococcus* eller *bacillus*. Eksempler på eukaryote organismer, hvorfra carbonylhydrolase og deres gener kan opnås, omfatter gør, såsom *S. cerevisiae*, svampe, såsom *Aspargillus sp.* og ikke-humane pattedyrskilder som f.eks. *Bovine sp.*, hvorfra det gen, som 30 koder for carbonylhydrolasechymosin, kan opnås. Som med subtilisiner kan der opnås en serie carbonylhydrolaser ud fra forskellige beslægtede arter, som har aminosyresekvenser, som ikke er fuldstændigt homologe mellem medlemmerne af denne serie, men som ikke desto mindre udviser samme eller tilsvarende type 35 biologisk aktivitet. Ikke-human carbonylhydrolase, som anvendt heri, har således en funktionel definition, som refererer til

carbonylhydrolaser, der er forbundet, direkte eller indirekte, med prokaryote og ikke-humane, eukaryote kilder.

En "carbonylhydrolasemutant" har en aminosyresekvens, som hidrører fra en ikke-human "forstadie-carbonylhydrolases" aminosyresekvens. Forstadiecarbonylhydrolaserne omfatter naturligt forekommende carbonylhydrolaser og rekombinerede carbonylhydrolaser. Carbonylhydrolasemutantens aminosyresekvens "hidrører" fra forstadiehydrolaseaminosyresekvensen ved substituptionen, deletionen eller indsættelsen af en eller flere aminosyrer i forstadieaminosyresekvensen. En sådan modifikation sker på "forstadie-DNA", som koder for forstadiecarbonylhydrolasens aminosyresekvens nærmere end ved manipulation af selve forstadiecarbonylhydrolasen. Egnede metoder til sådan manipulation af forstadie-DNA-sekvensen omfatter metoder, som er beskrevet heri og i EP publikation nr. 0130756.

Der er identificeret specifikke rester i *B. amyloliquefaciens*-subtilisin til substitution, indsættelse eller deletion. Disse aminosyrepositionsnumre refererer til de numre, som er tildelt den i fig. 1 viste *B. amyloliquefaciens*-subtilisinsekvens. Opfindelsen er imidlertid ikke begrænset til mutationen af denne bestemte subtilisin, men strækker sig til forstadiecarbonylhydrolaser indeholdende aminosyrerester, som er "ækvivalente" med de bestemte identificerede rester i *B. amyloliquefaciens*-subtilisin.

En rest (aminosyre) af en forstadiecarbonylhydrolase er ækvivalent med en rest i *B. amyloliquefaciens*-subtilisin, såfremt den enten er homolog (dvs. svarende i position i enten primær eller tertiar struktur) eller analog med en specifik rest eller del af denne rest i *B. amyloliquefaciens*-subtilisin (dvs. har samme eller tilsvarende funktionel evne til at kombinere, reagere eller vekselvirke kemisk).

Med henblik på at etablere homologi til den primære struktur sammenlignes en forstadiecarbonylhydrolases aminosyresekvens direkte med den primære sekvens af *B. amyloliquefaciens*-subtilisin og især med et sæt rester, som vides at være invariable

i alle subtilisiner, for hvilke sekvensen er kendt (fig. 5C). Efter at have rettet de bevarede rester ind, idet man tager hensyn til nødvendige indsættelser og deletioner for at bibe-
holde denne retten ind (dvs. undgår fjernelsen af bevarede
5 rester gennem vilkårlig deletion og indsættelse) defineres de
rester, som er ækvivalente med bestemte aminosyrer i *B. amyloliquefaciens*-subtilisins primære sekvens. Når de bevarede res-
ter rettes ind, bør fortrinsvis 100% af sådanne rester beva-
res. Når mere end 75% eller så lidt som 50% af de bevarede
10 rester rettes ind, er dette imidlertid også tilstrækkeligt til
at definere ækvivalente rester. Der bør bibeholdes bevarelse
af den katalytiske trehed, Asp32/His64/Ser221.

I f.eks. fig. 5A er aminosyresekvensen for subtilisin fra *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilisin* var. I168 og *B. licheniformis* (carlsbergensis) rettet ind til tilvejebringelse af den maksimale mængde homologi mellem aminosyresekvenser. En sammenligning af disse sekvenser viser, at der er et antal bevarede rester indeholdt i hver sekvens. Disse rester er identificeret
20 i fig. 5C.

Disse bevarede rester kan således anvendes til at definerede de tilsvarende ækvivalente aminosyrerester fra *B. amyloliquefaciens*-subtilisin i andre carbonylhydrolaser, såsom thermitase hidrørende fra *Thermoactinomyces*. Disse to bestemte sekvenser er rettet ind i fig. 5B til fremkalдelse af den maksimale homologi af bevarede rester. Som det kan ses, er der et antal indsættelser og deletioner i thermitasesekvensen sammenlignet med *B. amyloliquefaciens*-subtilisin. I thermitase er den ækvivalente aminosyre af Tyr217 i *B. amyloliquefaciens*-subtilisin den bestemte lysin, som er vist neden for Tyr217.
25
30

I fig. 5A er den ækvivalente aminosyre i position 217 i *B. amyloliquefaciens*-subtilisin Tyr. Det ses ligeledes, at i *B. subtilis*-subtilisin er position 217 også optaget af Tyr, men i *B. licheniformis* er position 217 optaget af Leu.
35

Disse bestemte rester i thermitase, og subtilisin fra *B. subtilisin* og *B. licheniformis*, kan således substitueres med en

anden aminosyre til fremstilling af en mutantcarbonylhydrolase, eftersom de er ækvivalente i primær struktur med Tyr217 i B. amyloliquefaciens-subtilisin. Ækvivalente aminosyrer er naturligvis ikke begrænset til aminosyrer for Tyr217, men strækker sig til enhver rest, som er ækvivalent med en rest i B. amyloliquefaciens, hvad enten sådanne rester er bevarede eller ikke.

Ækvivalente rester, som er homologe på det tertiære struktur-niveau for en forstadie-carbonylhydrolase, hvis tertiære struktur er blevet bestemt ved røntgentkystallografi, er defineret som sådanne, for hvilke atomkoordinaterne for 2 eller flere af hovedkædeatomerne i en bestemt aminosyrerest fra forstadiecarbonylhydrolasen og B. amyloliquefaciens-subtilisin (N på N, CA på CA, C på C og O på O) er inden for 0,13 nm og fortrinsvis 0,1 nm efter at være blevet rettet ind. Der opnås retten ind efter at den bedste model er blevet orienteret og anbragt i stilling til at give det maksimale overlap af atomkoordinater for ikke-hydrogenproteinatomer fra den pågældende carbonylhydrolase med B. amyloliquefaciens-subtilisin. Den bedste model er den krystallografiske model, som giver den laveste R-faktor for eksperimentelle diffraktionsdata ved den højest tilgængelige oplosning.

$$25 \quad R\text{-faktor} = \frac{\sum_h |F_o(h)| - |F_c(h)|}{\sum_h |F_o(h)|}$$

Ækvivalente rester, som er funktionelt analoge med en specifik rest i B. amyloliquefaciens-subtilisin, defineres som de aminosyrer i forstadiecarbonylhydrolaserne, som kan antage en sådan konformation, at de enten ændrer, modifierer eller bidrager til proteinstruktur, substratbinding eller katalyse på en måde, som er defineret og tilskrevet en specifik rest i B. amyloliquefaciens-subtilisin som beskrevet heri. De er desuden de rester i forstadiecarbonylhydrolasen (for hvilken en tertiær struktur er blevet opnået ved røntgenkystallografi), som optager en analog position i det omfang, at skønt hovedkæde-

atomerne i en givet rest muligvis ikke opfylder ækvivalenskriterierne på basis af optagelse af en homolog position, ligger atomkoordinaterne for mindst to af sidekædeatomerne i resten inden for 0,13 nm af de tilsvarende sidekædeatomer i B. amylo-
liquefaciens-subtilisin. De tredimensionelle strukturer ville
5 blive rettet ind som angivet ovenfor.

Nogle af de rester, som er identificeret til substitution, indsættelse eller deletion, er bevarede rester, mens andre ikke
10 er det. Når det drejer sig om ikke-bevarede rester, er erstatningen af en eller flere aminosyrer begrænset til substitutioner, som fremkalder en mutant med en aminosyresekvens, der ikke svarer til en, der findes i naturen. Når det drejer sig om bevarede rester, skulle sådanne erstatninger ikke resultere i en naturligt forekommende sekvens. Carbonylhydrolasemutanterne ifølge den foreliggende opfindelse omfatter de fuldt udviklede former af carbonylhydrolasemutanter samt pro-
15 og præpro-formerne af sådanne hydrolasemutanter. Præpro-formerne er den foretrukne konstruktion, eftersom dette letter ekspressionen, udskillelsen og modningen af carbonylhydrolase-
20 mutanterne.

"Ekspressionsvektor" refererer til en DNA-konstruktion indeholdende en DNA-sekvens, som er operativt bundet til en egnet kontrolsekvens, der er i stand til at bevirke ekspressionen af denne DNA i en egnet vært. Sådanne kontrolsekvenser omfatter en promotor til at bevirke transskription, en eventuel operatorsekvens til at regulere sådan transskription, en sekvens, som koder for egnede mRNA-ribosombindingssteder og sekvenser, som regulerer afslutning af transkription og translation. Vektoren kan være et plasmid, en fagpartikel eller blot et muligt genomt indsættelsesstykke. Når vektoren først er transformeret ind i en egnet vært, kan vektoren replikere og virke uafhængigt af værtsgenomet eller kan i nogle tilfælde integrere ind i selve genomet. I den foreliggende beskrivelse anvendes "plasmid" og "vektor" til tider i flæng, eftersom plasmidet for tiden er den mest almindeligt anvendte vektorform. Opfindelsen skal imidlertid omfatte sådanne andre former for eks-

pressionsvektorer, som tjener ækvivalente funktioner og som er, eller bliver kendte inden for fagområdet.

De "værtsceller", som anvendes i den foreliggende opfindelse, er sædvanligvis prokaryote eller eukaryote værter, som fortrinsvis er blevet manipuleret ved hjælp af de metoder, der er beskrevet i EP publikation nr. 0130756 for at gøre dem ude af stand til at udskille enzymatisk aktiv endoprotease. En foretrukket værtscelle til ekspression af subtilisin er Bacillus-stammen BG2036, som mangler enzymatisk aktiv, neutral protease og alkalisk protease (subtilisin). Konstruktionen af stamme BG2036 er beskrevet i detaljer i EP publikation nr. 0130756 og yderligere beskrevet af M.Y. Yang et al. (1984) J. Bacteriol. 160, 15-21. Andre værtsceller til ekspression af subtilisin omfatter Bacillus subtilis I168 (EP publikation nr. 0130756).

Værtsceller transformeres eller transficeres med vektorer, som er konstrueret under anvendelse af DNA-rekombineringsteknikker. Sådanne transformerede værtsceller er i stand til enten at replikere vektorer, som koder for carbonylhydrolasemutanterne eller udtrykke den ønskede carbonylhydrolasemutant. Når det drejer sig om vektorer, som koder for præ- eller præproformen af carbonylhydrolasemutanten, udskilles sådanne mutanter, når de udtrykkes, typisk fra værtscellen i værtscellemediet.

Når forholdet mellem to DNA-regioner beskrives, betyder "operativt bundet" blot, at de er funktionelt relaterede til hinanden. En præsekvens er f.eks. operativt bundet til et peptid, hvis den virker som en signalsekvens, der deltager i udskilelsen af den fuldt udviklede form af proteinet, højest sandsynligt involverende spaltning af signalsekvensen. En promotor er operativt bundet til en kodningssekvens, såfremt den regulerer transkriptionen af sekvensen, og et ribosombindingssted er operativt bundet til en kodende sekvens, såfremt det er anbragt således, at det muliggør translation.

De gener, som koder for den naturligt forekommende forstadie-carbonylhydrolase, kan opnås i overensstemmelse med de gene-

relle metoder, der er beskrevet heri og i EP publikation nr. 0130756.

Når carbonylhydrolasegenet først er blevet klonet, foretages 5 der et antal modifikationer for at forbedre anvendelsen af genet udo over syntese af den naturligt forekommende forstadiecarbonylhydrolase. Sådanne modifikationer omfatter fremstillingen af rekombinerede carbonylhydrolaser som beskrevet i EP publikation nr. 0130756 og fremstillingen af de heri beskrevne 10 carbonylhydrolasemutanter.

Carbonylhydrolasemutanterne ifølge den foreliggende opfindelse kan dannes ved stedspecifik mutagenese (M. Smith (1985) Ann. Rev. Genet. 423, M.J. Zoeller et al. (1982) Nucleic Acid Res. 10, 6487-6500), cassettemutagenese (EP publikation nr. 15 0130756) eller tilfældig mutagenese (D. Shortle et al. (1985) Genetics, 110 539; D. Shortle et al. (1986) Proteins: Structure, Function and Genetics, 1, 81; D. Shortle (1986) J. Cell. Biochem., 30, 281; T. Alber et al. (1985) Proc. Natl. Acad. of Sci., 82, 747; M. Matsumura et al. (1985) J. Biochem., 260, 20 15298; H. Liao et al. (1986) Proc. Natl. Acad. of Sci., 83, 576) af den klonende forstadiecarbonylhydrolase. Cassettemutagenemetoden og metoden med tilfældig mutagenese beskrevet heri foretrækkes.

Mutantcarbonylhydrolaserne, som udtrykkes efter transformation af egnede værter, screenes for enzymer, som udviser en eller flere egenskaber, som er væsentligt anderledes end egenskaberne hos forstadiecarbonylhydrolaserne, f.eks. ændringer i substratspecificitet, oxidativ stabilitet, termisk stabilitet, 25 alkalistabilitet, modstandsdygtighed over for proteolytisk nedbrydning, pH-aktivitetsprofiler og lignende.

En ændring i substratspecificitet defineres som en forskel 30 mellem forstadiecarbonylhydrolasens k_{cat}/K_m -forhold og hydro- lasemutantens forhold. k_{cat}/K_m -forholdet er et mål for katalytisk effektivitet. Carbonylhydrolasemutanter med forøgede eller formindskede k_{cat}/K_m -forhold er beskrevet i eksemplerne. Formålet vil sædvanligvis være at sikre en mutant med et stør-

re (numerisk større) kcat/Km-forhold for et givet substrat, hvorved muliggøres anvendelsen af enzymet til mere effektivt at virke på et målsubstrat. En væsentlig ændring i kcat/Km-forholdet er fortrinsvis mindst en to ganges forøgelse eller 5 formindskelse. Mindre forøgelser eller formindskelser i forholdet (f.eks. mindst 1,5 gange) betragtes imidlertid også som væsentlige. En forøgelse i kcat/Km-forhold for et substrat kan følges af reduktion i kcat/Km-forhold for et andet substrat. Dette er et skift i substratspecificitet, og mutanter, som ud- 10 viser sådanne skift, kan anvendes, hvor forstadiehydrolasen er uønskelig, f.eks. for at forhindre uønsket hydrolyse af et bestemt substrat i en blanding af substrater. Km og kcat måles i overensstemmelse med kendte procedurer, som beskrevet i EP publikation nr. 0130756 eller som beskrevet heri.

15 Oxidativ stabilitet måles enten ved hjælp af kendte procedurer eller ved de i det følgende beskrevne metoder. En væsentligt ændring i oxidativ stabilitet vises ved mindst ca. 50% forøgelse eller formindskelse (fortrinsvis formindskelse) af hastigheden af enzymaktivitetstab ved utsættelse for forskellige 20 oxiderende betingelser. Sådanne oxiderende betingelser er utsættelse for det organiske oxidationsmiddel diperdodecansyre (DPDA) under de i eksemplerne beskrevne betingelser.

Alkalistabilitet måles enten ved hjælp af kendte procedurer 25 eller ved hjælp af de heri beskrevne metoder. En væsentlig ændring i alkalistabilitet vises ved mindst ca. 5% eller større forøgelse eller formindskelse (fortrinsvis forøgelse) i halveringstiden for en mutants enzymaktivitet sammenlignet med forstadiecarbonylhydrolasen. Når det drejer sig om subtilisiner, 30 blev alkalistabilitet målt som en funktion af autoproteolytisk nedbrydning af subtilisin ved alkalisk pH-værdi, f.eks. 0,1 M natriumphosphat, pH-værdi 12 ved 25 eller 30°C.

Termisk stabilitet måles enten ved hjælp af kendte procedurer 35 eller ved hjælp af de heri beskrevne metoder. En væsentlig ændring i termisk stabilitet vises ved mindst ca. 5% eller større forøgelse eller formindskelse (fortrinsvis forøgelse) i halveringstiden for en mutants katalytiske aktivitet, når den

18

udsættes for en relativt høj temperatur og neutral pH-værdi sammenlignet med forstadiecarbonylhydrolasen. Når det drejer sig om subtilisiner, måles termisk stabilitet ved den autoproteolytiske nedbrydning af subtilisin ved forhøjede temperaturer og neutral pH-værdi, f.eks. 2 mM calciumchlorid, 50 mM MOPS pH-værdi 7,0 ved 59°C.

Opfinderne har fremstillet mutantsubtilisiner indeholdende substitutionen af aminosyreresterne af *B. amyloliquefaciens*-subtilisin vist i tabel I. Vildtypeaminosyresekvensen og DNA-sekvensen af *B. amyloliquefaciens*-subtilisin er vist i fig. 1.

15

20

25

30

35

TABEL I

<u>Rest</u>	<u>Erstatningsaminosyre</u>
5 Tyr21	F A
Thr22	C
Ser24	C
Asp32	Q S
Ser33	A T
10 Asp36	A G
Gly46	V
Ala48	E V R
Ser49	C L
Met50	C F V
15 Asn77	D
Ser87	C
Lys94	C
Val95	C
Leu96	D
20 Tyr104	A C D E F G H I K L M N P Q R S T V W
Ile107	V
Gly110	C R
Met124	I L
Asn155	A D H Q T
25 Glu156	Q S
Gly166	C E I L M P S T W Y
Gly169	C D E F H I K L M N P Q R T V W Y
Lys170	E R
Tyr171	F
30 Pro172	E Q
Phe189	A C D E G H I K L M N P Q R S T V W Y
Asp197	R A
Met199	I
Ser204	C R L P
35 Lys213	R T
Tyr217	A C D E F G H I K L M N P Q R S T V W
Ser221	A C

De forskellige substituerede aminosyrer er angivet i tabel I ved hjælp af de følgende enkeltbogstavsbetegnelser:

	Aminosyre eller rest <u>deraf</u>	3-bogstavs- symbol	1-bogstavs- symbol
5	Alanin	Ala	A
	Glutamat	Glu	E
10	Glutamin	Gln	Q
	Aspartat	Asp	D
	Asparagin	Asn	N
	Leucin	Leu	L
	Glycin	Gly	G
15	Lysin	Lys	K
	Serin	Ser	S
	Valin	Val	V
	Arginin	Arg	R
	Threonin	Thr	T
20	Prolin	Pro	P
	Isoleucin	Ile	I
	Methionin	Met	M
	Phenylalanin	Phe	F
	Tyrosin	Tyr	Y
25	Cystein	Cys	C
	Tryptophan	Trp	W
	Histidin	His	H

Bortset fra hvor andet er angivet i sammenhængen, er vildtype-aminosyrer angivet med de ovenstående tre-bogstavssymboler og erstattede aminosyrer med de ovenstående enkelt-bogstavssymboler. Såfremt således methionin i rest 50 i B. amyloliquefaciens-subtilisin erstattes med phenylalanin, kan denne mutation (mutant) betegnes Met50F eller F50. Tilsvarende betegnelser anvendes for multiple mutanter.

35 Udo over de aminosyrer, der anvendes til at erstatte de i tabel I beskrevne rester, forventes andre erstatninger af aminosyrer ved disse rester at danne mutantsubtilisiner med nyttige egen-

skaber. Disse rester og erstatningsaminosyrer er vist i tabel II.

TABEL II

	<u>Rest</u>	<u>Erstatningsaminosyre(r)</u>
5	Tyr-21	L
	Thr22	K
	Ser24	A
10	Asp32	
	Ser33	G
	Gly46	
	Ala48	
	Ser49	
15	Met50	L K I V
	Asn77	D
	Ser87	N
	Lys94	R Q
	Val95	L I
	Tyr104	
20	Met124	K A
	Ala152	C L I T M
	Asn155	
	Glu156	A T M L Y
	Gly166	
25	Gly169	
	Tyr171	K R E Q
	Pro172	D N
	Phe189	
	Tyr217	
30	Ser221	
	Met222	

Hver af mutantsubtilisinerne i tabel I indeholder erstatningen af en enkelt rest i *B. amyloliquefaciens*-aminosyresekvensen.
 35 Disse bestemte rester blev valgt for at undersøge indflydelsen af sådanne substitutioner på forskellige egenskaber hos *B. amyloliquefaciens*-subtilisin.

Opfinderne har således identificeret Met124 og Met222 som vigtige rester som, såfremt de substitueres med en anden aminosyre, danner en mutantsubtilisin med forbedret oxidativ stabilitet. For Met124 er Leu og Ile foretrukne erstatningsaminosyrer. Foretrukne aminosyrer til erstatning af Met222 er beskrevet i EP publikation nr. 0130756.

Forskellige andre specifikke rester er også blevet identificeret som værende vigtige med hensyn til substratspecificitet. Disse rester omfatter Tyr104, Ala152, Glu156, Gly166, Gly169, Phe189 og Tyr217, for hvilke der allerede er blevet fremstillet mutanter indeholdende de forskellige i tabel I viste erstatningsaminosyrer samt andre rester, som er vist nedenfor, for hvilke der endnu skal laves mutanter.

Identifikationen af disse rester, herunder dem, som endnu skal muteres, er baseret på opfindernes højopløsningskrystalstruktur af B. amyloliquefaciens-subtilisin til 1,8 Å (se tabel III), deres erfaring med in vitro-mutagenese af subtilisin og litteraturen om subtilisin. Dette arbejde og røntgenkrystalstrukturerne af subtilisin indeholdende covalent bundne peptidinhibitorer (J.D. Robertus et al. (1972) Biochemistry 11, 2439-2449), produktkomplekser (J.D. Robertus et al. (1972) Biochemistry 11, 4293-4303) og overgangstilstandsanaloger (D.A. Matthews et al. (1975) J. Biol. Chem. 250, 7120-7126, T.L. Poulos et al. (1976) J. Biol. Chem. 251, 1097-1103) har hjulpet med til at identificere en forøget peptidbindingskløft i subtilisin. Denne substratbindingskløft sammen med substrat er vist i et skematisk diagram i fig. 2, i overensstemmelse med I. Schechter et al.'s nomenklatur (1967) Biochem. Bio. Res. Commun. 27, 157. Den spaltelige binding i substratet er identificeret med en pil. P- og P'-betegnelserne refererer til de aminosyrer, som er anbragt henholdsvis mod amino- eller carboxyenden i forhold til den spaltelige binding. S- og S'-betegnelserne refererer til understeder i substratbindingskløften på subtilisin, som vekselvirker med de tilsvarende substrataminosyrerester.

36	ASP D	37,004	55,671	-13,579	36	ASP CB	3,712	55,720	-10,514
36	ASP CG	47,339	57,099	-10,804	36	ASP CD1	3,755	57,974	-11,425
36	ASP DD2	57,448	57,277	-10,263	37	SER W	1,304	56,822	-13,111
37	SER CA	17,183	57,221	-14,512	37	SER C	2,377	58,095	-14,949
37	SER O	27,545	58,303	-16,151	37	SER CB	-6,093	58,069	-14,788
37	SER DC	-8,090	59,133	-13,879	38	SER H	3,163	58,614	-14,801
38	SER CA	47,261	59,505	-14,687	38	SER C	5,466	58,705	-14,992
38	SER O	67,543	59,251	-15,285	38	SER CB	6,742	60,435	-13,398
38	SER DC	57,376	59,865	-12,236	39	MIS W	5,454	57,390	-14,892
39	MIS CA	67,637	56,574	-15,291	39	MIS C	6,681	56,401	-16,778
39	MIS O	57,738	55,878	-17,619	39	MIS CB	6,637	55,203	-14,515
39	MIS CG	87,014	54,609	-14,456	39	MIS CD1	8,795	54,356	-15,561
39	MIS CD2	87,769	56,345	-13,389	39	MIS CE1	9,970	53,930	-15,230
39	MIS NEZ	97,986	53,910	-13,808	40	PRO W	7,807	56,836	-17,387
40	PRO CA	77,918	56,697	-18,831	40	PRO C	8,156	55,280	-19,357
40	PRO D	87,032	55,097	-20,578	40	PRO C9	9,247	57,533	-19,161
40	PRO CG	107,053	57,405	-17,902	40	PRO CD	8,988	57,652	-16,776
41	ASP N	87,461	54,328	-18,485	41	ASP DD2	21,168	50,399	-18,668
41	ASP DD1	107,325	51,395	-20,429	41	ASP CG	10,473	51,307	-19,211
41	ASP CB	97,799	52,239	-18,226	41	ASP CA	8,645	52,959	-18,966
41	ASP C	77,311	52,163	-18,839	41	ASP D	7,396	50,947	-18,977
42	LEU M	67,185	52,803	-16,558	42	LEU CA	4,892	52,147	-18,466
42	LEU C	37,924	52,907	-19,376	42	LEU D	3,993	54,163	-19,490
42	LEU CB	47,421	52,158	-17,008	42	LEU CG	5,182	51,363	-15,966
42	LEU CD1	47,535	51,546	-14,581	42	LEU CD2	5,273	69,877	-16,350
43	LTS N	37,018	52,135	-19,966	43	LTS CA	1,893	52,685	-20,721
43	LTS C	67,637	52,156	-20,018	43	LTS D	0,504	30,920	-19,820
43	LTS CB	2,021	52,389	-22,169	43	LTS CG	0,685	52,436	-22,910
43	LTS CD	07,998	52,362	-24,339	43	LTS CE	-0,180	52,584	-25,260
43	LTS NZ	07,337	51,757	-26,418	44	VAL N	-0,191	53,035	-19,490
44	VAL CA	-17,407	52,639	-18,765	44	VAL C	-2,571	52,887	-19,731
44	VAL D	-2,623	53,906	-20,434	44	VAL CB	-1,680	53,351	-17,383
44	VAL CG1	-27,724	52,941	-16,582	44	VAL CG2	-0,197	53,194	-16,553
45	ALA N	-37,494	51,951	-19,871	45	ALA CA	-4,619	51,977	-20,810
45	ALA C	-57,841	52,507	-20,053	45	ALA D	-6,703	53,885	-20,703
45	ALA CB	-67,831	50,580	-21,389	46	GLY N	-5,910	52,356	-18,768
46	GLY CA	-77,082	52,837	-18,001	46	GLY C	-6,987	52,643	-16,538
46	GLY D	-57,938	52,806	-16,035	47	GLY M	-8,092	32,658	-15,793
47	GLY CA	-87,014	52,246	-14,388	47	GLY C	-9,179	52,757	-13,572
47	GLY D	-97,988	53,482	-14,185	48	ALA M	-9,221	52,446	-12,330
48	ALA CA	-107,255	52,870	-11,382	48	ALA C	-9,790	52,675	-9,968
48	ALA D	-97,066	51,720	-9,725	48	ALA CB	-21,558	52,100	-11,617
49	SER N	-107,149	53,567	-9,037	49	SER CA	-9,752	53,355	-7,652
49	SER C	-107,947	52,986	-6,783	49	SER O	-21,972	53,677	-6,908
49	SER CB	-97,092	54,588	-7,029	49	SER DC	-8,877	36,255	-5,650
50	MET N	-107,835	52,007	-5,932	50	MET CA	-11,852	51,549	-6,974
50	MET C	-117,663	51,962	-3,561	50	MET D	-11,997	51,398	-2,575
50	MET CB	-127,012	50,018	-4,996	50	MET CG	-21,912	49,463	-6,389
50	MET CD	-137,468	49,889	-7,256	50	MET CE	-12,808	50,111	-8,903
51	VAL N	-107,427	52,760	-3,622	51	VAL CA	-9,968	53,270	-21,867
51	VAL C	-107,630	54,562	-1,997	51	VAL D	-10,237	35,437	-21,682
51	VAL CB	-87,643	53,195	-2,000	51	VAL CG1	-7,892	33,579	-8,631
51	VAL CG2	-77,764	51,815	-2,302	52	PRO N	-21,621	54,693	-11,056
52	PRO CA	-127,372	55,933	-0,821	52	PRO C	-21,490	57,123	-6,460
52	PRO D	-117,771	58,220	-0,925	52	PRO CB	-23,400	55,594	-8,246
52	PRO CG	-137,583	54,103	0,085	52	PRO CD	-22,164	53,620	-6,175
53	SER N	-107,442	56,906	0,299	53	SER CA	-9,538	57,982	8,682
53	SER C	-87,420	58,265	-8,326	53	SER O	-7,679	59,226	-6,038
53	SER CB	-97,004	57,707	-2,069	53	SER DC	-8,256	56,521	2,127
54	GLU N	-87,254	57,523	-1,393	54	GLU CA	-7,284	57,648	-2,422
54	GLU C	-77,767	57,303	-3,785	54	GLU O	-7,533	56,263	-6,379
54	GLU CB	-67,134	56,599	-2,156	54	GLU CG	-3,289	56,959	-6,927
54	GLU CD	-47,944	46,942	-8,078	54	GLU CF	-3,665	55,604	-7,968

56	GLU DEZ	-3,908	55,777	0,271	55	TMR N	-8,571	58,291	-4,249
55	THR CA	-9,433	58,121	-5,441	55	THR C	-8,764	58,139	-6,779
55	THR O	-9,433	57,919	-7,810	55	THR CB	-10,586	59,280	-5,303
55	THR OG1	-9,885	60,510	-9,418	55	THR CG2	-11,432	59,243	-4,017
56	ASN W	-7,482	58,403	-6,977	56	ASN ND2	-4,930	61,179	-9,881
56	ASN DDI	-5,075	58,967	-10,337	56	ASN CG	-5,273	59,925	-9,555
56	ASN CB	-5,898	59,694	-8,208	56	ASN CA	-6,762	58,425	-8,200
56	ASN C	-6,812	57,994	-8,305	56	ASN O	-5,104	56,866	-7,470
57	PRO M	-6,362	56,261	-9,258	57	PRO CG	-7,123	55,257	-11,177
57	PRO CD	-7,384	56,433	-10,272	57	PRO CB	-6,644	54,178	-18,235
57	PRO CA	-5,679	54,961	-9,332	57	PRO C	-6,301	55,882	-9,966
57	PRO O	-3,509	56,128	-9,945	58	PHE N	-3,998	56,262	-10,491
58	PHE CA	-2,747	56,577	-11,222	58	PHE C	-2,712	57,129	-10,253
58	PHE O	-8,635	57,497	-10,680	58	PHE CS	-2,943	57,502	-12,423
58	PHE CG	-3,983	56,968	-13,357	58	PHE CD1	-3,756	55,780	-14,059
58	PHE CD2	-5,211	57,630	-13,459	58	PHE CE1	-6,722	55,255	-14,928
58	PHE CE2	-6,194	57,095	-14,276	58	PHE CZ	-5,949	55,939	-15,851
59	GLN W	-2,044	57,119	-8,990	59	GLN CA	-1,172	57,583	-7,934
59	GLN C	-8,807	56,403	-7,000	59	GLN O	-1,639	56,883	-6,115
59	GLN CB	-1,862	58,668	-7,089	59	GLN CG	-8,942	59,261	-6,834
59	GLN CD	-1,790	60,157	-5,150	59	GLN DE1	-1,404	61,288	-4,836
59	GLN NE2	-2,959	59,685	-6,742	60	ASP N	0,410	55,895	-7,211
60	ASP CA	0,851	54,792	-6,304	60	ASP C	1,631	55,267	-5,090
60	ASP O	2,827	55,550	-5,231	60	ASP CB	1,596	53,746	-7,188
60	ASP CG	2,077	52,538	-6,380	60	ASP DD1	1,746	52,337	-5,190
60	ASP CD2	2,915	51,841	-7,830	61	ASN N	0,959	55,265	-3,950
61	ASN ND2	-1,364	57,767	-2,347	61	ASN DD1	0,666	58,566	-2,875
61	ASN CG	-6,040	57,670	-2,399	61	ASN CB	0,531	56,401	-1,786
61	ASN CA	1,557	55,734	-2,700	62	ASN C	2,291	54,632	-1,940
61	ASN O	2,933	54,862	-8,902	62	ASN W	2,210	53,434	-2,668
62	ASN CA	2,877	52,348	-1,709	62	ASN C	4,124	51,893	-2,479
62	ASN O	4,951	51,313	-2,770	62	ASN CB	1,783	51,319	-1,421
62	ASN CG	2,371	50,103	-6,597	62	ASN OD1	2,633	49,877	-1,343
62	ASN ND2	2,622	50,208	0,601	63	SER N	4,152	52,104	-3,761
63	SER CA	5,189	51,696	-4,709	63	SER C	5,071	50,256	-5,209
63	SER O	5,593	49,790	-6,269	63	SER CB	6,523	51,938	-4,812
63	SER DG	6,871	50,698	-3,618	64	MIS N	4,202	49,475	-4,639
64	MIS CA	3,994	48,059	-6,935	64	MIS C	3,366	47,759	-6,261
64	MIS O	3,861	46,974	-7,108	64	MIS CB	3,184	47,501	-3,747
64	MIS CG	3,144	46,021	-3,726	64	MIS ND1	2,107	45,247	-4,241
64	MIS CD2	4,054	45,194	-3,135	64	MIS CE1	2,416	43,966	-4,054
64	MIS DE2	3,556	43,920	-3,368	65	GLY N	2,287	48,428	-6,587
65	GLY CA	1,552	48,264	-7,830	65	GLY C	2,392	48,636	-9,037
65	GLY O	2,230	48,078	-10,134	66	THR N	3,233	49,659	-8,832
66	THR CA	4,064	50,117	-9,954	66	THR C	5,089	49,009	-10,291
66	THR O	5,333	48,789	-11,461	66	THR CS	4,744	51,511	-9,667
66	THR OG1	3,637	52,425	-9,406	66	THR CG2	5,536	52,078	-10,849
67	MIS W	5,685	48,443	-9,276	67	MIS CA	6,703	47,361	-9,458
67	MIS C	6,091	46,141	-10,143	67	MIS O	6,649	45,638	-11,150
67	MIS CB	7,300	47,071	-8,064	67	MIS CG	8,595	46,275	-8,148
67	MIS ND1	8,590	46,907	-8,276	67	MIS CD2	9,704	46,678	-8,076
67	MIS CE1	9,857	46,491	-8,299	67	MIS NS2	10,678	45,514	-8,186
68	VAL W	4,892	45,749	-9,731	68	VAL CA	6,242	46,687	-10,266
68	VAL C	3,856	46,860	-11,760	68	VAL O	6,214	43,942	-12,535
68	VAL CB	2,939	46,252	-9,386	68	VAL CG1	1,960	43,260	-10,820
68	VAL CG2	3,319	43,705	-8,000	69	ALA N	3,373	46,049	-12,313
69	ALA CA	3,037	46,468	-13,629	69	ALA C	4,193	46,390	-14,611
69	ALA D	4,028	45,913	-13,565	69	ALA CS	2,332	47,851	-13,386
70	GLY N	5,340	46,782	-13,914	70	GLY CA	6,595	46,805	-14,670
70	GLY C	7,046	49,370	-13,021	70	GLY O	7,604	45,154	-16,119
71	THR N	6,820	44,431	-14,138	71	THR CA	7,177	43,819	-14,666
71	THR C	6,226	42,506	-15,563	71	THR O	6,682	41,828	-16,695
71	THR CB	7,119	42,070	-13,191	71	THR CG1	8,191	42,592	-12,390

126	MET C8	-6,198	60,082	-7,473	124	MET S2	-7,983	39,672	-6,450
126	MET CE	-7,940	38,095	-7,542	125	SER N	-1,654	60,696	-6,802
126	SER CA	-6,193	60,287	-5,769	125	SER CB	-8,622	60,712	-4,328
126	SER D	6,235	61,617	-5,805	125	SER C	1,021	61,027	-4,775
126	SER DG	1,666	60,496	-7,373	126	LEU N	-1,433	60,675	-4,222
126	LEU CA	-2,842	60,367	-2,386	126	LEU C	-2,438	39,056	-2,807
126	LEU D	-2,844	39,136	-2,329	126	LEU CB	-2,791	41,868	-2,610
126	LEU CG	-3,935	41,447	-3,333	126	LEU CD2	-8,278	61,131	-2,378
126	LEU CD2	-6,179	62,760	-6,073	127	GLY N	-2,922	39,082	-6,481
127	GLY CA	-3,035	37,871	0,193	127	GLY C	-3,176	38,180	1,682
127	GLY D	-2,646	39,830	2,220	128	GLY N	-4,121	37,443	2,222
128	GLY CA	-6,475	37,496	3,662	128	GLY C	-6,664	36,038	4,104
128	GLY D	-6,903	35,158	1,276	129	PRO N	-4,919	39,857	9,402
129	PRO CA	-6,671	34,323	8,998	129	PRO C	-6,716	36,086	6,082
129	PRO D	-6,338	32,887	6,303	129	PRO CB	-6,060	36,684	7,384
129	PRO CG	-6,419	36,218	7,727	129	PRO CD	-6,239	36,870	6,618
130	SER N	-7,051	35,013	5,912	130	SER CA	-8,670	34,811	6,023
130	SER C	-9,218	34,884	4,726	130	SER D	-8,949	35,881	6,028
130	SER CD	-8,049	35,331	7,216	130	SER DG	-8,723	36,626	8,603
131	GLY N	-10,083	33,967	4,349	131	GLY CA	-10,824	34,229	3,074
131	GLY C	-12,205	34,713	3,562	131	GLY D	-12,495	34,722	6,751
132	SER N	-13,060	33,038	2,594	132	SER CA	-14,607	35,633	3,011
132	SER C	-15,289	34,805	1,936	132	SER D	-14,799	36,386	8,824
132	SER CB	-14,390	36,927	3,143	132	SER DG	-14,693	37,539	1,875
133	ALA N	-16,347	34,548	2,294	133	ALA CA	-17,507	36,037	1,324
133	ALA C	-17,650	34,945	0,097	133	ALA D	-17,743	36,637	-1,016
133	ALA CB	-18,166	33,828	1,796	134	ALA N	-17,683	36,288	8,294
134	ALA CA	-17,872	37,239	-0,792	134	ALA C	-18,635	37,369	-1,674
134	ALA D	-18,781	37,593	-2,849	134	ALA CB	-18,263	38,600	-6,187
135	LEU N	-13,478	37,229	-3,046	135	LEU CA	-14,197	37,264	-1,804
135	LEU C	-14,198	38,005	-2,705	135	LEU D	-13,784	36,026	-3,890
135	LEU CB	-13,038	37,328	-0,798	135	LEU CG	-11,693	37,130	-1,508
135	LEU CD1	-11,460	38,415	-2,292	135	LEU CD2	-10,582	36,897	-6,819
136	LYS N	-14,509	34,825	-2,173	136	LYS EA	-16,543	33,397	-3,013
136	LYS C	-15,344	35,739	-6,190	136	LYS C	-15,279	33,431	-3,203
136	LYS CB	-16,903	32,361	-2,186	136	LYS CG	-16,743	33,067	-3,043
136	LYS CD	-15,083	29,892	-2,134	136	LYS CE	-15,763	28,797	-2,778
136	LYS NZ	-15,308	28,411	-6,260	137	ALA N	-16,766	34,260	-3,847
137	ALA CA	-17,795	34,416	-5,893	137	ALA C	-17,338	35,303	-6,943
137	ALA D	-17,703	35,049	-7,208	137	ALA CB	-19,094	34,941	-6,243
138	ALA N	-16,529	36,301	-5,729	138	ALA CA	-16,002	37,311	-6,585
138	ALA C	-16,903	36,696	-7,957	138	ALA D	-16,985	36,843	-8,762
138	ALA CB	-15,522	38,567	-5,934	139	VAL N	-13,950	35,939	-7,927
139	VAL CA	-12,866	35,291	-7,837	139	VAL C	-13,623	34,228	-8,720
139	VAL D	-13,208	36,070	-9,877	139	VAL CB	-11,830	34,871	-6,968
139	VAL CG1	-10,919	33,896	-7,866	139	VAL CG2	-11,078	35,780	-6,293
140	ASP N	-16,993	33,536	-8,122	140	ASP CA	-15,274	32,496	-8,929
140	ASP C	-16,023	33,131	-10,036	140	ASP D	-16,080	32,578	-11,190
140	ASP CB	-16,916	31,849	-8,158	140	ASP CG	-15,388	30,660	-7,186
140	ASP DD1	-14,918	30,603	-7,202	140	ASP DD2	-16,139	30,132	-6,329
141	LYS N	-16,658	34,263	-9,820	141	LYS C8	-17,373	35,006	-10,368
141	LYS C	-16,373	35,615	-11,946	141	LYS D	-16,700	35,248	-13,111
141	LYS CB	-15,039	36,275	-10,325	141	LYS CG	-18,884	37,036	-11,306
141	LYS CD	-15,386	38,187	-10,836	141	LYS CE	-20,972	39,051	-11,290
142	LYS NZ	-21,338	40,037	-10,273	142	ALA N	-19,167	35,848	-11,368
142	ALA CA	-16,173	36,192	-12,814	142	ALA C	-13,818	35,010	-13,921
142	ALA D	-13,770	39,169	-14,733	142	ALA CB	-12,670	36,697	-21,968
143	VAL N	-13,582	33,886	-12,832	143	VAL CA	-13,168	37,703	-13,630
143	VAL C	-14,346	32,233	-14,496	143	VAL D	-16,160	31,886	-13,639
143	VAL CB	-12,851	31,673	-12,714	143	VAL CG1	-12,300	30,370	-13,661
143	VAL CG2	-11,303	32,195	-12,014	144	ALA N	-15,531	32,238	-13,875
144	ALA CA	-16,764	31,834	-14,643	144	ALA C	-16,928	32,682	-13,861

164	ALA C	-17,380	32,263	-16,953	166	ALA CG	-17,942	31,968	-13,700
165	SER N	-16,507	33,948	-13,706	165	SER CG	-16,612	34,937	-16,786
165	SER C	-15,609	36,173	-17,829	165	SER O	-15,910	35,321	-18,993
165	SER CB	-17,016	36,176	-16,614	165	SER OG	-13,832	36,935	-15,849
166	GLY N	-16,577	33,936	-17,585	166	GLY CA	-13,619	33,935	-16,873
166	GLY C	-12,273	34,491	-18,385	166	GLY O	-13,420	34,386	-19,266
167	VAL N	-12,230	35,162	-17,236	167	VAL CA	-10,874	35,836	-16,912
167	VAL C	-9,830	34,836	-16,323	167	VAL O	-10,171	35,991	-18,486
167	VAL CB	-11,152	36,977	-15,889	167	VAL CG1	-9,896	37,803	-19,370
167	VAL CG2	-12,360	37,913	-16,230	168	VAL N	-8,583	35,018	-16,603
168	VAL CA	-7,682	34,230	-16,008	168	VAL C	-7,137	36,907	-16,701
168	VAL D	-6,860	38,133	-16,750	168	VAL CG	-6,273	34,126	-16,950
168	VAL CG1	-5,079	33,403	-16,281	168	VAL CG2	-6,890	33,632	-18,262
169	VAL N	-7,238	34,355	-13,531	169	VAL CA	-6,937	34,945	-12,249
169	VAL C	-5,700	34,389	-11,613	169	VAL D	-5,624	33,173	-11,439
169	VAL CB	-6,224	34,890	-13,313	169	VAL CG1	-7,943	35,619	-18,009
169	VAL CG2	-9,456	35,386	-12,096	170	VAL N	-6,732	35,381	-12,404
170	VAL CA	-3,393	24,937	-20,901	170	VAL C	-3,157	35,623	-9,939
170	VAL D	-3,392	36,778	-9,460	170	VAL CG	-2,774	35,303	-21,951
170	VAL CG1	-6,973	34,633	-11,461	170	VAL CG2	-2,773	34,863	-13,301
171	ALA N	-2,568	34,966	-8,395	171	ALA CA	-2,361	35,382	-7,287
171	ALA C	-1,080	35,036	-6,657	171	ALA D	-0,618	33,889	-6,904
171	ALA CB	-3,557	33,390	-8,307	172	ALA N	-0,490	35,907	-9,822
172	ALA CA	0,714	35,438	-5,112	172	ALA C	0,304	34,320	-6,138
172	ALA D	-8,728	34,466	-3,467	172	ALA CP	1,266	36,607	-4,294
173	ALA N	1,125	33,302	-3,912	173	ALA CA	0,840	32,230	-2,943
173	ALA C	0,931	32,723	-1,811	173	ALA D	0,317	32,192	-9,299
173	ALA CB	1,750	31,038	-3,193	174	GLY N	1,827	33,613	-1,244
174	GLY CA	2,043	34,211	0,125	174	GLY C	3,319	34,669	0,530
174	GLY D	4,189	33,267	-8,118	175	ASN N	3,953	36,788	1,568
175	ASN CA	5,346	34,787	2,037	175	ASN C	5,399	34,251	3,662
175	ASN D	6,101	34,829	4,295	175	ASN CB	6,008	36,198	1,704
175	ASN CG	5,890	36,702	0,500	175	ASN CD1	6,123	36,868	-8,934
175	ASN ND2	5,486	37,965	0,352	176	GLU N	4,731	33,168	3,875
176	GLU CA	6,633	32,937	4,970	176	GLU C	5,522	31,328	5,183
176	GLU D	8,376	30,637	6,222	176	GLU CB	3,205	31,980	5,100
176	GLU CG	2,691	32,442	6,368	176	GLU CD	2,394	33,931	6,270
176	GLU DE1	1,744	34,322	5,312	176	GLU DE2	3,106	34,456	7,146
177	GLY N	6,389	31,037	4,227	177	GLY CA	7,306	29,917	4,387
177	GLY C	6,503	28,622	4,553	177	GLY D	8,416	28,346	6,009
178	THR N	7,147	27,793	5,382	178	THR CG2	8,079	29,396	3,850
178	THR CG1	8,707	25,487	6,217	178	THR CB	7,164	29,246	5,294
178	THR CA	6,352	26,487	3,702	178	THR C	6,100	26,480	7,137
178	THR D	6,479	27,135	7,977	179	SER N	5,338	25,441	7,697
179	SER OG	3,141	23,906	20,325	179	SER CB	3,673	26,105	9,212
179	SER CA	4,835	29,210	8,855	179	SER C	4,494	23,720	8,946
179	SER D	3,339	23,281	9,030	180	GLY N	3,974	22,967	8,835
180	GLY CA	5,636	23,806	8,995	180	GLY C	4,376	23,049	7,738
180	GLY D	4,808	21,926	6,555	181	SER N	3,525	20,310	8,226
181	SER CA	2,656	19,777	7,056	181	SER C	1,477	20,708	6,786
181	SER D	0,696	20,347	9,869	181	SER CG	2,344	18,293	7,271
181	SER CG	1,834	18,028	8,585	182	SER N	3,303	21,841	7,659
182	SEA CA	0,167	22,723	7,113	182	SER C	0,430	23,952	8,248
182	SER D	1,333	23,660	5,394	182	SER CG	-0,213	23,666	8,242
182	SER OG	0,184	23,091	9,480	183	SER N	-0,679	23,921	8,197
183	SER CA	-0,623	26,750	3,990	183	SER C	-0,441	26,177	6,513
183	SER D	-3,078	26,548	8,504	183	SER CG	-2,890	24,642	8,211
183	SER OG	-1,992	25,718	2,331	184	THR N	0,387	26,952	3,932
184	THR CA	0,609	25,340	4,312	184	THR C	0,183	27,286	3,194
184	THR D	0,485	30,302	3,278	184	THR CG	2,095	28,318	4,838
184	THR CG1	2,984	26,282	3,692	184	THR CG2	2,397	27,610	8,001
185	VAL N	-0,313	28,742	2,190	185	VAL CA	-0,939	29,542	1,010
185	VAL C	-2,028	30,943	2,497	185	VAL O	-2,929	30,332	2,380

165	VAL CG	-3.339	29.624	-0.181	169	VAL CG1	-1.947	29.397	-1.376
165	VAL CG2	-3.210	29.716	-0.696	166	GLY N	-1.910	31.921	1.129
166	GLY CA	-2.943	32.778	-1.826	166	GLY C	-6.098	31.859	0.617
166	GLY D	-6.126	32.106	-0.396	167	TTR N	-3.994	33.730	0.970
167	TTR CA	-6.223	36.046	0.139	167	TTR C	-3.993	33.399	-0.606
167	TTR D	-6.174	36.203	0.084	167	TTR CB	-7.466	34.292	0.966
167	TTR CG	-7.791	32.984	1.709	167	TTR CD1	-7.208	32.703	1.947
167	TTR CD2	-8.710	32.116	1.133	167	TTR CE1	-7.867	31.828	0.618
167	TTR CEE	-8.168	30.953	1.809	167	TTR CZ	-8.486	30.671	0.646
167	TTR DH	-8.180	29.481	3.658	168	PFO N	-6.380	33.499	-1.830
168	PFO CG	-6.943	36.376	-3.939	168	PFO CO	-6.273	34.752	-1.624
168	PFO CB	-7.164	35.364	-3.503	168	PFO CA	-7.134	34.657	-2.560
168	PFO C	-6.139	33.336	-3.270	168	PFO D	-7.097	32.320	-3.912
169	GLY N	-3.106	33.193	-0.189	169	GLY CA	-6.446	32.077	-3.927
169	GLY C	-4.937	30.702	-0.470	169	GLY O	-6.880	39.733	-4.249
170	LVS N	-5.160	30.579	-2.289	170	LVS CA	-3.856	39.265	-1.765
170	LVS C	-7.055	28.773	-2.816	170	LVS D	-7.308	27.394	-3.824
170	LVS CB	-6.246	29.294	-0.286	170	LVS CG	-8.795	28.106	0.185
170	LVS CD	-6.250	28.289	2.031	170	LVS CE	-8.781	27.271	0.629
170	LVS NZ	-6.239	27.463	3.213	171	TTR N	-7.838	29.616	-3.148
171	TTR CA	-9.012	29.043	-3.839	171	TTR C	-8.603	28.309	-3.113
171	TTR D	-7.760	28.714	-5.928	171	TTR CB	-9.962	30.224	-4.242
171	TTR CG	-10.497	30.084	-3.047	171	TTR CD1	-11.060	30.303	-1.982
171	TTR CD2	-10.456	32.374	-3.026	171	TTR CE1	-11.520	31.003	-0.867
171	TTR CE2	-10.941	33.080	-1.936	171	TTR CI	-11.528	32.398	-0.886
171	TTR DH	-12.008	33.119	0.170	172	PFO N	-9.297	27.204	-3.376
172	PFO CA	-9.093	26.417	-6.396	172	PFO C	-9.233	27.156	-7.908
172	PFO D	-8.325	26.784	-8.881	172	PFO CB	-10.167	29.329	-6.513
172	PFO CG	-20.490	29.271	-8.094	172	PFO CO	-10.364	26.669	-4.516
173	SER N	-10.097	28.167	-8.019	173	SER CA	-10.220	28.818	-9.330
173	SER C	-9.025	29.773	-8.893	173	SER O	-8.966	30.233	-10.762
173	SER CB	-21.328	29.623	-9.481	173	SER OG	-11.595	30.346	-8.606
174	VAL N	-8.162	29.944	-8.614	174	VAL CA	-7.053	30.891	-8.855
174	VAL C	-9.754	30.131	-8.068	174	VAL D	-8.612	29.132	-8.366
174	VAL CB	-6.899	31.775	-7.396	174	VAL CG1	-5.796	32.837	-7.617
174	VAL CG2	-6.220	32.303	-7.323	175	ILE N	-6.911	30.729	-9.885
175	ILE CA	-3.169	30.156	-10.024	175	ILE C	-2.714	30.736	-8.894
175	ILE D	-2.150	31.936	-8.955	175	ILE CB	-2.953	30.824	-11.419
175	ILE CG1	-3.137	29.978	-12.924	175	ILE CG2	-1.451	30.087	-11.812
175	ILE CD1	-3.192	30.929	-13.946	176	ALA N	-2.220	30.028	-7.928
176	ALA CA	-3.335	30.517	-6.870	176	ALA C	0.120	30.301	-7.310
176	ALA D	0.533	29.215	-7.038	176	ALA CB	-1.639	29.838	-8.541
177	VAL N	9.064	31.420	-7.180	177	VAL CA	2.261	31.934	-7.656
177	VAL C	3.225	31.693	-8.473	177	VAL D	3.178	32.687	-5.721
177	VAL CB	2.439	31.607	-8.755	177	VAL CG1	3.362	32.867	-9.382
177	VAL CG2	2.374	32.332	-9.045	178	GLY N	4.077	30.656	-6.351
178	GLY CA	3.160	30.703	-8.339	178	GLY C	6.446	31.233	-6.076
178	GLY D	6.415	31.435	-7.286	179	ALA N	7.512	31.667	-3.287
179	ALA CA	8.715	32.037	-8.859	179	ALA C	9.939	31.089	-8.779
179	ALA C	10.198	30.681	-6.719	179	ALA CB	9.025	33.231	-6.973
180	VAL N	10.639	31.162	-6.825	180	VAL CA	11.970	30.482	-6.981
180	VAL C	13.048	31.585	-7.171	180	VAL D	12.712	32.691	-7.627
180	VAL CB	12.075	39.314	-8.166	180	VAL CG1	11.273	28.281	-7.833
180	VAL CG2	12.175	30.129	-9.300	181	ASP N	14.287	31.203	-6.800
181	ASP CA	19.431	32.208	-7.039	181	ASP C	15.962	31.804	-8.662
181	ASP D	19.338	31.090	-9.292	181	ASP CB	16.668	31.921	-8.916
181	ASP CG	17.120	30.534	-8.971	181	ASP CD1	17.103	29.783	-6.972
181	ASP DD2	17.680	30.256	-9.887	182	SER N	17.087	32.386	-8.867
182	SER CA	17.622	32.216	-10.191	182	SER C	18.193	30.817	-10.696
182	SER D	18.365	33.492	-11.670	182	SER CB	18.678	33.313	-10.666
182	SER DG	18.016	36.561	-10.475	183	SER N	18.258	30.042	-9.623
183	SER CA	18.714	28.665	-9.666	183	SER C	17.581	27.614	-9.947
183	SER D	17.839	26.619	-9.397	183	SER CB	19.256	28.823	-8.007

183	SER CG	26.589	26.615	-0.291	194	ASN N	26.373	26.094	-0.292
184	ASN C8	26.364	27.317	-0.980	194	ASN C	26.931	26.710	-0.197
184	ASN O	16.135	25.739	-8.097	194	ASN CG	26.931	26.341	-10.722
184	ASN CG	16.993	26.998	-12.076	194	ASN D21	26.700	26.184	-12.277
184	ASN ND2	15.352	26.210	-13.076	195	GLN N	26.862	27.247	-7.359
185	GLN CA	15.276	26.646	-13.095	195	GLN C	24.290	27.494	-3.203
185	GLN O	16.139	26.726	-9.376	195	GLN CB	26.597	26.568	-0.101
185	GLN CG	16.939	26.242	-3.814	195	GLN CD	26.011	26.182	-3.206
185	GLN DE2	16.864	25.799	-6.061	195	GLN NE2	26.266	26.386	-1.934
186	ARG N	13.278	26.958	-6.448	196	ARG CA	22.185	27.774	-3.841
186	ARG C	12.780	26.782	-2.966	196	ARG O	23.698	28.384	-2.003
186	ARG CB	13.215	26.843	-3.116	196	ARG CG	20.214	27.473	-3.161
186	ARG CD	9.467	26.337	-1.663	196	ARG NE	9.866	26.333	-0.117
186	ARG CZ	9.961	26.379	3.039	196	ARG NH1	9.367	27.880	1.558
186	ARG NH2	10.966	26.321	3.783	197	ALA N	22.294	30.009	-2.153
187	ALA CA	12.728	31.066	-2.098	197	ALA C	22.262	30.604	-0.317
187	ALA O	11.158	30.043	-0.387	197	ALA CB	22.166	32.402	-2.344
188	SER N	13.091	30.770	0.949	198	SER CA	22.672	30.288	1.369
188	SER C	11.336	30.867	3.412	198	SER O	20.740	30.311	3.212
188	SER CB	13.767	30.656	2.938	198	SER CG	24.137	31.826	2.861
189	PHE N	10.963	32.010	3.974	199	PHE CA	9.697	32.681	2.418
189	PHE C	8.499	32.198	3.609	199	PHE O	7.389	32.936	2.019
189	PHE CB	9.787	34.217	3.263	199	PHE CG	10.117	34.698	0.367
189	PHE CD1	9.167	34.330	-0.121	199	PHE CD2	11.415	35.214	0.367
189	PHE CE1	9.683	35.187	-3.611	199	PHE CE2	11.769	35.345	-0.702
189	PHE CI	10.786	35.386	-1.723	199	SER N	8.703	31.324	0.499
190	SER CA	7.626	31.096	-0.291	199	SER C	6.463	30.162	0.328
190	SER O	7.034	29.083	0.866	199	SER CB	8.181	30.590	-1.708
190	SER OG	7.136	30.337	-2.618	199	SER N	8.388	30.931	0.326
191	SER CA	6.361	29.676	0.987	199	SER C	6.261	28.330	0.223
191	SER O	6.363	28.268	-0.995	199	SER CB	3.018	30.411	0.911
191	SER OG	2.729	31.285	3.094	199	VAL N	3.756	27.310	0.928
192	VAL CA	3.623	25.932	0.391	199	VAL C	2.234	23.291	0.686
192	VAL D	1.939	25.698	1.198	199	VAL CB	4.781	29.127	1.088
192	VAL CG1	6.164	25.727	0.722	199	VAL CG2	4.617	25.104	0.392
193	GLY N	1.938	24.172	0.047	199	GLY CA	0.629	23.564	0.610
193	GLY C	0.081	23.029	-0.901	199	GLY O	0.530	23.264	-2.013
194	PRO N	-1.023	22.289	-0.722	199	PRO CA	-1.662	21.651	-3.373
194	PRO C	-2.237	22.605	-2.914	199	PRO O	-2.403	22.244	-0.985
194	PRO CB	-2.769	20.783	-1.210	199	PRO CG	-2.311	20.622	0.213
194	PRO CD	-1.633	21.956	0.878	199	GLU N	-2.522	23.793	-2.619
195	GLU CA	-3.145	24.890	-3.252	199	GLU C	-2.093	23.631	-4.038
195	GLU O	-2.816	26.398	-6.936	199	GLU CB	-6.043	25.786	-2.470
195	GLU CG	-4.962	25.124	-1.435	199	GLU CD	-6.313	26.860	-0.180
195	GLU DE2	-3.110	26.960	0.345	199	GLU OE2	-8.138	26.520	0.783
196	LEU N	-0.829	23.264	-3.870	199	LEU CA	0.241	25.929	-4.666
196	LEU C	0.228	23.376	-8.059	199	LEU O	0.303	26.122	-6.193
196	LEU CB	1.340	23.739	-3.834	199	LEU CG	2.770	26.178	-4.843
196	LEU CD1	2.739	27.716	-6.439	199	LEU CD2	4.027	25.721	-3.931
197	ASP N	0.140	26.208	-7.093	199	ASP CA	0.032	25.774	-8.480
197	ASP C	1.307	23.738	-9.213	199	ASP O	1.853	26.734	-9.914
197	ASP CD	-1.067	26.398	-9.191	199	ASP CG	-2.406	26.391	-9.369
197	ASP DD1	-2.804	25.155	-8.354	199	ASP D21	-3.035	27.327	-8.088
198	VAL N	2.013	26.389	-9.344	199	VAL CA	3.204	26.970	-10.201
198	VAL C	4.197	27.930	-9.314	199	VAL O	3.752	26.699	-8.587
198	VAL CB	2.834	27.476	-11.637	199	VAL CG1	1.930	26.726	-12.937
198	VAL CG2	2.337	28.919	-11.684	199	MET N	3.374	27.914	-10.016
199	MET CA	6.438	28.802	-8.498	199	MET C	6.843	29.810	-10.878
199	MET D	6.636	29.519	-11.793	199	MET CB	7.660	27.970	-9.877
199	MET CG	7.365	26.049	-8.139	199	MET SD	6.733	27.469	-6.568
199	MET CE	8.227	27.735	-8.587	200	ALA N	7.626	30.942	-10.303
200	ALA CA	7.991	31.929	-11.039	200	ALA C	9.688	32.666	-10.272
200	ALA D	9.127	32.126	-9.060	200	ALA CB	6.932	32.870	-13.638

218	ASN S	9.743	43.367	-1.917	218	ASN CD	12.553	39.340	-2.334
218	ASN CG	14.031	39.366	-2.163	218	ASN CD1	14.612	39.709	-3.422
219	ASN ND2	14.660	39.664	-1.163	219	GLY N	9.670	39.934	-3.289
219	GLY CA	8.382	38.235	-2.669	219	GLY C	7.570	37.384	-3.681
219	GLY D	7.873	37.802	-4.176	220	THR N	6.363	36.638	-3.203
220	THR CA	8.697	35.936	-4.171	220	THR C	4.878	37.044	-4.864
220	THR D	6.617	36.742	-8.929	220	THR CB	4.325	34.819	-3.326
220	THR CG1	6.136	35.843	-2.451	220	THR CG2	5.706	33.696	-2.920
221	SER N	6.738	38.238	-6.303	221	SER CA	3.934	39.201	-3.169
221	SER C	6.760	39.661	-6.303	221	SER D	4.117	40.208	-7.277
221	SER CG	3.323	40.383	-6.366	221	SER DG	3.433	40.282	-3.149
222	MET N	6.060	39.389	-6.685	222	MET CE	6.471	63.771	-5.173
222	MET SD	7.768	61.933	-6.993	222	MET CG	6.956	41.399	-6.602
222	MET CG	8.351	60.015	-7.210	222	MET CA	6.916	39.670	-7.438
222	MET C	6.877	38.435	-8.367	222	MET O	7.086	38.867	-9.775
223	ALA N	8.384	37.244	-8.041	223	ALA CA	6.669	36.810	-8.183
223	ALA C	9.200	36.068	-9.707	223	ALA D	5.133	35.948	-10.929
223	ALA CG	6.509	36.807	-7.923	224	SER N	4.076	36.360	-9.038
224	SER CA	2.758	36.489	-9.703	224	SER C	2.661	37.161	-21.039
224	SER D	2.145	36.593	-12.057	224	SER CG	1.801	36.996	-9.603
224	SER DG	0.492	36.899	-9.197	225	PRO N	3.196	38.411	-21.159
225	PRO CA	3.095	39.130	-12.439	225	PRO C	3.766	38.449	-13.626
225	PRO D	3.406	38.830	-14.804	225	PRO CB	3.653	40.311	-12.094
225	PRO CG	6.411	40.402	-10.764	225	PRO CD	3.733	39.224	-10.054
226	MIS N	4.769	37.626	-33.299	226	MIS CA	9.666	36.879	-14.262
226	MIS C	6.418	35.947	-18.061	226	MIS O	6.625	38.809	-16.293
226	MIS CG	6.008	36.066	-13.765	226	MIS CG	7.816	36.859	-13.358
226	MIS ND1	8.068	37.688	-12.170	226	MIS CD2	8.113	37.118	-14.167
226	MIS CB1	9.270	38.052	-22.236	226	MIS NE2	9.771	37.866	-13.663
227	VAL N	3.393	35.366	-14.199	227	VAL CA	2.983	36.311	-14.727
227	VAL C	1.479	35.187	-15.421	227	VAL O	2.018	34.773	-16.490
227	VAL CG	2.103	33.664	-13.619	227	VAL CG1	1.976	32.476	-14.246
227	VAL CG2	3.204	32.665	-12.891	228	ALA N	2.003	36.242	-16.816
228	ALA CA	8.011	37.109	-15.517	228	ALA C	0.543	37.538	-16.668
228	ALA O	-0.253	37.635	-17.828	228	ALA CG	-0.307	38.353	-14.663
229	GLY N	1.781	38.028	-26.941	229	GLY CA	2.352	38.408	-18.239
229	GLY C	2.420	37.197	-19.187	229	GLY O	2.189	37.375	-20.394
230	ALA N	2.711	35.748	-28.646	230	ALA CA	2.794	36.801	-19.566
230	ALA C	1.424	36.300	-20.133	230	ALA D	1.310	34.203	-21.343
230	ALA CG	3.298	31.624	-18.709	231	ALA N	0.315	34.623	-19.328
231	ALA CA	-1.010	34.416	-19.764	231	ALA C	-1.286	33.623	-20.864
231	ALA O	-1.909	35.036	-21.352	231	ALA CG	-1.932	34.664	-16.569
232	ALA N	-8.778	36.657	-20.721	232	ALA CA	-1.013	37.683	-21.792
232	ALA C	-0.281	37.284	-23.078	232	ALA D	-0.843	37.501	-24.187
232	ALA CG	-8.742	39.121	-21.377	233	LEU N	0.935	36.726	-22.967
233	LEU CA	2.617	36.293	-26.209	233	LEU C	0.821	39.169	-24.880
233	LEU O	0.696	35.231	-26.111	233	LEU CG	3.063	35.877	-23.907
233	LEU CG	3.996	36.994	-23.633	233	LEU CD1	3.239	36.342	-22.921
233	LEU CD2	6.243	37.853	-26.680	234	ILE N	0.357	34.199	-24.047
234	ILE CD1	0.306	30.664	-21.657	234	ILE CG1	0.456	31.223	-23.103
234	ILE CG2	-0.311	32.014	-23.370	234	ILE CG2	-1.803	30.900	-24.591
234	ILE C1	-0.408	33.076	-26.644	234	ILE C	-1.621	33.597	-25.034
234	ILE D	-1.183	33.166	-26.366	235	LEU N	-2.390	34.465	-16.779
235	LEU CA	-3.396	35.028	-25.423	235	LEU C	-3.258	33.843	-26.872
235	LEU O	-6.309	35.916	-27.389	235	LEU CG	-6.432	39.789	-24.378
235	LEU CG	-3.140	36.891	-23.342	235	LEU CD1	-5.652	35.683	-22.148
235	LEU CD2	-6.292	36.338	-26.120	236	SER N	-2.004	36.438	-26.798
236	SER CA	-3.764	37.237	-27.986	236	SER C	-1.491	36.292	-29.166
236	SER D	-1.768	36.634	-30.290	236	SER CP	-0.683	38.234	-27.733
236	SER CG	0.399	37.371	-27.382	237	LTS N	-1.046	33.067	-28.882
237	LTS CA	-0.868	34.085	-29.952	237	LTS C	-2.113	33.277	-30.268
237	LTS D	-2.378	32.931	-31.664	237	LTS CP	0.272	33.312	-29.551
237	LTS CG	0.677	32.240	-30.716	237	LTS CD	2.020	31.339	-30.442

237	LVS C2	2.345	20.762	-21.721	237	LVS N2	3.825	20.848	-21.596
238	MIS H	-1.931	21.989	-29.319	238	MIS C8	-4.161	22.163	-20.379
238	MIS C	-3.334	22.899	-28.697	238	MIS O	-5.713	22.584	-27.562
238	MIS C81	-3.948	20.862	-28.511	238	MIS CG	-3.899	20.921	-20.237
238	MIS MC1	-1.707	20.679	-28.333	238	MIS CD2	-3.137	20.258	-20.396
238	MIS CG1	-1.086	20.891	-29.042	238	MIS ME2	-1.943	20.600	-20.399
239	PRO N	-3.862	21.917	-29.369	239	PRO C8	-6.903	24.779	-28.773
239	PRO C	-3.204	20.952	-28.532	239	PRO D	-8.949	24.519	-27.662
239	PRO CB	-7.018	20.977	-29.713	239	PRO CG	-6.666	20.294	-21.027
239	PRO CD	-3.436	20.436	-30.668	240	ASH N	-3.386	22.969	-20.227
240	ASH CA	-9.829	22.041	-29.216	240	ASH C	-9.503	21.280	-27.980
240	ASH O	-10.340	20.610	-27.376	240	ASH CB	-9.403	21.249	-30.533
240	ASH CG	-7.971	20.827	-30.881	240	ASH OD1	-7.004	21.390	-31.147
240	ASH ND2	-7.670	20.909	-30.926	241	TRP N	-8.354	21.804	-27.304
241	TRP CA	-8.304	20.124	-26.120	241	TRP C	-9.105	20.638	-24.936
241	TRP O	-9.043	21.833	-26.686	241	TRP CB	-6.879	20.830	-26.679
241	TRP CG	-6.694	21.903	-28.557	241	TRP CD1	-6.331	20.433	-27.813
241	TRP CD2	-6.839	20.324	-26.133	241	TRP NE1	-3.362	27.547	-20.221
241	TRP CE2	-6.416	27.476	-27.216	241	TRP CE3	-6.097	20.496	-24.981
241	TRP CZ2	-3.375	20.786	-27.174	241	TRP CZ3	-2.912	27.667	-24.963
241	TER CM2	-2.470	20.073	-26.003	242	THR N	-9.727	20.781	-24.142
242	THR CA	-10.458	20.119	-22.911	242	THR C	-9.669	20.176	-21.747
242	THR O	-8.335	29.674	-21.937	242	THR CB	-11.579	20.032	-22.673
242	THR OG1	-10.037	27.786	-22.474	242	THR CG2	-12.494	20.907	-23.893
243	ASH N	-9.946	20.859	-20.611	243	ASH ND2	-11.787	20.404	-18.747
243	ASH OD1	-11.463	21.518	-16.788	243	ASH CG	-11.093	21.131	-17.905
243	ASH CB	-9.703	21.930	-18.332	243	ASH CA	-9.093	20.731	-19.644
243	ASH C	-8.657	21.303	-19.010	243	ASH O	-7.593	20.136	-18.448
244	THR N	-9.364	20.362	-19.283	244	THR CB	-9.382	20.934	-19.059
244	THR C	-8.133	20.393	-19.802	244	THR O	-7.324	20.757	-19.111
244	THR CB	-10.665	20.088	-19.494	244	THR OG1	-11.739	20.675	-18.684
244	THR CG2	-10.503	26.593	-19.159	245	GLN N	-8.082	26.716	-21.073
245	GLN CA	-6.964	26.362	-21.962	245	GLN C	-5.647	27.020	-21.920
245	GLN D	-4.573	26.393	-21.447	245	GLN CB	-7.330	26.899	-23.397
245	GLN CG	-8.263	25.526	-23.989	245	GLN CD	-8.493	29.873	-23.628
245	GLN DE1	-9.306	26.769	-29.727	245	GLN ME2	-7.745	29.312	-26.370
246	VAL N	-5.697	20.304	-21.218	246	VAL CA	-4.477	29.060	-20.770
246	VAL C	-3.936	20.462	-19.467	246	VAL O	-2.705	20.227	-19.261
246	VAL CB	-4.779	20.593	-20.623	246	VAL CG2	-3.564	21.272	-20.027
246	VAL CG2	-5.187	31.138	-21.059	247	ARG N	-6.787	20.260	-18.462
247	ARG CA	-4.380	27.714	-17.168	247	ARG C	-3.770	26.292	-17.340
247	ARG O	-2.703	23.985	-16.764	247	ARG CB	-3.533	27.667	-16.169
247	ARG CG	-4.987	27.095	-14.852	247	ARG CD	-6.056	27.179	-13.793
247	ARG NE	-5.640	26.757	-12.548	247	ARG CZ	-3.893	26.866	-11.313
247	ARG NH2	-7.094	27.486	-11.210	247	ARG MH2	-5.177	26.428	-10.270
248	SER N	-6.480	25.305	-18.191	248	SER CA	-6.039	24.131	-18.426
248	SER C	-2.037	24.086	-19.072	248	SER O	-1.848	23.293	-18.583
248	SER CB	-5.034	23.408	-19.372	248	SER OG	-6.146	23.090	-18.532
249	SER N	-2.500	24.859	-20.136	249	SER CA	-1.223	24.874	-20.851
249	SER C	-0.071	25.302	-19.940	249	SER O	1.028	24.705	-20.049
249	SER CB	-1.369	25.758	-22.088	249	SER OG	-0.300	25.619	-22.956
250	LEU N	-0.289	26.333	-19.160	250	LEU CO2	1.824	29.816	-10.222
250	LEU CD1	-0.373	20.453	-17.268	250	LEU CG	0.352	29.438	-10.131
250	LEU CB	0.178	20.063	-17.903	250	LEU CA	0.718	26.837	-10.216
250	LEU C	1.092	29.694	-17.265	250	LEU O	2.213	23.421	-17.032
251	GLN N	0.088	25.057	-16.716	251	GLN NE2	-2.750	25.512	-12.237
251	GLN DE1	-2.819	23.424	-12.939	251	GLN CD	-2.343	24.330	-13.036
251	GLN CG	-1.238	26.816	-13.996	251	GLN CB	-0.857	23.621	-14.877
251	GLN CA	0.381	23.961	-13.743	251	GLN C	0.939	22.664	-16.361
251	GLN O	1.763	22.014	-15.618	252	ASH N	0.633	22.394	-17.390
252	ASH CA	1.082	21.204	-18.282	252	ASH C	2.384	21.359	-18.991
252	ASH O	2.809	20.462	-19.768	252	ASH CB	0.004	20.780	-19.292
252	ASH CG	-3.036	19.926	-17.973	252	ASH OD1	-0.838	19.355	-17.502

252 ASN ND2	-2.236	19.834	-19.361	253 THR C8	3.910	22.303	-18.923
253 THR C8	6.256	22.717	-19.713	253 THR E	3.381	23.247	-18.818
253 THR O	6.346	23.793	-19.427	253 THR CG	6.086	23.672	-20.932
253 THR OG1	3.959	24.937	-20.628	253 THR CG2	3.147	23.330	-22.032
254 THR N	8.218	23.177	-17.551	254 THR CA	6.216	23.612	-16.988
254 THR C	7.666	22.700	-16.612	254 THR D	7.402	21.980	-17.093
254 THR CB	9.084	23.938	-18.132	254 THR OG1	5.329	22.378	-23.060
254 THR CG2	6.350	24.549	-14.802	255 THR N	9.499	23.296	-16.676
255 THR CA	9.771	22.394	-19.817	255 THR E	6.621	22.031	-14.616
255 THR O	9.639	22.786	-13.676	255 THR CB	11.080	23.455	-18.897
255 THR OG1	11.082	23.709	-17.321	255 THR CG2	12.216	22.628	-18.484
256 LYS N	9.606	20.702	-14.314	256 LYS CA	9.384	20.063	-13.910
256 LYS C	10.322	20.333	-12.063	256 LYS D	11.662	20.274	-12.592
256 LYS CB	9.024	18.590	-13.249	256 LYS CG	9.038	17.803	-11.921
256 LYS CD	10.286	16.948	-12.777	256 LYS CE	10.212	19.940	-10.623
256 LYS NZ	9.263	14.969	-12.054	257 LEU N	10.212	20.674	-10.824
257 LEU CA	11.272	21.036	-9.393	257 LEU C	11.239	20.232	-8.614
257 LEU D	12.096	20.865	-7.732	257 LEU CG	11.187	22.947	-9.522
257 LEU CG	11.357	23.420	-10.568	257 LEU CD1	11.348	23.003	-9.921
257 LEU CD2	12.678	23.468	-11.325	258 GLY N	10.431	19.282	-8.298
258 GLT CA	10.602	14.793	-6.879	258 GLY C	9.368	18.703	-8.373
258 GLT O	8.213	23.936	-7.202	259 ASP N	9.026	18.282	-5.190
259 ASP CA	7.757	17.896	-4.916	259 ASP C	6.659	18.941	-4.789
259 ASP O	8.859	20.039	-6.214	259 ASP CB	7.946	17.560	-3.033
259 ASP CG	6.701	17.128	-2.241	259 ASP DD1	5.611	17.527	-2.354
259 ASP DD2	7.988	16.289	-1.321	260 SER N	5.360	18.610	-8.312
260 SER CA	6.011	19.937	-5.929	260 SER C	4.046	20.362	-6.289
260 SER D	3.300	21.503	-6.446	260 SER CB	3.345	18.919	-6.269
260 SER DG	2.745	17.937	-5.448	261 PHE N	4.241	19.778	-8.112
261 PHE CA	3.131	20.468	-1.885	261 PHE C	6.544	21.866	-1.863
261 PHE D	3.366	22.848	-1.432	261 PHE CB	4.053	19.749	-8.563
261 PHE CG	3.349	20.337	0.715	261 PHE CD1	2.206	20.163	1.123
261 PHE CD2	4.601	21.060	1.598	261 PHE CE1	3.737	20.717	3.313
261 PHE CE2	3.945	21.602	2.748	261 PHE C2	2.605	21.465	3.114
262 TYR N	9.778	21.798	-2.305	262 TYR CA	6.688	22.914	-2.291
262 TYR C	6.820	23.689	-3.545	262 TYR O	7.201	24.893	-3.393
262 TYR CB	8.122	22.435	-1.852	262 TYR CG	8.146	21.892	-6.454
262 TYR CD1	8.014	20.484	-0.364	262 TYR CD2	8.143	22.669	0.498
262 TYR CE1	8.062	24.873	0.882	262 TYR CE2	8.314	22.069	1.962
262 TYR C2	8.069	20.472	2.018	262 TYR OH	7.963	20.029	3.205
263 TYR N	6.616	23.104	-4.693	263 TYR CA	6.812	23.653	-6.022
263 TYR C	5.626	23.680	-6.196	263 TYR D	5.781	24.117	-8.111
263 TYR CB	7.928	22.768	-6.681	263 TYR CG	6.278	23.059	-6.068
263 TYR CD1	10.064	26.046	-6.637	263 TYR CD2	9.800	22.342	-6.993
263 TYR CE1	11.335	26.328	-6.168	263 TYR CE2	11.062	22.660	-6.491
263 TYR C2	21.838	23.618	-8.106	263 TYR OH	13.063	23.949	-6.897
264 GLY N	6.471	23.161	-6.916	264 GLY CA	9.301	23.064	-7.612
264 GLY C	3.847	22.196	-8.936	264 GLY D	4.667	21.274	-8.303
265 LYS N	3.436	22.477	-9.754	265 LYS CA	3.834	21.798	-10.872
265 LYS C	5.288	22.232	-11.684	265 LYS D	5.684	21.563	-12.386
265 LYS CB	2.753	22.071	-12.064	265 LYS CG	1.490	21.363	-11.303
265 LYS CD	0.710	20.548	-12.079	265 LYS CE	-0.692	20.496	-11.391
265 LYS NZ	-3.678	22.977	-12.499	266 GLY N	3.787	23.226	-10.817
266 GLY CA	7.120	23.612	-11.729	266 GLY C	7.153	23.052	-11.818
266 GLY D	6.177	25.793	-11.648	267 LEU N	8.262	23.336	-12.490
267 LEU CA	8.490	26.890	-13.097	267 LEU C	7.804	26.771	-16.437
267 LEU D	7.953	25.909	-13.298	267 LEU CB	10.010	26.859	-13.216
267 LEU CG	10.432	28.052	-14.098	267 LEU CD1	10.096	29.331	-13.290
267 LEU CD2	31.924	27.921	-14.327	268 ILE N	7.064	27.863	-16.632
268 ILE CA	6.606	28.035	-15.944	268 ILE C	7.426	26.246	-17.065
268 ILE D	8.531	28.793	-16.912	268 ILE CB	5.363	29.210	-18.899
268 ILE CG1	6.099	30.561	-15.952	268 ILE CG2	6.243	26.929	-16.867
268 ILE CD1	8.391	31.765	-16.262	269 ASN N	7.007	27.363	-18.237

269	ASN CA	7.802	27.973	-19.437	269	ASN C	6.839	28.334	-28.685
269	ASN D	5.965	27.762	-20.942	269	ASN CB	8.692	28.853	-19.893
269	ASN CG	9.161	26.836	-21.231	269	ASN CD1	8.993	27.626	-22.122
269	ASN ND2	30.011	25.796	-21.472	270	VAL N	6.908	29.868	-20.724
270	VAL C4	5.863	28.618	-21.614	270	VAL C	6.039	30.007	-23.036
270	VAL D	5.097	29.969	-23.872	270	VAL CB	5.636	31.930	-21.422
270	VAL CG1	6.869	32.797	-21.879	270	VAL CG2	6.420	32.382	-22.232
271	GLN N	7.323	28.701	-23.352	271	GLN CA	7.603	29.270	-26.744
271	GLN C	6.869	27.934	-25.031	271	GLN D	6.213	27.806	-26.891
271	GLN CB	9.104	28.220	-24.964	271	GLN CG	9.406	28.618	-26.330
271	GLN CD	30.903	28.385	-26.582	271	GLN CD1	11.369	28.379	-27.718
271	GLN NE2	31.702	28.853	-25.810	272	ALB N	6.977	26.999	-26.092
272	ALB CA	6.224	28.712	-24.260	272	ALB C	6.701	28.958	-26.164
272	ALB D	3.898	25.903	-25.001	272	ALB CB	6.743	26.742	-23.172
273	ALB N	4.267	26.681	-23.135	273	ALB CA	8.840	26.921	-22.859
273	ALB C	2.081	27.528	-24.020	273	ALB D	8.898	27.219	-26.285
273	ALB CB	2.736	27.773	-21.383	274	ALB N	2.755	28.604	-26.762
274	ALB CG	2.952	30.391	-26.210	274	ALB CA	2.109	29.144	-29.867
274	ALB C	1.730	28.367	-27.090	274	ALB D	6.980	28.968	-27.921
275	GLN N	2.350	27.194	-27.314	275	GLN CA	2.048	26.389	-28.827
275	GLN C	2.167	27.261	-29.777	275	GLN D	3.260	27.807	-29.916
275	GLN CT	1.193	27.361	-30.580	275	GLN CB	0.666	25.734	-28.320
275	GLN CG	0.921	24.666	-27.447	275	GLN CD	-0.823	23.934	-27.631
275	GLN CD1	-1.376	23.893	-28.729	275	GLN NE2	-1.373	23.611	-26.938

De ovenstående strukturelle studier sammen med de heri og an-
detsteds viste kinetiske data (M. Philipp et al. (1983) Mol.
Cell. Biochem. 51, 5-32, I.B. Svendsen (1976) Carlsberg Res.
Comm. 41, 237-291; S.F. Markland Id; D.C. Stauffe et al.
5 (1965) J. Biol. Chem. 244, 5333-5338) angiver, at understeder-
ne i subtilisins bindingskløft er i stand til at vekselvirke
med substrataminosyrerester fra P-4 til P-2'.

De mest omfattende undersøgte af de ovenstående rester er
10 Gly166, Gly169 og Ala 152. Disse aminosyrer blev identificeret
som rester inden for S-1-understedet. Som det ses af fig. 3,
som er et stereobillede af S-1-understedet, optager Gly166 og
Gly169 positioner i bunden af S-1-understedet, mens Ala152 op-
tager en position nær toppen af S-1, nærværd den katalytiske
15 Ser221.

Alle 19 aminosyresubstitutioner af Gly166 og Gly169 er blevet
foretaget. Som det vil blive angivet i de følgende eksempler,
vil de foretrakne erstatningsaminosyrer for Gly166 og/eller
20 Gly169 afhænge af den specifikke aminosyre, som optager P-1-
positionen i et givet substrat.

De eneste substitutioner af Ala152, som for tiden er foretaget
og analyseret, omfatter erstatningen af Ala152 med Gly og Ser.
Resultaterne af disse substitutioner på P-1-specificitet vil
25 blive vist i eksemplerne.

Udover de rester, som er specifikt forbundne med specificitet
over for P-1-substrataminosyren, er Tyr104 blevet identifice-
ret som værende involveret i P-4-specificitet. Substitutioner
ved Phe189 og Tyr217 forventes imidlertid at påvirke henholds-
vis P-2'- og P-1'-specificitet.

Subtilisins katalytiske aktivitet er også blevet modificeret
ved enkelte aminosyresubstitutioner ved Asn155. Den kataly-
tiske trehed af subtilisin er vist i fig. 4. Som det kan ses,
35 er Ser221, His64 og Asp32 anbragt således at de letter nukleo-
filt angreb af serinhydroxylat på carbonylen i den spaltelige
peptidbinding. Krystallografiske undersøgelser af subtilisin

(Robertus et al. (1972) Biochem. 11, 4293-4303; Matthews et al. (1975) J. Biol. Chem. 250, 7120-7126 og Poulos et al. (1976) J. Biol. Chem. 250, 1097-1103) viser, at der dannes to hydrogenbindinger med oxyanionen fra substratovergangstilstan-
5 den. En hydrogenbindingsdonor er fra det katalytiske serin-221-hovedkædeamid, mens den anden er fra en af NE2-protonerne i asparagin-155-sidekæden, se fig. 4.

Asn155 blev substitueret med Ala, Asp, His, Glu og Thr. Disse substitutioner blev foretaget for at undersøge stabiliseringen af det ladede, tetraedriske mellemprodukt af overgangstilstandskomplekset ved hjælp af den mulige hydrogenbinding mellem sidekæden i Asn155 og mellemproduktets oxyanion. Disse bestemte substitutioner forårsagede store formindskelser i substrat-omsætningshastighed, k_{cat} (200 til 4000 gange), små formindskelser i substratbinding K_m (op til 7 gange) og et tab i overgangstilstandsstabiliseringens energi på 2,2 til 4,7 kcal/mol. Bibeholdelsen af K_m og faldet i k_{cat} vil gøre disse mutantenzymer nyttige som bindingsproteiner for specifikke peptidsekvenser, hvis natur vil blive bestemt af forstadieproteiens specificitet.
10
15
20

Der er blevet identificeret forskellige andre aminosyrerester, som påvirker alkalistabilitet. I nogle tilfælde har mutanter med ændret alkalistabilitet også ændret termisk stabilitet.
25

I *B. amyloliquefaciens*-subtilisin er resterne Asp36, Ile107, Lys170, Ser204 og Lys213 blevet identificeret som rester, der efter substitution med en anden aminosyre ændrer det muterede enzyms alkalistabilitet sammenlignet med forstadieenzymet.
30 Substitutionen af Asp36 med Ala og substitutionen af Lys170 med Glu resulterede hver i et mutantenzym med en lavere alkalistabilitet sammenlignet med vildtypesubtilisin. Når Ile107 blev substitueret med Val, Ser204 substitueret med Cys, Arg eller Leu, eller Lys213 substitueret med Arg, havde mutantsubtilisinen en større alkalistabilitet sammenlignet med vildtypesubtilisinen. Mutanten Ser204P udviste imidlertid en formindskelse i alkalistabilitet.
35

Desuden påvirker andre rester, som er blevet identificeret som værende forbundet med modifikationen af andre egenskaber hos subtilisin, også alkalistabilitet. Disse rester omfatter Ser24, Met50, Glu156, Gly166, Gly169 og Tyr217. Specifikt resulterer de følgende specielle substitutioner i en forsøget alkalistabilitet: Ser24C, Met50F, Gly156Q eller S, Gly166A, H, K, N eller Q, Gly169S eller A og Tyr217F, K, R eller L. Mutanten Met50V resulterer på den anden side i en formindskelse i alkalistabiliteten hos mutantsubtilisinen sammenlignet med vildtypesubtilisin.

Andre rester, som er involveret i alkalistabilitet, baseret på alkalistabilitetsundersøgelsen, omfatter Asp197 og Met222. Særlige mutanter omfatter Asp197 (R eller A) og Met222 (alle andre aminosyrer).

Forskellige andre rester er blevet identificeret som værende involveret i termisk stabilitet som bestemt ved den heri beskrevne termiske stabilitetsundersøgelse. Disse rester omfatter de ovenfor identificerede rester, som påvirker alkalistabiliteten og Met199 og Tyr21. Disse sidstnævnte to rester mener også at være vigtige for alkalistabilitet. Mutanter ved disse rester omfatter I199 og F21.

B. amyloliquefaciens-subtilisins aminosyresekvens er også blevet modifieret ved at substituere to eller flere aminosyrer i vildtypesekvensen. Der er blevet identificeret seks kategorier af flere gange substitueret mutantsubtilisin. De første to kategorier omfatter termisk og oxidativt stabile mutanter. De næste tre andre kategorier omfatter mutanter, som kombinerer de nyttige egenskaber af enhver af flere enkelte mutationer i B. amyloliquefaciens-subtilisin. Den sidste kategori omfatter mutanter, som har modifieret alkalistabilitet og/eller termisk stabilitet.

Den første kategori omfatter dobbelte mutanter, hvori to cysteinrester er blevet substitueret ved forskellige aminosyrestpositioner inde i subtilisinmolekylet. Dannelsen af disulfidbroer mellem de to substituerede cysteinrester resulterer i

mutantsubtilisiner med ændret termisk stabilitet og katalytisk aktivitet. Disse mutanter omfatter A21/C22/C87 og C24/C87, som vil blive beskrevet i flere detaljer i eksempel 11.

- 5 Den anden kategori af multiple subtilisinmutanter omfatter mutanter, som er stabile i nærværelse af forskellige oxidationsmidler, såsom hydrogenperoxid eller persyrer. I eksemplerne 1 og 2 beskrives disse mutanter, som omfatter F50/I124/Q222, F50/I124, F50/Q222, F50/L124/Q222, I124/Q222 og L124/Q222.
- 10 Den tredje kategori af multiple subtilisinmutanter omfatter mutanter med substitutioner i position 222 kombineret med forskellige substitutioner i positionerne 166 eller 169. Disse mutanter kombinerer f.eks. egenskaben oxidativ stabilitet ved A222-mutationen med den ændrede substratspecificitet hos de forskellige 166- eller 169-substitutioner. Sådanne multiple mutanter omfatter A166/A222, A166/C222, F166/C222, K166/A222, K166/C222, V166/A222 og V166/C222. K166/A222-mutantsubtilisinen har f.eks. et k_{cat}/K_m -forhold, som er ca. 2 gange større end forholdet for den enkelte A222-mutantsubtilisin, når de sammenlignes under anvendelse af et substrat med phenylalanin som P-1-aminoxyren. Denne kategori af multiple mutanter er beskrevet i flere detaljer i eksempel 12.
- 15 Den fjerde kategori af multiple mutanter kombinerer substitutioner i position 156 (Glu til Q eller S) med substitutionen af Lys i position 166. Hver af disse enkelte mutationer forbedrer enzymvirkningen på substrater med glutamat som P-1-aminoxyren. Når disse enkelte mutationer kombineres, virker de resulterende multiple enzymmutanter bedre end hvert forstadium, se eksempel 9.
- 20 Den femte kategori af multiple mutanter indeholder substitutionen af op til 4 aminosyrer i *B. amyloliquefaciens*-subtilisinsekvensen. Disse mutanter har specifikke egenskaber, som er praktisk talt identiske med egenskaberne af subtilisin fra *B. licheniformis*. Subtilisin fra *B. licheniformis* adskiller sig fra *B. amyloliquefaciens*-subtilisin i 87 ud af 275 aminosyrer. Den multiple mutant F50/S156/A169/L217 viste sig at have til
- 25
- 30
- 35

licheniformis-enzymet svarende substratspecificitet og kinetik (se eksempel 13). Dette skyldes imidlertid sandsynligvis kun tre af mutationerne (S156, A169 og L217), som er til stede i enzymets substratbindingsregion. Det er ganske overraskende, 5 at ved at foretage blot tre ændringer ud af de 87 forskellige aminosyrer mellem sekvensen i de to enzymer, blev *B. amyloliquefaciens*-enzymet omdannet til et enzym med egenskaber, som svarede til *B. licheniformis*-enzymets egenskaber. Andre enzymer i denne serie omfatter F50/Q156/N166/L217 og 10 F50/S156/L217.

Den sjette kategori af multiple mutanter omfatter kombinationen af substitutioner i stilling 107 (Ile til V) med substitutionen af Lys i position 213 med Arg, og kombinationen af substitutioner i position 204 (fortrinsvis Ser til C eller L, men 15 også til alle andre aminosyrer) med substitutionen af Lys i position 213 med R. Andre multiple mutanter, som har en ændret alkalistabilitet, omfatter Q156/K166, Q156/N166, S156/K166, S156/N166 (tidligere identificeret som havende ændret substratspecificitet) og F50/S156/A169/L217 (tidligere identificeret som en *B. amyloliquefaciens*-subtilisinmutant med egenskaber svarende til egenskaberne hos subtilisin fra *B. licheniformis*). Mutanten F50/V107/R213 blev konstrueret på basis af den observerede forøgelse i alkalistabilitet for de enkelte 20 mutanter F50, V107 og R213. Det blev bestemt, at V107/R213-mutanten havde en forøget alkalistabilitet sammenlignet med vildtypesubtilisinen. I denne bestemte mutant var den forøgede 25 alkalistabilitet resultatet af den kumulative stabilitet af hver af de individuelle mutationer. Tilsvarende havde mutanten F50/V107/R213 en endnu større alkalistabilitet sammenlignet med V107/R213-mutanten, hvilket antyder, at forøgelsen i alkalistabilitet på grund af F50-mutationen også var kumulativ. 30

Tabel IV opsummerer de multiple mutanter, som er blevet fremstillet, herunder dem, som ikke er nævnt ovenfor.

35 Desuden skal nævnes, baseret delvis på de ovenstående resultater, at substitutionen i de følgende rester i subtilisin forventes at fremkalde en multipel mutant med forøget termisk

stabilitet og alkalistabilitet: Ser24, Met50, Ile107, Glu156,
Gly166, Gly169, Ser204, Lys213, Gly215 og Tyr217.

TABEL V

	<u>Dobbelte mutanter</u>	<u>Tredobbelte, firedobbelte eller andre multiple</u>
5	C22/C87	F50/I124/Q222
	C24/C87	F50/L124/Q222
10	V45/V48	F50/L124/A222
	C49/C94	A21/C22/C87
	C49/C95	F50/S156/N166/L217
	C50/C95	F50/Q156/N166/L217
	C50/C110	F50/S156/A169/L217
15	F50/I124	F50/S156/L217
	F50/Q222	F50/Q156/K166/L217
	I124/Q222	F50/S156/K166/L217
	Q156/D166	F50/Q156/K166/K217
	Q156/K166	F50/S156/K166/K217
20	Q156/N166	F50/V107/R213
	S156/D166	[S153/S156/A158/G159/S160/A161- 164/I165/S166/A169/R170]
	S156/K166	L204/R213
	S156/N166	R213/204A, E, Q, D, N, G, K, V, R, T, P, I, M, F, Y, W, eller H
25	S156/A169	V107/R213
	A166/A222	
	A166/C222	
	F166/A222	
	F166/C222	
	K166/A222	
30	K166/C222	
	V166/A222	
	V166/C222	
	A169/A222	
	A169/A222	
	A169/C222	
35	A21/C22	

Udover de ovenfor identificerede aminosyrerester menes andre aminosyrerester i subtilisin også at være vigtige med hensyn

til substratspecificitet. Mutationen af hver af disse rester forventes at fremkalde ændringer i subtilisins substratspecificitet. Desuden forventes multiple mutationer blandt disse rester og blandt de tidligere identificerede rester også at fremkalde subtilisinmutanter med hidtil ukendt substratspecificitet.

Særligt vigtige rester er His67, Ile107, Leu126 og Leu135. Mutation af His67 skulle ændre S-1'-understedet og derved ændre mutantens specificitet for P-1'-substratresten. Ändringer i denne position kunne også påvirke mutantens pH-aktivitetsprofil. Denne rest blev identificeret baseret på opfindernes substratmodellering ud fra produktinhibitorkomplekser.

Ile107 er involveret i P-4-binding. Mutation i denne position skulle således ændre specificitet for P-4-substratresten udover den observerede virkning på alkalistabilitet. Ile107 blev også identificeret ved molekulmodellering fra produktinhibitorkomplekser.

S-2-bindingsstedet omfatter Leu126-resten. Modifikation i denne position skulle derfor påvirke P-2-specificitet. Desuden menes denne rest at være vigtig for at omdanne subtilisin til en aminopeptidase. pH-aktivitetsprofilen skulle også blive modifiseret ved passende substitution. Disse rester blev identificeret ved undersøgelse af den raffinerede model, den tredimensionelle struktur fra modelstudier. En længere sidekæde forventes at udelukke binding af nogen sidekæde ved S-2-understedet. Binding ville derfor være begrænset til understederne S-1, S-1', S-2', S-3', og spaltning ville blive tvunget til at ske efter det aminoterminale peptid.

Leu135 er i S-4-understedet og skulle, såfremt den blev muteret, ændre substratspecificitet for P-4 i tilfælde af mutation. Denne rest blev identificeret ved undersøgelse af den tredimensionelle struktur og modellering baseret på F222's produktinhibitorkompleks.

Udover disse steder menes specifikke aminosyrerester i segmenterne 97-103, 126-129 og 213-215 også at være vigtig for substratbinding.

Segmenterne 97-103 og 126-129 danner et antiparallelt β -lag med hovedkæden af substratresterne P-4 til P-2. Muterende rester i disse regioner skulle påvirke substratorienteringen gennem hovedkæde (enzym) - hovedkæde (substrat)-vekselvirkninger, eftersom hovedkæden af disse substratreste ikke vekselvirker med de bestemte rester i S-4-til S-2-understederne.

I segmentet 97-103 kan Gly97 og Asp99 muteres for at ændre positionen af resterne 101-103 inde i segmentet. Ændringer på disse steder skal imidlertid være forligelige. I B. amyloliquefaciens-subtilisin stabiliserer Asp99 en vending i den tertære foldning af hovedkæden, som påvirker retningen af resterne 101-103. B. licheniformis-subtilisin-Asp97 virker på analog måde.

Udover Gly97 og Asp99 vekselvirker Ser101 med Asp99 i B. amyloliquefaciens-subtilisin til stabilisering af den samme hovedkædevending. Ændringer i denne rest skulle ændre 101-103-hovedkæderetningen.

Mutationer i Glu103 forventes ligeledes at påvirke 101-103-hovedkæderetningen.

Sidekæden i Gly102 vekselvirker med substrat-P-3-aminoxyren. Sidekæder i substituerede aminoxyrer forventes således signifikant at påvirke specifiteten for P-3-substrataminoxyrerne.

Alle aminoxyrerne i 127-129-segmentet anses for at være vigtige for substratspecificitet. Gly127 er anbragt således, at dens sidekæde vekselvirker med S-1- og S-3-understederne. Ændringer af denne rest skulle således ændre specifiteten for substratets P-1- og P-3-rester.

Sidekæden i Gly128 omfatter en del af både S-2- og S-4-understederne. Man ville derfor forvente ændret specificitet over for P-2 og P-4 efter mutation. Desuden kan en sådan mutation omdanne subtilisin til en aminopeptidase af de samme årsager, som at man ville forvente, at substitutioner af Leu126 ville give dette resultat.

Pro129-resten begrænser sandsynligvis den konformationsmæssige frihed hos sekvensen 126-133, rester, som kan spille en stor rolle ved bestemmelse af P-1-specificitet. Erstatning af Pro kan muligvis indføre mere fleksibilitet og derved gøre sådanne 5 mutanters bindingsevneinterval bredere.

Sidekæden i Lys213 er anbragt inde i S-3-understedet. Alle aminosyrerne i 213-215-segmentet anses ligeledes for at være 10 værtige for substratspecificitet. Der forventes således ændret P-3-substratspecificitet efter mutation af denne rest.

Tyr214-resten vekselvirker ikke med substrat, men er anbragt således, at den kunne påvirke konformationen af hårnåleslyngningen 204-217.

15 Endelig skulle mutation af Gly215-resten påvirke S-3'-understedet og derved ændre P-3'-specificitet.

Udover de ovennævnte substitutioner af aminosyrer, kan indsættelsen eller deletionen af en eller flere aminosyrer i den eksterne slyngning omfattende resterne 152-172 også påvirke 20 specificiteten. Dette skyldes, at disse rester kan spille en rolle i den "sekundære kontaktregion", som er beskrevet i modellen af streptomyces subtilisininhibitoren, der er kompleksbundet med subtilisin, Hirono et al. (1984) J. Mol. Biol., 178, 389-413. Thermitase K har en deletion i denne region, som 25 fjerner adskillige af disse "sekundære kontakt"-rester. Deletion af resterne 161 til 164 forventes især at fremkalde en mutantsubtilisin med modificeret substratspecificitet. Desuden skulle en omlejring i dette område induceret ved deletionen, 30 ændre positionen af mange rester, som er involveret i substratbinding, hovedsageligt ved P-1. Dette skulle igen påvirke den totale aktivitet over for proteinholdige substrater.

Virkningen af deletion af resterne 162-164 er blevet vist ved 35 at sammenligne aktiviteten af vildtypeenzymet (WT) med et mutantenzym indeholdende denne deletion samt multiple substitutioner (dvs. S153/S156/A158/G159/S160/Δ160-164/I165/S166/A169/R170). Dette gav følgende resultater:

TABEL V

		<u>kcat</u>	<u>Km</u>	<u>kcat/Km</u>
	WT	50	$1,4 \times 10^{-4}$	$3,6 \times 10^5$
5	Deletionsmutant	8	$5,0 \times 10^{-6}$	$1,6 \times 10^6$

WT har en kcat, som er 6 gange større end deletionsmutanten, men substratbindingen er 28 gange tættere hos deletionsmutanten. Den totale effektivitet af deletionsmutanten er således 4,4 gange højere end WT-enzymet.

10

Alle disse ovenfor identificerede rester, som endnu skal substitueres, deleteres eller indsættes, er anført i tabel VI.

TABEL VI

15

Substitution/Indsættelse/Deletion

Reste

	His67	Ala152
20	Leu126	Ala153
	Leu135	Gly154
	Gly97	Asn155
	Asp99	Gly156
	Ser101	Gly157
25	Gly102	Gly160
	Glu103	Thr158
	Leu126	Ser159
	Gly127	Ser161
	Gly128	Ser162
30	Pro129	Ser163
	Tyr214	Thr164
	Gly215	Val165
	Gly166	Gly169
	Tyr167	Lys170
35	Pro168	Tyr171
		Pro172

Den følgende beskrivelse skal tjene som en fremvisning af udførelsesformer og skal ikke opfattes som en begrænsning af den

foreliggende ansøgnings omfang. Disse specifikke eksempler omhandler konstruktionen af visse af de ovenfor identificerede mutanter. Konstruktionen af de andre mutanter fremgår imidlertid af den foreliggende beskrivelse og af EP publikation nr. 5 0130756.

Alle litteraturcitatet indkorporeres udtrykkeligt heri ved denne henvisning.

EKSEMPEL 1

10

Identifikation af persyreoxiderbare rester af subtilisin-Q222 og -L222

15

Som vist i figurerne 6A og 6B inaktiverer organiske persyre-oxidationsmidler mutantsubtilisinerne Met222L og Met222Q (L222 og Q222). I dette eksempel beskrives identifikationen af persyreoxiderbare steder i disse mutantsubtilisiner.

20
25

Først bestemtes den type aminosyre, som er involveret i persyreoxidation. Bortset fra under drastiske betingelser (G.E. Means et al. (1971) Chemical Modifications of Proteins, Holden-Day, S.F., CA, side 160-162), modificerer organiske persyrer kun methionin og tryptophan i subtilisin. Differensspektre af enzymet over intervallet 250 nm til 350 nm blev bestemt under en inaktiveringstitrering ved anvendelse af reagenset diperdodecansyre (DPDA) som oxidationsmiddel. På trods af kvantitativ inaktivering af enzymet blev der ikke noteret nogen ændring i absorbansen over dette bølgelængdeinterval som vist i figurerne 7A og 7B, hvilket antyder, at tryptophan ikke blev oxideret, A. Fontana et al. (1980) Methods in Peptide and Protein Sequence Analysis (C. Birr ed.) Elsevier, New York, side 309. Fraværet af tryptophanmodifikation betyder, at der sker oxidation af en eller flere af de resterende methioniner i *B. amyloliquefaciens*-subtilisin, se fig. 1.

30

For at bekræfte dette resultat blev den rekombinerede subtilisin Met222F spaltet med cyanogenbromid (CNBr) både før og efter oxidation med DPDA. De peptider, som dannedes ved CNBr-spaltning, blev analyseret på SDS-pyridinpeptidgeler (SPG) med høj oplosningsevne.

- Subtilisin-Met222 (F222) blev oxideret på følgende måde. Oprenset F222 blev gensuspenderet i 0,1 M natriumborat pH-værdi 9,5 ved 10 mg/ml og blev tilsat til en slutkoncentration på 26 diperdodecansyre (DPDA) ved 26 mg/ml til fremkaldelse af en effektiv koncentration af aktivt oxygen på 30 ppm. Prøven blev inkuberet i mindst 30 minutter ved stuetemperatur og derefter tilsat 0,1 volumen 1 M Tris-puffer, pH-værdi 8,6, til dannelse af en slutkoncentration på 0,1 M Tris, pH-værdi 8,6. Der til-sattes 3 mM phenylmethyldisulfonylfluorid (PMSF), og 2,5 ml af prøven blev påført til en Pharmacia PD10-søjle, ækvilibreret i 10 mM natriumphosphat, pH-værdi 6,2, 1 mM PMSF. Der tilførtes 3,5 ml 10 mM natriumphosphat, pH-værdi 6,2, 1 mM PMSF, og elueringsmidlet opsamledes.
- F222 og DPDA-oxideret F222 blev udfældet med 9 volumener acetone ved -20°C. Prøverne blev gensuspenderet med 10 mg/ml i 8 M urinstof i 88% myresyre og fik lov til at henstå i 5 minutter. Der tilskaffedes samme volumen 200 mg/ml CNBr i 88% myresyre (5 mg/ml protein), og prøverne blev inkuberet i 2 timer ved stuetemperatur i mørke. Før geleleketroforese blev prøverne lyofiliseret og gensuspenderet med 2-5 mg/ml i prøvepuffer (1% pyridin, 5% NaDODSO₄, 5% glycerol og bromphenolblåt) og dissocierede ved 95°C i 3 minutter.
- Prøverne blev elektroforesebehandlet på diskontinuerte polyacrylamidgeler (J. Kyte et al. (1983) Anal. Bioch. 133, 515-522). Gelerne blev farvet under anvendelse af Pharmacias sølvfarvningsteknik (D.W. Sammons et al. (1981) Electrophoresis 2, 135-141).
- Resultaterne af dette eksperiment er vist i fig. 8. Som det kan ses giver F222, som er behandlet med CNBr, kun 9 opløste bånd på SPG. Når F222 imidlertid også behandles med DPDA før spaltning, forsvinder båndene X, 7 og 9, mens båndene 5 og 6 er stærkt forøgede i intensitet.
- For at bestemme, hvilke af methioninerne, som var påvirket, blev hver af CNBr-peptiderne isoleret ved HPLC med omvendt fase og yderligere karakteriseret. Puffersystemet i både

opløsningsmiddel A (vandigt) og opløsningsmiddel B (organisk) for alle HPLC-separationer var 0,05% triethylamin/trifluorediksyre (TEA-TFA). I alle tilfælde, med mindre andet er angivet, bestod opløsningsmiddel A af 0,05% TEA-TFA i H₂O, opløsningsmiddel B var 0,05% TEA-TFA i 1-propanol, og strømningshastigheden var 0,5 ml/minut.

Til HPLC-analyse anvendtes to injektioner af 1 mg enzymfordelsesmateriale. Tre prøver blev acetoneudfældet, vasket og tørret. De tørrede 1 mg prøver blev gensuspenderet ved 10 mg/ml i 8M urinstof, 88% myresyre, og der tilstættes samme volumen 200 mg/ml CNBr i 88% myresyre (5 mg/ml protein). Efter inkubation i 2 timer i mørke ved stuetemperatur blev prøverne afsaltet på en 0,8 cm x 7 cm søjle af grov Tris-acryl-GF05-harpiks (IBF, Paris, Frankrig) ækvilibreret med 40% opløsningsmiddel B og 60% opløsningsmiddel A. Der tilførtes 200 µl prøver ved en strømningshastighed på 1 ml per minut, og der opsamles 1,0-1,2 ml ved registrering af absorbansen ved 280 nm. Før injektion på HPLC blev hver afsaltet prøve fortyndet med 3 volumener opløsningsmiddel A. Prøverne blev injiceret med 1,0 ml/minut (2 minutter), og strømmingen blev derefter justeret til 0,5 ml/minut (100% A). Efter 2 minutters forløb påbegyndtes en lineær gradient til 60% B ved 1,0% B/minut. Fra hver 1 mg kørsel blev de opsamlede toppe udtaget til prøve (50 µl) og analyseret ved gelektroforese som beskrevet ovenfor.

Hvert polypeptid, som var isoleret ved HPLC med omvendt fase, blev yderligere analyseret for homogenitet ved SPG. Positionen af hvert peptid på den kendte gensekvens (J.A. Wells et al. (1983) Nucleic Acids Res. 11, 7911-7924) opnåedes gennem en kombination af aminosyresammensætningsanalyse og, hvor det var nødvendigt, sekvensbestemmelse af aminoenden.

Før en sådan analyse skulle de følgende peptider kromatograferes igen.

1. CNBr-peptider fra F222, der ikke var behandlet med DPDA:

Peptid 5 blev underkastet to yderligere adskillelser med omvendt fase. 10 cm C4-søjlen blev ækvilibreret til 80%A/20%B,

og den opsamlede prøve blev påført og vasket i 2 minutter. Derefter påbegyndtes en 0,5% ml B/minut-gradient. Fraktioner fra denne separation blev igen kørt, denne gang på 25 cm C4-søjlen og under anvendelse af 0,05% TEA-TFA i acetonitril/1-propanol (1:1) for oplosningsmiddel B. Gradienten var identisk med den netop beskrevne.

Peptid "X" blev underkastet en yderligere adskillelse efter den indledende kromatografi. Prøven blev påført og vasket i 2 minutter ved 0,5 ml/min (100%A), og en 0,5% ml B/min.-gradient blev påbegyndt.

Peptiderne 7 og 9 blev kromatograferet igen på tilsvarende måde som den første genkørsel af peptid 5.

15 Peptid 8 blev oprenset til homogenitet efter den indledende adskillelse.

2. CNBr-peptider fra DPDA-oxideret F222:

20 Peptiderne 5 og 6 fra en CNBr-fordøjelse af det oxiderede F222 blev oprenset på samme måde som peptid 5 fra det ubehandledes enzym.

25 Aminosyresammensætningsanalyse opnåedes som følger. Prøver (~1nM af hver aminosyre) blev tørret, hydrolyseret i vakuum med 100 μ l 6N HCl ved 106°C i 24 timer og derefter tørret i en Speed Vac. Prøverne blev analyseret på et Beckman 6300-amino-

syreanalyseapparat under anvendelse af ninhydrinpåvisning.

30 Aminoterminal sekvensdata opnåedes som beskrevet tidligere (H. Rodriguez et al. (1984) Anal. Biochem. 134, 538-547).

Resulaterne er vist i tabel VII og fig. 9.

TABEL VII

Amino- og COOH-ender af CNBr-fragmenter

Ende og metode

5

<u>Fraament</u>	<u>amino, metode</u>	<u>COOH, metode</u>
X	1, sekvens	50, sammensætning
9	51, sekvens	119, sammensætning
7	125, sekvens	199, sammensætning
10	8	
	200, sekvens	275, sammensætning
5ox	1, sekvens	119, sammensætning
6ox	120, sammensætning	199, sammensætning

10

Peptiderne 5ox og 6ox henviser til peptiderne 5 og 6, isoleret fra CNBr-fordøjelser af det oxiderede protein, hvor deres respektive mængder er forøget.

15

Fra dataene i tabel VII og sammenligningen af SPG-spor for fordøjelserne af det oxiderede og native protein i fig. 8, fremgår det, at (1) Met50 oxideres, hvilket fører til tab af peptiderne X og 9 og tilsynekomsten af 5, og at (2) Met124 også oxideres, hvilket fører til tabet af peptid 7 og akkumuleringen af peptid 6. Oxidation af B. amyloliquefaciens-subtilisin med persyren, diperdodecansyre, fører således til den specifikke oxidation af methionin i resterne 50 og 124.

20

25

EKSEMPEL 2

30

Substitution ved Met50 og Met124
i subtilisin Met2220

Valget af aminosyre til substitution ved Met50 blev baseret på de tilgængelige sekvensdata for subtilisiner fra B. licheniformis (E.C. Smith et al. (1968) J. Biol. Chem. 243, 2184-2191), B.DY (P. Nedkov et al. (1983) Hoppe Sayler's Z. Physiol. Chem. 364, 1537-1540), B. amylosacchariticus (F.S. Markland et al. (1967) J. Biol. Chem. 242, 5198-5211) og B. subtilis (M.L. Sthal et al (1984) J. Bacteriol. 158, 411-418). I

35

alle tilfælde er position 50 en phenylalanin, se fig. 5. Phe50 blev derfor valgt til konstruktionen.

I position 124 har alle kendte subtilisiner en methionin, se 5 fig. 5. Molekylmodellering af den røntgentaflede proteinstruktur var derfor nødvendig for at bestemme de mest sandsynlige emner til substitution. Af alle 19 emner valgtes isoleucin og leucin som de rester, som det var bedst at anvende. For 10 at teste, hvorvidt modifikation på det ene sted, men ikke begge steder, var tilstrækkeligt til at forøge den oxidative stabilitet, blev alle mulige kombinationer bygget på Q222-rygraden (F50/Q222, I124/Q222, F50/I124/Q222).

A. Konstruktion af mutationer

melle m codonerne 45 og 50

Alle manipulationer til cassettemutagenese blev udført på pS4.5 under anvendelse af metoder, som er beskrevet i EP publikation nr. 0130756 og J.A. Wells et al. (1985) Gene 34, 315-323. pΔ50-mutationerne i fig. 10, linie 4, blev fremkaldt 15 under anvendelse af den i fig. 10, linie 6 viste mutageneseprimer, og der anvendtes en måde at gå frem på, som betegnes restriktionsoprensning, hvilket er beskrevet nedenfor. Kort fortalt anvendtes en M13-skabelon indeholdende subtilisingenet, og M13mp11-SUBT anvendtes til heteroduplexsyntese (Adelman et al. (1983), DNA 2, 183-193). Efter transfektion af JM101 (ATCC nr. 33876) blev 1,5 kb EcoRI-BamHI-fragmentet indeholdende subtilisingenet underklonet fra M13mp11-SUBT-rf ind 20 i et modtagervektorfragment af pBS42, hvis konstruktion er beskrevet i EP publikation nr. 0130756. Til mutantsekvensberigelse (pΔ50, linie 4), blev den resulterende plasmidpulje fordøjet med KpnI, og lineære molekyler blev oprenset ved polyacrylamidgelektroforese. Lineære molekyler blev ligeret tilbage til en cirkulær form og transformerede ind i E. coli-MM294-cellere (ATCC nr. 31446). Isolerede plasmider blev screnet ved restriktionsanalyse for KpnI-stedet. KpnI⁺-plasmider 25 blev sekvensbestemt og bekræftede pΔ50-sekvensen. Stjerner i fig. 11 angiver de baser, som er muteret fra vildtypesekvensen (linie 4). pΔ50 (linie 4) blev skåret med SstI og EcoRI, og 30 35

0,5 kb fragmentet indeholdende 5'-halvdelen af subtilisingenet blev oprenset (fragment 1). pΔ50 (linie 4) blev fordøjet med KpnI og EcoRI, og 4,0 kb fragmentet indeholdende 3'-halvdelen af subtilisingenet og vektorsekvenser blev oprenset (fragment 5 2). Fragmenterne 1 og 2 (linie 5) og duplex-DNA-cassetter kodende for ønskede mutationer (skraveret sekvens, linie 6) blev blandet i et molært forhold på henholdsvis 1:1:10. Til den bestemte konstruktion i dette eksempel indeholdt DNA-cassetten tripletten TTT for codon 50, hvilket koder for Phe. Dette 10 plasmid blev betegnet pF50. Mutantsubtilisinen blev betegnet F50.

B. Konstruktion af mutation
mellem codonerne 122 og 127

15 Fremgangsmåden fra eksempel 2A blev fulgt i væsentlige detaljer, bortset fra at der anvendtes mutagenesepimeren fra fig. 11, linie 7, og at der anvendtes restriktionsoprensning for EcoRV-stedet i pΔ124. Desuden indeholdt DNA-cassetten (skravret sekvens, fig. 11, linie 6) tripletten ATT for codon 124, 20 hvilket koder for Ile, og CTT for Leu. De plasmider, som indeholdt substitutionen af Met124 med Ile, blev betegnet pI124. Mutantsubtilisinen blev betegnet I124.

C. Konstruktion af forskellige
multiple F50/I124/Q222-mutanter

30 Triplemutanten, F50/I124/Q222, blev konstrueret ud fra en trevejsligering, hvori hvert fragment indeholdt en af de tre mutationer. Enkeltmutanten Q222 (pQ222) blev fremstillet ved cassettemutagenese som beskrevet i EP publikation nr. 0130756. F50-mutationen var indeholdt på et 2,2 kb AvaII- til PvuII-fragment fra pF50, I124-mutationen var indeholdt på et 260 bp PvuII- til AvaII-fragment fra pI124, og Q222-mutationen var indeholdt på et 2,7 kb AvaII- til AvaII-fragment fra pQ222. De 35 tre fragmenter blev ligeret sammen og transformeret ind i E. coli-MM294celler. Restriktionsanalyse af plasmider fra isolerede transformanter bekræftede konstruktionen. For at analysere den endelige konstruktion var det bekvemt, at AvaII-stedet

i position 798 i vildtypesubtilisingenet blev fjernet af I124-konstruktionen.

5 F50/Q222- og I124/Q222-mutanterne blev konstrueret på tilsvarende måde, bortset fra at der anvendtes det behørige fragment fra pS4.5 til den endelige konstruktion.

D. Q222-mutanters oxidative stabilitet

10 De ovennævnte mutanter blev analyseret for stabilitet over for persyreoxidation. Som vist i fig. 12 er både I124/Q222 og F50/I124/Q222 fuldstændigt stabile efter inkubation med diperdodecansyre (protein 2 mg/ml, oxidationsmiddel 75 ppm[O]), mens F50/Q222 og Q222 inaktiveres. Dette viser, at omdannelse af Met124 til I124 i subtilisin Q222 er tilstrækkelig til at bringe modstandsdygtighed over for organiske persyreoxidationsmidler.

EKSEMPEL 3

20 Subtilisinmutanter med ændret substratspecificitet-hydrofobe substitutioner ved rest 166

25 Subtilisin indeholder en vidstrakt bindingskløft, som har hydrofob karakter. En bevaret glycin i rest 166 blev erstattet med 12 ikke-ioniske aminosyrer, hvis sidekæder kan rage ind i S-1-understedet. Disse mutanter blev konstrueret for at bestemme virkningen af ændringer i størrelse og hydrofobicitet på bindingen af forskellige substrater.

30 A. Kinetik for hydrolyse af substrater med ændrede P-1-aminoxyrer hos subtilisin fra B. amyloliquefaciens

35 Vildtypesubtilisin blev oprenset fra B. subtiliskultursuper-natanter, som udtrykte B. amyloliquefaciens-subtilisingenet (J.A. Wells et al. (1983) Nucleic Acids Res. 11, 7911-7925) som beskrevet tidligere (D.A. Estell et al. (1985) J. Biol. Chem. 260, 6518-6521). Detaljer af syntesen af tetrapeptid-

substrater med formen succinyl-L-AlaL-AlaL-ProL-[X]-P-nitroanilid (hvor X er P1-aminosyren) er beskrevet af E.G. DelMar et al. (1979) Anal. Biochem. 99, 316-320. Kinetikparametre, Km(M) og kcat(s⁻¹) blev målt under anvendelse af en modificeret forløbskurveanalyse (D.A. Estell et al. (1985) J. Biol. Chem. 260, 6518-6521). Kort fortalt passede afbildninger af hastighed mod produktkoncentration til den differentielle form af hastigheds ligningen under anvendelse af en ikke-lineær regressionsalgoritme. Fejl i kcat og Km for alle rapporterede værdier er mindre end 5%. De forskellige substrater i tabel VIII er anbragt i rækkefølge efter faldende hydrofobicitet. Y. Nozaki (1971), J. Biol. Chem. 246, 2211-2217, C. Tanford (1978) Science 200, 1012).

15

TABEL VIII

P1-substrat		kcat/Km	
<u>aminosyre</u>	<u>kcat(s⁻¹)</u>	<u>1/Km(M⁻¹)</u>	<u>(s⁻¹M⁻¹)</u>
Phe	50	7.100	360.000
Tyr	28	40.000	1.100.000
Leu	24	3.100	75.000
Met	13	9.400	120.000
His	7,9	1.600	13.000
Ala	1,9	5.500	11.000
Gly	0,003	8.300	21
Gln	3,2	2.200	7.100
Ser	2,8	1.500	4.200
Glu	0,54	32	16

30 kcat/Km-forholdet (som også omtales som katalytisk effektivitet) er den tilsyneladende anden ordens hastighedskonstant for omdannelsen af frit enzym plus substrat (E+S) til enzym plus produkter (E+P) (W.P. Jencks, Catalysis in Chemistry and Enzymology (McGraw-Hill, 1969) side 321-436; A. Fersht, Enzyme Structure and Mechanism (Freeman, San Francisco, 1977) side 226-287). Log (kcat/Km) er proportional med overgangstilstandsbindingsenergien, $\Delta G_{T\ddagger}$. En afbildung af log kcat/Km mod hydrofobiciteten af P1-sidekæden (fig. 14) viser en sterk kor-

relation ($r = 0,98$) bortset fra glycinsubstratet, som viser tegn på ikke-produktiv binding. Disse data viser, at relative forskelle mellem overgangstilstandsbindingsenergier kan forklares ved forskelle i P-1-sidekædehydrofobicitet. Når overgangstilstandsbindingsenergierne beregnes for disse substrater og afbordes mod deres respektive sidekædehydrofobiciteter, er liniens hældning 1,2 (ikke vist). En hældning på mere end en, hvilket også gælder for chymotrypsin (A. Fersht, Enzyme Structure and Mechanism (Freeman, San Francisco, 1977) side 5 226-287; J.V. Harper et al. (1984) Biochemistry, 23, 2995-10 3002), antyder, at P1-bindingskløften er mere hydrofob end ethanol- eller dioxanopløsningsmidler, som anvendtes til empirisk at bestemme aminosyrers hydrofobicitet (Y. Nozaki et al. J. Biol. Chem. (1971) 246, 2211-2217 og C. Tanford (1978) 15 Science 200, 1012).

For amidhydrolyse med subtilisin kan kcat fortolkes som acyleringshastighedskonstanten og Km som dissociationskonstanten for Michaelis-komplekset (E-S), Ks. H. Gut freund et al (1956) 20 Biochem. J. 63, 656. Den kendsgerning, at log kcat samt log 1/Km korrelerer med substrathydrofobicitet, er i overensstemmelse med forslag (J.D. Robertus et al. (1972) Biochemistry 11, 2439-2449, J.D. Robertus et al. (1972) Biochemistry 11, 4293-4303), at under acyleringstrinnet bevæger P-1-sidekæden 25 sig dybere ind i den hydrofobe kløft, når substratets skrider frem fra Michaelis-komplekset (E-S) til det tetraedriske overgangstilstandskompleks (E-S \ddagger). Disse data kan imidlertid også fortolkes som, at hydrofobicitetten af P1-sidekæden påvirker orienteringen og dermed den spaltelige peptidbindings tilbøjelighed til nukleofilt angreb af hydroxylgruppen i den katalytiske Ser221.

Afhængigheden af kcat/Km på P-1-sidekædehydrofobicitet antydede, at kcat/Km for hydrofobe substrater kan forøges ved at 35 forøge hydrofobicitetten af S-1-bindings-understedet. For at teste denne hypotese fremstilledes hydrofobe aminosyresubstitutioner af Gly166.

Eftersom alifatiske sidekæders hydrofobicitet er direkte proportional med sidekædeoverfladeareal (G.D. Rose et al. (1985)

Science 229, 834-838, J.A. Reynolds et al. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 2825-2927) kan en forøgelse af hydrofobiciteten i S-1-understedet også sterisk hindre binding af større substrater. På grund af vanskeligheder ved at forudsige den relative vigtighed af disse to modsatrettede virkninger, valgte man at fremkalde 12 ikke-ladede mutationer i position 166 for at bestemme de resulterende specifiteter mod ikke-ladede substrater med forskellig størrelse og hydrofobicitet.

10 B. Cassettemutagenese af
P-1-bindingskløften

Fremstillingen af mutantsubtilisiner indeholdende substitutionen af de hydrofobe aminosyrer Ala, Val og Phe i rest 166 er blevet beskrevet i EP publikation nr. 0130756. Den samme metode anvendtes til at fremstille de resterende hydrofobe mutanter ved rest 166. Ved anvendelse af denne metode indførtes to unikke og stille restriktionssteder i subtilisingenerne for at flankere målcodonen 166 tæt. Som det ses af fig. 13 blev vildtypesekvensen (linie 1) ændret ved stedsrettet mutagenese i M13 under anvendelse af den angivne 37mer mutagenesepimer til indførelse af en 13 bp deletion (stiptet linie) og unikke SacI- og XmaI-steder (understregede sekvenser), som flankerer codon 166 tæt. Subtilisingenfragmentet blev underklonet tilbage i E. coli-B. subtilis-pendulplasmidet, pBS42, til opnåelse af plasmidet pΔ166 (fig. 13, linie 2). pΔ166 blev skæret åben med SacI og XmaI, og der oprensesedes lineære molekyler med hul (fig. 13, linie 3). Puljer af syntetiske oligonukleotider indeholdende den pågældende mutation blev sammenføjet til opnåelse af duplex-DNA-cassetter, som blev ligeret ind i pΔ166 med hul (understregede og overstregede sekvenser i fig. 13, linie 4). Denne konstruktion genetablerede kodningssekvensen bortset fra over position 166 (NNN, linie 4). Mutantsekvenser blev bekræftet ved dideoxysekvensbestemmelse. Stjerner angiver sekvensændringer i forhold til vildtypesekvensen. Plasmider, som hver indeholdt mutant B. amyloliquefaciens-subtilisingen, blev udtrykt i groft taget økvivalente niveauer i en proteaseutilstrækkelig stamme af B. subtilis, BG2036 som beskrevet tidli-

gere. EP publikation nr. 0130756, M. Yang et al. (1984) J. Bacteriol. 160, 15-21 og D.A. Estell et al (1985) J. Biol. Chem. 260 (6518-6521).

5 C. Indsnævring af substratspecificitet
ved sterisk hindring

For at undersøge den ændring i substratsspecificitet, der forårsages af steriske ændringer i S-1-understedet, blev position 166-mutanter kinetisk analyseret mod P1-substrater med stigende størrelse (dvs. Ala, Met, Phe og Tyr). Forholdet k_{cat}/K_m vistes i log-form i fig. 15 for at muliggøre direkte sammenligninger af overgangstilstandsbindingsenergier mellem forskellige enzymsubstratpar.

15 Ifølge overgangstilstandsteorien kan ændringen i fri energi mellem det frie enzym + substrat ($E+S$) og overgangstilstandskomplekset ($E+S\ddagger$) beregnes ud fra ligning (1),

$$(1) \quad \Delta G_{T\ddagger} = -RT \ln k_{cat}/K_m + RT \ln kT/h$$

20 hvor k_{cat} er omsætningsstallet. K_m er Michaelis-konstanten, R er gaskonstanten, T er temperaturen, k er Boltzmann's konstant, og h er Planck's konstant. Specificitetsforskelle udtrykkes kvantitativt som forskelle mellem overgangstilstandsbindingsenergier (dvs. $\Delta\Delta G_{T\ddagger}$) og kan beregnes ud fra ligning (2).

$$(2) \quad \Delta\Delta G_{T\ddagger} = -RT \ln (k_{cat}/K_m)_A/(k_{cat}/K_m)_B$$

30 A og B angiver enten to forskellige substrater, der analyseres mod det samme enzym, eller to mutantenzym, som analyseres mod det samme substrat.

Som det fremgår af fig. 15A, skifter substratpræferencen fra store til små P-1-sidekæder, når størrelsen af sidekæden i position 166 forøges. En forøgelse af sidekæden i position 166 forårsager, at k_{cat}/K_m falder i forhold til størrelsen af P-1-substratsidekæden (f.eks. fra Gly166 (vildtype) til W166 falder k_{cat}/K_m for Tyr-substratet mest efterfulgt i rækkefølge af Phe-, Met- og Ala-P-1-substrater).

Specifikke steriske ændringer i sidekæden i position 166, såsom tilstedevarelsen af en β -hydroxylgruppe eller β - eller γ -alifatisk forgrening, forårsager store formindskelser i kcat/Km for større P-1-substrater. Indførelse af en β -hydroxylgruppe ved at gå fra A166 (fig. 15A) til S166 (fig. 15B) forårsager henholdsvis en 8 ganges og 4 ganges reduktion i kcat/Km for henholdsvis Phe- og Tyr-substrater, mens værdierne for Ala- og Met-substraterne er uændrede. Ved dannelsen af en β -forgrenet struktur og ved at gå fra S166 til T166 opnås et 5 fald på henholdsvis 14 og 4 gange i kcat/Km for henholdsvis Phe og Tyr. Disse forskelle forstørres lidt for V166, som er lidt større og isosterisk med T166. Ved at forstørre de β -forgrenede substituenter fra V166 til I166 forårsages en formindskelse af kcat/Km på mellem 2 og 6 gange mod Met-, Phe- og 10 Tyr-substrater. Ved indsættelse af en γ -forgrenet struktur ved erstattning af M166 (fig. 15A) med L166 (fig. 15B) fremkaldes henholdsvis en 5 ganges og en 18 ganges formindskelse i kcat/Km for Phe- og Tyr-substrater. Alifatisk γ -forgrening ser ud til at inducere mindre sterisk hindring mod Phe-P-1-substratet 15 end β -forgrening, hvilket ses af den 100-ganges formindskelse i kcat/Km for Phe-substratet ved at gå fra L166 til I166.

Reduktioner i kcat/Km som et resultat af forægeler i sidekædestørrelse i S-1-understedet, eller specifikke strukturelle træk, såsom β - og γ -forgrening, illustreres kvantitativt i 25 fig. 16. kcat/Km-værdierne for mutanterne i position 166, bestemt for Ala-, Met-, Phe- og Tyr-P-1-substraterne (fra det øverste felt til det nederste felt) er afbilledet mod sidekædevolumerne i position 166 (C. Chothia (1984) Ann. Rev. Biochem. 53, 537-572). Katalytisk effektivitet for Ala-substratet når 30 et maksimum for I166, og for Met-substratet, når den et maksimum mellem V166 og L166. Phe-substratet viser en bred kcat/Km-top, men er optimal med A166. Her danner de β -forgrenede substitutioner i position 166 en linie, som er parallel med, men groft taget 50 gange lavere i kcat/Km end sidekæder med tilsvarende størrelse [dvs. C166 mod T166, L166 mod I166]. Tyr-substratet anvendes mest effektivt af vildtypeenzym (Gly166), 35 og der er en stadig formindskelse, når man går frem mod store

sidekæder i position 166. De β -forgrenede og γ -forgrenede substitutioner danner en parallel linie under de andre ikke-ladede substitutioner med tilsvarende molekylvolumen.

- 5 Den optimale substitution i position 166 falder i volumen med
stigende volumen af P-1-substratet (dvs. I166/Ala-substrat,
L166/Met-substrat, A166/Phe-substrat, Gly166/Tyr-substrat). De
kombinerede volumener for disse optimale par kan nærme sig vo-
lumenet for produktiv binding i S-1-understedet. For de opti-
male par, Gly166/Tyr-substrat, A166/Phe-substrat, L166/Met-
substrat, V166/Met-substrat og I166/Ala-substrat er de kombi-
nerede volumener henholdsvis 266, 295, 313, 339 og 261 A^3 . Ved
10 at trække volumenet af peptidrygraden fra hvert par (dvs. to
gange volumenet af glycine) kan der beregnes et gennemsnitligt
nære sig volumenet for produktiv binding.
15 sidekædevolumen på $160 \pm 32 \text{A}^3$

Virkningen af volumen, udover det produktive bindingsvolumen,
på tabet i overgangsbindingsenergi, kan vurderes ud fra Tyr-
substratkurven (nederste felt, fig. 16), fordi disse data samt
20 modelleringsundersøgelser (fig. 2) antyder, at enhver substi-
tution udover glycine forårsager sterisk frastødning. Den bed-
ste linie, der kan trækkes mellem alle dataene ($r=0,87$) giver
en hældning, som angiver et tab på groft taget 3 kcal/mol i
overgangstilstandsbindingsenergi per 100 A^3 overskydende vo-
lumen (100 A^3 er ca. størrelsen af en leucylsidekæde).
25

D. Forøget katalytisk effektivitet
korrelerer med stigende hydrofobicitet
hos substitutionen i position 166

- 30 Der forekommer væsentlige forøgelser i k_{cat}/K_m med forstørrel-
se af sidekæden i position 166, bortset fra for Tyr-P-1-sub-
stratet (fig. 16). F.eks. stiger k_{cat}/K_m ved at gå fra Gly166
til I166 for Ala-substratet (netto 10 gange), fra Gly166 til
L166 for Met-substratet (netto 10 gange) og fra Gly166 til
35 A166 for Phe-substratet (netto 2 gange). Forøgelserne i $k_{cat}/$
 K_m kan ikke fuldstændigt forklares ved tiltrækningsudtrykkene
i van der Waals potentielle energi-funktion på grund af deres
stærke afstandsafhængighed ($1/r^6$) og på grund af disse til-

trækningskræfters svage natur (W.P. Jencks, *Catalysis in Chemistry and Enzymology* (McGraw-Hill, 1969) side 321-436, A. Fersht, *Enzyme Structure and Mechanism* (Freeman, San Francisco 1977) side 226-287, M. Levitt (1976) *J. Mol. Biol.* 104, 5 59-107). F.eks. har Levitt (M. Levitt (1976) *J. Mol. Biol.* 104, 59-107) beregnet, at van der Waals-tiltrækningen mellem to methionylrester ville give en maksimal vekselvirkningsenergi på groft taget -0,2 kcal/mol. Denne energi ville blive oversat til kun 1,4 ganges forøgelse i kcat/Km.

10 De forøgelser i katalytisk effektivitet, som forårsages af sidekædesubstitutioner i position 166, forklares bedre ved forøgelser i hydrofobiciteten hos S-1-understedet. Forøgelsen i 15 kcat/Km, der ses for Ala- og Met-substraterne med stigende sidekædestørrelse i position 166, ville blive forventet, fordi hydrofobicitet groft taget er proportionalt med sidekædeoverfladeareal (G.D. Rose et al. (1985) *Science* 229, 834-838, J.A. Reynolds et al. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 2825-2927).

20 Et andet eksempel, som kan fortolkes som en hydrofob virkning, 25 ses, når man sammenligner kcat/Km for isosteriske substitutio- nes, som adskiller sig i hydrofobicitet, såsom S166 og C166 (fig. 16). Cystein er betragteligt mere hydrofob end serin (-1,0 mod +0,3 kcal/mol) (Y. Nozaki et al. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 2211-2217; C. Tanford (1978) *Science* 200, 1012). Forskellen i hydrofobicitet korrelerer med den observation, at C166 bliver mere effektiv i forhold til Ser166, når substraternes hydrofobicitet forøges (dvs. Ala < Met < Tyr < Phe). Sterisk hindring kan ikke forklare disse forskelle, fordi se- 30 rin er betragteligt mindre end cystein (99 mod 118A³), I.C. Paul, *Chemistry of the -SH Group* (ed. S. Patai, Wiley Inter- science, New York, 1974) side 111-149.

E. Fremstilling af en elastaselignende
35 specificitet i subtilisin

I166-mutationen illustrerer særligt godt, at der kan fremkal- des store ændringer i specificitet ved at ændre strukturen og

hydrofobiciteten af S-1-understedet ved hjælp af en enkelt mutation (fig. 17). Ved at gå gennem de små hydrofobe substrater sker der en maksimal specificitetsforbedring i forhold til vildtypen for Val-substratet (16 gange i kcat/Km). Når substratsidekædestørrelsen forøges falder disse forbedringer til næsten en (dvs. Leu- og His-substrater). I166-enzymet bliver dårligere mod større aromatiske substrater med stigende størrelse (f.eks. er I166 over 1000 gange dårlige mod Tyr-substratet end Gly166 er). Man fortolker denne forøgelse i katalytisk effektivitet over for de små hydrofobe substrater for I166 sammenlignet med Gly166 som den større hydrofobicitet hos isoleucin (dvs. -1,8 kcal/mol mod 0), Y. Nozaki et al. (1971) J. Biol. Chem. 246, 2211-2217, C. Tanford (1978) Science 200, 2012. Formindskelsen i katalytisk effektivitet over for de meget store substrater for I166 mod Gly166 tilskrives sterisk frastødning.

Specificitetsforskellene mellem Gly166 og I166 svarer til specificitetsforskellene mellem chymotrypsin og den evolutionære slægtning elastase (J.W. Harbor et al. (1984) Biochemistry 23, 2995-3002). I elastase blokerer de fyldige aminosyrer Thr og Val adgang til P-1-bindingsstedet for store, hydrofobe substrater, som foretrækkes af chymotrypsin. Desuden er de katalytiske effektiviteter mod små hydrofobe substrater større for elastase end for chymotrypsin, således som det observeres for I166 mod Gly166 i subtilisin.

EKSEMPEL 4

Substitution af Gly166 med ioniske aminosyrer

Konstruktionen af subtilisinmutanter indeholdende substitutionen med de ioniske aminosyrer Asp, Asn, Gln, Lys og Arg er beskrevet i EP publikation nr. 0130756. Det foreliggende eksempel beskriver konstruktionen af mutantsubtilisinen indeholdende Glu i position 166 (E166) og viser substratspecificitsdata for disse mutanter. Yderligere data for enkelte og dobbelte mutanter i position 166 og 156 er vist nedenfor.

- pΔ166, beskrevet i eksempel 3, blev fordøjet med SacI og XmaI. Den dobbeltstrengede DNA-cassette (understreget og overstreget) i linie 4 i fig. 13 indeholdt tripletten GAA for codonen 166 for at kode for erstatningen af Gly166 med Glu. Dette mu-
 5 tantplasmid, der betegnes pQ166, blev opformeret i BG2036 som beskrevet. Denne mutantsubtilisin blev, sammen med de andre mutanter indeholdende ioniske substitutentaminosyrer i rest 166, isoleret som beskrevet og yderligere analyseret for va-
 riationer i substratspecificitet.
- 10 Hver af disse mutanter blev analyseret med tetrapeptidsubstraterne, succinyl-L-AlaL-AlaProL-X-p-nitroanilid, hvor X var Phe, Ala og Glu.

15 Resultaterne af denne analyse er vist i tabel IX.

TABEL IX

	<u>Position 166</u>	<u>P-1-substrat</u> (kcat/Km × 10 ⁻⁴)		
		<u>Phe</u>	<u>Ala</u>	<u>Glu</u>
20	Gly (vildtype)	36,0	1,4	0,002
	Asp (D)	0,5	0,4	<0,001
	Glu (E)	3,5	0,4	<0,001
	Asn (N)	18,0	1,2	0,004
25	Gln (Q)	57,0	2,6	0,002
	Lys (K)	52,0	2,8	1,2
	Arg (R)	42,0	5,0	0,08

Disse resultater viser, at substitutioner med ladede aminosy-
 30 rer ved Gly166 har forbedrede katalytiske effektiviteter (kcat/Km) for modsat ladede P-1-substrater (så meget som 500 gange) og dårligere katalytisk effektivitet for P-1-substrater med samme ladning.

EKSEMPEL 5Substitution af glycin i position 169

- 5 Substitutionen af Gly169 i *B. amyloliquefaciens*-subtilisin med Ala og Ser er beskrevet i EP publikation nr. 0130756. Den samme metode anvendtes til at fremstille de resterende 17 mutanter indeholdende alle andre substituentaminosyrer for position 169.
- 10 Konstruktionsprotokollen er opsummeret i fig. 18. De anvendte overstregede og understregede dobbeltstrengede DNA-cassetter indeholdt følgende triplet, som koder for substitutionen af den angivne aminosyre ved rest 169.

15	GCT	A	ATG	M
	TGT	C	AAC	N
	GAT	D	CCT	P
	GAA	E	CAA	Q
	TTC	F	AGA	R
20	GGC	G	AGC	S
	CAC	H	ACA	T
	ATC	I	GTT	V
	AAA	K	TGG	W
	CTT	L	TAC	Y

- 25 Hvert af plasmiderne indeholdende en substitueret Gly169 blev betegnet pX169, hvor X betegner substituentaminosyren. Mutantsubtilisinerne blev betegnet tilsvarende.
- 30 To af de ovennævnte mutantsubtilisiner, A169 og S169 blev analyseret for substratspecificitet mod syntetiske substrater indeholdende Phe, Leu, Ala og Arg i P-1-positionen. De følgende resultater er vist i tabel X.

TABEL X

Virkning af serin- og alaninmutationer
i position 169 på P-1-substratspecificitet

		<u>P-1-substrat (kcat/Km x 10⁻⁴)</u>			
<u>Position 169</u>		<u>Phe</u>	<u>Leu</u>	<u>Ala</u>	<u>Arg</u>
	Gly (vildtype)	40	10	1	0,4
	A169	120	20	1	0,9
10	S169	50	10	1	0,6

Disse resultater viser, at substitutioner af Ala og Ser ved Gly169 har bemærkelsesværdigt tilsvarende katalytiske effektiviteter mod en række P-1-substrater sammenlignet med deres modparte i position 166. Dette skyldes sandsynligvis, at position 169 er i bunden af P-1-specificitetsunderstedet.

EKSEMPEL 6Substitution ved position 104

20 Tyr104 er blevet substitueret med Ala, His, Leu, Met og Ser. Den anvendte metode var en modifikation af den stedrettede mutagenesemetode. Ifølge protokollen fra fig. 19 indførte en primer (skraveret i linie 4) et unikt HindIII-sted og en rammeskiftsmutation ved codon 104. Restriktionsoprensning for det unikke HindIII-sted lettede isoleringen af mutantsekvensen (linie 4). Restriktionsudvælgelse mod dette HindIII-sted under anvendelse af primere i linie 5 anvendtes til opnåelse af position 104-mutanter.

30 Følgende triplerter anvendtes i primerne fra fig. 19, linie 5 for 104-codonen, som substituerede de følgende aminosyrer.

	GCT	A	TTC	F
	ATG	M	CCT	P
35	CTT	L	ACA	T
	AGC	S	TGG	W
	CAC	H	TAC	Y
	CAA	Q	GTT	V

GAA	E	AGA	R
GGC	G	AAC	N
ATC	I	GAT	D
AAA	K	TGT	C

5

Substraterne i tabel XI anvendtes til at analysere disse mutanters substratspecificitet. De for H104-subtilisin opnæde resultater er vist i tabel XI.

10

TABEL XI

<u>Substrat</u>	<u>kcat</u>		<u>Km</u>		<u>Kcat/Km</u>	
	<u>WT</u>	<u>H104</u>	<u>WT</u>	<u>H104</u>	<u>WT</u>	<u>H104</u>
sAAPFpNA	50,0	22,0	$1,4 \times 10^{-4}$	$7,1 \times 10^{-4}$	$3,6 \times 10^5$	$3,1 \times 10^4$
15 sAAPApNA	3,2	2,0	$2,3 \times 10^{-4}$	$1,9 \times 10^{-3}$	$1,4 \times 10^4$	1×10^3
sFAPFpNA	26,0	38,0	$1,8 \times 10^{-4}$	$4,1 \times 10^{-4}$	$1,5 \times 10^5$	$9,1 \times 10^4$
sFAPApNA	0,32	2,4	$7,3 \times 10^{-5}$	$1,5 \times 10^{-4}$	$4,4 \times 10^3$	$1,6 \times 10^4$

Fra disse data er det klart, at erstatningen af Tyr med His i position 104 giver et enzym, som er mere effektivt (højere kcat/Km), når Phe er i P-4-substratpositionen, end når Ala er i P-4-substratpositionen.

EKSEMPEL 7

25

Substitution af Ala152

Ala152 er blevet substitueret med Gly og Ser for at bestemme virkningen af sådanne substitutioner på substratspecificitet.

Vildtype-DNA-sekvensen blev muteret med V152/P153-primeren (fig. 20, linie 4) under anvendelse af den ovenstående restriktionsoprensningssmetode for det nye KpnI-sted. Andre mutantprimerer (skraverede sekvenser i fig. 20, S152, linie 5 og G152, linie 6) muterede det nye KpnI-sted bort, og sådanne mutantter blev isoleret under anvendelse af restriktionsudvælgelsesprocedure som beskrevet ovenfor som tab af KpnI-stedet.

Resultatet af disse substitutioner for de ovenstående syntetiske substrater indeholdende P-1-aminoacyrerne, Phe, Leu og Ala, er vist i tabel XII.

TABEL XII

5	<u>Position 152</u>	<u>P-1-substraterne</u> (kcat/Km $\times 10^{-4}$)		
		<u>Phe</u>	<u>Leu</u>	<u>Ala</u>
	Gly (G)	0,2	0,4	<0,04
	Ala (vildtype)	40,0	10,0	1,0
	Ser (S)	1,0	0,5	0,2

10 Disse resultater viser, at, i modsætning til positionerne 166 og 169, forårsager erstatning af Ala152 med Ser eller Gly en dramatisk reduktion i katalytisk effektivitet over for alle undersøgte substrater. Dette antyder, at Ala152, i toppen af S-1-understedet, kan være den optimale aminosyre, fordi Ser og
15 Gly er homologe Ala-substitutter.

EKSEMPEL 8Substitution i position 156

20 Mutanter indeholdende substitutionen af Glu156 med Ser og Gln er blevet konstrueret i overensstemmelse med den i fig. 21 afbildede helhedsmetode. Denne metode blev opbygget for at lette konstruktionen af multiple mutanter i position 156 og 166 som beskrevet i det følgende. Ved imidlertid at regenerere vildtype-Gly166 opnåedes enkeltmutationer ved Glu156.
25

Plasmidet pΔ166 er allerede afbilledet i linie 2 i fig. 13. De syntetiske oligonukleotider for oven til højre i fig. 21 angiver de samme DNA-cassetter, som afbilledet i linie 4 i fig. 13. Plasmidet p166 i fig. 21 repræsenterer således mutantplasmidene fra eksemplerne 3 og 4. I dette bestemte eksempel indeholder p166 vildtype-Gly166.
30

Konstruktion af enkeltmutanter i position 156 blev fremstillet ved at ligere de tre fragmenter (1-3), som er angivet forneden i fig. 21. Fragment 3, indeholdende den carboxyterminale del af subtilisingenet inklusive vildtype-position 166-codonen, isoleredes som 610 bp SacI-BamHI-fragment. Fragment 1 inde-

holdt vektorsekvenserne samt de aminoterminal sekvenser af subtilisingenet til codon 151. Til fremstilling af fragment 1 indførtes et unikt KpnI-sted ved codon 152 i vildtypesubtilisinksekvensen fra pS4.5. Ved stedrettet mutagenese i M13 anvendtes en primer med sekvensen 5'-TA-GTC-GTT-GCG-GTA-CCC-GGT-AAC-GAA-3' til dannelsel af mutationen. Berigelse for mutantsekvensen opnåedes ved restriktion med KpnI, oprensning og selvligering. Mutantsekvensen indeholdende KpnI-stedet blev bekræftet ved direkte plasmidsekvensbestemmelse til opnåelse af pV152. pV152 (~1 µg) blev fordøjet med KpnI og behandlet med to enheder DNA-polymerase I-fragment (Klenow-fragment fra Boehringer Mannheim) plus 50 µM deoxynukleotidtriphosphater ved 37°C i 30 minutter. Dette fremkaldte en stump ende, som endte med codon 151. DNA'en blev ekstraheret med 1:1-volumener phenol og CHCl₃, og DNA i den vandige fase blev udfældet ved tilsætning af 0,1 volumen 5M ammoniumacetat og to volumener ethanol. Efter centrifugering og vask af DNA-pellet med 70% ethanol blev DNA'en lyofiliseret. DNA blev fordøjet med BamHI, og 4,6 kb stykket (fragment 1) blev oprenset ved acrylamidgel-elektroforese efterfulgt af elektroeluering. Fragment 2 var en syntetisk duplex-DNA-cassette, som, når den blev ligeret med fragmenterne 1 og 3, genetablerede kodningssekvensen korrekt, bortset fra ved codon 156. Den øverste streng blev syntetiseret til at indeholde en glutamincodon, og den komplementære nederste streng kodede for serin ved 156. Ligering af heterophosphylerede cassetter fører til en stor og favorabel præference for den phosphorylerede i forhold til den ikke-phosphorylerede oligonukleotidsekvens i det endelige segregerede plasmidprodukt. For at opnå Q166 blev den øverste streng derfor phosphoryleret og sammenføjet med den ikke-phosphorylerede nederste streng før ligering. Tilsvarende blev den nederste streng phosphoryleret og sammenføjet med den ikke-phosphorylerede øverste streng til opnåelse af S156. Mutantsekvenser isoleredes efter ligering og transformation og bekræftet ved restrikionsanalyse og DNA-sekvensbestemmelse som tidligere. Til ekspression af variantsubtilisiner blev plasmider transformeredt ind i en subtilisinneutral proteasedeletionsmutant af B. subtilis, BG2036, som beskrevet tidligere. Der dyrkedes kultu-

rer i rystekolber i 24 timer ved 37°C i LB-medier indeholdende 12,5 mg/ml chloramphenicol, og subtilisin opnåedes fra kultursupernatanter som beskrevet. Subtilisinrenheden var større end 95%, bedømt ved SDS-PAGE.

5

Disse mutantplasmider, betegnet pS156 og pQ156, og mutantsubtilisiner betegnet S156 og Q156 blev analyseret med de ovenstående syntetiske substrater, hvor P-1 omfattede aminosyrerne Glu, Gln, Met og Lys. Resultaterne af denne analyse er vist i eksempel 9.

10

EKSEMPEL 9

Multiple mutanter med ændret substratspecificitet - substitution i positionerne 156 og 166

15

Enkeltsubstitutioner af position 166 er beskrevet i eksemplerne 3 og 4. I eksempel 8 beskrives enkeltmutationer i position 156 samt protokollen fra fig. 21, hvorved forskellige dobbeltmutanter omfattende substitutionen af forskellige aminosyrer i positionerne 156 og 166 kan fremstilles. I dette eksempel beskrives konstruktionen og substratspecificiteten hos subtilisin indeholdende substitutioner i position 156 og 166 og opsummerer nogle af dataene for enkelt- og dobbeltmutanter i positionerne 156 og 166 med forskellige substrater.

20

25

K166 er en almindelig erstatningsaminosyre i de heri beskrevne 156/166-mutanter. Erstatningen af Gly166 med Lys opnåedes ved anvendelse af den syntetiske DNA-cassette for oven til højre i fig. 21, som indeholdt tripletten AAA i stedet for NNN. Dette gav fragment 2, idet Lys erstattede Gly166.

30

156-substituenterne var Gln og Ser. Gln- og Ser-substitutionerne ved Gly156 er indeholdt i fragment 3 (forneden til højre i fig. 21).

35

De multiple mutanter blev fremstillet ved at kombinere fragmenterne 1, 2 og 3, som beskrevet i eksempel 8. Mutanterne Q156/K166 og S156/K166 blev dannet selektivt ved differentiel phosphorylering som beskrevet. Alternativt fremstillede de

dobbelt 156/166-mutanter, sammenlign Q156/K166 og S156/K166 ved ligering af 4,6 kb SacI-BamHI-fragmentet fra det relevante p166 plasmid indeholdende 0,6 kb SacI-BamHI-fragmentet fra det relevante p166-plasmid.

5

Disse mutanter, den enkelte mutant K166 og S156- og Q156-mutanterne fra eksempel 8, analyseredes for substitutspecifitet mod syntetiske polypeptider indeholdende Phe eller Glu som P-1-substratresten. Resultaterne er vist i tabel XIII.

10

15

20

25

30

35

TABEL XIII

Enzymer, der blev sammelignet (b)	Substrat	kcat/Km (mutant)	
		kcat	Km
K166	Phe	50,00	1,4x10 ⁻⁴
	Glu	0,54	3,4x10 ⁻²
	Phe	20,00	4,0x10 ⁻⁵
	Glu	0,70	5,6x10 ⁻⁵
Q156/K166	Phe	30,00	1,9x10 ⁻⁵
	Glu	1,60	3,1x10 ⁻⁵
	Phe	30,00	1,8x10 ⁻⁵
	Glu	0,60	3,9x10 ⁻⁵
S156/K166	Phe	34,00	4,7x10 ⁻⁵
	Glu	0,40	1,8x10 ⁻³
	Phe	48,00	4,5x10 ⁻⁵
	Glu	0,90	3,3x10 ⁻³
E156	Phe	48,00	1,1x10 ⁶
	Glu	0,90	2,7x10 ²
	Phe	48,00	3,1
	Glu	0,90	17

Som det kan ses i tabel XIV forbedrer hver af disse enkelte mutationer enzymydeevnen på substrater med glutamat ved P-1-enzymbindingsstedet. Når disse enkelte mutationer blev kombineret, er de resulterende multiple enzymmutanter bedre end 5 hver af mødrene. Disse enkelte eller multiple mutationer ændrer også enzymernes relative pH-aktivitetsprofiler, som vist i fig. 23.

For at isolere det elektrostatiske bidrag til substratspecifitet fra andre kemiske bindingskræfter blev disse forskellige 10 enkelte og dobbelte mutanter analyseret for deres evne til at binde og spalte syntetiske substrater indeholdende Glu, Gln, Met og Lys som P-1-substrataminosyren. Dette muliggjorde sammenligninger mellem sidekæder, som var mere sterisk ensartede, men som adskilte sig i ladning (f.eks. Glu mod Gln, Lys mod 15 Met). Tilsvarende analyseredes mutantenzymet mod homologe P-1-substrater, som sterisk svarede mest til hinanden, men adskilte sig i ladning (tabel XIV).

20

25

30

35

TABEL XIV
Kinetik hos position 156/166-subtilisiner
bestemt for forskellige P1-substrater

Enzym-position (a)	Netto-ladning (b)	P-1-substrat log kcat/Km (log 1/Km) (c)		
		Glu	Gln	Met
156 166				
Glu Asp	-2	i.b.	3,02 (2,56)	3,93 (2,74)
Glu Glu	-2	i.b.	3,06 (2,91)	3,86 (3,28)
Glu Asn	-1	1,62 (2,22)	3,85 (3,14)	4,99 (3,85)
Glu Gln	-1	1,20 (2,12)	4,36 (3,64)	5,43 (4,36)
Gln Asp	-1	1,30 (1,79)	3,40 (3,08)	4,94 (3,87)
Ser Asp	-1	1,23 (2,13)	3,41 (3,09)	4,67 (3,68)
Glu Met	-1	1,20 (2,30)	3,89 (3,19)	5,64 (4,83)
Glu Ala	-1	i.b.	4,34 (3,55)	5,65 (4,46)
Glu GLY (wt)	-1	1,20 (1,47)	3,85 (3,35)	5,07 (3,97)
Gln Gly	0	2,42 (2,48)	4,53 (3,81)	5,77 (4,61)
Ser Gly	0	2,31 (2,73)	4,09 (3,68)	5,61 (4,55)
Gln Asn	0	2,04 (2,72)	4,51 (3,76)	5,79 (4,66)
Ser Asn	0	1,91 (2,78)	4,57 (3,82)	5,72 (4,64)
Glu Arg	0	2,91 (3,30)	4,26 (3,50)	5,32 (4,22)
Glu Lys	0	4,09 (4,25)	4,70 (3,88)	6,15 (4,45)
Gln Lys	+1	4,70 (4,50)	4,64 (3,68)	5,97 (4,68)
Ser Lys	+1	4,21 (4,40)	4,84 (3,94)	6,16 (4,90)

Maksimal forskel:

$$\log kcat/Km (\log 1/Km) (d) \quad 3,15 (3,0) \quad 1,8 (1,4) \quad 2,3 (2,2) \quad -1,3 (-1,0)$$

Fodnoter til tabel XIV:

- (a) B. subtilis, BG 2036, som udtrykker den angivne variant-subtilisin, blev fermenteret og enzymet oprenset som beskrevet tidligere (Estell, et al. (1985) J. Biol. Chem. 260, 6518-6521). Vildtype-subtilisin er angivet (WT) indeholdende Glu156 og Gly166.
- (b) Nettoladning i P-1-bindingsstedet defineres som summen af ladninger fra position 156 og 166 ved pH-værdi 8,6.
- (c) Værdier for $k_{cat}(s^{-1})$ og $K_m(M)$ blev målt i 0,1 M Tris, pH-værdi 8,6, ved 25°C som beskrevet tidligere mod P-1-substrater med formen succinyl-L-AlaL-AlaL-ProL-[X]-p-nitroanilid, hvor X er den angivne P-1-aminosyre. Værdier for $\log k_{cat}/K_m$ er vist i parenteser. Alle fejl i bestemmelsen af k_{cat}/K_m og $1/K_m$ er under 5%.
- (d) Fordi værdierne for Glu156/Asp166(D166) er for små til at blive bestemt præcis, er den maksimale forskel, der tages for Glu-P-1-substratet begrænset til et ladningsinterval på +1 til -1 i ladningsændring.

i.b. = ikke bestemt.

De viste k_{cat}/K_m -forhold er anden ordens hastighedskonstanterne for omdannelsen af substrat til produkt og repræsenterer enzymets katalytiske effektivitet. Disse forhold er vist i logaritmisk form for at bringe dataene inden for samme målestok, og fordi $\log k_{cat}/K_m$ er proportional med faldet i overgangstilstandsaktiviseringsenergi (ΔG_f). Mutationer i position 156 og 166 fremkalder ændringer i katalytisk effektivitet overfor Glu-, Gln-, Met- og Lys-P-1-substrater på henholdsvis 3100, 60, 200 og 20 gange. Ved at gøre P-1-bindingsstedet mere positivt ladet [sammenlign f.eks. Gln156/Lys166 (Q156/K166) med Glu156/Met166 (Glu156/M166)] forøgedes k_{cat}/K_m dramatisk over for Glu-P-1-substratet (op til 3100 gange), og den katalytiske effektivitet over for Lys-P-1-substratet faldt (op til 10 gange). Desuden viser resultaterne, at vildtypeenzymets kataly-

tiske effektivitet kan forbedres meget over for ethvert af de fire P-1-substrater ved mutagenese af P-1-bindingsstedet.

Ændringerne i k_{cat}/K_m forårsages hovedsageligt af ændringer i $1/K_m$. Fordi $1/K_m$ ca. er lig med $1/K_s$, enzym-substrat-associationskonstanten, forårsager mutationerne primært en ændring i substratbinding. Disse mutationer fremkalder mindre virkninger på k_{cat} , som løber parallelt med virkningerne på $1/K_m$. Ændringerne i k_{cat} antyder enten en ændring i binding i P-1-bindingsstedet ved at gå fra Michaelis-komplekset ($E \cdot S$) til overgangstilstandskomplekset ($E \cdot S\ddagger$) som tidligere foreslægt (J.D. Robertus et al. (1972) Biochemistry 11, 2439-2449, J.D. Robertus et al. (1972) Biochemistry 11, 4293-4303, eller en ændring i positionen af den spaltelige peptidbinding over den katalytiske serin i $E \cdot S$ -komplekset.

Ændringer i substratpræference, som opstår ud fra ændringer i nettoladningen i P-1-bindingsstedet viser tendenser, som bedst forklares ved elektrostatiske virkninger (fig. 28). Når P-1-bindingskløften bliver mere positivt ladet stiger den gennemsnitlige katalytiske effektivitet meget mere for Glu-P-1-substrat end for dets neutrale og isosteriske P-1-homolog, Gln (fig. 28A). Ved den positive ydergrænse har begge substrater desuden næsten identiske katalytiske effektiviteter.

I modsætning hertil falder den katalytiske effektivitet over for Lys-P-1-substratet, når P-1-stedet bliver mere positivt ladet og afviger skarpt fra dets neutrale og isosteriske homolog, Met (fig. 28B). Den tilsvarende og parallelle opadgående tendens, som ses med stigende positiv ladning for Met- og Glu-P-1-substraterne, er sandsynligvis et resultat af den kendsgerning, at alle substraterne er succinylerede på deres aminoterminals ende, og derfor bærer en formel negativ ladning.

De tendenser, der observeres i $\log k_{cat}/K_m$, domineres af ændringer i K_m -udtrykket (figurne 28C og 28D). Når lommen bliver mere positivt ladet, konvergerer $\log 1/K_m$ -værdierne for Glu- og Gln-P-1-substrater (fig. 28C) og divergerer for Lys- og Met-P-1-substrater (fig. 28D). Skønt der ses mindre udtalte

virkninger i log kcat, er virkningerne af P-1-ladning på log kcat parallelle med dem, der ses i log 1/Km og bliver større, når P-1-lommen bliver mere positivt ladet. Dette kan være resultatet af den kendsgerning, at overgangstilstanden er en tætraedrisk anion og en nettopositiv ladning i enzymet kan tjene til at tilvejebringe nogen ekstra stabilisering til overgangstilstanden.

Virkningen af ændringen i P-1-bindingsstedsladning på substratpræference kan vurderes ud fra forskellene i hældninger mellem de ladede og neutrale isosteriske P-1-substrater (fig. 28B). Den gennemsnitlige ændring i substratpræference ($\Delta \log k_{cat}/K_m$) mellem ladede og neutrale isosteriske substrater stiger godt taget 10 gange, når den komplementære ladning eller enzymet forøges (tabel XV). Når Glu sammenlignes med Lys, er denne forskel 100 gange, og ændringen i substratpræference fremgår hovedsageligt af Km-udtrykket.

TABEL XV

Differenciel virkning af bindingsstedsladning
på log kcat/Km eller (log 1/Km) for P-1-substrater, som adskiller sig i ladning(a)

	<u>Ændring i P-1-bindings-</u> <u>stedsladning(b)</u>	<u>$\Delta \log k_{cat}/K_m$</u>			<u>$(\Delta \log 1/K_m)$</u>		
		<u>GluGln</u>	<u>MetLys</u>	<u>GluLys</u>	<u>GluGln</u>	<u>MetLys</u>	<u>GluLys</u>
	-2 til -1	i.b.	1,2 (1,2)	i.b.			
	-1 til 0	0,7 (0,6)	1,3 (0,8)	2,1 (1,4)			
	0 til +1	1,5 (1,3)	0,5 (0,3)	2,0 (1,5)			
30	Gennemsnitlig ændring i log kcat/Km eller (log 1/Km) per enhedsladningsændring	1,1 (1,0)	1,0 (0,8)	2,1 (1,5)			

35 (a) Forskellen i kurvernes hældning blev taget mellem P-1-substraterne over ladningsintervallet, der er givet for log (kcat/Km) (fig. 28A, B) og (log 1/Km) (fig. 28C, D). Værdierne

repræsenterer den differentielle virkning, som en ladningsændring har på at skelne de substrater, som sammenlignes.

(b) Ladning i P-1-ladningssted defineres som summen af ladningerne fra positionerne 156 og 166.

Den frie energi for elektrostatiske vekselvirkninger i strukturen og energitikken for saltbroadannelse afhænger af afstanden mellem ladningerne og mediernes mikroskopiske dielektrika. For at analysere disse strukturelle og mikromiljømæssige virkninger vurderedes de energier, som er involveret i specifikke saltbroer. Udo over de viste mulige saltbroer (figurerne 29A og 29B) kan der bygges rimelige saltbroer mellem et Lys-P-1-substrat og Asp i position 166 og mellem et Glu-P-1-substrat og en Lys i position 166 (ikke vist). Skønt kun en af disse strukturer bekræftes af røntgenkristallografi (T.L. Poulos et al. (1976) J. Mol. Biol. 257, 1097-1103) har alle modeller favorable torsionsvinkler (A.R. Sielecki et al. (1979) J. Mol. Biol. 134, 781-804) og indfører ikke unfavorable van der Waalskontakter.

Den ændring i præference hos ladede P-1-substrater, som fremkaldes af dannelsen af de ovenstående modelsaltbroer, er vist i tabel XVI.

25

30

35

TABEL XVI

Virkning af saltbordannelselæse mellem enzym
og substrat på P1-substratpræference (a)

Enzymer, der blev sammenlignet (b)	Enzym-position ændret	P-1- substrater, der sammenlignes		Substrat(d) præference $\Delta \log (\text{kcat}/\text{Km})$	Ændring i substrat- præference $\Delta \Delta \log (\text{kcat}/\text{Km})$ (1-2)
		1	2		
Glu156/Asp166	Gln156/Asp166	156	LysMet	+0,30	-0,53
Glu156/Asn166	Gln156/Asn166	156	LysMet	-0,84	-2,04
Glu156/Gly166	Gln156/Gly166	156	LysMet	-0,47	-2,10
Glu156/Lsy-166	Gln156/Lys166	156	LysMet	-1,92	-2,74

Gennemsnitlig $\Delta \Delta \log (\text{kcat}/\text{Km})$ 1,10 ± 0,3

Glu156/Asp166	Glu156/Asn166	166	LysMet	+0,30	-0,84	1,14
Glu156/Glu166	Glu156/Glu166	166	LysMet	+0,62	-1,33	1,95
Gln156/Asp166	Gln156/Asn166	166	LysMet	-0,53	-2,04	1,51
Ser156/Asp166	Ser156/Asn166	166	LysMet	-0,43	-2,04	1,61
Glu156/Lys166	Glu156/Met166	166	GluGln	-0,63	-2,69	2,06

Gennemsnitlig $\Delta \Delta \log (\text{kcat}/\text{Km})$ 1,70 ± 0,3

Fodnoter til tabel XVI:

- (a) Molekylmodellering viser, at det er muligt at danne en saltbro mellem det angivne ladede P-1-substrat og en komplementær ladning i enzymets P-1-bindingssted ved den angivne ændrede position.
- (b) De sammenlignede enzymer har sterisk til hinanden svarende aminosyresubstitutioner, som adskiller sig i ladning ved den angivne position.
- (c) De sammenlignede P-1-substrater svarer strukturelt til hinanden, men adskiller sig i ladning. Det ladede P-1-substrat er komplementært med ladningsændringen ved den angivne position mellem enzymerne 1 og 2.
- (d) Data fra tabel XIV anvendtes til at beregne forskellen i $\log(k_{cat}/K_m)$ mellem det ladede og ikke-ladede P-1-substrat (dvs. substratpræferencen). Substratpræferencen er vist separat for enzym 1 og 2.
- (e) Forskellen i substratpræference mellem enzym 1 (mere højtladet) og enzym (mere neutralt) repræsenterer den hastighedsændring, som ledsager den elektrostatiske vekselvirkning.

Forskellen mellem katalytiske effektiviteter (dvs. $\Delta \log k_{cat}/K_m$) for de ladede og neutrale P-1-substrater (f.eks. Lys minus Met eller Glu minus Gln) giver substratpræferencen for hvert enzym. Ändringen i substratpræference ($\Delta \Delta \log k_{cat}/K_m$) mellem de ladede og mere neutrale enzymhomologer (f.eks. Glu156/Gly166 minus Gln156(Q156)/Gly166) afspejler ændringen i katalytisk effektivitet, som udelukkende kan tilskrives elektrostatiske virkninger.

Disse resultater viser, at den gennemsnitlige ændring i substratpræference er betragteligt større, når der fremkaldes elektrostatiske substitutioner i position 166 (50 gange k_{cat}/K_m) i forhold til position 156 (12 gange i k_{cat}/K_m). Fra

disse ΔΔlog kcat/Km-værdier kan der beregnes en gennemsnitlig ændring i overgangstilstandsstabiliseringsenergi på henholdsvis -1,5 og -2,4 kcal/mol for substitutionerne i positionerne 156 og 166. Dette skulle repræsentere den stabiliseringsenergi, som skyldes en favorabel elektrostatisk vekselvirkning for bindingen af frit enzym og substrat til dannelse af overgangstilstandskomplekset.

EKSEMPEL 10

10

Substitutioner i position 217

15

Tyr217 er blevet substitueret med alle andre 19 aminosyrer. Der anvendtes cassettemutagenese, som beskrevet i EP publikation nr. 0130756 i overensstemmelse med protokollen fra fig. 22. EcoRV-restriktionsstedet anvendtes til restriktionsoprensning af pΔ217.

20

Eftersom denne position er involveret i substratbinding påvirker mutationer her enzymets kinetiske parametre. Et eksempel er substitutionen af Tyr med Leu i position 217. For substratet sAAPFpNa har denne mutant en kcat på 277 og en Km på $4,7 \times 10^{-4}$ med et kcat/Km-forhold på 6×10^5 . Dette repræsenterer en 5,5 ganges forøgelse i kcat med en 3 ganges forøgelse i Km i forhold til vildtypeenzymet.

30

Desuden resulterer erstatning af Tyr217 med Lys, Arg, Phe eller Leu i mutantenzymet, som er mere stabile ved pH-værdier på ca. 9-11 end vildtypeenzymet. Omvendt resulterer erstatning af Tyr217 med Asp, Glu, Gly eller Pro i enzymet, som er mindre stabile ved pH-værdier på ca. 9-11 end vildtypeenzymet.

EKSEMPEL 11

Multiple mutanter med ændret termisk stabilitet

35

B. amyloliquefaciens-subtilisin indeholder ingen cysteinrester. Ethvert forsøg på at fremkalde termisk stabilitet ved hjælp af Cys-tværbinding krævede således substitutionen af mere end en aminosyre i subtilisin med Cys. Følgende subtilisinrester blev substitueret flere gange med cystein:

Thr22/Ser87

Ser24/Ser87

Mutagenese af Ser24 til Cys blev udført med en 5'-phosphoryleret oligonukleotidprimer med sekvensen

5

5'-pc-TAC-ACT-GGA-TGC-AAT-GTT-AAA-G-3'.

(Stjerner viser placeringen af forkert matchede, og den understregede sekvens viser positionen af det ændrede Sau3A-sted).
10 B. amyloliquefaciens-subtilisingenet på et 1,5 kb EcoRI-BamHI-fragment fra pS4,5 blev klonet ind i M13mp11 og enkeltstrenget DNA isoleredes. Denne skabelon (M13mp11SUBT) blev dobbeltpri-
met med den 5'-phosphorylerede universelle sekvens-M13-primer
og mutageneseprimeren, Adelman et al. (1983) DNA 2, 183-193.
15 Heteroduplexen blev transficeret ind i kompetente JM101-cel-
ler, og plaquer blev undersøgt for mutantsekvensen (M.J. Zol-
ler et al. (1982) Nucleic Acid Res. 10, 6487-6500, Wallace et
al. (1981) Nucleic Acid Res. 9, 3647-3656) under anvendelse af
en tetramethylammoniumchloridhybridiseringsprotokol (Wood et
al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 1585-1588). Ser87-
20 til -Cysmutationen blev fremstillet på tilsvarende måde under
anvendelse af en 5'-phosphoryleret primer med sekvensen

20

5'-pGGC-GTT-GCG-CCA-TGC-GCA-TCA-CT-3'

25

(Stjernen angiver positionen for den fejlagtige matchning, og den understregede sekvens viser positionen af et nyt MstI-sted). C24- og C87-mutationerne blev opnået med en frekvens på henholdsvis 1 og 2%. Mutantsekvenser bekræftedes ved dideoxy-
30 sekvensbestemmelse i M13.

30

Mutagenese af Tyr21/Thr22 til A21/C22 blev udført med en 5'-phosphoryleret oligonukleotidprimer med sekvensen

35

5'-pAC-TCT-CAA-GGC-GCT-TGT-GGC-AAT-GTT-3'

(Stjernerne viser forkerte matchninger til vildtypesekvensen, og den understregede sekvens viser positionen af et ændret

Sau3A-sted). Manipulationer for heteroduplexsyntese var identiske med dem, som er beskrevet for C24. Fordi direkte kloning af heteroduplex-DNA-fragmentet kan give forøgede mutagenesefrekvenser, blev EcoRI-BamHI-subtilisinfragmentet oprenset og 5 ligeret ind i PBS42. *E. coli*-MM294-eller blev transformeret med ligeringsblanding, og plasmid-DNA oprenseses fra isolerede transformanter. Plasmid-DNA blev screenet for tabet af Sau3Astedet ved codon 23, som var fjernet af mutageneseprimeren. To ud af 16 plasmidpræparer havde tabt vildtype-Sau3A-10 stedet. Mutantsekvensen blev bekræftet ved dideoxysekvensbestemmelse i M13.

Der fremstilles dobbelte mutanter, C22/C87 og C24/C87, ved at ligere fragmenter, som delte et fælles Clal-sted, der adskilte de enkelte modercystincodoner. Specifikt blev 500 bp 15 EcoRI-Clal-fragmentet indeholdende 5'-delen af subtilisingenet (herunder codonerne 22 og 24) ligeret med 4,7 kb Clal-EcoRI-fragmentet, som indeholdt 3'-delen af subtilisingenet (herunder codon 87) plus PBS42-vektorsekvens. *E. coli*-MM 294 blev 20 transformeret med ligeringsblanding, og plasmid DNA oprenseses fra individuelle transformanter. Dobbelt cysteinplasmidkonstruktioner blev identificeret ved restriktionsstedsmarkerer, som stammede fra modercysteinmutanterne (dvs. C22 og C24, Sau3A minus; Cys87, MstI plus). Plasmider fra *E. coli* 25 blev transformeret ind i *B. subtilis* BG2036. Disse mutanters termiske stabilitet sammenlignet med vildtypesubtilisin er vist i fig. 30 og tabellerne XVII og XVIII.

TABEL XVII

Virkning af DTT på halveringstiden for autolytisk inaktivering af vildtypesubtilisin og disulfidmutanter af subtilisin*

Enzym	$t_{\frac{1}{2}}$		-DTT/+DTT
	-DTT	+DTT	
Vildtype	95	85	1,1
C22/C87	44	25	1,8
C24/C87	92	62	1,5

10

15

20

(*) Oprensede enzymer blev enten behandlet eller ikke behandlet med 25 mM DTT og dialyseret med eller uden 10 mM DTT i 2 mM CaCl_2 , 50 mM Tris (pH-værdi 7,5) i 14 timer ved 4°C. Enzymkoncentrationer blev justeret til 80 μl . Portioner blev anbragt på is og analyseret for resterende aktivitet. Halveringstider for autolytisk inaktivering blev bestemt ud fra semilogaritmiske afbildninger af \log_{10} (resterende aktivitet) mod tiden. Disse afbildninger var lineære for over 90% af inaktiveringen.

TABEL XVIII

Virkning af mutationer i subtilisin
på halveringstiden for autolytisk
inaktivering ved 58°C*

25

30

35

Enzym	$t_{\frac{1}{2}}$	min
Vildtype	120	
C22	22	
C24	120	
C87	104	
C22/C87	43	
C24/C87	115	

(*) Halveringstider for autolytisk inaktivering blev bestemt for vildtypesubtilisin og mutantsubtilisiner som beskrevet i teksten til tabel III. Uoprensede og ikke-reducedede enzymer anvendtes direkte fra *B. subtilis*-kultursupernatanter.

Disulfiderne, som indførtes i subtilisin, forbedrede ikke mutantenzymernes autolytiske stabilitet sammenlignet med vildtypeenzymet. Imidlertid gav disulfidbindingerne en mærgen for autolytisk stabilitet sammenlignet med deres tilsvarende reducerede dobbeltcysteinenzym. Undersøgelse af en meget raffineret røntgentstruktur af vildtype-B. amyloliquefaciens-subtilisin afslører en hydrogenbinding mellem Thr22 og Ser87. Fordi cystein er en dårlig hydrogendorer eller -acceptor (I.C. Paul (1974) i Chemistry of the -SH Group (S. Patai, ed.) side 111-149, Wiley Interscience, New York) kan en svækkelse af 22/87-hydrogenbindingen forklare, hvorfor C22- og C87-enkeltcysteinmutantproteinerne er mindre autolytisk stabile end både C24 og vildtype (tabel XVIII). Den kendsgerning, at C22 er mindre autolytisk stabil end C87 kan være resultatet af Tyr21A-mutationen (tabel XVIII). Faktisk viser konstruktion og analyse af Tyr21/C22, at mutantproteinet har en autolytisk stabilitet, som er nærmere stabiliteten hos C87. Til opsumming destabiliserer C22 og C87 fra enkeltcysteinmutationer proteinet mod autolyse, og disulfidbindingsdannelse forøger stabiliteten til et niveau, som er mindre end eller lig med vildtypeenzymets stabilitet.

EKSEMPEL 12

Multiple mutanter indeholdende substitutioner
i position 222 og position 166 eller 169

Dobbelte mutanter 166/222 og 169/222 blev fremstillet ved at sammenliggere (1) 2,3 kb AcaII-fragmentet fra ps4.5, som indeholder 5'-delen af subtilisingenet og vektorsekvenser, (2) 200 bp AvaII-fragmentet, som indeholder de relevante 166- eller 169-mutationer fra de respektive 166- eller 169-plasmider og (3) 2,2 kb AvaII-fragmentet, som indeholder den relevante 222-mutation 3' og af subtilisingenerne samt vektorsekvens fra det respektive p222-plasmid.

Skønt mutationer i position 222 forbedrer oxidationsstabiliteten har de også en tendens til at forøge Km. Et eksempel er vist i tabel XIX. I dette tilfælde blev A222-mutationen kom-

bineret med K166-mutationen til opnåelse af et enzym med kcat og Km liggende mellem de to moderenzymmer.

TABEL XIX

	<u>kcat</u>	<u>Km</u>
WT	50	$1,4 \times 10^{-4}$
A222	42	$9,9 \times 10^{-4}$
K166	21	$3,7 \times 10^{-5}$
K166/A222	29	$2,0 \times 10^{-4}$

10

substrat sAAPFpNa

EKSEMPEL 13

15 Multiple mutanter indeholdende substitutioner i
position 50, 156, 166, 217 og kombinationer deraf

Den dobbelte mutant S156/A169 fremstilles ved ligering af to fragmenter, som hver indeholdt en af de relevante mutationer. Plasmidet pS156 blev skæret med XmaI og behandlet med S1-nuklease til dannelse af en stump ende ved codon 167. Efter fjernelse af nukleasen ved phenol/chloroformekstraktion og ethanoludfældning blev DNA'en fordøjet med BamHI, og det ca. 4 kb store fragment indeholdende vektoren samt 5'-delen af subtilisingenet til codon 167, oprensesedes.

25

pA169-plasmidet blev fordøjet med KpnI og behandlet med DNAPolymerase-Klenow-fragment plus 50 μ M dNTP'er til dannelse af en codon med stump ende ved codon 168. Klenow-fragmentet blev fjernet ved phenol/chloroformekstraktion og ethanoludfældning. DNA'en blev fordøjet med BamHI, og 590 bp fragmentet inklusive codon 168 frem til carboxyenden af subtilisingenet, isoleredes. De to fragmenter blev derefter ligeret til opnåelse af S156/A169.

30

35 Tredobbelte og firedobbelte mutanter fremstilles ved at sammenliggere (1) 220 bp PvuII/HaeII-fragmentet indeholdende de relevante 156-, 166- og/eller 169-mutationer fra det respektive p156-, p166- og/eller p169-dobbelte eller enkelte mutant-

plasmid, (2) 550 bp HaeII/BamHI-fragmentet indeholdende den relevante 217-mutant fra det respektive p217-plasmid og (3) 3,9 kb PvuII/BamHI-fragmentet indeholdende F50-mutationen og vektorsekvenser.

5

Den multiple mutant F50/S156/A169/L217 samt B. amyloliquefaciens-subtilisin, B. licheniformis-subtilisin og den enkelte mutant L217 blev analyseret med de ovenstående syntetiske polypeptider, hvor P-1-aminosyren i substratet var Lys, His, Ala, Gln, Tyr, Phe, Met og Leu. Disse resultater er vist i figurerne 26 og 27.

10

Disse resultater viser, at F50/S156/A169/L217-mutanten har en substratspecificitet, som sværer til substratspecificiteten for B. licheniformis-enzymet, og som adskiller sig dramatisk fra vildtypeenzymets. Skønt der kun er vist data for L217-mutanten, viste ingen af de enkelte mutanter (f.eks. F50, S156 eller A169) denne virkning. Skønt B. licheniformis adskiller sig i 88 restpositioner fra B. amyloliquefaciens, forklarer kombinationen af kun disse fire mutationer de fleste af forskellene i substratspecificitet mellem de to enzymer.

15

20

EKSEMPEL 14

Subtilisinmutanter med ændret alkalistabilitet

25

Der anvendtes en tilfældig mutageneseteknik til at frembringe enkelte og multiple mutationer i B. amyloliquefaciens-subtilisingenet. Sådanne mutanter blev screenet for ændret alkalistabilitet. Kloner med forøget (positiv) alkalistabilitet og formindsket (negativ) alkalistabilitet blev isoleret og sekvensbestemt for at identificere mutationerne i subtilisingenet. Blandt de positive kloner identificeredes mutanterne V107 og R213. Disse enkelte mutanter blev derefter kombineret til dannelse af mutanten V107/R213.

30

35

En af de negative kloner (V50) fra eksperimenterne med tilfældig mutagenese resulterede i en mærkbar formindskelse i alkalistabiliteten. En anden mutant (P50) analyseredes for alkalistabilitet for at bestemme virkningen af en anden substitu-

tion i position 50. F50-mutanten viste sig at have en større alkalistabilitet end vildtypesubtilisinen og resulterede, når den blev kombineret med den dobbelte mutant V107/R213 i en mutant med en alkalistabilitet, som afspejlede summen af alkali-
5 stabiliteten for hver af de individuelle mutanter.

Den enkelte mutant R204 og den dobbelte mutant C204/R213 blev identificeret ved alkaliscreening efter tilfældig cassettemu-
tagense over regionen fra position 197 til 228. C204/R213-mu-
tanten blev derefter modificeret til dannelse af mutationer
10 indeholdende de individuelle mutationer C204 og R213 for at bestemme bidraget fra hver af de individuelle mutationer. Cas-
settemutagenese under anvendelse af opsamlede oligonukleotider
15 til erstatning af alle aminosyrer ved position 204 anvendtes til at bestemme, hvilken substitution i position 204, som vil-
le maksimere forøgelsen i alkalistabilitet. Mutationen fra Lys213 til Arg blev bibeholdt konstant for hver af disse sub-
stitutioner i position 204.

A. Konstruktion af pB0180, et
20 E. coli-B. subtilis-pendulplasmid

2,9 kb EcoRI-BamHI-fragmentet fra pBR327 (L. Covarrubias et al. (1981) Gene 13, 25-35) blev ligeret til 3,7 kb EcoRI-BamHI-fragmentet fra pBD64 (T. Gryczan et al. (1980) J. Bacteriol., 141, 246-253) til opnåelse af det rekombinerede plasmid pB0153. Den unikke EcoRI-genkendelsessekvens i pBD64 blev fjernet ved fordøjelse med EcoRI efterfulgt af behandling med Klenow og deoxynukleotidtriphosphater (T. Maniatis et al. (eds.) (1982) i Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.). Ligering af stumpe ender og transformation gav pB0154. Den unikke AvAI-genkendelsessekvens i pB0154 blev fjernet på tilsvarende måde til opnåelse af pB0171. pB0171 blev fordøjet med BamHI og PvuII og behandlet med Klenow og deoxynukleotidtriphosphater til dannelse af stumpe ender. 6,4 kb fragmentet blev oprenset, ligeret og transformeret ind i LE392-celler (L.W. Enquist et al. (1977) J. Mol. Biol. 111, 97-120) til opnåelse af pB0172, som bibeholder det unikke BamHI-sted. For at lette subkloning

af subtilisinmutanter indførtes et unikt og stille KpnI-sted, som startede ved codon 166, i subtilisingenet fra pS4.5 (J.A. Wells et al. (1983) Nucleic Acids Res. 11, 7911-7925) ved stedrettet mutagenese. KpnI⁺-plasmidet blev fordøjet med EcoRI og behandlet med Klenow og deoxynukleotidtriphosphater til dannelsen af en stump ende. Klenow blev inaktivert ved opvarming i 20 minutter ved 68°C, og DNA'en blev fordøjet med BamHI. Det 1,5 kb stumpe EcoRI-BamHI-fragment indeholdende hele subtilisin blev ligeret med 5,8 kb NruI-BamHI fra pB0172 til opnælelse af pB0180. Ligeringen af den stumpe NruI-ende til den stumpe EcoRI-ende gendannede et EcoRI-sted. Ved at gå rundt om pB0180 med uret fra EcoRI-stedet i 5'-enden af subtilisingenet findes det unikke BamHI-sted i 3'-enden af subtilisingenet, chloramphenicol- og neomycinresistensgenerne og det grampositive UB110-replikationsorigin hidrørende fra pB064, ampicillinresistensgenet og det gramnegative replikationsorigin hidrørende fra pBR327.

B. Konstruktion af tilfældig mutagenese-bibliotek

1,5 kb EcoRI-BamHI-fragmentet indeholdende B. amyloliquefaciens-subtilisingenet (Wells et al. (1983) fra pB0180 blev klonet ind i M13mp11 til opnælelse af M13mp11-SUBT i alt væsentligt som beskrevet tidligere (J.A. Wells et al. (1986) J. Biol. Chem., 261, 6564-6570). Deoxyuridinholdig skabelon-DNA fremstilles i overensstemmelse med Kunkel (T.A. Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488-492). Uridinholdig skabelon-DNA (Kunkel, 1985) blev oprenset ved hjælp af CsCl-densitetsgradienter (T. Maniatis et al. (eds.) (1982) i Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.). Der anvendtes en primer (AvaI⁻¹) med sekvensen

5'GAAAAAAAGACCC[†]AGCGTCGCTTA

der endte ved codon -11, til at ændre den unikke AvaI-genkendelsessekvens i subtilisingenet. (Stjernen angiver de forkerte matchninger fra vildtypesekvensen, og det understregede er det ændrede AvaI-sted).

Den 5'-phosphorylerede AvaI-primer (~320 pmol) og ~40 pmol (~120 µg) uridinholdig M13mp11-SUBT-skabelon i 1,88 ml 53 mM NaCl, 7,4 mM MgCl₂ og 7,4 mM Tris.HCl (pH-værdi 7,5) blev sammenføjet ved opvarmning til 90°C i 2 minutter og afkøling i 15 minutter til 24°C (fig. 31). Primerforlængelse ved 24°C påbegyndtes ved tilsætning af 100 µL indeholdende 1 mM i alle fire deoxynukleotidtriphosphater samt 20 µl Klenow fragment (5 enheder/l). Forlængelsesreaktionen blev standset hvert 15 sekund i løbet af 10 minutter ved tilsætning af 10 µl 0,25 M EDTA (pH-værdi 8) til 50 µl portioner af reaktionsblanding. Prøver blev samlet og ekstraheret med phenol-chloroform, og DNA blev udfældet to gange ved tilsætning af 2,5 vol 100% ethanol og vasket to gange med 70% ethanol. Pellets blev tørret og genopløst i 0,4 ml 1 mM EDTA, 10 mM Tris (pH-værdi 8).

Forkert inkorporering af α-thiodeoxynukleotider på 3'-enderne af puljen af tilfældigt afsluttet skabelon blev udført ved inkubation af fire 0,2 ml oplosninger hver indeholdende en fjerdedel af den tilfældigt afsluttede skabelonblanding (20 µg), 0,25 mM af et givet α-thiodeoxynukleotidtriphosphat, 100 enheder AMV-polymerase, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0,4 mM dithiothreitol og 50 mM Tris (pH-værdi 8,3) (J.J. Champoux (1984) Genetics, 2, 454-464). Efter inkubation ved 37°C i 90 minutter forsegledes misinkorporeringsreaktioner ved inkubation i 5 minutter ved 37°C med 50 mM af alle fire deoxynukleotidtriphosphater (pH-værdi 8) og 50 enheder AMV-polymerase. Reaktionerne blev standset ved tilsætning af 25 mM EDTA (endelig) og opvarmet til 68°C i 10 minutter for at inaktivere AMV-polymerase. Efter ethanoludfældning og gensuspension udførtes syntese af lukkede, cirkulære heteroduplexer i to dage ved 14°C under de samme betingelser, som anvendtes til de ovenfor beskrevne tidstagne forlængelsesreaktioner, bortset fra at alle reaktionsblandinger også indeholdt 1000 enheder T4-DNA-ligase, 0,5 mM ATP og 1 mM β-mercaptopethanol. Samtidig restriktionsbehandling af hver heteroduplexpulje med KpnI, BamHI og EcoRI bekræftede, at forlængelsesreaktionerne næsten var kvantitative. Heteroduplex DNA i hver reaktionsblanding blev methyleret ved inkubation med 80 µM S-adenosylmethionin og 150 enheder dam-

methylase i 1 time ved 37°C. Methyleringsreaktioner standses ved opvarmning til 68°C i 15 minutter.

Halvdelen af hver af de fire methylerede heteroduplexreaktioner blev transformeret ind i 2,5 ml kompetent *E. coli* JM101 (J. Messing (1979) Recombinant DNA Tech. Bull., 2, 43-48). Antallet af uafhængige transformanter fra hver af de fire transformationer varierede fra 0,4 til 2,0 x 10⁵. Efter at fagpuljer var vokset ud, isoleredes RF-DNA fra hver af de fire transformationer og oprenseses ved centrifugering gennem CsCl-densitetsgradienter. Ca. 2 µg RF-DNA fra hver af de fire puljer blev fordøjet med EcoRI, BamHI og AvaI. 1,5 kb EcoRI-BamHI-fragmentet (dvs. AvaI-resistant) blev oprenset på agarose med lav geltemperatur og ligeret ind i 5,5 kb EcoRI-BamHI-vektorfragmentet fra p80180. De totale antal uafhængige transformanter fra hvert α-thiodeoxynukleotidmisinkorporeringsplasmidbibliotek varierede fra 1,2 til 2,4x10⁴. Puljen af plasmider fra hver af de fire transformationer blev dyrket ud i 200 ml LB-medier indeholdende 12,5 µg/ml cmp, og plasmid-DNA oprenseses ved centrifugering gennem CsCl-densitetsgradienter.

C. Ekspression og screening af subtilisinpunktmutanter

Plasmid-DNA fra hver af de fire misinkorporeringspuljer blev transformeret (C. Anagnostopoulos et al. (1967), J. Bacteriol., 81, 741-746) ind i BG2036. For hver transformation producerede 5 µg DNA ca. 2,5 x 10⁵ uafhængige BG2036-transformanter, og væskekulturportioner fra de fire biblioteker blev lagret i 10% glycerol ved 70°C. Optøede portioner af frosne kulturer blev udpladet på LB/5 µg/ml cmp/1,6% skummetmælkspader (J.A. Wells et al. (1983) Nucleic Acids Res., 11, 7911-7925), og friske kolonier blev anbragt i række på 96 brøndes mikrotiterplader indeholdende 150 l per brønd-medier plus 12,5 µg/ml cmp. Efter 1 times forløb ved stuetemperatur blev et replika præget (ved anvendelse af et tilpasset 96-grenet stempel) på et 132 mm BA 85-nitrocellulosefilter (Schleicher and Scheull), som blev lagt på en LB/cmp/skummetmælkspade med en diameter på 140 mm. Celler blev dyrket i ca. 16 timer ved 30°C, indtil proteolyseringen var ca. 5-7 mm i diameter, og filtrene blev

overført direkte til en frisk fremstillet agarplade ved 37°C, som kun indeholdt 1,6% skummetmælk og 50 mM natriumphosphat, pH-værdi 11,5. Filterne blev inkuberet på plader i 3-6 timer ved 37°C til dannelsen af ringe på ca. 5 mm for vildtypesubtilisin og blev kasseret. Pladerne blev farvet i 10 minutter ved 24°C med Coomassieblå-opløsning (0,25% Coomassieblå (R-250), 25% ethanol) og affarvedes med 25% ethanol og 10% eddikesyre i 10 minutter. Proteolysezoner fremkom som blå ringe på en hvid baggrund på undersiden af pladen og blev sammenlignet med den oprindelige vækstplade, som på tilsvarende måde var farvet og affarvet som en kontrol. De kloner blev betragtet som positive, som dannede forholdsvis større proteolysezoner på pladerne med høj pH-værdi i forhold til den oprindelige vækstplade. Negative kloner gav mindre ringe under alkaliske betingelser. Positive og negative kloner blev igen udstreget som stregkultur for at opnæse kolonierne og screenet i tre versioner for at bekræfte resultaterne med alkalisk pH-værdi.

D. Identifikation og analyse af mutantsubtilisiner

Plasmid-DNA fra 5 ml kulturer, der havde stået natten over og bestod af mere alkalisk aktive *B. subtilis*-kloner, fremstilles i overensstemmelse med Birnboim og Doly (H.C. Birnboim et al. (1979) Nucleic Acid Res. 7, 1513), bortset fra at der fortages inkubation med 2 mg/ml lysozym i 5 minutter ved 37°C forud for at sikre cellelyse, og at der anvendtes en yderligere phenol/CHCl₃-ekstraktion for at fjerne forureninger. 1,5 kb EcoRI-BamHI-fragmentet indeholdende subtilisingenet blev ligeret ind i M13mp11, og skabelon-DNA fremstilles til DNA-sekvensbestemmelse (J. Messing et al. (1982) Gene, 19, 269-276). Tre DNA-sekvensbestemmesprimere, som endte ved codon 26, +95 og +155 syntetiseredes til at matche med subtilisinkodningssekvensen. Til indledende sekvensidentifikation blev et enkelt DNA-sekvensspor, svarende til det dNTPaS-misinkorporeringsbibliotek, hvorfra mutanten kom, anbragt over hele det fuldt udviklede proteins kodningssekvens (dvs. et enkelt dideoxyguanosinsekvensspor anvendtes til at identificere en mutant fra dGTPaS-biblioteket). Der udførtes en komplet fire-

spors DNA-sekvens 200 bp over mutagenesestedet for at bekrafte og identificere mutantsekvensen (F. Sanger et al. (1980) J. Mol. Biol., 143, 161-178). Bekræftede positive og negative bacillikloner blev dyrket i LB-medier indeholdende 12,5 µg/ml cmp og oprenset fra kultursupernatanter som beskrevet tidligere (D.A. Estell et al. (1985) J. Biol. Chem. 260, 6518-6521). Enzymer, som var mere end 98% rene ved analyse ved SDS-polyacrylamidgelektroforese (U.K. Laemmli (1979), Nature, 227, 680-685) og proteinkoncentrationer blev beregnet ud fra absorbansen ved 280 nm,

$$\epsilon_{280}^{0,1\%} = 1,17 \text{ (H. Maturbara et al. (1965) J. Biol. Chem., 240, 1125-1130).}$$

Enzymaktiviteten blev målt med 200 µg/ml succinyl-L-Ala-L-Ala-ProL-Phe-p-nitroanilid (Sigma) i 0,1 M Tris pH-værdi 8,6 eller 0,1 M CAPS pH-værdi 10,8 ved 25°C. Den specifikke aktivitet (µmol produkt/min·mg) blev beregnet ud fra absorbansændringen ved 410 nm fra produktionen af p-nitroanilin med tiden per mg enzym ($E_{410}=8480 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; E.G. Del Mar et al. (1979), Anal. Biochem., 99, 316-320). Der udførtes alkalisk autolytisk stabilitetsundersøgelser på oprenede enzymer (200 µg/ml) i 0,1 M kaliumphosphat (pH-værdi 12,0) ved 37°C. På forskellige tidspunkter analyseredes portioner for resterende enzymaktivitet (J.A. Wells et al. (1986) J. Biol. Chem., 261, 6564-6570).

E. Resultater

1. Optimering og analyse af mutagenesefrekvens

Der fremstilles et sæt af primer-skabelonmolekyler, som var tilfældigt 3'-afsluttede over subtilisingenet (fig. 31) ved variabel forlængelse fra en fast 5'-primer (primeren muterede et unikt AvaI-sted i codon 11 i subtilisingenet). Dette opnædes ved at standse polymerasereaktioner med EDTA efter forskellige forlængelsestidsrum. Omfanget og fordelingen af duplexdannelse over 1 kb subtilisingenfragmentet vurderes ved multipel restriktions-fordøjelse (ikke vist). F.eks. identifi-

ceredes fremstilling af nye HindI-fragmenter, når polymerase-forlængelsen var gået forbi Ile110, Leu233 og Asp259 i subtilisingenet.

5 Til misinkorporering af hver dNTPas ved tilfældigt afsluttede
3'-ender ved hjælp af omvendt AMV-transkriptase (R.A. Zakour
et al. (1982), Nature, 295, 708-710, R.A. Zakour et al.
(1984), Nucleic Acids Res., 12, 6615-6628) anvendtes tidligere
beskrevne betingelser (J.J. Champoux (1984), Genetics, 2,
10 454-464). Virkningen af hver misinkorporeringsreaktion blev
vurderet til at være større end 80% ved tilsætning af hver
dNTPas til AvaI-restriktionsprimeren og analyse ved polyacryl-
amidgelelektroforese. Misinkorporeringer blev forseglet ved
polymerisering ved alle fire dNTP'er, og lukket, cirkulær DNA
15 fremstillede ved omsætning med DNA-ligase.

Der anvendtes adskillige manipulationer for at maksimere ud-
byttet af mutantsekvenserne i heteroduplexen. Disse omfattede
brugen af en deoxyuridinholidig skabelon (T.A. Kunkel (1985)
20 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488-492; P.J. Pukkila et al.
(1983) Genetics, 104, 571-582), in vitro-methylering af den
mutagene streng (W. Kramer et al. (1982) Nucleic Acids Res.
10, 6475-6485) og anvendelsen af AvaI-restriktionsudvælgelse
mod vildtypeskabelonstrengen, som indeholdt et unikt AvaI-
sted. Det separate bidrag fra hver af disse berigelsesproce-
25 durer til den endelige mutagenesfrekvens blev ikke bestemt,
bortset fra at før AvaI-restriktionsudvælgelsen indeholdt
groft taget 1/3 af de segregerede kloner i hver af de fire
puljer stadig et vildtype-AvaI-sted i subtilisingenet. Efter
AvaI-restriktionsudvælgelse mangede mere end 98% af plasmi-
30 derne vildtype-AvaI-stedet.

1,5 kb EcoRI-BamHI-subtilisingenfragmentet, som var resistent
over for AvaI-restriktionsfordøjelse, fra hver af de fire
CsCl-oprensede M13 RF-puljer, isoleredes på lavtsmeltende aga-
35 rose. Fragmentet blev ligeret in situ fra agarosen med en til-
svarende skåret E. coli-B. subtilis-pendulvektor, pB0180, og
transformeret direkte ind i E. coli LE392. Ved en sådan direkte
ligeing og transformation fra agaroseisoleret DNA undgik

man tab og muliggjorde opnåelse af et stort antal rekombinanter (100.000 per µg ækvivalent af tilført M13-pulje).

Mutagenesefrekvensen for hver af de fire dNTPas-misinkorpore-ringsreaktioner blev vurderet ud fra den frekvens, hvormed unikke restriktionssteder blev fjernet (tabel XX). De unikke restriktionssteder, som valgtes til denne analyse, Clal, PvuII og KpnI, var fordelt over subtilisingenet og startede ved henholdsvis codonerne 35, 104 og 166. Som en kontrol blev mutagenesefrekvensen bestemt ved PstI-stedet, som er placeret i β-lactamase-genet, der var uden for mutagenesevinduet. Fordi den absolute mutagenesefrekvens var tæt på procentsatsen af ufordøjet plasmid-DNA, var det nødvendigt med to runder restrikionsudvælgelse for at reducere baggrunden af overlevende, uskåret vildtypeplasmid-DNA under mutantplasmidet (tabel XX). Baggrunden af overlevende plasmid fra en vildtype-DNA repræsenterer sandsynligvis den totale sum af spontane mutationer, uskåret vildtypeplasmid og den effektivitet, med hvilken lineær DNA kan transformere *E. coli*. Ved at trække frekvensen for umutageniseret DNA (baggrund) fra frekvensen for mutant-DNA og normalisere for det mutagenesevindue, som var udtaget til prøve ved en given restriktionsanalyse (4-6 bp) opnås et estimat af mutageneseeffektiviteten over hele kodningssekvensen (1000 bp).

25

30

35

TABEL XX

α -thiol							%
dNTP	Restrik-	% resistente kloner ^c		% resistente kloner over		mutanter per	
misin-	tions-	Første	Anden				
korpo-	sted-						
reret ^b	udvælgelse	runde	runde	Total	baggrund ^d	1000 bpe ^e	
	Ingen	PstI	0,32	0,7	0,002	0	-
5	G	PstI	0,33	1,0	0,003	0,001	0,2
	T	PstI	0,32	-0,5	-0,002	0	0
	C	PstI	0,43	3,0	0,013	0,011	3
	Ingen	ClaI	0,28	5	0,014	0	-
10	G	ClaI	2,26	85	1,92	1,91	380
	T	ClaI	0,48	31	0,15	0,14	35
	C	ClaI	0,55	15	0,08	0,066	17
	Ingen	PvuII	0,08	29	0,023	0	-
15	G	PvuII	0,41	90	0,37	0,35	88
	T	PvuII	0,10	67	0,067	0,044	9
	C	PvuII	0,76	53	0,40	0,38	95
	Ingen	KpnI	0,41	3	0,012	0	-
20	G	KpnI	0,98	35	0,34	0,33	83
	T	KpnI	0,36	15	0,054	0,042	8
	C	KpnI	1,47	26	0,38	0,37	93

(a) Mutagenesefrekvensen vurderes ud fra frekvensen for opnåelse af mutationer, som ændrer unikke restriktionssteder i det mutageniserede subtilisingen (dvs. ClaI, PvuII eller KpnI) sammenlignet med mutationsfrekvenser for PstI-stedet, som ligger uden for mutagenesevinduet.

(b) Plasmid-DNA var fra vildtype (ingen) eller var mutageniseret ved hjælp af dNTPas-misinkorporering som beskrevet.

(c) Procent resistente kloner blev beregnet ud fra den fraktion af kloner, som opnåedes efter 3 gange eller flere over-

- fordøjelse af plasmidet med det angivne restriktionsenzym sammenlignet med en ikke-fordøjet kontrol. Restriktionsresistens-plasmid-DNA fra den første runde blev underkastet en anden runde med restriktionsudvælgelse. Totalen repræsenterer produktet af fraktionerne af resistente kloner, som opnåedes fra begge udvælgelsesrunder og giver procentsatsen af restriktionsstedmutantkloner i den oprindelige udgangspulje. Frekvenserne udledtes ved at tælle mindst 20 kolonier og sædvanligvis flere end 100.
- (d) Procent resistente kloner blev beregnet ved at trække procentsatsen af restriktionsresistente kloner, opnået fra wildtype-DNA (dvs. ingen) fra den procentsats, der opnåedes for mutant-DNA.
- (e) Denne ekstrapolerer fra mutationsfrekvensen over hvert restriktionssted til hele subtilisingenet (1 kb). Dette er blevet normaliseret til antallet af mulige baser (4-6 bp) i hvert restriktionssted, som kan mutageniseres af en given misinkorporeringsbegivenhed.

20

Fra denne analyse vurderedes den gennemsnitlige procent af subtilisingener indeholdende mutationer, som er et resultat af dGTP_αs-, dCTP_αs- eller dTTP_αs-misinkorporering til at være henholdsvis 90, 70 og 20%. Disse høje mutagenesefrekvenser var sædvanligvis ganske variable afhængigt af dNTP_αs og misinkorporingseffektiviteterne på dette sted. Misinkorporeringseffektivitet er blevet rapporteret til at være afhængig både af arten af den forkerte matchning og primersammenhængen (J.J. Champoux (1984), J.A. Skinner et al. (1986) Nucleic Acids Res., 14, 6945-6964). En tendentiøs misinkorporeringseffektivitet hos dGTP_αs og dCTP_αs i forhold til dTTP_αs er tidligere blevet observeret (D. Shortle et al. (1985), Genetics, 110, 35 539-555). Ulig dGTP_αs-, dCTP_αs- og dTTP_αs-bibliotekerne kunne mutageneseffektiviteten for dATP_αs-misinkorporeringsbiblioteket ikke blive vurderet præcist, fordi 90% af de analyserede restriktionsresistente plasmider simpelthen manglede det ind-

satte subtilisingenstykke. Dette problem skyldtes sandsynligvis selvligering af vektoren, når det dATP_α-mutageniserede subtilisingen blev subklonet fra M13 i p80180. Ved at korrigere for vektorbaggrunden vurderes mutagenesefrekvensen til at være omkring 20% i dATP_α-misinkorporeringsbiblioteket. I et separat eksperiment (ikke vist) blev mutageneseeffektiviteten for dGTP_α- og dTTP_α-misinkorporering vurderet til at være omkring henholdsvis 50 og 30%, baseret på frekvensen for reversering af en inaktivierende mutation i codon 169.

Placeringen og identiteten af hver mutation blev bestemt ved et enkelt spor af DNA-sekvensbestemmelse svarende til det misinkorporerede α-thiodeoxynukleotid over hele genet efterfulgt af en komplet firespors DNA-sekvensbestemmelse, som var fokuseret over mutationsstedet. Af 14 identificerede mutanter svarede fordelingen til den, der er rapporteret af Shortle og Lin (1985) bortset fra, at man ikke observerede nukleotidindsættelse eller deletionsmutationer. Andelen af AG-mutationer var højest i G-misinkorporeringsbiblioteket, og der fremkom nogle uventede punktmutationer i dTTP_α- og dCTP_α-bibliotekerne.

2. Screening og identifikation af alkalistabilitetsmutanter af subtilisin

Det er muligt at screene kolonier, som producerer subtilisin ved hjælp af ringe ved caseinfordøjelse (J.A. Wells et al. (1983) Nucleic Acids Res., 11, 7911-7925). Der var imidlertid to problemer ved at screene kolonier under stærkt alkaliske betingelser (> pH 11). For det første vil *B. subtilis* ikke vokse ved høj pH-værdi, og man har været ude af stand til at transformere en alkylofil bacillusstamme. Dette problem blev overvundet ved at anvende en replikaudpladningsstrategi, hvori kolonier blev dyrket på filtre ved neutral pH-værdi til fremstilling af subtilisin, og filtrene derefter blev overført til caseinplader ved pH-værdi 11,5 for at analysere subtilisinaktivitet. Ved pH-værdi 11,5 dannede caseinmicellerne imidlertid ikke længere en u klar baggrund og forhindrede dermed en klar observation af proteolyseringe. Problemets blev overvundet ved at farve pladen kort med Coomassie-blå for at forstærke pro-

teolysezoner og syrne pladerne til udvikling af caseinmicelle-turbiditet. Ved sammenligning af ringstørrelsen, der fremstillede på referencevækstpladen (pH-værdi 7) med pladen med høj pH-værdi (pH-værdi 11,5) var det muligt at identificere mutantsubtilisiner, som havde forøget (positive) eller formindsket (negative) stabilitet under alkaliske betingelser.

Der screenedes omkring 1000 kolonier fra hvert af de fire misinkorporeringsbiblioteker. Procentsatsen af kolonier, som viste et differentielt aktivitetstab ved pH-værdi 11,5 mod pH-værdi 7, var 1,4, 1,8, 1,4 og 0,6% af de totale kolonier, som screenedes fra henholdsvis thiol-dGTPas-, -dATPas-, -dTTPas- og -dCTPas-bibliotekerne. Flere af disse negative kloner blev sekvensbestemte og alle viste sig at indeholde en enkelt baseændring, som forventet ud fra det misinkorporeringsbibliotek, hvorfra de kom. Negative mutanter omfattede A36, E170 og V50. To positive mutanter identificeredes som V107 og R213. Forholdet mellem negative og positive var omkring 50:1.

3. Stabilitet og aktivitet af
subtilisinmutanter ved alkalisk pH-værdi

Subtilisinmutanter opnåede, og deres autolytiske stabiliteter blev målt ved tidsforløbet for inaktivering ved pH-værdi 12,0 (fig. 32 og 33). Fra screeningen identificerede positive mutanter (dvs. V107 og R213) var mere modstandsdygtige over for alkalisk induceret autolytisk inaktivering sammenlignet med vildtypen, og negative mutanter (dvs. E170 og V50) var mindre modstandsdygtige. Der fremkaldtes fordelagtigt en anden mutant i position 50 (F50) ved stedrettet mutagenese. Denne mutant var mere stabil end vildtypeenzymet over for alkalisk autolytisk inaktivering (fig. 33). Ved afslutningen af autolyseundersøgelsen bekræftede SDS-PAGE-analyse, at hver subtilisinvariant var autolyseret i et omfang, som var i overensstemmelse med den resterende enzymaktivitet.

De stabiliserende virkninger af V107, R213 og F50 er kumulative, se tabel XXI. Dobbeltmutanten, V107/R213, (fremstillet ved subkloning af en 920 bp EcoRI-KpnI-fragmentet fra p80180V107

ind i 6,6 kb EcoRI-KnpI-fragmentet fra p80180R213), er mere stabil end hver af enkeltmutanterne. Triplemutanten, F50/V107/R213 (fremstillet ved subkloning af 735 bp EcoRI-PvuII-fragmentet fra pF50 (eksempel 2) ind i 6,8 kb EcoRI-PvuII-fragmentet fra p80180/V107), er mere stabilt end dobbeltmutanten V107/R213 eller F50. Inaktivéringskurverne viser en tofaset karakter, som bliver mere udtalt, jo mere stabil den analyserede mutant er. Dette kan skyldes nogen destabiliseringe kemisk(e) modifikation(er) (f.eks. deamidering) under autolyseundersøgelsen og/eller reduceret stabilitet forårsaget af fuldstændig fordøjelse af større autolysepeptider. Disse alkalialautolyseundersøgelser er blevet gentaget på separat oprensende enzymcharger med i alt væsentligt samme resultater. Autolysehastigheder skulle både afhænge af konformationsstabiliteten samt subtilisinvariantens specifikke aktivitet (J.A. Wells et al. (1986), J. Biol. Chem., 261, 6564-6570). Det var derfor muligt, at formindskelserne i autolytisk inaktivéringshastigheder kunne være et resultat af formindskelser i specifik aktivitet af den mere stabile mutant under alkaliske betingelser. Generelt ser det modsatte ud til at være tilfældet. De mere stabile mutanter, om nogen, har en relativt højere specifik aktivitet end vildtypen under alkaliske betingelser, og de mindre stabile mutanter har en relativt lavere specifik aktivitet. Disse raffinerede virkninger på specifik aktivitet for V107/R213 og F50/V107/R213 er kumulative både ved pH-værdi 8,6 og 10,8. Ændringerne i specifik aktivitet kan afspejle små forskelle i substratspecificitet, men det er imidlertid værd at bemærke, at kun positionerne 170 og 107 er inden for 6A af et bundet model-substrat (J.D. Robertus et al. (1972) Biochemistry 11, 2438-2449).

TABEL XXI

Forhold mellem relativ specifik aktivitet ved
pH-værdi 8,6 eller 10,8 og alkaliautolysestabilitet

5

	<u>Enzym</u>	<u>Relativ specifik aktivitet</u>		<u>Alkalisk autolysehalveringstid</u>
		<u>pH 8,6</u>	<u>pH 10,8</u>	<u>(min)b</u>
10	Vildtype	100±1	100±3	86
	Q170	46±1	28±2	13
	V107	126±3	99±5	102
	R213	97±1	102±1	115
	V107/R213	116±2	106±3	130
15	V50	66±4	61±1	58
	F50	123±3	157±7	131
	F50/V107/R213	126±2	152±3	168

20 (a) Relativ specifik aktivitet var gennemsnittet fra tre aktivitetsbestemmelser divideret med vildtypeværdien ved den samme pH-værdi. Den gennemsnitlige specifikke aktivitet hos vildtypeenzymet ved pH-værdi 8,6 og 10,8 var henholdsvis 70 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ og 37 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$.

25 (b) Tiden til at nå 50% aktivitet blev taget fra fig. 32 og 33.

30 F. Tilfældig cassettemutagenese af resterne 197 til 228

Plasmid p λ 222 (Wells et al. (1985) Gene 34, 315-323) blev forøjet med PstI og BamHI og 0,4 kb PstI/BamHI-fragmentet (fragment 1, se fig. 34) oprenset fra en polyacrylamidgel ved elektroeluering.

1,5 kb EcoRI-BamHI-fragmentet fra pS4.5 blev klonet ind i M13mp9. Der udførtes stedrettet mutagenese for at danne A197-

mutanten og samtidig indsætte et stille SstI-sted over codonerne 195-196. Mutant-EcoRI-BamHI-fragmentet blev klonet tilbage i pBS42. pA197-plasmidet blev fordøjet med BamHI og SstI, og 5,3 kb BamHI/SstI-fragmentet (fragment 2) blev oprensset fra lavtsmeltende agarose.

Der syntetiseredes komplementære oligonukleotider til at spænde over regionen af SstI (codonerne 195-196) til PstI (codonerne 228-230). Disse oligodeoxynukleotider blev konstrueret for at (1) genetablere codon 197 til vildtypen, (2) gendanne et stille KpnI-sted, som er til stede i pA222 ved codonerne 219-220, (3) danne et stille SmaI-sted over codonerne 210-211 og (4) fjerne PstI-stedet over codonerne 228-230 (se fig. 35). Der syntetiseredes oligodeoxynukleotider med 2% forurenende nukleotider ved hver syntesecyklus, og f.eks. blev dATP-reagens forsynet med 2% dCTP, 2% dGTP og 2% dTTP. For 97-merer skulle denne 2%'s forgiftning give følgende procentsatser af ikke-mutanter, enkelte mutanter og dobbelte eller højere mutanter per streng med to eller flere misinkorporeringer per komplementærstreng: 14% ikke-mutant, 28% enkelt mutant og 57% med ≥ 2 mutanter, i overensstemmelse med den almene formel:

$$f = \frac{\mu^n}{n!} e^{-\mu}$$

hvor μ er det gennemsnitlige antal mutationer, og n er et mutationsklasseantal, og f brøkdelen af de totale med dette antal mutationer. Komplementære oligodeoxynukleotidpuljer blev phosphoryleret og sammenføjet (fragment 3) og derefter ligeret i et to gange molært overskud i forhold til fragmenterne 1 og 2 i en trevejsligering.

E. coli MM294 blev transformeret med ligeringsreaktionsblandingen, transformationspuljen voksede op natten over, og puljeplasmid-DNA'en isoleredes. Denne pulje repræsenterede $3,4 \times 10^4$ uafhængige transformanter. Denne plasmidpulje blev fordøjet med PstI og derefter anvendt til at gentransformere E. coli. En anden plasmidpulje fremstilles og anvendtes til at transformere B. subtilis (BG2036). Ca. 40% af BG2036-trans-

formanterne udtrykte aktivt subtilisin, bedømt ved ringklaring på caseinplader. Flere af de ikke-udtrykkende transformanter blev sekvensbestemte og viste sig at have indsættelser eller deletioner i de syntetiske cassetter. Udtrykkene BG2036-mutanter blev anbragt på række i mikrotiterskåle med 150 µl LB/12,5µg/ml chloramphenicol (cmp) per brønd, inkuberet ved 37°C i 3-4 timer og derefter præget to gange på nitrocellulosefiltre, som var lagt på LB 1,5% skummetmælk/5µg/ml cmp-plader og inkuberet natten over ved 37°C (indtil ringene var ca. 4-8 mm i diameter). Filterne blev derefter løftet over på bunker af filtrerpapir, som var mættet med 1 x Tide-detergent af kommercial kvalitet, 50 mM Na₂CO₃, pH-værdi 11,5 og inkubert ved 65°C i 90 minutter. Plader, som var vokset natten over, blev Commassie-farvet og affarvet for at etablere basis-ekspressionsniveauer. Efter denne behandling blev filterne lagt tilbage på pH-værdi 7/skummetmælk/20µg/ml tetracyklinplader og inkuberet ved 37°C i 4 timer natten over.

Mutanter, som ved screeningen for stabilitet ved høj pH-værdi, 20 var blevet identificeret som værende mere alkalisk stabile, blev oprenset og analyseret for autolytisk stabilitet ved høj pHværdi eller høj temperatur. Dobbeltsmutanten C204/R213 var mere stabil end vildtypen ved både høj pH-værdi og høj temperatur (tabel XXII).

Denne mutant blev optrevlet i enkeltmutantophav (C204 og R213) ved at skære ved det unikke SmaI-restriktionssted (fig. 35) og enten ligere vildtypesekvensen 3' for SmaI-stedet til dannelse af den enkelte C204-mutant eller ligere vildtypesekvensen 5' for SmaI-stedet til dannelse af den enkelte R213-mutant. Af de to enkelte ophav, var C204 næsten lige så alkalisk stabil som den dobbelte modermutant (C04/R213) og lidt mere termisk stabil, se tabel XXII. R213-mutanten var kun lidt mere stabil end vildtypen under begge betingelser (ikke vist).

En anden mutant, som var identificeret fra screeningen af den tilfældige cassettemutagenese ved 197-228, var R204. Denne mutant var mere stabil end vildtypen ved både høj pH-værdi og temperatur, men mindre stabil end C204.

TABEL XXIISubtilisinvarianters stabilitet

5 Oprensede enzymer (200 µg/ml) blev inkuberet i 0,1 M phosphat, pH-værdi 12 ved 30°C til alkalisk autolyse eller i 2 mM CaCl₂, 50 mM MOPS, pH-værdi 7,0 ved 62°C til termisk autolyse. På forskellige tidspunkter analyseredes prøver for resterende enzymaktivitet. Inaktiveringerne var groft taget pseudo-første ordens, og t 1/2 angiver den tid, som det tog at nå 50% af udgangsaktiviteten i to separate eksperimenter.

15	<u>Subtilisinvariant</u>	t 1/2 (alkalisk autolyse)		t 1/2 (termisk autolyse)	
		Eksp.	Eksp.	Eksp.	Eksp.
		# 1	# 2	# 1	# 2
	Vildtype	30	25	20	23
	F50/V107/R213	49	41	18	23
20	R204	35	32	24	27
	C204	43	46	38	40
	C204/R213	50	52	32	36
	L204/R213	32	30	20	21

25

G. Tilfældig mutagenese ved codon 204

Baseret på de ovenstående resultater blev codon 204 målet for tilfældig mutagenese. Mutagene DNA-cassetter (for codon ved 204) indeholdt alle en fikseret R213-mutation, som viste sig at forøge C204-mutantens stabilitet lidt.

30 Plasmid-DNA, som koder for subtilisinmutanten C204/R213, blev fordøjet med SstI og EcoRI, og et 1,0 kb EcoRI/SstI-fragment isoleredes ved elektroeluering fra polyacrylamidgel (fragment 1, se fig. 35).

35 C204/R213 blev også fordøjet med SmaI og EcoRI, og det 4,7 kb store fragment, indeholdende vektorsekvenser og 3'-delen af

den kodende region, isoleredes fra lavtsmeltende agarose (fragment 2, se fig. 36).

Fragmenterne 1 og 2 blev kombineret i fire separate trevejsligeringer med heterophosphorylerede fragmenter 3 (se figurerne 36 og 37). Denne heterophosphorylering af syntetiske duplexer skulle fortrinsvis drive den phosphorylerede streng ind i plasmidligeringsproduktet. Fire plasmidpuljer, svarende til de fire ligeringer, blev restriktionsbehandlet med SmaI for at linearisere enhver enkeltskåret C204/R213, som var til stede fra fragment 2-isolering, hvorved baggrunden for C204/R213 reduceredes. *E. coli* blev derefter gentransformeret med SmaI-restriktionsbehandlede plasmidpuljer til opnåelse af et andet sæt plasmidpuljer, som i alt væsentligt er fri for C204/R213 og ethvert ikke-segregeret heteroduplex materiale.

Disse andengangsberigede plasmidpuljer anvendtes derefter til at transformere *B. subtilis* (8G2036), og de resulterende fire mutantpuljer blev screenet for kloner, som udtrykte subtilisin, der var modstandsdygtig over for inaktivering ved høj pH-værdi/temperatur. Mutanter, som blev fundet positive ved en sådan screening, blev yderligere karakteriseret og identificeret ved sekvensbestemmelse.

Mutanten L204/R213 viste sig at være lidt mere stabil end vildtypesubtilisinen, se tabel XXII.

Efter have beskrevet de foretrukne udførelsesformer af den foreliggende opfindelse vil det fremgå for fagfolk inden for området, at der kan foretages forskellige modifikationer af de beskrevne udførelsesformer og at sådanne modifikationer skal opfattes som værende inden for omfanget af den foreliggende opfindelse.

P A T E N T K R A V

1. Subtilisinmutant, som hidrører fra substitution af mindst én aminosyrerest i en forstadiesubtilisin med en anden aminosyre, således at subtilisinmutanten har mindst en egenskab, som er forskellig fra den samme egenskab hos forstadiesubtilisinen, kendtegnet ved substitutionen ved en eller flere af Tyr21, Thr22, Ser24, Asp36, Ala45, Gly46, Ala48, Ser49, Met50, Asn77, Ser87, Lys94, Val95, Leu96, Ile107, Gly110, Met124, Lys170, Tyr171, Pro172, Asp197, Met199, Ser204, Lys213, His67, Leu135, Gly97, Ser101, Gly102, Glu103, Gly127, Gly128, Pro129, Tyr214 og Gly215 af Bacillus amyloliquefaciens-subtilisin og ækvivalente aminosyrerester i andre forstadiesubtilisiner.
2. Subtilisinmutant, der har en aminosyresekvens, som er afledt fra aminosyresekvensen af en forstadiesubtilisin ved substitution af mere end en aminosyrerest i forstadiesubtilisinens aminosyresekvens med en anden aminosyre, således at subtilisinmutanten har mindst én egenskab, som er forskellig fra den samme egenskab hos forstadiesubtilisinen, kendtegnet ved substitutioner ved mere end én af Tyr21, Thr22, Ser24, Asp32, Ser33, Asp36, Ala45, Ala48, Ser49, Met50, Ser87, Lys94, Val95, Tyr104, Ile107, Gly110, Met124, Ala152, Asn155, Glu156, Gly166, Gly169, Lys170, Tyr171, Pro172, Phe189, Asp197, Met199, Ser204, Lys213, Tyr217, Ser221, Met222, His67, Leu135, Gly97, Ser101, Gly102, Glu103, Gly127, Gly128, Pro129, Tyr214 og Gly215 af Bacillus amyloliquefaciens-subtilisin og ækvivalente aminosyrerester i andre forstadiesubtilisiner med det forbehold, at når substitutionen foretages ved enhver rest i gruppen Asp32, Ser 33, Tyr 104, Ala152, Asn155, Glu156, Gly166, Gly169, Phe189, Tyr 217 og Met222, foretages der ligeledes en substitution ved mindst én specifiseret stilling, som ikke er i denne gruppe.
3. Mutant ifølge krav 2, hvori kombinationerne er valgt blandt Thr22/Ser87, Ser24-/Ser87, Ala45/Ala48, Ser49/Lys94, Ser49/Val95, Met50/Val95, Met50/Gly110, Met50-/Met124, Met50/Met222, Met124/Met222, Tyr21/Thr22, Met50/Met124/Met222,

Tyr21/Thr22/Ser87, Met50/Glu156/Gly166/ Tyr217, Met50/Glu156/Tyr217, Ile170/-Lys213, Ser204/Lys213, Met50/Ile107/Lys213 og Ser24/Met50/Ile107/Glu156/-Gly166/Gly169/Ser204/Lys213/Gly215/Tyr217.

- 5 4. Subtilisinmutant hidrørende fra deletion af en eller flere aminosyrerester i en forstadiesubtilisin, der er ækvivalent med 161-164 i B. amyloliquefaciens-subtilisin, hvilken deletion foretages alene eller i kombination med substitutioner i forstadiesubtilisins aminosyresekvens og frembringer mindst én egenskab, som er forskellig fra den samme egenskab i forstadiesubtilisinen.

10

5. Subtilisinmutant med ændret substratspecificitet i sammenligning med en forstadiesubtilisin, hvilken mutant hidrører fra substitution af en anden aminosyre i resten svarende til Leu+126 i B. amyloliquefaciens-subtilisin, alene eller i kombination med andre substitutioner eller deletioner i forstadiesubtilisinens aminosyresekvens.

15

6. Subtilisinmutant med ændret substratspecificitet i sammenligning med en forstadiesubtilisin, hvilken mutant hidrører fra substitution af en anden aminosyre ved resten svarende til Asp + 99 i B. amyloliquefaciens-subtilisin, alene eller i kombination med andre substitutioner eller deletioner i forstadiesubtilisinens aminosyresekvens.

20

7. DNA-sekvens, der koder for mutanten ifølge et af de foregående krav.
8. Ekspressionsvektor, der indeholder mutant-DNA-sekvensen ifølge krav 7.

- 25 9. Værtscelle, der er transformeret med ekspressionsvektoren ifølge krav 8.

30

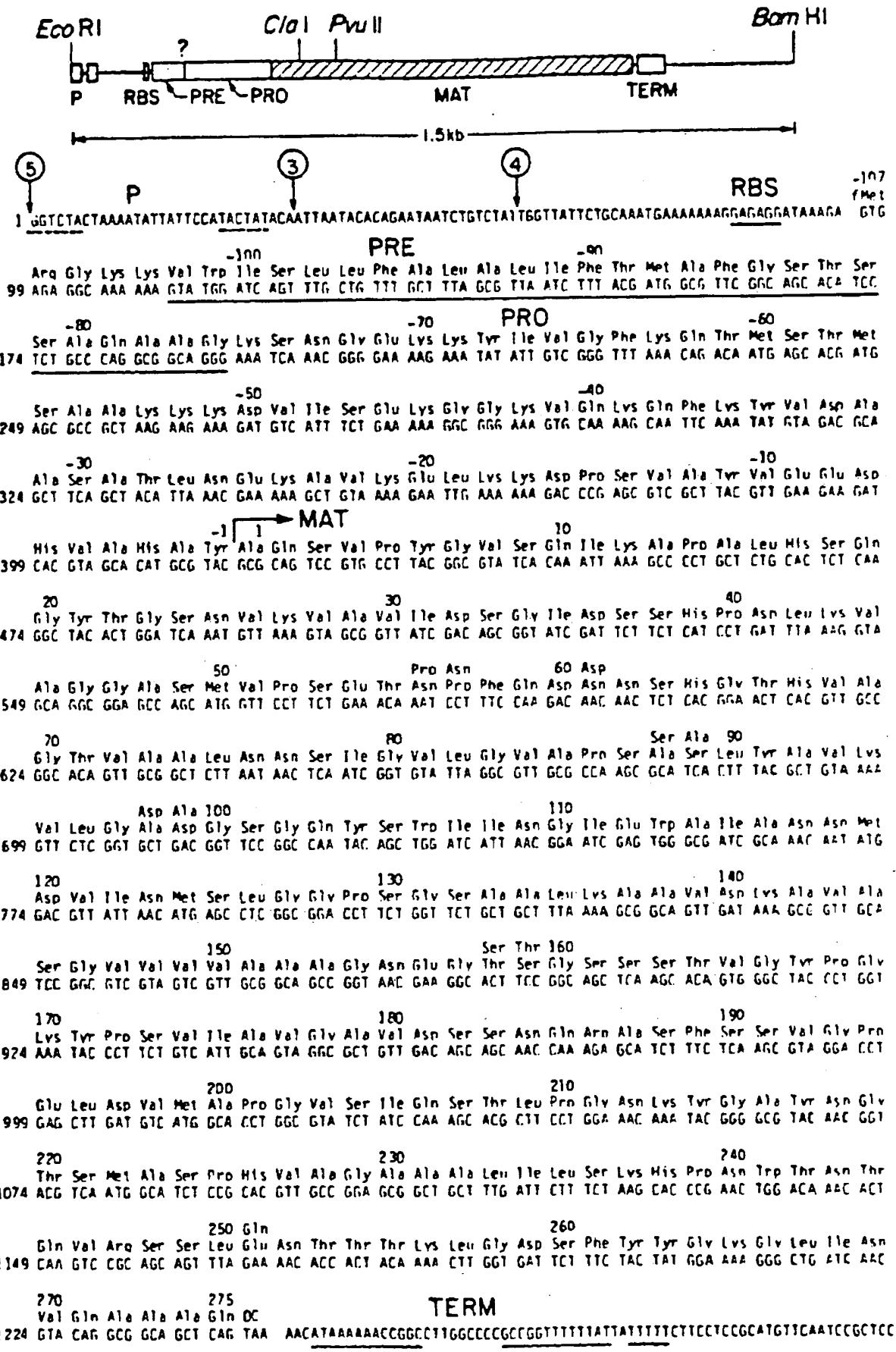


FIG. -1

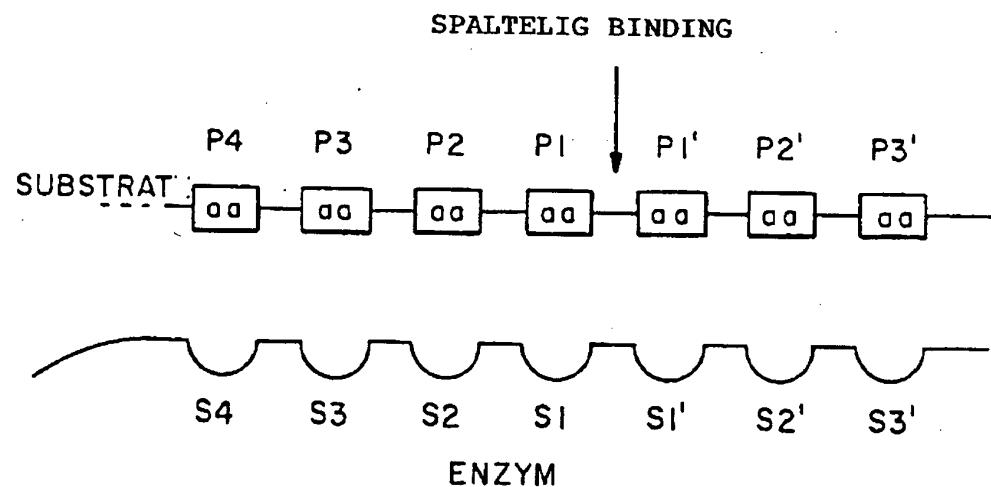


FIG.-2

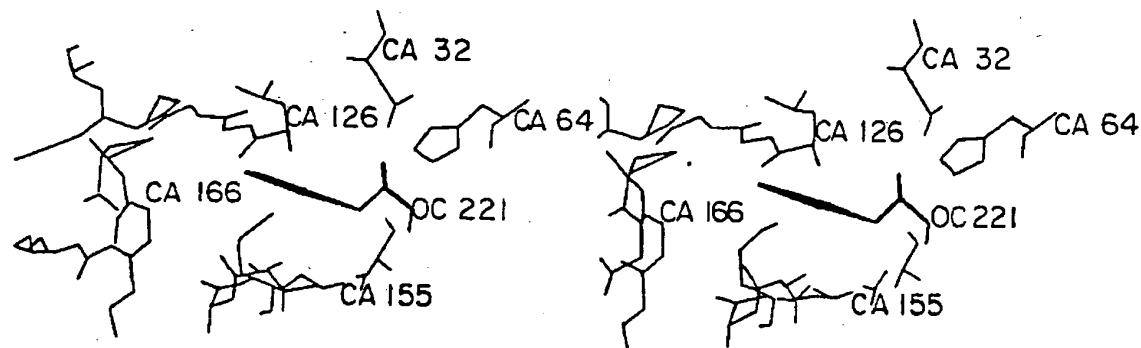


FIG.-3

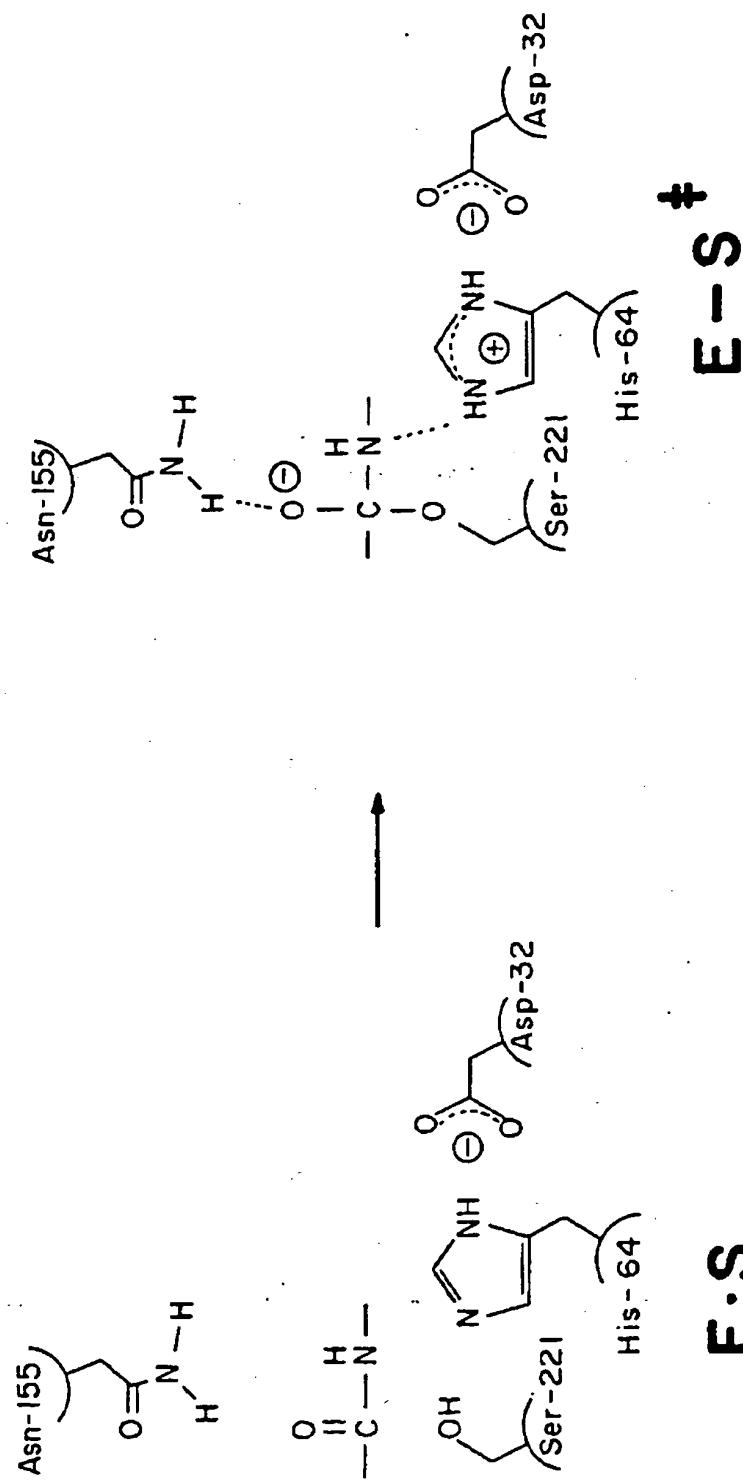


FIG. - 4

Homologous Bacillus protease

1. *Bacillus amyloliquifaciens*
 2. *Bacillus subtilis* var. I168
 3. *Bacillus licheniformis* (carlsbergensis)

1	A	Q	S	U	P	Y	6	U	S	Q	I	K	A	P	A	L	H	S	Q	20
A	Q	S	U	P	Y	6	I	S	Q	I	K	A	P	A	L	H	S	Q	6	
A	Q	T	V	P	Y	6	I	P	L	I	K	A	D	K	U	Q	A	Q	6	
21	Y	T	G	S	N	U	K	V	A	V	I	D	S	6	I	D	S	S	H	40
Y	T	G	S	N	U	K	V	A	V	I	D	S	6	I	D	S	S	H	P	
F	K	6	A	N	U	K	V	A	V	L	D	T	6	I	Q	A	S	S	H	
41	D	L	K	V	A	6	6	A	S	M	U	P	S	E	T	N	P	F	Q	60
D	L	N	U	U	R	6	6	A	S	F	U	P	S	E	T	N	P	Y	Q	
D	L	N	U	U	S	6	6	A	S	F	U	A	6	E	A	Y	N	T	•	
61	N	N	S	H	6	T	H	U	A	6	T	U	A	A	L	N	N	S	I	88
G	S	S	H	6	T	H	U	A	6	T	I	A	A	L	N	N	S	I	6	
6	N	6	H	6	T	H	U	A	6	T	U	A	A	L	D	N	T	T	6	
81	U	L	6	U	A	P	S	A	S	L	Y	A	U	K	U	L	6	A	D	100
U	L	6	U	S	P	S	A	S	L	Y	A	U	K	U	L	D	S	T	6	
U	L	6	U	A	P	S	U	S	L	Y	A	U	K	U	L	N	S	S	6	
101	S	6	Q	Y	S	W	I	I	N	6	I	E	W	A	I	A	N	N	M	120
S	6	Q	Y	S	W	I	I	I	N	6	I	E	W	A	I	S	N	N	M	
S	6	S	Y	S	6	I	V	S	6	I	E	W	A	T	T	N	6	M		

FIG.—5A—J

121	I	N	M	S	L	6	6	P	S	6	S	A	A	L	K	A	A	U	D
V	I	N	M	S	L	6	6	A	T	6	S	T	A	M	K	T	A	U	D
V	I	N	M	S	L	6	6	A	S	6	S	T	A	M	K	T	A	U	D
130																			
141	A	U	V	A	S	6	U	U	V	A	A	A	6	N	E	6	T	S	6
K	A	U	V	S	S	6	I	U	A	A	A	A	6	N	E	6	S	S	6
N	A	Y	A	R	G	U	U	U	A	A	A	A	6	N	S	6	N	S	6
150																			
161	S	S	S	T	U	6	Y	P	S	K	Y	P	S	V	I	A	U	6	A
S	T	S	T	V	6	Y	Y	P	A	K	Y	D	S	U	I	A	U	6	A
S	T	N	T	I	6	Y	P	A	K	Y	D	S	S	U	I	A	U	6	A
170																			
181	D	S	S	N	Q	R	A	S	F	S	S	V	6	P	E	L	D	U	M
N	S	S	N	Q	R	A	A	S	F	S	S	A	6	S	E	L	D	U	M
D	S	N	S	N	R	A	A	S	F	S	S	V	6	A	E	L	D	U	M
190																			
201	P	6	U	S	I	Q	S	T	L	P	6	N	K	Y	6	A	Y	N	6
P	6	V	S	I	Q	S	S	T	L	P	6	6	T	Y	6	A	Y	N	6
P	6	A	G	U	Y	S	T	Y	P	T	N	T	Y	A	T	L	N	6	T
210																			
221	S	M	A	S	P	H	U	A	6	A	A	A	L	I	L	S	K	H	P
S	M	A	A	T	P	H	U	A	6	A	A	A	L	I	L	S	K	H	P
S	M	A	A	S	P	H	U	A	6	A	A	A	L	I	L	S	K	H	P
230																			
241	W	T	N	T	Q	U	R	S	S	L	E	N	T	T	T	K	L	6	D
W	T	N	A	S	Q	U	R	D	R	L	E	S	T	A	T	T	Y	L	S
L	S	A	S	Q	U	R	R	N	R	L	S	S	T	A	T	T	Y	L	S
250																			
261	F	Y	Y	6	K	6	L	I	N	V	Q	A	A	A	A	Q			
F	Y	Y	6	K	6	L	I	N	V	Q	A	A	A	A	Q				
F	Y	Y	6	K	6	L	I	N	V	E	A	A	A	A	Q				
270																			

FIG.—5A-2

RETLEN IND AF B. AMYLOLIQUIFACIENS SUBTILISIN OG THERMITASE
 1.B.amyloliquifaciens subtilisin
 2.thermitase

A	Q	S	V	*	P	Y	*	*	*	*	*	*	*	8	U	S	Q	I	K	A
Y	T	P	N	D	P	Y	F	S	S	R	Q	Y	6	P	Q	K	I	Q	A	
P	A	L	H	S	Q	6	Y	T	G	S	N	U	K	U	A	U	I	D	S	
P	O	A	W	D	I	A	E	*	G	S	S	A	K	I	A	I	U	D	T	
B	I	D	S	S	H	P	D	L	*	*	K	U	A	6	S	A	S	M	U	
G	U	Q	S	N	H	P	D	L	A	B	K	V	V	6	6	U	D	F	V	
P	S	E	T	N	P	F	Q	0	0	N	N	S	H	6	T	H	U	A	B	
D	N	D	S	T	P	*	0	N	S	N	6	H	6	T	H	C	A	G	I	
U	A	A	L	*	N	N	6	I	6	V	L	6	U	A	P	S	A	S	L	
A	A	A	U	T	N	N	S	T	6	I	A	G	T	A	P	K	A	S	I	
Y	A	U	K	U	L	6	A	D	G	6	6	6	Q	Y	S	W	I	I	N	
L	A	V	R	U	L	D	N	S	6	6	6	6	T	U	T	A	V	A	6	
I	E	W	A	I	A	N	N	M	D	U	J	N	M	S	L	6	S	P	S	
I	T	Y	A	A	D	Q	6	A	K	U	I	S	L	S	L	6	6	T	V	
G	S	A	A	L	K	A	A	U	D	K	A	U	A	S	6	U	U	U	U	
G	N	S	6	L	Q	Q	A	V	N	Y	A	W	N	K	6	6	U	U	U	

FIG.-5B-I

A	A	A	S	N	E	B	T	S	160	S	S	S	T	U	S	Y	P	S	K
A	A	A	S	N	A	S	N	T	A	*	*	*	*	P	N	Y	P	A	Y
Y	P	S	V	I	A	V	G	A	180	D	B	S	N	O	R	A	S	F	S
Y	S	N	A	I	A	V	A	B	T	D	Q	N	D	N	K	S	S	F	S
S	U	G	P	E	L	D	V	M	200	A	P	6	U	S	I	Q	S	T	L
T	Y	G	S	U	V	D	V	A	A	P	8	5	W	I	Y	S	T	Y	P
S	N	K	Y	S	A	Y	N	G	220	T	S	M	A	S	P	H	U	A	G
T	S	T	Y	A	S	L	S	G	T	S	M	A	T	P	H	U	A	6	
																			A
																			U
A	A	L	I	L	S	K	H	P	240	N	U	T	N	T	Q	U	R	S	S
A	G	L	L	A	S	Q	B	R	A	S	*	*	A	S	N	I	R	A	L
																			I
E	N	T	T	T	K	*	L	G	260	D	S	F	Y	Y	G	K	S	L	I
E	N	T	A	D	K	I	S	G	T	E	T	Y	W	A	K	S	R	U	
																			N
270	V	Q	A	A	Q	Q	Y												
A	Y	K	A	U	Q	Y													

FIG.—5B-2

TOTAL BEVAREDE RESTER I SUBELLISINER

1		10		20
•	•	P	•	•
21		30		40
•	•	8	•	H
41		50		60
•	•	•	V	•
61		70		80
•	•	H 6 T H	6	•
81		90		100
•	•	6	U L	6
101	S	110		120
8	•	6	•	•
121		130		140
•	•	L 6	•	•
141		150		160
•	•	6	N	•
161		170		180
•	•	Y P	•	•
181		190		200
•	•	S F S	•	•
201	P	210		220
6	•	•	•	6 T
221	S M A	230		240
•	•	P H V A S	•	•
241		250		260
•	•	R	•	•
261		270		
•	•	N	•	

FIG.—5C

INAKTIVERING AF L222 MED
METACHLORPERBENZOESYRE

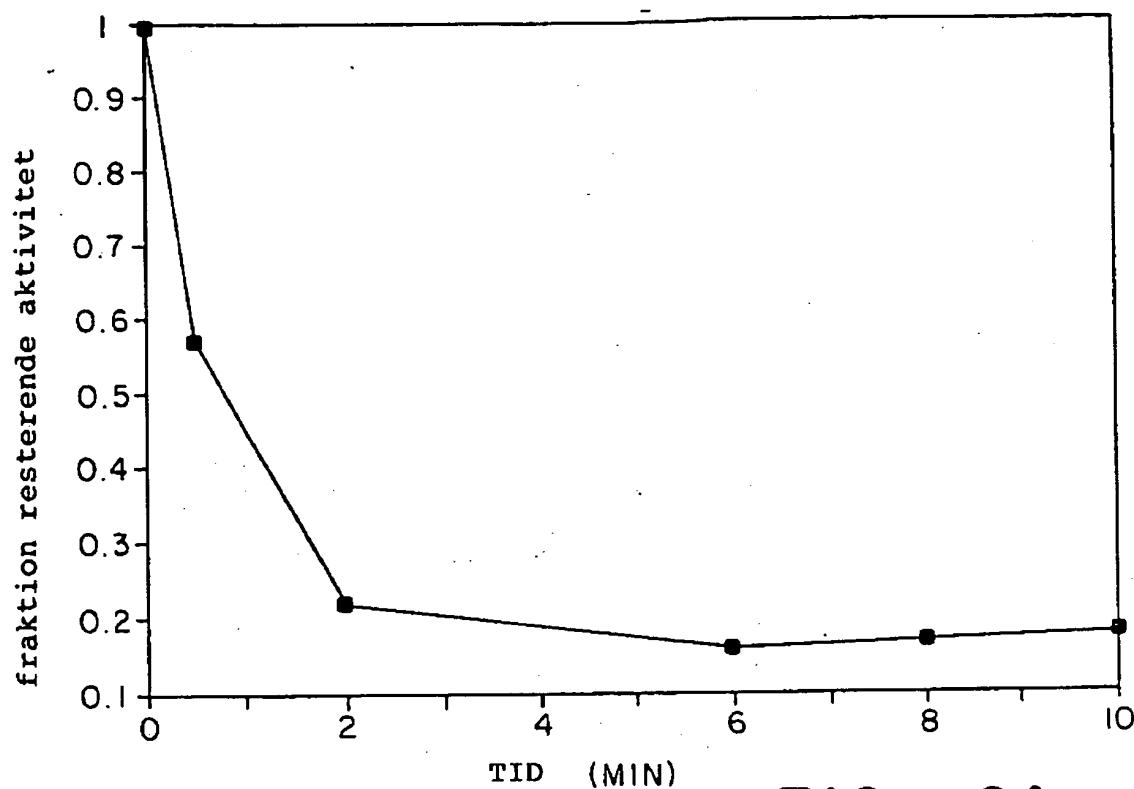


FIG. - 6A

INAKTIVERING AF Q222 MED DPDA
(diperbenzoesyre)

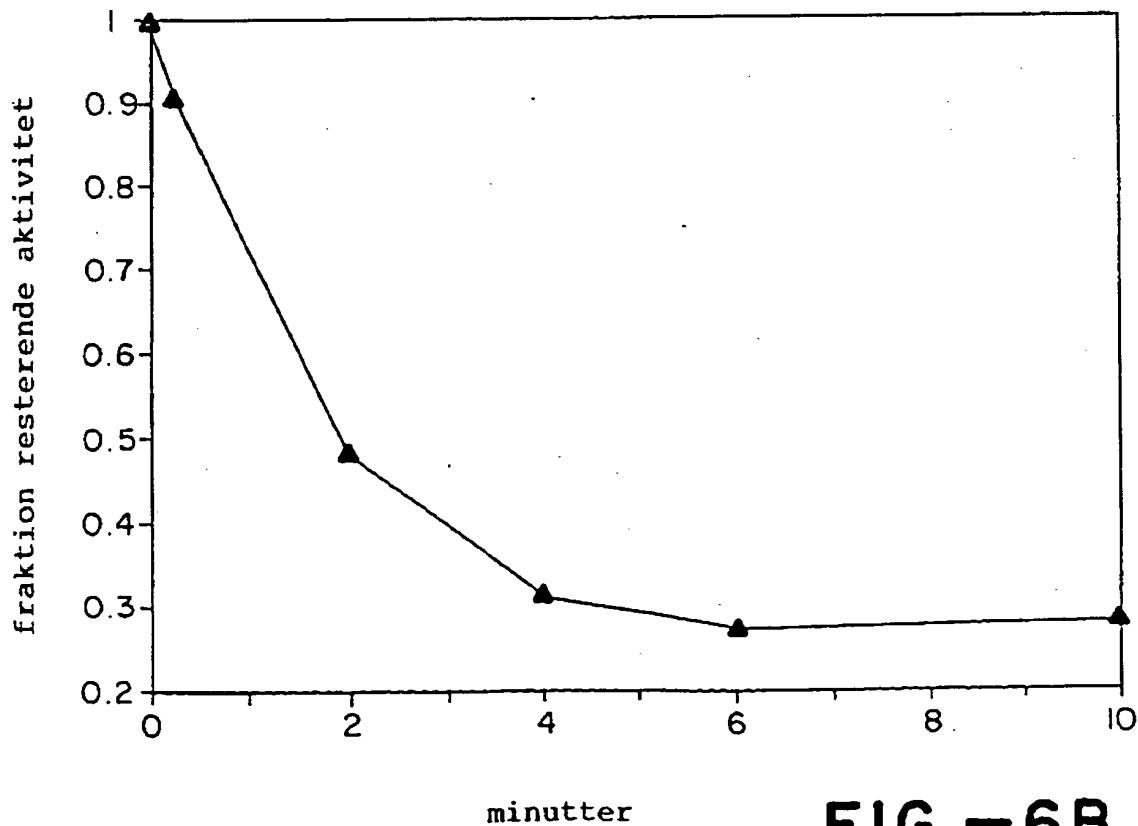


FIG. - 6B

DK 175523 B1

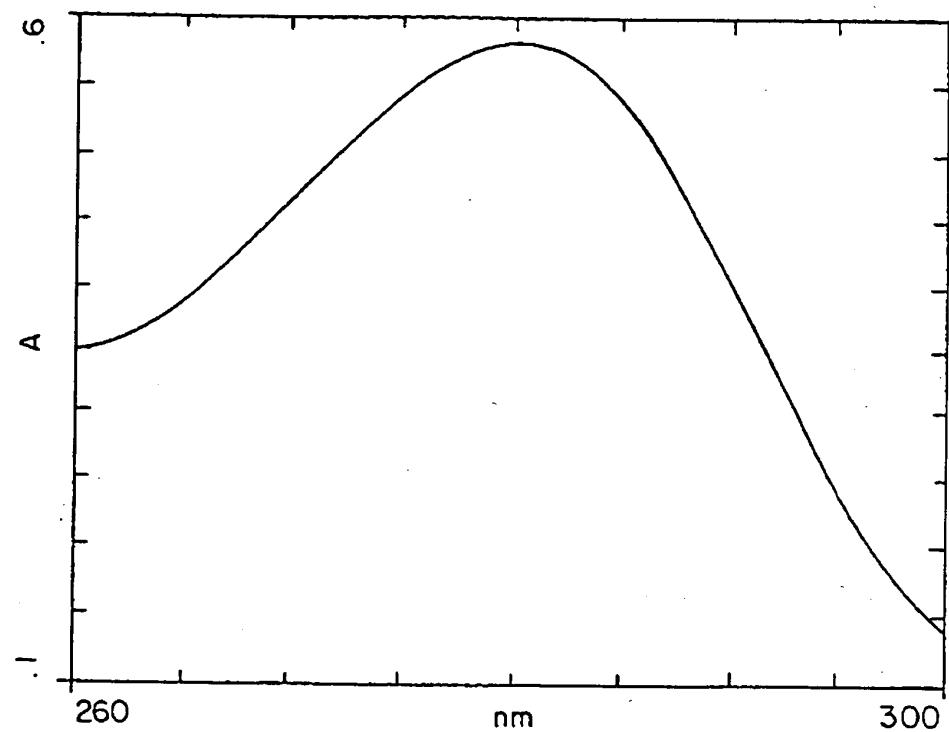


FIG. - 7A

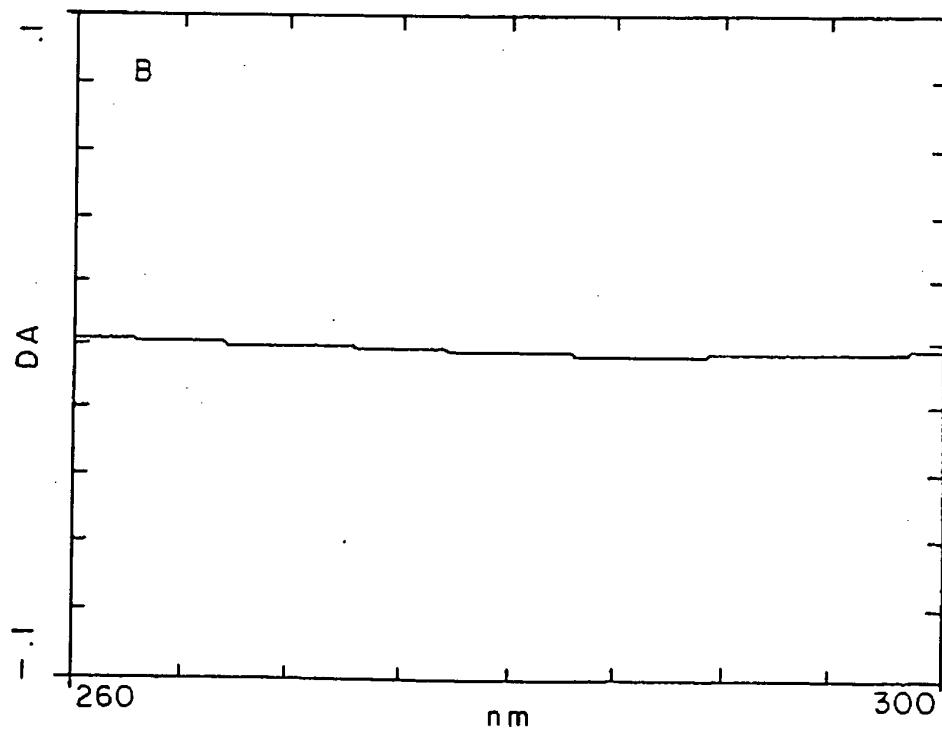


FIG. - 7B

DK 175523 B1

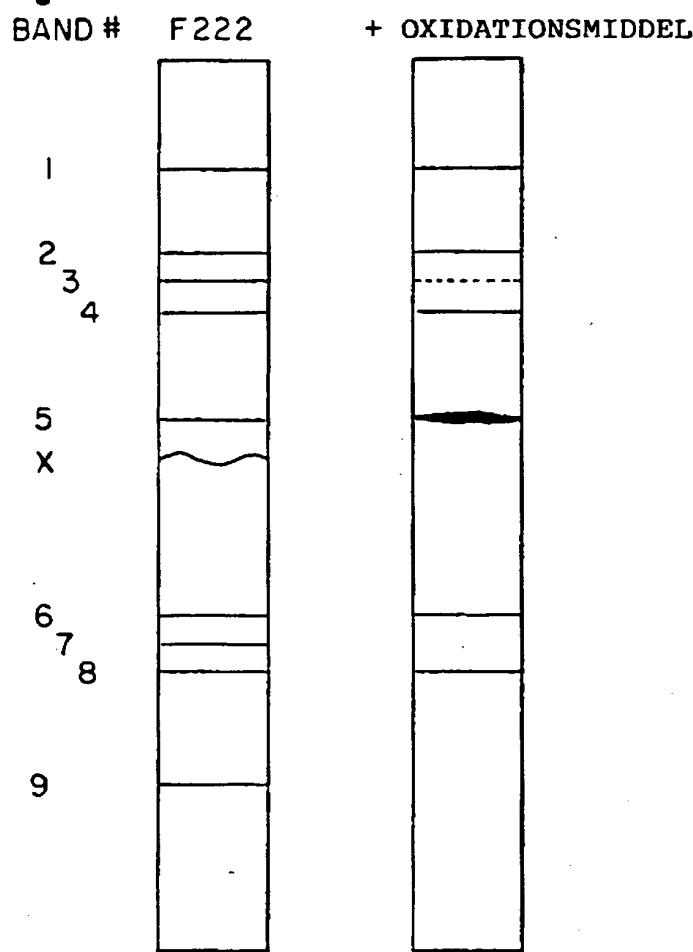


FIG.- 8

CNBr -FRAGMENTKORT AF F222-MUTANT

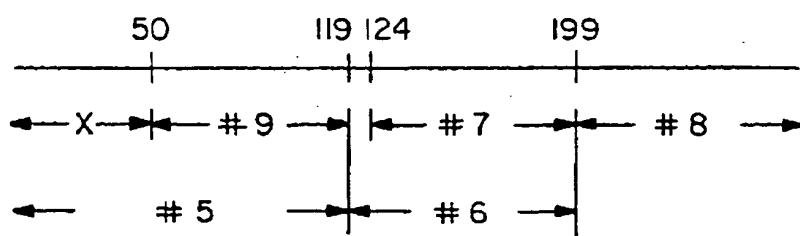


FIG.- 9

1. Codonnummer: 43 45
2. Vildtypeaminosyresekvens: Lys-Val-Ala-Gly-Gly-Ala-Ser-Met-Val-Pro-Ser
3. Vildtype-DNA-sekvens: 5'-AAG-GTA-GCA-GGC-GGA-GCC-AGC-ATG-GTG-ATG-CCT-TCT
TTC-CAT-CGT-CCG-CCT-CGG-TAC-TCG-TAC-CAA-GGA-AGA-5'
4. pΔ50:

 5' - AAG-GCC-T-----GC-ATG-GTA-CCT-TCT
 TTC-CGG-A-----CG-TAC-CAT-GGA-AGA-5'
 SmaI KpnI PstI EcoRI
5. pΔ50 skåret med SmaI/KpnI

 5' - AAG-G
 TTC-CP
6. Skåret pΔ50 ligget ned cassetter: 5'-AAG-GTA-GCA-GGC-GGA-GCC-AGC-ATG-GTG-ATG-CCT-TCT
TCC-CAT-CGT-CCG-CCT-CGG-TCG-TAC-CAT-GGA-AGA-5'
7. Mutageneseprinter for pΔ50:

 5' - CT-GAT-TTA-AAG-GCC-TGC-ATG-GTA-CCT-TCT-GA
8. Fremstillede mutanter:
 V45, P45, V45/P48, E46, E48, V48, C49, C50, F50

FIG.—10

1. Codonnummer: 117 120 124 126 130
2. Vildtypeaminosyresekvens: Asn-Asn-Met-Asp-Val-Ile-Asn-Met-Ser-Leu-Gly-Gly-Pro-Ser
3. Vildtype-DNA-sekvens: 5'-AAC-AAT-ATG-GAC-GTT-ATT-AAC-ATG-AGC-CTC-GGC-GGA-CCT-TCT
TTG-TTA-TAC-CTG-CAA-TAA-TTG-TAC-TCG-GAG-CCG-CCT-GGA-AGA-5'
4. pΔ124: * * * * *
5'-AAC-AAT-ATG-GAT-ATC-----C-GGG-GGC-CCT-TCT
TTG-TTA-TAC-CTA-TAG-----G-CCC-CCG-GGA-AGA-5'
Eco RV Apa I
5. pΔ124 skæret med EcoRV 5'-AAC-AAT-ATG-GAT *
og ApaI TTG-TTA-TAC-CTAp
6. Skæret pΔ124 ligeret 5'-AAC-AAT-ATG-GAT-GTT-AAT-AAC-ATG-AGC-CTC-GGC-GGC-CCT-TCT
med cassetter: TTG-TTA-TAC-CTA-CAA-TAA-TTG-TAC-TCG-GAG-CCG-GGA-AGA-5'
7. Mutageneseprinter * * * * *
for pΔ124: 5'-AAC-AAT-ATG-GAT-ATC-C-GGG-GGC-CCR-TCT-GGT-TCT-3'
8. Fremstillede mutanter: L124, L124 AND C126

FIG.—II

VIRKNING AF DEDA PÅ MUTANTER VED 1124 OG 50

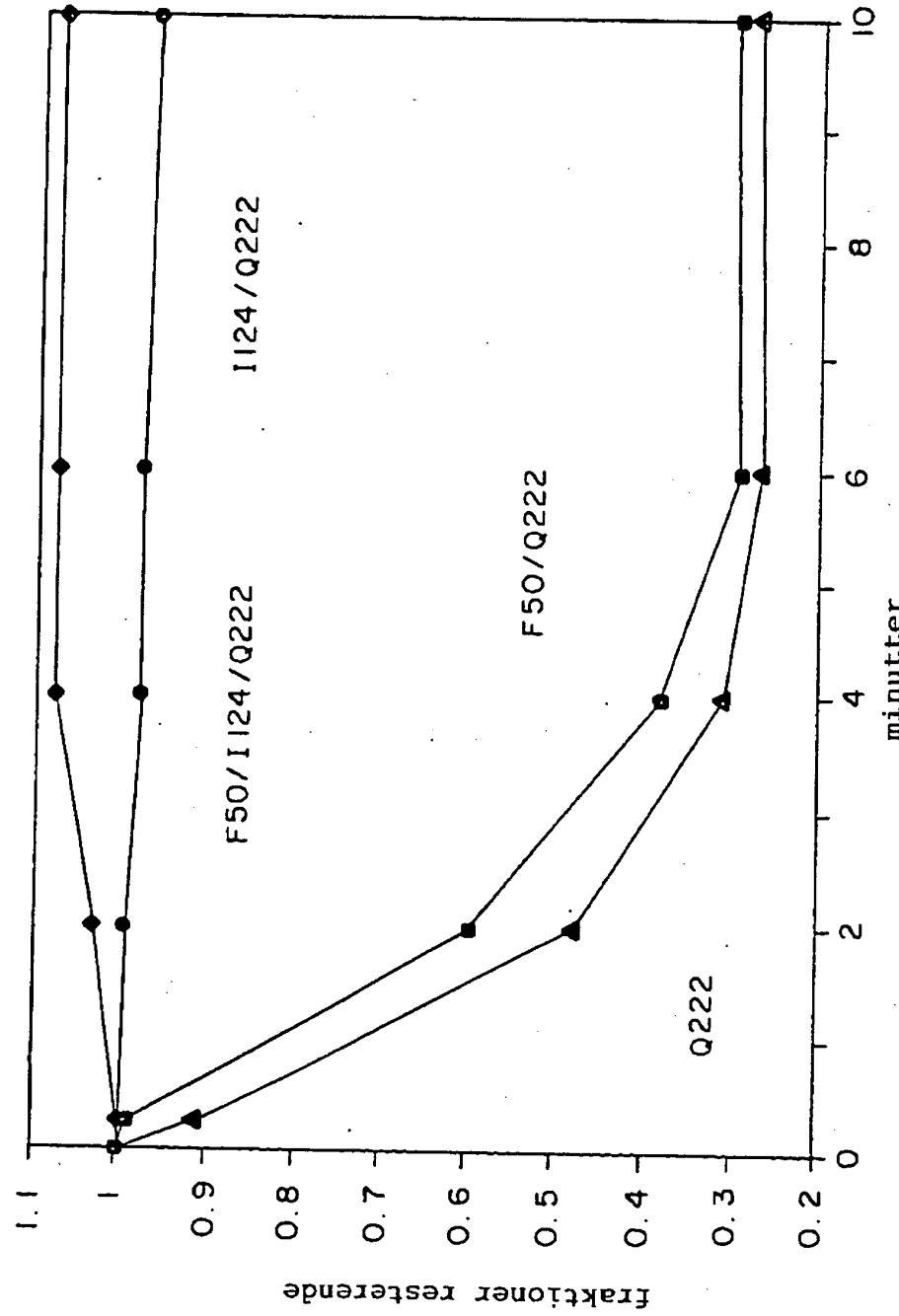


FIG. - 12

- Codon: **166**
Vildtypeaminosyresekvens: Thr Ser Gly Ser Ser Thr Val Gly Tyr Pro Gly
1. **vildtype-DNA-sekvens:** 5'-ACT TCC GGC AGC TCA AGC ACA GTG GGC TAC CCT GGT-3'
 3'-TGA AGG CCG TCG AGT TCG TGT CAC CCG ATG GGA CCA-5'
2. **pΔ166-DNA-sekvens:** * 5'-ACT TCC GGG AGC TCA A-----* C CCC GGT-3'
 3'-TGA AGG CCC TCG AGT I-----* G GGC CCA-5'
 SacI XmaI
3. **pΔ166 skåret med SacI og XmaI:** * 5'-ACT TCC GGG AGC T
 3'-TGA AGG CCCp
4. **Skåret pΔ166 ligeret med duplex-DNA-cassettepuljer:** *** * 5'-ACT TCC GGG AGC TCA AGC ACA GTG NNN TAC CCG GGT-3'
 3'-TGA AGG CCC TCG AGT TCG TGT CAC NNN ATG GGC CCA-5'

MUTAGENESEPRIMER - 37 MER

5' AA GGC ACT TCC GGG AGC TCA ACC CGG GTA AA TAC CCT 3'**FIG. — 13**

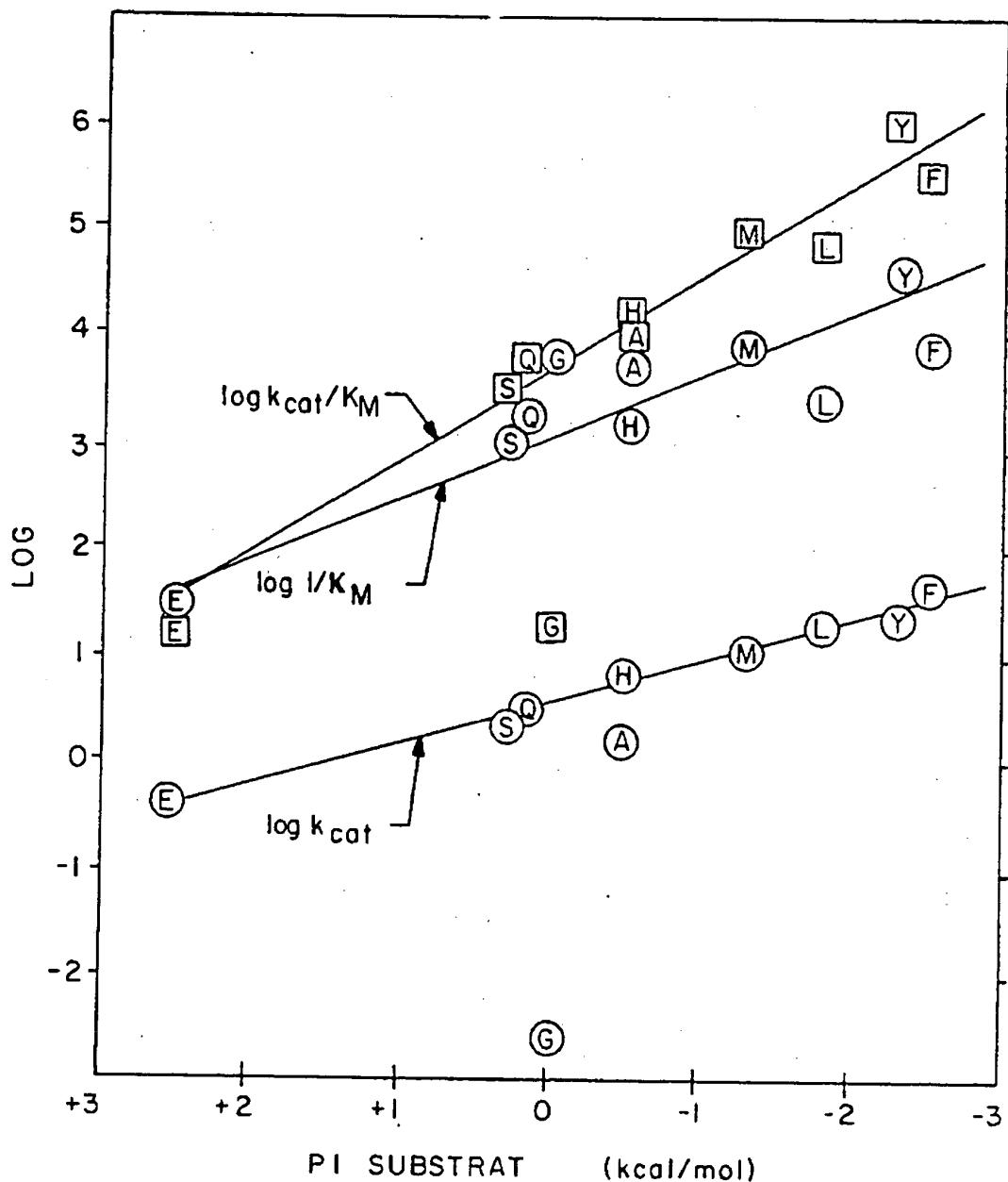
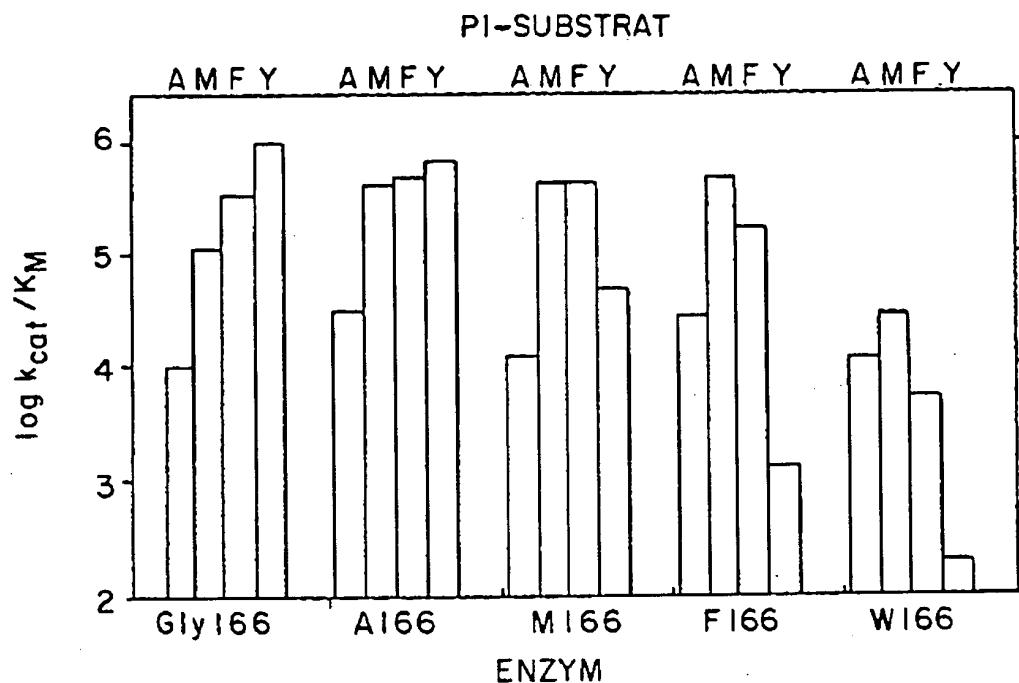
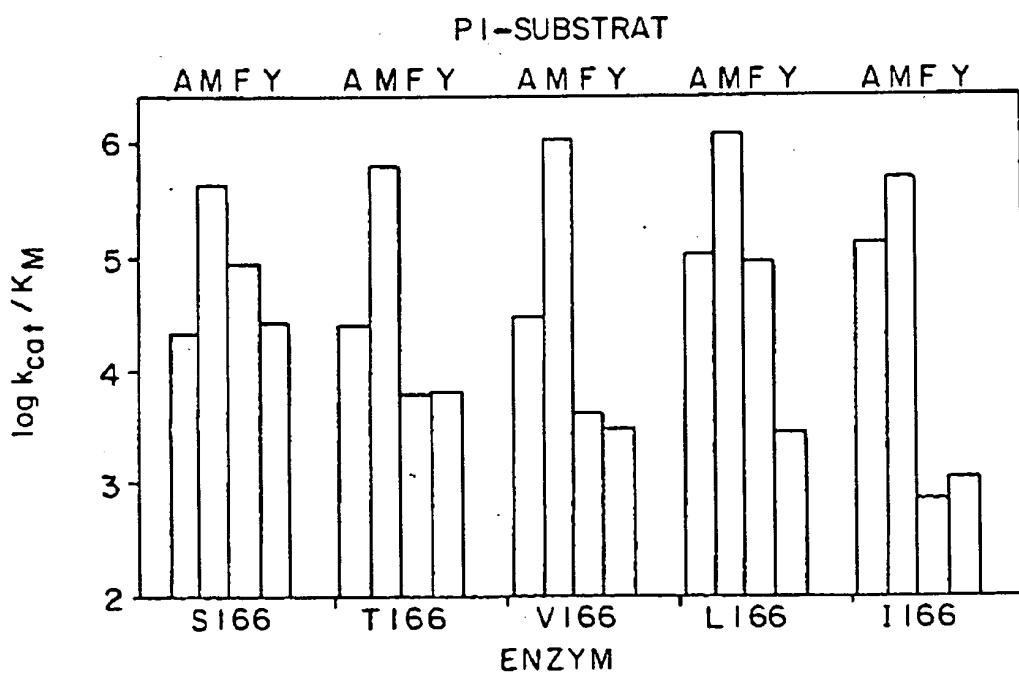


FIG. - 14

**FIG.-15A****FIG.-15B**

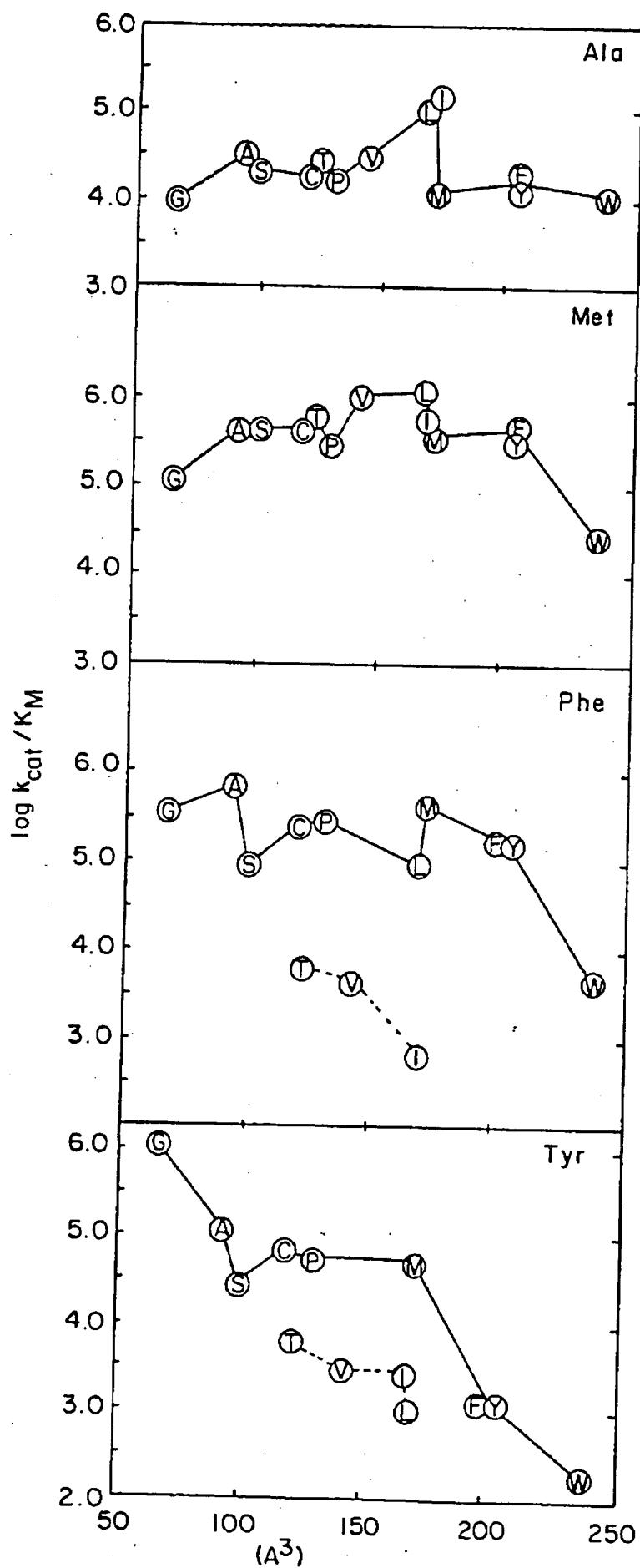


FIG.-16

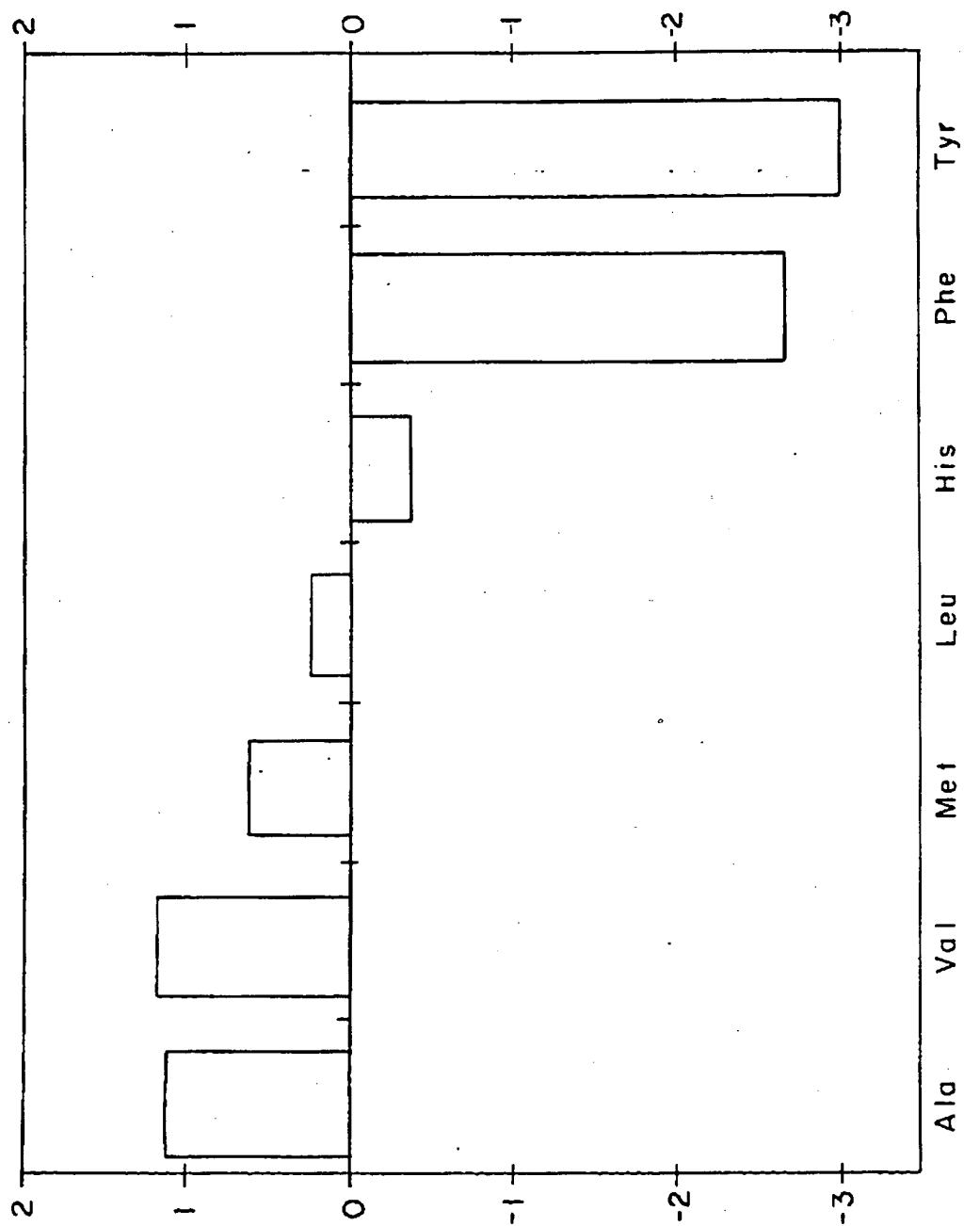


FIG. - 17

$$\frac{\log (k_{cat}/K_M) \text{ G1y166}}{(k_{cat}/K_M) \text{ Ile 166}}$$

Gyr-169-CASSETTE-MUTAGENESE

- CODON:**
- VILDTYPEPEAMINOSYRESEKvens:
- 1.** VILDTYPE-DNA-SEKvens
- 5' TCA AGC ACA GTG GGC TAC CCT GGT AAA TAC CCT TCT 3'
3' AGT TCG TGT CAC CCC ATG GGA CCA TTT ATG GGA AGA 5'
- 162 SER SER THR VAL GLY TYR PRO GLY LIS TYR PRO SER 169 173
- 2.** P169-DNA-SEKvens
- 5' TCA AGC ACA GTC GGG TAC CCT CCC ATG GGA CT ATA GGA AGA 5'
3' AGT TCG TGT CAC CCC ATG GGA CT ATA GGA AGA 5'
KPNI ECORV
- 5' TAC AGC ACA GTC GGG TAC CCT CCC ATG GGA CT ATA GGA AGA 5'
3' AGT TCG TGT CAC CCP PAT CCT TCT 3'
TA GGA AGA 5'
- 3.** P169 skæret med KpnI og EcoRV: 5' TAC AGC ACA GTC GGG TAC
3' AGT TCG TGT CAC CCP
- 4.** Skæret P169 ligeret med oligonukleotidpuljer
- 5' TAC AGC ACA GTC GGG TAC CCT CCC ATG GGA 5'
3' AGT TCG TGT CAC CCC ATG GGA CCC TTT ATA GGA AGA 5'
- MUTAGENESEPRIMER FOR P169 5' AAG CAC AGT GGG GTA CCC TGA TAT CCT TCT GTC A 3'

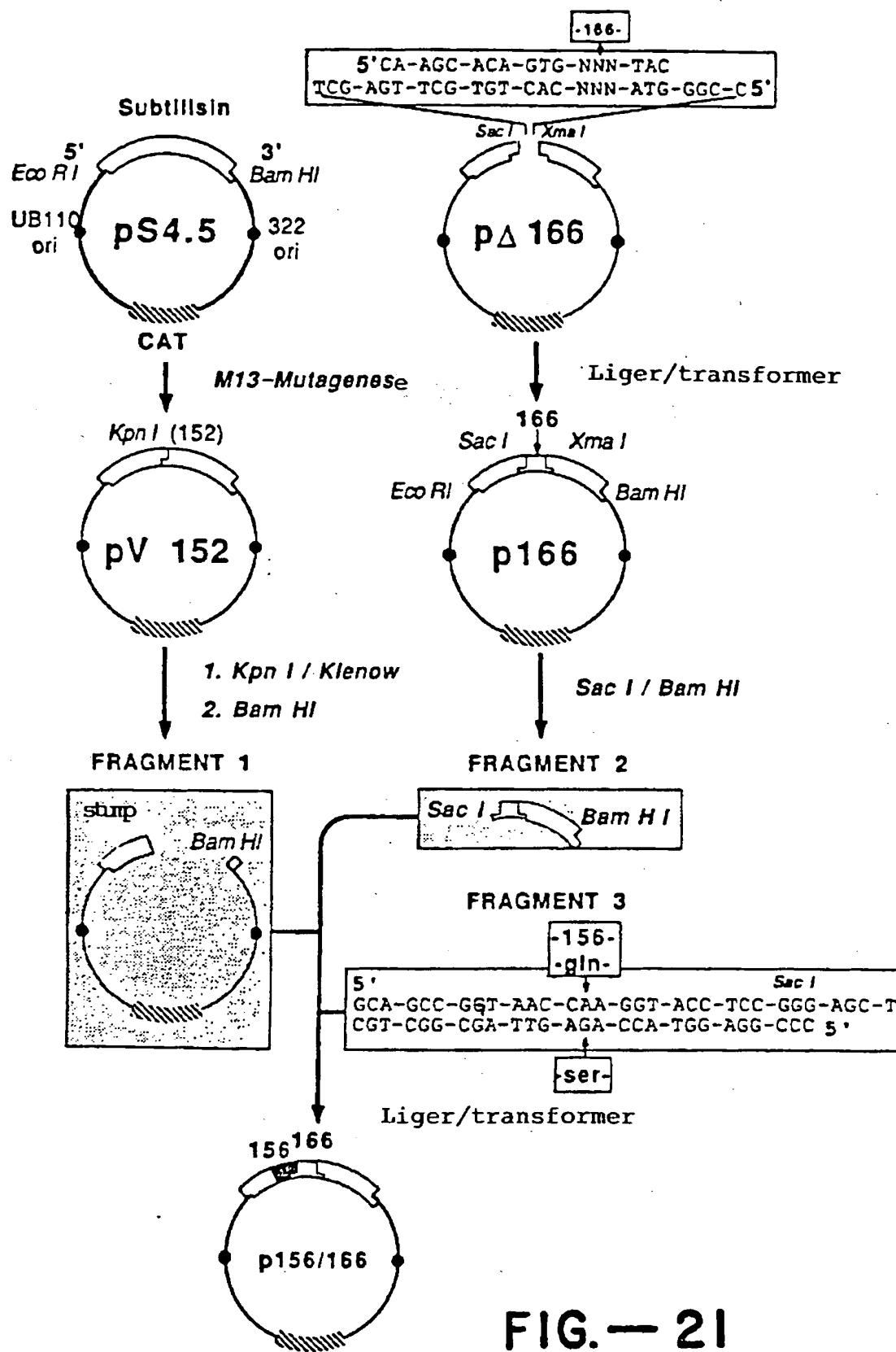
FIG.—18

1. CODONNUMMER: 100 104 105 108
2. VILDTYPEAMINOSYRESEKvens: Gly-Ser-Gln-Tyr-Ser-Trp-Ile-Ile-
3. VILDTYPE-DNA-SEKvens: 5'-GGT-TCC-GGC-CAA-TACAGC-TGG-ATC-ATT-3'
Pw I
4. PRIMER FOR HindIII- 5'-GGT-TCC-GGC-CAA-GCTT-AGC-TGG-ATC-ATT-3'
INDSETTELSE VED 104:
Hind III
5. PRIMERE FOR 104-MUTANTER: 5'---T-TCC-GCC-CAA-NNN-AGC-TGG-ATC-----3'
6. FREMSTILLEDE MUTANTER: A, M, L, S, OG H104

FIG.—19

1. CODONNUMBER:
148 150 152 155
2. VILDTYPEAMINOSYRESEVENTS:
Val-Val-Val-Ala-Ala-Gly-Asn-Glu
3. VILDTYPE-DNA-SEKvens: 5'-GTA-GTC-GTT-GCG-GCA-GCC-GGT-AAC-GAA-3'
4. V152/P153 5'-GTA-GTC-GTT-GCG-GTA-CCC-GGT-AAC-GAA-3'
Kpn |
* *
5. S152: 5'-GTA-GTC-GTT-GCG-AGC-GCC-GGT-AAC-GAA-3'
**
6. G152: 5'-GTA-GTC-GTT-GCG-GGC-GCC-GGT-AAC-GAA-3'

FIG.—20



1. CODONNUMMER: 211 215 217 220
2. VILDIYPEAMINOSYRESEKvens: Gly-Asn-Lys-Tyr-Gly-Ala-Tyr-Asn-Gly-Thr-Ser-Met-Ala
3. VILDTYPE-DNA-SEKvens: 5' -GGA-AAC-AAA-TAC-GGG-GCG-TAC-AAC-GGT-ACG-TCA-ATG-GCA CCT-TTG-TTT-ATG-CCC-CGC-ATG-TTG-CCA-TGC-AGT-TAC-CGT-5'

4. pΔ217 $5' \text{-AAC-AAA-TAC-GCC-GCC-TAC-----GG-ATA-TCA-ATG-GCA}$
 $\text{CCT-TTG-TTT-ATG-CCG-CCG-ATG-----CC-TAT-AGT-TAC-CGT-5'}$
 $\text{Nar I} \quad \text{Eco RI}$

5. pΔ217 skæret med NarI $5' \text{-GGA-AAC-AAA-TAC-GG}$
og EcoRI $\text{CCT-TTG-TTT-ATG-CCG-GP}$

6. Skæret pΔ217 ligeret med cassetter: $5' \text{-GGA-AAC-AAA-TAC-GGC-GCG-NNN-AAC-GGT-ACA-TCA-ATG-GCA}$
 $\text{CCT-TTG-TTT-ATG-CCG-CCG-NNN-TTG-CCA-TGT-AGT-TAC-CGT-5'}$

7. Mutageneseprimer for pΔ217: $5' \text{-GA-AAC-AAA-TAC-GGC-GCC-TAC-GGA-TAT-CAA-TGG-CAT-3'}$

8. Fremstillede mutanter: Alle 19 ved 217

FIG.—22

ALKALINSK pH-PROFIL

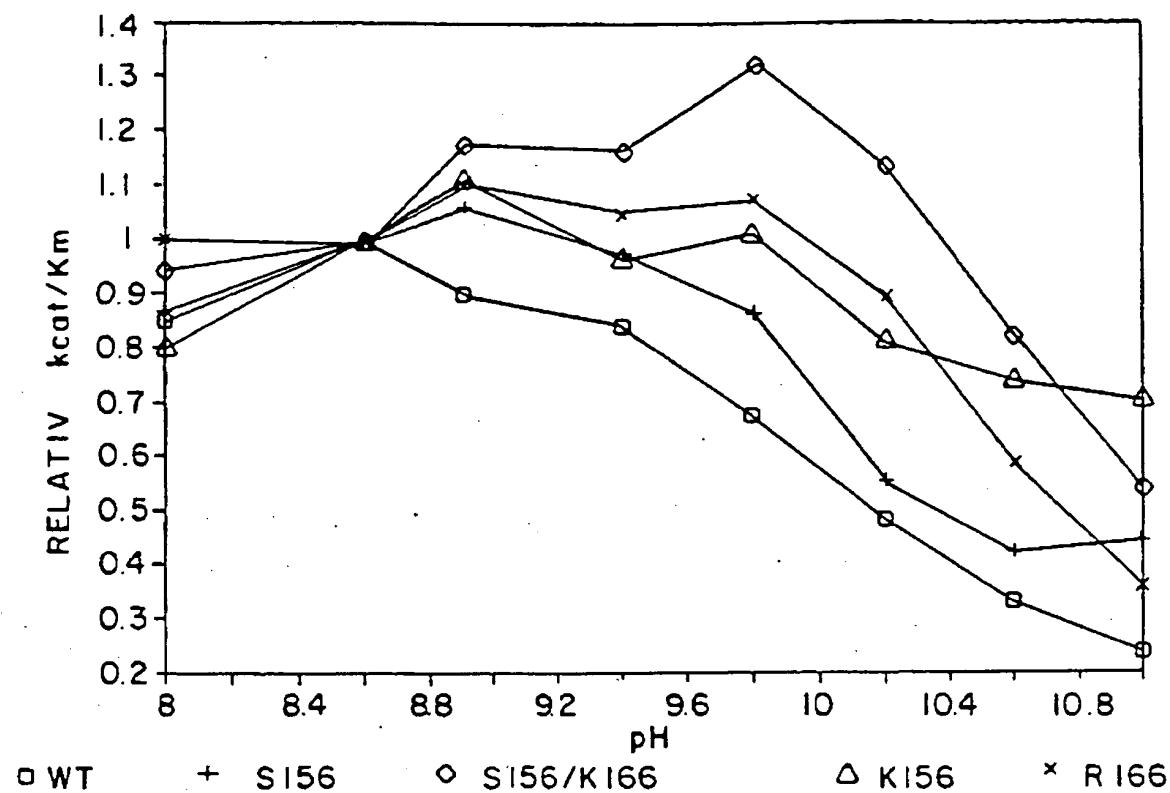


FIG. - 23A

ALKALINSK pH-PROFIL

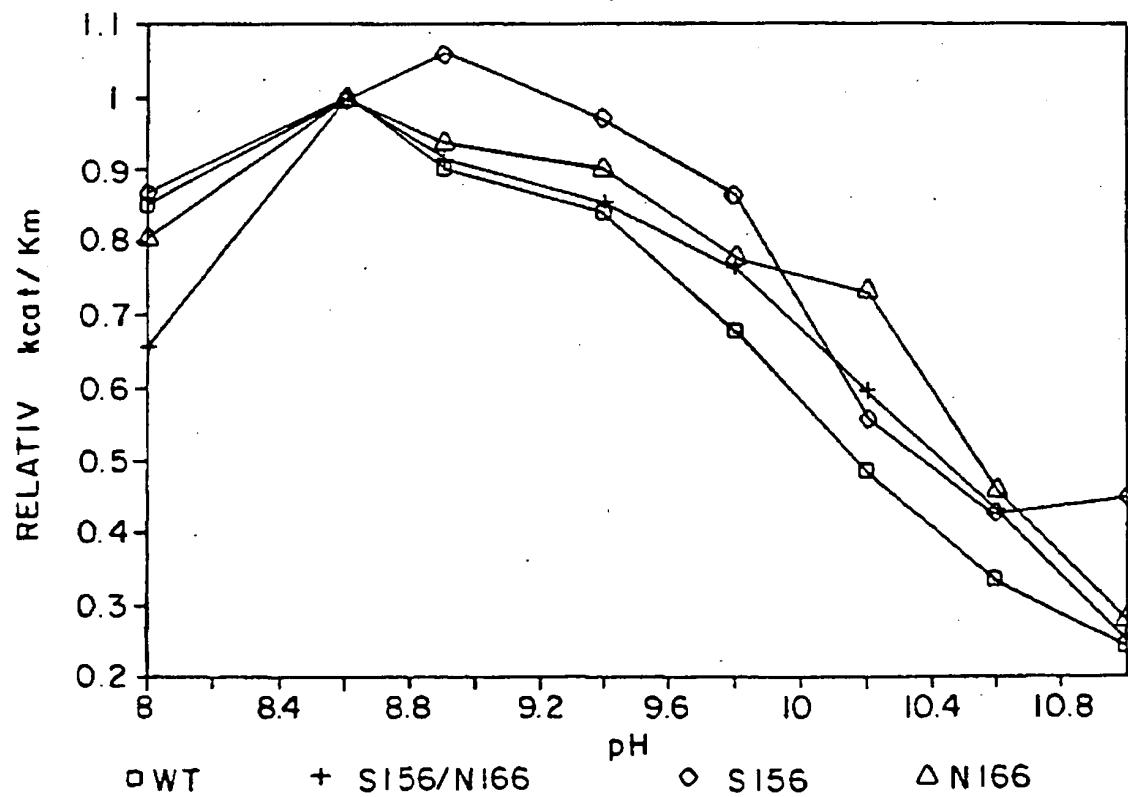


FIG. - 23B

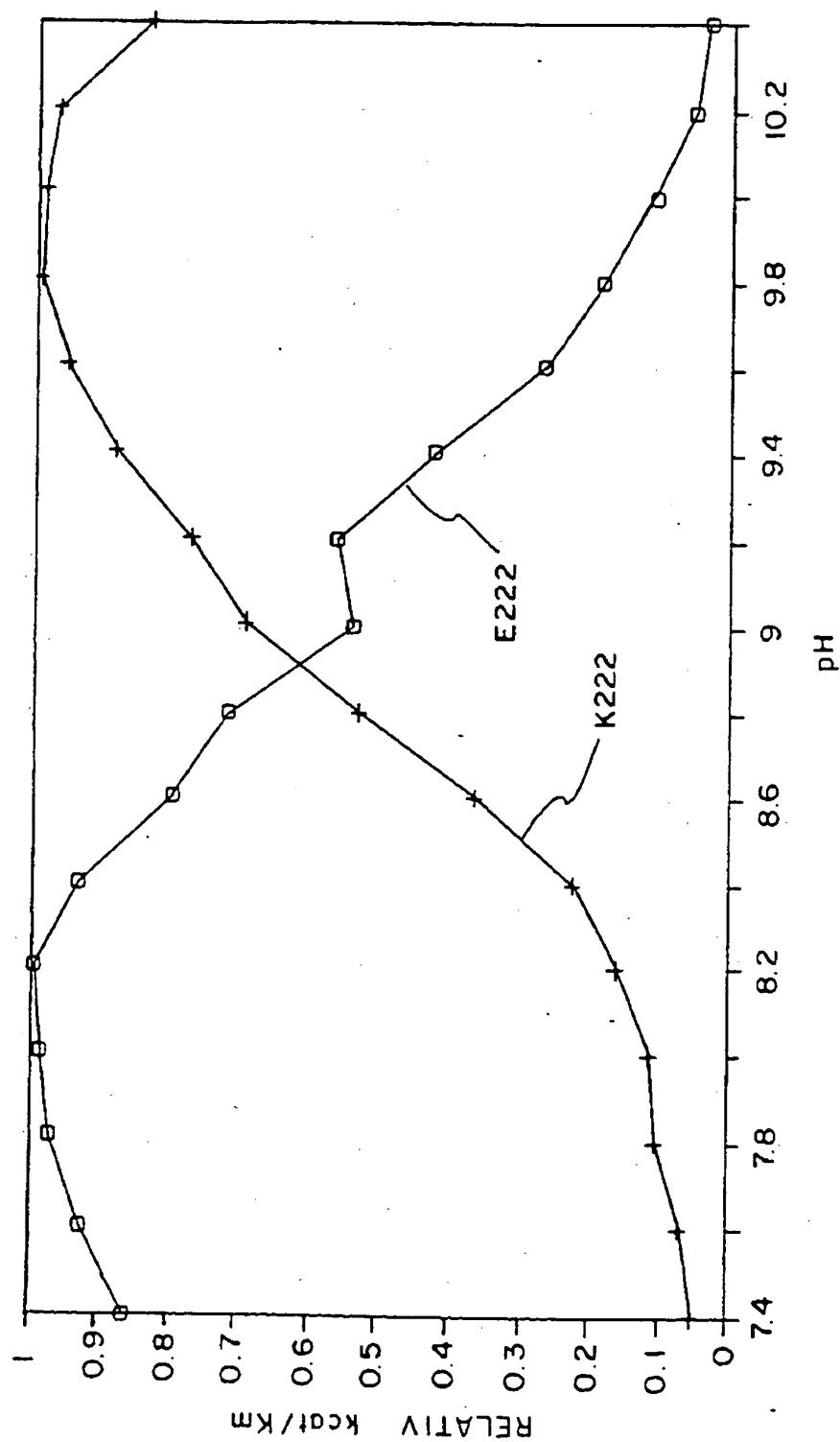


FIG. - 24

1. CODONNUMMER: 91
2. VILDTYPEAMINOSYRESEKVENS: Tyr-Ala-Val-Lys-Val-Leu-Gly-Ala-Asp-Gly-Ser
3. VILDTYPE-DNA-SEKVENS: 5'-TAC-GCT-GTA-AAA-GTT-CTC-GGT-GCT-GAC-GGT-TCC
ATG-CGA-CAT-TTT-CAA-GAG-CCA-CGA-CTG-CCA-AGG-5'
4. pΔ95:

$$\begin{array}{c} * \quad * \\ 5' - T A C - G C G - T - \dots - C T C - G C T - G C A - G A C - G G T - T C C \\ \text{ATG-CGC-A-----GAG-CGA-CGT-CTG-CCA-AGG-5'} \\ M u l \end{array}$$
5. pΔ95 skåret med $Mu l$ og $PstI$

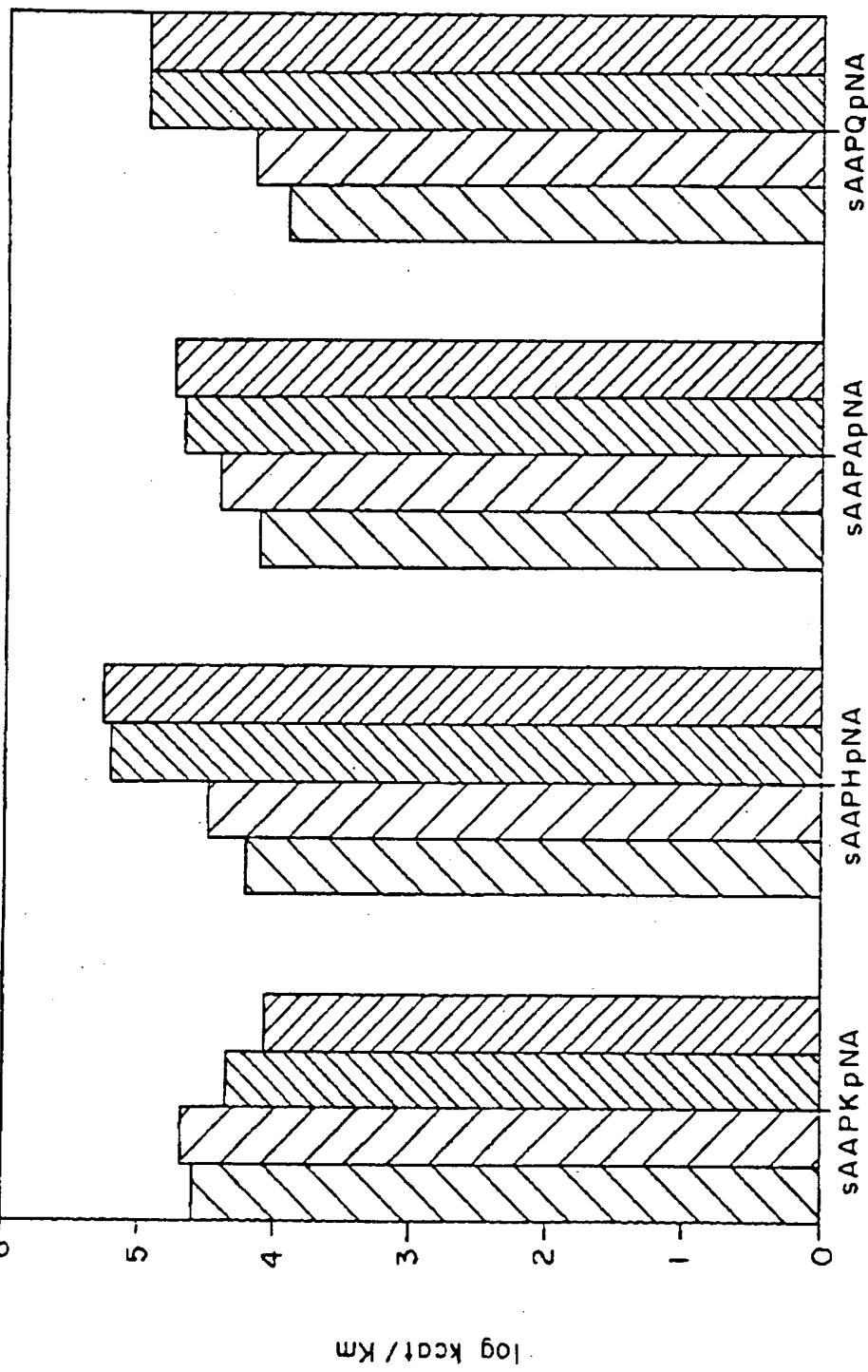
$$\begin{array}{c} * \quad * \\ 5' - T A \quad A T G - C G C p \\ \text{ATG-CGCp} \end{array}$$
6. Skåret pΔ95 ligeret med cassetter:

$$\begin{array}{c} * \quad * \\ 5' - T A C - G C G - G T A - A A A - G T T - C T C - G G T - G C A - G A C - G G T - T C C \\ \text{ATG-CGC-CAT-TTT-CAA-GAG-CCA-CGT-CTG-CCA-AGG-5'} \end{array}$$
7. Mutagenesepimer for pΔ95: 5'-CA-TCA-CTT-TAC-GCG-T-CTC-GCT-GCA-GAC-GGT-TCC

$$\begin{array}{c} * \quad * \quad * \quad * \\ 5' - C A - T C A - C T T - T A C - G C G - T - C T C - G C T - G C A - G A C - G G T - T C C \end{array}$$
8. Fremstillede mutanter: C94, C95, D96

FIG.—25

SUBSTRAT-SPECIFICITET
pH = 8.60, T = 25



SUBSTRAT

- B.A. SUBT
- L 217
- B.L. SUBT
- FSAL

FIG.—26

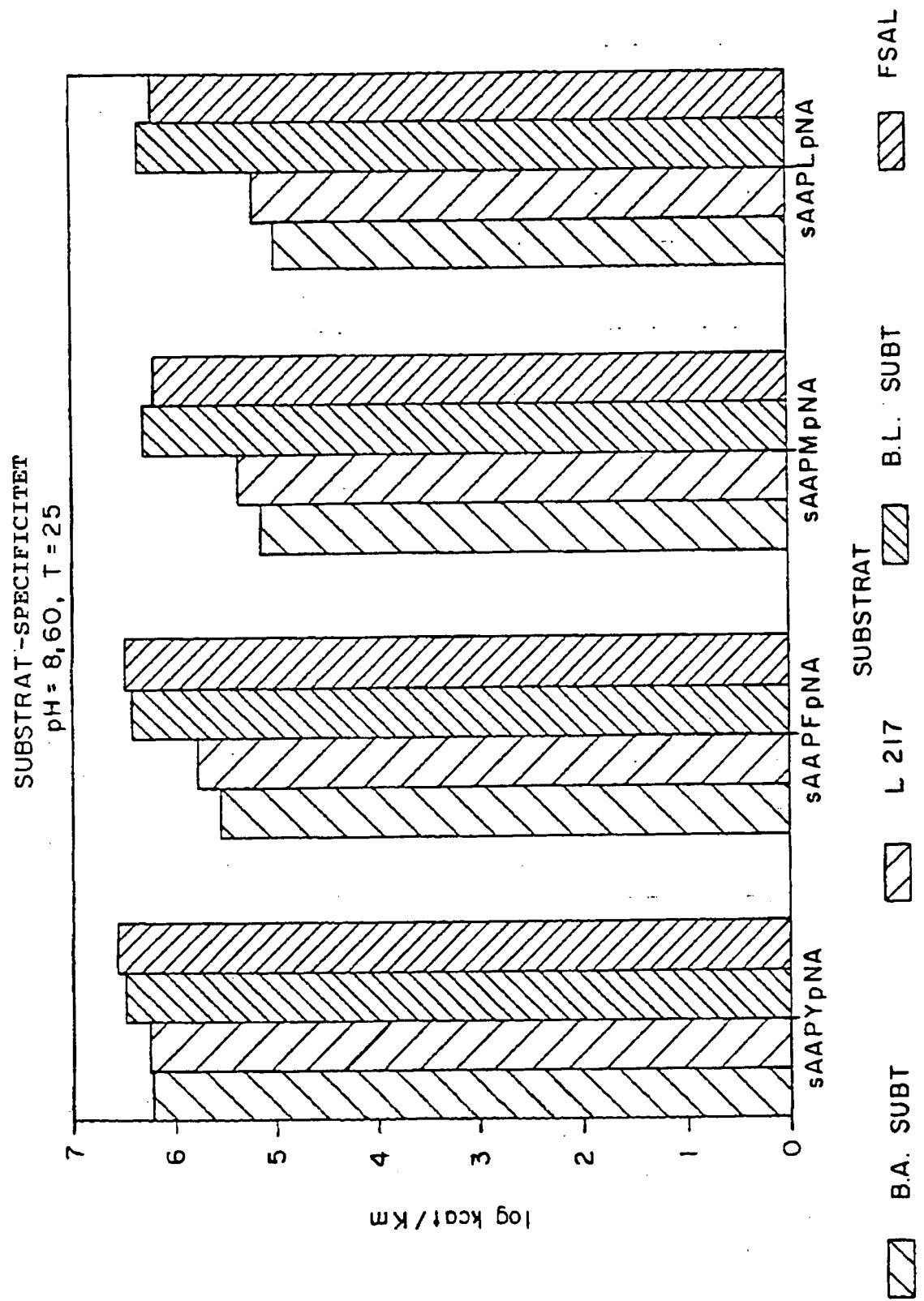
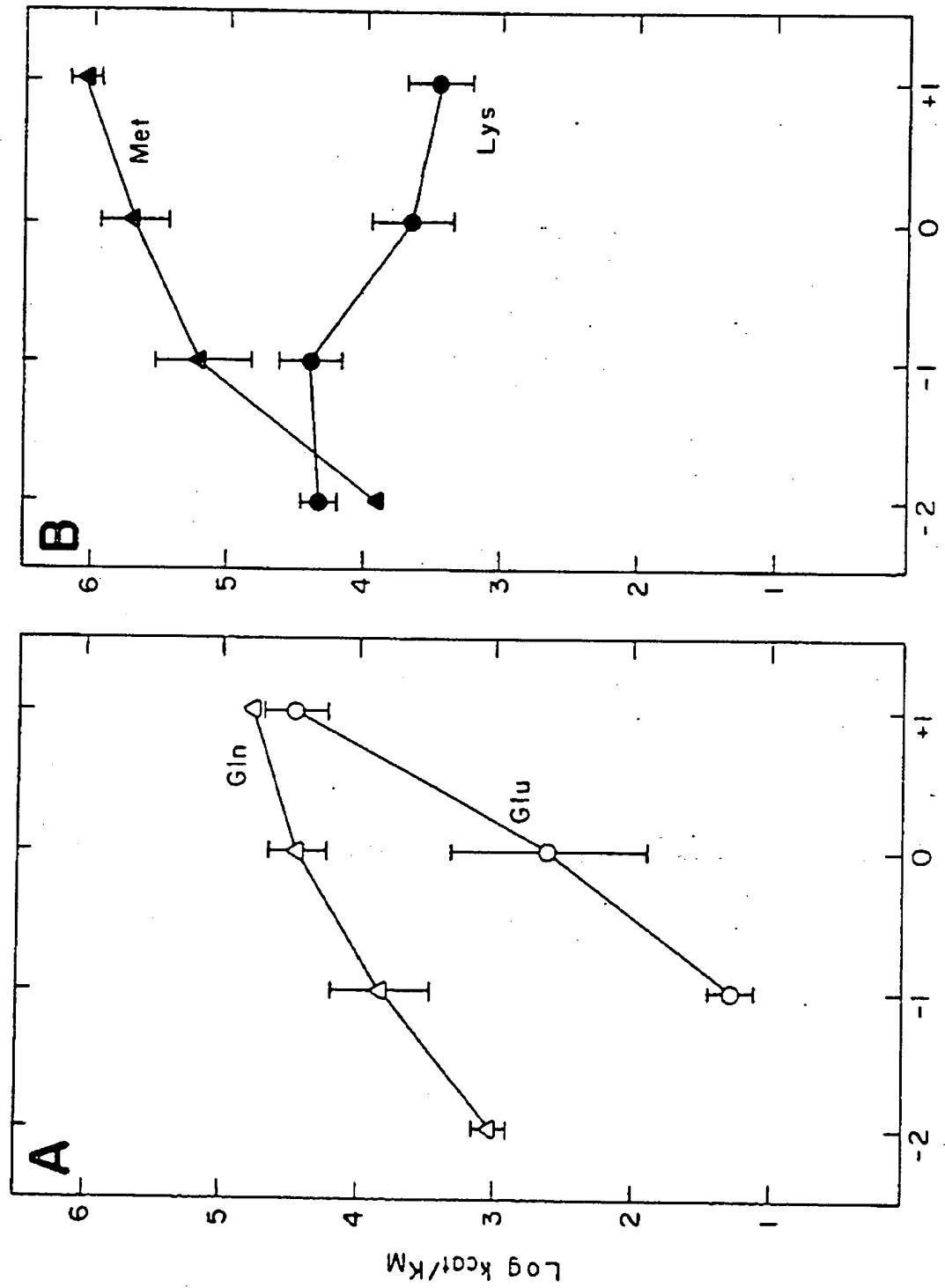


FIG. - 27

**FIG. -28**

BINDING AF P1-BINDINGSSTED

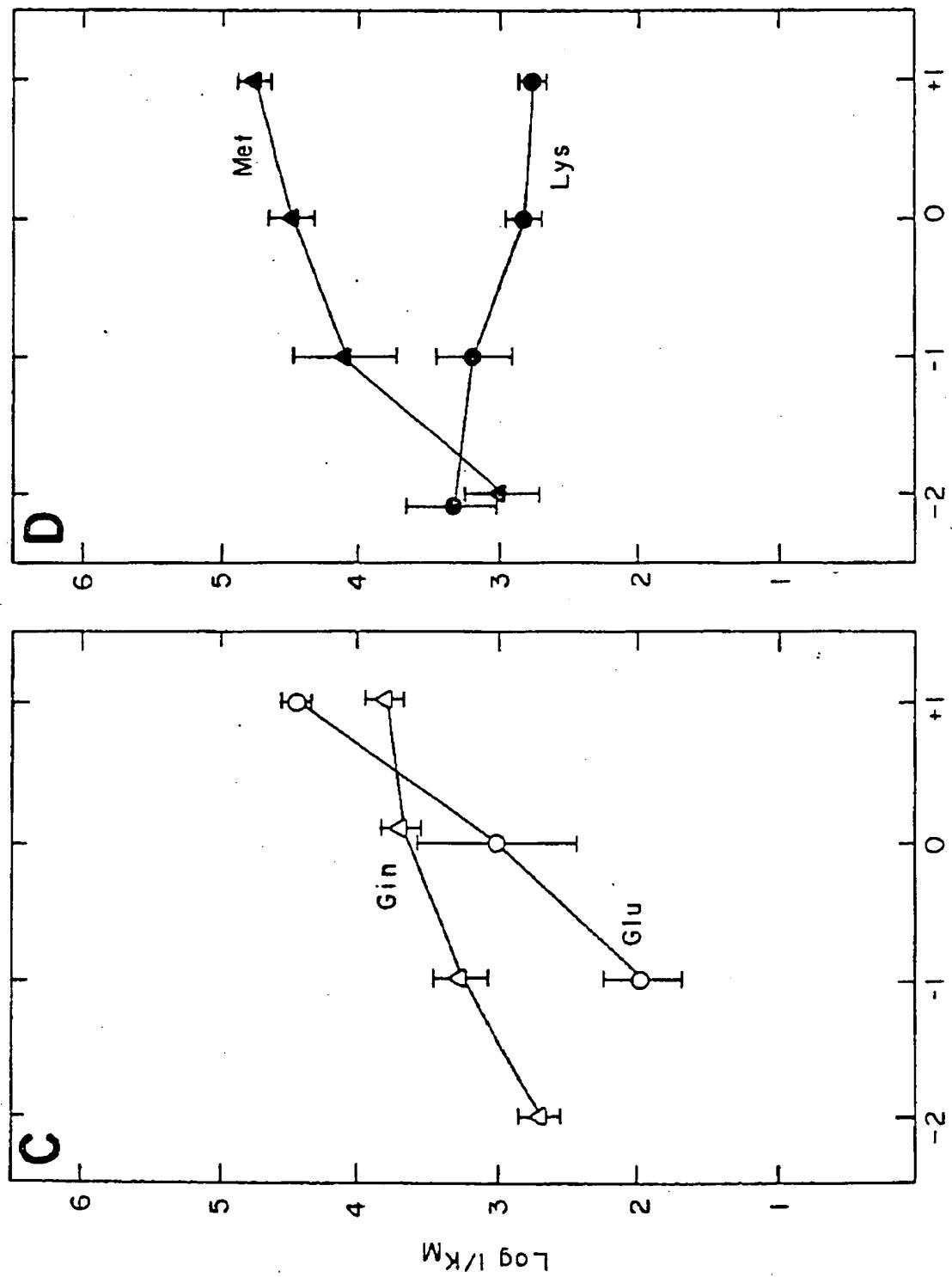


FIG. -28

LADING AF P1-BINDINGSSTED

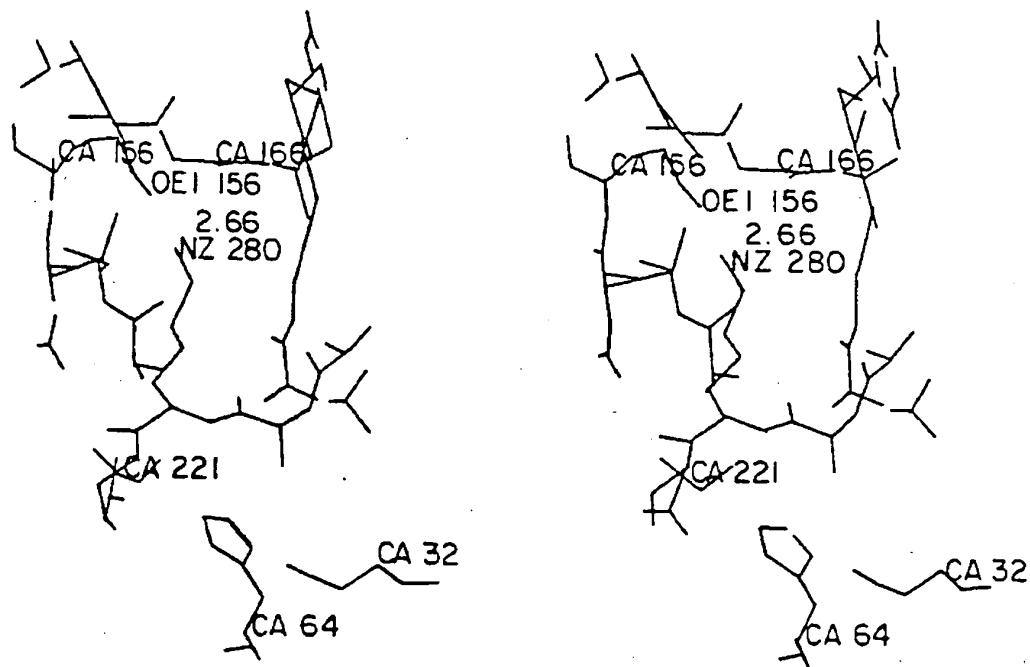


FIG. — 29A

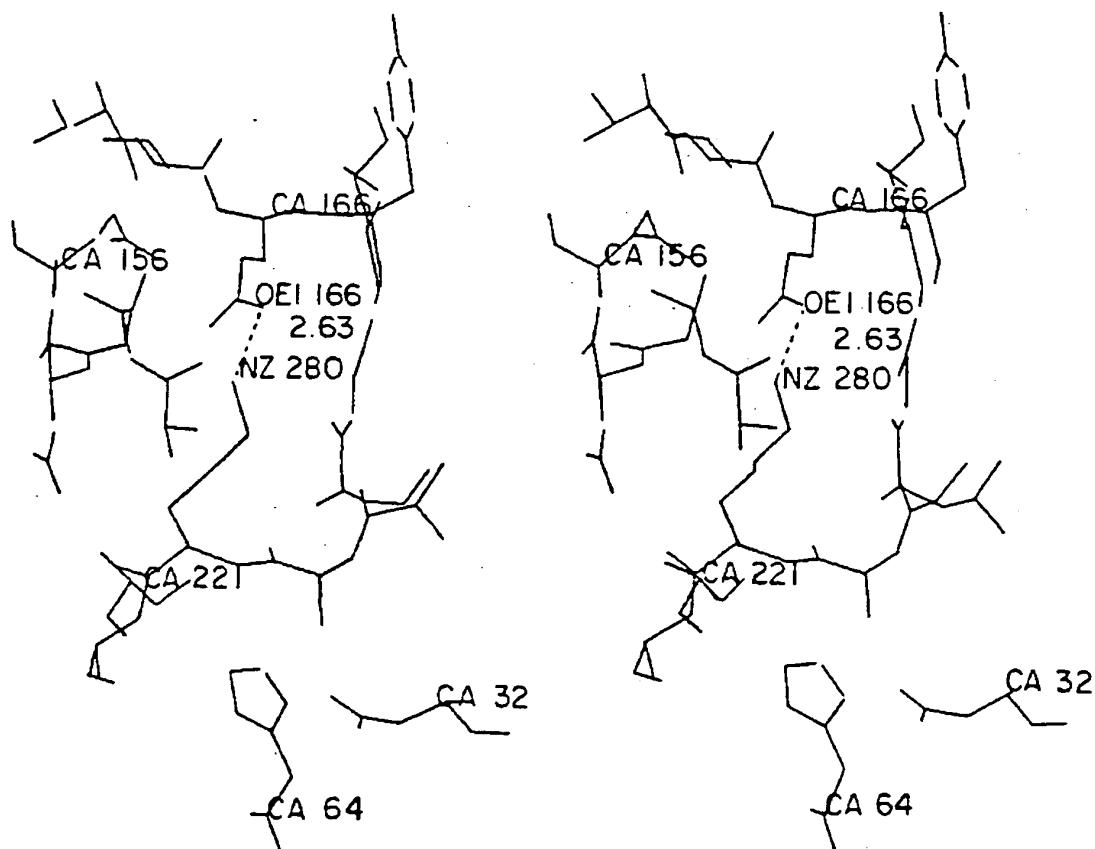


FIG. — 29B

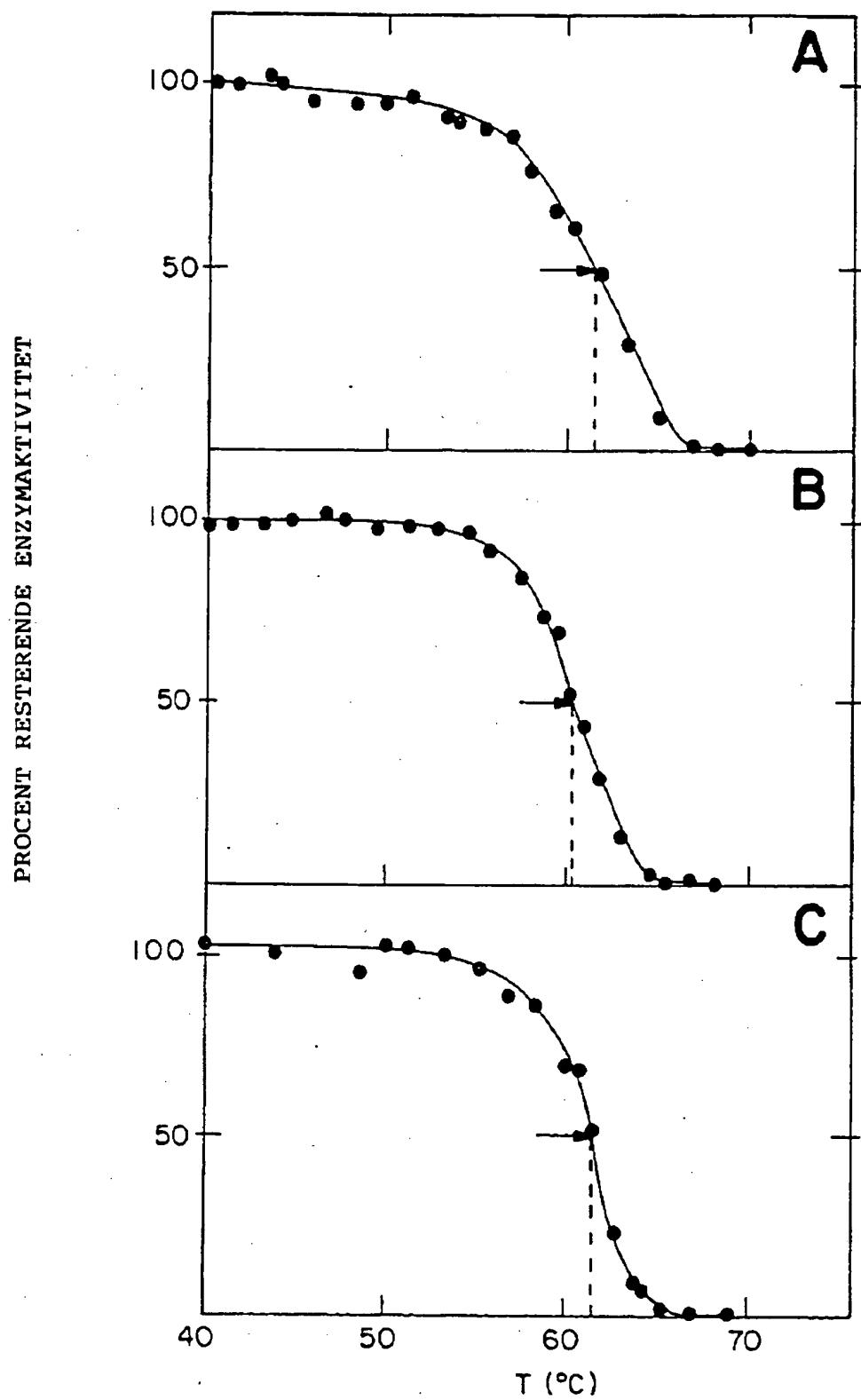


FIG.-30

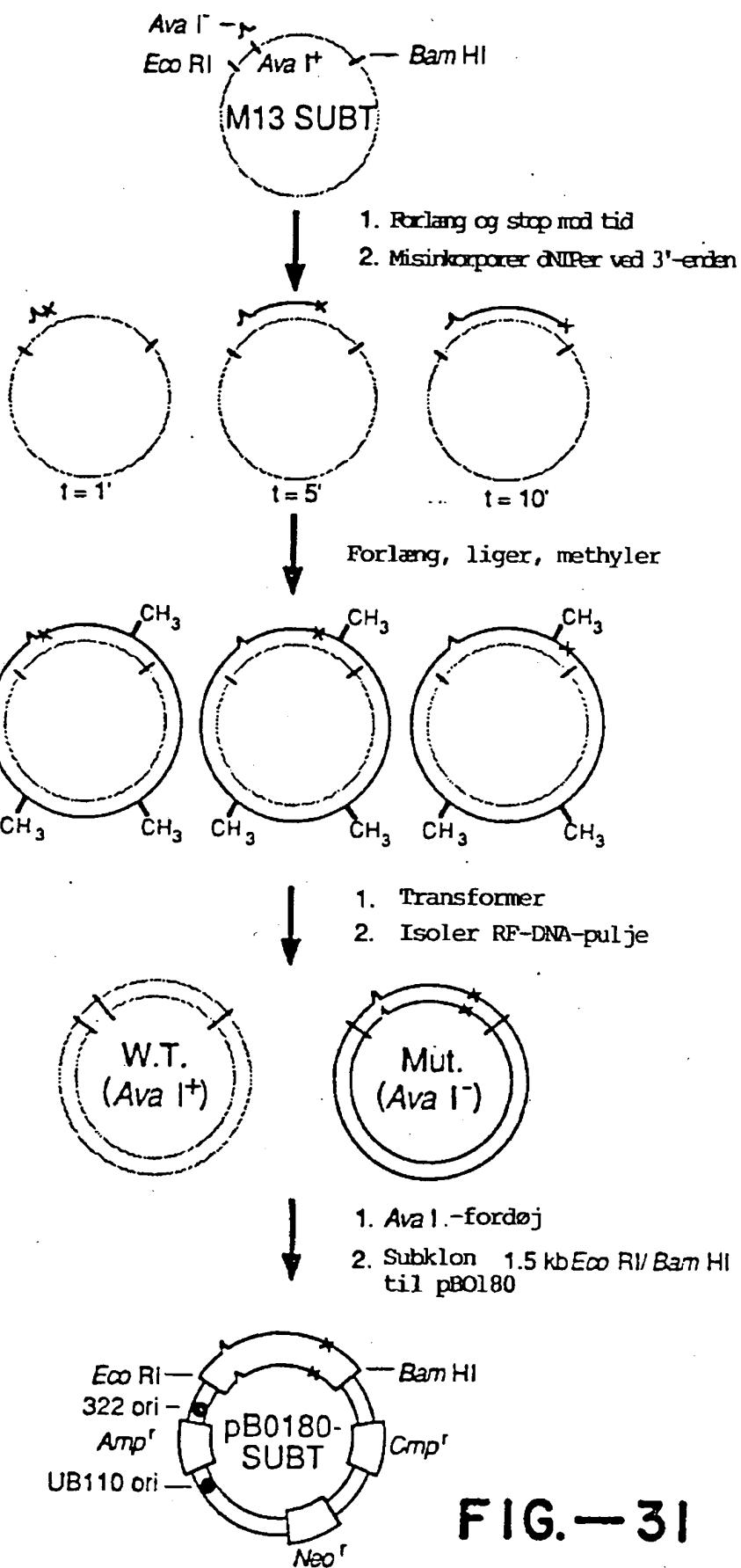


FIG.—31

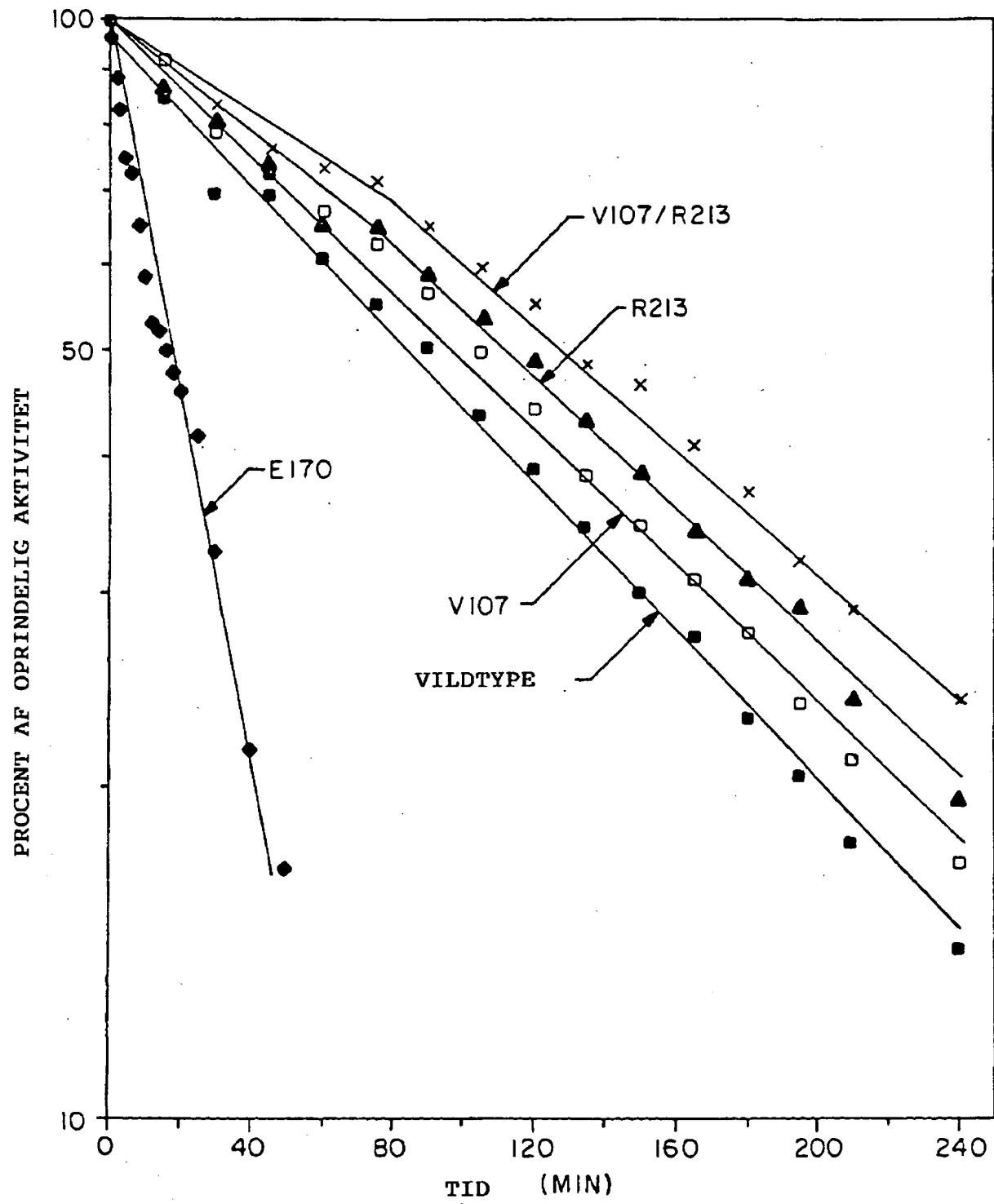


FIG.-32

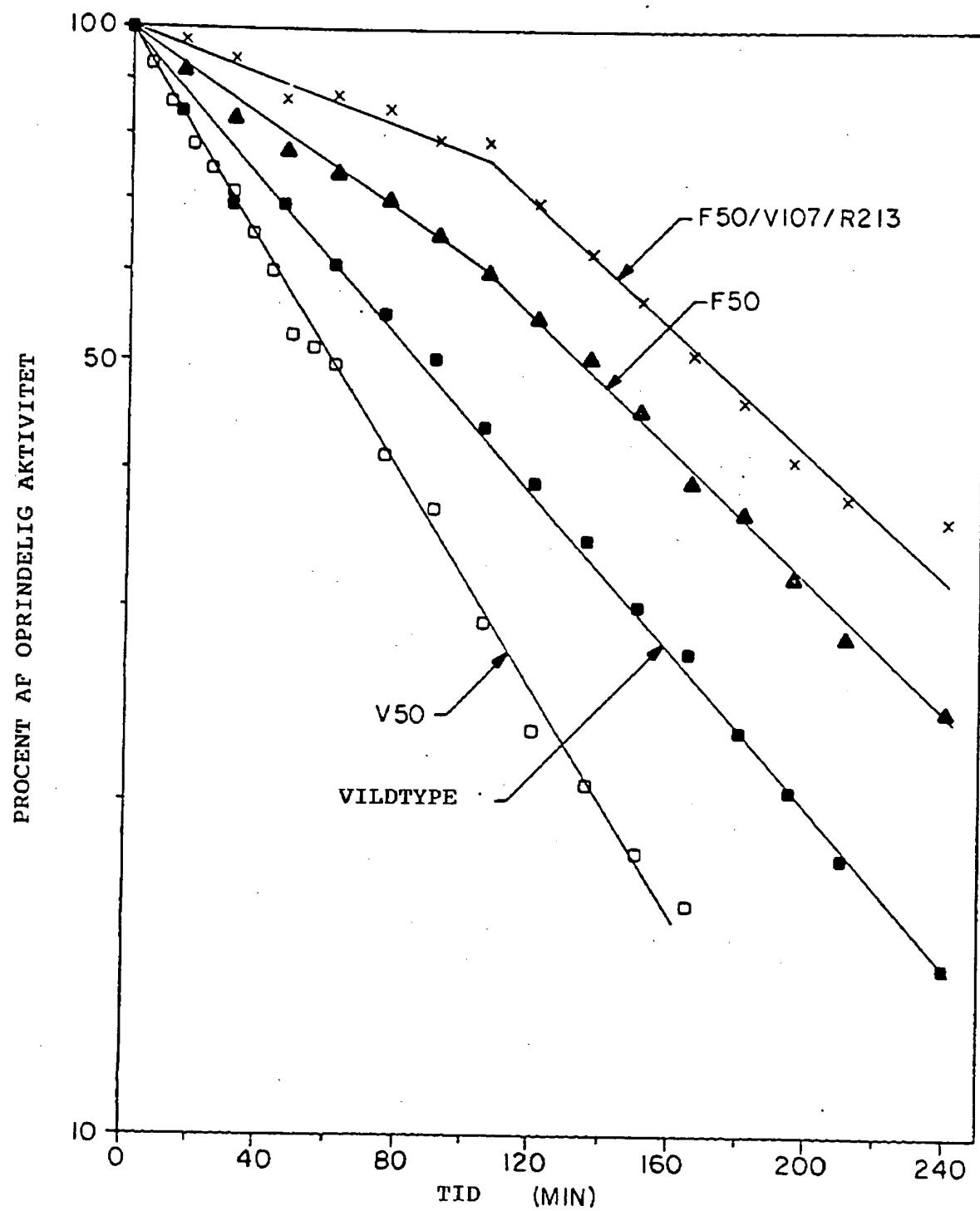
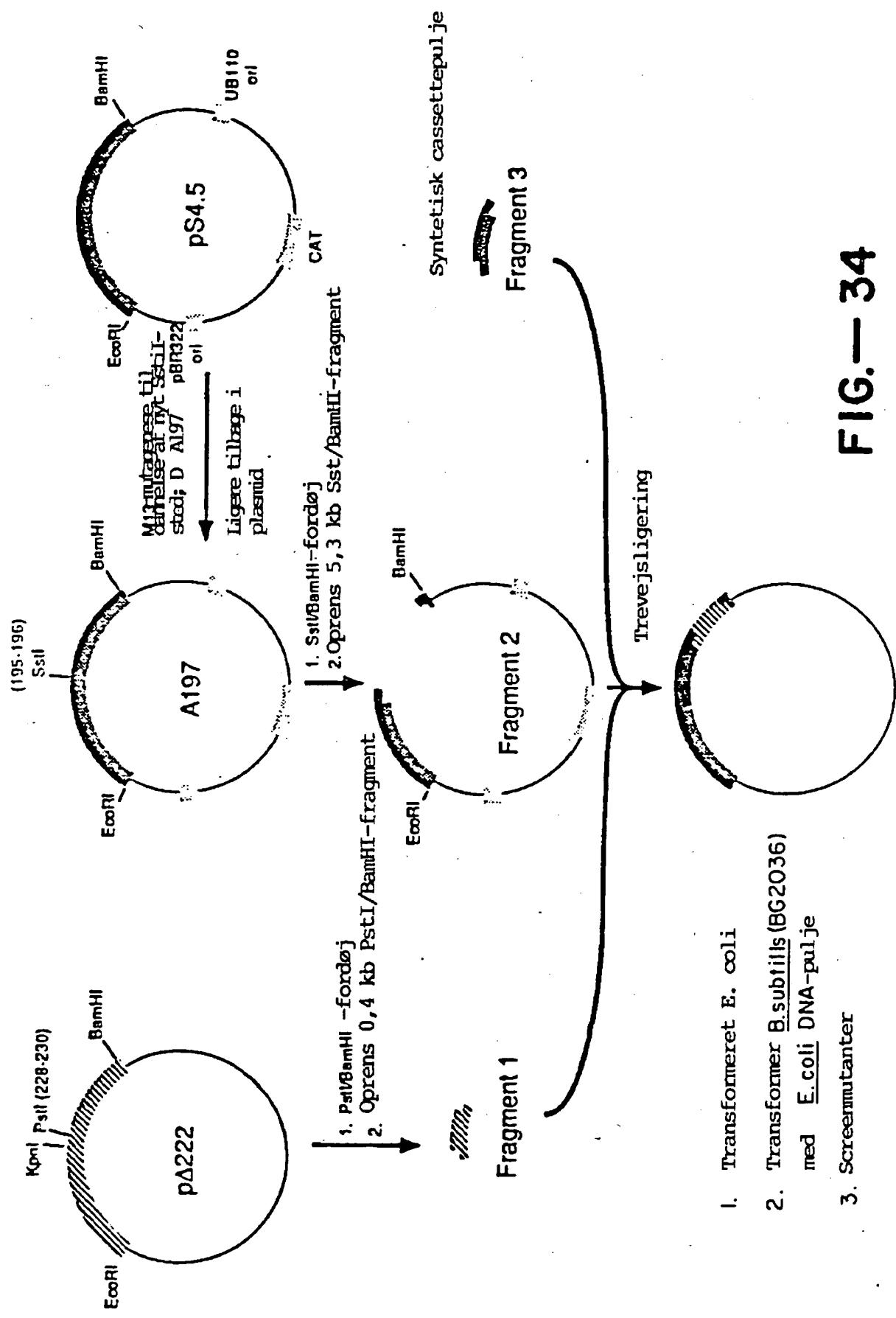


FIG.-33



	193	200	206
Vildtype- aminosyre	Glu Leu Asp Val Met Ala Pro Gly Val Ser Ile Gln		
Vildtype- DNA	GAG CTT GAT GTC ATG GCA CCT GGC GTA TCT ATC CAA		
pA222DNA:	CTC GAA CTA CAG TAC CGT GGA CCG CAT AGA TAG GTT		
A197 DNA:	GAG CTT GAT GTC ATG GCA CCT GGC GTA TCT ATC CAA		
	CTC GAA CTA CAG TAC CGT GGA CCG CAT AGA TAG GTT		
Fragmenter fra pA222 og A197 skæret med PstI/ SstI	GAG-CT Cp		
pA222, A197 skæret og ligeret med oligodeokyno- kleetidpuljer	<u>GAG CTC GAT GTC ATG GCA CCT GGC GTA TCT ATC CAA</u> <u>CTC GAG CTA CAG TAC CGT GGA CCG CAT AGA TAG GTT</u> SstI		
Vildtypeaminosyre:	207	210	218
	Ser Thr Leu Pro Gly Asn Lys Tyr Gly Ala Tyr Asn		
Vildtype-DNA:	AGC ACG CTT CCT GGA AAC AAA TAC GGG GCG TAC AAC		
	TCG TGC GAA GGA CCT TTG TTT ATG CCC CGC ATG TTG		
pA222DNA:	AGC ACG CTT CCT GGA AAC AAA TAC GGG GCG TAC AAC		
	TCG TGC GAA GGA CCT TTG TTT ATG CCC CGC ATG TTG		
A197 DNA:	AGC ACG CTT CCT GGA AAC AAA TAC GGG GCG TAC AAC		
	TCG TGC GAA GGA CCT TTG TTT ATG CCC CGC ATG TTG		
Fragmenter fra pA222 og A197 skæret med PstI/ SstI	<u>AGC ACG CTT CCC GGG AAC AAA TAC GGG GCG TAC AAC</u> <u>TCG TGC GAA GGG CCC TTG TTT ATG CCC CGC ATG TTG</u> SmaI		
Vildtypeaminosyre:	219	220	230
	Gly Thr Ser Met Ala Ser Pro His Val Ala Gly Ala		
Vildtype-DNA:	GGT ACG TCA ATG GCA TCT CCG CAC GTT GCC GGA GCG-3'		
	CCA TGG AGT TAC CGT AGA GGC GTG CAA CGG CCT CGC-5'		
pA222DNA:	<u>GGT ACC TCA ----- CG CAC GGT GCA GGA GCG-3'</u>		
	<u>CCA TGG AGT ----- GC GTG CGA CGT CCT CGC-5'</u>		
A197 DNA:	KpnI		PstI
Fragmenter fra pA222 og A197 skæret med PstI/SstI	GGT ACG TCA ATG GCA TCT CCG CAC GTT GCC GGA GCG-3'		
	CCA TGG AGT TAC CGT AGA GGC GTG CAA GTG CCT CGC-5'		
pA222, A197 skæret og ligeret med oligodeokyno- kleetidpuljer	<u>GGT ACC TCA ATG GCA TCT CCG CAC GTT GCA GGA GCG-3'</u>		
	<u>CCA TGG AGT TAC CGT AGA GGC GTG CAA CGT CCT CGC-5'</u>		
	KpnI		PstI destroyed

Oligodeokynokleetidpuljer syntetiseret med 2% forurende nukleotider i hver
hver cyklus til opnælse af 15% af puljen med 0 mutationer af puljen med
enkelmutationer og 57% af puljen med 2 eller flere

mutationer, i overensstemmelse med den almindelige formel

$$f = \frac{n}{n!} e^{-\mu}$$

FIG.—35

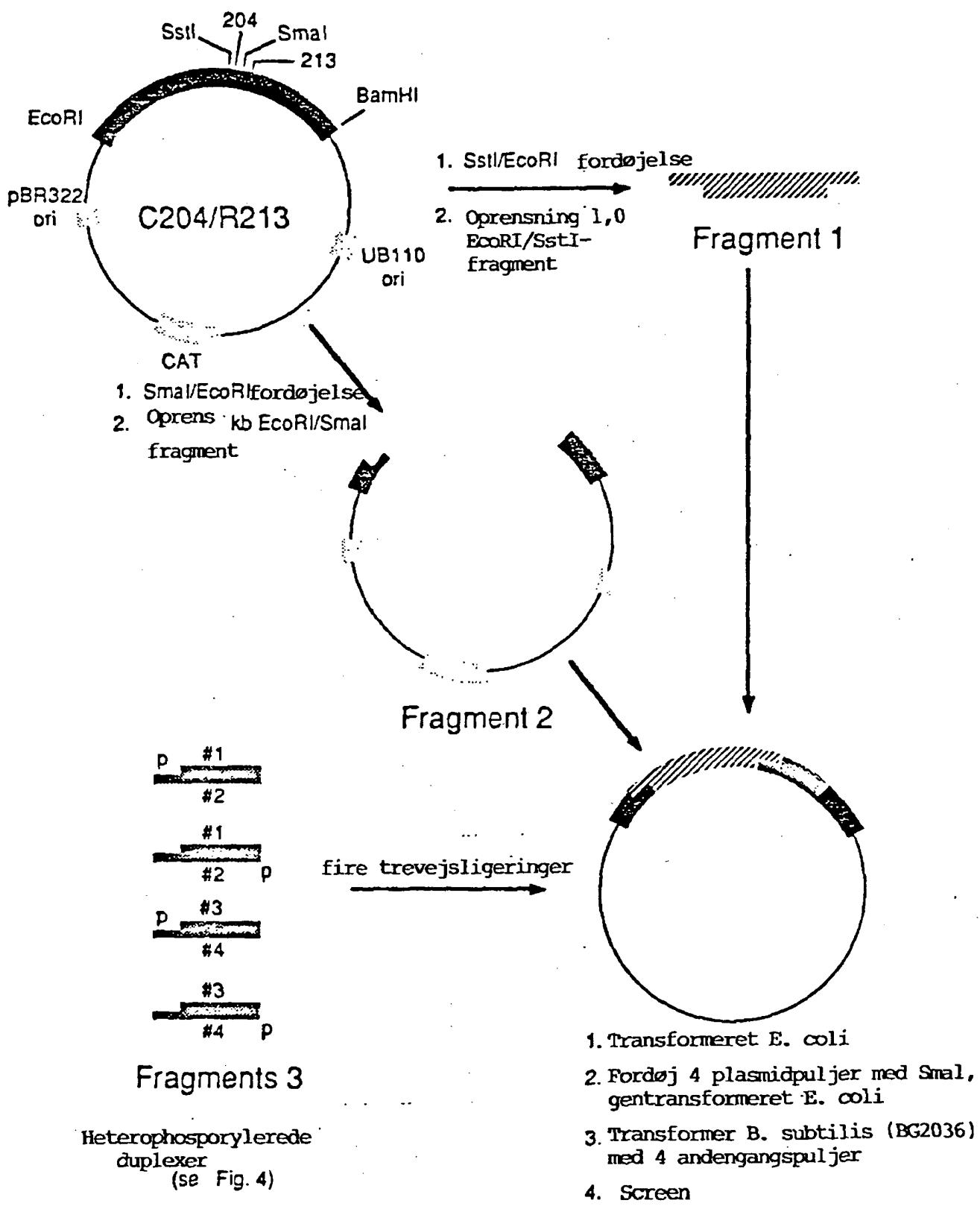


FIG.—36

Vildtypeaminosyre:
 195 Glu Leu Asp Val Met Ala Pro Gly Val Ser Ile Glu Ser Thr Leu Pro Gly Asn Lys 213
 200
 204

Vildtype-DNA:
 5'-GAG CTT GAT GTC ATG GCA CCT GGC GTA TCT ATC CAA AGC ACG CCT CCT GGA AAC AAA-3'
 3'-CTC GAA CTA CAG TAC CGT GGA CCG CAT AGA TAG GTT TCG TGC GAA GGA CCT TGT TTG TTT-5'

C204/R213 DNA:
 5'-GAG CTC GAT GTC ATG GCA CCT GGC GTA TGT ATC CAA AGC ACG CCT CCC GGG AAC AGA-3'
 3'-CTC GAG CTA CAG TAC CGT GGA CCG CAT ACA TAG GTT TCG TGC GAA GGG CCC TTG TCT-5'
SstI
SmaI

C204/R213 skæret med SstI og SmaI:
 5'-GAG CT 3'-C

C204/R213 skæret og ligeret med oligodeoxynukleotidpuljer
 5'-GAG CTC GAT CTC ATG GCA CCT GGC GTA ATC CAG TGC ACG CCT CCT GGG AAC AGA-3'
 3'-CTC GAG CTA CAG TAC CGT GGA CCC CAT TAG GTC AGC TGC GAA GGA CCC TTG TCT-5'
SstI
SaiI
SmaI

W, R, R, or G \leftarrow NGG or NCC \rightarrow S, P, T or A
 Stop, Y, H, Q, N, K, D or E \leftarrow $\frac{[G]_{TN}}{[C]_{AN}}$ or $\frac{[G]_{AN}}{[C]_{TN}}$ \rightarrow L, F, I, V or M

$\frac{A3}{H1}$
 $\frac{A2}{H4}$

FIG.—37