



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 601 14 804 T2** 2006.08.10

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 285 065 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **601 14 804.5**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US01/16149**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 937 550.0**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2001/090147**
(86) PCT-Anmeldetag: **17.05.2001**
(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **29.11.2001**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **26.02.2003**
(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **09.11.2005**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **10.08.2006**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/12** (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
C30B 29/58 (2006.01)
G06F 17/30 (2006.01)
G06F 19/00 (2000.01)

(30) Unionspriorität:
575847 19.05.2000 US

(73) Patentinhaber:
**The State of Oregon acting by and through The
State Board of Higher Education on behalf of the
University of Oregon, Eugene, Oreg., US**

(74) Vertreter:
**Dr. Volker Vossius, Corinna Vossius, Tilman
Vossius, Dr. Martin Grund, Dr. Georg Schnappauf,
81679 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR**

(72) Erfinder:
**WACHTER, Rebekka, Creswell, US; REMINGTON,
James, S., Eugene, US**

(54) Bezeichnung: **KONSTRUIERTE FLUORESCENZPROTEINE MIT LANGEN WELLENLÄNGEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Fluoreszenzmoleküle sind als Reportermoleküle in vielen Testsystemen aufgrund ihrer hohen Sensitivität und Einfachheit einer Quantifizierung attraktiv. In jüngerer Zeit waren Fluoreszenzproteine das Ziel großen Interesses aufgrund dessen, dass sie in vivo von biologischen Systemen produziert werden können und verwendet werden können, um intrazelluläre Ereignisse zu verfolgen, ohne die Notwendigkeit in die Zelle über Mikroinjektion oder Permeabilisierung eingebracht zu werden. Das grüne Fluoreszenzprotein von *Aequorea victoria* ist insbesondere als Fluoreszenzprotein interessant. Eine cDNA für das Protein wurde kloniert (D.C. Prasher et al., "Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent Protein", *Gene* (1992) 111:229-33). Es kann nicht nur die primäre Aminosäuresequenz des Proteins von der cDNA exprimiert werden, sondern das exprimierte Protein kann auch fluoreszieren. Dies zeigt, dass das Protein die Zyklisierung und Oxidation durchlaufen kann, von der angenommen wird, dass sie für eine Fluoreszenz notwendig ist. Das grüne Fluoreszenzprotein ("GFP") von *Aequorea* ist eine stabile, gegenüber Proteolyse resistente einzelne Kette aus 238 Resten und weist zwei Absorptionsmaxima bei etwa 395 und 475 nm auf. Die relativen Amplituden dieser zwei Peaks sind gegenüber äußeren Faktoren (W.W. Ward, *Bioluminescence and Chemiluminescence* (M.A. DeLuca und W.D. McElroy, Herausgeber) Academic Press S. 235-242 (1981), W.W. Ward & S.H. Bokman, *Biochemistry* 21:4535-4540 (1982), W.W. Ward et al., *Photochem. Photobiol.* 35:803-808 (1982)) und gegenüber der Bestrahlungsgeschichte empfindlich (A.B. Cubitt et al., *Trends Biochem. Sci.* 20:448-455 (1995)), was vermutlich zwei oder mehrere Grundzustände widerspiegelt. Eine Anregung bei dem primären Absorptionsspeak von 395 nm ergibt ein Emissionsmaximum bei 508 nm mit einer Quantenausbeute von 0,72-0,85 (O. Shimomura und F.H. Johnson, *J. Cell. Comp. Physiol.* 59:223 (1962), J.G. Morin und J.W. Hastings, *J. Cell. Physiol.* 77:313 (1971), H. Morise et al., *Biochemistry* 13:2656 (1974), W.W. Ward, *Photochem. Photobiol. Reviews* (Smith, K.C. Hrsg.) 4:1 (1979), A.B. Cubitt et al., *Trends Biochem. Sci.* 20:448-455 (1995), D.C. Prasher, *Trends Genet.* 11:320-323 (1995), M. Chalfie, *Photochem. Photobiol.* 62:651-656 (1995), W.W. Ward, *Bioluminescence and Chemiluminescence* (M.A. DeLuca und W.D. McElroy, Herausgeber) Academic Press S. 235-242 (1981), W.W. Ward & S.H. Bokman, *Biochemistry* 21:4535-4540 (1982), W.W. Ward et al., *Photochem. Photobiol.* 35:803-808 (1982)). Das Fluorophor resultiert aus der autokatalytischen Zyklisierung des Polypeptid-Rückgrats zwischen den Resten Ser⁶⁵ und Gly⁶⁷ und der Oxidation der β -Bindung von Tyr⁶⁶ (A.B. Cubitt et al., *Trends Biochem. Sci.* 20:448-455 (1995), C.W. Cody et al., *Biochemistry* 32:1212-1218 (1993), R. Heim et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:12501-12504 (1994)). Eine Mutation von Ser⁶⁵ zu Thr (S65T) vereinfacht das Exzitationsspektrum zu einem einzelnen Peak bei 488 nm mit einer verstärkten Amplitude (R. Heim et al., *Nature* 373:664-665 (1995)), das nicht mehr Anzeichen von Konformationsisomeren aufweist (A.B. Cubitt et al., *Trends Biochem. Sci.* 20:448-455 (1995)).

[0002] Fluoreszenzproteine wurden als Marker für eine Genexpression, Tracer für eine Abstammung von Zellen und als Fusionstags für eine Überwachung der Proteinlokalisierung innerhalb von lebenden Zellen verwendet (M. Chalfie et al., "Green fluorescent protein as a marker for gene expression", *Science* 263:802-805, A.B. Cubitt et al., "Understanding, improving and using green fluorescent proteins", *TIBS* 20, November 1995, S. 448-455, US-PS 5,491,084, M. Chalfie und D. Prasher). Ferner wurden veränderte Versionen des grünen Fluoreszenzproteins von *Aequorea* identifiziert, die veränderte Fluoreszenzcharakteristika, einschließlich veränderter Exzitations- und Emissionsmaxima, sowie Exzitations- und Emissionsspektren mit verschiedenen Formen aufweisen (R. Heim et al., "Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1994) 91:12501-04, R. Heim et al., "Improved green fluorescence", *Nature* (1995) 373:663-665).

[0003] Eine zweite Klasse von Anwendungen beruht auf dem GFP als einem spezifischen Indikator einer gewissen zellulären Eigenschaft und hängen somit von den bestimmten spektralen Charakteristika der verwendeten Variante ab. Bezüglich jüngerer Übersichtsartikel über GFP-Varianten und deren Anwendungen vergleiche Palm & Wlodawer, 1999; Tsien, 1998 und bezüglich einer Übersicht über spezielle Anwendungen vergleiche Sullivan & Kay, 1999. Biosensoranwendungen umfassen die Verwendung von unterschiedlich gefärbten GFPs für einen Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET), um Protein-Protein-Interaktionen (Heim, 1999) oder Ca²⁺-Konzentrationen (Miyawaki et al., 1999) zu überwachen, und Rezeptorinsertionen innerhalb von GFP-Oberflächenschleifen, um eine Ligandbindung zu überwachen (Baird et al., 1999, Doi & Yanagawa, 1999).

[0004] Die Fluoreszenzemission einer Reihe von Varianten ist gegenüber der Acidität der Umgebung hochgradig empfindlich (Elsiger et al., 1999, Wachter et al., 1998). Somit war eine besonders erfolgreiche Anwendung des grünen Fluoreszenzproteins (GFP) als ein visueller Reporter in lebenden Zellen die Bestimmung des pH-Werts in Organellen oder im Cytosol (Kneen et al., 1998, Llopis et al., 1998, Miesenbock et al., 1998, Robey et al., 1998). Es stellte sich heraus, dass die zwei Chromophoren-Ladungszustände mit der pH-Sensitivität des

intakten Proteins in Beziehung stehen und sie wurden kristallographisch hinsichtlich konformeller Veränderungen in der Nähe des phenolischen Endes (Eisliger et al., 1999) und spektroskopisch unter Verwendung von Raman-Untersuchungen (Bell et al., 2000) charakterisiert. Die neutrale Form des Chromophors, Bande A, absorbiert bei etwa 400 nm in den meisten Varianten, während das Chromophor-Anion, bei dem das phenolische Ende deprotoniert ist (Bande B), im blauen bis grünen Bereich absorbiert, abhängig von den speziellen Mutationen in der Nähe des Chromophors. WT-GFP zeigt spektrale Charakteristika, die mit zwei Grundzuständen konsistent sind, die durch eine Kombination der Banden A und B charakterisiert sind, wobei das Verhältnis zwischen einem pH-Wert von 6 und 10 verhältnismäßig unvariabel ist (Palm & Wlodawer, 1999, Ward et al., 1982). Es wurde vorgeschlagen, dass ein inneres Gleichgewicht besteht, bei dem ein Proton zwischen dem Chromophor-Phenolat und dem Carboxylat von Glu222 über einen breiten pH-Bereich geteilt wird (Brejc et al., 1997, Palm et al., 1997). Jüngere elektrostatische Berechnungen stützten dieses Modell (Scharnagl et al., 1999) und bestimmen den theoretischen pK_a -Wert für eine vollständige Deprotonierung des Chromophors auf etwa 13, was mit der Feststellung einer Verdopplung der Emissionsintensität bei einem pH-Wert von 11 bis 12 konsistent ist (Bokman & Ward, 1981, Palm & Wlodawer, 1999).

[0005] Im Gegensatz zu WT-GFP titriert der Chromophor der meisten Varianten mit einem einzelnen pK_a -Wert. Die Farbemission und der pK_a -Wert des Chromophors werden stark durch die Umgebung des Proteins moduliert (Llopis et al., 1998). Glu222 ist unter GFP-Homologen vollständig konserviert (Matz et al., 1999) und seine Substitution durch ein Glutamin verringert drastisch die Wirksamkeit einer Bildung des Chromophors (Eisliger et al., 1999). Eine Protonierung von Glu222 in S65T und in GFPs mit der T203Y-Mutation (YFPs) ist im Allgemeinen vermutlich für eine Senkung des pK_a -Werts des Chromophors von dem des WT auf etwa 5,9 in GFP S65T (Eisliger et al., 1999, Kneen et al., 1998) und 5,2-5,4 in YFP (GFP S65G/V68L/S72A/T203Y) (Ormv et al., 1996, Wachter & Remington, 1999) verantwortlich. Bei den YFPs ist vermutlich die kristallographisch identifizierte Stapel-Wechselwirkung des Chromophors mit Tyr203 größtenteils für die spektrale Rot-Verschiebung verantwortlich (Wachter et al., 1998). Eine gelbe Variante des grünen Fluoreszenzproteins zu Halogeniden und Nitraten ist von R.M. Wachter und S.J. Remington beschrieben (Current Biology, Band 9, Nr. 17, 1999, Seiten R628-R629).

[0006] Im Gegensatz zu anderen Varianten haben wir festgestellt, dass der pK_a -Wert des YFP-Chromophors eine starke Abhängigkeit von der Konzentration bestimmter kleiner Anionen wie Chlorid zeigt (Wachter & Remington, 1999), und dass sich der pK_a -Wert von etwa 5,2 auf 7,0 in Gegenwart von 140 mM NaCl erhöht (Eisliger et al., 1999). Diese Sensitivität kann ausgenutzt werden, um die Schaffung neuer GFPs als Biosensoren zu ermöglichen, um Ionen zu messen, die sowohl im Cytoplasma als auch in zellulären Kompartimenten (Wachter & Remington, 1999) in lebenden Zellen vorliegen. Die Erfindung umfasst die Schaffung und Verwendung neuer GFP-Varianten, die die Fluoreszenzmessung einer Vielzahl von Ionen, einschließlich Halogeniden wie Chlorid und Iodid, ermöglichen. Diese Eigenschaften steuern Variabilität und Verwendbarkeit zu dem Arsenal von biologisch basierten Fluoreszenzindikatoren bei. Es besteht ein Bedarf für veränderte Fluoreszenzproteine mit veränderten Fluoreszenzeigenschaften und mit der Fähigkeit, auf Ionenkonzentrationen mittels einer Veränderung der Fluoreszenzeigenschaften zu reagieren.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0007] [Fig. 1A-Fig. 1B](#). (A) Schematische Darstellung des Rückgrats von GFP, produziert von Molscript (J.P. Kráulis, J. Appl. Cryst., 24:946 (1991)). Der Chromophor ist als ein Kugel-Stab-Modell gezeigt. (B) Schematische Darstellung der Gesamtstruktur von GFP. Ungefähre Nummern der Reste markieren den Anfang und das Ende der sekundären Strukturelemente.

[0008] [Fig. 2A-Fig. 2C](#). (A) Stereodarstellung des Chromophors und von Resten in unmittelbarer Nähe. Kohlenstoffatome sind als offene Kreise dargestellt, Sauerstoffatome sind ausgefüllt und Stickstoffatome sind schattiert. Lösungsmittelmoleküle sind als isolierte ausgefüllte Kreise gezeigt. (B) Teil der finalen $2F_o - F_c$ -Elektronendichtekarte, die bei 1,0 σ fassiert ist, was die Elektronendichte zeigt, die den Chromophor umgibt. (C) Schematische Darstellung, die die ersten und zweiten Sphären einer Koordinierung des Chromophors zeigt. Wasserstoffbindungen sind als gestrichelte Linien gezeigt und weisen die angegebenen Längen in Å auf. Eingeschobenes Bild: Vorgeschlagene Struktur der Carbinolamin-Zwischenverbindung, die vermutlich während einer Bildung des Chromophors gebildet wird.

[0009] [Fig. 3](#) zeigt die Nukleotidsequenz (SEQ ID NO:1) und abgeleitete Aminosäuresequenz (SEQ ID NO:2) des grünen Fluoreszenzproteins von Aequorea.

[0010] [Fig. 4A-B](#) zeigen die Nukleotidsequenz (SEQ ID NO:3) und abgeleitete Aminosäuresequenz (SEQ ID

NO:4) des veränderten Aequorea-bezogenen Fluoreszenzproteins S65G/S72A/T203Y, wobei bevorzugte Säugercodons und eine optimale Kozak-Sequenz verwendet werden.

[0011] [Fig. 5A](#) bis [Fig. 5AT](#) zeigen die Koordinaten für die Kristallstruktur des Aequorea bezogenen grünen Fluoreszenzproteins S65T.

[0012] [Fig. 6](#) zeigt die Fluoreszenz-Anregungs- und Emissionsspektren für die veränderten Fluoreszenzproteine 20A und 10C (Tabelle F). Die vertikale Linie bei 528 nm vergleicht die Emissionsmaxima von 10C, links der Linie und 20A, rechts der Linie.

[0013] [Fig. 7](#) zeigt Absorptions-Scans von YFP bei einer variablen NaCl-Konzentration und bei einem konstanten pH-Wert von 6,4, der mit 20 mM MES abgepuffert ist (-O- mM NaCl, -▽- 15 mM NaCl, -□- 50 mM NaCl, -◇- 100 mM NaCl und -Δ- 400 mM NaCl). Bande A entspricht der neutralen Form des Chromophors (λ_{\max} 392 nm) und Bande B entspricht dem Anion des Chromophors (λ_{\max} 514 nm).

[0014] [Fig. 8](#) zeigt eine normalisierte Fluoreszenzemission von (a) YFP und (b) YFP-H148Q als eine Funktion des pH-Werts und der [Cl⁻]-Konzentration bei einer konstanten Ionenstärke von 150 mM. Der pH-Wert wurde mit 20 mM TAPS, pH 8,0 (O), 20 mM HEPES, pH 7,5 (Δ), 20 mM PIPES, pH 7,0 (◇) und 20 mM MES, pH 6,5 (▽) und pH 6,0 () gesteuert. [Fig. 8\(b\)](#) umfasst auch die Fluoreszenzemission von YFP-H148Q als eine Funktion der [I⁻]-Konzentration bei pH 7,5 (*). Kaliumchlorid (oder -iodid) wurde in der angegebenen Konzentration zugegeben und die Ionenstärke wurde auf 150 mM mit Kaliumglukonat eingestellt. Die Proben mit etwa 0,01 mg/ml Protein wurden bei 514 nm angeregt und die Emissionsintensität wurde bei 528 nm bestimmt.

[0015] [Fig. 9](#) zeigt eine Stereoansicht der 2F_o-F_c-Elektronendichtekarte des YFP-H 148Q-Chromophors, von Tyr203, Arg96, Gln69 und dem verborgenen Iodid nach Verfeinerung. Die 2,1 Å-Auflösungskarte wurde bei einer Standardabweichung von +1 fassoniert. Diese Figur wurde durch das Programm BOBSCRIPT gezeichnet.

[0016] [Fig. 10](#) zeigt eine schematische Darstellung mit allen Resten, die Atome innerhalb von 5 Å des verborgenen Iodids in der Kristallstruktur von YFP-H148Q enthalten (Iodid-Tränkung).

[0017] [Fig. 11](#) zeigt eine Stereoansicht eine Überlagerung einer Untergruppe von Resten, die die Anionen-Bindehöhle von YFP-H148Q auskleiden, mit und ohne Iodid (Iodidgebundene Struktur, grau; Apo-Struktur, schwarz). Das Iodid ist durch den zentralen Kreis dargestellt. Diese Figur wurde durch das Programm MOLSCRIPT gezeichnet (Kraulis, 1991).

[0018] [Fig. 12](#) zeigt eine schematische Darstellung der unmittelbaren Umgebung des Chromophors von YFP-H148Q in der (a) Apo-Struktur und (b) Iodid-gebundenen Struktur.

[0019] [Fig. 13](#) zeigt eine Stereoansicht der Lösungsmittel-zugänglichen Oberfläche der Iodid-gebundenen YFP-H148Q-Struktur, die unter Verwendung eines 1,4 Å-Sondenradius berechnet wurde. Die Oberfläche wurde nach Entfernen aller Wassermoleküle und des Iodids berechnet. Der Chromophor und alle Oberflächensegmente, die mit dem Chromophor in Kontakt stehen, sind auch gezeigt. Die äußere Oberfläche des Proteins verläuft entlang der linken Kante der Figur. Diese Figur wurde unter Verwendung des Programms MidasPlus™ (UCSF, 1994) erstellt.

[0020] [Fig. 14](#) zeigt die Rückgrat-Atomstruktur der β-Stränge 7 und 8 von YFP, der Apo-Struktur von YFP-H148Q und der Iodid-gebundenen Struktur von YFP-H148Q. Die Seitenkette von His148 (YFP) und Gln148 (YFP-H148Q) und wenige Wassermoleküle sind auch dargestellt. Die gestrichelten Linien stellen mögliche Wasserstoffbindungen dar.

[0021] [Fig. 15](#) zeigt den pK_a-Wert des YFP-Chromophors als eine Funktion der Halogenidkonzentration (-◇-Fluorid, -▽-Iodid, -Δ-Chlorid, -O-Bromid). Der pK_a-Wert des Chromophors wurde aus Absorptions-Scans bei veränderlichen Halogenidkonzentrationen abgeschätzt (vgl. Materialien und Methoden). Es erfolgte eine Kurvenanpassung der Daten an die Gleichung 1 (vergleiche Text).

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0022] Erfindungsgemäß werden funktionelle veränderte Fluoreszenzproteine mit veränderten Fluoreszenzcharakteristika bereitgestellt, die leicht von gegenwärtig bestehenden grünen und blauen Fluoreszenzproteinen unterschieden werden können. Solche veränderten Fluoreszenzproteine ermöglichen die gleichzeitige

Messung von zwei oder mehreren Vorgängen in Zellen und können als Fluoreszenzenergiedonoren oder -akzeptoren sowie Biosensoren für einen Nachweis von Anionen verwendet werden. Veränderte Fluoreszenzproteine mit längeren Wellenlängen sind besonders geeignet, da eine photodynamische Toxizität und Autofluoreszenz von Zellen signifikant bei längeren Wellenlängen vermindert sind. Insbesondere führt das Einbringen der Substitution T203X, worin X eine aromatische Aminosäure ist, zu einer Erhöhung der Exzitations- und Emissionswellenlängenmaxima von Aequorea-bezogenen Fluoreszenzproteinen.

[0023] In einem Aspekt wird erfindungsgemäß ein Nukleinsäuremolekül bereitgestellt, dass eine Nukleotidsequenz umfasst, die für ein funktionelles verändertes Fluoreszenzprotein kodiert, dessen Aminosäuresequenz im Wesentlichen zu der Aminosäuresequenz des grünen Fluoreszenzproteins von Aequorea (SEQ ID NO:2) identisch ist und das sich von SEQ ID NO:2 durch mindestens eine Aminosäuresubstitution unterscheidet, die nicht mehr als etwa 0,5 nm von dem Chromophor des veränderten Fluoreszenzproteins entfernt liegt, wobei die Substitution die elektronische Umgebung des Chromophors verändert, wobei das funktionelle veränderte Fluoreszenzprotein eine zu dem grünen Fluoreszenzprotein von Aequorea verschiedene Fluoreszenzeigenschaft aufweist.

[0024] In einem erfindungsgemäßen Aspekt wird ein Nukleinsäuremolekül bereitgestellt, das eine Nukleotidsequenz umfasst, die für ein funktionelles verändertes Fluoreszenzprotein kodiert, dessen Aminosäuresequenz im Wesentlichen zu der Aminosäuresequenz des grünen Fluoreszenzproteins von Aequorea (SEQ ID NO:2) identisch ist, und das sich von SEQ ID NO:2 durch mindestens eine Substitution bei T203 und insbesondere T203X unterscheidet, wobei X eine aromatische Aminosäure ist, die ausgewählt ist aus H, Y, W oder F, wobei das funktionelle veränderte Fluoreszenzprotein eine zu dem grünen Fluoreszenzprotein von Aequorea unterschiedliche Fluoreszenzeigenschaft aufweist. In einer Ausführungsform umfasst die Aminosäuresequenz ferner eine Substitution bei 565, wobei die Substitution ausgewählt ist aus S65G, S65T, S65A, S65L, S65C, S65V und S65I. In einer weiteren Ausführungsform unterscheidet sich die Aminosäuresequenz um nicht mehr als die Substitutionen S65T/T203H, S65T/T203Y, S72A/F64L/S65G/T203Y, S65G/V68L/Q69K/S72A/T203Y, S72A/S65G/V68L/T203Y, S65G/S72A/T203Y oder S65G/S72A/T203W. In einer weiteren Ausführungsform umfasst die Aminosäuresequenz ferner eine Substitution bei Y66, wobei die Substitution ausgewählt ist aus Y66H, Y66F und Y66W. In einer weiteren Ausführungsform umfasst die Aminosäuresequenz ferner eine Mutation aus Tabelle A. In einer weiteren Ausführungsform umfasst die Aminosäuresequenz ferner eine Faltungsmutation. In einer weiteren Ausführungsform unterscheidet sich die Nukleotidsequenz, die für das Protein kodiert, von der Nukleotidsequenz von SEQ ID NO:1 durch die Substitution von mindestens einem Codon durch ein bevorzugtes Säugercodon. In einer Ausführungsform kodiert das Nukleinsäuremolekül ein Fusionsprotein, wobei das Fusionsprotein ein interessierendes Polypeptid und das funktionelle veränderte Fluoreszenzprotein umfasst.

[0025] In einem weiteren Aspekt wird erfindungsgemäß ein Nukleinsäuremolekül bereitgestellt, das eine Nukleotidsequenz umfasst, die für ein funktionelles verändertes Fluoreszenzprotein kodiert, dessen Aminosäuresequenz im Wesentlichen zu der Aminosäuresequenz des grünen Fluoreszenzproteins von Aequorea (SEQ ID NO:2) identisch ist und das sich von SEQ ID NO:2 durch mindestens eine Aminosäuresubstitution bei L42, V61, T62, V68, Q69, Q94, N121, Y145, H148, V150, F165, I167, Q183, N185, L220, E222 (nicht E222G) oder V224 unterscheidet, wobei das funktionelle veränderte Fluoreszenzprotein eine zu dem grünen Fluoreszenzprotein von Aequorea unterschiedliche Fluoreszenzeigenschaft aufweist. In einer Ausführungsform ist die Aminosäuresubstitution wie folgt:

L42X, worin X ausgewählt ist aus C, F, H, W und Y,
V61X, worin X ausgewählt ist aus F, Y, H und C,
T62X, worin X ausgewählt ist aus A, V, F, S, D, N, Q, Y, H und C,
V68X, worin X ausgewählt ist aus F, Y und H,
Q69X, worin X ausgewählt ist aus K, R, E und G,
Q94X, worin X ausgewählt ist aus D, E, H, K und N,
N121X, worin X ausgewählt ist aus F, H, W und Y,
Y145X, worin X ausgewählt ist aus W, C, F, L, E, H, K und Q,
H148X, worin X ausgewählt ist aus F, Y, N, K, Q und R,
V150X, worin X ausgewählt ist aus F, Y und H,
F165X, worin X ausgewählt ist aus H, Q, W und Y,
I167X, worin X ausgewählt ist aus F, Y und H,
Q183X, worin X ausgewählt ist aus H, Y, E und K,
N185X, worin X ausgewählt ist aus D, E, H, K und Q,
L220X, worin X ausgewählt ist aus H, N, Q und T,
E222X, worin X ausgewählt ist aus N und Q, oder

V224X, worin X ausgewählt ist aus H, N, Q, T, F, W und Y.

[0026] In einem weiteren Aspekt wird erfindungsgemäß ein Expressionsvektor bereitgestellt, der Expressionskontrollsequenzen umfasst, die operativ mit einem jeglichen der vorstehend beschriebenen Nukleinsäuremoleküle verbunden sind. In einem weiteren Aspekt wird erfindungsgemäß eine rekombinante Wirtszelle bereitgestellt, die den vorstehend beschriebenen Expressionsvektor umfasst.

[0027] In einem weiteren Aspekt wird erfindungsgemäß ein funktionelles verändertes Fluoreszenzprotein bereitgestellt, dessen Aminosäuresequenz im Wesentlichen zu der Aminosäuresequenz des grünen Fluoreszenzproteins von Aequorea (SEQ ID NO:2) identisch ist und sich von SEQ ID NO:2 durch mindestens eine Aminosäuresubstitution unterscheidet, die nicht mehr als etwa 0,5 nm von dem Chromophor des veränderten Fluoreszenzproteins entfernt liegt, wobei die Substitution die elektronische Umgebung des Chromophors verändert, wobei das funktionelle veränderte Fluoreszenzprotein eine zu dem grünen Fluoreszenzprotein von Aequorea unterschiedliche Fluoreszenzeigenschaft aufweist.

[0028] In einem weiteren Aspekt wird erfindungsgemäß ein funktionelles verändertes Fluoreszenzprotein bereitgestellt, dessen Aminosäuresequenz im Wesentlichen zu der Aminosäuresequenz des grünen Fluoreszenzproteins von Aequorea (SEQ ID NO:2) identisch ist und das sich von SEQ ID NO:2 durch mindestens die Aminosäuresubstitution bei T203 und insbesondere T203X unterscheidet, wobei X eine aromatische Aminosäure ist, die ausgewählt ist aus H, Y, W oder F, wobei das funktionelle veränderte Fluoreszenzprotein eine zu dem grünen Fluoreszenzprotein von Aequorea unterschiedliche Fluoreszenzeigenschaft aufweist. In einer Ausführungsform umfasst die Aminosäuresequenz ferner eine Substitution bei 565, wobei die Substitution ausgewählt ist aus S65G, S65T, S65A, S65L, S65C, S65V und S65I. In einer weiteren Ausführungsform unterscheidet sich die Aminosäuresequenz um nicht mehr als die Substitutionen S65T/T203H, S65T/T203Y, S72A/F64L/S65G/T203Y, S72A/S65G/V68L/T203Y, S65G/V68L/Q69K/S72A/T203Y, S65G/S72A/T203Y oder S65G/S72A/T203W. In einer weiteren Ausführungsform umfasst die Aminosäuresequenz ferner eine Substitution bei Y66, wobei die Substitution ausgewählt ist aus Y66H, Y66F und Y66W. In einer weiteren Ausführungsform umfasst die Aminosäuresequenz ferner eine Faltungsmutation. In einer weiteren Ausführungsform ist das veränderte Fluoreszenzprotein Teil eines Fusionsproteins, wobei das Fusionsprotein ein interessierendes Polypeptid und das funktionelle veränderte Fluoreszenzprotein umfasst.

[0029] In einem weiteren Aspekt wird erfindungsgemäß ein funktionelles verändertes Fluoreszenzprotein bereitgestellt, dessen Aminosäuresequenz im Wesentlichen zu der Aminosäuresequenz des grünen Fluoreszenzproteins von Aequorea (SEQ ID NO:2) identisch ist und das sich von SEQ ID NO:2 durch mindestens eine Aminosäuresubstitution bei L42, V61, T62, V68, Q69, Q94, N121, Y145, H148, V150, F165, I167, Q183, N185, L220, E222 oder V224 unterscheidet, wobei das funktionelle veränderte Fluoreszenzprotein eine zu dem grünen Fluoreszenzprotein von Aequorea unterschiedliche Fluoreszenzeigenschaft aufweist.

[0030] In einem weiteren Aspekt wird erfindungsgemäß ein Fluoreszenz-markierter Antikörper bereitgestellt, der einen Antikörper umfasst, der an ein jegliches der vorstehend beschriebenen funktionellen veränderten Fluoreszenzproteine gekoppelt ist. In einer Ausführungsform ist der Fluoreszenz-markierte Antikörper ein Fusionsprotein, wobei das Fusionsprotein den Antikörper in Fusion an das funktionelle veränderte Fluoreszenzprotein umfasst.

[0031] In einem weiteren Aspekt wird erfindungsgemäß ein Nukleinsäuremolekül bereitgestellt, das eine Nukleotidsequenz umfasst, die für einen Antikörper kodiert und die an eine Nukleotidsequenz fusioniert ist, die für ein erfindungsgemäßes funktionelles verändertes Fluoreszenzprotein kodiert.

[0032] In einem weiteren Aspekt wird erfindungsgemäß eine Fluoreszenz-markierte Nukleinsäuresonde bereitgestellt, die eine Nukleinsäuresonde umfasst, die an ein funktionelles verändertes Fluoreszenzprotein gekoppelt ist, dessen Aminosäuresequenz Teil der Erfindung ist. Die Fusion kann über ein Linkerpeptid erfolgen.

[0033] In einem weiteren Aspekt wird erfindungsgemäß ein Verfahren zur Bestimmung, ob ein Gemisch ein Ziel enthält, bereitgestellt, das ein In-Kontakt-Bringen des Gemisches mit einer Fluoreszenz-markierten Sonde, die eine Sonde und ein erfindungsgemäßes funktionelles verändertes Fluoreszenzprotein umfasst, und ein Bestimmen, ob das Ziel an die Sonde gebunden hat, umfasst. In einer Ausführungsform wird das Zielmolekül auf einer festen Matrix abgefangen.

[0034] In einem weiteren Aspekt wird erfindungsgemäß ein Verfahren zur Veränderung eines funktionellen veränderten Fluoreszenzproteins mit einer Fluoreszenzeigenschaft, die zu dem grünen Fluoreszenzprotein

von Aequorea unterschiedlich ist, bereitgestellt, das ein Substituieren einer Aminosäure, die nicht mehr als 0,5 nm von einem jeglichen Atom in dem Chromophor eines Aequorea-bezogenen grünen Fluoreszenzproteins entfernt liegt, durch eine andere Aminosäure umfasst, wobei die Substitution eine Fluoreszenzeigenschaft des Proteins verändert. In einer Ausführungsform verändert die Aminosäuresubstitution die elektronische Umgebung des Chromophors.

[0035] In einem weiteren Aspekt wird erfindungsgemäß ein Verfahren zur Veränderung eines funktionellen veränderten Fluoreszenzproteins mit einer zu dem grünen Fluoreszenzprotein von Aequorea unterschiedlichen Fluoreszenzeigenschaft bereitgestellt, das ein Substituieren von Aminosäuren in einer Schleifendomäne eines Aequorea-bezogenen grünen Fluoreszenzproteins durch Aminosäuren umfasst, um eine Konsensus-Sequenz für eine Phosphorylierung oder für eine Proteolyse zu schaffen.

[0036] In einem weiteren Aspekt wird erfindungsgemäß ein Verfahren zur Erzeugung eines Fluoreszenzresonanzenergietransfers bereitgestellt, das ein Bereitstellen eines Donormoleküls, das ein erfindungsgemäßes funktionelles verändertes Fluoreszenzprotein umfasst, ein Bereitstellen eines geeigneten Akzeptormoleküls für das Fluoreszenzprotein und ein Bringen des Donormoleküls und des Akzeptormoleküls in einen ausreichend nahen Kontakt umfasst, um einen Fluoreszenzresonanzenergietransfer zu ermöglichen.

[0037] In einem weiteren Aspekt wird erfindungsgemäß ein Verfahren zur Erzeugung von Fluoreszenzresonanzenergietransfer bereitgestellt, das ein Bereitstellen eines Akzeptormoleküls, das ein erfindungsgemäßes funktionelles verändertes Fluoreszenzprotein umfasst, ein Bereitstellen eines geeigneten Donormoleküls für das Fluoreszenzprotein und ein Bringen des Donormoleküls und des Akzeptormoleküls in einen ausreichend nahen Kontakt umfasst, um einen Fluoreszenzresonanzenergietransfer zu ermöglichen. In einer Ausführungsform ist das Donormolekül ein verändertes Fluoreszenzprotein, dessen Aminosäuresequenz die Substitution T203I umfasst, und das Akzeptormolekül ist ein verändertes Fluoreszenzprotein, dessen Aminosäuresequenz die Substitution T203X umfasst, wobei X eine aromatische Aminosäure ist, die aus H, Y, W oder F ausgewählt ist, wobei das funktionelle veränderte Fluoreszenzprotein eine zu dem grünen Fluoreszenzprotein von Aequorea unterschiedliche Fluoreszenzeigenschaft aufweist.

[0038] In einem weiteren Aspekt wird erfindungsgemäß ein Kristall eines Proteins bereitgestellt, das ein Fluoreszenzprotein mit einer Aminosäuresequenz umfasst, die im Wesentlichen zu SEQ ID NO:2 identisch ist, wobei der Kristall mit mindestens einer Auflösung von 2,0 bis 3,0 Å streut.

[0039] In einer weiteren Ausführungsform wird erfindungsgemäß ein Berechnungsverfahren zum Entwerfen eines Fluoreszenzproteins bereitgestellt, das ein Bestimmen aus einem dreidimensionalen Modell eines kristallisierten Fluoreszenzproteins, das ein Fluoreszenzprotein mit einem gebundenen Liganden umfasst, von mindestens einer wechselwirkenden Aminosäure des Fluoreszenzproteins, die mit mindestens einer ersten chemischen Gruppe des Liganden wechselwirkt, und ein Auswählen mindestens einer chemischen Modifikation der ersten chemischen Gruppe umfasst, um eine zweite chemische Gruppe mit einer Struktur zu erzeugen, um entweder eine Wechselwirkung zwischen der wechselwirkenden Aminosäure und der zweiten chemischen Gruppe im Vergleich zu der Wechselwirkung zwischen der wechselwirkenden Aminosäure und der ersten chemischen Gruppe zu senken oder zu erhöhen.

[0040] In einer weiteren Ausführungsform wird erfindungsgemäß ein Berechnungsverfahren zum Modellieren der dreidimensionalen Struktur eines Fluoreszenzproteins bereitgestellt, das ein Bestimmen einer dreidimensionalen Beziehung zwischen mindestens zwei Atomen umfasst, die in den Atomkoordinaten der **Fig.** 5-1 bis 5-28 aufgeführt sind.

[0041] In einer weiteren Ausführungsform wird erfindungsgemäß eine Vorrichtung bereitgestellt, die eine Speichervorrichtung und mindestens 10 in der Vorrichtung gespeicherte Atomkoordinaten umfasst, die aus den Atomkoordinaten ausgewählt sind, die in den **Fig.** 5-1 bis 5-28 aufgeführt sind. In einer Ausführungsform ist die Speichervorrichtung eine Computer-lesbare Vorrichtung, die die Codons speichert und als Input die Atomkoordinaten empfängt. In einer weiteren Ausführungsform ist die Computer-lesbare Vorrichtung eine Floppy Disk oder ein Laufwerk.

[0042] In einer weiteren Ausführungsform wird erfindungsgemäß ein Nukleinsäuremolekül bereitgestellt, das eine Nukleotidsequenz umfasst, die für ein funktionelles verändertes Fluoreszenzprotein kodiert, dessen Aminosäuresequenz im Wesentlichen zu der Aminosäuresequenz des grünen Fluoreszenzproteins von Aequorea (SEQ ID NO:2) identisch ist und das sich von SEQ ID NO:2 durch mindestens eine erste Substitution an Position T203, wobei die Substitution ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus H, Y, W oder F, und mindes-

tens eine zweite Substitution an Position H148 unterscheidet.

[0043] In einem weiteren Aspekt umfasst die Erfindung ein Verfahren zur Bestimmung des Vorliegens eines interessierenden Anions in einer Probe, das die Schritte eines Einbringens eines veränderten grünen Fluoreszenzproteins in eine Probe, wobei das veränderte grüne Fluoreszenzprotein eine Aminosäuresequenz umfasst, die im Wesentlichen zu der Aminosäuresequenz des grünen Fluoreszenzproteins von Aequorea (SEQ ID NO:2) identisch ist und das sich von SEQ ID NO:2 durch mindestens eine erste Substitution an Position T203 unterscheidet, wobei die Substitution ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus H, Y, W oder F, und ein Bestimmen der Fluoreszenz des veränderten grünen Fluoreszenzproteins in der Probe umfasst.

[0044] In einer weiteren Ausführungsform umfasst die Erfindung ein funktionelles verändertes Fluoreszenzprotein, dessen Aminosäuresequenz im Wesentlichen zu der Aminosäuresequenz des grünen Fluoreszenzproteins von Aequorea (SEQ ID NO:2) identisch ist und das sich von SEQ ID NO:2 durch mindestens eine erste Substitution an Position T203, wobei die Substitution ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus H, Y, W oder F, und mindestens eine zweite Substitution an der Position H148 unterscheidet, wobei das funktionelle veränderte Fluoreszenzprotein eine zu dem grünen Fluoreszenzprotein von Aequorea unterschiedliche Fluoreszenzeigenschaft aufweist.

[0045] In einer weiteren Ausführungsform umfasst die Erfindung eine Wirtszelle, die ein funktionelles verändertes Fluoreszenzprotein umfasst, dessen Aminosäuresequenz im Wesentlichen zu der Aminosäuresequenz des grünen Fluoreszenzproteins von Aequorea (SEQ ID NO:2) identisch ist und das sich von SEQ ID NO:2 durch mindestens eine erste Substitution an Position T203, wobei die Substitution ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus H, Y, W oder F, und mindestens eine zweite Substitution an Position H148 unterscheidet, wobei das funktionelle veränderte Fluoreszenzprotein eine zu dem grünen Fluoreszenzprotein von Aequorea unterschiedliche Fluoreszenzeigenschaft aufweist.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

I. Definitionen

[0046] Wenn nicht anders definiert, haben alle technischen und wissenschaftlichen Begriffe, die hier verwendet werden, die gleiche Bedeutung wie sie herkömmlicherweise von dem Fachmann verstanden werden. Obwohl jegliche Verfahren und Materialien, die zu den hier beschriebenen ähnlich oder äquivalent sind, bei der Durchführung oder beim Testen der Erfindung verwendet werden können, sind die bevorzugten Verfahren und Materialien beschrieben. Für die Erfindung sind die nachstehenden Begriffe nachstehend definiert.

[0047] "Bindepaaar" betrifft zwei Gruppen (z.B. chemisch oder biochemisch), die eine Affinität füreinander aufweisen. Beispiele für Bindepaaare umfassen Antigen/Antikörper, Lectin/Avidin, Zielpolynukleotid/Sondenoligonukleotid, Antikörper/Anti-Antikörper, Rezeptor/Ligand, Enzym/Ligand und dergleichen. "Ein Mitglied eines Bindepaaars" betrifft eine Einheit des Paaars, wie ein Antigen oder einen Liganden.

[0048] "Nukleinsäure" betrifft ein Desoxyribonukleotid- oder Ribonukleotidpolymer in entweder einzel- oder doppelsträngiger Form und umfasst, wenn nicht anderweitig begrenzt, bekannte Analoga von natürlichen Nukleotiden, die in einer ähnlichen Weise wie natürlich auftretende Nukleotide fungieren können. Man wird erkennen, dass, wenn ein Nukleinsäuremolekül durch eine DNA-Sequenz dargestellt ist, dies auch RNA-Moleküle mit der entsprechenden RNA-Sequenz umfasst, worin "U" "T" ersetzt.

[0049] "Rekombinantes Nukleinsäuremolekül" betrifft ein Nukleinsäuremolekül, das nicht natürlich vorkommt und das zwei Nukleotidsequenzen umfasst, die nicht natürlich miteinander verbunden sind. Rekombinante Nukleinsäuremoleküle werden durch künstliche Rekombination wie genetische Veränderungstechniken oder chemische Synthese produziert.

[0050] In Bezug auf eine Nukleotidsequenz bedeutet ein Peptid "kodieren", dass die Sequenz bei einer Transkription und Translation von mRNA das Polypeptid erzeugt. Dies umfasst sowohl den kodierenden Strang, dessen Nukleotidsequenz zu der mRNA identisch ist und dessen Sequenz gewöhnlich in dem Sequenzprotokoll bereitgestellt wird, sowie den komplementären Strang, der als Matrize für eine Transkription verwendet wird. Wie der Fachmann erkennen wird, umfasst dies auch alle degenerierten Nukleotidsequenzen, die die gleiche Aminosäuresequenz kodieren. Nukleotidsequenzen, die für ein Polypeptid kodieren, umfassen Sequenzen, die Introns enthalten.

[0051] "Expressionskontrollsequenzen" betrifft Nukleotidsequenzen, die die Expression einer Nukleotidsequenz regulieren, mit der sie operativ verbunden sind. Expressionskontrollsequenzen sind mit einer Nukleotidsequenz "operativ verbunden", wenn die Expressionskontrollsequenzen die Transkription und gegebenenfalls Translation der Nukleotidsequenz kontrollieren und regulieren. Somit können Expressionskontrollsequenzen geeignete Promotoren, Enhancer, Transkriptionsterminatoren, ein Startcodon (d.h. ATG) vor einem Protein-kodierenden Gen, Splicing-Signale für Introns, ein Aufrechterhalten des richtigen Leserasters des Gens, um eine korrekte Translation der mRNA zu erlauben, und Stopp-Codons umfassen.

[0052] "Natürlich auftretend" wie hier verwendet und auf einen Gegenstand angewandt betrifft die Tatsache, dass ein Gegenstand in der Natur aufgefunden werden kann. Zum Beispiel ist eine Polypeptid- oder Polynukleotid-Sequenz, die in einem Organismus (einschließlich Viren) vorkommt, der von einer natürlichen Quelle isoliert werden kann und nicht zielgerichtet durch den Menschen im Labor modifiziert wurde, natürlich auftretend.

[0053] "Operativ verbunden" betrifft eine Nachbarschaft, wobei die Komponenten, die derartig beschrieben werden, in einer Beziehung stehen, die ihnen erlaubt, in ihrer beabsichtigten Weise zu fungieren. Eine Kontrollsequenz, die mit einer kodierenden Sequenz "operativ verbunden" ist, ist in einer derartigen Weise ligiert, dass die Expression der kodierenden Sequenz unter Bedingungen erreicht wird, die mit den Kontrollsequenzen kompatibel sind, beispielsweise wenn die geeigneten Moleküle (wie Inducer und Polymerasen) an die Kontroll- oder regulatorische(n) Sequenz(en) gebunden sind.

[0054] "Kontrollsequenz" betrifft Polynukleotid-Sequenzen, die notwendig sind, um die Expression von kodierenden und nicht-kodierenden Sequenzen, an die sie ligiert sind, zu bewirken. Die Art solcher Kontrollsequenzen unterscheidet sich abhängig von dem Wirtsorganismus. In Prokaryonten umfassen solche Kontrollsequenzen im Allgemeinen einen Promotor, Ribosomenbindestellen und eine Transkriptionsterminationssequenz. In Eukaryonten umfassen solche Kontrollsequenzen im Allgemeinen Promotoren und Transkriptionsterminationssequenzen. Der Begriff "Kontrollsequenzen" soll minimal Komponenten umfassen, deren Gegenwart eine Expression beeinflussen kann, und kann auch zusätzliche Komponenten umfassen, deren Gegenwart vorteilhaft ist, wie Leader-Sequenzen und Fusionspartnersequenzen.

[0055] "Isoliertes Polynukleotid" betrifft ein Polynukleotid eines genomischen, cDNA- oder synthetischen Ursprungs oder einer Kombination davon, wobei aufgrund seines Ursprungs das "isolierte Polynukleotid" (1) nicht mit der Zelle assoziiert ist, in der das "isolierte Polynukleotid" natürlich vorgefunden wird, oder (2) operativ mit einem Polynukleotid verbunden ist, mit dem es in der Natur nicht verbunden ist.

[0056] "Polynukleotid" betrifft eine polymerische Form von Nukleotiden mit mindestens 10 Basen Länge, entweder Ribonukleotide oder Desoxynukleotide oder eine modifizierte Form eines der beiden Nukleotidtypen. Der Begriff umfasst einzel- und doppelsträngige Formen von DNA.

[0057] Der Begriff "Sonde" betrifft eine Substanz, die spezifisch an eine andere Substanz (ein "Ziel") bindet. Sonden umfassen beispielsweise Antikörper, Nukleinsäuren, Rezeptoren und deren Liganden.

[0058] "Modulation" betrifft die Fähigkeit, eine funktionelle Eigenschaft einer biologischen Aktivität oder eines Vorgangs (wie Enzymaktivität oder Rezeptorbindung) entweder zu verstärken oder zu hemmen. Eine solche Verstärkung oder Hemmung kann von dem Auftreten eines spezifischen Ereignisses wie einer Aktivierung eines Signaltransduktionswegs abhängen und/oder kann sich nur in bestimmten Zelltypen manifestieren.

[0059] Der Begriff "Modulator" betrifft ein chemisches (natürlich auftretend oder nicht-natürlich auftretend) wie ein synthetisches Molekül (wie Nukleinsäure-, Protein-, Nicht-Peptid- oder organisches Molekül) oder einen Extrakt, der aus biologischen Materialien wie Bakterien, Pflanzen, Pilzen oder tierischen (insbesondere Säuger-) Zellen oder Geweben hergestellt wurde. Modulatoren können auf ihre mögliche Aktivität als Inhibitoren oder Aktivatoren (direkt oder indirekt) eines biologischen Vorgangs oder von biologischen Vorgängen (wie Agonist, teilweiser Antagonist, teilweiser Agonist, inverser Agonist, Antagonist, antineoplastische Mittel, cytotoxische Mittel, Inhibitoren einer neoplastischen Transformation oder Zellproliferation, Zellproliferation-fördernde Mittel und dergleichen) durch Einbau in die hier beschriebenen Screeningtests getestet werden. Die Aktivität eines Modulators kann bekannt, unbekannt oder teilweise bekannt sein.

[0060] Der Begriff "Testchemikalie" betrifft eine Chemikalie, die durch ein oder mehrere erfindungsgemäße Screeningverfahren als ein möglicher Modulator getestet werden soll. Es ist gewöhnlich unbekannt, ob eine Testchemikalie an das interessierende Ziel bindet. Der Begriff "Kontroll-Testchemikalie" betrifft eine Chemikalie, von der bekannt ist, dass sie an das Ziel bindet (wie ein bekannter Agonist, Antagonist, teilweiser Agonist

oder inverser Agonist). Gewöhnlich werden verschiedene vorbestimmte Konzentrationen von Testchemikalien für ein Screening verwendet wie 0,01 μM , 0,1 μM , 1,0 μM und 10,0 μM .

[0061] Der Begriff "Ziel" betrifft eine biochemische Einheit, die in einem biologischen Vorgang einbezogen ist. Ziele sind typischerweise Proteine, die eine nützliche Rolle bei der Physiologie oder Biologie eines Organismus spielen. Eine therapeutische Chemikalie bindet an ein Ziel, um dessen Funktion zu verändern oder zu modulieren. Wie hier verwendet können Ziele Zelloberflächenrezeptoren, G-Proteine, Kinasen, Ionenkanäle, Phospholipasen und andere hier beschriebene Proteine umfassen.

[0062] Der Begriff "Markierung" betrifft eine durch spektroskopische, photochemische, biochemische, immunochemische oder chemische Mittel nachweisbare Zusammensetzung. Beispielsweise umfassen verwendbare Markierungen ^{32}P , Fluoreszenzfarbstoffe, Fluoreszenzproteine, Elektronendichte-Reagenzien, Enzyme (wie sie beispielsweise herkömmlich in einem ELISA verwendet werden), Biotin, Digoxigenin oder Haptene und Proteine, für die Antisera oder monoklonale Antikörper verfügbar sind. Beispielsweise können erfindungsgemäße Polypeptide als nachweisbare Markierungen beispielsweise durch deren Einbau in ein Polypeptid hergestellt werden und verwendet werden, um Antikörper zu markieren, die spezifisch mit dem Polypeptid reagieren. Eine Markierung erzeugt häufig ein messbares Signal wie Radioaktivität, Fluoreszenzstrahlung oder Enzymaktivität, die für eine Quantifizierung der Menge der gebundenen Markierung verwendet werden können.

[0063] Der Begriff "Nukleinsäuresonde" betrifft ein Nukleinsäuremolekül, das an eine spezifische Sequenz oder Untersequenz eines anderen Nukleinsäuremoleküls bindet. Eine Sonde ist vorzugsweise ein Nukleinsäuremolekül, das über komplementäre Basenpaarung an die vollständige Sequenz oder an eine Untersequenz einer Ziel-Nukleinsäure bindet. Es wird verstanden werden, dass Sonden an Zielsequenzen binden können, die keine vollständige Komplementarität mit der Sondensequenz aufweisen, abhängig von der Stringenz der Hybridisierungsbedingungen. Sonden sind vorzugsweise direkt markiert, beispielsweise mit Isotopen, Chromophoren, Lumiphoren, Chromogenen, Fluoreszenzproteinen, oder sie sind indirekt markiert wie mit Biotin, an das ein Streptavidinkomplex später binden kann. Durch Testen des Vorliegens oder Fehlens der Sonde kann man das Vorliegen oder das Fehlen der ausgewählten Sequenz oder Untersequenz nachweisen.

[0064] Eine "markierte Nukleinsäuresonde" ist eine Nukleinsäuresonde, die entweder kovalent, über einen Linker oder über ionische, van der Waals- oder Wasserstoffbindungen an eine Markierung gebunden ist, so dass das Vorliegen der Sonde durch Nachweis des Vorliegens der an die Sonde gebundenen Markierung nachgewiesen werden kann.

[0065] Die Begriffe "Polypeptid" und "Protein" betreffen ein Polymer von Aminosäureresten. Die Begriffe finden Anwendung auf Aminosäurepolymere, in denen ein oder mehrere Aminosäurereste ein künstliches chemisches Analogon einer entsprechenden natürlich auftretenden Aminosäure sind, sowie auf natürlich auftretende Aminosäurepolymere. Der Begriff "rekombinantes Protein" betrifft ein Protein, das durch Expression einer die Aminosäuresequenz des Proteins kodierenden Nukleotidsequenz von einem rekombinanten DNA-Molekül produziert wird.

[0066] Der Begriff "rekombinante Wirtszelle" betrifft eine Zelle, die ein rekombinantes Nukleinsäuremolekül umfasst. Somit können beispielsweise rekombinante Wirtszellen Gene exprimieren, die nicht in der nativen (nicht-rekombinanten) Form der Zelle vorliegen.

[0067] Die Begriffe "isoliert", "aufgereinigt" oder "biologisch rein" betreffen ein Material, das im Wesentlichen oder wesentlich frei von Bestandteilen ist, die normalerweise das Material, wie es in dem nativen Zustand vorliegt, begleiten. Reinheit und Homogenität werden typischerweise unter Verwendung analytischer chemischer Techniken wie Polyacrylamidgelelektrophorese oder Hochleistungs-Flüssigchromatographie bestimmt. Ein Protein- oder Nukleinsäuremolekül, das die vorherrschende Protein- oder Nukleinsäurespezies in einer Zubereitung ist, ist im Wesentlichen aufgereinigt. Im Allgemeinen wird ein isoliertes Protein- oder Nukleinsäuremolekül mehr als 80% aller in der Zubereitung vorliegenden makromolekularen Spezies umfassen. Vorzugsweise ist das Protein aufgereinigt, so dass es mehr als 90% aller vorliegender makromolekularer Spezies darstellt. Mehr bevorzugt ist das Protein zu mehr als 95% aufgereinigt und am meisten bevorzugt ist das Protein zu wesentlicher Homogenität aufgereinigt, wobei andere makromolekulare Spezies nicht durch herkömmliche Verfahren nachgewiesen werden.

[0068] Der Begriff "natürlich auftretend", wie er auf einen Gegenstand angewandt wird, betrifft die Tatsache, dass ein Gegenstand in der Natur aufzufinden ist. Beispielsweise ist eine Polypeptid- oder Polynukleotid-Se-

quenz, die in einem Organismus (einschließlich Viren) vorliegt, der von einer natürlichen Quelle isoliert werden kann und nicht zielgerichtet durch den Menschen im Labor modifiziert wurde, natürlich auftretend.

[0069] Der Begriff "Antikörper" betrifft ein Polypeptid, das im Wesentlichen durch ein Immunglobulin-Gen oder durch Immunglobulin-Gene oder durch Fragmente davon kodiert wird und das spezifisch einen Analyten (Antigen) bindet und erkennt. Die bekannten Immunglobulin-Gene umfassen die kappa-, lambda-, alpha-, gamma-, delta-, epsilon- und mu-konstante Region-Gene, sowie die unzähligen Immunglobulin-variable Region-Gene. Antikörper treten beispielsweise als intakte Immunglobuline oder als eine Reihe von gut charakterisierten Fragmenten auf, die durch Verdauung mit verschiedenen Peptidasen produziert werden. Dies umfasst beispielsweise Fab'- und F(ab)₂-Fragmente. Der Begriff "Antikörper" wie hier verwendet umfasst auch Antikörperfragmente, die entweder durch die Modifikation von ganzen Antikörpern oder de novo unter Verwendung rekombinanter DNA-Verfahren produziert werden.

[0070] Der Begriff "Immunoassay" betrifft einen Test, der einen Antikörper verwendet, um spezifisch einen Analyten zu binden. Der Immunoassay ist durch die Verwendung von spezifischen Bindeeigenschaften eines bestimmten Antikörpers gekennzeichnet, um den Analyten zu isolieren, auf ihn abzielen und/oder zu quantifizieren.

[0071] Der Begriff "identisch" im Zusammenhang mit zwei Nukleinsäure- oder Polypeptidsequenzen betrifft die Reste in den zwei Sequenzen, die in einem Alignment auf eine maximale Übereinstimmung identisch sind. Wenn ein Prozentwert an Sequenzidentität in Bezug auf Proteine oder Peptide verwendet wird, ist anerkannt, dass sich Positionen von Resten, die nicht identisch sind, häufig durch konservative Aminosäuresubstitutionen unterscheiden, wobei Aminosäurereste gegen andere Aminosäurereste mit ähnlichen chemischen Eigenschaften (wie Ladung oder Hydrophobizität) ersetzt sind und daher nicht die funktionellen Eigenschaften des Moleküls verändern. Falls sich Sequenzen in konservativen Substitutionen unterscheiden, kann die prozentuale Sequenzidentität nach oben angepasst werden, um bezüglich der konservativen Art der Substitution zu korrigieren. Mittel für ein Bewerkstelligen dieser Anpassung sind bekannt. Typischerweise umfasst dies eine Bewertung einer konservativen Substitution als eine teilweise und nicht als eine vollständige Fehlpaarung, wobei dadurch die prozentuale Sequenzidentität erhöht wird. Somit wird beispielsweise, falls einer identischen Aminosäure eine Bewertung von 1 zugewiesen wird und einer nicht-konservativen Substitution eine Bewertung von 0 zugewiesen wird, einer konservativen Substitution eine Bewertung zwischen 0 und 1 zugewiesen. Die Bewertung von konservativen Substitutionen wird beispielsweise gemäß bekannter Algorithmen berechnet; vergleiche beispielsweise Meyers und Miller, *Computer Applic. Biol. Sci.*, 4: 11-17 (1988), Smith und Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482, Needleman und Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48: 443, Pearson und Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444, Higgins und Sharp (1988) *Gene*, 73: 237-244 und Higgins und Sharp (1989) *CABIOS* 5: 151-153, Corpet et al. (1988) *Nucleic Acids Research* 16, 10881-90, Huang et al. (1992) *Computer Applications in the Biosciences* 8, 155-65, und Pearson et al. (1994) *Methods in Molecular Biology* 24, 307-31. Ein Alignment erfolgt auch häufig durch Betrachtung und manuelles Alignment.

[0072] "Konservativ modifizierte Veränderungen" einer bestimmten Nukleinsäuresequenz betrifft diejenigen Nukleinsäuren, die für identische oder im Wesentlichen identische Aminosäuresequenzen kodieren, oder, falls die Nukleinsäure keine Aminosäuresequenz kodiert, im Wesentlichen identische Sequenzen. Aufgrund der Degeneriertheit des genetischen Codes kodiert eine große Anzahl an funktionell identischen Nukleinsäuren ein bestimmtes Polypeptid. Zum Beispiel kodieren die Codons CGU, CGC, CGA, CGG, AGA und AGG alle die Aminosäure Arginin. Somit kann an jeder Position, an der ein Arginin durch ein Codon spezifiziert wird, das Codon durch ein jegliches der entsprechenden beschriebenen Codons verändert werden, ohne das kodierte Polypeptid zu verändern. Solche Nukleinsäureveränderungen sind "stille Veränderungen", die eine Art von "konservativ modifizierten Veränderungen" sind. Jede Nukleinsäuresequenz, die für ein Polypeptid kodiert, beschreibt auch jede mögliche stille Veränderung. Der Fachmann wird erkennen, dass jedes Codon in einer Nukleinsäure (mit der Ausnahme von AUG, das herkömmlicherweise das einzige Codon für Methionin ist) durch Standardverfahren verändert werden kann, um ein funktionell identisches Molekül zu ergeben. Dementsprechend ist jede "stille Veränderung" einer Nukleinsäure, die für ein Polypeptid kodiert, implizit in jeder beschriebenen Sequenz offenbart. Ferner wird der Fachmann erkennen, dass einzelne Substitutionen, Deletionen oder Additionen, die eine einzelne Aminosäure oder einen kleinen Prozentsatz von Aminosäuren (typischerweise von weniger als 5%, mehr typisch weniger als 1%) in einer kodierten Sequenz verändern, hinzufügen oder deletieren, "konservativ modifizierte Veränderungen" sind, wobei die Veränderungen zu der Substitution einer Aminosäure mit einer chemisch ähnlichen Aminosäure führen. Konservative Aminosäuresubstitutionen, die funktionell ähnliche Aminosäuren bereitstellen, sind bekannt. Die nachstehenden sechs Gruppen enthalten jeweils Aminosäuren, die zueinander konservative Substitutionen darstellen:

1) Alanin (A), Serin (S), Threonin (T)

- 2) Asparaginsäure (D), Glutaminsäure (E)
- 3) Asparagin (N), Glutamin (Q)
- 4) Arginin (R), Lysin (K)
- 5) Isoleucin (I), Leucin (L), Methionin (M), Valin (V) und
- 6) Phenylalanin (F), Tyrosin (Y), Tryptophan (W).

[0073] Der Begriff "komplementär" bedeutet, dass ein Nukleinsäuremolekül die Sequenz des Bindepartners eines anderen Nukleinsäuremoleküls aufweist. Somit ist die Sequenz 5'-ATGC-3' komplementär zu der Sequenz 5'-GCAT-3'.

[0074] Eine Aminosäuresequenz oder eine Nukleotidsequenz ist zu einer Referenzsequenz "im Wesentlichen identisch" oder "im Wesentlichen ähnlich", falls die Aminosäuresequenz oder Nukleotidsequenz mindestens 80% Sequenzidentität mit der Referenzsequenz über ein bestimmtes Vergleichsfenster aufweist. Somit umfassen im Wesentlichen ähnliche Sequenzen diejenigen mit beispielsweise mindestens 85% Sequenzidentität, mindestens 90% Sequenzidentität, mindestens 95% Sequenzidentität oder mindestens 99% Sequenzidentität. Zwei Sequenzen, die zueinander identisch sind, sind natürlich auch im Wesentlichen identisch.

[0075] Eine bestimmte Nukleotidsequenz ist zu einer Referenz-Nukleotidsequenz "im Wesentlichen komplementär", falls das Komplement der bestimmten Nukleotidsequenz im Wesentlichen identisch zu der Referenz-Nukleotidsequenz ist.

[0076] Der Begriff "stringente Bedingungen" betrifft eine Temperatur und Ionenbedingungen, die bei einer Nukleinsäurehybridisierung verwendet werden. Stringente Bedingungen sind Sequenz-abhängig und sind unter verschiedenen Umgebungsparametern unterschiedlich. Im Allgemeinen werden stringente Bedingungen derart ausgewählt, dass sie etwa 5°C bis 20°C niedriger sind als der thermische Schmelzpunkt (T_m) der spezifischen Sequenz bei einer definierten Ionenstärke und einem definierten pH-Wert. Der T_m -Wert ist die Temperatur (unter definierter Ionenstärke und definiertem pH-Wert), bei der 50% der Zielsequenz an eine vollständig passende Sonde hybridisiert.

[0077] Der Begriff "allelische Varianten" betrifft polymorphe Formen eines Gens an einem bestimmten Genlokus, sowie cDNAs, die von mRNA-Transkripten der Gene abgeleitet sind, und die durch diese kodierten Polypeptide.

[0078] Der Begriff "bevorzugtes Säugercodon" betrifft die Untergruppe an Codons aus dem für eine Aminosäure kodierenden Satz an Codons, die am häufigsten in Proteinen verwendet wird, die in Säugerezellen exprimiert werden, wie ausgewählt aus der nachstehenden Liste:

Aminosäure	Bevorzugte Codons für hohe Expression in Säugern
Gly	GGC, GGG
Glu	GAG
Asp	GAC
Val	GUG, GUC
Ala	GCC, GCU
Sex	AGC, UCC
Lys	AAG
Asn	AAC
Met	AUG
Ile	AUC
Thr	ACC
Txp	UGG
Cys	UGC
Tyr	UAU, UAC
Leu	CUG
Phe	WC
Arg	CGC, AGG, AGA
Gln	CAG
His	CAC
Pro	CCC

[0079] Fluoreszenzmoleküle sind beim Fluoreszenzresonanzenergietransfer ("FRET") verwendbar. FRET

beteiligt ein Donormolekül und ein Akzeptormolekül. Um die Wirksamkeit und Nachweisbarkeit von FRET zwischen einem Donor- und Akzeptormolekül zu optimieren, müssen mehrere Faktoren ausgeglichen werden. Das Emissionsspektrum des Donors sollte so stark wie möglich mit dem Anregungsspektrum des Akzeptors überlappen, um das Überlappungsintegral zu maximieren. Auch sollte die Quantenausbeute der Donoreinheit und der Extinktionskoeffizient des Akzeptors so hoch wie möglich sein, um den R_0 -Wert, die Entfernung, bei der die Energietransferwirksamkeit 50% beträgt, zu maximieren. Jedoch sollten die Anregungsspektren des Donors und Akzeptors so wenig wie möglich überlappen, so dass eine Wellenlängenregion gefunden werden kann, bei der der Donor wirksam angeregt werden kann, ohne dass der Akzeptor direkt angeregt wird. Aus direkter Anregung des Akzeptors entstehende Fluoreszenz ist schwierig von Fluoreszenz zu unterscheiden, die von FRET stammt. In ähnlicher Weise sollten die Emissionsspektren des Donors und des Akzeptors so wenig wie möglich überlappen, so dass die zwei Emissionen klar unterschieden werden können. Eine hohe Fluoreszenzquantenausbeute der Akzeptoreinheit ist erwünscht, falls die Emission von dem Akzeptor entweder als alleinige Auslesung oder als Teil eines Emissionsverhältnisses gemessen werden soll. Ein Faktor, der bei der Auswahl des Donor- und Akzeptorpaars berücksichtigt werden soll, ist die Wirksamkeit des Fluoreszenzresonanzenergietransfers zwischen ihnen. Vorzugsweise beträgt die Wirksamkeit von FRET zwischen dem Donor und dem Akzeptor mindestens 10%, mehr bevorzugt mindestens 50% und noch mehr bevorzugt mindestens 80%.

[0080] Der Begriff "Fluoreszenzeigenschaft" betrifft den molaren Extinktionskoeffizienten bei einer geeigneten Anregungswellenlänge, die Fluoreszenzquantumwirksamkeit, die Form des Anregungsspektrums oder Emissionsspektrums, das Anregungswellenlängenmaximum und Emissionswellenlängenmaximum, das Verhältnis von Anregungsamplituden bei zwei verschiedenen Wellenlängen, das Verhältnis von Emissionsamplituden bei zwei verschiedenen Wellenlängen, die Lebensdauer des angeregten Zustands oder die Fluoreszenz Anisotropie. Ein messbarer Unterschied in einer jeglichen dieser Eigenschaften zwischen Aequorea-Wildtyp-GFP und der mutierten Form ist geeignet. Ein messbarer Unterschied kann durch Bestimmen der Menge einer jeglichen quantitativen Fluoreszenzeigenschaft wie der Menge an Fluoreszenz bei einer bestimmten Wellenlänge oder des Integrals an Fluoreszenz über das Emissionsspektrum bestimmt werden. Eine Bestimmung von Verhältnissen der Anregungsamplitude oder Emissionsamplitude bei zwei verschiedenen Wellenlängen ("Anregungsamplitude-Verhältnisbildung" bzw. "Emissionsamplitude-Verhältnisbildung") sind besonders vorteilhaft, da das Verhältnisbildungsverfahren eine innere Referenz bereitstellt und Veränderungen bei der absoluten Leuchtstärke der Anregungsquelle, der Empfindlichkeit des Detektors und Strahlungsstreuung oder Auslöschern durch die Probe beseitigt.

II. VERÄNDERTE FLUORESZENZPROTEINE MIT LANGEN WELLENLÄNGEN

A. Fluoreszenzproteine

[0081] Wie hierin verwendet betrifft der Begriff "Fluoreszenzprotein" ein jegliches Protein, das fluoreszieren kann, wenn es mit einer geeigneten elektromagnetischen Strahlung angeregt wird. Dies umfasst Fluoreszenzproteine, deren Aminosäuresequenzen entweder natürlich auftreten oder verändert sind (d.h. Analoga oder Mutanten). Viele Cnidarier verwenden grüne Fluoreszenzproteine (GFPs) als Energietransferakzeptoren bei der Biolumineszenz. Ein "grünes Fluoreszenzprotein" wie hier verwendet ist ein Protein, das grünes Licht fluoresziert. In ähnlicher Weise fluoreszieren "blaue Fluoreszenzproteine" blaues Licht und "rote Fluoreszenzproteine" fluoreszieren rotes Licht. GFPs wurden aus der Nordwestpazifik-Qualle *Aequorea victoria*, der Seeanemone, *Renilla reniformis*, und *Phialidium gregarium* isoliert; W.W. Ward et al., Photochem. Photobiol., 35:803-808 (1982), L.D. Levine et al., Comp. Biochem. Physiol., 72B:77-85 (1982).

[0082] Eine Vielzahl von *Aequorea*-bezogenen Fluoreszenzproteinen mit geeigneten Exzitations- und Emissionsspektren wurde durch Modifizieren der Aminosäuresequenz des natürlich auftretenden GFP von *Aequorea victoria* verändert (D.C. Prasher et al., Gene, 111:229-233 (1992), R. Heim et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:12501-04 (1994), US-Patentanmeldung 08/337,915, eingereicht am 10. November 1994, Internationale Anmeldung PCT/US95/14692, eingereicht am 10. November 1995).

[0083] Wie hier verwendet, ist ein Fluoreszenzprotein ein "Aequorea-bezogenes Fluoreszenzprotein", falls eine jegliche kontinuierliche Sequenz von 150 Aminosäuren des Fluoreszenzproteins mindestens 85% Sequenzidentität mit einer entweder kontinuierlichen oder nicht-kontinuierlichen Aminosäuresequenz des Wildtyp-Aequoreagrünen Fluoreszenzproteins mit 238 Aminosäuren der [Fig. 3](#) (SEQ ID NO:2) aufweist. Mehr bevorzugt ist ein Fluoreszenzprotein ein Aequorea-bezogenes Fluoreszenzprotein, falls eine jegliche kontinuierliche Sequenz von 200 Aminosäuren des Fluoreszenzproteins mindestens 95% Sequenzidentität mit einer kontinuierlichen oder nicht-kontinuierlichen Aminosäuresequenz aus dem Wildtyp-Aequorea-grünen Fluores-

zenzprotein von [Fig. 3](#) (SEQ ID NO:2) aufweist. In ähnlicher Weise kann das Fluoreszenzprotein Bezug zu Renilla- oder Phialidium-Wildtyp-Fluoreszenzproteinen unter Verwendung der gleichen Standards aufweisen.

[0084] Aequorea-bezogene Fluoreszenzproteine umfassen beispielsweise und ohne Begrenzung (natives) Wildtyp-Aequorea victoria-GFP (D.C. Prasher et al., "Primary structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein", Gene, (1992) 111:229-33), dessen Nukleotidsequenz (SEQ ID NO:1) und abgeleitete Aminosäuresequenz (SEQ ID NO:2) in [Fig. 3](#) gezeigt sind, allelische Varianten dieser Sequenz wie Q80R, worin der Glutaminrest an der Position 80 durch Arginin substituiert ist (M. Chalfie et al., Science, (1994) 263:802-805), diejenigen veränderten Aequorea-bezogenen Fluoreszenzproteine, die hier beschrieben sind, z.B. in Tabelle A oder Tabelle F, Varianten, die eine oder mehrere Faltungsmutationen umfassen, und Fragmente dieser Proteine, die fluoreszieren, wie Aequorea-grünes Fluoreszenzprotein, von dem die zwei aminoterminalen Aminosäuren entfernt wurden. Mehrere dieser Proteine enthalten unterschiedliche aromatische Aminosäuren innerhalb des zentralen Chromophors und fluoreszieren bei einer deutlich kürzeren Wellenlänge als Wildtyp-Spezies. Zum Beispiel enthalten veränderte Proteine P4 und P4-3 (zusätzlich zu anderen Mutationen) die Substitution Y66H, während W2 und W7 (zusätzlich zu anderen Mutationen) Y66W enthalten. Andere Mutationen, die sowohl nahe an der Chromophorregion des Proteins und entfernt von ihr in der Primärsequenz liegen, können die spektralen Eigenschaften des GFP beeinflussen und sind in dem ersten Teil der nachstehenden Tabelle aufgeführt.

TABELLE A

Klon	Mutation(en)	Anregung Max. (nm)	Emission Max. (nm)	Extinktionskoeff. (M ⁻¹ cm ⁻¹)	Quantum- ausbeute
Wildtyp	Keine	395 (475)	508	21,000 (7,150)	0.77
P4	Y66H	383	447	13,500	0.21
P4-3	Y66H Y145F	381	445	14,000	0.38
P4-3E	Y66H Y145F V163A	384	448	22,000	0.27
W7	Y66W N146I M153T V163A N212K	433 (453)	475 (501)	18,000 (17,100)	0.67
W2	Y66W I123V Y145H H148R M153T V163A N212K	432 (453)	480	10,000 (9,600)	0.72

W1C	S65A Y66W S72A N146I M153T V163A	435	495	21,200	0.39
W1B	F64L S65T Y66W N146I M153T V163A	434 (452)	476 (505)	32,500	0.4
S65T	S65T	489	511	39,200	0.68
P4-1	S65T M153A K238E	504 (396)	514	14,500 (8,600)	0.53
Emerald	S65T, S72A, N149K, M153T, I167T	487	509	57,500	0.68
EGFP	F64L, S65T	488	507	55,900	0.64
S65A	S65A	471	504		
S65C	S65C	479	507		
S65L	S65L	484	510		
Y66F	Y66F	360	442		
Y66W	Y66W	458	480		
Topaz	S65G S72A K79R T203Y	514	527	94,500	0.6
10C YFP	S65G V68L S72A T203Y	514	527	83,400	0.61
Sapphire	S72A, Y145F T203I	399	511	29,000	0.64

[0085] Weitere Mutationen in Aequorea-bezogenen Fluoreszenzproteinen, die als "Faltungsmutationen" be-

zeichnet werden, verbessern die Fähigkeit von Fluoreszenzproteinen, sich bei höheren Temperaturen zu falten und stärker zu fluoreszieren, wenn sie in Säugerzellen exprimiert werden, haben jedoch nur eine geringe oder keine Wirkung auf die Peak-Wellenlängen der Anregung und Emission. Es soll angemerkt werden, dass diese mit Mutationen kombiniert werden können, die die spektralen Eigenschaften von GFP beeinflussen, um Proteine mit veränderten spektralen Eigenschaften und Faltungseigenschaften zu erzeugen. Faltungsmutationen umfassen: F64L, V68L, S72A und auch T44A, F99S, Y145F, N146I, M153T oder A, V163A, I167T, S175G, S205T und N212K.

[0086] Wie hier verwendet betrifft der Begriff "Schleifendomäne" eine Aminosäuresequenz eines Aequorea-bezogenen Fluoreszenzproteins, die die Aminosäuren verbindet, die bei der Sekundärstruktur der elf Stränge des Fasses oder der zentralen Helix beteiligt sind (Reste 56-72) (vgl. [Fig. 1A](#) und [Fig. 1B](#)).

[0087] Wie hier verwendet ist die "Fluoreszenzproteingruppe" eines Fluoreszenzproteins der Teil der Aminosäuresequenz eines Fluoreszenzproteins, der, falls die Aminosäuresequenz des Fluoreszenzproteinsubstrats optimal mit der Aminosäuresequenz eines natürlich auftretenden Fluoreszenzproteins ausgerichtet wird, zwischen den aminoterminalen und carboxyterminalen Aminosäuren, jeweils einschließlich, der Aminosäuresequenz des natürlich auftretenden Fluoreszenzproteins liegt.

[0088] Man hat festgestellt, dass Fluoreszenzproteine genetisch an andere Zielproteine fusioniert werden können und als Marker verwendet werden können, um die Lokalisierung und Menge des produzierten Zielproteins zu identifizieren. Dementsprechend werden erfindungsgemäß Fusionsproteine bereitgestellt, die eine Fluoreszenzproteingruppe und weitere Aminosäuresequenzen umfassen. Solche Sequenzen können beispielsweise bis etwa 15, bis etwa 50, bis etwa 150 oder bis etwa 1000 Aminosäuren lang sein. Die Fusionsproteine besitzen die Fähigkeit, bei einer Anregung durch elektromagnetische Strahlung zu fluoreszieren. In einer Ausführungsform umfasst das Fusionsprotein einen Polyhistidin-Tag, um bei der Aufreinigung des Proteins Hilfe zu leisten.

B. Verwendung der Kristallstruktur eines grünen Fluoreszenzproteins um Mutanten mit veränderten Fluoreszenzeigenschaften zu entwerfen

[0089] Unter Verwendung von Röntgenkristallographie und Computerbearbeitung wurde erfindungsgemäß ein Modell der Kristallstruktur des grünen Fluoreszenzproteins von Aequorea erstellt, das die relative Position der Atome in dem Molekül zeigt. Diese Information ist bei der Identifizierung von Aminosäuren hilfreich, deren Substitution die Fluoreszenzeigenschaften des Proteins verändert.

[0090] Fluoreszenzeigenschaften von Aequorea-bezogenen Fluoreszenzproteinen hängen teilweise von der elektronischen Umgebung des Chromophors ab. Im Allgemeinen beeinflussen Aminosäuren, die innerhalb von etwa 0,5 nm des Chromophors liegen, die elektronische Umgebung des Chromophors. Daher kann eine Substitution solcher Aminosäuren Fluoreszenzproteine mit veränderten Fluoreszenzeigenschaften erzeugen. Im angeregten Zustand neigt die Elektronendichte dazu, sich von dem Phenolat zu dem Carbonylende des Chromophors zu verschieben. Daher neigt eine Platzierung von ansteigend positiver Ladung in der Nähe des Carbonylendes des Chromophors dazu, die Energie des angeregten Zustandes zu verringern und eine Rotverschiebung bei dem Absorptions- und Emissionswellenlängenmaximum des Proteins zu verursachen. Eine Verringerung der positiven Ladung in der Nähe des Carbonylendes des Chromophors neigt dazu, die gegenteilige Wirkung aufzuweisen, was eine Blauverschiebung der Wellenlängen des Proteins erzeugt.

[0091] Aminosäuren mit geladenen (ionisiertes D, E, K und R), Dipol- (H, N, Q, S, T, und ungeladenes D, E und K) und polarisierbaren Seitengruppen (wie C, F, H, M, W und Y) sind für eine Veränderung der elektronischen Umgebung des Chromophors geeignet, insbesondere wenn sie eine Aminosäure mit einer ungeladenen, nichtpolaren oder nicht-polarisierbaren Seitenkette substituieren. Im Allgemeinen verändern Aminosäuren mit polarisierbaren Seitengruppen die elektronische Umgebung am wenigstens und man vermutet dementsprechend, dass sie eine verhältnismäßig kleinere Veränderung in einer Fluoreszenzeigenschaft erzeugen. Aminosäuren mit geladenen Seitengruppen verändern die Umgebung am meisten und man vermutet dementsprechend, dass sie eine vergleichsweise größere Veränderung in einer Fluoreszenzeigenschaft erzeugen. Jedoch ist es wahrscheinlicher, dass Aminosäuren mit geladenen Seitengruppen die Struktur des Proteins zerstören und eine korrekte Faltung verhindern, falls sie in der Nähe des Chromophors ohne eine jegliche zusätzliche Solvatisierung oder Salzverbrückung verborgen sind. Daher ist es am wahrscheinlichsten, dass geladene Aminosäuren toleriert werden und hilfreiche Wirkungen ergeben, wenn sie andere geladene oder hochgradig polare Aminosäuren, die bereits solvatisiert oder bei Salzbrücken beteiligt sind, ersetzen. In bestimmten Fällen, falls eine Substitution durch eine polarisierbare Aminosäure ausgewählt wird, kann die Struktur des Pro-

teins die Auswahl einer größeren Aminosäure, wie W, viel weniger geeignet machen. Alternativ können Positionen, die durch Aminosäuren mit geladenen oder polaren Seitengruppen besetzt sind, die ungünstig ausgerichtet sind, durch Aminosäuren substituiert werden, die weniger geladene oder polare Seitengruppen aufweisen. In einer weiteren Ausführungsform kann eine Aminosäure, deren Seitengruppe einen in eine Richtung in dem Protein orientierten Dipol aufweist, durch eine Aminosäure mit einem in eine unterschiedliche Richtung orientierten Dipol ersetzt werden.

[0092] Insbesondere führt Tabelle B mehrere Aminosäuren auf, die innerhalb von etwa 0,5 nm von dem Chromophor entfernt liegen und deren Substitution in veränderten Fluoreszenzeigenschaften resultieren kann. Die Tabelle zeigt unterstrichen bevorzugte Aminosäuresubstitutionen an der angegebenen Position, um eine Fluoreszenzeigenschaft des Proteins zu verändern. Um solche Substitutionen einzubringen, stellt die Tabelle auch Codons für Primer bereit, die bei einer Stellen-gerichteten Mutagenese, die eine Amplifikation einbezieht, verwendet werden. Diese Primer wurden ausgewählt, um ökonomisch die bevorzugten Aminosäuren zu kodieren, sie kodieren jedoch genauso andere Aminosäuren wie angegeben oder sogar ein Stopp-Codon, das durch Z gekennzeichnet ist. Beim Einbringen von Substitutionen unter Verwendung von solchen degenerierten Primern ist die effizienteste Strategie ein Screening der Ansammlung, um Mutanten mit den gewünschten Eigenschaften zu identifizieren, und sodann ihre DNA zu sequenzieren, um herauszufinden, welche der möglichen Substitutionen verantwortlich ist. Codons sind in doppelsträngiger Form mit oben liegendem Sinnstrang und unten liegendem Antisinn-Strang gezeigt. Bei Nukleinsäuresequenzen sind: R = (A oder g), Y = (C oder T), M = (A oder C), K = (g oder T), S = (g oder C), W = (A oder T), H = (A, T oder C), B = (g, T oder C), V = (g, A oder C), D = (g, A oder T), N = (A, C, g oder T).

TABELLE B

Ursprüngliche Position und vermutliche Rolle	Veränderung zu	Codon
L42 Aliphatischer Rest in der Nähe von C=N des Chromophors	<u>CFHLQRWYZ</u>	5'YDS 3' 3'RHS 5'
V61 Aliphatischer Rest in der Nähe des zentralen -CH= des Chromophors	<u>FYHCLR</u>	YDC RHg
T62 Fast direkt über dem Zentrum der Brücke des Chromophors	<u>AVFS</u>	KYC MRg
	<u>DEHKNO</u>	VAS BTS
	<u>FYHCLR</u>	YDC RHg
V68 Aliphatischer Rest in der Nähe des Carbonyls und von G67	<u>FYHL</u>	YWC RWg
N121 In der Nähe der C-N-Stelle des Ringschlusses zwischen T65 und G67	<u>CFHLQRWYZ</u>	YDS RHS
Y145 Packt in der Nähe des Tyrosinrings des Chromophors	<u>WCFL</u>	TKS AMS
	<u>DEHNKO</u>	VAS BTS
H148 H-Bindungen zu Phenolatsauerstoffatom	<u>FYNI</u>	WWC WWg
	<u>KOR</u>	MRg KYC
V150 Aliphatischer Rest in der Nähe des Tyrosinrings des Chromophors	<u>FYHL</u>	YWC RWg
F165 Packt in der Nähe des Tyrosinrings	<u>CHQRWYZ</u>	YRS RYS
I167 Aliphatischer Rest in der Nähe des Phenolats, I167T hat Wirkungen	<u>FYHL</u>	YWC RWg
T203 H-Bindungen zu dem phenolischen Sauerstoffatom des Chromophors	<u>FHLQRWYZ</u>	YDS RHS
E222 Eine Protonierung reguliert eine Ionisierung des Chromophors	<u>HKNQ</u>	MAS KTS

[0093] Beispiele für Aminosäuren mit polaren Seitengruppen, die durch polarisierbare Seitengruppen ersetzt werden können, umfassen beispielsweise diejenigen in Tabelle C.

TABELLE C

Ursprüngliche Position und vermutliche Rolle	Veränderung zu	Codon
Q69 Terminiert Kette von H-Bindungs-Wassermolekülen	<u>KREG</u>	RRg YYC
Q94 H-Bindungen zu Carbonylterminus des Chromophors	<u>DEHKNQ</u>	VAS BTS
Q183 Verbrückt Arg96 und das Zentrum der Brücke des Chromophors	<u>HY</u>	YAC RTG
	<u>EK</u>	RAg YTC
N185 Teil des H-Brücken-Netzwerks in der Nähe des Carbonyls des Chromophors	<u>DHKNQ</u>	VAS BTS

[0094] In einer Ausführungsform kann eine Aminosäure, die nahe zu einer zweiten Aminosäure innerhalb von etwa 0,5 nm des Chromophors liegt, bei einer Substitution die elektronischen Eigenschaften der zweiten Aminosäure verändern und wiederum die elektronische Umgebung des Chromophors verändern. Tabelle D zeigt zwei solcher Aminosäuren. Die Aminosäuren L220 und V224 liegen nahe zu E222 und sind in dem β -Faltblatt in der gleichen Richtung orientiert.

TABELLE D

Ursprüngliche Position und vermutliche Rolle	Veränderung zu	Codon
L220 Packt in der Nähe zu Glu222, um GFP pH-sensitiv zu machen	<u>HKNPQT</u>	MMS KKS
V224 Packt in der Nähe von Glu222, um GFP pH-sensitiv zu machen	<u>HKNPQT</u>	MMS KKS
	<u>CFHLQRWYZ</u>	YDS RHS

[0095] Eine erfindungsgemäße Ausführungsform umfasst ein Nukleinsäuremolekül, das eine Nukleotidsequenz umfasst, die für ein funktionelles verändertes Fluoreszenzprotein kodiert, dessen Aminosäuresequenz im Wesentlichen zu der Aminosäuresequenz des grünen Fluoreszenzproteins von Aequorea (SEQ ID NO:2) identisch ist und das sich von SEQ ID NO:2 durch mindestens eine Substitution bei Q69 unterscheidet, wobei das funktionelle veränderte Fluoreszenzprotein eine zu Aequoreagrünem Fluoreszenzprotein unterschiedliche Fluoreszenzeigenschaft aufweist. Vorzugsweise ist die Substitution bei Q69 ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus K, R, E und G. Die Q69-Substitution kann mit anderen Mutationen kombiniert werden, um die Eigenschaften des Proteins zu verbessern, wie eine funktionelle Mutation bei 565.

[0096] Eine erfindungsgemäße Ausführungsform umfasst ein Nukleinsäuremolekül, das eine Nukleotidsequenz umfasst, die für ein funktionelles verändertes Fluoreszenzprotein kodiert, dessen Aminosäuresequenz im Wesentlichen zu der Aminosäuresequenz des grünen Fluoreszenzproteins von Aequorea (SEQ ID NO:2) identisch ist und das sich von SEQ ID NO:2 durch mindestens eine Substitution bei E222, ausgenommen E222G, unterscheidet, wobei das funktionelle veränderte Fluoreszenzprotein eine zu Aequorea-grünem Fluoreszenzprotein unterschiedliche Fluoreszenzeigenschaft aufweist. Vorzugsweise ist die Substitution bei E222 ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus N und Q. Die E222-Substitution kann mit anderen Mutationen kombiniert werden, um die Eigenschaften des Proteins zu verbessern, wie eine funktionelle Mutation bei F64.

[0097] Eine erfindungsgemäße Ausführungsform umfasst ein Nukleinsäuremolekül, das eine Nukleotidsequenz umfasst, die für ein funktionelles verändertes Fluoreszenzprotein kodiert, dessen Aminosäuresequenz im Wesentlichen zu der Aminosäuresequenz des grünen Fluoreszenzproteins von Aequorea (SEQ ID NO:2) identisch ist und das sich von SEQ ID NO:2 durch mindestens eine Substitution bei Y145 unterscheidet, wobei das funktionelle veränderte Fluoreszenzprotein eine zu dem grünen Fluoreszenzprotein von Aequorea unter-

schiedliche Fluoreszenzeigenschaft aufweist. Vorzugsweise ist die Substitution bei Y145 ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus W, C, F, L, E, H, K und Q. Die Y145-Substitution kann mit anderen Mutationen kombiniert werden, um die Eigenschaften des Proteins zu verbessern wie Y66.

[0098] Erfindungsgemäß umfasst sind auch Computer-bezogene Ausführungsformen, einschließlich Berechnungsverfahren einer Verwendung der Kristallkoordinaten zum Entwerfen von neuen Fluoreszenzproteinmutationen und Vorrichtungen zur Speicherung der Kristalldaten, einschließlich Koordinaten. Zum Beispiel umfasst die Erfindung eine Vorrichtung, die eine Speichervorrichtung und mindestens zehn in der Vorrichtung gespeicherte Atomkoordinaten umfasst, die ausgewählt sind aus den in den **Fig. 5-1 bis 5-28** aufgeführten Atomkoordinaten. Mehr Koordinaten können gespeichert werden, abhängig von der Komplexität der Berechnungen oder dem Ziel einer Verwendung der Koordinaten (wie etwa 100, 1000 oder mehr Koordinaten).

[0099] Beispielsweise werden größere Zahlen von Koordinaten für detailliertere Darstellungen der Struktur des Fluoreszenzproteins erwünscht sein. Typischerweise ist die Speichervorrichtung eine Computer-lesbare Vorrichtung, die Codes speichert, wie sie als Input die Atomkoordinaten empfängt. Nichtsdestotrotz sind andere bekannte Speichermittel auch vorgesehen. Die Computer-lesbare Vorrichtung kann eine Floppy Disk oder ein Laufwerk sein.

C. Verwendung der Kristallstruktur von YFP, um Mutanten mit veränderten Anionen-Bindeeigenschaften zu entwerfen

[0100] In einem weiteren Aspekt umfasst die Erfindung die Verwendung von Röntgenkristallographie und Computerbearbeitung, um ein Modell der Kristallstruktur von YFP zu erstellen, das die relative Position und Aminosäuren, die mit gebundenen Ionen Wechselwirken, zeigt. Diese Information ist bei der Identifizierung von Aminosäuren hilfreich, deren Substitution die Spezifität und Affinität der Bindungsstelle für verschiedene Anionen verändert. Da die Bindung des Anions nahe zu dem Chromophor von YFP erfolgt, führt eine Bindung zu einer Modulierung der Fluoreszenzeigenschaften von YFP, die verwendet werden können, um eine Anionenbindung und daher die Konzentration des Anions zu überwachen.

[0101] Die Anionenbindestelle, die in YFP-H148Q vorgefunden wird, zeigt viele der Charakteristika, die allgemein bei Halogenid-Bindestellen in anderen Proteinen anzutreffen sind. Im Fall der Anionen-enthaltenden Höhle in YFP-H148Q ist die Bindestelle von amphiphiler Natur, wobei eine Seite mit polaren und geladenen Gruppen (Tyr203, das Chromophor, Arg96, Gln69 und Gln 183) und die andere Seite mit hydrophoben Resten (Ile152, Leu201, Val163, Val150 und Phe165) ausgekleidet ist.

[0102] Das Entwerfen von veränderten Fluoreszenzproteinen mit veränderten Anionen-Bindesepezifitäten erfordert eine Berücksichtigung einer Reihe von Faktoren. Beispielsweise ist einer der signifikantesten Faktoren, die Anteil an der Anionenaffinität und -selektivität haben, die elektrostatische Konfiguration und der Aufbau der Bindetasche. Bei YFP umfassen diese die in der nachstehenden Tabelle E aufgeführten Gruppen.

TABELLE E

Ursprüngliche Position und vermutete Rolle

S65, Y66, G67	bildet Chromophor, aromatische Kante-Wechselwirkung mit Ion
Q69	Wasserstoffbindungen zu Ion
R96	Ladungswechselwirkung mit Ion
Q183	Ladungswechselwirkung mit Ion
Y203	Wasserstoffbindungen zu Ion (Y)

[0103] Im Allgemeinen kann eine Anionenbindung durch Schaffung von mehr und/oder festeren Bindewechselwirkungen zwischen dem interessierenden Anion und polaren Gruppen in der Bindetasche verbessert werden. Beispielsweise kann entweder eine direkte Substitution der vorstehenden polaren Reste durch polarere Reste oder eine Substitution von Resten von unterschiedlichen Größen, die wirksamer mit dem Anion Wechselwirken können, die Ionenbindung verbessern. Beispielsweise kann die Größe und Position des Chromophors durch die Substitution von S65 zu G, A, C, V, L, I oder T verändert werden. Y66 kann durch Substitution zu H, F oder W verändert werden. Q69 kann zu N oder K, R96 zu K, Q 183 zu N oder K substituiert werden.

Hydratationsenergie

[0104] Des Weiteren erfordert die Bindung eines Anions in einer verborgenen Höhle in der Nähe des Chromophors einen Austausch von Ionen-Lösungsmittel-Interaktionen durch Ionen-Protein-Interaktionen. Relative Bindungsenergien von monovalenten Anionen an YFP (Tabelle J) und YFP-H148Q (Jayaraman et al., 2000) in Relation zu ihrer Hydratationsenergie zeigen, dass Hydratationskräfte wichtigen Anteil an einer Bindung haben. In den nachstehenden Reihen von Monoanionen sind die Hydratationsenergien von schwach zu stark geordnet: $\text{CO}_4^- < \text{I}^- < \text{NO}_3^- < \text{SCN}^- < \text{Br}^- < \text{Cl}^- < \text{F}^-$ (Wright & Diamond, 1977). Polyatomare Monoanionen und Iodid haben verhältnismäßig schwache Hydratationsenergien, während die anderen Halogenide stärker mit Wasser interagieren. Im Fall der sphärisch symmetrischen Halogenide nimmt die Hydratationsenergie mit abnehmendem Atomvolumen zu (Born, 1920), was der Grund dafür ist, dass größere Halogenide leichter in die hydrophobere Umgebung des Inneren eines Proteins einzubauen sind. Der Trend, der für eine Anionenbindung an die YFPs beobachtet wird, folgt im Groben den vorstehenden Reihen (Tabelle J). Die Proteininteraktion nimmt im Allgemeinen mit abnehmender Hydratationsenergie zu, mit der Ausnahme von Fluorid, das aufgrund seiner kleinen Größe bei einer Proteinbindung nicht vollständig dehydratisieren kann.

[0105] Die Entwicklung von Anionenbindestellen mit höherer Affinität erfordert daher die Schaffung von ausreichenden Ionen-Protein-Wechselwirkungen, beispielsweise durch die Substitution von hydrophoben Resten, die die Ionenbindetasche auskleiden, durch polarere Reste mit einem stärkeren Wasserstoff-bindenden Potential. Beispiele für diesen Typ an Substitutionen zur Verbesserung der Ionenbindung für kleinere und größere Anionen sind in Tabelle F gezeigt.

TABELLE F

i) Mutation von Aminosäuren um die Ionenbindetasche, um die Bindeaffinität für kleinere Anionen als Iodid zu erhöhen.

Ursprüngliche Position und vermutete Rolle		Veränderung zu
V150	kleidet Bindetasche aus	S, T, Q, N
I152	kleidet Bindetasche aus	L, V, F, S, T, Q, N
V163	kleidet Bindetasche aus	S, T, Q, N
F165	kleidet Bindetasche aus	Y, W
H181	kleidet Bindetasche aus	F, W
Q183	kleidet Bindetasche aus	K, R, N
L201	kleidet Bindetasche aus	S, T, Q, N, V, I

ii) Mutation von Aminosäuren um die Ionenbindetasche, um die Bindungsaffinität für größere Anionen als Iodid zu erhöhen.

V150	kleidet Bindetasche aus	A, C, M, G, S, L
I152	kleidet Bindetasche aus	A, C, M, G, S
V163	kleidet Bindetasche aus	A, C, M, G, S, L
F165	kleidet Bindetasche aus	Y, L
H181	kleidet Bindetasche aus	K, R
Q183	kleidet Bindetasche aus	N, S, C
L201	kleidet Bindetasche aus	A, C, M, G, S

Größe der Bindetasche

[0106] Die Größe und Form der Bindetasche kann auch von besonderer Wichtigkeit aufgrund der verborgenen Natur der Bindestelle für größere Anionen sein. TCA mit einem mittleren geometrischen Durchmesser von 6,2 Å (Halm & Frizzell, 1992) ist offensichtlich zu groß, um mit YFP in einem messbaren Ausmaß wechselzuwirken, während das etwas kleinere TFA schwache Bindung zeigt (Tabelle J). Verbesserungen in der Bindeaf-

finität von größeren Anionen könnten somit durch die Substitution von Aminosäuren, die die Bindetasche auskleiden, durch kleinere Reste wie vorstehend in Tabelle F gezeigt, sowie Erhöhung der Lösungsmittelzugänglichkeit wie nachstehend erörtert, erreicht werden.

Konformationelle Veränderungen bei einer Anionenbindung

[0107] Eine Reihe von konformationellen Veränderungen von verschiedenen Seitenketten, die die Bindetasche in YFP auskleiden, sind für eine Halogenidbindung notwendig. Die größten Bewegungen werden für Gln69 und Gln 183 festgestellt, obwohl die apolaren Seitenketten von Leu201, Ile152, Val150 und Val163 ([Fig. 11](#)) alle Bewegungen durchlaufen, um die Größe der Höhle in Gegenwart von gebundenem Halogenid zu erhöhen. Ein weiterer Ansatz in Richtung festerer Anionenbindung ist daher die Substitution der Reste, die die dramatischste konformationelle Änderung bei einer Bindung durchlaufen, durch kleinere Reste. Diese Veränderungen können den Bedarf für strukturelle Umordnungen bei einer Bindung verringern, wodurch eine Anionenbindung energetisch bevorzugt gemacht wird. Diese Veränderungen umfassen die in der vorstehenden Tabelle F aufgeführten, sowie die Substitution von Q69 gegen N.

Lösungsmittelzugänglichkeit

[0108] Die Ergebnisse aus den strukturellen Bestimmungen verschiedener Mutationen bei His 148 legen nahe, dass spezifische Mutationen an dieser Stelle zu Gesamtstrukturangleichungen in dem β -Fass führen können, die direkt sowohl eine Lösungsmittelzugänglichkeit, als auch das Volumen der Bindetasche beeinflussen können. Eine Substitution von His148 beispielsweise zu kleineren Aminosäuren wie Q, N, G, A, L, V und I würde daher nach Vorhersage eine Lösungsmittelzugänglichkeit zu dem Chromophor erhöhen und folglich eine Bindung zu den größeren Anionen verbessern. In ähnlicher Weise wäre wahrscheinlich, dass eine Substitution von His148 durch größere Aminosäuren wie F oder W eine Anionen zugänglichkeit zu dem Chromophor verringert. In ähnlicher Weise könnten subtilere Veränderungen durch Substitution der Positionen 147 und 149 durch kleinere oder größere Aminosäuren erreicht werden.

[0109] Diese Mutationen werden typischerweise in das YFP-Matrizenprotein durch oligovermittelte Stellen-gerichtete Mutagenese eingebracht, um Bibliotheken von mutierten Proteinen herzustellen, die typischerweise eine Wahrscheinlichkeit von 10% dafür aufweisen, dass sie den Wildtyp-Aminosäurerest enthalten, und eine Wahrscheinlichkeit von 90% dafür aufweisen, dass sie einen der verschiedenen mutierten Reste enthalten. Unter Verwendung dieses Ansatzes ist es möglich, schnell Bibliotheken zu screenen, die verschiedene Kombinationen von Mutanten enthalten, um die besten Kombinationen für ein spezifisches interessierendes Anion zu identifizieren. Typischerweise kann dieser Vorgang iterativ wiederholt werden, um sicherzustellen, dass der Sequenzraum um die Bindetasche vollständig bezüglich eines jeglichen spezifischen interessierenden Anions untersucht wurde.

D. Herstellung von veränderten Fluoreszenzproteinen

[0110] Eine rekombinante Produktion eines Fluoreszenzproteins umfasst eine Expression eines Nukleinsäuremoleküls mit Sequenzen, die für das Protein kodieren.

[0111] In einer Ausführungsform kodiert die Nukleinsäure für ein Fusionsprotein, in dem ein einzelnes Polypeptid die Fluoreszenzproteingruppe in einem größeren Polypeptid umfasst. Das größere Polypeptid kann ein zweites funktionelles Protein wie einen FRET-Partner oder ein Protein mit einer zweiten Funktion (wie ein Enzym, einen Antikörper oder ein anderes Bindeprotein) umfassen. Nukleinsäuren, die für Fluoreszenzproteine kodieren, sind als Ausgangsmaterialien geeignet.

[0112] Die Fluoreszenzproteine können als Fusionsproteine durch rekombinante DNA-Technologie hergestellt werden. Eine rekombinante Herstellung von Fluoreszenzproteinen umfasst eine Expression von Nukleinsäuren mit Sequenzen, die die Proteine kodieren. Nukleinsäuren, die für Fluoreszenzproteine kodieren, können durch bekannte Verfahren erhalten werden. Fluoreszenzproteine können durch stellengerichtete Mutagenese von anderen Nukleinsäuren, die für Fluoreszenzproteine kodieren, oder durch zufällige Mutagenese, hervorgerufen durch eine Erhöhung der Fehlerrate einer PCR des ursprünglichen Polynukleotids mit 0,1 mM $MnCl_2$ und unausgeglichene Nukleotidkonzentrationen hergestellt werden; vgl. z.B. US-Patentanmeldung 08/337,915, eingereicht am 10. November 1994, oder Internationale Anmeldung PCT/US95/ 14692, eingereicht am 10. November 1995. Die Nukleinsäure, die für ein grünes Fluoreszenzprotein kodiert, kann durch Polymerase-Kettenreaktion von cDNA aus *A. victoria* unter Verwendung von Primern, die auf der DNA-Sequenz des grünen Fluoreszenzproteins von *A. victoria* basieren, wie in [Fig. 3](#) dargestellt, isoliert werden. PCR-Ver-

fahren sind beispielsweise in der US-PS 4,683,195, Mullis et al. (1987) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263 und Erlich, Hrsg., PCR Technology (Stockton Press, NY, 1989) beschrieben.

[0113] Die Herstellung von Expressionsvektoren und die Expression von Genen in transfizierten Zellen umfasst die Verwendung von molekularen Klonierungstechniken, die auch bekannt sind; vgl. Sambrook et al., Molecular Cloning – A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, (1989) und Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel et al., Hrsg. (Current Protocols, eine Zusammenarbeit zwischen Greene Publishing Associates, Inc. und John Wiley & Sons, Inc.). Der Expressionsvektor kann für eine Funktion in Prokaryonten oder Eukaryonten durch Einbau von geeigneten Promotoren, Replikationssequenzen, Markern usw. angepasst werden.

[0114] Nukleinsäuren, die für eine Transfektion von Zellen mit Sequenzen verwendet werden, die für eine Expression des interessierenden Polypeptids kodieren, werden im Allgemeinen in der Form eines Expressionsvektors vorliegen, der Expressionskontrollsequenzen umfasst, die operativ mit einer Nukleotidsequenz verbunden sind, die für eine Expression des Polypeptids kodiert. Wie hier verwendet, betrifft der Begriff "Nukleotidsequenz, die für eine Expression eines Polypeptids kodiert" eine Sequenz, die bei einer Transkription und Translation von mRNA das Polypeptid erzeugt. Dies kann Sequenzen umfassen, die beispielsweise Introns enthalten. Expressionskontrollsequenzen sind operativ mit einer Nukleinsäuresequenz verbunden, wenn die Expressionskontrollsequenzen die Transkription und, so weit geeignet, Translation der Nukleinsäuresequenz steuern und regulieren. Somit können Expressionskontrollsequenzen geeignete Promotoren, Enhancer, Transkriptionsterminatoren, ein Start-Codon (d.h. ATG) vor einem Protein-kodierenden Gen, Splicingsignale für Introns, eine Aufrechterhaltung des richtigen Leserasters des Gens, um eine korrekte Translation der mRNA zu ermöglichen, und Stopp-Codons umfassen.

[0115] Verfahren, die dem Fachmann bekannt sind, können verwendet werden, um Expressionsvektoren mit der Sequenz, die für das Fluoreszenzprotein kodiert, und geeigneten Transkriptions-/Translations-Kontrollsignalen herzustellen. Diese Verfahren umfassen in vitro-rekombinante DNA-Techniken, synthetische Techniken und in vivo-Rekombination/genetische Rekombination; vgl. beispielsweise die in Maniatis et al., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., 1989, beschriebenen Techniken.

[0116] Eine Transformation einer Wirtszelle mit rekombinanter DNA kann durch herkömmliche Verfahren erfolgen, die dem Fachmann bekannt sind. Falls der Wirt ein Prokaryont wie *E. coli* ist, können kompetente Zellen, die zur DNA-Aufnahme fähig sind, aus Zellen hergestellt werden, die nach der exponentiellen Wachstumsphase geerntet wurden und sodann durch das CaCl_2 -Verfahren in an sich bekannter Weise behandelt wurden. Alternativ dazu können MgCl_2 oder RbCl verwendet werden. Eine Transformation kann auch nach Bildung eines Protoplasten der Wirtszelle oder durch Elektroporation erfolgen.

[0117] Falls der Wirt ein Eukaryont ist, können Transfektionsverfahren von DNA wie Calciumphosphat-Co-Präzipitate, herkömmliche mechanische Verfahren wie Mikroinjektion, Elektroporation, Insertion eines in Liposomen eingeschlossenen Plasmids oder Virusvektoren verwendet werden. Eukaryontische Zellen können auch mit DNA-Sequenzen, die für das erfindungsgemäße Fusionspolypeptid kodieren, und einem zweiten fremden DNA-Molekül, das für einen selektierbaren Phänotyp kodiert, wie das Herpes simplex-Thymidinkinasen co-transfiziert werden. Ein weiteres Verfahren ist eine Verwendung eines eukaryontischen viralen Vektors wie Affenvirus 40 (SV40) oder Rinder-Papilloma-Virus, um transient eukaryontische Zellen zu infizieren oder transformieren und das Protein zu exprimieren (Eukaryotic Viral Vectors, Cold Spring Harbor Laboratory, Gluzman, Hrsg., 1982). Vorzugsweise wird ein eukaryontischer Wirt als die Wirtszelle wie hier beschrieben verwendet.

[0118] Verfahren zur Isolierung und Aufreinigung von entweder mikrobiell oder eukaryontisch exprimierten erfindungsgemäßen Polypeptiden können jegliche herkömmliche Verfahren sein wie beispielsweise präparative chromatographische Auftrennungen und immunologische Auftrennungen, beispielsweise diejenigen, die die Verwendung von monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern oder Antigen einbeziehen. In einer Ausführungsform können rekombinante fluoreszierende Proteine durch Expression einer Nukleinsäure, die für das Protein in *E. coli* kodiert, produziert werden. Aequorea-bezogene Fluoreszenzproteine werden am besten durch Zellen exprimiert, die bei etwa 15°C bis 30°C kultiviert werden, jedoch sind höhere Temperaturen (wie 37°C) möglich. Nach einer Synthese sind diese Enzyme bei höheren Temperaturen (wie 37°C) stabil und können in Tests bei diesen Temperaturen verwendet werden.

[0119] Eine Vielzahl von Wirt-Expressions-Vektorsystemen kann für eine Expression einer Fluoreszenzprotein-kodierenden Sequenz verwendet werden. Diese umfassen in nicht begrenzender Weise Mikroorganismen

wie Bakterien, die mit rekombinanten Bakteriophagen-DNA-, Plasmid-DNA- oder Cosmid-DNA-Expressionsvektoren mit einer Fluoreszenzprotein-kodierenden Sequenz transformiert wurden, Hefe, die mit rekombinanten Hefe-Expressionsvektoren mit der Fluoreszenzprotein-kodierenden Sequenz transformiert wurde, Pflanzensystems, die mit rekombinanten Virus-Expressionsvektoren (wie Blumenkohl-Mosaikvirus, CaMV, Tabak-Mosaikvirus, TMV) infiziert wurden oder mit rekombinanten Plasmid-Expressionsvektoren (wie Ti-Plasmid) mit einer Fluoreszenzprotein-kodierenden Sequenz transformiert wurden, Insektenzellensysteme, die mit rekombinanten Virus-Expressionsvektoren (wie Baculovirus) mit einer Fluoreszenzprotein-kodierenden Sequenz infiziert wurden oder Tierzellensysteme, die mit rekombinanten Virus-Expressionsvektoren (wie Retroviren, Adenovirus, Vacciniavirus) mit einer Fluoreszenzprotein-kodierenden Sequenz infiziert wurden, oder transformierte Tierzellensysteme, die für eine stabile Expression verändert wurden.

[0120] Abhängig von dem verwendeten Wirts-/Vektorsystem kann ein jegliches einer Reihe von geeigneten Transkriptions- und Translationselementen, einschließlich konstitutiver und induzierbarer Promotoren, Transkriptions-Enhancer-Elemente, Transkriptionsterminatoren usw., in dem Expressionsvektor verwendet werden (vgl. beispielsweise Bitter et al., *Methods in Enzymology* 153:516-544, 1987). Zum Beispiel können bei einer Klonierung in bakteriellen Systemen induzierbare Promotoren wie pL des Bakteriophagen Σ , plac, ptrp, ptac (ptrp-lac-Hybridpromoter) und dergleichen verwendet werden. Bei einer Klonierung in Säugerzellensystemen können Promotoren, die von dem Genom von Säugerzellen (wie Metallothionein-Promoter) oder von Säugerviren (wie die retrovirale lange terminale Wiederholung, der späte Promoter von Adenovirus, der 7,5K-Promoter von Vacciniavirus) abgeleitet sind, verwendet werden. Promotoren, die durch rekombinante DNA- oder synthetische Techniken hergestellt werden, können auch verwendet werden, um für eine Transkription der inserierten Fluoreszenzprotein-kodierenden Sequenz zu sorgen.

[0121] In bakteriellen Systemen kann eine Reihe von Expressionsvektoren vorteilhafterweise ausgewählt werden, abhängig von der beabsichtigten Verwendung bezüglich des exprimierten Fluoreszenzproteins. Beispielsweise können, wenn große Mengen des Fluoreszenzproteins produziert werden sollen, Vektoren erwünscht sein, die die Expression von großen Mengen an Fusionsproteinprodukten, die leicht aufgereinigt werden, steuern. Diejenigen, die so verändert sind, dass sie eine Spaltstelle enthalten, um bei einer Wiedergewinnung des Fluoreszenzproteins zu unterstützen, sind bevorzugt.

[0122] In Hefe kann eine Reihe von Vektoren mit konstitutiven oder induzierbaren Promotoren verwendet werden. Bezüglich einer Übersicht wird auf *Current Protocols in Molecular Biology*, Band 2, Hrsg. Ausubel et al., Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience, Kapitel 13, 1988, Grant et al., *Expression and Secretion Vectors for Yeast*, in *Methods in Enzymology*, Herausgeber Wu & Grossman, 31987, Acad. Press, N.Y., Band 153, Seiten 516-544, 1987, Glover, *DNA Cloning*, Band II, IRL Press, Wash., D.C., Kapitel 3, 1986 und Bitter, *Heterologous Gene Expression in Yeast*, *Methods in Enzymology*, Hrsg. Berger & Kimmel, Acad. Press, N.Y., Band 152, Seiten 673-684, 1987 und *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*, Hrsg. Strathern et al., Cold Spring Harbor Press, Bände I und II, 1982, verwiesen. Ein konstitutiver Hefepromoter wie ADH oder LEU2 oder ein induzierbarer Promoter wie GAL kann verwendet werden (*Cloning in Yeast*, Kapitel 3, R. Rothstein In: *DNA Cloning* Band 11, A Practical Approach, Hrsg. D.M. Glover, IRL Press, Wash., D.C., 1986). Alternativ können Vektoren verwendet werden, die eine Integration von fremden DNA-Sequenzen in das Hefe-Chromosom fördern.

[0123] In Fällen, bei denen Pflanzen-Expressionsvektoren verwendet werden, kann die Expression einer Fluoreszenzprotein-kodierenden Sequenz durch einen jeglichen einer Reihe von Promotoren angetrieben werden. Beispielsweise können virale Promotoren wie die 35S RNA- und 19S RNA-Promotoren von CaMV (Brisson et al., *Nature* 310:511-514, 1984) oder der Hüllprotein-Promoter von TMV (Takamatsu et al., *EMBO J.* 6:307-311, 1987) verwendet werden. Alternativ können Pflanzenpromotoren wie die kleine Untereinheit von RUBISCO (Coruzzi et al., 1984, *EMBO J.* 3:1671-1680, Broglie et al., *Science* 224:838-843, 1984) oder Hitzeschockpromotoren wie hsp17.5-E oder hsp17.3-B aus Sojabohne (Gurley et al., *Mol. Cell. Biol.* 6:559-565, 1986) verwendet werden. Diese Konstrukte können in Pflanzenzellen unter Verwendung von Ti-Plasmiden, Ri-Plasmiden, Pflanzen-Virusvektoren, direkter DNA-Transformation, Mikroinjektion, Elektroporation usw. eingebracht werden.

[0124] Für Übersichtsartikel bezüglich solcher Techniken wird beispielsweise auf Weissbach & Weissbach, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, NY, Abschnitt VIII, Seiten 421-463, 1988 und Grierson & Corey, *Plant Molecular Biology*, 2. Auflage, Blackie, London, Kapitel 7-9, 1988, verwiesen.

[0125] Ein alternatives Expressionssystem, das für eine Expression eines Fluoreszenzproteins verwendet werden könnte, ist ein Insektensystem. In einem solchen System wird *Autographa californica*-nukleärer Poly-

hedrosisvirus (AcNPV) als ein Vektor für eine Expression von Fremdgenen verwendet. Das Virus wächst in *Spodoptera frugiperda*-Zellen. Die für das Fluoreszenzprotein kodierende Sequenz kann in nichtessentielle Regionen (beispielsweise das Polyhedringen) des Virus kloniert und unter die Kontrolle eines AcNPV-Promoters (beispielsweise des Polyhedrinpromoters) gestellt werden. Eine erfolgreiche Insertion der für das Fluoreszenzprotein kodierenden Sequenz wird zu einer Inaktivierung des Polyhedringens und zu einer Produktion von nicht-okkludiertem rekombinantem Virus (d.h. Virus, dem die Proteinhülle, die durch das Polyhedringen kodiert wird, fehlt) führen. Diese rekombinanten Viren werden sodann für eine Infektion von *Spodoptera frugiperda*-Zellen verwendet, in denen das inserierte Gen exprimiert wird; vgl. Smith et al., J. Virol. 46:584, 1983, Smith, US-PS 4,215,051.

[0126] Eukaryontische Systeme und vorzugsweise Säugerexpressionssysteme ermöglichen richtige posttranslationale Modifikationen von exprimierten Säugerproteinen. Eukaryontische Zellen, die die zelluläre Maschinerie für eine korrekte Prozessierung des Primärtranskripts, Glykosylierung, Phosphorylierung und vorteilhafterweise Sekretion des Genprodukts aufweisen, sollten als Wirtszellen für die Expression von Fluoreszenzprotein verwendet werden. Solche Wirtszelllinien können in nicht begrenzender Weise CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, Jurkat, HEK-293 und WI38 umfassen.

[0127] Säugerzellsysteme, die rekombinante Viren oder virale Elemente verwenden, um eine Expression zu steuern, können verändert werden. Beispielsweise kann, wenn Adenovirus-Expressionsvektoren verwendet werden, die für das Fluoreszenzprotein kodierende Sequenz an einem Adenovirus-Transkriptions-/Translations-Kontrollkomplex wie den späten Promoter und die dreiteilige Leadersequenz ligiert werden. Dieses chimäre Gen kann sodann in das Adenovirusgenom durch in vitro- oder in vivo-Rekombination inseriert werden. Eine Insertion in eine nicht-essentielle Region des viralen Genoms (wie Region E1 oder E3) wird zu einem rekombinanten Virus führen, das lebensfähig ist und fähig ist, das Fluoreszenzprotein in infizierten Wirten zu exprimieren (siehe beispielsweise Logan & Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 3655-3659, 1984). Alternativ kann der Vaccinia-Virus-7.5K-Promoter verwendet werden (vgl. beispielsweise Mackett et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 7415-7419, 1982, Mackett et al., J. Virol. 49:857-864, 1984, Panicali et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 4927-4931, 1982). Von speziellem Interesse sind auf Rinderpappilomavirus basierende Vektoren, die die Fähigkeit aufweisen, als extrachromosomale Elemente zu replizieren (Sarver et al., Mol. Cell. Biol. 1: 486, 1981). Kurz nach Eintritt dieser DNA in Mäusezellen repliziert das Plasmid bis zu etwa 100 bis 200 Kopien pro Zelle. Eine Transkription der inserierten cDNA erfordert nicht die Integration des Plasmids in das Chromosom des Wirts, wodurch ein hoher Grad einer Expression erreicht wird. Diese Vektoren können für eine stabile Expression durch Einbau eines selektierbaren Markers in das Plasmid wie das neo-Gen verwendet werden. Alternativ kann das retrovirale Genom für eine Verwendung als ein Vektor modifiziert werden, der fähig ist, die Expression des Fluoreszenzprotein-Gens in Wirtszellen einzubringen und zu steuern (Cone & Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6349-6353, 1984). Starke Expression kann auch dadurch erreicht werden, dass induzierbare Promotoren, einschließlich in nicht begrenzender Weise den Metallothionein IIA-Promoter und Hitzeschock-Promotoren, verwendet werden.

[0128] Die Erfindung kann eine Lokalisationssequenz wie eine Kernlokalisationssequenz eine Lokalisationssequenz für das endoplasmatische Retikulum, eine Peroxisomen-Lokalisationssequenz, eine mitochondriale Lokalisationssequenz oder ein lokalisiertes Protein umfassen.

[0129] Lokalisationssequenzen können Zielsteuerungssequenzen sein, die beispielsweise in "Protein Targeting", Kapitel 35 von Stryer, L., Biochemistry (4. Auflage) W.H. Freeman, 1995, beschrieben sind. Die Lokalisationssequenz kann auch ein lokalisiertes Protein sein. Einige wichtige Lokalisationssequenzen umfassen diejenigen, die den Kern (KKKRK), die Mitochondrien (aminoterminal MLRTSSLFTRRVQPSLFNLRRLQST), das endoplasmatische Retikulum (KDEL am C-Terminus, unter der Annahme, dass eine Signalsequenz am N-Terminus vorliegt), Peroxisomen (SKF am C-Terminus), eine Prenylierung oder Insertion in die Plasmamembran (CaaX, CC, CXC oder CCXX am C-Terminus), die cytoplasmatische Seite der Plasmamembran (Fusion an SNAP-25) oder dem Golgi-Apparat (Fusion an Furin) ansteuern.

[0130] Für eine Langzeitproduktion mit hoher Ausbeute von rekombinanten Proteinen ist eine stabile Expression bevorzugt. Eher als eine Verwendung von Expressionsvektoren, die virale Replikationsursprünge enthalten, können Wirtszellen mit der Fluoreszenzprotein-cDNA, die durch geeignete Expressionskontrollelemente (wie Promoter, Enhancersequenzen, Transkriptionsterminatoren, Polyadenylierungsstellen usw.) gesteuert wird, und einem selektierbaren Marker transformiert werden. Der selektierbare Marker in dem rekombinanten Plasmid verleiht eine Resistenz gegenüber der Selektion und ermöglicht Zellen, das Plasmid stabil in ihre Chromosomen zu integrieren und sich zu vermehren, um Foci zu bilden, die wiederum kloniert und in Zelllinien expandiert werden können. Beispielsweise können nach dem Einbringen von Fremd-DNA veränderte Zellen 1

bis 2 Tage in einem angereicherten Medium vermehrt werden und sie werden sodann auf ein Selektionsmedium umgestellt. Eine Reihe von Selektionssystemen kann verwendet werden. Beispielsweise können in nicht begrenzender Weise Herpes simplex-Virus-Thymidinkinase- (Wigler et al., Cell, 11: 223, 1977), Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase- (Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 48:2026, 1962) und Adenin-Phosphoribosyltransferase-Gene (Lowy et al., Cell, 22:817, 1980) in tk-, hgprt- oder aprt-Zellen verwendet werden. Auch kann eine Antimetaboliten-Resistenz als die Basis für eine Selektion verwendet werden wie dhfr, das Resistenz gegenüber Methotrexat verleiht (Wigler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:3567, 1980, O'Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 8: 1527, 1981), gpt, das Resistenz gegenüber Mycophenolsäure verleiht (Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 2072, 1981), neo, das Resistenz gegenüber dem Aminoglykosid G-418 verleiht (Colberre-Garapin et al., J. Mol. Biol., 150:1, 1981) und hygromycin, das Resistenz gegenüber Hygromycin verleiht (Santerre et al., Gene, 30: 147, 1984). In jüngerer Zeit wurden weitere selektierbare Gene beschrieben, nämlich trpB, das Zellen ermöglicht, Indol anstelle von Tryptophan zu verwenden, hisD, das Zellen ermöglicht, Histidin anstelle von Histidin zu verwenden (Hartman & Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:8047, 1988), und ODC (Ornithin-Decarboxylase), die Resistenz gegenüber dem Ornithin-Decarboxylase-Inhibitor, 2-(Difluormethyl)-DL-Ornithin, DFMO, verleiht (McConlogue L., In: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory, Hrsg., 1987).

[0131] DNA-Sequenzen, die für das erfindungsgemäße Fluoreszenzprotein-Polypeptid kodieren, können in vitro durch DNA-Transfer in eine geeignete Wirtszelle exprimiert werden. "Wirtszellen" sind Zellen, in denen ein Vektor propagiert und seine DNA exprimiert werden kann. Der Begriff umfasst auch eine jegliche Nachkommenschaft der Wirtszelle. Es soll verstanden werden, dass alle Nachkommen nicht zu der parental Zelle identisch sein können, da Mutationen vorliegen können, die während einer Replikation auftreten. Jedoch sind solche Nachkommen von dem Begriff "Wirtszelle" umfasst. Verfahren eines stabilen Transfers, anders gesagt, wenn die Fremd-DNA kontinuierlich in dem Wirt aufrecht erhalten wird, sind bekannt.

[0132] Der Expressionsvektor kann in eine Wirtszelle für eine Expression der rekombinanten Nukleinsäure transfiziert werden. Wirtszellen können für hohe Grade an Expression selektiert werden, um das Fluoreszenzprotein-Fusionsprotein aufzureinigen. E. coli ist für diesen Zweck geeignet. Alternativ kann die Wirtszelle eine prokaryontische oder eukaryontische Zelle sein, die ausgewählt wird, um die Aktivität eines durch die Zelle produzierten Enzyms zu untersuchen. In diesem Fall ist das Linkerpeptid derart ausgewählt, dass es eine Aminosäuresequenz umfasst, die durch die Protease erkannt wird. Die Zelle kann beispielsweise eine kultivierte Zelle oder eine Zelle in vivo sein.

[0133] Ein primärer Vorteil von Fluoreszenzprotein-Fusionsproteinen ist, dass sie durch normale Proteinbiosynthese hergestellt werden, wodurch vollständig eine organische Synthese und das Erfordernis für maßgeschneiderte unnatürliche Aminosäureanaloge vermieden werden. Die Konstrukte können in E. coli in einem großen Maßstab für in vitro-Tests exprimiert werden. Eine Aufreinigung aus Bakterien ist vereinfacht, wenn die Sequenzen Polyhistidin-Tags für eine Ein-Schritt-Aufreinigung durch Nickelchelate-Chromatographie umfassen. Alternativ können die Substrate direkt in einer gewünschten Wirtszelle für in situ-Tests exprimiert werden.

[0134] In einer weiteren Ausführungsform wird erfindungsgemäß ein transgenes nichtmenschliches Tier bereitgestellt, das eine Nukleinsäuresequenz exprimiert, die für das Fluoreszenzprotein kodiert.

[0135] Die erfindungsgemäßen "nicht-menschlichen Tiere" umfassen ein jegliches nicht-menschliches Tier mit einer Nukleinsäuresequenz, die für ein Fluoreszenzprotein kodiert. Solche nicht-menschlichen Tiere umfassen Vertebraten wie Nager, nicht-menschliche Primate, Schaf, Hund, Kuh, Schwein, Amphibien und Reptilien. Bevorzugte nicht-menschliche Tiere sind aus der Nagerfamilie ausgewählt, einschließlich Ratte und Maus, am meisten bevorzugt Maus. Die erfindungsgemäßen "transgenen nicht-menschlichen Tiere" werden durch Einbringen von "Transgenen" in die Keimbahn des nicht-menschlichen Tiers hergestellt. Embryonale Zielzellen bei verschiedenen Entwicklungsstufen können für ein Einbringen von Transgenen verwendet werden. Verschiedene Verfahren werden abhängig von dem Entwicklungsstadium der embryonalen Zielzelle verwendet. Die Zygote ist das beste Ziel für eine Mikroinjektion. In der Maus erreicht der männliche Pronukleus die Größe von etwa 20 µm Durchmesser, was eine reproduzierbare Injektion von 1-2 pl DNA-Lösung ermöglicht. Die Verwendung von Zygoten als ein Ziel für einen Gentransfer hat einen hauptsächlichsten Vorteil darin, dass in den meisten Fällen die injizierte DNA in das Wirtsgen vor der ersten Spaltung eingebaut werden wird (Brinster et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:4438-4442, 1985). Als eine Konsequenz werden alle Zellen des transgenen nicht-menschlichen Tiers das eingebaute Transgen tragen. Dies wird im Allgemeinen auch durch die effiziente Transmission des Transgens an Nachkommen des Ursprungstiers reflektiert, da 50% der Keimzellen das Transgen tragen werden. Eine Mikroinjektion von Zygoten ist das bevorzugte Verfahren zum Einbau von Transgenen bei der Durchführung der Erfindung.

[0136] Der Begriff "transgen" wird verwendet, um ein Tier zu beschreiben, das exogenes genetisches Material innerhalb aller seiner Zellen umfasst. Ein "transgenes" Tier kann durch Kreuzung von zwei chimären Tieren hergestellt werden, die exogenes genetisches Material in bei der Reproduktion verwendeten Zellen umfassen. 25% der sich ergebenden Nachkommen werden transgene Tiere sein, die das exogene genetische Material in all ihren Zellen in beiden Allelen tragen. 50% der sich ergebenden Tiere werden das exogene genetische Material in einem Allel umfassen und 25% werden kein exogenes genetisches Material umfassen.

[0137] Eine retrovirale Infektion kann auch für ein Einbringen eines Transgens in ein nicht-menschliches Tier verwendet werden. Der sich entwickelnde nichtmenschliche Embryo kann in vitro zu dem Blastozysten-Stadium kultiviert werden. Während dieser Zeit können die Blastomere Ziele für eine retrovirale Infektion sein (Jaenich, R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73:1260-1264, 1976). Eine wirksame Infektion der Blastomere wird durch enzymatische Behandlung, um die zona pellucida zu entfernen, erhalten (Hogan, et al., (1986) in *Manipulating the Mouse Embryo*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). Das virale Vektorsystem, das verwendet wird, um das Transgen einzubringen, ist typischerweise ein replikationsdefizientes Retrovirus, das das Transgen trägt (Jahner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6927-6931, 1985, Van der Putten et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6148-6152, 1985). Eine Transfektion wird einfach und wirksam durch Kultivieren der Blastomere auf einer Monolayer von Virus-produzierenden Zellen erhalten (Van der Putten, supra, Stewart et al., EMBO J., 6:383-388, 1987). Alternativ kann eine Infektion bei einer späteren Stufe erfolgen. Virus oder Virus-produzierende Zellen können in das Blastozöl injiziert werden (D. Jahner et al., Nature 298:623-628, 1982). Die meisten der Ursprungstiere werden das Transgen in einer mosaikartigen Struktur aufweisen, da ein Einbau nur in einer Untergruppe der Zellen auftritt, die das transgene nicht-menschliche Tier bildeten. Ferner können die Ursprungstiere verschiedene retrovirale Insertionen des Transgens an verschiedenen Positionen in dem Genom enthalten, die sich im Allgemeinen in dem Nachkommen segregieren werden. Zusätzlich ist es auch möglich, Transgene in die Keimlinie durch intrauterine retrovirale Infektion des Embryos während der Trächtigkeit einzubringen, wenn auch bei niedriger Wirksamkeit (D. Jahner et al., supra).

[0138] Ein dritter Typ von Zielzellen für ein Einbringen eines Transgens ist die embryonale Stammzelle (ES). ES-Zellen werden aus Embryonen vor der Implantation erhalten, in vitro kultiviert und mit Embryonen fusioniert (M. J. Evans et al., Nature 292:154-156, 1981, M.O. Bradley et al., Nature 309: 255-258, 1984, Gossler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:9065-9069, 1986 und Robertson et al., Nature 322:445-448, 1986). Transgene können wirksam in ES-Zellen durch DNA-Transfektion oder durch Retrovirus-vermittelte Transduktion eingebracht werden. Solche transformierten ES-Zellen können sodann mit Blastozysten aus einem nicht-menschlichen Tier vereinigt werden. Die ES-Zellen kolonisieren sodann den Embryo und leisten einen Beitrag zu der Keimlinie des sich ergebenden chimären Tiers (bezüglich einer Übersicht vgl. Jaenisch, R., Science 240: 1468-1474, 1988).

[0139] "Transformiert" betrifft eine Zelle, in die (oder in dessen Vorfahr) mittels rekombinanter Nukleinsäure-techniken ein heterologes Nukleinsäuremolekül eingebracht wurde. "Heterolog" betrifft eine Nukleinsäuresequenz, die entweder von einer anderen Spezies abstammt oder bezüglich entweder der Ursprungsform oder der primär in der Zelle exprimierten Form modifiziert ist.

[0140] "Transgen" betrifft ein jegliches Stück an DNA, das künstlich in eine Zelle inseriert wird und Teil des Genoms des Organismus wird (d.h. entweder stabil integriert oder als ein stabiles extrachromosomales Element), der sich aus der Zelle entwickelt. Ein solches Transgen kann ein Gen umfassen, das teilweise oder vollständig heterolog (d.h. fremd) zu dem transgenen Organismus ist, oder kann ein Gen darstellen, das zu einem endogenen Gen des Organismus homolog ist. Von dieser Definition eingeschlossen ist ein Transgen, das durch Bereitstellung einer RNA-Sequenz erzeugt wird, die in DNA transkribiert und sodann in das Genom eingebaut wird. Die erfindungsgemäßen Transgene umfassen DNA-Sequenzen, die für das Fluoreszenzprotein kodieren, das in einem transgenen nicht-menschlichen Tier exprimiert werden kann. Der Begriff "transgen" wie hierin verwendet umfasst des Weiteren einen jeglichen Organismus, dessen Genom durch in vitro-Manipulation des frühen Embryos oder des befruchteten Eis oder durch eine jegliche transgene Technologie, um einen spezifischen Gen-Knockout zu induzieren, verändert wurde. Der Begriff "Gen-Knockout" wie hier verwendet betrifft die gezielte Zerstörung eines Gens in vivo mit einem vollständigen Verlust der Funktion, die durch eine jegliche transgene Technologie erreicht wurde, die dem Fachmann bekannt ist. In einer Ausführungsform sind transgene Tiere mit Gen-Knockouts diejenigen, in denen das Zielgen nicht-funktionell durch Insertion in das Gen mittels homologer Rekombination gemacht wurde. Wie hier verwendet umfasst der Begriff "transgen" eine jegliche bekannte transgene Technologie, die einen Organismus erzeugen kann, der ein eingebrachtes Transgen trägt, oder einen Organismus produzieren kann, in dem ein endogenes Gen nicht-funktionell gemacht wurde oder "ausgeschaltet" wurde.

III. VERWENDUNG VON VERÄNDERTEN FLUORESZENZPROTEINEN

[0141] Die erfindungsgemäßen Proteine sind in jeglichen Verfahren verwendbar, bei denen Fluoreszenzproteine eingesetzt werden.

[0142] Die erfindungsgemäßen veränderten Fluoreszenzproteine sind als Fluoreszenzmarker in den vielen Möglichkeiten verwendbar, in denen Fluoreszenzmarker bereits eingesetzt werden. Dies umfasst beispielsweise eine Kopplung von veränderten Fluoreszenzproteinen an Antikörper, Nukleinsäuren oder andere Rezeptoren für eine Verwendung in Nachweistests, wie Immunoassays oder Hybridisierungsassays.

[0143] Die erfindungsgemäßen veränderten Fluoreszenzproteine sind zum Nachverfolgen der Bewegung von Proteinen in Zellen verwendbar. In dieser Ausführungsform wird ein Nukleinsäuremolekül, das für das Fluoreszenzprotein kodiert, an ein Nukleinsäuremolekül fusioniert, das für das interessierende Protein in einem Expressionsvektor kodiert. Bei einer Expression in der Zelle kann das interessierende Protein basierend auf Fluoreszenz lokalisiert werden. In einer anderen Version werden zwei interessierende Proteine mit zwei veränderten Fluoreszenzproteinen mit unterschiedlichen Fluoreszenzcharakteristika fusioniert.

[0144] Die erfindungsgemäßen veränderten Fluoreszenzproteine sind in Systemen zum Nachweis einer Induktion von Transkription verwendbar. In bestimmten Ausführungsformen wird eine Nukleotidsequenz, die für das veränderte Fluoreszenzprotein kodiert, an interessierende Expressionskontrollsequenzen fusioniert und der Expressionsvektor in eine Zelle transfiziert. Eine Induktion des Promoters kann durch Nachweis der Expression und/oder der Menge an Fluoreszenz gemessen werden. Solche Konstrukte können verwendet werden, um Signalwege vom Rezeptor zum Promotor nachzuverfolgen.

[0145] Die erfindungsgemäßen veränderten Fluoreszenzproteine sind in Anwendungen einsetzbar die FRET einbeziehen. Solche Anwendungen können Ereignisse als eine Funktion der Bewegung eines Fluoreszenzdonors und Fluoreszenzakzeptors zueinander oder weg voneinander nachweisen. Ein Mitglied oder beide Mitglieder des Donor/Akzeptor-Paars können ein fluoreszierendes Protein sein. Ein bevorzugtes Donor- und Akzeptor-Paar für auf FRET basierende Tests ist ein Donor mit einer T203I-Mutation und ein Akzeptor mit der Mutation T203X, worin X eine aromatische Aminosäure-39, insbesondere T203Y, T203W oder T203H ist. In einem besonders geeigneten Paar enthält der Donor die nachstehenden Mutationen: S72A, K79R, Y145F, M153A und T203I (mit einem Exzitationspeak von 395 nm und einem Emissionspeak von 511 nm) und der Akzeptor enthält die nachstehenden Mutationen: S65G, S72A, K79R und T203Y. Dieses spezielle Paar stellt eine weite Trennung zwischen den Exzitations- und Emissionspeaks des Donors bereit und stellt eine gute Überlappung zwischen dem Emissionsspektrum des Donors und dem Exzitationsspektrum des Akzeptors bereit. Andere Mutanten mit einer Rot-Verschiebung wie die hier beschriebenen können auch als Akzeptor in einem solchen Paar verwendet werden.

[0146] In einem Aspekt wird FRET zum Nachweis der Spaltung eines Substrats eingesetzt, bei dem der Donor und der Akzeptor an das Substrat an gegenüberliegenden Seiten der Spaltstelle gekoppelt sind. Bei einer Spaltung des Substrats trennt sich das Donor/Akzeptor-Paar physikalisch, wodurch FRET beseitigt wird. Die Tests beinhalten ein In-Kontakt-Bringen des Substrats mit einer Probe und eine Bestimmung einer qualitativen oder quantitativen Veränderung des FRET. In einer Ausführungsform wird das veränderte Fluoreszenzprotein in einem Substrat für β -Lactamase verwendet. Beispiele für solche Substrate sind in der US-Patentanmeldung 08/407,544, eingereicht am 20. März 1995 und in der internationalen Anmeldung PCT/US96/04059, eingereicht am 20. März 1996, beschrieben. In einer anderen Ausführungsform sind ein verändertes Fluoreszenzprotein-Donor/Akzeptor-Paar Teil eines Fusionsproteins, das durch ein Peptid mit einer proteolytischen Spaltstelle gekoppelt ist. Solche Tandem-Fluoreszenzproteine sind in der US-Patentanmeldung 08/594,575, eingereicht am 31. Januar 1996, beschrieben.

[0147] In einem weiteren Aspekt wird FRET zum Nachweis von Veränderungen des Potentials über eine Membran verwendet. Ein Donor und ein Akzeptor werden auf gegenüberliegenden Seiten einer Membran gegeben, so dass einer die Membran in Reaktion auf eine Spannungsveränderung überschreitet. Dies erzeugt einen messbaren FRET. Ein solches Verfahren ist in der US-Patentanmeldung 08/481,977, eingereicht am 7. Juni 1995 und in der internationalen Anmeldung PCT/US96/09652, eingereicht am 6. Juni 1996, beschrieben.

[0148] Die erfindungsgemäßen veränderten Proteine sind zur Herstellung von Biosensoren für eine Bestimmung der Konzentrationen von Ionen in Proben und lebenden Zellen und transgenen Organismen verwendbar. Beim Binden eines Ions an das Fluoreszenzprotein tritt eine Veränderung in mindestens einer messbaren Fluoreszenzeigenschaft des veränderten Fluoreszenzproteins auf, die die Grundlage für die Bestimmung des Vor-

liegens des interessierenden Ions bereitstellt.

[0149] Die erfindungsgemäßen veränderten Proteine sind für die Herstellung von Fluoreszenzsubstraten für Proteinkinasen verwendbar. Solche Substrate umfassen eine Aminosäuresequenz, die durch Proteinkinasen erkennbar ist. Bei einer Phosphorylierung durchläuft das veränderte Fluoreszenzprotein eine Veränderung in einer Fluoreszenzeigenschaft. Solche Substrate sind zum Nachweis und für eine Messung der Proteinkinaseaktivität in einer Probe einer Zelle bei Transfektion und Expression des Substrats verwendbar. Vorzugsweise wird die Kinase-Erkennungsstelle innerhalb von etwa 20 Aminosäuren eines Terminus des veränderten Fluoreszenzproteins eingesetzt. Die Kinase-Erkennungsstelle kann auch in eine Schleifendomäne des Proteins eingesetzt werden (vergleiche z.B. [Fig. 1B](#)). Verfahren zur Herstellung von Fluoreszenzsubstraten für Proteinkinasen sind in der US-Patentanmeldung 08/680,877, eingereicht am 16. Juli 1996, beschrieben.

[0150] Eine Proteaseerkennungsstelle kann auch in eine Schleifendomäne eingebracht werden. Bei einer Spaltung ändert sich eine Fluoreszenzeigenschaft in einer messbaren Weise.

[0151] Die Erfindung umfasst auch ein Verfahren zur Identifizierung einer Testchemikalie. Typischerweise umfasst das Verfahren ein In-Kontakt-Bringen einer Testchemikalie mit einer Probe, die eine biologische Einheit, die mit einem funktionellen veränderten Fluoreszenzprotein markiert ist, oder ein für dieses funktionelle veränderte Fluoreszenzprotein kodierendes Polynukleotid enthält. Durch eine Überwachung der Fluoreszenz (d.h. eine Fluoreszenzeigenschaft) von der Probe, die das funktionelle veränderte Fluoreszenzprotein enthält, kann bestimmt werden, ob eine Testchemikalie aktiv ist. Kontrollen können eingebaut werden, um die Spezifität des Signals sicherzustellen. Solche Kontrollen umfassen Messungen einer Fluoreszenzeigenschaft bei Fehlen der Testchemikalie, bei Gegenwart einer Chemikalie mit einer erwarteten Aktivität (wie einem bekannten Modulator) oder veränderte Kontrollen (wie Fehlen von veränderten Fluoreszenzproteinen, Fehlen von Polynukleotiden für veränderte Fluoreszenzproteine oder Fehlen von operativer Verbindung der veränderten Fluoreszenzproteine).

[0152] Die Fluoreszenz in Gegenwart einer Testchemikalie kann größer sein oder geringer sein als bei Fehlen der Testchemikalie. Zum Beispiel kann, falls das veränderte Fluoreszenzprotein als ein Reporter der Genexpression verwendet wird, die Testchemikalie die Genexpression herauf- oder herunterregulieren. Für solche Screening-Typen ist das Polynukleotid, das für das funktionelle veränderte Fluoreszenzprotein kodiert, operativ mit einem genomischen Polynukleotid oder einem re verbunden. Alternativ ist das funktionelle veränderte Fluoreszenzprotein mit einem zweiten funktionellen Protein fusioniert. Diese Ausführungsform kann verwendet werden, um eine Lokalisation des zweiten Proteins zu verfolgen oder Protein-Protein-Interaktionen unter Verwendung von Energietransfer zu verfolgen.

IV. VERFAHREN

[0153] Fluoreszenz in einer Probe wird mit Hilfe eines Fluorimeters gemessen. Im Allgemeinen tritt Anregungsstrahlung von einer Anregungsquelle mit einer ersten Wellenlänge durch Anregungsoptik. Die Anregungsoptik verursacht, dass die Anregungsstrahlung die Probe anregt. In Reaktion darauf emittieren Fluoreszenzproteine in der Probe Strahlung, die eine Wellenlänge aufweist, die von der Anregungswellenlänge verschieden ist. Sammlungsoptik sammelt sodann die Emission aus der Probe. Die Vorrichtung kann eine Temperatursteuereinheit umfassen, um die Probe bei einer spezifischen Temperatur zu halten, während sie untersucht wird. Gemäß einer Ausführungsform bewegt ein Mehrfachachsen-Translationstisch eine Mikrotiterplatte, die eine Mehrzahl von Proben hält, um verschiedene Wells, die exponiert werden sollen, zu positionieren. Der Mehrfachachsen-Translationstisch, die Temperatursteuereinheit, eine Autofokussierungsvorrichtung und Elektronik, die mit einer Bildgebung und Datensammlung assoziiert ist, können durch einen geeigneterweise programmierten Digitalcomputer verwaltet werden. Der Computer kann auch die während des Tests gesammelten Daten in ein anderes Format für eine Darstellung transformieren. Dieser Vorgang kann miniaturisiert und automatisiert werden, um ein Screening von vielen Tausenden von Verbindungen zu ermöglichen.

[0154] Verfahren zum Durchführen von Tests auf Fluoreszenzmaterialien sind bekannt und beispielsweise beschrieben in Lakowicz, J.R., Principles of Fluorescence Spectroscopy, New York: Plenum Press (1983); Herman, B., Resonance energy transfer microscopy, in: Fluorescence Microscopy of Living cells in Culture, Part B, Methods in Cell Biology, Band 30, Hrsg. Tayler, D.L. & Wang, Y.-L., San Diego: Academic Press (1989), Seiten 219-243; Turro, N.J., Modern Molecular Photochemistry, Menlo Park: Benjamin/Cummings Publishing Col, Inc. (1978), Seiten 296-361.

Mutagenese und Herstellung von Protein

[0155] YFP-Varianten und -Revertanten wurden gemäß Herstellerangaben und unter Verwendung des YFP-Klons 10c als Matrize unter Verwendung des auf PCR-basierenden QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA) hergestellt (Ormo et al., 1996). Mutationen wurden durch Sequenzierung des gesamten Gens bestätigt und alle GFP-Varianten wurden wie beschrieben exprimiert und aufgereinigt (Ormo et al., 1996).

Fluoreszenzmessungen

[0156] Kleine Mengen von konzentriertem Protein wurden 25-fach in eine Reihe von Puffern (20 mM MES pH 6,0, MES pH 6,5, PIPES pH 7,0, HEPES pH 7,5 und TAPS pH 8,0) mit einer konstanten Ionenstärke verdünnt. Die Puffer enthielten veränderliche Konzentrationen von entweder Kaliumchlorid oder Kaliumiodid und die Ionenstärke wurde auf 150 mM mit Kalium-D-Gluconat eingestellt. Fluoreszenzmessungen als eine Funktion des pH-Werts und der Halogenid-Konzentration erfolgten auf einem Hitachi F4500-Fluoreszenzspektrophotometer bei Raumtemperatur ($\lambda_{\text{ex}} = 514 \text{ nm}$), wobei die Emission zwischen 520 und 550 nm dreimal bei einer Geschwindigkeit von 60 nm/min. gescannt wurde. Maximale Emission bei 528 nm wurde gemittelt und in Hinblick auf die Fluoreszenz ohne Halogenide normalisiert.

Kristallwachstum und Datensammlung

[0157] YFP-H148Q wurde auf 15 mg/ml in 20 mM TRIS pH 7,9 konzentriert und Kristalle wurden in hängenden Tropfen mit 5 μl Protein und 5 μl Mutterlösung gezüchtet. Die Mutterlösung enthielt 22% PEG 1550 bei einem pH-Wert von 5,5 in 100 mM Natriumacetat und 90 mM MgCl_2 . Die stäbchenförmigen Kristalle wiesen einen Durchmesser von etwa 0,04 mm und eine Länge von bis zu 1,0 mm auf und wuchsen innerhalb von 1,5 bis 2 Jahren bei 4°C. Ein Kristall wurde in synthetischer Mutterlösung mit den vorstehend beschriebenen Bestandteilen ohne MgCl_2 , jedoch mit 100 mM Kaliumiodid und 20% Ethylenglykol für eine Cryo-Protektion getränkt (als Iodid-Tränken bezeichnet). Ein weiterer Kristall wurde in der vorstehend beschriebenen Mutterlösung mit 100 mM MgCl_2 und 20% Ethylenglykol getränkt (als Chlorid-Tränken bezeichnet). Beide Tränkungen erfolgten bei einem pH-Wert von 4,6 für 4 Stunden bei Raumtemperatur und eine Datensammlung folgte unmittelbar danach. Die Kristalle wurden flash-gefroren und Röntgenstreudaten wurden bei 100 K unter Verwendung einer RAXIS-IIc-Bildplatte auf einem Rigaku RUH3-rotierenden Anodengenerator, der mit Spiegeln ausgestattet war, gesammelt.

Strukturbestimmung von YFP-H148Q und Identifizierung von Iodid-Bindestellen

[0158] Die zwei Datensätze wurden mit Denzo v1.9 bearbeitet und unter Verwendung von ScalePack bewertet (Otwinowski & Minor, 1997). Die Raumgruppe ist $P2_12_12_1$ mit Einheitszellparametern von $a = 51,2$, $b = 62,8$ und $c = 68,7 \text{ Å}$ für das Iodid-Tränken und $a = 51,7$, $b = 62,6$ und $c = 66,2 \text{ Å}$ für das Chlorid-Tränken. Die Kristalle sind nahezu isomorph zu den beschriebenen YFP-H148G- (Wachter et al., 1998) und GFP S65T-Kristallen (Ormo et al., 1996), und die YFP-H 148G-Koordinatendatei 2yfp (Wachter et al., 1998) wurde als Modell für eine Phasenbildung verwendet. Ein Modell für den anionischen Chromophor wurde durch halbempirische Molekülorbital-Berechnungen unter Verwendung von AM1 in dem Programm SPARTAN Version 4.1 erhalten (Wavefunction Inc., Irvine, CA).

[0159] Eine anomale Unterschiede-Karte wurde aus dem Datensatz berechnet, der von dem Iodid-Tränken abgeleitet war (anomale Daten waren 65% vollständig), da Iod ein signifikantes anomales Signal bei der In-House- CuK_α -Wellenlänge von 1,54 Å aufweist. Schweratom-Phasen wurden näherungsweise durch Subtraktion von 90° von berechneten Proteinphasen unter Verwendung des Programms Scaleit in dem CCP4-Programmpaket berechnet (Collaborative Computational Project N. 4, 1994). Die anomale Unterschiede-Karte identifizierte zwei Iodid-Positionen, wobei eine in dem Proteininneren verborgen war und eine auf der Proteinoberfläche lag.

Verfeinerung von YFP-H148Q mit und ohne gebundenem Iodid

[0160] Die zwei Datensätze, die aus dem Iodid- und aus dem Chlorid-Tränken abgeleitet waren, wurden in einer ähnlichen Weise verfeinert. Nach einer anfänglichen Starrkörperverfeinerung auf 4,0 Å wurde eine Positionsverfeinerung unter Verwendung der Daten auf 3,0 Å und sodann zur Auflösungsgrenze (Tabelle 1) unter Verwendung des Programms TNT (Tronrud et al., 1987) durchgeführt. Während früher Zyklen der Verfeinerung wurden gebundene Halogenide nicht aufgebaut und das Glutamin an Position 148 wurde als ein Glycin aufge-

baut. Elektronendichtekarten ($2F_0-F_c$ und F_0-F_c) wurden intermittierend unter Verwendung von O untersucht (Jones et al., 1991). Die F_0-F_c -Karten zeigten deutlich die Positionen der verborgenen und an der Oberfläche liegenden Iodide bei 11 bzw. 5,5 rms Abweichung, die in den Zentren der zwei anomale Unterschiede-Dichtepicks lagen, obwohl keine positiv Unterschied-Dichte festgestellt wurde, die mit der Bindung des verborgenen Chlorids konsistent war. Die Dichte für die Gln 148-Seitenkette war frühzeitig deutlich sichtbar, was einen Aufbau des Glutamins als ein Rotamer ermöglichte, das von dem ursprünglichen Histidin unterschiedlich war.

[0161] B-Faktoren wurden unter Verwendung der Default-TNT B-Faktorkorrelationsbibliothek verfeinert. B-Faktor-Korrelationswerte, die von His und Phe abgeleitet waren, wurden verwendet, um die Chromophorenatome aufzubauen. Gebundene Lösungsmittelmoleküle wurden zu dem Modell soweit geeignet hinzugefügt, wie bewertet aus der Differenzdichte und Nähe der Wasserstoffbindungspartner. Vor einer Verfeinerung der Belegung durch die gebundenen Halogenide wurden die B-Faktoren für diese Halogenide fixiert. Der thermische Faktor für das verborgene Iodid wurde auf den durchschnittlichen B-Faktor der dazu am nächsten liegenden 12 Atome, 30 \AA^2 , eingestellt (**Fig. 5**) und der thermische Faktor für das Oberflächen-Iodid wurde auf den durchschnittlichen B-Faktor der 6 am nächsten liegenden Lösungsmittelmoleküle, die an die Proteinoberfläche gebunden waren, 39 \AA^2 , eingestellt. Der letzte Schritt in der Verfeinerung war die Verfeinerung der Belegung durch die zwei gebundenen Halogenide.

Bestimmung des pK_a -Werts des Chromophors und der Iodid-Bindungskonstanten durch Absorption

[0162] Der pK_a -Wert des Chromophors wurde aus Absorptionsscans bei veränderlichen Anionenkonzentrationen bestimmt. Absorptionsscans wurden bei Raumtemperatur zwischen 250 und 600 nm (Shimadzu 2101-Spektrophotometer) mit 0,05 mg/ml YFP unter zwei verschiedenen pH-Bedingungen, die für das spezifische Anion geeignet waren, wobei aus einer Reihe von Puffern ausgewählt wurde (20 mM Äpfelsäure pH 5,8, Äpfelsäure pH 6,1, MES pH 6,4, HEPES pH 7,1), gesammelt. Die optische Dichte des Chromophoren-Anions (514 bis 515 nm für YFP und YFP-H148Q bei dem Puffer-pH, sowie die optische Dichte bei einem pH-Wert von 9 ohne wechselwirkende Anionen wurden in der Henderson-Hasselbach-Gleichung verwendet, um den pK_a -Wert des Chromophors für jede untersuchte Bedingung zu ermitteln. Mikroskopische Bindungskonstanten für eine Anionenbindung des Proteins wurden durch Kurvenanpassung des pK_a -Werts des Chromophors zu der Anionenkonzentration unter Verwendung eines Ausdrucks für ein gekoppeltes Gleichgewicht, das zwei unterschiedliche Liganden einbezieht, extrahiert.

[0163] Die nachstehenden Beispiele dienen der Veranschaulichung, sind jedoch nicht begrenzend zu verstehen.

BEISPIELE

[0164] Als ein Schritt zum Verständnis der Eigenschaften von GFP und um dabei zu helfen, GFPs mit veränderten Eigenschaften zu versehen, haben wir die dreidimensionale Struktur bei einer Auflösung von $1,9 \text{ \AA}$ der S65T-Mutante (R. Heim et al., Nature 373:664-665 (1995)) von A. victoria GFP bestimmt. Diese Mutante enthält auch die häufige Q80R-Substitution, die zufällig bei der frühen Verteilung der GFP-cDNA auftrat, und es ist nicht bekannt, dass sie irgendwelche Wirkungen auf die Eigenschaften des Proteins hat (M. Chalfie et al., Science 263:802-805 (1994)).

[0165] S65T-GFP (R. Heim et al., Nature 373:664-665 (1995)) mit einem Histidin-Tag wurde in JM109/pR-SETs in 41 YT-Nährmedium mit Ampicillin bei 37°C , 450 Upm und 5 l/Min. Luftstrom überexprimiert. Die Temperatur wurde auf 25°C bei $A_{595} = 0,3$ gesenkt, gefolgt von einer Induktion mit 1 mM Isopropylthiogalactosid für 5 Stunden. Zellpaste wurde bei -80°C über Nacht gelagert, sodann in 50 mM HEPES pH 7,9, 0,3 M NaCl, 5 mM 2-Mercaptoethanol, 0,1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) resuspendiert, einmal durch eine French-Press bei 10 000 psi geleitet und sodann bei 20 kUpm 45 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine Ni-NTA-Agarosesäule (Qiagen) aufgetragen, gefolgt von einem Waschen mit 20 mM Imidazol und einer Elution mit 100 mM Imidazol. Grüne Fraktionen wurden gepoolt und einer chymotryptischen (Sigma) Proteolyse (1:50 w/w) 22 Stunden bei Raumtemperatur unterzogen. Nach Zugabe von 0,5 mM PMSF wurde der Verdau erneut auf die Ni-Säule aufgetragen. Eine N-terminale Sequenzierung bestätigte das Vorliegen des richtigen N-terminalen Methionins. Nach Dialyse gegen 20 mM HEPES, pH 7,5 und einer Konzentration auf $A_{490} = 20$ wurden stäbchenförmige Kristalle bei Raumtemperatur in hängenden Tropfen mit 5 μl Protein und 5 μl Well-Lösung, 22-26% PEG 4000 (Serva), 50 mM HEPES, pH 8,0-8,5, 50 mM MgCl_4 und 10 mM 2-Mercaptoethanol, innerhalb von 5 Tagen erhalten. Kristalle wiesen einen Durchmesser von 0,05 mm und eine Länge von bis zu 1,0 mm auf. Die Raumgruppe war $P2_12_12_1$ mit $a = 51,8$, $b = 62,8$, $c = 70,7 \text{ \AA}$, $Z = 4$. Zwei Kristallformen von Wildtyp-GFP, ohne Bezug zu der erfindungsgemäßen Form, wurden von M.A. Perrozo, K.B. Ward,

R.B. Thompson und W.W. Ward, J. Biol. Chem. 203, 7713-7716 (1988) beschrieben.

[0166] Die Struktur von GFP wurde durch multiplen isomorphen Austausch und anomale Streuung (Tabelle E), Lösungsmittel-Abflachung, Phasenkombination und kristallographische Verfeinerung bestimmt. Das bemerkenswerteste Merkmal der Faltung von GFP ist ein elfsträngiges β -Fass (β -barrel), das um eine einzelne zentrale Helix gewickelt ist ([Fig. 1A](#) und [Fig. 1B](#)), wobei jeder Strang aus etwa 9 bis 13 Resten besteht. Das Fass bildet einen nahezu perfekten Zylinder mit einer Länge von 42 Å und einem Durchmesser von 24 Å. Die N-terminale Hälfte des Polypeptids umfasst drei anti-parallele Stränge, die zentrale Helix und sodann drei weitere anti-parallele Stränge, wobei der letztere (Reste 118-123) zu dem N-terminalen Strang (Reste 11-23) parallel ist. Das Polypeptid-Rückgrat kreuzt sodann den "Boden" des Moleküls, um die zweite Hälfte des Fasses in einem fünfsträngigen griechischer-Schlüssel-Motiv auszubilden. Das obere Ende des Zylinders besitzt eine Kappe aus drei kurzen verzerrten helikalen Segmenten, während ein kurzes sehr verzerrtes helikales Segment die Kappe für den Boden des Zylinders bildet. Die Hauptketten-Wasserstoffbindung, die die Oberfläche des Zylinders besetzt, ist sehr wahrscheinlich die Ursache für die ungewöhnliche Stabilität des Proteins gegenüber einer Denaturierung und Proteolyse. Es gibt keine langen Segmente des Polypeptids, die herausgeschnitten werden könnten, wobei die Intaktheit der Schale um den Chromophor beibehalten bleibt. Somit würde es schwierig erscheinen, GFP zu verändern, um dessen Molekulargewicht durch einen großen Prozentwert zu verringern (J. Dopf & T.M. Horiagon *Gene* 173:39-43 (1996)).

[0167] Der p-Hydroxybenzylidenimidazolidinon-Chromophor (C.W. Cody et al. *Biochemistry* 32:1212-1218 (1993)) ist vollständig vor der großen Menge an Lösungsmittel geschützt und liegt zentral in dem Molekül. Die gesamte und vermutlich steife Einkapselung ist möglicherweise für die kleine Stokes-Verschiebung (d.h. Wellenlängen-Unterschied zwischen Exzitations- und Emissionsmaxima), hohe Quantumausbeute einer Fluoreszenz, Unfähigkeit von O₂, den angeregten Zustand auszulöschen (B.D. Nageswara Rao et al., *Biophys. J.* 32:630-632 (1980)) und die Beständigkeit des Chromophors gegenüber einer Titration des äußeren pH-Werts (W.W. Ward, *Bioluminescence and Chemiluminescence* (M.A. DeLuca und W.D. McElroy, Hrsg.) Academic Press, Seiten 235-242 (1981); W.W. Ward & S.H. Bokman, *Biochemistry* 21:4535-4540 (1982); W.W. Ward et al., *Photochem. Photobiol.* 35:803-808 (1982)) verantwortlich. Sie ermöglicht auch eine Rationale darüber, warum die Bildung des Fluorophors ein spontaner intramolekularer Vorgang sein sollte (R. Heim et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:12501-12504 (1994)), da es schwierig ist, sich vorzustellen, wie ein Enzym Zutritt zu dem Substrat bekommen könnte. Die Ebene des Chromophors ist in etwa senkrecht (60°) zu der Symmetrieachse des umgebenden Fasses. Eine Seite des Chromophors steht einer überraschend großen Höhle gegenüber, die ein Volumen von etwa 135 Å³ einnimmt (B. Lee & F.M. Richards, *J. Mol. Biol.* 55:379-400 (1971)). Die Atomradien waren diejenigen von Lee & Richards, berechnet unter Verwendung des Programms MS mit einem Sondenradius von 1,4 Å (M.L. Connolly, *Science* 221:709-713 (1983)). Die Höhle öffnet sich nicht gegenüber dem Hauptlösungsmittel. Vier Wassermoleküle liegen in der Höhle, die eine Kette von Wasserstoffbindungen bilden, die die verborgenen Seitenketten von Glu²²² und Gln⁶⁹ verbindet. Sofern nicht besetzt, würde man annehmen, dass eine derart große Höhle das Protein um mehrere kcal/mol destabilisiert (S.J. Hubbard et al., *Protein Engineering* 7:613-626 (1994), A.E. Eriksson et al., *Science* 255:178-183 (1992)). Ein Teil des Volumens der Höhle könnte die Konsequenz der Verdichtung sein, die sich aus Zyklisierungs- und Dehydratisierungsreaktionen ergibt. Die Höhle könnte auch temporär das Oxidationsmittel, höchstwahrscheinlich O₂ beherbergen (A.B. Cubitt et al., *Trends Biochem. Sci.* 20:448-455 (1995), R. Heim et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:12501-12504 (1994), S. Inouye & F.I. Tsuji, *FEBS Lett.* 351:211-214 (1994)), das die α - β -Bindung von Tyr⁶⁶ dehydrogeniert. Der Chromophor, die Höhle und Seitenketten, die mit dem Chromophor in Kontakt stehen, sind in [Fig. 2A](#) und ein Teil der finalen Elektronendichtekarte in dieser Nähe in [Fig. 2B](#) gezeigt.

[0168] Die gegenüberliegende Seite des Chromophors ist gegenüber mehreren aromatischen und polaren Seitenketten gepackt. Von speziellem Interesse ist das komplizierte Netzwerk von polaren Wechselwirkungen mit dem Chromophor ([Fig. 2C](#)). His¹⁴⁸, Thr²⁰³ und Ser²⁰⁵ bilden Wasserstoffbindungen mit der phenolischen Hydroxylgruppe. Arg⁹⁶ und Gln⁹⁴ interagieren mit der Carbonylgruppe des Imidazolidinonrings und Glu²²² bildet eine Wasserstoffbindung mit der Seitenkette von Thr⁶⁵. Weitere polare Interaktionen wie Wasserstoffbindungen zu Arg⁹⁶ von der Carbonylgruppe von Thr⁶² und der Seitenketten-Carbonylgruppe von Gln¹⁸³ stabilisieren vermutlich das verborgene Arg⁹⁶ in seiner protonierten Form. Diese verborgene Ladung legt wiederum nahe, dass eine teilweise negative Ladung auf dem Carbonyl-Sauerstoffatom des Imidazolidinonrings des deprotonierten Fluorophors liegt wie zuvor vorgeschlagen (W.W. Ward, *Bioluminescence and Chemiluminescence* (M.A. DeLuca und W.D. McElroy, Hrsg.) Academic Press, Seiten 235-242 (1981), W.W. Ward & S.H. Bokman, *Biochemistry* 21:4535-4540 (1982), W.W. Ward et al., *Photochem. Photobiol.* 35:803-808 (1982)). Arg⁹⁶ ist möglicherweise für die Bildung des Fluorophors wesentlich und könnte den anfänglichen Ringschluss unterstützen. Schlussendlich zeigt Tyr¹⁴⁵ eine typische stabilisierende Kante-Fläche-Wechselwirkung mit dem Benzylring. Trp⁵⁷, der einzige Tryptophanrest in GFP, liegt 13 Å bis 15 Å von dem Chromophor entfernt und die langen Ach-

sen der zwei Ringsysteme sind nahezu parallel. Dies zeigt, dass ein wirksamer Energietransfer zu dem letzteren auftreten sollte, und erklärt, warum keine getrennte Tryptophanemission feststellbar ist (D.C. Prasher et al., *Gene* 111:229-233 (1992)). Die zwei Cysteine in GFP, Cys⁴⁸ und Cys⁷⁰, liegen 24 Å voneinander entfernt, zu weit entfernt, um eine Disulfidbrücke auszubilden. Cys⁷⁰ ist verborgen, Cys⁴⁸ sollte jedoch verhältnismäßig zugänglich gegenüber Sulfhydryl-spezifischen Reagenzien sein. Ein solches Reagenz, 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure), markiert GFP und löscht dessen Fluoreszenz (S. Inouye & F.I. Tsuji, *FEBS Lett.* 351:211-214 (1994)). Diese Wirkung wurde der Notwendigkeit für eine freie Sulfhydrylgruppe zugewiesen, könnte jedoch auch ein spezifisches Löschen durch die 5-Thio-2-nitrobenzoesäuregruppe widerspiegeln, die an Cys⁴⁸ binden würde.

[0169] Obwohl die Elektronendichtekarte größtenteils mit der vorgeschlagenen Struktur des Chromophors (D.C. Prasher et al., *Gene* 111:229-233 (1992), C.W. Cody et al., *Biochemistry* 32:1212-1218 (1993)) in der cis [Z]-Konfiguration konsistent ist, und es keine Anzeichen für eine jegliche substanzielle Fraktion des gegenteiligen Isomers um die Doppelbindung des Chromophors gibt, finden sich unterschiedliche Merkmale bei $> 4\sigma$ in der endgültigen (F_0-F_c) Elektronendichtekarte, die dahingehend interpretiert werden können, dass sie entweder das intakte, nicht-zyklisierte Polypeptid oder ein Carbinolamin darstellen (Nebenbild zu [Fig. 2C](#)). Dies legt nahe, dass eine signifikante Fraktion, möglicherweise soviel wie 30%, der Moleküle in dem Kristall die abschließende Dehydratisierungsreaktion nicht durchlaufen haben. Eine Bestätigung der unvollständigen Dehydratisierung ergibt sich aus einer Elektrospray-Massenspektrometrie, die in übereinstimmender Weise zeigt, dass die durchschnittlichen Massen von sowohl Wildtyp-, als auch S65T-GFP (3108614 bzw. 31099,5f4 Da) 6-7 Da größer als für die vollständig gereiften Proteine vorhergesagt (31079 bzw. 31093 Da) sind. Eine solche Abweichung könnte durch eine 30-35%-Molfraktion von Apoprotein oder Carbinolamin mit einem 18 oder 20 Da höheren Molekulargewicht erklärt werden. Die natürliche Menge von ¹³C und ²H und die begrenzte Auflösung des Hewlett-Packard 5989B-Elektrospraymassenspektrometers, das für diese Messungen verwendet wurde, erlauben keine Auflösung der einzelnen Peaks, ergeben jedoch stattdessen einen durchschnittlichen Massepeak mit einer vollen Breite bei halbem Maximum von etwa 15 Da. Die gezeigten Molekulargewichte umfassen den His-tag, der die Sequenz MRGSHHHHHH GMASMTGGQQM GRDLYDDDDK DPPAEF (SEQ ID NO:5) aufweist. Mutanten von GFP, die die Wirksamkeit der Reifung des Fluorophors erhöhen, könnten etwas strahlendere Zubereitungen ergeben. In einem Modell für das Apoprotein liegt die Thr⁶⁵-Tyr⁶⁶-Peptidbindung in etwa in der α -helikalen Konformation vor, während das Peptid von Tyr⁶⁶-Gly⁶⁷ nahezu senkrecht zu der Helixachse durch seine Wechselwirkung mit Arg⁹⁶ zu stehen scheint. Dies stützt ferner die Spekulation, dass Arg⁹⁶ bei der Bildung der Konformation, die für eine Zyklisierung erforderlich ist, und möglicherweise auch für eine Beschleunigung des Angriffs von Gly⁶⁷ auf das Carbonylkohlenstoffatom von Thr⁶⁵ wichtig ist (A.B. Cubitt et al., *Trends Biochem. Sci.* 20:448-455 (1995)).

[0170] Die Ergebnisse einer früheren zufälligen Mutagenese haben mehrere Aminosäureseitenketten mit wesentlichen Wirkungen auf die Spektren und das Atommodell impliziert. Es wird bestätigt, dass diese Reste nahe zu dem Chromophor liegen. Die Mutationen T203I und E222G haben grundlegende, jedoch gegensätzliche Konsequenzen auf das Absorptionsspektrum (T. Ehrig et al., *FEBS Letters* 367:163-166 (1995)). T203I (mit Wildtyp-Serbs) weist nicht den 475 nm-Absorptionspeak auf, der gewöhnlich dem anionischen Chromophor zugewiesen wird, und zeigt nur den 395 nm-Peak, der vermutlich den neutralen Chromophor wiedergibt (R. Heim et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:12501-12504 (1994), T. Ehrig et al., *FEBS Letters* 367:163-166 (1995)). Tatsächlich ist Thr²⁰³ über Wasserstoffbindungen zu dem phenolischen Sauerstoffatom des Chromophors gebunden, so dass ein Austausch durch Ile eine Ionisierung des phenolischen Sauerstoffatoms behindern sollte. Eine Mutation von Gluaaa zu Gly (T. Ehrig et al., *FEBS Letters* 367:163-166 (1995)) weist stark die gleiche spektroskopische Wirkung auf wie ein Austausch von Ser⁶⁵ durch Gly, Ala, Cys, Val oder Thr, nämlich eine Supprimierung des 395 nm-Peaks zugunsten eines Peaks bei 470-490 nm (R. Heim et al., *Nature* 373:664-665 (1995), S. Delagrave et al., *Bio/Technology* 13:151-154 (1995)). Tatsächlich sind Glu²²² und der Rest von Thr⁶⁵ zueinander über Wasserstoffbindungen in der erfindungsgemäßen Struktur verbunden, wobei möglicherweise die ungeladene Carboxylgruppe von Glu²²² als ein Donor für das Seitenketten-Sauerstoffatom von Thr⁶⁵ fungiert. Die Mutationen E222G, S65G, S65A und S65V würden alle eine solche H-Bindung unterdrücken. Um zu erklären, warum nur Wildtyp-Protein beide Anregungspeaks aufweist: Ser⁶⁵, im Gegensatz zu Thr⁶⁵, könnte eine Konformation einnehmen, in der seine Hydroxylgruppe eine Wasserstoffbindung für Glu²²² bereitstellt und Glu²²² als ein Anion stabilisiert, dessen Ladung sodann eine Ionisierung des Chromophors verhindert. Die Struktur erklärt auch, warum manche Mutationen neutral zu sein scheinen. Beispielsweise ist Gln⁸⁰ ein Oberflächen-Rest, der weit von dem Chromophor entfernt liegt, was erklärt, warum dessen zufällige und häufige Mutation zu Arg keine offensichtliche intramolekulare spektroskopische Wirkung aufzuweisen scheint (M. Chalfie et al., *Science* 263:802-805 (1994)).

[0171] Die Entwicklung von GFP-Mutanten mit rot-verschobenen Exzitations- und Emissionsmaxima ist eine

interessante Herausforderung bei einer Veränderung des Proteins (A.B. Cubitt et al., Trends Biochem. Sci. 20:448-455 (1995), R. Heim et al., Nature 373:664-665 (1995), S. Delagrave et al., Bio/Technology 13:151-154 (1995)). Solche Mutanten wären auch für ein Vermeiden einer zellulären Autofluoreszenz bei kurzen Wellenlängen, für eine gleichzeitige Vielfarben-Beschreibung der Aktivität von zwei oder mehreren zellulären Prozessen und für eine Ausnutzung des Fluoreszenzresonanzenergietransfers als ein Signal einer Protein-Protein-Wechselwirkung wertvoll (R. Heim & R.Y. Tsien, Current Biol. 6:178-182 (1996)).

[0172] Umfangreiche Versuche unter Verwendung von zufälliger Mutagenese haben das Emissionsmaximum um höchstens 6 nm zu längeren Wellenlängen, auf 514 nm verschoben (R. Heim & R.Y. Tsien, Current Biol. 6:178-182 (1996)). Zuvor beschriebene Mutanten mit einer "Rot-Verschiebung" unterdrückten lediglich den Exzitationspeak bei 395 nm zugunsten des Peaks bei 475 nm ohne eine jegliche signifikante Rot-Verschiebung der 505 nm-Emission (S. Delagrave et al., Bio/Technology 13:151-154 (1995)). Da Thr²⁰³ benachbart zu dem phenolischen Ende des Chromophors liegt, mutierten wir es zu polaren aromatischen Resten wie His, Tyr und Trp in der Hoffnung, dass die zusätzliche Polarisierbarkeit ihrer Systeme die Energie des angeregten Zustands des benachbarten Chromophors senken würde. Alle drei Substitutionen verschoben tatsächlich den Emissionspeak auf mehr als 520 nm (Tabelle F). Eine besonders attraktive Mutation war T203Y/S65G/V68L/S72A mit Exzitations- und Emissionspeaks bei 513 bzw. 527 nm. Diese Wellenlängen sind ausreichend unterschiedlich von vorherigen GFP-Mutanten, um einfach durch geeignete Filtersätze auf einem Fluoreszenzmikroskop unterscheidbar zu sein. Der Exzitationskoeffizient, $36\,500\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ und die Quantumausbeute, 0,63, sind nahezu so hoch wie diejenigen von S65T (R. Heim et al., Nature 373:664-665 (1995)).

[0173] Ein Vergleich von Aequorea-GFP mit anderen Proteinpigmenten ist aufschlussreich. Leider wurde sein nächstverwandtes charakterisiertes Homolog, das GFP aus der Seeanemone Renilla reniformis (O. Shimomura und F.H. Johnson, J. Cell. Comp. Physiol. 59:223 (1962), J. G. Morin und J.W. Hastings, J. Cell. Physiol. 77:313 (1971), H. Morise et al., Biochemistry 13:2656 (1974), W.W. Ward, Photochem. Photobiol. Reviews (Smith, K.C., Hrsg.) 4:1 (1979), W.W. Ward, Bioluminescence and Chemiluminescence (M.A. DeLuca und W.D. McElroy, Hrsg.), Academic Press, Seiten 235-242 (1981), W.W. Ward & S.H. Bokman, Biochemistry 21:4535-4540 (1982), W.W. Ward et al., Photochem. Photobiol. 35:803-808 (1982)), nicht sequenziert oder kloniert, obwohl dessen Chromophor wie in Wildtyp-Aequorea-GFP von der gleichen FSYG-Sequenz abgeleitet ist (R.M. San Pietro et al., Photochem. Photobiol. 57:635 (1993)). Das nächste Analogon, für das eine dreidimensionale Struktur verfügbar ist, ist das fotoaktive gelbe Protein (PYP, G. E. O. Borgstahl et al., Biochemistry 34:6278-6287 (1995)), ein 14 kDa-Photorezeptor aus einem halophilen Bakterium. PYP absorbiert in seinem nativen dunklen Zustand maximal bei 446 nm und transduziert Strahlung mit einer Quantumausbeute von 0,64, wobei es dem lange Wellenlänge-Absorptionsmaximum in der Nähe von 475 nm und der Fluoreszenzquantumausbeute von 0,72-0,85 des Wildtyp-GFP ziemlich nahe kommt. Der grundlegende Chromophor in beiden Proteinen ist eine anionische p-Hydroxycinnamylgruppe, die kovalent an das Protein über eine Thioesterbindung in PYP und einen heterocyclischen Iminolactam in GFP gebunden ist. Beide Proteine stabilisieren die negative Ladung an dem Chromophor mit Hilfe von verborgenen kationischen Arginin- und neutralen Glutaminsäuregruppen, Arg⁵² und Glu⁴⁶ in PYP und Arg⁹⁶ und Glu²²² in GFP, obwohl in PYP die Reste nahe zu dem Oxyphenylring liegen, während sie in GFP näher an dem Carbonylende des Chromophors liegen. Jedoch weist PYP eine Gesamt- α/β -Faltung mit geeigneter Flexibilität und Signaltransduktionsdomänen auf, um ihm zu ermöglichen, die zelluläre fototaktische Reaktion zu vermitteln, während GFP ein viel regelmäßigeres und steiferes β -Fass ist, um eine parasitische Verschwendung der Energie des angeregten Zustands als thermische oder konformelle Bewegungen zu minimieren. GFP ist ein elegantes Beispiel dafür, wie eine visuell ansprechende und äußerst hilfreiche Funktion, eine wirksame Fluoreszenz, spontan aus einer geschlossenen und ökonomischen Proteinstruktur erzeugt werden kann.

A. Zusammenfassung der Bestimmung der GFP-Struktur

[0174] Daten wurden bei Raumtemperatur intern unter Verwendung von entweder Molecular Structure Corp. R-axis II- oder San Diego Multiwire Systems (SDMS)-Detektoren (Cu K α) und später bei dem Strahl X4A bei dem Brookhaven National Laboratory bei der Selenabsorptionskante ($\lambda = 0,979\text{ \AA}$) unter Verwendung von Fotoplatten gesammelt. Daten wurden unter Verwendung des HKL-Pakets (Z. Otwinowski, in Proceedings of the CCP4 Study Weekend: Data Collection and Processing, L. Sawyer, N. Isaacs, S. Bailey, Hrsg. (Science and Engineering Research Council (SERC), Daresbury Laboratory, Warrington, UK, (1991)), Seiten 56-62, W. Minor, XDISPLAYF (Purdue University, West Lafayette, IN, 1993)) oder der SDMS-Software (A.J. Howard et al., Meth. Enzymol. 114:452-471 (1985)) ausgewertet. Jeder Datensatz wurde aus einem einzigen Kristall gesammelt. Ein Tränken mit Schweratomen erfolgte bei 2 mM in Mutterlösung für zwei Tage. Anfängliche Elektronendichtekarten basierten auf drei Schweratomderivaten unter Verwendung von In-House-Daten und sie wurden später durch die Synchrotron-Daten ersetzt. Die EMTS-Differenz-Patterson-Karte wurde durch Betrachtung

gelöst und sodann verwendet, um Unterschiede-Fourier-Karten der anderen Derivate zu berechnen. Eine Lack of closure-Verfeinerung der Schweratomparameter erfolgte unter Verwendung des Protein-Pakets (W. Steigemann, in der Doktorarbeit (Technische Universität, München, 1974)). Die MIR-Karten waren viel schwächer als die Gesamt-Leistungszahl nahe legen würde und es war klar, dass die EMTS-isomorphen Unterschiede die Phasenlage dominierten. Die verbesserte anomale Belegung für die Synchrotron-Daten stellte eine teilweise Lösung des Problems bereit. Es wird angemerkt, dass die Phasenleistung für die Synchrotron-Daten verringert war, jedoch war die Leistungszahl unverändert.

[0175] Alle experimentellen Elektronendichtekarten wurden durch Lösungsmittelabflachung unter Verwendung des Programms DM des CCP4-Pakets (CCP4: A Suite of Programs for Protein Crystallography (SERC Daresbury Laboratory, Warrington WA4 4AD, UK, 1979)) unter Annahme eines Lösungsmittelgehalts von 38% verbessert. Eine Phasenkombination erfolgte mit PHASCO2 des Protein-Pakets unter Verwendung eines Gewichts von 1,0 auf dem Atommodell. Schweratomparameter wurden sodann durch Verfeinerung gegen kombinierte Phasen verbessert. Ein Modellaufbau erfolgte mit FRODO und O (T.A. Jones et al., Acta. Crystallogr. Sect. A 47:110 (1991), T.A. Jones, in Computational Crystallography, D. Sayre, Hrsg. (Oxford University Press, Oxford, 1982), Seiten 303-317) und eine kristallographische Verfeinerung erfolgte mit dem TNT-Paket (D.E. Tronrud et al., Acta Cryst. A 43:489-503 (1987)). Bindungslängen und -winkel für den Chromophor wurden unter Verwendung von CHEM3D (Cambridge Scientific Computing) abgeschätzt. Eine endgültige Verfeinerung und ein Modellaufbau erfolgten gegen den X4A Selenomethion-Datensatz unter Verwendung von (2F_o-F_c)-Elektronendichtekarten. Die Daten jenseits von 1,9 Å-Auflösung wurden in diesem Stadium nicht verwendet. Das endgültige Modell enthält die Reste 2-229, da die terminalen Reste in der Elektronendichtekarte nicht sichtbar sind, und die Seitenketten von mehreren ungeordneten Oberflächenresten wurden weggelassen. Die Dichte ist schwach für die Reste 156-158 und die Koordinaten für diese Reste sind unzuverlässig. Diese Unordnung ist mit vorhergehenden Analysen konsistent, die zeigten, dass die Reste 1 und 233-238 verzichtbar sind, jedoch weitere Verkürzungen eine Fluoreszenz verhindern können (J. Dopf & T.M. Horiagon, Gene 173:39-43 (1996)). Das Atommodell wurde in der Protein-Datenbank (Zugangscode 1EMA) hinterlegt.

Tabelle G

Beugungsdatenstatistiken

<u>Kristall</u>	<u>Auflösung</u> (Å)	<u>Gesamt</u> <u>beob.</u>	<u>Einmalig</u> <u>beob.</u>	<u>Vollst.</u> (%) ^a	<u>Vollst.</u> (Schale) ^b	<u>Rmerge</u> (%) ^c	<u>Riso</u> (%) ^d
<u>R-axis II</u>							
Nativ	2,0	51907	13582	80	69	4,1	5,8
EMTS ^e	2,6	17727	6787	87	87	5,7	20,6
SeMet	2,3	44975	10292	92	88	10,2	9,3
<u>Multiwire</u>							
HGI4-Se	3,0	15380	4332	84	79	7,2	28,8
<u>X4a</u>							
SeMet	1,8	12607	19503	80	55	9,3	9,4
		8					
EMTS	2,3	57812	9204	82	66	7,2	26,3

Phasenstatistika

<u>Derivat</u>	<u>Auflösung</u> <u>(Å)</u>	<u>Anzahl an</u> <u>Stellen</u>	<u>Phasen-</u> <u>leistung^f</u>	<u>Phasen-</u> <u>leistung</u> <u>(Schale)</u>	<u>FOM_g</u>	<u>FOM</u> <u>(Schale)</u>
----------------	--------------------------------	------------------------------------	---	--	------------------------	-------------------------------

In House

EMTS	3,0	2	2,08	2,08	0,77	0,072
SeMet	3,0	4	1,66	1,28	-	-
HgI ₄ -Se	3,0	9	1,77	1,90	-	-

X4

EMTS	3,0	2	1,36	1,26	0,77	0,072
SeMet	3,0	4	1,31	1,08	-	-

Atommodell-Statistiken

Proteinatome	1790
Lösungsmittelatome	94
Auflösungsbereich (Å)	20-1,9
Anzahl an Reflexionen (F > 0)	17676
Vollständigkeit	84.
R-Faktor ^(h)	0,175
	65

Mittlerer B-Wert (Å ²)	24,1
------------------------------------	------

Abweichungen von dem Idealzustand

Bindungslängen (Å)	0,014
Bindungswinkel (°)	1,9
Eingeschränkte B-Werte (Å ²)	4,3
Ramachandran-Ausreißer	0

Anmerkungen:

(a) Vollständigkeit ist das Verhältnis von beobachteten Reflexionen zu theoretisch möglichen Reflexionen, ausgedrückt als Prozentwert.

(b) Schale gibt die höchste Auflösungsschale mit typischerweise einer Breite von 0,1 bis 0,4 Å an.

(c) $R_{\text{merge}} = \sum |I| - \langle I \rangle / \sum I$, worin $\langle I \rangle$ der Mittelwert von einzelnen Messungen von Intensitäten I ist.

(d) $R_{\text{iso}} = \sum |I_{\text{DER}} - I_{\text{NAT}}| / \sum I_{\text{NAT}}$

(e) Derivate waren EMTS = Ethylmercurithiosalicylat (modifizierte Reste Cys⁴⁸ und Cys⁷⁰), SeMet = Selenomethionin-substituiertes Protein (Met¹ und Met²³³ konnten nicht lokalisiert werden), HgI₄-SeMet = Doppeldersivat HgI₄ auf SeMet-Hintergrund.

(f) Phasenleistung = $\langle F_H \rangle / \langle E \rangle$, worin $\langle F_H \rangle$ = Effektwert (rms)-Schweratomstreuung und $\langle E \rangle$ = lack of closure.

(g) FOM, mittlere Leistungszahl.

(h) Standard-kristallographischer R-Faktor, $R = \sum ||F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|| / \sum |F_{\text{obs}}|$

B. Spektrale Eigenschaften von Thr²⁰³ ("T203")-Mutanten im Vergleich zu S65T

[0176] Die Mutationen F64L, V68L und S72A verbessern die Faltung von GFP bei 37° (B.P. Cormack et al., Gene 173:33 (1996)), verschieben jedoch nicht signifikant die Emissionsspektren.

TABELLE H

Klon	Mutationen	Anregungs- max. (nm)	Extinktions- koeffizient ($10^3 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	Emissions- max. (nm)
S65T	S65T	489	39.2	511
5B	T203H/S65T	512	19.4	524
6C	T203Y/S65T	513	14.5	525
10B	T203Y/F64L/S65G/S72A	513	30.8	525
10C	T203Y/F65G/V68L/S72A	513	36.5	527
11	T203W/S65G/S72A	502	33.0	512
12H	T203Y/S65G/S72A	513	36.5	527
20A	T203Y/S65G/V68L/Q69K/S72A	515	46.0	527

C. YFP und YFP-H148Q als Halogenidsensoren bei saurem und neutralem pH-Wert

[0177] Das Absorptionsspektrum für YFP ist eine Funktion der NaCl-Konzentration ([Fig. 7](#)) mit einer Konversion von Bande B, dem Chromophor-Anion (λ_{max} 514 nm), zu Bande A, der neutralen Form (λ_{max} 392 nm), bei Zugabe von Chlorid. Da nur das Anion in den YFPs fluoresziert, tritt gleichzeitig mit einer Erhöhung von [NaCl] eine Suppression der Fluoreszenz auf. Für YFP wird ein sauberer isosbestischer Punkt beobachtet ([Fig. 7](#)), während für YFP-H148Q der isosbestische Punkt weniger gut definiert ist (Jayaraman et al., 2000). Der Effekt ist vollständig reversibel. In YFP-H148Q und YFP-H148G erfährt das Absorptionsmaximum der Bande A eine Blau-Verschiebung um 20 nm (von 415 nm auf 395 nm) bei Zugabe von Salz, obwohl das Absorptionsmaximum der Bande B unberührt bleibt. Die detaillierten Bindegleichgewichte und Anionen-Spezifitäten werden nachstehend erörtert.

[0178] Um weiter die Verwendbarkeit der YFPs als Halogenidsensoren zu etablieren, insbesondere für Organellen, die saurer sind als das Cytosol (pH 7,4), wo ein CFTR-Pumpen getestet wurde (Jayaraman et al., 2000), wurde die Emissionsintensität von YFP und YFP-H148Q zwischen 0 und 150 mM NaCl bei einem pH-Wert von 6,0 bis 8,0 ([Fig. 8A, B](#)) unter Bedingungen einer konstanten Ionenstärke gemessen. Es wurde festgestellt, dass YFP eine ausgezeichnete Sonde unter sauren Bedingungen darstellt. Bei einem pH-Wert von 6,0 nimmt die Fluoreszenz um 39% von 0 bis 20 mM NaCl ab, während bei dem cytosolischen pH-Wert von 7,5 die Abnahme nur 3,2% unter identischen Bedingungen beträgt. Im Fall von mit NaCl titriertem YFP-H148Q ist der Fluoreszenzverlust auch groß bei einem pH-Wert von 6,0 (48%) und bleibt ziemlich signifikant (11%) bei einem pH-Wert von 7,5. Für Messungen der Chloridkonzentrationen in dem niedrigen millimolaren Bereich in der Nähe eines neutralen pH-Werts scheint YFP-H148Q die bevorzugte Sonde zu sein. Falls Chlorid gegen Iodid ausgetauscht wird, ist der Fluoreszenzverlust von YFP-H148Q sehr viel größer, sogar bei einem pH-Wert von 7,5, wo ein Verlust von 50% festgestellt wird (0 bis 20 mM NaI) ([Fig. 8B](#)). Diese Beobachtung wurde kürzlich in vivo in Studien eines Cl⁻/I⁻-Austausches durch den CFTR-Kanal in Plasmamembranen ausgenutzt (Jayaraman et al., 2000). Im Gegensatz zu der vorstehend beschriebenen Variante ist in dem ursprünglichen YFP die Größe des Iodideffekts mehr vergleichbar zu dem Chlorideffekt (vergleiche nachstehend beschriebene Bindedaten).

D. Kristallographische Identifizierung und Beschreibung von Halogenid-Bindestellen

[0179] Es wurden zwei Kristallstrukturen von YFP-H148Q bestimmt, wobei eine zwei gebundene Iodide enthält (Tränken mit 100 mM Iodid) und die andere keine gebundenen Halogenide enthält (Tränken mit 200 mM Chlorid). Die jeweiligen R-Faktoren sind 18,8% und 20,4% bei einer Auflösung von 2,1 Å und die Geometrie ist verhältnismäßig gut. Eine Zusammenfassung der relevanten kristallographischen Statistiken ist in Tabelle I

wiedergegeben. Da Iod ein anomales Signal bei der In-House-CuKa-Wellenlänge aufweist, wurde eine anomale Differenzkarte für das Tränken mit Iodid berechnet, um Schweratompositionen zu identifizieren. Es wurden zwei verschiedene Elektronendichtepeaks bei Effektivwerten von 7,7 bzw. 5,5 festgestellt, wobei einer in der Nähe des Chromophors und im Proteininneren verborgen lag und der andere in einer kleinen Einbuchtung auf der Proteinoberfläche in der Nähe von Trp57 bei der Kappe des Fasses lag (Daten nicht gezeigt).

[0180] Das verborgene Iodid verfeinerte bis zu einer Belegung von 0,60, wobei der thermische Faktor bei 30 Å² fixiert wurde, was zeigt, dass eine Bindung in dem Kristall bei 100 mM Iodid nicht nahezu so fest wie in Lösung ist, wo die Bindungskonstante 2,7 mM beträgt (vergleiche nachstehend). Dieses Iodid liegt 4,3 Å entfernt von dem heterocyclischen Carbonylsauerstoffatom des Chromophors und ist an einer Ladungswechselwirkung mit Arg96 bei einer Entfernung von 4,1 Å zu NE2 der Guanidiniumgruppe beteiligt ([Fig. 9](#) und [Fig. 10](#)), eine verborgene positive Ladung, die möglicherweise eine große Fraktion der Anionen-Bindeenergie bereitstellt. Ferner ist das Iodid über Wasserstoffbindungen sowohl an die phenolische Hydroxylgruppe von Tyr203, als auch das Seitenkettenamidstickstoffatom von Gln69 gebunden, wobei die Wasserstoffbindungsentfernungen 3,3 bzw. 3,2 Å betragen ([Fig. 9](#) und [Fig. 10](#)). Diese Entfernungen liegen im Bereich von Wasserstoffbindungsentfernungen, die für ein mit einem Sauerstoffatom oder einem Stickstoffatom wechselwirkendem Iodid erwartet werden. Eine statistische Datenbankanalyse der Kristallstrukturen von kleinen Molekülen zeigte, dass der mittlere Abstand zwischen einem Iodid und einer phenolischen Hydroxylgruppe 3,47 Å und zwischen einem Iodid und einem sp²-hybridisierten Stickstoffatom 3,66 Å beträgt (Steiner, 1998). Es stellte sich heraus, dass in einer Kristallstruktur von Haloalkan-Dehalogenase mit gebundenem Iodid das Iodid 3,4 und 3,6 Å von den Indol-Stickstoffatomen der zwei Tryptophangruppen, 3,3 Å von einem Lösungsmittelmolekül und 4,2 Å von dem phenolischen Sauerstoffatom eines Tyrosins entfernt liegt (Verschuere et al., 1993).

[0181] Das verborgene Halogenid weist auch Wechselwirkungen mit den aromatischen Ringen des Chromophors und von Tyr203 auf ([Fig. 9](#)). Anionen liegen häufig vorzugsweise in oder in der Nähe der Ebene von aromatischen Ringen, da die Wasserstoffatome von aromatischen Ringen eine teilweise positive Ladung tragen (Burley & Petsko, 1988). In YFP-H148Q liegt das Iodid nicht ganz in der Ebene eines der beiden π-Systeme, liegt jedoch nahezu in gleicher Entfernung von den zwei Ebenen, versetzt zu dem Zentrum der Stapel-Wechselwirkung, 4,1 Å entfernt von dem aromatischen CE1 von Tyr203 und 4,5 Å entfernt von dem aromatischen CD2 des Chromophors ([Fig. 9](#)). Auf der gegenüberliegenden Seite der Bindestelle kleidet eine Reihe von hydrophoben Resten die Halogenid-Bindestelle aus, bestehend aus Ile 152, Leu201, Val163, Val150 und Phe165, die alle in der Nähe eines van der Waals-Kontakts mit dem Iodid stehen. Sowohl aromatische Kante-Wechselwirkungen mit Tyrosinen und Tryptophanen, als auch apolare Wechselwirkungen mit hydrophoben Seitenketten finden sich herkömmlicherweise in anderen Halogenid-Bindestellen in Proteinen wie in Haloalkan-Dehalogenasen (Pikkemaat et al., 1999).

[0182] Das zweite, Oberflächen-gebundene Iodid ist über Wasserstoffbindungen mit dem Amid-Stickstoffatom von Trp 57 und mehreren geordneten Lösungsmittelmolekülen verbunden. Dieses exponierte Anion liegt 16 Å von dem phenolischen Sauerstoffatom des Chromophors entfernt, was zeigt, dass sein Einfluss auf den Ladungszustand des Chromophors vernachlässigbar ist. Die Belegung dieses Halogenids verfeinert auf 0,41 mit einer Fixierung des B-Faktors auf 39 Å², was mit einer schwachen Bindung im Vergleich zu dem zu dem Chromophor benachbarten primären Iodid konsistent ist.

E. Konformationsänderungen in der Nähe des verborgenen Iodids

[0183] Die Anionen-Bindetasche in der Nähe des Chromophors scheint in der Apo-Struktur von YFP-H 148Q leer zu sein trotz der Tatsache, dass die Kristalle in Gegenwart von 180 mM Chlorid gezüchtet wurden, gefolgt von einem Tränken in 200 mM Chlorid. Die Lösungs-Bindungskonstante von 28 mM für Chlorid zeigt, dass die Tasche bei dem pH-Wert der Kristall-Mutterlösung, 4,6, größtenteils durch Chlorid belegt ist (vergleiche nachstehend). Wie es bei dem Tränken mit Iodid festgestellt wurde, scheinen die Moleküle in den Kristallen keine Anionen so fest wie in Lösung zu binden, was möglicherweise an Kristall-Packungskräften liegt. Das Volumen der inneren Höhle in YFP-H148Q beträgt 55 Å³, wie berechnet unter Verwendung einer Sonde mit einem Radius von 1,2 Å (Connolly, 1985).

[0184] Die Iodid-enthaltende Höhle in der gebundenen Struktur von YFP-H148Q ist größer, 91 Å³, um das eher große Iodid, das ein van der Waals-Volumen von 42 Å³ aufweist, zu beherbergen. Eine Reihe von konformellen Änderungen von verschiedenen Seitenketten, die die Tasche auskleiden, wird beobachtet ([Fig. 11](#)). Die größte Bewegung wird von Gln69 beobachtet, wo die Seitenketten-Amidgruppe aus dem Zentrum der Höhle herausschwang, was zu einer Bewegung von 2,6 Å des NE2, das über Wasserstoffbindungen mit dem Halogenid verbunden ist, führt ([Fig. 11](#) und [Fig. 12](#)). Das NE2 von Gln183 bewegte sich um 1,0 Å heraus, obwohl

unklar ist, ob es ein Wasserstoffbindungsdonor für das Iodid oder Gln94 ist (NE2 und OE können gegenüberliegend zugewiesen werden). Die apolaren Seitenketten von Leu201, Ile 152, Val150 und Val163 ([Fig. 11](#)) durchlaufen alle Bewegungen, um die Höhlengröße in Gegenwart von Iodid zu erhöhen, wobei sich ihre terminalen Kohlenstoffatome (CD 1 im Fall von Leucin und Isoleucin, CG1 im Fall der Valine) um 2,4 Å, 1,9 Å, 1,6 Å bzw. 1,2 Å bewegen. Die aromatische Ringebeine von Phe165 hat um etwa 25° rotiert.

[0185] Die phenolische Hydroxylgruppe von Tyr203 hat sich in Richtung der Iodid-enthaltenden Höhle um 0,6 Å bewegt, was wahrscheinlich die Wasserstoffbindungswechselwirkung mit dem Halogenid verbessert ([Fig. 12](#)). Es scheint etwas Flexibilität bei der Positionierung der Seitenkette von Tyr203 in der Nähe des Chromophors aufzutreten, vermutlich da sie in eine große mit Wasser gefüllte Höhle herausragt, die ursprünglich in der Struktur von GFP S65T identifiziert wurde (Ormo et al., 1996). Eine C_α-Kohlenstoff-Überlagerung von 5 Strukturen von YFP und seinen Varianten (Wachter et al., 1998) zeigt, dass die C_β-Atome von Tyr203 sich ziemlich gut überlagern, während das phenolische Sauerstoffatom um bis zu 1,4 Å variiert. Die Wasserstoffbindung zwischen Tyr203 und dem Halogenid scheint von großer Wichtigkeit für die Bildung einer Halogenid-Bindestelle mit halbwegs fester Affinität zu sein (vergleiche nachstehende Mutationsanalyse). Die Verschiebung des Chromophors in Richtung des Halogenids kann auch dazu dienen, um aromatische Kante-Wechselwirkungen mit dem Anion zu verbessern. Als eine Konsequenz hat sich die Carboxylatgruppe von Glu222 von dem Ring-Stickstoffatom des Chromophors weggedreht (Entfernung erhöht sich von 3,3 auf 3,6 Å) und ist nun an einer festen Wasserstoffbindung zu Ser205 beteiligt ([Fig. 12](#)).

F. Beziehung zwischen einer Anionenbindung und der Höhlengröße

[0186] Die verborgene Iodid-Stelle in YFP-H148Q identifiziert eine kleine Höhle, die in einer Reihe von untersuchten Strukturen vorliegt und dessen Größe nicht stark variiert ([Fig. 13](#)). Bei einer Berechnung der van der Waals-Volumina unter Verwendung einer Kugel mit einem Sondenradius von 1,2 Å (Connolly, 1985) beträgt das Volumen dieser Höhle 21 Å³ in WT-GFP (Brejc et al., 1997), 19 Å³ in GFP-S65T (Ormo et al., 1996), 16 Å³ in YFP und YFP-H148G (Wachter et al., 1998) und 21 Å³ in YFP-H148G, getränkt in 500 mM KBr, wo die kristallographische Analyse zeigt, dass die Bindestelle auch leer ist (unveröffentlichte Daten). Die Position dieser Höhlen ist im Wesentlichen in den vorstehend aufgeführten GFPs gleich, wobei ihr Zentrum in der Nähe zu Val150, Val163, Leu201, Ile152, Gln183 und Gln69 liegt, jedoch etwa 6,6 Å von der Methylenbrücke des Chromophors und 6,1 Å von Arg96 entfernt liegt. WT (vergleiche nachstehend) und S65T-GFP (Wachter & Remington, 1999) scheinen nicht mit NaCl wechselzuwirken. Auf der anderen Seite weisen alle untersuchten YFPs Anionen-Wechselwirkungen auf, wobei die festeste Cl⁻-Bindung für YFP festgestellt wurde (vergleiche nachstehend). Deutlich stehen die Höhlengröße und -position nicht direkt mit einer Cl⁻-Bindung in Beziehung.

[0187] Die vorstehend beschriebenen Höhlen sind zu klein, um Chlorid, Bromid oder Iodid zu binden, deren van der Waals-Volumina 24,8 bis 54 Å³ betragen. Konformelle Veränderungen sind deutlich notwendig, um die Wechselwirkung mit jeglichen Anionen zu ermöglichen. In der Apo-Struktur von YFP-H148Q ist die Höhle etwas größer, sogar bei Fehlen von gebundenen Anionen, wobei das Volumen 55 Å³ beträgt. Bei dieser Variante ist die Höhle in Richtung des Chromophors verlängert und das Volumen ist durch kleine Bewegungen der Seitenkettenatome (0,4 Å und 1,2 Å), die die Bindungsstelle auskleiden (Gln69, Tyr203, Val150, Val163, Phe165, Arg96, His181), und des Chromophors selbst erhöht. Viele dieser Reste durchlaufen weitere Verschiebungen bei einer Iodidbindung wie vorstehend und in [Fig. 6](#) beschrieben. Kompensationsbewegungen der terminalen Seitenketten-Kohlenstoffatome von Ile152 (2,1 Å) und Leu201 (2,3 Å) führen zu einem gewissen Grad an Umpackung des hydrophoben Kerns ohne dass die benachbarte Höhlen-Oberfläche stark verändert wird. Die größere Höhlengröße von YFP-H148Q kann teilweise für die unerwartet starke Bindung von Iodid im Vergleich zu Chlorid verantwortlich sein.

G. Relaxierung des β-Fasses in Reaktion auf die H148Q-Substitution und eine Iodidbindung

[0188] Sowohl das Einbringen von H148Q in einen YFP-Hintergrund bei Fehlen von Halogeniden, als auch die Bindung von Iodid an YFP-H148Q führen zu strukturellen Anpassungen der β-Stränge 7 (Reste 143 bis 154) und 8 (Reste 160 bis 171). Diese Anpassungen sind in C_α-Überlagerungen von YFP und YFP-H148Q mit einer Abweichung des Effektivwerts von 0,42 Å und von YFP-H148Q mit und ohne I⁻ mit einer Abweichung des Effektivwerts von 0,47 Å zu erkennen ([Fig. 14](#)). An einer Kappe des Fasses sind die Stränge 7 und 8 über eine Schleife verbunden, die auf Rest 158 konzentriert ist, während in der Nähe der anderen Kappe des Fasses Strang 7 eine β-Ausbauchung um den Rest 148 ausbildet und Hauptketten-β-Faltblattwechselwirkungen zerstört sind (Ormo et al., 1996, Wachter et al., 1998). Anstelle dessen bilden mehrere geordnete Lösungsmittelmoleküle und Seitenketten-Kontakte (His 148 in YFP, Gln 148 in YFP-H148Q) ein Wasserstoffbindungsnetzwerk zwischen den Strängen ([Fig. 14](#)). Bei einer Substitution von His 148 durch Gln wird das α-Kohlenstoffat-

tom von Rest 166 in Richtung des Zentrums des Fasses um 0,94 Å gezogen und das α -Kohlenstoffatom des Rests 148 wird um 0,94 Å hinausgedrängt. Diese Bewegungen werden durch strukturelle Anpassungen innerhalb der Regionen der benachbarten Schleife kompensiert (1,4 Å-Verschiebung durch das α -Kohlenstoffatom von Rest 172 und 0,94 Å durch das α -Kohlenstoffatom von Rest 157). Keiner dieser Reste ist in Kristallkontakten in einer der beiden Strukturen beteiligt.

[0189] Bei einer Bindung von Iodid an YFP-H148Q wird Lys166 aus dem Zentrum des Fasses um 1,0 Å zurückgedrückt und liegt in der Nähe seiner ursprünglichen Position in YFP ([Fig. 14](#)). Diese Verschiebung in der Position tritt möglicherweise in Reaktion auf die Erweiterung der verborgenen Höhle auf. Lys166 ist nicht an einen Kristallkontakt in einer der zwei Strukturen beteiligt, während in der Nähe Arg168 eine intermolekulare Salzbrücke mit Asp149 bei einer Iodidbindung, jedoch nicht ohne diese ausbildet. Die Wasserstoffbindung des Sauerstoffatoms des Lys166-Rückgrats zu der Seitenkette von Gln148 wird durch diese Bewegung nicht zerstört. Kompensationsverschiebungen werden erneut an dem Ende dieses Strangs beobachtet, wo die Rückgratschleifenreste 172 und 173 um bis zu 1,7 Å hineingezogen werden, obwohl die Dichte in diesem Bereich weniger gut definiert ist. Ob eine Halogenid-Bindung an YFP eine ähnliche Wirkung auf die β -Ausbauchungsregion wie in YFP-H148Q aufweist, ist unbekannt. Rückgratbewegungen in Position 148 wurden zuvor in YFP-H148G beobachtet (Wachter et al., 1998), was mit einer erhöhten Flexibilität in diesem Teil des Fasses konsistent ist.

H. Lösungsmittel-Zugänglichkeit des Chromophors in YFP-H148Q

[0190] Die Struktur von YFP-H148Q zeigt, dass die Gln 148-Seitenkette im Gegensatz zu dem ursprünglichen Histidinimidazol, das zu der Hydroxylgruppe des Chromophors eine Wasserstoffbindung ausbildet (Wachter et al., 1998), in Richtung des Proteinäußeren herausgeschwungen wird ([Fig. 9](#)) und eine Barriere gegenüber dem Hauptlösungsmittel darstellt. Sogar bevor eine Struktur verfügbar war, wurde von uns vorhergesagt, dass Gln148 in das Lösungsmittel herausklappen könnte (Ekliger et al., 1999), da eine teilweise Exposition des Chromophors gegenüber äußerem Lösungsmittel den höheren pKa-Wert von YFP-H148Q im Vergleich zu YFP erklären kann (vergleiche Tabelle K). Sowohl in der Apo-, als auch in der Iodid-gebundenen Struktur von YFP-H148Q ist das Amidstickstoffatom NE2 der Gln148-Seitenkette über Wasserstoffbindungen mit dem Rückgrat-Carbonylsauerstoffatom von Lys166 verbunden und das Amid-Sauerstoffatom OE1 ist über Wasserstoffbindungen mit dem Rückgrat-Stickstoffatom von Asn149 verbunden ([Fig. 12](#) und [Fig. 14](#)), weit entfernt von dem Chromophor. Berechnungen einer Lösungsmittel-zugänglichen Oberfläche (Connolly, 1983) unter Verwendung eines Sonden-Kugelradius von 1,4 Å wie implementiert von MidasPlusTM zeigen, dass eine oberflächliche Einstülpung auf der Proteinoberfläche dort ausgebildet wird, wo die Wildtyp-Imidazolgruppe von His148 lag ([Fig. 13](#)). Diese Lösungsmitteltasche steht nahezu in Kontakt mit der van der Waals-Oberfläche des Chromophors. Unter Berücksichtigung von Protein-Atmungsbewegungen ist es wahrscheinlich, dass ein gewisser Grad an Lösungsmittelzugänglichkeit, der in der Kristallstruktur nicht feststellbar ist, auftritt. Im Vergleich zu YFP-H148G (Wachter et al., 1998), wo der Lösungsmittelkanal direkt in Kontakt mit der Chromophorenhülle steht, ist der Kanal von YFP-H148Q verkürzt, was mit Tripletzustand-Fotobleichexperimenten konsistent ist, die nahe legen, dass der Chromophor nicht gegenüber Wasserphase-Löschern exponiert ist (Jayaraman et al., 2000).

I. Energetische Analyse einer Bindung zwischen einer Anionen- und Protonenbindung

[0191] Die starke Abhängigkeit des pKa-Werts des Chromophors von einer spezifischen Anionenbindung kann durch ein gekoppeltes Bindegleichgewicht beschrieben werden, das die Wechselwirkung zwischen zwei unterschiedlichen Liganden berücksichtigt, dem Anion, das in der Nähe von Arg96 bindet, und dem Proton, das an das phenolische Ende des Chromophors bindet. Eine positive Kooperativität wird durch die Tatsache angezeigt, dass eine Bindung des Anions eine Bindung des Protons erleichtert, was den pKa-Wert des Chromophors erhöht. Die Bindungskonstante für eine Anionenbindung wird daher durch die Menge einer Protonenbindung beeinflusst und umgekehrt. Somit kann man in einem einfachen System mit jeweils einer Bindungsstelle für zwei unterschiedliche Liganden zwei mikroskopische Bindungskonstanten definieren, k_1 für eine Anionenbindung, falls das Proton vorliegt und k_2 für eine Anionenbindung, wenn das Proton fehlt. Unsere kristallographische Analyse für YFP-H148Q ist mit einer relevanten Bindungsstelle für das Anion konsistent und eine zuverläßige kristallographische Analyse von S65T ist mit einer Protonenbindungsstelle auf dem Chromophor konsistent (Elsiger et al., 1999). Das beobachtete Ausmaß einer Anionenbindung ist eine Funktion des pH-Werts und somit liegen die makroskopischen Bindungskonstanten irgendwo zwischen den begrenzenden Werten von k_1 und k_2 .

[0192] Eine mathematische Beschreibung wurde durch J. Wyman (1964) entwickelt und wird von Cantor und

Schimmel in Biophysical Chemistry, Teil III (Cantor & Schimmel, 1980) wiedergegeben. Hier wenden wir die allgemeine Gleichung 15-79 auf den speziellen Fall an, dass eine Bindungsstelle für jeden Liganden vorliegt, wobei pK_a den pK_a -Wert des Chromophors bei Fehlen jeglicher gebundener Anionen wiedergibt:

$$pK_a = \log \{(k_1 + [\text{Chlorid}])/k_1\} - \log \{(k_2 + [\text{Chlorid}])/k_2\} + pK_a. \quad \text{Gleichung (1)}$$

[0193] Unter Verwendung von Absorptionsmessungen bei sowohl pH 6,5 als auch pH 7,0 wurde der pK_a -Wert von YFP als eine Funktion der Anionenkonzentration für eine große Zahl verschiedener Ionen bestimmt. Die Konzentration des spezifischen interessierenden Anions variierte zwischen 0 und mindestens 150 mM (für die Halogenide so hoch wie 400 mM, [Fig. 15](#)) und die Ionenstärke wurde durch die Zugabe von Kaliumgluconat gesteuert, das nicht mit den YFPs wechselwirkt (Wachter & Remington, 1999). Ergebnisse für wechselwirkende Anionen wurden an die Gleichung (1) angepasst und die mikroskopischen Bindekonstanten k_1 und k_2 , wo möglich, aus der Kurvenanpassung extrahiert ([Fig. 15](#) und Tabelle J). Im Allgemeinen scheinen kleine monovalente Anionen etwas Wechselwirkung mit YFP aufzuweisen. Die Bindung ist am stärksten für Fluorid, wobei der k_1 -Wert 0,214 mM beträgt. Andere Anionen, von denen festgestellt wurde, dass sie Wechselwirken, einschließlich der anderen Halogenide, weisen mikroskopische Bindungskonstanten in dem unteren millimolaren Bereich auf, wobei bei Trifluoressigsäure (TFA) die schwächste Wechselwirkung in diesen Reihen auftritt ($k_1 = 21,2$ mM).

[0194] Es scheint keine jegliche spezifische Abhängigkeit von der molekularen Form für diese Wechselwirkung zu geben, da triatomare lineare (wie Thiocyanat), quadratische planare (wie Perchlorat), trigonale (wie Nitrit) und sphärische (wie Halogenid) Moleküle auch binden. Formiat modulierte den pK_a -Wert des Chromophors genauso ($k_1 = 7,47$ mM), obwohl ein vorhergehendes etwas vorläufiges Experiment mit Fluoreszenz keine Wechselwirkung anzeigte (Wachter & Remington, 1999). Wie erwartet, ist eine Anionenbindung an den anionischen Chromophor ungünstig, wobei der k_2 -Wert in dem höheren millimolaren oder in dem molaren Bereich, häufig außerhalb des Messbereichs liegt (Tabelle J).

Tabelle J. Anionenbindung an den YFP-Chromophor in Reihenfolge einer abnehmenden Wechselwirkungsstärke.

Wechselwirkende Anionen	k_1 (mM) ^b	k_2 (mM) ^b
Fluorid F ⁻	0.214 (0.009)	301 (64)
Thiocyanat SCN ⁻	1.37 (0.02)	groß ^c
Perchlorat ClO ₄ ⁻	1.46 (0.36)	175 (11)
Nitrit NO ₂ ⁻	2.12 (0.40)	273 (200)
Iodid I ⁻	2.46 (0.11)	325 (64)
Nitrat NO ₃ ⁻	4.44 (0.25)	groß ^c
Chlorid Cl ⁻	4.69 (0.17)	288 (40)
Formiat HCOO ⁻	7.47 (0.004)	groß ^c
Bromid Br ⁻	7.76 (1.00)	280 (126)
TFA CF ₃ COO ⁻	21.2 (3.7)	groß ^c

^a Konjugierte Basen (vorherrschendes Ion bei einem pH-Wert von 6 bis 7) sind in der Reihenfolge einer abnehmenden Wechselwirkungsstärke aufgeführt.

^b Die Zahlen in Klammern sind eine untere Abschätzung der Standardabweichung wie bestimmt durch Kaleidagraph™.

^c Diese Bindungskonstanten konnten nicht bestimmt werden, da sie außerhalb des Messbereich liegen und möglicherweise in dem molaren Bereich liegen.

[0195] Bivalente Anionen wie Phosphat und Sulfat und größere monovalente Anionen wie Gluconat, gute Puffer (wie HEPES, PIPES), Isethionat (2-Hydroxyethansulfonsäure) und TCA (Trichloressigsäure) weisen keine Wechselwirkung auf (Tabelle J) wie durch einen konstanten pK_a -Wert von etwa 5,4 für YFP angezeigt wird, der im Wesentlichen dem entspricht, der gemessen wird, falls die Messungen in Puffern mit niedriger Ionenstärke und ohne Salze durchgeführt werden (Wachter & Remington, 1999). Etwas kleinere monovalente Anionen, die keine Wechselwirkungen aufweisen, umfassen Phosphorsäure, Bicarbonat und Acetat. Die Hydratisierungsenergie kann für eine Unterscheidung von Anionen wichtig sein, da Acetat stark solvatisiert ist, während TCA nur leicht in wässrigen Lösungsmitteln hydratisiert ist (March, 1992). Die für YFP in Tabelle J dargestellte Reihe ist zu der sehr ähnlich, die für YFP-H148Q durch Fluoreszenz bei einem pH-Wert von 7,5 bestimmt wurde (Jayaraman et al., 2000), wobei nur geringe Unterschiede in der Reihenfolge auftreten. Zum Beispiel bindet YFP-H148Q Br⁻ stärker als Cl⁻, während im Fall von YFP die Reihenfolge umgekehrt ist, möglicherweise aufgrund der größeren Bindungsstelle in YFP-H148Q.

J. Identifizierung von Schlüsselresten für eine Anionenbindung durch Mutationsanalyse

[0196] Um zu identifizieren, welche Substituenten in YFP (S65G/V68L/S72A/T203Y) einen Anteil an der spezifischen Anionenbindung in der Nähe des Chromophors haben, wurde eine Mutationsanalyse durchgeführt, worin die vier Substitutionen einzeln zu dem Wildtyp zurückgeführt wurden. Sodann wurde der pK_a -Wert dieser Revertanten bei Fehlen von wechselwirkenden Anionen bestimmt und ihre Affinität für Chlorid und Iodid durch eine Bestimmung des pK_a -Werts als eine Funktion der Halogenidkonzentration gemessen, gefolgt von einem Anpassen der Kurve an die Gleichung (1). Revertante 1 (S65G/S72A/T203Y) und Revertante 2 (S65G/V68L/S72A) wiesen ein exaktes pH- und Halogenid-Titrationsverhalten, wie es für die YFPs beobachtet wird, auf und ihre pK_a - und k_1 -Werte für eine Chlorid- und Iodidbindung sind in Tabelle K mit denjenigen verglichen, die für die YFPs erhalten wurden. Eine Reversion des Rests 68 oder des Rests 203 steigert den pK_a -Wert des Chromophors auf 5,8 bzw. 6,4. Eine Reversion des Rests 68 führt zu einem leichten Verlust der Chlorid-Affinität ($k_1 = 13,2$ mM im Vergleich zu 4,69 mM in YFP), während eine Reversion des Rests 203 dramatisch die Wechselwirkung schwächt ($k_1 = 153$ mM). Wie aus Tabelle K ersichtlich, ist die Chlorid-Affinität stark mit dem pK_a -Wert des Chromophors gekoppelt, wobei eine Schwächung der Anionenwechselwirkung bei steigendem pK_a -Wert auftritt.

Tabelle K. Mikroskopische Dissoziationskonstanten für Chlorid- und Iodidbindung an die YFPs und seine Revertanten.

Variante	Substitutionen	k_1 (mM) ^a for Cl ⁻	k_1 (mM) ^a for I ⁻	pK_a ^b
YFP	S65G/V68L/S72A/T203Y	4.69 (0.17)	2.46 (0.11)	5.4
Revertante 1	S65G/S72A/T203Y	13.2 (0.34)	3.04 (0.11)	5.8
YFP-H148Q	S65G/V68L/S72A/H148Q/T203Y	28.4 (5.1)	2.68 (0.11)	6.7
YFP-H148G	S65G/V68L/S72A/H148G/T203Y	82.8 (18.3)	15.73 (2.6)	7.5
Revertante 2	S65G/V68L/S72A	153 (26)	117 (16)	6.4

^a Eine untere Abschätzung der Standardabweichung (wie von Kaleidagraph™ wiedergegeben) ist in Klammern angegeben.

^b Der pK_a -Wert des Chromophors bestimmt durch Absorption ohne jegliche wechselwirkende Anionen wie Chlorid (gepuffert mit HEPES oder PIPES, 150 mM Gluconat).

[0197] Da die einzige Ausnahme für diese Regel Revertante 2 darstellt, scheint die Korrelation nur in Gegenwart von T203Y intakt zu sein. Diese Substitution scheint für starke Anionenwechselwirkungen unverzichtbar zu sein.

[0198] Eine Iodidbindung scheint beträchtlich fester zu sein als eine Chloridbindung für alle getesteten Varianten (Tabelle K). Eine jegliche Korrelation mit dem pK_a -Wert des Chromophors ist bestenfalls schwach. Die relative Selektivität von Iodid gegenüber Chlorid ist für YFP-H148Q am stärksten, gefolgt von YFP-H148G. Dies kann die Tatsache widerspiegeln, dass Iodid ein zu Chlorid größeres weiches Ion ist und schwieriger in eine kleine Höhle einzupassen ist, wenn nicht die spezielle Variante eine strukturelle Entspannung des β -Fasses erlaubt (vergleiche vorstehend).

[0199] Revertanten 3 (S72A/T203Y) und 4 (T203Y) waren schwieriger zu analysieren, da deren Titrationsverhalten ähnlich zu WT GFP ist. Ihre Absorptionsspektren zeigen einen gemischten Grundzustand der Banden A und B und sind bei einem pH-Wert von über 6,5 nahezu pH-unabhängig. Eine Anregung von entweder Bande A oder B führt zu einer grünen Fluoreszenz bei diesen Revertanten, was an eine Deprotonierung des angeregten Zustands erinnert, die für WT GFP beschrieben wurde (Chattoraj et al., 1996). Eine Zugabe von NaCl auf 250 mM zu den Revertanten 3 und 4 bei einem pH-Wert von 6,5 verändert das Verhältnis der zwei Adsorptionsbanden nur in einem geringen Ausmaß, was zu etwa einer 20%igen Abnahme der Bande B zugunsten der Bande A führt. Bei WT GFP wird bei einem pH-Wert von 6,5 keine spektrale Änderung bei Zugabe von 250 mM NaCl unter Bedingungen einer konstanten Ionenstärke beobachtet, was mit einer Sensitivität gegenüber der Ionenstärke (Ward et al., 1982), jedoch nicht einer spezifischen Anionenbindung konsistent ist.

Veröffentlichungen

- Baird, G.S., Zacharias, D.A. & Tsien, R.Y. (1999). Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 11241-11246.
- Bell, A.F., He, X., Wachter, R.M. & Tonge, P.J. (2000). Probing the ground state structure of the green fluorescent protein chromophore using Raman spectroscopy. *Biochemistry* (in press).
- Bokman, S.H. & Ward, W.W. (1981). Renaturation of *Aequorea* green fluorescent protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101, 1372-1380.
- Born, M (1920). Volumen und Hydratationswärme der Ionen. *Z. Physik* 1, 45-48.
- Brejč, K., Sixma, T.K., Kitts, P.A., Kain, S.R., Tsien, R.Y., Ormö, M. & Remington, S.J. (1997). Structural basis for dual excitation and photoisomerization of the *Aequorea victoria* Green Fluorescent Protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 2306-2311.
- Burley, S.K. & Petsko, G.A. (1988). Weakly polar interactions in proteins. *Adv. Protein Chem.* 39, 125-189.
- Cantor, C.R. & Schimmel, P.R. (1980). *Biophysical Chemistry Part III: The behavior of biological macromolecules*, W.H. Freeman and Company, New York, Seiten 866-878.
- Chattoraj, M., King, B.A., Bubltz, G.U. & Boxer, S.G. (1996). Ultra-fast excited state dynamics in Green Fluorescent Protein: Multiple states and proton transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 8362-8367.
- Collaborative Computational Project N. 4 (1994). The CCP4 Suite: Programs for protein crystallography. *Acta Cryst. D50*, 760-763.
- Connolly, M.L. (1983). Solvent-accessible surfaces of proteins and nucleic acids. *Science* 221(4612), 709-713.
- Connolly, M.L. (1985). Computation of molecular volume. *J. Am. Chem. Soc.* 107, 1118-1124.
- De Giorgi, F., Ahmed, Z., Bastianutto, C., Brini, M., Jouvaille, L.S., Marsault, L.S., Murgia, M., Pinton, P., Pozzan, T. & Rizzutto, R. (1999). *Meth. Cell Biol.* 58, 75-85.
- Doi, N. & Yanagawa, H. (1999). Design of generic biosensors based on green fluorescent proteins with allosteric sites by directed evolution. *FEBS Lett.* 453, 305-307.
- Elsiger, M.-A., Wachter, R.M., Hanson, G.T., Kallio, K. & Remington, S.J. (1999). Structural and spectral response of green fluorescent protein variants to changes in pH. *Biochemistry* 38, 5296-5301.
- Feller, G., le Bussy, O., Houssier, C. & Gerday, C. (1996). Structural and functional aspects of chloride binding to *Alteromonas haloplantis* alpha-amylase. *J. Biol. Chem.* 271, 23836-23841.
- Fersht, A. (1985). *Enzyme structure and mechanism*, W.H. Freeman and Company, New York, NY, Seite 298.
- Halm, D.R. & Frizzell, R.A. (1992). Anion permeation in an apical membrane chloride channel of a secretory epithelial cell. *J. Gen. Physiol.* 99, 339-366.
- Heim, R. (1999). Green fluorescent protein forms for energy transfer. *Methods Enzymol.* 302, 408-423.
- Heim, R., Prasher, D.C. & Tsien, R.Y. (1994). Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 12501-12504.

- Jayaraman, S., Haggie, P., Wachter, R.M., Remington, S.J & Verkman, A.S. (2000). Mechanism and cellular applications of a green fluorescent protein-based halide sensor. *J. Biol. Chem.* (in press).
- Jones, T.A., Zou, J.-Y., Cowan, S.W. & Kjeldgaard, M. (1991). Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr. Sect. A* 47, 110-119.
- Kneen, M., Farinas, J., Li, Y. & Verkman, A.S. (1998). Green fluorescent protein as a noninvasive intracellular pH indicator. *Biophys. J.* 74, 1591-1599.
- Kraulis, P. (1991). MOLSCRIPT: A program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Crystallog.* 24, 946-950.
- Llopis, J., McCaffery, J.M., Miyawaki, A., Farquhar, M. & Tsien, R.Y. (1998). Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 6803-6808.
- March, J. (1992). *Advanced Organic Chemistry*, John Wiley & Sons, New York, Seite 272.
- Matz, M.V., Fradkov, A.F., Labas, Y.A., Savitsky, A.P., Zaraisky, A.G., Markelov, M.L. & Lukyanov, S.A. (1999). Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nature Biotechnol.* 17, 969-973.
- Miesenbock, G., De Angelis, D.A. & Rothman, J.E. (1998). Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature* 394, 192-195.
- Miyawaki, A., Griesbeck, O., Heim, R. & Tsien, R.Y. (1999). Dynamic and quantitative Ca²⁺ measurements using improved cameleons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 2135-2140.
- Ormö, M., Cubitt, A.B., Kallio, K., Gross, L.A., Tsien, R.Y. & Remington, S.J. (1996). Crystal structure of the *Aequorea victoria* Green Fluorescent Protein. *Science* 273, 1392-1395.
- Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* 276, 307-326.
- Palm, G.J. & Wlodawer, A. (1999). Spectral variants of green fluorescent protein. *Methods Enzymol.* 302, 378-394.
- Palm, G.J., Zdanov, A., Gaitanaris, G.A., Stauber, R., Pavlakis, G.N. & Wlodawer, A. (1997). The structural basis for spectral variations in green fluorescent protein. *Nat. Struct. Biol.* 4(5), 361-365.
- Pikkemaat, M.G., Ridder, I.S., Rozeboom, H.J., Kalk, K.H., Dijkstra, B.W. & Janssen, D.B. (1999). Crystallographic and kinetic evidence of a collision complex formed during halide import in haloalkane dehalogenase. *Biochemistry* 38, 12052-12061.
- Robey, R.B., Ruiz, O., Santos, A.V.P., Ma, J., Kear, F., Wang, L.-J., Li, C.-J., Bernardo, A.A. & Arruda, J.A.L. (1998). pH-Dependent fluorescence of a heterologously expressed *Aequorea* Green Fluorescent Protein mutant: In situ spectral characteristics and applicability to intracellular pH estimation. *Biochemistry* 37, 9894-9901.
- Scharnagl, C., Raupp-Kossmann, R. & Fischer, S.F. (1999). Molecular basis for pH sensitivity and proton transfer in Green Fluorescent Protein: Protonation and Conformational substates from electrostatic calculations. *Biophys. J.* 77, 1839-1857.
- Steiner, T. (1998). Hydrogen-bond distances to halide ions in organic and organometallic crystal structures: Up-to-date database study. *Acta Cryst. B* 54, 456-463.
- Sullivan, K.F. & Kay, S.A.E., Hrsg. (1999). *Green fluorescent proteins*. *Methods Cell Biol.* 58, Academic Press, San Diego.
- Topell, S., Hennecke, J. & Glockshuber, R. (1999). Circularly permuted variants of the green fluorescent protein. *FEBS Lett.* 457, 283-289.
- Tronrud, D.E., Ten Eyck, L.F. & Matthews, B.W. (1987). An efficient general-purpose least-squares refinement program for macromolecular structures. *Acta Crystallogr. Sect. A* 43, 489-501.
- Tsien, R.Y. (1998). The green fluorescent protein. *Ann. Rev. Biochem.* 67, 509-544.
- Verschueren, K.H.G., Kingma, J., Rozeboom, H.J., Kalk, K.H., Janssen, D.B. & Dijkstra, B.W. (1993). Crystallographic and fluorescence studies of the interaction of haloalkane dehalogenase with halide ions. Studies with halide compounds reveal a halide binding site in the active site. *Biochemistry* 32, 9031-9037.
- Wachter, R.M., Elsliger, M.-A., Kallio, K., Hanson, G.T. & Remington, S.J. (1998). Structural basis of spectral shifts in the yellow-emission variants of green fluorescent protein. *Structure* 6(10), 1267-1277.
- Wachter, R.M. & Remington, S.J. (1999). Sensitivity of the yellow variant of green fluorescent protein to halides and nitrate. *Curr. Biol.* 9(17), R628-R629.
- Wang, Z., Asenjo, A.B. & Oprian, D.D. (1993). Identification of the Cl⁻ binding site in the human red and green color vision pigments. *Biochemistry* 32, 2125-2130.
- Ward, W.W., Prentice, H.J., Roth, A.F., Cody, C.W. & Reeves, S.C. (1982). Spectral perturbations of the *Aequorea* green-fluorescent protein. *Photochem. Photobiol.* 35, 803-808.
- Wright, E.M. & Diamond, J.M. (1977). Anion selectivity in biological systems. *Physiological Reviews* 57, 109-156.
- Yang, F., Moss, L.G. & Phillips, G.N. (1996). The molecular structure of green fluorescent protein. *Nature Biotech.* 14, 1246-1251.
- Yuan, C., Kuwata, O., Liang, J., Misra, S., Balashov, S.P. & Ebrey, T.G. (1999). Chloride binding regulates the

Schiff base pK in Gecko P521 cone-type visual pigment. Biochemistry 38, 4649-4654.

Patentansprüche

1. Nukleinsäuremolekül, umfassend eine Nukleotidsequenz, die für ein funktionelles manipuliertes fluoreszierendes Protein kodiert, dessen Aminosäuresequenz im Wesentlichen identisch mit der Aminosäuresequenz des grün-fluoreszierenden Proteins von Aequorea (SEQ ID NO:2) ist und die sich von SEQ ID NO:2 durch
i) mindestens eine erste Substitution an der Position T203Y und
ii) mindestens eine zweite Substitution an der Position H148 und
iii) mindestens eine dritte Substitution an einer der folgenden Positionen: V150T oder A, V163S, T oder A, I152L oder F165Y unterscheidet,
wobei das funktionelle manipulierte fluoreszierende Protein eine unterschiedliche fluoreszierende Eigenschaft aufweist als das grünfluoreszierende Protein von Aequorea und eine Fluoreszenzmessung von Haliden ermöglicht.

2. Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 1, wobei die mindestens eine zweite Substitution an der Position H148 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus H148R, H148G, H148Q, H148A, H148N und H148K.

3. Nukleinsäure nach Anspruch 1, wobei die mindestens eine dritte Substitution an der Position V150 V150T ist.

4. Nukleinsäure nach Anspruch 1, wobei die mindestens eine dritte Substitution an der Position V163 V163S ist.

5. Nukleinsäure nach Anspruch 1, wobei die mindestens eine dritte Substitution an der Position V163 V163T ist.

6. Nukleinsäure nach Anspruch 1, wobei die mindestens eine dritte Substitution an der Position V163 V163A ist.

7. Nukleinsäure nach Anspruch 1, wobei die mindestens eine dritte Substitution an der Position V150 V150A ist.

8. Verfahren zur Bestimmung des Vorliegens eines Anions von Interesse in einer Probe, umfassend die Schritte

1) Einführen eines manipulierten grün-fluoreszierenden Proteins in eine Probe, wobei das manipulierte grün-fluoreszierende Protein eine Aminosäuresequenz umfasst, die im Wesentlichen identisch mit der Aminosäuresequenz des grün-fluoreszierenden Proteins von Aequorea (SEQ ID NO:2) ist und sich von SEQ ID NO:2 durch mindestens eine erste Substitution an der Position T203Y, mindestens eine zweite Substitution an der Position H148 und mindestens eine dritte Substitution an einer der folgenden Positionen: V150T oder A, V163S, T oder A, I152L oder F165Y unterscheidet, wobei das funktionelle manipulierte fluoreszierende Protein eine unterschiedliche fluoreszierende Eigenschaft aufweist als das grünfluoreszierende Protein von Aequorea und eine Fluoreszenzmessung von Haliden ermöglicht,

2) Bestimmung der Fluoreszenz des manipulierten grün-fluoreszierenden Proteins in der Probe.

9. Verfahren nach Anspruch 8, weiter umfassend den Schritt des Vergleichens der Fluoreszenz des manipulierten grün-fluoreszierenden Proteins in der Probe mit der Fluoreszenz einer Kontrolle des manipulierten grünfluoreszierenden Proteins, das in eine Kontrollprobe, die das Anion von Interesse bei einer bekannten Konzentration umfasst, eingeführt wurde.

10. Verfahren nach Anspruch 8, wobei die Probe mindestens eine lebende Zelle umfasst.

11. Verfahren nach Anspruch 8, wobei das Anion von Interesse ein Halid ist.

12. Verfahren nach Anspruch 8, wobei das manipulierte fluoreszierende Protein durch ein Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3 kodiert wird.

13. Funktionelles manipuliertes fluoreszierendes Protein, das durch ein Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 kodiert wird.

14. Wirtszelle, umfassend ein funktionelles manipuliertes fluoreszierendes Protein gemäß Anspruch 13.

15. Verfahren zum Screening der Wirkungen von Testverbindungen auf die Ionenkanalaktivität, umfassend die Schritte

i) Bereitstellen einer Zelle, umfassend

a) ein manipuliertes grün-fluoreszierendes Protein, wobei das manipulierte grün-fluoreszierende Protein eine Aminosäuresequenz umfasst, die im Wesentlichen identisch mit der Aminosäuresequenz des grün-fluoreszierenden Proteins von Aequorea (SEQ ID NO:2) ist und sich von SEQ ID NO:2 durch mindestens eine erste Substitution an der Position T203Y, mindestens eine zweite Substitution an der Position H148 und mindestens eine dritte Substitution an einer der folgenden Positionen: V150T oder A, V163S, T oder A, I152L oder F165Y unterscheidet, wobei das funktionelle manipulierte fluoreszierende Protein eine unterschiedliche fluoreszierende Eigenschaft aufweist als das grün-fluoreszierende Protein von Aequorea und eine Fluoreszenzmessung von Haliden ermöglicht,

b) einen Ionenkanal von Interesse,

ii) In-Kontakt-Bringen der Zelle mit einer Testverbindung,

iii) Bestimmen der Fluoreszenz von dem manipulierten grün-fluoreszierenden Protein.

16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei das Verfahren weiter den Schritt des In-Kontakt-Bringens der Zelle mit einem bekannten Aktivator des Ionenkanals von Interesse umfasst.

17. Verfahren nach Anspruch 15, weiter umfassend den Schritt des Vergleichens der Fluoreszenz von dem manipulierten grün-fluoreszierenden Protein in der Zelle mit der Fluoreszenz einer Kontrolle des manipulierten grün-fluoreszierenden Proteins, das in eine Kontrollzelle eingeführt wurde.

18. Verfahren nach Anspruch 15, wobei der Ionenkanal von Interesse Halide transportiert.

19. Verfahren nach Anspruch 15, wobei das manipulierte fluoreszierende Protein eines gemäß Anspruch 13 ist.

Es folgen 62 Blatt Zeichnungen

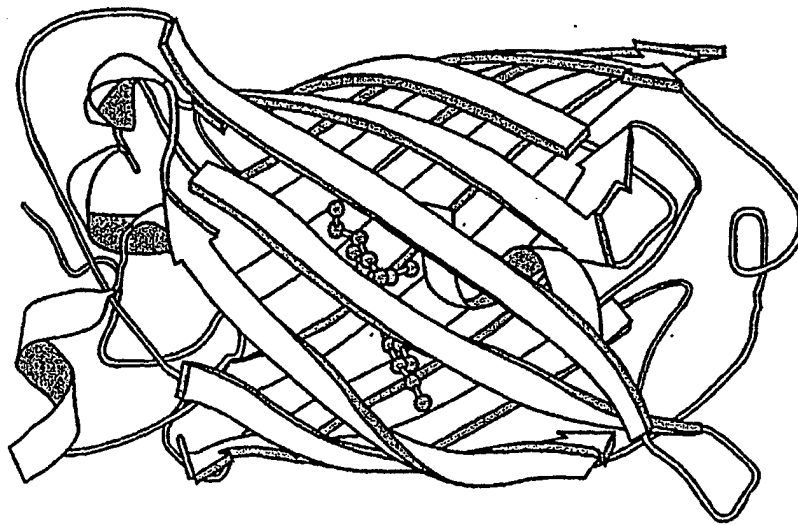


FIG. 1A

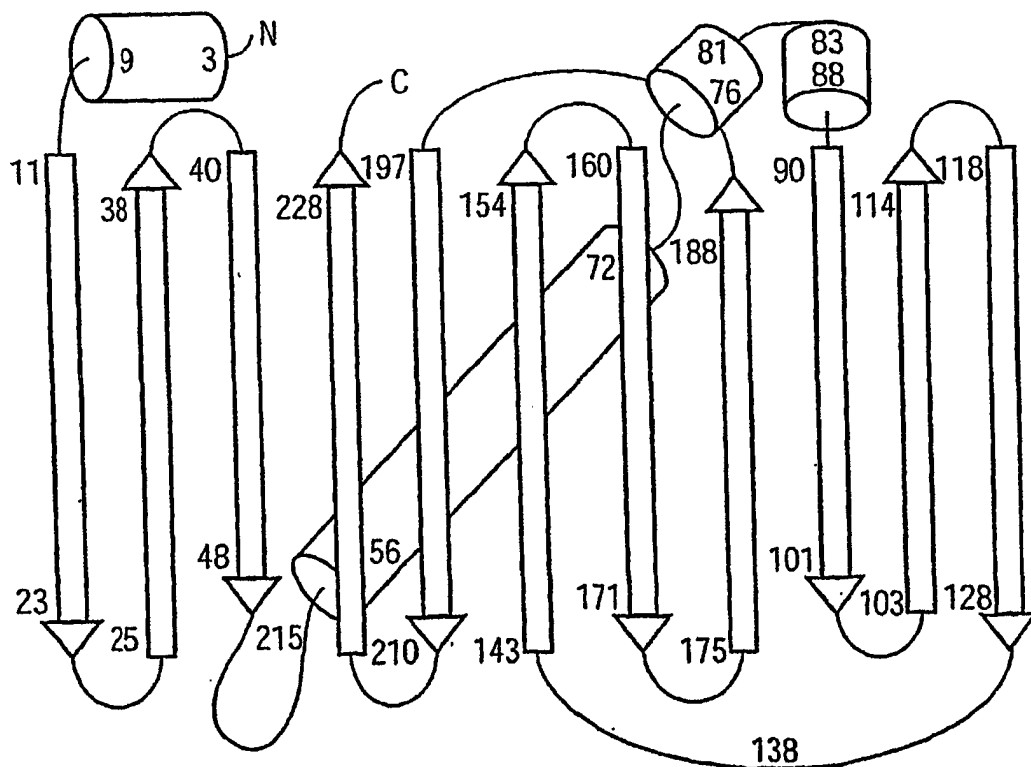


FIG. 1B

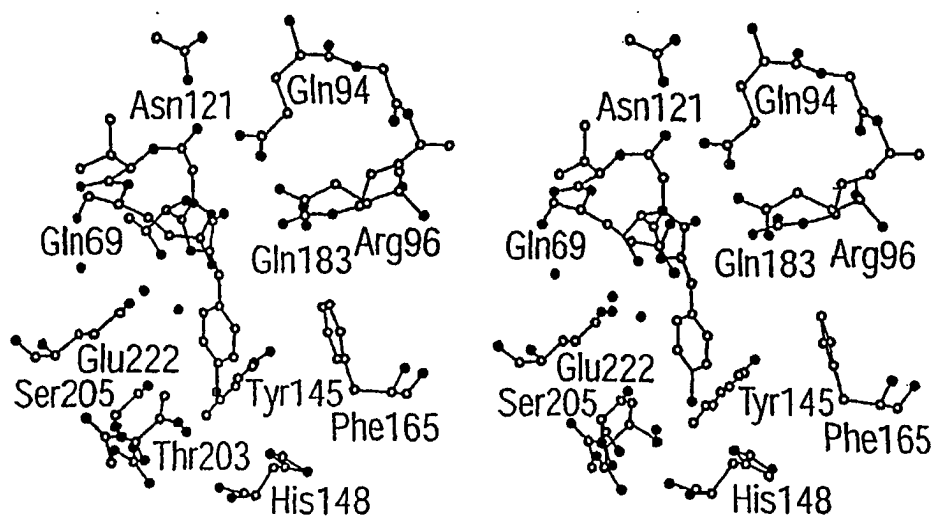


FIG. 2A

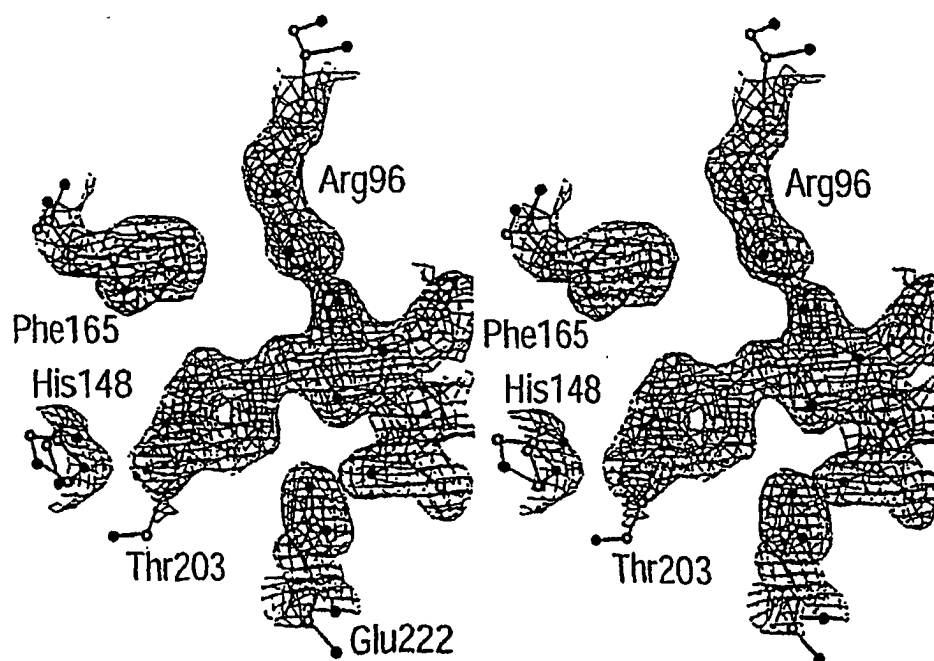


FIG. 2B

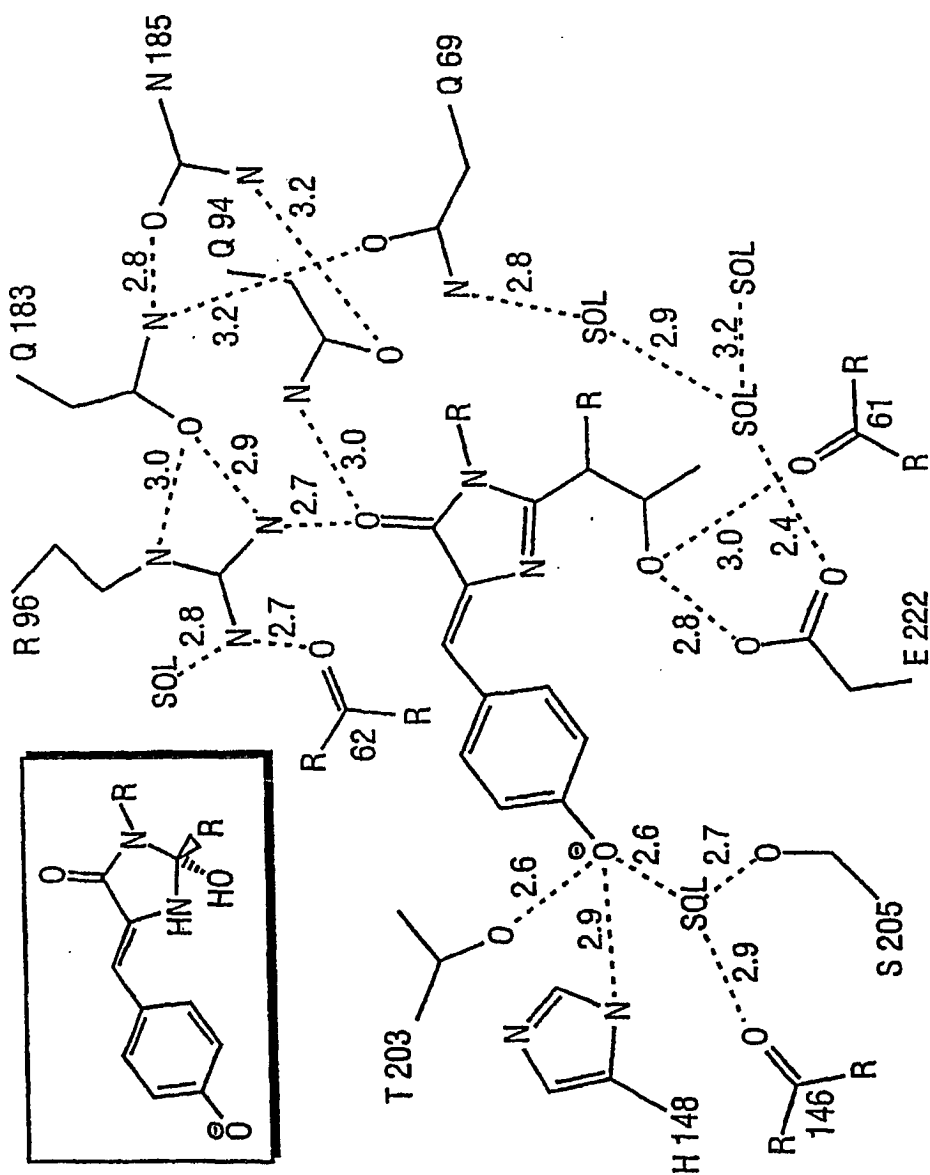


FIG. 2C

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG:

SEQ ID NO:1:

SEQ ID NO:2:

ATG	AGT	AA	GGA	GAA	GAA	CTT	TTC	ACT	GGA	GTT	GTC	CCA	ATT	CTT	GTT	48
Met	Sen	Lys	Gly	Glu	Glu	Leu	Phe	Thr	Gly	Val	Val	Pro	Ile	Leu	Val	
1				5					10					15		
GAA	TTA	GAT	GGT	GAT	GTT	AAT	GGG	CAC	AAA	TTT	TCT	GTC	AGT	GGA	GAG	96
Glu	Leu	Asp	Gly	Asp	Val	Asn	Gly	His	Lys	Phe	Ser	Val	Ser	Gly	Glu	
			20				25						30			
GGT	GAA	GGT	GAT	GCA	ACA	TAC	GGA	AAA	CTT	ACC	CTT	AAA	TTT	ATT	TGC	144
Gly	Glu	Gly	Asp	Ala	Thr	Tyr	Gly	Lys	Ileu	Thr	Leu	Lys	Phe	Ile	Cys	
			35				40					45				
ACT	ACT	GGA	AAA	CTA	CCT	GTT	CCA	TGG	CCA	ACA	CTT	GTC	ACT	ACT	TTC	192
Thr	Thr	Gly	Lys	Leu	Pro	Val	Pro	Trp	Pro	Thr	Leu	Val	Thr	Thr	Phe	
			50				55					60				
TCT	TAT	GGT	GTT	CAA	TGC	TTT	TCA	AGA	TAC	CCA	GAT	CAT	ATG	AAA	CGG	240
Sen	Tyr	Gly	Val	Gln	Cys	Phe	Ser	Arg	Tyr	Pro	Asp	His	Met	Lys	Arg	
					70					75					80	
CAT	GAC	TTT	TTC	AAG	AGT	GCC	ATG	CCC	GAA	GGT	TAT	GTA	CAG	GAA	AGA	288
His	Asp	Phe	Phe	Lys	Sen	Ala	Met	Pro	Glu	Gly	Tyr	Val	Gln	Glu	Arg	
				85					90					95		
ACT	ATA	TTT	TTC	AAA	GAT	GAC	GGG	AAC	TAC	AAG	ACA	CGT	GCT	GAA	GTC	336
Thr	Ile	Phe	Phe	Lys	Asp	Asp	Gly	Asn	Tyr	Lys	Thr	Arg	Ala	Glu	Val	
			100				105						110			
AAG	TTT	GAA	GGT	GAT	ACC	CTT	GTT	AAT	AGA	ATC	GAG	TTA	AAA	GGT	ATT	384
Lys	Phe	Glu	Gly	Asp	Thr	Leu	Val	Asn	Arg	Ile	Glu	Leu	Lys	Gly	Ile	
			115				120					125				
GAT	TTT	AAA	GAA	GAT	GGA	AAC	ATT	CTT	GGA	CAC	AAA	TTG	GAA	TAC	AAC	432
Asp	Phe	Lys	Glu	Asp	Gly	Asn	Ile	Leu	Gly	His	Lys	Leu	Glu	Tyr	Asn	
			130			135					140					
TAT	AAC	TCA	CAC	AAT	GTA	TAC	ATC	ATG	GCA	GAC	AAA	CAA	AAG	AAT	GGA	480
Tyr	Asn	Ser	His	Asn	Val	Tyr	Ile	Met	Ala	Asp	Lys	Gln	Lys	Asn	Gly	
					150					155					160	
ATC	AAA	GTT	AAC	TTC	AAA	ATT	AGA	CAC	AAC	ATT	GAA	GAT	GGA	AGC	GTT	528
Ile	Lys	Val	Asn	Phe	Lys	Ile	Arg	His	Asn	Ile	Glu	Asp	Gly	Ser	Val	
				165					170					175		
CAA	CTA	GCA	GAC	CAT	TAT	CAA	CAA	AAT	ACT	COA	ATT	GGC	GAT	GGC	CCT	576
Gln	Leu	Ala	Asp	His	Tyr	Gln	Gln	Asn	Thr	Pro	Ile	Gly	Asp	Gly	Pro	
			180					185					190			
GTC	CTT	TTA	CCA	GAC	AAC	CA	TAC	CTG	TCC	ACA	CAA	TCT	GCC	CTT	TCG	624
Val	Leu	Leu	Pro	Asp	Asn	His	Tyr	Leu	Sen	Thr	Gln	Ser	Ala	Leu	Ser	
			195				200					205				
AAA	GAT	CCC	AAC	GAA	AAG	AGA	GAC	CAC	ATG	GTC	CTT	CTT	GAG	TTT	GTA	672
Lys	Asp	Pro	Asn	Glu	Lys	Arg	Asp	His	Met	Val	Leu	Leu	Glu	Phe	Val	
			210			215				220						
ACA	GCT	GCT	GGG	ATT	ACA	CAT	GGC	ATG	GAT	GAA	CTA	TAC	AAA	TA		717
Thr	Ala	Ala	Gly	Ile	Thr	His	Gly	Met	Asp	Glu	Leu	Tyr	Lys			
225					230					235						

FIG. 3

T203Y, S65G, S72A-humanisierte Codon-Verwendung mit einer weiteren Aminosäure nach dem Start-Met, um eine optimale Kozak-Sequenz bereitzustellen

		9			18			27			36			45			54
ATG	GTG	AGC	AAG	GGC	GAG	GAG	CTG	TTC	ACC	GGG	GTG	GTG	CCC	ATC	CTG	GTC	GAG
Met	Val	Ser	Lys	Gly	Glu	Glu	Leu	Phe	Thr	Gly	Val	Val	Pro	Ile	Leu	Val	Glu
		63			72			81			90			99			108
CTG	GAG	GGC	GAC	GTA	AAC	GGC	CAC	AAG	TTC	AGC	GTG	TCC	GGC	GAG	GGC	GAG	GGC
Leu	Asp	Gly	Asp	Val	Asn	Gly	His	Lys	Phe	Ser	Val	Ser	Gly	Glu	Gly	Glu	Gly
		117			126			135			144			153			162
GAT	GCC	ACC	TAC	GGC	AAG	CTG	ACC	CTG	AAG	TTC	ATC	TGC	ACC	ACC	GGC	AAG	CTG
Asp	Ala	Thr	Tyr	Gly	Lys	Leu	Thr	Leu	Lys	Phe	Ile	Cys	Thr	Thr	Gly	Lys	Leu
		171			180			189			198			207			216
CCC	GTG	CCC	TGG	CCC	ACC	CTC	GTG	ACC	ACC	TTC	GGC	TAC	GGC	GTG	CAG	TGC	TTC
Pro	Val	Pro	Trp	Pro	Thr	Leu	Val	Thr	Thr	Phe	Gly	Tyr	Gly	Val	Gln	Cys	Phe
		225			234			243			252			261			270
GCC	CGC	TAC	CCC	GAC	CAC	ATG	AAG	CAG	CAC	GAC	TTC	TTC	AAG	TCC	GCC	ATG	CCC
Ala	Arg	Tyr	Pro	Asp	His	Met	Lys	Gln	His	Asp	Phe	Phe	Lys	Ser	Ala	Met	Pro
		279			288			297			306			315			324
GAA	GGC	TAC	GTC	CAG	GAG	CGG	ACC	ATC	TTC	TTC	AAG	GAC	GAC	GGC	AAC	TAC	AAG
Glu	Gly	Tyr	Val	Gln	Glu	Arg	Thr	Ile	Phe	Phe	Lys	Asp	Asp	Gly	Asn	Tyr	Lys
		333			342			351			360			369			378
ACC	CGC	GCC	GAG	GTG	AAG	TTC	GAG	GGC	GAC	ACC	CTG	GTG	AAC	CGC	ATC	GAG	CTG
Thr	Arg	Ala	Glu	Val	Lys	Phe	Glu	Gly	Asp	Thr	Leu	Val	Asn	Arg	Ile	Glu	Leu
		387			396			405			414			423			432
AAG	GGC	ATC	GAC	TTC	AAG	GAG	GAC	GGC	AAC	ATC	CTG	GGG	CAC	AAG	CTG	GAG	TAC
Lys	Gly	Ile	Asp	Phe	Lys	Glu	Asp	Gly	Asn	Ile	Leu	Gly	His	Lys	Leu	Glu	Tyr
		441			450			459			468			477			486
AAC	TAC	AAC	AGC	CAC	AAC	GTC	TAT	ATC	ATG	GCC	GAC	AAG	CAG	AAG	AAC	GGC	ATC
Asn	Tyr	Asn	Ser	His	Asn	Val	Tyr	Ile	Met	Ala	Asp	Lys	Gln	Lys	Asn	Gly	Ile

FIG. 4A

	495		504		513		522		531		540						
AAG	GTG	AAC	TTC	AAG	ATC	CGC	CAC	AAC	ATC	GAG	GAC	GGC	AGC	GTG	CAG	CTC	GCC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Lys	Val	Asn	Phe	Lys	Ile	Arg	His	Asn	Ile	Glu	Asp	Gly	Ser	Val	Gln	Leu	Ala
	549		558		567		576		585		594						
GAC	CAC	TAC	CAG	CAG	AAC	ACC	CCC	ATC	GGC	GAC	GGC	CCC	GTG	CTG	CTG	CCC	GAC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Asp	His	Tyr	Gln	Gln	Asn	Thr	Pro	Ile	Gly	Asp	Gly	Pro	Val	Leu	Leu	Pro	Asp
	603		612		621		630		639		648						
AAC	CAC	TAC	CTG	AGC	TAC	CAG	TCC	GCC	CTG	AGC	AAA	GAC	CCC	AAC	GAG	AAG	CGC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Asn	His	Tyr	Leu	Ser	Tyr	Gln	Ser	Ala	Leu	Ser	Lys	Asp	Pro	Asn	Glu	Lys	Arg
	657		666		675		684		693		702						
GAT	CAC	ATG	GTC	CTG	CTG	GAG	TTC	GTG	ACC	GCC	GCC	GGG	ATC	ACT	CAC	GGC	ATG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Asp	His	Met	Val	Leu	Leu	Glu	Phe	Val	Thr	Ala	Ala	Gly	Ile	Thr	His	Gly	Met
	711																
GAC	GAG	CTG	TAC	AAG	TAA	3'											
---	---	---	---	---	---	---											
Asp	Glu	Leu	Tyr	Lys	***												

FIG. 4B

CRYST1	51.767	62.845	70.666	90.00	90.00	90.00		
ORIGX1	1.000000	0.000000	0.000000			0.000000		
ORIGX2	0.000000	1.000000	0.000000			0.000000		
ORIGX3	0.000000	0.000000	1.000000			0.000000		
SCALE1	0.019317	0.000000	0.000000			0.000000		
SCALE2	0.000000	0.015912	0.000000			0.000000		
SCALE3	0.000000	0.000000	0.014151			0.000000		
ATOM	1	N	SER	2	28.888	9.409	52.301	1.00 85.05
ATOM	2	CA	SER	2	27.638	10.125	52.516	1.00 80.05
ATOM	3	C	SER	2	26.499	9.639	51.644	1.00 85.36
ATOM	4	O	SER	2	26.606	8.656	50.915	1.00 84.56
ATOM	5	CB	SER	2	27.783	11.635	52.378	1.00 70.97
ATOM	6	OG	SER	2	27.690	12.033	51.012	1.00 44.08
ATOM	7	N	LYS	3	25.418	10.403	51.731	1.00 87.71
ATOM	8	CA	LYS	3	24.141	10.191	51.036	1.00 87.15
ATOM	9	C	LYS	3	24.214	10.266	49.497	1.00 76.86
ATOM	10	O	LYS	3	24.107	9.258	48.774	1.00 78.27
ATOM	11	CB	LYS	3	23.127	11.240	51.521	1.00 89.44
ATOM	12	CG	LYS	3	21.768	10.697	51.949	1.00 75.06
ATOM	13	CD	LYS	3	20.681	11.781	51.987	1.00 76.58
ATOM	14	CE	LYS	3	20.711	12.655	53.243	1.00 68.55
ATOM	15	NZ	LYS	3	20.816	14.103	52.953	1.00 46.24
ATOM	16	N	GLY	4	24.318	11.495	49.015	1.00 53.62
ATOM	17	CA	GLY	4	24.297	11.798	47.605	1.00 45.97
ATOM	18	C	GLY	4	25.425	11.206	46.796	1.00 31.90
ATOM	19	O	GLY	4	25.234	10.923	45.619	1.00 33.63
ATOM	20	N	GLU	5	26.606	11.082	47.420	1.00 32.54
ATOM	21	CA	GLU	5	27.821	10.598	46.726	1.00 32.57
ATOM	22	C	GLU	5	27.523	9.590	45.616	1.00 28.40
ATOM	23	O	GLU	5	27.850	9.803	44.444	1.00 26.12
ATOM	24	CB	GLU	5	28.873	10.053	47.718	1.00 38.53
ATOM	25	CG	GLU	5	30.337	10.461	47.425	1.00 41.36
ATOM	26	CD	GLU	5	31.311	9.584	48.170	1.00 90.82
ATOM	27	OE1	GLU	5	31.508	9.677	49.381	1.00 74.80
ATOM	28	OE2	GLU	5	31.839	8.653	47.403	1.00 100.00
ATOM	29	N	GLU	6	26.883	8.499	46.017	1.00 28.57
ATOM	30	CA	GLU	6	26.479	7.410	45.150	1.00 31.50
ATOM	31	C	GLU	6	25.561	7.837	43.979	1.00 31.10
ATOM	32	O	GLU	6	25.479	7.142	42.955	1.00 30.96
ATOM	33	CB	GLU	6	25.780	6.330	45.992	1.00 35.64
ATOM	34	CG	GLU	6	25.260	6.893	47.338	1.00 55.53
ATOM	35	N	LEU	7	24.864	8.966	44.138	1.00 22.26

FIG. 5A

ATOM	36	CA	LEU	7	23.954	9.456	43.089	1.00	21.61
ATOM	37	C	LEU	7	24.693	10.061	41.917	1.00	16.90
ATOM	38	O	LEU	7	24.152	10.250	40.836	1.00	18.38
ATOM	39	CB	LEU	7	23.050	10.548	43.665	1.00	22.41
ATOM	40	CG	LEU	7	21.672	10.058	44.098	1.00	32.84
ATOM	41	CD1	LEU	7	21.597	8.536	44.074	1.00	31.64
ATOM	42	CD2	LEU	7	21.332	10.591	45.485	1.00	33.14
ATOM	43	N	PHE	8	25.944	10.407	42.157	1.00	20.75
ATOM	44	CA	PHE	8	26.740	11.132	41.159	1.00	21.64
ATOM	45	C	PHE	8	27.818	10.333	40.427	1.00	30.59
ATOM	46	O	PHE	8	28.590	10.856	39.600	1.00	30.05
ATOM	47	CB	PHE	8	27.309	12.376	41.820	1.00	16.95
ATOM	48	CG	PHE	8	26.222	13.355	42.163	1.00	13.29
ATOM	49	CD1	PHE	8	25.672	13.378	43.447	1.00	17.27
ATOM	50	CD2	PHE	8	25.726	14.227	41.189	1.00	13.12
ATOM	51	CE1	PHE	8	24.661	14.290	43.772	1.00	15.14
ATOM	52	CE2	PHE	8	24.712	15.137	41.499	1.00	13.19
ATOM	53	CZ	PHE	8	24.192	15.170	42.794	1.00	5.69
ATOM	54	N	THR	9	27.798	9.074	40.699	1.00	27.35
ATOM	55	CA	THR	9	28.704	8.122	40.175	1.00	34.93
ATOM	56	C	THR	9	28.709	7.998	38.636	1.00	45.22
ATOM	57	O	THR	9	29.642	7.452	38.062	1.00	50.55
ATOM	58	CB	THR	9	28.447	6.795	40.892	1.00	44.60
ATOM	59	OG1	THR	9	29.629	6.330	41.527	1.00	40.40
ATOM	60	CG2	THR	9	27.801	5.779	39.959	1.00	29.76
ATOM	61	N	GLY	10	27.690	8.510	37.956	1.00	30.53
ATOM	62	CA	GLY	10	27.689	8.458	36.507	1.00	23.21
ATOM	63	C	GLY	10	27.144	9.746	35.914	1.00	16.55
ATOM	64	O	GLY	10	27.011	10.729	36.617	1.00	25.70
ATOM	65	N	VAL	11	26.835	9.719	34.629	1.00	16.39
ATOM	66	CA	VAL	11	26.209	10.863	33.971	1.00	22.28
ATOM	67	C	VAL	11	24.758	11.020	34.479	1.00	29.60
ATOM	68	O	VAL	11	23.972	10.062	34.456	1.00	20.43
ATOM	69	CB	VAL	11	26.173	10.664	32.467	1.00	30.87
ATOM	70	CG1	VAL	11	25.912	11.980	31.734	1.00	31.75
ATOM	71	CG2	VAL	11	27.480	10.048	32.015	1.00	33.85
ATOM	72	N	VAL	12	24.417	12.227	34.931	1.00	20.12
ATOM	73	CA	VAL	12	23.080	12.561	35.433	1.00	12.88
ATOM	74	C	VAL	12	22.407	13.624	34.516	1.00	14.37
ATOM	75	O	VAL	12	23.007	14.639	34.179	1.00	13.42
ATOM	76	CB	VAL	12	23.270	13.077	36.839	1.00	15.01

FIG. 5B

ATOM	77	CG1VAL	12	22.000	13.662	37.422	1.00	17.57
ATOM	78	CG2VAL	12	23.781	11.936	37.728	1.00	16.55
ATOM	79	N PRO	13	21.180	13.382	34.066	1.00	14.72
ATOM	80	CA PRO	13	20.493	14.382	33.265	1.00	10.76
ATOM	81	C PRO	13	20.116	15.589	34.141	1.00	7.65
ATOM	82	O PRO	13	19.797	15.468	35.337	1.00	15.14
ATOM	83	CB PRO	13	19.225	13.707	32.745	1.00	17.36
ATOM	84	CG PRO	13	19.043	12.422	33.550	1.00	19.69
ATOM	85	CD PRO	13	20.315	12.195	34.340	1.00	15.41
ATOM	86	N ILE	14	20.196	16.766	33.557	1.00	14.91
ATOM	87	CA ILE	14	19.893	17.991	34.266	1.00	12.93
ATOM	88	C ILE	14	18.768	18.760	33.596	1.00	12.08
ATOM	89	O ILE	14	18.724	18.878	32.399	1.00	11.04
ATOM	90	CB ILE	14	21.109	18.905	34.325	1.00	16.54
ATOM	91	CG1ILE	14	22.271	18.169	35.015	1.00	18.08
ATOM	92	CG2ILE	14	20.783	20.207	35.084	1.00	11.56
ATOM	93	CD1ILE	14	23.642	18.836	34.738	1.00	16.15
ATOM	94	N LEU	15	17.899	19.307	34.421	1.00	13.85
ATOM	95	CA LEU	15	16.811	20.136	33.955	1.00	14.82
ATOM	96	C LEU	15	16.915	21.474	34.685	1.00	3.62
ATOM	97	O LEU	15	17.080	21.509	35.901	1.00	10.00
ATOM	98	CB LEU	15	15.462	19.450	34.285	1.00	21.25
ATOM	99	CG LEU	15	14.412	19.541	33.199	1.00	40.50
ATOM	100	CD1LEU	15	13.279	20.440	33.679	1.00	46.97
ATOM	101	CD2LEU	15	15.008	20.098	31.913	1.00	49.22
ATOM	102	N VAL	16	16.885	22.556	33.919	1.00	10.56
ATOM	103	CA VAL	16	16.964	23.905	34.479	1.00	10.23
ATOM	104	C VAL	16	15.716	24.727	34.063	1.00	9.47
ATOM	105	O VAL	16	15.347	24.748	32.904	1.00	16.72
ATOM	106	CB VAL	16	18.273	24.668	34.098	1.00	12.85
ATOM	107	CG1VAL	16	18.226	26.075	34.691	1.00	12.58
ATOM	108	CG2VAL	16	19.520	23.945	34.628	1.00	14.24
ATOM	109	N GLU	17	15.059	25.317	35.060	1.00	14.43
ATOM	110	CA GLU	17	13.904	26.144	34.870	1.00	13.61
ATOM	111	C GLU	17	14.086	27.474	35.571	1.00	9.38
ATOM	112	O GLU	17	14.331	27.524	36.765	1.00	15.74
ATOM	113	CB GLU	17	12.650	25.402	35.344	1.00	14.15
ATOM	114	CG GLU	17	12.436	24.178	34.447	1.00	15.37
ATOM	115	CD GLU	17	11.865	24.573	33.105	1.00	49.50
ATOM	116	OE1 GLU	17	11.160	25.557	32.950	1.00	83.46
ATOM	117	OE2 GLU	17	12.220	23.766	32.127	1.00	38.75

FIG. 5C

ATOM	118	N	LEU	18	13.990	28.571	34.805	1.00	17.82
ATOM	119	CA	LEU	18	14.116	29.914	35.401	1.00	16.61
ATOM	120	C	LEU	18	12.962	30.855	35.057	1.00	14.91
ATOM	121	O	LEU	18	12.585	30.978	33.917	1.00	14.31
ATOM	122	CB	LEU	18	15.426	30.630	35.005	1.00	13.56
ATOM	123	CG	LEU	18	15.533	32.049	35.579	1.00	19.27
ATOM	124	CD1	LEU	18	16.740	32.182	36.489	1.00	21.40
ATOM	125	CD2	LEU	18	15.682	33.033	34.438	1.00	18.38
ATOM	126	N	ASP	19	12.480	31.551	36.082	1.00	17.88
ATOM	127	CA	ASP	19	11.476	32.577	35.940	1.00	19.57
ATOM	128	C	ASP	19	12.098	33.896	36.360	1.00	11.65
ATOM	129	O	ASP	19	12.486	34.044	37.493	1.00	16.82
ATOM	130	CB	ASP	19	10.234	32.305	36.847	1.00	24.92
ATOM	131	CG	ASP	19	9.305	31.262	36.282	1.00	38.46
ATOM	132	OD1	ASP	19	8.572	30.587	36.989	1.00	61.49
ATOM	133	OD2	ASP	19	9.337	31.189	34.949	1.00	22.44
ATOM	134	N	GLY	20	12.178	34.863	35.471	1.00	16.82
ATOM	135	CA	GLY	20	12.784	36.101	35.908	1.00	19.52
ATOM	136	C	GLY	20	12.048	37.385	35.538	1.00	19.35
ATOM	137	O	GLY	20	11.240	37.443	34.628	1.00	18.22
ATOM	138	N	ASP	21	12.401	38.407	36.286	1.00	13.19
ATOM	139	CA	ASP	21	11.908	39.737	36.112	1.00	16.36
ATOM	140	C	ASP	21	13.039	40.683	36.424	1.00	12.77
ATOM	141	O	ASP	21	13.517	40.742	37.569	1.00	15.18
ATOM	142	CB	ASP	21	10.701	40.036	37.040	1.00	22.26
ATOM	143	CG	ASP	21	10.230	41.491	37.022	1.00	30.80
ATOM	144	OD1	ASP	21	10.878	42.407	36.557	1.00	27.40
ATOM	145	OD2	ASP	21	9.062	41.658	37.604	1.00	45.92
ATOM	146	N	VAL	22	13.464	41.393	35.397	1.00	19.66
ATOM	147	CA	VAL	22	14.524	42.388	35.542	1.00	25.10
ATOM	148	C	VAL	22	14.010	43.780	35.154	1.00	18.26
ATOM	149	O	VAL	22	13.769	44.062	33.955	1.00	15.10
ATOM	150	CB	VAL	22	15.803	42.012	34.750	1.00	26.57
ATOM	151	CG1	VAL	22	16.861	43.127	34.896	1.00	24.27
ATOM	152	CG2	VAL	22	16.365	40.710	35.297	1.00	22.98
ATOM	153	N	ASN	23	13.823	44.641	36.166	1.00	25.32
ATOM	154	CA	ASN	23	13.319	45.993	35.908	1.00	32.81
ATOM	155	C	ASN	23	11.987	45.958	35.142	1.00	32.77
ATOM	156	O	ASN	23	11.774	46.730	34.187	1.00	30.47
ATOM	157	CB	ASN	23	14.344	46.831	35.096	1.00	31.26
ATOM	158	CG	ASN	23	15.374	47.607	35.938	1.00	24.72

FIG. 5D

ATOM	159	OD1ASN	23	15.795	47.183	37.024	1.00	27.22
ATOM	160	ND2ASN	23	15.829	48.723	35.389	1.00	41.15
ATOM	161	N GLY	24	11.118	45.024	35.519	1.00	24.95
ATOM	162	CA GLY	24	9.831	44.919	34.848	1.00	23.22
ATOM	163	C GLY	24	9.832	44.111	33.573	1.00	23.31
ATOM	164	O GLY	24	8.780	43.868	33.024	1.00	28.37
ATOM	165	N HIS	25	11.000	43.691	33.071	1.00	20.89
ATOM	166	CA HIS	25	11.042	42.840	31.877	1.00	19.30
ATOM	167	C HIS	25	10.981	41.373	32.316	1.00	27.26
ATOM	168	O HIS	25	11.898	40.850	32.951	1.00	26.47
ATOM	169	CB HIS	25	12.268	43.060	30.958	1.00	24.20
ATOM	170	CG HIS	25	12.313	44.382	30.218	1.00	33.04
ATOM	171	ND1HIS	25	12.917	45.514	30.758	1.00	37.58
ATOM	172	CD2HIS	25	11.876	44.716	28.971	1.00	42.76
ATOM	173	CE1HIS	25	12.801	46.497	29.867	1.00	39.14
ATOM	174	NE2HIS	25	12.185	46.050	28.778	1.00	42.80
ATOM	175	N LYS	26	9.872	40.728	32.028	1.00	25.90
ATOM	176	CA LYS	26	9.675	39.355	32.446	1.00	26.27
ATOM	177	C LYS	26	10.154	38.361	31.429	1.00	27.09
ATOM	178	O LYS	26	10.027	38.576	30.232	1.00	25.75
ATOM	179	CB LYS	26	8.230	39.069	32.863	1.00	27.58
ATOM	180	CG LYS	26	7.873	39.770	34.166	1.00	44.94
ATOM	181	CD LYS	26	6.369	39.914	34.400	1.00	71.44
ATOM	182	CE LYS	26	6.008	41.000	35.421	1.00	45.29
ATOM	183	N PHE	27	10.703	37.250	31.910	1.00	22.04
ATOM	184	CA PHE	27	11.164	36.236	30.978	1.00	18.78
ATOM	185	C PHE	27	11.273	34.863	31.619	1.00	14.75
ATOM	186	O PHE	27	11.293	34.722	32.842	1.00	15.94
ATOM	187	CB PHE	27	12.495	36.638	30.287	1.00	21.58
ATOM	188	CG PHE	27	13.599	36.826	31.311	1.00	22.06
ATOM	189	CD1PHE	27	14.490	35.791	31.612	1.00	23.61
ATOM	190	CD2PHE	27	13.722	38.029	32.005	1.00	17.55
ATOM	191	CE1PHE	27	15.487	35.963	32.579	1.00	16.61
ATOM	192	CE2PHE	27	14.747	38.234	32.931	1.00	19.75
ATOM	193	CZ PHE	27	15.621	37.187	33.234	1.00	13.83
ATOM	194	N SER	28	11.370	33.857	30.752	1.00	12.40
ATOM	195	CA SER	28	11.492	32.479	31.186	1.00	15.59
ATOM	196	C SER	28	12.579	31.749	30.379	1.00	15.96
ATOM	197	O SER	28	12.699	31.933	29.167	1.00	18.99
ATOM	198	CB SER	28	10.143	31.702	31.086	1.00	14.48
ATOM	199	OG SER	28	9.510	31.678	32.353	1.00	31.95

FIG. 5E

ATOM	200	N	VAL	29	13.335	30.902	31.073	1.00	16.73
ATOM	201	CA	VAL	29	14.361	30.093	30.435	1.00	14.06
ATOM	202	C	VAL	29	14.258	28.614	30.187	1.00	6.80
ATOM	203	O	VAL	29	14.058	28.266	31.987	1.00	10.85
ATOM	204	CB	VAL	29	15.768	30.570	30.839	1.00	17.96
ATOM	205	CG1	VAL	29	16.826	29.599	30.234	1.00	15.30
ATOM	206	CG2	VAL	29	15.989	32.001	30.357	1.00	16.37
ATOM	207	N	SER	30	14.462	27.781	29.824	1.00	11.31
ATOM	208	CA	SER	30	14.535	26.351	30.011	1.00	17.96
ATOM	209	C	SER	30	15.917	25.818	29.571	1.00	11.26
ATOM	210	O	SER	30	16.398	26.157	28.513	1.00	13.17
ATOM	211	CB	SER	30	13.471	25.603	29.202	1.00	19.91
ATOM	212	OG	SER	30	12.249	25.667	29.882	1.00	48.74
ATOM	213	N	GLY	31	16.480	24.926	30.364	1.00	9.88
ATOM	214	CA	GLY	31	17.718	24.321	29.977	1.00	12.44
ATOM	215	C	GLY	31	17.737	22.816	30.249	1.00	13.16
ATOM	216	O	GLY	31	17.149	22.324	31.176	1.00	12.41
ATOM	217	N	GLU	32	18.459	22.112	29.433	1.00	13.44
ATOM	218	CA	GLU	32	18.622	20.670	29.570	1.00	13.73
ATOM	219	C	GLU	32	20.079	20.297	29.262	1.00	17.33
ATOM	220	O	GLU	32	20.734	20.946	28.456	1.00	15.56
ATOM	221	CB	GLU	32	17.761	19.893	28.543	1.00	12.67
ATOM	222	CG	GLU	32	16.264	20.187	28.618	1.00	26.43
ATOM	223	CD	GLU	32	15.501	19.547	27.468	1.00	21.13
ATOM	224	OE1	GLU	32	15.996	18.767	26.698	1.00	23.45
ATOM	225	OE2	GLU	32	14.292	20.022	27.337	1.00	30.63
ATOM	226	N	GLY	33	20.534	19.207	29.822	1.00	15.36
ATOM	227	CA	GLY	33	21.860	18.687	29.518	1.00	12.84
ATOM	228	C	GLY	33	22.236	17.602	30.467	1.00	14.69
ATOM	229	O	GLY	33	21.390	16.919	31.011	1.00	13.56
ATOM	230	N	GLU	34	23.525	17.453	30.702	1.00	15.15
ATOM	231	CA	GLU	34	23.971	16.450	31.621	1.00	18.14
ATOM	232	C	GLU	34	25.220	16.874	32.367	1.00	16.26
ATOM	233	O	GLU	34	25.926	17.760	31.944	1.00	18.67
ATOM	234	CB	GLU	34	24.180	15.114	30.927	1.00	22.53
ATOM	235	CG	GLU	34	24.948	15.261	29.624	1.00	33.78
ATOM	236	CD	GLU	34	24.879	14.020	28.796	1.00	55.15
ATOM	237	OE1	GLU	34	25.861	13.352	28.534	1.00	45.39
ATOM	238	OE2	GLU	34	23.653	13.719	28.430	1.00	56.26
ATOM	239	N	GLY	35	25.461	16.222	33.485	1.00	11.20
ATOM	240	CA	GLY	35	26.611	16.502	34.315	1.00	10.62

FIG. 5F

ATOM	241	C	GLY	35	27.293	15.192	34.662	1.00	19.92
ATOM	242	O	GLY	35	26.650	14.161	34.750	1.00	16.69
ATOM	243	N	ASP	36	28.594	15.238	34.860	1.00	16.92
ATOM	244	CA	ASP	36	29.367	14.061	35.221	1.00	16.19
ATOM	245	C	ASP	36	30.396	14.505	36.233	1.00	13.94
ATOM	246	O	ASP	36	31.469	15.004	35.879	1.00	15.77
ATOM	247	CB	ASP	36	30.032	13.457	33.948	1.00	19.98
ATOM	248	CG	ASP	36	30.681	12.066	34.075	1.00	31.92
ATOM	249	OD1	ASP	36	31.236	11.519	33.141	1.00	30.97
ATOM	250	OD2	ASP	36	30.587	11.515	35.248	1.00	25.32
ATOM	251	N	ALA	37	30.015	14.402	37.490	1.00	13.40
ATOM	252	CA	ALA	37	30.818	14.846	38.582	1.00	12.98
ATOM	253	C	ALA	37	32.181	14.145	38.637	1.00	21.94
ATOM	254	O	ALA	37	33.084	14.604	39.331	1.00	13.61
ATOM	255	CB	ALA	37	30.070	14.741	39.916	1.00	11.49
ATOM	256	N	THR	38	32.307	13.016	37.945	1.00	15.63
ATOM	257	CA	THR	38	33.581	12.280	37.943	1.00	19.94
ATOM	258	C	THR	38	34.705	13.114	37.335	1.00	25.61
ATOM	259	O	THR	38	35.850	13.069	37.775	1.00	17.89
ATOM	260	CB	THR	38	33.462	10.898	37.299	1.00	22.57
ATOM	261	OG1	THR	38	32.543	10.146	38.067	1.00	29.86
ATOM	262	CG2	THR	38	34.821	10.213	37.355	1.00	22.90
ATOM	263	N	TYR	39	34.323	13.920	36.347	1.00	18.45
ATOM	264	CA	TYR	39	35.210	14.837	35.675	1.00	9.39
ATOM	265	C	TYR	39	34.874	16.291	35.991	1.00	14.41
ATOM	266	O	TYR	39	35.454	17.177	35.410	1.00	16.24
ATOM	267	CB	TYR	39	35.156	14.582	34.180	1.00	11.82
ATOM	268	CG	TYR	39	35.426	13.137	33.929	1.00	28.73
ATOM	269	CD1	TYR	39	36.715	12.633	34.065	1.00	33.75
ATOM	270	CD2	TYR	39	34.392	12.249	33.642	1.00	39.19
ATOM	271	CE1	TYR	39	36.982	11.276	33.828	1.00	29.75
ATOM	272	CE2	TYR	39	34.635	10.885	33.435	1.00	45.41
ATOM	273	CZ	TYR	39	35.943	10.410	33.570	1.00	57.62
ATOM	274	OH	TYR	39	36.199	9.070	33.364	1.00	70.77
ATOM	275	N	GLY	40	33.935	16.525	36.929	1.00	9.94
ATOM	276	CA	GLY	40	33.474	17.879	37.266	1.00	7.02
ATOM	277	C	GLY	40	32.952	18.600	36.004	1.00	9.45
ATOM	278	O	GLY	40	33.068	19.830	35.829	1.00	12.63
ATOM	279	N	LYS	41	32.380	17.823	35.092	1.00	5.44
ATOM	280	CA	LYS	41	31.954	18.335	33.842	1.00	6.63
ATOM	281	C	LYS	41	30.414	18.554	33.703	1.00	20.92

FIG. 5G

ATOM	282	O	LYS	41	29.617	17.693	34.085	1.00	12.94
ATOM	283	CB	LYS	41	32.360	17.357	32.827	1.00	8.27
ATOM	284	CG	LYS	41	32.099	17.771	31.419	1.00	13.19
ATOM	285	CD	LYS	41	32.521	16.644	30.481	1.00	20.20
ATOM	286	CE	LYS	41	32.690	17.068	29.032	1.00	35.79
ATOM	287	NZ	LYS	41	33.113	15.954	28.147	1.00	47.56
ATOM	288	N	LEU	42	30.049	19.684	33.069	1.00	18.31
ATOM	289	CA	LEU	42	28.643	20.064	32.794	1.00	16.08
ATOM	290	C	LEU	42	28.456	20.422	31.330	1.00	14.23
ATOM	291	O	LEU	42	29.240	21.168	30.787	1.00	14.79
ATOM	292	CB	LEU	42	28.223	21.300	33.621	1.00	13.22
ATOM	293	CG	LEU	42	28.007	21.061	35.082	1.00	16.70
ATOM	294	CD1	LEU	42	27.894	22.406	35.782	1.00	13.79
ATOM	295	CD2	LEU	42	26.732	20.243	35.295	1.00	18.70
ATOM	296	N	THR	43	27.395	19.914	30.672	1.00	8.04
ATOM	297	CA	THR	43	27.103	20.275	29.282	1.00	4.87
ATOM	298	C	THR	43	25.636	20.666	29.186	1.00	17.23
ATOM	299	O	THR	43	24.811	19.818	29.442	1.00	14.38
ATOM	300	CB	THR	43	27.351	19.140	28.317	1.00	21.59
ATOM	301	OG1	THR	43	28.692	18.743	28.415	1.00	42.74
ATOM	302	CG2	THR	43	27.073	19.675	26.917	1.00	31.23
ATOM	303	N	LEU	44	25.327	21.934	28.830	1.00	11.83
ATOM	304	CA	LEU	44	23.944	22.409	28.847	1.00	13.81
ATOM	305	C	LEU	44	23.589	23.307	27.668	1.00	18.19
ATOM	306	O	LEU	44	24.416	23.989	27.107	1.00	13.86
ATOM	307	CB	LEU	44	23.725	23.275	30.125	1.00	15.37
ATOM	308	CG	LEU	44	23.369	22.584	31.456	1.00	24.69
ATOM	309	CD1	LEU	44	21.869	22.381	31.601	1.00	23.20
ATOM	310	CD2	LEU	44	24.083	21.286	31.650	1.00	46.18
ATOM	311	N	LYS	45	22.294	23.331	27.339	1.00	10.29
ATOM	312	CA	LYS	45	21.752	24.224	26.358	1.00	11.94
ATOM	313	C	LYS	45	20.534	24.913	26.957	1.00	19.35
ATOM	314	O	LYS	45	19.665	24.248	27.530	1.00	18.43
ATOM	315	CB	LYS	45	21.409	23.560	25.060	1.00	13.75
ATOM	316	CG	LYS	45	20.878	24.556	24.045	1.00	8.83
ATOM	317	CD	LYS	45	20.486	23.863	22.746	1.00	26.87
ATOM	318	CE	LYS	45	19.574	24.688	21.842	1.00	16.58
ATOM	319	NZ	LYS	45	19.318	24.024	20.555	1.00	18.33
ATOM	320	N	PHE	46	20.535	26.236	26.910	1.00	12.34
ATOM	321	CA	PHE	46	19.463	27.048	27.451	1.00	13.32
ATOM	322	C	PHE	46	18.759	27.718	26.343	1.00	18.26

FIG. 5H

ATOM	323	O	PHE	46	19.386	28.093	25.360	1.00	16.83
ATOM	324	CB	PHE	46	19.934	28.101	28.473	1.00	15.29
ATOM	325	CG	PHE	46	20.773	27.495	29.552	1.00	13.81
ATOM	326	CD1	PHE	46	22.132	27.268	29.337	1.00	17.06
ATOM	327	CD2	PHE	46	20.209	27.121	30.774	1.00	8.24
ATOM	328	CE1	PHE	46	22.924	26.693	30.331	1.00	15.95
ATOM	329	CE2	PHE	46	20.979	26.524	31.767	1.00	11.90
ATOM	330	CZ	PHE	46	22.340	26.309	31.540	1.00	8.84
ATOM	331	N	ILE	47	17.440	27.845	26.498	1.00	13.24
ATOM	332	CA	ILE	47	16.588	28.453	25.479	1.00	18.02
ATOM	333	C	ILE	47	15.645	29.460	26.118	1.00	20.14
ATOM	334	O	ILE	47	15.039	29.162	27.148	1.00	17.67
ATOM	335	CB	ILE	47	15.737	27.386	24.801	1.00	22.67
ATOM	336	CG1	ILE	47	16.585	26.271	24.291	1.00	20.66
ATOM	337	CG2	ILE	47	15.024	28.002	23.641	1.00	33.79
ATOM	338	CD1	ILE	47	16.639	26.293	22.805	1.00	23.69
ATOM	339	N	CYS	48	15.564	30.653	25.561	1.00	14.68
ATOM	340	CA	CYS	48	14.681	31.635	26.170	1.00	16.93
ATOM	341	C	CYS	48	13.323	31.352	25.628	1.00	24.18
ATOM	342	O	CYS	48	13.122	31.513	24.453	1.00	20.63
ATOM	343	CB	CYS	48	15.063	33.116	25.885	1.00	16.85
ATOM	344	SG	CYS	48	13.913	34.268	26.712	1.00	22.06
ATOM	345	N	THR	49	12.424	30.871	26.484	1.00	27.31
ATOM	346	CA	THR	49	11.101	30.458	26.042	1.00	32.18
ATOM	347	C	THR	49	10.106	31.572	25.803	1.00	37.51
ATOM	348	O	THR	49	9.150	31.407	25.061	1.00	35.71
ATOM	349	CB	THR	49	10.537	29.417	26.972	1.00	23.66
ATOM	350	OG1	THR	49	10.387	29.989	28.258	1.00	30.10
ATOM	351	CG2	THR	49	11.512	28.226	27.022	1.00	29.98
ATOM	352	N	THR	50	10.314	32.693	26.447	1.00	32.34
ATOM	353	CA	THR	50	9.416	33.810	26.283	1.00	28.67
ATOM	354	C	THR	50	9.836	34.711	25.126	1.00	37.98
ATOM	355	O	THR	50	9.228	35.763	24.904	1.00	39.17
ATOM	356	CB	THR	50	9.251	34.611	27.589	1.00	36.23
ATOM	357	OG1	THR	50	10.512	34.980	28.118	1.00	35.37
ATOM	358	CG2	THR	50	8.507	33.773	28.602	1.00	27.78
ATOM	359	N	GLY	51	10.881	34.282	24.372	1.00	31.04
ATOM	360	CA	GLY	51	11.394	35.059	23.239	1.00	32.42
ATOM	361	C	GLY	51	12.865	35.542	23.427	1.00	48.45
ATOM	362	O	GLY	51	13.779	34.737	23.701	1.00	57.11
ATOM	363	N	LYS	52	13.087	36.862	23.282	1.00	36.08

FIG. 5I

ATOM	364	CA	LYS	52	14.416	37.460	23.416	1.00	35.75
ATOM	365	C	LYS	52	14.827	37.726	24.861	1.00	29.65
ATOM	366	O	LYS	52	14.140	38.420	25.620	1.00	25.70
ATOM	367	CB	LYS	52	14.577	38.714	22.582	1.00	43.37
ATOM	368	CG	LYS	52	15.772	38.649	21.644	1.00	78.17
ATOM	369	N	LEU	53	15.983	37.190	25.250	1.00	19.22
ATOM	370	CA	LEU	53	16.439	37.430	26.596	1.00	13.52
ATOM	371	C	LEU	53	16.717	38.932	26.775	1.00	17.76
ATOM	372	O	LEU	53	17.392	39.539	25.973	1.00	21.59
ATOM	373	CB	LEU	53	17.705	36.567	26.845	1.00	17.39
ATOM	374	CG	LEU	53	18.100	36.435	28.302	1.00	17.43
ATOM	375	CD1	LEU	53	17.048	35.621	29.053	1.00	20.12
ATOM	376	CD2	LEU	53	19.440	35.718	28.368	1.00	16.11
ATOM	377	N	PRO	54	16.197	39.525	27.817	1.00	16.69
ATOM	378	CA	PRO	54	16.324	40.962	28.092	1.00	18.60
ATOM	379	C	PRO	54	17.638	41.414	28.707	1.00	25.39
ATOM	380	O	PRO	54	17.865	42.609	28.861	1.00	18.88
ATOM	381	CB	PRO	54	15.268	41.265	29.139	1.00	22.52
ATOM	382	CG	PRO	54	14.832	39.933	29.720	1.00	26.02
ATOM	383	CD	PRO	54	15.318	38.855	28.779	1.00	21.26
ATOM	384	N	VAL	55	18.435	40.455	29.161	1.00	23.32
ATOM	385	CA	VAL	55	19.746	40.716	29.711	1.00	15.83
ATOM	386	C	VAL	55	20.688	39.868	28.973	1.00	19.38
ATOM	387	O	VAL	55	20.268	39.035	28.219	1.00	20.34
ATOM	388	CB	VAL	55	19.814	40.409	31.147	1.00	17.67
ATOM	389	CG1	VAL	55	18.864	41.340	31.851	1.00	22.52
ATOM	390	CG2	VAL	55	19.402	38.959	31.397	1.00	19.11
ATOM	391	N	PRO	56	21.963	40.070	29.167	1.00	19.37
ATOM	392	CA	PRO	56	22.911	39.258	28.447	1.00	13.09
ATOM	393	C	PRO	56	23.059	37.834	29.038	1.00	5.83
ATOM	394	O	PRO	56	23.067	37.631	30.254	1.00	12.35
ATOM	395	CB	PRO	56	24.231	40.062	28.420	1.00	18.34
ATOM	396	CG	PRO	56	23.851	41.478	28.849	1.00	20.73
ATOM	397	CD	PRO	56	22.525	41.379	29.578	1.00	18.66
ATOM	398	N	TRP	57	23.202	36.848	28.158	1.00	11.12
ATOM	399	CA	TRP	57	23.354	35.458	28.595	1.00	12.55
ATOM	400	C	TRP	57	24.411	35.239	29.700	1.00	14.13
ATOM	401	O	TRP	57	24.178	34.586	30.709	1.00	11.49
ATOM	402	CB	TRP	57	23.604	34.535	27.406	1.00	10.56
ATOM	403	CG	TRP	57	22.335	34.237	26.641	1.00	12.65
ATOM	404	CD1	TRP	57	21.999	34.714	25.426	1.00	16.24

FIG. 5J

ATOM	405	CD2TRP	57	21.281	33.327	27.013	1.00 12.50
ATOM	406	NE1TRP	57	20.784	34.200	25.018	1.00 14.25
ATOM	407	CE2TRP	57	20.315	22.354	25.963	1.00 14.65
ATOM	408	CE3TRP	57	21.052	32.521	28.129	1.00 12.01
ATOM	409	CZ2TRP	57	19.148	32.583	26.007	1.00 14.36
ATOM	410	CZ3TRP	57	19.887	31.767	28.170	1.00 14.23
ATOM	411	CH2TRP	57	18.945	31.818	27.128	1.00 10.01
ATOM	412	N PRO	58	25.594	35.800	29.518	1.00 15.78
ATOM	413	CA PRO	58	26.629	35.616	30.503	1.00 9.53
ATOM	414	C PRO	58	26.241	36.010	31.878	1.00 9.71
ATOM	415	O PRO	58	26.760	35.467	32.825	1.00 11.70
ATOM	416	CB PRO	58	27.833	36.441	30.040	1.00 10.83
ATOM	417	CG PRO	58	27.597	36.748	28.582	1.00 18.50
ATOM	418	CD PRO	58	26.137	36.432	28.278	1.00 15.82
ATOM	419	N THR	59	25.336	36.977	32.021	1.00 7.54
ATOM	420	CA THR	59	24.976	37.366	33.357	1.00 4.53
ATOM	421	C THR	59	24.228	36.258	34.137	1.00 8.41
ATOM	422	O THR	59	24.174	36.261	35.367	1.00 10.57
ATOM	423	CB THR	59	24.187	38.691	33.384	1.00 16.64
ATOM	424	OG1THR	59	22.895	38.480	32.844	1.00 15.51
ATOM	425	CG2THR	59	24.917	39.731	32.542	1.00 15.76
ATOM	426	N LEU	60	23.686	35.304	33.427	1.00 11.99
ATOM	427	CA LEU	60	22.899	34.248	34.073	1.00 9.15
ATOM	428	C LEU	60	23.657	32.944	34.385	1.00 15.62
ATOM	429	O LEU	60	23.118	32.027	35.042	1.00 11.99
ATOM	430	CB LEU	60	21.645	33.914	33.203	1.00 7.67
ATOM	431	CG LEU	60	20.728	35.111	33.042	1.00 14.06
ATOM	432	CD1LEU	60	19.620	34.775	32.062	1.00 14.54
ATOM	433	CD2LEU	60	20.142	35.456	34.394	1.00 10.67
ATOM	434	N VAL	61	24.893	32.837	33.917	1.00 11.27
ATOM	435	CA VAL	61	25.656	31.587	34.094	1.00 4.37
ATOM	436	C VAL	61	25.678	31.013	35.496	1.00 6.02
ATOM	437	O VAL	61	25.385	29.805	35.743	1.00 10.75
ATOM	438	CB VAL	61	27.050	31.643	33.406	1.00 7.14
ATOM	439	CG1VAL	61	27.888	30.396	33.805	1.00 6.47
ATOM	440	CG2VAL	61	26.890	31.745	31.876	1.00 6.63
ATOM	441	N THR	62	26.053	31.843	36.442	1.00 7.02
ATOM	442	CA THR	62	26.178	31.421	37.808	1.00 6.51
ATOM	443	C THR	62	24.862	30.954	38.410	1.00 9.22
ATOM	444	O THR	62	24.801	30.163	39.352	1.00 6.99
ATOM	445	CB THR	62	26.816	32.520	38.660	1.00 16.97

FIG. 5K

ATOM	446	OG1THR	62	26.103	33.744	38.453	1.00	12.00
ATOM	447	CG2THR	62	28.297	32.708	39.225	1.00	8.86
ATOM	448	N THR	63	23.814	31.547	37.910	1.00	9.98
ATOM	449	CA THR	63	22.457	31.212	38.388	1.00	6.69
ATOM	450	C THR	63	22.033	29.830	37.865	1.00	8.14
ATOM	451	O THR	63	21.499	28.984	38.604	1.00	13.48
ATOM	452	CB THR	63	21.458	32.312	37.295	1.00	11.14
ATOM	453	OG1THR	63	21.785	33.498	38.602	1.00	11.75
ATOM	454	OG2THR	63	20.024	31.897	38.296	1.00	9.31
ATOM	455	N PHE	64	22.250	29.620	36.583	1.00	10.19
ATOM	456	CA PHE	64	21.895	28.371	35.995	1.00	8.00
ATOM	457	C PHE	64	22.774	27.253	36.518	1.00	25.26
ATOM	458	O PHE	64	23.313	26.147	36.761	1.00	9.64
ATOM	459	CB PHE	64	22.114	28.438	34.513	1.00	6.88
ATOM	460	CG PHE	64	21.233	29.357	33.750	1.00	10.96
ATOM	461	CD1PHE	64	21.724	29.954	32.593	1.00	9.15
ATOM	462	CD2PHE	64	19.899	29.563	34.106	1.00	14.43
ATOM	463	CE1PHE	64	20.936	30.792	31.805	1.00	14.20
ATOM	464	CE2PHE	64	19.077	30.375	33.317	1.00	13.95
ATOM	465	CZ PHE	64	19.597	30.983	32.171	1.00	16.35
HETATM	466	N1 CRO	66	24.077	27.513	36.610	1.00	11.86
HETATM	467	CG1CRO	66	25.155	25.422	34.796	1.00	16.67
HETATM	468	OG1CRO	66	26.679	27.129	35.461	1.00	14.22
HETATM	469	CB1CRO	66	25.931	26.035	35.930	1.00	10.77
HETATM	470	CA1CRO	66	25.011	26.478	37.078	1.00	7.34
HETATM	471	C1 CRO	66	25.718	26.991	38.253	1.00	17.70
HETATM	472	N2 CRO	66	26.975	27.732	38.216	1.00	9.21
HETATM	473	OH CRO	66	32.894	30.804	36.971	1.00	13.84
HETATM	474	CD2CRO	66	30.487	30.110	39.805	1.00	10.79
HETATM	475	CE2CRO	66	31.614	30.563	39.085	1.00	10.01
HETATM	476	CZ CRO	66	31.718	30.300	37.721	1.00	9.48
HETATM	477	CE1CRO	66	30.707	29.546	37.033	1.00	17.44
HETATM	478	CD1CRO	66	29.541	29.103	37.742	1.00	11.31
HETATM	479	CG2CRO	66	29.437	29.370	39.124	1.00	7.67
HETATM	480	CB2CRO	66	28.329	28.822	39.960	1.00	10.75
HETATM	481	CA2CRO	66	27.197	28.245	39.512	1.00	16.08
HETATM	482	C2 CRO	66	26.043	27.875	40.370	1.00	5.46
HETATM	483	O2 CRO	66	26.022	27.962	41.566	1.00	13.20
HETATM	484	N3 CRO	66	25.240	26.978	39.517	1.00	18.43
HETATM	485	CA3CRO	66	23.840	26.511	39.734	1.00	10.40
HETATM	486	C3 CRO	66	23.413	25.550	40.817	1.00	11.96

FIG. 5L

HETATM	487	O3	CRO	66	22.747	26.014	41.764	1.00	100.00
ATOM	488	N	VAL	68	23.737	24.208	41.005	1.00	29.95
ATOM	489	CA	VAL	68	24.209	22.972	40.304	1.00	17.16
ATOM	490	C	VAL	68	25.692	22.550	40.734	1.00	14.88
ATOM	491	O	VAL	68	26.378	21.821	40.026	1.00	9.03
ATOM	492	CB	VAL	68	23.870	22.899	38.831	1.00	18.94
ATOM	493	CG1	VAL	68	24.685	22.088	37.942	1.00	17.17
ATOM	494	CG2	VAL	68	22.396	22.538	38.680	1.00	18.80
ATOM	495	N	GLN	69	26.129	22.965	41.914	1.00	11.04
ATOM	496	CA	GLN	69	27.465	22.764	42.394	1.00	15.00
ATOM	497	C	GLN	69	27.749	21.366	42.893	1.00	22.46
ATOM	498	O	GLN	69	28.876	21.026	43.154	1.00	15.84
ATOM	499	CB	GLN	69	27.929	23.852	43.414	1.00	10.93
ATOM	500	CG	GLN	69	28.202	25.174	42.615	1.00	14.13
ATOM	501	CD	GLN	69	28.216	26.385	43.520	1.00	17.01
ATOM	502	OE1	GLN	69	27.433	26.476	44.448	1.00	18.94
ATOM	503	NE2	GLN	69	29.151	27.300	43.241	1.00	8.52
ATOM	504	N	CYS	70	26.703	20.540	42.906	1.00	12.10
ATOM	505	CA	CYS	70	26.862	19.171	43.287	1.00	11.84
ATOM	506	C	CYS	70	27.611	18.391	42.175	1.00	10.54
ATOM	507	O	CYS	70	28.036	17.242	42.367	1.00	14.70
ATOM	508	CB	CYS	70	25.476	18.584	43.596	1.00	14.52
ATOM	509	SG	CYS	70	24.325	19.012	42.251	1.00	15.61
ATOM	510	N	PHE	71	27.801	19.029	41.005	1.00	8.64
ATOM	511	CA	PHE	71	28.525	18.419	39.883	1.00	6.59
ATOM	512	C	PHE	71	30.041	18.754	39.876	1.00	16.43
ATOM	513	O	PHE	71	30.753	18.481	38.916	1.00	13.05
ATOM	514	CB	PHE	71	27.951	18.771	38.523	1.00	7.61
ATOM	515	CG	PHE	71	26.669	18.016	38.303	1.00	14.73
ATOM	516	CD1	PHE	71	26.693	16.642	38.050	1.00	10.34
ATOM	517	CD2	PHE	71	25.434	18.660	38.453	1.00	17.14
ATOM	518	CE1	PHE	71	25.506	15.931	37.866	1.00	15.09
ATOM	519	CE2	PHE	71	24.238	17.961	38.300	1.00	20.92
ATOM	520	CZ	PHE	71	24.282	16.598	37.990	1.00	18.49
ATOM	521	N	SER	72	30.500	19.370	40.938	1.00	13.13
ATOM	522	CA	SER	72	31.889	19.715	41.075	1.00	11.65
ATOM	523	C	SER	72	32.689	18.446	41.357	1.00	14.56
ATOM	524	O	SER	72	32.256	17.566	42.122	1.00	10.90
ATOM	525	CB	SER	72	32.075	20.672	42.257	1.00	8.65
ATOM	526	OG	SER	72	31.361	21.874	42.038	1.00	19.29
ATOM	527	N	ARG	73	33.905	18.358	40.794	1.00	16.27

FIG. 5M

ATOM	528	CA	ARG	73	34.695	17.212	41.117	1.00	13.56
ATOM	529	C	ARG	73	35.414	17.426	42.443	1.00	19.96
ATOM	530	O	ARG	73	36.182	18.376	42.599	1.00	16.14
ATOM	531	CB	ARG	73	35.694	16.817	40.013	1.00	16.80
ATOM	532	CG	ARG	73	36.549	15.616	40.460	1.00	20.13
ATOM	533	CD	ARG	73	37.489	15.093	39.381	1.00	28.47
ATOM	534	NE	ARG	73	38.743	15.859	39.260	1.00	25.48
ATOM	535	CZ	ARG	73	39.756	15.777	40.127	1.00	28.04
ATOM	536	NH1	ARG	73	39.688	15.004	41.195	1.00	28.76
ATOM	537	NH2	ARG	73	40.865	16.504	39.918	1.00	39.65
ATOM	538	N	TYR	74	35.151	16.561	43.424	1.00	12.05
ATOM	539	CA	TYR	74	35.861	16.659	44.690	1.00	11.57
ATOM	540	C	TYR	74	36.946	15.566	44.721	1.00	25.02
ATOM	541	O	TYR	74	36.658	14.387	44.558	1.00	19.71
ATOM	542	CB	TYR	74	34.978	16.528	45.934	1.00	15.51
ATOM	543	CG	TYR	74	34.395	17.850	46.402	1.00	16.59
ATOM	544	CD1	TYR	74	33.455	18.546	45.631	1.00	14.44
ATOM	545	CD2	TYR	74	34.799	18.399	47.618	1.00	15.94
ATOM	546	CE1	TYR	74	32.901	19.756	46.059	1.00	7.99
ATOM	547	CE2	TYR	74	34.261	19.612	48.058	1.00	18.29
ATOM	548	CZ	TYR	74	33.294	20.276	47.298	1.00	13.87
ATOM	549	OH	TYR	74	32.829	21.507	47.738	1.00	18.39
ATOM	550	N	PRO	75	38.181	15.947	44.902	1.00	19.20
ATOM	551	CA	PRO	75	39.213	14.940	44.995	1.00	18.42
ATOM	552	C	PRO	75	38.958	13.993	46.175	1.00	15.60
ATOM	553	O	PRO	75	39.373	14.361	47.174	1.00	11.99
ATOM	554	CB	PRO	75	40.514	15.681	45.196	1.00	18.31
ATOM	555	CG	PRO	75	40.242	17.158	44.868	1.00	24.81
ATOM	556	CD	PRO	75	38.742	17.306	44.694	1.00	15.41
ATOM	557	N	ASP	76	39.433	12.756	46.038	1.00	18.63
ATOM	558	CA	ASP	76	39.269	11.770	47.062	1.00	16.19
ATOM	559	C	ASP	76	39.581	12.280	48.431	1.00	15.92
ATOM	560	O	ASP	76	38.862	12.042	49.389	1.00	17.35
ATOM	561	CB	ASP	76	40.083	10.507	46.790	1.00	18.69
ATOM	562	CG	ASP	76	39.826	9.432	47.825	1.00	24.04
ATOM	563	OD1	ASP	76	40.523	9.268	48.817	1.00	29.72
ATOM	564	OD2	ASP	76	38.732	8.743	47.584	1.00	40.96
ATOM	565	N	HIS	77	40.647	12.984	48.561	1.00	18.79
ATOM	566	CA	HIS	77	40.978	13.418	49.877	1.00	19.36
ATOM	567	C	HIS	77	40.117	14.507	50.397	1.00	24.57
ATOM	568	O	HIS	77	40.205	14.826	51.551	1.00	27.15

FIG. 5N

ATOM	569	CB HIS	77	42.435	13.806	50.042	1.00 19.84
ATOM	570	CG HIS	77	42.743	15.035	49.322	1.00 17.31
ATOM	571	ND1HIS	77	42.925	15.028	47.953	1.00 21.86
ATOM	572	CD2HIS	77	42.925	16.295	49.774	1.00 18.70
ATOM	573	CE1 HIS	77	43.203	16.289	47.593	1.00 17.49
ATOM	574	NE2 HIS	77	43.213	17.069	48.668	1.00 18.11
ATOM	575	N MSE	78	39.277	15.069	49.565	1.00 25.36
ATOM	576	CA MSE	78	38.412	16.140	50.026	1.00 24.65
ATOM	577	C MSE	78	36.920	15.774	50.066	1.00 26.47
ATOM	578	O MSE	78	36.070	16.636	50.260	1.00 28.16
ATOM	579	CB MSE	78	38.596	17.331	49.121	1.00 26.38
ATOM	580	CG MSE	78	39.803	18.177	49.406	1.00 27.01
ATOM	581	SE MSE	78	39.987	19.608	48.177	1.00 43.09
ATOM	582	CE MSE	78	38.874	20.873	49.044	1.00 27.11
ATOM	583	N LYS	79	36.606	14.509	49.856	1.00 18.68
ATOM	584	CA LYS	79	35.216	14.061	49.853	1.00 21.54
ATOM	585	C LYS	79	34.406	14.449	51.082	1.00 20.21
ATOM	586	O LYS	79	33.186	14.652	51.025	1.00 21.08
ATOM	587	CB LYS	79	35.152	12.581	49.612	1.00 23.48
ATOM	588	CG LYS	79	35.859	12.225	48.317	1.00 41.09
ATOM	589	CD LYS	79	35.159	11.134	47.535	1.00 34.66
ATOM	590	CE LYS	79	35.796	10.881	46.181	1.00 53.46
ATOM	591	NZ LYS	79	35.084	11.549	45.080	1.00 49.53
ATOM	592	N ARG	80	35.069	14.542	52.213	1.00 19.77
ATOM	593	CA ARG	80	34.365	14.874	53.434	1.00 20.13
ATOM	594	C ARG	80	33.898	16.311	53.481	1.00 26.42
ATOM	595	O ARG	80	33.251	16.717	54.467	1.00 23.51
ATOM	596	CB ARG	80	35.155	14.549	54.700	1.00 24.58
ATOM	597	CG ARG	80	36.204	15.620	55.034	1.00 29.71
ATOM	598	CD ARG	80	36.964	15.344	56.335	1.00 61.30
ATOM	599	NE ARG	80	36.551	16.230	57.415	1.00 71.14
ATOM	600	CZ ARG	80	37.398	16.882	58.192	1.00 100.00
ATOM	601	NH1ARG	80	38.714	16.758	48.040	1.00 100.00
ATOM	602	NH2ARG	80	36.917	17.679	59.155	1.00 99.06
ATOM	603	N HIS	81	34.275	17.121	52.473	1.00 18.77
ATOM	604	CA HIS	81	33.903	18.547	52.499	1.00 19.60
ATOM	605	C HIS	81	32.841	18.883	51.486	1.00 18.62
ATOM	606	O HIS	81	32.557	20.043	51.295	1.00 17.76
ATOM	607	CB HIS	81	35.129	19.472	52.283	1.00 20.39
ATOM	608	CG HIS	81	36.221	19.224	53.305	1.00 28.02
ATOM	609	ND1HIS	81	36.127	19.701	54.618	1.00 30.59

FIG. 50

ATOM	610	CD2HIS	81	37.392	18.535	53.202	1.00	29.02
ATOM	611	CE1HIS	81	37.218	19.308	55.265	1.00	26.24
ATOM	612	NE2HIS	81	37.991	18.603	54.452	1.00	28.18
ATOM	613	N ASP	82	32.298	17.843	50.841	1.00	12.20
ATOM	614	CA ASP	82	31.358	18.011	49.769	1.00	13.24
ATOM	615	C ASP	82	29.922	18.148	50.259	1.00	24.30
ATOM	616	O ASP	82	29.175	17.195	50.243	1.00	16.55
ATOM	617	CB ASP	82	31.480	16.917	48.730	1.00	12.23
ATOM	618	CG ASP	82	30.642	17.209	47.518	1.00	9.92
ATOM	619	OD1ASP	82	29.870	18.134	47.459	1.00	20.31
ATOM	620	OD2ASP	82	30.938	16.466	46.507	1.00	11.12
ATOM	621	N PHE	83	29.566	19.353	50.705	1.00	23.66
ATOM	622	CA PHE	83	28.220	19.634	51.201	1.00	20.23
ATOM	623	C PHE	83	27.154	19.333	50.168	1.00	20.93
ATOM	624	O PHE	83	26.116	18.733	50.503	1.00	15.97
ATOM	625	CB PHE	83	28.077	21.106	51.666	1.00	19.59
ATOM	626	CG PHE	83	26.624	21.613	51.805	1.00	16.91
ATOM	627	CD1PHE	83	25.946	21.498	53.021	1.00	17.76
ATOM	628	CD2PHE	83	25.968	22.236	50.734	1.00	18.88
ATOM	629	CE1PHE	83	24.635	21.960	53.156	1.00	24.13
ATOM	630	CE2PHE	83	24.650	22.690	50.840	1.00	19.24
ATOM	631	CZ PHE	83	24.001	22.575	52.068	1.00	20.67
ATOM	632	N PHE	84	27.432	19.784	48.921	1.00	14.06
ATOM	633	CA PHE	84	26.515	19.693	47.809	1.00	12.96
ATOM	634	C PHE	84	25.893	18.332	47.602	1.00	24.96
ATOM	635	O PHE	84	24.674	18.200	47.534	1.00	21.55
ATOM	636	CB PHE	84	27.085	20.265	46.513	1.00	13.44
ATOM	637	CG PHE	84	27.630	21.645	46.721	1.00	14.27
ATOM	638	CD1PHE	84	29.001	21.845	46.890	1.00	15.17
ATOM	639	CD2PHE	84	26.781	22.753	46.752	1.00	13.48
ATOM	640	CE1PHE	84	29.520	23.129	47.073	1.00	14.63
ATOM	641	CE2PHE	84	27.276	24.041	46.969	1.00	16.34
ATOM	642	CZ PHE	84	28.650	24.221	47.137	1.00	15.77
ATOM	643	N LYS	85	26.738	17.330	47.482	1.00	14.07
ATOM	644	CA LYS	85	26.294	15.985	47.283	1.00	13.30
ATOM	645	C LYS	85	25.657	15.371	48.547	1.00	13.43
ATOM	646	O LYS	85	24.773	14.509	48.429	1.00	18.46
ATOM	647	CB LYS	85	27.434	15.089	46.757	1.00	17.38
ATOM	648	CG LYS	85	27.873	15.372	45.323	1.00	13.93
ATOM	649	CD LYS	85	28.969	14.381	44.888	1.00	13.23
ATOM	650	CE LYS	85	29.766	14.819	43.662	1.00	10.36

FIG. 5P

ATOM	651	NZ	LYS	85	30.319	16.185	43.773	1.00	12.92
ATOM	652	N	SER	86	26.119	15.795	49.752	1.00	11.03
ATOM	653	CA	SER	86	25.610	15.267	50.998	1.00	12.09
ATOM	654	C	SER	86	24.156	15.639	51.240	1.00	21.58
ATOM	655	O	SER	86	23.452	14.979	52.013	1.00	19.89
ATOM	656	CB	SER	86	26.448	15.661	52.208	1.00	16.45
ATOM	657	OG	SER	86	26.308	17.042	52.495	1.00	22.05
ATOM	658	N	ALA	87	23.705	16.698	50.582	1.00	15.09
ATOM	659	CA	ALA	87	22.333	17.138	50.762	1.00	19.52
ATOM	660	C	ALA	87	21.337	16.399	49.870	1.00	18.60
ATOM	661	O	ALA	87	20.162	16.557	50.040	1.00	19.55
ATOM	662	CB	ALA	87	22.204	18.647	50.632	1.00	19.23
ATOM	663	N	MSE	88	21.835	15.536	48.976	1.00	14.05
ATOM	664	CA	MSE	88	21.007	14.796	48.035	1.00	15.32
ATOM	665	C	MSE	88	20.496	13.448	48.579	1.00	21.48
ATOM	666	O	MSE	88	21.109	12.876	49.457	1.00	23.03
ATOM	667	CB	MSE	88	21.848	14.593	46.791	1.00	16.98
ATOM	668	CG	MSE	88	22.263	15.891	46.131	1.00	10.66
ATOM	669	SE	MSE	88	20.737	16.894	45.394	1.00	31.99
ATOM	670	CE	MSE	88	21.318	18.684	45.748	1.00	28.86
ATOM	671	N	PRO	89	19.363	12.930	48.084	1.00	14.78
ATOM	672	CA	PRO	89	18.552	13.475	47.008	1.00	14.80
ATOM	673	C	PRO	89	17.572	14.611	47.385	1.00	12.10
ATOM	674	O	PRO	89	17.085	15.301	46.493	1.00	18.06
ATOM	675	CB	PRO	89	17.733	12.294	46.494	1.00	17.00
ATOM	676	CG	PRO	89	17.726	11.261	47.607	1.00	15.83
ATOM	677	CD	PRO	89	18.844	11.642	48.560	1.00	17.16
ATOM	678	N	GLU	90	17.278	14.795	48.695	1.00	14.63
ATOM	679	CA	GLU	90	16.348	15.838	49.157	1.00	20.68
ATOM	680	C	GLU	90	16.701	17.229	48.645	1.00	25.59
ATOM	681	O	GLU	90	15.833	18.042	48.368	1.00	21.57
ATOM	682	CB	GLU	90	16.031	15.816	50.682	1.00	22.21
ATOM	683	CG	GLU	90	15.782	14.403	51.228	1.00	37.69
ATOM	684	CD	GLU	90	17.071	13.641	51.447	1.00	83.49
ATOM	685	OE1	GLU	90	18.179	14.151	51.342	1.00	54.80
ATOM	686	OE2	GLU	90	16.875	12.373	51.749	1.00	64.65
ATOM	687	N	GLY	91	17.977	17.509	48.510	1.00	21.39
ATOM	688	CA	GLY	91	18.394	18.769	47.906	1.00	17.77
ATOM	689	C	GLY	91	18.673	19.911	48.839	1.00	12.17
ATOM	690	O	GLY	91	18.769	19.764	50.055	1.00	16.81
ATOM	691	N	TYR	92	18.861	21.086	48.225	1.00	13.02

FIG. 5Q

ATOM	692	CA	TYR	92	19.143	22.266	48.994	1.00	10.33
ATOM	693	C	TYR	92	18.575	23.478	48.347	1.00	9.87
ATOM	694	O	TYR	92	18.270	23.483	47.144	1.00	15.89
ATOM	695	CB	TYR	92	20.678	22.488	49.278	1.00	15.40
ATOM	696	CG	TYR	92	21.546	22.468	48.012	1.00	15.13
ATOM	697	CD1	TYR	92	21.620	23.576	47.166	1.00	14.75
ATOM	698	CD2	TYR	92	22.317	21.350	47.683	1.00	16.09
ATOM	699	CE1	TYR	92	22.404	23.561	46.006	1.00	6.50
ATOM	700	CE2	TYR	92	23.067	21.300	46.504	1.00	15.12
ATOM	701	CZ	TYR	92	23.156	22.424	45.683	1.00	18.13
ATOM	702	OH	TYR	92	23.944	22.393	44.517	1.00	13.37
ATOM	703	N	VAL	93	18.447	24.504	49.189	1.00	11.93
ATOM	704	CA	VAL	93	18.025	25.822	48.778	1.00	14.74
ATOM	705	C	VAL	93	19.281	26.666	48.625	1.00	16.00
ATOM	706	O	VAL	93	20.172	26.625	49.451	1.00	16.16
ATOM	707	CB	VAL	93	17.073	26.480	49.791	1.00	23.45
ATOM	708	CG1	VAL	93	16.855	27.937	49.413	1.00	26.05
ATOM	709	CG2	VAL	93	15.716	25.764	49.771	1.00	22.90
ATOM	710	N	GLN	94	19.361	27.345	47.521	1.00	13.78
ATOM	711	CA	GLN	94	20.480	28.195	47.227	1.00	10.53
ATOM	712	C	GLN	94	19.948	29.583	46.998	1.00	12.23
ATOM	713	O	GLN	94	19.153	29.788	46.061	1.00	15.52
ATOM	714	CB	GLN	94	21.232	27.727	45.934	1.00	7.95
ATOM	715	CG	GLN	94	22.361	28.708	45.469	1.00	11.87
ATOM	716	CD	GLN	94	23.431	27.999	44.632	1.00	12.04
ATOM	717	OE1	GLN	94	23.805	26.879	44.946	1.00	13.60
ATOM	718	NE2	GLN	94	23.719	28.527	43.449	1.00	7.98
ATOM	719	N	GLU	95	20.396	30.531	47.820	1.00	11.78
ATOM	720	CA	GLU	95	19.974	31.899	47.643	1.00	13.47
ATOM	721	C	GLU	95	21.149	32.804	47.398	1.00	18.42
ATOM	722	O	GLU	95	22.206	32.623	47.985	1.00	19.23
ATOM	723	CB	GLU	95	19.277	32.427	48.878	1.00	13.52
ATOM	724	CG	GLU	95	18.009	31.684	49.215	1.00	28.46
ATOM	725	CD	GLU	95	17.657	32.016	50.622	1.00	45.93
ATOM	726	OE1	GLU	95	17.574	33.166	51.011	1.00	100.00
ATOM	727	OE2	GLU	95	17.764	30.987	51.423	1.00	61.33
ATOM	728	N	ARG	96	20.929	33.838	46.601	1.00	16.51
ATOM	729	CA	ARG	96	21.978	34.783	46.342	1.00	16.87
ATOM	730	C	ARG	96	21.510	36.195	46.206	1.00	15.84
ATOM	731	O	ARG	96	20.389	36.488	45.806	1.00	15.01
ATOM	732	CB	ARG	96	22.582	34.463	44.967	1.00	16.19

FIG. 5R

ATOM	733	CG ARG	96	23.495	33.247	44.929	1.00	17.61
ATOM	734	CD ARG	96	24.615	33.453	43.908	1.00	9.06
ATOM	735	NE ARG	96	25.411	32.277	43.766	1.00	9.88
ATOM	736	CZ ARG	96	25.434	31.493	42.693	1.00	20.03
ATOM	737	NH1ARG	96	24.684	31.709	41.615	1.00	15.29
ATOM	738	NH2ARG	96	26.236	30.430	42.714	1.00	11.03
ATOM	739	N THR	97	22.470	37.068	46.344	1.00	13.39
ATOM	740	CA THR	97	22.368	38.424	45.935	1.00	13.12
ATOM	741	C THR	97	23.593	38.688	45.084	1.00	16.81
ATOM	742	O THR	97	24.686	38.347	45.485	1.00	19.25
ATOM	743	CB THR	97	22.282	39.442	47.066	1.00	26.27
ATOM	744	OG1THR	97	21.225	39.101	47.945	1.00	31.43
ATOM	745	CG2THR	97	22.038	40.804	46.445	1.00	15.90
ATOM	746	N ILE	98	23.396	39.219	43.899	1.00	16.23
ATOM	747	CA ILE	98	24.486	39.526	42.977	1.00	16.70
ATOM	748	C ILE	98	24.533	41.017	42.686	1.00	21.10
ATOM	749	O ILE	98	23.628	41.566	42.075	1.00	14.58
ATOM	750	CB ILE	98	24.385	38.752	41.660	1.00	13.47
ATOM	751	CG1ILE	98	24.480	37.236	41.890	1.00	16.09
ATOM	752	CG2ILE	98	25.457	39.231	40.679	1.00	13.30
ATOM	753	CD1ILE	98	23.875	36.431	40.738	1.00	13.93
ATOM	754	N PHE	99	25.613	41.678	43.110	1.00	14.86
ATOM	755	CA PHE	99	25.719	43.098	42.896	1.00	12.44
ATOM	756	C PHE	99	26.514	43.441	41.699	1.00	20.37
ATOM	757	O PHE	99	27.696	43.164	41.700	1.00	20.07
ATOM	758	CB PHE	99	26.401	43.770	44.084	1.00	15.96
ATOM	759	CG PHE	99	25.638	43.624	45.356	1.00	21.41
ATOM	760	CD1PHE	99	25.863	42.524	46.189	1.00	24.98
ATOM	761	CD2PHE	99	24.698	44.585	45.743	1.00	22.94
ATOM	762	CE1PHE	99	25.176	42.400	47.400	1.00	32.06
ATOM	763	CE2PHE	99	23.992	44.469	46.946	1.00	24.26
ATOM	764	CZ PHE	99	24.235	43.369	47.771	1.00	28.19
ATOM	765	N PHE	100	25.906	44.085	40.704	1.00	12.53
ATOM	766	CA PHE	100	26.679	44.522	39.554	1.00	8.75
ATOM	767	C PHE	100	27.294	45.855	39.872	1.00	21.81
ATOM	768	O PHE	100	26.599	46.775	40.308	1.00	20.31
ATOM	769	CB PHE	100	25.927	44.572	38.226	1.00	5.94
ATOM	770	CG PHE	100	25.537	43.183	37.764	1.00	12.75
ATOM	771	CD1PHE	100	24.426	42.538	38.325	1.00	16.31
ATOM	772	CD2PHE	100	26.317	42.484	36.843	1.00	15.27
ATOM	773	CE1PHE	100	24.087	41.230	37.975	1.00	13.50

FIG. 5S

ATOM	774	CE2 PHE	100	25.965	41.192	36.435	1.00 21.25
ATOM	775	CZ PHE	100	24.852	40.567	37.014	1.00 21.06
ATOM	776	N LYS	101	28.603	45.946	39.737	1.00 15.49
ATOM	777	CA LYS	101	29.270	47.179	40.085	1.00 17.93
ATOM	778	C LYS	101	28.732	48.349	39.287	1.00 13.71
ATOM	779	O LYS	101	28.658	48.304	38.072	1.00 17.18
ATOM	780	CB LYS	101	30.784	47.069	39.950	1.00 17.13
ATOM	781	CG LYS	101	31.518	48.252	40.551	1.00 18.01
ATOM	782	CD LYS	101	33.036	48.060	40.534	1.00 26.70
ATOM	783	CE LYS	101	33.797	49.116	41.332	1.00 41.58
ATOM	784	N ASP	102	28.353	49.403	39.997	1.00 18.09
ATOM	785	CA ASP	102	27.805	50.618	39.368	1.00 23.08
ATOM	786	C ASP	102	26.559	50.356	38.549	1.00 25.42
ATOM	787	O ASP	102	26.292	51.061	37.586	1.00 23.34
ATOM	788	CB ASP	102	28.840	51.369	38.516	1.00 26.27
ATOM	789	CG ASP	102	30.109	51.629	39.296	1.00 57.01
ATOM	790	OD1ASP	102	31.206	51.233	38.931	1.00 63.33
ATOM	791	OD2ASP	102	29.886	52.200	40.464	1.00 47.66
ATOM	792	N ASP	103	25.813	49.328	38.933	1.00 20.17
ATOM	793	CA ASP	103	24.602	48.949	38.233	1.00 15.70
ATOM	794	C ASP	103	23.608	48.284	39.189	1.00 18.47
ATOM	795	O ASP	103	23.749	48.431	40.409	1.00 17.72
ATOM	796	CB ASP	103	24.899	48.085	36.995	1.00 19.89
ATOM	797	CG ASP	103	23.946	48.387	35.860	1.00 23.93
ATOM	798	OD1ASP	103	24.238	48.274	34.688	1.00 19.05
ATOM	799	OD2ASP	103	22.774	48.809	36.283	1.00 23.89
ATOM	800	N GLY	104	22.612	47.542	38.646	1.00 20.17
ATOM	801	CA GLY	104	21.598	46.900	39.498	1.00 20.22
ATOM	802	C GLY	104	22.055	45.619	40.180	1.00 24.68
ATOM	803	O GLY	104	23.202	45.211	40.085	1.00 18.06
ATOM	804	N ASN	105	21.125	44.967	40.872	1.00 15.71
ATOM	805	CA ASN	105	21.425	43.703	41.510	1.00 8.89
ATOM	806	C ASN	105	20.399	42.620	41.181	1.00 21.85
ATOM	807	O ASN	105	19.255	42.911	40.824	1.00 15.17
ATOM	808	CB ASN	105	21.605	43.840	43.001	1.00 8.58
ATOM	809	CG ASN	105	20.359	44.366	43.697	1.00 43.57
ATOM	810	OD1ASN	105	19.565	43.601	44.259	1.00 36.67
ATOM	811	ND2ASN	105	20.178	45.674	43.659	1.00 36.47
ATOM	812	N TYR	106	20.826	41.365	41.328	1.00 16.80
ATOM	813	CA TYR	106	19.966	40.219	41.156	1.00 13.90
ATOM	814	C TYR	106	19.763	39.543	42.475	1.00 11.05

FIG. 5T

ATOM	815	O	TYR	106	20.678	39.404	43.281	1.00	13.86
ATOM	816	CB	TYR	106	20.547	39.128	40.246	1.00	15.88
ATOM	817	CG	TYR	106	20.619	39.398	38.793	1.00	15.57
ATOM	818	CD1	TYR	106	19.952	40.458	38.178	1.00	13.14
ATOM	819	CD2	TYR	106	21.373	38.524	38.006	1.00	13.35
ATOM	820	CE1	TYR	106	20.038	40.632	36.793	1.00	13.44
ATOM	821	CE2	TYR	106	21.481	38.692	36.628	1.00	10.87
ATOM	822	CZ	TYR	106	20.814	39.751	36.025	1.00	15.93
ATOM	823	OH	TYR	106	20.970	39.931	34.670	1.00	17.32
ATOM	824	N	LYS	107	18.538	39.115	42.709	1.00	12.39
ATOM	825	CA	LYS	107	18.194	38.349	43.897	1.00	11.51
ATOM	826	C	LYS	107	17.619	37.037	43.397	1.00	17.25
ATOM	827	O	LYS	107	16.704	37.010	42.562	1.00	13.14
ATOM	828	CB	LYS	107	17.217	39.063	44.823	1.00	14.82
ATOM	829	CG	LYS	107	17.860	39.631	46.060	1.00	40.71
ATOM	830	CD	LYS	107	18.528	40.974	45.793	1.00	43.48
ATOM	831	N	THR	108	18.205	35.951	43.835	1.00	14.95
ATOM	832	CA	THR	108	17.774	34.658	43.352	1.00	11.97
ATOM	833	C	THR	108	17.463	33.696	44.468	1.00	15.81
ATOM	834	O	THR	108	18.043	33.734	45.582	1.00	18.68
ATOM	835	CB	THR	108	18.847	34.034	42.410	1.00	23.81
ATOM	836	OG1	THR	108	20.064	33.791	43.137	1.00	13.88
ATOM	837	CG2	THR	108	19.123	34.968	41.264	1.00	13.04
ATOM	838	N	ARG	109	16.560	32.804	44.154	1.00	13.57
ATOM	839	CA	ARG	109	16.212	31.751	45.048	1.00	12.56
ATOM	840	C	ARG	109	15.939	30.498	44.254	1.00	13.07
ATOM	841	O	ARG	109	15.239	30.509	43.249	1.00	12.52
ATOM	842	CB	ARG	109	15.069	32.100	45.959	1.00	17.32
ATOM	843	CG	ARG	109	14.767	30.995	46.932	1.00	17.92
ATOM	844	CD	ARG	109	13.400	31.160	47.610	1.00	19.99
ATOM	845	NE	ARG	109	12.821	29.854	47.883	1.00	36.05
ATOM	846	CZ	ARG	109	12.968	29.244	49.035	1.00	55.71
ATOM	847	NH1	ARG	109	13.630	29.815	50.046	1.00	44.11
ATOM	848	NH2	ARG	109	12.432	28.041	49.195	1.00	94.34
ATOM	849	N	ALA	110	16.577	29.414	44.635	1.00	13.26
ATOM	850	CA	ALA	110	16.377	28.207	43.870	1.00	12.68
ATOM	851	C	ALA	110	16.346	26.979	44.734	1.00	13.15
ATOM	852	O	ALA	110	16.829	26.965	45.869	1.00	16.75
ATOM	853	CB	ALA	110	17.465	28.059	42.822	1.00	17.31
ATOM	854	N	GLU	111	15.770	25.939	44.176	1.00	15.39
ATOM	855	CA	GLU	111	15.741	24.655	44.823	1.00	15.24

FIG. 5U

ATOM	856	C	GLU	111	16.438	23.678	43.926	1.00	12.08
ATOM	857	O	GLU	111	16.086	23.545	42.771	1.00	15.70
ATOM	858	CB	GLU	111	14.303	24.123	44.993	1.00	19.20
ATOM	859	CG	GLU	111	13.744	24.242	46.399	1.00	38.62
ATOM	860	CD	GLU	111	12.247	24.280	46.372	1.00	60.99
ATOM	861	OE1	GLU	111	11.589	23.843	45.432	1.00	76.05
ATOM	862	OE2	GLU	111	11.742	24.956	47.380	1.00	54.87
ATOM	863	N	VAL	112	17.438	22.965	44.457	1.00	10.78
ATOM	864	CA	VAL	112	18.063	21.978	43.631	1.00	10.98
ATOM	865	C	VAL	112	17.968	20.630	44.261	1.00	8.62
ATOM	866	O	VAL	112	18.271	20.438	45.432	1.00	15.63
ATOM	867	CB	VAL	112	19.428	22.358	43.012	1.00	22.75
ATOM	868	CG1	VAL	112	19.966	23.704	43.487	1.00	16.69
ATOM	869	CG2	VAL	112	20.452	21.232	43.078	1.00	18.47
ATOM	870	N	LYS	113	17.415	19.732	43.516	1.00	14.67
ATOM	871	CA	LYS	113	17.175	18.421	44.045	1.00	16.41
ATOM	872	C	LYS	113	16.822	17.485	42.931	1.00	7.11
ATOM	873	O	LYS	113	16.695	17.893	41.808	1.00	16.27
ATOM	874	CB	LYS	113	16.032	18.497	45.036	1.00	22.50
ATOM	875	CG	LYS	113	14.792	19.084	44.376	1.00	20.40
ATOM	876	CD	LYS	113	13.509	18.321	44.703	1.00	44.65
ATOM	877	CE	LYS	113	12.526	19.134	45.528	1.00	54.02
ATOM	878	NZ	LYS	113	12.379	20.518	45.036	1.00	100.00
ATOM	879	N	PHE	114	16.683	16.208	43.267	1.00	10.09
ATOM	880	CA	PHE	114	16.325	15.175	42.317	1.00	11.41
ATOM	881	C	PHE	114	14.806	14.975	42.181	1.00	14.18
ATOM	882	O	PHE	114	14.110	14.878	43.160	1.00	15.03
ATOM	883	CB	PHE	114	16.866	13.838	42.838	1.00	12.89
ATOM	884	CG	PHE	114	18.231	13.536	42.338	1.00	16.80
ATOM	885	CD1	PHE	114	19.344	13.795	43.139	1.00	18.61
ATOM	886	CD2	PHE	114	18.403	13.009	41.056	1.00	19.50
ATOM	887	CE1	PHE	114	20.627	13.500	42.665	1.00	22.78
ATOM	888	CE2	PHE	114	19.673	12.708	40.572	1.00	25.36
ATOM	889	CZ	PHE	114	20.780	12.953	41.387	1.00	23.99
ATOM	890	N	GLU	115	14.354	14.819	40.966	1.00	15.29
ATOM	891	CA	GLU	115	12.978	14.473	40.642	1.00	11.40
ATOM	892	C	GLU	115	13.121	13.193	39.906	1.00	13.30
ATOM	893	O	GLU	115	13.434	13.207	38.730	1.00	18.72
ATOM	894	CB	GLU	115	12.348	15.481	39.667	1.00	9.68
ATOM	895	CG	GLU	115	11.856	16.747	40.376	1.00	19.54
ATOM	896	CD	GLU	115	10.742	16.460	41.342	1.00	38.12

FIG. 5V

ATOM	897	OE1 GLU	115	10.181	15.395	41.431	1.00 34.84
ATOM	898	OE2 GLU	115	10.460	17.461	42.079	1.00 27.88
ATOM	899	N GLY	116	13.005	12.087	40.585	1.00 14.51
ATOM	900	CA GLY	116	13.225	10.861	39.869	1.00 15.91
ATOM	901	C GLY	116	14.727	10.767	39.641	1.00 23.59
ATOM	902	O GLY	116	15.516	10.922	40.570	1.00 19.35
ATOM	903	N ASP	117	15.137	10.564	38.439	1.00 20.26
ATOM	904	CA ASP	117	16.572	10.462	38.233	1.00 28.00
ATOM	905	C ASP	117	17.237	11.677	37.598	1.00 22.39
ATOM	906	O ASP	117	18.423	11.672	37.265	1.00 21.38
ATOM	907	CB ASP	117	17.055	9.074	37.733	1.00 33.06
ATOM	908	CG ASP	117	16.624	8.677	36.348	1.00 55.04
ATOM	909	OD1ASP	117	16.230	9.468	35.495	1.00 59.57
ATOM	910	OD2ASP	117	16.805	7.391	36.130	1.00 82.48
ATOM	911	N THR	118	16.463	12.729	37.493	1.00 19.62
ATOM	912	CA THR	118	16.889	13.981	36.910	1.00 18.21
ATOM	913	C THR	118	17.186	14.988	37.976	1.00 18.92
ATOM	914	O THR	118	16.498	15.064	38.996	1.00 15.94
ATOM	915	CB THR	118	15.806	14.497	35.952	1.00 19.03
ATOM	916	OG1THR	118	15.552	13.508	34.990	1.00 21.42
ATOM	917	CG2THR	118	16.217	15.793	35.275	1.00 15.49
ATOM	918	N LEU	119	18.284	15.681	37.805	1.00 13.66
ATOM	919	CA LEU	119	18.679	16.706	38.759	1.00 13.50
ATOM	920	C LEU	119	18.036	17.992	38.269	1.00 8.81
ATOM	921	O LEU	119	18.194	18.368	37.091	1.00 12.49
ATOM	922	CB LEU	119	20.243	16.815	38.839	1.00 12.25
ATOM	923	CG LEU	119	20.845	17.678	39.951	1.00 3.90
ATOM	924	CD1LEU	119	20.701	19.167	39.669	1.00 10.11
ATOM	925	CD2LEU	119	20.366	17.311	41.333	1.00 7.86
ATOM	926	N VAL	120	17.230	18.595	39.170	1.00 13.34
ATOM	927	CA VAL	120	16.466	19.797	38.859	1.00 13.77
ATOM	928	C VAL	120	16.929	21.039	39.587	1.00 8.56
ATOM	929	O VAL	120	17.135	21.039	40.762	1.00 13.32
ATOM	930	CB VAL	120	14.939	19.566	39.082	1.00 17.60
ATOM	931	CG1VAL	120	14.133	20.790	38.642	1.00 17.58
ATOM	932	CG2VAL	120	14.501	18.351	38.246	1.00 15.35
ATOM	933	N ASN	121	17.067	22.111	38.839	1.00 12.24
ATOM	934	CA ASN	121	17.424	23.405	39.400	1.00 11.78
ATOM	935	C ASN	121	16.301	24.382	39.060	1.00 11.18
ATOM	936	O ASN	121	16.195	24.802	37.934	1.00 11.09
ATOM	937	CB ASN	121	18.753	23.928	38.791	1.00 11.41

FIG. 5W

ATOM	938	CG	ASN	121	19.201	25.261	39.367	1.00	11.07
ATOM	939	OD	ASN	121	18.773	25.654	40.461	1.00	12.06
ATOM	940	ND2	ASN	121	20.124	25.938	38.670	1.00	11.90
ATOM	941	N	ARG	122	15.470	24.706	40.029	1.00	13.69
ATOM	942	CA	ARG	122	14.348	25.610	39.825	1.00	12.99
ATOM	943	C	ARG	122	14.622	26.946	40.498	1.00	5.89
ATOM	944	O	ARG	122	14.749	27.011	41.723	1.00	14.47
ATOM	945	CB	ARG	122	13.068	25.025	40.417	1.00	15.99
ATOM	946	CG	ARG	122	12.478	23.921	39.589	1.00	30.23
ATOM	947	CD	ARG	122	11.282	23.244	40.281	1.00	60.61
ATOM	948	N	ILE	123	14.663	27.992	39.680	1.00	11.46
ATOM	949	CA	ILE	123	15.030	29.340	40.095	1.00	11.86
ATOM	950	C	ILE	123	13.991	30.450	39.835	1.00	10.54
ATOM	951	O	ILE	123	13.370	30.535	38.765	1.00	12.83
ATOM	952	CB	ILE	123	16.296	29.757	39.292	1.00	15.41
ATOM	953	CG1	ILE	123	17.316	28.585	39.180	1.00	12.27
ATOM	954	CG2	ILE	123	16.944	30.993	39.918	1.00	14.01
ATOM	955	CD1	ILE	123	17.652	28.242	37.743	1.00	7.74
ATOM	956	N	GLU	124	13.953	31.358	40.793	1.00	11.36
ATOM	957	CA	GLU	124	13.189	32.752	40.700	1.00	15.20
ATOM	958	C	GLU	124	14.168	33.713	40.811	1.00	11.93
ATOM	959	O	GLU	124	14.919	33.797	41.780	1.00	15.61
ATOM	960	CB	GLU	124	12.028	32.677	41.751	1.00	19.74
ATOM	961	CG	GLU	124	12.387	33.337	43.089	1.00	72.94
ATOM	962	N	LEU	125	14.183	34.550	39.808	1.00	12.19
ATOM	963	CA	LEU	125	15.092	35.654	39.767	1.00	15.00
ATOM	964	C	LEU	125	14.420	37.011	39.722	1.00	19.35
ATOM	965	O	LEU	125	13.563	37.267	38.893	1.00	18.41
ATOM	966	CB	LEU	125	15.976	35.533	38.510	1.00	14.29
ATOM	967	CG	LEU	125	17.003	36.683	38.375	1.00	17.65
ATOM	968	CD1	LEU	125	18.302	36.083	37.849	1.00	13.46
ATOM	969	CD2	LEU	125	16.511	37.732	37.367	1.00	12.09
ATOM	970	N	LYS	126	14.890	37.897	40.554	1.00	12.73
ATOM	971	CA	LYS	126	14.391	39.260	40.579	1.00	15.92
ATOM	972	C	LYS	126	15.563	40.276	40.445	1.00	18.53
ATOM	973	O	LYS	126	16.489	40.246	41.246	1.00	19.86
ATOM	974	CB	LYS	126	13.611	39.487	41.877	1.00	17.31
ATOM	975	CG	LYS	126	12.853	40.786	41.923	1.00	33.94
ATOM	976	CD	LYS	126	11.366	40.601	41.675	1.00	60.87
ATOM	977	CE	LYS	126	10.652	41.929	41.521	1.00	52.70
ATOM	978	NZ	LYS	126	11.229	42.988	42.367	1.00	47.22

FIG. 5X

ATOM	979	N	GLY	127	15.514	41.127	39.411	1.00	18.71
ATOM	980	CA	GLY	127	16.551	42.151	39.121	1.00	17.32
ATOM	981	C	GLY	127	16.012	43.572	39.272	1.00	25.32
ATOM	982	O	GLY	127	14.981	43.908	38.693	1.00	20.14
ATOM	983	N	ILE	128	16.706	44.404	40.070	1.00	18.42
ATOM	984	CA	ILE	128	16.282	45.787	40.243	1.00	21.04
ATOM	985	C	ILE	128	17.405	46.789	40.196	1.00	25.93
ATOM	986	O	ILE	128	18.562	46.496	40.429	1.00	19.37
ATOM	987	CB	ILE	128	15.482	46.052	41.504	1.00	23.82
ATOM	988	CG1	ILE	128	16.408	45.888	42.701	1.00	23.86
ATOM	989	CG2	ILE	128	14.272	45.120	41.577	1.00	28.95
ATOM	990	CD1	ILE	128	15.824	46.391	44.013	1.00	29.89
ATOM	991	N	ASP	129	16.999	48.002	39.918	1.00	20.26
ATOM	992	CA	ASP	129	17.861	49.124	39.882	1.00	18.53
ATOM	993	C	ASP	129	18.864	49.086	38.801	1.00	20.36
ATOM	994	O	ASP	129	19.949	49.632	38.953	1.00	24.28
ATOM	995	CB	ASP	129	18.498	49.407	41.253	1.00	20.57
ATOM	996	CG	ASP	129	17.545	50.077	42.226	1.00	43.70
ATOM	997	OD1	ASP	129	16.653	50.842	41.883	1.00	49.42
ATOM	998	OD2	ASP	129	17.770	49.740	43.475	1.00	38.07
ATOM	999	N	PHE	130	18.510	48.493	37.693	1.00	16.40
ATOM	1000	CA	PHE	130	19.433	48.459	36.563	1.00	16.99
ATOM	1001	C	PHE	130	19.330	49.732	35.576	1.00	35.37
ATOM	1002	O	PHE	130	18.242	50.318	35.623	1.00	27.34
ATOM	1003	CB	PHE	130	19.248	47.223	35.657	1.00	18.07
ATOM	1004	CG	PHE	130	19.809	45.980	36.312	1.00	19.10
ATOM	1005	CD1	PHE	130	19.021	45.210	37.171	1.00	16.15
ATOM	1006	CD2	PHE	130	21.126	45.572	36.073	1.00	19.17
ATOM	1007	CE1	PHE	130	19.536	44.074	37.801	1.00	23.37
ATOM	1008	CE2	PHE	130	21.665	44.445	36.703	1.00	21.11
ATOM	1009	CZ	PHE	130	20.867	43.703	37.575	1.00	22.13
ATOM	1010	N	LYS	131	20.464	50.169	35.218	1.00	31.09
ATOM	1011	CA	LYS	131	20.477	51.371	34.400	1.00	27.52
ATOM	1012	C	LYS	131	20.105	51.045	32.992	1.00	25.57
ATOM	1013	O	LYS	131	20.695	50.169	32.343	1.00	22.97
ATOM	1014	CB	LYS	131	21.796	52.109	34.438	1.00	32.64
ATOM	1015	CG	LYS	131	22.153	52.633	35.813	1.00	38.34
ATOM	1016	CD	LYS	131	23.646	52.886	35.975	1.00	75.76
ATOM	1017	N	GLU	132	19.116	51.751	32.509	1.00	26.88
ATOM	1018	CA	GLU	132	18.623	51.484	31.189	1.00	28.42
ATOM	1019	C	GLU	132	19.710	51.514	30.140	1.00	36.19

FIG. 5Y

ATOM	1020 O	GLU	132	19.617	50.862	29.101	1.00 39.24
ATOM	1021 CB	GLU	132	17.374	52.331	30.830	1.00 29.04
ATOM	1022 N	ASP	133	20.752	52.254	30.438	1.00 40.08
ATOM	1023 CA	ASP	133	21.883	52.442	29.525	1.00 45.36
ATOM	1024 C	ASP	133	23.224	51.861	30.049	1.00 50.61
ATOM	1025 O	ASP	133	24.299	52.243	29.572	1.00 52.14
ATOM	1026 CB	ASP	133	22.063	53.946	29.332	1.00 50.45
ATOM	1027 CG	ASP	133	22.109	54.642	30.670	1.00 87.10
ATOM	1028 OD1	ASP	133	21.408	54.314	31.624	1.00 91.27
ATOM	1029 OD2	ASP	133	23.047	55.552	30.739	1.00 100.00
ATOM	1030 N	GLY	134	23.159	50.970	31.053	1.00 37.06
ATOM	1031 CA	GLY	134	24.349	50.376	31.639	1.00 30.22
ATOM	1032 C	GLY	134	24.845	49.228	30.803	1.00 23.10
ATOM	1033 O	GLY	134	24.360	48.990	29.685	1.00 19.23
ATOM	1034 N	ASN	135	25.807	48.486	31.341	1.00 18.66
ATOM	1035 CA	ASN	135	26.339	47.370	30.563	1.00 18.03
ATOM	1036 C	ASN	135	25.372	46.199	30.406	1.00 15.75
ATOM	1037 O	ASN	135	25.485	45.430	29.461	1.00 16.03
ATOM	1038 CB	ASN	135	27.665	46.883	31.139	1.00 19.27
ATOM	1039 CG	ASN	135	28.743	47.943	31.108	1.00 20.99
ATOM	1040 OD1	ASN	135	28.969	48.595	30.078	1.00 25.69
ATOM	1041 ND2	ASN	135	29.423	48.095	32.239	1.00 22.57
ATOM	1042 N	ILE	136	24.444	46.052	31.362	1.00 18.14
ATOM	1043 CA	ILE	136	23.494	44.924	31.368	1.00 19.78
ATOM	1044 C	ILE	136	22.331	45.086	30.384	1.00 23.76
ATOM	1045 O	ILE	136	22.178	44.313	29.395	1.00 22.53
ATOM	1046 CB	ILE	136	23.078	44.500	32.804	1.00 21.24
ATOM	1047 CG1	ILE	136	24.230	43.728	33.423	1.00 28.44
ATOM	1048 CG2	ILE	136	21.899	43.543	32.770	1.00 22.77
ATOM	1049 CD1	ILE	136	25.346	44.596	33.935	1.00 12.39
ATOM	1050 N	LEU	137	21.543	46.117	30.640	1.00 18.21
ATOM	1051 CA	LEU	137	20.394	46.415	29.815	1.00 23.30
ATOM	1052 C	LEU	137	20.828	46.875	28.470	1.00 27.26
ATOM	1053 O	LEU	137	20.181	46.619	27.488	1.00 27.00
ATOM	1054 CB	LEU	137	19.442	47.430	30.490	1.00 21.74
ATOM	1055 CG	LEU	137	18.828	46.852	31.762	1.00 22.56
ATOM	1056 CD1	LEU	137	17.856	47.837	32.415	1.00 22.27
ATOM	1057 CD2	LEU	137	18.118	45.554	31.424	1.00 37.52
ATOM	1058 N	GLY	138	21.979	47.527	28.432	1.00 22.14
ATOM	1059 CA	GLY	138	22.510	48.033	27.187	1.00 20.03
ATOM	1060 C	GLY	138	23.157	46.959	26.368	1.00 20.16

FIG. 5Z

ATOM	1061 O	GLY	138	23.600	47.202	25.264	1.00 22.44
ATOM	1062 N	HIS	139	23.246	45.756	26.903	1.00 18.27
ATOM	1063 CA	HIS	139	23.859	44.655	26.148	1.00 20.24
ATOM	1064 C	HIS	139	25.301	44.929	25.616	1.00 20.13
ATOM	1065 O	HIS	139	25.605	44.745	24.439	1.00 17.97
ATOM	1066 CB	HIS	139	22.931	44.207	25.018	1.00 22.20
ATOM	1067 CG	HIS	139	21.708	43.551	25.550	1.00 25.52
ATOM	1068 ND1	HIS	139	21.666	42.182	25.785	1.00 25.67
ATOM	1069 CD2	HIS	139	20.525	44.092	25.927	1.00 28.09
ATOM	1070 CE1	HIS	139	20.474	41.918	26.275	1.00 27.50
ATOM	1071 NE2	HIS	139	19.766	43.044	26.382	1.00 29.53
ATOM	1072 N	LYS	140	26.187	45.311	26.525	1.00 23.51
ATOM	1073 CA	LYS	140	27.569	45.638	26.197	1.00 25.82
ATOM	1074 C	LYS	140	28.600	44.537	26.560	1.00 26.28
ATOM	1075 O	LYS	140	29.824	44.730	26.391	1.00 22.29
ATOM	1076 CB	LYS	140	27.977	46.937	26.911	1.00 27.56
ATOM	1077 CG	LYS	140	27.269	48.217	26.445	1.00 31.19
ATOM	1078 CD	LYS	140	27.234	49.254	27.582	1.00 51.32
ATOM	1079 CE	LYS	140	26.924	50.696	27.169	1.00 47.92
ATOM	1080 NZ	LYS	140	27.112	51.663	28.284	1.00 73.76
ATOM	1081 N	LEU	141	28.116	43.403	27.115	1.00 19.33
ATOM	1082 CA	LEU	141	28.987	42.296	27.559	1.00 14.32
ATOM	1083 C	LEU	141	29.366	41.401	26.427	1.00 20.75
ATOM	1084 O	LEU	141	28.526	41.087	25.620	1.00 19.01
ATOM	1085 CB	LEU	141	28.313	41.488	28.676	1.00 12.53
ATOM	1086 CG	LEU	141	27.979	42.352	29.875	1.00 17.54
ATOM	1087 CD1	LEU	141	27.700	41.469	31.070	1.00 24.81
ATOM	1088 CD2	LEU	141	29.116	43.310	30.182	1.00 27.50
ATOM	1089 N	GLU	142	30.644	40.987	26.346	1.00 14.76
ATOM	1090 CA	GLU	142	31.040	40.059	25.311	1.00 13.43
ATOM	1091 C	GLU	142	30.462	38.691	25.641	1.00 15.69
ATOM	1092 O	GLU	142	30.175	38.393	26.787	1.00 16.43
ATOM	1093 CB	GLU	142	32.558	39.866	25.204	1.00 14.73
ATOM	1094 CG	GLU	142	33.290	41.077	24.624	1.00 29.30
ATOM	1095 CD	GLU	142	34.787	41.003	24.825	1.00 56.32
ATOM	1096 OE1	GLU	142	35.340	40.098	25.420	1.00 31.70
ATOM	1097 OE2	GLU	142	35.430	42.015	24.321	1.00 34.10
ATOM	1098 N	TYR	143	30.365	37.873	24.632	1.00 16.30
ATOM	1099 CA	TYR	143	29.837	36.542	24.764	1.00 20.04
ATOM	1100 C	TYR	143	30.925	35.559	25.049	1.00 12.46
ATOM	1101 O	TYR	143	31.327	34.792	24.193	1.00 16.99

FIG. 5AA

ATOM	1102 CB TYR	143	29.035	36.118	23.498	1.00 20.96
ATOM	1103 CG TYR	143	28.187	34.857	23.674	1.00 16.12
ATOM	1104 CD1TYR	143	27.040	34.859	24.472	1.00 18.24
ATOM	1105 CD2TYR	143	28.512	33.684	22.986	1.00 12.87
ATOM	1106 CE1TYR	143	26.257	33.708	24.615	1.00 17.91
ATOM	1107 CE2TYR	143	27.735	32.530	23.104	1.00 16.58
ATOM	1108 CZ TYR	143	26.603	32.551	23.914	1.00 17.35
ATOM	1109 OH TYR	143	25.861	31.432	24.035	1.00 23.40
ATOM	1110 N ASN	144	31.392	35.597	26.251	1.00 12.40
ATOM	1111 CA ASN	144	32.428	34.703	26.689	1.00 12.05
ATOM	1112 C ASN	144	32.433	34.675	28.193	1.00 15.75
ATOM	1113 O ASN	144	31.637	35.369	28.837	1.00 14.58
ATOM	1114 CB ASN	144	33.823	35.038	26.068	1.00 18.45
ATOM	1115 CG ASN	144	34.310	36.445	26.374	1.00 18.98
ATOM	1116 OD1ASN	144	34.150	36.951	27.488	1.00 20.34
ATOM	1117 ND2ASN	144	34.891	37.085	25.382	1.00 23.02
ATOM	1118 N TYR	145	33.311	33.876	28.773	1.00 12.16
ATOM	1119 CA TYR	145	33.343	33.765	30.195	1.00 10.63
ATOM	1120 C TYR	145	34.765	33.458	30.730	1.00 14.58
ATOM	1121 O TYR	145	35.510	32.751	30.090	1.00 18.83
ATOM	1122 CB TYR	145	32.404	32.627	30.571	1.00 9.76
ATOM	1123 CG TYR	145	31.698	32.916	31.826	1.00 11.86
ATOM	1124 CD1TYR	145	30.515	33.658	31.808	1.00 9.04
ATOM	1125 CD2TYR	145	32.188	32.419	33.030	1.00 10.07
ATOM	1126 CE1TYR	145	29.860	33.948	32.999	1.00 8.36
ATOM	1127 CE2TYR	145	31.544	32.707	34.235	1.00 15.32
ATOM	1128 CZ TYR	145	30.375	33.469	34.206	1.00 11.69
ATOM	1129 OH TYR	145	29.730	33.735	35.376	1.00 15.23
ATOM	1130 N ASN	146	35.086	33.931	31.933	1.00 15.36
ATOM	1131 CA ASN	146	36.415	33.737	32.560	1.00 17.00
ATOM	1132 C ASN	146	36.426	32.618	33.589	1.00 19.68
ATOM	1133 O ASN	146	35.395	32.043	33.848	1.00 14.71
ATOM	1134 CB ASN	146	36.844	35.062	33.235	1.00 11.89
ATOM	1135 CG ASN	146	37.013	36.147	32.215	1.00 35.45
ATOM	1136 OD1ASN	146	37.533	35.890	31.105	1.00 31.63
ATOM	1137 ND2ASN	146	36.547	37.349	32.553	1.00 19.74
ATOM	1138 N SER	147	37.630	32.338	34.201	1.00 12.09
ATOM	1139 CA SER	147	37.804	31.320	35.266	1.00 8.55
ATOM	1140 C SER	147	37.769	31.999	36.575	1.00 11.70
ATOM	1141 O SER	147	38.219	33.125	36.671	1.00 16.56
ATOM	1142 CB SER	147	39.148	30.540	35.129	1.00 9.87
ATOM	1143 OG SER	147	39.212	29.980	33.828	1.00 33.20

FIG. 5AB

ATOM	1144 N	HIS	148	37.195	31.365	37.583	1.00	5.53
ATOM	1145 CA	HIS	148	37.090	31.998	38.850	1.00	8.06
ATOM	1146 C	HIS	148	37.346	31.038	39.949	1.00	11.30
ATOM	1147 O	HIS	148	37.328	29.844	39.754	1.00	16.87
ATOM	1148 CB	HIS	148	35.648	32.608	39.067	1.00	11.29
ATOM	1149 CG	HIS	148	35.215	33.554	37.972	1.00	10.84
ATOM	1150 ND1	HIS	148	34.548	33.121	36.836	1.00	12.77
ATOM	1151 CD2	HIS	148	35.403	34.887	37.851	1.00	8.82
ATOM	1152 CE1	HIS	148	34.389	34.178	36.060	1.00	8.84
ATOM	1153 NE2	HIS	148	34.882	35.242	36.647	1.00	8.82
ATOM	1154 N	ASN	149	37.534	31.579	41.125	1.00	10.80
ATOM	1155 CA	ASN	149	37.626	30.805	42.345	1.00	13.35
ATOM	1156 C	ASN	149	36.409	31.157	43.205	1.00	14.47
ATOM	1157 O	ASN	149	36.099	32.320	43.387	1.00	18.17
ATOM	1158 CB	ASN	149	38.890	31.093	43.184	1.00	12.67
ATOM	1159 CG	ASN	149	40.148	30.822	42.424	1.00	20.21
ATOM	1160 OD1	ASN	149	40.993	31.713	42.281	1.00	56.34
ATOM	1161 ND2	ASN	149	40.210	29.641	41.818	1.00	16.44
ATOM	1162 N	VAL	150	35.773	30.144	43.741	1.00	14.65
ATOM	1163 CA	VAL	150	34.588	30.262	44.552	1.00	12.92
ATOM	1164 C	VAL	150	34.910	29.806	45.943	1.00	16.30
ATOM	1165 O	VAL	150	35.257	28.665	46.147	1.00	17.83
ATOM	1166 CB	VAL	150	33.482	29.382	43.914	1.00	15.22
ATOM	1167 CG1	VAL	150	32.252	29.297	44.765	1.00	14.09
ATOM	1168 CG2	VAL	150	33.172	29.791	42.464	1.00	10.94
ATOM	1169 N	TYR	151	34.796	30.716	46.900	1.00	17.64
ATOM	1170 CA	TYR	151	35.139	30.440	48.275	1.00	18.31
ATOM	1171 C	TYR	151	34.003	29.917	49.117	1.00	24.35
ATOM	1172 O	TYR	151	32.963	30.536	49.239	1.00	20.83
ATOM	1173 CB	TYR	151	35.793	31.681	48.920	1.00	20.15
ATOM	1174 CG	TYR	151	37.025	32.033	48.141	1.00	25.86
ATOM	1175 CD1	TYR	151	37.003	32.989	47.127	1.00	26.00
ATOM	1176 CD2	TYR	151	38.200	31.315	48.355	1.00	28.66
ATOM	1177 CE1	TYR	151	38.151	33.234	46.369	1.00	33.73
ATOM	1178 CE2	TYR	151	39.360	31.550	47.619	1.00	29.01
ATOM	1179 CZ	TYR	151	39.325	32.512	46.618	1.00	29.55
ATOM	1180 OH	TYR	151	40.449	32.737	45.877	1.00	38.69
ATOM	1181 N	ILE	152	34.250	28.791	49.753	1.00	17.71
ATOM	1182 CA	ILE	152	33.255	28.159	50.572	1.00	14.12
ATOM	1183 C	ILE	152	33.619	28.056	52.000	1.00	18.51
ATOM	1184 O	ILE	152	34.728	27.703	52.336	1.00	22.05

FIG. 5AC

ATOM	1185 CB ILE	152	32.979	26.776	50.060	1.00 16.66
ATOM	1186 CG1 ILE	152	32.431	26.875	48.638	1.00 11.30
ATOM	1187 CG2 ILE	152	32.017	26.078	51.021	1.00 17.96
ATOM	1188 CD1 ILE	152	32.377	25.559	47.949	1.00 13.48
ATOM	1189 N MSE	153	32.623	28.278	52.841	1.00 17.41
ATOM	1190 AC MSE	153	32.789	28.162	54.269	1.00 22.61
ATOM	1191 C MSE	153	31.534	27.648	54.916	1.00 27.31
ATOM	1192 O MSE	153	30.433	27.831	54.396	1.00 20.50
ATOM	1193 CB MSE	153	33.145	29.490	54.855	1.00 19.11
ATOM	1194 CG MSE	153	34.010	30.302	53.957	1.00 100.00
ATOM	1195 SE MSE	153	34.060	32.117	54.524	1.00 100.00
ATOM	1196 CE MSE	153	33.463	31.798	56.330	1.00 30.27
ATOM	1197 N ALA	154	31.733	26.983	56.053	1.00 22.29
ATOM	1198 CA ALA	154	30.669	26.389	56.796	1.00 22.66
ATOM	1199 C ALA	154	29.820	27.401	57.552	1.00 29.00
ATOM	1200 O ALA	154	30.274	28.457	57.960	1.00 27.02
ATOM	1201 CB ALA	154	31.224	25.336	57.744	1.00 19.78
ATOM	1202 N ASP	155	28.566	27.063	57.726	1.00 29.48
ATOM	1203 CA ASP	155	27.669	27.887	58.484	1.00 32.18
ATOM	1204 C ASP	155	26.976	27.019	59.511	1.00 44.51
ATOM	1205 O ASP	155	25.898	26.492	59.274	1.00 39.56
ATOM	1206 CB ASP	155	26.659	28.617	57.597	1.00 31.70
ATOM	1207 CG ASP	155	26.140	29.851	58.247	1.00 49.89
ATOM	1208 OD1 ASP	155	26.595	30.297	59.277	1.00 46.67
ATOM	1209 OD2 ASP	155	25.187	30.422	57.565	1.00 76.07
ATOM	1210 N LYS	156	27.646	26.816	60.629	1.00 46.37
ATOM	1211 CA LYS	156	27.116	25.954	61.654	1.00 53.23
ATOM	1212 C LYS	156	25.750	26.369	62.224	1.00 65.62
ATOM	1213 O LYS	156	25.012	25.520	62.703	1.00 65.54
ATOM	1214 CB LYS	156	28.147	25.612	62.725	1.00 59.51
ATOM	1215 N GLN	157	25.398	27.655	62.138	1.00 68.32
ATOM	1216 CA GLN	157	24.119	28.135	62.670	1.00 73.00
ATOM	1217 C GLN	157	22.891	27.767	61.817	1.00 87.53
ATOM	1218 O GLN	157	21.778	27.547	62.325	1.00 96.16
ATOM	1219 N LYS	158	23.095	27.725	60.506	1.00 72.49
ATOM	1220 CA LYS	158	22.040	27.386	59.593	1.00 66.19
ATOM	1221 C LYS	158	22.235	25.985	59.040	1.00 58.21
ATOM	1222 O LYS	158	21.447	25.524	58.226	1.00 59.85
ATOM	1223 N ASN	159	23.303	25.294	59.502	1.00 40.00
ATOM	1224 CA ASN	159	23.582	23.944	59.012	1.00 36.67
ATOM	1225 C ASN	159	23.755	24.002	57.500	1.00 34.11

FIG. 5AD

ATOM	1226	CO	ASN	159	23.223	23.167	56.754	1.00	31.69
ATOM	1227	CB	ASN	159	22.431	22.952	59.367	1.00	46.42
ATOM	1228	CG	ASN	159	22.842	21.485	59.428	1.00	80.46
ATOM	1229	OD1	ASN	159	23.850	21.121	60.054	1.00	100.00
ATOM	1230	ND2	ASN	159	22.003	20.620	58.854	1.00	58.09
ATOM	1231	N	GLY	160	24.474	25.044	57.062	1.00	22.34
ATOM	1232	CA	GLY	160	24.686	25.247	55.663	1.00	17.58
ATOM	1233	C	GLY	160	26.055	25.791	55.433	1.00	26.75
ATOM	1234	O	GLY	160	26.960	25.664	56.271	1.00	25.57
ATOM	1235	N	ILE	161	26.200	26.395	54.277	1.00	23.28
ATOM	1236	CA	ILE	161	27.442	26.975	53.909	1.00	16.45
ATOM	1237	C	ILE	161	27.200	28.354	53.395	1.00	15.77
ATOM	1238	O	ILE	161	26.118	28.680	52.962	1.00	15.95
ATOM	1239	CB	ILE	161	28.129	26.117	52.864	1.00	19.27
ATOM	1240	CG1	ILE	161	27.237	26.016	51.619	1.00	18.53
ATOM	1241	CG2	ILE	161	28.351	24.735	53.445	1.00	21.96
ATOM	1242	CD1	ILE	161	28.009	25.614	50.350	1.00	14.44
ATOM	1243	N	LYS	162	28.226	29.169	53.471	1.00	17.86
ATOM	1244	CA	LYS	162	28.187	30.508	52.948	1.00	14.42
ATOM	1245	C	LYS	162	29.216	30.524	51.857	1.00	17.73
ATOM	1246	O	LYS	162	30.249	29.875	51.991	1.00	19.16
ATOM	1247	CB	LYS	162	28.480	31.540	54.055	1.00	18.15
ATOM	1248	CG	LYS	162	27.221	31.963	54.796	1.00	42.08
ATOM	1249	CD	LYS	162	27.493	32.787	56.039	1.00	70.42
ATOM	1250	N	VAL	163	28.911	31.176	50.759	1.00	13.74
ATOM	1251	CA	VAL	163	29.798	31.201	49.629	1.00	11.95
ATOM	1252	C	VAL	163	29.928	32.610	49.103	1.00	19.30
ATOM	1253	O	VAL	163	28.944	33.318	48.983	1.00	19.84
ATOM	1254	CB	VAL	163	29.249	30.268	48.532	1.00	15.89
ATOM	1255	CG1	VAL	163	30.105	30.277	47.261	1.00	12.09
ATOM	1256	CG2	VAL	163	29.029	28.852	49.077	1.00	15.86
ATOM	1257	N	ASN	164	31.146	32.999	48.733	1.00	14.03
ATOM	1258	CA	ASN	164	31.382	34.310	48.195	1.00	15.58
ATOM	1259	C	ASN	164	32.396	34.271	47.050	1.00	20.08
ATOM	1260	O	ASN	164	33.268	33.386	46.988	1.00	23.49
ATOM	1261	CB	ASN	164	31.732	35.325	49.308	1.00	20.52
ATOM	1262	CG	ASN	164	33.196	35.697	49.330	1.00	89.21
ATOM	1263	OD1	ASN	164	34.020	34.987	49.929	1.00	100.00
ATOM	1264	ND2	ASN	164	33.515	36.831	48.700	1.00	91.46
ATOM	1265	N	PHE	165	32.244	35.207	46.109	1.00	17.37
ATOM	1266	CA	PHE	165	33.133	35.301	44.953	1.00	10.86

FIG. 5AE

ATOM	1267 C	PHE	165	32.751	36.445	44.071	1.00 15.53
ATOM	1268 O	PHE	165	31.686	37.020	44.251	1.00 17.16
ATOM	1269 CB	PHE	165	33.207	33.960	44.187	1.00 12.86
ATOM	1270 CG	PHE	165	31.862	33.486	43.622	1.00 14.35
ATOM	1271 CD1	PHE	165	31.510	33.749	42.293	1.00 14.61
ATOM	1272 CD2	PHE	165	30.978	32.757	44.413	1.00 13.56
ATOM	1273 CE1	PHE	165	30.300	33.297	41.759	1.00 22.67
ATOM	1274 CE2	PHE	165	29.774	32.282	43.893	1.00 15.78
ATOM	1275 CZ	PHE	165	29.426	32.572	42.573	1.00 16.20
ATOM	1276 N	LYS	166	33.641	36.799	43.132	1.00 10.79
ATOM	1277 CA	LYS	166	33.417	37.864	42.162	1.00 10.74
ATOM	1278 C	LYS	166	33.603	37.344	40.774	1.00 15.95
ATOM	1279 O	LYS	166	34.602	36.727	40.470	1.00 22.80
ATOM	1280 CB	LYS	166	34.387	39.055	42.249	1.00 16.61
ATOM	1281 CG	LYS	166	34.573	39.688	43.573	1.00 18.11
ATOM	1282 CD	LYS	166	35.540	40.875	43.454	1.00 32.56
ATOM	1283 CE	LYS	166	35.272	41.966	44.476	1.00 48.19
ATOM	1284 NZ	LYS	166	34.823	41.435	45.782	1.00 85.81
ATOM	1285 N	ILE	167	32.703	37.704	39.911	1.00 9.75
ATOM	1286 CA	ILE	167	32.768	37.340	38.558	1.00 9.35
ATOM	1287 C	ILE	167	33.203	38.542	37.823	1.00 14.36
ATOM	1288 O	ILE	167	32.811	39.640	38.170	1.00 16.22
ATOM	1289 CB	ILE	167	31.379	36.929	38.005	1.00 13.16
ATOM	1290 CG1	ILE	167	30.909	35.624	38.669	1.00 13.02
ATOM	1291 CG2	ILE	167	31.423	36.786	36.472	1.00 7.91
ATOM	1292 CD1	ILE	167	31.773	34.415	38.344	1.00 19.57
ATOM	1293 N	ARG	168	34.005	38.299	36.815	1.00 12.19
ATOM	1294 CA	ARG	168	34.500	39.308	35.945	1.00 15.07
ATOM	1295 C	ARG	168	33.948	39.122	34.528	1.00 16.64
ATOM	1296 O	ARG	168	34.278	38.156	33.836	1.00 17.70
ATOM	1297 CB	ARG	168	36.024	39.287	35.944	1.00 16.54
ATOM	1298 CG	ARG	168	36.580	39.632	37.321	1.00 25.54
ATOM	1299 CD	ARG	168	37.894	38.910	37.601	1.00 63.52
ATOM	1300 NE	ARG	168	38.380	38.191	36.416	1.00 73.52
ATOM	1301 CZ	ARG	168	38.764	36.926	36.416	1.00 67.92
ATOM	1302 NH1	ARG	168	38.795	36.192	37.527	1.00 57.44
ATOM	1303 NH2	ARG	168	39.192	36.375	35.271	1.00 59.15
ATOM	1304 N	HIS	169	33.090	40.064	34.098	1.00 14.88
ATOM	1305 CA	HIS	169	32.505	40.025	32.758	1.00 13.24
ATOM	1306 C	HIS	169	33.214	41.001	31.839	1.00 12.64
ATOM	1307 O	HIS	169	33.306	42.203	32.121	1.00 14.99

FIG. 5AF

ATOM	1308 CB HIS	169	30.970	40.374	32.760	1.00 10.46
ATOM	1309 CG HIS	169	30.097	39.474	33.573	1.00 6.54
ATOM	1310 ND1HIS	169	29.724	38.246	33.111	1.00 12.63
ATOM	1311 CD2HIS	169	29.474	39.695	34.764	1.00 10.21
ATOM	1312 CE1 HIS	169	28.892	37.718	34.031	1.00 10.53
ATOM	1313 NE2HIS	169	28.734	38.566	35.063	1.00 11.84
ATOM	1314 N ASN	170	33.691	40.513	30.737	1.00 10.66
ATOM	1315 CA ASN	170	34.349	41.368	29.812	1.00 15.87
ATOM	1316 C ASN	170	33.356	42.224	29.067	1.00 25.06
ATOM	1317 O ASN	170	32.386	41.701	28.537	1.00 16.60
ATOM	1318 CB ASN	170	35.110	40.550	28.755	1.00 19.60
ATOM	1319 CG ASN	170	36.245	39.717	29.312	1.00 18.70
ATOM	1320 OD1ASN	170	36.702	38.752	28.684	1.00 48.29
ATOM	1321 ND2ASN	170	36.695	40.073	30.480	1.00 19.13
ATOM	1322 N ILE	171	33.662	43.527	28.947	1.00 18.75
ATOM	1323 CA ILE	171	32.848	44.460	28.168	1.00 16.74
ATOM	1324 C ILE	171	33.459	44.638	26.791	1.00 19.51
ATOM	1325 O ILE	171	34.643	44.596	26.642	1.00 21.06
ATOM	1326 CB ILE	171	32.713	45.804	28.842	1.00 20.46
ATOM	1327 CG1ILE	171	32.089	45.617	30.193	1.00 24.79
ATOM	1328 CG2ILE	171	31.852	46.727	27.997	1.00 19.03
ATOM	1329 CD1ILE	171	32.630	46.599	31.229	1.00 41.65
ATOM	1330 N GLU	172	32.632	44.818	25.804	1.00 16.54
ATOM	1331 CA GLU	172	33.034	44.933	24.420	1.00 17.00
ATOM	1332 C GLU	172	34.110	45.967	24.147	1.00 26.80
ATOM	1333 O GLU	172	34.776	45.898	23.125	1.00 29.20
ATOM	1334 CB GLU	172	31.813	45.165	23.509	1.00 22.46
ATOM	1335 CG GLU	172	31.122	46.531	23.786	1.00 58.53
ATOM	1336 CD GLU	172	29.871	46.783	22.933	1.00 100.00
ATOM	1337 OE1 GLU	172	29.415	45.970	22.156	1.00 100.00
ATOM	1338 OE2 GLU	172	29.370	47.982	23.149	1.00 100.00
ATOM	1339 N ASP	173	34.277	46.934	25.034	1.00 24.41
ATOM	1340 CA ASP	173	35.292	47.978	24.852	1.00 25.03
ATOM	1341 C ASP	173	36.651	47.624	25.455	1.00 33.40
ATOM	1342 O ASP	173	37.561	48.451	25.518	1.00 30.42
ATOM	1343 CB ASP	173	34.822	49.319	25.401	1.00 23.30
ATOM	1344 CG ASP	173	34.743	49.358	26.912	1.00 32.47
ATOM	1345 OD1ASP	173	34.406	50.355	27.513	1.00 37.58
ATOM	1346 OD2ASP	173	34.949	48.196	27.504	1.00 49.22
ATOM	1347 N GLY	174	36.766	46.410	25.956	1.00 23.87
ATOM	1348 CA GLY	174	38.019	45.994	26.537	1.00 21.30

FIG. 5AG

ATOM	1349 C	GLY	174	38.012	46.090	28.044	1.00 19.99
ATOM	1350 O	GLY	174	38.927	45.585	28.709	1.00 20.45
ATOM	1351 N	SER	175	36.972	46.767	28.598	1.00 13.88
ATOM	1352 CA	SER	175	36.898	46.931	30.034	1.00 8.70
ATOM	1353 C	SER	175	36.296	45.728	30.765	1.00 17.30
ATOM	1354 O	SER	175	36.136	44.655	30.175	1.00 18.77
ATOM	1355 CB	SER	175	36.288	48.235	30.450	1.00 14.07
ATOM	1356 OG	SER	175	36.360	48.316	31.865	1.00 24.79
ATOM	1357 N	VAL	176	35.963	45.912	32.051	1.00 13.74
ATOM	1358 CA	VAL	176	35.415	44.826	32.864	1.00 16.46
ATOM	1359 C	VAL	176	34.191	45.204	33.703	1.00 22.46
ATOM	1360 O	VAL	176	34.159	46.254	34.334	1.00 21.31
ATOM	1361 CB	VAL	176	36.477	44.285	33.818	1.00 24.43
ATOM	1362 CG1	VAL	176	35.847	43.344	34.827	1.00 27.45
ATOM	1363 CG2	VAL	176	37.532	43.536	33.035	1.00 25.65
ATOM	1364 N	GLN	177	33.234	44.269	33.787	1.00 15.47
ATOM	1365 CA	GLN	177	32.048	44.430	34.647	1.00 15.40
ATOM	1366 C	GLN	177	32.102	43.457	35.813	1.00 10.60
ATOM	1367 O	GLN	177	32.027	42.243	35.634	1.00 13.65
ATOM	1368 CB	GLN	177	30.709	44.283	33.872	1.00 15.57
ATOM	1369 CG	GLN	177	29.468	44.294	34.828	1.00 19.13
ATOM	1370 CD	GLN	177	29.108	45.678	35.361	1.00 14.91
ATOM	1371 OE1	GLN	177	28.759	46.588	34.574	1.00 20.17
ATOM	1372 NE2	GLN	177	29.128	45.821	36.690	1.00 17.28
ATOM	1373 N	LEU	178	32.227	43.993	37.018	1.00 8.17
ATOM	1374 CA	LEU	178	32.313	43.180	38.181	1.00 16.66
ATOM	1375 C	LEU	178	30.954	42.786	38.712	1.00 20.93
ATOM	1376 O	LEU	178	30.033	43.608	38.753	1.00 14.66
ATOM	1377 CB	LEU	178	33.089	43.896	39.293	1.00 20.63
ATOM	1378 CG	LEU	178	34.286	43.110	39.815	1.00 39.28
ATOM	1379 CD1	LEU	178	33.831	42.087	40.852	1.00 45.14
ATOM	1380 CD2	LEU	178	35.018	42.426	38.648	1.00 39.52
ATOM	1381 N	ALA	179	30.869	41.550	39.171	1.00 16.72
ATOM	1382 CA	ALA	179	29.652	41.033	39.754	1.00 15.55
ATOM	1383 C	ALA	179	29.932	40.277	41.040	1.00 15.70
ATOM	1384 O	ALA	179	30.337	39.119	41.028	1.00 15.91
ATOM	1385 CB	ALA	179	28.853	40.197	38.731	1.00 14.08
ATOM	1386 N	ASP	180	29.694	40.946	42.155	1.00 8.88
ATOM	1387 CA	ASP	180	29.897	40.407	43.480	1.00 7.18
ATOM	1388 C	ASP	180	28.802	39.460	43.891	1.00 17.07
ATOM	1389 O	ASP	180	27.651	39.844	43.987	1.00 18.22

FIG. 5AH

ATOM	1390 CB ASP	180	29.934	41.509	44.509	1.00 13.06
ATOM	1391 CG ASP	180	31.285	41.902	44.935	1.00 46.28
ATOM	1392 OD1ASP	180	31.981	41.206	45.655	1.00 60.46
ATOM	1393 OD2ASP	180	31.574	43.121	44.560	1.00 46.61
ATOM	1394 N HIS	181	29.173	38.242	44.197	1.00 14.51
ATOM	1395 CA HIS	181	28.213	37.223	44.575	1.00 10.49
ATOM	1396 C HIS	181	28.218	36.897	46.049	1.00 14.28
ATOM	1397 O HIS	181	29.255	36.580	46.607	1.00 17.40
ATOM	1398 CB HIS	181	28.450	35.915	43.769	1.00 9.89
ATOM	1399 CG HIS	181	28.077	35.972	42.328	1.00 10.38
ATOM	1400 ND1HIS	181	28.606	36.926	41.455	1.00 12.24
ATOM	1401 CD2HIS	181	27.279	35.146	41.606	1.00 10.42
ATOM	1402 CE1 HIS	181	28.093	36.678	40.269	1.00 9.97
ATOM	1403 NE2 HIS	181	27.314	35.594	40.316	1.00 9.38
ATOM	1404 N TYR	182	27.029	36.897	46.668	1.00 10.40
ATOM	1405 CA TYR	182	26.848	36.518	48.062	1.00 13.86
ATOM	1406 C TYR	182	25.871	35.393	48.089	1.00 20.61
ATOM	1407 O TYR	182	24.819	35.520	47.532	1.00 16.35
ATOM	1408 CB TYR	182	26.359	37.664	48.934	1.00 21.12
ATOM	1409 CG TYR	182	27.421	38.693	49.062	1.00 34.16
ATOM	1410 CD1TYR	182	27.521	39.715	48.120	1.00 46.06
ATOM	1411 CD2TYR	182	28.389	38.616	50.064	1.00 38.56
ATOM	1412 CE1 TYR	182	28.532	40.674	48.197	1.00 57.53
ATOM	1413 CE2 TYR	182	29.418	39.559	50.147	1.00 40.76
ATOM	1414 CZ TYR	182	29.480	40.594	49.216	1.00 54.61
ATOM	1415 OH TYR	182	30.461	41.534	49.308	1.00 61.92
ATOM	1416 N GLN	183	26.246	34.277	48.686	1.00 17.63
ATOM	1417 CA GLN	183	25.410	33.104	48.583	1.00 16.37
ATOM	1418 C GLN	183	25.289	32.311	49.863	1.00 21.39
ATOM	1419 O GLN	183	26.260	32.174	50.623	1.00 19.86
ATOM	1420 CB GLN	183	25.984	32.219	47.422	1.00 13.33
ATOM	1421 CG GLN	183	25.651	30.688	47.457	1.00 17.38
ATOM	1422 CD GLN	183	26.411	29.884	46.389	1.00 17.27
ATOM	1423 OE1 GLN	183	26.975	30.454	45.456	1.00 13.80
ATOM	1424 NE2 GLN	183	26.361	28.553	46.473	1.00 13.94
ATOM	1425 N GLN	184	24.080	31.739	50.055	1.00 19.74
ATOM	1426 CA GLN	184	23.760	30.829	51.168	1.00 16.55
ATOM	1427 C GLN	184	23.033	29.582	50.658	1.00 13.60
ATOM	1428 O GLN	184	22.219	29.640	49.747	1.00 18.01
ATOM	1429 CB GLN	184	22.949	31.444	52.330	1.00 20.11
ATOM	1430 CG GLN	184	23.364	32.855	52.768	1.00 74.84

FIG. 5A1

ATOM	1431	CD	GLN	184	22.312	33.517	53.657	1.00	100.00
ATOM	1432	OE1	GLN	184	21.159	33.054	53.752	1.00	97.99
ATOM	1433	NE2	GLN	184	22.689	34.625	54.286	1.00	100.00
ATOM	1434	N	ASN	185	23.418	28.446	51.207	1.00	14.76
ATOM	1435	CA	ASN	185	22.831	27.155	50.887	1.00	13.86
ATOM	1436	C	ASN	185	22.421	26.463	52.166	1.00	16.06
ATOM	1437	O	ASN	185	23.176	26.402	53.172	1.00	17.39
ATOM	1438	CB	ASN	185	23.761	26.212	50.119	1.00	15.20
ATOM	1439	CG	ASN	185	24.110	26.696	48.748	1.00	12.75
ATOM	1440	OD1	ASN	185	24.704	27.758	48.592	1.00	22.56
ATOM	1441	ND2	ASN	185	23.830	25.868	47.763	1.00	17.70
ATOM	1442	N	THR	186	21.227	25.941	52.139	1.00	18.01
ATOM	1443	CA	THR	186	20.707	25.227	53.288	1.00	17.40
ATOM	1444	C	THR	186	19.976	24.010	52.824	1.00	23.63
ATOM	1445	O	THR	186	19.389	23.991	51.730	1.00	24.57
ATOM	1446	CB	THR	186	19.856	26.100	54.206	1.00	28.82
ATOM	1447	OG1	THR	186	18.874	26.752	53.446	1.00	35.65
ATOM	1448	CG2	THR	186	20.753	27.121	54.903	1.00	28.86
ATOM	1449	N	PRO	187	20.101	22.951	53.620	1.00	22.40
ATOM	1450	CA	PRO	187	19.504	21.683	53.269	1.00	20.28
ATOM	1451	C	PRO	187	17.988	21.757	53.288	1.00	22.41
ATOM	1452	O	PRO	187	17.390	22.518	54.071	1.00	25.07
ATOM	1453	CB	PRO	187	19.977	20.682	54.337	1.00	19.79
ATOM	1454	CG	PRO	187	20.840	21.449	55.338	1.00	26.98
ATOM	1455	CD	PRO	187	20.786	22.918	54.949	1.00	22.04
ATOM	1456	N	ILE	188	17.382	20.957	52.453	1.00	18.77
ATOM	1457	CA	ILE	188	15.907	20.855	52.407	1.00	20.12
ATOM	1458	C	ILE	188	15.470	19.766	53.389	1.00	31.58
ATOM	1459	O	ILE	188	14.596	19.966	54.202	1.00	38.58
ATOM	1460	CB	ILE	188	15.385	20.574	50.991	1.00	21.52
ATOM	1461	CG1	ILE	188	15.555	21.775	50.102	1.00	16.10
ATOM	1462	CG2	ILE	188	13.916	20.141	50.981	1.00	28.85
ATOM	1463	CD1	ILE	188	15.139	21.471	48.660	1.00	15.31
ATOM	1464	N	GLY	189	16.142	18.618	53.352	1.00	32.39
ATOM	1465	CA	GLY	189	15.833	17.531	54.283	1.00	32.94
ATOM	1466	C	GLY	189	16.339	17.817	55.702	1.00	40.20
ATOM	1467	O	GLY	189	17.016	18.810	55.967	1.00	35.57
ATOM	1468	N	ASP	190	16.003	19.928	56.617	1.00	49.41
ATOM	1469	CA	ASP	190	16.392	17.047	58.021	1.00	55.01
ATOM	1470	C	ASP	190	17.556	16.115	58.338	1.00	56.16
ATOM	1471	O	ASP	190	18.083	16.100	59.463	1.00	58.30

FIG. 5AJ

ATOM	1472 CB	ASP	190	15.195	16.734	58.955	1.00 63.89
ATOM	1473 CG	ASP	190	14.592	15.365	58.686	1.00 99.67
ATOM	1474 OD1	ASP	190	14.599	14.466	59.514	1.00 100.00
ATOM	1475 OD2	ASP	190	14.088	15.240	57.470	1.00 100.00
ATOM	1476 N	GLY	191	17.921	15.312	57.323	1.00 47.20
ATOM	1477 CA	GLY	191	19.015	14.347	57.419	1.00 44.96
ATOM	1478 C	GLY	191	20.359	15.044	57.587	1.00 34.43
ATOM	1479 O	GLY	191	20.452	16.266	57.438	1.00 29.96
ATOM	1480 N	PRO	192	21.402	14.264	57.905	1.00 27.26
ATOM	1481 CA	PRO	192	22.737	14.834	58.100	1.00 24.01
ATOM	1482 C	PRO	192	23.444	15.274	56.787	1.00 20.55
ATOM	1483 O	PRO	192	23.323	14.648	55.740	1.00 23.84
ATOM	1484 CB	PRO	192	23.583	13.764	58.825	1.00 21.00
ATOM	1485 CG	PRO	192	22.739	12.501	58.915	1.00 27.49
ATOM	1486 CD	PRO	192	21.330	12.863	58.448	1.00 27.26
ATOM	1487 N	VAL	193	24.193	16.363	56.892	1.00 17.87
ATOM	1488 CA	VAL	193	24.964	16.902	55.792	1.00 19.51
ATOM	1489 C	VAL	193	26.380	17.108	56.249	1.00 22.37
ATOM	1490 O	VAL	193	26.663	17.189	57.443	1.00 23.84
ATOM	1491 CB	VAL	193	24.449	18.245	55.256	1.00 25.24
ATOM	1492 CG1	VAL	193	23.059	18.118	54.632	1.00 21.90
ATOM	1493 CG2	VAL	193	24.497	19.322	56.346	1.00 24.81
ATOM	1494 N	LEU	194	27.253	17.241	55.277	1.00 19.04
ATOM	1495 CA	LEU	194	28.654	17.438	55.516	1.00 20.29
ATOM	1496 C	LEU	194	29.006	18.930	55.571	1.00 18.71
ATOM	1497 O	LEU	194	28.907	19.615	54.591	1.00 20.13
ATOM	1498 CB	LEU	194	29.412	16.806	54.327	1.00 22.92
ATOM	1499 CG	LEU	194	29.994	15.423	54.542	1.00 30.60
ATOM	1500 CD1	LEU	194	29.227	14.642	55.595	1.00 35.19
ATOM	1501 CD2	LEU	194	30.048	14.672	53.211	1.00 25.61
ATOM	1502 N	LEU	195	29.453	19.430	56.713	1.00 17.39
ATOM	1503 CA	LEU	195	29.881	20.808	56.785	1.00 18.83
ATOM	1504 C	LEU	195	31.389	20.837	56.579	1.00 28.32
ATOM	1505 O	LEU	195	32.161	20.152	57.281	1.00 21.98
ATOM	1506 CB	LEU	195	29.489	21.525	58.072	1.00 22.20
ATOM	1507 CG	LEU	195	28.055	21.349	58.444	1.00 26.40
ATOM	1508 CD1	LEU	195	27.937	21.508	59.941	1.00 31.99
ATOM	1509 CD2	LEU	195	27.225	22.395	57.726	1.00 26.90
ATOM	1510 N	PRO	196	31.789	21.610	55.597	1.00 21.58
ATOM	1511 CA	PRO	196	33.177	21.666	55.154	1.00 22.17
ATOM	1512 C	PRO	196	34.080	22.623	55.892	1.00 29.56

FIG. 5AK

ATOM	1513 O	PRO	196	33.635	23.588	56.490	1.00	29.04
ATOM	1514 CB	PRO	196	33.054	22.265	53.752	1.00	22.77
ATOM	1515 CG	PRO	196	31.761	23.104	53.735	1.00	18.99
ATOM	1516 CD	PRO	196	30.910	22.567	54.861	1.00	16.42
ATOM	1517 N	ASP	197	35.379	22.410	55.716	1.00	22.95
ATOM	1518 CA	ASP	197	36.364	23.370	56.134	1.00	19.71
ATOM	1519 C	ASP	197	36.556	24.295	54.931	1.00	24.74
ATOM	1520 O	ASP	197	36.251	23.913	53.800	1.00	24.88
ATOM	1521 CB	ASP	197	37.711	22.730	56.446	1.00	22.28
ATOM	1522 CG	ASP	197	37.690	21.913	57.687	1.00	43.93
ATOM	1523 OD1	ASP	197	36.912	22.117	58.608	1.00	53.47
ATOM	1524 OD2	ASP	197	38.634	21.006	57.694	1.00	31.58
ATOM	1525 N	ASN	198	37.062	25.501	55.168	1.00	19.74
ATOM	1526 CA	ASN	198	37.254	26.470	54.118	1.00	15.38
ATOM	1527 C	ASN	198	37.974	25.889	52.971	1.00	19.61
ATOM	1528 O	ASN	198	38.958	25.236	53.134	1.00	22.69
ATOM	1529 CB	ASN	198	38.013	27.704	54.614	1.00	24.48
ATOM	1530 CG	ASN	198	37.236	28.504	55.632	1.00	52.21
ATOM	1531 OD1	ASN	198	36.107	28.174	55.961	1.00	34.54
ATOM	1532 ND2	ASN	198	37.854	29.556	56.150	1.00	55.11
ATOM	1533 N	HIS	199	37.462	26.125	51.801	1.00	16.30
ATOM	1534 CA	HIS	199	38.071	25.627	50.616	1.00	15.80
ATOM	1535 C	HIS	199	37.496	26.357	49.450	1.00	14.85
ATOM	1536 O	HIS	199	36.757	27.295	49.643	1.00	16.45
ATOM	1537 CB	HIS	199	37.988	24.103	50.471	1.00	16.53
ATOM	1538 CG	HIS	199	36.597	23.628	50.218	1.00	16.65
ATOM	1539 ND1	HIS	199	35.695	23.491	51.244	1.00	17.85
ATOM	1540 CD2	HIS	199	35.987	23.282	49.048	1.00	18.67
ATOM	1541 CE1	HIS	199	34.561	23.052	50.688	1.00	19.45
ATOM	1542 NE2	HIS	199	34.716	22.905	49.364	1.00	18.74
ATOM	1543 N	TYR	200	37.879	25.998	48.247	1.00	12.56
ATOM	1544 CA	TYR	200	37.334	26.689	47.100	1.00	14.01
ATOM	1545 C	TYR	200	37.207	25.824	45.870	1.00	15.57
ATOM	1546 O	TYR	200	37.793	24.751	45.768	1.00	20.20
ATOM	1547 CB	TYR	200	38.030	28.011	46.779	1.00	19.79
ATOM	1548 CG	TYR	200	39.382	27.745	46.202	1.00	22.25
ATOM	1549 CD1	TYR	200	39.543	27.526	44.835	1.00	22.53
ATOM	1550 CD2	TYR	200	40.473	27.605	47.057	1.00	25.73
ATOM	1551 CE1	TYR	200	40.800	27.222	44.317	1.00	35.51
ATOM	1552 CE2	TYR	200	41.739	27.314	46.559	1.00	29.34
ATOM	1553 CZ	TYR	200	41.896	27.132	45.186	1.00	54.14

FIG. 5AL

ATOM	1554 OH	TYR	200	43.153	26.820	44.703	1.00 62.66
ATOM	1555 N	LEU	201	36.393	26.309	44.946	1.00 15.07
ATOM	1556 CA	LEU	201	36.147	25.680	43.678	1.00 11.01
ATOM	1557 C	LEU	201	36.753	26.532	42.593	1.00 17.30
ATOM	1558 O	LEU	201	36.619	27.753	42.610	1.00 20.19
ATOM	1559 CB	LEU	201	34.628	25.518	43.354	1.00 10.09
ATOM	1560 CG	LEU	201	33.749	25.027	44.480	1.00 13.41
ATOM	1561 CD1	LEU	201	32.293	24.938	43.954	1.00 17.11
ATOM	1562 CD2	LEU	201	34.196	23.635	44.927	1.00 23.03
ATOM	1563 N	SER	202	37.407	25.868	41.651	1.00 10.75
ATOM	1564 CA	SER	202	38.047	26.490	40.528	1.00 8.51
ATOM	1565 C	SER	202	37.222	26.189	39.294	1.00 11.56
ATOM	1566 O	SER	202	36.919	25.038	38.996	1.00 14.58
ATOM	1567 CB	SER	202	39.485	25.987	40.442	1.00 15.68
ATOM	1568 OG	SER	202	40.067	26.353	39.228	1.00 36.44
ATOM	1569 N	THR	203	36.798	27.241	38.601	1.00 12.36
ATOM	1570 CA	THR	203	35.879	27.067	37.499	1.00 15.60
ATOM	1571 C	THR	203	36.417	27.521	36.195	1.00 20.19
ATOM	1572 O	THR	203	37.192	28.472	36.114	1.00 18.29
ATOM	1573 CB	THR	203	34.565	27.892	37.757	1.00 20.51
ATOM	1574 OG1	THR	203	34.911	29.260	37.780	1.00 20.39
ATOM	1575 CG2	THR	203	33.935	27.557	39.093	1.00 6.80
ATOM	1576 N	GLN	204	35.913	26.883	35.164	1.00 10.30
ATOM	1577 CA	GLN	204	36.173	27.271	33.807	1.00 14.85
ATOM	1578 C	GLN	204	34.956	26.980	32.921	1.00 23.14
ATOM	1579 O	GLN	204	34.334	25.932	33.056	1.00 21.66
ATOM	1580 CB	GLN	204	37.475	26.696	33.237	1.00 20.33
ATOM	1581 CG	GLN	204	37.271	25.371	32.518	1.00 40.16
ATOM	1582 CD	GLN	204	38.588	24.722	32.193	1.00 59.76
ATOM	1583 OE1	GLN	204	39.011	24.716	31.035	1.00 41.80
ATOM	1584 NE2	GLN	204	39.276	24.241	33.235	1.00 34.80
ATOM	1585 N	SER	205	34.619	27.913	32.021	1.00 15.83
ATOM	1586 CA	SER	205	33.447	27.762	31.172	1.00 14.60
ATOM	1587 C	SER	205	33.654	28.307	29.783	1.00 20.21
ATOM	1588 O	SER	205	34.282	29.337	29.581	1.00 17.82
ATOM	1589 CB	SER	205	32.197	28.445	31.758	1.00 11.88
ATOM	1590 OG	SER	205	32.121	28.406	33.177	1.00 15.45
ATOM	1591 N	ALA	206	33.065	27.630	28.827	1.00 13.00
ATOM	1592 CA	ALA	206	33.079	28.029	27.426	1.00 9.99
ATOM	1593 C	ALA	206	31.623	28.192	26.924	1.00 21.23
ATOM	1594 O	ALA	206	30.809	27.306	27.139	1.00 14.10

FIG. 5AM

ATOM	1595	CB	ALA	206	33.751	26.936	26.596	1.00	13.45
ATOM	1596	N	LEU	207	31.335	29.320	26.263	1.00	16.09
ATOM	1597	CA	LEU	207	30.036	29.167	25.706	1.00	12.07
ATOM	1598	C	LEU	207	30.070	29.445	24.235	1.00	19.76
ATOM	1599	O	LEU	207	31.014	29.840	23.576	1.00	20.82
ATOM	1600	CB	LEU	207	29.580	31.057	26.004	1.00	8.24
ATOM	1601	CG	LEU	207	29.744	31.493	27.457	1.00	16.35
ATOM	1602	CD1	LEU	207	28.955	32.790	27.707	1.00	13.78
ATOM	1603	CD2	LEU	207	29.268	30.406	28.400	1.00	18.79
ATOM	1604	N	SER	208	29.011	28.863	23.698	1.00	15.35
ATOM	1605	CA	SER	208	28.914	28.692	22.270	1.00	13.74
ATOM	1606	C	SER	208	27.449	28.852	21.794	1.00	20.16
ATOM	1607	O	SER	208	26.548	29.085	22.594	1.00	15.81
ATOM	1608	CB	SER	208	29.495	27.367	21.822	1.00	17.82
ATOM	1609	OG	SER	208	28.769	26.311	22.431	1.00	31.45
ATOM	1610	N	LYS	209	27.242	28.738	20.485	1.00	16.50
ATOM	1611	CA	LYS	209	25.907	28.828	19.906	1.00	18.02
ATOM	1612	C	LYS	209	25.637	27.610	19.031	1.00	29.99
ATOM	1613	O	LYS	209	26.578	27.004	18.502	1.00	32.55
ATOM	1614	CB	LYS	209	25.783	30.100	19.082	1.00	20.96
ATOM	1615	CG	LYS	209	24.746	31.055	19.606	1.00	34.50
ATOM	1616	CD	LYS	209	25.262	31.964	20.666	1.00	22.72
ATOM	1617	CE	LYS	209	24.370	33.159	290.896	1.00	18.96
ATOM	1618	NZ	LYS	209	23.565	33.067	22.116	1.00	27.39
ATOM	1619	N	ASP	210	24.347	27.241	18.912	1.00	27.01
ATOM	1620	CA	ASP	210	23.890	26.159	18.038	1.00	24.62
ATOM	1621	C	ASP	210	23.465	26.793	16.705	1.00	26.77
ATOM	1622	O	ASP	210	22.468	27.514	16.605	1.00	23.00
ATOM	1623	CB	ASP	210	22.744	25.361	18.691	1.00	24.43
ATOM	1624	CG	ASP	210	22.197	24.249	17.839	1.00	35.55
ATOM	1625	OD1	ASP	210	22.333	24.185	16.631	1.00	36.53
ATOM	1626	OD2	ASP	210	21.499	23.400	18.535	1.00	45.51
ATOM	1627	N	PRO	211	24.306	26.618	15.708	1.00	30.25
ATOM	1628	CA	PRO	211	24.120	27.224	14.397	1.00	30.30
ATOM	1629	C	PRO	211	22.733	26.982	13.770	1.00	39.72
ATOM	1630	O	PRO	211	22.253	27.782	12.959	1.00	37.65
ATOM	1631	CB	PRO	211	25.197	26.620	13.500	1.00	29.99
ATOM	1632	CG	PRO	211	25.782	25.418	14.255	1.00	38.59
ATOM	1633	CD	PRO	211	25.158	25.405	15.647	1.00	35.05
ATOM	1634	N	ASN	212	22.102	25.868	14.140	1.00	39.64
ATOM	1635	CA	ASN	212	20.808	25.515	13.592	1.00	39.60

FIG. 5AN

ATOM	1636 C	ASN	212	19.642	25.894	14.497	1.00 41.92
ATOM	1637 O	ASN	212	18.485	25.518	14.263	1.00 42.30
ATOM	1638 CB	ASN	212	20.788	24.028	13.236	1.00 48.64
ATOM	1639 CG	ASN	212	21.883	23.678	12.230	1.00 53.61
ATOM	1640 N	GLU	213	19.947	26.675	15.520	1.00 27.84
ATOM	1641 CA	GLU	213	18.953	27.080	16.478	1.00 20.43
ATOM	1642 C	GLU	213	18.485	28.527	16.241	1.00 29.95
ATOM	1643 O	GLU	213	19.247	29.475	16.324	1.00 32.77
ATOM	1644 CB	GLU	213	19.535	26.878	17.894	1.00 16.45
ATOM	1645 CG	GLU	213	18.594	27.326	18.995	1.00 18.29
ATOM	1646 CD	GLU	213	17.229	26.703	18.853	1.00 38.01
ATOM	1647 OE1	GLU	213	16.238	27.334	18.508	1.00 25.07
ATOM	1648 OE2	GLU	213	17.223	25.423	19.122	1.00 19.17
ATOM	1649 N	LYS	214	17.223	28.713	15.963	1.00 22.99
ATOM	1650 CA	LYS	214	16.721	30.081	15.726	1.00 22.84
ATOM	1651 C	LYS	214	16.252	30.778	16.982	1.00 21.50
ATOM	1652 O	LYS	214	16.130	32.016	17.032	1.00 28.15
ATOM	1653 CB	LYS	214	15.653	30.197	14.606	1.00 27.58
ATOM	1654 CG	LYS	214	16.153	29.816	13.209	1.00 32.71
ATOM	1655 CD	LYS	214	16.752	30.979	12.431	1.00 55.31
ATOM	1656 N	ARG	215	15.947	30.028	18.014	1.00 14.52
ATOM	1657 CA	ARG	215	15.518	30.726	19.209	1.00 15.58
ATOM	1658 C	ARG	215	16.719	31.382	19.892	1.00 21.87
ATOM	1659 O	ARG	215	17.848	31.075	19.572	1.00 26.69
ATOM	1660 CB	ARG	215	14.808	29.804	20.159	1.00 18.82
ATOM	1661 CG	ARG	215	13.660	29.067	19.475	1.00 23.30
ATOM	1662 CD	ARG	215	13.220	27.806	20.205	1.00 15.45
ATOM	1663 NE	ARG	215	14.107	26.668	19.929	1.00 28.08
ATOM	1664 CZ	ARG	215	14.022	25.473	20.543	1.00 21.38
ATOM	1665 NH1	ARG	215	13.074	25.215	21.455	1.00 23.92
ATOM	1666 NH2	ARG	215	14.893	24.514	20.225	1.00 20.46
ATOM	1667 N	ASP	216	16.466	32.275	20.830	1.00 16.72
ATOM	1668 CA	ASP	216	17.556	32.895	21.617	1.00 19.06
ATOM	1669 C	ASP	216	18.047	31.817	22.607	1.00 20.02
ATOM	1670 O	ASP	216	17.261	31.214	23.350	1.00 18.45
ATOM	1671 CB	ASP	216	17.066	34.169	22.383	1.00 21.33
ATOM	1672 CG	ASP	216	18.138	35.140	22.893	1.00 20.97
ATOM	1673 OD1	ASP	216	17.869	36.079	23.620	1.00 28.46
ATOM	1674 OD2	ASP	216	19.342	34.900	22.441	1.00 20.37
ATOM	1675 N	HIS	217	19.332	31.537	22.589	1.00 13.18
ATOM	1676 CA	HIS	217	19.813	30.482	23.433	1.00 11.21

FIG. 5A0

ATOM	1677 C	HIS	217	21.313	30.614	23.723	1.00	21.35
ATOM	1678 O	HIS	217	22.014	31.471	23.163	1.00	15.03
ATOM	1679 CB	HIS	217	19.587	29.168	22.690	1.00	13.03
ATOM	1680 CG	HIS	217	20.525	29.025	21.542	1.00	15.49
ATOM	1681 ND1	HIS	217	20.463	29.871	20.449	1.00	17.88
ATOM	1682 CD2	HIS	217	21.589	28.172	21.361	1.00	17.51
ATOM	1683 CE1	HIS	217	21.457	29.524	19.635	1.00	17.94
ATOM	1684 NE2	HIS	217	22.152	28.501	20.151	1.00	17.59
ATOM	1685 N	MSE	218	21.794	29.725	24.576	1.00	11.26
ATOM	1686 CA	MSE	218	23.186	29.642	24.887	1.00	11.49
ATOM	1687 C	MSE	218	23.560	28.198	25.094	1.00	24.15
ATOM	1688 O	MSE	218	22.822	27.446	25.751	1.00	20.70
ATOM	1689 CB	MSE	218	23.539	30.421	26.172	1.00	12.84
ATOM	1690 CG	MSE	218	24.809	30.004	26.907	1.00	12.59
ATOM	1691 SE	MSE	218	25.267	31.128	28.434	1.00	29.94
ATOM	1692 CE	MSE	218	24.039	30.502	29.781	1.00	13.54
ATOM	1693 N	VAL	219	24.727	27.824	24.558	1.00	15.62
ATOM	1694 CA	VAL	219	25.309	26.518	24.782	1.00	10.58
ATOM	1695 C	VAL	219	26.473	26.689	25.753	1.00	16.54
ATOM	1696 O	VAL	219	27.280	27.604	25.585	1.00	15.54
ATOM	1697 CB	VAL	219	25.774	25.883	23.498	1.00	15.08
ATOM	1698 CG1	VAL	219	26.330	24.495	23.824	1.00	14.34
ATOM	1699 CG2	VAL	219	24.599	25.766	22.512	1.00	15.78
ATOM	1700 N	LEU	220	26.523	25.836	26.783	1.00	10.95
ATOM	1701 CA	LEU	220	27.490	25.939	27.850	1.00	11.01
ATOM	1702 C	LEU	220	28.206	24.643	28.184	1.00	21.26
ATOM	1703 O	LEU	220	27.592	23.577	28.324	1.00	15.94
ATOM	1704 CB	LEU	220	26.807	26.545	29.100	1.00	13.75
ATOM	1705 CG	LEU	220	27.624	26.578	30.402	1.00	21.10
ATOM	1706 CD1	LEU	220	28.433	27.875	30.483	1.00	23.53
ATOM	1707 CD2	LEU	220	26.663	26.556	31.586	1.00	22.04
ATOM	1708 N	LEU	221	29.570	24.758	28.273	1.00	19.04
ATOM	1709 CA	LEU	221	30.498	23.666	28.697	1.00	13.22
ATOM	1710 C	LEU	221	31.309	24.178	29.887	1.00	10.73
ATOM	1711 O	LEU	221	31.846	25.267	29.857	1.00	12.98
ATOM	1712 CB	LEU	221	31.382	23.102	27.549	1.00	13.74
ATOM	1713 CG	LEU	221	32.580	22.257	28.045	1.00	18.64
ATOM	1714 CD1	LEU	221	32.149	20.868	28.496	1.00	17.38
ATOM	1715 CD2	LEU	221	33.571	22.109	26.911	1.00	26.97
ATOM	1716 N	GLU	222	31.316	23.446	30.963	1.00	9.31
ATOM	1717 CA	GLU	222	31.936	23.929	32.144	1.00	9.97

FIG. 5AP

ATOM	1718 C	GLU	222	32.548	22.803	32.951	1.00	12.94
ATOM	1719 O	GLU	222	32.072	21.662	32.966	1.00	13.38
ATOM	1720 CB	GLU	222	30.836	24.762	32.896	1.00	12.14
ATOM	1721 CG	GLU	222	31.092	25.119	34.364	1.00	13.88
ATOM	1722 CD	GLU	222	29.895	25.891	34.934	1.00	13.57
ATOM	1723 OE1	GLU	222	29.128	26.477	34.240	1.00	19.47
ATOM	1724 OE2	GLU	222	29.752	25.789	36.207	1.00	18.51
ATOM	1725 N	PHE	223	33.687	23.123	33.542	1.00	15.86
ATOM	1726 CA	PHE	223	34.476	22.227	34.373	1.00	9.34
ATOM	1727 C	PHE	223	34.711	22.864	35.722	1.00	11.08
ATOM	1728 O	PHE	223	35.028	24.055	35.828	1.00	19.86
ATOM	1729 CB	PHE	223	35.847	21.919	33.684	1.00	8.30
ATOM	1730 CG	PHE	223	35.703	21.134	32.431	1.00	10.50
ATOM	1731 CD1	PHE	223	35.570	19.747	32.469	1.00	13.56
ATOM	1732 CD2	PHE	223	35.750	21.750	31.184	1.00	11.32
ATOM	1733 CE1	PHE	223	35.481	19.010	31.287	1.00	12.58
ATOM	1734 CE2	PHE	223	35.667	21.032	29.995	1.00	12.17
ATOM	1735 CZ	PHE	223	35.521	19.648	30.050	1.00	10.87
ATOM	1736 N	VAL	224	34.542	22.081	36.765	1.00	9.28
ATOM	1737 CA	VAL	224	34.708	22.587	38.080	1.00	11.18
ATOM	1738 C	VAL	224	35.324	21.553	39.010	1.00	17.52
ATOM	1739 O	VAL	224	34.848	20.418	39.137	1.00	13.17
ATOM	1740 CB	VAL	224	33.370	23.078	38.662	1.00	16.61
ATOM	1741 CG1	VAL	224	33.622	23.736	40.022	1.00	13.90
ATOM	1742 CG2	VAL	224	32.674	24.048	37.697	1.00	13.85
ATOM	1743 N	THR	225	36.380	21.965	39.676	1.00	11.71
ATOM	1744 CA	THR	225	37.026	21.099	40.617	1.00	11.61
ATOM	1745 C	THR	225	37.366	21.798	41.927	1.00	14.76
ATOM	1746 O	THR	225	37.702	23.002	41.962	1.00	16.64
ATOM	1747 CB	THR	225	38.162	20.279	40.014	1.00	20.38
ATOM	1748 OG1	THR	225	39.288	20.337	40.822	1.00	30.44
ATOM	1749 CG2	THR	225	38.468	20.722	38.631	1.00	10.89
ATOM	1750 N	ALA	226	37.222	21.065	43.011	1.00	7.89
ATOM	1751 CA	ALA	226	37.478	21.595	44.352	1.00	11.63
ATOM	1752 C	ALA	226	38.969	21.558	44.677	1.00	16.61
ATOM	1753 O	ALA	226	39.687	20.699	44.199	1.00	15.60
ATOM	1754 CB	ALA	226	36.695	20.847	45.444	1.00	12.17
ATOM	1755 N	ALA	227	39.395	22.490	45.479	1.00	13.95
ATOM	1756 CA	ALA	227	40.789	22.550	45.871	1.00	19.64
ATOM	1757 C	ALA	227	40.987	23.299	47.170	1.00	26.33
ATOM	1758 O	ALA	227	40.042	23.715	47.840	1.00	25.39

FIG. 5AQ

ATOM	1759 CB	ALA	227	41.557	23.246	44.760	1.00 18.42
ATOM	1760 N	GLY	228	42.245	23.476	47.523	1.00 23.28
ATOM	1761 CA	GLY	228	42.616	24.292	48.658	1.00 21.61
ATOM	1762 C	GLY	228	42.805	23.562	49.939	1.00 32.93
ATOM	1763 O	GLY	228	42.948	24.201	51.009	1.00 32.53
ATOM	1764 N	ILE	229	42.803	22.231	49.842	1.00 33.59
ATOM	1765 CA	ILE	229	43.006	21.375	50.998	1.00 31.81
ATOM	1766 C	ILE	229	44.016	20.291	50.633	1.00 28.78
ATOM	1767 O	ILE	229	45.090	20.176	51.246	1.00 96.02
ATOM	1768 CB	ILE	229	41.691	20.772	51.519	1.00 35.70
ATOM	1769 CG1	ILE	229	40.890	21.807	52.325	1.00 30.66
ATOM	1770 CG2	ILE	229	41.990	19.549	52.392	1.00 33.37
ATOM	1771 CD1	ILE	229	39.386	21.715	52.092	1.00 38.74
ATOM	1772 O	HOH	301	27.530	12.735	38.010	1.00 15.09
ATOM	1773 O	HOH	302	23.919	34.589	37.331	1.00 10.29
ATOM	1774 O	HOH	303	27.229	34.816	35.487	1.00 11.12
ATOM	1775 O	HOH	304	29.914	18.943	44.692	1.00 16.10
ATOM	1776 O	HOH	305	30.956	21.886	49.900	1.00 21.47
ATOM	1777 O	HOH	306	20.072	31.196	43.592	1.00 16.85
ATOM	1778 O	HOH	307	26.660	48.630	33.797	1.00 24.67
ATOM	1779 O	HOH	308	22.329	33.239	41.399	1.00 14.11
ATOM	1780 O	HOH	309	22.465	48.025	32.810	1.00 18.51
ATOM	1781 O	HOH	310	31.012	39.126	29.118	1.00 16.01
ATOM	1782 O	HOH	311	33.067	35.809	33.010	1.00 19.92
ATOM	1783 O	HOH	312	31.130	37.076	30.841	1.00 12.68
ATOM	1784 O	HOH	313	40.304	30.058	38.616	1.00 56.07
ATOM	1785 O	HOH	314	34.166	26.379	57.222	1.00 22.58
ATOM	1786 O	HOH	315	36.215	35.320	43.598	1.00 22.30
ATOM	1787 O	HOH	316	33.866	29.786	34.671	1.00 12.21
ATOM	1865 O	HOH	317	42.341	20.166	43.534	1.00 26.67
ATOM	1788 O	HOH	318	10.270	28.684	30.403	1.00 43.66
ATOM	1789 O	HOH	319	28.448	16.822	30.655	1.00 25.44
ATOM	1790 O	HOH	320	30.612	20.922	37.231	1.00 21.57
ATOM	1791 O	HOH	321	11.639	37.421	26.801	1.00 34.12
ATOM	1792 O	HOH	322	27.030	37.308	36.869	1.00 13.10
ATOM	1793 O	HOH	323	33.119	14.524	43.070	1.00 30.93
ATOM	1794 O	HOH	324	37.973	14.036	53.352	1.00 35.39
ATOM	1795 O	HOH	235	32.015	49.100	37.028	1.00 59.37
ATOM	1796 O	HOH	326	11.959	12.020	43.429	1.00 29.06
ATOM	1797 O	HOH	327	36.760	29.941	31.666	1.00 22.03
ATOM	1864 O	HOH	328	15.305	26.513	15.694	1.00 39.62

FIG. 5AR

ATOM	1798 O	HOH	329	33.005	46.924	36.994	1.00 22.07
ATOM	1863 O	HOH	330	23.801	36.134	22.715	1.00 45.30
ATOM	1799 O	HOH	331	33.609	31.296	26.261	1.00 23.65
ATOM	1862 O	HOH	332	34.942	24.780	29.532	1.00 38.93
ATOM	1800 O	HOH	333	25.235	12.919	54.611	1.00 36.20
ATOM	1861 O	HOH	334	38.048	23.467	36.645	1.00 37.73
ATOM	1801 O	HOH	335	12.284	43.511	38.338	1.00 33.79
ATOM	1802 O	HOH	336	9.826	47.020	32.568	1.00 46.67
ATOM	1803 O	HOH	337	7.671	41.532	29.806	1.00 40.88
ATOM	1804 O	HOH	338	15.430	23.713	26.808	1.00 34.73
ATOM	1805 O	HOH	339	24.344	20.385	25.121	1.00 53.42
ATOM	1806 O	HOH	340	31.550	10.656	40.819	1.00 47.85
ATOM	1807 O	HOH	341	17.569	23.030	25.796	1.00 28.17
ATOM	1808 O	HOH	342	19.174	38.552	23.965	1.00 45.54
ATOM	1809 O	HOH	343	24.268	37.527	25.415	1.00 30.97
ATOM	1810 O	HOH	344	21.266	29.482	41.551	1.00 19.69
ATOM	1811 O	HOH	345	20.668	26.999	41.933	1.00 11.81
ATOM	1812 O	HOH	346	24.780	24.795	43.460	1.00 20.95
ATOM	1813 O	HOH	347	42.962	13.170	46.312	1.00 31.00
ATOM	1814 O	HOH	348	32.322	14.088	47.013	1.00 28.20
ATOM	1815 O	HOH	349	31.708	13.186	49.679	1.00 35.57
ATOM	1816 O	HOH	350	22.408	35.801	50.514	1.00 40.71
ATOM	1817 O	HOH	351	25.366	47.090	42.583	1.00 38.15
ATOM	1818 O	HOH	352	27.243	47.647	43.977	1.00 41.55
ATOM	1819 O	HOH	353	29.868	45.076	42.906	1.00 29.32
ATOM	1820 O	HOH	354	14.175	22.269	42.680	1.00 74.11
ATOM	1821 O	HOH	355	13.414	10.739	35.791	1.00 29.92
ATOM	1822 O	HOH	356	20.338	9.974	37.765	1.00 30.46
ATOM	1823 O	HOH	357	23.520	40.420	24.953	1.00 29.75
ATOM	1824 O	HOH	358	25.718	41.692	26.023	1.00 30.43
ATOM	1825 O	HOH	359	26.826	38.466	25.345	1.00 31.72
ATOM	1826 O	HOH	360	37.768	42.373	25.123	1.00 41.53
ATOM	1827 O	HOH	361	40.078	42.268	25.852	1.00 37.12
ATOM	1828 O	HOH	362	31.483	38.677	22.083	1.00 54.21
ATOM	1829 O	HOH	363	33.891	37.723	30.126	1.00 23.35
ATOM	1860 O	HOH	364	39.936	26.543	36.329	1.00 47.93
ATOM	1830 O	HOH	365	36.631	34.210	41.636	1.00 62.74
ATOM	1831 O	HOH	366	37.038	29.783	52.197	1.00 40.07
ATOM	1832 O	HOH	367	37.289	37.407	40.231	1.00 37.59
ATOM	1833 O	HOH	368	18.930	17.517	52.472	1.00 35.80
ATOM	1834 O	HOH	369	19.506	18.914	57.913	1.00 45.72

FIG. 5AS

ATOM	1835 O	HOH	370	30.903	26.708	41.139	1.00	21.54
ATOM	1836 O	HOH	371	30.369	25.678	24.583	1.00	22.46
ATOM	1837 O	HOH	372	21.000	33.705	20.826	1.00	26.00
ATOM	1838 O	HOH	373	13.648	32.794	21.329	1.00	27.98
ATOM	1839 O	HOH	374	29.735	25.683	38.707	1.00	21.00
ATOM	1859 O	HOH	375	33.670	24.419	60.503	1.00	50.04
ATOM	1840 O	HOH	376	30.034	11.047	37.420	1.00	43.28
ATOM	1841 O	HOH	377	8.662	35.846	35.068	1.00	51.94
ATOM	1842 O	HOH	378	10.847	36.466	39.503	1.00	42.32
ATOM	1843 O	HOH	379	14.395	48.943	39.085	1.00	29.72
ATOM	1844 O	HOH	380	36.676	11.660	40.172	1.00	39.81
ATOM	1845 O	HOH	381	35.968	7.212	34.763	1.00	58.66
ATOM	1846 O	HOH	382	17.426	21.988	21.077	1.00	41.69
ATOM	1847 O	HOH	383	29.837	22.623	39.378	1.00	32.82
ATOM	1848 O	HOH	384	23.855	29.386	55.164	1.00	55.00
ATOM	1849 O	HOH	385	17.408	35.360	47.495	1.00	61.61
ATOM	1850 O	HOH	386	27.900	49.720	42.445	1.00	47.70
ATOM	1851 O	HOH	387	13.932	36.230	44.385	1.00	45.08
ATOM	1852 O	HOH	388	12.650	28.021	43.288	1.00	49.86
ATOM	1853 O	HOH	389	16.974	42.367	43.435	1.00	34.38
ATOM	1854 O	HOH	390	37.335	42.653	28.295	1.00	64.46
ATOM	1855 O	HOH	391	29.701	49.856	35.323	1.00	62.61
ATOM	1856 O	HOH	392	27.267	50.835	33.976	1.00	66.60
ATOM	1857 O	HOH	393	19.661	29.181	51.537	1.00	34.01
ATOM	1858 O	HOH	394	29.412	17.505	59.089	1.00	51.78
TER								
END								

FIG. 5AT

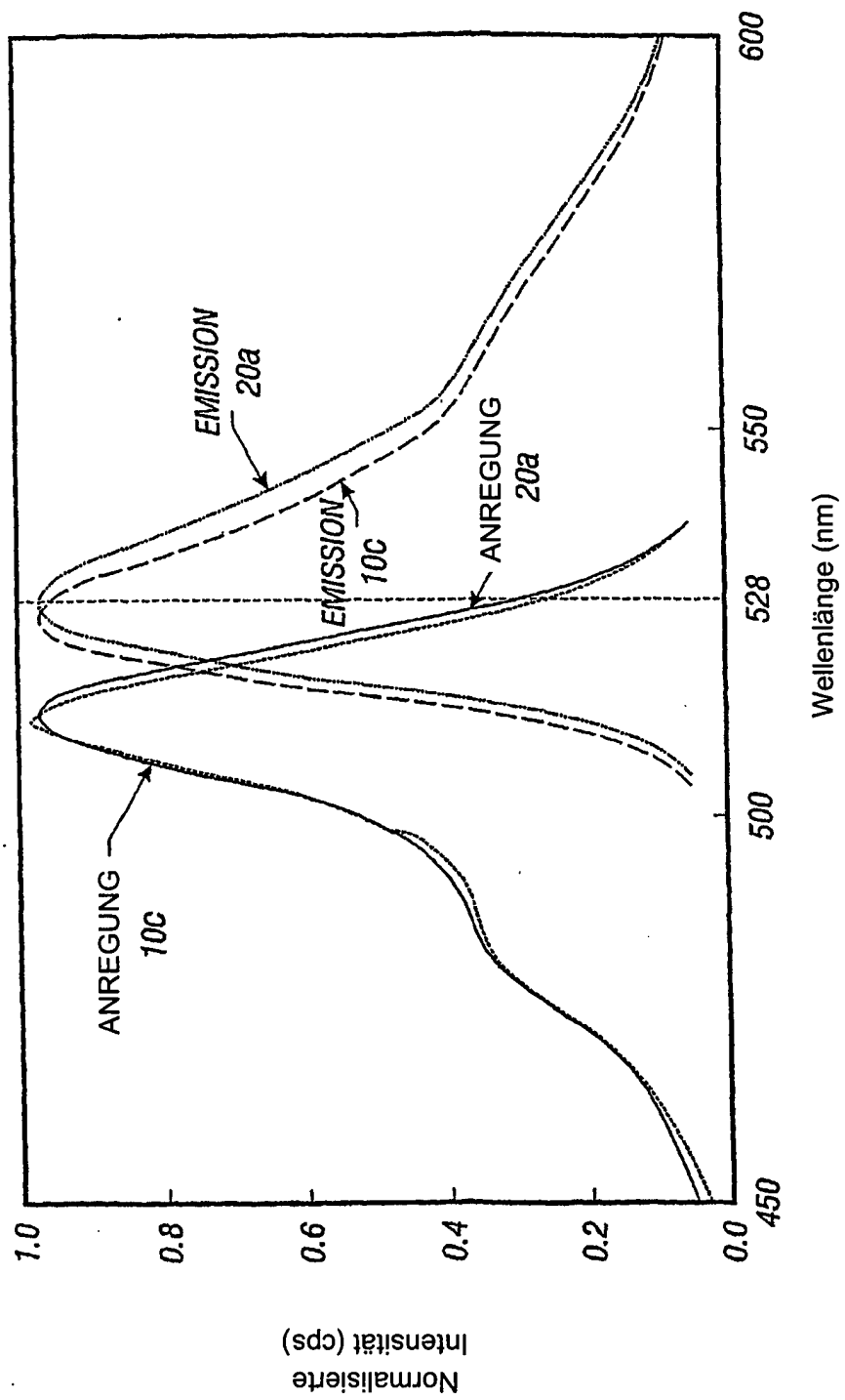


FIG. 6

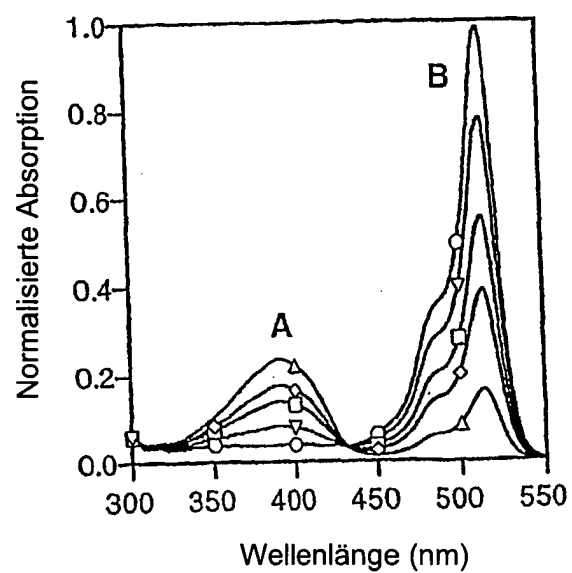


FIG. 7

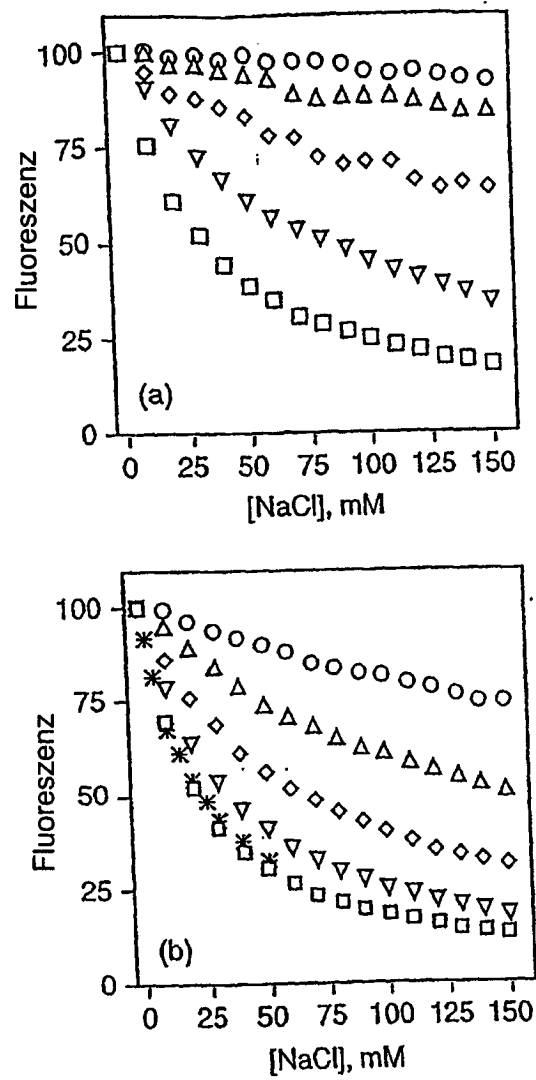


FIG. 8

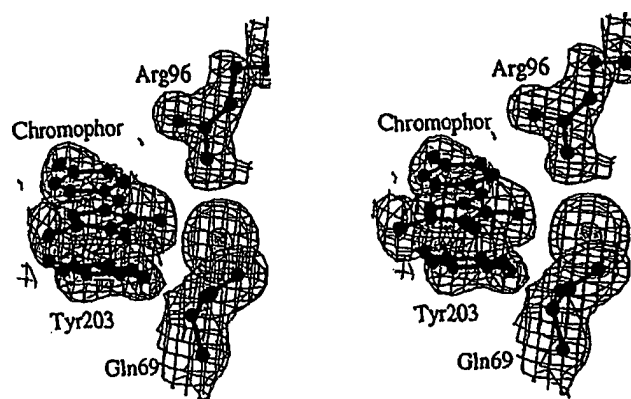


FIG. 9

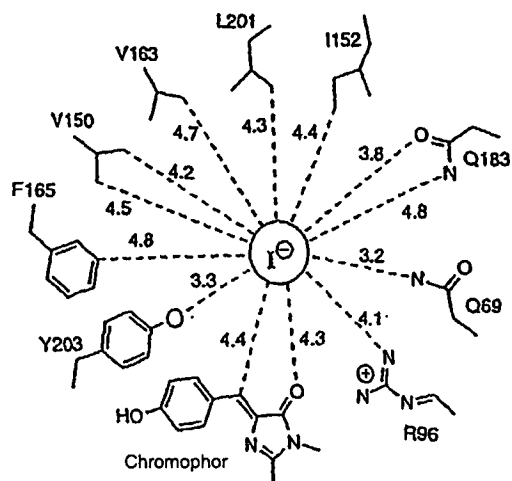


FIG. 10

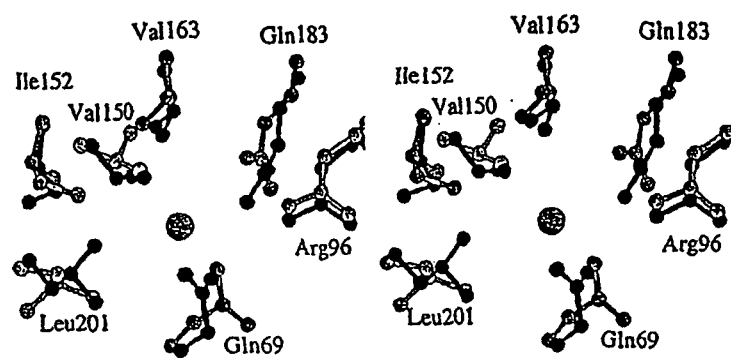
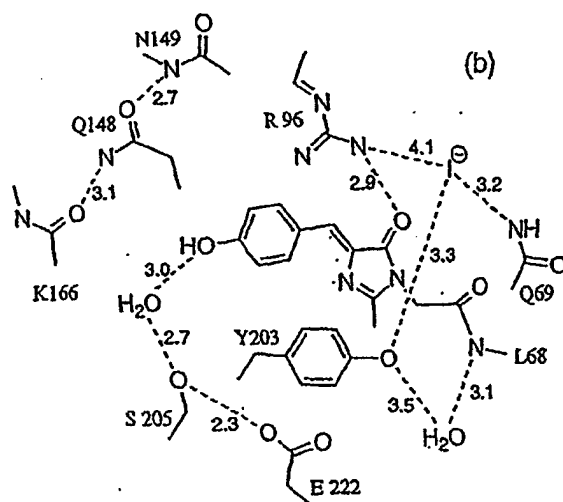


FIG. 11



105/108

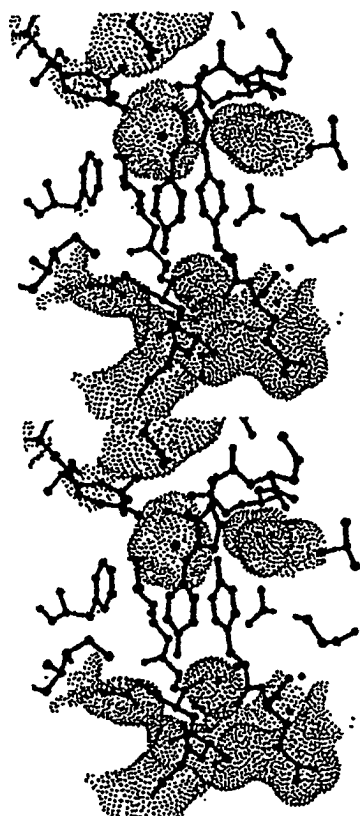


FIG. 13

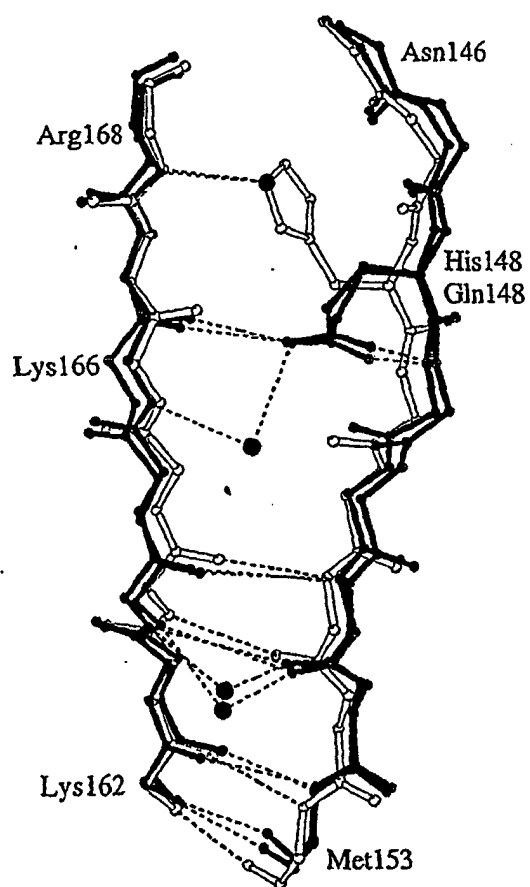
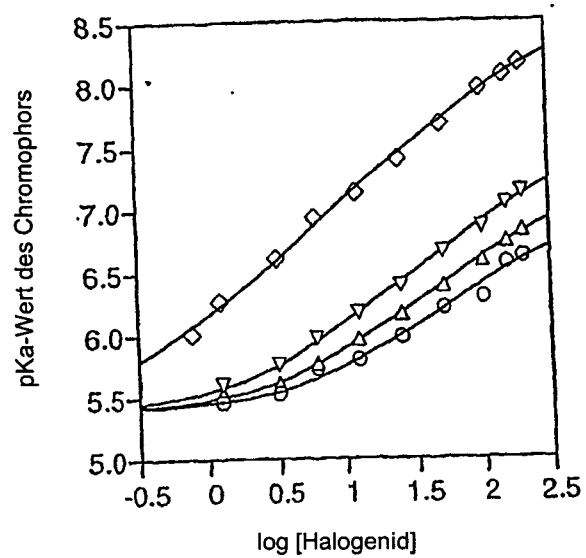


FIG. 14

FIG. 15