



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 36 732 T2** 2008.05.29

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 137 761 B1**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 9/18** (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 36 732.8**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/DK99/00678**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 957 265.4**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2000/034450**

(86) PCT-Anmeldetag: **03.12.1999**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **15.06.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **04.10.2001**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **01.08.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **29.05.2008**

(30) Unionspriorität:

160498	04.12.1998	DK
990330	09.03.1999	DK

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(73) Patentinhaber:

Novozymes A/S, Bagsvaerd, DK

(72) Erfinder:

**ABO, Masanobu, Funabashi-shi Chiba-ken 274,
JP; FUKUYAMA, Shiro, Chiba-shi Chiba 211-0012,
JP; SVENDSEN, Allan, DK-3460 Birkerød, DK;
MATSUI, Tomoko, Ichikawa Chiba 272-0026, JP**

(74) Vertreter:

**Patentanwälte Isenbruck Bösl Hörschler
Wichmann Huhn, 81675 München**

(54) Bezeichnung: **CUTINASE-VARIANTEN**

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**GEBIET DER ERFINDUNG**

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft eine Cutinase-Variante, genauer eine Cutinase-Variante mit verbesserter Wärmestabilität. Die Erfindung betrifft auch eine DNA, die die Variante codiert, einen Vektor, der die DNA-Sequenz umfasst, eine transformierte Wirtszelle, die die DNA-Sequenz oder den Vektor beherbergt, ein Verfahren zur Herstellung der Variante und die Verwendung der Variante.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Cutinasen sind lipolytische Enzyme, die in der Lage sind, das Substrat Cutin zu hydrolysieren. Cutinasen sind aus verschiedenen Pilzen bekannt (P.E. Kolattukudy in „Lipases“, Hrsg. B. Borgström und H.L. Brockman, Elsevier 1984, 471–504). Die Aminosäuresequenz und die Kristallstruktur einer Cutinase aus *Fusarium solani* pisi wurden bereits beschrieben (S. Longhi et al., Journal of Molecular Biology, 268 (4), 779–799 (1997)). Auch die Aminosäuresequenz einer Cutinase aus *Humicola insolens* wurde bereits veröffentlicht (US 5,827,719).

[0003] Eine Anzahl von Varianten von Cutinasen aus *Fusarium solani* pisi ist bereits veröffentlicht: WO 94/14963; WO 94/14964; Appl. Environm. Microbiol. 64, 2794–2799, 1998; Proteins: Structure, Function and Genetics 26, 442–458, 1996; J. of Computational Chemistry 17, 1783–1803, 1996; Protein Engineering 6, 157–165, 1993; Proteins: Structure, Function and Genetics 33, 253–264, 1998; J. of Biotechnology 66, 11–26, 1998; Biochemistry 35, 398–410, 1996.

[0004] Pilzliche Cutinasen können zur enzymatischen Hydrolyse von cyclischen Oligomeren von Poly(ethylenterephthalat) verwendet werden, z. B. bei der Veredlung von Garn oder Stoff aus Poly(ethylenterephthalat)-Fasern (WO 97/27237). Es ist jedoch wünschenswert, die Wärmestabilität bekannter pilzlicher Cutinasen zu verbessern, um eine höhere Prozesstemperatur zu ermöglichen.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0005] Die Erfinder haben festgestellt, dass bestimmte Varianten pilzlicher Cutinasen eine verbesserte Wärmestabilität aufweisen.

[0006] Demnach stellt die Erfindung eine Variante einer pilzlichen Eltern-Cutinase bereit, wobei

- a) die Eltern-Cutinase eine Aminosäuresequenz aufweist, die wenigstens 70% homolog zu der Cutinase von *H. insolens* Stamm DSM 1800 ist,
- b) die Variante eine Aminosäuresequenz aufweist, die 1–20 Änderungen im Vergleich zur Eltern-Cutinase aufweist,
- c) die Variante den Austausch eines negativen Aminosäurerestes an einer Stelle, die der Position E6, E10, E30, E47, D63, E82 und/oder E179 entspricht, durch eine neutrale oder positive Aminosäure oder eine Substitution mit Pro an einer Stelle, die A14 oder R51 in der Eltern-Cutinase entspricht, umfasst,
- d) die Variante eine hydrolytische Aktivität für cyclisches Tri(ethylenterephthalat) oder Terephthalsäure-bis(2-hydroxyethyl)-ester-dibenzoat aufweist, und
- e) die Variante wärmerestabiler ist als die Eltern-Cutinase.

[0007] Die Erfindung stellt auch eine DNA Sequenz, die die Variante codiert, einen Expressionsvektor, der die DNA-Sequenz umfasst, eine transformierte Wirtszelle, die die DNA-Sequenz oder den Expressionsvektor beherbergt, ein Verfahren zur Herstellung der Variante, Verfahren unter Verwendung der Variante und eine Detergensenzusammensetzung, die die Variante umfasst, bereit.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0008] [Fig. 1](#) gibt die Koordinaten der 3D-Struktur der Cutinase von *H. insolens* an.

[0009] [Fig. 2](#) ist ein Computermodell, das die dreidimensionalen Strukturen der Cutinasen von *F. solani* pisi (links) und *H. insolens* (rechts) zeigt. Es wurden verschiedene Farben verwendet, um die N-terminale Aminosäure und Zonen von 12 Å und 17 Å Durchmesser um diese herum zu bezeichnen.

[0010] [Fig. 3–Fig. 6](#) zeigen die Hydrolyse von c3ET. Einzelheiten sind in den Beispielen angegeben.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

Pilz-Cutinase

[0011] Die Eltern-Cutinase ist eine Pilz-Cutinase, wie eine filamentöse Pilz-Cutinase, z. B. die einem Stamm von *Humicola* oder *Fusarium*, speziell *H. insolens* oder *F. solani pisi*, genauer *H. insolens* Stamm DSM 1800, arteigen ist.

[0012] Die Aminosäuresequenz der Cutinase des *H. insolens* Stamm DSM 1800 und die sie codierende DNA-Sequenz sind als SEQ ID NO: 2 und SEQ ID NO: 1 der US 5,827,719 gezeigt. Das hier verwendete Nummerierungssystem für die *H. insolens* Cutinase beruht auf dem reifen Peptid, wie in der SEQ ID NO: 2 gezeigt.

[0013] Die Aminosäuresequenz der Cutinase von *F. solani pisi* ist als reifes Peptid in [Fig. 1D](#) von WO 94/14964 gezeigt. Das hier verwendete Nummerierungssystem für die *F. solani pisi* Cutinase ist das in WO 94/14964 verwendete; es schließt die Pro-Sequenz ein, die in [Fig. 1D](#) gezeigt ist; daher befindet sich die reife Cutinase an den Positionen 16–14.

[0014] Die Eltern-Cutinase kann eine Aminosäuresequenz aufweisen, die wenigstens 50% (insbesondere wenigstens 70% oder wenigstens 80%) zu der Cutinase von *H. insolens* Stamm DSM 1800 homolog ist. Die Eltern-Cutinase kann insbesondere eine Cutinase sein, die mit der Cutinase von *H. insolens* Stamm DSM 1800 abgeglichen werden kann.

Nomenklatur für Aminosäuren und die Änderungen

[0015] Die Beschreibung und Ansprüche bezeichnen Aminosäuren mit ihrem Einbuchstabencode. Eine bestimmte Aminosäure in einer Sequenz wird durch ihren Einbuchstabencode und ihre Position benannt, z. B. Q1 bezeichnet Gln (Glutamin bei Position 1, d. h. am N-Terminus).

[0016] Die hierin zur Definition von Substitutionen verwendete Nomenklatur ist grundsätzlich wie in WO 92/05249 beschrieben. Demnach bezeichnet R51P die Substitution von R (Arg) an Position 51 mit P (Pro).

Homologie und Abgleich

[0017] Für Zwecke der vorliegenden Erfindung kann der Homologiegrad zweckmäßigerweise nach dem Verfahren, das bei Needleman, S.B. und Wunsch, C.D. (1970), *Journal of Molecular Biology*, 48, 443–45 beschrieben ist, mit den folgenden Einstellungen für den Polypeptid-Sequenzvergleich bestimmt werden: GAP creation penalty von 3.0 und GAP extension penalty von 0,1. Die Bestimmung kann durch ein Computerprogramm durchgeführt werden, das als GAP bekannt ist, das im GCG Programmpaket (Programm-Anleitung für das Wisconsin Package, Version 8, August 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711) bereitgestellt ist.

[0018] Zwei gegebene Sequenzen können nach dem Verfahren, das bei Needleman (supra) beschrieben ist, unter Verwendung der gleichen Parameter abgeglichen werden. Dies kann mit einem GAP-Programm (supra) erfolgen.

Dreidimensionale Struktur von Cutinase

[0019] Die Struktur der Cutinase von *H. insolens* wurde in Übereinstimmung mit dem Prinzip für röntgenkristallographische Verfahren gelöst, wie z. B. in *X-Ray Structure Determination*, Stout, G.K. und Jensen, L.H., John Wiley & Sons, Inc. NY, 1989 beschrieben. Die Strukturkoordinaten für eine aufgelöste Kristallstruktur bei 2,2 Å Auflösung unter Verwendung des Verfahrens des isomorphen Ersatzes sind in [Fig. 1](#) im Standard-PDB-Format (Protein Data Bank, Brookhaven National Laboratory, Brookhaven, CT) angegeben.

[0020] Die Struktur der Cutinase von *F. solani pisi* ist bei Martinez et al. (1992) *Nature* 356, 615–618 beschrieben. Die 3D-Strukturen der Cutinasen von *F. solani pisi* und *H. insolens* werden als Computermodell in [Fig. 2](#) verglichen.

[0021] Es sollte festgehalten werden, dass die dreidimensionalen Gesamt-Strukturen von Pilz-Cutinasen sehr ähnlich sind und durch Röntgenkristallographie als stark homolog gezeigt wurden. Die Ähnlichkeiten zwischen den Cutinasen von *F. solani pisi* und *H. insolens* gehen eindeutig aus dem Computermodell in [Fig. 2](#) hervor.

Daher sind Modifikationen der für eine Pilz-Cutinase gezeigten Art auch für andere Pilz-Cutinasen funktionell.

Substitution nahe dem N-Terminus

[0022] Die erfindungsgemäße Variante besitzt eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen in der Nachbarschaft des N-Terminus. Die Substitution liegt in einer Entfernung von 17 Å (z. B. innerhalb von 12 Å) und/oder innerhalb von 20 Positionen (z. B. innerhalb von 15 Positionen) des N-Terminus. Der Abstand vom N-Terminus muss zwischen dem C α -Atom der Aminosäuren berechnet werden und wird aus einer Aminosäure in einer Kristallstruktur (d. h. sichtbar in der Röntgenstruktur) berechnet.

[0023] In der Cutinase des *H. insolens* Stamm DSM 1800 sind die zwei N-terminalen Aminosäuren (Q1 und L2, d. h. Gin und Leu an den Positionen 1 und 2) nicht in der Röntgenstruktur sichtbar, also muss die Entfernung aus der Aminosäure G3 berechnet werden. Aminosäuren innerhalb von 17 Å schließen die Positionen 3–12, 18, 20–60, 62–64, 82, 85–86, 100–108, 110–111, 130–132, 174, 176–182, 184–185, 188 und 192 ein. Diejenigen innerhalb von 12 Å schließen die Positionen 3–8, 22–27, 30–47, 53–59, 102, 177 und 180–181 ein.

[0024] In der Cutinase von *F. solani pisi* ist die N-terminale Aminosäure G17 in der Röntgenkristallstruktur sichtbar. Aminosäuren innerhalb von 17 Å schließen die Positionen 17–26, 34–75, 77–79, 101, 115, 117–119, 147, 191–197, 199–200 und 203 ein. Solche innerhalb von 12 Å schließen die Positionen 17–22, 38, 40, 45–58, 60, 65 und 70–72 ein.

[0025] Die erfindungsgemäßen Varianten weisen im Vergleich zu dem Eltern-Enzym eine verbesserte Wärmestabilität auf. Die Wärmestabilität kann aus der Denaturierungstemperatur durch DSC (Differential Scanning Calorimetrie) bestimmt werden, z. B. wie in einem Beispiel beschrieben, z. B. bei pH 8,5 mit einer Scangeschwindigkeit von 90 K/h. Die Varianten können eine Denaturierungstemperatur aufweisen, die wenigstens 5°C höher ist als die des Eltern-Enzyms.

[0026] Die Gesamtanzahl von Substitutionen in den obigen Regionen beträgt typischerweise 1–10, z. B. 1–5 Substitutionen in den obigen Regionen. Zusätzlich kann die Cutinase-Variante der Erfindung fakultativ andere Modifikationen des Eltern-Enzyms umfassen, typischerweise 10 oder weniger, z. B. 5 oder weniger Änderungen (Substitutionen, Deletionen oder Insertionen) außerhalb der obigen Regionen. Daher enthält die Aminosäuresequenz der Variante typischerweise 1–20, z. B. 1–10 Änderungen im Vergleich zu der Eltern-Cutinase.

Lösungsmittel-zugängliche Oberfläche

[0027] Eine oder mehr der Substitutionen können an einem exponierten Aminosäurerest vorgenommen werden, d. h. einem Aminosäurerest mit einer Lösungsmittel-zugänglichen Oberfläche. Dieses kann mit dem „ds-sp“ Programm (Version Oktober 1988), das bei W. Kabsch und C. Sander, Biopolymers, 22 (1983), S. 2577–2637 beschrieben ist, berechnet werden.

[0028] In der Cutinase des *H. insolens* Stamm DSM 1800, liegen die folgenden Aminosäuren innerhalb von 17 Å von G3 am N-Terminus und weisen eine Lösungsmittel-zugängliche Oberfläche von größer als 0 auf: 3–12, 18, 26–33, 36–38, 40–45, 47–56, 59–60, 62–64, 82, 85–86, 104–105, 174, 176–179, 181–182, 192.

Spezifische Substitutionen

[0029] Die Substitution nahe dem N-Terminus kann spezifisch eine Substitution sein, die die elektrische Ladung erhöht, d. h. eine Substitution einer negativ geladenen Aminosäure mit einer neutralen oder positiv geladenen Aminosäure oder eine Substitution einer neutralen Aminosäure mit einer positiv geladenen Aminosäure. Demnach kann ein negativer Aminosäurerest an einer Position entsprechend Position E6, E10, E30, E47, D63, E82 und/oder E179 in der Cutinase von *Humicola insolens* Stamm DSM 1800 durch eine neutrale oder positive Aminosäure substituiert sein, z. B. R, K, Y, H, Q oder N. Einige spezielle Substitutionen sind diejenigen, die E6Q/N, E10Q/N, E47K/R oder E179Q/N entsprechen. Auch kann ein neutraler Aminosäurerest an einer Position entsprechend N7, S11, N44 oder N52 in der *H. insolens* Cutinase durch eine positive Aminosäure (R, K oder H) ersetzt sein.

[0030] Ein weiteres Beispiel für eine Substitution nahe dem N-Terminus ist eine Substitution mit einem Pro-Rest, z. B. eine Substitution, die A14P oder R51P in der Cutinase des *Humicola insolens* Stammes DSM 1800 entspricht.

Spezielle Varianten

[0031] Die folgenden sind einige Beispiele von Varianten in der H. insolens Cutinase. Entsprechende Varianten können auf der Grundlage von anderen Eltern-Cutinasen hergestellt werden.

R51P

E6N/Q + L138I

A14P + E47K

E47K

E179N/Q

E6N/Q + E47K + R51P

A14P + E47K + E179N/Q

E47K + E179N/Q

E47K + D63N

E6N/Q + E10N/Q + A14P + E47K + R51P + E179N/Q

E6N/Q + A14P + E47K + R51P + E179N/Q

Q1P + L2V + S11C + N15T + F24Y + L46I + E47K

Verwendung der Cutinase-Variante

[0032] Die Erfindungsgemäße Cutinase-Variante kann z. B. für die enzymatische Hydrolyse von cyclischen Oligomeren von Poly(ethylenterephthalat), wie cyclisches Tri(ethylenterephthalat), abgekürzt als c3ET, verwendet werden.

[0033] Insbesondere kann diese verwendet werden, um solche cyclischen Oligomere aus Polyester-enthaltendem Textilstoff oder Garn durch Behandlung des Stoffs oder des Garns mit der Cutinase-Variante und gegebenenfalls anschließendes Spülen des Stoffs oder Garns mit einer wässrigen Lösung mit einem pH im Bereich von etwa pH 7 bis etwa pH 11 zu entfernen. Die Behandlung von Polyester wird zweckmäßigerweise oberhalb der Glasübergangstemperatur von c3ET (etwa 55°C) und unterhalb der Glasübergangstemperatur von Polyester (etwa 70°C) durchgeführt. Demnach kann die Behandlung zweckmäßigerweise bei 50–80°C, z. B. bei 60–75°C, durchgeführt werden. Das Verfahren kann in Analogie zu WO 97/27237 durchgeführt werden.

[0034] Die Cutinase-Variante kann verwendet werden, um Polyester-enthaltenden Textilstoff zu behandeln, z. B. PET (Polymer von Ethylenglycol und Terephthalsäure), P3GT (Polymer von 1,3-Propandiol und Terephthalsäure) oder eine Polyester/Baumwolle-Mischung. Die Behandlung kann für den Polyester-Textilstoff Vorteile bieten, wie verbesserten Tragekomfort, erhöhte Wasser-Durchlässigkeit, vermindertes antistatisches Verhalten, Handhabung und Weichheit verbessern, veränderte Wiederabsetzungseigenschaften und/oder Farbaufhellung.

[0035] Die Cutinase-Variante kann verwendet werden, um die funktionelle Veredelung eines PET-enthaltenden Garns oder Stoffs durch Behandlung mit der Cutinase-Variante zu verbessern, gefolgt von einer Behandlung mit einem Veredelungsmittel, wie ein Weichmacher, ein Antiknitterharz, ein antistatisches Mittel, ein schmutzabweisendes Mittel oder Mittel, um faltenfreie, bügelfreie oder feuerbeständige Wirkungen zu verleihen. Die Behandlung mit der Cutinase-Variante kann die Anzahl von funktionellen Gruppen auf der Oberfläche erhöhen, und dies kann verwendet werden, um die funktionelle Veredelung anzubringen. Beispiele für Veredelungsmittel werden in „SENSHOKU SIAGEKAKO BENRAN“, veröffentlicht 1998-10-15 von Nihon Seni Sentaa KK beschrieben.

[0036] Die erfindungsgemäße Cutinase-Variante ist auch in Detergentien geeignet, in die sie eingearbeitet werden kann, um die Entfernung von Fettschmutz zu verbessern, wie in WO 94/03578 und WO 94/14964 beschrieben. Der Zusatz der Cutinase-Variante zu Wäsche-Waschmitteln kann schlechten Geruch von Kleidung mindern, der sich während mehrerer Wasch/Trage-Zyklen ansammelt.

[0037] Die Cutinase-Variante kann auch für den Abbau und das Recycling von Polyester, wie Polycaprolacton (PCL), Polyethylenglycolterephthalat (PET), Polymilchsäure, Polybutylensuccinat und Poly(hydroxybuttersäure)-co-(hydroxyvalerat), z. B. Film und Flaschen, verwendet werden, z. B. wie in JP-A 5-344897 beschrieben.

[0038] Die Cutinase-Variante kann auch für andere bekannte Anwendungen von Lipasen und Cutinasen verwendet werden, z. B. in der Backindustrie (z. B. wie beschrieben in WO 94/04035 und EP 585988), in der Papierherstellungsindustrie (z. B. für Pech-Entfernung, siehe EP 374700) und in der Leder-, Wolle- und verwandten Industrien (z. B. zur Entfettung von Tierhäuten, Schafhaut oder Wolle) und für andere Anwendungen unter

Verwendung von Entschmierung/Entfettung. Sie kann in immobilisierter Form in der Fett- und Ölindustrie, als ein Katalysator in der organischen Synthese (z. B. Veresterung, Umesterung oder Esterhydrolysereaktionen) verwendet werden.

Färben von Polyester

[0039] Die Erfindung stellt ein Verfahren zum Färben von Polyesterstoff oder -garn bereit. Bei diesem Verfahren wird der Stoff oder das Garn erst mit einer Cutinase behandelt, z. B. 12–48 Stunden bei 50–70°C oder 65–70°C, pH 7–10, und anschließend mit Farbstoff, z. B. einem Reaktivfarbstoff, einem Dispersionsfarbstoff oder einem kationischen Farbstoff, gefärbt. Der Reaktivfarbstoff kann ein Farbstoff sein, der mit OH- oder CO-OH-Gruppen reagiert, z. B. mit der Struktur Chromophor-NHPh-SO₂CH₂CH₂OSO₃Na. Das Färben kann bei 40–80°C, z. B. für 20–60 Minuten durchgeführt werden.

[0040] Die Cutinase kann eine wärmestabile Cutinase mit einer Wärmedenaturierungstemperatur T_d bei pH 8,5 sein, die wenigstens 5°C höher als diejenige der Eltern-Cutinase ist, z. B. 7–10°C höher, z. B. ein Wert von 65°C oder höher. Die Messung kann durch DSC, wie in einem Beispiel dieser Beschreibung beschrieben, vorgenommen werden.

Tensid

[0041] Bei der Behandlung von Stoff oder Garn kann ein herkömmliches Netzmittel und/oder ein Dispergiermittel verwendet werden, um den Kontakt mit dem Enzym zu verbessern. Das Netzmittel kann ein nichtionisches Tensid sein, z. B. ein ethoxylierter Fettalkohol. Ein sehr geeignetes Netzmittel ist ein ethoxylierter und propoxylierter Fettsäureester, wie Berol 087 (Produkt von Akzo Nobel, Schweden).

[0042] Das Dispergiermittel kann zweckmäßigerweise aus nichtionischen, anionischen, kationischen, ampholytischen oder zwitterionischen Tensiden ausgewählt werden. Spezieller kann das Dispergiermittel ausgewählt werden aus Carboxymethylcellulose, Hydroxypropylcellulose, Alkylarylsulfonaten, langkettigen Alkoholsulfaten (primären und sekundären Alkylsulfaten), sulfonierten Olefinen, sulfatierten Monoglyceriden, sulfatierten Ethern, Sulfosuccinaten, sulfonierten Methylethern, Alkansulfonaten, Phosphateestern, Alkylisothionaten, Acylsarcosiden, Alkyltauriden, Fluortensiden, Fettalkohol und Alkylphenol Kondensaten, Fettsäurekondensaten, Kondensaten von Ethylenoxid mit einem Amin, Kondensaten von Ethylenoxid mit einem Amid, Saccharoseestern, Sorbitanestern, Alkylamiden, Fettaminoxiden, ethoxylierten Monoaminen, ethoxylierten Diaminen, Alkoholethoxylaten und Mischungen davon. Ein sehr geeignetes Dispergiermittel ist ein Alkoholethoxylat, wie Berol 08 (Produkt von Akzo Nobel, Schweden).

Verfahren zur Herstellung von Cutinase-Varianten

[0043] Die erfindungsgemäße Cutinase-Variante kann durch Verfahren hergestellt werden, die auf dem Fachgebiet bekannt sind, z. B. wie in WO 94/14963 oder WO 94/14964 (Unilever) beschrieben. Das Folgende beschreibt Verfahren zur Klonierung von Cutinase-codierenden DNA-Sequenzen und anschließend Verfahren zur Erzeugung von Mutationen an speziellen Stellen innerhalb der Cutinase-codierenden Sequenz.

Klonierung einer DNA-Sequenz, die eine Cutinase codiert

[0044] Die eine Eltern-Cutinase codierende DNA-Sequenz kann aus einer beliebigen Zelle oder einem Mikroorganismus, die die fragliche Cutinase produzieren, unter Verwendung verschiedener auf dem Fachgebiet wohl bekannter Verfahren isoliert werden. Zuerst sollte eine genomische DNA und/oder cDNA-Bibliothek unter Verwendung chromosomaler DNA oder Messenger-RNA aus dem Organismus konstruiert werden, der die zu untersuchende Cutinase herstellt. Ist dann die Aminosäuresequenz der Cutinase bekannt, können markierte Oligonucleotidsonden synthetisiert und verwendet werden, um Cutinase-codierende Klone aus der genomischen Bibliothek, die aus dem fraglichen Organismus hergestellt wurde, zu identifizieren. Alternativ könnte eine markierte Oligonucleotidsonde, die Sequenzen enthält, die zu anderen bekannten Cutinase-Genen homolog sind, als Sonde verwendet werden, um Cutinase-codierende Klone unter Verwendung von Hybridisierungs- und Waschbedingungen von niedrigerer Stringenz zu identifizieren.

[0045] Noch ein weiteres Verfahren zur Identifizierung von Cutinase-codierenden Klonen würde das Inserieren von Fragmenten genomischer DNA in einen Expressionsvektor, wie ein Plasmid, das Transformieren Cutinase-negativer Bakterien mit der resultierenden genomischen DNA-Bibliothek und das anschließende Ausplattieren der transformierten Bakterien auf Agar, der ein Substrat für Cutinase (d. h. Maltose) enthält, umfas-

sen, wodurch es möglich ist, Klone, die die Cutinase exprimieren, zu identifizieren.

[0046] Alternativ kann die DNA-Sequenz, die das Enzym codiert, durch bewährte Standard-Verfahren synthetisch hergestellt werden, z. B. durch das Phosphoramidit-Verfahren, das bei S.L. Beaucage und M.H. Caruthers, (1981), Tetrahedron Letters 22, S. 1859–1869 beschrieben ist, oder das Verfahren, das bei Matthes et al., (1984), EMBO J. 3, S. 801–805 beschrieben ist. Bei dem Phosphoramidit-Verfahren werden Oligonucleotide synthetisiert, z. B. in einem automatischen DNA-Synthesizer, gereinigt, anneliert, ligiert und in passende Vektoren kloniert.

[0047] Schließlich kann die DNA-Sequenz gemischt genomischen und synthetischen Ursprungs, gemischt synthetischen und cDNA-Ursprungs oder gemischt genomischen und cDNA Ursprungs sein, die durch das Ligieren von Fragmenten synthetischen, genomischen oder cDNA Ursprungs (wie angemessen, die Fragmente, die verschiedenen Teilen der Gesamt-DNA-Sequenz entsprechen) in Übereinstimmung mit Standardtechniken hergestellt werden. Die DNA-Sequenz kann auch durch Polymerasekettenreaktion (PCR) unter Verwendung von spezifischen Primern, zum Beispiel wie in US 4,683,202 oder R.K. Saiki et al., (1988), Science 239, 1988, S. 487–491 beschrieben, hergestellt werden.

Ortsgerichtete Mutagenese

[0048] Nachdem eine Cutinase-codierende DNA-Sequenz isoliert und wünschenswerte Stellen für Mutationen identifiziert wurden, können unter Verwendung synthetischer Oligonucleotide Mutationen eingeführt werden. Diese Oligonucleotide enthalten Nucleotidsequenzen, die die gewünschten Mutationsstellen flankieren. Bei einem speziellen Verfahren wird eine einzelsträngige DNA-Lücke, die Cutinase-codierende Sequenz, in einem Vektor erzeugt, der das Cutinase-Gen trägt. Dann wird das synthetische Nucleotid, das die gewünschte Mutation trägt, mit einem homologen Teil der einzelsträngigen DNA anneliert. Die verbleibende Lücke wird dann mit DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) aufgefüllt, und das Konstrukt wird unter Verwendung von T4-Ligase ligiert. Ein spezielles Beispiel für dieses Verfahrens wird bei Morinaga et al., (1984), Biotechnology 2, S. 646–639 beschrieben. US 4,760,025 offenbart das Einführen von Oligonucleotiden, die mehrere Mutationen codieren, durch die Durchführung kleiner Änderungen der Kassette. Allerdings kann eine noch größere Auswahl von Mutationen durch das Morinaga-Verfahren beliebig eingeführt werden, weil eine Vielzahl von Oligonucleotiden verschiedener Länge eingeführt werden kann.

[0049] Ein weiteres Verfahren zur Einführung von Mutationen in Cutinase-codierende DNA-Sequenzen wird bei Nelson und Long, (1989), Analytical Biochemistry 180, S. 147–151 beschrieben. Es schließt die 3-Schritt-Erzeugung eines PCR-Fragments ein, das die Mutation enthält, die unter Verwendung eines chemisch synthetisierten DNA-Strangs als einer der Primer bei den PCR-Reaktionen eingeführt wurde. Von dem PCR-erzeugten Fragment kann ein DNA-Fragment, das die Mutation trägt, durch Spaltung mit Restriktionsendonukleasen isoliert und in ein Expressionsplasmid reinseriert werden.

Expression von Cutinase-Varianten

[0050] Gemäß der Erfindung kann eine durch die vorstehend beschriebenen Verfahren oder durch beliebige auf dem Fachgebiet bekannte alternative Verfahren produzierte DNA-Sequenz, die die Variante in Enzymform codiert, unter Verwendung eines Expressionsvektors exprimiert werden, der typischerweise Kontrollsequenzen, die einen Promotor codieren, einen Operator, eine Ribosomen-Bindungsstelle, ein Translationsinitiations-signal und gegebenenfalls ein Regressorgen oder verschiedene Aktivatorgene einschließt.

Expressionsvektor

[0051] Der rekombinante Expressionsvektor, der die DNA-Sequenz trägt, die eine erfindungsgemäße codiert, kann ein Vektor sein, der zweckmäßigerweise rekombinanten DNA-Verfahren unterzogen werden kann, und die Wahl des Vektors hängt oft von der Wirtszelle ab, in welche er eingeführt werden soll. Der Vektor kann ein Vektor sein, der bei Einführung in die Wirtszelle in das Wirtszellgenom integriert und zusammen mit dem/den Chromosom(en), in welche(s) er integriert wurde, repliziert wird. Beispiele von passenden Expressionsvektoren schließen pMT838 ein.

Promotor

[0052] In dem Vektor sollte die DNA-Sequenz mit einer geeigneten Promotorsequenz operabel verknüpft sein. Der Promotor kann eine beliebige DNA-Sequenz sein, welche in der Wirtszelle der Wahl Transkriptions-

aktivität zeigt, und kann von Genen abgeleitet sein, die Proteine codieren, die zur Wirtszelle entweder homolog oder heterolog sind.

[0053] Beispiele für geeignete Promotoren zur Steuerung der Transkription der DNA-Sequenz, die eine erfindungsgemäße Cutinase-Variante codiert, insbesondere in einem bakteriellen Wirt, sind die Promotoren des lac Operons von *E. coli*, die *Streptomyces coelicolor* Agarase Gen *dagA* Promotoren, die Promotoren des *Bacillus licheniformis* α -Amylase Gens (*amyL*), die Promotoren des *Bacillus stearothermophilus* maltogenischen Amylase Gens (*amyM*), die Promotoren der *Bacillus amyloliquefaciens* α -Amylase (*amyQ*), die Promotoren der *Bacillus subtilis* *xylA* and *xylB* Gene etc. Zur Transkription in einem Pilzwirt sind Beispiele für geeignete Promotoren solche Promotoren, die sich von dem Gen ableiten, das die *A. oryzae* TAKA Amylase codiert, der TPI (Triosephosphat-Isomerase) Promotor von *S. cerevisiae* (Alber et al. (1982), J. Mol. Appl. Genet 1, S. 419–434), *Rhizomucor miehei* Aspartatprotease, *A. niger* neutrale α -Amylase, *A. niger* säurestabile α -Amylase, *A. niger* Glucoamylase, *Rhizomucor miehei* Lipase, *A. oryzae* alkalische Protease, *A. oryzae* Triosephosphat-Isomerase oder *A. nidulans* Acetamidase.

Expressionsvektor

[0054] Der erfindungsgemäße Expressionsvektor kann auch einen passenden Transkriptionsterminator und, in Eukaryoten, Polyadenylierungssequenzen umfassen, die mit der DNA-Sequenz operabel verknüpft sind, die die erfindungsgemäße α -Amylase Variante codiert. Terminations- und Polyadenylierungssequenzen können zweckmäßigerweise von den gleichen Quellen wie der Promotor abgeleitet sein.

[0055] Der Vektor kann außerdem eine DNA-Sequenz umfassen, die es dem Vektor ermöglicht, sich in der in Frage kommenden Wirtszelle zu replizieren. Beispiele solcher Sequenzen sind die Replikationsstartpunkte der Plasmide pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, pAMB1 und pIJ702.

[0056] Der Vektor kann auch einen selektierbaren Marker enthalten, z. B. ein Genprodukt, welches einen Defekt in der Wirtszelle ausgleicht, wie die *dal* Gene aus *B. subtilis* oder *B. licheniformis*, oder einen Marker, der eine Antibiotikum-Resistenz verleiht, wie Ampicillin-, Kanamycin-, Chloramphenicol- oder Tetracyclinresistenz. Außerdem kann der Vektor *Aspergillus*-Selektions-Marker, wie *amdS*, *argB*, *niaD* und *sC*, einen Marker, der Hygromycinresistenz verleiht, umfassen, oder die Selektion kann durch Cotransformation erfolgen, z. B. wie beschrieben in WO 91/17243.

[0057] Die Verfahren, die verwendet werden, um das erfindungsgemäße DNA-Konstrukt, das eine Cutinase-Variante codiert, den Promotor, Terminator bzw. andere Elemente zu ligieren und sie in die passenden Vektoren zu inserieren, die die für die Replikation notwendige Information enthalten, sind dem Fachmann wohlbekannt (vgl., z. B., Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Ausgabe, Cold Spring Harbor, 1989).

Wirtszellen

[0058] Die erfindungsgemäße Zelle, die entweder ein DNA-Konstrukt oder einen erfindungsgemäßen Expressionsvektor, wie vorstehend definiert, umfasst, wird zweckmäßigerweise als Wirtszelle bei der rekombinanten Herstellung einer erfindungsgemäßen Cutinase-Variante verwendet. Die Zelle kann mit dem erfindungsgemäßen DNA-Konstrukt, das die Variante codiert, transformiert werden, zweckmäßigerweise durch Einbau des DNA-Konstrukts (in einer oder mehreren Kopien) in das Wirtschromosom. Dieser Einbau wird im Allgemeinen als ein Vorteil betrachtet, da die DNA-Sequenz wahrscheinlicher in der Zelle stabil aufrechterhalten wird. Der Einbau des DNA-Konstrukts in das Wirtschromosom kann nach konventionelle Verfahren, z. B. durch homologe oder heterologe Rekombination, durchgeführt werden. Alternativ kann die Wirtszelle mit einem Expressionsvektor, wie vorstehend in Verbindung mit den verschiedenen Typen von Wirtszellen beschrieben, transformiert werden.

[0059] Die erfindungsgemäße Zelle kann eine Zelle eines höheren Organismus, wie eines Säugetiers oder eines Insekts, sein, ist aber vorzugsweise eine mikrobielle Zelle, z. B. eine Bakterien- oder Pilz-(inklusive Hefe-)Zelle.

[0060] Beispiele für geeignete Bakterien sind Gram-positive Bakterien, wie *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis* oder *Streptomyces lividans* oder *Streptomyces murinus*, oder Gram-negative Bakterien wie *E. coli*. Die Transforma-

tion der Bakterien kann z. B. durch Protoplasten-Transformation oder unter Verwendung kompetenter Zellen in einer per se bekannten Weise erfolgen.

[0061] Der Hefe-Organismus kann bevorzugt aus einer Spezies von *Saccharomyces* oder *Schizosaccharomyces*, z. B. *Saccharomyces cerevisiae* ausgewählt sein.

[0062] Die Wirtszelle kann auch ein filamentöser Pilz sein, z. B. ein Stamm, der einer Spezies von *Aspergillus*, besonders bevorzugt *Aspergillus oryzae* oder *Aspergillus niger*, angehört, oder ein *Fusarium*-Stamm, wie ein Stamm von *Fusarium oxysporium*, *Fusarium graminearum* (im perfekten Stadium benannt als *Gibberella zeae*, früher *Sphaeria zeae*, synonym mit *Gibberella roseum* und *Gibberella roseum* f. sp. *cerealis*) oder *Fusarium sulphureum* (im perfekten Stadium benannt als *Gibberella purpuris*, synonym mit *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium sambucium*, *Fusarium roseum*, und *Fusarium roseum* var. *graminearum*), *Fusarium cerealis* (synonym mit *Fusarium crockwellens*), oder *Fusarium venenatum*.

[0063] Bei einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist die Wirtszelle ein Proteasedefizienter oder Protease-minus Stamm.

[0064] Dies kann z. B. der Protease-defiziente Stamm *Aspergillus oryzae* JaL 125 sein, in dem das alkalische Protease-Gen, das „alp“ genannt wird, deletiert ist. Dieser Stamm wird in WO 97/35956 (Novo Nordisk) beschrieben.

[0065] Filamentöse Pilzzellen können durch ein Verfahren transformiert werden, das Protoplasten-Transformation und Transformation der Protoplasten und anschließende Regeneration der Zellwand in einer per se bekannten Weise umfasst. Die Verwendung von *Aspergillus* als Wirts-Mikroorganismus ist in EP 238 023 (Novo Nordisk A/S) beschrieben, deren Inhalt hiermit durch Bezugnahme mit eingeschlossen ist.

Herstellung der Cutinase-Variante durch Kultivierung des Transformanten

[0066] Die Erfindung betrifft, inter alia, ein Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen Cutinase-Variante, wobei das Verfahren das Kultivieren einer Wirtszelle unter Bedingungen, die der Produktion der Variante förderlich sind, und das Gewinnen der Variante aus den Zellen und/oder Kulturmedium umfasst.

[0067] Das zur Kultivierung der Zellen verwendete Medium kann jedes herkömmliche Medium sein, das für das Wachsen der fraglichen Wirtszelle und zum Erhalt der Expression der erfindungsgemäßen Cutinase-Variante geeignet ist. Passende Medien sind von kommerziellen Lieferanten erhältlich oder können nach veröffentlichten Rezepturen hergestellt werden (z. B. wie in Katalogen der American Type Culture Collection beschrieben).

[0068] Die von den Wirtszellen sezernierte Cutinase-Variante kann zweckmäßigerweise aus dem Kulturmedium durch wohlbekannte Verfahren gewonnen werden, einschließlich Abtrennen der Zellen von dem Medium durch Zentrifugation oder Filtration und Präzipitation der Protein-Komponenten des Mediums durch Salz, wie Ammoniumsulfat, gefolgt von der Verwendung chromatographischer Verfahren, wie Ionenaustauscherchromatographie, Affinitätschromatographie oder ähnliche.

Expression der Variante in Pflanzen

[0069] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auch auf eine transgene Pflanze, Pflanzenteil oder Pflanzenzelle, welche mit einer DNA-Sequenz, die die erfindungsgemäße Variante codiert, transformiert wurde, um dieses Enzym in gewinnbaren Mengen zu exprimieren und zu produzieren. Alternativ kann die Pflanze oder der Pflanzenteil, der das rekombinante Enzym enthält, als solcher verwendet werden.

[0070] Die transgene Pflanze kann zweikeimblättrig oder einkeimblättrig, kurz dikotyl oder monokotyl, sein. Beispiele für monokotyle Pflanzen sind Gräser, wie Wiesengras (Blaues Gras, *Poa*), Futtergras, wie *Festuca*, *Lolium*, gemäßigtes Gras, wie *Agrostis* und Getreide, wie z. B. Weizen, Hafer, Roggen, Gerste, Reis, Hirse und Mais (Korn).

[0071] Beispiele für dikotyle Pflanzen sind Tabak, Gemüse, wie Lupinen, Kartoffeln, Zuckerrübe, Erbse, Bohne und Sojabohne und Kruziferen (Familie *Brassicaceae*) wie Blumenkohl, Raps und der nah verwandte Modellorganismus *Arabidopsis thaliana*.

[0072] Beispiele für Pflanzenteile sind Stamm, Kallus, Laub, Wurzel, Früchte, Saat und Knollen. Im vorliegenden Zusammenhang werden auch spezielle Pflanzengewebe, wie Chloroplasten, Apoplasten, Mitochondrien, Vakuole, Peroxisomen und Cytoplasma, als Pflanzenteil angesehen. Außerdem wird jede Pflanzenzelle, gleich welchen Gewebe-Ursprungs, als Pflanzenteil angesehen.

[0073] Ebenfalls im Schutzzumfang der Erfindung liegen die Nachkommen von solchen Pflanzen, Pflanzenteilen und Pflanzenzellen.

[0074] Die transgene Pflanze oder Pflanzenzelle, die die erfindungsgemäße Variante exprimiert, kann in Übereinstimmung mit auf dem Fachgebiet bekannten Verfahren konstruiert werden. Kurz gesagt wird die Pflanze oder Pflanzenzelle durch Einbringen von einem oder mehreren Expressionskonstrukten, die das erfindungsgemäße Enzym codieren, in das Wirtspflanzengenom und Vermehren der resultierenden modifizierten Pflanze oder Pflanzenzelle zu einer transgenen Pflanze oder Pflanzenzelle konstruiert.

[0075] Zweckmäßigerweise ist das Expressionsprodukt ein DNA-Konstrukt, welches ein Gen, das das erfindungsgemäße Enzym codiert, in operabler Assoziation mit geeigneten regulatorischen Sequenzen umfasst, die für die Expression des Gens in der Pflanze oder dem Pflanzenteil der Wahl erforderlich sind. Außerdem kann das Expressionskonstrukt einen selektierbaren Marker, der für die Identifizierung von Wirtszellen geeignet ist, in die das Expressionskonstrukt eingebaut wurde, und DNA-Sequenzen, die zur Einführung des Konstrukts in die fragliche Pflanze (letzteres hängt von dem einzusetzenden DNA-Einführungsverfahren ab) notwendig sind, umfassen.

[0076] Die Wahl regulatorischer Sequenzen, wie Promotor- und Terminator-Sequenzen, und fakultativ Signal- und Transitsequenzen wird z. B. auf der Grundlage davon bestimmt, wann, wo und wie das Enzym exprimiert werden soll. Die Expression des Gens, das das erfindungsgemäße Enzym codiert, kann z. B. konstitutiv oder induzierbar sein oder kann Entwicklungs-, Stadien- oder Stoff-spezifisch sein, und das Genprodukt kann auf ein spezielles Gewebe oder einen speziellen Pflanzenteil, wie Samen oder Laub, gerichtet sein. Regulatorische Sequenzen werden z. B. von Tague et al., Plant, Phys., 86, 506, 1988 beschrieben.

[0077] Für die konstitutive Expression kann der 35S-CaMV-Promotor verwendet werden (Franck et al., 1980. Cell 21: 285–294). Organ-spezifische Promotoren können z. B. sein ein Promotor aus Speichergeweben, wie Samen, Kartoffelknollen und Früchten (Edwards & Coruzzi, 1990. Annu. Rev. Genet. 24: 275–303) oder aus metabolischen Speichergeweben, wie Meristeme (Ito et al., 1994. Plant Mol. Biol. 24: 863–878), ein Saat-spezifischer Promotor, wie der Glutelin-, Prolamin-, Globulin- oder Albumin-Promotor aus Reis (Wu et al., Plant and Cell Physiology Band 39, Nr. 8 S. 885–889 (1998)), ein Vicia faba Promotor aus dem Legumin B4 und dem unbekannten Saat Proteingen aus Vicia faba, beschrieben von Conrad U. et al., Journal of Plant Physiology Band 152, Nr. 6 S. 708–811 (1998), ein Promotor eines Saatölkörperproteins (Chen et al., Plant and cell physiology Band 39, Nr. 9 S. 935–941 (1998), der Lagerprotein napA-Promotor aus Brassica napus oder ein beliebiger anderer Saat-spezifischer Promotor, der auf dem Fachgebiet bekannt ist, wie z. B. in WO 91/14772 beschrieben. Außerdem kann der Promotor ein laubspezifischer Promotor sein, wie der rbcs Promotor aus Reis oder Tomate (Kyojuka et al., Plant Physiology Band 102, Nr. 3 S. 991–1000 (1993)), der Chlorellavirus Adeninmethyltransferase-Gen-Promotor (Mittra, A. und Higgins, DW, Plant Molecular Biology Band 26, Nr. 1, S. 85–93 (1994) oder der aldP-Genpromotor aus Reis (Kagaya et al., Molecular and General Genetics Band 248, Nr. 6 S. 668–674 (1995) oder ein Wund-induzierbarer Promotor, wie der Kartoffel pin2-Promotor (Xu et al., Plant Molecular Biology Band 22, Nr. 4 S. 573–588 (1993)).

[0078] Ein Promotor-Enhancer-Element kann verwendet werden, um eine höhere Expression des Enzyms in der Pflanze zu erreichen. Z. B. kann das Promotor-Enhancer-Element ein Intron sein, welches zwischen den Promotor und die Nucleotidsequenz, die das Enzym codiert, angeordnet ist. Z. B. beschreiben Xu et al. die Verwendung des ersten Introns des Reis-Actin 1 Gens, um Expression zu verbessern.

[0079] Das selektierbare Markergen und jeder andere Teil des Expressions-Konstrukts kann aus denjenigen gewählt werden, die auf dem Fachgebiet verfügbar sind.

[0080] Das DNA-Konstrukt wird in das Pflanzengenom nach konventionellen auf dem Fachgebiet bekannten Verfahren eingebaut, einschließlich Agrobacterium-vermittelte Transformation, Virus-vermittelte Transformation, Mikroinjektion, Partikelbombardement, biolistische Transformation und Elektroporation (Gasser et al., Science, 244, 1293; Potrykus, Bio/Techn. 8, 535, 1990; Shimamoto et al., Nature, 338, 274, 1989).

[0081] Derzeit ist der Agrobacterium Tumefaciens-vermittelte Gentransfer das Verfahren der Wahl zur Her-

stellung transgener Dikotyle (für einen Überblick: Hooykas & Schilperoort, 1992. Plant Mol. Biol. 19: 15–38), allerdings kann er auch zur Transformation von Monokotylen verwendet werden, obwohl allgemein andere Transformationsverfahren für diese Pflanzen bevorzugt sind. Derzeit ist der Teichenbeschluss das Verfahren der Wahl zur Erzeugung von transgenen Monokotylen (mikroskopische Gold- oder Wolfram-Partikel beschichtet mit der transformierenden DNA), von embryonalen Kalli oder sich entwickelnden Embryonen (Christou, 1992. Plant J. 2: 275–281; Shimamoto, 1994. Curr. Opin. Biotechnol. 5: 158–162; Vasil et al., 1992. Bio/Technology 10: 667–674). Ein alternatives Verfahren zur Transformation von Monokotylen beruht auf der Protoplasten-Transformation, wie von Omirulleh, S. et al., Plant Molecular Biology Band 21, Nr. 3, S. 415–428 (1993) beschrieben.

[0082] Nach der Transformation werden die Transformanten, die das Expressionskonstrukt eingebaut aufweisen, selektiert und nach auf dem Fachgebiet wohlbekannten Verfahren zu ganzen Pflanzen regeneriert.

Material und Verfahren

Plasmide

pJSO026

[0083] Dieses ist ein *S. cerevisiae* Expressionsplasmid, beschrieben in WO 97/07205 und bei J.S. Okkels, (1996) „A URA3-promoter deletion in a pYES vector increases the expression level of a fungal lipase in *Saccharomyces cerevisiae*. Recombinant DNA Biotechnology III: The Integration of Biological and Engineering Sciences, Band 782 der Annals of the New York Academy of Sciences).

pFuku83

[0084] Dieses ist ein Hefe- und *E. coli*-Shuttlevektor zur Expression der *H. insolens* Cutinase unter Kontrolle eines TPI-Promotors, konstruiert aus pJSO026.

Substrat

BETEB

[0085] Therephthalsäure-bis(2-hydroxyethyl)ester-dibenzoat wird hier als BETEB (Benzoyl-ethylen-terephthal-ethylen-benzoat) abgekürzt. Sie wurde aus Therephthalsäure-bis(2-hydroxyethyl)ester und Benzoesäure hergestellt.

Lipase-Aktivität (LU)

[0086] Ein Substrat für Lipase wird durch Emulgieren von Tributyrin (Glycerintributyrat) unter Verwendung von Gummi Arabicum als Emulgator hergestellt. Die Hydrolyse von Tributyrin bei 30°C bei pH 7 erfolgt in einem pH-stat Titrationsexperiment. Eine Einheit Lipaseaktivität (1 LU) ist gleich die Menge Enzym, die 1 µmol Buttersäure/Minute unter Standardbedingungen freisetzen kann.

Differential Scanning Calorimetrie (DSC)

[0087] Proben- und Referenzlösung werden unmittelbar vor Laden der Proben in das Calorimeter (Referenz: Puffer ohne Enzym) vorsichtig entgast. Proben- und Referenzlösungen (etwa 0,5 ml) werden für 20 Minuten bei 5°C thermisch voräquilibriert. Der DSC-Scan wird von 5°C bis 95°C bei einer Scanrate von etwa 90 K/h durchgeführt. Denaturierungstemperaturen werden mit einer Genauigkeit von etwa +/- 1°C bestimmt. Ein VP-DSC von MicroCal Inc. ist für die Experimente geeignet.

Verfahren

PCR-Bedingungen

Schritt 1: 94°C, 120 Sek.
Schritt 2: 94°C, 60 Sek.
Schritt 3: 50°C, 60 Sek.
Schritt 4: 72°C, 150 Sek.

Zurückgehen zu Schritt 2, 35 Zyklen
Schritt 5: 72°C, 480 Sek.
Schritt 6: 4°C für immer

Beispiele

Beispiel 1: Herstellung von Cutinase-Varianten

[0088] Eine DNA-Sequenz, die *H. insolens* Cutinase codiert, wurde wie in US 5,827,719 (Novo Nordisk) beschrieben erhalten, und es wurde festgestellt, dass sie eine DNA-Sequenz, wie hier in SEQ ID NO: 1 gezeigt, aufweist.

[0089] Varianten wurden durch lokalisierte Zufalls-Mutagenese und Selektion von positiven Klonen durch Inkubation bei 60°C für einen Tag auf BETER-Platten hergestellt. Die BETER-Platten enthielten 200 ml/l 500 mM Glycin-Puffer (pH 8,5), 1,25 g/l BETER (aufgelöst in heißem Ethanol) und 20 g/l Agar.

[0090] Drei positive Varianten wurden isoliert, und ihre Aminosäuresequenz wurde bestimmt. Es wurde festgestellt, dass sie, verglichen mit der Eltern-*H. insolens*-Cutinase, folgende Modifikationen aufweisen:

A14P + E47K

E47K

E179Q

Beispiel 2: Ortsgerichtete Mutation

[0091] Eine Variante der *H. insolens* Cutinase mit den Substitutionen E6Q + E47K + R51P wurde wie folgt hergestellt:

Ein Paar PCR-Primer wurde entworfen, so dass unter Verwendung der nahebei existierenden Restriktionsenzym-Schnittstellen Aminosäuresubstitutionen wie folgt eingeführt wurden (ein Stern zeigt eine eingeführte Mutation an):

Oberer Primer: E6QF

cgg cag ctg gga gcc atc c*ag aac

Pvu II

Unterer Primer: E47K, R51P

cgc cct gga tcc aga tgt tcg* gga tgt ggg act t*aa ggc

BamH I

[0092] Die PCR wurde unter Verwendung dieser Primer und pFukuNL83 als Templat unter den vorstehend beschriebenen PCR-Bedingungen durchgeführt.

[0093] Die erhaltenen PCR-Fragmente wurde mit Clontech Spin-Säulen gereinigt und mit Pvu II und BamHI verdaut.

[0094] Das resultierende Fragment wurde Gel-gereinigt und an pFukuNL83 ligiert, welches mit den gleichen Restriktionsenzymstellen verdaut worden war.

Beispiel 3: Wärmestabilität von Cutinase-Varianten

Varianten

[0095] Die Wärmestabilität wurde getestet, wie nachstehend für die *H. insolens* Cutinase und ihre folgenden Varianten beschrieben:

A14P + E47K

E47K

E179Q

E6Q + E47K + R51P

A14P + E47K + E179Q

E6Q + A14P + E47K + R51P + E179Q

E6Q + E10Q + A14P + E47K + R51P + E179Q

Differential Scanning Calorimetrie (DSC)

[0096] Die Wärmestabilität von Cutinase-Varianten wurde mittels DSC bei pH 4,5 (50 mM Acetat-Puffer) und pH 8,5 (50 mM Glycyl-Glycin-Puffer) untersucht. Die thermische Denaturierungstemperatur, T_d , wurde als die Spitze des Denaturierungssignals (größter endothermer Peak) in den erhaltenen Thermogrammen (C_p vs. T) herangezogen, die nach Erwärmen der Enzymlösungen bei einer konstanten programmierten Aufwärmgeschwindigkeit erhalten wurden.

[0097] Es wurde festgestellt, dass die Eltern-Cutinase eine T_d von 63°C bei pH 8,5 aufweist. Es wurde festgestellt, dass sechs der obigen Varianten eine T_d von 70–73°C aufweisen, d. h. eine Verbesserung von 7–10°C.

[0098] Es wurde festgestellt, dass die Eltern-Cutinase eine T_d von 61°C bei pH 4,5 aufweist. Es wurde festgestellt, dass fünf der obigen Varianten eine T_d von 64–66°C aufweisen, d. h. eine Verbesserung von 3–5°C.

Hydrolyse von BETER

[0099] Die Wärmestabilität der H. insolens Cutinase und zwei der obigen Varianten wurde durch Hydrolyse von BETER bei erhöhter Temperatur gemessen. Für jede der Cutinasen wurde die folgende Mischung 17 h bei verschiedenen Temperaturen im Bereich 55–70°C inkubiert:

0,1 ml 0,5 M Glycyl-Glycin-Puffer (pH 8,5)

0,1 ml 0,5 % BETEB aufgelöst in Ethanol

0,1 ml Enzymlösung (etwa 25 LU/ml)

0,7 ml MilliQ-Wasser

[0100] Der Hydrolysegrad wurde nach der Inkubation gemessen. Die Ergebnisse sind in der Tabelle nachstehend gezeigt.

	Variante	Variante	Eltern
	27 LU/ml	25 LU/ml	24 LU/ml
55°C	98%	99%	72%
60°C	91%	83%	33%
65°C	66%	13%	7%

[0101] Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die Varianten eine im Vergleich zur Eltern-Cutinase verbesserte Wärmestabilität aufweisen.

Hydrolyse von BETEB

[0102] Die Wärmestabilität der H. insolens Cutinase und drei der obigen Varianten wurde durch Hydrolyse von BETEB bei 60°C für 2 Stunden gemessen. Die Hydrolyse wurde unter den obigen Bedingungen durchgeführt, außer dass die Temperatur bei 60°C festgehalten und die Cutinase-Dosierung variiert wurde. Die Ergebnisse sind in der Tabelle nachstehend gezeigt.

LU/ml	Variante	Variante	Variante	Eltern
0	0%	0%	0%	0%
10	97%	99%	9%	6%
20	98%	99%	74%	
50	98%	94%	93%	15%
100	88%	69%	92%	34%
300				41%
600				63%
1200				82%

[0103] Die Ergebnisse zeigen eine viel schnellere Hydrolyse bei 60°C mit den Varianten als mit der Eltern-Cu-

tinase.

Beispiel 4: Hydrolyse von c3ET

[0104] Die H. insolens Cutinase und fünf der obigen Varianten wurden bei der Hydrolyse von c3ET bei erhöhter Temperatur getestet. Für jede Cutinase wurde die folgende Mischung 2 Stunden bei verschiedenen Temperaturen inkubiert.

0,115 mg	c3ET (0,1 ml von 2 mM c3ET, aufgelöst in HFIP, wurde in einem Reaktionsgefäß vorgelegt. Das Lösungsmittel wurde unter Vakuum entfernt, dann bei 70°C über Nacht getrocknet)
0,1 ml	0,5 M Glycylglycin-Puffer (pH 8,5)
0,1 ml	Enzymlösung (etwa 600 LU/ml)
0,8 ml	MilliQ-Wasser

[0105] Nach der Inkubation wurden jeder Reaktionsmischung 2 ml 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol (HFIP) zugegeben, dann wurde die Hydrolyserate mit HPLC gemessen. Die Ergebnisse in [Fig. 3](#) zeigen eindeutig, dass die Varianten eine im Vergleich zur Eltern-Cutinase verbesserte Wärmestabilität aufweisen.

Beispiel 5: Hydrolyse von c3ET auf Garn

[0106] Die Wärmestabilität der H. insolens Cutinase 5 der obigen Varianten wurde unter Verwendung von Polyester-Garn, das c3ET als Nebenprodukt enthält, getestet. Die folgende Substratmischung wurde bei 60 oder 65°C vorinkubiert:

0,1 g	Polyester-Garn
0,2 ml	0,5 mM Glycylglycin-Puffer (pH 8,5)
1,7 ml	MilliQ-Wasser

[0107] Nach der Vorinkubation wurden jedem Reaktionsgefäß 0,1 ml Enzymlösung (etwa 1000 LU/ml) zugegeben und 17 Stunden inkubiert. Dann wurden 2 ml HFIP zugegeben und 30 Minuten stehen gelassen, um c3ET, das auf der Oberfläche des Polyester-Garns sitzt, zu extrahieren und zu hydrolysieren; dann wurde der Hydrolysegrad bestimmt. Die Ergebnisse sind in [Fig. 4](#) gezeigt.

[0108] Man sieht, dass die Varianten für die Hydrolyse von c3ET auf Polyester-Garn wirksamer sind als die Eltern-Cutinase. Eine Variante ergibt bei 65°C einen höheren Hydrolysegrad als bei 60°C.

Beispiel 6: Behandlung von Garn mit Cutinase-Variante

[0109] Zeitverläufe der c3ET-Hydrolyse auf Polyester-Garn bei verschiedener Temperatur oder Dosierung wurden untersucht. Der Zeitverlauf bei verschiedenen Temperaturen wird in [Fig. 5](#) gezeigt. Man sieht, dass die optimale Temperatur 65°C ist. Bei 70°C ist noch etwa die Hälfte der Aktivität übrig. Der Zeitverlauf mit erhöhter Enzym-Dosierung wird in [Fig. 6](#) gezeigt. Man sieht, dass die Kurven bei der Dosis 275 und 550 LU/ml gleich sind, was zeigt, dass die Hydrolyserate bei 100 bis 275 LU/ml ein Plateau erreichte. Vermutlich sind 200 LU/ml genug.

Beispiel 7: Färben von Polyester mit Reaktivfarbstoff

[0110] Die folgenden Polyester-Stoffe wurden behandelt:

Gewebter Stoff; ca. 2 × 2 cm, 34 mg
Gestrickter Stoff; ca. 1,5 × 1,5 cm; 50 mg

[0111] Jeder Stoff wurde in 0,9 ml, 50 mM GlyGly (Glycyl-Glycin) Puffer (pH 8,5) und 0,1 ml Lösung einer Variante der H. insolens-Cutinase (1100 LU/ml) eingeweicht und bei 65 oder 70°C inkubiert. Nach einem Tag wurden weitere 0,1 ml Enzymlösung zugegeben, die Inkubation wurde für mehr als zwei Tage fortgesetzt, die Stoffe wurden dann herausgenommen und in Wasser gespült. Ein Vergleichsexperiment wurde mit der Eltern-Cutinase vorgenommen, und eine Blindprobe wurde auf die gleiche Weise ohne Enzym behandelt.

[0112] Die Stoffe wurden in einer Mischung von 9 g 120 g Na₂SO₄ und 60 g Na₂CO₃ in 3 Liter deionisiertem Wasser bei 60°C für 30 Minuten gerührt und dann mit laufendem warmem Wasser gespült. Der Reaktivfarbstoff war Celmazol Brilliant Blau B (Produkt von Mitsui Chemical Co., Japan), welcher die Struktur Chromophor-NH-

Ph-SO₂CH₂CH₂OSO₃Na aufweist.

[0113] Bei allen vier Experimenten (gewebt und gestrickt, 65 und 70°C) wurden die Stoffe gleichmäßig gefärbt.

Beispiel 8: Solubilisierung von Polyesterfragmenten aus Strickstoff

[0114] Eine 1 × 1 cm Probe von Polyester (PET, Polymer von Ethylenglycol und Terephthalsäure)-Strickstoff wurde 1 Stunde in 1 ml Puffer bei pH 10, 60°C mit 0,01 mg einer Variante der H. insolens-Cutinase inkubiert. Das Reaktionsgemisch wurde abgetrennt, und die Freisetzung von Terephthalsäure wurde durch Messungen der OD bei 250 nm (ausgedrückt als OD₂₅₀/mg PET) bestimmt. Vergleichsexperimente wurden ohne Enzym oder mit der Eltern-Cutinase vorgenommen. Ergebnisse:

	Enzym	OD ₂₅₀
Erfindung	Cutinase-Variante	4,5
Referenz	Eltern-Cutinase	0,3
	ohne	0,1

[0115] Die Ergebnisse zeigen, dass die Variante für die Solubilisierung von Polyester wirksam ist.

[0116] Bei einem anderen Experiment wurde die Cutinase-Variante 2 Stunden bei 65°C mit und ohne Zugabe von nicht-ionischen Tensiden (Alkoholethoxylat, Produktname Softanol 50) unter Verwendung verschiedener Mengen der Variante von 0,5 bis 200 LU/ml getestet. Die Ergebnisse zeigten in Gegenwart eines nicht-ionischen Tensids eine stärkere Solubilisierung.

Beispiel 9: Hydrolyse von Polycaprolacton- und Polyester-Film

[0117] Etwa 0,1 g Polycaprolacton- oder Polyester-Film wurden in Röhrchen gegeben. Sie wurden in 5 ml 50 mM GlyGly-Puffer (pH 8,5) mit oder ohne eine Variante der H. insolens-Cutinase (450 LU) eingeweicht. Sie wurden 5 Stunden bei 70°C inkubiert. Nach der Reaktion stellten wir auf der Oberfläche der Röhrchen mit Enzym sowohl mit Polycaprolacton- als auch mit Polyester-Film eine dünne Hydrolysatschicht fest.

[0118] Andererseits wurde in Kontrollen ohne Enzym keine Veränderung beobachtet. Im Fall von Polycaprolacton gab es einen Gewichtsverlust von 10 %, Bei Polyester sehen wir keine Gewichtsänderung.

Beispiel 10: cPET-Hydrolyse

[0119] Die Leistung einer Cutinase-Variante wurde mit dem Eltern-Enzym (H. insolens-Cutinase) verglichen. Die Versuche wurden wie folgt vorgenommen:

Eine Oligomer-gefärbte Stoffprobe von (schwarzem) PET-Stoff (etwa 4 cm × 13 cm) wird bei relativ langsamem Schütteln in einem so genannten Mini-Tergitometer der Enzym-Behandlung unterzogen. Der PET-Stoff wird auf einem zylindrischen perforierten Halter befestigt (Radius ca. 2 cm, Höhe ca. 6 cm), der sich um seine Achse dreht, und wobei die Oligomer-gefärbte Seite des PET-Stoffs zum Zylinder-Äußeren weist.

[0120] Der Stoff wird bei einer gegebenen Temperatur (hier 65°C) in ein 150-ml-Becherglas mit 100 ml Behandlungslösung eingetaucht. Nach einer gegebenen Behandlungszeit (hier 90 Minuten) wird die PET-Stoffprobe aus dem Bad genommen und in deionisiertem Wasser gespült und an der Luft getrocknet.

[0121] Nach dem Konditionieren werden die Stoffproben auf der Seite mit der Oligomer-Färbung visuell bewertet (in Hinblick auf die Oligomer-Flecken-Entfernung). Die Bewertung ist wie folgt:

- 2: Probe signifikant schlechter als Blindprobe (kein Enzym)
- 1: Probe etwas schlechter als Blindprobe (kein Enzym)
- 0: Probe kann von der Blindprobe nicht unterschieden werden
- 1: Probe gegenüber Blindprobe etwas verbessert
- 2: Probe gegenüber Blindprobe signifikant verbessert

[0122] Die Stoffproben werden auch spektralphotometrisch gelesen (Gerät: Hunterlab Reflectometer), um die Farbstärke (K/S-Wert bei 600 nm) zu quantifizieren.

[0123] Die Tabelle nachstehend fasst die Test-Bedingungen für einen Versuch zusammen, der die Leistung von Enzymen unter ähnlichen Bedingungen vergleicht:

Temperatur:	65°C
Puffer/pH:	50 mM Glycinpuffer, pH 10,3
Behandlungszeit (min)	90
Enzymdosis (LU/g)	30000

Die Ergebnisse des Versuchs werden nachstehend zusammengefasst

Enzym	visuelle Bewertung (Durchschn.)	K/S Unterschied
		@ 600 nm
ohne	0 (definiert)	2,33
Eltern-Cutinase	0	2,38
Cutinase-Variante	1,5–2,0	2,89

[0124] Aus dieser Reihe von Experimenten scheint es somit, dass das Eltern-Enzym bei den gegebenen Testbedingungen keine oder nur eine sehr begrenzte Wirkung bereitstellt (wahrscheinlich weil die Temperatur für das Enzym zu hoch ist, um Aktivität zu behalten), während die Cutinase-Variante eine nennenswerte Entfernung von Oligomer-Färbung aus PET-Stoff bereitstellt.

Beispiel 11: cPET-Hydrolyse

[0125] Das pH- und Temperatur-Profil einer Variante der H. insolens-Cutinase wurde in einem Modell-Dispersionsfärb-Experiment getestet. Die Versuche wurden wie folgt durchgeführt: Eine Oligomer-gefärbte Stoffprobe von (schwarzem) PET-Stoff wird in einem Werner-Mathis-Laborrat den Bedingungen einer typischen Dispersionsfärbungsabfolge unterzogen. Als Überblick über das Verfahren wird die Stoffprobe einer Pufferlösung zugegeben, auf 130°C erwärmt, auf Raumtemperatur abgekühlt. Enzym oder Puffer wird zugegeben und dann 30 Minuten bei der gewünschten Temperatur gehalten. Die Lösung wird auf Raumtemperatur abgekühlt, und die Trübung in der Waschlage wird gemessen. Die verminderte Trübung ist ein direktes Maß der Cutinase-Aktivität, das hydrolysierten cPET-Oligomeren entspricht.

Ausführliche Beschreibung des Experiments:

[0126] Einer schwarze PET (etwa 4 cm × 13 cm) Stoffprobe wird zu 140 ml 100 mM Britton-Robinson-Puffer zugesetzt, der 0,2 g/l Lutensol AT11 (BASF) enthält, und in den Labomat geladen (32 Drehungen pro Minute).

[0127] Der Labomat wird mit einem Gradienten von 9°C/Minute auf 130°C erhitzt und 10 Minuten gehalten.

[0128] Die Bechergläser werden mit einem Gradienten von 9°C/Minute auf die Arbeitstemperatur (gemäß der Tabelle nachstehend) abgekühlt und 1 Minute gehalten.

[0129] 10 ml Enzymlösung (100 LU/ml der Variante) oder Pufferlösung (0 LU/ml) bei geeignetem pH werden in die Bechergläser injiziert.

[0130] Der Labomat wird mit einem Gradienten von 2°C/Minute wieder auf Temperatur gebracht und 30 Minuten gehalten.

[0131] Die Stoffproben werden entnommen, und die Waschlage wird auf Raumtemperatur abgekühlt.

[0132] Die Trübung der Waschlagen wird bestimmt.

[0133] Bewertung: die Trübung wird auf einem Hach 18900 Ratio Turbidimeter (standardisiert mit den Trübungsstandards 1,8, 18 und 180 NTU) gemessen. Die Enzymleistung wird relativ zu einer Blindprobe als Differenz zwischen Trübung der Blindprobenflüssigkeit (kein Enzym) und Trübung der Enzym-behandelten Waschlage berechnet.

[0134] Die relative Leistung (herabgesetzte Trübung) der Cutinase-Variante wird berechnet, und die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle gezeigt. Wenn eine negative Zahl erhalten wird, wird das Ergebnis als „ne-

gativ" angegeben. Eine negative Zahl wird als Artefakt betrachtet, der durch die Schwankung des Aufbaus hervorgerufen wird.

Temperatur	pH 7	pH 8	pH 9	pH 10
60°C	39	57	37	14
65°C	39	16	60	30
70°C	25	12	54	33
75°C	22	50	114	58
85°C	negativ	negativ	15	negativ

[0135] Die Ergebnisse zeigen, dass die Cutinase-Variante über einen breiten pH- und Temperaturbereich aktiv ist, mit einer optimalen Oligomer-Entfernung bei dem aktuellen Aufbau um pH 9 und 75°C. Inaktivierung scheint bei oder über 85°C aufzutreten.

Beispiel 12: cPET-Hydrolyse

[0136] Der Einfluss der Behandlungsdauer wurde für eine Variante der H. Insolens Cutinase in einem Dispersionsfärb-Modellexperiment untersucht. Die Versuche wurden wie folgt durchgeführt:

Eine Oligomer-gefärbte Stoffprobe von (schwarzem) PET-Stoff wird in einem Werner-Mathis-Labomat den Bedingungen einer typischen Dispersionsfärbungsabfolge unterzogen. Als Überblick über das Verfahren wird die Stoffprobe einer Pufferlösung zugegeben, auf 130°C erhitzt, auf Raumtemperatur abgekühlt. Enzym oder Puffer (100 mM Britton-Robinson-pH 9) wird zugegeben und dann 0–40 Minuten bei 75°C gehalten. Die Lösung wird auf Raumtemperatur abgekühlt, und die Trübung in der Waschlage wird gemessen. Die verminderte Trübung ist ein direktes Maß der Cutinase-Aktivität, entsprechend hydrolysierten cPET Oligomeren.

Ausführliche Beschreibung des Experiments:

[0137] Eine schwarze PET (etwa 4 cm × 13 cm) Stoffprobe wird zu 140 ml 100 mM Britton-Robinson-Puffer zugesetzt, der 0,2 g/l Lutensol AT11 (BASF) enthält, und in den Labomat geladen (32 Drehungen pro Minute).

[0138] Der Labomat wird mit einem Gradienten von 9°C/Minute auf 130°C erwärmt und 10 Minuten gehalten.

[0139] Die Bechergläser werden auf 75°C mit einem Gradienten von 9°C/Minute abgekühlt und 1 Minute gehalten.

[0140] 10 ml Enzymlösung (100 LU/ml der Variante) oder 100 mM Britton-Robinson-Puffer pH 9,0 (0 LU/ml) werden in die Bechergläser injiziert.

[0141] Der Labomat wird mit einem Gradienten von 2°C/Minute wieder auf 75°C erwärmt und während der entsprechenden Zahl von Minuten (0–40 Minuten, siehe Tabelle nachstehend) gehalten.

[0142] Die Stoffproben werden entnommen, und die Waschlage wird auf Raumtemperatur abgekühlt.

[0143] Die Trübung der Waschlagen wird bestimmt.

[0144] Bewertung: die Trübung wird auf einem Hach 18900 Ratio Turbidimeter (mit den Trübungsstandards 1,8, 18 und 180 NTU standardisiert) gemessen. Die Enzymleistung wird relativ zu einer Blindprobe zum Zeitpunkt Null : Trübung der Blindprobenflüssigkeit (kein Enzym) zum Zeitpunkt Null abzüglich Trübung der Enzym-behandelten Waschlage (zu einer gegebenen Zeit) berechnet.

[0145] Die relative Leistung (verminderte Trübung) der Cutinase-Variante wurde berechnet, und die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle gezeigt.

Zeit (Minuten)	relative Leistung (verminderte Trübung)
0	0
5	42
10	48
15	62
20	69
25	85
30	72
40	78

[0146] Die Ergebnisse zeigen, dass die Wirkung des Enzyms mit der Zeit zunimmt. Bei der aktuellen Enzymdosierung und Oligomerkonzentration scheint sie oberhalb von etwa 20 Minuten ein Plateau zu erreichen.

Beispiel 13: Fasermodifizierung

[0147] Die Wirkung auf die Benetzungseigenschaften eines dispersionsgefärbten Polyesterstoffes wurde durch Behandeln des Stoffes mit einer Variante der H. insolens Cutinase vor dem Färben untersucht. Das Experiment bestand daher aus zwei Phasen, der tatsächlichen Fasermodifikation und dem Dispersionsfärbeverfahren.

Phase 1 – Fasermodifikation

Ausstattung: Atlas Launder-O-meter LP2
 Stoff: gestrickter 100% gereinigter Polyester von Testfabrics
 pH: 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7
 Scheuermittel: 5 große Stahlkugeln
 Becherglasvolumen: 120 ml
 Behandlung: 2 Stunden 65°C, dann Anstieg auf 90°C und 1 Stunde Halten
 Stoffproben-Vorbereitung: 3 × geschnittene 1,5 g Stoffprobe, 3 pro Becherglas = 4,5 g

Spülen:

Spülen in deionisiertem Wasser

Phase 2 – Färben – Dispersionsfarbstoff:

Farbstofflösung:

[0148] Zugabe zu deionisiertem Wasser zum Herstellen eines Flottenverhältnisses von 1:20–0,4% Dianix Red (DyStar) SE-CB (owf)
 pH 4,5–5

Färbeverfahren:

1. Eine Stoffprobe pro Behandlung aus der Fasermodifikation wird für das Färben verwendet (1,5 g/Stoffprobe wird für die Berechnung des Flottenverhältnisses verwendet).
2. Herstellen eines Färbebades gemäß der Rezeptur, vorstehend. Hinzufügen der kalten Farbstofflösung zu den Labomat-Bechergläsern und Erwärmen auf 55°C mit einem Gradienten von 3,5°C/Minute. 5 min Laufenlassen nach Erreichen der Temperatur.
3. Zugeben des Stoffs zu den Bechergläsern.
4. Erhöhen der Temperatur auf 130°C mit einem Gradienten von 1,5°C/Minute. 30 min Färben.
5. Abkühlen auf 70°C mit einem Gradienten von 5°C/Minute. Ausleeren des Bades, jedoch Sammeln und 10 min heißes Spülen des Stoffes (60°C). Nachfolgendes Überlauf-Spülen bei Raumtemperatur nach dem heißen Spülen, bis jegliches Ausbluten zu Erliegen kommt.

6. Über Nacht an der Luft Trocknenlassen.

Tests/Auswertungen:

AATCC-Testverfahrenmethode 61 – Farbechtheit beim Waschen
 Prozent Farbstoffbad-Erschöpfung – Spektralphotometer
 K/S und L*-Reflektometer
 AATCC TM-79 Drop Test

Ergebnisse:

[0149] Die Ergebnisse der Fasermodifikation werden in der folgenden Tabelle gezeigt.

Varianten-Dosierung	Anfärbung (AATCC TM 61)	Farbveränderung (K/S @ 530 vor und nach TM-61)	Drop Test (AATCC TM-79)
Blindprobe	4,5	5	53 Sek.
50 LU/ml	4,5	5	18 Sek.
100 LU/ml	4,5	5	15 Sek.

[0150] Die Ergebnisse zeigen, dass die Behandlung des Polyesters mit der Variante die Benetzung wesentlich verstärkte. Mit dem Dispersionsfarbstoff im aktuellen Aufbau werden keine nachteiligen Auswirkungen auf die Färbbarkeit festgestellt.

Beispiel 14: Verminderung von schlechtem Geruch in mit menschlichem Schweiß/Talg verschmutzten Textilien durch Verwendung einer Cutinase-Variante in der Wäsche

[0151] Die Leistung von Cutinase im Hinblick auf die Verminderung von schlechtem Geruch kann in einem Ein-Zyklus-Waschversuch, der in einem Terg-O-tometer durchgeführt wird, getestet werden.

Experimentelle Bedingungen

Waschlauge:	1000 ml pro Becherglas
Stoffproben:	100% Polyester (interlock gestrickt, vorher durch Soxhlet-Extraktion gereinigt). 24 Stoffproben (3,3 × 3,5 cm) pro Becherglas.
Schmutz:	Menschlicher männlicher Achselschweiß und Talg, aufgetragen durch Abwischen der Achselhöhlen nach sportlicher Anstrengung.
Reinigungsmittel:	5 g/l eines Standard-Farbwaschmittels. Keine pH-Anpassung.
Wasserhärte:	3,2 mM Ca ²⁺ /Mg ²⁺ (im Verhältnis 5:1)
Waschtemperatur:	30°C
Waschzeit:	30 min
Spülen:	15 min unter laufendem Leitungswasser

Bewertung:

[0152] Nach dem Waschen werden die nassen Stoffproben in geschlossene, getönte 200 ml Gläser verbracht. Ein geschultes sensorisches Panel (9–11 Juroren) bewertet den Geruch durch Beriechen des Gasraums über den nassen Proben und bewertet die Gesamtgeruchsintensität. Die Geruchsintensität wird durch Anbringen einer Markierung auf einer ununterteilten Linienskala von 15 cm mit Wortmarken an jedem Ende („Nichts“ am Beginn der Skala und „Sehr stark“ am Ende) notiert. Alle Bewertungen werden zweimal durchgeführt. Die Stoffproben werden an Tag 1, 2 und 3 nach dem Waschen bewertet (die Stoffproben werden zu allen Zeiten in den Gläsern gehalten).

Patentansprüche

1. Variante einer Eltern-Cutinase, wobei:

a) die Eltern-Cutinase die Cutinase von *H. insolens*, Stamm DSM 1800, ist,

- b) die Variante eine Aminosäuresequenz mit 1–20 Änderungen im Vergleich zu der Eltern-Cutinase aufweist,
- c) die Variante eine Substitution eines negativen Aminosäurerestes an einer Position entsprechend Position E6, E10, E30, E47 D63, E82 und/oder E179 mit einer neutralen oder positiven Aminosäure oder eine Substitution mit Pro an einer Position entsprechend A14 oder R51 in der Eltern-Cutinase umfasst,
- d) die Variante hydrolytische Aktivität gegenüber cyclischem Tri(ethylenterephthalat) oder Terephthalsäure-bis(2-hydroxyethyl)esterdibenzoat aufweist, und
- e) die Variante wärmerestabiler ist als die Eltern-Cutinase.

2. Variante des vorhergehenden Anspruchs, die eine Substitution entsprechend E6N/Q, E10N/Q, E47K/R und/oder E179N/Q (H. insolens-Cutinase-Nummerierung) umfasst.

3. Variante nach einem der beiden vorhergehenden Ansprüche, die in der Cutinase von Humicola insolens, Stamm DSM 1800, eine Substitution entsprechend A14P oder R51P umfasst.

4. Variante nach einem vorhergehenden Anspruch, die eine, zwei, drei, vier, fünf oder sechs der Substitutionen aufweist.

5. Variante nach einem vorhergehenden Anspruch, die in der Cutinase von Humicola insolens, Stamm DSM 1800, Substitutionen aufweist, die einer der folgenden entsprechen:

- a) R51P
- b) E6N/Q + L138I
- c) A14P + E47K
- d) E47K
- e) E179N/Q
- f) E6N/Q + E47K + R51P
- g) A14P + E47K + E179N/Q
- h) E47K + E179N/Q
- i) E47K + D63N
- j) E6N/Q + A14P + E47K + R51P + E179N/Q
- k) E6N/Q + E10N/Q + A14P + E47K + R51P + E179N/Q oder
- l) Q1P + L2V + S11C + N15T + F24Y + L46I + E47K

6. Variante nach einem vorhergehenden Anspruch, die eine Denaturierungstemperatur aufweist, die mindestens 5° höher ist als diejenige der Eltern-Cutinase, gemessen bei pH 8,5.

7. DNA-Sequenz, die die Variante nach einem vorhergehenden Anspruch codiert.

8. Vektor, der die DNA-Sequenz des vorhergehenden Anspruchs einschließt.

9. Transformierte Wirtszelle, die die DNA-Sequenz nach Anspruch 7 oder den Vektor nach Anspruch 8 beherbergt.

10. Verfahren zur Herstellung der Variante nach einem der Ansprüche 1–6, umfassend

- a) Kultivieren der Zelle des vorhergehenden Anspruchs, so dass die Variante exprimiert und vorzugsweise sezerniert wird, und
- b) Gewinnen der Variante.

11. Verfahren zur enzymatischen Hydrolyse eines cyclischen Oligomers von Poly(ethylenterephthalat), wobei das Verfahren die Behandlung des cyclischen Oligomers mit der Cutinase-Variante nach einem der Ansprüche 1–6 umfasst.

12. Verfahren des vorhergehenden Anspruchs, wobei das cyclische Oligomer cyclisches Tri(ethylenterephthalat) ist.

13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, wobei die Behandlung bei 60–80°C, vorzugsweise bei 65–75°C vorgenommen wird.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 11–13, wobei das cyclische Oligomer in und auf den Fasern eines Polyester-enthaltenden Textilstoffs oder Garns vorhanden ist.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 11–14, welches weiterhin anschließend das Spülen des Textilstoffs oder Garns, vorzugsweise das Spülen mit einer wässrigen Lösung mit einem pH-Wert im Bereich von etwa pH 7 bis etwa pH 11 umfasst.

16. Verfahren zum Färben von Polyester-Textilstoff oder -Garn, umfassend:

- a) Behandeln des Textilstoffs oder Garns mit der Cutinase-Variante nach einem der Ansprüche 1–6, und
- b) Färben des behandelten Stoffs mit einem Reaktivfarbstoff oder einem Dispersionsfarbstoff.

17. Detergensenzusammensetzung, umfassend ein oberflächenaktives Mittel und die Variante nach einem der Ansprüche 1–6.

18. Verfahren zur Verbesserung der funktionellen Ausrüstung eines PET-enthaltenden Garns oder Textilstoffs, umfassend

- a) Behandeln des Garns oder Textilstoffs mit der Variante nach einem der Ansprüche 1–6, und
- b) anschließendes Behandeln des Garns oder Textilstoffs mit einem Veredlungsmittel, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Weichmachern, Antiknitterharzen, antistatischen Mitteln, schmutzabweisenden Mitteln.

Es folgen 34 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Fig. 1

3D-Struktur von Cutinase aus *Humicola insolens*

ATOM	1	N	GLY A	3	24.424	-7.935	18.390	1.00	46.73
ATOM	2	CA	GLY A	3	23.848	-8.994	17.546	1.00	42.29
ATOM	3	C	GLY A	3	24.396	-10.112	16.727	1.00	37.35
ATOM	4	O	GLY A	3	25.347	-10.913	16.728	1.00	35.38
ATOM	5	N	ALA A	4	23.664	-10.625	15.797	1.00	34.53
ATOM	6	CA	ALA A	4	23.051	-10.874	14.555	1.00	30.95
ATOM	7	C	ALA A	4	21.574	-11.246	14.920	1.00	28.33
ATOM	8	O	ALA A	4	20.677	-10.499	14.446	1.00	22.94
ATOM	9	CB	ALA A	4	23.574	-11.780	13.556	1.00	26.92
ATOM	10	N	ILE A	5	21.583	-12.058	16.043	1.00	26.48
ATOM	11	CA	ILE A	5	20.281	-12.289	16.637	1.00	25.65
ATOM	12	C	ILE A	5	20.316	-12.151	18.118	1.00	22.40
ATOM	13	O	ILE A	5	21.060	-12.888	18.717	1.00	24.74
ATOM	14	CB	ILE A	5	19.724	-13.683	16.524	1.00	26.04
ATOM	15	CG1	ILE A	5	19.852	-13.927	15.050	1.00	29.85
ATOM	16	CG2	ILE A	5	18.374	-13.558	17.159	1.00	20.48
ATOM	17	CD1	ILE A	5	19.066	-15.133	14.709	1.00	27.96
ATOM	18	N	GLU A	6	19.461	-11.377	18.668	1.00	20.52
ATOM	19	CA	GLU A	6	19.207	-11.015	20.040	1.00	17.94
ATOM	20	C	GLU A	6	17.711	-11.027	20.432	1.00	17.76
ATOM	21	O	GLU A	6	16.931	-10.165	19.990	1.00	17.60
ATOM	22	CB	GLU A	6	19.809	-9.614	20.199	1.00	14.22
ATOM	23	CG	GLU A	6	21.232	-9.374	20.385	1.00	16.71
ATOM	24	CD	GLU A	6	22.148	-10.387	21.030	1.00	34.47
ATOM	25	OE1	GLU A	6	21.634	-11.347	21.693	1.00	49.57
ATOM	26	OE2	GLU A	6	23.410	-10.310	20.975	1.00	37.43
ATOM	27	N	ASN A	7	17.375	-11.895	21.333	1.00	21.67
ATOM	28	CA	ASN A	7	16.070	-11.854	21.846	1.00	24.04
ATOM	29	C	ASN A	7	15.927	-11.488	23.238	1.00	22.08
ATOM	30	O	ASN A	7	15.098	-12.179	23.820	1.00	24.00
ATOM	31	CB	ASN A	7	15.468	-13.307	21.820	1.00	25.06
ATOM	32	CG	ASN A	7	15.039	-13.160	20.341	1.00	38.52
ATOM	33	OD1	ASN A	7	15.519	-14.147	19.759	1.00	48.45
ATOM	34	ND2	ASN A	7	14.318	-12.081	19.968	1.00	36.89
ATOM	35	N	GLY A	8	16.671	-10.813	23.926	1.00	23.56
ATOM	36	CA	GLY A	8	16.654	-10.628	25.363	1.00	23.69
ATOM	37	C	GLY A	8	15.366	-10.247	25.984	1.00	22.72
ATOM	38	O	GLY A	8	14.967	-10.939	26.867	1.00	32.25
ATOM	39	N	LEU A	9	14.785	-9.144	25.755	1.00	23.61
ATOM	40	CA	LEU A	9	13.470	-8.753	26.033	1.00	23.73
ATOM	41	C	LEU A	9	12.559	-9.961	25.782	1.00	25.93
ATOM	42	O	LEU A	9	11.494	-10.054	26.480	1.00	30.47
ATOM	43	CB	LEU A	9	12.971	-7.621	25.105	1.00	5.84
ATOM	44	CG	LEU A	9	11.556	-7.227	25.470	1.00	23.25
ATOM	45	CD1	LEU A	9	11.422	-6.765	26.968	1.00	20.21
ATOM	46	CD2	LEU A	9	11.009	-6.071	24.714	1.00	17.64
ATOM	47	N	GLU A	10	12.775	-10.786	24.773	1.00	29.56

ATOM	48	CA	GLU	A	10	11.635	-11.681	24.484	1.00	33.93
ATOM	49	C	GLU	A	10	11.640	-12.872	25.412	1.00	32.18
ATOM	50	O	GLU	A	10	10.600	-13.159	25.996	1.00	36.67
ATOM	51	CB	GLU	A	10	11.513	-11.996	23.012	1.00	40.97
ATOM	52	CG	GLU	A	10	10.054	-12.303	22.745	1.00	51.96
ATOM	53	CD	GLU	A	10	9.570	-11.711	21.437	1.00	54.08
ATOM	54	OE1	GLU	A	10	10.488	-11.440	20.635	1.00	48.22
ATOM	55	OE2	GLU	A	10	8.323	-11.643	21.471	1.00	52.39
ATOM	56	N	SER	A	11	12.822	-13.334	25.688	1.00	29.58
ATOM	57	CA	SER	A	11	12.993	-14.455	26.645	1.00	35.25
ATOM	58	C	SER	A	11	13.403	-14.012	28.047	1.00	39.86
ATOM	59	O	SER	A	11	13.688	-14.790	28.919	1.00	43.72
ATOM	60	CB	SER	A	11	14.053	-15.364	25.983	1.00	33.73
ATOM	61	OG	SER	A	11	15.275	-14.620	25.928	1.00	46.98
ATOM	62	N	GLY	A	12	13.467	-12.802	28.456	1.00	41.40
ATOM	63	CA	GLY	A	12	13.841	-12.332	29.752	1.00	45.34
ATOM	64	C	GLY	A	12	12.673	-12.562	30.694	1.00	47.62
ATOM	65	O	GLY	A	12	11.485	-12.335	30.335	1.00	50.76
ATOM	66	N	SER	A	13	12.969	-12.900	31.936	1.00	48.09
ATOM	67	CA	SER	A	13	11.974	-13.158	32.995	1.00	45.26
ATOM	68	C	SER	A	13	11.509	-11.933	33.772	1.00	39.53
ATOM	69	O	SER	A	13	12.563	-11.204	33.992	1.00	36.30
ATOM	70	CB	SER	A	13	12.708	-14.006	34.101	1.00	51.20
ATOM	71	OG	SER	A	13	12.006	-13.947	35.338	1.00	57.14
ATOM	72	N	ALA	A	14	10.256	-11.785	34.214	1.00	35.22
ATOM	73	CA	ALA	A	14	10.068	-10.530	34.964	1.00	34.78
ATOM	74	C	ALA	A	14	10.574	-10.620	36.417	1.00	37.51
ATOM	75	O	ALA	A	14	10.809	-9.584	37.113	1.00	38.41
ATOM	76	CB	ALA	A	14	8.714	-9.915	34.903	1.00	32.71
ATOM	77	N	ASN	A	15	11.039	-11.834	36.737	1.00	38.85
ATOM	78	CA	ASN	A	15	11.715	-12.086	37.963	1.00	43.49
ATOM	79	C	ASN	A	15	13.073	-11.411	37.953	1.00	46.45
ATOM	80	O	ASN	A	15	13.453	-11.022	39.022	1.00	52.50
ATOM	81	CB	ASN	A	15	12.088	-13.533	38.207	1.00	53.08
ATOM	82	CG	ASN	A	15	10.772	-14.226	38.553	1.00	71.86
ATOM	83	OD1	ASN	A	15	9.837	-13.535	38.998	1.00	71.73
ATOM	84	ND2	ASN	A	15	10.866	-15.523	38.267	1.00	77.71
ATOM	85	N	ALA	A	16	13.712	-11.305	36.812	1.00	46.73
ATOM	86	CA	ALA	A	16	14.915	-10.470	36.743	1.00	41.22
ATOM	87	C	ALA	A	16	15.031	-9.286	35.798	1.00	36.70
ATOM	88	O	ALA	A	16	16.027	-9.254	35.075	1.00	37.67
ATOM	89	CB	ALA	A	16	15.903	-11.545	36.301	1.00	41.80
ATOM	90	N	CYS	A	17	14.300	-8.227	35.843	1.00	30.62
ATOM	91	CA	CYS	A	17	14.614	-7.093	34.997	1.00	31.78
ATOM	92	C	CYS	A	17	16.024	-6.579	35.149	1.00	32.94
ATOM	93	O	CYS	A	17	16.744	-6.850	36.113	1.00	39.10
ATOM	94	CB	CYS	A	17	13.679	-5.881	35.138	1.00	28.00
ATOM	95	SG	CYS	A	17	12.048	-6.583	34.858	1.00	24.72

ATOM	96	N	PRO	A	18	16.529	-5.910	34.092	1.00	30.49
ATOM	97	CA	PRO	A	18	17.994	-5.626	33.971	1.00	22.04
ATOM	98	C	PRO	A	18	18.178	-4.138	34.241	1.00	20.15
ATOM	99	O	PRO	A	18	17.085	-3.459	34.370	1.00	17.83
ATOM	100	CB	PRO	A	18	18.353	-6.003	32.559	1.00	19.20
ATOM	101	CG	PRO	A	18	17.044	-6.595	32.101	1.00	20.16
ATOM	102	CD	PRO	A	18	15.903	-5.936	32.792	1.00	24.35
ATOM	103	N	ASP	A	19	19.428	-3.652	34.011	1.00	14.85
ATOM	104	CA	ASP	A	19	19.451	-2.168	34.226	1.00	16.59
ATOM	105	C	ASP	A	19	18.739	-1.367	33.156	1.00	20.42
ATOM	106	O	ASP	A	19	18.311	-0.242	33.430	1.00	23.84
ATOM	107	CB	ASP	A	19	20.896	-1.818	34.485	1.00	27.25
ATOM	108	CG	ASP	A	19	21.433	-2.389	35.793	1.00	42.30
ATOM	109	OD1	ASP	A	19	21.162	-3.549	36.297	1.00	53.52
ATOM	110	OD2	ASP	A	19	22.251	-1.719	36.543	1.00	54.02
ATOM	111	N	ALA	A	20	18.646	-1.780	31.895	1.00	20.18
ATOM	112	CA	ALA	A	20	18.066	-1.036	30.809	1.00	17.43
ATOM	113	C	ALA	A	20	17.713	-2.087	29.703	1.00	16.06
ATOM	114	O	ALA	A	20	18.334	-3.172	29.860	1.00	9.45
ATOM	115	CB	ALA	A	20	18.975	-0.048	30.100	1.00	12.07
ATOM	116	N	ILE	A	21	16.814	-1.602	28.829	1.00	8.47
ATOM	117	CA	ILE	A	21	16.657	-2.583	27.753	1.00	9.23
ATOM	118	C	ILE	A	21	16.952	-1.745	26.486	1.00	14.77
ATOM	119	O	ILE	A	21	16.681	-0.473	26.403	1.00	12.01
ATOM	120	CB	ILE	A	21	15.208	-2.984	27.837	1.00	16.28
ATOM	121	CG1	ILE	A	21	14.851	-3.898	28.956	1.00	15.55
ATOM	122	CG2	ILE	A	21	14.689	-3.671	26.514	1.00	13.71
ATOM	123	CD1	ILE	A	21	13.401	-3.879	29.372	1.00	6.12
ATOM	124	N	LEU	A	22	17.432	-2.451	25.391	1.00	12.24
ATOM	125	CA	LEU	A	22	17.665	-1.774	24.087	1.00	11.27
ATOM	126	C	LEU	A	22	16.849	-2.517	23.038	1.00	14.60
ATOM	127	O	LEU	A	22	16.908	-3.781	22.850	1.00	9.78
ATOM	128	CB	LEU	A	22	19.087	-1.865	23.693	1.00	10.96
ATOM	129	CG	LEU	A	22	19.493	-1.543	22.257	1.00	10.32
ATOM	130	CD1	LEU	A	22	19.311	-0.081	21.900	1.00	4.72
ATOM	131	CD2	LEU	A	22	20.990	-1.842	22.156	1.00	7.42
ATOM	132	N	ILE	A	23	16.038	-1.815	22.242	1.00	15.13
ATOM	133	CA	ILE	A	23	15.298	-2.459	21.115	1.00	18.06
ATOM	134	C	ILE	A	23	15.916	-1.771	19.901	1.00	17.42
ATOM	135	O	ILE	A	23	16.117	-0.519	19.795	1.00	19.31
ATOM	136	CB	ILE	A	23	13.820	-2.194	21.392	1.00	18.16
ATOM	137	CG1	ILE	A	23	13.208	-3.076	22.447	1.00	14.23
ATOM	138	CG2	ILE	A	23	12.787	-2.167	20.247	1.00	13.19
ATOM	139	CD1	ILE	A	23	12.142	-2.065	22.976	1.00	20.41
ATOM	140	N	PHE	A	24	16.218	-2.548	18.940	1.00	14.59
ATOM	141	CA	PHE	A	24	16.859	-2.159	17.671	1.00	11.72
ATOM	142	C	PHE	A	24	16.347	-2.719	16.353	1.00	7.25
ATOM	143	O	PHE	A	24	16.095	-3.998	16.161	1.00	3.47

ATOM	144	CB	PHE	A	24	18.195	-2.855	17.658	1.00	12.61
ATOM	145	CG	PHE	A	24	19.015	-2.150	16.716	1.00	10.72
ATOM	146	CD1	PHE	A	24	19.457	-0.844	16.913	1.00	13.08
ATOM	147	CD2	PHE	A	24	19.325	-2.852	15.558	1.00	6.61
ATOM	148	CE1	PHE	A	24	20.232	-0.187	15.983	1.00	4.86
ATOM	149	CE2	PHE	A	24	20.061	-2.218	14.545	1.00	7.61
ATOM	150	CZ	PHE	A	24	20.550	-0.823	14.804	1.00	8.78
ATOM	151	N	ALA	A	25	16.037	-1.700	15.449	1.00	6.32
ATOM	152	CA	ALA	A	25	15.662	-2.158	14.068	1.00	7.18
ATOM	153	C	ALA	A	25	16.851	-1.976	13.055	1.00	8.59
ATOM	154	O	ALA	A	25	17.518	-1.000	13.133	1.00	5.95
ATOM	155	CB	ALA	A	25	14.488	-1.402	13.562	1.00	8.27
ATOM	156	N	ARG	A	26	17.174	-3.032	12.325	1.00	8.84
ATOM	157	CA	ARG	A	26	18.134	-3.278	11.277	1.00	4.04
ATOM	158	C	ARG	A	26	17.691	-2.694	9.894	1.00	7.67
ATOM	159	O	ARG	A	26	16.527	-2.361	9.525	1.00	9.36
ATOM	160	CB	ARG	A	26	18.581	-4.659	10.756	1.00	6.06
ATOM	161	CG	ARG	A	26	17.705	-5.741	10.439	1.00	5.08
ATOM	162	CD	ARG	A	26	18.069	-7.224	10.382	1.00	6.73
ATOM	163	NE	ARG	A	26	17.000	-8.053	9.708	1.00	9.04
ATOM	164	CZ	ARG	A	26	15.724	-8.206	9.912	1.00	7.06
ATOM	165	NH1	ARG	A	26	15.085	-7.535	10.895	1.00	22.93
ATOM	166	NH2	ARG	A	26	14.809	-8.825	9.346	1.00	7.89
ATOM	167	N	GLY	A	27	18.761	-2.539	9.092	1.00	7.71
ATOM	168	CA	GLY	A	27	18.537	-1.888	7.782	1.00	5.34
ATOM	169	C	GLY	A	27	18.063	-2.896	6.862	1.00	4.70
ATOM	170	O	GLY	A	27	18.155	-4.139	7.075	1.00	13.14
ATOM	171	N	SER	A	28	17.562	-2.612	5.765	1.00	11.82
ATOM	172	CA	SER	A	28	17.108	-3.325	4.615	1.00	14.72
ATOM	173	C	SER	A	28	18.214	-4.327	4.142	1.00	7.74
ATOM	174	O	SER	A	28	19.286	-3.973	4.083	1.00	6.71
ATOM	175	CB	SER	A	28	16.460	-2.352	3.538	1.00	6.38
ATOM	176	OG	SER	A	28	16.819	-0.978	3.833	1.00	28.10
ATOM	177	N	THR	A	29	17.942	-5.634	4.241	1.00	4.79
ATOM	178	CA	THR	A	29	18.562	-6.763	3.914	1.00	8.71
ATOM	179	C	THR	A	29	19.500	-7.271	4.985	1.00	14.00
ATOM	180	O	THR	A	29	20.162	-8.326	4.713	1.00	17.68
ATOM	181	CB	THR	A	29	19.454	-6.680	2.617	1.00	14.90
ATOM	182	OG1	THR	A	29	20.736	-6.066	-2.595	1.00	14.00
ATOM	183	CG2	THR	A	29	18.785	-5.888	1.561	1.00	15.59
ATOM	184	N	GLU	A	30	19.740	-6.599	6.105	1.00	14.52
ATOM	185	CA	GLU	A	30	20.677	-7.266	7.056	1.00	14.10
ATOM	186	C	GLU	A	30	20.092	-8.513	7.647	1.00	13.07
ATOM	187	O	GLU	A	30	18.916	-8.726	7.705	1.00	19.98
ATOM	188	CB	GLU	A	30	21.228	-6.371	8.072	1.00	15.45
ATOM	189	CG	GLU	A	30	21.166	-4.945	7.709	1.00	8.37
ATOM	190	CD	GLU	A	30	22.073	-4.143	8.637	1.00	23.08
ATOM	191	OE1	GLU	A	30	21.395	-3.328	9.284	1.00	19.26

ATOM	192	OE2	GLU	A	30	23.317	-4.327	8.712	1.00	19.71
ATOM	193	N	PRO	A	31	20.875	-9.479	7.918	1.00	13.09
ATOM	194	CA	PRO	A	31	20.477	-10.818	8.402	1.00	14.56
ATOM	195	C	PRO	A	31	20.167	-10.698	9.895	1.00	18.27
ATOM	196	O	PRO	A	31	20.148	-9.636	10.392	1.00	20.45
ATOM	197	CB	PRO	A	31	21.690	-11.692	8.215	1.00	10.95
ATOM	198	CG	PRO	A	31	22.790	-10.664	8.455	1.00	11.24
ATOM	199	CD	PRO	A	31	22.350	-9.316	7.864	1.00	13.71
ATOM	200	N	GLY	A	32	19.612	-11.689	10.472	1.00	18.99
ATOM	201	CA	GLY	A	32	19.205	-11.774	11.816	1.00	13.53
ATOM	202	C	GLY	A	32	18.133	-10.808	12.188	1.00	16.62
ATOM	203	O	GLY	A	32	17.345	-10.294	11.411	1.00	17.01
ATOM	204	N	ASN	A	33	18.055	-10.528	13.468	1.00	16.15
ATOM	205	CA	ASN	A	33	17.290	-9.346	13.823	1.00	14.74
ATOM	206	C	ASN	A	33	18.294	-8.273	14.230	1.00	15.46
ATOM	207	O	ASN	A	33	17.774	-7.184	14.575	1.00	15.90
ATOM	208	CB	ASN	A	33	16.241	-9.663	14.867	1.00	17.42
ATOM	209	CG	ASN	A	33	16.827	-10.201	16.127	1.00	17.97
ATOM	210	OD1	ASN	A	33	16.112	-10.395	17.089	1.00	19.05
ATOM	211	ND2	ASN	A	33	18.074	-10.460	16.112	1.00	13.29
ATOM	212	N	MET	A	34	19.633	-8.378	14.282	1.00	14.22
ATOM	213	CA	MET	A	34	20.282	-7.171	14.751	1.00	12.97
ATOM	214	C	MET	A	34	21.142	-6.663	13.611	1.00	19.02
ATOM	215	O	MET	A	34	21.654	-5.512	13.713	1.00	26.04
ATOM	216	CB	MET	A	34	21.202	-7.329	15.859	1.00	13.39
ATOM	217	CG	MET	A	34	20.579	-7.713	17.163	1.00	9.02
ATOM	218	SD	MET	A	34	20.175	-6.316	18.069	1.00	9.13
ATOM	219	CE	MET	A	34	21.481	-5.121	18.095	1.00	4.11
ATOM	220	N	GLY	A	35	21.259	-7.446	12.550	1.00	19.99
ATOM	221	CA	GLY	A	35	22.071	-7.135	11.418	1.00	14.30
ATOM	222	C	GLY	A	35	23.511	-7.340	11.764	1.00	17.58
ATOM	223	O	GLY	A	35	23.965	-7.724	12.842	1.00	12.78
ATOM	224	N	ILE	A	36	24.450	-6.839	10.950	1.00	20.63
ATOM	225	CA	ILE	A	36	25.833	-7.029	11.277	1.00	17.71
ATOM	226	C	ILE	A	36	26.609	-5.714	11.280	1.00	16.15
ATOM	227	O	ILE	A	36	27.865	-5.618	11.662	1.00	20.30
ATOM	228	CB	ILE	A	36	26.412	-8.070	10.327	1.00	30.19
ATOM	229	CG1	ILE	A	36	26.088	-7.448	8.959	1.00	31.16
ATOM	230	CG2	ILE	A	36	25.944	-9.490	10.543	1.00	15.68
ATOM	231	GD1	ILE	A	36	26.922	-8.149	7.958	1.00	34.10
ATOM	232	N	THR	A	37	25.905	-4.589	11.040	1.00	13.00
ATOM	233	CA	THR	A	37	26.825	-3.396	11.141	1.00	9.67
ATOM	234	C	THR	A	37	26.587	-2.513	12.350	1.00	15.44
ATOM	235	O	THR	A	37	27.040	-3.055	13.410	1.00	20.20
ATOM	236	CB	THR	A	37	26.592	-2.679	9.818	1.00	14.13
ATOM	237	OG1	THR	A	37	25.241	-2.212	9.503	1.00	22.62
ATOM	238	CG2	THR	A	37	26.949	-3.739	8.800	1.00	2.29
ATOM	239	N	VAL	A	38	25.733	-1.493	12.249	1.00	11.92

ATOM	240	CA	VAL	A	38	25.237	-0.800	13.411	1.00	15.22
ATOM	241	C	VAL	A	38	24.588	-1.455	14.612	1.00	14.68
ATOM	242	O	VAL	A	38	24.906	-1.185	15.733	1.00	15.89
ATOM	243	CB	VAL	A	38	24.124	0.180	12.855	1.00	14.13
ATOM	244	CG1	VAL	A	38	23.663	0.897	14.167	1.00	13.55
ATOM	245	CG2	VAL	A	38	24.570	1.025	11.670	1.00	6.75
ATOM	246	N	GLY	A	39	23.745	-2.410	14.677	1.00	14.24
ATOM	247	CA	GLY	A	39	23.135	-3.151	15.746	1.00	11.03
ATOM	248	C	GLY	A	39	24.096	-3.586	16.791	1.00	13.34
ATOM	249	O	GLY	A	39	24.131	-3.181	17.934	1.00	15.13
ATOM	250	N	PRO	A	40	25.067	-4.340	16.352	1.00	14.70
ATOM	251	CA	PRO	A	40	26.094	-5.025	17.171	1.00	13.44
ATOM	252	C	PRO	A	40	27.010	-3.909	17.589	1.00	11.81
ATOM	253	O	PRO	A	40	27.346	-3.871	18.764	1.00	12.79
ATOM	254	CB	PRO	A	40	26.723	-6.111	16.279	1.00	8.43
ATOM	255	CG	PRO	A	40	25.873	-6.243	14.950	1.00	4.84
ATOM	256	CD	PRO	A	40	25.198	-4.902	14.995	1.00	12.36
ATOM	257	N	ALA	A	41	27.226	-2.979	16.695	1.00	7.41
ATOM	258	CA	ALA	A	41	28.066	-1.962	17.278	1.00	11.03
ATOM	259	C	ALA	A	41	27.378	-1.206	18.439	1.00	14.87
ATOM	260	O	ALA	A	41	28.028	-0.503	19.274	1.00	14.26
ATOM	261	CB	ALA	A	41	28.579	-0.905	16.313	1.00	7.17
ATOM	262	N	LEU	A	42	26.135	-0.811	18.237	1.00	11.87
ATOM	263	CA	LEU	A	42	25.487	-0.048	19.300	1.00	12.36
ATOM	264	C	LEU	A	42	25.337	-0.856	20.624	1.00	11.94
ATOM	265	O	LEU	A	42	25.423	-0.397	21.730	1.00	8.33
ATOM	266	CB	LEU	A	42	24.036	0.168	18.811	1.00	13.24
ATOM	267	CG	LEU	A	42	23.272	1.160	19.676	1.00	6.90
ATOM	268	CD1	LEU	A	42	24.108	2.419	19.962	1.00	6.62
ATOM	269	CD2	LEU	A	42	21.991	1.580	18.943	1.00	7.11
ATOM	270	N	ALA	A	43	24.905	-2.095	20.482	1.00	10.88
ATOM	271	CA	ALA	A	43	24.761	-3.027	21.553	1.00	12.37
ATOM	272	C	ALA	A	43	26.106	-3.136	22.252	1.00	15.45
ATOM	273	O	ALA	A	43	25.958	-2.743	23.433	1.00	20.80
ATOM	274	CB	ALA	A	43	24.148	-4.324	21.002	1.00	9.60
ATOM	275	N	ASN	A	44	27.263	-3.440	21.636	1.00	16.91
ATOM	276	CA	ASN	A	44	28.454	-3.434	22.439	1.00	20.33
ATOM	277	C	ASN	A	44	28.717	-2.044	23.113	1.00	17.66
ATOM	278	O	ASN	A	44	29.019	-1.991	24.301	1.00	17.06
ATOM	279	CB	ASN	A	44	29.756	-3.695	21.625	1.00	35.48
ATOM	280	CG	ASN	A	44	29.564	-5.115	21.138	1.00	58.23
ATOM	281	OD1	ASN	A	44	30.013	-5.403	20.034	1.00	79.77
ATOM	282	ND2	ASN	A	44	28.908	-5.945	21.921	1.00	70.10
ATOM	283	N	GLY	A	45	28.682	-0.988	22.297	1.00	14.39
ATOM	284	CA	GLY	A	45	29.015	-0.221	22.976	1.00	11.65
ATOM	285	C	GLY	A	45	28.175	0.255	24.234	1.00	14.30
ATOM	286	O	GLY	A	45	28.529	0.582	25.385	1.00	10.77
ATOM	287	N	LEU	A	46	26.861	-0.099	24.065	1.00	16.88

ATOM	288	CA	LEU	A	46	25.968	0.248	25.207	1.00	16.29
ATOM	289	C	LEU	A	46	26.395	-0.651	26.346	1.00	13.48
ATOM	290	O	LEU	A	46	26.579	-0.325	27.462	1.00	7.75
ATOM	291	CB	LEU	A	46	24.608	-0.243	24.847	1.00	19.46
ATOM	292	CG	LEU	A	46	23.642	0.551	25.664	1.00	13.97
ATOM	293	CD1	LEU	A	46	24.089	1.994	25.563	1.00	13.99
ATOM	294	CD2	LEU	A	46	22.275	0.465	25.038	1.00	32.18
ATOM	295	N	GLU	A	47	26.523	-1.890	25.882	1.00	15.90
ATOM	296	CA	GLU	A	47	26.910	-2.886	26.909	1.00	24.03
ATOM	297	C	GLU	A	47	28.140	-2.500	27.702	1.00	24.14
ATOM	298	O	GLU	A	47	28.722	-3.203	28.500	1.00	27.24
ATOM	299	CB	GLU	A	47	27.147	-4.206	26.204	1.00	33.33
ATOM	300	CG	GLU	A	47	27.386	-5.254	27.245	1.00	51.29
ATOM	301	CD	GLU	A	47	27.661	-6.560	26.524	1.00	68.40
ATOM	302	OE1	GLU	A	47	26.741	-7.007	25.777	1.00	66.37
ATOM	303	OE2	GLU	A	47	28.856	-6.921	26.830	1.00	78.70
ATOM	304	N	SER	A	48	28.992	-1.626	27.215	1.00	27.50
ATOM	305	CA	SER	A	48	30.331	-1.518	27.789	1.00	25.23
ATOM	306	C	SER	A	48	30.108	-0.555	28.926	1.00	26.91
ATOM	307	O	SER	A	48	31.124	-0.058	29.462	1.00	33.39
ATOM	308	CB	SER	A	48	31.116	-0.990	26.621	1.00	21.90
ATOM	309	OG	SER	A	48	31.294	0.422	26.483	1.00	27.87
ATOM	310	N	HIS	A	49	28.826	-0.101	28.995	1.00	25.04
ATOM	311	CA	HIS	A	49	28.542	0.955	29.956	1.00	19.72
ATOM	312	C	HIS	A	49	27.480	0.461	30.950	1.00	22.55
ATOM	313	O	HIS	A	49	27.186	1.089	31.898	1.00	27.93
ATOM	314	CB	HIS	A	49	28.094	2.197	29.463	1.00	16.13
ATOM	315	CG	HIS	A	49	28.806	3.036	28.520	1.00	39.79
ATOM	316	ND1	HIS	A	49	29.564	4.058	28.953	1.00	45.66
ATOM	317	CD2	HIS	A	49	28.776	3.070	27.197	1.00	46.91
ATOM	318	CE1	HIS	A	49	30.028	4.750	27.979	1.00	45.87
ATOM	319	NE2	HIS	A	49	29.544	4.139	26.934	1.00	50.84
ATOM	320	N	ILE	A	50	27.009	-0.703	30.715	1.00	18.34
ATOM	321	CA	ILE	A	50	25.874	-1.129	31.415	1.00	19.89
ATOM	322	C	ILE	A	50	25.917	-2.629	31.146	1.00	26.29
ATOM	323	O	ILE	A	50	25.322	-3.023	30.168	1.00	25.33
ATOM	324	CB	ILE	A	50	24.527	-0.535	31.008	1.00	10.50
ATOM	325	CG1	ILE	A	50	24.340	0.906	31.292	1.00	4.97
ATOM	326	CG2	ILE	A	50	23.466	-1.298	31.697	1.00	12.96
ATOM	327	CD1	ILE	A	50	23.413	1.845	30.602	1.00	16.65
ATOM	328	N	ARG	A	51	26.707	-3.256	32.066	1.00	31.77
ATOM	329	CA	ARG	A	51	26.887	-4.714	32.107	1.00	29.06
ATOM	330	C	ARG	A	51	25.457	-5.331	32.170	1.00	32.68
ATOM	331	O	ARG	A	51	25.396	-6.363	31.512	1.00	37.16
ATOM	332	N	ASN	A	52	24.380	-4.817	32.788	1.00	28.48
ATOM	333	CA	ASN	A	52	23.284	-5.767	32.832	1.00	26.39
ATOM	334	C	ASN	A	52	22.176	-5.178	31.993	1.00	27.75
ATOM	335	O	ASN	A	52	21.333	-4.488	32.636	1.00	26.68

ATOM	336	CB	ASN	A	52	22.750	-5.884	34.232	1.00	34.86
ATOM	337	CG	ASN	A	52	21.637	-6.879	34.271	1.00	39.54
ATOM	338	OD1	ASN	A	52	20.781	-6.541	35.095	1.00	54.31
ATOM	339	ND2	ASN	A	52	21.611	-7.954	33.503	1.00	48.82
ATOM	340	N	ILE	A	53	22.127	-5.699	30.800	1.00	24.42
ATOM	341	CA	ILE	A	53	21.261	-5.092	29.772	1.00	20.15
ATOM	342	C	ILE	A	53	20.585	-6.151	28.912	1.00	17.63
ATOM	343	O	ILE	A	53	21.020	-7.349	28.917	1.00	18.01
ATOM	344	CB	ILE	A	53	22.245	-4.297	28.880	1.00	14.09
ATOM	345	CG1	ILE	A	53	21.682	-3.257	27.936	1.00	22.91
ATOM	346	CG2	ILE	A	53	22.907	-5.321	27.946	1.00	16.37
ATOM	347	CD1	ILE	A	53	22.877	-2.315	27.622	1.00	38.17
ATOM	348	N	TRP	A	54	19.447	-5.880	28.383	1.00	15.19
ATOM	349	CA	TRP	A	54	18.804	-6.889	27.567	1.00	17.96
ATOM	350	C	TRP	A	54	18.803	-6.230	26.151	1.00	19.82
ATOM	351	O	TRP	A	54	18.340	-5.059	25.985	1.00	18.37
ATOM	352	CB	TRP	A	54	17.364	-7.046	27.998	1.00	23.18
ATOM	353	CG	TRP	A	54	16.949	-7.932	29.100	1.00	24.57
ATOM	354	CD1	TRP	A	54	17.757	-8.727	29.895	1.00	24.46
ATOM	355	CD2	TRP	A	54	15.595	-8.164	29.603	1.00	30.21
ATOM	356	NE1	TRP	A	54	17.004	-9.372	30.858	1.00	25.87
ATOM	357	CE2	TRP	A	54	15.692	-9.039	30.700	1.00	24.92
ATOM	358	CE3	TRP	A	54	14.358	-7.633	29.243	1.00	36.26
ATOM	359	CZ2	TRP	A	54	14.611	-9.442	31.432	1.00	19.75
ATOM	360	CZ3	TRP	A	54	13.316	-8.042	30.009	1.00	32.94
ATOM	361	CH2	TRP	A	54	13.451	-8.916	31.068	1.00	23.02
ATOM	362	N	ILE	A	55	19.063	-7.152	25.204	1.00	15.21
ATOM	363	CA	ILE	A	55	19.178	-6.655	23.838	1.00	12.41
ATOM	364	C	ILE	A	55	18.091	-7.215	22.962	1.00	11.40
ATOM	365	O	ILE	A	55	17.955	-8.378	22.680	1.00	7.34
ATOM	366	CB	ILE	A	55	20.546	-6.962	23.201	1.00	16.44
ATOM	367	CG1	ILE	A	55	21.939	-6.409	23.702	1.00	8.75
ATOM	368	CG2	ILE	A	55	20.384	-6.460	21.750	1.00	21.77
ATOM	369	CD1	ILE	A	55	21.767	-5.582	24.863	1.00	16.23
ATOM	370	N	GLN	A	56	17.226	-6.412	22.390	1.00	9.67
ATOM	371	CA	GLN	A	56	16.161	-7.016	21.619	1.00	10.90
ATOM	372	C	GLN	A	56	16.432	-6.621	20.143	1.00	13.08
ATOM	373	O	GLN	A	56	16.402	-5.393	19.953	1.00	10.32
ATOM	374	CB	GLN	A	56	14.786	-6.542	22.014	1.00	11.49
ATOM	375	CG	GLN	A	56	13.653	-7.256	21.316	1.00	23.47
ATOM	376	CD	GLN	A	56	13.789	-8.741	21.351	1.00	24.88
ATOM	377	OE1	GLN	A	56	13.610	-9.379	20.324	1.00	9.56
ATOM	378	NE2	GLN	A	56	14.119	-9.221	22.544	1.00	17.94
ATOM	379	N	GLY	A	57	16.288	-7.645	19.216	1.00	6.84
ATOM	380	CA	GLY	A	57	16.174	-7.019	17.841	1.00	16.15
ATOM	381	C	GLY	A	57	14.740	-7.085	17.267	1.00	13.72
ATOM	382	O	GLY	A	57	14.124	-8.016	17.752	1.00	12.70
ATOM	383	N	VAL	A	58	14.068	-6.264	16.525	1.00	12.73

ATOM	384	CA	VAL	A	58	12.739	-6.308	16.070	1.00	11.16
ATOM	385	C	VAL	A	58	12.715	-7.246	14.893	1.00	14.85
ATOM	386	O	VAL	A	58	13.234	-6.891	13.849	1.00	18.64
ATOM	387	CB	VAL	A	58	12.262	-4.984	15.352	1.00	6.54
ATOM	388	CG1	VAL	A	58	10.894	-4.974	14.731	1.00	5.89
ATOM	389	CG2	VAL	A	58	12.650	-3.840	16.331	1.00	5.86
ATOM	390	N	GLY	A	59	12.209	-8.465	15.008	1.00	21.96
ATOM	391	CA	GLY	A	59	12.120	-9.385	13.874	1.00	17.81
ATOM	392	C	GLY	A	59	10.645	-9.561	13.550	1.00	23.35
ATOM	393	O	GLY	A	59	9.919	-8.579	13.249	1.00	27.99
ATOM	394	N	GLY	A	60	10.166	-10.805	13.623	1.00	18.75
ATOM	395	CA	GLY	A	60	8.841	-11.142	13.285	1.00	11.46
ATOM	396	C	GLY	A	60	8.550	-10.833	11.851	1.00	14.56
ATOM	397	O	GLY	A	60	9.160	-11.439	11.003	1.00	16.32
ATOM	398	N	PRO	A	61	7.505	-10.103	11.612	1.00	12.10
ATOM	399	CA	PRO	A	61	7.123	-9.774	10.250	1.00	14.70
ATOM	400	C	PRO	A	61	8.230	-8.941	9.570	1.00	22.17
ATOM	401	O	PRO	A	61	8.143	-8.758	8.344	1.00	25.74
ATOM	402	CB	PRO	A	61	5.911	-8.860	10.332	1.00	14.30
ATOM	403	CG	PRO	A	61	5.880	-8.514	11.784	1.00	13.62
ATOM	404	CD	PRO	A	61	6.723	-9.417	12.576	1.00	12.29
ATOM	405	N	TYR	A	62	9.162	-8.257	10.292	1.00	21.56
ATOM	406	CA	TYR	A	62	9.973	-7.242	9.674	1.00	17.07
ATOM	407	C	TYR	A	62	11.133	-7.907	9.047	1.00	18.73
ATOM	408	O	TYR	A	62	12.132	-8.213	9.691	1.00	22.39
ATOM	409	CB	TYR	A	62	10.504	-6.401	10.803	1.00	17.51
ATOM	410	CG	TYR	A	62	11.461	-5.421	10.236	1.00	15.23
ATOM	411	CD1	TYR	A	62	11.343	-4.920	9.032	1.00	17.79
ATOM	412	CD2	TYR	A	62	12.465	-4.971	10.969	1.00	19.09
ATOM	413	CE1	TYR	A	62	12.206	-3.997	8.506	1.00	19.28
ATOM	414	CE2	TYR	A	62	13.438	-4.101	10.490	1.00	25.40
ATOM	415	CZ	TYR	A	62	13.327	-3.571	9.186	1.00	20.95
ATOM	416	OH	TYR	A	62	14.320	-2.649	8.791	1.00	14.70
ATOM	417	N	ASP	A	63	10.998	-8.419	7.816	1.00	19.47
ATOM	418	CA	ASP	A	63	12.137	-9.011	7.081	1.00	17.52
ATOM	419	C	ASP	A	63	13.027	-7.973	6.453	1.00	17.97
ATOM	420	O	ASP	A	63	13.628	-8.442	5.512	1.00	14.94
ATOM	421	CB	ASP	A	63	11.474	-9.873	6.015	1.00	17.16
ATOM	422	CG	ASP	A	63	10.563	-9.136	5.096	1.00	27.75
ATOM	423	OD1	ASP	A	63	10.049	-8.030	5.281	1.00	34.11
ATOM	424	OD2	ASP	A	63	10.300	-9.635	4.002	1.00	44.13
ATOM	425	N	ALA	A	64	13.089	-6.685	6.584	1.00	15.36
ATOM	426	CA	ALA	A	64	14.054	-5.725	6.098	1.00	17.14
ATOM	427	C	ALA	A	64	14.118	-5.780	4.589	1.00	21.10
ATOM	428	O	ALA	A	64	15.193	-5.861	3.968	1.00	23.12
ATOM	429	CB	ALA	A	64	15.458	-5.861	6.646	1.00	20.45
ATOM	430	N	ALA	A	65	12.946	-6.009	4.006	1.00	22.21
ATOM	431	CA	ALA	A	65	12.817	-6.072	2.565	1.00	21.81

ATOM	432	C	ALA	A	65	13.143	-4.857	1.745	1.00	21.76
ATOM	433	O	ALA	A	65	12.855	-3.801	-2.229	1.00	23.60
ATOM	434	CB	ALA	A	65	11.384	-6.390	2.364	1.00	17.31
ATOM	435	N	LEU	A	66	13.401	-4.866	0.402	1.00	21.48
ATOM	436	CA	LEU	A	66	13.763	-3.581	-0.216	1.00	13.20
ATOM	437	C	LEU	A	66	12.469	-2.913	-0.452	1.00	13.90
ATOM	438	O	LEU	A	66	12.548	-1.767	-0.197	1.00	11.85
ATOM	439	CB	LEU	A	66	14.593	-3.602	-1.470	1.00	3.92
ATOM	440	CG	LEU	A	66	15.891	-4.308	-1.191	1.00	9.05
ATOM	441	CD1	LEU	A	66	16.509	-4.725	-2.438	1.00	12.78
ATOM	442	CD2	LEU	A	66	16.569	-3.119	-0.580	1.00	13.44
ATOM	443	N	ALA	A	67	11.413	-3.625	-0.801	1.00	14.94
ATOM	444	CA	ALA	A	67	10.253	-2.759	-1.277	1.00	12.42
ATOM	445	C	ALA	A	67	9.626	-1.879	-0.224	1.00	14.21
ATOM	446	O	ALA	A	67	9.218	-0.818	-0.643	1.00	14.29
ATOM	447	CB	ALA	A	67	9.089	-3.588	-1.781	1.00	3.90
ATOM	448	N	THR	A	68	9.494	-2.409	1.006	1.00	12.11
ATOM	449	CA	THR	A	68	8.780	-1.647	1.997	1.00	11.77
ATOM	450	C	THR	A	68	9.242	-0.214	2.219	1.00	13.05
ATOM	451	O	THR	A	68	8.597	0.683	2.766	1.00	11.13
ATOM	452	CB	THR	A	68	8.892	-2.488	3.241	1.00	13.93
ATOM	453	OG1	THR	A	68	10.145	-3.150	3.224	1.00	27.44
ATOM	454	CG2	THR	A	68	7.783	-3.459	3.087	1.00	13.39
ATOM	455	N	ASN	A	69	10.450	-0.057	1.808	1.00	7.59
ATOM	456	CA	ASN	A	69	11.020	1.236	1.791	1.00	8.76
ATOM	457	C	ASN	A	69	10.095	2.165	1.047	1.00	10.28
ATOM	458	O	ASN	A	69	9.950	3.345	1.305	1.00	5.30
ATOM	459	CB	ASN	A	69	12.461	1.251	1.231	1.00	5.54
ATOM	460	CG	ASN	A	69	13.374	1.207	2.398	1.00	15.08
ATOM	461	OD1	ASN	A	69	13.307	2.124	3.275	1.00	31.90
ATOM	462	ND2	ASN	A	69	14.048	0.099	2.360	1.00	4.51
ATOM	463	N	PHE	A	70	9.390	1.656	0.079	1.00	19.09
ATOM	464	CA	PHE	A	70	8.552	2.619	-0.631	1.00	21.80
ATOM	465	C	PHE	A	70	7.157	2.836	-0.123	1.00	23.36
ATOM	466	O	PHE	A	70	6.509	3.717	-0.724	1.00	25.74
ATOM	467	CB	PHE	A	70	8.547	2.386	-2.082	1.00	17.38
ATOM	468	CG	PHE	A	70	9.870	2.360	-2.770	1.00	15.72
ATOM	469	CD1	PHE	A	70	10.080	3.430	-3.576	1.00	5.15
ATOM	470	CD2	PHE	A	70	10.702	1.245	-2.497	1.00	7.61
ATOM	471	CE1	PHE	A	70	11.268	3.330	-4.191	1.00	16.05
ATOM	472	CE2	PHE	A	70	11.913	1.267	-3.168	1.00	22.23
ATOM	473	CZ	PHE	A	70	12.199	2.314	-4.016	1.00	9.57
ATOM	474	N	LEU	A	71	6.765	2.246	1.034	1.00	25.53
ATOM	475	CA	LEU	A	71	5.506	2.725	1.599	1.00	24.24
ATOM	476	C	LEU	A	71	5.649	4.037	2.343	1.00	27.91
ATOM	477	O	LEU	A	71	6.694	4.521	2.750	1.00	28.86
ATOM	478	CB	LEU	A	71	5.150	1.635	2.535	1.00	19.99
ATOM	479	CG	LEU	A	71	5.003	0.342	1.873	1.00	16.09

ATOM	480	CD1	LEU	A	71	4.879	-0.764	2.885	1.00	18.12
ATOM	481	CD2	LEU	A	71	3.786	0.546	1.000	1.00	18.24
ATOM	482	N	PRO	A	72	4.535	4.663	2.529	1.00	33.01
ATOM	483	CA	PRO	A	72	4.389	5.888	3.311	1.00	34.96
ATOM	484	C	PRO	A	72	4.865	5.590	4.778	1.00	32.90
ATOM	485	O	PRO	A	72	4.619	4.512	5.331	1.00	28.55
ATOM	486	CB	PRO	A	72	2.983	6.453	3.095	1.00	32.98
ATOM	487	CG	PRO	A	72	2.224	5.189	2.827	1.00	30.36
ATOM	488	CD	PRO	A	72	3.188	4.093	2.380	1.00	33.56
ATOM	489	N	ARG	A	73	5.601	6.610	5.221	1.00	27.54
ATOM	490	CA	ARG	A	73	6.325	6.547	6.408	1.00	25.42
ATOM	491	C	ARG	A	73	7.613	5.755	6.321	1.00	21.78
ATOM	492	O	ARG	A	73	8.360	5.950	7.304	1.00	29.61
ATOM	493	CB	ARG	A	73	5.469	5.978	7.549	1.00	24.29
ATOM	494	CG	ARG	A	73	4.575	6.998	8.155	1.00	23.47
ATOM	495	CD	ARG	A	73	3.818	6.793	9.360	1.00	29.73
ATOM	496	NE	ARG	A	73	3.222	5.460	9.392	1.00	36.30
ATOM	497	CZ	ARG	A	73	2.891	5.312	10.713	1.00	42.26
ATOM	498	NH1	ARG	A	73	3.145	6.288	11.555	1.00	26.57
ATOM	499	NH2	ARG	A	73	2.320	4.144	10.883	1.00	39.03
ATOM	500	N	GLY	A	74	7.868	4.909	5.326	1.00	8.42
ATOM	501	CA	GLY	A	74	9.120	4.291	5.332	1.00	5.06
ATOM	502	C	GLY	A	74	9.243	2.858	5.508	1.00	12.74
ATOM	503	O	GLY	A	74	10.256	2.286	5.317	1.00	16.46
ATOM	504	N	THR	A	75	8.145	2.321	5.906	1.00	12.82
ATOM	505	CA	THR	A	75	8.036	0.869	6.008	1.00	11.14
ATOM	506	C	THR	A	75	6.625	0.428	6.134	1.00	10.64
ATOM	507	O	THR	A	75	5.757	1.231	5.949	1.00	9.36
ATOM	508	CB	THR	A	75	8.843	0.398	7.219	1.00	6.97
ATOM	509	OG1	THR	A	75	8.938	-0.950	7.125	1.00	5.64
ATOM	510	CG2	THR	A	75	8.108	0.865	8.603	1.00	6.30
ATOM	511	N	SER	A	76	6.409	-0.858	6.259	1.00	10.07
ATOM	512	CA	SER	A	76	5.061	-1.384	6.354	1.00	13.33
ATOM	513	C	SER	A	76	4.405	-1.163	7.747	1.00	21.87
ATOM	514	O	SER	A	76	5.228	-1.102	8.679	1.00	24.22
ATOM	515	CB	SER	A	76	5.030	-2.832	6.083	1.00	4.81
ATOM	516	OG	SER	A	76	5.327	-3.664	7.107	1.00	16.98
ATOM	517	N	GLN	A	77	3.082	-1.100	7.911	1.00	24.90
ATOM	518	CA	GLN	A	77	2.454	-1.020	9.166	1.00	23.85
ATOM	519	C	GLN	A	77	2.643	-2.236	10.015	1.00	19.58
ATOM	520	O	GLN	A	77	2.908	-2.140	11.203	1.00	15.15
ATOM	521	CB	GLN	A	77	0.983	-0.703	9.217	1.00	32.64
ATOM	522	CG	GLN	A	77	0.567	-0.580	10.642	1.00	49.56
ATOM	523	CD	GLN	A	77	0.689	0.785	11.194	1.00	65.91
ATOM	524	OE1	GLN	A	77	0.956	0.869	12.356	1.00	66.06
ATOM	525	NE2	GLN	A	77	0.481	1.750	10.350	1.00	68.91
ATOM	526	N	ALA	A	78	2.754	-3.376	9.402	1.00	15.90
ATOM	527	CA	ALA	A	78	3.071	-4.577	10.073	1.00	19.47

ATOM	528	C	ALA	A	78	4.381	-4.332	10.819	1.00	24.48
ATOM	529	O	ALA	A	78	4.389	-4.729	11.983	1.00	26.91
ATOM	530	CB	ALA	A	78	3.390	-5.808	9.336	1.00	17.23
ATOM	531	N	ASN	A	79	5.350	-3.863	10.093	1.00	21.58
ATOM	532	CA	ASN	A	79	6.602	-3.576	10.774	1.00	20.62
ATOM	533	C	ASN	A	79	6.480	-2.673	11.969	1.00	20.93
ATOM	534	O	ASN	A	79	6.975	-2.944	13.053	1.00	15.52
ATOM	535	CB	ASN	A	79	7.474	-3.069	9.670	1.00	24.79
ATOM	536	CG	ASN	A	79	7.933	-4.238	8.824	1.00	28.76
ATOM	537	OD1	ASN	A	79	7.867	-5.439	9.091	1.00	25.30
ATOM	538	ND2	ASN	A	79	8.488	-3.891	7.660	1.00	24.90
ATOM	539	N	ILE	A	80	5.731	-1.611	11.936	1.00	15.93
ATOM	540	CA	ILE	A	80	5.586	-0.574	12.924	1.00	17.00
ATOM	541	C	ILE	A	80	4.925	-1.187	14.118	1.00	20.63
ATOM	542	O	ILE	A	80	5.234	-0.939	15.264	1.00	18.79
ATOM	543	CB	ILE	A	80	4.756	0.629	12.436	1.00	11.98
ATOM	544	CG1	ILE	A	80	5.627	1.124	11.297	1.00	9.50
ATOM	545	CG2	ILE	A	80	4.379	1.728	13.354	1.00	16.27
ATOM	546	CD1	ILE	A	80	5.007	2.071	10.424	1.00	8.15
ATOM	547	N	ASP	A	81	4.017	-2.019	13.708	1.00	19.21
ATOM	548	CA	ASP	A	81	3.304	-2.778	14.728	1.00	15.15
ATOM	549	C	ASP	A	81	4.147	-3.711	15.510	1.00	15.77
ATOM	550	O	ASP	A	81	4.084	-3.697	16.695	1.00	15.82
ATOM	551	CB	ASP	A	81	2.291	-3.438	13.868	1.00	26.36
ATOM	552	CG	ASP	A	81	1.065	-2.530	13.790	1.00	23.71
ATOM	553	OD1	ASP	A	81	1.105	-1.355	14.226	1.00	14.33
ATOM	554	OD2	ASP	A	81	0.061	-3.125	13.222	1.00	33.05
ATOM	555	N	GLU	A	82	5.148	-4.447	15.096	1.00	16.07
ATOM	556	CA	GLU	A	82	5.984	-5.318	15.882	1.00	14.77
ATOM	557	C	GLU	A	82	6.839	-4.355	16.667	1.00	19.33
ATOM	558	O	GLU	A	82	7.315	-4.708	17.752	1.00	23.58
ATOM	559	CB	GLU	A	82	6.998	-6.031	15.064	1.00	13.20
ATOM	560	CG	GLU	A	82	7.792	-7.239	15.476	1.00	23.09
ATOM	561	CD	GLU	A	82	6.767	-8.114	16.185	1.00	29.68
ATOM	562	OE1	GLU	A	82	5.666	-7.670	16.403	1.00	26.63
ATOM	563	OE2	GLU	A	82	7.273	-9.181	16.411	1.00	33.08
ATOM	564	N	GLY	A	83	7.228	-3.227	16.199	1.00	16.79
ATOM	565	CA	GLY	A	83	8.033	-2.428	17.140	1.00	17.32
ATOM	566	C	GLY	A	83	7.238	-2.018	18.366	1.00	17.54
ATOM	567	O	GLY	A	83	7.561	-2.103	19.528	1.00	15.06
ATOM	568	N	LYS	A	84	6.093	-1.408	18.114	1.00	18.72
ATOM	569	CA	LYS	A	84	5.050	-1.146	19.096	1.00	16.90
ATOM	570	C	LYS	A	84	4.893	-2.337	20.057	1.00	17.74
ATOM	571	O	LYS	A	84	4.962	-2.265	21.295	1.00	14.31
ATOM	572	CB	LYS	A	84	3.799	-0.872	18.307	1.00	14.62
ATOM	573	CG	LYS	A	84	3.535	0.565	18.291	1.00	19.30
ATOM	574	CD	LYS	A	84	2.787	1.013	17.044	1.00	34.24
ATOM	575	CE	LYS	A	84	1.568	1.902	17.337	1.00	37.70

ATOM	576	NZ	LYS	A	84	0.346	1.226	16.827	1.00	48.42
ATOM	577	N	ARG	A	85	4.617	-3.506	19.519	1.00	18.50
ATOM	578	CA	ARG	A	85	4.583	-4.705	20.280	1.00	19.04
ATOM	579	C	ARG	A	85	5.677	-4.733	21.308	1.00	19.63
ATOM	580	O	ARG	A	85	5.442	-5.192	22.383	1.00	19.24
ATOM	581	CB	ARG	A	85	4.740	-5.979	19.464	1.00	14.74
ATOM	582	CG	ARG	A	85	3.843	-7.094	19.887	1.00	8.85
ATOM	583	CD	ARG	A	85	4.146	-8.554	19.705	1.00	7.20
ATOM	584	NE	ARG	A	85	5.483	-8.898	19.194	1.00	20.30
ATOM	585	CZ	ARG	A	85	6.170	-9.705	19.899	1.00	18.19
ATOM	586	NH1	ARG	A	85	5.627	-10.161	21.040	1.00	34.03
ATOM	587	NH2	ARG	A	85	7.345	-9.979	19.555	1.00	15.36
ATOM	588	N	LEU	A	86	6.901	-4.586	20.956	1.00	22.21
ATOM	589	CA	LEU	A	86	8.006	-4.792	21.873	1.00	20.94
ATOM	590	C	LEU	A	86	8.044	-3.637	22.803	1.00	20.73
ATOM	591	O	LEU	A	86	8.155	-3.970	23.925	1.00	22.18
ATOM	592	CB	LEU	A	86	9.333	-4.932	21.168	1.00	6.67
ATOM	593	CG	LEU	A	86	9.358	-6.241	20.282	1.00	11.45
ATOM	594	CD1	LEU	A	86	10.546	-6.054	19.287	1.00	18.60
ATOM	595	CD2	LEU	A	86	9.362	-7.516	21.020	1.00	5.17
ATOM	596	N	PHE	A	87	7.700	-2.446	22.529	1.00	16.79
ATOM	597	CA	PHE	A	87	7.850	-1.416	23.492	1.00	18.21
ATOM	598	C	PHE	A	87	6.939	-1.805	24.618	1.00	26.51
ATOM	599	O	PHE	A	87	7.082	-1.565	25.839	1.00	30.36
ATOM	600	CB	PHE	A	87	7.498	-0.118	22.846	1.00	15.81
ATOM	601	CG	PHE	A	87	8.661	0.503	22.128	1.00	22.72
ATOM	602	CD1	PHE	A	87	9.625	1.163	22.795	1.00	25.90
ATOM	603	CD2	PHE	A	87	8.800	0.446	20.774	1.00	24.19
ATOM	604	CE1	PHE	A	87	10.699	1.781	22.220	1.00	26.46
ATOM	605	CE2	PHE	A	87	9.871	0.991	20.153	1.00	29.24
ATOM	606	CZ	PHE	A	87	10.827	1.669	20.849	1.00	20.81
ATOM	607	N	ALA	A	88	5.862	-2.422	24.266	1.00	29.15
ATOM	608	CA	ALA	A	88	4.772	-2.699	25.195	1.00	22.92
ATOM	609	C	ALA	A	88	5.186	-3.837	26.068	1.00	22.03
ATOM	610	O	ALA	A	88	4.974	-3.879	27.284	1.00	27.02
ATOM	611	CB	ALA	A	88	3.551	-2.803	24.299	1.00	22.13
ATOM	612	N	LEU	A	89	5.649	-4.897	25.531	1.00	19.16
ATOM	613	CA	LEU	A	89	6.188	-6.032	26.208	1.00	19.29
ATOM	614	C	LEU	A	89	7.250	-5.507	27.133	1.00	22.06
ATOM	615	O	LEU	A	89	7.449	-6.050	28.177	1.00	20.49
ATOM	616	CB	LEU	A	89	7.021	-6.863	25.221	1.00	18.41
ATOM	617	CG	LEU	A	89	7.477	-8.167	25.834	1.00	20.45
ATOM	618	CD1	LEU	A	89	6.326	-8.707	26.627	1.00	17.22
ATOM	619	CD2	LEU	A	89	8.060	-9.057	24.769	1.00	18.83
ATOM	620	N	ALA	A	90	8.124	-4.644	26.722	1.00	22.80
ATOM	621	CA	ALA	A	90	9.027	-4.137	27.701	1.00	24.14
ATOM	622	C	ALA	A	90	8.237	-3.488	28.849	1.00	23.63
ATOM	623	O	ALA	A	90	8.414	-3.835	30.071	1.00	22.73

ATOM	624	CB	ALA	A	90	10.080	-3.253	27.139	1.00	7.74
ATOM	625	N	ASN	A	91	7.457	-2.445	28.732	1.00	25.45
ATOM	626	CA	ASN	A	91	6.665	-1.979	29.870	1.00	27.25
ATOM	627	C	ASN	A	91	5.847	-2.996	30.656	1.00	30.97
ATOM	628	O	ASN	A	91	5.346	-2.884	31.768	1.00	27.64
ATOM	629	CB	ASN	A	91	5.560	-1.206	29.125	1.00	29.14
ATOM	630	CG	ASN	A	91	4.946	-0.345	30.216	1.00	31.73
ATOM	631	OD1	ASN	A	91	3.845	-0.692	30.645	1.00	46.76
ATOM	632	ND2	ASN	A	91	5.641	0.629	30.643	1.00	29.03
ATOM	633	N	GLN	A	92	5.369	-4.008	29.969	1.00	35.37
ATOM	634	CA	GLN	A	92	4.702	-5.141	30.591	1.00	35.55
ATOM	635	C	GLN	A	92	5.619	-6.072	31.352	1.00	34.28
ATOM	636	O	GLN	A	92	5.227	-6.519	32.440	1.00	39.47
ATOM	637	CB	GLN	A	92	3.866	-5.903	29.573	1.00	54.94
ATOM	638	CG	GLN	A	92	2.689	-6.698	30.142	1.00	78.63
ATOM	639	CD	GLN	A	92	2.806	-8.167	29.805	1.00	93.87
ATOM	640	OE1	GLN	A	92	3.597	-8.840	30.475	1.00	96.99
ATOM	641	NE2	GLN	A	92	2.083	-8.696	28.824	1.00	97.81
ATOM	642	N	LYS	A	93	6.859	-6.403	31.050	1.00	31.97
ATOM	643	CA	LYS	A	93	7.675	-7.204	31.972	1.00	25.22
ATOM	644	C	LYS	A	93	8.381	-6.298	33.015	1.00	24.68
ATOM	645	O	LYS	A	93	8.716	-6.793	34.075	1.00	32.13
ATOM	646	CB	LYS	A	93	8.673	-7.980	31.148	1.00	10.86
ATOM	647	CG	LYS	A	93	8.225	-8.963	30.159	1.00	24.26
ATOM	648	CD	LYS	A	93	9.362	-9.966	29.986	1.00	21.96
ATOM	649	CE	LYS	A	93	9.093	-10.718	28.658	1.00	23.78
ATOM	650	NZ	LYS	A	93	10.084	-11.805	28.300	1.00	25.87
ATOM	651	N	CYS	A	94	8.752	-5.096	32.774	1.00	16.62
ATOM	652	CA	CYS	A	94	9.752	-4.412	33.480	1.00	18.95
ATOM	653	C	CYS	A	94	9.512	-2.936	33.537	1.00	24.83
ATOM	654	O	CYS	A	94	10.184	-2.017	33.150	1.00	26.80
ATOM	655	CB	CYS	A	94	11.147	-4.691	32.911	1.00	3.14
ATOM	656	SG	CYS	A	94	11.618	-6.437	32.882	1.00	25.28
ATOM	657	N	PRO	A	95	8.403	-2.561	34.086	1.00	26.08
ATOM	658	CA	PRO	A	95	7.891	-1.202	33.878	1.00	26.11
ATOM	659	C	PRO	A	95	8.960	-0.259	34.299	1.00	27.32
ATOM	660	O	PRO	A	95	8.776	0.966	34.108	1.00	29.08
ATOM	661	CB	PRO	A	95	6.609	-1.090	34.747	1.00	20.75
ATOM	662	CG	PRO	A	95	6.587	-2.421	35.322	1.00	19.04
ATOM	663	CD	PRO	A	95	7.363	-3.461	34.509	1.00	22.55
ATOM	664	N	ASN	A	96	9.836	-0.776	35.193	1.00	31.44
ATOM	665	CA	ASN	A	96	10.559	0.274	35.966	1.00	35.38
ATOM	666	C	ASN	A	96	11.891	0.476	35.353	1.00	33.83
ATOM	667	O	ASN	A	96	12.599	1.359	35.684	1.00	33.31
ATOM	668	CB	ASN	A	96	10.558	-0.099	37.429	1.00	53.70
ATOM	669	CG	ASN	A	96	9.238	0.342	38.026	1.00	61.69
ATOM	670	OD1	ASN	A	96	8.758	1.432	37.706	1.00	64.33
ATOM	671	ND2	ASN	A	96	8.676	-0.526	38.861	1.00	67.25

ATOM	672	N	THR	A	97	12.287	-0.409	34.507	1.00	30.32
ATOM	673	CA	THR	A	97	13.519	-0.367	33.794	1.00	22.83
ATOM	674	C	THR	A	97	13.404	0.493	32.534	1.00	22.44
ATOM	675	O	THR	A	97	12.446	0.779	31.816	1.00	21.14
ATOM	676	CB	THR	A	97	13.835	-1.851	33.705	1.00	25.87
ATOM	677	OG1	THR	A	97	14.602	-1.915	32.528	1.00	38.91
ATOM	678	CG2	THR	A	97	12.769	-2.901	33.621	1.00	24.22
ATOM	679	N	PRO	A	98	14.393	1.415	32.408	1.00	20.59
ATOM	680	CA	PRO	A	98	14.513	2.292	31.254	1.00	18.15
ATOM	681	C	PRO	A	98	14.882	1.494	29.978	1.00	16.07
ATOM	682	O	PRO	A	98	15.622	0.462	29.934	1.00	17.19
ATOM	683	CB	PRO	A	98	15.563	3.339	31.676	1.00	14.55
ATOM	684	CG	PRO	A	98	16.270	2.646	32.699	1.00	12.29
ATOM	685	CD	PRO	A	98	15.735	1.331	33.046	1.00	12.02
ATOM	686	N	VAL	A	99	14.322	2.107	28.940	1.00	13.81
ATOM	687	CA	VAL	A	99	14.225	1.544	27.632	1.00	14.02
ATOM	688	C	VAL	A	99	14.956	2.407	26.663	1.00	10.66
ATOM	689	O	VAL	A	99	14.716	3.679	26.712	1.00	6.90
ATOM	690	CB	VAL	A	99	12.673	1.343	27.335	1.00	2.87
ATOM	691	CG1	VAL	A	99	12.666	1.272	25.872	1.00	17.40
ATOM	692	CG2	VAL	A	99	12.442	-0.111	27.744	1.00	5.75
ATOM	693	N	VAL	A	100	15.885	1.776	25.861	1.00	6.45
ATOM	694	CA	VAL	A	100	16.525	2.755	24.900	1.00	9.61
ATOM	695	C	VAL	A	100	16.389	2.159	23.561	1.00	10.79
ATOM	696	O	VAL	A	100	16.256	0.973	23.477	1.00	9.11
ATOM	697	CB	VAL	A	100	17.877	3.260	25.197	1.00	8.05
ATOM	698	CG1	VAL	A	100	17.824	4.252	26.336	1.00	6.05
ATOM	699	CG2	VAL	A	100	18.853	2.053	25.591	1.00	6.68
ATOM	700	N	ALA	A	101	16.277	2.928	22.511	1.00	13.14
ATOM	701	CA	ALA	A	101	16.127	2.266	21.183	1.00	15.67
ATOM	702	C	ALA	A	101	17.065	2.747	20.053	1.00	12.08
ATOM	703	O	ALA	A	101	17.261	4.042	19.907	1.00	11.16
ATOM	704	CB	ALA	A	101	14.685	2.609	20.812	1.00	6.57
ATOM	705	N	GLY	A	102	17.218	1.787	19.099	1.00	7.53
ATOM	706	CA	GLY	A	102	17.949	2.415	17.939	1.00	7.10
ATOM	707	C	GLY	A	102	17.477	1.803	16.744	1.00	7.27
ATOM	708	O	GLY	A	102	17.102	0.621	16.878	1.00	10.83
ATOM	709	N	GLY	A	103	17.706	2.407	15.648	1.00	7.80
ATOM	710	CA	GLY	A	103	17.446	1.745	14.356	1.00	5.33
ATOM	711	C	GLY	A	103	18.303	2.211	13.180	1.00	7.56
ATOM	712	O	GLY	A	103	18.785	3.340	13.227	1.00	6.88
ATOM	713	N	TYR	A	104	18.490	1.387	12.139	1.00	7.09
ATOM	714	CA	TYR	A	104	19.392	1.682	11.069	1.00	5.99
ATOM	715	C	TYR	A	104	18.705	1.614	9.705	1.00	9.47
ATOM	716	O	TYR	A	104	18.115	0.638	9.441	1.00	6.46
ATOM	717	CB	TYR	A	104	20.592	0.797	11.079	1.00	5.40
ATOM	718	CG	TYR	A	104	21.436	1.078	9.876	1.00	8.05
ATOM	719	CD1	TYR	A	104	21.708	2.302	9.352	1.00	5.91

ATOM	720	CD2	TYR	A	104	21.961	-0.044	9.172	1.00	6.85
ATOM	721	CE1	TYR	A	104	22.447	2.513	8.186	1.00	5.61
ATOM	722	CE2	TYR	A	104	22.751	0.052	8.072	1.00	7.49
ATOM	723	CZ	TYR	A	104	22.972	1.377	7.608	1.00	11.08
ATOM	724	OH	TYR	A	104	23.795	1.509	6.479	1.00	14.32
ATOM	725	N	SER	A	105	18.939	2.975	8.852	1.00	18.39
ATOM	726	CA	SER	A	105	18.190	2.854	7.601	1.00	9.66
ATOM	727	C	SER	A	105	16.763	2.370	7.722	1.00	6.10
ATOM	728	O	SER	A	105	16.090	3.304	8.077	1.00	5.63
ATOM	729	CB	SER	A	105	19.124	2.159	6.607	1.00	8.55
ATOM	730	OG	SER	A	105	18.553	1.685	5.463	1.00	24.30
ATOM	731	N	GLN	A	106	16.241	1.405	7.079	1.00	9.93
ATOM	732	CA	GLN	A	106	14.759	1.316	7.002	1.00	8.25
ATOM	733	C	GLN	A	106	14.453	1.089	8.473	1.00	8.51
ATOM	734	O	GLN	A	106	13.470	1.683	8.862	1.00	6.31
ATOM	735	CB	GLN	A	106	14.239	0.393	5.940	1.00	7.45
ATOM	736	CG	GLN	A	106	13.184	-0.528	6.465	1.00	18.04
ATOM	737	CD	GLN	A	106	12.228	-1.220	5.581	1.00	16.87
ATOM	738	OE1	GLN	A	106	11.024	-1.180	5.492	1.00	17.59
ATOM	739	NE2	GLN	A	106	12.643	-2.032	4.713	1.00	8.32
ATOM	740	N	GLY	A	107	15.269	0.310	9.172	1.00	7.13
ATOM	741	CA	GLY	A	107	15.190	0.159	10.606	1.00	4.61
ATOM	742	C	GLY	A	107	15.048	1.472	11.356	1.00	8.27
ATOM	743	O	GLY	A	107	14.219	1.511	12.290	1.00	6.52
ATOM	744	N	ALA	A	108	15.653	2.637	11.033	1.00	6.44
ATOM	745	CA	ALA	A	108	15.266	3.864	11.641	1.00	7.41
ATOM	746	C	ALA	A	108	13.813	4.346	11.471	1.00	11.76
ATOM	747	O	ALA	A	108	13.150	4.914	12.298	1.00	12.64
ATOM	748	CB	ALA	A	108	16.121	5.006	11.170	1.00	13.93
ATOM	749	N	ALA	A	109	13.321	4.312	10.267	1.00	9.78
ATOM	750	CA	ALA	A	109	12.056	4.685	9.861	1.00	10.47
ATOM	751	C	ALA	A	109	11.093	3.858	10.727	1.00	12.32
ATOM	752	O	ALA	A	109	10.016	4.391	11.035	1.00	14.67
ATOM	753	CB	ALA	A	109	12.035	4.173	8.456	1.00	10.24
ATOM	754	N	LEU	A	110	11.259	2.690	11.077	1.00	4.34
ATOM	755	CA	LEU	A	110	10.458	1.760	11.783	1.00	11.71
ATOM	756	C	LEU	A	110	10.305	2.253	13.203	1.00	15.26
ATOM	757	O	LEU	A	110	9.298	2.672	13.685	1.00	18.07
ATOM	758	CB	LEU	A	110	11.031	0.319	11.634	1.00	7.52
ATOM	759	CG	LEU	A	110	10.247	-0.801	12.258	1.00	8.41
ATOM	760	CD1	LEU	A	110	10.685	-2.233	11.862	1.00	7.17
ATOM	761	CD2	LEU	A	110	10.278	-0.659	13.783	1.00	5.25
ATOM	762	N	ILE	A	111	11.397	2.373	13.907	1.00	15.77
ATOM	763	CA	ILE	A	111	11.510	2.860	15.246	1.00	12.22
ATOM	764	C	ILE	A	111	11.027	4.255	15.234	1.00	9.39
ATOM	765	O	ILE	A	111	10.404	4.636	16.241	1.00	12.54
ATOM	766	CB	ILE	A	111	12.977	2.814	15.685	1.00	15.55
ATOM	767	CG1	ILE	A	111	13.222	1.279	15.805	1.00	14.19

ATOM	768	CG2	ILE	A	111	13.195	3.465	17.005	1.00	4.64
ATOM	769	CD1	ILE	A	111	12.410	0.887	17.002	1.00	14.88
ATOM	770	N	ALA	A	112	11.309	5.170	14.341	1.00	11.00
ATOM	771	CA	ALA	A	112	10.792	6.528	14.427	1.00	12.45
ATOM	772	C	ALA	A	112	9.266	6.455	14.308	1.00	15.59
ATOM	773	O	ALA	A	112	8.728	7.131	15.154	1.00	18.13
ATOM	774	CB	ALA	A	112	11.334	7.505	13.486	1.00	5.70
ATOM	775	N	ALA	A	113	8.575	5.572	13.587	1.00	12.85
ATOM	776	CA	ALA	A	113	7.167	5.512	13.557	1.00	15.39
ATOM	777	C	ALA	A	113	6.475	5.093	14.861	1.00	18.21
ATOM	778	O	ALA	A	113	5.498	5.750	15.226	1.00	14.59
ATOM	779	CB	ALA	A	113	6.678	4.562	12.500	1.00	17.63
ATOM	780	N	ALA	A	114	6.937	3.948	15.303	1.00	16.02
ATOM	781	CA	ALA	A	114	6.483	3.218	16.412	1.00	16.43
ATOM	782	C	ALA	A	114	6.578	4.114	17.643	1.00	22.20
ATOM	783	O	ALA	A	114	5.673	4.321	18.426	1.00	18.94
ATOM	784	CB	ALA	A	114	7.474	2.084	16.565	1.00	4.69
ATOM	785	N	VAL	A	115	7.722	4.836	17.744	1.00	22.46
ATOM	786	CA	VAL	A	115	7.855	5.499	19.064	1.00	20.88
ATOM	787	C	VAL	A	115	6.670	6.469	19.007	1.00	22.71
ATOM	788	O	VAL	A	115	6.136	6.761	20.057	1.00	22.05
ATOM	789	CB	VAL	A	115	9.279	6.090	19.137	1.00	19.61
ATOM	790	CG1	VAL	A	115	9.396	7.259	20.122	1.00	8.35
ATOM	791	CG2	VAL	A	115	10.245	5.016	19.562	1.00	13.91
ATOM	792	N	SER	A	116	6.467	7.085	17.828	1.00	23.59
ATOM	793	CA	SER	A	116	5.539	8.172	17.736	1.00	23.68
ATOM	794	C	SER	A	116	4.169	7.647	18.120	1.00	23.77
ATOM	795	O	SER	A	116	3.333	8.523	18.399	1.00	27.35
ATOM	796	CB	SER	A	116	5.522	8.865	16.376	1.00	25.21
ATOM	797	OG	SER	A	116	5.168	8.043	15.277	1.00	28.05
ATOM	798	N	GLU	A	117	3.859	6.397	18.004	1.00	18.83
ATOM	799	CA	GLU	A	117	2.491	6.020	18.238	1.00	22.21
ATOM	800	C	GLU	A	117	2.461	5.474	19.653	1.00	30.46
ATOM	801	O	GLU	A	117	1.487	4.773	19.863	1.00	35.72
ATOM	802	CB	GLU	A	117	1.977	4.902	17.343	1.00	21.63
ATOM	803	CG	GLU	A	117	2.167	5.219	15.897	1.00	26.41
ATOM	804	CD	GLU	A	117	1.560	4.424	14.814	1.00	34.01
ATOM	805	OE1	GLU	A	117	0.912	3.440	15.046	1.00	32.59
ATOM	806	OE2	GLU	A	117	1.750	4.833	13.659	1.00	44.62
ATOM	807	N	LEU	A	118	3.438	5.570	20.512	1.00	34.45
ATOM	808	CA	LEU	A	118	3.326	5.006	21.812	1.00	33.64
ATOM	809	C	LEU	A	118	2.681	6.110	22.633	1.00	41.75
ATOM	810	O	LEU	A	118	2.594	7.267	22.370	1.00	39.90
ATOM	811	CB	LEU	A	118	4.600	4.668	22.392	1.00	29.44
ATOM	812	CG	LEU	A	118	5.628	3.891	21.645	1.00	26.36
ATOM	813	CD1	LEU	A	118	6.921	3.840	22.379	1.00	27.53
ATOM	814	CD2	LEU	A	118	5.110	2.520	21.536	1.00	20.69
ATOM	815	N	SER	A	119	2.076	5.794	23.726	1.00	48.86

ATOM	816	CA	SER A 119	0.910	5.647	24.476	1.00	52.44
ATOM	817	C	SER A 119	1.212	6.063	25.866	1.00	52.57
ATOM	818	O	SER A 119	1.485	5.258	26.735	1.00	55.54
ATOM	819	CB	SER A 119	0.550	4.132	24.488	1.00	70.55
ATOM	820	OG	SER A 119	1.393	3.091	23.908	1.00	66.80
ATOM	821	N	GLY A 120	1.532	7.307	26.024	1.00	52.95
ATOM	822	CA	GLY A 120	1.910	7.761	27.382	1.00	53.35
ATOM	823	C	GLY A 120	2.944	7.109	28.291	1.00	49.09
ATOM	824	O	GLY A 120	4.086	7.617	28.358	1.00	49.66
ATOM	825	N	ALA A 121	2.526	6.129	29.102	1.00	42.97
ATOM	826	CA	ALA A 121	3.477	5.574	30.022	1.00	40.72
ATOM	827	C	ALA A 121	4.587	4.772	29.326	1.00	44.20
ATOM	828	O	ALA A 121	5.749	4.803	29.711	1.00	45.42
ATOM	829	CB	ALA A 121	2.965	4.542	30.903	1.00	36.34
ATOM	830	N	VAL A 122	4.122	4.035	28.312	1.00	41.15
ATOM	831	CA	VAL A 122	5.090	3.269	27.548	1.00	33.41
ATOM	832	C	VAL A 122	5.870	4.168	26.652	1.00	28.48
ATOM	833	O	VAL A 122	7.084	4.019	26.872	1.00	27.69
ATOM	834	CB	VAL A 122	4.424	2.056	26.952	1.00	30.22
ATOM	835	CG1	VAL A 122	2.924	1.997	27.098	1.00	28.03
ATOM	836	CG2	VAL A 122	4.891	1.836	25.551	1.00	23.22
ATOM	837	N	LYS A 123	5.424	5.310	26.177	1.00	23.16
ATOM	838	CA	LYS A 123	6.354	6.314	25.661	1.00	23.11
ATOM	839	C	LYS A 123	7.403	6.783	26.661	1.00	25.28
ATOM	840	O	LYS A 123	8.524	7.224	26.449	1.00	29.01
ATOM	841	CB	LYS A 123	5.561	7.502	25.100	1.00	23.54
ATOM	842	CG	LYS A 123	6.171	8.573	24.277	1.00	26.71
ATOM	843	CD	LYS A 123	5.400	9.775	23.888	1.00	43.07
ATOM	844	CE	LYS A 123	4.953	9.783	22.461	1.00	59.59
ATOM	845	NZ	LYS A 123	3.518	9.637	22.099	1.00	67.50
ATOM	846	N	GLU A 124	6.977	6.991	27.918	1.00	27.95
ATOM	847	CA	GLU A 124	7.845	7.700	28.863	1.00	27.29
ATOM	848	C	GLU A 124	8.910	6.706	29.243	1.00	25.21
ATOM	849	O	GLU A 124	9.993	7.165	29.769	1.00	21.21
ATOM	850	CB	GLU A 124	6.986	8.351	29.927	1.00	40.13
ATOM	851	CG	GLU A 124	7.588	8.609	31.295	1.00	57.40
ATOM	852	CD	GLU A 124	8.530	9.814	31.247	1.00	66.99
ATOM	853	OE1	GLU A 124	9.619	9.751	31.902	1.00	70.44
ATOM	854	OE2	GLU A 124	7.949	10.652	30.502	1.00	73.84
ATOM	855	N	GLN A 125	8.656	5.393	29.058	1.00	19.93
ATOM	856	CA	GLN A 125	9.761	4.509	29.546	1.00	17.98
ATOM	857	C	GLN A 125	10.865	4.556	28.521	1.00	24.28
ATOM	858	O	GLN A 125	11.964	4.107	28.815	1.00	21.47
ATOM	859	CB	GLN A 125	9.225	3.178	29.844	1.00	9.13
ATOM	860	CG	GLN A 125	9.901	2.001	30.299	1.00	9.05
ATOM	861	CD	GLN A 125	9.211	0.719	30.129	1.00	19.33
ATOM	862	OE1	GLN A 125	8.190	0.703	29.466	1.00	28.52
ATOM	863	NE2	GLN A 125	9.662	-0.396	30.684	1.00	13.34

ATOM	864	N	VAL A 126	10.593	5.188	27.319	1.00	25.30
ATOM	865	CA	VAL A 126	11.738	5.124	26.361	1.00	22.55
ATOM	866	C	VAL A 126	12.546	6.334	26.614	1.00	17.55
ATOM	867	O	VAL A 126	12.109	7.408	26.329	1.00	12.79
ATOM	868	CB	VAL A 126	11.227	4.560	25.022	1.00	23.76
ATOM	869	CG1	VAL A 126	9.706	4.686	24.946	1.00	23.77
ATOM	870	CG2	VAL A 126	11.795	5.081	23.743	1.00	23.81
ATOM	871	N	LYS A 127	13.726	6.233	27.264	1.00	16.41
ATOM	872	CA	LYS A 127	14.462	7.494	27.639	1.00	18.18
ATOM	873	C	LYS A 127	15.239	8.063	26.488	1.00	18.49
ATOM	874	O	LYS A 127	15.812	9.103	26.680	1.00	18.99
ATOM	875	CB	LYS A 127	15.401	7.148	28.792	1.00	20.81
ATOM	876	CG	LYS A 127	14.770	6.110	29.713	1.00	21.99
ATOM	877	CD	LYS A 127	13.435	6.726	30.064	1.00	33.86
ATOM	878	CE	LYS A 127	12.779	6.612	31.399	1.00	32.17
ATOM	879	NZ	LYS A 127	12.279	7.863	31.993	1.00	45.34
ATOM	880	N	GLY A 128	15.522	7.281	25.416	1.00	20.56
ATOM	881	CA	GLY A 128	16.280	7.948	24.306	1.00	20.72
ATOM	882	C	GLY A 128	16.358	7.104	23.063	1.00	17.71
ATOM	883	O	GLY A 128	16.168	5.901	23.226	1.00	16.66
ATOM	884	N	VAL A 129	16.451	7.725	21.892	1.00	16.16
ATOM	885	CA	VAL A 129	16.497	6.872	20.691	1.00	13.82
ATOM	886	C	VAL A 129	17.519	7.371	19.719	1.00	8.35
ATOM	887	O	VAL A 129	17.602	8.553	19.556	1.00	3.85
ATOM	888	CB	VAL A 129	15.192	6.426	20.054	1.00	11.02
ATOM	889	CG1	VAL A 129	14.007	7.041	20.726	1.00	6.50
ATOM	890	CG2	VAL A 129	15.051	6.729	18.571	1.00	10.03
ATOM	891	N	ALA A 130	18.455	6.398	19.363	1.00	8.05
ATOM	892	CA	ALA A 130	19.430	6.845	18.344	1.00	7.55
ATOM	893	C	ALA A 130	19.078	6.293	16.958	1.00	11.17
ATOM	894	O	ALA A 130	18.755	5.145	16.849	1.00	15.74
ATOM	895	CB	ALA A 130	20.781	6.391	18.603	1.00	5.89
ATOM	896	N	LEU A 131	18.911	6.953	15.892	1.00	7.36
ATOM	897	CA	LEU A 131	18.635	6.625	14.553	1.00	7.70
ATOM	898	C	LEU A 131	19.876	6.908	13.661	1.00	12.02
ATOM	899	O	LEU A 131	20.436	8.033	13.604	1.00	6.80
ATOM	900	CB	LEU A 131	17.604	7.713	14.102	1.00	8.40
ATOM	901	CG	LEU A 131	16.160	7.830	14.575	1.00	6.67
ATOM	902	CD1	LEU A 131	15.391	8.957	13.981	1.00	4.49
ATOM	903	CD2	LEU A 131	15.481	6.488	14.324	1.00	5.12
ATOM	904	N	PHE A 132	20.271	6.009	12.802	1.00	11.56
ATOM	905	CA	PHE A 132	21.422	6.183	11.908	1.00	10.44
ATOM	906	C	PHE A 132	20.965	6.013	10.478	1.00	8.46
ATOM	907	O	PHE A 132	20.175	5.101	10.097	1.00	11.04
ATOM	908	CB	PHE A 132	22.217	4.931	12.282	1.00	10.56
ATOM	909	CG	PHE A 132	22.693	4.830	13.714	1.00	16.38
ATOM	910	CD1	PHE A 132	21.951	4.029	14.542	1.00	13.36
ATOM	911	CD2	PHE A 132	23.860	5.489	14.213	1.00	15.12

ATOM	912	CE1	PHE	A	132	22.342	3.911	15.889	1.00	14.91
ATOM	913	CE2	PHE	A	132	24.176	5.323	15.513	1.00	18.02
ATOM	914	CZ	PHE	A	132	23.426	4.530	16.403	1.00	15.09
ATOM	915	N	GLY	A	133	21.431	6.876	9.580	1.00	7.35
ATOM	916	CA	GLY	A	133	21.026	6.893	8.148	1.00	5.86
ATOM	917	C	GLY	A	133	19.503	6.919	8.061	1.00	12.25
ATOM	918	O	GLY	A	133	18.890	5.926	7.593	1.00	9.03
ATOM	919	N	TYR	A	134	18.926	8.070	8.532	1.00	9.85
ATOM	920	CA	TYR	A	134	17.455	8.022	8.838	1.00	7.40
ATOM	921	C	TYR	A	134	16.647	8.365	7.584	1.00	10.61
ATOM	922	O	TYR	A	134	16.785	9.513	7.131	1.00	5.85
ATOM	923	CB	TYR	A	134	17.161	9.128	9.836	1.00	7.27
ATOM	924	CG	TYR	A	134	15.842	9.393	10.391	1.00	7.89
ATOM	925	CD1	TYR	A	134	14.889	8.437	10.312	1.00	6.65
ATOM	926	CD2	TYR	A	134	15.661	10.651	10.948	1.00	11.44
ATOM	927	CE1	TYR	A	134	13.657	8.690	10.821	1.00	9.05
ATOM	928	CE2	TYR	A	134	14.408	10.928	11.467	1.00	12.89
ATOM	929	CZ	TYR	A	134	13.428	9.923	11.423	1.00	14.22
ATOM	930	OH	TYR	A	134	12.146	10.110	11.975	1.00	12.41
ATOM	931	N	THR	A	135	15.811	7.398	7.139	1.00	11.51
ATOM	932	CA	THR	A	135	15.229	7.581	5.789	1.00	7.71
ATOM	933	C	THR	A	135	14.082	8.530	5.825	1.00	10.36
ATOM	934	O	THR	A	135	13.845	8.878	4.727	1.00	11.26
ATOM	935	CB	THR	A	135	14.772	6.394	4.967	1.00	12.02
ATOM	936	OG1	THR	A	135	13.821	5.399	5.398	1.00	22.81
ATOM	937	CG2	THR	A	135	15.828	5.332	4.712	1.00	14.88
ATOM	938	N	GLN	A	136	13.632	9.105	6.928	1.00	15.28
ATOM	939	CA	GLN	A	136	12.596	10.134	6.968	1.00	16.48
ATOM	940	C	GLN	A	136	13.102	11.418	7.646	1.00	17.46
ATOM	941	O	GLN	A	136	12.292	12.231	8.035	1.00	12.82
ATOM	942	CB	GLN	A	136	11.336	9.671	7.701	1.00	5.71
ATOM	943	CG	GLN	A	136	11.178	8.191	7.263	1.00	13.60
ATOM	944	CD	GLN	A	136	10.504	8.264	5.932	1.00	14.65
ATOM	945	OE1	GLN	A	136	9.587	9.102	5.986	1.00	23.99
ATOM	946	NE2	GLN	A	136	10.852	7.529	4.914	1.00	14.68
ATOM	947	N	ASN	A	137	14.421	11.532	7.566	1.00	18.52
ATOM	948	CA	ASN	A	137	14.953	12.752	8.141	1.00	18.16
ATOM	949	C	ASN	A	137	14.301	13.929	7.458	1.00	19.79
ATOM	950	O	ASN	A	137	13.895	14.802	8.157	1.00	12.28
ATOM	951	CB	ASN	A	137	16.481	12.573	8.239	1.00	14.17
ATOM	952	CG	ASN	A	137	17.247	13.740	8.812	1.00	19.75
ATOM	953	OD1	ASN	A	137	17.821	14.341	7.934	1.00	14.52
ATOM	954	ND2	ASN	A	137	17.390	14.130	10.042	1.00	17.43
ATOM	955	N	LEU	A	138	14.180	14.062	6.141	1.00	27.31
ATOM	956	CA	LEU	A	138	13.640	15.270	5.553	1.00	25.53
ATOM	957	C	LEU	A	138	12.190	15.332	5.971	1.00	22.45
ATOM	958	O	LEU	A	138	11.710	16.281	6.549	1.00	25.13
ATOM	959	CB	LEU	A	138	13.632	15.269	4.056	1.00	41.28

ATOM	960	CG	LEU	A	138	13.713	16.582	3.303	1.00	31.76
ATOM	961	CD1	LEU	A	138	14.641	17.503	4.012	1.00	51.09
ATOM	962	CD2	LEU	A	138	14.207	16.573	1.958	1.00	46.20
ATOM	963	N	GLN	A	139	11.378	14.403	5.569	1.00	20.48
ATOM	964	CA	GLN	A	139	10.034	14.390	6.037	1.00	19.98
ATOM	965	C	GLN	A	139	9.846	14.749	7.471	1.00	22.85
ATOM	966	O	GLN	A	139	8.791	15.282	7.528	1.00	26.66
ATOM	967	CB	GLN	A	139	9.517	12.969	5.899	1.00	18.37
ATOM	968	CG	GLN	A	139	9.684	12.643	4.450	1.00	22.02
ATOM	969	CD	GLN	A	139	10.984	11.983	4.110	1.00	22.69
ATOM	970	OE1	GLN	A	139	10.674	10.980	3.477	1.00	35.62
ATOM	971	NE2	GLN	A	139	12.195	12.405	4.410	1.00	31.70
ATOM	972	N	ASN	A	140	10.454	14.072	8.427	1.00	26.14
ATOM	973	CA	ASN	A	140	10.215	14.183	9.848	1.00	19.06
ATOM	974	C	ASN	A	140	10.941	15.429	10.293	1.00	16.99
ATOM	975	O	ASN	A	140	11.040	15.654	11.454	1.00	18.05
ATOM	976	CB	ASN	A	140	10.581	12.910	10.541	1.00	17.20
ATOM	977	CG	ASN	A	140	9.465	11.998	10.210	1.00	16.28
ATOM	978	OD1	ASN	A	140	8.615	12.565	9.563	1.00	23.57
ATOM	979	ND2	ASN	A	140	9.460	10.756	10.630	1.00	22.65
ATOM	980	N	ARG	A	141	11.457	16.162	9.397	1.00	19.20
ATOM	981	CA	ARG	A	141	12.170	17.350	9.790	1.00	26.25
ATOM	982	C	ARG	A	141	13.219	17.090	10.818	1.00	25.06
ATOM	983	O	ARG	A	141	13.365	17.928	11.649	1.00	27.60
ATOM	984	CB	ARG	A	141	11.123	18.299	10.271	1.00	37.72
ATOM	985	CG	ARG	A	141	10.083	18.974	9.372	1.00	49.61
ATOM	986	N	GLY	A	142	14.110	16.165	10.920	1.00	19.42
ATOM	987	CA	GLY	A	142	14.997	15.778	11.902	1.00	14.21
ATOM	988	C	GLY	A	142	14.652	15.066	13.158	1.00	19.42
ATOM	989	O	GLY	A	142	15.547	14.759	13.971	1.00	23.74
ATOM	990	N	GLY	A	143	13.354	14.851	13.569	1.00	14.09
ATOM	991	CA	GLY	A	143	13.210	14.075	14.757	1.00	11.80
ATOM	992	C	GLY	A	143	12.203	12.972	14.555	1.00	16.69
ATOM	993	O	GLY	A	143	11.760	12.787	13.481	1.00	19.57
ATOM	994	N	ILE	A	144	11.668	12.386	15.590	1.00	19.71
ATOM	995	CA	ILE	A	144	10.494	11.589	15.667	1.00	20.13
ATOM	996	C	ILE	A	144	9.313	12.315	16.296	1.00	27.00
ATOM	997	O	ILE	A	144	9.298	13.026	17.268	1.00	26.75
ATOM	998	CB	ILE	A	144	10.973	10.583	16.692	1.00	16.84
ATOM	999	CG1	ILE	A	144	12.363	9.956	16.348	1.00	5.60
ATOM	1000	CG2	ILE	A	144	9.882	9.636	16.775	1.00	14.01
ATOM	1001	CD1	ILE	A	144	12.437	9.156	17.562	1.00	2.75
ATOM	1002	N	PRO	A	145	8.249	12.380	15.499	1.00	32.77
ATOM	1003	CA	PRO	A	145	6.959	12.993	15.779	1.00	29.89
ATOM	1004	C	PRO	A	145	6.484	12.588	17.180	1.00	27.78
ATOM	1005	O	PRO	A	145	6.475	11.446	17.537	1.00	26.07
ATOM	1006	CB	PRO	A	145	5.957	12.384	14.784	1.00	26.51
ATOM	1007	CG	PRO	A	145	6.887	12.059	13.668	1.00	25.85

ATOM	1008	CD	PRO	A 145	8.174	11.563	14.234	1.00	31.33
ATOM	1009	N	ASN	A 146	5.796	13.462	17.878	1.00	27.07
ATOM	1010	CA	ASN	A 146	5.454	13.274	19.230	1.00	28.59
ATOM	1011	C	ASN	A 146	6.526	12.605	20.045	1.00	29.25
ATOM	1012	O	ASN	A 146	6.087	11.995	20.996	1.00	35.51
ATOM	1013	CB	ASN	A 146	4.285	12.364	19.230	1.00	41.13
ATOM	1014	CG	ASN	A 146	3.300	12.568	18.120	1.00	48.43
ATOM	1015	OD1	ASN	A 146	3.134	13.721	17.788	1.00	49.24
ATOM	1016	ND2	ASN	A 146	2.763	11.437	17.695	1.00	47.79
ATOM	1017	N	TYR	A 147	7.791	12.799	19.885	1.00	23.88
ATOM	1018	CA	TYR	A 147	8.689	12.339	20.969	1.00	21.90
ATOM	1019	C	TYR	A 147	9.583	13.495	21.285	1.00	22.57
ATOM	1020	O	TYR	A 147	9.777	14.399	20.494	1.00	26.53
ATOM	1021	CB	TYR	A 147	9.309	11.098	20.498	1.00	21.16
ATOM	1022	CG	TYR	A 147	10.285	10.471	21.349	1.00	20.45
ATOM	1023	CD1	TYR	A 147	9.882	9.720	22.384	1.00	24.28
ATOM	1024	CD2	TYR	A 147	11.608	10.564	21.189	1.00	17.96
ATOM	1025	CE1	TYR	A 147	10.681	9.029	23.273	1.00	24.55
ATOM	1026	CE2	TYR	A 147	12.509	9.948	21.983	1.00	20.73
ATOM	1027	CZ	TYR	A 147	12.022	9.184	23.030	1.00	24.61
ATOM	1028	OH	TYR	A 147	12.891	8.536	23.887	1.00	24.80
ATOM	1029	N	PRO	A 148	9.893	13.858	22.507	1.00	22.86
ATOM	1030	CA	PRO	A 148	10.817	14.916	22.769	1.00	21.77
ATOM	1031	C	PRO	A 148	12.127	14.882	21.957	1.00	22.49
ATOM	1032	O	PRO	A 148	13.007	14.004	22.117	1.00	22.31
ATOM	1033	CB	PRO	A 148	11.185	14.694	24.251	1.00	23.23
ATOM	1034	CG	PRO	A 148	10.324	13.576	24.719	1.00	23.39
ATOM	1035	CD	PRO	A 148	9.677	12.889	23.590	1.00	25.33
ATOM	1036	N	ARG	A 149	12.432	15.980	21.250	1.00	25.45
ATOM	1037	CA	ARG	A 149	13.735	16.138	20.567	1.00	22.54
ATOM	1038	C	ARG	A 149	14.910	16.018	21.499	1.00	21.28
ATOM	1039	O	ARG	A 149	15.860	15.477	21.015	1.00	16.61
ATOM	1040	CB	ARG	A 149	13.829	17.346	19.727	1.00	31.02
ATOM	1041	CG	ARG	A 149	12.837	17.750	18.719	1.00	58.26
ATOM	1042	CD	ARG	A 149	13.452	18.605	17.658	1.00	80.58
ATOM	1043	NE	ARG	A 149	13.769	17.798	16.491	1.00	92.05
ATOM	1044	CZ	ARG	A 149	13.315	18.154	15.320	1.00	91.85
ATOM	1045	NH1	ARG	A 149	12.586	19.213	15.165	1.00	86.98
ATOM	1046	NH2	ARG	A 149	13.544	17.488	14.242	1.00	91.61
ATOM	1047	N	GLU	A 150	14.813	16.282	22.825	1.00	28.09
ATOM	1048	CA	GLU	A 150	15.950	16.171	23.735	1.00	25.55
ATOM	1049	C	GLU	A 150	16.272	14.736	24.020	1.00	21.12
ATOM	1050	O	GLU	A 150	17.372	14.443	24.371	1.00	24.39
ATOM	1051	CB	GLU	A 150	15.753	17.040	24.917	1.00	38.73
ATOM	1052	CG	GLU	A 150	14.328	17.370	25.359	1.00	67.27
ATOM	1053	CD	GLU	A 150	14.252	17.185	26.899	1.00	85.05
ATOM	1054	OE1	GLU	A 150	15.005	17.890	27.657	1.00	90.70
ATOM	1055	OE2	GLU	A 150	13.454	16.321	27.373	1.00	91.68

ATOM	1056	N	ARG A 151	15.396	13.807	23.727	1.00	19.70
ATOM	1057	CA	ARG A 151	15.752	12.424	23.844	1.00	19.52
ATOM	1058	C	ARG A 151	16.163	11.779	22.531	1.00	19.28
ATOM	1059	O	ARG A 151	16.373	10.586	22.480	1.00	14.55
ATOM	1060	CB	ARG A 151	14.548	11.796	24.412	1.00	23.06
ATOM	1061	CG	ARG A 151	13.853	12.432	25.516	1.00	22.24
ATOM	1062	CD	ARG A 151	13.200	11.451	26.393	1.00	33.40
ATOM	1063	NE	ARG A 151	12.609	11.893	27.633	1.00	46.53
ATOM	1064	CZ	ARG A 151	11.796	11.028	28.275	1.00	52.87
ATOM	1065	NH1	ARG A 151	11.428	9.823	27.930	1.00	51.02
ATOM	1066	NH2	ARG A 151	11.203	11.278	29.416	1.00	59.98
ATOM	1067	N	THR A 152	16.360	12.526	21.505	1.00	14.12
ATOM	1068	CA	THR A 152	16.629	11.925	20.253	1.00	15.05
ATOM	1069	C	THR A 152	17.995	12.249	19.745	1.00	17.30
ATOM	1070	O	THR A 152	18.282	13.373	19.965	1.00	21.34
ATOM	1071	CB	THR A 152	15.680	12.408	19.158	1.00	13.91
ATOM	1072	OG1	THR A 152	14.423	12.256	19.858	1.00	23.92
ATOM	1073	CG2	THR A 152	15.737	11.934	17.759	1.00	6.77
ATOM	1074	N	LYS A 153	18.704	11.336	19.121	1.00	15.49
ATOM	1075	CA	LYS A 153	19.930	11.725	18.450	1.00	17.73
ATOM	1076	C	LYS A 153	19.893	11.035	17.073	1.00	18.41
ATOM	1077	O	LYS A 153	19.866	9.800	17.121	1.00	16.04
ATOM	1078	CB	LYS A 153	21.112	11.260	19.338	1.00	14.55
ATOM	1079	CG	LYS A 153	22.523	11.508	18.933	1.00	11.95
ATOM	1080	CD	LYS A 153	22.883	12.882	19.403	1.00	40.35
ATOM	1081	CE	LYS A 153	24.358	13.093	19.079	1.00	62.12
ATOM	1082	NZ	LYS A 153	24.930	14.235	19.863	1.00	73.03
ATOM	1083	N	VAL A 154	19.910	11.962	16.136	1.00	15.86
ATOM	1084	CA	VAL A 154	20.031	11.508	14.730	1.00	15.79
ATOM	1085	C	VAL A 154	21.406	11.481	14.040	1.00	13.11
ATOM	1086	O	VAL A 154	21.958	12.460	13.675	1.00	13.51
ATOM	1087	CB	VAL A 154	19.095	12.257	13.674	1.00	5.90
ATOM	1088	CG1	VAL A 154	19.276	11.765	12.247	1.00	8.45
ATOM	1089	CG2	VAL A 154	17.672	12.091	14.117	1.00	7.14
ATOM	1090	N	PHE A 155	22.039	10.448	13.605	1.00	13.75
ATOM	1091	CA	PHE A 155	23.263	10.473	12.843	1.00	10.67
ATOM	1092	C	PHE A 155	22.906	10.406	11.402	1.00	11.64
ATOM	1093	O	PHE A 155	22.505	9.367	10.893	1.00	15.09
ATOM	1094	CB	PHE A 155	23.955	9.120	13.304	1.00	5.38
ATOM	1095	CG	PHE A 155	24.396	9.266	14.739	1.00	16.52
ATOM	1096	CD1	PHE A 155	23.678	8.642	15.696	1.00	23.70
ATOM	1097	CD2	PHE A 155	25.503	9.950	15.107	1.00	11.27
ATOM	1098	CE1	PHE A 155	24.037	8.702	17.011	1.00	23.25
ATOM	1099	CE2	PHE A 155	25.888	9.994	16.372	1.00	7.37
ATOM	1100	CZ	PHE A 155	25.139	9.384	17.357	1.00	16.13
ATOM	1101	N	CYS A 156	23.205	11.255	10.511	1.00	12.38
ATOM	1102	CA	CYS A 156	22.847	11.443	9.114	1.00	11.64
ATOM	1103	C	CYS A 156	24.057	12.027	8.461	1.00	10.08

ATOM	1104	O	CYS A 156	24.385	13.174	8.378	1.00	13.73
ATOM	1105	CB	CYS A 156	21.575	12.391	8.917	1.00	6.30
ATOM	1106	SG	CYS A 156	20.137	11.470	8.287	1.00	10.60
ATOM	1107	N	ASN A 157	24.814	11.147	7.918	1.00	16.95
ATOM	1108	CA	ASN A 157	26.229	11.665	7.576	1.00	19.16
ATOM	1109	C	ASN A 157	26.197	12.367	6.310	1.00	17.70
ATOM	1110	O	ASN A 157	25.368	12.330	5.469	1.00	20.91
ATOM	1111	CB	ASN A 157	27.115	10.714	8.300	1.00	30.34
ATOM	1112	CG	ASN A 157	27.733	9.498	7.932	1.00	34.95
ATOM	1113	OD1	ASN A 157	28.011	8.573	8.606	1.00	44.28
ATOM	1114	ND2	ASN A 157	27.965	9.541	6.660	1.00	54.18
ATOM	1115	N	VAL A 158	26.849	13.501	6.313	1.00	25.65
ATOM	1116	CA	VAL A 158	26.825	14.483	5.192	1.00	28.21
ATOM	1117	C	VAL A 158	26.768	13.893	3.758	1.00	24.85
ATOM	1118	O	VAL A 158	25.732	14.266	3.111	1.00	30.96
ATOM	1119	CB	VAL A 158	27.954	15.512	5.217	1.00	27.87
ATOM	1120	CG1	VAL A 158	28.751	14.595	4.238	1.00	40.51
ATOM	1121	CG2	VAL A 158	27.791	16.704	4.399	1.00	34.39
ATOM	1122	N	GLY A 159	27.483	12.956	3.016	1.00	5.94
ATOM	1123	CA	GLY A 159	26.713	12.774	1.732	1.00	6.20
ATOM	1124	C	GLY A 159	25.734	11.797	1.487	1.00	4.00
ATOM	1125	O	GLY A 159	25.732	10.704	0.848	1.00	4.06
ATOM	1126	N	ASP A 160	25.052	11.441	2.643	1.00	8.53
ATOM	1127	CA	ASP A 160	24.106	10.302	2.828	1.00	11.97
ATOM	1128	C	ASP A 160	22.755	10.698	2.177	1.00	14.44
ATOM	1129	O	ASP A 160	21.928	11.398	2.692	1.00	10.21
ATOM	1130	CB	ASP A 160	24.037	9.829	4.277	1.00	12.43
ATOM	1131	CG	ASP A 160	23.126	8.629	4.261	1.00	20.99
ATOM	1132	OD1	ASP A 160	22.525	8.408	3.179	1.00	33.03
ATOM	1133	OD2	ASP A 160	22.956	7.840	5.216	1.00	10.13
ATOM	1134	N	ALA A 161	22.455	10.402	0.961	1.00	12.33
ATOM	1135	CA	ALA A 161	21.318	10.743	0.269	1.00	11.01
ATOM	1136	C	ALA A 161	19.961	10.317	0.848	1.00	15.22
ATOM	1137	O	ALA A 161	18.969	11.034	0.594	1.00	9.50
ATOM	1138	CB	ALA A 161	21.365	10.334	-1.172	1.00	13.68
ATOM	1139	N	VAL A 162	19.915	9.468	1.840	1.00	14.54
ATOM	1140	CA	VAL A 162	18.653	9.014	2.287	1.00	9.86
ATOM	1141	C	VAL A 162	18.235	10.063	3.258	1.00	13.50
ATOM	1142	O	VAL A 162	17.094	10.458	3.377	1.00	20.47
ATOM	1143	CB	VAL A 162	18.596	7.778	3.117	1.00	7.34
ATOM	1144	CG1	VAL A 162	18.931	6.592	2.259	1.00	6.50
ATOM	1145	CG2	VAL A 162	19.514	7.858	4.210	1.00	18.46
ATOM	1146	N	CYS A 163	19.198	10.733	3.719	1.00	13.44
ATOM	1147	CA	CYS A 163	18.864	11.811	4.720	1.00	11.26
ATOM	1148	C	CYS A 163	18.256	12.963	4.042	1.00	15.57
ATOM	1149	O	CYS A 163	18.219	13.857	4.880	1.00	14.09
ATOM	1150	CB	CYS A 163	20.144	12.145	5.570	1.00	18.70
ATOM	1151	SG	CYS A 163	20.748	10.705	6.581	1.00	13.38

ATOM	1152	N	THR A 164	18.100	13.014	2.696	1.00	21.82
ATOM	1153	CA	THR A 164	17.603	14.283	2.171	1.00	23.08
ATOM	1154	C	THR A 164	16.597	14.022	1.098	1.00	23.39
ATOM	1155	O	THR A 164	16.517	14.727	0.137	1.00	33.37
ATOM	1156	CB	THR A 164	18.463	15.341	1.454	1.00	23.25
ATOM	1157	OG1	THR A 164	19.486	14.707	0.674	1.00	23.21
ATOM	1158	CG2	THR A 164	18.958	16.261	2.491	1.00	37.71
ATOM	1159	N	GLY A 165	15.802	13.085	1.309	1.00	24.23
ATOM	1160	CA	GLY A 165	14.606	12.783	0.579	1.00	26.69
ATOM	1161	C	GLY A 165	14.699	11.814	-0.515	1.00	28.56
ATOM	1162	O	GLY A 165	13.680	11.775	-1.124	1.00	39.76
ATOM	1163	N	THR A 166	15.661	11.044	-0.736	1.00	25.80
ATOM	1164	CA	THR A 166	16.006	10.220	-1.774	1.00	25.53
ATOM	1165	C	THR A 166	16.195	8.866	-1.175	1.00	25.35
ATOM	1166	O	THR A 166	16.913	8.760	-0.206	1.00	30.91
ATOM	1167	CB	THR A 166	17.406	10.657	-2.230	1.00	31.57
ATOM	1168	OG1	THR A 166	17.105	11.788	-2.982	1.00	24.13
ATOM	1169	CG2	THR A 166	18.061	9.559	-2.983	1.00	34.67
ATOM	1170	N	LEU A 167	15.734	7.833	-1.817	1.00	19.63
ATOM	1171	CA	LEU A 167	16.219	6.552	-1.465	1.00	16.11
ATOM	1172	C	LEU A 167	17.395	6.044	-2.300	1.00	19.87
ATOM	1173	O	LEU A 167	17.265	4.869	-2.612	1.00	21.38
ATOM	1174	CB	LEU A 167	15.086	5.624	-1.555	1.00	23.45
ATOM	1175	CG	LEU A 167	14.123	5.773	-0.401	1.00	33.91
ATOM	1176	CD1	LEU A 167	12.969	4.908	-0.793	1.00	42.10
ATOM	1177	CD2	LEU A 167	14.776	5.385	0.903	1.00	25.86
ATOM	1178	N	ILE A 168	18.534	6.726	-2.507	1.00	21.67
ATOM	1179	CA	ILE A 168	19.608	6.051	-3.170	1.00	23.38
ATOM	1180	C	ILE A 168	20.675	5.585	-2.189	1.00	20.47
ATOM	1181	O	ILE A 168	21.139	6.541	-1.581	1.00	18.08
ATOM	1182	CB	ILE A 168	20.254	6.835	-4.297	1.00	23.50
ATOM	1183	CG1	ILE A 168	21.232	7.874	-3.800	1.00	13.71
ATOM	1184	CG2	ILE A 168	19.445	7.627	-5.276	1.00	18.16
ATOM	1185	CD1	ILE A 168	20.908	8.938	-4.804	1.00	26.95
ATOM	1186	N	ILE A 169	21.396	4.478	-2.394	1.00	18.32
ATOM	1187	CA	ILE A 169	22.554	4.448	-1.536	1.00	13.25
ATOM	1188	C	ILE A 169	23.924	4.662	-1.967	1.00	11.95
ATOM	1189	O	ILE A 169	24.615	3.942	-2.539	1.00	20.35
ATOM	1190	CB	ILE A 169	22.503	3.351	-0.499	1.00	21.07
ATOM	1191	CG1	ILE A 169	23.398	2.181	-0.655	1.00	11.06
ATOM	1192	CG2	ILE A 169	21.122	2.801	-0.533	1.00	7.02
ATOM	1193	CD1	ILE A 169	22.581	1.266	-1.587	1.00	32.83
ATOM	1194	N	THR A 170	24.570	5.586	-1.296	1.00	17.16
ATOM	1195	CA	THR A 170	25.883	6.217	-1.397	1.00	13.01
ATOM	1196	C	THR A 170	26.722	5.719	-0.240	1.00	10.14
ATOM	1197	O	THR A 170	26.334	5.036	0.758	1.00	9.98
ATOM	1198	CB	THR A 170	25.623	7.713	-1.344	1.00	15.02
ATOM	1199	OG1	THR A 170	26.466	7.947	-0.255	1.00	23.39

ATOM	1200	CG2	THR	A	170	24.389	7.914	-0.452	1.00	41.10
ATOM	1201	N	PRO	A	171	28.000	5.738	-0.469	1.00	10.12
ATOM	1202	CA	PRO	A	171	29.012	5.066	0.339	1.00	11.88
ATOM	1203	C	PRO	A	171	28.897	5.492	1.765	1.00	9.74
ATOM	1204	O	PRO	A	171	28.904	4.682	2.646	1.00	9.54
ATOM	1205	CB	PRO	A	171	30.414	5.207	-0.286	1.00	7.15
ATOM	1206	CG	PRO	A	171	30.017	5.603	-1.654	1.00	7.18
ATOM	1207	CD	PRO	A	171	28.667	6.233	-1.601	1.00	6.90
ATOM	1208	N	ALA	A	172	28.725	6.718	1.980	1.00	6.71
ATOM	1209	CA	ALA	A	172	28.247	7.315	3.169	1.00	8.62
ATOM	1210	C	ALA	A	172	27.075	6.631	3.892	1.00	10.99
ATOM	1211	O	ALA	A	172	27.037	6.755	5.165	1.00	16.49
ATOM	1212	CB	ALA	A	172	27.904	8.812	3.040	1.00	2.86
ATOM	1213	N	HIS	A	173	26.287	5.815	3.278	1.00	6.36
ATOM	1214	CA	HIS	A	173	25.133	5.468	4.081	1.00	5.29
ATOM	1215	C	HIS	A	173	25.685	4.314	4.888	1.00	10.58
ATOM	1216	O	HIS	A	173	25.082	3.598	5.668	1.00	9.36
ATOM	1217	CB	HIS	A	173	24.081	4.883	3.216	1.00	8.41
ATOM	1218	CG	HIS	A	173	22.815	4.403	3.791	1.00	7.30
ATOM	1219	ND1	HIS	A	173	22.066	5.327	4.565	1.00	8.48
ATOM	1220	CD2	HIS	A	173	22.148	3.264	3.670	1.00	7.83
ATOM	1221	CE1	HIS	A	173	20.932	4.657	4.861	1.00	17.36
ATOM	1222	NE2	HIS	A	173	20.945	3.423	4.379	1.00	5.29
ATOM	1223	N	LEU	A	174	26.823	3.947	4.326	1.00	8.03
ATOM	1224	CA	LEU	A	174	27.344	2.623	4.682	1.00	8.06
ATOM	1225	C	LEU	A	174	28.171	2.787	5.930	1.00	13.06
ATOM	1226	O	LEU	A	174	28.609	1.648	6.151	1.00	19.88
ATOM	1227	CB	LEU	A	174	28.078	2.118	3.488	1.00	2.76
ATOM	1228	CG	LEU	A	174	27.560	0.902	2.847	1.00	13.35
ATOM	1229	CD1	LEU	A	174	26.024	1.017	2.796	1.00	18.01
ATOM	1230	CD2	LEU	A	174	27.913	0.740	1.421	1.00	21.70
ATOM	1231	N	SER	A	175	28.290	3.989	6.447	1.00	12.43
ATOM	1232	CA	SER	A	175	29.230	4.052	7.553	1.00	18.01
ATOM	1233	C	SER	A	175	28.872	4.811	8.847	1.00	19.89
ATOM	1234	O	SER	A	175	28.968	6.047	9.120	1.00	14.61
ATOM	1235	CB	SER	A	175	30.516	4.606	6.847	1.00	20.11
ATOM	1236	OG	SER	A	175	30.834	5.907	7.293	1.00	27.73
ATOM	1237	N	TYR	A	176	28.479	3.978	9.815	1.00	17.89
ATOM	1238	CA	TYR	A	176	28.092	4.530	11.133	1.00	12.54
ATOM	1239	C	TYR	A	176	28.530	3.671	12.272	1.00	11.16
ATOM	1240	O	TYR	A	176	27.949	3.770	13.257	1.00	7.63
ATOM	1241	CB	TYR	A	176	26.511	4.283	11.053	1.00	9.13
ATOM	1242	CG	TYR	A	176	25.831	5.525	10.029	1.00	5.03
ATOM	1243	CD1	TYR	A	176	25.874	6.923	10.425	1.00	2.75
ATOM	1244	CD2	TYR	A	176	25.152	5.022	8.980	1.00	2.18
ATOM	1245	CE1	TYR	A	176	25.287	7.754	9.633	1.00	4.25
ATOM	1246	CE2	TYR	A	176	24.649	5.981	8.085	1.00	6.77
ATOM	1247	CZ	TYR	A	176	24.658	7.329	8.399	1.00	6.22

ATOM	1248	OH	TYR A 176	24.074	8.375	7.635	1.00	5.76
ATOM	1249	N	THR A 177	29.430	2.685	12.167	1.00	10.72
ATOM	1250	CA	THR A 177	29.797	1.854	13.284	1.00	13.31
ATOM	1251	C	THR A 177	30.516	2.659	14.320	1.00	12.46
ATOM	1252	O	THR A 177	30.311	2.436	15.475	1.00	13.12
ATOM	1253	CB	THR A 177	30.658	0.683	12.798	1.00	3.49
ATOM	1254	OG1	THR A 177	31.361	1.247	11.870	1.00	32.08
ATOM	1255	CG2	THR A 177	29.675	-0.149	12.083	1.00	6.42
ATOM	1256	N	ILE A 178	31.409	3.474	13.920	1.00	10.48
ATOM	1257	CA	ILE A 178	32.203	4.246	14.783	1.00	15.25
ATOM	1258	C	ILE A 178	31.180	5.045	15.632	1.00	16.95
ATOM	1259	O	ILE A 178	31.092	4.774	16.851	1.00	22.68
ATOM	1260	CB	ILE A 178	33.338	5.121	14.357	1.00	25.11
ATOM	1261	CG1	ILE A 178	34.701	4.496	14.056	1.00	25.05
ATOM	1262	CG2	ILE A 178	33.599	6.205	15.392	1.00	27.60
ATOM	1263	CD1	ILE A 178	34.553	3.006	14.071	1.00	55.86
ATOM	1264	N	GLU A 179	30.218	5.799	15.178	1.00	16.34
ATOM	1265	CA	GLU A 179	29.290	6.610	15.985	1.00	16.94
ATOM	1266	C	GLU A 179	28.324	5.713	16.692	1.00	14.79
ATOM	1267	O	GLU A 179	27.683	6.012	17.716	1.00	19.20
ATOM	1268	CB	GLU A 179	28.555	7.637	15.169	1.00	21.16
ATOM	1269	CG	GLU A 179	28.790	7.283	13.691	1.00	50.37
ATOM	1270	CD	GLU A 179	29.933	7.701	12.851	1.00	61.82
ATOM	1271	OE1	GLU A 179	30.163	8.890	12.697	1.00	77.56
ATOM	1272	OE2	GLU A 179	30.627	6.854	12.309	1.00	75.83
ATOM	1273	N	ALA A 180	28.240	4.418	16.412	1.00	8.00
ATOM	1274	CA	ALA A 180	27.353	3.520	17.042	1.00	14.34
ATOM	1275	C	ALA A 180	28.048	2.991	18.280	1.00	19.53
ATOM	1276	O	ALA A 180	27.397	3.142	19.265	1.00	21.17
ATOM	1277	CB	ALA A 180	26.843	2.437	16.128	1.00	11.97
ATOM	1278	N	ARG A 181	29.317	2.547	18.287	1.00	21.89
ATOM	1279	CA	ARG A 181	29.992	1.982	19.398	1.00	16.48
ATOM	1280	C	ARG A 181	30.296	3.106	20.367	1.00	19.44
ATOM	1281	O	ARG A 181	30.243	3.104	21.639	1.00	28.53
ATOM	1282	CB	ARG A 181	31.310	1.408	19.143	1.00	12.43
ATOM	1283	CG	ARG A 181	31.954	0.432	20.052	1.00	45.44
ATOM	1284	CD	ARG A 181	32.596	-0.688	19.242	1.00	66.21
ATOM	1285	NE	ARG A 181	33.333	-0.030	18.164	1.00	85.83
ATOM	1286	CZ	ARG A 181	33.306	-0.321	16.895	1.00	91.35
ATOM	1287	NH1	ARG A 181	32.551	-1.320	16.530	1.00	96.98
ATOM	1288	NH2	ARG A 181	34.023	0.400	16.095	1.00	92.83
ATOM	1289	N	GLY A 182	30.387	4.262	19.847	1.00	13.94
ATOM	1290	CA	GLY A 182	30.553	5.404	20.728	1.00	7.40
ATOM	1291	C	GLY A 182	29.741	6.574	20.960	1.00	7.95
ATOM	1292	O	GLY A 182	29.171	6.512	22.083	1.00	12.73
ATOM	1293	N	GLU A 183	29.725	7.622	20.138	1.00	6.42
ATOM	1294	CA	GLU A 183	28.816	8.775	20.405	1.00	10.04
ATOM	1295	C	GLU A 183	27.421	8.369	20.645	1.00	14.41

ATOM	1296	O	GLU	A	183	26.846	8.530	21.749	1.00	15.43
ATOM	1297	CB	GLU	A	183	29.053	9.791	19.402	1.00	21.24
ATOM	1298	CG	GLU	A	183	28.079	10.638	18.725	1.00	62.21
ATOM	1299	CD	GLU	A	183	28.248	12.103	19.141	1.00	81.34
ATOM	1300	OE1	GLU	A	183	28.850	12.243	20.232	1.00	95.85
ATOM	1301	OE2	GLU	A	183	27.791	13.027	18.430	1.00	90.85
ATOM	1302	N	ALA	A	184	26.766	7.605	19.808	1.00	15.56
ATOM	1303	CA	ALA	A	184	25.444	7.083	20.117	1.00	14.54
ATOM	1304	C	ALA	A	184	25.549	6.382	21.464	1.00	13.62
ATOM	1305	O	ALA	A	184	24.575	6.533	22.215	1.00	16.75
ATOM	1306	CB	ALA	A	184	25.019	6.015	19.089	1.00	9.58
ATOM	1307	N	ALA	A	185	26.428	5.396	21.774	1.00	9.42
ATOM	1308	CA	ALA	A	185	26.219	4.677	23.031	1.00	7.48
ATOM	1309	C	ALA	A	185	26.330	5.715	24.100	1.00	12.30
ATOM	1310	O	ALA	A	185	25.761	5.503	25.179	1.00	9.50
ATOM	1311	CB	ALA	A	185	27.138	3.475	23.260	1.00	4.60
ATOM	1312	N	ARG	A	186	27.271	6.673	24.090	1.00	15.54
ATOM	1313	CA	ARG	A	186	27.352	7.507	25.300	1.00	13.57
ATOM	1314	C	ARG	A	186	26.085	8.286	25.561	1.00	11.49
ATOM	1315	O	ARG	A	186	25.421	8.267	26.573	1.00	8.74
ATOM	1316	CB	ARG	A	186	28.484	8.460	25.043	1.00	30.29
ATOM	1317	CG	ARG	A	186	29.869	7.851	25.240	1.00	37.15
ATOM	1318	CD	ARG	A	186	30.983	8.826	24.813	1.00	42.36
ATOM	1319	NE	ARG	A	186	31.902	7.942	24.064	1.00	51.82
ATOM	1320	CZ	ARG	A	186	32.324	8.346	22.870	1.00	50.20
ATOM	1321	NH1	ARG	A	186	31.924	9.538	22.424	1.00	47.65
ATOM	1322	NH2	ARG	A	186	33.115	7.476	22.318	1.00	39.90
ATOM	1323	N	PHE	A	187	25.565	8.774	24.434	1.00	8.37
ATOM	1324	CA	PHE	A	187	24.195	9.370	24.426	1.00	13.48
ATOM	1325	C	PHE	A	187	23.187	8.476	25.182	1.00	15.92
ATOM	1326	O	PHE	A	187	22.379	8.916	25.995	1.00	14.81
ATOM	1327	CB	PHE	A	187	23.667	9.791	23.087	1.00	11.81
ATOM	1328	CG	PHE	A	187	22.282	10.323	23.032	1.00	14.64
ATOM	1329	CD1	PHE	A	187	21.984	11.586	23.391	1.00	8.47
ATOM	1330	CD2	PHE	A	187	21.186	9.599	22.564	1.00	18.34
ATOM	1331	CE1	PHE	A	187	20.698	12.134	23.353	1.00	12.89
ATOM	1332	CE2	PHE	A	187	19.895	10.026	22.485	1.00	17.42
ATOM	1333	CZ	PHE	A	187	19.661	11.322	22.924	1.00	3.70
ATOM	1334	N	LEU	A	188	23.033	7.232	24.803	1.00	15.17
ATOM	1335	CA	LEU	A	188	21.908	6.427	25.324	1.00	18.43
ATOM	1336	C	LEU	A	188	22.207	6.221	26.775	1.00	19.67
ATOM	1337	O	LEU	A	188	21.280	6.512	27.461	1.00	18.17
ATOM	1338	CB	LEU	A	188	21.703	5.088	24.552	1.00	18.72
ATOM	1339	CG	LEU	A	188	21.116	5.375	23.136	1.00	9.96
ATOM	1340	CD1	LEU	A	188	20.950	4.066	22.601	1.00	7.86
ATOM	1341	CD2	LEU	A	188	19.849	6.206	23.168	1.00	4.70
ATOM	1342	N	ARG	A	189	23.333	5.805	27.230	1.00	17.48
ATOM	1343	CA	ARG	A	189	23.798	5.812	28.547	1.00	18.41

ATOM	1344	C	ARG A 189	23.353	7.039	29.321	1.00	16.87
ATOM	1345	O	ARG A 189	22.852	7.164	30.389	1.00	13.64
ATOM	1346	CB	ARG A 189	25.325	6.017	28.529	1.00	21.93
ATOM	1347	CG	ARG A 189	25.882	5.624	29.894	1.00	19.95
ATOM	1348	CD	ARG A 189	27.239	6.140	30.235	1.00	21.42
ATOM	1349	NE	ARG A 189	27.257	7.545	29.926	1.00	25.62
ATOM	1350	CZ	ARG A 189	28.491	7.983	29.699	1.00	29.22
ATOM	1351	NH1	ARG A 189	29.315	6.960	29.840	1.00	26.71
ATOM	1352	NH2	ARG A 189	28.780	9.210	29.383	1.00	33.27
ATOM	1353	N	ASP A 190	23.837	8.150	28.796	1.00	13.76
ATOM	1354	CA	ASP A 190	23.489	9.338	29.615	1.00	17.78
ATOM	1355	C	ASP A 190	22.008	9.364	29.711	1.00	16.79
ATOM	1356	O	ASP A 190	21.661	9.891	30.692	1.00	23.13
ATOM	1357	CB	ASP A 190	23.995	10.663	29.070	1.00	23.17
ATOM	1358	CG	ASP A 190	25.553	10.664	29.079	1.00	33.40
ATOM	1359	OD1	ASP A 190	26.250	9.836	29.761	1.00	22.68
ATOM	1360	OD2	ASP A 190	25.961	11.595	28.321	1.00	30.24
ATOM	1361	N	ARG A 191	21.156	9.128	28.781	1.00	21.61
ATOM	1362	CA	ARG A 191	19.707	9.265	28.849	1.00	20.99
ATOM	1363	C	ARG A 191	19.176	8.237	29.825	1.00	21.23
ATOM	1364	O	ARG A 191	18.327	8.515	30.651	1.00	20.98
ATOM	1365	CB	ARG A 191	19.014	9.214	27.450	1.00	19.76
ATOM	1366	CG	ARG A 191	19.605	10.282	26.521	1.00	27.49
ATOM	1367	CD	ARG A 191	18.848	11.594	26.689	1.00	36.68
ATOM	1368	NE	ARG A 191	17.559	11.023	27.144	1.00	60.89
ATOM	1369	CZ	ARG A 191	16.841	11.651	28.087	1.00	73.30
ATOM	1370	NH1	ARG A 191	17.404	12.780	28.496	1.00	76.65
ATOM	1371	NH2	ARG A 191	15.675	11.224	28.574	1.00	62.02
ATOM	1372	N	ILE A 192	19.734	7.037	29.885	1.00	21.02
ATOM	1373	CA	ILE A 192	19.500	6.080	30.913	1.00	21.92
ATOM	1374	C	ILE A 192	19.705	6.598	32.337	1.00	25.67
ATOM	1375	O	ILE A 192	19.145	6.053	33.263	1.00	27.95
ATOM	1376	CB	ILE A 192	20.289	4.775	30.750	1.00	24.23
ATOM	1377	CG1	ILE A 192	19.770	4.215	29.475	1.00	26.91
ATOM	1378	CG2	ILE A 192	19.923	3.983	31.951	1.00	15.15
ATOM	1379	CD1	ILE A 192	20.418	2.954	29.019	1.00	21.07
ATOM	1380	N	ARG A 193	20.535	7.574	32.629	1.00	28.72
ATOM	1381	CA	ARG A 193	20.800	8.068	33.963	1.00	33.95
ATOM	1382	C	ARG A 193	20.116	9.377	34.406	1.00	42.87
ATOM	1383	O	ARG A 193	20.479	9.267	35.618	1.00	48.19
ATOM	1384	CB	ARG A 193	22.298	8.179	34.167	1.00	34.19
ATOM	1385	CG	ARG A 193	23.096	6.896	34.100	1.00	39.38
ATOM	1386	CD	ARG A 193	24.590	7.213	34.133	1.00	65.92
ATOM	1387	NE	ARG A 193	25.339	5.973	34.003	1.00	81.05
ATOM	1388	CZ	ARG A 193	26.631	5.765	33.770	1.00	81.52
ATOM	1389	NH1	ARG A 193	27.441	6.816	33.647	1.00	80.92
ATOM	1390	NH2	ARG A 193	27.120	4.536	33.652	1.00	74.00
ATOM	1391	OT	ARG A 193	19.292	10.277	34.082	1.00	38.80
TER								

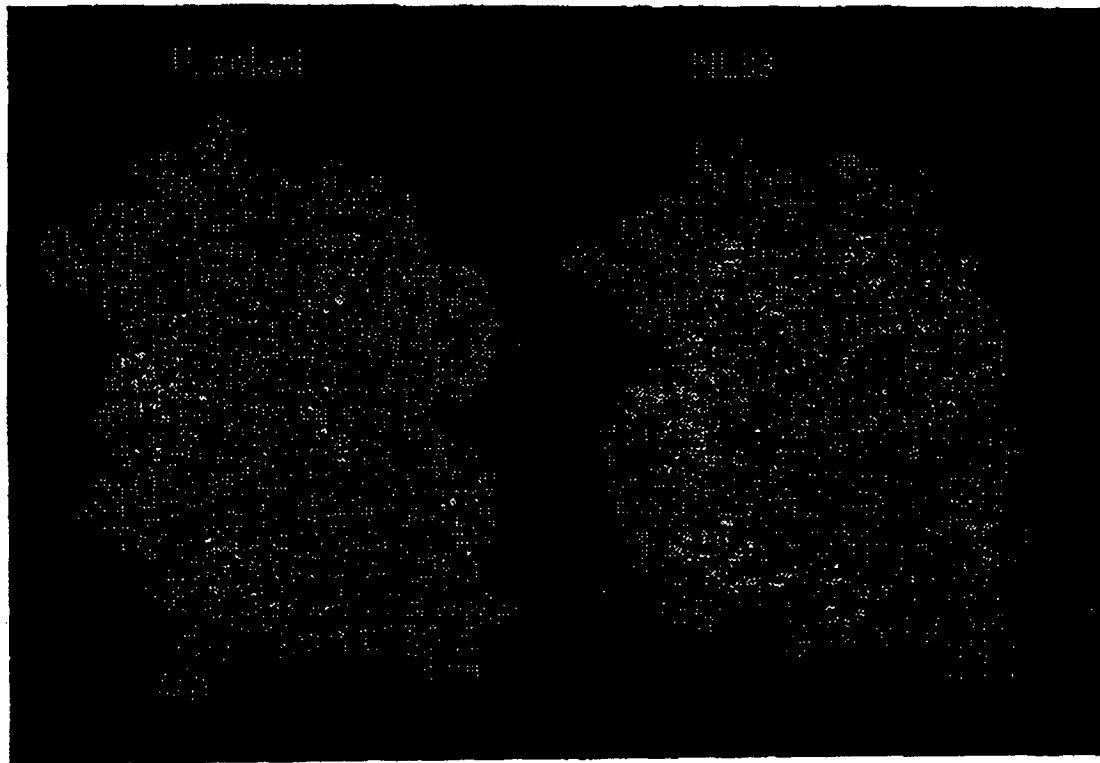


Fig. 2

3D-Struktur von Cutinase aus *F. solani* pisi (links) und *H. insolens* (rechts)

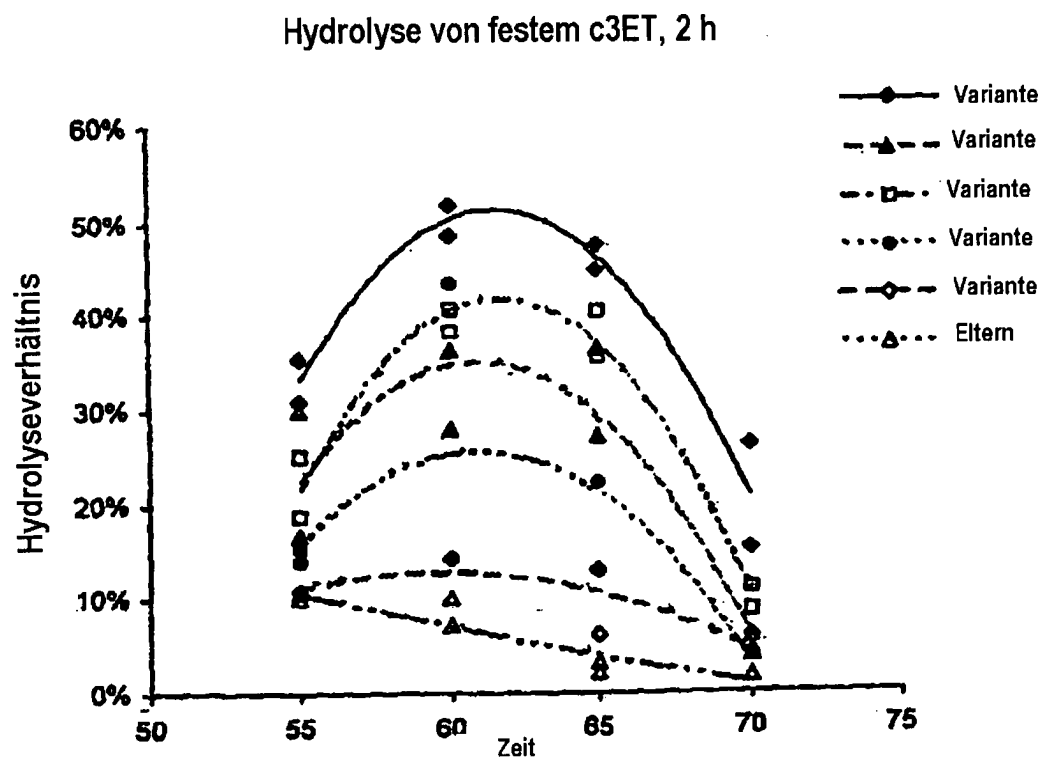
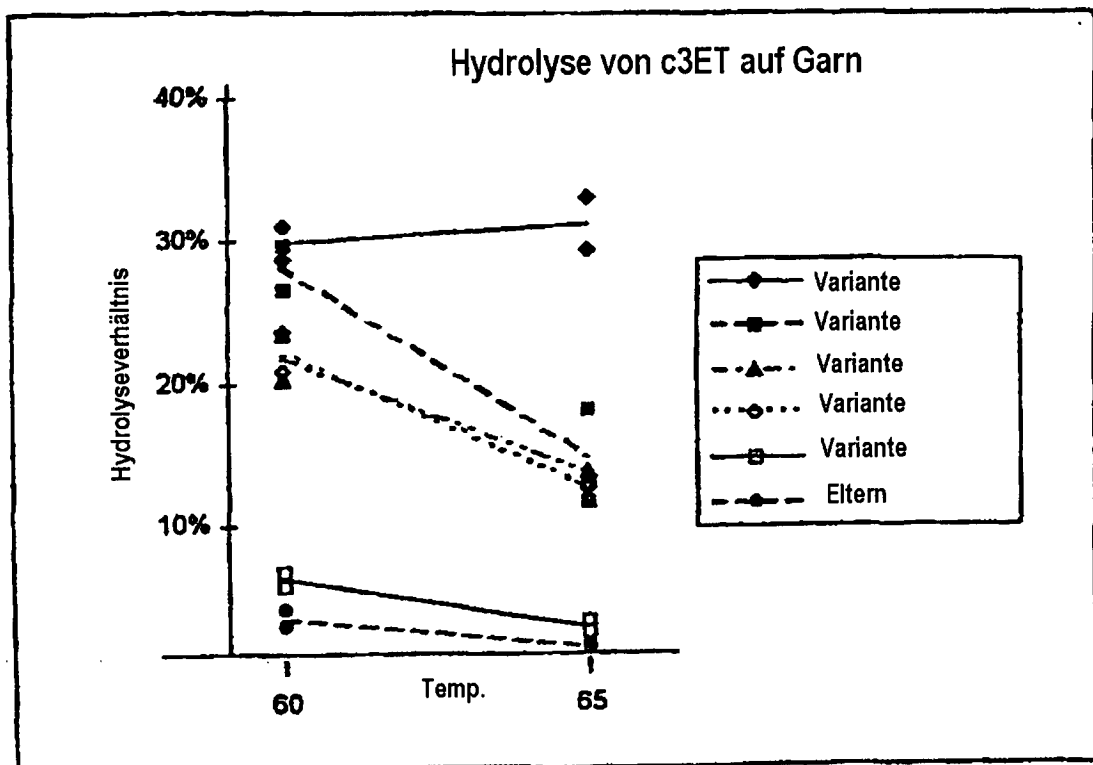
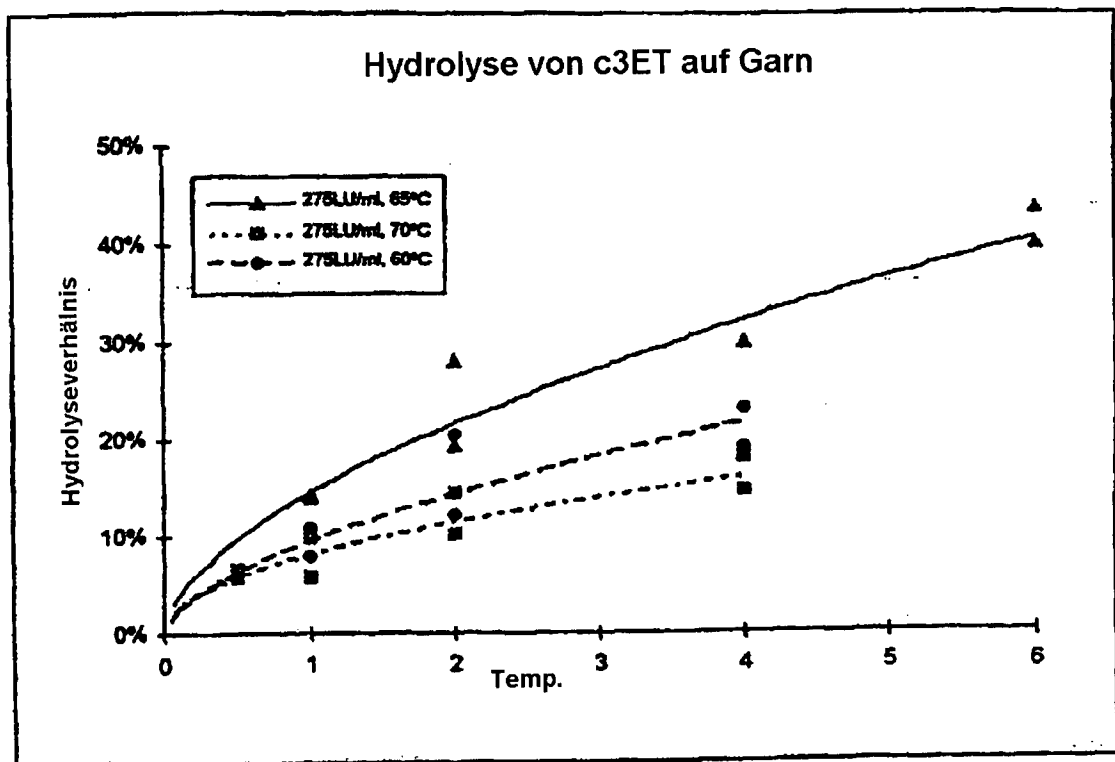


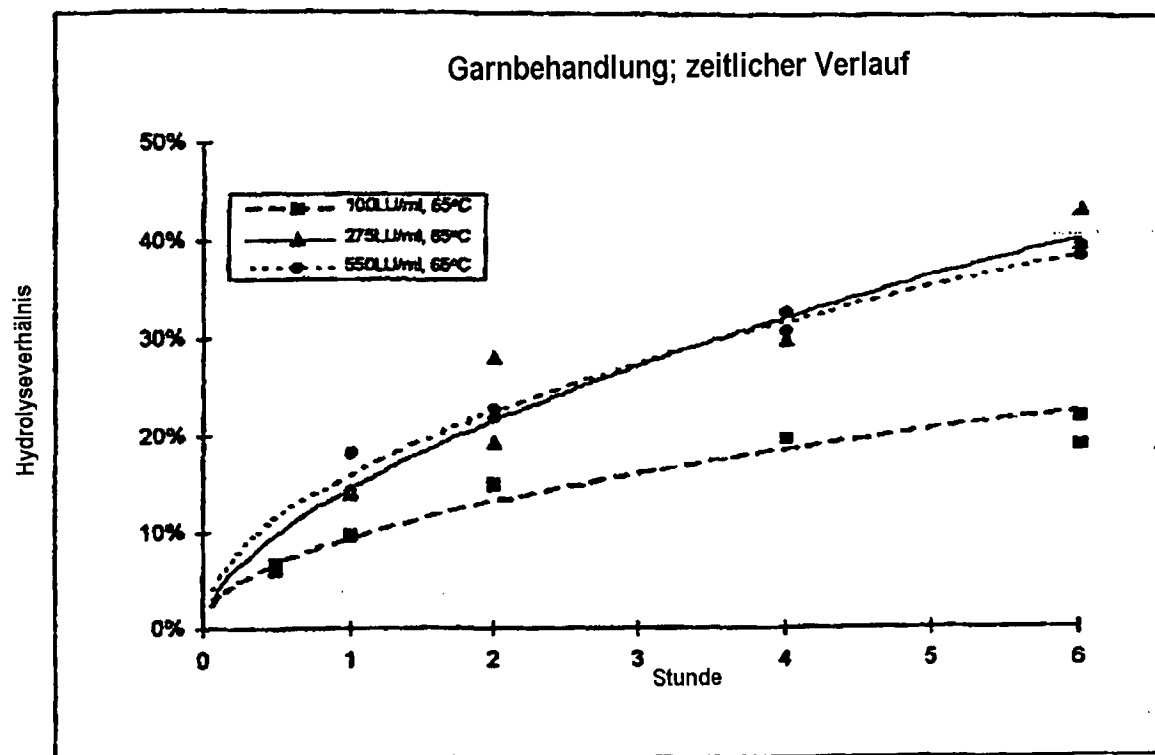
Fig. 3

Hydrolyse von festem c3ET, 2 h

**Fig. 4****Hydrolyse von c3ET auf Garn, 17 h**

**Fig. 5**

Garnbehandlung; zeitlicher Verlauf

**Fig. 6**

Garnbehandlung; zeitlicher Verlauf