

**UTILIZAÇÃO DA GFP (*Green Fluorescent Protein*) NA ANÁLISE
DA EVOLUÇÃO DIRIGIDA DA β -GLUCOSIDASE A DE
Fervidobacterium sp.**

ANDRÉ OLIVEIRA DE SOUZA LIMA

Biólogo

Orientadora: Profa. Dra. ALINE A. PIZZIRANI-KLEINER

Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade
de São Paulo, para a obtenção do título de
Doutor em Agronomia, Área de
Concentração: Genética e Melhoramento de
Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Janeiro - 2001

Errata:

- pag. iii – apoio financeiro = CNPq (bolsa de doutorado), CAPES (estágio no exterior)
- pag. xviii – PNP = ρ - nitrofenol
- pag. xviii – PNP α ou β piranosídeos = ρ - nitrofenil α ou β piranosídeos
- pag. xviii – CIAP = *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase* – fosfatase alcalina de intestino de bezerro
- pag. 3 – *beta can* = barril beta
- pag. 15, parag. 1, lin. 5 – 0,1% para 0,5% = 0,001 para 0,005
- pag. 18, parag. 2, lin. 4 – clivam = liberam
- pag. 25, item 3.1.5.12. – referência = Food Microbiology, 2000, v.17, p.217-223.
- pag. 28, parag. 1, lin. 4 – Imidizol = Imidazol
- pag. 36, item 3.2.23. – proteína padrão = BSA fração V
- pag. 47, parag. 2, lin. 3 – pBBGH = pBBSGH
- pag. 56, parag. 2, lin. 1 – a estrutura terciária não foi determinada para a fusão
- pag. 60, Tabela 5 – n.d. no desvio padrão = não foi possível determinar
- pag. 76, parag. I, lin. 4 – Figura 23 I, F, K, L = Figura 20 I, J, K, L

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Lima, André Oliveira de Souza

Utilização da GFP (*Green Fluorescent Protein*) na análise da evolução dirigida da β -glucosidase A de *Fervidobacterium* sp. / André Oliveira de Souza Lima. - - Piracicaba, 2001.

116 p. : il.

Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2001.
Bibliografia.

1. Bactéria termófila 2. Beta-glucosidase 3. Engenharia genética 4. Enzima 5. Gene marcador 6. Proteína recombinante I. Título

CDD 589.95

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte - O autor"

Data de depósito junto à CPG/ESALQ

26 / 01 / 2001

Dedico este trabalho às famílias Lima e Ávila
pelo amor e ajuda

e

ofereço em especial à minha esposa
Angela Carina Vendramini de Ávila Lima
por todo amor, colaboração, paciência e incentivo

AGRADECIMENTOS

- Dra. Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner, pela amizade e confiança durante todos esses anos.
- Dr. Douglas E. Eveleigh pela receptividade, ajuda, confiança e orientação do trabalho.
- Dr. Dinesh Yernool, pela ajuda e orientação
- Dr. Diane F. Davis, pela amizade, colaboração e orientação do trabalho.
- Dr. Wellington Luis de Araújo, pela amizade e ajuda durante os anos da pós-graduação.
- Dr. Marcelo Afonso Vallim, pela amizade e sugestões durante o doutorado.
- Dr. Walter Maccheroni Jr., pela amizade e ajuda durante o doutorado.
- Gavin C. Swiatek, pela receptividade, amizade e ajuda no trabalho.
- James McCarthy, pela amizade, orientação e discussões durante o trabalho.
- Dra. Salete Gaziola, pela amizade e colaboração no trabalho.
- Carlos Vildoso Aguilar, pela amizade durante a pós-graduação e ajuda no trabalho.
- Dr. Luiz Humberto Gomes e Dra. Cristina Falco pela amizade, paciência e ajuda no trabalho.
- Dr. Ricardo Antunes Azevedo e Dr. Márcio de Castro e Silva, pela utilização dos respectivos laboratórios.
- Dr. Raymond F. Sullivan e Daniel Gonzales, pela ajuda e sugestões ao trabalho.
- aos amigos dos laboratórios e funcionários da ESALQ-USP (Paulo Lacava, Joelma Marcon, Ágata Giancoli, Fernando Andreote, Fernando Barcelos, Leonardo Sousa, Ricardo Yara, Jucimary Marques, Cláudia Gai, Priscila Rosseto, Júlia Sobral, Marcelo Gullo, Maria Carolina, Zezo, Léia, Adriana, Neusa, Berdã, Fernando) e da Rutgers University (Joe Cagno, Peter Anderson, Allen, Arlen, Eillen, Kathy) pela amizade e colaboração no decorrer desses anos de pesquisa.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xvi
LISTA DE SIGLAS.....	xviii
RESUMO.....	xix
SUMMARY.....	xxi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Proteína de fluorescência verde (<i>Green Fluorescent Protein -GFP</i>)	3
2.1.1. Propriedades da GFP.....	3
2.1.1.1. Características e vantagens da utilização da GFP.....	3
2.1.1.2. Mutantes e fluorescência.....	4
2.1.1.3. Métodos de detecção.....	5
2.1.2. Aplicações da GFP.....	6
2.1.2.1. Monitoramento de células vivas no meio ambiente.....	7
2.1.2.2. Monitoramento de proteínas e promotores fusionados à GFP.....	8
2.1.2.2.1. Quantificação e produtividade.....	8
2.1.2.2.2. Localização e dinâmica celular.....	9
2.1.2.2.3. Estudo de promotores da transcrição gênica.....	10
2.2. Melhoramento de enzimas.....	11
2.2.1. Evolução dirigida.....	11
2.2.1.1. Métodos para a geração de diversidade.....	13
2.2.1.1.1. <i>Error Prone PCR</i> (EPP).....	14
2.2.1.1.2. PCR sexual.....	15

2.2.2.	Celulases e termoenzimas.....	17
2.2.2.1.	Celulose e degradação.....	17
2.2.2.2.	Celulases.....	18
2.2.2.3.	Termoenzimas e BglA de <i>Fervidobacterium</i> sp.....	19
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1.	Materiais.....	21
3.1.1.	Microrganismo.....	21
3.1.2.	Meios de cultura.....	21
3.1.2.1.	LB (Luria-Bertani).....	21
3.1.2.2.	Meio SOC.....	21
3.1.3.	Plasmídios.....	22
3.1.4.	Oligonucleotídeos.....	22
3.1.5.	Soluções e tampões.....	23
3.1.5.1.	Solução de ampicilina.....	23
3.1.5.2.	Solução de arabinose 20%.....	23
3.1.5.3.	Solução de NaOH.....	23
3.1.5.4.	Solução de MnCl ₂	23
3.1.5.5.	Solução de CaCl ₂	23
3.1.5.6.	Solução de brometo de etídio.....	23
3.1.5.7.	Solução X-gal (5-bromo 4-cloro 3-indolil β-galactosídeo).....	24
3.1.5.8.	Solução de glicina.....	24
3.1.5.9.	Solução de dNTPs para PCR.....	24
3.1.5.10.	Solução de dNTPs para <i>Error Prone PCR</i> (EPP).....	24
3.1.5.11.	Reagente de Bradford.....	24
3.1.5.12.	Soluções para coloração de gel de poliacrilamida com prata.....	25
3.1.5.12.1.	Solução fixadora.....	25
3.1.5.12.2.	Solução incubadora.....	25
3.1.5.12.3.	Solução de prata.....	25
3.1.5.12.4.	Solução reveladora.....	25
3.1.5.12.5.	Solução de interrupção.....	25
3.1.5.13.	Soluções para purificação por IMAC (<i>Imobilized Metal Affinity Chromathography</i>).....	26
3.1.5.13.1.	Solução A.....	26
3.1.5.13.2.	Solução B.....	26

3.1.5.13.3.	Solução de sulfato de níquel.....	26
3.1.5.14.	Solução de agarose.....	26
3.1.5.15.	Solução MU α -Glu (metil umbeliferil β -D-glucopiranosídeo).....	26
3.1.5.16.	Solução PMSF (Fenil Metil Sufonil Fluoride).....	27
3.1.5.17.	Solução de p -nitrofenol piranosídeos.....	27
3.1.5.18.	Tampão pipes.....	27
3.1.5.19.	Tampão para células.....	28
3.1.5.20.	Tampão mutagênico para <i>Error Prone PCR</i> (EPP).....	28
3.1.5.21.	Tampão TAE 50X.....	28
3.1.5.22.	Tampão de amostra para DNA.....	28
3.1.5.23.	Tampão de TrisHCl.....	28
3.2.	Métodos.....	29
3.2.1.	Esterilização.....	29
3.2.2.	Cultivo e estocagem.....	29
3.2.3.	Concentração celular.....	29
3.2.4.	Cultivo em microplacas para avaliação da biblioteca gênica da BglA.....	29
3.2.5.	Indução à expressão.....	30
3.2.6.	Replicação e manutenção dos plasmídios.....	30
3.2.7.	Produção de células competentes de <i>E. coli</i> para transformação por choque térmico.....	30
3.2.8.	Transformação de <i>Escherichia coli</i> por choque térmico.....	30
3.2.9.	Desenho de primers.....	31
3.2.10.	Síntese de oligonucleotídeos.....	31
3.2.11.	Concentração de DNA.....	31
3.2.12.	Condições de amplificação por reação de polimerase em cadeia (PCR).....	31
3.2.12.1.	Clonagem de GFP e BglA por PCR.....	32
3.2.12.2.	PCR longo para retirada do epítipo Myc.....	32
3.2.12.3.	<i>Error Prone PCR</i> (EPP)	32
3.2.13.	Preparo de pBBGH para construção da biblioteca gênica.....	33
3.2.14.	Construção de um espaçador.....	34
3.2.15.	Digestão com enzima de restrição.....	34
3.2.16.	Reação de ligação de DNA.....	34

3.2.17.	Defosforilação do DNA.....	34
3.2.18.	Limpeza de produto de PCR.....	35
3.2.19.	Extração de plasmídio.....	35
3.2.20.	Extração e purificação de bandas de gel.....	35
3.2.21.	Seqüenciamento automático.....	35
3.2.21.1.	Seqüenciamento automático total da fusão.....	35
3.2.22.	Eletroforese de DNA.....	35
3.2.23.	Quantificação de proteínas.....	36
3.2.24.	Eletroforese de proteínas.....	36
3.2.25.	Coloração de gel de poliácridamida com prata.....	36
3.2.26.	Extração de proteínas em larga escala (mg)	37
3.2.27.	Extração de proteínas em pequena escala (μ g).....	37
3.2.28.	Purificação da fusão via IMAC (<i>Imobilized Metal Affinity Chromathography</i>).....	38
3.2.28.1.	Purificação em larga escala da fusão via IMAC.....	38
3.2.28.2.	Purificação em pequena escala da fusão via IMAC.....	38
3.2.29.	Análise de estrutura primária da fusão.....	39
3.2.30.	Obtenção da estrutura terciária das proteínas.....	39
3.2.31.	Quantificação da atividade da β -glucosidase.....	39
3.2.31.1.	Quantificação da atividade da β -glucosidase em microplacas.....	39
3.2.31.2.	Quantificação da atividade da β -glucosidase em microtubos.....	40
3.2.32.	Quantificação da atividade da GFP em fluorímetro.....	40
3.2.32.1.	Ensaio em microplacas.....	40
3.2.32.2.	Ensaio em cubetas.....	40
3.2.33	Concentração de proteínas.....	41
3.2.34.	Índice (BglA/GFP).....	41
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.1.	Construção de um vetor para a expressão de fusões com GFP.....	42
4.1.1.	Clonagem do gene GFPmut3.1 no plasmídio pBADMyHis.....	42
4.1.2.	Obtenção de uma nova variante da GFP.....	44
4.1.3.	Obtenção de vetores que expressam a GFP309.....	44
4.2.	Construção, otimização da expressão e caracterização da fusão BglA-GFP.....	45
4.2.1.	Construção de vetores de expressão da fusão BglA-GFP.....	45

4.2.2.	Correlação entre a atividade de cada uma das proteínas que compõem a fusão.....	47
4.2.3.	Otimização da expressão da fusão.....	49
4.2.3.1.	Otimização da expressão da fusão em microplacas.....	49
4.2.3.1.	Otimização da expressão da fusão em 100 mL de meio.....	51
4.2.4.	Extração e purificação da fusão.....	53
4.2.5.	Caracterização da fusão.....	55
4.2.5.1.	Composição e estrutura molecular da fusão.....	55
4.2.5.2.	Temperatura ótima para a atividade da β -glucosidase.....	58
4.2.5.3.	Especificidade pelo substrato.....	59
4.2.5.4.	Termoestabilidade da GFP.....	60
4.3.	Obtenção e caracterização de moléculas mutantes da BglA.....	62
4.3.1.	Otimização das condições de <i>Error Prone PCR</i> (EPP).....	62
4.3.2.	Construção de uma biblioteca de clones mutantes via EPP.....	64
4.3.3.	Avaliação e seleção de clones mutantes da BglA em diferentes substratos.....	65
4.3.3.1.	Primeira fase de avaliação e seleção.....	65
4.3.3.2.	Segunda fase de avaliação e seleção.....	69
4.3.3.3.	Terceira fase de avaliação e seleção.....	72
4.3.4.	Caracterização dos clones mutantes selecionados.....	74
4.3.4.1.	Estabilidade plasmidial e expressão diferencial da β -glucosidase....	74
4.3.4.2.	Caracterização da fusão produzida pelos mutantes selecionados....	78
4.3.4.2.1.	Extração e purificação da fusão.....	79
4.3.4.2.2.	Atividade específica da β -glucosidase das fusões purificadas.....	81
4.4.	Correlação entre o índice (BglA/GFP) e a atividade específica da BglA das fusões - fatores que influenciam sua determinação.....	82
5.	CONCLUSÕES.....	85
	ANEXOS.....	87
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98

LISTA DE FIGURAS

Página

- 1 Fluorescência das colônias de *E. coli* expressando as diferentes construções obtidas. Cultivo em meio LB sólido e avaliação sobre luz UV. pBADMycHis- vetor de expressão utilizado como receptor da GFP; pGFPmut3.1- plasmídeo contendo o gene da GFPmut3.1.; A~F- construções obtidas para GFPmut3.1.; H- plasmídeo contendo o gene da GFP309; pBGH- vetor contendo GFP309 e cauda de histidinas; pBSGH- o mesmo que pBGH adicionado de espaçador antes da GFP; pBBGH- vetor expressando a fusão β -glucosidase e GFP309 com a cauda de histidinas; pBBSGH- o mesmo que pBBGH adicionado de um espaçador de 12 aminoácidos entre o gene da BglA e da GFP309..... 43
- 2 Diagrama esquemático do vetor pBBGH. Estão representados: AraC- ORF de AraC; pBAD- promotor arabinose; BglA- ORF da β -glucosidase A de *Feridobacterium* sp.; linker 6/12- espaçador com 6 aminoácidos (GTIWEF); GFP309- ORF da GFP309; linker- espaçador entre GFP e cauda His; His- cauda de 6 histidinas; stop- códon de término da tradução; Amp- resistência a ampicilina; pMB1 ori- origem de replicação derivada de pUC; SacI e KpnI - par de sítios de restrição usado na inserção da BglA; EcoRI e XbaI - par de sítios de restrição usado na inserção da GFP..... 46

- 3 Diferentes concentrações celulares e correlação entre a atividade da BglA e da GFP em células induzidas possuindo o vetor pBBSGH. As células foram cultivadas (14 h), concentradas e posteriormente diluídas em série com tampão Pipes. Foram determinadas a atividade da GFP e da β -glucosidase (substrato PNP β -Glu, reação por 10 min. a 70° C). Como controle negativo foi utilizada uma cultura não induzida..... 48
- 4 Dispersão dos valores obtidos para a atividade das proteínas que compõem a fusão BglA-GFP. Células de *E. coli* expressando a fusão codificada pelo vetor pBBSGH, foram cultivadas (19 h, 150 rpm, LB+arabinose 0.1 %) e distribuídas em alíquotas (75 μ L) em duas microplacas, sendo uma para quantificação da atividade da β -glucosidase (substrato PNP β -Glu, reação por 40 min. à temperatura ambiente) e outra para a GFP. As barras representam o desvio padrão em relação à média das amostras.... 48
- 5 Cultivo em microplacas e efeito da concentração de arabinose na atividade das proteínas da fusão, em função do tempo de cultivo. Células de *E. coli* portadoras do plasmídeo pBBGH foram cultivadas em microplacas (37 °C, 14 h, agitação de 150 rpm) contendo meio LB (200 μ L) suplementado com diferentes concentrações de arabinose (0, 0,01; 0,02; 0,1; 0,2; 1 %). Amostras de cada tratamento (9 repetições) foram coletadas a cada 1,5h. Após a coleta, as amostras foram submetidas a lise celular (15 min., 75 °C) e avaliadas quanto à atividade da GFP e da β -glucosidase (substrato PNP β -Glu, reação por 20 min. à temperatura ambiente, 75 μ L da amostra)..... 50

- 6 Cultivo de células de *E. coli* em Erlenmeyer e efeito da concentração de arabinose na atividade da fusão e no desenvolvimento da cultura. Os tratamentos (pBBGH e pBBSGH) foram inoculados (1 % de cultura previamente cultivadas por 18h) e incubados (600 mL de LB, agitação de 150 rpm, 37 °C) até obtenção de densidade celular apropriada (DO 0.6 a 600nm) para a indução. Após isso, a cultura foi subdividida (100 mL) em 5 frascos (Erlenmeyer 250 mL), induzida com diferentes concentrações de arabinose (0; 0,002; 0,02; 0,1; 0,2%) e incubada novamente. Amostras (2 mL) dos tratamentos foram coletadas a cada hora (0 e 3~12 h), submetidas à lise celular (15min., 75°C) e avaliadas para os ensaios A e B (5 repetições de 75 µL da amostra por ensaio). Em: A- quantificação da atividade da β-glucosidase (substrato PNPβ-Glu, reação por 7 min. à temperatura ambiente); B- quantificação da atividade da GFP; C- densidade celular (1 mL de amostra)..... 52
- 7 Cromatograma de purificação da fusão por IMAC evidenciando a atividade de cada proteína (BglA e GFP) nas diferentes frações coletadas. Para a purificação foi seguido o protocolo de larga escala. A atividade da β-glucosidase foi determinada com amostras de 75µL em reação com PNPβ-Glu por 2 min..... 53
- 8 Gel de eletroforese de proteína SDS-PAGE corado com prata, evidenciando a pureza da fusão BglA-GFP obtida após purificação por IMAC. Amostras: GFP (mut3.1.), fusão (BglA-GFP), marcadores de peso molecular (Mark 12- Novex) e respectivos pesos, do maior para o menor: miosina, β-glucosidase, fosforilase B, BSA, desidrogenase glutâmica, desidrogenase láctica, anidrase carbônica, inibidor de tripsina..... 55
- 9 Sequência de aminoácidos da fusão BglA-GFP-His. A cor do(s) segmento(s) refere-se à sua função. Sendo: preto- sítios de restrição e espaçador; azul- ORF da BglA; verde- ORF da GFP309; vermelho- cauda de histidinas..... 56

- 10 Estrutura terciária predita pelo Swiss Model para as proteínas que compõem a fusão. As seqüências primárias dos polipeptídeos (BglA, GFP309 e BglA-GFP309) foram analisadas e visualizadas como descrito no item 3.2.30, sendo apresentadas, em: A- a estrutura secundária e terciária da BglA, em vermelho região sem homologia a outras proteínas; B e C- vista superior e lateral, respectivamente da estrutura terciária da GFP309, em verde evidenciado a região cromofórica da proteína..... 57
- 11 Temperatura ótima de atividade para a β -glucosidase. Os dados referentes a fusão (Bgl-GFP) são apresentados na forma de médias (4 repetições) com seus respectivos desvios padrões (barras verticais). Estes foram obtidos a partir de reação (substrato PNP β -Glu, reação 10 min.) em diferentes temperaturas (40, 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 100 °C). Os resultados apresentados para a BglA não fusionada, foram obtidos por Davis et al. (2000)..... 58
- 12 Termoestabilidade da fusão (BglA-GFP309) e da GFP selvagem. Amostras puras de cada tratamento foram diluídas em tampão pipes e adicionadas de 0,1 % de BSA. Um total de 8mL de cada amostra foi submetido ao tratamento térmico (70 °C) por 21 h. Frações de 250 μ L foram coletadas nos diferentes tempos e avaliadas (3 repetições de 70 μ L) quanto a atividade da GFP. Os resultados são apresentados em fluorescência relativa (%), expressa pela razão entre a fluorescência no tempo X e no início do ensaio, multiplicada por 100..... 61
- 13 Gel de eletroforese de DNA apresentando amostras de diferentes testes realizados para otimização da reação de EPP. Em 1 e 2: amplificação (10 ng DNA molde; 300 μ M de MnCl₂) da BglA utilizando 14 e 16 ciclos de amplificação, respectivamente. Em 3 e 4: amplificação (20 ciclos; 10 ng de DNA molde) da BglA, reação adicionada de 0 e 300 μ M de MnCl₂, respectivamente. Em 5: marcador de DNA (1Kb, Gibco) e, ao lado, o respectivo tamanho das bandas em Kb..... 63

- 14 Relação entre a frequência de clones inativos e a quantidade de $MnCl_2$ utilizada na reação de EPP. Resultados obtidos com a avaliação de 1500~2000 clones por concentração de cloreto de manganês. Os mutantes ativos foram identificados como colônias azuis, após cultivo (24 h) em placa de Petri contendo LB suplementado com X-gal. A frequência de inativos foi determinada pela razão entre o número de colônias brancas em relação ao total (brancas+azuis). As barras verticais se referem ao desvio padrão em relação a média (4 repetições)..... 64
- 15 Gráfico de dispersão indicando a atividade produzida por cada um dos componentes da fusão (BglA e GFP) para os diferentes tratamentos analisados (clones mutantes, parental- pBBGH, pBGH e LB) durante a primeira fase de avaliação da população mutante. No gráfico superior, estão os resultados referentes ao teste com $PNP\beta$ -Glu (5 μ L de amostra, reação por 5,5min. a 75°C) e, no inferior, os dados do ensaio com $PNP\beta$ -Xil (25 μ L de amostra, reação por 1,5h a 65°C)..... 67
- 16 Distribuição dos índices obtidos para os clones mutantes e parental, segundo o tipo de substrato testado. Índice = $(BglA (U) /GFP (U)) \cdot 10^5$. Considerar eixo superior para a atividade da BglA sobre o substrato $PNP\beta$ -Xil e eixo inferior sobre $PNP\beta$ -Glu..... 68
- 17 Gráficos de dispersão considerando a atividade da β -glucosidase e da GFP, apresentadas pelos mutantes selecionados e parental. Cada quadro é relativo a um substrato testado. Para a quantificação da β -glucosidase as condições de reação utilizadas foram: $PNP\beta$ -Glu- amostra 10 μ L, reação 4min. a 70 °C; $PNP\beta$ -Xil- amostra 20 μ L, reação 35 min. a 65 °C; $PNP\alpha$ -Ara- amostra 20 μ L, reação 15 min. a 80 °C; $PNP\beta$ -Man- amostra 20 μ L, reação 1 h a 80 °C..... 70

- 18 Gráfico de dispersão considerando a atividade da BglA e da GFP, apresentadas pelos clones mutantes (círculo cheio) e parentais (triângulo vazio), em quatro substratos testados (PNP β -Glu azul; PNP β -Xil vermelho; PNP α -Ara laranja; PNP β -Man verde). São apresentadas as médias (2 repetições) referentes a 30 clones e 4 pBBGH (parental) testados em cada substrato. Após o cultivo (20 h), as amostras foram testadas para GFP e β -glucosidase (PNP β -Glu: amostra 10 μ L, reação 3 min. a 70°C; PNP β -Xil: amostra-20 μ L, reação 10 min. a 70 °C; PNP α -Ara: amostra 20 μ L, reação 6 min. a 80°C; PNP β -Man: amostra 20 μ L, reação 45 min. a 80 °C)..... 72
- 19 Índices apresentados pelos mutantes e parentais, quando incubados em diferentes substratos, obtidos pela razão entre a atividade da BglA (U) e a fluorescência da GFP (U) x 10⁶, nos diferentes substratos testados. As condições de quantificação da BglA foram: PNP β -Glu- amostra 10 μ L, reação 3 min. a 70°C; PNP β -Xil: amostra-20 μ L, reação 10 min. a 70 °C; PNP α -Ara: amostra 20 μ L, reação 6 min. a 80°C; PNP β -Man: amostra 20 μ L, reação 45 min. a 80 °C). As barras verticais se referem ao desvio padrão em relação à média das repetições..... 73
- 20 Morfologia das colônias de clones cultivados em placas de Petri contendo X-gal. Em A e B aspecto da placa de Petri com clones ativo (EPP16) e instável (EPP7), respectivamente. Em C e D vista ampliada do apresentado em A e B. Em E, exemplo de colônia ativa (EPP16), em G inativa (EPP7), em F e H instável com setores (EPP7). Em I, J, K, L estria do material cultivado para purificação de plasmídios, clones pBBGH, EEP6, EPP7, EPP9, respectivamente..... 75

- 21 Caracterização do plasmídeo de diferentes clones em gel de agarose. Considerar: I) DNA de colônia inativa, A) DNA de colônia ativa. Em a) experimento de linearização do plasmídeo presente nos diferentes clones. O plasmídeo foi extraído e digerido com KpnI; M) marcador Lambda HindIII (Gibco). Em b) amplificação por PCR do segmento que compreende a região da fusão (oligonucleotídeos 28 e 34, Tabela1; reação: 5' a 95°, 25 ciclos [15" a 94°C, 30" a 56°C, 2'30" a 72°C], 10' a 72°C); M) marcador 500pb DNA Ladder (Gibco)..... 77
- 22 Fluorescência em placa de Petri dos clones EPP selecionados. Os diferentes clones são designados pelo seu número de identificação. Também é apresentado o parental pBBGH e o outro vetor de expressão pBBSGH..... 78
- 23 Cromatograma da purificação da fusão (BglA-GFP) de alguns mutantes EPP. Em vermelho a absorbância (280 nm) das frações coletadas. Em C- carregamento da amostra; L- lavagem inicial (Imidizol 10 mM); P- pulso (Imidizol 40 mM); G- gradiente (Imidizol 40~200 mM); F- fusão pura eluída..... 80
- 24 Gel de eletroforese de proteínas SDS-PAGE com coloração de prata, apresentando amostras puras da fusão provenientes dos diferentes tratamentos, onde foram aplicadas cerca de 300ng de cada amostra pura. As amostras apresentadas são: EPP- clones EPP; G- GFP309; P- clone parental (pBBGH); M- marcadores de peso molecular (Sigma) e respectivos pesos do maior para o menor (BSA, ovoalbumina, gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase, anidrase carbônica) 80

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Lista dos oligonucleotídeos utilizados, respectivas seqüências e aplicações...	22
2 Lista dos substratos ρ -nitrofenol piranosídeos utilizados na determinação da atividade da β -glucosidase.....	27
3 Lista das polimerases utilizadas com respectivas origens e aplicações.....	32
4 Seqüência de aminoácidos e identificação das construções obtidas para a GFPmut3.1.....	43
5 Especificidade da β -glucosidase presente na fusão nos diferentes substratos e comparação dos resultados àqueles obtidos para a molécula selvagem. Para tanto, foram avaliadas 4 repetições de cada tratamento da fusão, sendo a reação (95 °C, 10 min.). Os dados da BglA selvagem foram determinados por Davis et al. (2000) a 70 °C. Para a obtenção da atividade relativa para a fusão nos diferentes susbtratos, foi utilizada como referência a atividade máxima específica obtida com PNP β -Glu.....	60
6 Efeito da normalização da BglA pela GFP no coeficiente de variação dos diferentes tratamentos.....	71
7 Proporção dos tipos de colônias que se desenvolveram após o cultivo dos diferentes clones em placa de Petri, contendo meio LB suplementado com arabinose, ampicilina e X-gal.....	76

- 8 Atividade da β -glucosidase e da GFP apresentadas pelas fusões purificadas a partir dos clones selecionados EPP e controle. Para a quantificação da β -glucosidase, o ensaio foi realizado em duplicata com 20ng de proteína a 75°C (tempo de reação: PNP β -Glu 5'; PNP β -Gal 10'; PNP β -Xil 100'; PNP α -Ara 20')..... 82

LISTA DE SIGLAS

GFP = *green fluorescent protein*, proteína de fluorescência verde

BglA = β -glucosidase A de *Feravidobacterium* sp.

PCR = *polimerase chain reaction*, reação em cadeia de polimerase

EPP = *error prone PCR*, reação em cadeia de polimerase com tendência ao erro

U = unidade de atividade

BglA/GFP = razão entre a atividade da BglA e a fluorescência da GFP

PNP= *p*-nitrofenol piranosideo

PNP β -Glu= *p*-nitrofenol β -glucopiranosideo

PNP α -Glu= *p*-nitrofenol α -glucopiranosideo

PNP β -Gal= *p*-nitrofenol β -galactopiranosideo

PNP α -Gal= *p*-nitrofenol α -galactopiranosideo

PNP β -Xil= *p*-nitrofenol β -xilopiranosideo

PNP β -Ara= *p*-nitrofenol β -arabinopiranosideo

PNP α -Ara= *p*-nitrofenol α -arabinopiranosideo

PNP β -Man= *p*-nitrofenol β -manopiranosideo

MU α -Glu= 4-metilumbelifenil α -glucopiranosideo

MU α -Man= 4-metilumbelifenil α -manopiranosideo

IMAC- *Imobilized Metal Affinity Chromathography*, Cromatografia de afinidade por Metal imobilizado

h = horas

min.= minutos

seg. = segundos

DO = densidade optica

ORF = *open reading frame*, quadro aberto de leitura

pb = pares de bases

Kb = kilo bases

NCBI = National Center for Biotechnology Information

UTILIZAÇÃO DA GFP (*Green Fluorescent Protein*) NA ANÁLISE DA EVOLUÇÃO DIRIGIDA DA β -GLUCOSIDASE A DE *Fervidobacterium* sp.

Autor: ANDRÉ OLIVEIRA DE SOUZA LIMA
Orientadora: Profa. Dra. ALINE A. PIZZIRANI-KLEINER

RESUMO

As enzimas são amplamente empregadas na indústria (fármacos, alimentos, tintas, biodegradação, etc), devido a sua capacidade de catalisar reações biológicas. Atualmente, a evolução dirigida permite a obtenção de enzimas mais eficientes e/ou estáveis. Este método consiste em gerar variabilidade por meio do PCR, introduzindo mutações aleatórias na molécula de DNA que codifica a proteína de interesse. Em seguida, faz-se a clonagem do DNA mutante e, posteriormente, a avaliação e seleção dos clones desejáveis expressando a proteína de interesse. Dessa forma, o presente trabalho teve por objetivo integrar à este sistema de melhoramento de proteínas, a utilização da *green fluorescent protein* (GFP) como um gene repórter, a fim de que este, por meio de sua fluorescência, auxiliasse o processo de seleção das moléculas mais ativas. Neste estudo, foi utilizada como modelo a β -glucosidase A (BglA) de *Fervidobacterium* sp. (Sullivan et al., 1998), de interesse na biodegradação da celulose devido a sua termoestabilidade. O gene desta enzima, bem como o da GFP (pGFPmut3.1, Clontech), foram clonados num vetor de expressão (pBADMyHis, Invitrogen) induzível por arabinose. Para tanto, uma série de plasmídios, bem como uma nova variável da GFP (GFP309), foram criados resultando nos vetores pBBGH e pBBSGH. Estes vetores binários conferiram às células de *Escherichia coli* a capacidade de produção de uma proteína quimérica ativa, composta pela BglA fusionada à GFP, seguida de uma cauda de 6 histidinas. A produção desta fusão foi

otimizada, seguida de sua purificação (*Imobilized Metal Affinity Chromathography - IMAC*) e caracterização (temperatura ótima, especificidade pelo substrato, termoestabilidade, etc). Foram estabelecidas as condições para a obtenção de moléculas mutantes da BglA por meio da técnica de *Error Prone PCR* (EPP), sendo construída uma biblioteca de clones mutantes, que foram avaliados por meio do índice obtido entre a atividade da BglA e a fluorescência da GFP (BglA/GFP). Os clones com superior índice (BglA/GFP) foram selecionados e suas respectivas fusões purificadas e caracterizadas. Não foi verificada correlação entre este índice e a atividade específica da BglA nas fusões mutantes purificadas. Aqui são sugeridas as fontes de variação que reduziram a correlação entre estes parâmetros e, entre elas, são consideradas: a interação entre as moléculas que compõem a fusão, a instabilidade plasmidial, a suscetibilidade da fusão à proteólise e a não automatização total dos ensaios.

USE OF GFP (*Green Fluorescent Protein*) IN A DIRECTED EVOLUTION APPROACH OF THE β -GLUCOSIDASE A OF *Fervidobacterium* sp.

Author: ANDRÉ OLIVEIRA DE SOUZA LIMA
Adviser: Profa. Dra. ALINE A. PIZZIRANI-KLEINER

SUMMARY

Enzymes are proteins able to catalyze biological reactions and for this reason they are largely used in biotechnological processes (drugs, food, paint, fuel, bioconversion, etc). Today, one of the most promising strategy of engineering proteins to obtain more active and/or stable molecules is the directed evolution. This approach is based on the generation of variability through the obtaintion of mutant DNA molecules that codify the protein of interest, followed by its screening. The present work was aimed to integrate to this evolutionary method, the use of the green fluorescent protein (GFP) as a reporter. In this case the GFP will work as a tool aiding the process of selection of the most active molecules. In this study, β -glucosidase A (BglA) of *Fervidobacterium* sp. (Sullivan et al., 1998) was used as a model, an enzyme that is of biotechnological interest in cellulose degradation due to its thermostability. The gene of this enzyme, as well the one that codifies the GFP protein (pGFPmut3.1- Clontech), were cloned into a vector (pBADMyHis- Invitrogen). After the construction of a serie of plasmids and the obtaintion of a new derived GFP molecule (GFP309), a final pair of expression vectors (pBBGH and pBBSGH) were obtained. The expression of those vectors allowed *Escherichia coli* cells to produce a chimeric active protein, composed by the BglA fused to GFP, and these, linked to a histidine tag. The fusion production was optimized, followed by its purification (Ion Metal Affinity Chromathography - IMAC) and characterization (optimal temperature, substrate specificity, thermostability). Based

on the existence of a proportion of 1:1 between the number of molecules of each protein in the fusion, the selection of enhanced BglA mutants was studied through the index obtained by the ratio between the BglA activity and the GFP fluorescence (BglA/GFP). In order to do that, the conditions to produce mutant molecules of BglA were established by the Error Prone PCR technique. A library of mutant molecules was built and evaluated in *Escherichia coli*. Some clones were selected through the index (BglA/GFP), and then its fusion was purified and characterized. No correlation was verified between the index obtained and the specific activity of BglA from pure fusion samples. Based on the assays performed, some of the sources that could be generating the difference observed between the index and the specific activity of the fusion are suggested: the different interaction among the molecules that compose the fusion, the plasmidial instability, susceptibility of the fusion to proteolysis, and non totally automated assays.

1. INTRODUÇÃO

Enzimas são proteínas capazes de catalisar reações biológicas *in vivo* ou *in vitro*. Esta propriedade é de grande interesse em processos biotecnológicos, na indústria farmacêutica, alimentícia, entre outras diversas. Objetivando aumentar a eficiência da catálise mediada pelas enzimas, estas moléculas vem sendo submetidas a programas de melhoramento, que visam, de maneira geral, a obtenção de proteínas mais ativas e/ou estáveis, além da criação de moléculas com novas atividades.

Entretanto, a construção racional de moléculas mais apropriadas aos vários processos é dificultada pela complexidade da relação existente entre a seqüência de aminoácidos e a estrutura tridimensional da proteína, estrutura esta responsável por suas propriedades e características. Nesse sentido, foi proposta uma nova estratégia para a obtenção de enzimas melhoradas, chamada de evolução dirigida. Por meio dessa metodologia, tenta-se simular *in vitro* os processos que ocorrem na evolução das espécies, isto é, geração e amplificação da variabilidade, seguidos de seleção.

Numa primeira etapa a variabilidade é gerada por meio de mutações pontuais. Estas são introduzidas aleatoriamente no DNA que codifica a proteína de interesse, por uma técnica conhecida como *Error Prone PCR* (EPP). Em seguida, é feita a seleção das moléculas com as características desejáveis. As moléculas selecionadas podem, então, ser submetidas a um novo ciclo de EPP, ou serem dirigidas ao processo de amplificação da variabilidade. A amplificação é realizada pela técnica de PCR sexual ou evolução *in vitro*, a qual permite a recombinação de segmentos do DNA proveniente das moléculas selecionadas. Por fim, são realizados vários ciclos de geração, amplificação e seleção das enzimas com as propriedades de interesse.

Atualmente, são vários os relatos de êxito na utilização da estratégia de evolução dirigida para a obtenção de proteínas mais ativas e resistentes. Esta estratégia porém, requer que um grande número de moléculas ou clones sejam

avaliados ($10^3\sim 10^6$), que acarreta em um alto custo para o sistema devido à automatização requerida para obtenção (cultivo e preparo) e avaliação (purificação e quantificação) das amostras.

O presente trabalho visa integrar ao processo de evolução dirigida, as vantagens proporcionadas pela proteína de fluorescência verde (*green fluorescent protein*), mais conhecida como GFP. Esta proteína, devido a sua capacidade de fluorescer e permitir sua detecção de maneira não invasiva, tornou-se, em menos de 10 anos, o marcador biológico mais utilizado em diversas pesquisas. A GFP já foi aplicada nos mais diferentes tipos de células e com os mais distintos objetivos, como o estudo de eventos celulares (regulação da síntese, transporte e secreção de proteínas), no monitoramento da distribuição de microrganismos no ambiente, no acompanhamento da produção de moléculas de interesse, entre outros.

Com o objetivo de estudar o uso da GFP como um marcador quantitativo num programa de evolução dirigida e assim auxiliar a seleção de enzimas melhoradas, sem que essas sejam purificadas, foi utilizada como modelo de enzima a β -glucosidase A (BglA) de *Fervidobacterium* sp., celulase esta de grande interesse biotecnológico (vinho, papel e etanol) devido a sua termoestabilidade (Davis et al., 2000). Para tanto, considerou-se que a atividade da BglA e da GFP apresentaria uma relação 1:1, sendo assim, possível determinar o número de moléculas ativas da BglA, por meio da fluorescência da GFP. Considerando este fato, foi proposto que o índice formado pela razão obtida entre atividade da enzima e a fluorescência da GFP (BglA/GFP), poderia ser semelhante ao valor obtido para atividade específica da enzima.

A fim de testar essa hipótese o presente trabalho tem como objetivos específicos:

- a construção de um vetor de expressão binária para *E. coli* produzindo a quimera proteica formada pela BglA fusionada a GFP.
- otimização da produção, purificação e caracterização da fusão BglA-GFP.
- obtenção e avaliação de uma banco de genes, expressando moléculas mutantes da BglA ligadas à GFP.
- purificação e caracterização da fusão produzida pelos clones selecionados pelo índice (BglA/GFP).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Proteína de fluorescência verde (*Green Fluorescent Protein* - GFP)

2.1.1. Propriedades da GFP

A proteína de fluorescência verde, mais conhecida como *green fluorescent protein* ou GFP, é uma molécula capaz de fluorescer na presença de luz UV. No início da década, o gene responsável pela sua expressão foi clonado por Prasher et al. (1992) a partir do cnidário *Aequorea victoria*. Logo após a descrição de suas primeiras aplicações como um gene repórter transgênico (Chalfie et al., 1994), tornou-se uma das ferramentas mais utilizadas em estudos de biologia molecular. Nesta revisão, são apresentadas as características e as mais recentes aplicações desta proteína como um marcador em algumas áreas da Biologia.

2.1.1.1. Características e vantagens da utilização da GFP

A principal característica da GFP é a fluorescência proporcionada por sua estrutura terciária, chamada de *beta-can*, a qual possui em seu interior a região cromofórica responsável pela fluorescência. Tal propriedade permite que esta proteína, de detecção não invasiva, seja utilizada como um eficiente gene marcador *in vivo*. A GFP tornou-se importante também devido ao seu reduzido tamanho, alta estabilidade e fácil detecção.

A molécula selvagem da GFP possui 238 aminoácidos, sendo que grande parte da estrutura primária (resíduos 2 a 232) exerce função catalítica durante a formação do cromóforo (Dopf & Horiagon, 1996). Devido a seu tamanho, a GFP pode ser facilmente clonada em diferentes vetores (plasmídios, cosmídios e bacteriófagos) e expressa nos mais variados tipos celulares (vírus, procariotos, eucariotos inferiores e superiores) (Tsien, 1998). Uma vez formada, apresenta-se estável em diferentes tampões e temperaturas por longos períodos de tempo (Yang et al., 1996; Lim et al.,

1995). Entretanto, a redução da meia vida da sua atividade em células de camundongos, foi constatada pela introdução aleatória de sítios proteolíticos na seqüência original (Corish & Tyler, 1999). A sensibilidade da GFP foi demonstrada ser semelhante à apresentada pelo marcador β -galactosidase, quando testada em células de *Escherichia coli* (Lissemore et al., 2000). No entanto, quando testada em células de *Drosophila*, detectou-se que, dependendo do tecido, um marcador pode ser mais eficiente que o outro (Timmons et al., 1997).

2.1.1.2. Mutantes e fluorescência

A fluorescência apresentada pela GFP selvagem pode ser obtida pela excitação desta molécula com luz ultravioleta a 395 nm e a detecção da fluorescência emitida a 510 nm em fluorímetro. Porém, é sabido que uma pequena porcentagem das GFPs ativas apresentam uma forma ionizada, a qual somente é excitada a 447 nm (Brejc et al., 1997).

Atualmente, inúmeras variantes da molécula original ou selvagem foram criadas com a finalidade de apresentarem características específicas como maior fluorescência, cores diferentes, rápida ativação, alta solubilidade, afinidade por sítios e sais e outras. Um exemplo é a GFP obtida por Miller & Lindow (1997), a qual é 60 vezes mais fluorescente que a selvagem quando expressa em *E. coli*. Esta molécula foi obtida pela combinação da mutação presente na variante *red-shift* (serina 65 para treonina), que confere alta fluorescência (Heim et al., 1995), com a mutação de alta solubilidade (fenilalanina 64 para leucina) anteriormente descrita por Cormack et al. (1996).

Outros casos de aumento de fluorescência foram relatados: Cinelli et al. (2000) obtiveram, por mutações específicas, uma molécula muito ativa designada de *enhanced GFP*; já Cramer et al. (1996) construíram, por meio da estratégia de evolução dirigida, uma molécula 42 vezes mais fluorescente que a selvagem, quando expressas em células de camundongos ou em *E. coli*.

A seleção de GFPs mais apropriadas ao organismo hospedeiro, também foi conduzida por Natarajan et al. (1998), que objetivaram a seleção das moléculas mais ativas em células CHO de camundongo e em leveduras. No mesmo sentido, Wu et al.

(1997), obtiveram variantes azuis e amarelas, otimizadas para a expressão em baculovírus.

Também foram construídas moléculas de GFP com afinidade específica, como a variante com afinidade por metais foi obtida por Richmond et al. (2000). Já Persechini et al. (1997) e Baubet et al. (2000), construíram variantes da GFP com afinidade por cálcio (Ca^{+2}), sendo que os primeiros autores obtiveram a variante com afinidade por Ca^{+2} por meio da inserção, na GFP, de um segmento da seqüência da camodoluina, a qual tem afinidade por Ca^{+2} . Bogdanov Jr. et al. (1998) desenvolveram uma GFP que, ligada a jusante a um determinado segmento hidrofóbico, conferiram à esta a afinidade pelo isótopo tecmetato.

Durante a obtenção desses mutantes, tais modificações na estrutura primária podem também acarretar alteração de outras características de importância, assim como a verificada por Heim & Tsien (1996), onde foi observada, durante a obtenção da variante azul, uma redução na fluorescência, bem como mudança no comprimento de onda de excitação.

2.1.1.3. Métodos de detecção

Juntamente com o desenvolvimento de novas variantes da GFP, os métodos de detecção da fluorescência também evoluíram, procurando aplicar tal ferramenta nos mais diferentes tipos de estudos. Portanto, além da avaliação direta em fluorímetro, atualmente também se utiliza a visualização em microscópio de fluorescência e confocal, entre outros.

Com o intuito de reduzir a interferência da fluorescência emitida naturalmente pelos diferentes tipos de células, Cronin & Hampton (1999) desenvolveram uma série de filtros para visualização de leveduras. Neste contexto, Niswender et al. (1995) desenvolveram um espelho dicróico de corte para reduzir a fluorescência amarela proveniente de células de mamíferos (HeLa), na avaliação de amostras sob microscópio a laser confocal. Mainen et al. (1999) construíram um microscópio específico, chamado de *2-photon excitation laser scanning microscopy* (TPLSM), o qual viabilizou a avaliação da dinâmica da morfologia de neurônios pela fluorescência da GFP como gene marcador.

Plautz et al. (1996) desenvolveram um sistema de quantificação da GFP via imagem 3D, o qual foi aplicado em *Drosophila melanogaster*, em células de soja e de mamíferos. Foi desenvolvido também um sistema de avaliação da fluorescência denominado de microscópio de correlação, com o qual foi possível quantificar a atividade desde poucas até milhares de moléculas da GFP, tendo sido especulada sua aplicação em estudos baseados na avaliação de muitas amostras (*high throughput put screening*) (Brock et al., 1999).

Diante das variantes da GFP existentes, foram desenvolvidos sistemas de dupla fluorescência. Estes, em sua maioria aplicados em células de mamíferos, relataram a eficiente distinção da fonte de fluorescência. Foram testados sistemas com duas GFPs que emitem fluorescência em distintos comprimentos de onda (Anderson et al., 1996), bem como proteínas com cores diferentes (amarela e azul) (Rustom et al., 2000), ou até mesmo a GFP combinada com luciferase (Day et al., 1998; Liu et al., 2000).

A fim de reduzir a sobreposição de fluorescências, ao avaliar simultaneamente duas GFPs distintas, Ellenberg et al. (1998) avaliaram por longo tempo as amostras sob microscópio confocal e, em seguida, corrigiram os resultados obtidos em programa projetado especificamente para este propósito.

2.1.2. Aplicações da GFP

A utilização da GFP como um marcador, tem permitido o desenvolvimento de diferentes tipos de estudos que, em sua maioria, preconizam a utilização da GFP fusionada a um promotor e/ou a uma proteína específica, a fim de monitorar o organismo vivo (Callus & Mathey, 1999; Poppenborg et al., 1997; Burlage et al., 1996) ou sua dinâmica intracelular (Baubet et al., 2000; Webb et al., 1995; Subramanian & Srien, 1996). Revisões podem ser encontradas em Tsien (1998), Phillips (1997) e Kendall & Badminton (1998).

Outras aplicações tais como a exposição de GFP (*GFP display*) (Aoki et al., 2000), também foram testadas quanto à determinação da composição de aminoácidos específicos em um peptídeo ligado à GFP, baseando-se no padrão de migração da fusão em gel SDS; ou ainda, o monitoramento de eventos da conjugação em

Pseudomonas putida pela transferência do gene que codifica a GFP (Christensen et al., 1996).

Além do sistema padrão, que é somente a GFP ligada a um promotor e/ou a uma proteína específica, também existem os vetores com mais genes repórteres. Estes podem ser de dupla fluorescência como descrito no item 2.1.3., ou ainda, a GFP combinada à β -galactosidase (Timmons et al., 1997; Ross et al., 1997), normalmente relatado como capaz de conferir vantagens na detecção ou quantificação da atividade.

2.1.2.1. Monitoramento de células vivas no meio ambiente

O monitoramento de células vivas é uma das grandes vantagens proporcionadas pela marcação de organismos com GFP. Nesse sentido, tem-se estudado, principalmente em células microbianas, a distribuição destas em sistemas abertos ou fechados (Errampalli et al., 1999).

Com o intuito de monitorar a migração e a distribuição de células bacterianas de *E. coli* e *Pseudomonas putida* na areia, estes microrganismos foram marcados com GFP (Burlage et al., 1996). O mesmo princípio foi utilizado por Sternberg et al. (1999), a fim de monitorar a formação de biofilmes, ou ainda, na identificação de *Azoarcus* expressando os genes *nif* ligados à GFP (Egener et al., 1998).

A fim de avaliar a interação entre microrganismos fitopatogênicos e seus respectivos hospedeiros, foram desenvolvidos ensaios nos quais tais patógenos foram marcados com GFP e posteriormente monitorados. Como exemplo, tem-se o monitoramento de *Erwinia amylovora* durante a penetração em macieiras (Biggs & Geider, 1999), ou a síntese de poligalacturonase por *Colletotrichium lindemuthianum* durante a infecção de feijão (Dumas et al., 1999). Além desses, também foram avaliados, em meio de cultura, *Agrobacterium tumefaciens* (Li et al., 1999) e *Phytophthora parasitica* (Bottin et al., 1999) marcados com GFP.

Por meio do monitoramento da fluorescência também foram estudados outros tipos de infecção, como as infecções entéricas provocadas por bactérias patogênicas em células epiteliais humanas (Valdivia et al., 1996), ou a infestação por

acantamoeba (Koehler et al., 2000) e *Listeria monocytogenes* (Fortineau et al., 2000), sugerindo-se um possível monitoramento em tempo real do processo infeccioso..

2.1.2.2. Monitoramento de proteínas e promotores fusionados à GFP

2.1.2.2.1. Quantificação e produtividade

Com o intuito de acompanhar a produção de determinada molécula de interesse sem que seja necessário quantificá-la especificamente, faz-se a expressão desta fusionada à GFP e, então, monitora-se a produtividade da molécula de interesse por meio da fluorescência emitida pela fusão. Este princípio já foi testado de várias formas, apresentando em sua maioria resultados positivos. Recentemente, Waldo et al. (2000) relataram o uso da GFP como gene repórter da ativação, com mais de 20 proteínas citoplasmáticas diferentes de *Pyrobaculum aerophilum* testadas em *E. coli*.

Dabrowski et al. (1999) expressando em *E. coli* a pró-insulina humana ligada à proteína de fluorescência amarela, relataram manutenção da relação entre a atividade das proteínas, sendo possível estimar a quantidade da pró-insulina via fluorescência. Uma linearidade semelhante foi observada com a expressão da interleucina (Cha et al., 2000) e cloranfenicol (Albano et al., 1998) em *E. coli*, mesmo quando as proteínas que compõem a fusão foram traduzidas independentemente, devido à presença de um segundo sítio de ligação do ribossomo (Delisa et al., 1999).

O monitoramento da produção em células de mamíferos também foi especulado. Nesse sentido, Meng et al. (2000) conseguiram expressar diferentes proteínas (neurotrofina 3, deoxirribonuclease, fator de crescimento de tecido endotelial vascular) em células de ovário fusionadas à GFP, sendo possível a discriminação das células mais produtivas por FACS (*fluorescence activated cell sorting*). Já Subramanian & Srienc (1996) avaliaram a expressão da GFP por citometria de fluxo, sendo também possível identificar as células ativas.

Observando sob microscópio a fluorescência emitida pela fusão da calretinina-GFP, expressa em células de teratocarcinomas, Kack et al. (2000), foram capazes de estabelecer uma relação entre a atividade das proteínas e monitorar a dinâmica celular pela fluorescência.

Células fúngicas de *Aspergillus niger* também já foram monitoradas pela fluorescência durante a expressão de glucoamilase fusionada à GFP (Gordon et al., 2000). O mesmo foi descrito para uma protease humana de HIV no bacteriófago T4 (Mullaney & Black, 1998)

Também em células de insetos, a produtividade de proteínas de interesse ligadas à GFP, pode ser monitorada pela fluorescência. Por exemplo, Eriksson et al. (1996) expressaram a melitina de abelhas fusionada à GFP sobre controle de um promotor de poliedrina do vírus *Autographa californica* e avaliaram a fluorescência por citometria de fluxo.

No mesmo sentido, Cha et al. (1999a) expressaram em células de inseto a interleucina 2 de humanos fusionada à GFP. Neste caso, foi adicionado à fusão um espaçador contendo um sítio para uma enteroquinase e também uma cauda de histidinas (6XHis). A 6xHis é um segmento que facilita a posterior purificação da fusão por cromatografia de afinidade por metal imobilizado (*Immobilized Metal Affinity Chromathography* - IMAC). O mesmo tipo de cauda também foi utilizado por outros autores (Nordström et al., 1999; Poppenborg et al., 1997; Negro et al., 1997) ao purificarem a GFP, sendo relatado como eficiente essa estratégia na purificação de diferentes proteínas.

2.1.2.2.2. Localização e dinâmica celular

A fim de localizar a ocorrência da síntese e transporte dos diferentes componentes celulares, bem como fornecer informações relativas à dinâmica geral da célula, também tem sido utilizada a GFP fusionada a diferentes promotores e proteínas (Gerdes & Kaether, 1996). Em *Saccharomyces cerevisiae*, por exemplo, já foi monitorado o transporte de hexoses em diferentes meios de cultivo (Kruckeberg et al., 1999). Merkulov & Boeke (1998) utilizando um transposon desta levedura contendo a GFP, propõem, por esse sistema, a localização celular de proteínas e sinais. Entretanto, Kunze et al. (1999), também trabalhando com *S. cerevisiae*, descreveram que durante a avaliação da secreção de uma quitinase ligada à GFP, a fusão era transportada para o vacúolo, independentemente da presença ou ausência de seqüência sinal de secreção, sugerindo dificuldades na utilização desse sistema para monitorar a secreção.

O mesmo sistema foi utilizado em plantas, permitindo estudos de sinais de transporte para plastídeos em *Arabidopsis* (Tirlapur et al., 1999) e também para o núcleo em tabaco (Grebenok et al., 1997). Quando expressa em *Arabidopsis thaliana* e em células de cebola e couve-flor, a GFP dirigiu-se para o núcleo independentemente da presença de seqüência sinal, sendo tal distribuição relacionada à capacidade da GFP em se difundir através do núcleo (Von Arnim et al., 1998).

Já em mamíferos, além da localização de enzimas como a colina acetil-transferase e a identificação de sua seqüência sinal (Resendes et al., 1999), fusões com GFP também permitiram monitorar a distribuição de vírus em células da cóclea de porcos (Lalwani et al., 1997), ou ainda, a migração de células em metástases até o pulmão em camundongos (Schmidt et al., 1999).

Condições que induzem ao estresse celular já foram identificadas por meio do monitoramento da fluorescência emitida pela GFP ligada a um promotor de proteína de choque térmico (Cha et al., 1999b), assim como na detecção de eventos relacionados à apoptose, por meio da ligação da anexina V à GFP (Emst et al., 1998), ou ainda no monitoramento da esporulação em *Bacillus* (Webb et al., 1995).

2.1.2.2.3. Estudo de promotores da transcrição gênica

A aplicação da GFP em estudos de promotores da transcrição gênica, também tem sido de grande valia. Estes estudos visam a identificação de novos promotores, bem como a caracterização dos já conhecidos. Ouahrani et al. (1999) propõem o uso da GFP na identificação de promotores oriundos de bactérias gram-negativas. Já Cassata et al. (1998), valorizam a GFP na discriminação de promotores putativos identificados em projetos genomas, exemplificando com o uso em *Caenorhabditis elegans* com um gene homeobox *ceh-38*.

Visando o estudo de promotores conhecidos ligados à GFP, diferentes células hospedeiras já foram testadas. Por exemplo, o promotor *ceccropin* de insetos em peixe-gato (Zhang et al., 1998), promotores alfa e beta actina em peixe-zebra (Higashijima et al., 1997) e outros promotores (CMV- *citomegalovirus enhancer promoter* e CKM- promotor da creatina quinase) em tecido muscular de camundongos (Bartlett et al., 1996).

Também já foi descrita variação na fluorescência com a utilização de um mesmo promotor constitutivo expressando em diferentes tecidos vegetais (Blumenthal et al., 1999). Expressão diferenciada também foi verificada por Scholz et al. (2000), constatando-se redução (50%) na fluorescência com a utilização de um promotor muito forte (hsp60) ligado à GFP, em *E. coli*.

2.2. Melhoria de Enzimas

As enzimas exibem poder catalítico realmente extraordinário, incomparável aos catalisadores convencionais. Entre suas aplicações encontra-se a síntese química e a produção de alimentos e fármacos. Todavia, as enzimas que ocorrem naturalmente não suprem as exigências das indústrias, porque nestas as condições exigidas são muitas vezes diferentes daquelas observadas na natureza, onde as enzimas se apresentam instáveis e com baixa atividade.

A realização de programas racionais dirigidos de melhoria de enzimas é limitada pelo reduzido entendimento da relação entre estrutura e função, bem como devido à necessidade de ampla informação sobre a estrutura e mecânica de ação da proteína. Mesmo assim, as modificações de funções e/ou atividades baseadas em métodos racionais, são realizadas e proteínas com novas funções enzimáticas são obtidas. Os exemplos incluem: o aumento na estabilidade térmica de pululanases de *Klebsiella pneumoniae* (Yamashita et al., 1994); aumento na eficiência catalítica e no número de substratos a que é ativa com uma glucoamilase de *Aspergillus awamori* (Fierobe et al., 1996); melhora na eficiência catalítica (Hermes et al., 1970; Miranda et al., 1995; Viadiu et al., 1995); estabilidade em pH alcalino (Cunningham & Wells, 1987); aumento da estabilidade em diferentes pHs e modificação do pH ótimo (Zhang et al., 1993); construção de enzimas híbridas (Kim et al., 1996).

2.2.1. Evolução dirigida

Como amplamente relatado, uma das estratégias para a criação de proteínas é a mutagênese aleatória que, de modo limitado, imita a evolução natural. Esta estratégia, conhecida como evolução dirigida, provou ser efetiva na modificação de enzimas sem que fosse necessário o pré-conhecimento da estrutura terciária da mesma. As propriedades melhoradas incluem entre outras: atividade sobre novos

substratos (El Hawrani et al., 1996; Nukaga a., 1995; Pijura et al., 1993); aumento da eficiência catalítica em enzimas cineticamente alteradas (El Hawrani et al., 1996; Gulick & Fahl, 1995; Moore & Arnold, 1996; You & Arnold, 1994); estabilidade e nível de expressão em hospedeiro heterólogo (Kuchner & Arnold, 1997). Exemplos de evolução dirigida incluem o aumento na fluorescência da GFP (Crameri et al., 1996), aumento de 50~60 vezes na atividade de uma esterase de *Bacillus subtilis* (Moore & Arnold, 1996) e uma β -galactosidase convertida numa fucosidase (Zhang et al., 1997), sendo que a fucosidase desenvolvida apresentou um aumento de 300 vezes a especificidade pelo substrato p-nitrofenol fucosídeo em relação ao p-nitrofenol galactopiranosídeo.

Um dos métodos mais eficazes de evolução dirigida, conhecido como PCR sexual ou DNA Shuffling, foi desenvolvido por Stemmer (1994a,b) e envolve ciclos de mutação aleatória de DNA *in vitro*. Depois de vários ciclos de mutações de ponto, as proteínas alteradas são avaliadas e, posteriormente, são selecionadas aquelas com atividade melhorada. É praticado, então, um último ciclo de retrocruzamento com o tipo selvagem de DNA, a fim de eliminar as mutações neutras. O mesmo autor obteve uma TEM β -lactamase, cuja concentração mínima inibitória apresentou aumento de 32.000 vezes (Stemmer, 1994b). Em resumo, a evolução dirigida gera variantes de enzimas que podem ser selecionadas e aperfeiçoadas para aplicações específicas.

Zhao et al. (1998b) desenvolveram métodos e estratégias para a obtenção de proteínas por meio da evolução dirigida, utilizando como modelo duas enzimas de interesse industrial (serina protease subtilisina E e p-nitrobenzil esterase) (Arnold, 1996 e 1998). Eles consideram como primeiro passo na evolução dirigida, a geração de diversidade molecular a partir de um ou mais genes relacionados, por meio de mutagênese de ponto aleatória e/ou recombinação *in vitro*. Em seguida, os produtos dos genes são avaliados e selecionados. Os genes que codificam produtos melhorados podem ser submetidos, então, à gerações adicionais de evolução, sendo combinados com um passo de recombinação a fim de acumular, numa mesma molécula, as mutações desejáveis. Este processo evolutivo pode ser repetido até que a meta seja alcançada ou até que se admita que nenhuma melhoria possa ser obtida.

2.2.1.1. Métodos para a geração de diversidade

Em contraste com a evolução natural, a evolução dirigida tem uma meta definida e os processos fundamentais de mutação, recombinação, avaliação e seleção devem ser controlados cuidadosamente. Devido às limitações no tamanho de uma biblioteca gênica que viabilize a avaliação e seleção das variantes produzidas, a taxa de mutação deve ser controlada (Kuchner & Arnold, 1997; Arnold, 1996). Bibliotecas de tamanho razoável podem ser criadas introduzindo mutações múltiplas em uma região particular ou num limitado número de posições, por exemplo, por mutagênese combinatória com cassetes de oligonucleotídeos (Reidhaar-Olson & Sauer, 1988). Porém, esta última exclui as possibilidades da obtenção de combinações úteis em regiões não testadas (Arnold, 1998). Os engenheiros de proteína estão se dando conta de que muitas funções das proteínas não são limitadas a um pequeno número de aminoácidos, mas podem ser afetadas por meio de resíduos distantes em relação aos sítios ativos.

Considerando Zhao et al. (1998b) como exemplo, verifica-se que estes basearam sua estratégia de mutação utilizando o gene todo como alvo. Neste sentido, como sua capacidade de avaliação era de somente $10^2 \sim 10^5$ variantes da enzima, decidiram pela obtenção de bancos genômicos que codificariam proteínas possuindo somente a alteração de um aminoácido. A análise de bibliotecas maiores ($10^8 \sim 10^9$) somente é possível, quando existem bons sistemas de avaliação, permitindo assim a obtenção de moléculas possuindo 2 ou 3 substituições de aminoácidos, dependendo do comprimento da seqüência.

A maioria dos métodos de mutagênese aleatória criam mutações em bases únicas. Devido à degeneração do código genético, isto resulta em seis tipos de substituições de aminoácido ao invés de dezenove, reduzindo assim, significativamente, o potencial de diversidade. Além disso, muitos métodos de mutagênese não são realmente aleatórios, enquanto limitam o número de substituições de aminoácido. Por exemplo, o método de mutagênese utilizado por Zhao et al. (1998b), *Error Prone PCR* ou EPP (Leung et al., 1989), apresenta tendência para transições ao invés de transversões. Em métodos de recombinação *in vitro*, como o PCR sexual ou *DNA shuffling* (Stemmer, 1994a), *random priming recombination* (Shao

et al., 1998) e o *staggered extension process* (Zhao et al., 1998a), todos possuem nível controlável de mutagênese de ponto.

A estratégia de evolução dirigida pode iniciar-se também a partir de várias seqüências relacionadas (Cramer et al., 1998). A recombinação aleatória de seqüências homólogas cria um outro nível de diversidade que a mutagênese de ponto não pode gerar. Uma biblioteca de genes recombinantes pode prover um ótimo ponto de partida para a criação de novas funções.

2.2.1.1.1. Error Prone PCR (EPP)

Na mutação aleatória de ponto, os dois fatores mais importantes são a freqüência e a tendência das mutações. A freqüência de mutação é o número de mutações ocorridas por gene, sendo normalmente designada como uma porcentagem. Esta freqüência pode ser calculada considerando-a como uma estimativa do número de alterações em relação ao comprimento do DNA submetido à mutação. Por exemplo, um nível de mutação desejável para evolução dirigida é a substituição de 2 a 3 bases por gene (Arnold, 1996; Moore & Arnold, 1996). Assim para uma molécula de 1 Kb, a freqüência de mutação deve ser de 0,2~0,3 %. Zhao et al. (1998b) usaram o EPP por considerá-lo um procedimento simples, rápido, confiável e permitir o controle da freqüência de mutação.

O EPP não cria substituições de DNA verdadeiramente aleatórias, pois possui a tendência de substituir A por G. Algumas tendências podem ser toleradas em experimentos de evolução dirigida, enquanto que grandes variações na freqüência de erro normalmente não o podem. A tendência afeta o local de mutação, isto é, mutações nos pares AT ocorrem mais freqüentemente do que nos pares CG, bem como A é substituído mais freqüentemente que G. Apesar disso, considera-se que as adeninas estão distribuídas ao longo do gene, portanto as mutações podem estar ocorrendo por todo o gene em qualquer uma das fitas de DNA. Modificações do EPP podem reduzir a tendência mas não eliminá-la (Cadwell & Joyce, 1992; Shafikhani et al., 1997).

O método de EPP foi desenvolvido originalmente por Leung et al. (1989) e testado por Cadwell & Joyce (1992) e Shafikhani et al. (1997). Uma série de freqüências de mutações que variam de 0,11 % a 2 % foram obtidas em condições de reação diferentes. A freqüência de mutação pode ser controlada (de 0,11 % a 0,49 %)

simplesmente ajustando a concentração de manganês na mistura da reação (Shafikhani et al., 1997).

A frequência de mutação no EPP é resultado de três parâmetros: fidelidade ou taxa de erro da polimerase na reação, comprimento do gene de interesse e número de ciclos do PCR. Variando a concentração de $MnCl_2$ é possível alterar a taxa de erro da polimerase. Zhao et al. (1998b) relatam um protocolo, no qual a frequência geral de mutação aumentou de 0,1% para 0,5%, quando a concentração de $MnCl_2$ foi alterada de 0 para $500\mu M$. O número de cópias é outro parâmetro ajustável, podendo ser alterado por meio do número de ciclos do PCR ou pela modificação da relação entre DNA molde e primers.

Como a fidelidade da polimerase também depende da natureza da seqüência utilizada, são observadas diferentes taxas de mutação nos diferentes genes testados, mesmo quando utilizada a mesma condição de reação. Um modo direto para avaliar a frequência e natureza da mutação é o sequenciamento de clones selecionados aleatoriamente. Sendo tal processo demorado e caro, foi desenvolvida uma alternativa simples e eficiente, a qual se baseia na estimativa da frequência de mutação, por meio da avaliação de uma fração dos clones mutantes ativos (Shafikhani et al., 1997; Zhao & Arnold, 1997). Zhao et al. (1998b), trabalhando com o gene da subtilina, descrevem que a fração de clones ativos variou de 90 % para 30 % com a adição de $MnCl_2$ na concentração de $500\mu M$. Nesse sentido, calcularam por meio de sequenciamento que 65 % dos clones ativos correspondem a uma frequência de mutação de 2 mudanças de base por gene, ou 0,2 %. Apesar de enzimas diferentes apresentarem atividade variada, a fração de clones ativos é um índice conveniente de frequência de mutação e pode ser usada como um diagnóstico para certificar-se da criação de uma biblioteca contendo mutantes aleatórios.

2.2.1.1.2. PCR Sexual

Um método eficiente para a recombinação aleatória de seqüências de DNA por PCR foi descrito por Stemmer (1994a). Este método, conhecido como PCR sexual ou DNA *shuffling*, envolve a digestão enzimática do DNA parental em fragmentos curtos e posterior rearranjo dos fragmentos em genes com o comprimento original. Considerando que os segmentos de DNA são capazes de associar-se livremente com

outros fragmentos de DNA complementares, mutações de um parental podem ser combinadas a de outro parental gerando novas combinações. A técnica também pode remover mutações que são deletérias ou que não contribuam para obtenção da propriedade desejada. Zhao et al. (1998b) modificaram o método original a fim de simplificar e permitir melhor controle da taxa de mutação (Zhao & Arnold, 1997; Lorimer & Patan, 1995), realizando a recombinação aleatória sem envolver a digestão dos genes do parental (Shao et al., 1998; Zhao et al., 1998a).

Quando recombinando genes oriundos de diferentes variantes melhoradas, é importante considerar o tamanho da biblioteca gênica (Moore et al., 1997). Vários métodos de recombinação *in vitro* podem recombinar qualquer número de genes, porém, as bibliotecas resultantes podem ser exageradamente grandes, capazes de impossibilitar a identificação de melhorias adicionais em sua função. Caso cada mutação ocorra independentemente das outras, a probabilidade de gerar uma seqüência que possua todas as mutações M apresentadas em N seqüências é de $1/N^M$ (Moore et al., 1997). Ao submeter quatro pNB esterases melhoradas ao PCR sexual (cada molécula contendo uma mutação positiva), Zhao et al. (1998b), assumindo que todas as mutações são aleatórias, determinaram que a probabilidade para as quatro mutações ficarem juntas é de 1 em 256. Esta probabilidade se relaciona ao número ou tamanho de amostra a ser avaliada, sendo maior quanto mais mutações são inseridas e/ou conforme o tamanho da molécula.

O sucesso da evolução dirigida depende em grande parte dos protocolos de avaliação e seleção. Novas atividades podem ser criadas que, aparentemente, não existem na natureza, desde que sejam desenvolvidos métodos eficientes de avaliação e seleção, afim de guiar o processo de evolução da enzima para as propriedades desejadas (Zhao et al., 1996). Métodos de avaliação são fáceis quando a seleção positiva pode ser aplicada, como por exemplo: resistência antibiótica aumentada (Stemmer, 1994b), superior fluorescência (Cramer et al., 1996) ou termoestabilidade (Yamashita et al., 1994). A seleção porém, é mais complexa e demorada ao se avaliarem mutantes com exigências de co-fator, atividade específica pelo substrato alterada, ou propriedades cinéticas. Por exemplo, a comparação entre mutantes com propriedades cinéticas modificadas requer a purificação de muitas moléculas (Gulick e Fahl, 1995), um processo caro e trabalhoso. Sendo assim, há

necessidade de métodos alternativos de avaliação, que permitam a fácil comparação entre as enzimas variantes com propriedades cinéticas alteradas sem que seja necessária a purificação de cada variante obtida.

2.2.2. Celulases e termoenzimas

2.2.2.1. Celulose e degradação

A celulose é a biomolécula mais abundante na terra e, além de ser o principal constituinte estrutural das plantas, também atua como reservatório de energia. Sua conversão em açúcares mais simples como glicose é de interesse biotecnológico, porém, devido a sua associação com lignina e hemicelulose que lhe confere grande persistência na terra, ela se apresenta resistente à hidrólise rápida.

Devido as grandes quantidades de biomassa celulósica descartadas diariamente (lixo municipal, agroindústria, outras industrias, etc), houve um aumento no interesse em seu uso como recurso para a produção de reservas de energia (Lynd et al., 1991). A transformação da celulose foi estudada do ponto de vista ecológico (Ljungdahl & Eriksson, 1985) e em relação a sua degradação (Clarke, 1997; Eriksson et al., 1990; Olsen et al., 1994). Estes trabalhos permitiram a elucidação de fatores cruciais que regulam produção de celulase e a interação sinérgica de seus componentes.

Uma estratégia adotada para o uso da celulose é visar a produção de glicose, seguida por fermentação, resultando em etanol. Este processo permite a produção de combustíveis renováveis, além de reduzirem o aumento no efeito-estufa mundial. Como combustível, o etanol já é utilizado no Brasil e também adicionado à gasolina no mesmo país e no EUA.

A conversão de biomassas florestais de maneira economicamente viável é um grande desafio. Nos países da América do Norte e Europa as madeiras, constituídas pelos polímeros de celulose, hemicelulose e lignina, são processadas e hidrolisadas a oligossacarídeos (Wood & Garcia-Campayo, 1990; Kennedy & Hossain, 1992; Hayn et al., 1993). Estes açúcares são então convertidos por microrganismos em álcool (Grohmann, 1993; Lee, 1997).

2.2.2.2. Celulases

Durante o processo de conversão da celulose, as enzimas chamadas celulases são as mais importantes. Devido principalmente aos estudos realizados com o gênero *Trichoderma* (Montenecourt & Eveleigh, 1977; Ryu & Mandels, 1980), atualmente muito se conhece sobre o processo de hidrólise da celulose cristalina à glucose, sendo determinado que no mínimo 3 grupos de enzimas estão envolvidas (Pourquie & Warzywoda, 1993; Nakari-Setälä & Penttilä, 1995; Srisodsuk et al., 1997; Seiboth et al., 1997).

Estas enzimas atuam de forma sinérgica e diferentemente conforme o organismo e o substrato, entretanto, podem ser genericamente caracterizadas como: as endoglucanases que clivam internamente ligações glucosídicas beta-1,4; as celobiohidrolases que clivam o dissacarídeo de celobiose a partir do terminal não reduzido da cadeia do polímero de celulose; e por fim as beta-1,4 glucosidases, que hidrolisam a celobiose e outros celo-oligossacarídeos curtos à glucose. Em alguns microrganismos estas proteínas foram caracterizadas físico-quimicamente e, por exemplo, em *T. reesei*, além da seqüência de amino ácidos e do gene (Teeri et al., 1987; Ilmén et al., 1996), sua estrutura tridimensional também já é conhecida (Divne et al., 1994).

Como mencionado anteriormente, a biodegradação da celulose envolve a ação sinérgica de um complexo enzimático, porém existem limitações ao tentar se obter conversão enzimática eficiente utilizando enzimas de microrganismos celulolíticos. O estudo envolvendo misturas de enzimas de diferentes organismos também foi testada, porém o sucesso foi parcial. Acredita-se que isto esteja relacionado ao fato de que algumas celulases naturais só evoluíram para satisfazer as necessidades do próprio microrganismo, e não a total sacarificação da celulose a nível industrial (Eveleigh et al., 1995).

Em contraste, os sistemas industriais requerem a superprodução de enzimas e desenvolvimento de hidrólise completa para substratos pré-tratados (delignificados), como por exemplo: papel reciclado, papelão, algodão têxtil e restos de comida. É reconhecido que, para a efetiva conversão enzimática da celulose de lascas de madeira de floresta, seria necessário modificar as celulases existentes, tornando-as

mais eficientes. Atualmente, tem sido investigado um grupo de microrganismos celulolíticos compreendendo as bactérias hiper-termofílicas, como a *Thermotoga neapolitana*, oriunda de fossas termais oceânicas (Adams, 1993; Blöchl et al., 1995; Bronnenmeier et al., 1995, Ciaremella et al., 1995). Essas celulases são eficientes, sendo ativas e estáveis em diferentes condições. Seus atributos especiais incluem a resistência à inibição pelo produto final e estabilidade térmica, como exemplo a endoA de *T. neapolitana*, que é estável à fervura (Bok et al., 1994).

2.2.2.3. Termoenzimas e BglA de *Fervidobacterium* sp.

As termoenzimas são estáveis e ativas em altas temperaturas, oferecendo vantagens biotecnológicas como: uma superior taxa de reação; inferior viscosidade; superior resistência à desnaturação química; reduzida chance de contaminação do sistema fermentativo devido a alta temperatura; facilidade de purificação pelo uso de tratamento térmico (Vieille et al., 1996). Na indústria têm sido usadas como elementos aditivos para detergentes (proteases), processamento de goma (amilases), na indústria de alimentos (isomerase de glicose) e na produção farmacêutica (acilase de penicilina, transformações de esteróides).

Embora o aumento na atividade é freqüentemente relatado como uma das vantagens primárias das termoenzimas, o seu rendimento é de mesma magnitude que o daquelas de origem mesofílica em suas temperaturas ótimas (Cowan, 1992; Vieille et al., 1996). Em contraste, os grandes aumentos na taxa de reação acontecem com certas enzimas termoestáveis como as polissacarases (Cowan, 1992). As fontes da maioria das termoenzimas são organismos termófilos ou hiper-termófilos, embora alguns mesófilos produzam enzimas ativas e estáveis a 60 °C, com a α -amilase de *Bacillus licheniformis* (Schumann et al., 1991).

As enzimas termoestáveis podem ser utilizadas como ponto de partida para que novas atividades sejam criadas. A aplicação de enzimas em processos industriais é, em geral, limitada devido a sua instabilidade. Sendo assim, existe grande oportunidade para o desenvolvimento de termoenzimas como catalisadoras industriais que substituam o processo químico, ou enzimas provenientes de microrganismos mesofílicos.

A β -glucosidase termoestável utilizada no presente trabalho é proveniente do microrganismo *Fervidobacterium* sp., o qual foi isolado de fontes termais do Parque Nacional Yellowstone (USA). Segundo Sullivan et al. (1998), este microrganismo foi capaz de crescer a 80 °C em meio para *Thermotoga* e, além de fermentar mono, di e trissacarídeos, também degrada celulose, xilana e goma. Baseando-se na seqüência do DNA ribossômico 16S, este apresentou semelhança de 98.5% com *F. islandicum* (Hüber et al., 1990) no grupo dos Thermotogales porém, devido às características fermentativas, acredita-se tratar de uma nova espécie. A partir de uma biblioteca genômica, foi identificado por avaliação em substratos metil umbeliferil piranosídeos (MU), um clone ativo para MU- β -glucopiranosídeo, cujo gene foi clonado e designado como β -glucosidase A (BglA). O gene da BglA, codifica uma enzima de 438 aminoácidos, a qual pertence a família glicosil hidrolase 1. Esta proteína foi avaliada e apresentou atividade em pH entre 5 e 8, estabilidade a 70 °C por 23 dias em pH 7, atividade sobre diferentes substratos naturais e análogos (p-nitrofenol piranosídeos), além da lactose, salicina e arbutina. Quando testada com p-nitrofenol β -glucopiranosídeo (PNP β -Glu) como substrato a enzima é ativa em baixas concentrações de glicose e somente é inibida com 2 M desse açúcar.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Microrganismo

Escherichia coli linhagem Top10 (Invitrogen): F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80/*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 deoR recA1araD139 (araA-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG*.

3.1.2. Meios de cultura

3.1.2.1. LB (Luria-Bertani)

Bacto-triptona	10 g/L
Bacto-extrato de levedura	5 g/L
NaCl	10 g/L

O pH foi ajustado para 6,8 com a adição de NaOH 10 M (item 3.1.5.3.) na quantidade 100 μ L/L de meio, sendo posteriormente autoclavado (item 3.2.1.). Para meio sólido foram adicionadas 15 g/L de ágar bacteriológico (Difco).

3.1.2.2. Meio SOC

Bacto-triptona	20,0 g/L
Bacto-extrato de levedura	5,0 g/L
NaCl	0,5 g/L

Após a dissolução dos componentes, foram adicionados 10 mL/L de uma solução de KCl (250 mM). Em seguida, o pH foi ajustado para 7 com a solução de NaOH (item 3.1.5.3.) e autoclavado (item 3.2.1.). Antes do uso, o meio foi adicionado de 5 mL/L de uma solução de MgCl₂ (2 M) e 20 mL/L de uma solução de glicose (1 M), previamente esterilizadas por autoclavagem e filtração (0,22 μ m), respectivamente.

3.1.3. Plasmídios

Os plasmídios utilizados durante o trabalho foram: pBADMyHis tipos A, B e C (Invitrogen); pGFPmut3.1 (Clontech); pBglA contendo o gene da β -glucosidase (BglA) de *Ferrodobacterium* sp, previamente obtido por Sullivan et al. (1998); e todos os construídos durante o trabalho (A, B, C, D, E, F, H, pBGH, pBSGH, pBBGH, pBBSGH, EPP3~18). Todos foram mantidos conforme descrito no item 3.2.6.

3.1.4. Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos utilizados foram solubilizados em TrisHCl (item 3.1.5.23.) para obtenção de uma solução estoque com 250 pmoles/ μ L. Posteriormente, esta foi diluída para 5 pmoles/ μ L e, no momento do uso, diluída 1:10.

Tabela 1. Lista dos oligonucleotídeos utilizados, respectivas seqüências e aplicações.

oligonucleotídeo	aplicação	seqüência 5'→3' (enzima de restrição)*
517	clonar GFPmut3.1	GAAATTAAGCTTCCGTTAAAGGAG (HindIII)
518	clonar GFPmut3.1	TAATTAAGCTTGCTTTGTATAGTTCATC (HindIII)
1	clonar GFPmut3.1	AGAAAGAATTCATGCGTAAAGGAG (EcoRI)
2	clonar GFPmut3.1	GCTAATTAATCTAGATTGTATAGTTCATC (XbaI)
13	clonar GFPmut3.1	GCTAATCTAGATTATTTGTATAGTAGTTCATC (XbaI)
14	clonar bglA	GGGAGCTCAATGATAAGAAGG (SacI)
15	clonar bglA	AACTTGGTACCTTTTAGAAATTCCTT (KpnI)
16	retirada do epitopo Myc	GATCTAGATCCCGGCGTCGACC (XbaI)
19	espaçador	CGCTGGGAGTGCTGCTGGATCTGGGG
20	espaçador	GAATTC CCCAGATCCAGCAGCACTCCCAGCGG TACC (EcoRI / KpnI)
28	seqüenciamento F1	CCTACCTGACGCTTTTTATCGC
29	seqüenciamento F2	TCTCCTGGCCCAGAATTATGC
30	seqüenciamento F3	ACATGGACATGCCGTTTCAGG
31	seqüenciamento F4	TCCCAAACGGAGATGGGATGG
32	seqüenciamento F5	TGGGAATTCATGCGTAAAGGAG
33	seqüenciamento F6	TGACGGGAACAACAAGACACG
34	seqüenciamento R6	ATCAGACCGCTTCTGCGTTC
35	seqüenciamento R5	TGGTCTGCTAGTTGAACGCTTC
36	seqüenciamento R4	GTTGCATCACCTTCACCCTCTC
37	seqüenciamento R3	CAACACCTGCATTGATTGCTTC
38	seqüenciamento R2	CAACAGGGTCATGGAACCATGC
39	seqüenciamento R1	ATCTGGGTTAAGCCATCCACC
40	seqüenciamento Bad F	CTCTACTGTTTCTCCATACC
41	seqüenciamento Bad R	CTCATCCGCCAAAACAGCC

* site de restrição em negrito e enzima no parêntesis

3.1.5. Soluções e tampões

3.1.5.1. Solução de ampicilina

Uma solução de 0,1 g/mL foi obtida pela dissolução da ampicilina (Sigma) em água Milli-Q (sistema Millipore de purificação). Posteriormente, esta foi esterilizada por filtração (22 μm) e mantida no escuro a -20 °C. A solução foi adicionada ao meio de cultura na concentração final de 100 $\mu\text{g/mL}$ de meio.

3.1.5.2. Solução de arabinose 20%

Uma solução de 0,2 g/mL foi obtida pela dissolução de L-arabinose (Sigma) em água (Milli-Q). Posteriormente, esta foi esterilizada por filtração (22 μm) e mantida a 4°C.

3.1.5.3. Solução de NaOH

Foi obtida uma solução de 10 N de NaOH (Fisher) em água deionizada e mantida à temperatura ambiente.

3.1.5.4. Solução de MnCl_2

Foi obtida uma solução de 5 mM de cloreto de manganês (Sigma) em água esterilizada (Milli-Q) e mantida a -20 °C.

3.1.5.5. Solução de CaCl_2

Foi obtida uma solução de 50 mM de cloreto de cálcio (Fisher) em água (Milli-Q), esterilizada por filtração (22 μm) e mantida a -20 °C.

3.1.5.6. Solução de brometo de etídio

Uma solução de 10 mg/mL foi obtida pela dissolução de brometo de etídio em água (deionizada). Posteriormente, esta foi mantida no escuro à temperatura ambiente.

3.1.5.7. Solução X-gal (5-bromo 4-cloro 3-indolil β -galactosídeo)

Uma solução de 20 mg/mL foi obtida pela dissolução de X-gal em dimetilformamida e mantida a -20 °C.

3.1.5.8. Solução de glicina

Foi obtida uma solução de 0,2 M de glicina (Fisher) em água (Milli-Q), o pH ajustado para 10,5 com a solução de NaOH (item 3.1.5.3.) sendo, a seguir, mantida à temperatura ambiente.

3.1.5.9. Solução de dNTPs para PCR

Os quatro deoxinucleotídeos (Promega) foram solubilizados em água esterilizada (Milli-Q) e misturados em quantidade equimolar, para obtenção de uma solução com concentração final de 2,5 mM para cada um deles. Esta solução estoque foi armazenada a -20 °C e, para uso, diluída 1:10.

3.1.5.10. Solução de dNTPs para *Error Prone PCR* (EPP)

Os quatro deoxinucleotídeos (Promega) foram solubilizados em água esterilizada (Milli-Q) e, misturados na concentração final de 2 mM para dGTP e dATP, e 10 mM para dCTP e dTTP. Esta solução estoque foi armazenada a -20 °C e, para uso, diluída 1:10.

3.1.5.11. Reagente de Bradford

Para obtenção do reagente, foram solubilizados 8 mg de Bromofenol Blue G250 (Sigma) em 5 mL de etanol (PA); em seguida, foram adicionados 10 mL de ácido fosfórico (PA) e, por fim, o volume ajustado para 100 mL com água (Milli-Q). O reagente foi mantido em frasco escuro a 4 °C por um prazo máximo de 1 mês.

3.1.5.12. Soluções para coloração de gel de poliacrilamida com prata

3.1.5.12.1. Solução fixadora

A solução fixadora foi obtida pela mistura de 40 % de etanol (PA) com 10% de ácido acético (PA), e o volume completado com água (deionizada). A solução foi mantida à temperatura ambiente.

3.1.5.12.2. Solução incubadora

A solução foi obtida pela dissolução de 17 g de acetato de sódio (3 H₂O) e 1 g de tiosulfato de sódio em 75 mL de etanol (96° GL, PA). O volume foi completado para 250 mL com água (deionizada) e por fim, estocada à temperatura ambiente. No momento do uso, foram adicionados 520 µL de glutaraldeído 25 % (Sigma) para cada 100 mL da solução.

3.1.5.12.3. Solução de prata

Para obtenção da solução de prata foram dissolvidos 0,25 g de nitrato de prata em 250 mL de água (deionizada). A solução foi mantida em frasco escuro a 4 °C e, antes de seu uso, foram adicionados 20 µL de formaldeído para cada 100 mL da solução.

3.1.5.12.4. Solução reveladora

A solução reveladora foi obtida pela solubilização de 6,25 g de carbonato de sódio em 250 mL de água (deionizada). A solução foi mantida à temperatura ambiente, sendo que, antes de seu uso, foram adicionados 20 µL de formaldeído (Sigma) para cada 100 mL de solução.

3.1.5.12.5. Solução de interrupção

Foi obtida pela solubilização de 3,65 g de EDTA sódico em 250 mL de água (deionizada) e armazenada à temperatura ambiente.

3.1.5.13. Soluções para purificação por IMAC (*Immobilized Metal Affinity Chromathography*)

3.1.5.13.1. Solução A

NaCl	300 mM
NaH ₂ PO ₄	50 mM
Imidizol	10 mM

Foi obtida pela solubilização dos componentes em água Milli-Q. Posteriormente esta foi filtrada (0,22 µm) e degazeificada por agitação (agitador magnético) e sucção com bomba a vácuo. Após o processo, foi autoclavada e mantida à temperatura ambiente.

3.1.5.13.2. Solução B

NaCl	300 mM
NaH ₂ PO ₄	50 mM
Imidizol	200 mM

Obtida da mesma maneira que a solução A (item 3.1.5.13.1.).

3.1.5.13.3. Solução de sulfato de níquel

Foi obtida solução de 200 mM de sulfato de níquel (Sigma) em água (Milli-Q) e, posteriormente, mantida à temperatura ambiente.

3.1.5.14. Solução de agarose

Foi preparada uma solução de 1% de agarose em tampão TAE1X (item 3.1.5.21.), a qual foi aquecida em microondas para solubilização. Posteriormente, a solução foi mantida em frasco vedado à temperatura ambiente por, no máximo, 2 semanas.

3.1.5.15. Solução MU_α-Glu (metil umbeliferil β-D-glucopiranosídeo)

Foi preparada uma solução de 1 mM de MU_α-Glu (Sigma) em água (Milli-Q) e posteriormente mantida a -20 °C.

3.1.5.16. Solução PMSF (Fenil Metil Sufonil Fluoride)

Foi preparada uma solução de 2 mM de PMSF (Sigma) em tampão Tris-HCl (item 3.1.5.23.). Para tanto, foi dissolvida a quantidade apropriada de PMSF em 100 μ L de álcool isopropílico e misturada ao tampão. A solução foi preparada no momento da utilização.

3.1.5.17. Solução de ρ -nitrofenol piranosídeos

Para obtenção dos diferentes substratos, os ρ -nitrofenol piranosídeos foram solubilizados separadamente na concentração de 2 mM em água (Milli-Q), sendo posteriormente mantidos a -20 °C.

Tabela 2. Lista dos substratos ρ -nitrofenol piranosídeos utilizados na determinação da atividade da β -glucosidase.

Substratos	Sigla	concentração
ρ -nitrofenol β -D-glucopiranosídeo	PNP β -Glu	602 mg/L
ρ -nitrofenol α -D-glucopiranosídeo	PNP α -Glu	602 mg/L
ρ -nitrofenol β -D-galactopiranosídeo	PNP β -Gal	602 mg/L
ρ -nitrofenol α -D-galactopiranosídeo	PNP α -Gal	602 mg/L
ρ -nitrofenol β -D-xilopiranosídeo	PNP β -Xil	542 mg/L
ρ -nitrofenol β -D-arabinopiranosídeo	PNP β -Ara	602 mg/L
ρ -nitrofenol α -D-arabinopiranosídeo	PNP α -Ara	602 mg/L
ρ -nitrofenol β -D-celobiosídeo	PNP β -Cel	927 mg/L
ρ -nitrofenol β -D-lactopiranosídeo	PNP β -Lac	927 mg/L
ρ -nitrofenol β -D-manopiranosídeo	PNP β -Man	602 mg/L

3.1.5.18. Tampão pipes

Foi obtida uma solução tampão pipes de 20 mM (Sigma) em água (Milli-Q), tendo seu pH sido ajustado para 7,3 com a solução de NaOH (item 3.1.5.3.) a 75 °C. Posteriormente, esta foi autoclavada e mantida à temperatura ambiente.

3.1.5.19. Tampão para células

Tris-HCl pH8	20 mM
Glicose	50 mM
EDTA	2 mM

O tampão foi obtido pela mistura e solubilização dos componentes em água deionizada e estocado à temperatura ambiente.

3.1.5.20. Tampão mutagênico para *Error Prone PCR (EPP)*

MgCl ₂	70 mM
KCl	500 mM
Tris-HCl pH 8,3	100 mM
Gelatina (BioRad)	0,1 %

O tampão foi obtido pela mistura e solubilização dos componentes em água esterilizada (Milli-Q) e estocado a -20°C.

3.1.5.21. Tampão TAE 50X

Tris-Base	242 g/L
EDTA	18,6 g/L
Ácido acético glacial	57,1 mL/L

O tampão foi obtido pela mistura e solubilização dos componentes em água deionizada e estocado à temperatura ambiente.

3.1.5.22. Tampão de amostra para DNA

Azul de bromofenol	2,5 g/L
Xileno Cianol FF	2,5 g/L
Ficoll Tipo 400	300 g/L

O tampão foi obtido pela mistura e solubilização dos componentes em água esterilizada (Milli-Q) e estocado à temperatura ambiente.

3.1.5.23. Tampão de TrisHCl

Foi obtida uma solução tampão Tris-Base (Fisher) 10 mM em água (Milli-Q). O pH foi ajustado para 8 com HCl (PA) e a solução autoclavada e mantida à temperatura ambiente.

3.2. Métodos

3.2.1. Esterilização

Os meios de cultura e as soluções foram esterilizadas durante 20 min. a 120 °C (1 atm), em autoclave. Os microtubos, ponteiras e vidrarias foram esterilizados nas mesmas condições, porém no programa seco da autoclave.

3.2.2. Cultivo e estocagem

As bactérias foram cultivadas em meio LB sólido (item 3.1.2.1.) a 37°C (câmara climatizada ou estufa Fanen) ou líquido (agitador Innova 2300- New Brunswick Scientific) e estocadas (glicerol 20 %) em freezer a -70 °C (So-Low Enviromental equipment).

3.2.3. Concentração celular

A concentração celular de culturas crescidas em meio líquido foi acompanhada nos diferentes experimentos pelo uso de espectrofotômetro. Quando cultivadas em microplacas, a densidade foi observada a 550 nm em um leitor de microplacas (SLT Lab instruments - EAR340A). Nos demais casos, as amostras foram colocadas em cubetas e analisadas a 600 nm (Pharmacia Biotech- Ultrospec 3000).

3.2.4. Cultivo em microplacas para avaliação da biblioteca gênica da BglA

As células provenientes das placas mestras da biblioteca gênica da BglA foram utilizadas como inóculo sendo previamente cultivadas por 20 h (200 µL LB + ampicilina, 37 °C, 150 rpm) e estocadas a -70 °C (glicerol 20%). Com auxílio de um replicador multifio (96 pontos), estas células foram então transferidas, para a nova microplaca contendo meio de cultura (LB + ampicilina + 0,1 % de arabinose). Após a incubação (37 °C, 14 h, 150 rpm) as amostras foram coletadas e avaliadas quanto à atividade da β-glucosidase (item 3.2.31.1.) e GFP (item 3.2.32.). O volume das amostras utilizadas na quantificação da BglA variou de acordo com o substrato testado.

3.2.5. Indução à expressão

Para a indução à expressão das diferentes construções em *E. coli*, foi adicionado 0,1 % de arabinose (item 3.1.5.2.) ao meio de cultura LB (item 3.1.2.1.), exceto nos casos onde é especificada outra concentração. Para o meio sólido, a adição da arabinose foi efetuada ao meio LB quando este ainda estava líquido e, para cultivo em meio líquido, as células foram induzidas quando a concentração celular (item 3.2.3.) atingia concentração específica (0,6 Densidade Óptica (DO) a 600 nm).

3.2.6. Replicação e manutenção dos plasmídios

Os plasmídios foram inseridos em *E. coli* (item 3.1.1.) via transformação por choque térmico (item 3.2.8.). Uma vez extraído (item 3.2.19.) das bactérias, o DNA plasmidial foi mantido em freezer -20°C.

3.2.7. Produção de células competentes de *E. coli* para transformação por choque térmico

As células competentes foram obtidas de acordo com uma modificação do protocolo proposto por Sambrook et al. (1989). Para tanto, células de *E. coli* Top10 (item 3.1.1.) crescidas (18 h) foram inoculadas (1 %) em 300 mL de LB (item 3.1.2.1.) e crescidas até DO de 0,5~0,6 (espectrofotômetro a 600 nm). Em seguida, a cultura foi colocada em banho de gelo (20 min.) e centrifugada (6000 rpm, 10 min., 4 °C). O precipitado foi ressuscitado em 150 mL de CaCl₂ gelado (item 3.1.5.5.) e deixado em banho de gelo (2 horas). Novamente as células foram centrifugadas (5000 rpm, 5 min., 4 °C), o precipitado formado foi cuidadosamente ressuscitado (3 mL glicerol 80 % + 12 mL CaCl₂ 50 mM), dividido em alíquotas (100 ou 200 µL) e imediatamente armazenado em freezer -70 °C (So-Low Environmental equipment).

3.2.8. Transformação de *Escherichia coli* por choque térmico

A transformação das bactérias com os diferentes plasmídios foi conduzida por choque térmico. Para tanto, 100 µL de células competentes (item 3.2.7.) foram colocadas juntamente com o DNA a ser introduzido (para plasmídios puros 100 ng de DNA e metade da reação para produtos de ligação, item 3.2.16.) em banho de gelo (30

min.). Em seguida, um choque térmico foi aplicado nas células (45 seg. a 42 °C) e estas foram colocadas novamente em banho de gelo (3 min.). Por fim, foram adicionadas de 250 µL de meio SOC (item 3.1.2.2.), incubadas sob agitação (30 min., 37 °C) e, semeadas em meio LB com ampicilina (item 3.1.5.1.) e arabinose (item 3.1.5.2.).

3.2.9. Desenho de primers

Os diferentes primers construídos foram desenhados e analisados nos programas Oligo 4.06 (National Biosciences, Inc., USA) e DNA strider 2.1 (Biologie Cellulaire et Moléculaire, CEA, France).

3.2.10. Síntese de oligonucleotídeos

A síntese dos oligonucleotídeos foi realizada pela empresa Integrated DNA Technologies, INC- USA.

3.2.11. Concentração de DNA

A concentração do DNA foi determinada por leitura em espectrofotômetro (Pharmacia Biotech-Ultrospec 3000) ou em gel de eletroforese (item 3.2.22.). No primeiro caso, o DNA foi diluído 200 vezes e analisado em microcubeta de quartzo sob luz UV (260 nm e 280 nm), segundo Sambrook et al. (1989).

Também a eletroforese de DNA (item 3.2.22.) foi utilizada na quantificação e análise da qualidade do DNA. Para isso, uma amostra padrão com peso e concentração conhecidas foi avaliada juntamente com a amostra de interesse. O tamanho e a quantidade de DNA foram determinados por meio da comparação da intensidade e posição das bandas formadas.

3.2.12. Condições de amplificação por reação de polimerase em cadeia (PCR)

As reações de amplificação de DNA por PCR foram conduzidas no equipamento Perkin Elmer (GeneAmp PCR Systems 9600) e, cada uma delas, em condições específicas. A enzima (Tabela 3) bem como os programas utilizados variaram de acordo com os objetivos da reação de amplificação. Os primers empregados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 3. Lista das polimerases utilizadas com respectivas origens e aplicações.

Objetivo	DNA polimerase	Origem
clonagem de genes	<i>pfu</i> + KlenTaq (1:15)	<i>pfu</i> (Stratagene), KlenTaq (AB Peptides)
EPP (<i>error prone PCR</i>)	Taq	Taq (Promega)
amplificação para confirmar presença	Taq	Taq produzida no laboratório segundo Desai & Pfaffle (1995)

3.2.12.1. Clonagem da GFP e BglIA por PCR

A clonagem de genes foi conduzida por meio de uma reação de amplificação por PCR, seguida de clonagem do produto da reação no vetor apropriado. Para a amplificação das GFPs foi utilizado o seguinte programa: 4 min. a 94 °C, 25 ciclos (20 seg. a 94 °C; 30 seg. a 52 °C; 60 seg. a 72 °C) e 7 min. a 72 °C. Para a BglIA, o tempo de extensão durante os ciclos, foi alterado para 1 min. e 55 seg.. Os oligonucleotídeos usados como primers são apresentados na Tabela 1. Após a reação de PCR, os produtos foram purificados (item 3.2.18.) ou, alternativamente, observados em gel de eletroforese de DNA (item 3.2.22.) com posterior extração da banda de interesse (item 3.2.20.). Depois disso, o fragmento de DNA foi ligado (item 3.2.16.) ao vetor apropriado e preparado conforme protocolo descrito no item 3.2.13.. Por fim, este foi introduzido em *E. coli* (item 3.1.1.) via transformação por choque térmico (item 3.2.8.).

3.2.12.2. PCR para retirada do epitopo Myc

Para a retirada do epitopo Myc do plasmídeo H, foi realizado um longo PCR (5 min. a 94 °C, 25 ciclos [6 seg. a 94 °C; 30 seg. a 59 °C; 5 min. 10 seg. a 68°C], 10 min. a 68 °C) com os primers (oligonucleotídeos 16 e 2, Tabela 1). Posteriormente, o produto da amplificação foi digerido com XbaI (item 3.2.15.), purificado (item 3.2.18.), re-circularizado (item 3.2.16.) e introduzido em *E. coli* (item 3.2.8.).

3.2.12.3. Error Prone PCR (EPP)

O EPP é um método baseado num PCR de baixa fidelidade, no qual são introduzidas mutações pontuais na molécula de DNA de interesse. No presente

trabalho, o plasmídio pBBGH foi utilizado como molde da BglA, cujo DNA foi submetido ao processo de mutagênese.

Para tanto, a reação de PCR foi otimizada em 50 μL contendo: 5 μL tampão mutagênico 10X (item 3.1.5.20.); 5 μL solução de dNTP para EPP (item 3.1.5.10.); 5 μL de cada primer (oligonucleotídeos 14 e 15, Tabela 1); 50 ng de DNA (pBBGH, item 4.2.1.); 0,5 μL de Taq DNA polimerase (Promega 5 U/ μL); quantidade apropriada de MnCl_2 (item 3.1.5.4.) e volume completado com água esterilizada (Milli-Q). O programa de amplificação utilizado no termociclador (GeneAmp PCR Systems 9600, Perkin Elmer) foi de 4 min. a 94 °C, 25 ciclos (7 seg. a 94 °C; 30 seg. a 53 °C; 1 min. 55 seg. a 72 °C) e 10 min. a 72 °C.

Uma amostra da reação foi analisada em gel de eletroforese de DNA (item 3.2.22.) para constatação da amplificação. Posteriormente, todo o volume restante da reação foi digerido com as enzimas ScaI e KpnI (item 3.2.15.). O produto da digestão foi purificado (item 3.2.18.) e, finalmente, ligado (item 3.2.16.) na proporção 2,5:1 ao plasmídio pBBGH previamente preparado (item 3.2.13.).

3.2.13. Preparo de pBBGH para construção da biblioteca gênica

O plasmídio pBBGH foi especialmente preparado a fim de permitir a eficiente ligação com o DNA das BglA mutantes e, assim, construir as bibliotecas gênicas da BglA. Para tanto, 50 μg do plasmídio pBBGH (item 4.2.1.) foram digeridos por 1 h 30 min. com 200 U de cada enzima (ScaI e KpnI, item 3.2.15.). Posteriormente, o produto da digestão foi defosforilado (item 3.2.17.) por 45min. com 4U de fosfatase alcalina (NEB) e, em seguida, submetido à eletroforese de DNA (item 3.2.22.) com a finalidade de separar a banda correspondente ao plasmídio (4,8 Kb), daquela referente ao gene da BglA (1,3 Kb). Após a separação das bandas no gel, a mais pesada (4,8Kb) foi cortada e, então, purificada do gel (item 3.2.20.). Por fim, o DNA foi concentrado em centrifuga a vácuo (Savant) até 250 ng/ μL (item 3.2.11.).

3.2.14. Construção do espaçador

Foi obtido um segmento de DNA que codifica uma seqüência específica de aminoácidos (GTAGSAAGSGEF) para ser utilizado como um espaçador entre as proteínas a serem expressas. Para tanto, foram desenhados 2 oligonucleotídeos complementares (19 e 20, Tabela 1), sendo um maior que o outro a fim de deixar um sítio de restrição em cada extremidade da molécula. Com o objetivo de hibridizar estas moléculas e assim obter um DNA de fita dupla, estes oligonucleotídeos foram pré-aquecidos (95 °C) e colocados em concentrações equimolares (5 pmoles/ μ L) em um microtubo. Este foi mantido em um Becker (1 L de água aquecida a 100 °C) à temperatura ambiente. Após o resfriamento da água, o microtubo foi mantido em freezer -20 °C. Para inserção do espaçador (produto da hibridização das 2 oligonucleotídeos) no plasmídeo (pBGH), ambos foram digeridos com KpnI e EcoRI (item 3.2.15.) e, então, submetidos à reação de ligação (item 3.2.16.). A identificação dos clones que possuíam o espaçador foi realizada por PCR (item 3.2.12.), utilizando-se como primers os oligonucleotídeos 2 e 19 (Tabela 1). Por fim, a seqüência foi confirmada por seqüenciamento automático (item 3.2.21.).

3.2.15. Digestão com enzima de restrição

As reações de digestão foram conduzidas segundo protocolo especificado pelo fornecedor das enzimas (New England Biolabs).

3.2.16. Reação de ligação de DNA

As reações de ligação de DNA foram conduzidas utilizando-se o Ligation Express kit (Clontech), seguindo as especificações do manual. Também foram conduzidas ligações com outras enzimas (NEB e Boehringer Mannheim), para as quais seguiu-se o protocolo sugerido pelo fornecedor.

3.2.17. Defosforilação do DNA

A defosforilação foi executada com a CIAP (Promega), segundo o protocolo apresentado no manual do produto.

3.2.18. Limpeza de produto de PCR

Os produtos de PCR foram purificados utilizando-se o kit, QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), seguindo o protocolo para QIAquick PCR purification presente em seu respectivo manual.

3.2.19. Extração de plasmídeo

As extrações de plasmídios foram conduzidas com o kit, QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen), segundo o protocolo sugerido no manual do produto.

3.2.20. Extração e purificação de bandas de gel

A extração de bandas do gel foi efetuada utilizando-se o kit, QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), segundo o protocolo sugerido no manual do produto.

3.2.21. Seqüenciamento automático

Os seqüenciamentos foram conduzidos nos equipamentos Perkin Elmer Applied ABI Prism 373 com o protocolo para FS terminator (Perkin Elmer) e também no ABI Prism 377 com Big Dye (Perkin Elmer). Os resultados foram analisados em ABI Auto Assembler 1.3.0, ABI Prism Sequencing 2.1.1. e ABI Fractura 1.2.0..

3.2.21.1. Seqüenciamento automático total da fusão

Para o seqüenciamento dos plasmídios pBBGH e pBBSGH, todo o segmento de DNA contido na região da fusão teve suas duas fitas seqüenciadas (item 3.2.21.) empregando-se como primers os oligonucleotídeos (28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38 e 39) apresentados na Tabela 1.

3.2.22. Eletroforese de DNA

A eletroforese de DNA foi conduzida em gel de agarose (1%) utilizando-se TAE 1X (item 3.1.5.21.) como tampão. Antes dos géis serem colocados nas cubas (Owl) foram adicionados 5 μ L da solução de brometo de etídio (item 3.1.5.6.) para cada 100 mL de agarose. Cada amostra de DNA foi diluída (1:10) com o tampão da amostra

(3.1.5.22.) e aplicadas no gel na quantidade apropriada. Por fim, após a eletroforese o DNA presente no gel foi visualizado colocando-se este sobre um transiluminador com luz UV (IBI).

3.2.23. Quantificação de proteínas

Para a quantificação das proteínas foram empregadas duas metodologias baseadas no reagente de Bradford. A quantificação rotineira foi realizada com reagente de Bradford (BioRad) seguindo-se as instruções do fabricante. Para a quantificação das proteínas dos clones selecionados (item 4.3.4.2.), foram adicionados 800 μL do reagente de Bradford (item 3.1.5.11.) em 200 μL de amostra. A reação foi incubada por 10 min. à temperatura ambiente e, posteriormente, a leitura da amostra (cubeta plástica, Sigma) foi conduzida em espectrofotômetro (Pharmacia Biotech-Ultrospec 3000, a 595 nm). Em ambos, os resultados obtidos foram submetidos à regressão linear, utilizando-se para isso uma equação linear previamente determinada para concentrações conhecidas (reta padrão).

3.2.24. Eletroforese de proteínas

A eletroforese de proteínas foi conduzida em gel de poliacrilamida empregando-se os equipamentos da BioRad (Mini Protean II), Novex (Cell II). Conforme o experimento, foram feitas corridas em gel desnaturante (SDS-PAGE 10 ou 12 % segundo protocolo proposto pelo fabricante do MiniProtean II), ou nativo (gel pronto NuPAGE 3~8 % Tris Acetato, Novex-USA). Nos géis SDS-PAGE foi utilizada a coloração por prata (item 3.2.25.). Quanto aos géis nativos, a atividade da GFP foi evidenciada pela avaliação direta do gel sobre uma fonte de luz UV e, para a observação da atividade da β -glucosidase, o gel foi incubado (20 min.) com $\text{MU}\alpha\text{-Glu}$ (item 3.1.5.15.) e também observado sobre luz UV.

3.2.25. Coloração de gel de poliacrilamida com prata

Concluída a eletroforese (item 3.2.24.), o gel foi colocado (1~2h) em 50 mL da solução fixadora (item 3.1.5.12.1.). Após o período, o fixador foi substituído por 50 mL da solução incubadora (item 3.1.5.12.2.) e o gel mantido por 15 min. nesta solução. Em seguida, a solução foi retirada e o gel lavado em 400 mL de água deionizada (3X de 10

min. cada). Após a lavagem, o gel foi incubado por 15 min. em 50 mL da solução de prata (item 3.1.5.12.3.) e lavado em água deionizada. Por fim, o gel foi incubado com a solução reveladora (item 3.1.5.12.4.) até o aparecimento das bandas. A reação foi interrompida pela adição de 50 mL da solução de interrupção (item 3.1.5.12.5.). Os géis foram analisados em transiluminador de luz branca fluorescente.

3.2.26. Extração de proteínas em larga escala (mg)

Para a extração de proteínas em larga escala, foram utilizados 2 L de cultura bacteriana induzida com arabinose (item 3.1.5.2.). Para tanto, o meio foi inoculado com 1 % de pré-inóculo (cultura crescida por 18h), induzido segundo o item 3.2.5. e, em seguida, incubado por mais 14h. Após o período, foi iniciado o processo de extração das proteínas. Primeiramente, as células foram precipitadas (centrifugação por 10 min., 6000 rpm, rotor GSA, Sorvall RC5B Plus), lavadas em tampão TrisHCl (item 3.1.5.23.) e novamente centrifugadas. Em seguida, as células foram congeladas (-70 °C, 30 min.) e submetidas à sonicação (3X por 1 min., potência de 60 W em um sonificador VibraCell, Sonics Material Inc). Após isso, as células foram prensadas (3X com pressão de 15000psi em uma prensa francesa, American Instruments) e novamente centrifugadas (40 min. a 18000 rpm, rotor SS34, Sorvall RC5B Plus). O sobrenadante foi filtrado (0,2 µm) e mantido a -20 °C.

3.2.27. Extração de proteínas em pequena escala (µg)

O processo utilizado para cultivo, precipitação e lavagem das células foi semelhante ao apresentado no item 3.2.26., entretanto, foram utilizados 300 mL da cultura bacteriana. Após a precipitação, as células foram rompidas utilizando-se nitrogênio líquido e maceração em cadinho de porcelana. O macerado foi, então, ressuspenso em tampão TrisHCl (item 3.1.5.23.), suplementado com o inibidor de protease PMSF (item 3.1.5.16.) e centrifugado (40 min., 4 °C, microcentrifuga Eppendorf), sendo estes processos de maceração e precipitação repetidos 3 vezes. Posteriormente, o sobrenadante obtido foi filtrado (22 µm) e mantido a -20 °C.

3.2.28. Purificação da fusão via IMAC (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*)

Após a extração, as proteínas foram purificadas de acordo com a técnica de IMAC. Esta técnica se baseia na afinidade entre a cauda de histidinas presente na fusão e o níquel presente na coluna. Posteriormente, a molécula protéica foi eluída pela adição de imidazol, o qual compete com as histidinas pelo níquel. Neste sentido foram desenvolvidas duas estratégias segundo a quantidade de proteína a ser purificada (itens 3.2.28.1. e 3.2.28.2.).

3.2.28.1. Purificação em larga escala da fusão via IMAC

Com esse propósito, foi utilizada uma coluna Pharmacia XK com 15 mL da resina NiTA (Qiagen) conectada a um sistema de GradiFrac (LKB optical UV-1, P-50, Grad-Frac- Pharmacia). Primeiramente a coluna foi carregada com 20 mL da solução de sulfato de níquel (item 3.1.5.13.3.). Em seguida, a coluna foi lavada com água (75 mL a 2 mL/min.) e com a solução A (item 3.1.5.13.1., 75 mL a 2 mL/min.). Depois o extrato protéico obtido no item 3.2.26., foi carregado (1 mL/min.) e, em seguida, lavado em duas fases (solução A e depois solução A mais 15 % da solução B, item 3.1.5.13.2.), a fim de eluir os peptídeos que se ligaram fracamente à coluna. Por fim, a fusão foi eluída (300 mL, fluxo de 0.5 mL/min.) com um gradiente (15~100 % da solução B na solução A). Durante a purificação foram coletadas amostras de 3mL. Todas as frações coletadas foram posteriormente avaliadas quanto à atividade da β -glucosidase (item 3.2.31.1.) e da GFP (item 3.2.32.).

3.2.28.2. Purificação em pequena escala da fusão via IMAC

Na purificação em pequena escala foram utilizadas as mesmas soluções e procedimentos empregados no item 3.2.28.1., entretanto foram necessários outros equipamentos: uma bomba peristáltica (BioRad) conectada a uma coluna 1 mL Pharmacia (Hitrap chelating), seguida por um detector de luz UV (BioRad), um registrador (BioRad) e, por fim, um coletor de frações (Pharmacia). Foi mantido sempre o fluxo de 1 mL/min, sendo as frações de 1,6 mL e o volume das lavagens reduzidos em 15 vezes.

3.2.29. Análise de estrutura primária da fusão

Para a análise da estrutura primária da fusão foi usado o programa Protparam (<http://expasy.cbr.nrc.ca/tools/protparam.html>).

3.2.30. Obtenção da estrutura terciária das proteínas

A estrutura terciária da fusão, bem como a de seus componentes foram determinadas utilizando-se o programa Swiss-Model (<http://www.expasy.ch/swissmod>). Este programa determina a estrutura terciária da proteína a partir da seqüência primária fornecida, utilizando uma base de dados com informações já existentes sobre diversas proteínas que já tiveram sua estrutura tridimensional caracterizada (Guex & Peitsch, 1997; Peitsch, 1995, 1996). Para visualizar os resultados produzidos pelo modelador automatizado, foi usado o programa Swizz Pdb Viewer (v3.7b1).

3.2.31. Quantificação da atividade da β -glucosidase

Todos os ensaios para a quantificação da atividade da β -glucosidase foram conduzidos com substratos análogos (Tabela 2) sob condições específicas (temperatura, pH, volume) e posterior avaliação colorimétrica em espectrofotômetro adequado. A atividade da β -glucosidase é expressa em unidades (U = 1 μ mole de substrato / min. de reação) e a atividade específica é obtida pela razão entre U e 1 mg de proteína. Dois tipos de ensaios foram realizados, conduzidos em microplacas e em microtubos.

3.2.31.1. Quantificação da atividade da β -glucosidase em microplacas

Os ensaios foram conduzidos em microplacas (96 poços) com volume final de reação de 150 μ L. A reação foi interrompida com a adição do mesmo volume de uma solução de glicina (item 3.1.5.8.). No caso de amostras provenientes de suspensão celular, estas foram lisadas com tratamento térmico (banho-maria a 75 °C por 15 min.). O volume de amostra utilizado (15~120 μ L) variou de acordo com o experimento, sendo sempre completado para 150 μ L com a solução Pipes (item 3.1.5.18.). Também foram específicos para cada ensaio, a temperatura e o tempo de incubação. Após a reação, a absorbância ($\lambda=405\text{nm}$) da amostra foi avaliada em um leitor de microplaca

(EAR 340A, SLT Lab Instruments). Os valores obtidos foram então submetidos à regressão linear por uma equação obtida para uma reta padrão (0~0,14 μ moles de PNP).

3.2.31.2. Quantificação da atividade da β -glucosidase em microtubos

Os ensaio em microtubos (1,7 mL) foram conduzidos com amostras puras da fusão (100 ng) e reação com volume final de 500 μ L. As reações foram conduzidas por 10 min. em banho-maria (LKB Multitemp III, Pharmacia) e interrompidas com a adição de 1 mL da solução de glicina (item 3.1.5.8.). Após a homogeneização, 1 mL foi coletado e diluído em 4 partes de água (Milli-Q) e esta amostra mensurada em um espectrofotômetro (Stasar II- Gilford Instruments). Os resultados da absorbância foram submetidos à regressão linear segundo a equação determinada para uma reta padrão (0~0,8 μ moles de PNP).

3.2.32. Quantificação da atividade da GFP em fluorímetro

3.2.32.1. Ensaio em microplacas

Para a determinação da atividade da GFP, foi utilizado um fluorímetro Perkin Elmer LS50B, acoplado a um leitor de microplaca (96 poços). A leitura das amostras (70 μ L) foi realizada em microplaca branca (Microfluor 2, Dynex Technologies Inc) com fundo redondo. As condições aplicadas foram: excitação λ = 395 nm e emissão λ = 510 nm, com amplitude de 10 nm para ambos os parâmetros. A fluorescência emitida pela GFP foi captada pelo fluorímetro e expressa em unidades, sendo que uma unidade foi calculada como sendo equivalente a 0,57 pmoles da fusão BglA-GFP.

3.2.32.2. Ensaio em cubetas

Para a quantificação da atividade da GFP no experimento de caracterização dos clones purificados, foi utilizado um fluorímetro DynaQuant (Pharmacia). As leituras das amostras (1 mL) da fusão purificada de cada clone foram realizadas em cubetas de quartzo. Como padrão foi usada uma amostra da GFP309, sendo considerado 1 U o equivalente a 1 ng de proteína pura.

3.2.33. Concentração de proteínas

As amostras de proteínas foram concentradas de acordo com o objetivo do experimento. No caso de amostras para gel nativo, foi utilizado a coluna Microcon YM-10 (Millipore), seguindo o protocolo proposto no manual. No caso de amostras para gel desnaturante, as proteínas foram concentradas utilizando-se TCA (Ácido tricloroacético, Sigma). Para tanto, a amostra foi incubada em gelo por 30 min. e adicionada do mesmo volume de TCA 20 %. Em seguida, foi centrifugada (15 min. a 4 °C), sendo o sobrenadante descartado. Ao precipitado foram adicionados 300 µL de acetona gelada, e novamente centrifugado (5 min. a 4 °C). O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado e aquecido (10 min. a 80 °C) em tampão de corrida para SDS-PAGE.

3.2.34. Índice (BglA/GFP)

Para a seleção dos clones mutantes obtidos durante o trabalho, foi utilizado o índice formado pela razão entre atividade (U) da BglA e a fluorescência da GFP (BglA/GFP). Visava-se, por meio deste índice, a seleção das moléculas mais ativas da BglA, sem que estas fossem purificadas. Esta estratégia baseava-se na proporcionalidade (1:1) existente entre a atividade dessas proteínas, sendo testado dessa forma, se o índice obtido, representaria um valor semelhante à atividade específica da BglA.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Construção de um vetor para a expressão de fusões com GFP

Primeiramente, foi objetivada a construção de um vetor com capacidade de expressar proteínas fusionadas à GFP. Para tanto, foi construído um plasmídio com as seguintes características: ser capaz de replicar-se em *E. coli*; ter resistência à ampicilina, ter um promotor regulável pela presença de arabinose; possuir uma região com vários sítios de restrição para inserção do gene de interesse; e apresentar o gene da GFP seguido de uma cauda de 6 histidinas (6Xhis) para facilitar a purificação. Com esse fim foi decidida a clonagem do gene da GFPmut3.1 (pGFPmut3.1- Clontech) no plasmídio pBADMyHis (Invitrogen).

4.1.1. Clonagem do gene GFPmut3.1 no plasmídio pBADMyHis

Para se obter a construção desejada, o gene que codifica a GFPmut3.1 foi clonado por PCR (item 3.2.12.1.) no plasmídio pBADMyHis. Entretanto, dado à dificuldade na obtenção do vetor com as características desejadas, foi necessária a construção e seqüenciamento de uma série de plasmídios (A~F), os quais diferiam pela composição de nucleotídeos adjacentes ao gene da GFPmut3.1.. Tal dificuldade foi devida à reduzida fluorescência observada nas construções obtidas (Figura 1). Na Tabela 4 é apresentada a seqüência de aminoácidos que flanqueiam a proteína da GFP produzida por estes vetores.

Tabela 4. Seqüência de aminoácidos e identificação das construções obtidas para a GFPmut3.1.

construção	seqüência de aminoácidos em relação aos terminais da GFPmut3.1.		primers	pBADMyc His [∞]
	terminal C *	terminal N [£]		
A	EASV	KASFL E QKLISEEDLNSAVDHHHHHH	517 e 518	B
B	MR	N L EQKLISEEDLNSAVDHHHHHH	1 e 2	B
C	MR	KASFL E QKLISEEDLNSAVDHHHHHH	1 e 518	B
D [§]	MR	NLARTKTHLRRGSE	1 e 2	B
E	MR	KASLGPNKNSSQKRI	1 e 518	A
F	MR	KASLRRTKTHLRRGSE	1 e 518	C

* seqüência a partir do 18º aminoácido (1-GFPDPSSRSAAGTIWEF-17); [£] aminoácidos em: vermelho- epítipo Myc; azul- cauda de 6 histidinas; [∞] vetores (Invitrogen) utilizados na clonagem da GFPmut3.1.; [§] a construção de D o plasmídio B foi digerido com XbaI, tratada com o fragmento Klenow da DNA Polimerase (NEB) e re-circularizado.

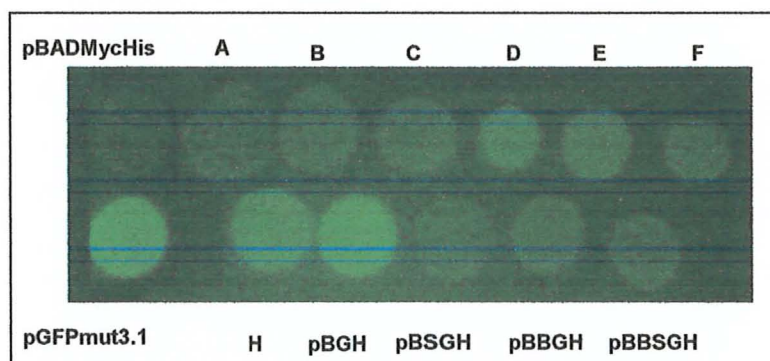


Figura 1. Fluorescência das colônias de *E. coli* expressando as diferentes construções obtidas. Cultivo em meio LB sólido (suplementado com ampicilina e arabinose) e avaliação sobre luz UV. pBADMycHis- vetor de expressão utilizado como receptor da GFP; pGFPmut3.1- plasmídio contendo o gene da GFPmut3.1.; A~F- construções obtidas para GFPmut3.1.; H- plasmídio contendo o gene da GFP309; pBGH- vetor contendo GFP309 e cauda de histidinas; pBSGH- o mesmo que pBGH adicionado de espaçador antes da GFP; pBBGH- vetor expressando a fusão β -glucosidase e GFP309 com a cauda de histidinas; pBBSGH- o mesmo que pBBGH adicionado de um espaçador de 12 aminoácidos entre o gene da BglA e da GFP309.

Foram avaliados os clones A, B e C que possuíam os segmentos Myc (epitopo Myc para ligação a anticorpos específicos) e 6XHis no terminal N da proteína, bem como os clones D, E e F, nos quais tais seqüências foram substituídas por uma composição aleatória de aminoácidos. A avaliação das diferentes construções permitiu verificar que a atividade da GFP era influenciada pela composição peptídica em seu N terminal. Fenômeno semelhante foi descrito por Dopf & Horiagon (1996) que, por meio de sucessivas deleções, verificaram que a GFP é incapaz de fluorescer quando mais que 7 aminoácidos são eliminados nas extremidades C ou N da proteína.

4.1.2. Obtenção de uma nova variante da GFP

Durante a clonagem (item 3.2.12.1.) da GFPmut3.1 utilizando os oligonucleotídeos 1 e 13 (Tabela 1), foi obtida uma GFP mutante, resultando num plasmídeo (H) mais fluorescente que os demais (Figura 1). Após o seqüenciamento (item 3.2.21., oligonucleotídeos 40 e 41 da Tabela1) foi observado que a nova variante da GFP, denominada GFP309, apresentava a substituição de um nucleotídeo (guanina →adenina). Esta modificação reverteu para estado selvagem da GFP o resíduo de número 65 (glicina→serina), o qual é um dos aminoácidos mutantes presente na GFPmut3.1., sendo portanto obtida uma nova variante da GFP, chamada de GFP309.

Segundo Yang *et al.* (1996), este resíduo é essencial na formação da região cromofórica da GFP, sendo capaz de conferir diferentes intensidades de fluorescência, bem como aumentar a expressão e/ou a ativação da proteína. Também Brejc *et al.* (1997), estudando a dupla absorção da GFP (395 e 447nm) pela variação deste mesmo resíduo, indicaram a importância deste na formação e ativação da proteína.

4.1.3. Obtenção de vetores que expressam a GFP309

Uma vez obtido o plasmídeo H que confere fluorescência às células de *E. coli*, o mesmo foi submetido a alterações a fim de se obter o vetor desejado. Inicialmente foi realizado um longo PCR (item 3.2.12.2.) objetivando construir um plasmídeo capaz de expressar a GFP309 seguida da cauda de histidinas. Para tanto, foi retirado o códon de terminação da GFP, o qual estava presente na construção H e, além disso, também foi eliminado o epitopo Myc, de não interesse neste trabalho. O plasmídeo obtido, denominado pBGH, teve o gene da GFP seqüenciado (item 3.2.21., oligonucleotídeos

40 e 41) e sua seqüência (Anexo A) depositada no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), com número de acesso AF339022.

Considerando que a ativação das proteínas da fusão poderia depender do espaçamento entre elas, foi decidida a construção do vetor pBSGH, o qual apresenta 12 aminoácidos (GTAGSAAGSGEF) entre a região de inserção da proteína de interesse e a GFP, ao invés de 6 (GTIWEF) como presentes no plasmídio pBGH. Este novo espaçador foi desenhado com base no descrito por Waldo et al. (1999), e por eles utilizado na expressão de 20 diferentes proteínas fusionadas à GFP. A construção do espaçador bem como sua clonagem estão descritas nos itens 3.2.14 e 3.2.12.1., respectivamente.

Foi verificada uma redução na fluorescência do vetor pBSGH em relação ao pBGH (Figura 1). A variação observada também já foi descrita na avaliação de variantes da GFP possuindo deleções no terminal 5' do gene (Dopf & Horiagon, 1996), e durante a expressão da GFP em peixe zebra, devido à presença de um segmento do vetor antes do gene (Higashijima et al, 1997), o que indica que segmentos na extremidade C da GFP podem influenciar sua fluorescência.

4.2. Construção, otimização da expressão e caracterização da fusão BglA-GFP

A próxima etapa foi dedicada à obtenção e caracterização de vetores expressando a fusão BglA de *Feravidobacterium* sp. e a GFP309 ligadas à cauda de histidinas. Para tanto, foram construídos vetores expressando a fusão, seguido da otimização das condições de cultivo de *E. coli* visando máxima produção. Por fim, o polipeptídeo foi purificado e caracterizado.

4.2.1. Construção de vetores de expressão da fusão BglA-GFP

Foi construído um vetor capaz de expressar a fusão protéica composta pela β -glucosidase A (BglA) de *Feravidobacterium* sp. e a GFP309. Para tanto, o DNA contendo o código de leitura aberto (*open reading frame*- ORF) de 1,3Kb desta celulase, foi amplificado (item 3.2.12., oligonucleotídeos 14 e 15, Tabela 1) a partir do plasmídio pBglA (item 3.1.3.), previamente obtido por Sullivan et al. (1998). Em seguida, o produto do PCR foi clonado (item 3.2.12.1.) nos sítios SacI e KpnI dos vetores pBGH e pBSGH (item 4.1.3.), sendo obtidos assim, os plasmídios pBBGH e

pBBSGH, respectivamente (Figura 2), cujas seqüências nucleotídicas são apresentadas no Anexo A. O plasmídio pBBSGH difere do pBBGH, somente devido a presença de um espaçador de 12 aminoácidos ao invés de 6 entre o gene da BglA e da GFP. Todo o segmento de DNA contido na região da fusão foi seqüenciado (item 3.2.21.1.), para que a seqüência dos plasmídios obtidos fosse reconfirmada (Anexo A).

Assim como já relatado na literatura para outras enzimas ligadas à GFP (Meng et al., 2000; Dabrowski et al., 1999; Albano et al., 1998), a expressão dos vetores conferiram às células capacidade de produzir a molécula quimérica ativa para as duas proteínas. Porém foi visível a redução na fluorescência da GFP (Figura 1). O mesmo efeito na fluorescência foi relatado por Cha et al. (2000), ao produzir em *E. coli*, a fusão composta pela GFP ligada à interleucina, e sua fluorescência comparada àquela apresentada para a proteína não fusionada.

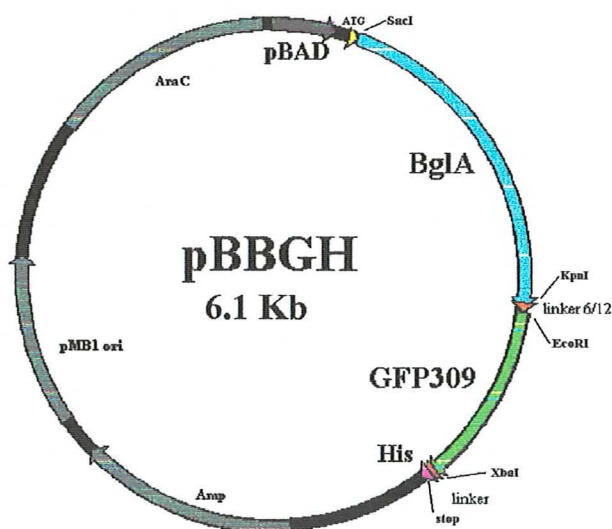


Figura 2. Diagrama esquemático do vetor pBBGH. Estão representados: AraC- ORF de AraC; pBAD- promotor arabinose; BglA- ORF da β -glucosidase A de *Ferriodobacterium* sp.; linker 6/12- espaçador com 6 aminoácidos (GTIWEF); GFP309- ORF da GFP309; linker- espaçador entre GFP e cauda His; His- cauda de 6 histidinas; stop- códon de término da tradução; Amp- resistência à ampicilina; pMB1 ori- origem de replicação derivada de pUC; SacI e KpnI - par de sítios de restrição usado na inserção da BglA; EcoRI e XbaI - par de sítios de restrição usado na inserção da GFP.

4.2.2. Correlação entre a atividade de cada uma das proteínas que compõem a fusão

A fim de constatar a existência da proporção 1:1 entre a atividade de cada uma das proteínas que constituem a fusão, a correlação entre elas foi determinada em preparações contendo diferentes concentrações de células expressando a fusão (pBBSGH). A avaliação da atividade da β -glucosidase (item 3.2.32.1.), bem como a fluorescência da GFP (item 3.2.32.1.) em diferentes concentrações celulares, é apresentada na Figura 3. Foi verificada a correlação de 0,98 entre a atividade dessas duas proteínas, o que indica alta linearidade entre a atividade dos componentes da fusão, isto é, a existência da proporção 1:1. A mesma linearidade também já foi relatada para outras moléculas fusionadas à GFP e produzidas em *E. coli*, entre estas, a enzima cloranfenicol acetil transferase (Delisa et al., 1999), a interleucina humana (Cha et al., 2000) e a proinsulina humana (Dabrowski et al., 1999). Além disso, foi detectada uma variação maior na atividade da BglA quando avaliada em concentrações superiores. Entretanto, verificou-se que a alta fluorescência do meio LB reduz pela metade a capacidade do fluorímetro em quantificar a GFP, o mesmo tipo de efeito que já foi considerado por Lissemore et al. (2000) ao avaliar diferentes promotores ligados a GFP.

Posteriormente, foi avaliada a distribuição dos valores relativos à atividade das proteínas que compõem a fusão (Figura 4). Para tanto, uma amostra de *E. coli* expressando a fusão (pBBGH) foi distribuída em uma microplaca e avaliada. Os resultados indicaram que a atividade das duas proteínas apresentaram uma distribuição normal, sendo superior o coeficiente de variação dos dados obtidos para a GFP (15%) em relação aos da BglA (4%). Com base nos valores obtidos foi determinado o número de repetições necessárias para se reduzir a variação experimental (Anexo B). Foi verificado, por exemplo, ao fixar o desvio relativo da média em 5%, serem necessárias 7 repetições para avaliação da BglA e 9 para a GFP. A quantidade de repetições necessárias é uma informação importante em sistemas automatizados, onde é possível avaliar um número superior de amostras provenientes do mesmo tratamento. No presente estudo, este valor sugere que os parâmetros avaliados foram influenciados por fatores ambientais.

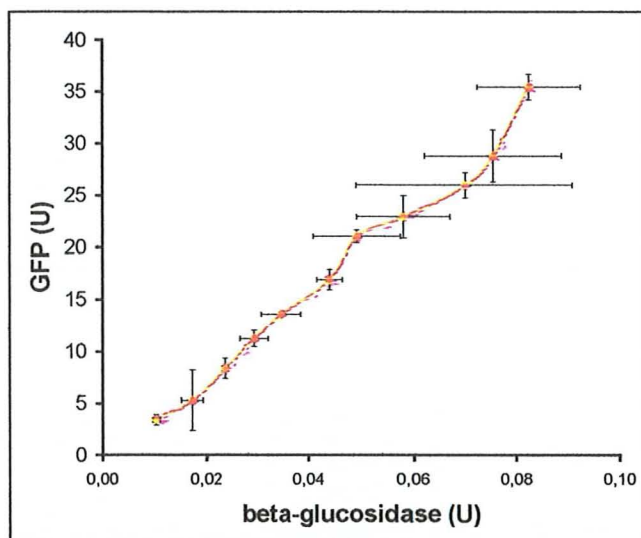


Figura 3. Diferentes concentrações celulares e correlação entre a atividade da BglA e da GFP em células induzidas possuindo o vetor pBBSGH. As células foram cultivadas (14 h), concentradas e posteriormente diluídas em série com tampão Pipes. Foram determinadas a atividade da GFP e da β -glucosidase (substrato PNP β -Glu, reação por 10 min. a 70° C). Como controle negativo foi utilizada uma cultura não induzida.

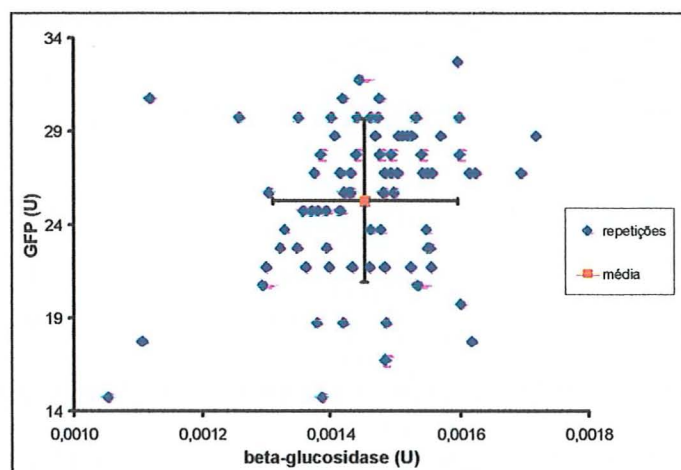


Figura 4. Dispersão dos valores obtidos para a atividade das proteínas que compõem a fusão BglA-GFP. Células de *E. coli* expressando a fusão codificada pelo vetor pBBSGH, foram cultivadas (19 h, 150 rpm, LB+arabinose 0.1 %) e distribuídas em alíquotas (75 μ L) em duas microplacas, sendo uma para quantificação da atividade da β -glucosidase (substrato PNP β -Glu, reação por 40 min. à temperatura ambiente) e outra para a GFP. As barras representam o desvio padrão em relação à média das amostras.

4.2.3. Otimização da expressão da fusão

Uma vez determinada a existência de correlação entre a atividade de cada uma das proteínas que compõem a fusão, a próxima etapa foi destinada ao estabelecimento das condições ótimas de cultivo de *E. coli* para a expressão desta. Para isso, a atividade da BglA (item 3.2.31.1.) e da GFP (item 3.2.32.1.) foram avaliadas sob diferentes condições de cultivo.

Os testes foram realizados em microplacas e em Erlenmeyers. O uso de microplacas (200 μ L de meio LB) visou determinar as condições ótimas para a posterior avaliação da biblioteca de clones mutantes para a β -glucosidase. O uso de um volume maior (100 mL), teve por objetivo o estabelecimento das condições de cultivo para posterior purificação da fusão. Em ambos os casos, foram avaliados os efeitos de diferentes concentrações do indutor (arabinose) em função do tempo de cultivo. Os resultados são apresentados nas Figuras 5 e 6.

4.2.3.1. Otimização da expressão da fusão em microplacas

Nos ensaios com microplacas (Figura 5), foi observada uma mesmo nível de atividade para a BglA e GFP nas diferentes concentrações de arabinose (0,01; 0,02; 0,1; 0,2%). Entretanto, em ambas, a atividade foi reduzida com a aplicação de 1% do indutor. Assim como no experimento com 100 mL de LB (item 4.2.3.2.), as células não induzidas apresentaram atividade nula. Além de possuírem o mesmo padrão de expressão em relação ao indutor, as duas proteínas se ativaram no mesmo período de incubação (9-10h após a indução). Com base na cinética da atividade determinada, foi escolhido o cultivo por 14h em meio LB com 0,1% de arabinose para a avaliação da biblioteca de clones mutantes.

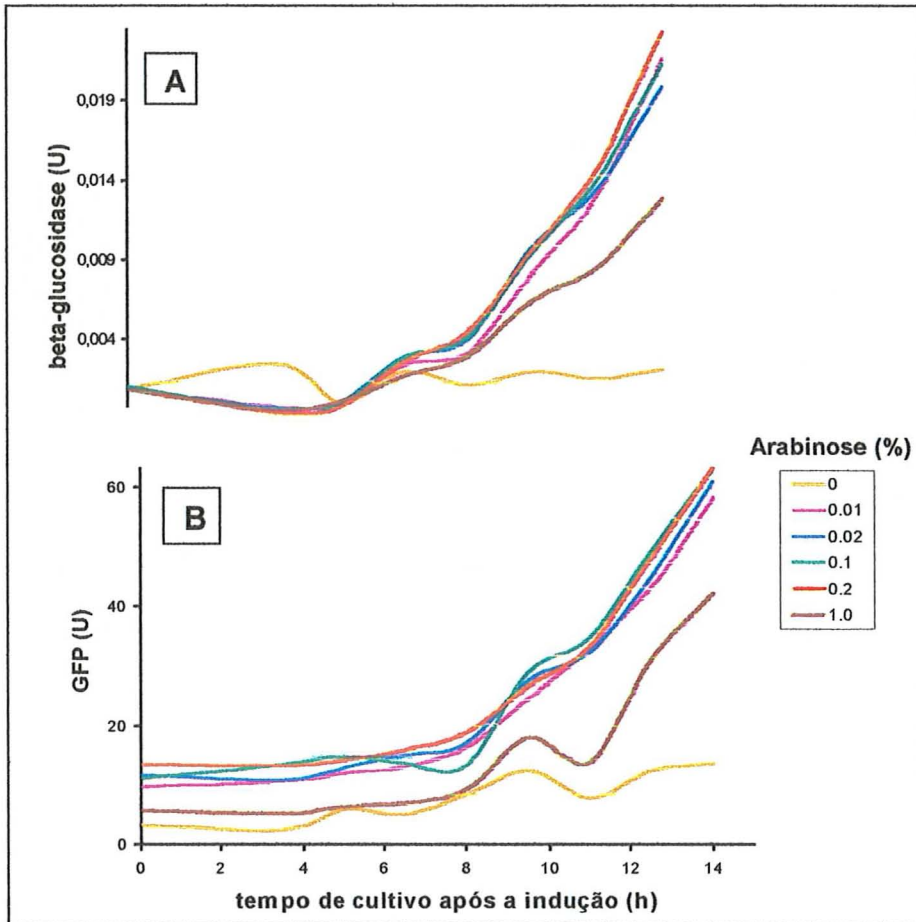


Figura 5. Cultivo em microplacas e efeito da concentração de arabinose na atividade das proteínas da fusão, em função do tempo de cultivo. Células de *E. coli* portadoras do plasmídeo pBBGH foram cultivadas em microplacas (37 °C, 14 h, agitação de 150 rpm) contendo meio LB (200 μ L) suplementado com diferentes concentrações de arabinose (0, 0,01; 0,02; 0,1; 0,2; 1 %). Amostras de cada tratamento (9 repetições) foram coletadas a cada 1,5h. Após a coleta, as amostras foram submetidas a lise celular (15 min., 75 °C) e avaliadas quanto à atividade da GFP e da β -glucosidase (substrato PNP β -Glu, reação por 20 min. à temperatura ambiente, 75 μ L da amostra).

4.2.3.2. Otimização da expressão da fusão em 100 mL de meio

Com o intuito de determinar a construção (pBBGH ou pBBSGH) mais eficiente na produção da fusão, bem como as condições ideais de cultivo para sua purificação, os clones possuidores desses plasmídios foram incubados em 100 mL de LB e avaliados para as mesmas variáveis do ensaio com microplacas. Foi observada, em todas as condições ensaiadas, atividade superior para a BglA e GFP na fusão produzida pelo clone pBBGH (Figura 6 A e B).

Ao observar a densidade celular das construções durante o cultivo (Figura 6C), foi verificado que esta não variou significativamente entre os clones, indicando que a redução da atividade do vetor pBBSGH não está relacionada ao crescimento celular. Assim como observado no vetor pBSGH (item 4.2.1.) para a atividade da GFP, a presença do espaçador de 12 aminoácidos ocasionou a redução da atividade das duas proteínas que compõem a fusão no clone pBBSGH, efeito que pode ser atribuído à síntese de uma molécula menos ativa e/ou mais tóxica, ou ainda, proporcionado por variações na expressão da fusão. Em função da superioridade apresentada pelo vetor pBBGH, este foi escolhido para ser utilizado nos ensaios posteriores.

Foi detectado também um padrão diferente de expressão para cada proteína em resposta ao indutor. Em baixas concentrações do indutor, ambas as construções apresentaram atividade superior para a β -glucosidase e reduzida fluorescência. O inverso foi observado com a aplicação de altas concentrações de arabinose, sugerindo que a arabinose possa ligar-se no sítio de ligação ao substrato da BglA, reduzindo assim a atividade da enzima sobre o substrato testado (PNP β -Glu).

Por fim, foi verificado que a atividade da celulase é detectada antes da atividade da GFP. Tal fato é devido à rápida ativação da BglA em relação à GFP, cuja ativação é descrita como demorada (Cubitt et al., 1995). Ativação independente dos componentes da fusão também é relatada por Negro et al. (1997), ao expressar o gene de um fator neurotrófico ligado ao da GFP.

Foi definido que as condições ideais para o cultivo, visando a purificação da fusão, são a indução com 0,1% de arabinose seguida de 13h de incubação, o mesmo tempo de cultivo determinado por Poppenborg et al. (1997) quando visou máxima produção da GFP em *E. coli*.

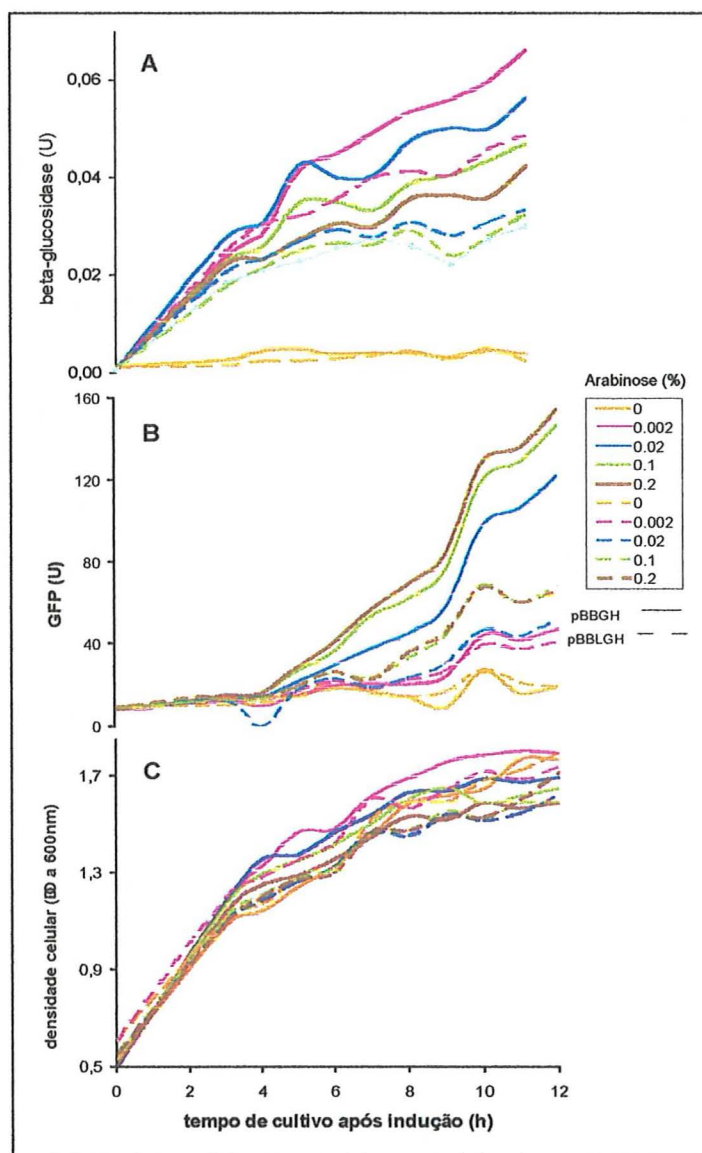


Figura 6. Cultivo de células de *E. coli* em Erlenmeyer e efeito da concentração de arabinose na atividade da fusão e no desenvolvimento da cultura. Os tratamentos (pBBGH e pBBSGH) foram inoculados (1 % de cultura previamente cultivadas por 18h) e incubados (600 mL de LB, agitação de 150 rpm, 37 °C) até obtenção de densidade celular apropriada (DO 0.6 a 600nm) para a indução. Após isso, a cultura foi subdividida (100 mL) em 5 frascos (Erlenmeyer 250 mL), induzida com diferentes concentrações de arabinose (0; 0,002; 0,02; 0,1; 0,2%) e incubada novamente. Amostras (2 mL) dos tratamentos foram coletadas a cada hora (0 e 3~12 h), submetidas à lise celular (15min., 75°C) e avaliadas para os ensaios A e B (5 repetições de 75 μ L da amostra por ensaio). Em: A- quantificação da atividade da β -glucosidase (substrato PNP β -Glu, reação por 7 min. à temperatura ambiente); B- quantificação da atividade da GFP; C- densidade celular (1 mL de amostra).

4.2.4. Extração e purificação da fusão

Seguindo as condições de cultivo determinadas no item 4.2.1. (0,1% de arabinose, 13 h de cultivo, 150 rpm e 37 °C), foram obtidas células contendo o vetor pBBGH. Posteriormente, estas foram rompidas para a extração das proteínas, segundo o protocolo de larga escala (item 3.2.26.). Após a obtenção do extrato protéico, este foi submetido à purificação da fusão, empregando-se a técnica de IMAC (item 3.2.28.1.). O cromatograma da purificação indicando a atividade da β -glucosidase (item 3.2.31.1.), bem como a fluorescência da GFP (item 3.2.32.1.) nas diferentes frações, está apresentado na Figura 7.

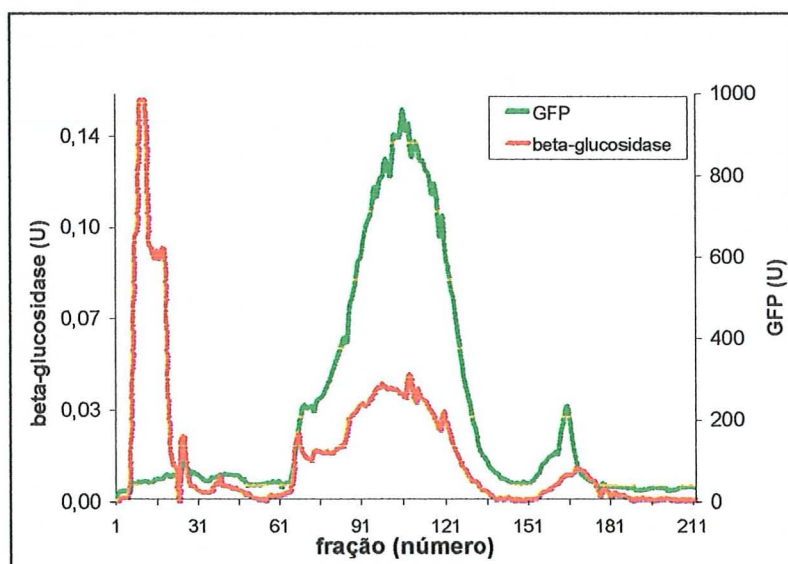


Figura 7. Cromatograma de purificação da fusão por IMAC evidenciando a atividade de cada proteína (BgIA e GFP) nas diferentes frações coletadas. Para a purificação foi seguido o protocolo de larga escala. A atividade da β -glucosidase foi determinada com amostras de 75 μ L em reação com PNP β -Glu por 2 min..

A união de duas ferramentas como a fluorescência da GFP e a cauda de histidinas, assim como já descrito por Negro et al. (1997) e Nordström et al. (1999), facilitou muito a purificação da fusão. Tal fato se deve à facilidade em monitorar a proteína de interesse por meio da sua fluorescência, a qual é evidenciada com o uso de uma lanterna com luz UV (comprimento de onda longa ou luz negra). Além disso, a purificação utilizando a cauda de histidina é muito eficiente devido a sua grande afinidade pela matriz da coluna carregada com níquel, permitindo que a molécula seja

eluída (75 mM de Imidizol) após os outros polipeptídeos terem sido retirados da coluna (30 mM de Imidizol). Para eluição da fusão foi utilizada quantidade de Imidizol semelhante à relatada por Cha et al. (1999a), os quais usaram 100 mM para eluir a fusão his-GFP-interleucina. Entretanto, concentrações superiores (200 mM) já foram relatadas para a GFP ligada a uma pequena proteína (hisactofilina de 13,5 KDa) rica em histidinas (Poppenborg et al., 1998)

Foi observada a presença de frações ativas para a BglA provenientes do estágio de carregamento da amostra na coluna. Este resultado indica que algumas moléculas da fusão poderiam estar perdendo a cauda de histidina, porém a presença marcante da atividade da BglA nas frações de carregamento e lavagem inicial da coluna, sugerem a possibilidade de que não somente toda a molécula mas, principalmente, o espaçador estarem sendo digeridos por proteases, fazendo com que a BglA não se ligasse à coluna mas a GFP, sim. Considerando que a ativação da GFP é dependente da formação de dímeros (Gonzalez & Ward, 2000), parte das moléculas da GFP não associadas a BglA poderiam ligar-se entre si ou com a fusão e, assim, à coluna.

A avaliação da atividade e pureza das frações foi efetuada em géis de eletroforese de proteínas. Para tanto, amostras de algumas frações (26, 90, 106, 121, 160, 166, 171), foram concentradas (0,5 µg de proteínas/mL; item 3.2.23.) e avaliadas em gel desnaturante SDS-PAGE (item 3.2.24.), assim como em gel nativo (item 3.2.24.). O gel nativo permitiu a detecção de uma banda fluorescente que também apresentava atividade para a β-glucosidase. Por meio de gel desnaturante foram determinadas as frações mais puras (98 a 116), as quais foram misturadas resultando em 5mg de proteína pura (item 3.2.23.), ou seja, 0,1% do peso da biomassa úmida de *E. coli* foi recuperado em proteína pura.

Segundo Cha et al. (2000), a produção de fusões com a GFP gera um gasto energético adicional à célula. Provavelmente este gasto, no presente trabalho, reduziu a concentração celular (2,5 g peso úmido células / L de meio) em relação aos valores obtidos em sistemas de alta densidade celular (Dabrowski et al., 1999; Delisa et al., 1999). A pureza da amostra obtida pode ser visualizada no gel da Figura 8. O peso molecular da fusão observado no gel coincidiu com o previsto pelo programa Protparam (item 3.2.29) de 79,9 KDa (Anexo C). Pela quantidade e qualidade da fusão recuperada, a estratégia de purificação via IMAC foi considerada eficiente.

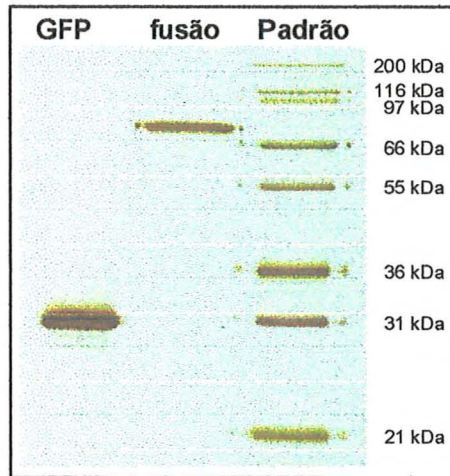


Figura 8. Gel de eletroforese de proteína SDS-PAGE corado com prata, evidenciando a pureza da fusão BglA-GFP obtida após purificação por IMAC. Amostras: GFP (mut3.1.), fusão (BglA-GFP), marcadores de peso molecular (Mark 12- Novex) e respectivos pesos do maior para o menor: miosina, β -glucosidase, fosforilase B, BSA, desidrogenase glutâmica, desidrogenase láctica, anidrase carbônica, inibidor de tripsina.

4.2.5. Caracterização da fusão

A interação entre as moléculas que compõem a fusão, pode proporcionar a estes polipeptídeos (BglA e GFP) características específicas. Neste sentido, as propriedades da fusão (temperatura ótima de atividade, especificidade pelo substrato, estrutura terciária, termoestabilidade) foram comparadas àquelas apresentadas pelo seus componentes quando analisados separadamente, a fim de determinar que tipos de interações podem ocorrer entre as proteínas quando no estado de fusão.

4.2.5.1. Composição e estrutura molecular

As seqüências nucleotídicas dos plasmídios pBBGH e pBBSGH são apresentadas no Anexo A. A estrutura primária da fusão apresenta 437 aminoácidos da BglA ligados a 238 da GFP e esta, por sua vez, ligada à cauda de seis histidinas (Figura 9). Outras propriedades desta fusão foram obtidas pela análise da estrutura primária no programa ProtParam (item 3.2.29.) e são apresentadas no Anexo C.

Ao avaliar a similaridade da seqüência de aminoácidos da GFP309 em relação a outras proteínas já clonadas, foi verificado que esta apresenta 99% de homologia com outras variantes dessa proteína. Quanto a BglA, foi observado que esta apresenta homologia com a seqüência de aminoácidos de outras β -glucosidases termoestáveis, entre elas *Thermotoga maritima* (Liebl et al., 1994) e *Thermotoga neapolitana*, com as quais apresentou 69% de identidade quanto os aminoácidos positivos, isto é, resíduos iguais ou com propriedades semelhantes aos da BglA de *Feridobacterium* sp. A BglA apresentou ainda, 51 e 46% de identidade com a mesma enzima termoestável oriunda de *Clostridium thermocellum* (Grabnitz et al., 1991) e *Microbispora bispora* (Wright et al., 1992), respectivamente, indicando, assim, alta homologia de sua seqüência com outras β -glucosidases termoestáveis já clonadas.

DPSSMIRRS	DFKDFIFGTA	TAAYQIEGAA	NEDGRGPS IW	DVFSHTPGKT	LNQDTGQDVAC
DHYHRYKEDI	QLMKEIGLDA	YRFSISWPRI	MPDGKNINQK	GVDFYNRLVD	ELLKNDIIPF
VTLYHWDLFY	ALYEKGGWLN	PDIALYFRAY	ATTFMFNELGD	RVKHWITLME	PWCSSFLGYY
TGEHAPGNQN	LQEAIFYAANN	LLRANGKAVQ	AFREEVVKDCK	VGLTHVVMKI	EPGDAPKPEF
LVASLVDRFV	NAWFNDPVVF	GKYPEEAVL	YTEKGLQVPD	SDMNIISTPI	DFFGVHYTYR
TLVYFDMMNP	LGFSYVQGD	PKTEMGWEIY	PQGLFDMLVY	LKERYKLPY	ITENGMAGPD
KLENGRVHDN	YRIEYLEKHF	EKALRAINAG	VDLKGYFIWS	LMDNFEWAYG	YSKRFGIIVY
DYNTQKRILK	DSALWLKEFL	KGTIWEFMRE	GEELFTGVVP	ILVELDQDVN	GHKFSVSGEG
EGDATYIGKLT	LRFICTIGKL	PVFWPTLVET	PSYGVQCFAR	YFDWMKQPDF	FRSAMPEGYV
QERTIFFKDD	GNYKTRAEVK	FRGDTLVNRI	BLKGIQPKED	GNILGNKLEY	NYNSHNVIIM
ADKQKNGIKV	NPKIENHIED	GSVQLADNYQ	QNTPIQDQPV	LLFDNHYLST	QSALSKDPEE
KRDHMVLEEF	VTAAGITHGM	DELYEILDPGV	DKKKKKKK		

Figura 9. Seqüência de aminoácidos da fusão BglA-GFP-His. A cor do(s) segmento(s) refere-se à sua função. Sendo: preto- sítios de restrição e espaçador; azul- ORF da BglA; verde- ORF da GFP309; vermelho- cauda de histidinas.

A estrutura terciária da fusão, bem como de seus componentes, foi predita pelo programa Swiss-Model (item 3.2.30.) e pode ser visualizada na Figura 10. Em relação à GFP309, foi possível identificar a estrutura de *beta-can*, a qual confere a esta proteína fluorescência e alta estabilidade, protegendo a região cromofórica no seu interior (Yang et al., 1996). Também foi possível prever a estrutura terciária para a BglA, a qual apresentou similaridade com várias outras β -glucosidase já caracterizadas a nível estrutural, permitindo, assim, um modelamento adequado excetuando-se alguns peptídeos com estrutura não predita (segmentos vermelhos na Figura 10). Uma das enzimas que apresentou superior homologia foi a β -glucosidase termoestável de

Bacillus polymyxa (Sanz-Aparicio et al., 1998), a qual pode ser utilizada como modelo na avaliação de futuras modificações na estrutura da BglA de *Ferredobacterium* sp. O programa, porém, não foi capaz de determinar a estrutura da fusão como uma molécula única e, como resultado para a fusão, produziu dois modelos iguais àqueles obtidos para a avaliação das moléculas BglA e GFP separadamente. Portanto, não foi possível pré-determinar as possíveis alterações estruturais nas moléculas que compõem a fusão.

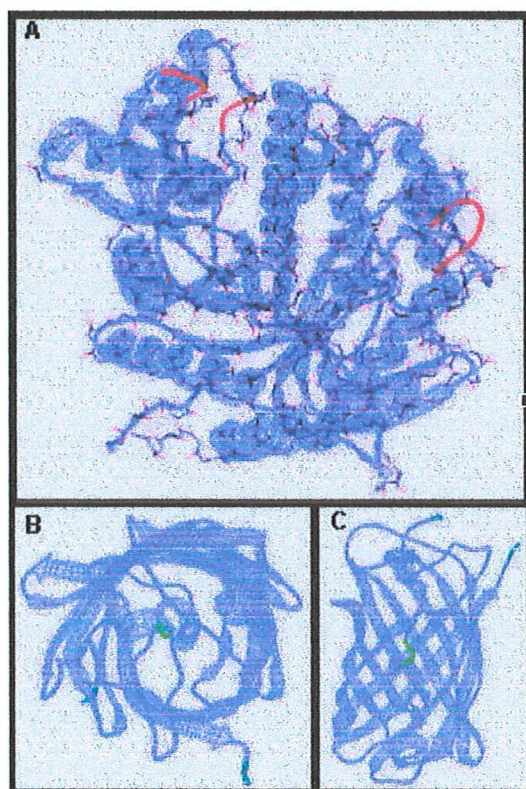


Figura 10. Estrutura terciária predita pelo Swiss Model para as proteínas que compõem a fusão. As seqüências primárias dos polipeptídeos (BglA, GFP309 e BglA-GFP309) foram analisadas e visualizadas como descrito no item 3.2.30, sendo apresentadas, em: A- a estrutura secundária e terciária da BglA, em vermelho região sem homologia a outras proteínas; B e C- vista superior e lateral, respectivamente da estrutura terciária da GFP309, em verde evidenciado a região cromofórica da proteína.

4.2.5.2. Temperatura ótima para a atividade da β -glucosidase

Com o objetivo de verificar se a presença da GFP afetaria a temperatura ótima de atividade da BglA da fusão, a ação desta sobre o substrato PNP β -Glu (item 3.2.31.2.) foi determinada em diferentes temperaturas. Em seguida, os resultados foram comparados aos valores previamente determinados por Davis et al. (2000) para a BglA selvagem, isto é, não fusionada.

Os resultados indicaram que a temperatura ótima para a atividade da β -glucosidase presente na fusão é de 95 °C (Figura 11). Quando estes dados foram comparados aos da BglA selvagem, foi verificado que a fusão apresenta atividade ótima em uma temperatura de 10 °C acima daquela apresentada pela BglA, porém com uma distribuição menos abrangente. Segundo Zeikus et al. (1998) o determinante da atividade das termoenzimas é independente do responsável por sua termoestabilidade. Baseado nas variações observadas, pode-se supor que a redução na amplitude de distribuição da atividade nas diferentes temperaturas seja consequência de alterações no determinante da estabilidade e que, o aumento na atividade ótima seja produto de modificação no determinante da atividade.

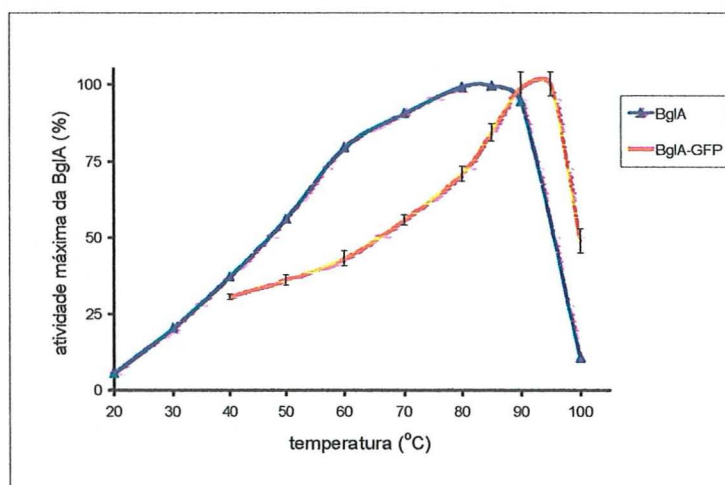


Figura 11. Temperatura ótima de atividade para a β -glucosidase. Os dados referentes a fusão (Bgl-GFP) são apresentados na forma de médias (4 repetições) com seus respectivos desvios padrões (barras verticais). Estes foram obtidos a partir de reação (substrato PNP β -Glu, reação 10 min.) em diferentes temperaturas (40, 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 100 °C). Os resultados apresentados para a BglA não fusionada, foram obtidos por Davis et al. (2000).

4.2.5.3. Especificidade pelo substrato

A fim de caracterizar a BglA proveniente da fusão em relação à especificidade pelo substrato, foi determinada a atividade desta celulase em relação a diferentes substratos. Foram utilizados os substratos PNP: α e β -glucopiranosídeo, α e β -galactopiranosídeo, α e β -arabinopiranosídeo, β -manopiranosídeo, β -xilopiranosídeo, β -cellobiosídeo e β -lactopiranosídeo (item 3.1.5.17.). A reação foi conduzida a 95°C (item 3.2.31.2.), e os dados obtidos foram convertidos em atividade específica e atividade relativa (Tabela 5).

Ao comparar estes resultados àqueles apresentados por Davis et al. (2000) obtidos para a BglA selvagem, foi detectado, de maneira geral, que a atividade relativa da enzima foi mantida, apenas sendo observada redução quanto aos substratos PNP α -Glu e PNP β -Xil, e um aumento sobre o substrato PNP β -Gal. Além disso, ao comparar os resultados referentes à atividade específica normalizada pelo peso molecular, entre BglA e BglA-GFP, foi observado que a atividade máxima obtida para a fusão a 95 °C é 31 % superior àquela apresentada pela BglA selvagem a 85 °C. Estes dados novamente sugerem a ocorrência de alterações no determinante responsável pela atividade da enzima, desta vez provavelmente influenciando o sítio de ligação ao substrato. Apesar de existirem inúmeros casos de enzimas ativas ligadas a GFP (Meng et al., 2000; Gordon et al., 2000; Mullaney & Black, 1998), ainda não existem relatos quanto à influência da GFP na especificidade da enzima pelo substrato.

Tabela 5. Especificidade da β -glucosidase presente na fusão nos diferentes substratos e comparação dos resultados àqueles obtidos para a molécula selvagem. Para tanto, foram avaliadas 4 repetições de cada tratamento da fusão, sendo a reação (95 °C, 10 min.). Os dados da BglA selvagem foram determinados por Davis et al. (2000) a 70 °C. Para a obtenção da atividade relativa para a fusão nos diferentes substratos, foi utilizada como referência a atividade máxima específica obtida com PNP β -Glu.

Substrato ¹	atividade da β -glucosidase			
	fusão ²		BglA selvagem ³	
	atividade específica (U/mg)	desvio padrão	atividade relativa (%)	atividade relativa (%)
PNP α -Glu	0	n.d.	0	1.4
PNP β -Glu	187	13,33	100	100
PNP α -Gal	0	n.d.	0	0
PNP β -Gal	102	8,58	54,6	33
PNP α -Ara	18	0,77	9,8	n.d.
PNP β -Ara	0	n.d.	0	0
PNP β -Xil	1	0,38	0,5	2,7
PNP β -Man	0	n.d.	0	0
PNP β -Cel	19	2,85	10,3	n.d.
PNP β -Lac	22	3,68	11,8	n.d.

¹ *p*-nitrofenol-piranosídeos (item 3.1.5.17.); ² fusão BglA-GFP; ³ BglA selvagem (Davis et al., 2000); n.d.- dado não determinado

4.2.5.4. Termoestabilidade da GFP

Além da já comentada redução na fluorescência (item 4.2.1.) da GFP quando no estado de fusão, foi objetivado determinar se a termoestabilidade desta proteína também havia se alterado. com esse fim, a estabilidade da fluorescência da fusão a altas temperaturas foi comparada à da GFP selvagem (GFP produzida em *E. coli*, com seqüência derivada da GFP de *Aequorea victoria*). Para tanto, amostras puras das duas proteínas foram incubadas a 70 e 95 °C e frações coletadas em função do tempo (0 ~ 21 h) foram avaliadas (item 3.2.32.1.). Os resultados referentes à fluorescência relativa de cada tratamento do ensaio a 70 °C são apresentados na Figura 12.

Quanto aos resultados obtidos pela incubação das moléculas a 70 °C (Figura 12), foi verificado que a GFP309 no estado de fusão, apresentou ser mais tolerante a altas temperaturas que a GFP selvagem. Além disso, quando incubadas a 95 °C, as duas amostras perdem totalmente a fluorescência após somente 10 min. de tratamento. Considerando estes resultados, sugere-se que a desnaturação da GFP possa estar relacionada à rápida elevação da atividade da BglIA na fusão em temperaturas superiores a 80°C (item 4.2.5.2.), fazendo com que a total desnaturação da GFP a 95°C, permitisse a máxima atividade da BglIA. Segundo Beadle et al. (1999), a termoestabilidade é produto do equilíbrio termodinâmico entre as forças de entalpia e entropia exercidas entre os resíduos da proteína. Neste sentido, é considerado que a presença da BglIA na fusão possa ter alterado a termodinâmica da GFP.

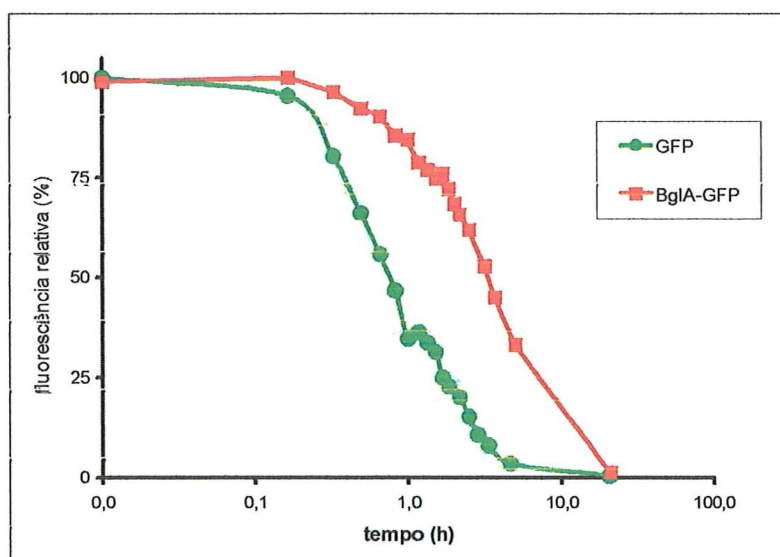


Figura 12. Termoestabilidade da fusão (BglIA-GFP309) e da GFP selvagem. Amostras puras de cada tratamento foram diluídas em tampão pipes e adicionadas de 0,1 % de BSA. Um total de 8mL de cada amostra foi submetido ao tratamento térmico (70 °C) por 21 h. Frações de 250 µL foram coletadas nos diferentes tempos e avaliadas (3 repetições de 70 µL) quanto a atividade da GFP. Os resultados são apresentados em fluorescência relativa (%), expressa pela razão entre a fluorescência no tempo X e no início do ensaio, multiplicada por 100.

Foi constatado que a molécula composta pela fusão apresenta praticamente todas as propriedades das duas proteínas que a compõem, entretanto, tornou-se importante considerar, nas análises subsequentes, quais as características que foram alteradas em função da interação entre a GFP e BglA.

4.3. Obtenção e caracterização de moléculas mutantes da BglA

4.3.1. Otimização das condições de *Error Prone PCR* (EPP)

A estratégia escolhida para a obtenção de moléculas mutantes da BglA foi o método de *Error Prone PCR* (EPP, item 3.2.12.3.), que se baseia na introdução de mutações aleatórias em uma molécula de DNA, por meio de uma reação de PCR com baixa fidelidade. No EPP, a taxa de mutação pode ser controlada pela quantidade de DNA molde, pelo número de ciclos do PCR, bem como pela concentração de cloreto de manganês. Este sal funciona como uma molécula análoga ao cloreto de magnésio (cofator da DNA *Taq* polimerase) e, ao ligar-se à *Taq* polimerase, reduz a fidelidade de incorporação de nucleotídeos durante o processo de polimerização do DNA, favorecendo a introdução de mutações (Zhao et al., 1998b).

O controle da taxa de mutação por meio da concentração de $MnCl_2$ é o método mais eficiente. Segundo Dr. Jeffrey Moore (comunicação pessoal), a frequência de moléculas mutantes inativas deve ser entre 25 e 30% da população, isto é, não tão baixa para permitir que pequena quantidade de clones sejam avaliados, mas também não tão alta para evitar que mutações desejáveis sejam mascaradas por deletérias.

Baseando-se no protocolo de EPP proposto por Zhao *et al* (1998b), em uma primeira etapa foram otimizadas as condições de amplificação da BglA. Para tanto, foram conduzidos testes com mais ciclos (14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25 ciclos) e maior quantidade de DNA molde (8, 10, 20, 100ng) que o proposto. O produto da amplificação obtida em alguns desses testes é apresentada na Figura 13. À partir dos resultados obtidos a reação de EPP (50 μ L) foi padronizada em 25 ciclos com 50ng de DNA molde.

A fim de determinar a quantidade de $MnCl_2$ necessária para que 25~30% dos clones fossem inativos, foram construídas e avaliadas 5 bibliotecas de genes mutantes da BglA, cada uma obtida numa concentração de cloreto de manganês (0, 50, 75, 100,

125 μM). Posteriormente, os clones ativos foram identificados como colônias azuis, após cultivo em meio sólido (LB + ampicilina + arabinose) suplementado com X-gal, permitindo assim, o cálculo da frequência de clones inativos (Figura 14). A partir dos resultados foi possível determinar que a adição de MnCl_2 na concentração final de 75 μM foi capaz de proporcionar uma população com 25% de moléculas inativas de BglA. Deste modo, a biblioteca gênica a ser avaliada foi obtida com esta concentração de MnCl_2 , nas condições previamente otimizadas e apresentadas no item 3.2.12.3.. Quanto ao método proposto para a determinação da porcentagem de clones não ativos, apesar dessa estratégia restringir-se somente àquelas enzimas para as quais este tipo de substrato cromogênico é disponível, no presente caso, o método possibilitou avaliar diretamente, sem equipamentos (placas de Petri), um grande número de clones (1500~2000), portanto apresentando-se eficiente para este propósito.

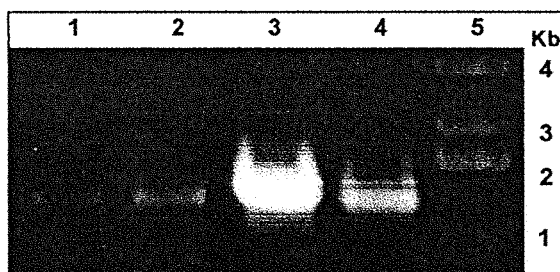


Figura 13. Gel de eletroforese de DNA apresentando amostras de diferentes testes realizados para otimização da reação de EPP. Em 1 e 2: amplificação (10 ng DNA molde; 300 μM de MnCl_2) da BglA utilizando 14 e 16 ciclos de amplificação, respectivamente. Em 3 e 4: amplificação (20 ciclos; 10 ng de DNA molde) da BglA, reação adicionada de 0 e 300 μM de MnCl_2 , respectivamente. Em 5: marcador de DNA (1Kb, Gibco) e, ao lado, o respectivo tamanho das bandas em Kb.

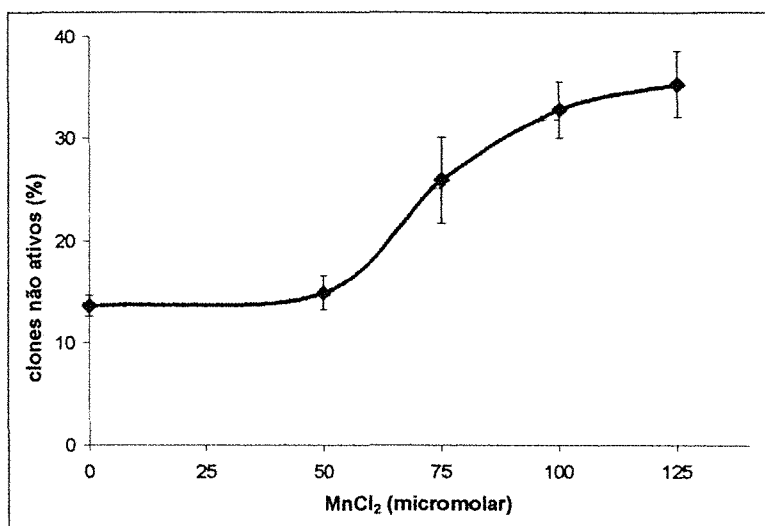


Figura 14. Relação entre a freqüência de clones inativos e a quantidade de $MnCl_2$ utilizada na reação de EPP. Resultados obtidos com a avaliação de 1500~2000 clones por concentração de cloreto de manganês. Os mutantes ativos foram identificados como colônias azuis, após cultivo (24 h) em placa de Petri contendo LB suplementado com X-gal. A freqüência de inativos foi determinada pela razão entre o número de colônias brancas em relação ao total (brancas+azuis). As barras verticais se referem ao desvio padrão em relação a média (4 repetições).

4.3.2. Construção de uma biblioteca de clones mutantes via EPP

Após a determinação das condições para construção do banco de clones expressando moléculas mutantes da BglA (item 4.3.1.), prosseguiu-se com a obtenção da mesma. Para tanto, as moléculas mutantes de BglA foram clonadas no plasmídio pBBGH previamente preparado (item 3.2.13.), sendo as colônias transformantes semeadas em meio LB sólido suplementado com X-gal. As colônias ativas (azuis) foram coletadas e transferidas para as microplacas (mestra). Foram obtidas 15 microplacas mestras contendo os clones mutantes e os controles: pBBGH considerado como parental e controle da atividade de BglA; pBGH como controle positivo da GFP e negativo da BglA; o meio LB sem inóculo como controle negativo da fluorescência e da BglA. Dessa forma, foi totalizada uma população de 1350 clones mutantes, 60 parentais, 15 pBGH e 15 LB distribuídos em 15 microplacas (96 poços).

4.3.3. Avaliação e seleção de clones mutantes da BglA em diferentes substratos

Após a construção da biblioteca de clones mutantes, estes foram submetidos à avaliação da atividade dos componentes da fusão (BglA e GFP) a fim de determinar o índice (BglA/GFP) descrito no item 3.2.34.. Foi pressuposto que a normalização da atividade da BglA pela GFP apresentada pelos clones avaliados, reduziria os efeitos adversos ao sistema (crescimento e expressão diferencial), permitindo assim a obtenção de um valor mais representativo da atividade da BglA, o qual seria comparado à atividade específica desta enzima.

Para a caracterização dos clones obtidos, foram processadas três fases de avaliação, seguidas da seleção dos mutantes com índice superior. Cada índice foi determinado especificamente para um substrato, sendo testados um total de 8 substratos análogos (PNP β -Glu, PNP β -Xil, PNP α -Ara, PNP β -Ara, PNP β -Man, PNP β -Gal, MU α -Man, MU α -Glu). Estes substratos foram escolhidos em função da especificidade da enzima, tendo portanto sido avaliado não somente o substrato principal (PNP β -Glu), mas também aqueles em que a celulase é pouco ou até mesmo não ativa.

4.3.3.1. Primeira fase de avaliação e seleção

Nesta primeira etapa, toda a população presente nas 15 microplacas mestras (item 4.3.2.) foi submetida à avaliação da atividade da β -glucosidase (item 3.2.31.1.) e da GFP (item 3.2.32.1.). Para tanto, as placas foram inoculadas e incubadas conforme item 3.2.4.. Após o cultivo, foram coletadas amostras de cada tratamento, a fim de avaliar a fluorescência da GFP, bem como a atividade da BglA sobre substratos análogos (PNP β -Glu; PNP β -Xil e mistura de MU α -Man, MU α -Glu, PNP β -Ara). Por fim, foi determinado um índice (BglA/GFP) específico para cada substrato.

A partir da análise dos resultados obtidos, nenhuma atividade da BglA foi observada na mistura de substratos. No entanto, foram detectados clones mutantes significativamente (5 %) superiores à linhagem parental quanto à atividade da BglA sobre os substratos PNP β -Glu e PNP β -Xil, bem como quanto à fluorescência da GFP. Esses dados, quando apresentados em um gráfico de dispersão (Figura 15), evidenciaram a superioridade dos mutantes.

Como no item 4.2.1., foi novamente detectada redução na fluorescência da GFP quando fusionada à BglA, sendo determinado que a fluorescência média emitida pelo vetor pBGH (GFP309 não fusionada) é aproximadamente três vezes superior à das fusões (mutantes ou parental). Também neste ensaio, foi observada, como no item 4.2.2., alta fluorescência do meio de cultura LB, o que reduz a sensibilidade do fluorímetro na determinação da fluorescência oriunda da GFP.

Em seguida, foi determinada a correlação entre a atividade da BglA e da GFP, sendo esta 0,51 e 0,58, para os substratos PNP β -Glu e PNP β -Xil, respectivamente. Este resultado, quando comparado ao valor de 0,98 obtido no item 4.2.2., indica uma redução na linearidade dos parâmetros testados, o que, por sua vez, gerou um índice (BglA/GFP) com amplitude de variação superior.

Os resultados indicaram a obtenção de clones mais ativos por meio do processo de evolução dirigida. Este fato, porém, não garante que moléculas mais ativas de BglA tivessem sido criadas, pois a melhora na atividade dos diferentes clones pode ser produto de variação no crescimento e/ou produção da fusão. Com o objetivo de determinar a possível existência de uma fusão que apresentasse uma β -glucosidase com atividade específica superior à parental, foi realizada a avaliação dos clones por meio do índice (BglA/GFP), sendo este um valor específico para cada substrato testado.

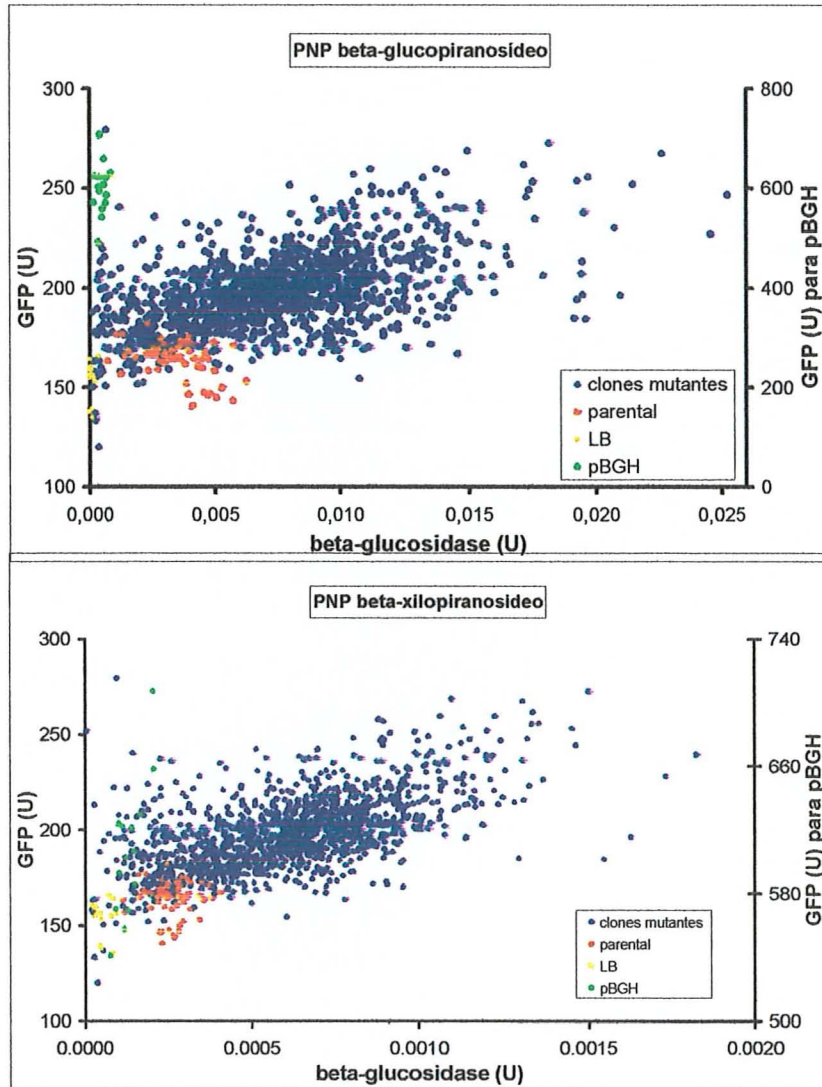


Figura 15. Gráfico de dispersão indicando a atividade produzida por cada um dos componentes da fusão (BglA e GFP) para os diferentes tratamentos analisados (clones mutantes, parental- pBBGH, pBGH e LB) durante a primeira fase de avaliação da população mutante. No gráfico superior, estão os resultados referentes ao teste com PNP β -Glu (5 μ L de amostra, reação por 5,5min. a 75°C) e, no inferior, os dados do ensaio com PNP β -Xil (25 μ L de amostra, reação por 1,5h a 65°C).

Nesse sentido, foi calculado o índice (BglA/GFP) para cada tratamento em ambos substratos (PNP β -Glu; PNP β -Xil). Estes valores, quando comparados, demonstraram alta correlação entre os dois substratos testados. A distribuição destes valores (Figura 16) sugere um aumento na média dos mutantes em relação ao parental porém, a variância deste índice no tratamento parental foi alta, indicando uma possível influência de ordem ambiental ou ainda, um reflexo da redução da linearidade entre a BglA e a GFP.

Em seguida, considerando o índice determinado para a atividade da BglA nos substratos testados (PNP β -Glu e PNP β -Xil), foram selecionados 6 a 9 clones por microplaca mestra, totalizando-se 110 clones por substrato. Estes foram, então, submetidos à segunda fase de avaliação e seleção.

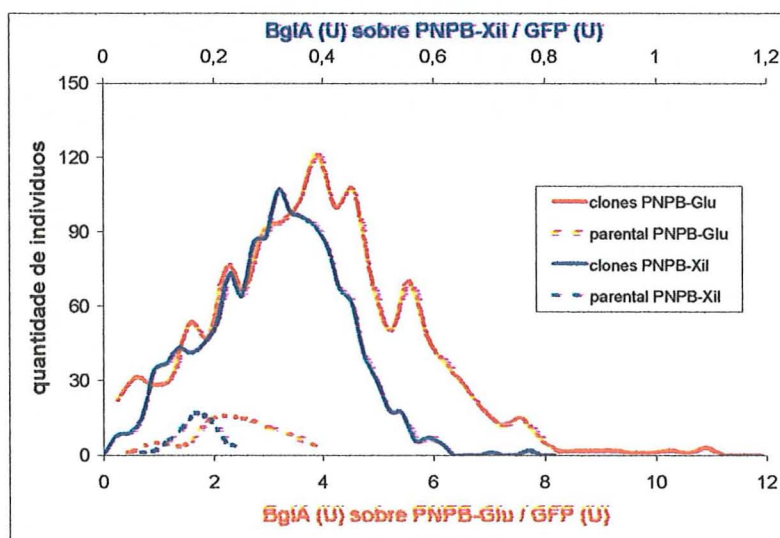


Figura 16. Distribuição dos índices obtidos para os clones mutantes e parental, segundo o tipo de substrato testado. Índice = $(\text{BglA (U) / GFP (U)}) \cdot 10^5$. Considerar eixo superior para a atividade da BglA sobre o substrato PNP β -Xil e eixo inferior sobre PNP β -Glu.

4.3.3.2. Segunda fase de avaliação e seleção

Os clones selecionados no item 4.3.3.1., bem como os controles (parental, pBGH), foram repicados em 4 microplacas mestras. Em seguida, estas foram incubadas (item 3.2.4.) para se determinar a atividade da β -glucosidase (PNP β -Glu; PNP β -Xil; PNP α -Ara; PNP β -Man, item 3.2.31.1.) e da GFP (item 3.2.32.1.).

Os resultados (Figura 17) indicaram que a maioria dos mutantes selecionados apresentaram performance semelhante aos parentais. Este efeito de redução na performance geral dos mutantes da primeira para a segunda fase, provavelmente foi devido ao critério de seleção adotado na fase 1, na qual foi considerado o índice entre as atividade das proteínas e não a produtividade do clone. Apesar disso, alguns dos clones mutantes ainda foram superiores aos parentais quanto ao índice, indicando que o processo de seleção estava sendo eficiente. Na avaliação da especificidade pelo substrato, os clones apresentaram padrões semelhantes de distribuição (Figura 17).

Na segunda fase, a correlação entre a atividade das duas proteínas (BglA e GFP) nos mutantes avaliados, foi superior àquela observada na primeira fase, sendo em média 0,63 (0,53 para PNP β -Glu; 0,67 para PNP β -Xil e PNP α -Ara; 0,65 para PNP β -Man). No entanto, estes valores foram ainda inferiores em relação ao controle parental, o qual apresentou em média correlação de 0,9 (0,86 para PNP β -Glu; 0,93 para PNP β -Xil; 0,92 para PNP α -Ara; 0,89 para PNP β -Man).

A diferença na correlação observada entre mutantes e parentais indica certa independência entre os parâmetros (BglA e GFP), a qual pode ter sido gerada por várias razões, entre as quais destacam-se: a variação oriunda da população de moléculas mutantes da BglA, a interação entre os componentes da fusão e a presença de clones sem atividade de GFP.

Com o objetivo de avaliar a normalização da atividade da BglA pela GFP (BglA/GFP) e seus efeitos sobre a variação na atividade da β -glucosidase, foi determinado para os diferentes substratos testados, o coeficiente de variação antes e depois dessa normalização (Tabela 6). Os resultados indicaram como sendo efetiva a diminuição na variação da atividade da β -glucosidase pela normalização com a GFP, sendo observada, em média, uma redução de 10% para mutantes e 18,5 % para o parental.

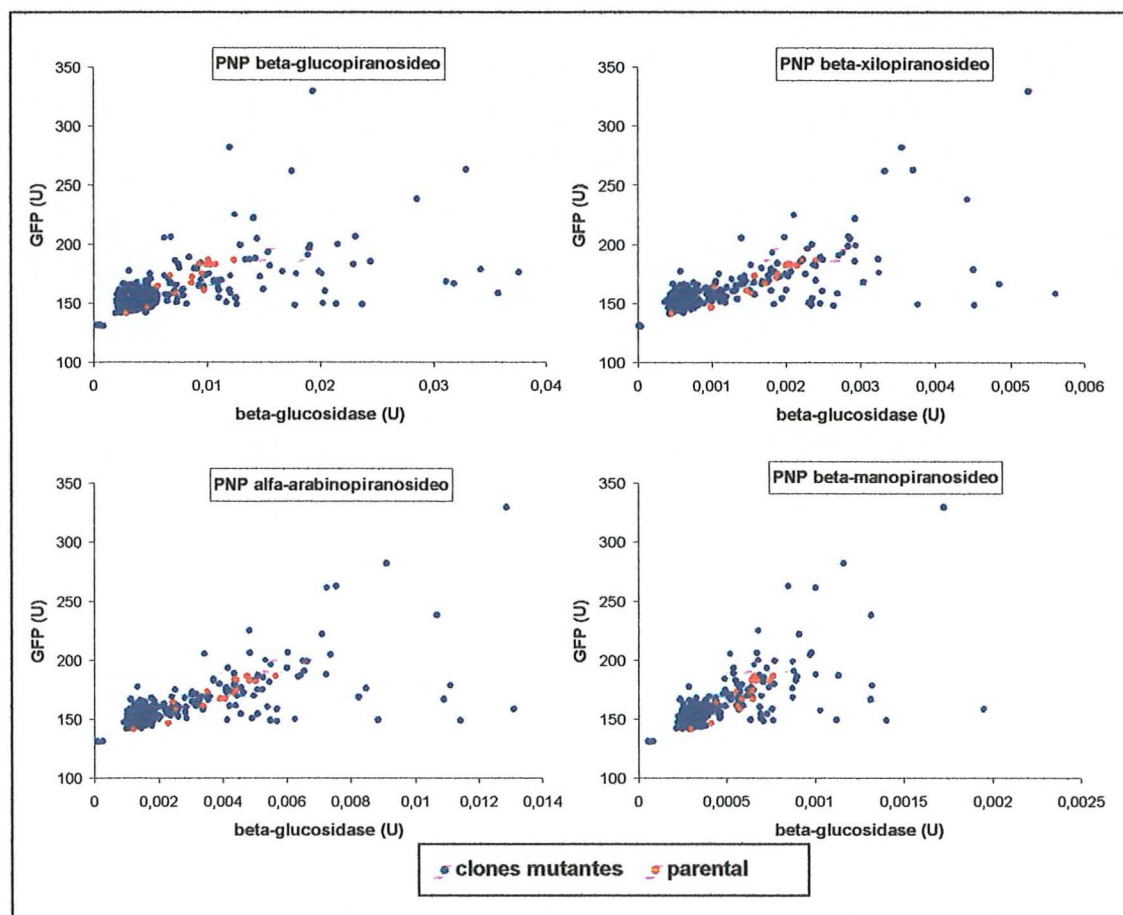


Figura 17. Gráficos de dispersão considerando a atividade da β -glucosidase e da GFP, apresentadas pelos mutantes selecionados e pelo parental. Cada quadro se refere a um substrato testado. Para a quantificação da β -glucosidase, as condições de reação utilizadas foram: PNP β -Glu- amostra 10 μ L, reação 4min. a 70 $^{\circ}$ C; PNP β -Xil- amostra 20 μ L, reação 35 min. a 65 $^{\circ}$ C; PNP α -Ara- amostra 20 μ L, reação 15 min. a 80 $^{\circ}$ C; PNP β -Man- amostra 20 μ L, reação 1 h a 80 $^{\circ}$ C.

Tabela 6. Efeito da normalização da BglA pela GFP no coeficiente de variação dos diferentes tratamentos.

Tratamento	Substrato	Coeficiente de Variação (CV)		Redução (%) no CV pela normalização com GFP
		β -glucosidase (U)	β -glucosidase (U) / GFP (U)	
Mutantes	PNP β -Glu	91	85	7
	PNP β -Xil	80	72	10
	PNP α -Ara	80	72	10
	PNP β -Man	58	50	13
Parental	PNP β -Glu	29	24	15
	PNP β -Xil	30	25	16
	PNP α -Ara	30	25	17
	PNP β -Man	20	15	26

Os resultados permitem sugerir que a avaliação por meio do índice (BglA/GFP) é efetiva na obtenção de um valor mais representativo da atividade da BglA, pela redução do efeito oriundo do crescimento diferencial dos clones. Porém, a eficiência da normalização é reduzida nos mutantes, fato este provavelmente devido à ampliação da variação no índice determinado para o grupo mutante, o qual possui um coeficiente de variação três vezes superior àquele verificado para o grupo parental.

Após a determinação do índice (BglA/GFP) para cada substrato, foi realizada mais uma etapa de seleção na qual, além dos índices para os quatro substratos, foi considerada também a fluorescência como critério de seleção. Assim, foram selecionados clones com os dois parâmetros em questão, reduzindo a seleção de mutantes com elevado índice devido a uma baixa atividade da GFP. Nesta etapa foram coletados 30 clones, os quais foram submetidos à última fase de avaliação.

4.3.3.3. Terceira fase de avaliação e seleção

Esta etapa de avaliação e seleção foi realizada com os 30 mutantes provenientes da fase 2 (item 4.3.3.2.). Estes foram cultivados em duplicata e avaliados quanto aos mesmos parâmetros testados na fase 2. Os resultados relativos à atividade da fusão, em todos os ensaios realizados, foram plotados em um único gráfico (Figura 18), o qual evidenciou a existência de clones mutantes com produção superior àquela apresentada pelo parental.

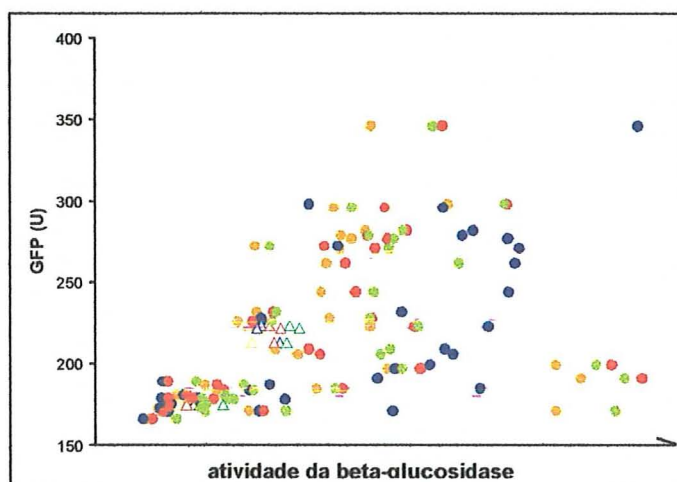


Figura 18. Gráfico de dispersão considerando a atividade da BglA e da GFP, apresentadas pelos clones mutantes (círculo cheio) e parentais (triângulo vazio), em quatro substratos testados (PNP β -Glu azul; PNP β -Xil vermelho; PNP α -Ara laranja; PNP β -Man verde). São apresentadas as médias (2 repetições) referentes a 30 clones e 4 pBBGH (parental) testados em cada substrato. Após o cultivo (20 h), as amostras foram testadas para GFP e β -glucosidase (PNP β -Glu: amostra 10 μ L, reação 3 min. a 70°C; PNP β -Xil: amostra-20 μ L, reação 10 min. a 70 °C; PNP α -Ara: amostra 20 μ L, reação 6 min. a 80°C; PNP β -Man: amostra 20 μ L, reação 45 min. a 80 °C).

Os índices para os diferentes tratamentos foram determinados e, com base nestes, foi possível identificar em todas as condições testadas, dois mutantes (EPP4, EPP8) com índices superiores aos parentais (Figura 19). Além desses mutantes, outros também apresentaram-se melhores que o clone parental. Porém tal superioridade só foi verificada quanto ao índice obtido para o substrato PNP β -Glu, o que é indicativo de que seja possível modificar a atividade da BglA de maneira independente, isto é, especificamente para um substrato. Este fato está de acordo com a variação observada na especificidade pelo substrato (item 4.2.5.3.), quando foi verificado aumento na atividade da fusão sobre o substrato PNP β -Gal. Durante esta última fase de avaliação, foram selecionados 16 mutantes, os quais foram submetidos à caracterização da estabilidade plasmidial e da atividade específica da fusão.

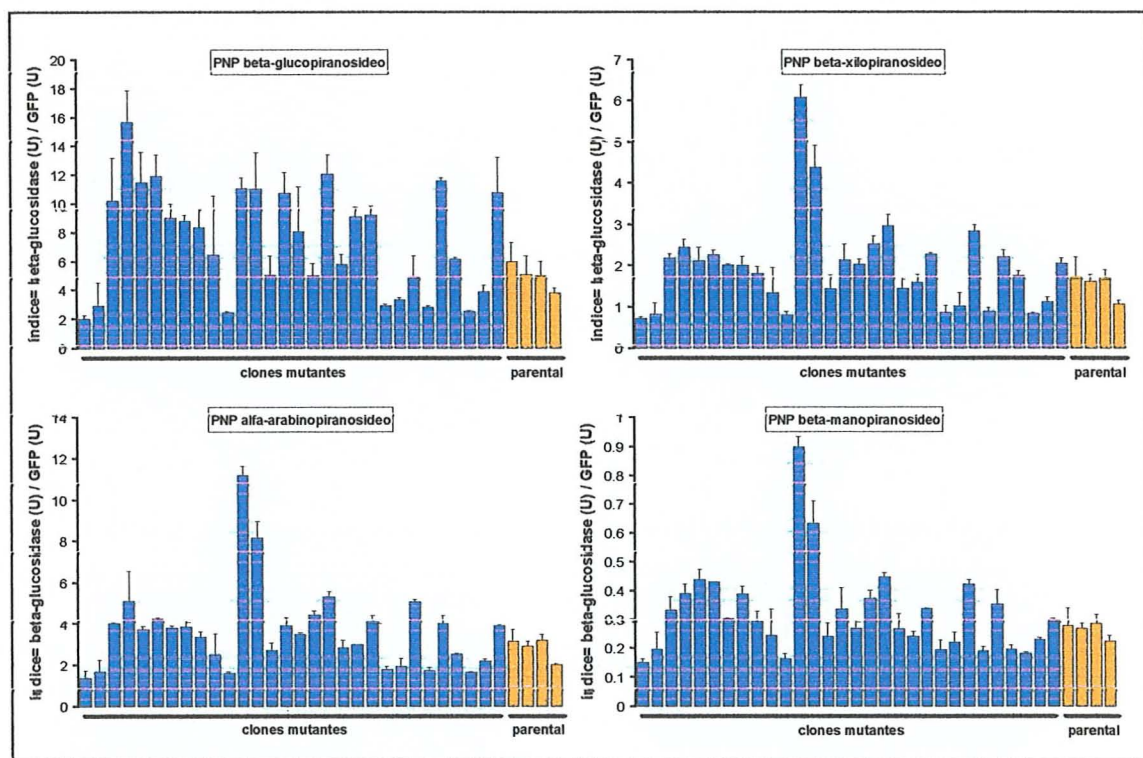


Figura 19. Índices apresentados pelos mutantes e parentais, quando incubados em diferentes substratos, obtidos pela razão entre a atividade da BglA (U) e a fluorescência da GFP (U) $\times 10^6$, nos diferentes substratos testados. As condições de quantificação da BglA foram: PNP β -Glu- amostra 10 μ L, reação 3 min. a 70°C; PNP β -Xil: amostra-20 μ L, reação 10 min. a 70 °C; PNP α -Ara: amostra 20 μ L, reação 6 min. a 80°C; PNP β -Man: amostra 20 μ L, reação 45 min. a 80 °C). As barras verticais se referem ao desvio padrão em relação à média das repetições.

4.3.4. Caracterização dos clones mutantes selecionados

4.3.4.1. Estabilidade plasmidial e expressão diferencial da β -glucosidase

Um total de 16 clones mutantes da fase 3 de avaliação, foram selecionados e designados como clones EPP seguido de um número. Ao repicá-los em meio LB sólido (suplementado com ampicilina e arabinose) foi verificada a presença de células não ativas para a BglA. A fim de melhor caracterizar esse fenômeno, foi conduzido um ensaio no qual células provenientes de colônias ativas de cada clone, foram cultivadas em meio líquido (5 mL LB, 20 h, 37 °C, 150 rpm) e posteriormente semeadas em meio sólido contendo X-gal (item 3.1.5.7.). Após incubação (24h), a atividade da BglA foi determinada por inspeção visual.

Entre as colônias formadas, foram observados três tipos: as de coloração azul (ativas para a β -glucosidase), as brancas (inativas), e também um estágio intermediário representado por uma colônia azul com setores brancos (instáveis). Os tipos de colônia formadas bem como sua distribuição na placa de Petri são apresentadas na Figura 20.

A porcentagem de cada tipo de colônia para os diferentes clones foi determinada e apresentada na Tabela 7. Foi verificado que metade dos clones, apresentavam, além do tipo ativo, também colônias com setores (instáveis) e, nesse grupo, a grande maioria com reduzida porcentagem (<1%) de colônias inativas. Porém, clones como pBBSGH, EPP 13 e 17 foram mais afetados, apresentando cerca de 5% de colônias com setores (instáveis). O máximo de instabilidade foi observado com o EPP7, o qual apresentou somente 21% de colônias totalmente ativas.

Em todos os clones instáveis, a proporção de colônias com setores foi superior à de inativas. A presença de colônias com setores indicou que o fenômeno observado poderia ter origem genética. A fim de confirmar se o efeito observado era realmente de origem plasmidial e não produto da formação de corpo de inclusão devido à toxicidade da molécula expressa, como já relatado por Hugh Fisher (comunicação pessoal) para a GFP, foi realizada a caracterização dos plasmídios presentes nas células ativas e inativas.

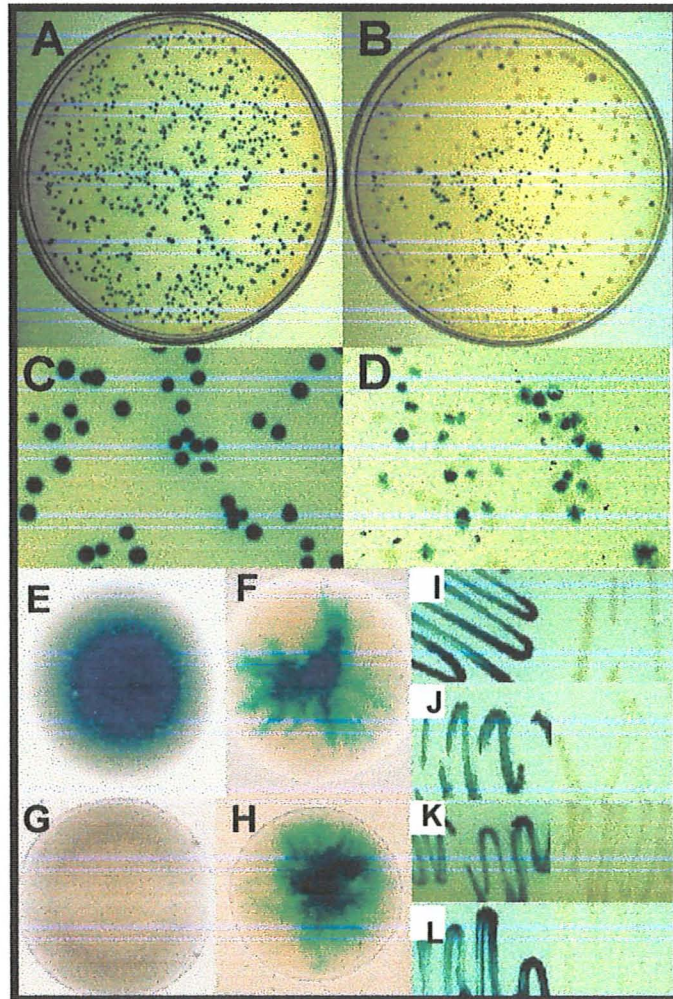


Figura 20. Morfologia das colônias de clones cultivados em placas de Petri contendo X-gal. Em A e B aspecto da placa de Petri com clones ativo (EPP16) e instável (EPP7), respectivamente. Em C e D vista ampliada do apresentado em A e B. Em E, exemplo de colônia ativa (EPP16), em G inativa (EPP7), em F e H instável com setores (EPP7). Em I, J, K, L estria do material cultivado para purificação de plasmídios, clones pBBGH, EEP6, EPP7, EPP9, respectivamente.

Tabela 7. Proporção dos tipos de colônias que se desenvolveram após o cultivo dos diferentes clones em placa de Petri, contendo meio LB suplementado com arabinose, ampicilina e X-gal.

Construção	Colônias de acordo com sua morfologia (%)			Total de colônias avaliadas
	Azul	com Setor	Branca	
EPP 3; EPP 4; EPP 5; EPP 8; EPP 10; EPP 14; EPP 15; EPP 16; EPP 18	100	-	-	400~1800
pBBGH	99,6	0,4%	-	2800
pBBSGH	93,7	6,3	-	1200
EPP 6	98,8	0,4	0,8	268
EPP 7	21	42	33	300
EPP 9	99,7	0,13	0,13	728
EPP 12	99,15	0,85	-	1300
EPP 13	96	4	-	344
EPP 17	93,4	5,5	1,1	182

Células provenientes dos dois tipos de colônias (ativa e inativa) dos clones pBBGH, EPP6, EPP7 e EPP9 foram inoculadas em meio líquido e sólido. O cultivo em meio líquido foi utilizado para a extração dos plasmídios e o em meio sólido foi utilizado para checar a atividade do inóculo (Figura 23 I, F, K, L). Foi efetuada a extração dos plasmídios (item 3.2.19.) e posteriormente, a linearização dos mesmos com KpnI (item 3.2.15.). Em seguida, o DNA foi separado por eletroforese (item 3.2.22.) e os resultados obtidos são apresentados na Figura 21a.

Pela análise do gel, foi possível detectar uma alteração estrutural padrão em todos os plasmídios provenientes das colônias inativas, sendo estes aproximadamente 1,5Kb maiores que os plasmídios oriundos das colônias ativas (Figura 21a). Foi observado também que o clone EPP7 é tão instável que apresentou maior quantidade do plasmídio alterado que do inalterado, quando foi avaliada uma amostra proveniente da colônia ativa.

Com o objetivo de determinar a posição da inserção, bem como certificar-se da identidade dos plasmídios alterados, foi realizada a amplificação por PCR do DNA (oligonucleotídeos 28 e 34, Tabela1) de toda a região que compreende a fusão e, em seguida, foi feita a separação do produto de PCR por meio de eletroforese (item 3.2.22.). Os dados (Figura 21b) confirmaram a identidade do plasmídio, indicando que a inserção ocorreu na região amplificada resultando em um aumento de aproximadamente 1,5Kb.

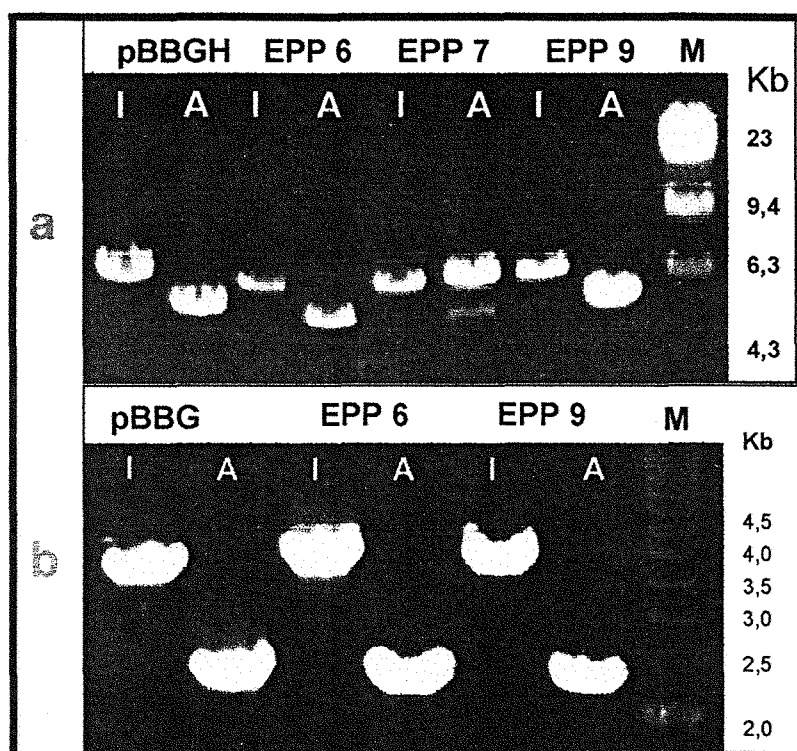


Figura 21. Caracterização do plasmídio de diferentes clones em gel de agarose. Considerar: I) DNA de colônia inativa, A) DNA de colônia ativa. Em a) experimento de linearização do plasmídio presente nos diferentes clones. O plasmídio foi extraído e digerido com KpnI; M) marcador Lambda HindIII (Gibco). Em b) amplificação por PCR do segmento que compreende a região da fusão (oligonucleotídeos 28 e 34, Tabela1; reação: 5' a 95°, 25 ciclos [15" a 94°C, 30" a 56°C, 2'30" a 72°C], 10' a 72°C); M) marcador 500pb DNA Ladder (Gibco).

A recombinação em plasmídios é descrita como um evento que pode ser mediado por diferentes enzimas como a DNA topoisomerase I (Meima et al., 1998) e a RepH (Ballester et al., 1989) entre outras, as quais reconhecem sítios específicos do DNA (Akiyama et al., 1998; Rinken & Wackernagel, 1992) e promovem modificações pontuais e/ou estruturais na seqüência do DNA.

No presente caso tais modificações estruturais do plasmídio geraram, por razão ainda não determinada, uma população heterogênea de células ativas e inativas. Considerando o enfoque quantitativo do projeto, conclui-se que a instabilidade observada pode estar também prejudicando a quantificação da atividade fusão, pois a geração da expressão diferencial da BglA na população celular amplia a variação na atividade dos clones.

4.3.4.2. Caracterização da fusão produzida pelos mutantes selecionados

Com o objetivo de determinar a correlação existente entre o índice (BglA/GFP) e a atividade específica da fusão, os clones EPP foram submetidos à extração, purificação e caracterização do polipeptídeo químero. A fluorescência dos clones selecionados quando crescidos em placas de Petri, é apresentada na Figura 22.

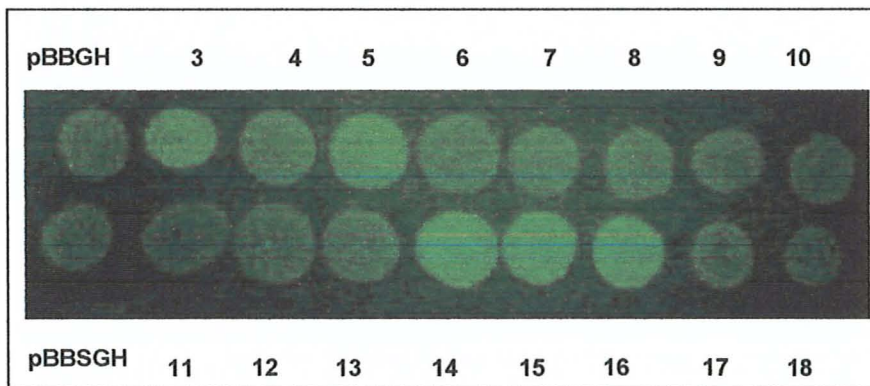


Figura 22. Fluorescência em placa de Petri dos clones EPP selecionados. Os diferentes clones são designados pelo seu número de identificação. Também é apresentado o parental pBBGH e o outro vetor de expressão pBBSGH.

4.3.4.2.1. Extração e purificação da fusão

Numa primeira etapa, as condições de purificação em pequena escala foram otimizadas. Para tanto, foram realizados alguns testes, os quais resultaram no protocolo de extração de proteínas descrito no item 3.2.27., bem como no processo de purificação da fusão apresentado no item 3.2.28.2.. Em seguida, os clones foram submetidos ao processo de purificação por IMAC. O cromatograma de alguns clones purificados é apresentado na Figura 23. Por esta metodologia foi possível purificar a fusão em somente uma etapa e, além disso, neste caso a fusão ligou-se mais fortemente a resina desta coluna do que àquela utilizada no experimento em larga escala (item 3.2.28.1.). Este fato por sua vez, permitiu a aplicação de um fluxo (volume da coluna/min.) maior do que o utilizado em larga escala, reduzindo o tempo de purificação.

Da população inicial de 16 mutantes, somente foi possível a obter a fusão pura para 12 destes. Tal dificuldade foi atribuída a diferentes razões e, entre elas, a perda da fluorescência como apresentada pelo clone EPP4. Este apresentou a GFP inativa, provavelmente devido à introdução de um códon de finalização durante a mutagenese da BglA, o qual impediu a tradução da GFP e a cauda de histidinas, impedindo que a BglA formada se ligasse à matriz da coluna. A ausência da GFP neste clone, explica o alto índice (BglA/GFP) apresentado por este no item 4.3.3.3., evidenciando que a falta ou baixa fluorescência leva a obtenção de índices inconsistentes, ou não passíveis de comparação com o apresentando pelo clone parental.

Além do exemplo citado (EPP4), outros fatos impediram a purificação da fusão. No caso dos clones EPP 6 e 8, apesar de serem capazes de sintetizar a fusão, seus componentes (BglA e GFP) se apresentam separados durante o processo de purificação das proteínas, sendo purificada somente a GFP pela ligação na coluna. Este fenômeno de ruptura das moléculas foi observado na maioria dos clones avaliados (pBBGH, EPP 3, 9, 11, 12, 13, 16, 17) porém, em intensidade bem menor que a apresentada pelos mutantes EPP 6 e 8.

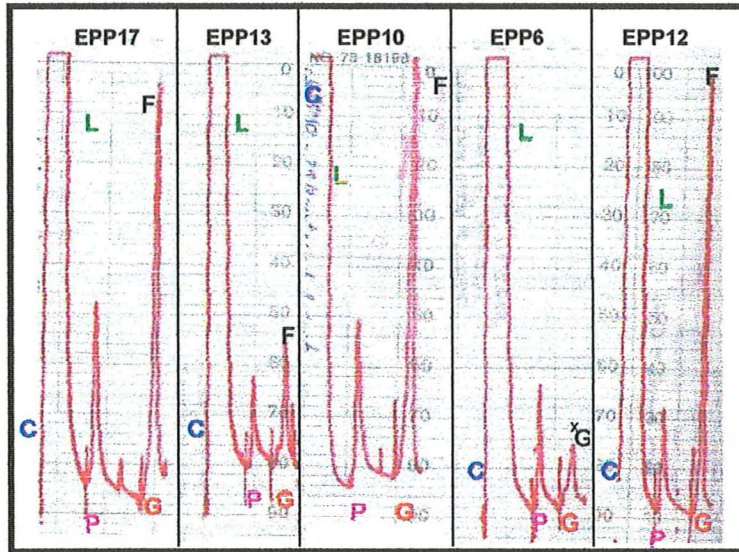


Figura 23. Cromatograma da purificação da fusão (BglA-GFP) de alguns mutantes EPP. Em vermelho a absorbância (280 nm) das frações coletadas. Em C- carregamento da amostra; L- lavagem inicial (Imidizol 10 mM); P- pulso (Imidizol 40 mM); G- gradiente (Imidizol 40~200 mM); F- fusão pura eluída; ^xG- GFP eluída.

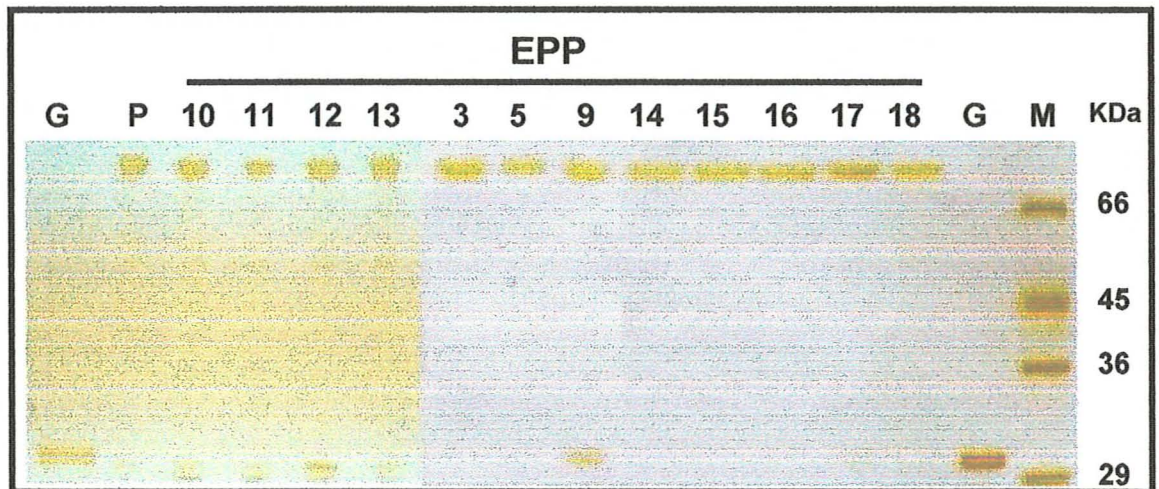


Figura 24. Gel de eletroforese de proteínas SDS-PAGE com coloração de prata, apresentando amostras puras da fusão provenientes dos diferentes tratamentos, onde foram aplicadas cerca de 300ng de cada amostra pura. As amostras apresentadas são: EPP- clones EPP; G- GFP309; P- clone parental (pBBGH); M- marcadores de peso molecular (Sigma) e respectivos pesos, do maior para o menor, (BSA, ovoalbumina, gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase, anidrase carbônica).

De maneira semelhante ao observado na purificação da fusão do clone pBBGH (item 4.2.4.), esta separação das proteínas indica que existe, no extrato protéico, uma mistura da fusão e de moléculas separadas da BglA e da GFP. A mistura, quando submetida à purificação, gera, além da fusão pura, também uma quantidade variável de GFP pura. Essa constatação pode ser verificada nas amostras EPP 9 e 12 da Figura 24. Considerando que foi utilizado um inibidor de proteases (PMSF) durante o processo de extração, pode-se inferir que tal separação possa estar ocorrendo no interior celular. Além desses dois casos que impossibilitaram a purificação da fusão de alguns clones (EPP 4, 6 e 8), a instabilidade plasmidial discutida no item 4.3.4.1. também prejudicou a produção da fusão para posterior purificação.

4.3.4.2.2. Atividade específica da β -glucosidase das fusões purificadas

Após a obtenção das amostras puras da fusão, estas proteínas foram quantificadas (item 3.2.23.) e, em seguida, aquelas com concentração (mínimo 10 $\mu\text{g/mL}$) e quantidade adequadas para o ensaio, foram analisadas quanto à atividade da β -glucosidase (item 3.2.31.1.) e da GFP (item 3.2.32.2.).

Os resultados obtidos com a atividade da BglA e da GFP são apresentados na Tabela 8. Com base nestes dados, foi observada variação significativa (5%) na fluorescência da GFP e na atividade da β -glucosidase nos substratos PNP β -gal, PNP β -Xil e PNP α -Ara (análise estatística, Anexo D). Foi verificado, também, que nenhum dos mutantes foi significativamente superior ao parental quanto à atividade específica da BglA, porém alguns deles mostraram-se superiores ao parental quanto à fluorescência da GFP. Considerando que a mesma quantidade da fusão foi utilizada para a avaliação da GFP, foi constatado que a variação observada na fluorescência é devida à interação diferencial entre a GFP e as β -glucosidases mutantes.

Tabela 8. Atividade da β -glucosidase e da GFP apresentadas pelas fusões purificadas a partir dos clones selecionados EPP e controle. Para a quantificação da β -glucosidase, o ensaio foi realizado em duplicata com 20ng de proteína a 75°C (tempo de reação: PNP β -Glu 5'; PNP β -Gal 10'; PNP β -Xil 100'; PNP α -Ara 20').

Tratamento	Atividade específica relativa (%) da β -glucosidase nos substratos				GFP (U)
	PNP β -Glu	PNP β -Gal	PNP β -Xil	PNP α -Ara	
pBBGH (parental)	94,8	45,3	0,8	10,1	9,1
EPP 3	100,0	45,6	0,7	7,1	8,6
EPP 10	90,9	35,8	0,5	4,5	10,8
EPP 12	92,9	36,1	0,4	5,8	10,8
EPP 13	98,1	42,1	0,7	6,6	19,2
EPP 14	97,6	43,4	0,6	7,2	14,4
EPP 17	93,6	38,1	0,4	5,1	10,4

4.4. Correlação entre o índice (BglA/GFP) e a atividade específica da BglA das fusões - fatores que influenciam sua determinação

A partir dos dados obtidos para os diferentes clones (item 4.3.4.2.2.), foi possível determinar a inexistência de correlação entre a atividade específica da β -glucosidase e o índice (BglA/GFP) anteriormente obtido (item 4.3.3.3.) nos diferentes substratos testados (correlação: PNP β -Glu= -0,37; PNP β -Xil= -0,44; PNP α -Ara= -0,33).

A partir dos resultados obtidos neste trabalho foi permitido concluir que a obtenção de moléculas da BglA com atividade específica superior por meio do índice, fica prejudicada devido à interferência de alguns fatores, que ampliam a variação dos parâmetros avaliados (BglA e GFP) e induzem à seleção de clones que, indevidamente, apresentam índice alto. Esses fatores foram agrupados em duas categorias de acordo com seus efeitos.

No primeiro conjunto foram agrupados os fatores erro experimental e quebra do espaçador. Esses fatores pertencem a um mesmo grupo, por serem passíveis de correção. Devido à natureza quantitativa dos parâmetros avaliados, é fundamental que a variação ambiental ou erro experimental, introduzida durante a experimentação, seja

reduzida ao mínimo possível. Nesse sentido, acredita-se que a otimização das condições de avaliação pode ser obtida por meio do cultivo e ensaio monitorados por programas e conduzidos roboticamente, gerando assim maior controle e repetibilidade dos ensaios e ocasionando redução dos efeitos indesejados como variação no tamanho do inóculo, taxa de crescimento e fluorescência do LB, entre outros.

O espaçador, também considerado uma variável reparável, apresentou-se como um fator importante na expressão da fusão, podendo ainda estar relacionado à susceptibilidade dessa molécula ao ataque das proteases no interior celular. Diante dos resultados, conclui-se que é necessária a seleção de espaçadores apropriados para a expressão da fusão e também resistentes à proteólise, reduzindo assim a possível variação na atividade gerada por esse componente e propiciando a manutenção de apenas um tipo de molécula ativa no interior da célula. Dependendo do interesse, pode-se ainda utilizar um espaçador contendo um sítio de clivagem específico para uma protease não bacteriana, como utilizado por Cha et al. (2000), quando se deseja a análise da proteína de interesse isolada da GFP.

Um segundo conjunto de fatores que podem ter atuado na redução da correlação entre o índice e a atividade específica, são os considerados não controláveis e de difícil controle. Entre esses foram incluídas a interação da GFP com a molécula da BglA, bem como a recombinação plasmidial.

Durante o desenvolvimento do presente trabalho foram observados resultados indicativos de que a fluorescência emitida pela GFP se tratava de um parâmetro influenciado pela seqüência de aminoácidos flanqueadores desta proteína. Inicialmente, este fato foi observado no terminal N da GFP durante a construção dos vetores contendo a GFPmut3.1.. Também, na avaliação das fusões puras oriundas dos clones EPP (item 4.3.4.2.2.) foi detectada uma variação significativa na fluorescência apresentada por elas. Esta alteração na fluorescência é, portanto, indicativa que ela é uma variável dependente da composição da BglA que a antecede. Esta interação poderia estar relacionada à formação apropriada da estrutura terciária da GFP, bem como em relação a sua dimerização. Portanto, ao apresentar-se variável em função da molécula que a antecede, a GFP reduz a eficiência da normalização da atividade da BglA pela GFP, ou seja, a seleção pelo índice de moléculas mais ativas.

Um segundo fator de difícil, se possível, controle é a instabilidade plasmidial, que foi descrita para metade dos clones avaliados. A inativação da fusão por uma alteração estrutural espontânea do plasmídeo, tem efeito reduzido na maioria dos casos, porém, a longo prazo, pode comprometer a avaliação devido à presença de uma população celular heterogênea.

Analisando-se os dados como um todo a viabilidade do processo em discussão, isto é, a utilização da GFP como uma estratégia auxiliar na seleção primária de clones mutantes, durante um programa de melhoramento de enzimas via evolução dirigida, pode ser considerada como uma avaliação preliminar, cujo possível aprimoramento ainda depende do prosseguimento da pesquisa ora iniciada. No entanto, os pontos aqui salientados (automatização, espaçador, interação entre os componentes da fusão e recombinação plasmidial) devem ser considerados a fim de se obter um sistema cada vez mais efetivo, valorizando somente as variações de origem genética da enzima de interesse e tornando, assim, cada vez mais eficiente a comparação entre moléculas mutantes sem a necessidade da purificação das mesmas.

5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que:

- a seqüência dos aminoácidos que flanqueiam a GFP pode influenciar sua fluorescência quando esta proteína é produzida em *E. coli*.
- a substituição de um aminoácido essencial na formação da região cromofórica da GFP, permite a obtenção de um vetor que confere elevada fluorescência às células de *E. coli*.
- é possível produzir em *E. coli* uma proteína quimérica ativa, composta pela BglA de *Fervidobacterium* sp. fusionada à GFP309 de *Aequeroea victoria*, sendo estas ligadas a uma cauda de 6 histidinas.
- a composição do espaçador entre as proteínas da fusão influencia a atividade das mesmas.
- ao avaliar células de *E. coli*, após a produção da fusão (BglA-GFP), foi possível observar a existência de correlação linear positiva entre as atividades de seus componentes.
- a estratégia de purificação da fusão adotada por meio de IMAC e cauda de histidinas, permite a purificação da fusão em somente uma etapa.
- as atividades da BglA de *Fervidobacterium* sp. e da GFP de *Aequeroea victoria*, foram alteradas quando estas proteínas foram expressas como uma fusão.

- o método de *Error Prone PCR* foi eficaz na produção de mutantes mais ativos do que o clone parental.
- a instabilidade plasmidial gerada espontaneamente pela inserção de um segmento de DNA na região da fusão, altera a porcentagem de células ativas durante o cultivo.
- a dificuldade observada no estabelecimento da correlação entre os índices (BglA/GFP) determinados para os clones de *E. coli*, expressando moléculas mutantes da β -glucosidase e suas respectivas atividades específicas é, em parte, produto da interação entre as moléculas que compõem a fusão, cujas atividades podem variar de acordo com a composição da BglA. Além disso, esta dificuldade é devida também à outras variações como: a instabilidade plasmidial, a proteólise da fusão e a não automatização total dos ensaios.

ANEXO A

Seqüência nucleotídica dos plasmídios construídos, sendo evidenciado em: azul- β -glucosidase A de *Feruidobacterium* sp.; marrom- espaçador; verde- GFP309; amarelo-nucleotídeo modificado durante o trabalho que deu origem a GFP309; vermelho- cauda de histidina; preto- demais nucleotídeos do plasmídio.

• pBGH

AAGAAACCAATTGTCCATATTGCATCAGACATTGCCGTCCTACTGCGTCTTTTACTGGCTCTTCTCGCTAACCAAACCGGT
AACCCCGCTTATTTAAAAGCATTCTGTAAACAAAGCGGGACCAAAGCCATGACAAAAACGCGTAACAAAAGTGTCTATAAT
CACGGCAGAAAAGTCCACATTGATTATTTGCACGGCGTCACACTTTGCTATGCCATAGCATTTTTATCCATAAGATTAG
CGGATCCTACCTGACGCTTTTTATCGCAACTCTCTACTGTTTCTCCATACCCGTTTTTTTTGGGCTAACAGGAGGAATTA
ACCATGGATCCGAGCTCGAGATCTGCAGCTGGTACCATATGGGAATTCATGCGTAAAGGAGAAGAAGCTTTTCACTGAG
TTGTCCCAATTCTTGTGAATTAGATGGTGATGTTAATGGGCACAAATTTTCTGTCACTGGAGAGGGTGAAGGTGATGC
AACATACGGAAAACCTACCCCTTAAATTTATTTGCACACTACTGGAAAACCTACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTACT
TTCAGTTATGGTGTTCAAATGCTTTTGCAGATACCCAGATCATATGAAACAGCATGACTTTTTCAAGAGTGCCATGCCCG
AAGGTTATGTACAGGAAAGAACTATATTTTTCAAAGATGACGGGAACACAAGACACGCTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGG
TGATACCCCTTGTAAATAGAATCGAGTTAAAAGGTATTGATTTTTAAAGAAGATGGAAACATTCTTGGACACAAATGGAA
TACAACTATAACTCACACAATGTATACATCATGGCAGACAAAACAAAAGAATGGAATCAAAGTTAACTTCAAATTAGAC
ACAACATTGAAGATGGAAGCGTTCAACTAGCAGACCATATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCTTTTT
ACCGAGACAACCATTACCTGTCCACACAATCTGCCCTTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCCCTTCTT
GAGTTTGTAAACAGCTGCTGGGATTACACATGGCATGSSATGAACTATACAATCTAGATCCCGCGCTCGACATCATCATC
ATCATCATGAGTTTAAACGGTCTCCAGCTTGGCTGTTTTGGCGGATGAGAGAAGATTTTTACGCTGATACAGATTAAA
TCAGAACGCAGAAGCGGTCTGATAAAACAGAATTTGCCCTGGCGGCAGTAGCGCGGTGGTCCCACCTGACCCCATGCCGA
ACTCAGAAGTGAACCGCGTAGCGCCGATGGTAGTGTGGGGTCTCCCCATGCGAGAGTAGGGAAGTCCAGGCATCAA
TAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCCTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTGCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGAC
AAATCCGCCGGGAGCGGATTTGAACGTTGCGAAGCAACGGCCCGGAGGGTGGCGGGCAGGACGCCCGCCATAAACTGCC
AGGCATCAAATTAAGCAGAAGGCCATCTGACGGATGGCCTTTTTGCGTCTTACAAAACCTTTTTTGTATTTTTTCTA
AATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAGGAAGAGTATG
AGTATTCACATTTCCGTGTCCGCTTATFCCCTTTTTTGCAGGATTTTTGCCCTTCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGC
TGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGAT
CCTTGAGAGTTTTCCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTTAAAGTCTGCTATGTGGCGCGGTATATCC
CGTGTGACGCCGGCAAGAGCAACTCGGTCCGCGCATACTACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCA
CAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATFATGCAAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGC
CAACTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGC
CTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATAACAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCGTGATGCAATGGCAA
CAACGTTCCGCAAACATACTAACTGGCGAACTACTTACTTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGA
TAAAGTTGCAGAACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAAGCT
GGGTCTCGCGGTATCATTCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTC
AGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCCTCACTGATTAAGCATTGGTAAGTGTGACAGCA
AGTTTACTCATATATACCTTAGATTGATTTAAAACCTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGAT
AATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTT
CTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTGTTTGGC
GGATCAAGAGTACCAACTTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGAGATACCAAAATAGACTGGATGGAGGCGGA
TAGCCGTAGTTAGGCCACCCTTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGG
CTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTCTTACCAGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCAGGATAAGGGCAGCGGTGGG
CTGAACGGGGGTTCTGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTA

TGAGAAAGCGCCACGCTTCCCAGAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCA
 CGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATT
 TTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACCGCGGCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGC
 TGGCCTTTTGTCCACATGTTCTTTCTTCCGTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTG
 ATACCGCTCGCCGACGCCGAACGACCCGAGCGACGAGTCAATGCGACCGAAGCGGAAGAGCAGCCTGATGCGGTATTT
 TCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTA
 AGCCAGTATACACTCCGCTATCGTACGTGACTGGGTATGGCTGCGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCC
 CTGACGGGCTTGTCTGCTCCCAGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTAGAGGTTT
 TCACCGTCATCACCAGAACGCGCGAGGCAGCAGATCAATTCGCGCGCGAAGGCGAAGCGGCATGCATAATGTGCCTGTC
 AAATGGACGAAGCAGGGATTTCGCAAAACCTATGCTACTCCGTCAAGCCGTCAATTGTCTGATTTCGTTACCAATTTATGA
 CAACTTGACGGGTACATCACTTCTTTCTTTCACAACCCGGCAGGAACTCGCTCGGGCTGGCCCCGGTGCATTTTTTA
 AATACCGCGAGAAATAGATTTGATCGTCAAAACCAACTGCGACCGGAGCTGGCGATCCGGCTCGGCTCGGCTGCTCA
 AAAGCAGCTTCGCTGGCTGATACGTTGGTCTCGCGCCAGCTTAAGACGCTAATCCCTAACTGCTGGCGAAAAAGATG
 TGACAGACGCGACGGCGACAAGCAAAACATGCTGTGCGACGCTGGCGATATCAAAATGCTGTCTGCCAGGTGATCGCTG
 ATGTAATGACAAGCTCGCGTACCGGATTATCCATCGGTGGATGGAGGACTCGTTAATCGCTTCCATGCGCCGCGAGTA
 ACAATTGCTCAAGCAGATTTATCGCCAGCAGCTCCGAATAGCGCCCTTCCCTTGGCCGGCGTTAATGATTTGCCCAA
 CAGGTGCTGAAATGCGGCTGGTGCCTTCATCCGGGCGAAAGAACCCCGTATTGGCAAATATTGACGGCCAGTTAAGC
 CATTGATGAGCTAGGCGCGCGGAGCAAAAGTAAACCCATGGTGATACCATTCGCGAGCTCCGGATGACGACCGTATG
 GATGAACTCTCTTCCGCGGAAACGCAAAATATCACCCTGGCGAAACAAATTCGCTCCCTGATTTTTTACCACCCC
 CTGACCGCAATGGTGAGATTGAGAAATAAACCTTTCATTTCCAGCGGTGGTGCATAAAAAATCGAGATAACCGTTG
 GCCTCAATCGCGCTTAAACCCGCCACCAGATGGGCATTAACGAGTATCCCGCAGCAGGGGATCATTTTTGCGCTTCAG
 CCATACTTTTCATACTCCCGCCATTCAGAG

• pBSGH

AAGAAACCAATTGTCCATATTGCATCAGACATTGCCGTCACTGCGTCTTTACTGGCTCTTCTCGCTAACCAAACCGGT
 AACCCCGCTTATTTAAAAGCATTCTGTAAACAAAGCGGGACCAAAGCCATGACAAAAACGGTAACAAAAGTGTCTATAAT
 CACGGCAGAAAAGTCCACATTTGATTTATTTGCACGGCGTCACACTTTTGTATGCCATAGCATTTTTTATCCATAAGATTAG
 CGGATCCTACCTGACGCTTTTTATCGCAACTCTCTACTGTTTCTCCATACCCGTTTTTTTTGGGCTAACAGGAGGAATTA
 ACCATGGATCCGAGCTCGAGATCTGCAGCTGGTACCCTGGGAGTGCCTGGATCTGGGAATTCATGCSTAAAAGSAG
 AAGAATTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTTCTTGTGTAATTAGATGGTGATGTTAATGGGCACAAATTTTTCTGTCAGTGG
 AGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGAAAACCTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACCTACCCTGTTCCATGG
 CCAACACTTGTCACTACTTTCTGTTATGGTGTTCATGCTTTTGGCAGATACCCAGATCATATGAAAACAGCATGACTTTTT
 TCAAGAGTGCCATGCCCGAAGGTTATGTACAGGAAAGAACTATATTTTTCAAAGATGACGGGAACCTACAAGCACGTGC
 TGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCTTGTTAATAGAATCGAGTTAAAAGGTATTGATTTTTAAAGAAGATGGAAACATT
 CTTGGACACAAATTTGAAATACAACTATAAATCACAACAATGTATACATCATGGCAGACAAAACAAAAGAAATGGAAATCAAG
 TTAATCTCAAAATTTAGACACAACATTTGAAGATGGAAGCGTTCAACTAGCAGACCATTATCAACAAAATACTCCAATTGG
 CGATGGCCCTGTCTTTTACCAGACAACCATTTACCTGTCCACACAATCTGCCCTTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGAGA
 GACCACATGSTCTTCTTTGAGTTTTGTAACAGCTGCTGGGATTAACATGGCATGGATGAACTATACAATCTAGATCCCC
 GCGTCGACCATCATCATCATCATGAGTTTAAACGGTCTCCAGCTTGGCTGTTTTGGCGGATGAGAGAAGATTTTC
 AGCTGATACAGATTAATCAGAACGCAGAAGCGGTCTGATAAAACAGAAATTTGCCCTGGCGGCAGTAGCGCGGTGGTCC
 CACCTGACCCCATGCCGAACCTCAGAAGTGAACCGCGTAGCGCCGATGGTAGTGTGGGGTCTCCCCATGCCGAGAGTAGG
 GAACTGCCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCTTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTCCGGTGA
 CGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGGGAGCGGATTTGAACGTTGCGAAGCAACGCCCGGAGGGTGGCGGGCAGGA
 CGCCCGCCATAAACTGCCAGGCATCAAATTAAGCAGAAGGCCATCCTGACGGATGGCTTTTTGCGTTTTCTACAAACTC
 TTTTTGTTTATTTTTCTAAATACATTTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCGTATAAATGCTTCAATAATAT
 TGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCCCTTATTCCTTTTTTGGCGCATTTTTGCCCTTCTGTTT
 TTGCTACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGA
 TCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTTAAAGTTCTGCTA
 TGTGGCGCGGTATTTATCCCGTGTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCCCGCATACTACTATTCTCAGAATGACTTGG
 TTGAGTACTCACCAGTACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTTGCAAGTGTGCCATGCCATAACCA
 TGTGATAAACACTGCCGCAACTTCTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGACTAACCGCTTTTTTGCACAACATG
 GGGGATCATGTAACCTCGCTTGTATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGA
 TGCCCTGATGAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAAT
 AGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACCTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGTGGTTTTATTGCTGATAAA
 TCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTCGAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTA
 TCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCCTCACTGATTAAGCA
 TTGGTAACTGTGACACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAG
 GTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAG

AAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCCGCTACC
 AGCGGTGGTTGGTTTGGCCGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCA
 AATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGAGTTAGGCCACCACCTCAAGAACTCTGTAGCACCCGCTACATACCTCGCTCTGC
 TAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTGCTTTACCAGGTGGACTCAAGACGATAGTACC
 TAAGGCGCAGCGGTGGGCTGAACGGGGGGTTCGTCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGA
 TACCTACAGCGTGAAGCTATGAGAAAAGCGCCACGCTTCCGAAGGGAGAAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGG
 TCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCTTGGTATCTTTATAGTCTGTCGGGTTTCCGCCACT
 CTGACTTGAGCGTCGATTTTTGATGCTCGTACAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCTGGCCTTTTTTA
 CGGTTCTTGGCCTTTTGGCTGGCCTTTTGGCTCACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCCGATTCTGTGGATAACCGTATTA
 CCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGCGAAGCAGCCAGCGCAGCGAGTCACTGAGCGAGGAAGCGGAAGA
 GCGCTGATGCGGATTTTTCTCCTTACGATCTGTGCGGATTTTCACCCGCAATGGTGCACCTCAGTCAAACTTCG
 TCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATACACTCCGCTATCGCTACGTGACTGGGTCAATGGTGCGCCCCGACACCCGCC
 AACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGC
 TGATGTGTGACAGGTTTTTACCGTCAACCGAAACGCGCGAGGCAGCAGATCAATTCCGCGCGGAAAGCGAAGCGGC
 ATGCATAATGTGCTGTCAAATGGACGAAGCAGGATTTGCAAACCTATGCTACTCCGTCAGCCGTCAATTGTCTG
 ATTCGTTACCAATATGACAACCTGACGGCTACATCATTCACTTTTTCTTCAACACCCGCGCACGGAACTCGCTCGGGCTG
 GCCCGGTGCATTTTTAAATACCCCGGAGAAAATAGAGTTGATCGTCAAACCAACATTTGCGACCGACGGTGGCGATAG
 GCATCCGGGTGGTGTCAAAGCAGCTTCGCTGCTGATACGTTGGTCCGCGCCAGCTTAAGACGCTAATCCCTAA
 CTGCTGGCGGAAAAGATGTGACAGACGCGACGGCGACAAGCAAACATGCTGTGCGACGCTGGCGATATCAAATTTGCTG
 TCTGCCAGGTGATCGCTGATGTACTGACAAGCTCGCGTACCCGATTATCCATCGGTGGATGGAGCGACTCGTTAATCG
 CTCCATGCGCCGAGTAACAATTGCTCAAGCAGATTTATCGCCAGCAGCTCCGAATAGCGCCCTTCCCTTGGCCGGC
 GTTAATGATTTGCCAAAACAGGTGCTGAAATGCGGCTGGTGCCTTCATCCGGGCGAAAGAACCCCGTATTGGCAAT
 ATTGACGGCCAGTTAAGCCATTTCATGCCAGTAGGCGCGCGGACGAAAGTAAACCCACTGGTGATACCATTCCGCGAGCCT
 CCGGATGACGACCGTGTGATGAATCTCTCTGGCGGAAACAGCAAAAATACACCCGGTCCGGCAACAATTTCTCGTCC
 CTGATTTTTACCACCCCTGACC CGAATGGTGAGATTGAGAATATAACCTTTTCATCCAGCGGTCGGTFCGATAAAA
 AAATCGAGATAACCGTTGGCTCAATCGGCGTTAAACCCGCCACCAGATGGGCATTAACAGAGTATCCGGCAGCAGGG
 GATCATTTTGCGCTTACGCATACTTTTCATACTCCCGCCATTTCAGAG

• pBBGH

AAGAAACCAATTGTCATATTCATCAGACATTGCCGTCACTGCGTCTTTTACTGGCTCTTCTCGCTAACCAAACCGGT
 AACCCCGTATATTAAGCATTCTGTAAACAAAGCGGGACCAAAGCCATGACAAAACCGCTAAACAAAAGTGCTATAAT
 CAGGCGAAAAGTCCACATTGATTAATTTGCACGGCTCAACTCTACTGTTTCTCCATACCCGTTTTTGGGCTAACAGGAAATTA
 CGGATCCTACCTAGCGCTTTTTATCGCAACTCTCTACTGTTTCTCCATACCCGTTTTTGGGCTAACAGGAAATTA
 ACCATGGATCCGAGCTCAATGATAAAGGTCGGATTTTTCCRAAGATTTTATCTTCCGAGCGCTACAGCAGCATACC
 AGATTGAAGGTGCAGCAAACGAAGATGGCAGAGGACCATCAATTTGGGATGTCTTTTCCACACCGCTGGCAAAACCTT
 GAACGGTGACACAGGAGACGTTGCGTGTGACCATTATCACCGATACAAGGAAGATATCCAGCTGATGAAAGAAATAGGG
 TTGGACGCTTACAGGTTCTCTATCTCTGCGCCAGATTTATGCCAGATGGGAAGAACATCAACCAAAGGGTGTGGATT
 TCTACAACAGACTCGTTGATGAGCTTTTGAAGAATGATATCATAACCATTTCGTAACACTCTATCACTGGGACTTACCCTA
 CGCACTTTATGAAAAAGGTGGATGGCTTAACCCAGATATAGCGCTTTATTTAGAGCATAACGCAACGTTTATGTTCAAC
 GAACCGGTGATCTGTTGAACATTGGATTACACGAAAGCAGCATGGTGTCTTCTTCTTGGGTTATTACAGCGGAG
 AGCATGCCCGGGTCAATCAAATTTACAAGAAGCGATAATCGCGGCACACAACCTGTTAAGAGCACATGGACATGCCGT
 TCAGGCGTTACAGGGAAGAAGTAAAGATGGAAGATTGGCTTAACCAACGTTGTGATGAAATAGAACCAGGCGGATGCA
 AARCCGAAAGTTTTCTGGTGCAGTCTTGTGTGATGATGGTTCGTTAATGCATGGTTCCATGACCCCTGTTGTTTTCGGAA
 AATATCCCGAAGAAGCAGTTGCACTTTATACGGAAAAGGGTTGCAAGTTCCCGATAGCGATATGAATATTATTTCCGAC
 TCCATAGACTTCTTTGGTGTGAATTAATACACAAGAACACTTGTGTTTTTATGATGAAACATCCTCTTGGATTTTCG
 TATGTTCCAGGGAGACCTTCCCAAACCGGAGATGGGATGGGAAATCTACCCGAGGGATTTATTTGATATGCTGGTCTATC
 TAAGGAAAGATATAAACTACCACTTTATATACAGAGAACCGGATGGCTGGACTGATAAATGGAAAACGGAAGAT
 TCATGATAATTACCGAATTGAATTTTGAAAAAGCACTTTGAAAAGCACTTTGAAGCAATCAATGCAGGTGTTGATTTG
 AAGGTTACTTCTTTGGTCTTTGATGGACAACCTTCGAATGGGCATACCGGATACTCAAACGTTTTCGGTTAATCTACG
 TAGATTACAATACGCAAAAAGGATACTGAAAGATTCAGCGTTATGGTTGAAGGAATTTCTAAAAGGTACCATATGGGA
 ATTCTATGCGTAAGGAGAAGAATTTTCACTGGAGTTGCCAATTTGTTGAATTAGATGGTGTGTTAATGGGCAC
 AAATTTTCTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGAAAACCTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAA
 AACTACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTACTTTCAGTTATGGTGTTCATAGCTTTGGCGAGATACCCAGATCATAT
 GAAACAGCATGACTTTTTCAAGAGTGCCATGCCGCGAGGGTTATGTACAGGAAAGAATATATTTTTCAAAGATGACGGG
 AACTACAAGACACGTCGTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCTTGTTAATAGAATCGAGTTAAAAGGTATTGATTTTA
 AAGAAGATGGAACATCTTGGACACAAATGGAAATACAACATAAATCACACAATGTATACATCATGGCAGACAAAACA
 AAAGAAATGGAATCAAAGTTAACTTCAAATTAGACACAACATTTGAAGATGGAAGCGTTCAACTAGCAGACCATTATCAA
 CAAAATACTCAAATGGCGATGGCCCTGTCTTTTACCAGACAACCATTACCTGTCCACACAATCTGCCCTTTTCGAAAG

ATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCCTTCTTGAGTTTGTAAACAGCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAAC
 ATACAATCTAGATCCCGGGCGTCGACCATCATCATCATCATTTGAGTTTAAACGGTCTCCAGCTTGGCTGTTTTGGCG
 GATGAGAGAAGATTTTCAGCCTGATACAGATTAATCAGAACGCAGAAGCGGTCTGATAAAAACAGAATTTGCCTGGCGG
 CAGTAGCGCGGTGGTCCCACCTGACCCCATGCCGAATCAGAAGTGAACCGCGTAGCGCCGATGGTAGTGTGGGGTCT
 CCCATGCGAGAGTAGGGAACCTGCCAGGCATCAAAATAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCCTTCGTTTTATC
 TGTGTTTTGTGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGGGAGCGGATTTGAACGTTGCGAAGCAACGGCCCG
 GAGGGTGGCGGGCAGGACGCCGCCATAAACTGCCAGGCATCAAAATTAAGCAGAAGGCCATCCTGACGGATGGCCTTTT
 TGCGTTTCTACAACTCTTTTTGTTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCCTGAT
 AAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCGCCCTATTCCCTTTTTTTCGCGC
 ATTTTGCCTTCCCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTG
 GGTACACTCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAAGCTTTTCCAATGATGAGCA
 CTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCGTGTTGACCGCGGCAAGAGCAACTCGCTCGCCGCATACACTA
 TTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGC
 AGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACC
 CTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGA
 CGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCT
 TCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCCTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGT
 GGTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCC
 CTTCCGTATCGTAGTTACTACACGCGGGGAGTCAGGCAACTGGATGAACAGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGT
 GCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTCATTTTTT
 AATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCTG
 AGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGGTAATCTGCTGCTTGCAAACA
 AAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTGTTTGGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACFGGCTTCA
 GCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCCTTCAAGAACTCTGTAGCACCAGCC
 TACATACTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGCTTACCAGGTTGGACTCA
 AGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACCA
 CCTACACCGAACCTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGGCGACAGTA
 TCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCTTGGTATCTTTATAGTCT
 GTCGGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTGCATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCA
 GCAACGCGGCCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTTGCTGGCCTTTTTGCTCATATGTTCTTTCTGCGTTATCCCTGATTC
 TGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGCCGAACGACCAGCGCAGCGAGTCAGTG
 AGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATATGGTGCA
 CTTCTAGATAAATCTGCTGTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATACACTCCGCTATCGCTAGCTGGGTATGGCTATGGCT
 GCGCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGCATCCGCTTACAGACAAGCTG
 TGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGTTTTACCCTCATCACCGAAACGCGGAGGAGCAGATCAATTCGCG
 CGCGAAGGCGAAGCGGCATGCATAATGTCCCTGTCAAATGGACGAAGCAGGATTTCTGCAAACCTATGCTACTCCGTC
 AAGCGTCAATTTGCTGATTCGTTACCAATTATGACAACTTGACGGCTACATCATTACTTTTTCTTACAAACCGGCAC
 GAACTCGCTCGGGCTGGCCCGGTGCATTTTTTAAATACCCGCGAGAAATAGAGTTGATCGTCAAAAACCAACATTGCG
 ACCGACGGTGGCGATAGGCATCCGGGTGGTGTCAAAGCAGCTTCGCCCTGGCTGATACGTTGGTCTCGCGCCAGCTT
 AAGACGTAATCCCTAACTGCTGGCGAAAAGATGTGACAGACGCGGACAGCAACAAATGCTGTGACGCTGGCAGCTGG
 CGATATCAAATTTGCTGCTGCCAGGTGATCGCTGATGTACTGACAAGCCTCGCGTACCCGATTATCCATCGGTGGATG
 GAGCGACTCGTTAATCGCTTCCATGCGCCGAGTAACAATTTGCTCAAGCAGATTTATCGCCAGCAGCTCCGAATAGCGC
 CCTTCCCTTGGCCGCGTAAATGATTTGCCAAACAGGTCGCTGAAATGCGGCTGGTGCCTTCATCCGGCGGAAAGA
 ACCCGTATTGGCAAATATTGACGGCCAGTTAAGCCATTCATGCCAGTAGCGCGCGGACGAAAGTAAACCCACTGGTG
 ATACCATTGCGGAGCCTCCGGATGACGACCGTAGTGATGAATCTCTCTGGCGGGAACAGCAAATATCACCCGGTCCG
 CAAACAAATCTCGTCCCTGATTTTTACCACCCCTGACCAGCAATGGTGAAGATGAGAATAAACCCTTTTCAATCCCA
 CGGTCGGTTCGATAAAAAATCGAGATAACCGTTGGCCTCAATCGCGTTAAACCCGCCACAGATGGGCATTAACGA
 GTATCCCGGACAGAGGGATCATTTTTGCGCTTACGCATACTTTTACATACCTCCCGCATTACAG

• pBBSGH

AAGAAACCAATTGTCCATATTGCATCAGACATTGCCGTCAGTGCCTTTTTACTGGCTCTTCTCGCTAACCAAACCGGT
 AACCCGCTTATTAAGCATTTCTGTAACAAAGCGGGACCAAAGCCATGACAAAACGCGTAACAAAAGTGTCTATAAT
 CACGGCAGAAAAGTCCACATTGATTATTTGCACGGCGTCACACTTTGCTATGCCATAGCATTTTTTATCCATAAGATTAG
 CGGATCTTACTGACGCTTTTTATCGCAACTCTACTGTTTCTCCATAACCCGTTTTTTTTGGGCTAACAGGAGGAATTA
 ACCATTGGATCCGAGCTCAATGATAAGAGGTCAGATTTTTCCAAAAGATTTTTATCTTCGGAACGGCTACAGGACATAC
 AGATTGAAGGTGCAGCAAAACGAAGATGGCAGAGGACCATAAATTTGGGATGTCTTTTACACACGCTTGGCAAACCTT
 GAACGGTGACACAGGAGACGTTGCGTGTGACCATTATCACCGATAACAAGGAAGATATCCAGCTGATGAAAGAAATAGGG
 TTGGACGCTTACAGGTTCTTATCTCCTGGCCAGAAATATGCCAGATGGGAAGAATCAACCAAAGGSGTGTGGATT

TCTACAACAGACTCGTTGATGAGCTTTTGAAGAATGATATCATACCATTTCGTAACACTCTATCACTGGGACTTACCCTA
 CGCACTTTTATGAAAAGGTGGATGGCTTAACCCAGATATAGCGCTTTATTTTCAGAGCATACGCAACGTTTATGTTCAAC
 GAACTCGGTGATCGTGTGAAACATTTGGATTACACTGAACGAACCATGGTGTCTCTTTCTTGGGTTATTACACGGGAG
 AGCATGCCCCGGTCACTCAAATTTACAAGAAGCGATAATCGCGGCACACAACCTGTAAAGACACATGGACATGCCGT
 TCAGGCGTTTCAGGGAGAAGTAAAAGTGGAAAAGTTGGCTTAACCAACGTTGTGATGAAAATAGAACCAGGGCGATGCA
 AAACCCGAAAAGTTTCTTGGTCGCAAGTCTTGTGATAAGTTCGTTAATGCATGGTTCATGACCCTGTTGTTTTCGGAA
 AATATCCCGAAGAAGCAGTTGCACCTTATACGGAAAAAGGGTTGCAAGTCCCGATAGCGATATGAATATTATTTTCGAC
 TCCTATAGACTTCTTTGGTGTGAATTTATACACAAGAACACTTGTGTTTTTATGATATGAAACCTCTCTGGATTTTCG
 TATGTTTCAGGGAGACCTTCCCAAACGGAGATGGGATGGGAAATCTACCCGACGGGATTATTTGATATGCTGGTCTATC
 TGAAGGAAAGATATAAACTACCCTTTATATCACAGAGAACGGGATGGCTGGACCTGATAAATGGAAAACGGAAAGAT
 TCATGATAATTACCGAATTAATTTGAAAAGCCTTTGAAAAGCCTTGAAGCAATCAATGCAGGTGTGATTTG
 AAAGTFACTTCAATTTGGTCTTTGATGGACAACCTCGAATGGGCATACGGATACTCAAACGTTTCGGTATAATCTACG
 TAGATTACAATACGCAAAAAGGATACTGAAAAGATTCAGCGTTATGGTTGAAGGAATTTCTAAAAGGTACCCTGGGAG
 TGCTGCTGGATCTGGGGRAATTCATGCGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTTCTGTTGAATTAGAT
 GGTGATGTTAATGGGCACAAAATTTCTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGAAAACCTTACCCTTAAAT
 TTATTTGCACTACTGAAAAACTACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTACTTTCAAGTTATGGTGTTCATGCTTTG
 GAGATACCCAGATCATATGAAACAGCATGACTTTTTCAAGAGTGGCCATGCCCGAAGGTTATGTACAGGAAAGAACTATA
 TTTTTCAAAGATACCGGAATTAATGAAACAGCAGTCTGAAAGTCAAGTTGAAGGTGATACCTTGTTAATAGAACTCGAT
 TAAAAGTATTGATTTTAAAGAAGATGAAAACATTTTGGACACAAAATTTGGAATACAACATAAATCACACAATGTATA
 CATCATGGCAGACAAAACAAAAGAATGGAATCAAAGTTAACTTCAAATTTAGACACAACATTGAAGATGGAAGCGTTCAA
 CTAGCAGACCATTATCAACAAAATACCCAATTGGCGATGGCCCTGTCTTTTACCAGACAACCATTACCTGTCCACAC
 AATCTGCCCTTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCCCTTCTTGGAGTTTGTAAACAGCTGCTGGGATTAC
 ACATGGCATGGATGAACTATACAATCTAGATCCCGGCGTCGACCATCATCATCATCATTTGAGTTTAAACGGTCTCC
 AGCTTGGCTGTTTTGGCGGATGAGAGAAGATTTTCAGCCTGATACAGATTAATCAGAACGCGAGAAGCGGCTGTATAAA
 ACAGAATTTGCCTGGCGGCAGTAGCCGGTGGTCCCACCTGACCCCATGCCGAACCTCAGAAGTGAACCGCGTAGCGCC
 GATGTTAGTGTGGGTTCTCCCATGCGAGAGTAGGAACTGCCAGGCATCAAATAAAAACGAAAGCTCAGTCGAAAGAC
 TGGGCTTTTCTGTTTTATCTGTTGTTTGTGCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAAATCCGCCGGGAGCGGATTTGAACG
 TTGCGAAGCAACGGCCCGAGGGTGGCGGGCAGGACGCCGCCATAAATGCCAGGCATCAAATTAAGCAGAAGGCCAT
 CCTGACGGATGGCCTTTTTGCCTTTCTACAACTCTTTTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCA
 TGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCACATTTCCGTGTCCGCCCT
 TATTCCTTTTTTGGCGCATTTTTGCCTTCTGTTTTTGTCAACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAGAT
 CAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAATCGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGATTTTCGCCCCGAAGAAC
 GTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTCTGTATGTGGCGCGTATTATCCCGTGTGACGCCGGCAAGGAACT
 CGGTGCGCCGATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATG
 ACAGTAAGAGAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAG
 GACCGAAGGAGCTAACCCTTTTTTGCACAACATGGGGATCATGTAACTCGCCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAA
 TGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCAGATGCCGTGAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACCTGGC
 GAACACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGGCGGATAAAGTTGCAGGACCATTCTGCGCT
 CGGCCCTTCGGCTGGCTGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGTTGAGCGTGGGCTCGCGGTATCATTTGCAGCACT
 GGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTACTGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTTGGATGAACGAAATAGA
 CAGATCGCTGAGATAGGTGCCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTG
 ATTTAAAACCTTCAATTTTAAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTAACG
 TGAGTTTTCGTTCCTGAGCGTCAGACCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGGATCCTTTTTTTTCTGCGCGTA
 ATCTGCTGCTTGCAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTTC
 CGAAGGTAACCTGGCTTACGAGAGCGCAGATACCAAACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACCTTCAA
 GAACCTGTAGCACCCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCATAAGTCTGTG
 TTTACCAGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCAGATAAGGCGCAGCGGTCCGGCTGAACGGGGGTTCTGTCACACAGC
 CCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAATGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGG
 GAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCCGAAACAGGAGAGCGCACGAGGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCC
 TGGTATCTTTATAGTCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTGTCAGGGGGCGGA
 GCCTATGGAACAAACGCCAGCAACGCGGCCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTTGCTGGCCTTTTTGCTCACATGTTCTTTCC
 TGCGTTATCCCTGATTTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGGCTGATACCGCTCGCCGACGCGAACGACC
 GAGCGCAGCGAGTCACTGAGCGGAGGAAGCGGAAGACGCCCTGATCGGTAATTTCTCTTACGCATCTGCTCGGTATTT
 CACACCGCATAGTGGTCACTCTCAGTACAATCTGCTGTGATGCCGATAGTTAAGCCAGTATACACTCCGCTGCTGCTA
 CGTGACTGGGTGATGGCTGCGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGCAT
 CCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTTACCCTCATACCGAAACGCGCGAG
 GCAGCAGATCAATTCGCGCGCGAAGGCCAAGCGGCATGCATAATGTGCCGTGTTCAAATGGACGAAGCAGGGATTCTGCAA
 ACCCTATGCTACTCCGTCAAGCGTCAATTTGCTGATTCGTTACCAATTTATGACAACCTGACGGCTACATCATTTCACTT
 TTTCTTCAACACCGGCACGGAACCTCGCTCGGGCTGGCCCCGGTGCATTTTTTAAATACCCGCGAGAAAATAGAGTTGATC
 GTCAAACCAACATTGCGACCGGACGGTGGCGATAGGCATCCGGTGGTGTCAAAGCAGCTTCGCTGGCTGATACGT

TGGTCCTCGCGCCAGCTTAAGACGCTAATCCCTAACTGCTGGCGGAAAAGATGTGACAGACGCGACGGCGACAAGCAA
CATGCTGTGCGACGCTGGCGATATCAAAATTGCTGTCTGCCAGGTGATCGCTGATGTACTGACAAGCCTCGCGTACCCG
ATTATCCATCGGTGGATGGAGCGACTCGTTAATCGCTTCCATGCGCCGCGAGTAACAATTGCTCAAGCAGATTTATCGCC
AGCAGCTCCGAATAGCGCCCTTCCCCTTGCCCGGCGTTAATGATTTGCCCAAACAGGTGCTGAAATGCGGCTGGTGGC
CTTCATCCGGGCGAAAGAACCCCGTATTGGCAAATATTGACGGCCAGTTAAGCCATTCATGCCAGTAGGCGCGCGGACG
AAAGTAAACCCACTGGTGATACCATTGCGGAGCCTCCGGATGACGACCGTAGTGATGAATCTCTCCTGGCGGGAACAGC
AAAATATCACCCGGTCGGCAAACAAATTCGTCCTGATTTTTACCACCCCTGACCGGAATGGTGAGATTGAGAA
TATAACCTTTCATTCCCAGCGGTGCGTATAAAAAATCGAGATAACCGTTGGCCTCAATCGGCGTTAAACCCGCCAC
CAGATGGGCATTAACGAGTATCCCGGCAGCAGGGGATCATTTTGGCTTCAGCCATACTTTTCATACTCCCGCCATTC
AGAG

ANEXO B

- **Estimativa do número de repetições necessárias para a determinação de BglA(U) e GFP**

A estimativa do número de repetições foi determinada a partir da fórmula:

$$N = s^2 / s_x^2$$

N = Número de repetições

s^2 = Variância amostral

s_x^2 = Variância da média desejada

Sendo que:

$$s_x^2 = d^2$$

d = Precisão desejada

A partir dos dados, foi determinada a tabela a seguir:

BglA(U) - Média = 1,436550375 (x1000)			GFP- Média =25,28846		
Precisão da média	Número de repetições	Sx(%)	Precisão da média	Número de repetições	Sx(%)
0,01	356,7	0,7	0,1	1633,0	0,4
0,02	89,2	1,4	0,2	408,2	0,8
0,03	39,6	2,1	0,3	181,4	1,2
0,04	22,3	2,8	0,4	102,1	1,6
0,05	14,3	3,5	0,5	65,3	2,0
0,06	9,9	4,2	0,6	45,4	2,4
0,07	7,3	4,9	0,7	33,3	2,8
0,08	5,6	5,6	0,8	25,5	3,2
0,09	4,4	6,3	0,9	20,2	3,6
0,1	3,6	7,0	1	16,3	4,0
0,2	0,9	13,9	1,1	13,5	4,3
0,3	0,4	20,9	1,2	11,3	4,7
0,4	0,2	27,8	1,3	9,7	5,1
0,5	0,1	34,8	1,4	8,3	5,5
0,6	0,1	41,8	1,5	7,3	5,9
0,7	0,1	48,7	1,6	6,4	6,3
0,8	0,1	55,7	1,7	5,7	6,7
0,9	0,0	62,7	1,8	5,0	7,1
1	0,0	69,6	1,9	4,5	7,5
			2	4,1	7,9
			3	1,8	11,9
			4	1,0	15,8
			5	0,7	19,8

ANEXO C

- **Resultados obtidos a partir da análise pelo programa *ProtParam tool*, dos aminoácidos que compõem a fusão produzida pelo clone pBBGH.**

número de aminoácido: 697

Peso Molecular: 79917.4

pl teórico: 5.51

composição dos aminoácidos:

Ala (A)	38	5.5%
Arg (R)	24	3.4%
Asn (N)	36	5.2%
Asp (D)	53	7.6%
Cys (C)	4	0.6%
Gln (Q)	18	2.6%
Glu (E)	45	6.5%
Gly (G)	58	8.3%
His (H)	29	4.2%
Ile (I)	40	5.7%
Leu (L)	59	8.5%
Lys (K)	47	6.7%
Met (M)	18	2.6%
Phe (F)	40	5.7%
Pro (P)	33	4.7%
Ser (S)	26	3.7%
Thr (T)	33	4.7%
Trp (W)	13	1.9%
Tyr (Y)	39	5.6%
Val (V)	44	6.3%
Asx (B)	0	0.0%
Glx (Z)	0	0.0%
Xaa (X)	0	0.0%

número total dos resíduos com carga negativa (Asp + Glu): 98

número total dos resíduos com carga positiva (Arg + Lys): 71

Composição atômica:

Carbono	C	3646
Hidrogênio	H	5461
Nitrogênio	N	941
Oxigênio	O	1046
Enxofre	S	22

Fórmula: $C_{3646}H_{5461}N_{941}O_{1046}S_{22}$

Número total de átomos: 11116

Coefficiente de extinção:

Condições : 6.0 M hidrocloreto de guanidina
 0.02 M tampão fosfato
 pH 6.5

Os coeficientes de extinção são apresentados em unidade de $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

A primeira tabela lista valores computados na pressuposição de que todos os resíduos de cisteína aparecem como meia cisteína, enquanto na segunda tabela os valores são listados na pressuposição de que nenhum resíduo aparece como tal.

	276	278	279	280	282
	nm	nm	nm	nm	nm
coeficiente de Ext.	127040	127654	126275	124130	119840
Abs 0,1% (=1 g/l)	1.590	1.597	1.580	1.553	1.500

	276	278	279	280	282
	nm	nm	nm	nm	nm
coeficiente de Ext.	126750	127400	126035	123890	119600
Abs 0,1% (=1 g/l)	1.586	1.594	1.577	1.550	1.497

Meia vida estimada:

O terminal N da seqüência considerada é D (Asp).

A meia vida estimada é 1,1 h (reticulócitos de mamíferos, *in vitro*).

3 min. (levedura, *in vivo*).

>10 h (*Escherichia coli*, *in vivo*).

Índice de Instabilidade:

O índice de instabilidade foi computado como 27,2, isto classifica a proteína como

Índice alifático: 79.15

ANEXO D

- **Estatística da atividade específica da BgIA apresentada pela fusão pura de alguns clones EPP, testados sobre diferentes substratos.**

- os resultados obtidos foram avaliados quanto a sua distribuição (figura abaixo, lado esquerdo). Uma vez transformados ($\log x+1$), estes valores apresentaram um melhor ajuste à distribuição normal (figura abaixo, lado direito). Prosseguiu-se então com a análise estatística com os dados transformados.

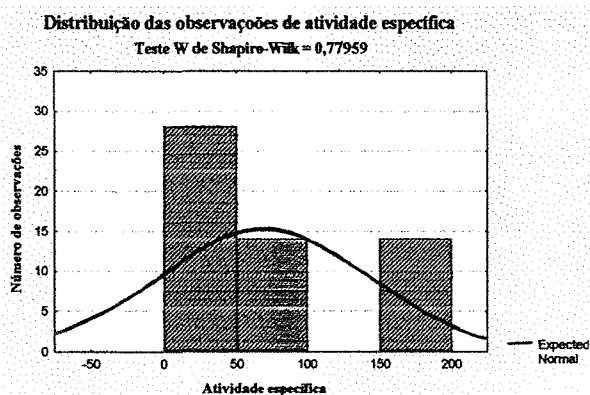


Figura 1. Dados sem transformação

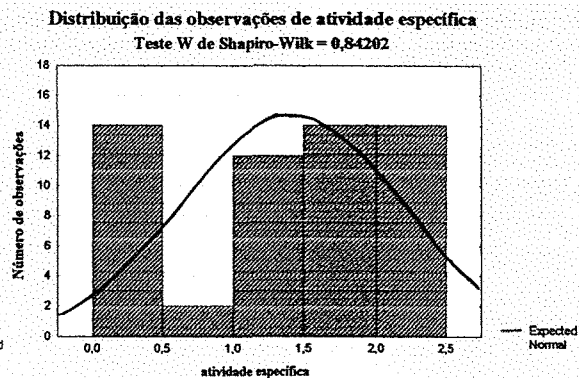


Figura 2. Dados transformados por $\log(x+1)$

ANÁLISE DE UM EXPERIMENTO FATORIAL 4 x 7

QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA com transformação dos dados

Causas de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
FATOR A	3	31,4170	10,4723	23716,0467 **
FATOR B	6	0,1290	0,0215	48,6860 **
FATOR AXB	18	0,0770	0,0043	9,6931 **
(TRATAMENTOS)	27	31,6230	1,1712	
RESÍDUO	28	0,0124	0,0004	
MÉDIA GERAL DO ENSAIO		1,4034		
DESVIO PADRÃO		0,0210		
COEFICIENTE DE VARIAÇÃO		1,4973		

DESDOBRAMENTO DE A D. B					
CAUSAS DE VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	
A D. B(1)	3	4,0591	1,3530	3064,1619 **	
A D. B(2)	3	4,4684	1,4895	3373,1391 **	
A D. B(3)	3	4,5300	1,5100	3419,6257 **	
A D. B(4)	3	4,7382	1,5794	3576,7373 **	
A D. B(5)	3	4,3591	1,4530	3290,5936 **	
A D. B(6)	3	4,4889	1,4963	3388,6028 **	
A D. B(7)	3	4,8502	1,6167	3661,3453 **	

(A D. B) (21) (31,4940)

Teste de Tukey

FATOR B CLONES	B	PNPG	PNPGal	PNPxil	PNPara
Clone 1	1	2,2635 Aa	1,9460 Ab	0,3985 Ad	1,3100 Ac
EPP3	2	2,2875 Aa	1,9495 Ab	0,3535 ABd	1,1645 Bc
EPP10	3	2,2455 Aa	1,8455 Db	0,3090 Bd	0,9840 Ec
EPP12	4	2,2555 Aa	1,8490 CDb	0,2410 Cd	1,0845 CDc
EPP13	5	2,2790 Aa	1,9145 ABCb	0,3620 ABd	1,1410 BCc
EPP14	6	2,2770 Aa	1,9280 ABb	0,3285 Bd	1,1735 Bc
EPP17	7	2,2585 Aa	1,8710 BCDb	0,2415 Cd	1,0345 DEc

DMS(TUKEY) coluna = 0,0666

DMS(TUKEY)linha = 0,0574

Letras maiúsculas: comparação na mesma coluna, isto é, comparação entre os clones para um dado substrato.

Letras minúsculas: comparação dos substratos para um determinado clone.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADMAS, M. Enzymes and proteins from organisms that grow near and above 100°C. **Annual Review of Microbiology**, v.47, p.627-658, 1993.
- AKIYAMA, H.; KANAI, S.; HIRANO, M.; MIYASAKA, H. A novel plasmid recombination mechanism of the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7002. **DNA Research**, v.5, p.327-334, 1998.
- ALBANO, C. R.; RANDERS, E. L.; BENTLEY, W. E.; RAO, G. Green fluorescent protein as a real time quantitative reporter of heterologous protein production. **Biotechnology Progress**, v.14, p.351-354, 1998.
- ANDERSON, M. T.; TJIOE, I. M.; LORINCZ, M. C.; PARKS, D. R.; HERZENBERG, L. A.; NOLAN, G. P.; HERZENBERG, L. A. Simultaneous fluorescence-activated cell sorter analysis of two distinct transcriptional elements within a single cell using engineered green fluorescent proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences - USA**, v.93, p.8508-8511, 1996.
- AOKI, T.; AMI, R.; ONAGI, H.; FUJINO, H.; WATANABE, H. A new approach to gene mutation analysis using "GFP-display". **Journal of Biochemistry**, v.127, p.627-633, 2000.
- ARNOLD, F. H. Directed evolution: creating biocatalysts for the future. **Chemical Engineering Science**, v.51, p.5091-5102, 1996.
- ARNOLD, F. H.; ZHAO, H. Functional and nonfunctional mutations distinguished by random recombination of homologous genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences - USA**, v.94, p.7997-8000, 1997.
- ARNOLD, F. H. Design by directed evolution. **Accounts of Chemical Research**, v.31, p.125-131, 1998.

- BALLESTER, S.; LOPEZ, P.; ESPINOSA, M.; ALONSO, J. C.; LACKS, S. A. Plasmid structural instability associated with pC194 replication functions. **Journal of Bacteriology**, v.171, p.2271-2277, 1989.
- BARTLETT, R. J.; SECORE, S. L.; SINGER, J. T.; BODO, M.; SHARMA, K.; RIOCORDI, C. Long-term expression of a fluorescent reporter gene via direct injection of plasmid vector into mouse skeletal muscle: comparison of human creatine kinase and CMV promoter expression levels *in vivo*. **Cell-Transplant**, v.5, p.411-419, 1996.
- BAUBET, V.; LE-MOUELLIC, H.; CAMPBELL, A. K.; LUCAS, M. E.; FOSSIER, P.; BRULET, P. Chimeric green fluorescent protein-aequorin as bioluminescent Ca²⁺ reporters at the single-cell level. **Proceedings of the National Academy of Sciences - USA**, v.97, p.7260-7265, 2000.
- BEADLE, B. M.; BAASE, W. A.; WILSON, D. B.; GILKES, N. R.; SHOICHET, B. K. Comparing the thermodynamic stability of related thermophilic and mesophilic enzyme. **Biochemistry**, v.38, p.2570-2576, 1999.
- BIGS, J.; GEIDER, K. Movement of *Erwinia amylovora* in host plants and bacterial sorbitol and sucrose metabolism assayed with the Green Fluorescent Protein. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM, 5., Germany, 1998. **New aspects of resistance research on cultivated plants: bacterial diseases**. Germany, 1999. p.55-57.
- BLÖCHL, E.; BURGGRAF, S.; FIALA, G.; LAURERER, G.; HUBER, G.; HUBER, R.; RACHEL, R.; SEGERER, A.; STETTER, K. O.; VÖLKL, P. Isolation, taxonomy and phylogeny of hyperthermophilic microorganisms. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.11, p.9-16, 1995.
- BLUMENTHAL, A.; KUZNETZOVA, L.; EDELBAUM, O.; RASKIN, V.; LEVY, M.; SELA, I. Measurement of green fluorescence protein in plants: quantification, correlation to expression, rapid screening and differential gene expression. **Plant Science**, v.142, p.93-99, 1999.
- BOGDANOV Jr., A.; SIMONOVA, M.; WEISSLEDER, R. Design of metal-binding green fluorescent protein variants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1397, p.56-64, 1998.

- BOK, J. D.; GOERS, S. K.; EVELEIGH, D. E. The cellulase and xylanase systems of *Thermotoga neapolitana*. In: ENZYMATIC CONVERSION OF BIOMASS FOR FUELS PRODUCTION, 566, Washington, 1994. **American Chemical Society Symposium**. Washington: American Chemical Society, 1994. 54-65.
- BOTTIN, A.; LARCHE, L.; VILLALBA, F.; GAULIN, E.; ESQUERRE, T. M. T.; RICKAUER, M. Green fluorescent protein (GFP) as gene expression reporter and vital marker for studying development and microbe-plant interaction in the tobacco pathogen *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. **FEMS Microbiology Letters**, v.176, p. 51-56, 1999.
- BREJC, K.; SIXMA, T. K.; KITTS, P. A.; KAIN, S. R.; TSIEN, R. Y.; ORMOE, M. Remington, -S.J. Structural basis for dual excitation and photoisomerization of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences - USA**, v. 94, p.2306-2311, 1997.
- BROCK, R.; VAMOSI, G.; VEREB, G.; JOVIN, T. M. Rapid characterization of green fluorescent protein fusion proteins on the molecular and cellular level by fluorescence correlation microscopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences - USA**, v.96, p.10123-10128, 1999.
- BRONNENMEIER, K. A.; KERN, W.; LIEBL, W.; STAUDENBAUER, W. L. Purification of *Thermotoga maritima* enzymes for degradation of cellulosic materials. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.1399-1407, 1995.
- BURLAGE, R. S.; YANG, Z. K.; MEHLHORN, T. A transposon for green fluorescent protein transcriptional fusions: application for bacterial transport experiments. **Gene**, v.173, p.53-58, 1996.
- CADWELL, R. C.; JOYCE, G. F. Randomization of genes by PCR mutagenesis. **PCR Methods and Applications**, v.2, p.28-33, 1992.
- CALLUS, B. A.; MATHEY, P. B. Rapid selection of tetracycline-controlled inducible cell lines using a green fluorescent-transactivator fusion protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.257, p.874-878, 1999.

- CASSATA, G.; KAGOSHIMA, H.; PRÉTÔT, R. F.; ASPÖCK, G.; NIKLAUS, G.; BÜRGLIN, T. R. Rapid expression screening of *Caenorhabditis elegans* homeobox open reading frames using a two-step polymerase chain reaction promoter-*gfp* reporter construction technique. **Gene**, v.212, p.127–135, 1998.
- CHA, H. J.; DALAL, N. G.; VAKHARIA, V. N.; BENTLEY, W. E. Expression and purification of human interleukin-2 simplified as a fusion with green fluorescent protein in suspended Sf-9 insect cells. **Journal of Biotechnology**, v.69, p.9–17, 1999a.
- CHA, H. J.; SRIVASTAVA, R.; VAKHARIA, V.; RAO, G.; BENTLEY, W. E. Green Fluorescent Protein as a Noninvasive Stress Probe in Resting *Escherichia coli* Cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.409–414, 1999b.
- CHA, H. J.; WU, C. F.; VALDES, J. J.; RAO, G.; BENTLEY, W. E. Observations of green fluorescent protein as a fusion partner in genetically *engineered Escherichia coli*: Monitoring protein expression and solubility. **Biotechnology and Bioengineering**, v.67, p.565-574, 2000.
- CHALFIE, M.; TU, Y.; EUSKIRCHEN, G.; WARD, W.; PRASHER, D. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**, v.263, p.802-805, 1994.
- CHRISTENSEN, D. D.; STERNBERG, C.; MOLIN, S. Bacterial plasmid conjugation on semi-solid surfaces monitored with the green fluorescent protein (GFP) from *Aequorea victoria* as a marker. **Gene**, v.173, p. 59-65, 1996.
- CIAREMELLA, M. R.; CANNIO, R.; MORACCI, M.; PISANI, F. M.; ROSSI, M. Molecular biology of extremophiles. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, p.71-84, 1995.
- CINELLI, R. A.; FERRARI, A.; PELLEGRINI, V.; TYAGI, M.; GIACCA, M.; BELTRAM, F. The enhanced green fluorescent protein as a tool for the analysis of protein dynamics and localization: local fluorescence study at the single molecule level. **Photochem Photobiol**, v.71, p.771-776, 2000.
- CLARKE, A. J. **Biodegradation of Cellulose Enzymology and Biotechnology**. Lancaster: Technomic Publishing Company Inc, 1997. 270p.
- CORISH, P.; TYLER, S. C. Attenuation of green fluorescent protein half-life in mammalian cells. **Protein Engineering**, v.12, p.1035-1040, 1999.

- CORMACK, B. P.; VALDIVIA, R. H.; FALKOW, S. FACS optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). **Gene**, v.173, p.33-38, 1996.
- COWAN, D. A. Biotechnology of the archaea. **Tibtech**, v.10, p.315-323, 1992.
- CRAMERI, A.; WHITEHORN, E. A.; TATE, E.; STEMMER, W. P. Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. **Nature Biotechnology**, v.14, p.315-319, 1996.
- CRAMERI, A.; RAILLARD, S. A.; BERMUDEZ, E.; STEMMER, W. P. C. DNA shuffling of family of genes from diverse species accelerates directed evolution. **Nature**, v.391, p.288-291, 1998.
- CRONIN, S.; HAMPTON, R. A genetics-friendly GFP assay. **Trends in Cell Biology**, v.9, p.36, 1999.
- CUBITT, A. B.; HEIM, R.; ADAMS, S. R.; BOYD, A. E.; GROSS, L. A.; TSIEN, R. Y. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. **Trends in Biochemical Science**, v.20, p.448-455, 1995.
- CUNNINGHAM, B. C.; WELLS, J. A. Improvement in the alkaline stability of subtilisin using random mutagenesis and screening procedure. **Protein Engineering**, v.1, p.319-325, 1987.
- DABROWSKI, S.; BRILLOWSKA, A.; KUR, J. Use of the green fluorescent protein variant (YFP) to monitor MetArg human proinsulin production in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v.16, p.315-323, 1999.
- DAVIS, D. F.; SULLIVAN, R. F.; EVELEIGH, D. E. Thermostability and kinetic behavior of a b-glucosidase from *Fervidobacterium* sp. In: GENERAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, 100, Los Angeles-USA, 2000. **Final Program**. Los Angeles: American Society for Microbiology, 2000. p.81.
- DAY, R. N.; KAWECKI, M.; BERRY, D. Dual-Function Reporter Protein for Analysis of Gene Expression in Living Cells. **Biotechniques**, v.25, p.848-856, 1998.
- DELISA, M. P.; LI, J.; RAO, G.; WEIGAND, W. A.; BENTLEY, W. E. Monitoring GFP-operon fusion protein expression during high cell density cultivation of *Escherichia coli* using an on-line optical sensor. **Biotechnology and Bioengineering**, v.65, p.54-64, 1999.

- DESAI, U. J.; PFAFFLE, P. K. Single-step purification of a thermostable DNA polymerase expressed in *Escherichia coli*. **Biotechniques**, v.19, p.780-784, 1995.
- DIVNE, C.; STÅHLBERG, J.; REINIKAINEN, T.; RUOHONEN, L.; PETTERSON, G.; KNOWLES, J. K. C.; TEERI, T. T.; JONES, T. A. The three-dimension crystal structure of the catalytic core of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. **Science**, v.265, p.524-526, 1994.
- DOPF, J.; HORIAGON, T. M. Deletion mapping of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. **Gene**, v.173, p.39-44, 1996.
- DUMAS, B.; CENTIS, S.; SARRAZIN, N.; ESQUERRE, T. M. T. Use of green fluorescent protein to detect expression of an endopolygalacturonase gene of *Colletotrichum lindemuthianum* during bean infection. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.1769-1771, 1999.
- EGENER, T.; HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. Use of green fluorescent protein to detect expression of nif genes of *Azoarcus* sp. BH72, a grass-associated diazotroph, on rice roots. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.11, p.71-75, 1998.
- EL HAWRANI, A. S.; SESSIONS, R. B.; MORETON, K. M.; HOLBROOK, J. J. Guided evolution of enzymes with new substrate specificities. **Journal of Molecular Biology**, v.264, p.97-110, 1996.
- ELLENBERG, J.; LIPPINCOTT, S. J.; PRESLEY, J. F. Two color green fluorescent protein time lapse imaging. **Biotechniques**, v.25, p. 838-846, 1998.
- EMST, J. D.; YANG, L.; ROSALES, J. L.; BROADDUS, V. C. Preparation and characterization of an endogenously fluorescent annexin for detection of apoptotic cells. **Analytical Biochemistry**, v. 260, p.18-23, 1998.
- ERIKSSON, K. E. L.; BLANCHETTE, R. A.; ANDER, P. **Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components**. Berlin: Springer Verlag, 1990. 407p.
- ERIKSSON, S.; RAIVIO, E.; KUKKONEN, J. P.; ERIKSSON, K.; LINDQVIST, C. Green fluorescent protein as a tool for screening recombinant baculoviruses. **Journal of Virology Methods**, v.59, p.126-133, 1996.

- ERRAMPALLI, D. ; LEUNG, K.; CASSIDY, M. B.; KOSTRZYNSKA, M.; BLEARS, M.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Applications of the green fluorescent protein as a molecular marker in environmental microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v.35, p.187-199, 1999.
- EVELEIGH, D. E.; BOK, J.; EL DORRY, H.; EL GOGARY, S.; ELLISTON, K.; GOYAL, A.; WALDRON, C.; WRIGHT, R.; WU, Y. M. A cautionary tale of cellulose lessons revealed through the microbe's perspective. In: FUELS FROM BIOMASS, 16, USA, 1995. p.51-52.
- FIEROBE, H. P.; STOFFER, B. B.; FRANDBSEN, T. P.; SEVENSON, B. Mutational modulation of substrate bond type specificity and thermostability of glucoamylase from *Aspergillus awamori* by replacement with short homologue active site sequences and thiol/disulphide engineering. **Biochemistry**. v.38, p.8696-8704, 1996.
- FORTINEAU, N.; TRIEU, C. PA.; GAILLOT, O.; PELLEGRINI, E.; BERCHE, P.; GAILLARD, J. L. Optimization of green fluorescent protein expression vectors for *in vitro* and *in vivo* detection of *Listeria monocytogenes*. **Research in Microbiology**, v.151, p.353-360, 2000.
- GERDES, H. H.; KAETHER, C. Green fluorescent protein: applications in cell biology. **FEBS Letters**, v.389, p.44-47, 1996.
- GONZALEZ, D. G.; WARD, W. W. Large-scale purification of recombinant green fluorescent protein from *Escherichia coli*. **Methods in Enzymology**. v.305, p.212-223, 2000.
- GORDON, C. L.; KHALAJ, V.; RAM, A. F. J.; ARCHER, D. B.; BROOKMAN, J. L.; TRINCI, A. P. J.; JEENES, D. J.; DOONAN, J. H.; WELLS, B.; PUNT, P. J.; VAN DEN HONDEL, C. A.; ROBSON, G. D. Glucoamylase::green fluorescent protein fusions to monitor protein secretion in *Aspergillus niger*. **Microbiology Reading**, v.146, p.415-426, 2000.
- GRABNITZ, F.; SEISS, M.; RUCKNAGEL, K. P.; STAUDENBAUER, W. L. Structure of the beta-glucosidase gene bglA of *Clostridium thermocellum* Sequence analysis reveals a superfamily of cellulases and beta-glycosidases including human lactase/phlorizin hydrolase. **European Journal of Biochemistry**, v.200, p.301-309, 1991.

- GREBENOK, R. J.; LAMBERT, G. M.; GALBRAITH, D. W. Characterization of the targeted nuclear accumulation of GFP within the cells of transgenic plants. **Plant Journal**, v.12, p.685-696, 1997.
- GROHMANN, K. Simultaneous saccharification and fermentation of cellulosic substrates to ethanol. In: SADDLER, J. N. **Bioconversion of Agricultural Plant Residues**. Vancouver: CAB International, 1993. cap. 8, p. 183-209.
- GUEX, N.; PEITSCH, M. C. Swiss-Model and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling. **Electrophoresis**, v.18, p.2714-2723, 1997.
- GULICK, A. M.; FAHL, W. E. Forced evolution of glutathione S-transferase to create a more efficient drug detoxication enzyme. **Proceedings of the National Academy of Sciences - USA**, v. 92, p.8140-8144, 1995.
- HAYN, M.; STEINER, W.; KLINGER, R.; STEINMÜLLER, H.; SINNER, M.; ESTERBAUER, H. Basic research and pilot studies on the enzymatic conversion of lignocellulosics. In: SADDLER, J. N. **Bioconversion of Agricultural Plant Residues**. Vancouver: CAB International, 1993. cap. 2, p. 33-72.
- HEIM, R.; CUBITT, A. B.; TSIEN, R. Y. Improved green fluorescence. **Nature**, v.373, p.663-664, 1995.
- HEIM, R.; TSIEN, R. Y. Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. **Current Biology**, v.6, p.178-182, 1996.
- HERMES, J. D.; BLACKLOW, S. C.; KNOWLES, J. R. Searching sequence space by definably random mutagenesis: improving catalytic potency of an enzyme. **Proceedings of the National Academy of Sciences - USA**, v.87, p.696-700, 2000.
- HIGASHIJIMA, S.; OKAMOTO, H.; UENO, N.; HOTTA, Y.; EGUCHI, G. High-frequency generation of transgenic zebrafish which reliably express GFP in whole muscles or the whole body by using promoters of zebrafish origin. **Developmental Biology**, v. 192, p. 289-99, 1997.
- HÜBER, R.; WOESE, C. R.; LANGWORTHY, T. A.; KRISTJANSSON, J. K.; STETTER, K. O. *Fervidobacterium islandicum* sp. nov., a new extremely thermophilic eubacterium belonging to the "Thermotogales". **Archives of Microbiology**, v.154, p.105-111, 1990.

- ILMÉN, M.; ONNELA, M. L.; KLEMSDAL, S.; KERÄNEN, S.; PENTTILÄ, M. Functional analysis of the cellobiohydrolase I promoter of the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **Molecular and General Genetics**, v.253, p.303-314, 1996.
- KACK, N. J.; BILLUPS, B.; GUTHRIE, P. B.; ROGERS, J. H.; MUIR, E. M.; PARKS, T. N.; KATER, S. B. Green fluorescent protein as a quantitative tool. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 95, p. 177–184, 2000.
- KENDALL, J. M.; BADMINTON, M. N. *Aequorea victoria* bioluminescence moves into an exciting new era. **Trends in Biotechnology**, v.16, p.216-224, 1998.
- KENNEDY, J. F.; HOSSAIN, M. A. Cellulose biotechnology and its uses in industrial processes. **The Genetic Engineer & Biotechnologist**, v.12, p.12-14, 1992.
- KIM, Y. G.; CHA, J.; CHANDRASEGARAM, S. Hybrid restriction enzyme: Zinc finger fusion to Fok I cleavage domain. **Proceedings of the National Academy of Sciences - USA**, v.93, p.1156-1160, 1996.
- KOEHLER, R.; BUBERT, A.; GOEBEL, W.; STEINERT, M.; HACKER, J.; BUBERT, B. Expression and use of the green fluorescent protein as a reporter system in *Legionella pneumophila*. **Molecular and General Genetics**, v.262, p.1060-1069, 2000.
- KRUCKEBERG, A. L.; YE, L.; BERDEN, J. A.; VAN DAM, K. Functional expression, quantification and cellular localization of the Hxt2 hexose transporter of *Saccharomyces cerevisiae* tagged with the green fluorescent protein. **Biochemical Journal**, v.339, p.299-307, 1999.
- KUCHNER, O.; ARNOLD, F. H. Directed evolution of enzyme catalysts. **Biofutur**, v.185, p.B1-B11, 1999.
- KUNZE, I.; HENSEL, G.; ADLER, K.; BERNARD, J.; NEUBOHN, B.; NILSSON, C.; STOLTENBURG, R.; KOHLWEIN, S. D.; KUNZE, G. The green fluorescent protein targets secretory proteins to the yeast vacuole. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1410, p.287-298, 1999.
- LALWANI, A. K.; HAN, J. J.; WALSH, B. J.; ZOLOTUKHIN, S.; MUZYCZKA, N.; MHATRE, A. N. Green fluorescent protein as reporter for genes studies in cochlea. **Hearing Research**, v.114, p.139-147, 1997.

- LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**, v.56, p.1-24, 1997.
- LEUNG, D. W.; CHEN, E.; GOEDDEL, D. V. A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction. **Technique**, v.1, p.11-15, 1989.
- LI, L.; LI, Y.; LIM, T. M.; TAN, S. Q. GFP-aided confocal laser scanning microscopy can monitor *Agrobacterium tumefaciens* cell morphology and gene expression associated with infection. **FEMS Microbiology Letters**, v.179, p.141-146, 1999.
- LIEBL, W.; GABELSBERGER, J.; SCHLEIFER, K. H. Comparative amino acid sequence analysis of *Thermotoga maritima* beta-glucosidase (BglA) deduced from the nucleotide sequence of the gene indicates distant relationship between beta-glucosidases of the BGA family and other families of beta-1,4-glycosyl hydrolases. **Molecular and General Genetics**, v.242, p. 111-115, 1994.
- LIM, C.; KIMATA, K.; OKA, M.; NOMAGUCHI, K.; KOHNO, K. Thermosensitivity of green fluorescent protein utilized to reveal novel nuclear-like compartments. **Journal of Biochemistry**, v. 118, p. 13-17, 1995.
- LISSEMORE, J. L.; JANKOWSKI, J. T.; THOMAS, C. B.; MACOTTI, D. P.; DEHASETH, P. L. Green fluorescent protein as a quantitative reporter of relative promoter activity in *E. coli*. **Biotechniques**, v.28, p.82-89, 2000.
- LIU, J.; WANG, Y.; SZALAY, A. A.; ESCHER, A. Visualizing and quantifying protein secretion using a Renilla luciferase-GFP fusion protein. **Luminescence Chichester**, v.15, p.45-49, 2000.
- LYUNGDAHL, L. G.; ERIKSSON, K. E. Ecology of microbial cellulose degradation. **Advanced Microbial Ecology**, v.8, p.237-299, 1985.
- LORIMER, I. A. J.; PASTAN, I. Random recombination of antibody single chain fv sequences after fragmentation with DNaseI in the presence of Mn²⁺. **Nucleic Acids Research**, v.23, p.3067-3068, 1995.
- LYND, L. R.; CUSHMAN, J. H.; NICHOLAS, R. J.; WYMAN, C. Fuel ethanol from cellulosic biomass. **Science**, v.251, p.1318-1323, 1991.

- MAINEN, Z. F.; MALETIC, S. M.; SHI, S. H.; HAYASHI, Y.; MALINOW, R.; SVOBODA, K. Two-photon imaging in living brain slices. **Methods Orlando**, v.18, p.231-239, 1999.
- MENG, Y. G.; LIANG, J.; WONG, W. L.; CHISHOLM, V. Green fluorescent protein as a second selectable marker for selection of high producing clones from transfected CHO cells. **Gene**, v. 242, p.201-207, 2000.
- MEIMA, R.; HAAN, G. J.; BRON, J. V. S.; DE JONG, S. Sequence specificity of illegitimate plasmid recombination in *Bacillus subtilis*: Possible recognition sites for DNA topoisomerase I. **Nucleic Acids Research**, v.26, p.2366-2373, 1998.
- MERKULOV, G. V.; BOEKE, J. D. Libraries of green fluorescent protein fusions generated by transposition in vitro. **Gene**, v.222, p.213-222, 1998.
- MILLER, W. G.; LINDOW, S. E. An improved GFP cloning cassette designed for prokaryotic transcriptional fusions. **Gene**, v.191, p.149-53, 1997.
- MIRANDA, E. A.; DANTZER, F.; O'FARRELL, M.; DE MURCIA, G.; DE MURCIA, J. M. Characterization of a gain of function mutant of poly (ADP-ribose) polymerase. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v.212, p.317-325, 1995.
- MONTENECOURT, B. S.; EVELEIGH, D. E. Preparations of mutants of *Trichoderma reesei* with enhanced cellulase production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 34, p. 777-782, 1977.
- MOORE, J. C.; ARNOLD, F. H. Directed evolution of para-nitrobenzyl esterase for aqueous organic solvents. **Nature Biotechnology**, v.14, p.458-467, 1996.
- MOORE, J. C.; JIN, H. M.; KUCHNER, O.; ARNOLD, F. H. Strategies for the *in vitro* evolution of protein function: enzyme evolution by random recombination of improved sequences. **Journal of Molecular Biology**, v.272, p.336-347, 1997.
- MULLANEY, J. M.; BLACK, L. W. GFP:HIV-1 protease production and packaging with a T4 phage expression packaging processing system. **Biotechniques**, v.25, p.1008-1012, 1998.
- NAKARI-SETÄLÄ, T.; PENTTILÄ, M. Production of *Trichoderma reesei* cellulases on glucose-containing media. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 3650-3655, 1995.

- NATARAJAN, A.; SUBRAMANIAN, S.; SRIENC, F. Comparison of mutant forms of the green fluorescent protein as expression markers in Chinese hamster ovary (CHO) and *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Journal of Biotechnology**, v.62, p.29-45, 1998.
- NEGRO, A.; GRASSATO, L.; POLVERINO, D. L.; SKAPER, S. D. Genetic construction, properties and application of a green fluorescent protein-tagged ciliary neurotrophic factor. **Protein Engineering**, v.10, p.1077-1083, 1997.
- NISWENDER, K. D.; BLACKMAN, S. M.; ROHDE, L.; MAGNUSON, M. A.; PISTON, D. W. Quantitative imaging of green fluorescent protein in cultured cells: comparison of microscopic techniques, use in fusion proteins and detection limits. **Journal of Microscopy**, v.180, p.109-116, 1995.
- NORDSTRÖM, T.; SENKAS, A.; ERIKSSON, S.; PÖNTYNER, N.; NORDSTRÖM, E.; LINDQVIST, C. Generation of a new protein purification matrix by loading ceramic hydroxyapatite with metal ions demonstration with poly-histidine tagged green fluorescent protein. **Journal of Biotechnology**, v.69, p.125–133, 1999.
- NUKAGA, M.; HARUTA, S.; TANIMOTO, K.; KOGURE, K.; TANIGUCHI, K.; TAMAKI, M.; SAWAI, T. Molecular evolution of a class C beta-lactamase extending its substrate specificity. **Journal of Biological Chemistry**, v.270, p.5729-5735, 1995.
- OLSEN, G. J.; WOESE, C. R.; OVERBEEK, R. The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. **Journal of Bacteriology**, v.176, p.1-6, 1994.
- OUAHRANI, B. S.; PORTE, F.; TEYSSIER, J.; LIAUTARD, J. P.; KÖHLER, S. pBBR1-GFP: A broad-host-range vector for prokaryotic promoter studies. **Biotechniques**, v.26, p.620-622, 1999.
- PEITSCH, M. C. Protein modeling by E-mail. **Bio/Technology**, v.13, p.658-660, 1995.
- PEITSCH, M. C. ProMod and Swiss-Model: Internet-based tools for automated comparative protein modelling. **Biochemical Society Transaction**, v.24, p.274-279, 1996.
- PERSECHINI, A.; LYNCH, J. A.; ROMOSER, V. A. Novel fluorescent indicator proteins for monitoring free intracellular Ca²⁺. **Cell Calcium**, v. 22, p.209-216, 1997.

- PHILLIPS, G. N. Jr. Structure and dynamics of green fluorescent protein. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 7, p.821-827, 1997.
- PIJURA, P.; MATSUMURA, M.; BAASE, W. A.; MATTHEWS, B. W. Development of an *in vivo* method to identify mutants of phage T4 lysozyme of enhanced thermostability. **Protein Science**, v.2, p.2217-2225, 1993.
- PLAUTZ, J. D.; DAY, R. N.; DAILEY, G. M.; WELSH, S. B.; HALL, J. C.; HALPAIN, S.; KAY, S. A. Green fluorescent protein and its derivatives as versatile marker for gene expression in living *Drosophila melanogaster*, plant and mammalian cells. **Gene**, v.173, p.83-87, 1996.
- POPPENBORG, L.; FRIEHS, K.; FLASCHEL, E. The green fluorescent protein is a versatile reporter for bioprocess monitoring. **Journal of Biotechnology**, v.58, p.79-88, 1997.
- POURQUIE, J.; WARZYWODA, M. Cellulase production in *Trichoderma reesei*. In: SADDLER, J. N. **Bioconversion of Agricultural Plant Residues**. Vancouver: CAB International, 1993. cap. 5, p. 107-116.
- PRASGER, D.; ECKENRODE, V.; WARD, W.; PRENDERGAST, F.; CORMIER, M. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. **Gene**, v.111, p.229-233, 1992.
- RESENDES, M. C.; DOBRANSKY, T.; FERGUSON, S. S. G.; RYLETT, R. J. Nuclear localization of the 82-kDa form of human choline acetyltransferase. **Journal of Biological Chemistry**, v.274, p.19417-19421, 1999.
- REIDHAAR-OLSON, J. F.; SAUER, R. T. Combinatorial cassette mutagenesis as a probe of the information content of proteins. **Science**, v.241, p.53-57, 1988.
- RICHMOND, T. A.; TAKAHASHI, T. T.; SHIMKHADA, R.; BERNSDORF. Engineered metal binding sites on green fluorescence protein. **Journal of Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 268, p.462-465, 2000.
- RINKEN, R.; WACKERNAGEL, W. Inhibition of the recBCD-dependent activation of Chi recombinational hot spots in SOS-induced cells of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v.174, p.1172-1178, 1992.

- ROSS, M. P.; SHEEHAN, A.; ROEDER, G. S.; SNYDER, M. A multipurpose transposon system for analyzing protein production, localization, and function in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences - USA**, v.94, p.190-195, 1997.
- RUSTOM, A.; GERLICH, D.; RUDOLF, R.; HEINEMANN, C.; EILS, R.; GERDES, H. H. Analysis of Fast Dynamic Processes in Living Cells: High-Resolution and High-Speed Dual-Color Imaging Combined with Automated Image Analysis. **Biotechniques**, v.28, p.722-730, 2000.
- RYU, D. D. Y.; MANDELS, M. Cellulase: biosynthesis and applications. **Enzyme Microbial Technology**, v. 2, p. 91-99, 1980.
- SAMBROOK, J.; FITSCH, E. F.; MANIATIS, T. M. Molecular cloning: a laboratory manual. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- SANZ-APARICIO, J.; HERMOSO, J. A.; MARTINEZ-RIPOLL, M.; LEQUERICA, J. L.; POLAINA, J. Crystal structure of beta-glucosidase A from *Bacillus polymyxa*: insights into the catalytic activity in family 1 glycosyl hydrolases. **Journal of Molecular Biology**, v.275, p.491-502, 1998.
- SCHMIDT, C. M.; SETTLE, S. L.; KEENE, J. L.; WESTLIN, W. F.; Nickols, G. A.; Griggs, D. W. Characterization of spontaneous metastasis in an aggressive breast carcinoma model using flow cytometry. **Clinical and Experimental Metastasis**, v.17, p.537-544, 1999.
- SCHOLZ, O.; THIEL, A.; HILLEN, W.; NIEDERWEIS, M. Quantitative analysis of gene expression with an improved green fluorescent protein. **European Journal of Biochemistry**, v.267, p.1565-1570, 2000.
- SCHUMANN, J.; WRBA, A.; JAENICKE, R.; STETTER, K. O. Topographical and enzymatic characterization of amylases from the extremely thermophilic eubacterium *Thermotoga maritima*. **FEBS Letters**, v.282, p.122-126, 1991.
- SEIBOTH, B.; HAKOLA, S.; MACH, R. L.; SUOMINEN, P. L.; KUBICEK, C. P. Role of four major cellulases in triggering of cellulase gene expression by cellulose in *Trichoderma reesei*. **Journal of Bacteriology**, v.179, p.5318-5320, 1997.

- SHAFIKHANI, S.; SIEGEL, R. A.; FERRARI, E.; SCHELLENBERGER, V. Generation of large libraries of random mutants in *Bacillus subtilis* by PCR based plasmid multimerization. **Biotechniques**, v.23, p.301-310, 1997.
- SHAO, Z.; ZHAO, H.; GIVER, L.; ARNOLD, F. H. Random priming *in vitro* recombination: an effective tool for directed evolution. **Nucleic Acids Research**, v.26, p.681-683, 1998.
- SRISODSUK, M.; LEHTIÖ, J.; LINDER, M.; MARGOLLES-CLARK, E.; REINIKAINEN, T.; TEERI, T. T. *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I with an endoglucanase cellulose-binding domain: action on bacterial microcrystalline cellulose. **Journal of Biotechnology**, v.57, p.49-57, 1997.
- STEMMER, W. P. C. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: *In vitro* recombination for molecular evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences - USA**, v.91, p.10747-10751, 1994a.
- STEMMER, W. P. C. Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling. **Letters to Nature**, v.370, p.389-391, 1994b.
- STERNBERG, C.; CHRISTENSEN, B. B.; JOHANSEN, T.; TOFTGAARD, N. A.; ANDERSEN, J. B.; GIVSKOV, M.; MOLIN, S. Distribution of bacterial growth activity in flow-chamber biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.4108-4117, 1999.
- SUBRAMANIAN, S.; SRIENC, F. Quantitative analysis of transient gene expression in mammalian cells using the green fluorescent protein. **Journal of Biotechnology**, v.49, p.137-151, 1996.
- SULLIVAN, R. F.; YERNOOL, D. A.; DAVIS, D. F.; REYSENBACH, A. L.; EVELEIGH, D. E. *Thermotoga's* cool cousin has enzymes: a glycosyl hydrolase from a Yellowstone *Fervidobacterium*. In: GENERAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, 98, Local-USA, 1998. **Final Program**. Local: American Society for Microbiology, 1998. p.34.
- TEERI, T. T.; LEHTOVAARA, P.; KAUPPINEN, S.; SALOVUORI, I.; KNOWLES, J. Homologous domains in *Trichoderma reesei* cellulolytic enzymes: gene sequence and expression of cellobiohydrolase II. **Gene**, v.51, p.43-52, 1987.

- TIMMONS, L.; BECKER, J.; BARTHMAIER, P.; FYERBERG, C.; SHEAM, A.; FRYBERG, E. Green fluorescent protein/beta-galactosidase double reporters for visualizing *Drosophila* gene expression patterns. **Developmental Genetics**, v.20, p.338-347, 1997.
- TIRLAPUR, U. K.; DAHSE, I.; REISS, B.; MEUER, J.; OELMUELLER, R. Characterization of the activity of a plastid-targeted green fluorescent protein in *Arabidopsis*. **European Journal of Cell Biology**, v.78, p.233-240, 1999.
- TSIEN, R.Y. The green fluorescent protein. **Annual Review of Biochemistry**, v.67, p.509-544, 1998.
- VALDIVIA, R. H.; HROMOCKYJ, A. E.; MONACK, D.; RAMAKRISHNAN, L.; FALKOW, S. Applications of green fluorescent protein (GFP) in the study of host-pathogen interactions. **Gene**, v.173, p.47-52, 1996.
- VIADIU, H.; OSUNA, J.; FINK, A. L.; SOBERON, X. A new TEM beta-lactamase double mutant with broadened specificity reveals substrate dependent functional interactions. **Journal of Biological Chemistry**, v.270, p.781-787, 1995.
- VIELLE, C.; BURDETTE, D. S.; ZEIKUS, J. G. Thermoenzymes. In: EL-GEWELY, M. R. **Biotechnology Annual Review**. New York: Elsevier Sciences Publisher, 1996. cap. 1, p.1-83.
- VON ARNIM, A.G.; DENG, X. W.; STACEY, M. G. Cloning vectors for the expression of green fluorescent protein fusion proteins in transgenic plants. **Gene**, v.221, p.35-43, 1998.
- WALDO, G. S.; STANDISH, B. M.; BERENDZEN, J.; TERWILLIGER, T. C. Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein. **Nature Biotechnology**, v. 17, p. 691-695, 1999.
- WEBB, C. D.; DECATUR, A.; TELEMAN, A.; LOSICK, R. Use of green fluorescent protein for visualization of cell-specific gene expression and subcellular protein localization during sporulation in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v.177, p.5906-5911, 1995.
- WOOD, T. M.; GARCIA-CAMPAYO, V. Enzymology of cellulose degradation. **Biodegradation**, v.1, p.147-161, 1990.

- WRIGHT, R. M.; YABLONSKY, M. D.; SHALITA, Z. P.; GOYAL, A. K.; EVELEIGH, D. E. Cloning, characterization, and nucleotide sequence of a gene encoding *Microbispora bispora* BglB, a thermostable beta-glucosidase expressed in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.3455-3465, 1992.
- WU, C.; LIU, H.; CROSSEN, R.; GRUENWALD, S.; SINGH, S. Novel green fluorescent protein (GFP) baculovirus expression vectors. **Gene**, v.190, p.157-162, 1997.
- YAMASHITA, M. ; KINOSHITA, T.; IHARA, M.; MIKAWA, T.; MUROOKA, Y. Tandem mutagenesis of pullulanase from *Klebsiella aerogenes* for studies of structure and function of the enzyme. **Journal of Biochemistry (Tokyo)**, v.116, p.1233-1240, 1994.
- YANG, F.; MOSS, L. G.; PHILLIPS Jr., G. N. The molecular structure of green fluorescent protein. **Nature Biotechnology**, v.14, p.1246-1251, 1996.
- YOU, L.; ARNOLD, F. H. Directed evolution of subtilisin E in *Bacillus subtilis* to enhance total activity in aqueous dimethylformamide. **Protein Engineering**, v.9, p.77-83, 1996.
- ZEIKUS, J. G.; VIEILLE, C.; SAVCHENKO, A. Thermoenzymes: biotechnology and structure-function relationship. **Extremophiles**, v.2, p.179-183, 1998.
- ZHANG, H. Y.; ZHANG, T.; LIN, L.; DU, W. Y.; LU, J. Enhancement of the stability and activity of aspartase by random and site-directed mutagenesis. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v.192, p.15-21, 1993.
- ZHANG, J. H.; DAWES, G.; STEMMER, W. P. Directed evolution of a fucosidase from a galactosidase by DNA shuffling and screening. **Proceedings of the National Academy of Sciences - USA**, v.94, p.4504-4509, 1997.
- ZHANG, Q.; TIERSCH, T. R.; COOPER, R. K. Inducible expression of green fluorescent protein within channel catfish cells by a cecropin gene promoter. **Gene**, v.216, p.207-213, 1998.
- ZHAO, H.; LI, Y.; ARNOLD, F. H. Strategy for the directed evolution of a peptide ligase. **Annual New York Academy of Science**, v.799, p.1-5, 1996.

- ZHAO, H.; ARNOLD, F. H. Optimization of DNA shuffling for high fidelity recombination. **Nucleic Acids Research**, v.25, p.1307-1308, 1997.
- ZHAO, H.; GIVER, L.; SHAO, Z.; AFFHOLTER, J. A.; ARNOLD, F. H. Molecular evolution by staggered extension process (StEP) *in vitro* recombination. **Nature Biotechnology**, v.16, p.259-261, 1998a.
- ZHAO, H.; MOORE, J. C.; ARNOLD, F. H. Methods for optimizing industrial enzymes by directed evolution. In: **ASM Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 20p. 1998b.