

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0719181-2 A2



* B R P I 0 7 1 9 1 8 1 A 2 *

(22) Data de Depósito: 09/10/2007

(43) Data da Publicação: 05/08/2014
(RPI 2274)

(51) *Int.Cl.:*

C12N 9/34

C07K 14/37

C12N 15/56

C12N 15/31

C12R 1/885

C12N 15/62

(54) **Título:** VARIANTES DE GLUCOAMILASE COM
PROPRIEDADES ALTERADAS

(57) **Resumo:**

(30) **Prioridade Unionista:** 10/10/2006 US 60/850,431

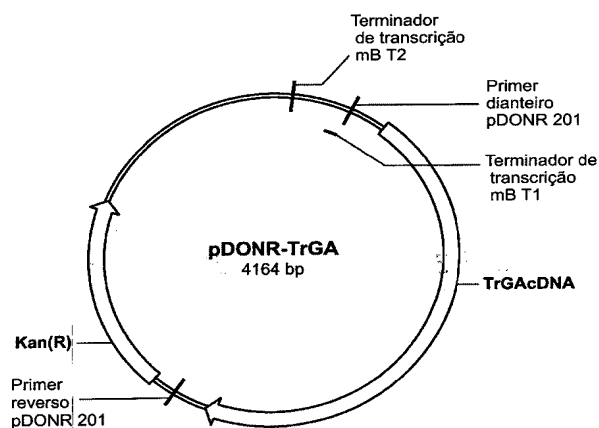
(73) **Titular(es):** Danisco US Inc., Genencor Division

(72) **Inventor(es):** MARTIJN SCHEFFERS, Piet Van Solingen,
Richard R. Bott, Wolfgang Aehle

(74) **Procurador(es):** Dannemann, Siemsen, Bigler &
Ipanema Moreira

(86) **Pedido Internacional:** PCT US2007021683 de
09/10/2007

(87) **Publicação Internacional:** WO 2008/045489de
17/04/2008



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "VARIANTES DE GLUCOAMILASE COM PROPRIEDADES ALTERADAS".

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se à variantes de uma glucoamilase precursora tendo propriedades alteradas (por exemplo, termoestabilidade e/ou atividade específica aperfeiçoada). Em particular, a presente invenção proporciona composições compreendendo as glucoamilases variantes, incluindo composições de hidrólise de amido, composições de ração para animais e composições de limpeza. A invenção também refere-se a constructos de DNA que codificam as variantes e métodos de produção das variantes de glucoamilase em células hospedeiras.

Antecedentes da Invenção

Enzimas glucoamilase (1,4- α -glico-hidrolases de glucano, EC 3.2.1.3) são carboidrases de exo-atuação de hidrólise de amido as quais catalisam a remoção de unidades de glicose sucessivas das extremidades de não-redução de amido ou moléculas de oligo ou polissacarídeo.

Glucoamilases são produzidas por numerosas cepas de bactérias, fungos, levedo e plantas. De modo particularmente interessante e comercialmente importante, glucoamilases são enzimas fúngicas que são extracelularmente produzidas, por exemplo, a partir de cepas *Aspergillus* (Svensson e outros (1983) *Carlsberg Res. Commun.* 48: 529 - 544; Boel e outros, (1984) *EMBO J.* 3: 1097 - 1102; Hayashida e outros, (1989) *Agric. Biol. Chem.* 53: 923 - 929; USP 5.024.941; USP 4.794.175 e WO 88/09795); *Talaromyces* (USP 4.247.637; USP 6.255.084 e USP 6.620.924); *Rhizopus* (Ashikari e outros, (1986) *Agric. Biol. Chem.* 50: 957-964; Ashikari e outros, (1989) *App. Microbiol. and Biotech.* 32: 129 - 133 e USP 4.863.864); *Humicola* (WO 05/052148 e USP 4.618.579) e *Mucor* (Houghton-Larsen e outros, (2003) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62: 210 - 217). Muitos dos genes que codificam essas enzimas foram clonados e expressos em células de levedo, fúngicas e/ou bacterianas.

Comercialmente, glucoamilases são enzimas muito importantes e têm sido usadas em uma ampla variedade de aplicações que requerem a

hidrólise de amido (por exemplo, para a produção de glicose e outros monossacarídeos a partir de amido). Glucoamilases são usadas para produzir adoçantes de milho com alto teor de frutose, os quais compreendem mais de 50% do mercado de adoçantes nos Estados Unidos. Em geral, glucoamilases podem ser e comumente são usadas com amilases alfa em processos de hidrólise de amido para hidrolisar amido em dextrinas e, então, glicose. A glicose pode, então, ser convertida em frutose por outras enzimas (por exemplo, isomerases de glicose); cristalizada; ou usada em fermentações para produzir numerosos produtos finais (por exemplo, etanol, ácido cítrico, ácido láctico, succinato, intermediários de ácido ascórbico, ácido glutâmico, glicerol e 1,3 propanodiol). O etanol produzido usando glucoamilases na fermentação de amido e/ou material contendo celulose pode ser usado como uma fonte de combustível para consumo alcoólico.

Embora glucoamilases tenham sido usadas com sucesso em aplicações comerciais durante muitos anos, ainda existe uma necessidade por novas glucoamilases com propriedades alteradas, tais como atividade específica aperfeiçoada e termoestabilidade aumentada.

Embora diferentes mutações tenham sido feitas em glucoamilases de *Aspergillus*, as quais intensificam a estabilidade térmica e atividade específica e referência é feita a USP 6.537.792; USP 6.352.851; Chen e outros (1996) *Prot. Eng.* 9: 499 - 505, Chen e outros (1995) *Prot Eng.* 8: 575-582; Fierobe e outros (1996) *Biochem.* 35: 8698 - 8704; e Li e outros, (1997) *Prot. Eng.* 10: 1199-1204, há uma necessidade por proporcionar variantes de glucoamilase com propriedades alteradas com relação a seu precursor.

25 Sumário da Invenção

Em um aspecto, a presente invenção refere-se à variantes de glucoamilase tendo uma ou mais substituições de aminoácido em posições de resíduo correspondendo às posições 4, 5, 12, 24, 43,44,45,46,47,49,51, 70, 75, 94, 100, 108, 114, 116, 119, 122, 124, 125,137, 141, 143, 146, 148, 169, 171, 172, 175, 178, 180, 181, 208, 211, 228, 242, 243, 245, 292, 294, 197, 309, 310, 313, 314, 315, 316, 317, 321, 340, 341, 350, 353, 356, 363, 368, 369, 375, 376, 395, 398, 401, 408, 409, 412, 415, 418, 421, 433, 436 e

451 de SEQ ID NO: 2 ou 3 e/ou uma posição equivalente em uma glucoamilase precursora. A posição equivalente pode ser determinada pela identidade de sequência, de modo que a glucoamilase precursora tem pelo menos 80% de identidade de sequência e menos de 100% de identidade de sequência com SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9. A glucoamilase precursora pode ser uma de SEQ ID NO: 1, 2 ou 3. A posição equivalente pode ser determinada pela identidade estrutural à SEQ ID NO: 3. Um outro aspecto da presente invenção é uma variante de glucoamilase tendo uma ou mais substituições de aminoácido correspondendo a uma posição selecionada das posições 4, 5, 24, 29, 43, 49, 70, 75, 76, 100, 108, 119, 124, 137, 146, 148, 169, 171, 172, 175, 178, 181, 208, 211, 243, 292, 294, 297, 314, 316, 317, 340, 341, 350, 356, 363, 368, 369, 376, 395, 401, 412, 433, 436 e 451 e tendo pelo menos 90% de identidade de sequência à SEQ ID NO. 2. Em alguns aspectos, a uma ou mais substituições de aminoácido corresponde às seguintes posições: 5, 24, 43, 49, 70, 75, 76, 94, 119, 141, 146, 148, 172, 175, 178, 180, 181, 208, 211, 243, 294, 309, 314, 353, 369, 375, 409. A glucoamilase precursora pode ser qualquer uma de: *Trichoderma spp.*, *Aspergillus spp.*, *Humicola spp.*, *Penicillium spp.*, *Talaromyces spp.* ou *Schizosaccharmyces spp.* Em alguns aspectos, a variante de glucoamilase é, de preferência, *Trichoderma spp.* ou *Aspergillus spp.*

Em outros aspectos da invenção, a variante de glucoamilase inclui uma substituição em uma posição correspondendo a pelo menos uma das seguintes posições: D4L/E/R/S/C/A/Q/W, F5C/M/N/R/S/T/V/W, I12L/R, D24E/L/Y/T, F29L/I/D/C/S/V/W, I43F/R/D/Y/S, D44E/H/K/S/N/Y/F/R, Y47W, Y49N, Q70R/K/M/P/G/L/F, Q75R/K/A, R76L/M/K/T/P, P94L, D100W/I/Q/M/P/A/N, N119P/T/Y/D/E, N146S/G/C/H/E/D/T/W/L/M, Q148V/Y/H/A/C/D/G/M/R/S/T, Y169D/F, Q172C/A/D/R/E/F/H/V/L/M/N/S/T/V, E180A/C/G/H/I/L/N/P/Q/R/S/T/V/Y, V181E/C/D/G/H/I/P/T/Y/S/K/F/A, Q208L/A/C/E/N/F/H/T, S211C/R/E/A/Y/W/M/H/L/I/R/Q/T, E243S/R/N/M/Y/A/L, R245A/E/M/I/P/V, I292D/H/P/R/T/N/V/F/L, G294D/E/T/Q/I/A, K297F/L/P/T/M/D/N/Q/A/Y/H/S/R/W, R309A/C/G/H/I/N/P/Q/S/T/W/Y/L, Y310E/G/L/P/S/W/R/Q, D313Q, V314A/R/N/D/C/E/Q/G/H/I/K/L/M/F/P/S/T/W/Y, Y315F, Y316Q/R, N317T/H,

K340D/T, K341F/D/P/V/G/S, T350S/E/A/N, Q356H/D/E, T363L/R/C/H/W, S368W/D/F/L, S369F, N376Q/T/H/S/V, Y395Q/R/S, A398S/I/T, S401C/V, R408S, N409W/T/K, T412A/h/K/G, R433H/Q, I436A/T e S451M/T/H. Algumas variantes preferidas têm substituições na posição 172. Outras variantes preferidas têm substituições na posição 208 ou 211. Outras variantes preferidas têm substituições correspondendo a Q172F, Q208N ou S221R. Outras variantes preferidas têm pelo menos uma substituição na posição 314. Em alguns aspectos, as variantes têm pelo menos uma substituição na posição 24, 181, 208, 243, 292, 294, 353, 375 ou 409. Algumas substituições preferidas estão nas posições D24E/L/Y, V181K/L, Q208C, E243Y I292V, G294A/Q, T353R, N375N/Q e/ou N409K/W. Em um aspecto, a glucoamilase variante exibe termoestabilidade aumentada quando comparado com a glucoamilase precursora. Alternativamente ou além disso, a variante exibe atividade específica aumentada comparado com uma glucoamilase precursora.

Um outro aspecto da invenção é um polinucleotídeo que codifica a variante descrita aqui. Um outro aspecto é uma célula hospedeira contendo o polinucleotídeo. Um outro aspecto da invenção é uma composição enzimática incluindo a variante de glucoamilase descrita aqui. Em um aspecto, a composição enzimática é usada em um processo de conversão de amido ou uma formulação de ração para animal. Em outros aspectos, a composição enzimática é usada em um processo de fermentação de álcool.

Um outro aspecto da invenção é um método de produção de uma glucoamilase variante em uma célula hospedeira através de transformação de uma célula hospedeira com um constructo de DNA compreendendo o polinucleotídeo que codifica a glucoamilase variante; cultura da célula hospedeira sob condições adequadas para a expressão e produção de uma variante de glucoamilase e produção da variante. O método também pode incluir a etapa de recuperação da variante de glucoamilase da cultura.

Breve Descrição dos Desenhos

A figura 1A ilustra a glucoamilase precursora de *Trichoderma reesei* (TrGA) tendo 632 aminoácidos (SEQ ID NO: 1). O peptídeo sinalizador está sublinhado, a região catalítica (SEQ ID NO: 3) começando com os

resíduos de aminoácido SVDDFI (SEQ ID NO: 160) e tendo 453 resíduos de aminoácido está em negrito; a região ligante está em itálico e o domínio de ligação está em itálico e sublinhado. A proteína madura, a qual inclui o domínio catalítico (SEQ ID NO: 3), região ligante e domínio de ligação a amido é representada por SEQ ID NO: 2.

A figura 1B ilustra o cDNA (SEQ ID NO: 4) o qual codifica a TrGA.

A figura 2 ilustra o plasmídeo pDONR-TrGA, o qual inclui o cDNA (SEQ ID NO: 4) da TrGA precursora.

A figura 3 ilustra os plasmídeos pREP3Y-DEST (A) e pREP3Y-TrGA (C).

As FIGS. 4A - 4B ilustram uma comparação por alinhamento dos domínios catalíticos de glucoamilases precursoras, incluindo a glucoamilase derivada de *Aspergillus awamorii* (AaGA) (SEQ ID NO: 5); *Aspergillus niger* (AnGA) (SEQ ID NO: 6); *Aspergillus oryzae* (AoGA) (SEQ ID NO: 7); *Trichoderma reesei* (TrGA) (SEQ ID NO: 3); *Hemicella grisea* (HgGA) (SEQ ID NO: 8); e *Hypocrea vinosa* (HvGA) (SEQ ID NO: 9). Aminoácidos idênticos são indicados por um asterisco (*).

A figura 5 ilustra (A) o plasmídeo pTrex 3g-DEST e (B) o plasmídeo pTrex3g-TrGA, os quais foram usados como um vetor de expressão para expressão e produção de glucoamilases variantes em um hospedeiro *Trichoderma reesei*.

A figura 6 ilustra a comparação de V_{max} (μM de glicose/seg) entre a TrGA precursora (tipo silvestre) e variantes, V314, S211R, Q172F e Q208N a 60°C e 32°C, conforme ainda discutido no Exemplo 8.

A figura 7 ilustra a atividade de mutantes combinacionais sobre o amido.

A figura 8 ilustra a atividade de mutantes em um único sítio sobre amido de milho.

A figura 9 ilustra a atividade de GA de TrGA e da variante LR8 de TrGA sobre uma amostra de liquefeito de massa de milho (NE) do Exemplo 10.

A figura 10 ilustra o perfil de atividade de TrGA e da variante LR8 de TrGA sobre o liquefeito de massa de milho (BSE) do Exemplo 10.

A figura 11 ilustra a variante LR8 de TrGA sobre um substrato de amido de milho solúvel.

5 A figura 12 é uma comparação das estruturas tridimensionais de glucoamilase de *Trichoderma* (preto) (SEQ ID NO: 2) e glucoamilase de *Aspergillus awamorii* (cinza) visualizadas pelo lado.

10 A figura 13 é uma comparação das estruturas tridimensionais de glucoamilase de *Trichoderma* (preto) e glucoamilase de *Aspergillus awamorii* (cinza) vista de cima.

Descrição Detalhada da Invenção

I. Definições

A menos que de outro modo definido, todos os termos técnicos e científicos usados aqui têm o mesmo significado conforme comumente entendido por aqueles versados na técnica à qual a presente invenção pertence. Singleton e outros, DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY, 2ª ED., John Wiley and Sons, New York (1994) e Hale & Markham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY, Harper Perennial, N.Y. (1991) fornecem àqueles versados na técnica o significado geral de muitos dos termos usados aqui. Ainda, determinados termos são definidos abaixo para fins de clareza e facilidade de referência.

20 Conforme usado aqui, o termo "glucoamilase (EC 3.2.1.3)" refere-se a uma enzima que catalisa a liberação de D-glicose das extremidades de não-redução do amido e oligo- e polissacarídeos relacionados.

25 O termo "precursor" ou "sequência precursora" refere-se a uma sequência que é nativa ou ocorre naturalmente em uma célula hospedeira.

O termo "TrGA" refere-se a uma sequência de glucoamilase precursora de *Trichoderma reesei* tendo a sequência da proteína madura ilustrada em SEQ ID NO: 2, a qual inclui o domínio catalítico tendo a sequência ilustrada em SEQ ID NO: 3. O isolamento, clonagem e expressão da TrGA são descritos no WO 2006/060062 e Pub. de Pat. U.S. No. 2006/0094080, publicada em 4 de Maio de 2006, os quais são incorporados aqui por refe-

rência. Em algumas modalidades, A sequência precursora refere-se a uma TrGA que é o ponto de partida para manipulação de proteína. A numeração dos aminoácidos de glucoamilase aqui é baseada na sequência da TrGA (SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 3).

5 A frase "forma madura de uma proteína ou polipeptídeo" refere-se à forma funcional final da proteína ou polipeptídeo. Para exemplificar, uma forma madura da TrGA inclui o domínio catalítico, região ligante e domínio de ligação a amido tendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 2.

10 O termo "homólogos de glucoamilase de *Trichoderma*" refere-se à glucoamilases precursoras tendo pelo menos 80% de identidade de sequência de aminoácido a uma sequência de TrGA (SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 ou SEQ ID NO: 3) e glucoamilases as quais retêm as características funcionais de uma glucoamilase.

15 Conforme usado aqui, uma "sequência homóloga" significa uma sequência de ácido nucleico ou polipeptídeo tendo pelo menos 100%, pelo menos 99%, pelo menos 98%, pelo menos 97%, pelo menos 96%, pelo menos 95%, pelo menos 94%, pelo menos 93%, pelo menos 92%, pelo menos 91%, pelo menos 90%, pelo menos 88%, pelo menos 85%, pelo menos
20 80%, pelo menos 75%, pelo menos 70%, pelo menos 65%, pelo menos 60%, pelo menos 55%, pelo menos 50%, ou pelo menos 45% de identidade de sequência a uma sequência de ácido nucleico ou sequência de polipeptídeo quando otimamente alinhada para comparação, em que a função da sequência de ácido nucleico ou sequência de polipeptídeo candidata é essencialmente a mesma que a sequência de ácido nucleico ou sequência de
25 polipeptídeo com a qual a referida sequência homóloga candidata está sendo comparada. Em algumas modalidades, sequências homólogas têm entre 85% e 100% de identidade de sequência enquanto que, em outras modalidades, há entre 90% e 100% de identidade de sequência e, em outras modalidades, há entre 95% e 100% de identidade de sequência. Em algumas
30 modalidades, a sequência homóloga candidata é comparada com a sequência de ácido nucleico de TrGA ou a sequência da proteína madura.

Conforme usado aqui, os termos "variante de glucoamilase", "variante" e "variante de TrGA" são usados em referência à glucoamilases que são similares a uma sequência de glucoamilase precursora (por exemplo, a TrGA ou homólogos de glucoamilase de *Trichoderma*), mas têm pelo menos uma substituição, deleção ou inserção em sua sequência de aminoácido que as torna diferentes, quanto à sequência, de uma glucoamilase precursora.

Conforme usado aqui, o termo "domínio catalítico" refere-se a uma região estrutural de um polipeptídeo a qual contém o sítio ativo para hidrólise de substrato.

O termo "ligante" refere-se a uma sequência de aminoácido curta tendo, em geral, entre 3 e 40 resíduos de aminoácido que se ligam covalentemente a uma sequência de aminoácido compreendendo um domínio de ligação a amido com uma sequência de aminoácido compreendendo um domínio catalítico.

O termo "domínio de ligação a amido" refere-se a uma sequência de aminoácido que se liga, de preferência, a um substrato de amido.

Conforme usado aqui, os termos "sequência mutante" e "gene mutante" são usados permutavelmente e se referem a uma sequência de polinucleotídeo que tem uma alteração em pelo menos um códon que ocorre em uma sequência precursora de uma célula hospedeira. O produto da expressão da sequência mutante é uma proteína variante com uma sequência de aminoácido alterada com relação à precursora. O produto da expressão pode ter uma capacidade funcional alterada (por exemplo, atividade enzimática alterada).

O termo "propriedade" ou equivalentes gramaticais do mesmo, no contexto de um polipeptídeo, conforme usado aqui, refere-se a qualquer característica ou atributo de um polipeptídeo que pode ser selecionado ou deletado. Essas propriedades incluem, mas não estão limitadas a, estabilidade oxidativa, especificidade por substrato, atividade catalítica, estabilidade térmica, perfil de atividade de pH, resistência à degradação proteolítica, K_M , K_{CAT} , proporção K_M/K_{CAT} , duplicação de proteína, capacidade de ligação a um substrato e capacidade de ser secretado.

O termo "propriedades" ou equivalentes gramaticais do mesmo, no contexto de um ácido nucleico, conforme usado aqui, refere-se a qualquer característica ou atributo de um ácido nucleico que pode ser selecionado ou deletado. Essas propriedades incluem, mas não estão limitadas a, uma propriedade que afeta a transcrição de gene (por exemplo, resistência do promotor ou reconhecimento de promotor), uma propriedade que afeta o processamento de RNA (por exemplo, *combinação* de RNA e estabilidade do RNA), uma propriedade que afeta a tradução (por exemplo, regulação, ligação de mRNA à proteínas ribossômicas).

Os termos "termicamente estável" e "termoestável" se referem à variantes de glucoamilase da presente invenção que retêm uma quantidade especificada de atividade enzimática após exposição à temperaturas identificadas durante um determinado período de tempo sob condições que prevalecem durante a hidrólise de substratos de amido, por exemplo, enquanto expostas à temperaturas alteradas.

O termo "estabilidade intensificada", no contexto de uma propriedade, tal como termoestabilidade, refere-se a uma maior atividade hidrolítica de amido retida durante o tempo quando comparado com outras glucoamilases, variantes e/ou glucoamilases do tipo silvestre.

O termo "estabilidade diminuída", no contexto de uma propriedade, tal como termoestabilidade, refere-se a uma menor atividade hidrolítica de amido retida durante o tempo quando comparado com outras glucoamilases, variantes e/ou glucoamilases do tipo silvestre.

Os termos "ativo" e "biologicamente ativo" se referem a uma atividade biológica associada a uma proteína em particular. Segue que a atividade biológica de uma determinada proteína refere-se a qualquer atividade biológica tipicamente atribuída a essa proteína por aqueles versados na técnica. Por exemplo, uma atividade enzimática associada a uma glucoamilase é hidrolítica e, assim, uma glucoamilase ativa tem atividade hidrolítica.

Os termos "polinucleotídeo" e "ácido nucleico", usados permutavelmente aqui, se referem a uma forma polimérica de nucleotídeos de qualquer comprimento, quer ribonucleotídeos ou deóxiribonucleotídeos. Esses

termos incluem, mas não estão limitados a, DNA fita simples, dupla ou tripla, DNA genômico, cDNA, RNA, híbrido de DNA-RNA ou um polímero compreendendo bases purina ou pirimidina ou outras bases de nucleotídeo naturais, química, bioquimicamente modificadas, não-naturais ou derivatizadas.

5 Conforme usado aqui, os termos "constructo de DNA", "DNA de transformação" e "vetor de expressão" são usados permutavelmente para se referir ao DNA usado para introduzir sequências em uma célula ou organismo hospedeiro. O DNA pode ser gerado *in vitro* através de PCR ou qualquer outro método adequado conhecido por aqueles versados na técnica. O constructo de DNA, DNA de transformação ou cassete de expressão recombinante
10 pode ser incorporado em um plasmídeo, cromossoma, DNA mitocondrial, DNA de plastídeo, vírus ou fragmento de ácido nucleico. Tipicamente, a porção do cassete de expressão recombinante de um vetor de DNA, constructo de DNA ou DNA de transformação inclui, dentre outras sequências, uma sequência de ácido nucleico a ser transcrita e um promotor. Em modalidades
15 preferidas, vetores de expressão têm a capacidade de incorporar e expressar fragmentos de DNA heterólogos na célula hospedeira.

 Conforme usado aqui, o termo "vetor" refere-se a um constructo de polinucleotídeo criado para introduzir ácidos nucleicos em um ou mais
20 tipos de célula. Vetores incluem vetores de clonagem, vetores de expressão, vetores de desvio, plasmídeos, cassetes e semelhantes.

 Conforme usado aqui, no contexto de introdução de uma sequência de ácido nucleico em uma célula, o termo "introduzida" refere-se a qualquer método adequado para transferência da sequência de ácido nucleico para a célula. Tais métodos para introdução incluem, mas não estão limitados a, fusão de protoplasta, transfecção, transformação, conjugação e
25 transdução.

 Conforme usado aqui, os termos "transformada" e "estavelmente transformada" se referem a uma célula que tem uma sequência de polinucleotídeo não-nativa (heteróloga) integrada em seu genoma ou como um
30 plasmídeo epissomal que é mantido durante pelo menos duas gerações.

 Conforme usado aqui, os termos "marcador selecionável" e

"marcador seletivo" se referem a um ácido nucleico (por exemplo, um gene) capaz de expressão em células hospedeiras, o qual permite facilidade de classificação daqueles hospedeiros contendo o vetor. Tipicamente, marcadores selecionáveis são genes que conferem resistência antimicrobiana ou uma vantagem metabólica à célula hospedeira para permitir que células con-
5 tendo o DNA exógeno sejam distinguidas de células que não receberam qualquer sequência exógena durante a transformação.

Conforme usado aqui, o termo "promotor" refere-se a uma sequência de ácido nucleico que funciona para dirigir a transcrição de um gene
10 a jusante. O promotor, junto com outras sequências de ácido nucleico regulatórias de transcrição e tradução (também denominadas "sequências de controle") é necessário para expressar um determinado gene. Em geral, as sequências regulatórias de transcrição e tradução incluem, mas não estão limitadas a, sequências promotoras, sítios de ligação ribossômica, sequên-
15 cias de início e término de transcrição, sequências de início e término de tradução e sequências intensificadoras ou ativadoras.

Um ácido nucleico é "operavelmente ligado" quando ele é colocado em uma relação funcional com outra sequência de ácido nucleico. Por exemplo, DNA que codifica um líder secretório (isto é, um peptídeo sinaliza-
20 dor) é operavelmente ligado ao DNA para um polipeptídeo se ele é expresso como uma pré-proteína que participa na secreção do polipeptídeo. Geralmente, "operavelmente ligado" significa que as sequências de DNA que estão sendo ligadas são contínuas e, no caso de um líder secretório, contínuas e em fase de leitura.

Conforme usado aqui, o termo "gene" refere-se a um polinucleotídeo (por exemplo, um segmento de DNA) que codifica um polipeptídeo e inclui regiões que precedem e seguem as regiões de codificação, bem como sequências intervenientes (íntrons) entre segmentos de codificação individu-
25 ais (éxons).

Conforme usado aqui, "genes homólogos" refere-se a um par de genes de espécies diferentes, mas usualmente relacionadas, os quais cor-
30 respondem um ao outro e os quais são idênticos ou muito similares um ao

outro. O termo abrange genes que foram separados através de especialização (isto é, o desenvolvimento de novas espécies) (por exemplo, genes ortólogos), bem como genes que foram separados através de duplicação genética (por exemplo, genes parálogos).

5 Conforme usado aqui, "ortólogo" e "genes ortólogos" se referem a genes em diferentes espécies que evoluíram a partir de um gene ancestral em comum (isto é, um gene homólogo) através de especialização. Tipicamente, ortólogos retêm a mesma função durante o curso de evolução. A identificação de ortólogos encontra uso na previsão confiável de função de
10 gene em genomas recentemente sequenciados.

 Conforme usado aqui, "parálogo" e "genes parálogos" se referem a genes que são relacionados através de duplicação dentro de um genoma. Enquanto ortólogos retêm a mesma função através do curso de evolução, parálogos desenvolvem novas funções, mesmo embora algumas funções sejam frequentemente relacionadas àquela original. Exemplos de genes parálogos incluem, mas não estão limitados a, genes que codificam tripsina, quimiotripsina, elastase e trombina, os quais são todas proteinases de serina e ocorrem juntos dentro da mesma espécie.

 Conforme usado aqui, "homologia" refere-se à similaridade ou
20 identidade de sequência, com identidade sendo preferida. Essa homologia é determinada usando métodos padrões conhecidos na técnica (vide, por exemplo, Smith e Waterman, Adv. Appl. Math., 2: 482 [1981]; Needleman e Wunsch, J. Mol. Biol., 48: 443 [1970]; Pearson e Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444 [1988]; programas tais como INTERVALO, BESTFIT,
25 FASTA e TFASTA no Pacote de Software Wisconsin Genetics (Genetics Computer Group, Madison, WI); e Devereux e outros, Nucl. Acid Res., 12: 387-395 [1984]).

 A "identidade de sequência de ácido nucleico percentual (%)" ou "identidade de sequência de aminoácido percentual (%)" é definida como o
30 percentual de resíduos de nucleotídeo ou resíduos de aminoácido em uma sequência candidata que são idênticos aos resíduos de nucleotídeo ou resíduos de aminoácido da sequência inicial (isto é, TrGA).

Sequências homólogas são determinadas através de métodos conhecidos de alinhamento de sequência. Um método de alinhamento comumente usado é o BLAST, descrito por Altschul e outros, (Altschul e outros, J. Mol. Biol., 215: 403-410, [1990]; e Karlin e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5787 [1993]) Um programa BLAST particularmente útil é o programa WU-BLAST-2 (vide Altschul e outros, Meth. Enzymol., 266: 460-480 [1996]). O WU-BLAST-2 usa vários parâmetros de busca, a maioria dos quais são ajustados para os valores de padrão. Os parâmetros ajustáveis são ajustados com os seguintes valores: amplitude de sobreposição = 1, fração de sobreposição = 0,125, limiar de palavra (T) = 11. Os parâmetros HSP e HSP S2 são valores dinâmicos e são estabelecidos pelo programa em si, dependendo da composição da sequência em particular e da composição do banco de dados em particular contra o qual a sequência de interesse está sendo comparada. Contudo, os valores podem ser ajustados para aumentar a sensibilidade. Um valor % de identidade de sequência de aminoácido é determinado pelo número de resíduos idênticos equivalentes dividido pelo número total de resíduos da sequência "mais longa" na região alinhada. A sequência "mais longa" é uma tendo os resíduos mais reais na região alinhada (intervalos introduzidos pelo WU-Blast-2 para maximizar o escore de alinhamento são ignoradas).

Outros métodos encontram uso no alinhamento de sequências. Um exemplo de um algoritmo útil é o PILEUP. O PILEUP cria um alinhamento múltiplo de sequência a partir de um grupo de sequências relacionadas usando alinhamento aos pares progressivo. Ele também pode plotar uma árvore mostrando as relações de agrupamento usadas para criar o alinhamento. O PILEUP usa uma simplificação do método de alinhamento progressivo de Feng e Doolittle (Feng e Doolittle, J. Mol. Evol., 35: 351-360 [1987]). O método é similar àquele descrito por Higgins e Sharp (Higgins e Sharp, CABIOS 5: 151-153 [1989]). Parâmetros úteis no PILEUP incluem um peso por intervalo de padrão de 3,00, um peso por comprimento de intervalo de padrão de 0,10 e intervalos de extremidades ponderadas.

O termo "alinhamento ótimo" refere-se ao alinhamento que pro-

porciona o maior escore de identidade percentual.

Conforme usado aqui, o termo "hibridização" refere-se ao processo pelo qual uma fita de ácido nucleico se une a uma fita complementar através de emparelhamento de base, conforme conhecido na técnica.

5 Uma sequência de ácido nucleico é considerada como sendo "seletivamente hibridizável" a uma sequência de ácido nucleico de referência se as duas sequências se hibridizam especificamente uma à outra sob condições de hibridização e lavagem de estringência moderada a alta. Condições de hibridização são baseadas na temperatura de fusão (T_m) do complexo ou sonda de ligação a ácido nucleico. Por exemplo, "estringência máxima" ocorre, tipicamente, em torno da $T_m - 5^\circ\text{C}$ (5°C abaixo da T_m da sonda); "alta estringência" em torno de $5-10^\circ\text{C}$ abaixo da T_m ; "estringência intermediária" em torno de $10-20^\circ\text{C}$ abaixo da T_m da sonda; e "baixa estringência" em torno de $20-25^\circ\text{C}$ abaixo da T_m . Funcionalmente, condições de
10 estringência máxima podem ser usadas para identificar sequências tendo identidade próxima ou quase próxima à sonda de hibridização; enquanto que uma hibridização em estringência baixa ou intermediária pode ser usada para identificar ou detectar homólogos de sequência de polinucleotídeo.

Condições de hibridização em estringência moderada e alta são bem-conhecidas na técnica. Um exemplo de condições de alta estringência
20 inclui hibridização em torno de 42°C em formamida a 50%, 5X SSC, 5X solução de Denhardt, SDS a 0,5% e 100 ng/ml de DNA veículo desnaturado, seguido por lavagem duas vezes em 2X SSC e SDS a 0,5% em temperatura ambiente e mais duas vezes em 0,1X SSC e SDS a 0,5% a 42°C . Um exemplo de condições de estringência moderada incluem uma incubação du-
25 rante a noite a 37°C em uma solução compreendendo formamida a 20%, 5X SSC (NaCl a 150 mM, citrato trissódico a 15 mM), fosfato de sódio a 50 mM (pH de 7,6), 5X solução de Denhardt, sulfato de dextrana a 10% e 20 mg/ml de DNA de esperma de salmão cisalhado desnaturado, seguido por lavagem
30 dos filtros em 1X SSC em torno de $37-50^\circ\text{C}$. Aqueles versados na técnica saberão como ajustar a temperatura, resistência iônica, etc. conforme necessário para acomodar fatores tais como comprimento da sonda e seme-

lhantes.

Conforme usado aqui, "recombinante" inclui referência a uma célula ou vetor que tenha sido modificado através da introdução de uma sequência de ácido nucleico heteróloga ou homóloga ou onde a célula é derivada de uma célula assim modificada. Assim, por exemplo, células recombinantes expressam genes que não são encontrados na forma idêntica dentro da forma nativa (não-recombinante) da célula ou expressam genes nativos que são, de outro modo, anormalmente expressos, subexpressos ou não expressos em geral como um resultado de intervenção humana deliberada.

Em uma modalidade da invenção, sequências de DNA com mutação são geradas com mutagênese por saturação de sítio em pelo menos um códon. Em outra modalidade preferida, mutagênese por saturação de sítio é realizada para dois ou mais códons. Em uma outra modalidade, sequências de DNA mutantes têm mais de 50%, mais de 55%, mais de 60%, mais de 65%, mais de 70%, mais de 75%, mais de 80%, mais de 85%, mais de 90%, mais de 95%, ou mais de 98% de homologia com a sequência precursora. Em modalidades alternativas, o DNA mutante é gerado *in vivo* usando qualquer procedimento mutagênico conhecido tal como, por exemplo, radiação, nitrosoguanidina e semelhantes. A sequência de DNA desejada é, então, isolada e usada nos métodos fornecidos aqui.

Conforme usado aqui, "proteína heteróloga" refere-se a uma proteína ou polipeptídeo que não ocorre naturalmente na célula hospedeira.

Conforme usado aqui, "proteína homóloga" refere-se a uma proteína ou polipeptídeo nativo ou que ocorre naturalmente em uma célula e inclui proteínas nativas que são super-expressas na célula, quer através da tecnologia de DNA recombinante ou naturalmente.

Uma enzima é "superexpressa" em uma célula hospedeira se a enzima é expressa na célula em um nível maior do que o nível no qual ela é expressa em uma célula do tipo silvestre correspondente.

Os termos "proteína" e "polipeptídeo" são usados permutavelmente aqui. Na presente descrição e nas reivindicações, os códigos com uma letra e três letras convencionais para resíduos de aminoácido são usa-

dos. O código com 3 letras para aminoácidos é conforme definido em conformidade com a IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Também deve ser entendido que um polipeptídeo pode ser codificado por mais de uma sequência de nucleotídeo em virtude da degeneração do código genético.

Variantes da invenção são descritas pela seguinte nomenclatura: [resíduo de aminoácido original/posição/resíduo de aminoácido substituído]. Por exemplo, a substituição de leucina por arginina na posição 76 é representada como R76L. Quando mais de um aminoácido é substituído em uma determinada posição, a substituição é representada como 1) Q172C, Q172D ou Q172R; 2) Q172C, D ou R ou 3) Q172C/D/R. Quando uma posição adequada para substituição é identificada aqui sem um aminoácido específico sugerido, deve ser entendido que qualquer resíduo de aminoácido pode ser substituído pelo resíduo de aminoácido presente na posição. Onde uma glucoamilase variante contém uma deleção em comparação com outras glucoamilases, a deleção é indicada com "*". Por exemplo, uma deleção na posição R76 é representada como R76*. Uma deleção de dois ou mais aminoácidos consecutivos é indicada, por exemplo, como (76-78)*.

Uma "pró-sequência" é uma sequência de aminoácido entre a sequência sinalizadora e a proteína madura que é necessária para a secreção da proteína. Clivagem da pró-sequência resultará em uma proteína ativa madura.

O termo "sequência sinalizadora" ou "peptídeo sinalizador" refere-se a qualquer sequência de nucleotídeos e/ou aminoácidos a qual pode participar na secreção das formas maduras ou precursoras da proteína. Essa definição de sequência sinalizadora é aquela funcional, que se destina a incluir todas aquelas sequências de aminoácido codificadas pela porção N-terminal do gene da proteína, as quais participam na realização da secreção da proteína. Elas são, frequentemente, mas não universalmente, ligadas à porção N-terminal de uma proteína ou à porção N-terminal de uma proteína precursora. A sequência sinalizadora pode ser endógena ou exógena. A sequência sinalizadora pode ser aquela normalmente associada à proteína

(por exemplo, glucoamilase) ou pode ser de um gene que codifica outra proteína secretada.

O termo forma "precursora" de uma proteína ou peptídeo refere-se a uma forma madura da proteína tendo uma pró-sequência operavelmente ligada ao amino ou carboxi término da proteína. O precursor pode também ter uma sequência "sinalizadora" operavelmente ligada ao amino término da pró-sequência. O precursor pode também ter polinucleotídeos adicionais que estão envolvidos em atividade pós-traducional (por exemplo, polinucleotídeos clivados dos mesmos levam à forma madura de uma proteína ou peptídeo).

"Cepa hospedeira" ou "célula hospedeira" refere-se a um hospedeiro adequado para um vetor de expressão compreendendo DNA de acordo com a presente invenção.

Os termos "derivado de" e "obtido de" se referem não apenas a uma glucoamilase produzida ou produzível por uma cepa do organismo em questão, mas também a uma glucoamilase codificada por uma sequência de DNA isolada de tal cepa e produzida em um organismo hospedeiro contendo tal sequência de DNA. Adicionalmente, os termos se referem a uma glucoamilase a qual é codificada por uma sequência de DNA de origem sintética e/ou cDNA e a qual tem as características de identificação da glucoamilase em questão.

Um "derivado", dentro do escopo dessa definição, geralmente retém a atividade de hidrólise característica observada na forma do tipo silvestre, nativa ou precursora até o ponto em que o derivado é útil para fins similares conforme a forma do tipo silvestre, nativa ou precursora. Derivados funcionais de glucoamilase abrangem peptídeos ou fragmentos de peptídeo que ocorrem naturalmente, sintética ou recombinantemente produzidos os quais têm as características gerais das glucoamilases da presente invenção.

O termo "isolado" ou "purificado" refere-se a um material que é removido de seu ambiente original (por exemplo, o ambiente natural se ele ocorre naturalmente).

Conforme usado aqui, o termo "mutagênese combinatorial" refe-

re-se a métodos nos quais bibliotecas de variantes de uma sequência inicial são geradas. Nessas bibliotecas, as variantes contêm uma ou várias mutações escolhidas de um conjunto pré-definido de mutações. Além disso, os métodos proporcionam meios para introduzir mutações aleatórias as quais não são membros do conjunto pré-definido de mutações. Em algumas modalidades, os métodos incluem aqueles apresentados na USP 6.582.914, aqui incorporada por referência. Em modalidades alternativas, métodos de mutagênese combinatorial abrangem kits comercialmente disponíveis (por exemplo, QuikChange® Multisite, Stratagene, San Diego, CA).

10 Conforme usado aqui, o termo "biblioteca de mutantes" refere-se a uma população de células as quais são idênticas na maior parte de seu genoma, mas incluem diferentes homólogos de um ou mais genes. Tais bibliotecas podem ser usadas, por exemplo, para identificar genes ou óperons com traços aperfeiçoados.

15 Conforme usado aqui, o termo "teor de sólidos secos (DS ou ds)" refere-se aos sólidos totais em uma pasta em % em uma base em peso seco.

Conforme usado aqui, o termo "hit inicial" refere-se a uma variante que foi identificada através de classificação de uma biblioteca de mutagênese de consenso combinatorial. Em modalidades preferidas, os hits iniciais têm características de desempenho aperfeiçoadas quando comparado com o gene inicial.

20 Conforme usado aqui, o termo "hit aperfeiçoado" refere-se a uma variante que foi identificada através de classificação de uma biblioteca de mutagênese de consenso combinatorial intensificada.

25 Conforme usado aqui, o termo "propriedade-alvo" refere-se à propriedade do gene inicial que tem de ser alterado. Não se pretende que a presente invenção esteja limitada a qualquer propriedade-alvo em particular. Contudo, em algumas modalidades preferidas, a propriedade-alvo é a estabilidade de um produto gênico (por exemplo, resistência à desnaturação, proteólise ou outros fatores degradativos) enquanto que, em outras modalidades, o nível de produção em um hospedeiro de produção é alterado. Na

verdade, considera-se que qualquer propriedade de um gene inicial encontrará uso na presente invenção.

Outras definições de termos podem aparecer por toda a especificação.

5 Antes que modalidades exemplificativas sejam descritas em maiores detalhes, deve ser entendido que a presente invenção não está limitada às modalidades descritas embalagem, uma vez que as mesmas podem, naturalmente, variar. Também deve ser entendido que a terminologia usada aqui é para fins de descrição de modalidades particulares apenas e
10 não se destina a ser limitativa, uma vez que o escopo da presente invenção estará limitado apenas pelas reivindicações em anexo.

Onde uma faixa de valores é fornecida, deve ser entendido que cada valor interveniente, até o décimo da unidade do limite mínimo, a menos que o contexto indique claramente de outro modo, entre os limites máximo e
15 mínimo dessa faixa, também é especificamente descrito. Cada faixa menor entre cada valor estabelecido ou valor interveniente em uma faixa estabelecida e qualquer outro valor estabelecido ou interveniente nessa faixa estabelecida é abrangido dentro da invenção. Os limites máximo e mínimo dessas faixas menores podem ser independentemente incluídos ou excluídos da
20 faixa e cada faixa onde ambos, nenhum ou qualquer um dos limites são incluídos nas faixas menores é também abrangida dentro da invenção, sujeito a qualquer limite especificamente excluído na faixa estabelecida. Onde a faixa estabelecida inclui um ou ambos os limites, faixas excluindo um ou ambos esses limites incluídos também são incluídas na invenção.

25 Embora quaisquer métodos e materiais similares ou equivalentes àqueles descritos aqui possam ser usados na prática ou testagem da presente invenção, métodos e materiais exemplificativos e preferidos são agora descritos. Todas as publicações mencionadas aqui são incorporadas aqui por referência para divulgar e descrever os métodos e/ou materiais com
30 relação aos quais as publicações são citadas.

Deve ser notado que, conforme usado aqui e nas reivindicações em anexo, as formas no singular "um", "uma", "o" e "a" incluem as referên-

cias no plural, a menos que o contexto indique claramente de outro modo. Assim, por exemplo, referência a "um gene" inclui uma pluralidade de tais agentes candidatos e referência a "uma célula" inclui referência a uma ou mais células e equivalentes das mesmas conhecidos por aqueles versados na técnica e assim por diante.

As publicações discutidas aqui são fornecidas unicamente por sua descrição antes da data de depósito do presente pedido. Nada aqui deve ser construído como uma admissão de que a presente invenção não se destina a antecipar tal publicação em virtude de invenção anterior.

10 **Modalidades Preferidas**

Um objetivo da presente invenção foi alterar propriedades, tal como melhorar a estabilidade térmica e/ou atividade específica, de glucoamilases precursoras e, em particular, glucoamilase de *Trichoderma reesei* (TrGA), em que uma variante de glucoamilase tendo propriedades alteradas, tal como aperfeiçoada, seria útil, por exemplo, em processos de conversão de amido ou fermentação de álcool.

Glucoamilases precursoras:

Em algumas modalidades, a presente invenção proporciona uma variante de glucoamilase. A variante de glucoamilase é uma variante de uma glucoamilase precursora, a referida glucoamilase precursora compreendendo uma sequência de aminoácido conforme ilustrado em SEQ ID NO: 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8 ou 9 ou a referida glucoamilase precursora compreendendo um domínio catalítico tendo uma sequência de aminoácido mostrando pelo menos 80% de identidade de sequência com uma ou mais das sequências de aminoácido ilustradas em SEQ ID NO: 1, 2, 3, 5, 6, 7, ou 8 e/ou codificada por uma sequência de DNA a qual se hibridiza, sob condições média, alta ou estridentes, com um DNA que codifica uma glucoamilase tendo uma das sequências de aminoácido de SEQ ID NO: 1, 2 ou 3.

A estrutura prevista e sequências conhecidas de glucoamilases são conservadas dentre as espécies fúngicas (Coutinho e outros, 1994 Protein Eng., 7: 393 - 400 e Coutinho e outros, 1994, Protein Eng., 7: 749-760). Em algumas modalidades, a glucoamilase precursora é uma glucoamilase

fúngica filamentosa. Em algumas modalidades, a glucoamilase precursora é obtida de uma cepa de *Trichoderma* (por exemplo, *T. reesei*, *T. longibrachiatum*, *T. strictipilis*, *T. asperellum*, *T. konilangbra* e *T. hazianum*), uma cepa de *Aspergillus* (por exemplo, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. kawachi*, *A. awamorii* e *A. oryzae*), uma cepa de *Talaromyces* (por exemplo, *T. emersonii*, *T. thermophilus* e *T. duponti*), uma cepa de *Hypocrea* (por exemplo, *H. gelatinosa*, *H. orientalis*, *H. vinosa* e *H. citrina*), uma cepa de *Fusarium* (por exemplo, *F. oxysporum*, *F. roseum* e *F. venenatum*), uma cepa de *Neurospora* (por exemplo, *N. crassa*) e uma cepa de *Humicola* (por exemplo, *H. grisea*, *H. insolens* e *H. lanuginosa*), uma cepa de *Penicillium* (por exemplo, *P. notatum* ou *P. chrysogenum*) ou uma cepa de *Saccharomycopsis* (por exemplo, *S. fibuligera*).

Em algumas modalidades, a glucoamilase precursora pode ser uma glucoamilase bacteriana. Por exemplo, o polipeptídeo pode ser obtido de uma cepa bacteriana gram positiva, tal como *Bacillus* (por exemplo, *B. alkalophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. lentus*, *B. licheniformis*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis* e *B. thuringiensis*) ou uma cepa de *Streptomyces* (por exemplo, *S. lividans*).

Em algumas modalidades, a glucoamilase precursora terá pelo menos 80% de identidade de sequência, pelo menos 85% de identidade de sequência, pelo menos 88% de identidade de sequência, pelo menos 90% de identidade de sequência, pelo menos 93% de identidade de sequência, pelo menos 95% de identidade de sequência, pelo menos 96% de identidade de sequência, pelo menos 97% de identidade de sequência, pelo menos 98% de identidade de sequência e também pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de TrGA de SEQ ID NO: 2.

Em outras modalidades, a glucoamilase precursora terá pelo menos 80% de identidade de sequência, pelo menos 85% de identidade de sequência, pelo menos 90% de identidade de sequência, pelo menos 95% de identidade de sequência, pelo menos 97% de identidade de sequência e também pelo menos 98% de identidade de sequência com o domínio catalítico da sequência de aminoácido de TrGA de SEQ ID NO: 3.

Em ainda outras modalidades, a glucoamilase precursora compreenderá uma sequência de aminoácido tendo pelo menos 90% de identidade de sequência, pelo menos 93% de identidade de sequência, pelo menos 95% de identidade de sequência, pelo menos 96% de identidade de sequência, pelo menos 97% de identidade de sequência, pelo menos 98% de identidade de sequência e também pelo menos 99% de identidade de sequência com o domínio catalítico da glucoamilase precursora de *Aspergillus* de SEQ ID NO: 5 ou SEQ ID NO: 6.

Em outras modalidades, a glucoamilase precursora compreenderá uma sequência de aminoácido tendo pelo menos 90% de identidade de sequência, pelo menos 95% de identidade de sequência, pelo menos 97% de identidade de sequência e também pelo menos 99% de identidade de sequência com o domínio catalítico da glucoamilase precursora de *Humicola grisea* (HgGA) de SEQ ID NO: 8.

Em outras modalidades, um homólogo de glucoamilase de *Trichoderma* será obtido de uma cepa de *Trichoderma* ou *Hypocrea*. Alguns homólogos de glucoamilase de *Trichoderma* são descritos na Pub. de Pat. U.S. No. 2006/0094080 e referência é feita especificamente às sequências de aminoácido apresentadas em SEQ ID NOs: 17-22 e 43-47 desta referência.

Em algumas modalidades, a glucoamilase precursora é TrGA compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 2 ou um homólogo de glucoamilase de *Trichoderma* tendo pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 88%, pelo menos 90%, pelo menos 93%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% de identidade de sequência à sequência da TrGA.

Homologia Estrutural de Glucoamilase:

O dogma central de biologia molecular é que a sequência de DNA que codifica um gene para uma enzima em particular determina a sequência de aminoácido da proteína, essa sequência, por sua vez, determina a duplicação tridimensional da enzima. Essa duplicação leva a resíduos muito diferentes que criam um centro catalítico e superfície de ligação a substra-

to e isso resulta na alta especificidade e atividade das enzimas em questão.

Glucoamilases consistem de tanto quanto em três domínios estruturais distintos, um domínio catalítico de aproximadamente 450 resíduos, o qual é estruturalmente conservado em todas as glucoamilases, geralmente
5 seguido por uma região ligante consistindo em entre 30 e 80 resíduos os quais são conectados a um domínio de ligação a amido de aproximadamente 100 resíduos. A estrutura da glucoamilase de *Trichoderma reesei* com todas as três regiões intactas foi determinada em uma resolução de 1,8 Angstrom aqui (vide tabela 15 e Exemplo 11). Usando as coordenadas (vide
10 tabela 15), a estrutura foi alinhada com as coordenadas do domínio catalítico da cepa X100 de *Aspergillus awamori* que foi determinada previamente (Aleshin, A.E., Hoffman, C., Firsov, L.M. e Honzatko, R.B. 1994 Refined crystal structures of glucoamylase from *Aspergillus awamori* var. X100. *J Mol Biol* 238: 575-591). A estrutura de cristal de *Aspergillus awamori* incluía apenas
15 o domínio catalítico. Conforme observado nas Figuras 12 e 13, a estrutura dos domínios catalíticos se sobrepõe muito intimamente e é possível identificar resíduos equivalentes baseado nessa superposição estrutural. Os inventores acreditam que todas as glucoamilases compartilham a estrutura básica representada nas figuras 12 e 13.

20 A figura 12 é uma comparação das estruturas das estruturas tridimensionais da glucoamilase de *Trichoderma* (preto) de SEQ ID NO: 1 (vide figura 1 para sequência de aminoácido) e de *Aspergillus awamori* (cinza) vistas de lado. Nessa vista, a relação entre o domínio catalítico e a região ligante e o domínio de ligação a amido podem ser observados.

25 A figura 13 é uma comparação das estruturas tridimensionais da glucoamilase de *Trichoderma* (preto) e de *Aspergillus awamori* (cinza) vistas de cima. As glucoamilases mostradas aqui e, na verdade, todas as glucoamilases conhecidas até o momento, compartilham essa homologia estrutural. A conservação de estrutura se correlaciona com a conservação de atividade
30 e um mecanismo conservado de ação para todas as glucoamilases. Dada sua alta homologia, alterações resultantes de variantes sítio-específicas da glucoamilase de *Trichoderma* que resultam em função alterada também têm

consequências estruturais e, portanto, funcionais similares em outras glucoamilases. Portanto, os ensinamentos de quais variantes resultam em benefícios desejáveis podem ser aplicados a outras glucoamilases.

Assim, os números de posição de aminoácido discutidos aqui se referem àqueles atribuídos à sequência de glucoamilase de *Trichoderma reesei* madura apresentada na figura 1. A presente invenção, contudo, não está limitada às variantes de glucoamilase de *Trichoderma*, mas se estende à glucoamilases contendo resíduos de aminoácido nas posições as quais são "equivalentes" aos resíduos identificados em particular em glucoamilase de *Trichoderma reesei* (SEQ ID NO: 2). Em uma modalidade preferida da presente invenção, a glucoamilase precursora é GA de *Taleromyces* e as substituições são feitas nas posições de resíduo de aminoácido equivalentes em glucoamilase de *Taleromyces* conforme aquelas divulgadas aqui. Em outras modalidades, a glucoamilase precursora é uma daquelas listadas na tabela 1. Em outras modalidades, a glucoamilase precursora é uma glucoamilase de *Penicillium*, tal como *Penicillium chrysogenum*.

A identidade estrutural determina se os resíduos de aminoácido são equivalentes. A identidade estrutural é um equivalente topológico um-a-um quando as duas estruturas (estruturas tridimensionais e de aminoácido) são alinhadas. Uma posição de resíduo (aminoácido) de uma glucoamilase é equivalente a um resíduo de glucoamilase de *T. reesei* se ela é homóloga (isto é, correspondendo, quanto à posição, à estrutura primária ou terciária) ou análoga a um resíduo ou porção específica desse resíduo na glucoamilase de *T. reesei* (tendo a mesma ou uma capacidade funcional similar para combinar, reagir ou interagir quimicamente).

De forma a estabelecer a identidade à estrutura primária, a sequência de aminoácido de uma glucoamilase pode ser diretamente comparada com a sequência primária da glucoamilase de *Trichoderma reesei* e, particularmente, com um conjunto de resíduos conhecidos por serem invariáveis em glucoamilases para as quais a sequência é conhecida. Por exemplo, as Figuras 4A e B aqui mostram os resíduos conservados entre glucoamilases. Após alinhamento dos resíduos conservados, que permitem inser-

ções e deleções necessárias de forma a manter o alinhamento (isto é, evitando a eliminação de resíduos conservados através de deleção e inserção arbitrária), os resíduos equivalentes a aminoácidos em particular na sequência primária de glucoamilase de *Trichoderma reesei* são definidos. O alinhamento de resíduos conservados conservará, de preferência, 100% de tais resíduos. Contudo, o alinhamento de mais de 75% ou tão pouco quanto 50% dos resíduos conservados é também adequado para definir resíduos equivalentes.

Por exemplo, na figura 4, glucoamilases de seis organismos são alinhadas para proporcionar a quantidade máxima de homologia entre sequências de aminoácido. Uma comparação dessas sequências mostra que há uma série de resíduos conservados contidos em cada sequência, conforme designado por um asterisco. Esses resíduos conservados, assim, podem ser usados para definir os resíduos de aminoácido equivalentes correspondentes de glucoamilase de *Trichoderma reesei* em outras glucoamilases, tal como glucoamilase de *Aspergillus niger*.

A identidade estrutural envolve a identificação de resíduos equivalentes entre as duas estruturas. "Resíduos equivalentes" podem ser definidos determinando a homologia ao nível da estrutura terciária (identidade estrutural) para uma enzima cuja estrutura terciária tenha sido determinada através de cristalografia de raios x. Resíduos equivalentes são definidos conforme aqueles para os quais as coordenadas atômicas de dois ou mais dos átomos da cadeia principal de um resíduo de aminoácido em particular da glucoamilase de *Trichoderma reesei* (N sobre N, CA sobre CA, C sobre C e O sobre O) estão dentro de 0,13 nm e, de preferência, 0,1 nm após o alinhamento. O alinhamento é obtido após o melhor modelo ter sido orientado e posicionado para proporcionar o menor fator R para dados de difração experimental na maior resolução disponível.

$$\text{Fator } R = \frac{\sum_h |F_o(h)| \cdot |F_c(h)|}{\sum_h |F_o(h)|}$$

Resíduos equivalentes os quais são funcionalmente análogos a um resíduo específico de glucoamilase de *Trichoderma reesei* são definidos

como aqueles aminoácidos da enzima os quais podem adotar uma conformação de modo que eles alteram, modificam ou contribuem para a estrutura da proteína, ligação a substrato ou catálise de uma maneira definida e atribuída a um resíduo específico da glucoamilase de *Trichoderma reesei*. Ainda, eles são aqueles resíduos da enzima (para os quais uma estrutura terciária foi obtida através de cristalografia por raios x) os quais ocupam uma posição análoga até o ponto em que, embora os átomos da cadeia principal do determinado resíduo possam não satisfazer os critérios de equivalência com base em ocupação de uma posição homóloga, as coordenadas atômicas de pelo menos dois dos átomos na cadeia lateral do resíduo repousam entre 0,13 nm dos átomos da cadeia lateral correspondente de glucoamilase de *Trichoderma reesei*. As coordenadas da estrutura tridimensional de glucoamilase de *Trichoderma reesei* são apresentadas na tabela 15 e podem ser usadas conforme esboçado acima para determinar resíduos equivalentes ao nível da estrutura terciária.

Alguns dos resíduos identificados para substituição são resíduos conservados, enquanto que outros não são. No caso de resíduos os quais não são conservados, a substituição de um ou mais aminoácidos está limitada à substituições as quais produzem uma variante que tem uma sequência de aminoácido que não corresponde a uma encontrada na natureza. No caso de resíduos conservados, tais substituições não resultarão em uma sequência que ocorre naturalmente.

Variantes

As variantes de acordo com a invenção incluem pelo menos uma substituição, deleção ou inserção na sequência de aminoácido de uma glucoamilase precursora que torna a variante diferente, quanto à sequência, de uma glucoamilase precursora. Em algumas modalidades, as variantes da invenção têm pelo menos 20%, pelo menos 40%, pelo menos 60%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% e também pelo menos 100% da atividade de glucoamilase da atividade de TrGA de SEQ ID NO: 2.

Em algumas modalidades, as variantes de acordo com a inven-

ção compreenderão uma substituição, deleção ou inserção em pelo menos uma posição de aminoácido da TrGA precursora (SEQ ID NO: 2) ou em uma posição equivalente na sequência de outra glucoamilase precursora tendo pelo menos 93% de identidade de sequência, pelo menos 95%, pelo menos 97% e pelo menos 99%.

Em outras modalidades, a variante de acordo com a invenção compreenderá uma substituição, deleção ou inserção em pelo menos uma posição de aminoácido de um fragmento da TrGA precursora, em que o fragmento compreende o domínio catalítico da sequência da TrGA (SEQ ID NO: 3) ou em uma posição equivalente em um fragmento compreendendo o domínio catalítico de uma glucoamilase precursora tendo pelo menos 80% de identidade de sequência ao fragmento da sequência da TrGA, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97% e pelo menos 99%. Em algumas modalidades, o fragmento compreenderá pelo menos 400, 425, 450, e/ou 500 resíduos de aminoácido. Em algumas modalidades, quando a glucoamilase precursora inclui não apenas um domínio catalítico, região ligante e domínio de ligação a amido, o fragmento pode incluir parte da região ligante. Em uma modalidade particularmente preferida, a variante compreenderá uma substituição, deleção ou inserção na sequência de aminoácido de um fragmento da sequência da TrGA (SEQ ED NO: 2 ou SEQ ID NO: 3).

Identidade estrutural, com referência a uma substituição de aminoácido, significa que a substituição ocorre na posição de aminoácido equivalente na glucoamilase homóloga ou glucoamilase precursora. O termo posição equivalente significa uma posição que é comum a duas sequências precursoras a qual é baseada em um alinhamento da sequência de aminoácido de uma glucoamilase precursora em questão, bem como alinhamento da estrutura tridimensional da glucoamilase precursora em questão com a sequência de aminoácido da glucoamilase de TrGA de referência e a sequência tridimensional. Por exemplo, com referência à figura 4, a posição 24 na TrGA (SEQ ID NO: 3) é D24 e a posição equivalente para *Aspergillus niger* (SEQ ID NO: 6) é a posição D25 e a posição equivalente para *Aspergillus oryzae* (SEQ ID NO: 7) é a posição D26. Vide Figuras 13 e 13 para um

alinhamento exemplificativo da sequência tridimensional.

Em algumas modalidades, a variante de glucoamilase incluirá pelo menos uma substituição na sequência de aminoácido de um precursor. Em outras modalidades, a variante pode ter mais de uma substituição (por exemplo, duas, três ou quatro substituições).

Em algumas modalidades, uma variante de glucoamilase compreende uma substituição, deleção ou inserção e, de preferência, uma substituição em pelo menos uma posição de aminoácido em uma posição correspondendo às regiões de aminoácidos não-conservados, conforme ilustrado na figura 4 (por exemplo, posições de aminoácido correspondendo àquelas posições as quais não são designadas por "*" na figura 4).

Embora as variantes possam estar em qualquer posição na sequência da proteína madura (SEQ ID NOs: 2 ou 3), em uma modalidade, uma variante de glucoamilase compreende uma ou mais substituições nas seguintes posições na sequência de aminoácido apresentada em SEQ ID NO: 2 ou 3: 4, 5, 12, 24, 29, 43, 44, 45, 46, 47, 49, 51, 70, 75, 76, 94, 100, 108, 114, 116, 119, 122, 124, 125, 137, 143, 146, 148, 169, 171, 172, 175, 178, 180, 181, 208, 211, 228, 242, 243, 245, 292, 294, 297, 309, 310, 313, 314, 315, 316, 317, 321, 340, 341, 350, 353, 356, 363, 368, 369, 375, 376, 395, 398, 401, 408, 409, 412, 415, 418, 421, 433, 436 e 451; e/ou em uma posição equivalente em uma glucoamilase precursora. Em algumas modalidades, a glucoamilase precursora terá pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97% pelo menos 98% e pelo menos 99% de identidade de sequência com SEQ ID NO: 2 ou SEQ ID NO: 3. Em outras modalidades, a glucoamilase precursora será um homólogo de glucoamilase de *Trichoderma*.

Em algumas modalidades, a variante de glucoamilase compreende uma ou mais substituições nas seguintes posições na sequência de aminoácido apresentada em SEQ ID NO: 2 ou 3:

D4, F5, I12, D24, F29, I43, D44, P45, D46, Y47, Y49, W51, Y70, Q75, R76, P94, D100, K108, K114, F116, N119, R122, Q124, R125, G137, N146, Q148, Y169, N171, Q172, F175, W178, E180, V181, Q208, S211,

W228, N242, E243, R245, I292, G294, K297, R309, Y310, D313, V314, Y315, Y316, N317, W321, K340, K341, T350, Q356, T363, S368, S369, N376, Y395, A398, S401, R408, N409, T412, H418, W421, R433, 1436 e/ou S451 e/ou um posição equivalente na glucoamilase precursora (por exemplo, um homólogo de glucoamilase de *Trichoderma*).

Em outras modalidades, a variante de uma glucoamilase precursora compreende uma ou mais substituições nas seguintes posições na sequência de aminoácido apresentada em SEQ ID NO: 2 ou 3: 4, 5, 24, 29, 43, 44, 49, 70, 75, 76, 100, 108, 119, 124, 137, 146, 148, 169, 171, 172, 175, 178, 181, 208, 211, 243, 292, 294, 297, 314, 316, 317, 340, 341, 350, 356, 363, 368, 369, 376, 395, 401, 409, 412, 433, 436 e/ou 451 e/ou uma posição equivalente em uma glucoamilase precursora (por exemplo, homólogo de glucoamilase de *Trichoderma*).

Em outras modalidades, a variante de uma glucoamilase precursora compreende pelo menos uma das seguintes substituições nas seguintes posições em uma sequência de aminoácido apresentada em SEQ ID NO: 2 ou 3: D4L/E/R/S/C/A/Q/W, F5C/M/N/R/S/T/V/W, I12L/R, D24E/L/Y/T, F29L/I/D/C/S/V/W, I43F/R/D/Y/S, D44E/H/K/S/N/Y/F/R, Y47W, Y49N, Q70R/K/M/P/G/L/F, Q75R/K/A, R76L/M/K/T/P, P94L, D100W/I/Q/M/P/A/N, N119P/T/Y/D/E, N146S/G/C/H/E/D/T/W/L/F/M, Q148V/Y/H/A/C/D/G/M/R/S/T, Y169D/F, Q172C/A/D/R/E/F/H/V/L/M/N/S/T/V, F175H/A/G/R/S/T/C/W/Y, W178A/C/D/E/F/G/H/K/N/R/S/T/V/Y, E180A/C/G/H/I/L/N/P/Q/R/S/T/V/Y, V181E/C/D/G/H/I/P/T/Y/S/L/K/F/A, Q208L/A/C/E/N/F/H/T, S211C/R/E/A/Y/W/M/H/L/I/R/Q/T, E243S/R/N/M/Y/A/L, R245A/E/M/I/P/V, I292D/H/P/R/T/N/V/F/L, G294D/E/T/Q/I/A, K297F/L/P/T/M/D/N/Q/A/Y/H/S/R/W, R309A/C/G/H/I/N/P/Q/S/T/W/Y/L, Y310E/G/L/P/S/W/R/Q, D313Q, V314A/R/N/D/C/E/Q/G/H/I/L/K/M/F/P/S/T/W/Y, Y315F, Y316Q/R, N317T/H, K340D/T, K341F/D/P/V/G/S, T350S/E/A/N, Q356H/D/E, T363L/R/C/H/W, S368W/D/F/L, S369F, N376Q/T/H/S/V, Y395Q/R/S, A398S/I/T, S401C/V, R408S, N409W/T/K, T412A/H/K/G, R433H/Q, I436A/T, S451M/T/H e/ou uma substituição em uma posição equivalente em um homólogo de glucoamilase precursora.

Em algumas modalidades preferidas, a variante de glucoamilase compreende pelo menos uma substituição em uma posição correspondendo à posição de resíduo de aminoácido apresentada em SEQ ID NO: 2 de 5, 24, 43, 49, 70, 75, 76, 94, 119, 146, 148, 172, 175, 178, 180, 181, 208, 211, 245, 294, 353, 315, 375, 409, 309, 314, 369, 412 e/ou uma posição equivalente em uma glucoamilase precursora homóloga.

Em algumas modalidades particularmente preferidas, a variante de glucoamilase compreende pelo menos uma substituição selecionada do grupo consistindo em F5W, D24E, I43R, I43Y, I43S, I43F, Y47W, Y49N, Q70K, Q75R, R76L, P94L, N119P/T/Y/D, N146S/D/T/E/W/L, Q148V, N171D, Q172C/D/R/E/F/V/L/T, F175R/W/Y, W178K/N/Y, E180H/N/V/R, V181E/F/G/I/H, Q208A/T/N, S211H/M/L/R, R245E, R245M, R309W, V314F/G/H/K/P/R/Y, Y315F, S369F, T412K correspondendo à posição apresentada em SEQ ID NO: 2 ou 3 e/ou uma posição equivalente em uma glucoamilase precursora homóloga.

Em outras modalidades particulares, a variante de glucoamilase compreende pelo menos uma substituição de um resíduo de aminoácido selecionado das posições correspondendo à posição 5, 43, 75, 76, 94, 108, 119, 124, 146, 148, 171, 172, 175, 178, 180, 181, 208, 211, 297, 314, 316 ou 412 de SEQ ID NO: 2 ou 3 e/ou uma posição equivalente em um homólogo de glucoamilase de *Trichoderma*. Em algumas modalidades preferidas, a substituição é na posição correspondendo à posição número 148, 172, 175, 178, 180, 208, 211, 314, 412 ou 297 de SEQ ID NO: 2 ou 3 e/ou uma posição equivalente em um homólogo de glucoamilase de *Trichoderma*. Em algumas modalidades particularmente preferidas, a substituição é em uma posição correspondendo à posição número 148, 172, 175, 178, 180, 208, 211, 314, 412 ou 297 de SEQ ID NO: 2 ou 3 e/ou uma glucoamilase precursora homóloga (por exemplo, homólogo de glucoamilase de *Trichoderma*).

Em algumas modalidades, a variante de glucoamilase compreende múltiplas substituições. Algumas das múltiplas substituições incluirão uma substituição em uma ou mais posições equivalentes a e incluindo as posições 24, 43, 44, 108, 124, 171, 175, 181, 208, 243, 292, 294, 297, 310,

314 e 363 de SEQ ID NO: 2 ou 3. Algumas múltiplas substituições preferidas incluirão uma ou mais das posição equivalentes a e compreendendo as posições 108, 124, 171, 208, 211 e 314 de SEQ ID NO: 2 ou 3. Em algumas modalidades, as variantes de glucoamilase compreendem múltiplas substituições, tais como Y47W e Y315F ou Y47F e Y315W.

Alguns exemplos de substituições incluem nas posições: D24/I43/D44/F175/V181/V314/T363; D24/Q208/I292/G294/K297/Y310; V181/E243/I292/K297/N317/Y395; D24/V181/Q208/G294/T363/N376/N409; D24/V181/I292/G294/E243/N409; e I43R/E243/I292/G294/K297 de SEQ ID NO: 2 ou 3 e posições equivalentes em glucoamilases precursoras e, particularmente, homólogos de glucoamilase de *Trichoderma*.

Algunas múltiplas substituições preferidas incluem as substituições: D24E, L/I43F, R/D44H, N/F175H/V181K, L/V314D,H,K/T363R; D24L,W,Y/Q208F/I292F, N, V/G294A, I, Q/K297A/Y310F, Q, R; V181F, K, L/E243A,N,M,R,Y/I292F,L,N,V/K297A, D, H, M, N, Q/N317H/Y395Q, R D24E, L, YV81F, K, L/Q208C, F/G294A, I, Q/T363R/N376Q/N409K, W; D24E.L, Y/V 181 F, K, L/I292F,L,N,V/G294A, I, Q/E243 A, M, N, R, Y/N409K, W; e I43R/E243A, M, N, R, Y/I292F,L,N,V/G294A/K297A,D,H,M, N,Q,S,R,W,Y de SEQ ID NO: 2 ou 3 e posições equivalentes em glucoamilases precursoras e, particularmente, um homólogo de glucoamilase de *Trichoderma*.

Uma série de glucoamilases precursoras foi alinhada com a sequência de aminoácido de TrGA. A figura 4 inclui o domínio catalítico das seguintes glucoamilases precursoras: *Aspergillus awamori* (AaGA) (SEQ ID NO: 5); *Aspergillus niger* (AnGA) (SEQ ID NO: 6); *Aspergillus oryzae* (AoGA) (SEQ ID NO: 7), *Humicola grisea* (HgGA) (SEQ ID NO: 8) e *Hypocrea vinosa* (HvGA) (SEQ ID NO: 9). A identidade % dos domínios catalíticos é representada na tabela 1 abaixo. Em algumas modalidades, por exemplo, a glucoamilase variante será derivada de uma glucoamilase precursora a qual é uma glucoamilase de *Aspergillus* e a variante incluirá pelo menos uma substituição em uma posição equivalente a uma posição apresentada em SEQ ID NO: 2 ou 3 e, particularmente, em uma posição correspondendo a D4, F5,

I12, D24, F29, I43, D44, P45, D46, Y47, Y49, W51, Y70, Q75, R76, P94, D100, K108, K114, F116, N119, R122, Q124, R125, G137, N146, Q148, Y169, N171, Q172, F175, W178, E180, V181, Q208, S211, W228, N242, E243, R245, 1292, G294, K297, R309, Y310, D313, V314, Y315, Y316, N317, W321, K340, K341, T350, Q356, T363, S368, S369, N376, Y395, A398, S401, R408, N409, T412, H418, W421, R433, I436 e/ou S451.

A remoção de endo-H de açúcares N-ligados na glucoamilase de *Trichoderma reesei* teve um efeito de estabilização (quando se olha a T_m). Assim, variantes tendo uma substituição N171D podem ter termoestabilidade aumentada quando comparado com o tipo silvestre. Em algumas modalidades, variantes tendo uma ou mais substituições em sítios tendo açúcares N-ligados são proporcionadas, incluindo N171D em *Trichoderma reesei* (SEQ ID NO: 2).

tabela 1

	AaGA	AnGA	AoGA	HgGA	HvGA	TrGA
AaGA	100	95	58	53	57	56
AnGA		100	59	53	57	56
AoGA			100	55	56	56
HgGA				100	61	63
HvGA					100	91
TrGA						100

A presente invenção também proporciona variantes de glucoamilase tendo pelo menos uma propriedade alterada (por exemplo, propriedade aperfeiçoada) quando comparado a uma glucoamilase precursora e, particularmente, à TrGA. Em algumas modalidades preferidas, pelo menos uma propriedade alterada (por exemplo, propriedade aperfeiçoada) é selecionada do grupo consistindo em estabilidade ao ácido, estabilidade térmica e atividade específica. De preferência, a propriedade alterada é estabilidade aumentada ao ácido, estabilidade térmica aumentada e/ou atividade específica aumentada. De preferência, a estabilidade térmica aumentada é em maiores temperaturas. Em uma modalidade, a estabilidade aumentada ao pH é em pH elevado. Em uma outra modalidade, a estabilidade aumentada ao pH é

em baixo pH.

As variantes de glucoamilase da invenção também podem proporcionar maiores taxas de hidrólise de amido em baixas concentrações de substrato quando comparado à glucoamilase precursora. A variante pode ter
 5 uma maior V_{max} ou menor K_m do que uma glucoamilase precursora quando testada sob as mesmas condições. Por exemplo, a glucoamilase variante pode ter uma maior V_{max} em uma faixa de temperatura de 25°C a 70°C (por exemplo, a 25°C a 35°C; 30°C a 35°C; 40°C a 50°C; a 50°C a 55°C e a 55°C a 62°C). Os valores da constante de Michaelis-Menten, K_m e V_{max} podem
 10 ser facilmente determinados usando procedimentos conhecidos padrões.

Estabilidade Térmica (variantes termoestáveis):

Em um aspecto, a invenção refere-se a uma glucoamilase variante tendo estabilidade térmica alterada em temperaturas alteradas quando comparado a um precursor ou tipo silvestre. Temperaturas alteradas incluem
 15 temperaturas aumentadas ou diminuídas. Em algumas modalidades, a variante de glucoamilase terá termoestabilidade aperfeiçoada, tal como retendo pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% da atividade enzimática após exposição à temperaturas alteradas durante um determinado período de tempo, por exemplo, pelo menos 60
 20 minutos, 120 minutos, 180 minutos, 240 minutos, 300 minutos, etc. Em algumas modalidades, a variante tem estabilidade térmica aumentada comparado à glucoamilase precursora em temperaturas selecionadas na faixa de 40 a 80 °C, também na faixa de 50 a 75 °C e na faixa de 60 a 70 °C e, de preferência, em uma faixa de pH de 4,0 a 6,0. Em algumas modalidades, a
 25 termoestabilidade é determinada conforme descrito nos Exemplos.

Em algumas modalidades, variantes particularmente interessantes com relação a um aperfeiçoamento na termoestabilidade incluem uma ou mais deleções, substituições ou inserções e, particularmente, substituições nas seguintes posições na sequência de aminoácido apresentada em SEQ
 30 ID NO: 2 ou 3: D4, F5, I12, D24, F29, I43, D44, P45, D46, Y47, Y49, W51, Y70, Q75, R76, P94, D100, K108, K114, F116, N119, R122, Q124, R125, G137, N146, Q148, Y169, N171, Q172, F175, W178, E180, V181, Q208,

S211, W228, N242, E243, R245, I292, G294, K297, R309, Y310, D313, V314, Y315, Y316, N317, W321, K340, K341, T350, Q356, T363, S368, S369, N376, Y395, A398, S401, R408, N409, I412, H418, W421, R433, I436 e/ou S451 e/ou uma posição equivalente em uma glucoamilase precursora.

- 5 Em algumas modalidades, a glucoamilase precursora será um homólogo de glucoamilase de *Trichoderma* e, em outras modalidades preferidas, a glucoamilase precursora terá pelo menos 90%, pelo menos 95% e pelo menos 98% de identidade de sequência à SEQ ID NO: 2 ou 3.

Glucoamilases Quiméricas:

- 10 Variantes de glucoamilase da invenção podem também incluir glucoamilases quiméricas ou híbridas, por exemplo, com um domínio de ligação a amido (SBD) de uma glucoamilase e um domínio catalítico e ligante de outra. Por exemplo, uma glucoamilase híbrida pode ser feita trocando o SBD de AnGA pelo SBD de TrGA, fazendo um híbrido com o SBD de AnGA e o domínio catalítico e ligante de TrGA. Alternativamente, o SBD e ligante de AnGA podem ser trocados pelo SBD e o ligante de TrGA.
- 15

Atividade Específica:

- Em outro aspecto, a invenção refere-se a uma glucoamilase variante tendo atividade específica alterada quando comparado a uma glucoamilase precursora ou do tipo silvestre.
- 20

- Em algumas modalidades, variantes particularmente interessantes com relação a um aperfeiçoamento na atividade específica incluem uma ou mais deleções, substituições ou inserções e, particularmente, substituições nas seguintes posições na sequência de aminoácido apresentada em SEQ ID NO: 2 ou 3: D4, F5, I12, D24, F29, I43, D44, P45, D46, Y47, Y49, W51, Y70, Q75, R76, P94, D100, K108, K114, F116, N119, R122, Q124, R125, G137, N146, Q148, Y169, N171, Q172, F175, W178, E180, V181, Q208, S211, W228, N242, E243, R245, I292, G294, K297, R309, Y310, D313, V314, Y315, Y316, N317, W321, K340, K341, T350, Q356, T363, S368, S369, N376, Y395, A398, S401, R408, N409, T412, H418, W421, R433, I436 e/ou S451 e/ou uma posição equivalente em uma glucoamilase precursora. Em algumas modalidades, variantes da invenção tendo atividade
- 25
- 30

específica aperfeiçoada incluem uma substituição nas seguintes posições, na sequência de aminoácido apresentada em SEQ ID NO: 2 ou 3: D4, D24, 143, D44, Y70, Q75, R76, D100, K108, N119, Q124, N146, Q148, N171, Q172, F175, V181, Q208, S211, E243, R245, 1292, G294, K297, V314, Y316, N317, K340, K341, T350, Q356, T363, S368, N376, Y395, A398, S401, N409, T412, 1436 e/ou S451 e/ou uma posição equivalente em uma glucoamilase precursora. Em algumas modalidades preferidas, a glucoamilase precursora compreenderá uma sequência tendo pelo menos 90% ou 95% de identidade de sequência à sequência de SEQ ID NO: 2 ou 3.

10 **Polinucleotídeos:**

A presente invenção também refere-se a polinucleotídeos isolados que codificam uma glucoamilase variante da invenção. Os polinucleotídeos que codificam uma glucoamilase variante podem ser preparados através de métodos estabelecidos na técnica. Os polinucleotídeos podem ser preparados sinteticamente, tal como através de um sintetizador de DNA automático. A sequência de DNA pode ser de origem genômica (ou cDNA) e sintética misturada preparada através de ligação de fragmentos juntos. Os polinucleotídeos também podem ser preparados através de reação em cadeia de polimerase (PCR) usando iniciadores específicos. Em geral, referência é feita a Minshull J. e outros, (2004), Engineered protein function by selective amino acid diversification, Methods 32(4): 416 - 427). Também, uma série de companhias agora sintetizam DNA, tal como Geneart AG, Regensburg, Alemanha.

A presente invenção também proporciona polinucleotídeos isolados compreendendo uma sequência de nucleotídeo (i) tendo pelo menos 70% de identidade de sequência à SEQ ID NO: 4 ou (ii) sendo capazes de hibridização a uma sonda derivada da sequência de nucleotídeo apresentada em SEQ ID NO: 4, sob condições de estringência intermediária a alta ou (iii) sendo complementares a uma sequência de nucleotídeo tendo pelo menos 90% de identidade de sequência à sequência apresentada em SEQ ID NO: 4. Sondas úteis de acordo com a invenção podem incluir pelo menos 50, 100, 150, 200, 250, 300 ou mais nucleotídeos contínuos de SEQ ID NO:

4.

A presente invenção ainda proporciona polinucleotídeos isolados que codificam glucoamilases variantes as quais compreendem uma sequência de aminoácido compreendendo pelo menos 80% de identidade de sequência de aminoácido à SEQ ID NO: 2 ou 3. Em algumas modalidades, as glucoamilases variantes têm pelo menos 80% de identidade à SEQ ID NO: 2 ou 3. Em algumas modalidades, as glucoamilases variantes têm pelo menos 90% de identidade de sequência de aminoácido à SEQ ID NO: 2. Em algumas modalidades, as glucoamilases variantes têm pelo menos 93% de identidade de sequência de aminoácido à SEQ ID NO: 2. Em algumas modalidades, as glucoamilases variantes têm pelo menos 95% de identidade de sequência de aminoácido à SEQ ID NO: 2. Em algumas modalidades, as glucoamilases variantes têm pelo menos 97% de identidade de sequência de aminoácido à SEQ ID NO: 2. Em algumas modalidades, as glucoamilases variantes têm pelo menos 98% de identidade de sequência de aminoácido à SEQ ID NO: 2. Em algumas modalidades, as glucoamilases variantes têm pelo menos 99% de identidade de sequência de aminoácido à SEQ ID NO: 2. A presente invenção também proporciona vetores de expressão compreendendo qualquer um dos polinucleotídeos fornecidos acima.

A presente invenção também proporciona fragmentos (isto é, porções) do DNA que codifica as glucoamilases variantes fornecidas aqui. Esses fragmentos encontram uso na obtenção de fragmentos de DNA de comprimento parcial capazes de serem usados para isolar ou identificar polinucleotídeos que codificam enzimas glucoamilase maduras descritas aqui a partir de células fúngicas filamentosas (por exemplo, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Schizosaccharomyces* e *Humicola*) ou um segmento da mesma tendo atividade de glucoamilase. Em algumas modalidades, fragmentos do DNA podem compreender pelo menos 50, 100, 150, 200, 250, 300 ou mais nucleotídeos contínuos. Em algumas modalidades, porções do DNA fornecido em SEQ ID NO: 4 encontram uso na obtenção de glucoamilase precursora e, particularmente, homólogos de glucoamilase de *Trichoderma* de outras espécies, tais como fungos filamentosos, as quais

codificam uma glucoamilase.

Constructos de DNA e Vetores:

De acordo com uma modalidade da invenção, um constructo de DNA compreendendo um polinucleotídeo conforme descrito acima que codifica uma glucoamilase variante abrangida pela invenção e operavelmente ligado a uma sequência promotora é montado para transferência a uma célula hospedeira.

O constructo de DNA pode ser introduzido em uma célula hospedeira usando um vetor. O vetor pode ser qualquer vetor o qual, quando introduzido em uma célula hospedeira é, de preferência, integrado no genoma da célula hospedeira e é replicado. Vetores incluem vetores de clonagem, vetores de expressão, vetores-ponte, plasmídeos, partículas de fago, cassetes e similares. Em algumas modalidades preferidas, o vetor é um vetor de expressão que compreende sequências regulatórias operavelmente ligadas à sequência que codifica a glucoamilase.

Exemplos de vetores de expressão e/ou integração adequados são fornecidos em Sambrook e outros (1989) *supra* e Ausubel (1987) *supra* e van den Hondel e outros (1991) em Bennett e Lasure (Eds.) MORE GENE MANIPULATIONS IN FUNGI, Academic Press páginas 396-428 e Patente U.S. No. 5.874.276. Referência também é feita ao Fungal Genetics Stock Center Catalogue of Strains (FGSC, < www.fgsc.net>) para uma lista de vetores. Vetores particularmente úteis incluem vetores obtidos, por exemplo, da Invitrogen e Promega.

Vetores específicos adequados para uso em células hospedeiras fúngicas incluem vetores tais como pFB6, pBR322, pUC18, pUC100, pDONR®201, pDONR®221, pENTR®, pGEM®3Z e pGEM®4Z. Um vetor de expressão para fins gerais útil em *Aspergillus* inclui pRAX com um promotor *glaA* e, em *Hypocrea/Trichoderma*, inclui pTrex3g com um promotor *cbhl*.

Plasmídeos adequados para uso em células bacterianas incluem pBR322 e pUC19 que permitem replicação em *E. coli* e pE194 que permite replicação em *Bacillus*.

Em algumas modalidades preferidas, o promotor mostra ativida-

de transcricional em uma célula hospedeira bacteriana ou fúngica e pode ser derivado de genes que codificam proteínas, quer homólogas ou heterólogas à célula hospedeira. O promotor pode ser um promotor mutante, truncado e/ou híbrido. Os promotores mencionados acima são conhecidos na técnica.

5 Exemplos de promotores adequados úteis em células fúngicas e, particularmente, células fúngicas filamentosas, tais como células de *Trichoderma* ou *Aspergillus*, incluem promotores exemplificativos tais como os promotores *cbh1*, *cbh1*, *egl1*, *egl1*, *eg5*, *xln1* e *xln1* de *T. reesei*. Outros exemplos de promotores úteis incluem promotores de genes de glucoamilase
10 (glaA) de *A. awamori* e *A. niger* (vide Nunberg e outros (1984) *Mol. Cell Biol.* 4: 2306-2315 e Boel e outros (1984) *EMBO J.* 3: 1581-1585), o promotor de amilase TAKA de *A. oryzae*, o promotor TPI (isomerase de triose de fosfato) de *S. cerevisiae*, o promotor dos genes de acetamidase de *Aspergillus nidulans* e dos genes de lipase de *Rhizomucor miehei*.

15 Exemplos de promotores adequados úteis em células bacterianas incluem aqueles obtidos do óperon lac de *E. coli*; gene de alfa amilase de *Bacillus licheniformis* (*amyL*), gene de amilase de *B. stearothermophilus* (*amyM*); genes *xylA* e *xylB* de *Bacillus subtilis*, o gene de beta-lactamase e o promotor *tac*.

20 Em uma modalidade, o promotor é um que é nativo à célula hospedeira. Por exemplo, quando *T. reesei* é o hospedeiro, o promotor é um promotor nativo de *T. reesei*. Em outra modalidade, o promotor é um que é heterólogo à célula hospedeira fúngica. Em algumas modalidades, o promotor será um promotor de glucoamilase precursora, tal como o promotor de
25 TrGA.

 Em algumas modalidades, o constructo de DNA inclui ácidos nucleicos que codificam uma sequência sinalizadora que é uma sequência de aminoácido ligada ao amino término do polipeptídeo o qual dirige o polipeptídeo codificado à via secretória da célula. A extremidade 5' da sequência de codificação da sequência de ácido nucleico pode incluir naturalmente
30 uma região de codificação de peptídeo sinalizador a qual é naturalmente ligada em rede de leitura de tradução com o segmento da sequência de co-

dificação de glucoamilase o qual codifica a glucoamilase secretada ou a extremidade 5' da sequência de codificação da sequência de ácido nucleico pode incluir um peptídeo sinalizador qual é estranho à sequência de codificação. Em algumas modalidades, o constructo de DNA inclui uma sequência

5 sinalizadora que está naturalmente associada a um gene de glucoamilase precursora do qual uma glucoamilase variante foi obtida. Em algumas modalidades, a sequência sinalizadora será a sequência representada em SEQ ID NO: 1 ou uma sequência tendo pelo menos 90%, pelo menos 94% e pelo menos 98% de identidade de sequência à mesma. Sequências sinalizadoras

10 eficazes podem incluir as sequências sinalizadoras obtidas de glucoamilases de outras enzimas fúngicas filamentosas, tal como de *Trichoderma* (glucoamilase de *T. reesei*), *Humicola* (celulase de *H. insolens* ou glucoamilase de *H. grisea*), *Aspergillus* (glucoamilase de *A. niger* e amilase TAKA de *A. oryzae*) e *Rhizopus*.

15 Em modalidades adicionais, um constructo de DNA ou vetor compreendendo uma sequência sinalizadora e uma sequência promotora a ser introduzido em uma célula hospedeira é derivado da mesma fonte. Em algumas modalidades, a sequência sinalizadora da glucoamilase nativa de um homólogo de glucoamilase de *Trichoderma*, tal como uma sequência

20 sinalizadora de uma cepa de *Hypocrea*, pode ser usada.

Em algumas modalidades, o vetor de expressão também inclui uma sequência de término. Qualquer sequência terminadora funcional na célula hospedeira pode ser usada na presente invenção. Em uma modalidade, a sequência de término e a sequência promotora são derivadas da

25 mesma fonte. Em outra modalidade, a sequência de término é homóloga à célula hospedeira. Sequências terminadoras úteis incluem sequências terminadoras obtidas dos genes *cbhl* de *Trichoderma reesei*; glucoamilase de *A. niger* ou *A. awamori* (Nunberg e outros (1984) *supra* e Boel e outros (1984) *supra*), sintase de antranilato de *Aspergillus nidulans*, amilase TAKA de *Aspergillus oryzae* ou *trpC* de *A. nidulans* (Punt e outros (1987) *Gene* 56: 117 -

30 124).

Em algumas modalidades, um vetor de expressão inclui um

marcador selecionável. Exemplos de marcadores selecionáveis incluem aqueles os quais conferem resistência antimicrobiana (por exemplo, higromicina e fleomicina). Marcadores seletivos nutricionais também encontram uso na presente invenção, incluindo aqueles marcadores conhecidos na técnica como *amdS* (acetamidase), *argB* (carbamoil transferase de ornitina) e *pyrG* (decarboxilase de orotidina-5'-fosfato). Marcadores úteis em sistemas de vetor para transformação de *Trichoderma* são conhecidos na técnica (vide, por exemplo, Finkelstein, capítulo 6 em BIOTECHNOLOGY OF FILAMENTOUS FUNGI, Finkelstein e outros Eds. Butterworth-Heinemann, Boston, MA (1992); Kinghorn e outros (1992) APPLIED MOLECULAR GENETICS OF FILAMENTOUS FUNGI, Blackie Academic and Professional, Chapman and Hall, Londres; Berges e Barreau (1991) Curr. Genet. 19: 359 - 365; e van Hartingsveldt e outros (1987) Mol. Gen. Genet. 206: 71 - 75). Em uma modalidade preferida, o marcador seletivo é o gene *amdS*, o qual codifica a enzima acetamidase, que permite que as células transformadas cresçam sobre acetamida como uma fonte de nitrogênio. O uso do gene *amdS* de *A. nidulans* como um marcador seletivo é descrito em Kelley e outros (1985) EMBO J. 4: 475 - 479 e Penttilä e outros (1987) Gene 61: 155-164.

Métodos usados para ligar o constructo de DNA compreendendo uma sequência de ácido nucleico que codifica uma glucoamilase variante, um promotor, um terminador e outras sequências e inserir o mesmo em um vetor adequado são bem-conhecidos na técnica. A ligação é, em geral, realizada através de ligação em sítios de restrição convenientes. Se tais sítios não existem, ligantes de oligonucleotídeo sintético são usados de acordo com a prática convencional (vide Sambrook (1989) *supra* e Bennett e Lasure, MORE GENE MANIPULATIONS IN FUNGI, Academic Press, San Diego (1991) páginas 70 - 76). Adicionalmente, vetores podem ser construídos usando técnicas de recombinação conhecidas (por exemplo, Invitrogen Life Technologies, Gateway Technology).

30 **Células Hospedeiras:**

A presente invenção também refere-se à células hospedeiras compreendendo um polinucleotídeo que codifica uma glucoamilase variante

da invenção, as quais são usadas para produzir as glucoamilases da invenção. Em algumas modalidades preferidas, as células hospedeiras são selecionadas de células bacterianas, fúngicas, de planta e levedo. O termo célula hospedeira inclui as células, prole das células e protoplastos criados a partir das células as quais são usadas para produzir uma glucoamilase variante de acordo com a invenção.

Em algumas modalidades, as células hospedeiras são células fúngicas e, de preferência, células hospedeiras fúngicas filamentosas. O termo "fungo filamentoso" refere-se a todas as formas filamentosas da subdivisão Eumycotina (vide Alexopoulos, C. J. (1962), *INTRODUCTORY MYCOLOGY*, Wiley, New York). Esses fungos são caracterizados por um micélio vegetativo com uma parede celular composta de quitina, celulose e outros polissacarídeos complexos. Os fungos filamentosos da presente invenção são morfológica, fisiológica e geneticamente distinto de levedos. Crescimento vegetativo pelo fungo filamentoso é através de alongamento hifal e o catabolismo de carbono é obrigatoriamente aeróbico. Na presente invenção, a célula precursora fúngica filamentosa pode ser uma célula de uma espécie de, mas não limitado a, *Trichoderma* (por exemplo, *Trichoderma reesei*, o morfo assexual de *Hypocrea jecorina*, previamente classificado como *T. longibrachiatum*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma harzianum*) (Sheir-Neirs e outros (1984) *Appl. Microbiol. Biotechnol* 20: 46 - 53; ATCC No. 56765 e ATCC No. 26921); *Penicillium* sp., *Humicola* sp. (por exemplo, *H. insolens*, *H. lanuginosa* e *H. grisea*); *Chrysosporium* sp. (por exemplo, *C. lucknowense*), *Gliocladium* sp., *Aspergillus* sp. (por exemplo, *A. oryzae*, *A. niger*, *A. sojae*, *A. japonicus*, *A. nidulans* e *A. awamori*) (Ward e outros (1993) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39: 738 - 743 e Goedegebuur e outros (2002) *Genet* 41: 89 -98), *Fusarium* sp. (por exemplo, *F. roseum*, *F. graminum* *F. cerealis*, *F. oxysporum* e *F. venenatum*), *Neurospora* sp. (*N. crassa*), *Hypocrea* sp., *Mucor* sp., (*M. miehei*), *Rhizopus* sp. e *Emericella* sp. (Vide também Innis e outros (1985) *Sci.* 228: 21 -26). O termo "*Trichoderma*" ou "*Trichoderma* sp." ou "*Trichoderma* spp." refere-se a qualquer gênero fúngico prévia ou atualmente classificado como *Trichoderma*.

Em algumas modalidades, as células hospedeiras serão células bacterianas gram-positivas. Exemplos não limitativos incluem cepas de *Streptomyces*, (por exemplo, *S. lividans*, *S. coelicolor* e *S. griseus*) e *Bacillus*. Conforme usado aqui, o "gênero *Bacillus*" inclui todas as espécies dentro do

5 gênero "*Bacillus*", conforme conhecido por aqueles versados na técnica incluindo, mas não limitado a, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. lentus*, *B. brevis*, *B. stearothermophilus*, *B. alkalophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. clausii*, *B. halodurans*, *B. megaterium*, *B. coagulans*, *B. circulans*, *B. lautus* e *B. thuringiensis*. É reconhecido que o gênero *Bacillus* continua a sofrer reorganização taxonômica. Assim, se pretende que o gênero inclua espécies que foram

10 reclassificadas incluindo, mas não limitado a, organismos tal como *B. stearothermophilus*, o qual é agora denominado "*Geobacillus stearothermophilus*".

Em algumas modalidades, a célula hospedeira é uma cepa bacteriana gram-negativa, tal como *E. coli* ou *Pseudomonas sp.* Em outras modalidades, as células hospedeiras podem ser células de levedo, tais como

15 *Saccharomyces sp.*, *Schizosaccharomyces sp.*, *Pichia sp.* ou *Candida sp.*

Em outras modalidades, a célula hospedeira será uma célula hospedeira geneticamente manipulada em que os genes nativos foram inativados, por exemplo, através de deleção em células bacterianas ou fúngicas.

20 Em que é desejado obter uma célula hospedeira fúngica tendo um ou mais genes inativados, métodos conhecidos podem ser obtidos (por exemplo, métodos divulgados na Patente U.S. No. 5.246.853, Patente U.S. No. 5.475.101 e WO 92/06209). Inativação gênica pode ser realizada através de deleção completa ou parcial, através de inativação insercional ou através de qualquer

25 outro meio o qual torna um gene não funcional para sua finalidade pretendida (de modo que o gene seja impedido de expressão de uma proteína funcional). Em algumas modalidades preferidas, quando a célula hospedeira é uma célula de *Trichoderma* e particularmente uma célula hospedeira de *T. reesei*, os genes *cbh1*, *cbh2*, *egl1* e *egl2* serão inativados e, de preferência,

30 deletados. Células hospedeiras de *Trichoderma reesei* particularmente preferidas tendo proteínas quad-deletadas são apresentadas e descritas na USP 5.847.276 e WO 05/001036. Em outras modalidades, a célula hospe-

deira é uma cepa semprotease ou protease-deficiente.

Transformação de células hospedeiras:

A introdução de um constructo de DNA ou vetor em uma célula hospedeira inclui técnicas tais como transformação; eletroporação; microinjeção nuclear; transdução; transfecção (por exemplo, lipofecção mediada e transfecção mediada por DEAE-Dextrina); incubação com fosfato de cálcio, precipitação de DNA; bombardeamento em alta velocidade com microprojéteis revestidos de DNA; e fusão de protoplasta. Métodos de transformação geral são conhecidos na técnica (vide, por exemplo, Ausubel e outros (1987), *supra*, capítulo 9; e Sambrook (1989) *supra* e Campbell e outros (1989) *Curr. Genet.* 16: 53-56).

Métodos de transformação para *Bacillus* são divulgados em numerosas referências, incluindo Anagnostopoulos C e J. Spizizen (1961) *J. Bacteriol.* 81: 741 - 746 e WO 02/14490.

Métodos de transformação para *Aspergillus* são descritos em Yelton e outros (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 1470 - 1474; Berka e outros (1991) em *Applications of Enzyme Biotechnology*, Eds. Kelly e Baldwin, Plenum Press (NY); Cao e outros (2000) *Sci.* 9: 991 - 1001; Campbell e outros (1989) *Curr. Genet.* 16: 53-56 e EP 238 023. A expressão de uma proteína heteróloga em *Trichoderma* é descrita na USP 6.022.725; USP 6.268.328; Harkki e outros (1991); *Enzyme Microb. Technol.* 13: 227-233; Harkki e outros (1989) *Bio Technol.* 7: 596-603; EP 244.234; EP 215.594; e Nevalainen e outros, "The Molecular Biology of *Trichoderma* and its Application to the Expression of Both Homologous and Heterologous Genes", em MOLECULAR INDUSTRIAL MYCOLOGY, Eds. Leong e Berka, Marcel Dekker Inc., NY (1992) páginas 129 - 148). Referência também é feita ao WO96/00787 e Bajar e outros (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 8202 - 28212 para transformação de cepas de *Fusarium*.

Em uma modalidade específica, o preparo de *Trichoderma sp.* para transformação envolve o preparo de protoplastas a partir de micélio fúngico (vide Campbell e outros (1989) *Curr. Genet.* 16: 53-56; Pentilla e outros (1987) *Gene* 61: 155 - 164). Transformação *Agrobacterium tumefaciens*-

mediada de fungos filamentosos é conhecida (vide de Groot e outros (1998) *Nat. Biotechnol.* 16: 839 - 842). Referência também é feita à USP 6.022.725 e USP 6.268.328 para procedimentos de transformação usados com hospedeiros fúngicos filamentosos.

5 De preferência, transformantes geneticamente estáveis são construídos com sistemas de vetor pelos quais o ácido nucleico que codifica a glucoamilase variante é estavelmente integrada no cromossoma de uma cepa hospedeira. Transformantes são, então, purificados através de técnicas conhecidas.

10 Em algumas outras modalidades, as células hospedeiras são células de planta, tais como células de uma planta monocot (por exemplo, milho, trigo e sorgo) ou células de uma planta dicot (por exemplo, soja). Métodos para fazer constructos de DNA úteis em transformação de plantas e métodos para a transformação de plantas são conhecidos. Alguns desses
15 métodos incluem transferência de gene *Agrobacterium tumefaciens*-mediada; bombardeamento de microprojétil, transformação PEG-mediada de protoplastas, eletroporação e similares. Referência é feita à USP 6.803.499, USP 6.777.589; Fromm e outros (1990) *Biotechnol.* 8: 833-839; Potrykus e outros (1985) *Mol. Gen. Genet.* 199: 169-177.

20 **Produção de proteínas:**

A presente invenção ainda refere-se a métodos de produção das glucoamilases variantes compreendendo transformação de uma célula hospedeira com um vetor de expressão compreendendo um polinucleotídeo que codifica uma glucoamilase variante de acordo com a invenção, opcionalmen-
25 te cultura da célula hospedeira sob condições adequadas para a produção da glucoamilase variante e opcionalmente recuperação da glucoamilase.

Nos métodos de expressão e produção da presente invenção, as células hospedeiras são cultivadas sob condições adequadas em cultura em frasco de agitação, fermentações em pequena escala ou larga escala (inclu-
30 indo fermentações contínua, em batelada e alimentada em batelada) em fermentadores de laboratório ou industriais, com meio adequado contendo sais fisiológicos e nutrientes (vide, por exemplo, Pourquie, J. e outros, BIO-

CHEMISTRY AND GENETICS OF CELLULOSE DEGRADATION, eds. Aubert, J. P. e outros, Academic Press, páginas 71-86, 1988 e Ilmen, M. e outros (1997) *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1298-1306). Meios comuns comercialmente preparados (por exemplo, caldo de Extrato de Malte de Levedo (YM), caldo de Luria Bertani (LB) e caldo de Dextrose de Sabouraud (SD))
5 encontram uso na presente invenção. Condições de cultura preferidas para células fúngicas bacterianas e filamentosas são conhecidas na técnica e podem ser encontradas na literatura científica e/ou da fonte dos fungos, tal como a American Type Culture Collection e Fungal Genetics Stock Center. Em
10 casos onde uma sequência de codificação de glucoamilase está sob o controle de um promotor induzível, o agente de indução (por exemplo, um açúcar, sal de metal ou antimicrobiano) é adicionado ao meio em uma concentração eficaz para induzir à expressão da glucoamilase.

Em algumas modalidades, a presente invenção refere-se a métodos de produção da glucoamilase variante compreendendo cultura de uma
15 planta ou célula de planta compreendendo um polinucleotídeo que codifica uma glucoamilase variante de acordo com a invenção sob condições adequadas para a produção da variante e, opcionalmente, recuperação da glucoamilase.

Em algumas modalidades, de forma a avaliar a expressão de uma glucoamilase variante por uma linhagem de célula que foi transformada com um polinucleotídeo que codifica a glucoamilase variante abrangida pela
20 invenção, ensaios são realizados a nível de proteína, a nível de RNA e/ou através do uso de bioensaios funcionais particulares à atividade e/ou produção de glucoamilase. Alguns desses ensaios incluem Northern blotting, dot blotting (análise de DNA ou RNA), RT-PCR (reação em cadeia de polimerase com transcriptase reversa) ou hibridização *in situ*, usando uma sonda
25 apropriadamente rotulada (baseado na sequência de codificação de ácido nucleico) e Southern blotting e auto-radiografia convencionais.

Além disso, a produção e/ou expressão de uma glucoamilase variante pode ser medida em uma amostra diretamente, por exemplo, através de ensaios que medem diretamente açúcares de redução, tal como gli-

cose, no meio de cultura e através de ensaios para medição da atividade, expressão e/ou produção de glucoamilase. Em particular, a atividade de glucoamilase pode ser ensaiada através do método com ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (vide Goto e outros (1994) Biosci. Biotechnol. Biochem. 58: 49 - 54). Em modalidades adicionais, a expressão da proteína é avaliada através de métodos imunológicos, tal como coloração imunohistoquímica de células, seções teciduais ou imunoensaio do meio de cultura tecidual (por exemplo, através de Western blot ou ELISA). Tais imunoensaios podem ser usados para avaliar, qualitativa e quantitativamente, a expressão de uma glucoamilase. Os detalhes de tais métodos são conhecidos por aqueles versados na técnica e muitos reagentes para a prática de tais métodos estão comercialmente disponíveis.

As glucoamilases da presente invenção podem ser recuperadas ou purificadas do meio de cultura através de uma variedade de procedimentos conhecidos na técnica, incluindo centrifugação, filtração, extração, precipitação e similares.

Composições:

As glucoamilase variantes podem ser usadas em composições enzimáticas incluindo, mas não limitado a, composições para hidrólise e sacarificação de amido, composições de limpeza e detergentes (por exemplo, detergentes para a lavagem de roupas, detergentes para a lavagem de louça e composições de limpeza para superfícies rígidas), composições para fermentação de álcool e em composições de ração para animais. Ainda, as glucoamilases variantes podem ser usadas em aplicações de cozinha, tal como produção de pão e bolo, fermentação, cuidados com a saúde, têxtil, processos de conversão de resíduos ambientais, processamento de biopolpa e aplicações de conversão de biomassa.

Em algumas modalidades, uma composição enzimática incluindo uma glucoamilase variante abrangida pela invenção obtida no meio de cultura ou recuperada e purificada do meio de cultura será opcionalmente usada em combinação com qualquer uma ou uma combinação das seguintes enzimas - alfa amilases, proteases, pululanases, isoamilases, celulasas, hemi-

celulases, xilanases, glicotransferases de ciclodextrina, lipases, fitases, lacases, oxidases, esterases, cutinases, xilanases, enzimas de hidrólise de amido granulares e outras glucoamilases. Em uma modalidade, as proteases são proteases fúngicas ácidas (AFP). Em uma outra modalidade, as proteases fúngicas ácidas são de (por exemplo, NSP-24, vide também US 2006/015342, publicada em 13/7/2006, SEQ ID NO: 10, incorporada por referência). Em uma outra modalidade, a fitase é de *Buttiainiella spp.* (por exemplo, BP-17, vide também variantes divulgadas na publicação de patente PCT WO 2006/043178).

Em algumas composições particularmente preferidas, as glucoamilases variantes da invenção serão combinadas com uma alfa amilase, tal como alfa amilases fúngicas (por exemplo, *Aspergillus sp.*) ou alfa amilases bacterianas (por exemplo, *Bacillus sp.*, tal como *B. stearothermophilus*, *B. amyloliquefaciens* e *B. licheniformis*) e variantes e híbridos das mesmas. Em uma modalidade, a alfa amilase é uma alfa amilase estável ao ácido. Em uma modalidade, a alfa amilase é uma enzima de hidrólise de amido granular (GSHE). Em uma modalidade, a alfa amilase é alfa amilase de *Aspergillus kawachi* (AKAA), vide US 7.037.704. Alfa amilases comercialmente disponíveis consideradas para uso nas composições da invenção são conhecidas e incluem GZYME G997, SPEZYME FRED, SPEZYME XTRA, STAR-GEN (Danisco US, Inc., Genencor Division), TERMAMYL 120-L e SUPRA (Novozymes, Biotech.) e VIRIDIUM (Diversa).

Em outras modalidades preferidas, as glucoamilases variantes da invenção podem ser combinadas com outras glucoamilases. Em algumas modalidades, as glucoamilases da invenção serão combinadas com uma ou mais glucoamilases derivadas de cepas de *Aspergillus* ou variantes das mesmas, tais como *A. oryzae*, *A. niger*, *A. kawachi* e *A. awamori*; glucoamilases derivadas de cepas de *Humicola* ou variantes das mesmas, particularmente *H. grisea*, tal como a glucoamilase tendo pelo menos 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98% e 99% de identidade de sequência à SEQ ID NO: 3 divulgada no WO 05/052148; glucoamilases derivadas de cepas de *Talaromyces* ou variantes das mesmas, particularmente *T. emersonii*; glucoami-

lases derivadas de cepas de *Athelia* e, particularmente, *A. rolfsii*; glucoamilases derivadas de cepas de *Penicillium*, particularmente *P. chrysogenum*.

Usos:

Em particular, as glucoamilases variantes podem ser usadas para processos de conversão de amido e, particularmente, na produção de dextrose para xaropes de frutose, açúcares especiais e na produção de álcool e outros produtos finais (por exemplo, ácido orgânico, ácido ascórbico e aminoácidos) a partir da fermentação de substratos contendo amido (G.M.A van Beynum e outros, Eds. (1985) STARCH CONVERSION TECHNOLOGY, Marcel Dekker Inc. NY). Dextrinas produzidas usando composições de glucoamilase variante da invenção podem resultar em rendimentos de glicose de pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90% e pelo menos 95%. A produção de álcool a partir da fermentação de substratos de amido usando glucoamilases abrangidas pela invenção pode incluir a produção de álcool combustível ou álcool portátil. Em algumas modalidades, a produção de álcool será maior quando a glucoamilase variante é usada sob as mesmas condições que a glucoamilase precursora. Em algumas modalidades, a produção de álcool estará entre cerca de 0,5% e 2,5% no máximo incluindo, mas não limitado a, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1,0%, 1,1%, 1,2%, 1,3%, 1,4%, 1,5%, 1,6%, 1,7%, 1,8%, 1,9%, 2,0%, 2,1%, 2,2%, 2,3% e 2,4% mais álcool do que a glucoamilase precursora.

Em uma modalidade preferida, as glucoamilases variantes da invenção encontrarão uso na hidrólise de amido de vários substratos baseados em planta, os quais são usados para a produção de álcool. Em algumas modalidades preferidas, os substratos baseados em planta incluirão milho, trigo, cevada, centeio, mucilagem, arroz, cana-de-açúcar, batata e combinações dos mesmos. Em algumas modalidades, o substrato baseado em planta será material vegetal fracionado, por exemplo, um grão de cereal, tal como milho, o qual é fracionado em componentes tais como fibra, germe, proteína e amido (endosperma) (USP 6.254.914 e USP 6.899.910). Métodos de fermentação de álcool são descritos em THE ALCOHOL TEXTBOOK, A REFERENCE FOR THE BEVERAGE, FUEL AND INDUSTRIAL ALCOHOL INDUSTRIES, 3ª Ed.,

Eds K.A. Jacques e outros, 1999, Nottingham University Press, Reino Unido. Em determinadas modalidades preferidas, o álcool será etanol. Em particular, processos de produção por fermentação de álcool são caracterizados como processos de trituração a úmido ou trituração a seco. Em algumas modalidades, a glucoamilase variante será usada em um processo de fermentação por trituração a úmido e, em outras modalidades, a glucoamilase variante encontrará uso em um processo de trituração a seco.

A trituração a seco do grão envolve uma série de etapas básicas, as quais geralmente incluem: trituração, cozimento, liquefação, sacarificação, fermentação e separação de líquidos e sólidos para produzir álcool e outros coprodutos. Material vegetal e, particularmente, grãos de cereal integrais, tais como milho, trigo ou centeio, são triturados. Em alguns casos, o grão pode ser primeiro fracionado em partes componentes. O material vegetal triturado pode ser moído para obter uma partícula espessa ou fina. O material vegetal triturado é misturado com líquido (por exemplo, água e/ou vinhaça fina) em um tanque de transformação em pasta. A pasta é submetida à altas temperaturas (por exemplo, 90 °C a 150 °C ou maior) em um forno a jato junto com enzimas de liquefação (por exemplo, alfa amilases) para solubilizar e hidrolisar o amido no grão em dextrinas. A mistura é esfriada e ainda tratada com enzimas de sacarificação, tais como glucoamilases abrangidas pela presente invenção, para produzir glicose. A massa contendo glicose pode, então, ser fermentada durante aproximadamente 24 a 120 horas na presença de micro-organismos de fermentação, tais como micro-organismos que produzem etanol e, particularmente, levedo (*Saccharomyces* spp). Os sólidos na massa são separados da fase líquida e álcool, tal como etanol e outros coprodutos úteis, tais como grãos de destilaria, são obtidos.

Em algumas modalidades, a etapa de sacarificação e a etapa de fermentação são combinadas e o processo é referido como sacarificação e fermentação simultânea ou sacarificação, propagação de levedo e fermentação simultâneas.

Em outras modalidades, a glucoamilase variante é usada em um processo para hidrólise de amido, em que a temperatura do processo está

entre 30 °C e 75 °C e também em uma temperatura de entre 40 °C e 65 °C em uma faixa de pH de entre um pH de 3,0 e um pH de 6,5. Os processos de fermentação, em algumas modalidades, incluem trituração de um grão de cereal ou grão fracionado e combinação do grão de cereal triturado com líquido para formar uma pasta a qual é, então, misturada em um único vaso com uma glucoamilase variante de acordo com a invenção e, opcionalmente, outras enzimas tais como, mas não limitado a, alfa amilases, outras glucoamilases, fitases, proteases, pululanases, isoamilases ou outras enzimas tendo atividade de hidrólise de amido granular e levedo para produzir etanol e outros coprodutos (USP 4.514.496, WO 04/081193 e WO 04/080923).

Em algumas modalidades, a invenção refere-se a um método de sacarificação de uma solução de amido líquida, o qual compreende uma etapa de sacarificação enzimática usando uma glucoamilase variante da invenção.

A presente invenção também proporciona uma ração para animal compreendendo pelo menos uma glucoamilase variante abrangida pela invenção. Métodos de uso de uma enzima glucoamilase na produção de rações compreendendo amido são fornecidos no WO 03/049550, depositado em 13 de Dezembro de 2002 (aqui incorporado por referência em sua totalidade). Resumidamente, a variante de glucoamilase é misturada com uma ração compreendendo amido. A glucoamilase é capaz de degradar o amido resistente para uso pelo animal.

Outros objetivos e vantagens da presente invenção são evidentes a partir da presente Especificação.

25 **EXPERIMENTAL**

Na descrição e seção experimental a qual segue, as seguintes abreviações se aplicam: GA (glucoamilase); GAU (unidade de glucoamilase); % em peso (percentual em peso); °C (graus Centígrados); rpm (revoluções por minuto); H₂O (água); dH₂O (água desionizada); dIH₂O (água desionizada, filtração Milli-Q); aa ou AA (aminoácido); bp (par de base); kb (par de quilobase); kD (quilodaltons); g ou gm (gramas); µg (microgramas); mg (miligramas); µL (microlitros); ml e mL (mililitros); mm (milímetro); µm (micrôme-

tro); M (molar); mM (milimolar); μ M (micromolar); U (unidades); V (volts); MW (peso molecular); seg(s) ou s(s) (segundo/segundos); min(s) ou m(s) (minuto/minutos); hr(s) ou h(s) (hora/horas); DO (oxigênio dissolvido); ABS (Absorbância); EtOH (etanol); PSS (solução salina fisiológica); m/v (massa/volume); e MTP (lâmina de microtitulação); N (Normal); DP1 (monossacarídeos); DP2 (dissacarídeos); DP>3 (oligossacarídeos, açúcares tendo um grau de polimerização maior do que 3); ppm (partes por milhão).

Os métodos usados para proporcionar as variantes são descritos abaixo. Contudo, deve ser notado que diferentes métodos podem ser usados para proporcionar as variantes de uma molécula precursora e a invenção não está limitada aos métodos usados nos exemplos. Pretende-se que qualquer meio adequado para fazer variantes e classificação de variantes possa ser usado.

Ensaio de atividade de glucoamilase pNPG para lâminas de microtitulação com 96 cavidades:

As soluções de reagente foram: tampão de NaAc: tampão de acetato de sódio a 200 mM, pH de 4,5; substrato: p-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (Sigma N-1377) a 50 mM em tampão de NaAc (0,3 g/20 ml) e solução de término: tampão de glicina-NaOH a 800 mM, pH de 10. 30 μ l de sobrenadante filtrado foram colocados em uma MTP de fundo plano com 96 cavidades nova. A cada cavidade, 50 μ l de tampão de NaAc e 120 μ l de substrato foram adicionados e incubados durante 30 minutos a 50°C (Thermolab Systems iEMS Incubator/shaker HT). A reação foi terminada através da adição de 100 μ l de solução de término. A absorbância foi medida a 405 nm em um leitor para MTP (Molecular Devices Spectramax 384 plus) e a atividade foi calculada usando um coeficiente de extinção molar de 0,011 μ M/cm.

Ensaio de estabilidade térmica:

Sobrenadante bruto (100 μ l) foi adicionado a 100 μ l de tampão de NaAc a 50 mM, pH de 4,5. A amostra foi igualmente dividida sobre 2 MTP. Uma MTP (lâmina inicial) foi incubada durante 1 hora a 4 °C e a outra MTP (lâmina residual) foi incubada a 60 °C (Thermolab Systems iEMS Incu-

bator/Shaker HT) durante 1 hora. A lâmina residual foi rapidamente esfriada durante 15 min sobre gelo. A atividade é medida usando o ensaio de aplicação de etanol descrito abaixo, com a seguinte modificação: a quantidade de amostra tomada para o ensaio de termoestabilidade é de 25 µl e a quantidade de tampão de NaAc a 30 mM, pH de 4,0, é de 35 µl.

A termoestabilidade é calculada como atividade residual % como segue:

$\text{ABS (340) residual - placebo} \times 100$

$\text{ABS (340) inicial - placebo}$

O material sobrenadante bruto é testado com relação à glicose restante no meio de cultura após o período de crescimento. Se glicose restante é encontrada, o valor de absorvância é subtraído dos valores de absorvância medidos da atividade inicial, bem como a atividade residual.

Ensaio de Bradford para quantificação de proteína em lâminas de microtitulação com 96 cavidades:

A solução reagente era solução de trabalho Bradford Quickstart (BioRad cat#500-0205). 100 µl de sobrenadante filtrado a 10 kD foram colocados em uma lâmina de fundo plano com 96 cavidades. A cada cavidade, 200 µl de reagente foram adicionados e incubados durante 5 minutos em temperatura ambiente. A absorvância foi medida a 595 nm em um leitor para MTP (Molecular Devices Spectramax 384 plus). As concentrações de proteína foram calculadas de acordo com uma curva padrão de Albumina de Soro Bovino (BSA) (0-50 µg/ml).

Ensaio de atividade de hexoquinase:

Coquetel de hexoquinase: 10 a 15 minutos antes de uso, 90 ml de água foram adicionados a um recipiente BoatIL de glicose HK R1 (kit de teste de glicose IL (HK), Instrument Laboratory nº 182507-40) e gentilmente misturados. 85 µl de coquetel de hexoquinase foram adicionados a 100 µl de dH₂O. 15 µl de amostra foram adicionados às misturas e incubados durante 5 mins no escuro em temperatura ambiente. A absorvância foi lida a 340 nm em um leitor para MTP. As concentrações de glicose foram calculadas de acordo com uma curva padrão de glicose (0 a 1 mg/ml).

Condições do ensaio de aplicação de etanol:

Solução de estoque a 8%: 8 g de amido de milho solúvel (Sigma #S4180) foram suspensos em 40 ml de dH₂O em temperatura ambiente. 50 ml de dH₂O em ebulição foram adicionados à pasta em um frasco de 250 ml e cozidos durante 5 min. A solução de amido foi esfriada para 25°C e o volume ajustado para 100 ml com dH₂O.

Solução de término: tampão de glicina-NaOH a 800 mM, pH de 10,0.

Solução de trabalho de amido solúvel a 4% (p/v): solução de estoque foi diluída (1:1) com tampão de acetato de sódio a 100 mM, pH de 4,0.

50 µl de tampão de NaAc a 30 mM, pH de 4,0, foram colocados em uma lâmina de fundo plano com 96 cavidades. A cada cavidade, 120 µl de amido de milho solúvel a 4% e 10 µl de sobrenadante filtrado a 10 kD foram adicionados e incubados durante 2 horas a 32°C, 900 rpm (Thermolabsystems iEMS Incubator/Shaker HT). A reação foi cessada através da adição de 90 µl de solução de término gelada a 4 °C. A amostra foi colocada sobre gelo. O amido foi centrifugado a 716 xg a 15°C durante 5 min (SIGMA 6K15) e 15 µl de sobrenadante foram usados no ensaio de atividade de hexoquinase descrito acima para determinar o teor de glicose.

Condições de ensaio de aplicação de adoçante:

Solução de estoque a 8%: 8 g de amido solúvel (Sigma #S4180) foram suspensos em 40 ml de água em temperatura ambiente. 50 ml de dH₂O em ebulição foram adicionados à pasta em um frasco de 250 ml e cozidos durante 5 mins. A solução de amido foi esfriada para 25°C e o volume ajustado para 100 ml com dH₂O.

Solução de término: tampão de glicina-NaOH a 800 mM, pH de 10,0.

Solução de trabalho de amido solúvel a 4% (p/v): solução de estoque foi diluída (1:1) com tampão de acetato de sódio a 100 mM, pH de 4,5.

50 µl de tampão de NaAc a 80 mM, pH de 4,5, foram colocados em uma lâmina de fundo plano com 96 cavidades. A cada cavidade, 120 µl de amido de milho solúvel a 4% e 5 µl de sobrenadante filtrado a 10 kD fo-

ram adicionados e incubados durante 1 hora a 60 °C. A reação foi cessada através da adição de 90 µl de solução de término gelada a 4 °C. A amostra foi colocada sobre gelo durante 30 mins. O amido foi centrifugado a 716 rpm a 15°C durante 5 mins (SIGMA 6K15, centrífuga) e 15 µl de sobrenadante foram usados no ensaio de atividade de hexoquinase descrito aqui para determinar o teor de glicose.

EXEMPLOS

Os exemplos a seguir são fornecidos de forma a demonstrar e ilustrar adicionalmente determinadas modalidades e aspectos preferidos da invenção e não devem ser construídos como limitando o escopo da mesma.

Exemplo 1: Construção do vetor pREP3Y-TrGA

O cassete de expressão de TrGA composto da sequência de DNA (SEQ ID NO: 4) que codifica o peptídeo sinalizador de TrGA, a pró-sequência e a proteína madura, incluindo o domínio catalítico, região ligante e domínio de ligação a amido, foi clonado no pDONR®201, um vetor de Entrada Gateway® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). O cassete de expressão de TrGA foi clonado no vetor de destino compatível Gateway pREP3Y-DEST (Fig 3) através da reação de recombinação Gateway® LR.

O vetor de expressão pRep3Y-TrGA (figura 3B) permitiu a expressão da proteína de TrGA (SEQ ID NO: 2) em *Schizosaccharomyces pombe*.

Sessenta e cinco bibliotecas de mutagênese sítio-saturada de TrGA (SSM) foram construídas usando o vetor de entrada pDONR-TrGA (Fig 2) como uma *padrão* e os iniciadores listados na tabela 2. Os iniciadores de mutagênese usados nos experimentos contêm o código de sequência de DNA triplo NNS (N = A, C, T, G e S = C ou G) na posição que corresponde ao códon da sequência de TrGA a sofrer mutação (SEQ ID NO: 2) e iniciou a incorporação aleatória de nucleotídeos nessa posição. Construção de cada biblioteca de SSM começou com duas amplificações por PCR usando o iniciador de mutagênese (pDONR201 - FW) dianteiro específico para Gateway (tabela 3) e o iniciador reverso para Gateway (pDONR201 - RV) iniciador e um iniciador de mutagênese dianteiro específico (tabela 2) (posições iguais

para os iniciadores de mutagênese). DNA polimerase Phusion High Fidelity (Finnzymes OY, Espoo, Finlândia) foi usada para amplificação por PCR (iniciadores a 0,2 μ M, 25 ciclos) de acordo com o protocolo fornecido pela Finnzymes. Resumidamente, 1 μ l de fragmento de DNA (SEQ ID NO: 1) de
 5 ambas as misturas de PCR específicas, objetivados ao mesmo códon, foi adicionado a 48 μ l de solução de reação de PCR fresca junto com os iniciadores Gateway FW e Gateway RV (Invitrogen) e misturados. Essa amplificação por PCR de fusão (22 ciclos) resultou em um fragmento de DNA de casete linear com um códon de TrGA com mutação aleatória e sítios de re-
 10 combinação Gateway únicos sobre ambas as extremidades. Purificação desse fragmento de DNA (ChargeSwitch® PCR Clean-up, Invitrogen, Carlsbad EUA) e uma reação de recombinação BP (Invitrogen, Carlsbad, EUA) com pDONR201 (Invitrogen) gerou DNA multimérico circular (vetor de entrada) que foi subsequentemente transformado em *E. coli* Max Efficiency DH5a
 15 (Invitrogen) e colocado sobre 2x meio TY [16 g/L de Triptona Bacto (Difco), 10 g/L de Extrato de Levedo Bacto (Difco), 5 g/L de NaCl] suplementado com 50 μ g/mL de canamicina.

tabela 2 - Iniciadores dianteiros usados para gerar bibliotecas SSM de TrGA

Iniciador	Sequência de DNA 5' para 3'	SEQ ID NO:
pDONR 201-FW	TCGCGTTAACGCTAGCATGGATCTC	10
D4F	TCTGTTGACNNSTTCATCAGCACCGAGACGC	11
F5F	TCTGTTGACGACNNSATCAGCACCGAGACGCCTA	12
I12F	ATCAGCACCGAGACGCCTNNSGCACTGAACAATCTTCTTT	13
D24F	CTTTGCAATGTTGGTCCTNNSGGATGCCGTGCATTCGGCA	14
F29F	CCTGATGGATGCCGTGCANNSSGGCACAT-CAGCTGGTGCGG	15
I43F	ATTGCATCTCCCAGCACANNSSGACCCGGACTACTATTACA	16
D44F	GCATCTCCCAGCACAAATTNNSCCGGACTACTATTACATGT	17
P45F	TCTCCCAGCACAAATTGACNNSGACTACTATTACATGTGGA	18
D46F	CCCAGCACAAATTGACCCGNNSTACTATTACATGTGGACGC	19
Y47F	AGCACAAATTGACCCGGACNNSTATTACATGTGGACGCGAG	20

Iniciador	Sequência de DNA 5' para 3'	SEQ ID NO:
Y49F	ATTGACCCGGACTACTAT NNS ATGTGGACGCGAGATAGCG	21
W51F	CCGGACTACTATTACAT GNN SACGCGAGATAGCGCTCTTG	22
Y70F	GACCGCTTCACCGAAAC GNN SGATGCGGGCCTG-CAGCGCC	23
Q75F	ACGTACGATGCGGGCCT GNN SCGCCGCATCGAGCAGTA-CA	24
R76F	TACGATGCGGGCCTGCAG NN SCGCATCGAGCAGTACAT-TA	25
P94F	CTCCAGGGCCTCTCTAAC NN STCGGGCTCCCTCGCG-GACG	26
D100F	CCCTCGGGCTCCCTCGCG NN SGGCTCTGGTCTCGGC-GAGC	27
K114F	AAGTTTGAGTTGACCCT GNN SCCTTTCACCGGCAACTGGG	28
F116F	GAGTTGACCCTGAAGCCT NN SACCGGCAACTGGGGTC-GAC	29
N119F	CTGAAGCCTTTCACCGGC NN STGGGGTCGACCG-CAGCGGG	30
R122F	TTCACCGGCAACTGGGGT NN SCCGCAGCGGGATGGCC-CAG	31
R125F	AACTGGGGTCGACCGCAG NN SGATGGCCCAGCTCTGC-GAG	32
N146F	AAGTGGCTCATCAACAAC NN STATCAGTCGACTGTGTCCA	33
Q148F	CTCATCAACAACAAC TATNN STCGACTGTGTCCAACGTCA	34
Y169F	CTCAACTATGTTGCCAG NN STGGAACCAAACCGGCTTTG	35
Q172F	GTTGCCCAGTACTGGAAC NN SACCGGCTTTGACCTCTGGG	36
F175F	TACTGGAACCAAACCGGC NN SGACCTCTGGGAAGAAGT-CA	37
W178F	CAAACCGGCTTTGACCTC NN SGAAGAAGTCAATGGGAGCT	38
E180F	GGCTTTGACCTCTGGGA NN SGTCAATGGGAGCTCATTCT	39
V181F	TTTGACCTCTGGGAAGA NN SAATGGGAGCTCATTCTTTA	40
Q208F	CTTGCTGCCACTCTTG GNN STCGGGAAGCGCTTATTCAT	41
S211F	ACTCTTGGCCAGTCGGG NN SGCTTATTCATCTGTTGCTC	42
W228F	TGCTTTCTCCAACGATTC NN SGTGTCGTCTGGTGGATACG	43
N242F	GACTCCAACATCAACACC NN SGAGGGCAGGACTGGCAAGG	44
E243F	TCCAACATCAACACCAAC NN SGGCAGGACTGGCAAG-GATG	45
R245F	ATCAACACCAACGAGGGC NN SACTGGCAAGGATGTCAACT	46

Iniciador	Sequência de DNA 5' para 3'	SEQ ID NO:
I292F	GTCGACTCCTTCCGCTCC NN STACGGCGTGAACAAGGG-CA	47
G294F	TCCTTCCGCTCCATCTAC NN SGTGAACAAGGGCATTCTG	48
K297F	TCCATCTACGGCGTGAAC NN SGG-CATTCTGCGCGGTGCTG	49
R309F	GCTGCCGTCGCCATTGGC NN STATGCAGAGGATGTGTACT	50
Y310F	GCCGTCGCCATTGGCCGG NN SGCAGAGGATGTGTACTA-CA	51
D313F	ATTGGCCGGTATGCAGAG NN SGTGTACTACAACGGCAACC	52
V314F	GGCCGGTATGCAGAGGAT NN STACTACAACGGCAACCCTT	53
Y315F	CGGTATGCAGAGGATGTG NN STACAACGGCAACCCTTGGT	54
Y316F	TATGCAGAGGATGTGTAC NN SAACGGCAACCCTTGGTATC	55
N317F	GCAGAGGATGTGTACTAC NN SGGCAACCCTTGGTATCTTG	56
W321F	TACTACAACGGCAACCCT NN STATCTTGCTACATTTGCTG	57
K340F	GATGCCATCTACGTCTGG NN SAAGACGGGCTCCAT-CACGG	58
K341F	GCCATCTACGTCTGGAAG NN SACGGGCTCCATCACGGT-GA	59
T350F	TCCATCACGGTGACCGCC NN STCCCTGGCCTTCTTCCAG	60
Q356F	ACCTCCCTGGCCTTCTT NN SGAGCTTGTTCTTGGCGTGA	61
T363F	GAGCTTGTTCTTGGCGTG NN SGCCGGGACCTACTCCAGCA	62
S368F	GTGACGGCCGGGACCTAC NN SAGCAGCTCTTCGACCTTTA	63
S369F	ACGGCCGGGACCTACTCC NN SAGCTCTTCGACCTTTACCA	64
N376F	AGCTCTTCGACCTTTACC NN SATCATCAACGCCGTCTCGA	65
Y395F	CTCAGCGAGGCTGCCAAG NN SGTCCCCGCC-GACGGTTCGC	66
A398F	GCTGCCAAGTACGTCCCC NN SGACGGTTCGCTGGCC-GAGC	67
S401F	TACGTCCCCGCCGACGGT NN SCTGGCCGAGCAGTTT-GACC	68
R408F	CTGGCCGAGCAGTTTGAC NN SAACAGCGG-CACTCCGCTGT	69
N409F	GCCGAGCAGTTTGACCGC NN SAGCGG-CACTCCGCTGTCTG	70
T412F	TTTGACCGCAACAGCGGC NN SCCGCTGTCTGCGCTT-CACC	71
H418F	ACTCCGCTGTCTGCGCT NN SCTGACGTGGTCGTACGCCT	72

Iniciador	Sequência de DNA 5' para 3'	SEQ ID NO:
W421F	TCTGCGCTTCACCTGACGNNSTCGTACGCCTCGTTCTTGA	73
R433F	TTGACAGCCACGGCCCGTNNSGCTGG-CATCGTGCCCCCT	74
I436F	ACGGCCCGTCGGGCTGGCNNSGTGCCCCCTCGTGGGC CA	75
S451F	AGCGCTAGCACGATCCCCNN-SACGTGCTCCGGCGCGTCCG	76

tabela 3 - Iniciadores usados para gerar bibliotecas SSM de TrGA

Iniciador	Sequência de DNA 5' para 3'	SEQ ID NO:
pDON201-RV	GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC	77
D4R	GCGTCTCGGTGCTGATGAASNNGTCAACAGA	78
F5R	TAGGCGTCTCGGTGCTGATSNNGTCTCGTCAACAGA	79
I12R	AAAGAAGATTGTTTCAGTGCSNAGGCGTCTCGGTGCTGAT	80
D24R	TGCCGAATGCACGGCATCCSNNAGGACCAACATTGCA-AAG	81
F29R	CCGCACCAGCTGATGTGCCSNNTGCACGGCATCCAT-CAGG	82
I43R	TGTAATAGTAGTCCGGGTCSNNTGTGCTGGGAGATG-CAAT	83
D44R	ACATGTAATAGTAGTCCGGSNNAATTGTGCTGGGA-GATGC	84
P45R	TCCACATGTAATAGTAGTCSNNGTCAATTGTGCTGGGA-GA	85
D46R	GCGTCCACATGTAATAGTASNCGGGTCA-ATTGTGCTGGG	86
Y47R	CTCGCGTCCACATGTAATASNNGTCCGGGTCA-ATTGTGCT	87
Y49R	CGCTATCTCGCGTCCACATSNNATAGTAGTCCGGGTCA-AT	88
W51R	CAAGAGCGCTATCTCGCGTSNNCATGTAATAG-TAGTCCGG	89
Y70R	GGCGCTGCAGGCCCGCATCSNNCGTTTCGGTGA-AGCGGTC	90
Q75R	TGTACTGCTCGATGCGGCGSNNCAGGCCCGCATCG-TACGT	91

Iniciador	Sequência de DNA 5' para 3'	SEQ ID NO:
R76R	TAATGTACTGCTCGATGCGSNNCTGCAGGCCCG- CATCGTA	92
P94R	GGTCCGCGAGGGAGCCCGASNNGTTAGA- GAGGCCCTGGAG	93
D100R	GCTCGCCGAGACCAGAGCCSNNCGCGAGGGAGCCC- GAGGG	94
K114R	CCCAGTTGCCGGTGAAAGGSNNCAGGGTCAACTCAA- ACTT	95
F116R	GTCGACCCCAGTTGCCGGTSNNAGGCTTCAGGGTCA- ACTC	96
N119R	CCCGCTGCGGTGCGACCCASNNGCCGGTGAAAGGCTT- CAG	97
R122R	CTGGGCCATCCCGCTGCGGSNNACCC- CAGTTGCCGGTGAA	98
R125R	CTCGCAGAGCTGGGCCATCSNNCTGCGGTGCGACCC- CAGTT	99
N146R	TGGACACAGTCGACTGATASNNGTTGTTGATGAGC- CACTT	100
Q148R	TGACGTTGGACACAGTCGASN NATAGTTGTTGTTGAT- GAG	101
Y169R	CAAAGCCGGTTTGGTTCCASNCTGGGCAACATAGTT- GAG	102
Q172R	CCCAGAGGTCAAAGCCGGTSNNGTTCCAGTACTGGG- CAAC	103
F175R	TGACTTCTTCCCAGAGGTCSNNGCCGGTTTGGTTCCAG- TA	104
W178R	AGCTCCCATTTGACTTCTTCSNNGAGGTCAA- AGCCGGTTTG	105
E180R	AGAATGAGCTCCCATTTGACSNNTTCCCAGAGGTCAA- AGCC	106
V181R	TAAAGAATGAGCTCCCATTSNNTTCTTCCCAGAGGTCA- AA	107
Q208R	ATGAATAAGCGCTTCCCGASNNGCCAAGAGTGGCAG- CAAG	108
S211R	GAGCAACAGATGAATAAGCSNNTCCCGACTGGCCAA- GAGT	109
W228R	CGTATCCACCAGACGACACSNNGAATCGTTGGAGAA- AGCA	110

Iniciador	Sequência de DNA 5' para 3'	SEQ ID NO:
N242R	CCTTGCCAGTCCTGCCCTCSNNGGTGTTGATGTTG- GAGTC	111
E243R	CATCCTTGCCAGTCCTGCCSNGTTGGTGTGATGTTG- GA	112
R245R	AGTTGACATCCTTGCCAGTSNNGCCCTCGTTGGTGT- GAT	113
I292R	TGCCCTTGTTACGCCGTASNNGGAGCGGAAGGAGTC- GAC	114
G294R	CAGGAATGCCCTTGTTACSNNGTAGATGGAGCGGA- AGGA	115
K297R	CAGCACCGGCAGGAATGCCSNGTTACGCCGTA- GATGGA	116
R309R	AGTACACATCCTCTGCATASNNGCCAATGGCGACGG- CAGC	117
Y310R	TGTAGTACACATCCTCTGCSNNCCGGCCAATGGC- GACGGC	118
D313R	GGTTGCCGTTGTAGTACACSNNCTCTGCATACCGGC- CAAT	119
V314R	AAGGGTTGCCGTTGTAGTASN NATCCTCTGCA- TACCGGCC	120
Y315R	ACCAAGGGTTGCCGTTGTASN NCACATCCTCTGCA- TACCG	121
Y316R	GATACCAAGGGTTGCCGTTSNNGTACACATCCTCTGCA- TA	122
N317R	CAAGATACCAAGGGTTGCCSNGTAGTACA- CATCCTCTGC	123
W321R	CAGCAAATGTAGCAAGATASNAGGGTTGCCGTTGTAG- TA	124
K340R	CCGTGATGGAGCCCGTCTTSNNCCAGACGTAGATGG- CATC	125
K341R	TCACCGTGATGGAGCCCGTSNNCTTCCAGACGTA- GATGGC	126
T350R	CCTGG AAG AAGGCCAGGGASNNGGCGGTCACCGT- GATGGA	127
Q356R	TCGAGACGGCGTTGATGATSNNGGTAAAGGTCGAA- GAGCT	128
T363R	TGCTGGAGTAGGTCCCGGCSNNCACGCCAGGAACA- AGCTC	129

Iniciador	Sequência de DNA 5' para 3'	SEQ ID NO:
S368R	TAAAGGTCGAAGAGCTGCTSNNGTAGGTCCCGGCCGT-CAC	130
S369R	TGGTAAAGGTCGAAGAGCTSNNGGAG-TAGGTCCCGGCCGT	131
N376R	TCGAGACGGCGTTGATGATSNNGGTAAAGGTCGAA-GAGCT	132
Y395R	GCGAACCGTCGGCGGGGACSNNCTTGG-CAGCCTCGCTGAG	133
A398R	GCTCGGCCAGCGAACCGTCSNNGGGGACGTACTTGG-CAGC	134
S401R	GGTCAAACCTGCTCGGCCAGSNNACCGTCGGCGGG-GACGTA	135
R408R	ACAGCGGAGTGCCGCTGTTSNNGTCAAACCTGCTCGGC-CAG	136
N409R	CAGACAGCGGAGTGCCGCTSNNGCGGTCAA-ACTGCTCGGC	137
T412R	GGTGAAGCGCAGACAGCGGSNNGCCGCTGTTGCGGT-CAAA	138
H418R	AGGCGTACGACCACGTCAGSNNAAAGCGCAGACAGCG-GAGT	139
W421R	TCAAGAACGAGGCGTACGASNCGTCAGGTGAAGCG-CAGA	140
R433R	AGGGGGGCACGATGCCAGCSN-NACGGGCCGTGGCTGTCAA	141
I436R	TGGCCACGAGGGGGGCACSNNGCCAGCCC-GACGGGCCGT	142
S451R	CGGACGCGCCGGAGCACGTSNNGGGGATCGTGC-TAGCGCT	143

Para cada biblioteca, após incubação durante a noite a 37°C, colônias foram empoçadas através de resuspensão dos clones em PSS. Dos transformantes de *E. coli* empoçados, plasmídeo total foi isolado (Qiagen) usando técnicas padrões. Resumidamente, 1 µl da solução de plasmídeo foi adicionado a 1 ml de solução de vetor de destino pRep3Y (figura1A) e adicionado à mistura de enzima LR clonase® II de acordo com o protocolo fornecido pela Invitrogen. Um DNA multimérico circular foi gerado e transformado em *E. coli* Max Efficiency DH5a, conforme descrito pelo fornecedor.

Após incubação durante a noite a 37°C, 96 colônias simples de cada biblioteca foram selecionadas a partir de lâminas de ágar 2xTY com 100 µg/ml de ampicilina e crescidas durante 24 horas a 37°C em MTP contendo 200 µL de 2x meio TY com 100 µg/ml de ampicilina. As culturas foram

5 usadas para análises de sequência (BaseClear B.V., Leiden, Países Baixos).

Os números das bibliotecas oscilavam de 1 a 65, com uma adição referente ao códon da sequência da TrGA que sofre mutação aleatória. Após classificação, cada biblioteca incluía um máximo de 19 variantes de TrGA. Essas variantes foram individualmente transferidas para *Schizosac-*

10 *charomyces pombe* de acordo com a instrução dos fabricantes (Zymo Research, Orange CA. EUA).

Transformações de *S. pombe* foram feitas em lâminas sobre meio seletivo (Ágar EMM, Qbiogene, Irvine, EUA Cat. No. 4110-232) e incubadas a 28°C durante 4 dias. Os transformantes foram purificados da lâmina

15 de transformação dispersando as colônias sobre Ágar EMM.

Exemplo 2: descrição das condições de crescimento e pré-tratamento de amostra

Transformantes de *S. pombe* foram inoculados em lâminas de microtitulação com 96 cavidades (MTP) contendo meio seletivo (2x EMM-C)

20 [64,4 g/L de Caldo EMM (Qbiogene Cat. No: 4110-032), 0,62 g/L de Mistura de Suplemento Completa (CSM-HIS-LEU-TRP, Qbiogene, Cat. No. 4530-122)] e incubados durante a noite a 28°C. Da lâmina de microtitulação incubada durante a noite, 200 µl de cultura de *S. pombe* em crescimento foram inoculados em 20 ml de 2x meio líquido EMM-C em um frasco de agitação

25 de 100 ml e incubados durante 4 dias a 26°C a 280 rpm em uma incubadora de agitação Multitron (Infors AG, Bottmingen, Suíça). A cultura em crescimento, 2 ml de cultura de *S. pombe* foram coletados e centrifugados durante 5 min a 14.000 rpm (Sigma). O sobrenadante foi transferido para um conjunto de filtro Vivaspín 500 HT de 10 kD (VivaScience AG, Hannover, Alemanha)

30 e centrifugado durante 25 min a 1000 g. O retentado foi diluído novamente para o volume inicial com NaAc a 50 mM, pH de 4,5, suplementado com Tween 80 a 0,015%. Essa solução foi usada nos diferentes ensaios.

Exemplo 3: construção de uma biblioteca combinatorial de 4 variantes de TrGA

(A) Experimentos foram conduzidos para a construção de variantes de TrGA trazendo combinações das seguintes mutações em um único sítio: Q172F; Q208N; S211R e V314H. Uma revisão das variantes é mostrada abaixo:

- a) Q172F; Q208N
- b) Q172F; S211R
- c) Q172F; V314H
- d) Q208N; S211R
- e) Q208N; V314H
- f) S211R; V314H
- g) Q172F; Q208N; S211R
- h) Q172F; Q208N; V314H
- i) Q172F; S211R; V314H
- j) Q208N; S211R; V314H
- k) Q172F; Q208N; S211R; V314H

O kit de mutagênese multi sítio-dirigida Quikchange® (QCMS) (Stratagene) foi usado para construir a biblioteca. Os iniciadores 5' fosforilados usados para criar a biblioteca são mostrados na tabela 4. Resultados ótimos em termos de incorporação de iniciadores de comprimento total, bem como redução significativa nos erros iniciador-derivados foram obtidos através do uso de HPLC, PAGE ou qualquer outro tipo de iniciadores purificados (Invitrogen).

tabela 4

Iniciador	Sequência	SEQ ID NO:
143R	GCATCTCCCAGCACACGAGACCCGGACTACTAT	144
143Y	GCATCTCCCAGCACATACGACCCGGACTACTAT	145
R76L	GATGCGGGCCTGCAGCTGCGCATCGAGCAGTAC	146
N119T	CTGAAGCCTTTCACCGGCACCTGGGGTCGACCG-CAGCGGG	147

Iniciador	Sequência	SEQ ID NO:
N119Y	TGAAGCCTTTCACCGGCTACTGGGGTCGACCG-CAGCGGG	148
N119D	CTGAAGCCTTTCACCGGCGACTGGGGTCGACCG-CAGCGGG	149
N146	AGTGGCTCATCAACAACGASTATCAGTCGACTGTGT	150
N146T	AGTGGCTCATCAACAACACCTATCAGTCGACTGTGT	151
N146W	GTGGCTCATCAACAATGGTATCAGTCGACTGTGT	152
N146L	AGTGGCTCATCAACAACCTGTATCAGTCGACTGTGT	153
N146S	AGTGGCTCATCAACAACCTCCTATCAGTCGACTGTGT	154
Q172D/E	TTGCCCAGTACTGGAACGASACCGGCTTT-GACCTCTGG	155
Q172V/L	TTGCCCAGTACTGGAACSTGACCGGCTTT-GACCTCTGG	156
Q172T	TTGCCCAGTACTGGAACACCACCGGCTTT-GACCTCTGG	157
Q172R	TTGCCCAGTACTGGAACCGAACCGGCTTT-GACCTCTGG	158
Q172C	TTGCCCAGTACTGGAACCTGCACCGGCTTT-GACCTCTGG	159

O plasmídeo *padrão* pDONR-TrGA (figura 2) foi usado para construir a biblioteca combinatorial usando o kit QCMS da Stratagene. A biblioteca foi construída conforme descrito pelo fornecedor, com concentrações de iniciador modificadas usadas nas reações. Especificamente, 4 µl de pDONR-TrGA (25-50 ng) foram misturados com 11 µl de água destilada estéril; 1,5 µl de dNTP; 2,5 µl de 10x tampão QCMS; 1 µl de mistura de enzima e 1 µl de cada mistura de iniciador mutante, proporcionando um total de 100 ng de iniciadores em cada reação. As condições de PCR foram 95°C durante 1 min, seguido por 30 ciclos de 95 °C durante 1 min, 55°C durante 1 min e 65°C durante 6 min, em um termociclizador MJ Research usando tubos de PCR de 0,2 ml com parede fina. O produto da reação foi digerido com 1 µl de Dpn1 do kit QCMS através de incubação a 37°C durante a noite. Um kit de purificação por PCR (Qiagen) foi usado para purificação da amostra e um segundo ciclo de digestão foi realizado com Dpn1 (Stratagene) durante 1

hora a 37°C.

A mistura de reação foi transformada em *E. coli* Max Efficiency DH5 α (Invitrogen) e colocada sobre Ágar seletivo (2xTY suplementado com 50 μ g de canamicina/ml). Após incubação durante a noite a 37°C, 96 colônias simples foram selecionadas para análise de sequência (BaseClear B.V., Leiden, Países Baixos). As variantes combinatoriais foram clonadas e expressas em uma cepa hospedeira de *T. reesei*, conforme descrito abaixo e no WO 06/060062.

(B) Mais seis bibliotecas combinatoriais (tabela 5) foram feitas sinteticamente pela Geneart (Regensburg, Alemanha) e foram testadas com relação à estabilidade térmica e em ensaios de aplicação de adoçante e etanol, conforme descrito aqui.

tabela 5. bibliotecas combinatoriais

1	D24E,L/I43F,R/D44H,N/F175H/V181K,L/V314D,H,K/ T363R
2	D24L,W,Y/Q208F/I292F,L,N,V/G294A,I,Q/K297A/Y310F, Q,R
3	V181F,K,L/E243A,N,M,R,Y/I292F,L,N,V/K297A,D,H,M,N,Q/N317H/Y395 Q,R
4	D24E,L,Y/V181F,K,L/Q208C/F/G294A,I,Q/T363R/N376Q/N409K,W
5	D24E,L,Y/V181F,K,L/I292F,L,N,V/G294A,I,Q/E243A,M,N,R,Y/N409K,W
6	I43R/E243A,M,N,R,Y/I292F,L,N,V/G294/K297A,D,H,M,N,Q,S,R,W,Y

Exemplo 4: variantes com estabilidade térmica aperfeiçoada

A molécula de TrGA precursora, sob as condições descritas, tinha uma atividade residual entre 15 e 44% (variação dia a dia). O índice de desempenho foi calculado baseado na termoestabilidade da TrGA do mesmo lote. Os índices de desempenho são os quocientes PI = (atividade residual da variante)/(atividade residual da TrGA). Um índice de desempenho > 1 indica uma estabilidade aperfeiçoada. Variantes as quais têm um índice de desempenho de estabilidade térmica de mais de 1,0 são mostradas na tabela 6 a seguir.

tabela 6 - Classificação de estabilidade térmica

Variante	Estabilidade térmica, 60 °C, pH de 4,5
D4P	1,05

I12E	1,09
I12Y	1,40
D24L	1,09
D24W	1,13
D24Y	1,03
I43R	1,28
D44N	1,06
D44Q	1,10
Q75N	1,09
R76K	1,03
N146D	1,20
N146E	1,24
N146L	1,10
N146V	1,28
N146W	1,17
Q148D	1,02
F175I	1,02
F175Y	1,06
E180A	1,41
E180D	1,02
E180G	1,13
E180I	1,41
E180L	1,38
E180M	1,10
E180N	1,27
E180Q	1,72
E180R	1,59
E180V	1,08
E180W	1,30
E180Y	1,31
V181I	1,20
V181K	1,12
V181L	1,06

V181Q	1,09
V181R	1,07
Q208F	1,06
Q208T	1,17
Q208V	1,15
S211D	1,10
S211E	1,02
S211I	1,31
S211M	1,90
E243A	1,19
E243H	1,04
E243M	1,53
E243N	1,35
E243P	1,06
E243R	1,21
E243S	1,09
E243T	1,48
E243Y	1,43
I292F	1,17
I292L	1,10
I292N	1,31
I292V	1,02
G294A	1,30
G294C	1,41
G294D	1,31
G294E	1,34
G294H	1,17
G294I	2,15
G294L	2,01
G294P	1,13
G294Q	1,91
G294R	1,34
G294V	1,10

K297A	1,47
K297C	1,10
K297D	1,50
K297F	1,24
K297G	1,25
K297H	1,63
K297L	1,62
K297M	1,62
K297N	1,87
K297Q	1,82
K297R	1,29
K297S	1,22
K297T	1,33
K297V	1,10
K297W	1,85
K297Y	1,71
R309S	1,08
Y310C	1,06
Y310F	1,35
Y310L	1,11
Y310Q	1,40
Y310R	1,61
Y315E	1,24
Y315H	1,48
Y315L	1,35
Y315N	1,17
Y315P	1,19
Y315Q	1,43
Y315T	1,34
Y316D	1,06
N317H	1,26
N317Q	1,09
K340H	1,02

K340R	1,09
K341I	1,10
K341V	1,07
T350G	1,08
T350P	1,08
T350S	1,33
Q356L	1,20
T363N	1,30
S368C	1,12
S368E	1,07
S368F	1,16
S368H	1,26
S368I	1,15
S368L	1,33
S368N	1,21
S368P	1,05
S368Q	1,10
S368R	1,14
S368T	1,15
S368W	1,16
S369A	1,22
S369D	1,05
S369F	1,20
S369G	1,05
S369K	1,12
S369L	1,49
S369M	1,36
S369N	1,25
S369P	1,16
S369R	1,12
S369T	1,25
N376F	1,12
N376G	1,26

N376H	1,21
N376K	1,40
N376L	1,34
N376P	1,05
N376Q	1,11
N376S	1,09
N376V	1,19
N376W	1,12
N376Y	1,05
Y395A	1,05
Y395C	1,02
Y395F	1,03
Y395G	1,13
Y395H	1,10
Y395L	1,50
Y395N	1,20
Y395Q	1,18
Y395R	1,14
Y395S	1,13
Y395T	1,04
A398C	1,10
A398D	1,39
A398F	1,05
A398G	1,17
A398H	1,33
A398I	1,41
A398K	1,47
A398L	1,44
A398N	1,23
A398P	1,38
A398Q	1,43
A398R	1,59
A398S	1,14

A398T	1,25
A398V	1,29
A398W	1,45
A398Y	1,38
S401A	1,12
S401E	1,08
S401I	1,05
S401N	1,12
S401P	1,15
S401R	1,25
S401T	1,26
S401V	1,18
R408A	1,14
R408E	1,41
R408G	1,15
R408H	1,12
R408I	1,19
R408K	1,80
R408L	1,55
R408N	1,09
R408Q	1,23
R408S	1,17
N409A	1,25
N409C	1,18
N409D	1,21
N409E	1,27
N409F	1,32
N409G	1,14
N409H	1,29
N409I	1,56
N409K	1,44
N409L	1,57
N409M	1,17

N409Q	1,03
N409R	1,29
N409V	1,11
N409W	1,58
T412L	1,10
S451R	1,01

Exemplo 5: Variantes de alto desempenho a partir de um ensaio de classificação com etanol

- Variantes foram testadas em um ensaio de classificação com etanol conforme descrito acima. A tabela 7 mostra os resultados do ensaio de classificação para variantes com um índice de desempenho (PI) > 1,0, comparado com o PI da TrGA. O PI é uma medida de atividade específica (atividade/mg de enzima). O PI da atividade específica é o quociente "variante - atividade específica/ WT - atividade específica". O PI da atividade específica é de 1,0 e uma variante com um PI > 1,0 tinha uma atividade específica que é maior do que a TrGA precursora. A atividade específica é a atividade medida através do ensaio de classificação com etanol dividido pelos resultados obtidos no ensaio de Bradford descrito acima.

tabela 7 - Classificação de etanol

variante	P.I. 32 °C, pH de 4
D4A	1,07
D4C	1,08
D4E	1,23
D4L	1,34
D4R	1,18
D4S	1,17
F5C	1,35
I12L	1,19
I12R	1,13
D24E	1,60
D24L	1,19
D24W	1,03

D24Y	1,14
F29A	1,05
F29C	1,12
F29D	1,20
F29E	1,05
F29I	1,26
F29L	1,42
F29Q	1,01
F29S	1,07
F29V	1,06
I43D	1,14
I43F	1,33
I43R	1,21
I43Y	1,05
D44E	1,37
D44F	1,07
D44G	1,03
D44H	1,11
D44K	1,09
D44N	1,07
D44S	1,08
D44Y	1,07
Y70E	1,02
Y70G	1,06
Y70K	1,01
Y70M	1,36
Y70P	1,15
Y70R	1,40
Y70S	1,04
Q75A	1,10
Q75K	1,77
R76K	1,06
R76L	1,11

R76M	1,13
R76N	1,02
R76T	1,04
R76V	1,05
R76W	1,02
R76Y	1,05
D100A	1,08
D100I	1,14
DIOOL	1,03
DIOOM	1,12
DIOON	1,06
DIOOP	1,09
DIOOQ	1,14
DIOOT	1,06
DIOOW	1,19
DIOOY	1,05
N119E	1,02
N119F	1,03
N119Y	1,28
N146C	1,11
N146E	1,02
N146G	1,11
N146H	1,07
N146K	1,06
Q148H	1,10
Q148N	1,05
Q148V	1,18
Q148W	1,05
Q148Y	1,16
Y169D	1,18
Y169F	1,10
Y169H	1,05
Y169R	1,02

Q172E	1,08
Q172G	1,05
Q172R	1,22
Q172S	1,03
F175C	1,18
F175H	1,26
F175T	1,28
F175W	1,16
F175Y	1,05
V181F	1,28
V181K	1,35
V181L	1,37
V181R	1,01
Q208A	1,22
Q208C	1,17
Q208F	1,12
Q208H	1,02
Q208I	1,02
Q208L	1,32
S211A	1,30
S211E	1,30
S211G	1,05
S211L	1,04
S211M	1,05
S211R	1,34
S211W	1,07
S211Y	1,08
E243A	1,23
E243L	1,20
E243M	1,26
E243N	1,28
E243R	1,31
E243Y	1,25

I292F	1,23
I292H	1,04
I292L	1,21
I292N	1,27
I292R	1,02
I292V	1,24
G294A	1,91
G294I	1,92
G294Q	1,99
K297A	1,82
K297D	1,87
K297H	1,79
K297M	1,91
K297N	1,87
K297Q	1,85
K297R	1,71
K297S	1,72
K297W	1,70
K297Y	1,80
R309L	1,43
Y310F	1,05
Y310Q	1,16
Y310R	1,24
V314D	1,10
V314F	1,04
V314H	1,31
V314K	1,08
V314L	1,02
V314N	1,05
V314R	1,06
Y316R	1,42
Y316W	1,05
N317H	1,14

N317K	1,02
N317S	1,03
N317T	1,23
K340D	1,33
K340T	1,16
K341D	1,04
K341F	1,64
K341G	1,64
K341L	1,04
K341N	1,05
K341S	1,06
T350A	1,56
T350D	1,04
T350E	1,59
T350H	1,03
T350N	1,06
T350Q	1,05
T350R	1,02
Q356D	1,69
Q356E	1,07
Q356H	1,03
Q356K	1,03
T363A	1,04
T363C	1,54
T363G	1,02
T363H	1,09
T363N	1,02
T363R	1,61
T363V	1,05
T363W	1,08
S368D	1,11
S368F	1,08
S368H	1,04

S368L	1,07
S368M	1,03
S368N	1,02
S368W	1,24
S369F	1,68
S369M	1,04
S369T	1,05
N376G	1,05
N376H	1,10
N376Q	1,16
N376S	1,06
N376T	1,12
N376V	1,64
Y395A	1,02
Y395C	1,05
Y395G	1,02
Y395Q	1,63
Y395R	1,20
Y395S	1,09
A398D	1,05
A398P	1,03
S401A	1,04
S401D	1,01
S401G	1,04
S401N	1,02
S401V	1,06
N409K	1,30
N409L	1,04
N409W	1,31
T412A	1,04
T412G	1,06
T412K	1,05
R433Q	1,16

I436A	1,32
I436H	1,02
I436T	1,03
S451A	1,03
S451M	1,28
S451T	1,09
S451Y	1,03

Exemplo 6: Variantes de alto desempenho a partir de um ensaio de classificação de adoçante

- Variantes foram testadas em um ensaio de classificação de adoçante conforme descrito aqui acima. A tabela 8 mostra os resultados do ensaio de classificação, em que variantes com um índice de desempenho (PI) > 1,00, comparado com o PI da TrGA, são mostradas. O PI é uma medida de atividade específica (atividade/mg de enzima). O PI da atividade específica é o quociente "variante - atividade específica/ WT - atividade específica". O PI da atividade específica é de 1,0 e uma variante com um PI > 1,0 tinha uma atividade específica que é maior do que a TrGA precursora.

tabela 8 - Classificação de adoçante

Variante	P.I. 60 °C, pH de 4,5
D4E	1,09
D4L	1,03
D4S	1,07
D24E	1,45
D24L	1,31
D24Y	1,01
I43D	1,05
I43F	1,31
I43R	1,28
D44E	1,09
D44H	1,12
D44N	1,31
Y70F	1,26

Y70L	1,22
Q75K	1,12
R76K	1,11
R76M	1,03
R76P	1,13
R76T	1,11
R76W	1,07
D100Y	1,04
N119E	1,12
N119Y	1,01
N146D	1,05
N146E	1,11
Q148D	1,02
Q148W	1,05
Q172H	1,05
Q172Y	1,03
F175H	1,42
F175Y	1,11
V181A	1,10
V181F	1,01
V181K	1,43
V181L	1,42
Q208C	1,08
Q208F	1,20
Q208H	1,11
Q208L	1,03
Q208N	1,03
Q208S	1,06
Q208T	1,12
S211H	1,16
S211M	1,16
S211R	1,34
S211W	1,09

E243A	1,06
E243F	1,01
E243N	1,05
E243R	1,14
E243S	1,09
E243Y	1,07
R245A	1,01
I292N	1,04
I292V	1,12
G294A	1,06
G294Q	1,02
K297A	1,04
K297D	1,10
K297Q	1,07
V314D	1,22
V314H	1,85
V314K	1,34
V314L	1,13
V314N	1,08
V314R	1,20
V314Y	1,05
Y316R	1,20
N317H	1,25
N317K	1,03
K340D	1,21
K340E	1,05
K341D	1,08
K341G	1,22
K341L	1,08
K341N	1,08
K341S	1,12
T350H	1,03
T350L	1,04

Q356D	1,31
Q356E	1,04
Q356K	1,05
T363C	1,08
T363G	1,04
T363N	1,02
T363R	1,50
S368G	1,04
S368M	1,03
N376G	1,02
N376Q	1,07
Y395Q	1,01
A398H	1,03
A398S	1,03
S401A	1,01
N409K	1,19
N409T	1,02
N409W	1,01
T412G	1,06
T412S	1,03
I436D	1,02
I436Q	1,06
I436T	1,16
S451D	1,01
S451E	1,09
S451F	1,02
S451H	1,11
S451T	1,11

Exemplo 7: construção de vetores e transformação em células hospedeiras de *Trichoderma reesei*

A. Construção de vetores de expressão compreendendo um polinucleotídeo que codifica uma GA variante

ID NO: 4 foi clonado no pDONR[®] 201, um vetor de Entrada Gateway[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA). O cassete de expressão de TrGA foi clonado no vetor de destino Gateway compatível pTrex3g-DEST (figura 5), o qual também é descrito no WO 06/060062, através de reação de recombinação Gateway[®] LR. O vetor de expressão pTrex3g-TrGA (figura 5) permitiu a expressão da proteína de TrGA (SEQ ID NO: 2) em um hospedeiro *Trichoderma reesei*. Vetores foram construídos, os quais incluíam cDNA de TrGA modificado que codifica pelo menos as seguintes variantes (1) V314H; (2) S211R; (3) Q208N e (4) Q172F.

10 B. Transformação

Um vetor de expressão contendo uma GA variante foi transformado em uma cepa hospedeira de *T. reesei* derivada de RL-P37 (IA52) e tendo várias deleções de gene ($\Delta cbh1$, $\Delta cbh2$, $\Delta egl1$, $\Delta egl2$) usando bombardeamento de partículas através do Sistema PDS-1000/Helium (BioRad Cat. No. 165-02257). O protocolo é esboçado abaixo e referência é feita também aos Exemplos 6 e 11 do WO 05/001036.

Uma suspensão de esporos (aproximadamente 5×10^8 esporos/ml) da cepa de *T. reesei* foi preparada. 100-200 μ l de suspensão de esporos foram dispersos sobre o centro de lâminas com meio Médio Mínimo (MM) de acetamida. O meio de acetamida MM tinha a seguinte composição: 0,6 g/L de acetamida; 1,68 g/L de CsCl; 20 g/L de glicose; 20 g/L de KH_2PO_4 ; 0,6 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1 ml/L de 1000X solução de elementos vestigiais; 20 g/L de ágar; e pH de 5,5. 1 ml/L de 400X solução salina de elementos vestigiais: ácido cítrico a 175 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 200 g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 16 g/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a 3,2 g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ a 1,4 g/L, H_3BO_3 a 0,8 g/L. A suspensão de esporos foi deixada secar sobre a superfície do meio MM de acetamida.

Transformação seguiu a instrução dos fabricantes. Resumidamente, 60 mg de partículas de tungstênio M10 foram colocados em um tubo para microcentrifuga. 1 mL de etanol foi adicionado e deixado descansar durante 15 minutos. As partículas foram centrifugadas a 15.000 rpm durante 15 segundos. O etanol foi removido e as partículas foram lavadas três vezes com dH_2O estéril antes de 1 mL glicerol estéril a 50% (v/v) ser adicionado.

25 µl de suspensão de partículas de tungstênio foram colocados em um tubo para microcentrífuga. Enquanto se submetia a turbilhonamento continuamente, o seguinte foi adicionado: 0,5 -5 µl (100-200 ng/µl) de DNA de plasmídeo, 25 µl de CaCl₂ a 2,5M e 10 µl de espermidina a 0,1M. As partículas foram centrifugadas durante 3 segundos. O sobrenadante foi removido e as partículas foram lavadas com 200 µl de etanol a 70% (v/v) e centrifugadas durante 3 segundos. O sobrenadante foi removido e 24 µl de etanol a 100% foram adicionados, misturados através de pipetamento e o tubo foi colocado em um banho ultrassônico. Alíquotas de 8 µl das partículas foram removidas e colocadas sobre o centro dos discos macroveículo que foram mantidos em um secador. Uma vez que a suspensão de tungstênio/DNA tinha secado, o disco microveículo foi colocado na câmara de bombardeamento junto com a lâmina de acetamida MM com esporos e o processo de bombardeamento foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Após bombardeamento dos esporos na lâmina com partículas de tungstênio/DNA, as lâminas foram incubadas a 28 °C. As colônias transformadas foram separadas das lâminas frescas de acetamida MM após 4 dias (Pentilla e outros (1987) Gene 61: 155-164).

C. Demonstração de atividade de GA a partir da TrGA variante expressa em células transformadas

Após 5 dias de crescimento sobre acetamida MM, os transformantes nas lâminas mostrando morfologia estável foram inoculados em frascos de agitação de 250 ml contendo 30 ml de meio Proflo (o meio Proflo continha: 30 g/L de α-lactose; 6,5 g/L de (NH₄)₂SO₄; 2 g/L de KH₂PO₄; 0,3 g/L de MgSO₄.7H₂O; 0,2 g/L de CaCl₂.2H₂O; 1 ml/L de 400X solução salina de elementos vestigiais: ácido cítrico a 175 g/L, FeSO₄.7H₂O a 200 g/L, ZnSO₄.7H₂O a 16 g/L, CuSO₄.5H₂O a 3,2 g/L, MnSO₄.H₂O a 1,4 g/L, H₃BO₃ a 0,8 g/L; 2 ml/L de Tween 80 a 10%; 22,5 g/L de farinha de semente de algodão ProFlo (Traders Protein, Memphis, TN); 0,72 g/L de CaCO₃. Após dois dias de crescimento a 28°C e 140 rpm, 10% da cultura Proflo foram transferidos para um frasco de agitação de 250 ml contendo 30 ml de Meio de Lactose Definido. A composição do Meio de Lactose Definido era como segue: 5

g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 33 g/L de tampão de ácido 1,4-Piperazina bis(propano-sulfônico); 9 g/L de casaminoácidos; 4,5 g/L de KH_2PO_4 ; 1,0 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 5 ml/L de anti-espumante Mazu DF60-P (Mazur Chemicals, IL); 1000X solução de elementos vestigiais; pH de 5,5; 40 ml/L de solução de lactose a 40% (peso/v) foram adicionados ao meio após esterilização. Os frascos de agitação com Meio de Lactose Definido foram incubados a 28 °C, 140 rpm durante 4-5 dias.

Amostras do sobrenadante de cultura foram misturadas com um volume aproximado de 2X tampão de carregamento de amostra com agente de redução. Micélio foi removido através de centrifugação e o sobrenadante foi analisado com relação à proteína total (BCA Protein Assay Kit, Pierce Cat. No. 23225).

A atividade de GA foi medida usando o ensaio com p-nitrofenil-alfa-D-glicopiranosídeo (pNPG), com pNPG como um substrato (Sigma N-1377). Nesse ensaio, a capacidade da glucoamilase de catalisar a hidrólise de p-nitrofenil-alfa-D-glicopiranosídeo (pNPG) em glicose e p-nitrofenol é medida. Em um pH alcalino, o nitrofenol forma uma cor amarela que é proporcional à atividade de glucoamilase e é monitorada a 405 nm e comparada contra um padrão enzimático medido como GAU (Elder, M. T. e Montgomery R. S., Glucoamylase activity in industrial enzyme preparations using colorimetric enzymatic method, Journal of AOAC International, vol. 78(2), 1995). Um GAU é definido como a quantidade de enzima que produzirá 1 gm de açúcar de redução calculado como glicose por hora a partir de um substrato de amido solúvel (ds de 4%) em um pH de 4,2 e 60°C.

O perfil de proteína foi determinado através de eletroforese PAGE sobre um gel de Bis-Tris a 10% NuPAGE® Novex com Tampão de Operação de SDS de MES (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

Exemplo 8: testagem de aplicações em pequena escala de variantes selecionadas sobre amido solúvel

Cepas hospedeiras de *Trichoderma reesei* expressando as variantes únicas a) V314H, b) S211R, c) Q172F e d) Q208N foram crescidas em fermentadores de 14 L alimentados em batelada a 34 °C, pH de 3,5 em meio

nutriente incluindo glicose (Cerelease DE99), KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, elementos vestigiais e anti-espumante Mazu (DF6000K). Quando de depleção de glicose, a temperatura de crescimento e o pH foram desviados para 28 °C e 4,0, respectivamente. O material celular foi removido através de filtração e os sobrenadantes de cultura foram coletados e concentrados para obter mais de 90% de glucoamilase como proteína total.

Várias propriedades cinéticas foram determinadas para a produção de glicose sobre amido de batata solúvel em um pH de 4,3 a 32 °C e 60 °C e comparadas com a TrGA do tipo silvestre. Cada uma das quatro variantes demonstrou valores de V_{max} aumentados (μM de glicose/seg) quando comparado com o tipo silvestre (TrGA), indicando taxas catalíticas elevadas (kcat (seg^{-1})). A figura 6 ilustra a V_{max} de duas réplicas para cada temperatura testada.

Exemplo 9: método para determinar o desempenho sobre a produção de EtOH das variantes

Validação da classificação foi realizada sobre as variantes que foram identificadas como tendo um maior índice de desempenho quando comparado com a TrGA precursora (vide tabelas 7/8) usando um novo teste de aplicação de etanol em pequena escala. 24 variantes derivadas de avaliação de sítio e bibliotecas combinatoriais (tabela 9) foram selecionadas e transformadas diretamente em *T.reesei* para expressão e testagem em escala maior. As variantes foram testadas com relação desenvolvimento térmico térmico usando Calorimetria por Exploração Diferencial (análise de DSC descrita aqui abaixo) e o desempenho usando um novo ensaio de aplicação de etanol em pequena escala secundário. O método consistia em duas etapas: 1) injeção de variantes sobre uma coluna de troca de ânions para determinar precisamente a concentração de proteína; e 2) titulação de variantes com três diferentes concentrações de TrGA (0,3-0,15-0,075 g/ 28 g de ds) de forma a calcular seu desempenho sobre a produção de etanol com relação à molécula do tipo silvestre.

tabela 9. Lista de variantes combinatoriais

Variante	Mutação
LR8	Q172F/Q208N
LR6	Q172F/Q208N/V/314H
LR12	Q172F/S211R
SW3-1	D24E/I43R/D44N/F175H/V181L/V314H/T353R
SW3-2	D24L/I43F/D44N/F175H/V181L/V/314H/T353R
ET4-1	D24L/Q208Q/I292V/G294A/K297A/Y310R
ET4-2	D24W/Q208F/I292V/G294Q/K297A/Y310R
ET5-1	V181L/E243A/I292N/K297N/N317N/Y395Q
ET5-2	V181L/E243R/I292F/K297A/N317N/Y395Q
ET7-1	D24Y/V181L/Q208C/G294A/T353R/N375N/N409W
ET7-2	D24LA/181L/Q208C/G294A/T353R/N375Q/N409W
ET8-1	D24E/V181K/E243Y/I292V/G294Q/N409K
ET8-2	D24E/V181F/E243R/I292N/G294I/N409W
ET9-1	I043R/E243R/I292F/G294A/K297A
ET9-2	I043R/E243R/I292F/G294A/K297M

Purificação e determinação de proteína

Um preparado de enzima bruta foi purificado usando um sistema AKTA Explorer 100 FPLC Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). β -Ciclodextrina (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Países Baixos; 85: 608-8) foi aco-

5 plada a glóbulos de Sepharose epóxi-ativados (GE Healthcare, Diegem, Bélgica; 17-0480-01). A coluna foi usada para capturar glucoamilases do preparado enzimático. A enzima foi eluída dos glóbulos usando tampão de Tris a 25 mM, pH de 7,5 ou tampão de acetato de sódio a 50 mM, pH de 4,3 contendo α -ciclodextrina a 10 mM (Sigma, 28705). As amostras purificadas fo-

10 ram analisadas através de SDS-PAGE. Para determinar precisamente a concentração de proteína das variantes, um método de determinação de proteína baseado em FPLC foi desenvolvido. A concentração de proteína da molécula de TrGA marcadora purificada foi primeiro determinada usando um protocolo padrão de Bradford (Bio-Rad cat#500-0205). Subsequentemente,

15 as amostras purificadas foram injetadas sobre uma coluna ResourceQ_1 ml (GE Healthcare) e a enzima foi eluída com tampão de Tris a 25 mM, contendo NaCl a 500 mM. A área de pico foi determinada e a concentração de pro-

teína foi calculada com relação à área de pico do padrão de TrGA com uma concentração conhecida.

Aplicação de EtOH em pequena escala

A tabela 10 resume a produção de etanol e açúcares (DPI, DP2, DP>3) por diferentes variantes combinatoriais. Uma amostra de liquefeito de massa de milho foi obtida e diluída para DS de 26% usando vinhaça fina. O pH da pasta foi ajustado para um pH de 4,3 usando ácido sulfúrico a 4N. Uma alíquota de 100 g de massa foi colocada em um banho de água a 32 °C e deixada equilibrar. Após a adição de 100 µ de ureia a 400 ppm, 1 ml de amostra de enzima de TrGA variante purificada (150 µg/ml) ou TrGA purificada (300, 150, 75 µg/ml) foi adicionado a cada amostra de massa de milho. Finalmente, 333 µl de solução a 15 g de levedo Red Star Red hidratado 30 minutos em 45 ml de água DI (Lesaffre yeast Corp. Milwaukee, WI) foram adicionados a cada amostra. As amostras foram tomadas a 5, 21, 28, 48 e 52 horas e analisadas através de HPLC usando uma coluna Aminex HPX-87H 9 (Bio-Rad).

Determinações de etanol e carboidrato

Um tubo de Eppendorf para centrífuga de 2 ml foi enchido com cerveja de fermentador e esfriado sobre gelo durante 10 minutos. A amostra foi centrifugada durante 3 minutos a 14.000 x g e 500 µl do sobrenadante foram transferidos para um tubo de ensaio contendo 50 µl de solução de morte (ácido sulfúrico a 1,1N) e deixada descansar durante 5 minutos. 5,0 ml de água foram adicionados ao tubo de ensaio e, então, filtrados em uma lâmina com filtro de 0,22 µm (Multiscreen, Millipore, Amsterdam, Países Baixos) e levada para HPLC. Temperatura da coluna: 60 °C; fase móvel: ácido sulfúrico a 0,01 N; taxa de fluxo: 0,6 ml/min; detector: RI; volume de injeção: 20 µl. A coluna separa as moléculas baseado na carga e peso molecular; DP1 (monossacarídeos); DP2 (dissacarídeos); DP3 (trissacarídeos); DP>3 (açúcares de oligossacarídeo tendo um grau de polimerização maior do que 3); ácido succínico; ácido láctico; glicerol; metanol; etanol.

Análise por DSC

A temperatura de fusão das amostras de enzima purificadas

(0,2-0,4 mg/ml) foi determinada usando Calorimetria por Exploração Diferencial (DSC).

tabela 10. produção de etanol e sacarídeos

	horas	DP>3 (m/v)%	DP2 (m/v)%	DP1 (m/v)%	Etanol (m/v)%
TrGA(0,3mg)	5,5	3,46	2,70	0,91	1,02
	21,5	3,40	0,50	0,06	6,80
	28,5	1,68	1,46	0,07	8,13
	46	0,04	0,71	0,06	10,21
	52,5	0,04	0,45	0,03	10,96
TrGA (0,150 mg)	5,5	3,40	2,43	0,15	1,00
	21,5	3,78	0,21	0,03	4,23
	28,5	3,86	0,20	0,03	5,07
	46	2,73	0,52	0,06	7,86
	52,5	1,70	0,87	0,04	7,92
TrGA (0,075 mg)	5,5	3,43	2,16	-0,01	0,94
	21,5	3,54	0,20	0,03	3,10
	28,5	3,43	0,18	0,03	3,14
	46	3,93	0,18	0,05	4,65
	52,5	4,01	0,18	0,03	4,79
ET7-1	5,5	3,45	2,53	0,21	1,00
	21,5	3,94	0,22	0,04	4,77
	28,5	3,89	0,23	0,04	5,58
	46	1,58	1,22	0,06	8,64
	52,5	0,62	1,50	0,04	9,14
LR8	5,5	3,43	2,50	0,17	1,00
	21,5	3,96	0,22	0,04	4,79
	28,5	3,86	0,21	0,04	6,21
	46	1,27	1,11	0,07	9,17
	52,5	0,45	1,24	0,04	8,73
LR12	5,5	3,47	2,51	0,16	1,05
	21,5	3,86	0,22	0,04	4,44
	28,5	3,94	0,22	0,04	5,30
	46	2,09	1,08	0,07	8,56

	52,5	0,99	1,52	0,04	9,16
LR6	5,5	3,37	2,44	0,18	0,96
	21,5	3,88	0,21	0,04	4,44
	28,5	3,90	0,20	0,04	5,10
	46	2,44	0,64	0,08	8,59
	52,5	1,27	1,01	0,04	8,97
ET8-1	5,5	3,46	2,53	0,22	0,99
	21,5	3,99	0,21	0,04	4,86
	28,5	3,90	0,21	0,04	5,76
	46	1,29	1,11	0,08	8,94
	52,5	0,47	1,25	0,04	9,56
ET7-2	5,5	3,57	2,46	0,17	1,02
	21,5	4,26	0,21	0,03	4,21
	28,5	4,37	0,20	0,04	5,14
	46	3,87	0,27	0,05	7,21
	52,5	3,27	0,33	0,03	8,07

A tabela 11 representa os rendimentos finais de etanol e o desempenho das variantes em uma dosagem de 0,15 mg. O desempenho foi calculado através de interpolação dos valores de 0,3 mg e 0,15 mg da TrGA com os valores das variantes.

5 **tabela 11: Rendimentos de etanol**

variante	EtOH %(v/v)	desempenho com relação à TrGA
TrGA 0,3 mg	10,21	
TrGA 0,15 mg	7,86	1,00
TrGA 0,075 mg	4,65	
ET7-1	8,64	1,33
LR8	9,17	1,56
LR12	8,56	1,30
LR6	8,59	1,31
ET8-1	8,94	1,46
ET7-2	7,21	0,72

Todas as variantes combinatoriais, exceto ET7-2, tiveram um desempenho melhor do que a TrGA do tipo silvestre. LR8 teve um desem-

penho melhor, com um desempenho aperfeiçoado de 1,56.

- 5 A tabela 12 proporciona uma visão geral de todos os mutantes em um único sítio e combinacionais testados usando o ensaio de aplicação de etanol em pequena escala. Variantes que estão sombreadas na tabela 12 tiveram um desempenho melhor do que a TrGA e também tiveram uma maior temperatura de desenvolvimento térmico (dTm).

tabela 12. Desempenho e desenvolvimento térmico de variantes com relação à TrGA

variante	X TrGA	dTm
LR8	1,56	0,30
ET8-1	1,46	1,60
ET7-1	1,33	0,90
LB6	1,31	0,73
LR12	1,30	-0,13
ET5-2	1,29	-0,31
ET4-2	1,27	0,71
V218	1,27	0,06
ET4-1	1,21	-2,64
SW	1,21	0,29
Q172F	1,18	-0,01
V314H	1,17	-0,44
G294I	1,16	-0,22
S211R	1,12	-0,44
Q208N	1,08	-0,22
ET9-1	1,04	-1,33
K297A	1,03	-1,11
SW3-2	1,00	0,88
TrGA	1,00	0,00
G294Q	0,99	-0,86
ET8/2	0,93	-0,01
P94N	0,76	-5,17
ET5-1	0,76	-3,28
ET7-2	0,72	-3,59
S214L/C222F	0,70	-3,98

Os resultados mostraram que cromatografia (FPLC) era uma ferramenta útil para determinar precisamente a concentração de proteína. Os resultados também mostraram que titulação das variantes com três concentrações de TrGA era um método valioso para determinar o desempenho de variantes em pequena escala. Sete variantes tiveram um desempenho melhor do que a TrGA do tipo silvestre (vide tabela 12) e também tiveram uma temperatura de desenvolvimento térmico maior e as variantes não tiveram um desempenho tão bom quanto a TrGA tinha em uma menor T_m.

Exemplo 10: determinação de atividade específica de um conjunto selecionado de variantes em um único sítio e combinatoriais e especificidade de substrato de LR8

A atividade específica de um conjunto das variantes combinatoriais e vários mutantes em um único sítio que foram usados para construir variantes combinatoriais foi analisada (tabela 13). LR8 (PI 1,56 determinado com ensaio de aplicação em pequena escala) foi ainda estudada com relação à especificidade de substrato. Isso foi feito através de ajuste de um ensaio em MTP para determinar as taxas de produção de glicose de variantes de GA e determinar a especificidade de substrato da variante LR8. Descobriu-se que o ensaio em MTP discrimina entre variantes e todas as variantes, exceto ET7-1, mostraram maiores taxas do que a glucoamilase de *Trichoderma reesei* do tipo silvestre (wt). Ainda, diversas variantes (LR8/ET8/Q172F) tiveram um desempenho 20-30% melhor do que a TrGA. LR8 teve um desempenho melhor sobre amido solúvel e duas amostras diferentes de liquefeito de massa de milho comparado com o tipo silvestre.

Substratos usados nos experimentos a seguir eram solução de estoque de amido de milho solúvel preparada como segue: 8 g de amido de milho solúvel (Sigma # S4180) foram dissolvidos em 100 ml de água milliQ e aquecidos em um microondas durante 1 minuto. A dispersão foi levada à ebulição durante 5 minutos e, após esfriar, o volume foi ajustado para 100 ml. Amido de milho solúvel a 4% foi preparado através de diluição da solução de estoque a 1:1 com tampão de NaAc a 100 mM, pH de 4. Em um ex-

perimento, um substrato de liquefeito de milho (NE) foi preparado usando um analisador de umidade para medir a% em ds, então, o substrato foi diluído 7,5 x com NaAc a 50 mM para, finalmente, obter ds de 4%. O substrato foi centrifugado durante 5' a 2000xg e o sobrenadante foi filtrado com um filtro de 0,22 μ m. Em outro experimento, um substrato de liquefeito de milho (BSE) foi preparado da mesma forma, exceto que o substrato foi diluído 10x antes de centrifugação.

A enzima foi diluída usando a solução de Estoque de 150 μ g de enzima/ml (3 μ g/180 μ l de mistura de reação). As soluções foram ainda diluídas com NaAc a 50 mM, pH de 4,0 como segue: 300 ng (10x), 200 ng, 150 ng, 100 ng, 75 ng, 50 ng, 25 ng, 10 ng/180 μ l de mistura de reação.

O ensaio foi realizado como segue: 40 μ l de NaAc a 50 mM, pH de 4,0, 120 μ l de amido de milho solúvel a 4% e 20 μ l de enzima foram adicionados a cada cavidade. As amostras foram incubadas durante 2 horas a 32 °C, 900 rpm e terminada sobre gelo após a adição de 90 μ l de tampão de glicina-NaOH a 800 mM, pH de 10 durante 5 min. A lâmina foi centrifugada durante 5 min a 2000 rpm a 15 °C. A lâmina fresca, 85 μ l de água milliQ e 100 μ l de coquetel de hexoquinase (kit de teste de glicose II (HK), Instrumental Laboratory # 182507-40) e 20 μ l de sobrenadante foram adicionados. Para uma linha de calibração de glicose (0-1 mg/ml), 20 μ l de estoque de glicose foram adicionados ao invés disso. As lâminas foram incubadas durante 10 min em temperatura ambiente no escuro, seguido por medição da absorção a 340 nm usando o Spectramax.

tabela 13

desempenho com relação ao tipo silvestre

gráfico 1	300	200	150	100	75	50	25	ng de GA
TrGa	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
ET7-1	0,94	0,98	0,91	0,92	0,63	0,39	3,50	0,53
	0,93	1,00	1,22	0,91	0,64	0,06	-0,89	-3,99
LR12	0,94	0,99	1,17	0,83	0,66	-0,15	-0,99	0,62
LR8	0,94	1,01	1,16	0,99	0,55	0,17	-1,67	-4,36
ET8	0,87	0,95	1,29	1,02	0,62	-0,05	-1,64	-3,42

ET7	0,94	1,00	1,21	0,93	0,50	0,22	-0,62	-1,40
gráfico 2								
V314H	0,95	0,97	1,24	0,91	0,78	0,54	0,74	1,89
G294Q	0,98	0,99	1,03	1,21	1,00	0,19	-0,34	-1,12
S21	0,97	0,99	1,29	1,05	0,94	0,27	-1,32	0,53
Q208N	0,97	1,01	1,13	0,95	0,90	-0,05	-1,01	-2,81
O17	0,99	1,04	1,31	1,23	1,32	0,38	-1,59	-2,20
G294I	0,91	0,96	1,37	1,25	0,80	0,09	-1,20	-3,66
P94	0,98	1,00	1,24	1,09	1,05	0,29	6,29	-3,80
TrGA	1,00	1,00	1,06	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Os resultados do ensaio para determinar as taxas de produção de glicose pelas variantes de GA são mostrados nas Figuras 7 e 8. Nessas figuras, o desempenho relativo da TrGA foi calculado por quantidade de enzima adicionada. Conclusões foram extraídas da região linear do gráfico a 150 ng de enzima. Os resultados nas Figuras 7, 8 e tabela 13 mostraram que LR8, ET8, ET7-2, S211R, Q172F e P94N tiveram um desempenho melhor do que o tipo silvestre sobre a faixa linear.

Especificidade de substrato de LR8 - O desempenho de LR8 e do tipo silvestre de TrGA foi testado sobre substratos (amido de milho solúvel e dois substratos de massa de milho produzidos no Exemplo 10) usados em classificação e aplicação. Quando analisados através de HPLC, os substratos mostraram uma diferença no grau de padrão de polimerização (DP) (vide Figuras 9-11). Em NE e BSE $\rightarrow$ = DP4 está presente, enquanto que o amido de milho solúvel consiste em pelo menos quatro ou mais moléculas de glicose. Sobre todos os substratos, LR8 teve um desempenho melhor do que o tipo silvestre (vide Figuras 9, 10 e 11).

Exemplo 11: estrutura de Cristal da TrGA

A estrutura tridimensional completa da glucoamilase de *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*) (TrGA) foi determinada em uma resolução de 1,9 Å. A tabela 15 mostra as coordenadas para a estrutura de cristal de glucoamilase de *Trichoderma*. A TrGA foi cristalizada em uma forma intacta contendo 599 resíduos e todas as modificações pós-traducionais que normalmente ocorreriam no hospedeiro natural. A estrutura de cristal foi produ-

zida e analisada como segue.

Expressão e purificação de proteína

O gene que codifica a GA de *H. jecorina* foi clonado e expresso de acordo com os protocolos descritos no pedido de patente US com publicação No.: US 2006/0094080 A1, por Dunn-Coleman e outros e data de publicação de 4 de Maio de 2006.

O material de proteína de TrGA usado para todos os experimentos de cristalização foi inicialmente purificado em uma etapa através de cromatografia de troca de ânions como segue: sobrenadantes de cultura concentrados de TrGA expressa, consistindo em 180 mg/ml de proteína total, foram preparados através de diluição de uma amostra a 1:10 em um tampão de Tris-HCl a 25 mM, pH de 8,0. Uma coluna HiPrep 16/10 Q Sepharose FF (GE Helthcare) foi empregada para a purificação por troca de ânions. A coluna HiPrep foi equilibrada com 4 volumes de coluna (CV) de tampão de iniciação (Tris-HCl a 25 mM, pH de 8,0), seguido por aplicação de 10 ml da amostra de proteína diluída. Um gradiente linear de 8 CV de NaCl a 0 a 140 mM em tampão de operação (Tris-HCl a 25 mM, pH de 8,0) foi aplicado para eluir a proteína ligada. A TrGA ligada eluiu da coluna HiPrep Q sepharose em uma concentração de sal de NaCl a aproximadamente 80 mM. Frações contendo a proteína de TrGA pura foram empoçadas e concentradas para 50 mg/ml usando um tubo de concentração para centrifuga Vivaspin de 25 ml (Viva Science) com um corte de peso molecular (MWCO) de 10 kD. O material de TrGA purificado e concentrado teve o tampão trocado usando uma coluna de desalinização DG-10 (Bio-Rad) e equilibrado com tampão de acetato de sódio a 50 mM, pH de 4,3. As concentrações de proteína foram determinadas através de medição da absorbância a 280 nm. O estoque de proteína de TrGA inicialmente purificado e concentrado foi, após o que, armazenado a -20 °C.

Duas etapas de purificação adicionais, purificação de troca de ânions adicional e uma purificação por exclusão de tamanho, foram introduzidas para intensificar a cristalinidade do material de proteína de TrGA. Essas duas etapas de purificação adicionais foram realizadas como segue: em

uma primeira etapa de purificação por troca de ânions, uma coluna MonoQ (GE Helthcare) de 10 ml foi empregada. Uma amostra de 1 ml do material de TrGA inicialmente purificado e congelado (50 mg de proteína) foi descongelada e o tampão foi trocado para Tris-HCl a 20 mM, pH de 8,0, através de diluição repetida da amostra para 6 ml no novo tampão, seguido por uma concentração da amostra novamente para 0,5 ml usando um tubo de concentração com MWCO de 5 kD de 6 ml. A amostra de TrGA foi diluída após a última etapa de concentração em água destilada, até ser atingida uma condutividade da amostra de proteína a qual correspondia à condutividade do tampão de iniciação da purificação de ânions, isto é, Tris-HCl a 25 mM, pH de 8,0. A coluna MonoQ foi primeiro equilibrada com 4 volumes de coluna (CV) de tampão de iniciação, seguido por aplicação da amostra de proteína diluída à coluna. A proteína ligada foi eluída da coluna MonoQ através de dois gradientes diferentes. No primeiro, um gradiente em pH linear de 4 CB foi aplicado, onde o pH do tampão de iniciação foi diminuído de 8,0 para 6,0. No segundo, um gradiente de 8 CV com alta concentração de sal foi aplicado, no qual a concentração de sal foi aumentada de NaCl a 0 para 350 mM no tampão de operação (Tris-HCl a 25 mM, pH de 6,0). Descobriu-se que a TrGA ligada elui da coluna durante o segundo gradiente de sal em uma concentração de NaCl de aproximadamente 150 mM. Frações contendo TrGA foram empoadas e concentradas para 2 ml usando um tubo de concentração Vivaspin com MWCO de 5 kD de 6 ml. A amostra de TrGA concentrada foi, após o que, aplicada a uma coluna de exclusão de tamanho Superdex 200 16/60 (GE Helthcare) equilibrada com 4 CV de Tris-Cl a 20 mM, pH de 8,0 e NaCl a 50 mM, o qual também foi usado como tampão de operação. Frações do pico de eluição principal após a purificação por exclusão de tamanho foram empoadas e concentradas até uma concentração aproximada de proteína de 7,5 mg/ml usando um tubo de concentração Vivaspin com MWCO de 5 kD de 6 ml.

30 **Cristalização de proteína**

A amostra de proteína que foi usada para encontrar as condições iniciais de cristalização de TrGA era uma amostra do material de TrGA

que foi purificado uma vez através de purificação de troca de ânions e, após o que, armazenado a -20°C . A amostra de proteína de TrGA foi descongelada e diluída com tampão de acetato de sódio a 50 mM, pH de 4,3, para aproximadamente 12 mg/ml antes dos experimentos de cristalização iniciais.

- 5 O conjunto de dados de raios X ortorômbico foi usado para solucionar a estrutura da TrGA através de substituição molecular (MR) e o conjunto de dados ortorômbico de alta resolução usado para o modelo da estrutura de TrGA com grupo espacial ortorômbico. Descobriu-se que os cristais de TrGA ortorômbicos crescem em solução consistindo em PEG 3350 a 25%, acetato de amônio a 0,20M, Bis-Tris a 0,10M, pH de 5,5 (solução reservatório) usando o método de difusão de vapor com gotejamento (McPherson 1982), a 20°C . As gotas de cristalização foram preparadas através de mistura de quantidades iguais de solução de proteína (12 mg/ml) e solução reservatório para um volume final de 10 ml. Descobriu-se que os cristais de TrGA3 pertencem
- 10
- 15 ao grupo espacial ortorômbico P212121, com dimensões celulares aproximadas: $a = 52,2 \text{ \AA}$, $b = 99,2 \text{ \AA}$, $c = 121,2 \text{ \AA}$ e têm uma V_m calculada de 2,3 (Matthews 1968) com moléculas na unidade assimétrica.

Coleta de dados de raios X

- Os dois conjuntos de dados de TrGA ortorômbicos foram coletados de cristais únicos montados em tubos capilares vedados, em temperatura ambiente. O conjunto de dados de raios X ortorômbico de alta resolução inicial usado para solucionar a estrutura através de métodos de substituição molecular (MR) foi coletado em uma fonte de raios X no laboratório, um detector de placa de imagem MSC/Rigaku (Molecular Structures Corp., The
- 20
- 25 Woodlands, Texas) Raxis IV++ com espelhos de focalização usando radiação $\text{CuK}\alpha$ a partir de um gerador de anodo giratório Rigaku RU200. Esse conjunto de dados foi processado, escalonado e a média calculada usando o software d*trek fornecido pela MSC/Rigaku. O conjunto de dados monoclinico centralizado C foi coletado a partir de um único cristal de TrGA congelado
- 30 a 100K, equilibrado em um agente crio-protetor compreendido de PEG 3350 a 25%, glicerol a 15%, CaCl_2 a 50 mM e Bis-Tris a 0,1 M, pH de 5,5 como crio-protetor, montado em laços de fita de rayon e congelados mergulhando

em nitrogênio líquido antes de transporte para o Synchrotron. O conjunto de dados ortorômbico de alta resolução (1,9 Å) e o conjunto de dados monoclinico centralizado C (1,8 Å) foram ambos coletados em uma fonte de Synchrotron, linha de feixe 911:5 no MAX LAB em Lund, Suécia. Ambos os conjuntos de dados que foram coletados em uma fonte de Synchrotron foram processados com o MOSFLM e escalonados com o programa SCALA incluído no pacote de programa CCP4 (Collaborative Computational Project Number 4, 1994). Todo o processamento de dados subsequente foi realizado usando o pacote de programa CCP4 (Collaborative Computational Project Number 4, 1994), a menos que de outro modo estabelecido. Um conjunto de 5% das reflexões de cada conjunto de dados foi posto de lado e usado para monitoramento de R-livre (Brünger 1992).

Solução de estrutura

A estrutura da TrGA foi inicialmente solucionada através de MR com o programa de substituição automática MOLREP (Collaborative Computational Project Number 4, 1994), incluído no pacote de programa CCP4, usando o conjunto de dados ortorômbico de alta resolução inicial e usando as coordenadas da variante de GA X100 de *Aspergillus. awamori* (AaGA) (pdb, entrada 1GLM (Aleshin e outros, 1992)) como modelo de busca. O modelo de busca por GA de *A. awamori* foi editado para remover todas as porções de glicosilação presas à molécula de proteína como N- e O-glicosilações e todas as moléculas de solvente antes de realização dos experimentos de MR. Todas as reflexões entre uma resolução de 36,8 e 2,8 Å, a partir do conjunto de dados de TrGA de alta resolução inicial, foram usadas para a solução através de MR. O programa de MR encontrou uma única solução em função da rotação, com um máximo de 11,1 σ acima da base, o próximo máximo mais alto foi 3,8 σ acima da base. A solução em função da translação proporcionou um R-fator de 48,7% e tinha um fator de contraste de 17,4. A solução por MR foi refinada para 10 ciclos de refino por mínimos quadrados restrito usando o programa Refmac 5.0 (Murshudov e outros, 1997). Isso diminuiu o R-fator cristalográfico para 31,1%, enquanto que o valor de R-livre caiu de 42,2% para 41,1%.

Refino e adaptação de modelo

O modelo de solução por MR refinado foi usado para calcular um mapa de densidade inicial a partir do conjunto de dados de TrGA ortorômbica de alta resolução. A densidade eletrônica para uma ponte de dissulfeto entre os resíduos 19 e 26 da TrGA, uma ponte de dissulfeto não presente no modelo da estrutura da variante X100 de *A. awamori*, pôde ser prontamente identificada nesse mapa de densidade eletrônica. Isso foi tomado como uma indicação de que o mapa de densidade eletrônica era de qualidade suficiente para ser usado para construir um modelo estrutural da TrGA a partir de sua sequência de aminoácido. O modelo da estrutura de TrGA inicial, baseado no conjunto de dados de alta resolução, foi refinado com ciclos alternados de construção de modelo usando Coot (Emsley e Cowtan 2004) e o refino de probabilidade máxima usando o Refmac 5.0.

A resolução do modelo de estrutura de TrGA inicial foi estendida para a resolução do conjunto de dados ortorômbico de alta resolução (1,9 Å) através de refino do modelo estrutural de TrGA inicial contra o conjunto de dados de alta resolução durante 10 ciclos de refino restrito usando o programa Refmac 5.0. A maioria das moléculas de água nos modelos estruturais foi localizada automaticamente usando os protocolos de captura de água em programas de refino e, então, manualmente selecionadas ou descartadas através de inspeção visual. Todas as comparações estruturais foram feitas com o Coot (Emsley e Cowtan, 2004) ou O (Jones e outros, 1991) e as figuras foram preparadas com PyMOL (DeLano, 2002).

A partir desses resultados, pode ser observado que o segmento de núcleo catalítico da TrGA seguia a mesma topologia em barril (α/α)₆ descrita por Aleshin e outros, 1992 para a AaGA, consistindo em um barril duplo de alfa hélices com o C-término da hélice externa levando ao N-término de uma hélice interna. Foi possível identificar diferenças chave na densidade eletrônica, tal como a ponte de dissulfeto entre os resíduos 19 e 26 e uma inserção (resíduos 257-260) com relação à AaGA. O segmento compreendendo 80-100 também sofreu reconstrução extensiva de modelo. Um principal sítio de glicosilação foi identificado em Asn 171, o qual tinha até quatro

porções de glicosídeo presas. Um sítio de glicosilação similar foi identificado em AaGA. Adicionalmente, o núcleo catalítico contendo três cis-peptídeos entre os resíduos 22-23, 44-45 e 122-123 era conservado entre a TrGA e a AaGA. Em geral, havia uma variação rms de 0,535 Å entre 409 de 453 átomos de C α quando de comparação das coordenadas dos núcleos catalíticos da TrGA e AaGA.

Exemplo 12: homologia entre TrGA e GA de *Aspergillus awamori*

A estrutura de cristal da TrGA identificada no Exemplo 11 foi superposta sobre a estrutura de cristal previamente identificada da GA de *Aspergillus awamori* (AaGA). A estrutura de cristal da AaGA foi obtida do banco de dados de proteína (PDB) e a forma da AaGA que cristalizou foi a forma contendo apenas um domínio catalítico. A estrutura da glucoamilase de *Trichoderma reesei*, com todas as três regiões intactas, foi determinada em uma resolução de 1,8 Angstroms aqui (vide tabela 15 e Exemplo 11). Usando as coordenadas (vide tabela 15), a estrutura foi alinhada com as coordenadas do domínio catalítico da cepa X100 de *Aspergillus awamori*, que foi determinada previamente (Aleshin, A.E., Hoffman, C., Firsov, L.M. e Honzatko, R.B. 1994 Refined crystal structures of glucoamylase from *Aspergillus awamori* var. X100. *J Mol Biol* **238**: 575-591 e o PDB). Conforme observado nas Figuras 12 e 13, a estrutura do domínio catalítico se sobrepôs muito intimamente e permitiu a identificação de resíduos equivalentes baseado nessa superposição estrutural.

Baseado nesse análise, foram identificados sítios que poderiam sofrer mutação na TrGA e resultar em estabilidade e/ou atividade específica aumentada. Esses sítios incluem 108, 124, 175 e 316 no sítio ativo. Também foram identificadas variantes aos pares específicas Y47W/Y315F e Y47F/Y315W. Em virtude da alta homologia estrutural, espera-se que variantes benéficas encontradas nos sítios na GA de *Trichoderma reesei* tenham consequências similares em *Aspergillus awamori* e outras glucoamilases homólogas.

Várias modificações e variações dos métodos e sistema descrito da invenção serão evidentes para aqueles versados na técnica sem se desviar

do escopo e espírito da invenção. Embora a invenção tenha sido descrita com relação à modalidades preferidas específicas, deve ser entendido que a invenção, conforme reivindicado, não estará indevidamente limitada a tais modalidades específicas. Na verdade, diversas modificações dos modos descritos para

5 realização da invenção os quais são óbvios para aqueles versados na técnica se destinam a estar dentro do escopo das reivindicações em anexo.

tabela 15

CRYST1	52.	185	99.232	121.240	90.00	90.00	90.00		
ORIGX1		1.000000	0.000000	0.000000			0.000000		
ORIGX2		0.000000	1.000000	0.000000			0.000000		
ORIGX3		0.000000	0.000000	1.000000			0.000000		
SCALE1		0.019163	-0.000001	-0.000001			0.000000		
SCALE2		0.000000	0.010077	0.000000			0.000000		
SCALE3		0.000000	0.000000	0.008248			0.000000		
ATOM	1	N	SER A	1	-30.485	30.567	-21.185	1.00	37.11
ATOM	2	CA	SER A	1	-30.568	29.350	-20.326	1.00	37.00
ATOM	3	CB	SER A	1	-31.953	28.707	-20.424	1.00	37.27
ATOM	4	OG	SER A	1	-32.137	28.089	-21.695	1.00	40.11
ATOM	5	C	SER A	1	-29.519	28.345	-20.772	1.00	35.91
ATOM	6	O	SER A	1	-29.043	28.415	-21.911	1.00	35.46
ATOM	7	N	VAL A	2	-29.170	27.425	-19.867	1.00	34.51
ATOM	8	CA	VAL A	2	-28.302	26.293	-20.179	1.00	33.56
ATOM	9	CB	VAL A	2	-28.142	25.339	-18.955	1.00	33.84
ATOM	10	CG1	VAL A	2	-27.349	24.103	-19.316	1.00	34.20
ATOM	11	CG2	VAL A	2	-27.468	26.057	-17.827	1.00	34.79
ATOM	12	C	VAL A	2	-28.846	25.506	-21.363	1.00	32.48
ATOM	13	O	VAL A	2	-28.086	25.109	-22.245	1.00	31.10
ATOM	14	N	ASP A	3	-30.160	25.286	-21.381	1.00	31.43
ATOM	15	CA	ASP A	3	-30.791	24.530	-22.457	1.00	31.38
ATOM	16	CB	ASP A	3	-32.283	24.323	-22.190	1.00	32.17
ATOM	17	CG	ASP A	3	-32.522	23.492	-20.943	1.00	35.28
ATOM	18	OD1	ASP A	3	-32.413	22.251	-21.028	1.00	36.80
ATOM	19	OD2	ASP A	3	-32.786	24.092	-19.870	1.00	40.63
ATOM	20	C	ASP A	3	-30.556	25.153	-23.818	1.00	30.59
ATOM	21	O	ASP A	3	-30.282	24.446	-24.778	1.00	30.19
ATOM	22	N	ASP A	4	-30.644	26.477	-23.875	1.00	29.89
ATOM	23	CA	ASP A	4	-30.369	27.244	-25.083	1.00	29.99
ATOM	24	CB	ASP A	4	-30.601	28.731	-24.822	1.00	31.12
ATOM	25	CG	ASP A	4	-32.088	29.121	-24.785	1.00	34.16
ATOM	26	OD1	ASP A	4	-32.991	28.260	-24.925	1.00	36.06
ATOM	27	OD2	ASP A	4	-32.340	30.332	-24.608	1.00	39.96
ATOM	28	C	ASP A	4	-28.925	27.049	-25.579	1.00	28.65
ATOM	29	O	ASP A	4	-28.697	26.881	-26.770	1.00	28.51
ATOM	30	N	PHE A	5	-27.961	27.096	-24.660	1.00	26.74
ATOM	31	CA	PHE A	5	-26.553	26.860	-24.994	1.00	25.21
ATOM	32	CB	PHE A	5	-25.666	27.110	-23.764	1.00	25.59
ATOM	33	CG	PHE A	5	-24.244	26.646	-23.931	1.00	26.03
ATOM	34	CD1	PHE A	5	-23.395	27.259	-24.854	1.00	27.29
ATOM	35	CE1	PHE A	5	-22.063	26.823	-25.009	1.00	27.33
ATOM	36	CZ	PHE A	5	-21.593	25.783	-24.228	1.00	26.77
ATOM	37	CE2	PHE A	5	-22.425	25.181	-23.286	1.00	28.42
ATOM	38	CD2	PHE A	5	-23.749	25.617	-23.144	1.00	28.42
ATOM	39	C	PHE A	5	-26.352	25.438	-25.539	1.00	24.23
ATOM	40	O	PHE A	5	-25.659	25.244	-26.544	1.00	23.56

ATOM	212	CD2	PHE	A	29	-10.611	17.408	-46.973	1.00	22.71
ATOM	213	C	PHE	A	29	-6.853	16.783	-45.296	1.00	19.10
ATOM	214	O	PHE	A	29	-5.862	17.501	-45.224	1.00	19.40
ATOM	215	N	GLY	A	30	-6.830	15.558	-45.816	1.00	18.73
ATOM	216	CA	GLY	A	30	-5.603	15.008	-46.398	1.00	19.00
ATOM	217	C	GLY	A	30	-4.717	14.307	-45.399	1.00	19.69
ATOM	218	O	GLY	A	30	-3.657	13.809	-45.768	1.00	19.61
ATOM	219	N	THR	A	31	-5.133	14.255	-44.123	1.00	18.86
ATOM	220	CA	THR	A	31	-4.450	13.384	-43.165	1.00	19.14
ATOM	221	CB	THR	A	31	-4.846	13.689	-41.689	1.00	18.79
ATOM	222	OG1	THR	A	31	-6.265	13.579	-41.559	1.00	18.61
ATOM	223	CG2	THR	A	31	-4.410	15.106	-41.262	1.00	16.47
ATOM	224	C	THR	A	31	-4.812	11.925	-43.498	1.00	19.11
ATOM	225	O	THR	A	31	-5.713	11.661	-44.313	1.00	19.69
ATOM	226	N	SER	A	32	-4.107	10.982	-42.881	1.00	19.74
ATOM	227	CA	SER	A	32	-4.367	9.554	-43.094	1.00	20.00
ATOM	228	CB	SER	A	32	-3.411	8.722	-42.248	1.00	20.73
ATOM	229	OG	SER	A	32	-2.064	8.973	-42.612	1.00	21.56
ATOM	230	C	SER	A	32	-5.806	9.217	-42.704	1.00	20.57
ATOM	231	O	SER	A	32	-6.334	9.778	-41.732	1.00	20.70
ATOM	232	N	ALA	A	33	-6.443	8.319	-43.452	1.00	19.94
ATOM	233	CA	ALA	A	33	-7.768	7.823	-43.068	1.00	19.61
ATOM	234	CB	ALA	A	33	-8.232	6.729	-44.035	1.00	19.31
ATOM	235	C	ALA	A	33	-7.764	7.285	-41.637	1.00	19.10
ATOM	236	O	ALA	A	33	-6.906	6.482	-41.264	1.00	19.49
ATOM	237	N	GLY	A	34	-8.742	7.719	-40.856	1.00	17.74
ATOM	238	CA	GLY	A	34	-8.878	7.282	-39.473	1.00	18.31
ATOM	239	C	GLY	A	34	-7.988	8.020	-38.473	1.00	18.48
ATOM	240	O	GLY	A	34	-8.050	7.739	-37.271	1.00	19.07
ATOM	241	N	ALA	A	35	-7.173	8.959	-38.937	1.00	17.05
ATOM	242	CA	ALA	A	35	-6.329	9.723	-38.000	1.00	17.17
ATOM	243	CB	ALA	A	35	-5.167	10.376	-38.730	1.00	17.10
ATOM	244	C	ALA	A	35	-7.173	10.784	-37.271	1.00	16.55
ATOM	245	O	ALA	A	35	-8.174	11.271	-37.808	1.00	17.35
ATOM	246	N	VAL	A	36	-6.793	11.130	-36.051	1.00	15.39
ATOM	247	CA	VAL	A	36	-7.490	12.198	-35.328	1.00	14.41
ATOM	248	CB	VAL	A	36	-8.142	11.687	-34.031	1.00	15.02
ATOM	249	CG1	VAL	A	36	-8.903	12.828	-33.349	1.00	16.72
ATOM	250	CG2	VAL	A	36	-9.081	10.520	-34.336	1.00	16.45
ATOM	251	C	VAL	A	36	-6.407	13.201	-34.944	1.00	14.36
ATOM	252	O	VAL	A	36	-5.421	12.816	-34.311	1.00	14.44
ATOM	253	N	ILE	A	37	-6.566	14.454	-35.331	1.00	13.68
ATOM	254	CA	ILE	A	37	-5.614	15.470	-34.893	1.00	13.67
ATOM	255	CB	ILE	A	37	-5.528	16.687	-35.849	1.00	13.66
ATOM	256	CG1	ILE	A	37	-6.847	17.486	-35.901	1.00	14.31
ATOM	257	CD1	ILE	A	37	-6.773	18.712	-36.864	1.00	14.21
ATOM	258	CG2	ILE	A	37	-5.158	16.214	-37.260	1.00	14.62
ATOM	259	C	ILE	A	37	-6.041	15.908	-33.505	1.00	13.27
ATOM	260	O	ILE	A	37	-7.235	16.011	-33.224	1.00	12.99
ATOM	261	N	ALA	A	38	-5.081	16.159	-32.630	1.00	13.03
ATOM	262	CA	ALA	A	38	-5.445	16.697	-31.333	1.00	12.81
ATOM	263	CB	ALA	A	38	-4.235	16.680	-30.377	1.00	12.73
ATOM	264	C	ALA	A	38	-6.046	18.122	-31.497	1.00	12.45
ATOM	265	O	ALA	A	38	-6.939	18.503	-30.775	1.00	12.23
ATOM	266	N	SER	A	39	-5.555	18.870	-32.482	1.00	12.90
ATOM	267	CA	SER	A	39	-5.973	20.246	-32.769	1.00	12.85
ATOM	268	CB	SER	A	39	-5.512	21.211	-31.657	1.00	12.63

ATOM	326	CG	TYR	A	47	-1.773	20.722	-29.377	1.00	12.59
ATOM	327	CD1	TYR	A	47	-0.589	21.236	-28.827	1.00	13.54
ATOM	328	CE1	TYR	A	47	-0.524	21.586	-27.462	1.00	12.81
ATOM	329	CZ	TYR	A	47	-1.652	21.407	-26.673	1.00	13.40
ATOM	330	OH	TYR	A	47	-1.620	21.755	-25.354	1.00	13.08
ATOM	331	CE2	TYR	A	47	-2.825	20.887	-27.208	1.00	12.02
ATOM	332	CD2	TYR	A	47	-2.876	20.540	-28.532	1.00	12.76
ATOM	333	C	TYR	A	47	-0.994	19.090	-32.772	1.00	11.46
ATOM	334	O	TYR	A	47	-1.885	18.239	-32.692	1.00	11.66
ATOM	335	N	TYR	A	48	-0.316	19.301	-33.893	1.00	12.26
ATOM	336	CA	TYR	A	48	-0.697	18.639	-35.132	1.00	12.80
ATOM	337	CB	TYR	A	48	-0.323	19.509	-36.348	1.00	12.75
ATOM	338	CG	TYR	A	48	-1.134	19.146	-37.569	1.00	13.21
ATOM	339	CD1	TYR	A	48	-2.492	19.482	-37.652	1.00	14.46
ATOM	340	CE1	TYR	A	48	-3.254	19.124	-38.767	1.00	15.86
ATOM	341	CZ	TYR	A	48	-2.643	18.453	-39.823	1.00	14.62
ATOM	342	OH	TYR	A	48	-3.390	18.106	-40.936	1.00	16.20
ATOM	343	CE2	TYR	A	48	-1.295	18.086	-39.756	1.00	15.86
ATOM	344	CD2	TYR	A	48	-0.543	18.456	-38.638	1.00	13.44
ATOM	345	C	TYR	A	48	-0.072	17.245	-35.187	1.00	13.47
ATOM	346	O	TYR	A	48	0.877	16.986	-35.940	1.00	13.95
ATOM	347	N	TYR	A	49	-0.592	16.360	-34.338	1.00	13.13
ATOM	348	CA	TYR	A	49	-0.131	14.987	-34.171	1.00	13.51
ATOM	349	CB	TYR	A	49	0.887	14.842	-33.009	1.00	13.11
ATOM	350	CG	TYR	A	49	2.133	15.662	-33.216	1.00	13.90
ATOM	351	CD1	TYR	A	49	3.193	15.174	-33.996	1.00	13.54
ATOM	352	CE1	TYR	A	49	4.354	15.964	-34.216	1.00	13.41
ATOM	353	CZ	TYR	A	49	4.419	17.225	-33.665	1.00	14.69
ATOM	354	OH	TYR	A	49	5.511	18.016	-33.883	1.00	17.21
ATOM	355	CE2	TYR	A	49	3.365	17.737	-32.906	1.00	13.49
ATOM	356	CD2	TYR	A	49	2.227	16.952	-32.698	1.00	13.78
ATOM	357	C	TYR	A	49	-1.349	14.181	-33.783	1.00	13.93
ATOM	358	O	TYR	A	49	-2.390	14.759	-33.406	1.00	13.00
ATOM	359	N	MET	A	50	-1.203	12.857	-33.839	1.00	13.66
ATOM	360	CA	MET	A	50	-2.241	11.940	-33.365	1.00	14.56
ATOM	361	CB	MET	A	50	-2.447	10.822	-34.381	1.00	15.21
ATOM	362	CG	MET	A	50	-3.532	9.811	-33.947	1.00	15.64
ATOM	363	SD	MET	A	50	-3.996	8.804	-35.361	1.00	19.52
ATOM	364	CE	MET	A	50	-5.204	7.742	-34.566	1.00	17.12
ATOM	365	C	MET	A	50	-1.797	11.323	-32.060	1.00	14.38
ATOM	366	O	MET	A	50	-0.806	10.583	-32.024	1.00	13.80
ATOM	367	N	TRP	A	51	-2.528	11.608	-30.984	1.00	13.47
ATOM	368	CA	TRP	A	51	-2.265	10.965	-29.720	1.00	13.13
ATOM	369	CB	TRP	A	51	-2.598	11.930	-28.585	1.00	12.85
ATOM	370	CG	TRP	A	51	-1.478	12.809	-28.116	1.00	13.64
ATOM	371	CD1	TRP	A	51	-0.671	12.604	-27.011	1.00	13.49
ATOM	372	NE1	TRP	A	51	0.211	13.657	-26.864	1.00	12.36
ATOM	373	CE2	TRP	A	51	-0.023	14.573	-27.858	1.00	11.83
ATOM	374	CD2	TRP	A	51	-1.076	14.065	-28.674	1.00	13.12
ATOM	375	CE3	TRP	A	51	-1.506	14.825	-29.772	1.00	11.07
ATOM	376	CZ3	TRP	A	51	-0.859	16.061	-30.035	1.00	12.87
ATOM	377	CH2	TRP	A	51	0.193	16.522	-29.218	1.00	13.24
ATOM	378	CZ2	TRP	A	51	0.618	15.806	-28.127	1.00	12.61
ATOM	379	C	TRP	A	51	-3.136	9.732	-29.575	1.00	13.35
ATOM	380	O	TRP	A	51	-4.322	9.769	-29.907	1.00	12.89
ATOM	381	N	THR	A	52	-2.576	8.652	-29.024	1.00	13.20
ATOM	382	CA	THR	A	52	-3.386	7.462	-28.753	1.00	13.02

ATOM	440	CE2	PHE	A	59	-13.901	7.165	-35.186	1.00	16.90
ATOM	441	CD2	PHE	A	59	-13.895	6.709	-33.882	1.00	16.17
ATOM	442	C	PHE	A	59	-14.674	6.681	-29.785	1.00	15.69
ATOM	443	O	PHE	A	59	-15.699	6.175	-30.220	1.00	15.46
ATOM	444	N	LYS	A	60	-14.321	6.586	-28.510	1.00	15.65
ATOM	445	CA	LYS	A	60	-15.257	5.994	-27.552	1.00	16.61
ATOM	446	CB	LYS	A	60	-14.661	5.954	-26.144	1.00	16.44
ATOM	447	CG	LYS	A	60	-15.626	5.363	-25.059	1.00	17.65
ATOM	448	CD	LYS	A	60	-16.174	3.992	-25.433	1.00	18.35
ATOM	449	CE	LYS	A	60	-16.738	3.234	-24.199	1.00	19.79
ATOM	450	NZ	LYS	A	60	-17.819	3.976	-23.512	1.00	18.40
ATOM	451	C	LYS	A	60	-16.577	6.779	-27.579	1.00	16.72
ATOM	452	O	LYS	A	60	-17.663	6.182	-27.681	1.00	17.08
ATOM	453	N	ASN	A	61	-16.487	8.101	-27.508	1.00	16.77
ATOM	454	CA	ASN	A	61	-17.680	8.948	-27.628	1.00	18.06
ATOM	455	CB	ASN	A	61	-17.278	10.424	-27.573	1.00	19.41
ATOM	456	CG	ASN	A	61	-18.465	11.375	-27.643	1.00	22.93
ATOM	457	OD1	ASN	A	61	-19.585	11.057	-27.231	1.00	30.05
ATOM	458	ND2	ASN	A	61	-18.206	12.568	-28.130	1.00	29.54
ATOM	459	C	ASN	A	61	-18.480	8.659	-28.907	1.00	17.28
ATOM	460	O	ASN	A	61	-19.697	8.475	-28.852	1.00	18.11
ATOM	461	N	LEU	A	62	-17.799	8.647	-30.056	1.00	16.54
ATOM	462	CA	LEU	A	62	-18.460	8.379	-31.334	1.00	16.19
ATOM	463	CB	LEU	A	62	-17.479	8.572	-32.499	1.00	16.85
ATOM	464	CG	LEU	A	62	-17.047	10.027	-32.697	1.00	18.47
ATOM	465	CD1	LEU	A	62	-16.118	10.153	-33.916	1.00	20.38
ATOM	466	CD2	LEU	A	62	-18.263	10.925	-32.837	1.00	19.93
ATOM	467	C	LEU	A	62	-19.089	6.991	-31.371	1.00	16.01
ATOM	468	O	LEU	A	62	-20.225	6.833	-31.842	1.00	15.98
ATOM	469	N	ILE	A	63	-18.387	5.998	-30.831	1.00	15.67
ATOM	470	CA	ILE	A	63	-18.910	4.628	-30.810	1.00	15.86
ATOM	471	CB	ILE	A	63	-17.803	3.610	-30.372	1.00	15.88
ATOM	472	CG1	ILE	A	63	-16.756	3.466	-31.478	1.00	14.98
ATOM	473	CD1	ILE	A	63	-15.375	2.976	-30.966	1.00	15.62
ATOM	474	CG2	ILE	A	63	-18.398	2.251	-30.016	1.00	15.96
ATOM	475	C	ILE	A	63	-20.156	4.538	-29.920	1.00	16.39
ATOM	476	O	ILE	A	63	-21.137	3.854	-30.272	1.00	16.90
ATOM	477	N	ASP	A	64	-20.129	5.242	-28.796	1.00	16.51
ATOM	478	CA	ASP	A	64	-21.299	5.324	-27.922	1.00	17.76
ATOM	479	CB	ASP	A	64	-20.953	6.022	-26.594	1.00	17.81
ATOM	480	CG	ASP	A	64	-20.089	5.164	-25.682	1.00	17.84
ATOM	481	OD1	ASP	A	64	-19.883	3.944	-25.963	1.00	18.57
ATOM	482	OD2	ASP	A	64	-19.595	5.699	-24.659	1.00	20.95
ATOM	483	C	ASP	A	64	-22.492	5.982	-28.617	1.00	18.64
ATOM	484	O	ASP	A	64	-23.617	5.493	-28.507	1.00	20.85
ATOM	485	N	ARG	A	65	-22.262	7.070	-29.348	1.00	19.57
ATOM	486	CA	ARG	A	65	-23.341	7.750	-30.097	1.00	20.59
ATOM	487	CB	ARG	A	65	-22.823	9.046	-30.733	1.00	20.62
ATOM	488	CG	ARG	A	65	-22.465	10.083	-29.693	1.00	25.00
ATOM	489	CD	ARG	A	65	-22.010	11.385	-30.324	1.00	28.44
ATOM	490	NE	ARG	A	65	-23.106	12.071	-30.990	1.00	31.14
ATOM	491	CZ	ARG	A	65	-23.968	12.878	-30.373	1.00	32.75
ATOM	492	NH1	ARG	A	65	-23.873	13.095	-29.060	1.00	32.10
ATOM	493	NH2	ARG	A	65	-24.928	13.459	-31.080	1.00	32.31
ATOM	494	C	ARG	A	65	-23.907	6.841	-31.184	1.00	20.83
ATOM	495	O	ARG	A	65	-25.129	6.711	-31.357	1.00	20.48
ATOM	496	N	PHE	A	66	-22.998	6.213	-31.910	1.00	20.52

ATOM	497	CA	PHE	A	66	-23.340	5.271	-32.966	1.00	21.42
ATOM	498	CB	PHE	A	66	-22.046	4.778	-33.604	1.00	21.97
ATOM	499	CG	PHE	A	66	-22.224	3.603	-34.520	1.00	21.97
ATOM	500	CD1	PHE	A	66	-22.601	3.791	-35.844	1.00	23.23
ATOM	501	CE1	PHE	A	66	-22.768	2.690	-36.699	1.00	22.87
ATOM	502	CZ	PHE	A	66	-22.552	1.409	-36.221	1.00	22.60
ATOM	503	CE2	PHE	A	66	-22.165	1.216	-34.895	1.00	23.74
ATOM	504	CD2	PHE	A	66	-22.006	2.309	-34.054	1.00	23.07
ATOM	505	C	PHE	A	66	-24.152	4.084	-32.415	1.00	21.98
ATOM	506	O	PHE	A	66	-25.040	3.551	-33.099	1.00	21.80
ATOM	507	N	THR	A	67	-23.831	3.654	-31.195	1.00	22.48
ATOM	508	CA	THR	A	67	-24.546	2.537	-30.576	1.00	23.79
ATOM	509	CB	THR	A	67	-23.809	1.999	-29.333	1.00	23.68
ATOM	510	OG1	THR	A	67	-22.551	1.439	-29.745	1.00	23.93
ATOM	511	CG2	THR	A	67	-24.613	0.881	-28.653	1.00	23.90
ATOM	512	C	THR	A	67	-25.992	2.925	-30.258	1.00	24.77
ATOM	513	O	THR	A	67	-26.893	2.090	-30.349	1.00	25.31
ATOM	514	N	GLU	A	68	-26.207	4.189	-29.916	1.00	25.62
ATOM	515	CA	GLU	A	68	-27.540	4.688	-29.616	1.00	27.41
ATOM	516	CB	GLU	A	68	-27.466	6.038	-28.894	1.00	28.13
ATOM	517	CG	GLU	A	68	-26.997	5.951	-27.446	1.00	32.86
ATOM	518	CD	GLU	A	68	-28.095	5.487	-26.468	1.00	38.33
ATOM	519	OE1	GLU	A	68	-29.241	5.982	-26.542	1.00	40.42
ATOM	520	OE2	GLU	A	68	-27.799	4.633	-25.607	1.00	42.48
ATOM	521	C	GLU	A	68	-28.418	4.784	-30.873	1.00	27.86
ATOM	522	O	GLU	A	68	-29.602	4.429	-30.845	1.00	28.00
ATOM	523	N	THR	A	69	-27.833	5.260	-31.968	1.00	27.32
ATOM	524	CA	THR	A	69	-28.540	5.373	-33.241	1.00	27.32
ATOM	525	CB	THR	A	69	-29.113	6.792	-33.451	1.00	27.49
ATOM	526	OG1	THR	A	69	-29.922	7.153	-32.334	1.00	30.86
ATOM	527	CG2	THR	A	69	-29.945	6.843	-34.719	1.00	29.06
ATOM	528	C	THR	A	69	-27.563	5.133	-34.359	1.00	26.07
ATOM	529	O	THR	A	69	-26.619	5.905	-34.523	1.00	25.25
ATOM	530	N	TYR	A	70	-27.790	4.064	-35.123	1.00	25.65
ATOM	531	CA	TYR	A	70	-26.948	3.738	-36.267	1.00	25.36
ATOM	532	CB	TYR	A	70	-27.480	2.504	-37.013	1.00	25.26
ATOM	533	CG	TYR	A	70	-26.638	2.104	-38.217	1.00	25.62
ATOM	534	CD1	TYR	A	70	-26.949	2.567	-39.498	1.00	25.62
ATOM	535	CE1	TYR	A	70	-26.190	2.201	-40.611	1.00	26.48
ATOM	536	CZ	TYR	A	70	-25.099	1.360	-40.437	1.00	25.36
ATOM	537	OH	TYR	A	70	-24.354	0.995	-41.520	1.00	24.80
ATOM	538	CE2	TYR	A	70	-24.770	0.883	-39.175	1.00	25.59
ATOM	539	CD2	TYR	A	70	-25.538	1.259	-38.071	1.00	25.36
ATOM	540	C	TYR	A	70	-26.816	4.909	-37.230	1.00	25.38
ATOM	541	O	TYR	A	70	-27.802	5.573	-37.583	1.00	24.87
ATOM	542	N	ASP	A	71	-25.575	5.127	-37.666	1.00	25.16
ATOM	543	CA	ASP	A	71	-25.188	6.210	-38.550	1.00	25.40
ATOM	544	CB	ASP	A	71	-24.668	7.404	-37.724	1.00	25.60
ATOM	545	CG	ASP	A	71	-24.361	8.642	-38.573	1.00	26.17
ATOM	546	OD1	ASP	A	71	-23.801	8.526	-39.681	1.00	25.82
ATOM	547	OD2	ASP	A	71	-24.675	9.755	-38.108	1.00	27.85
ATOM	548	C	ASP	A	71	-24.061	5.619	-39.386	1.00	25.64
ATOM	549	O	ASP	A	71	-22.956	5.377	-38.875	1.00	24.82
ATOM	550	N	ALA	A	72	-24.347	5.379	-40.665	1.00	24.95
ATOM	551	CA	ALA	A	72	-23.380	4.764	-41.586	1.00	24.24
ATOM	552	CB	ALA	A	72	-24.047	4.434	-42.921	1.00	24.35
ATOM	553	C	ALA	A	72	-22.152	5.657	-41.812	1.00	24.04

ATOM	554	O	ALA	A	72	-21.054	5.159	-42.086	1.00	23.21
ATOM	555	N	GLY	A	73	-22.356	6.970	-41.695	1.00	23.63
ATOM	556	CA	GLY	A	73	-21.265	7.938	-41.761	1.00	24.20
ATOM	557	C	GLY	A	73	-20.285	7.809	-40.596	1.00	23.85
ATOM	558	O	GLY	A	73	-19.067	7.927	-40.806	1.00	24.81
ATOM	559	N	LEU	A	74	-20.798	7.588	-39.376	1.00	22.78
ATOM	560	CA	LEU	A	74	-19.927	7.347	-38.232	1.00	22.21
ATOM	561	CB	LEU	A	74	-20.662	7.449	-36.879	1.00	22.58
ATOM	562	CG	LEU	A	74	-21.132	8.846	-36.434	1.00	24.06
ATOM	563	CD1	LEU	A	74	-21.732	8.793	-35.019	1.00	22.31
ATOM	564	CD2	LEU	A	74	-20.002	9.869	-36.503	1.00	26.04
ATOM	565	C	LEU	A	74	-19.256	5.999	-38.370	1.00	21.94
ATOM	566	O	LEU	A	74	-18.060	5.872	-38.098	1.00	20.62
ATOM	567	N	GLN	A	75	-20.019	4.988	-38.814	1.00	21.47
ATOM	568	CA	GLN	A	75	-19.451	3.654	-38.989	1.00	21.07
ATOM	569	CB	GLN	A	75	-20.469	2.709	-39.619	1.00	21.44
ATOM	570	CG	GLN	A	75	-20.002	1.280	-39.594	1.00	23.11
ATOM	571	CD	GLN	A	75	-21.101	0.312	-39.945	1.00	24.74
ATOM	572	OE1	GLN	A	75	-21.273	-0.719	-39.290	1.00	26.57
ATOM	573	NE2	GLN	A	75	-21.872	0.654	-40.950	1.00	23.71
ATOM	574	C	GLN	A	75	-18.219	3.704	-39.889	1.00	21.05
ATOM	575	O	GLN	A	75	-17.229	3.046	-39.611	1.00	21.10
ATOM	576	N	ARG	A	76	-18.294	4.466	-40.975	1.00	20.73
ATOM	577	CA	ARG	A	76	-17.184	4.551	-41.910	1.00	21.56
ATOM	578	CB	ARG	A	76	-17.544	5.460	-43.101	1.00	22.06
ATOM	579	CG	ARG	A	76	-16.452	5.627	-44.168	1.00	24.00
ATOM	580	CD	ARG	A	76	-15.586	6.895	-43.934	1.00	27.60
ATOM	581	NE	ARG	A	76	-16.275	8.150	-44.280	1.00	30.93
ATOM	582	CZ	ARG	A	76	-15.778	9.378	-44.082	1.00	32.20
ATOM	583	NH1	ARG	A	76	-14.572	9.556	-43.535	1.00	30.72
ATOM	584	NH2	ARG	A	76	-16.491	10.443	-44.437	1.00	32.29
ATOM	585	C	ARG	A	76	-15.942	5.063	-41.162	1.00	20.85
ATOM	586	O	ARG	A	76	-14.858	4.514	-41.296	1.00	20.93
ATOM	587	N	ARG	A	77	-16.116	6.119	-40.378	1.00	20.17
ATOM	588	CA	ARG	A	77	-14.990	6.723	-39.631	1.00	19.61
ATOM	589	CB	ARG	A	77	-15.419	8.058	-39.009	1.00	19.11
ATOM	590	CG	ARG	A	77	-15.719	9.106	-40.075	1.00	20.18
ATOM	591	CD	ARG	A	77	-16.379	10.299	-39.459	1.00	22.42
ATOM	592	NE	ARG	A	77	-16.489	11.411	-40.396	1.00	24.06
ATOM	593	CZ	ARG	A	77	-17.501	11.592	-41.243	1.00	27.81
ATOM	594	NH1	ARG	A	77	-18.508	10.714	-41.303	1.00	28.01
ATOM	595	NH2	ARG	A	77	-17.509	12.658	-42.033	1.00	27.19
ATOM	596	C	ARG	A	77	-14.425	5.789	-38.570	1.00	18.77
ATOM	597	O	ARG	A	77	-13.197	5.685	-38.411	1.00	18.64
ATOM	598	N	ILE	A	78	-15.320	5.117	-37.852	1.00	17.79
ATOM	599	CA	ILE	A	78	-14.931	4.125	-36.857	1.00	18.13
ATOM	600	CB	ILE	A	78	-16.165	3.514	-36.151	1.00	17.88
ATOM	601	CG1	ILE	A	78	-16.862	4.564	-35.282	1.00	18.78
ATOM	602	CD1	ILE	A	78	-18.274	4.154	-34.879	1.00	19.16
ATOM	603	CG2	ILE	A	78	-15.772	2.279	-35.308	1.00	18.15
ATOM	604	C	ILE	A	78	-14.105	3.012	-37.491	1.00	18.09
ATOM	605	O	ILE	A	78	-13.088	2.612	-36.949	1.00	17.42
ATOM	606	N	GLU	A	79	-14.565	2.495	-38.631	1.00	18.82
ATOM	607	CA	GLU	A	79	-13.826	1.446	-39.341	1.00	20.22
ATOM	608	CB	GLU	A	79	-14.587	1.017	-40.609	1.00	20.36
ATOM	609	CG	GLU	A	79	-15.811	0.136	-40.312	1.00	22.29
ATOM	610	CD	GLU	A	79	-16.633	-0.206	-41.565	1.00	22.92

ATOM	611	OE1	GLU	A	79	-16.345	0.328	-42.670	1.00	26.99
ATOM	612	OE2	GLU	A	79	-17.579	-1.012	-41.425	1.00	25.69
ATOM	613	C	GLU	A	79	-12.418	1.918	-39.704	1.00	18.80
ATOM	614	O	GLU	A	79	-11.450	1.191	-39.507	1.00	19.44
ATOM	615	N	GLN	A	80	-12.301	3.147	-40.211	1.00	18.84
ATOM	616	CA	GLN	A	80	-10.998	3.661	-40.636	1.00	17.90
ATOM	617	CB	GLN	A	80	-11.149	4.921	-41.482	1.00	18.92
ATOM	618	CG	GLN	A	80	-11.794	4.593	-42.844	1.00	21.99
ATOM	619	CD	GLN	A	80	-12.040	5.799	-43.707	1.00	27.48
ATOM	620	OE1	GLN	A	80	-12.265	6.898	-43.223	1.00	30.45
ATOM	621	NE2	GLN	A	80	-12.037	5.586	-45.013	1.00	32.63
ATOM	622	C	GLN	A	80	-10.059	3.892	-39.456	1.00	17.64
ATOM	623	O	GLN	A	80	-8.862	3.612	-39.535	1.00	17.21
ATOM	624	N	TYR	A	81	-10.607	4.408	-38.365	1.00	17.29
ATOM	625	CA	TYR	A	81	-9.839	4.552	-37.122	1.00	17.64
ATOM	626	CB	TYR	A	81	-10.750	5.139	-36.023	1.00	17.24
ATOM	627	CG	TYR	A	81	-10.188	4.973	-34.621	1.00	17.79
ATOM	628	CD1	TYR	A	81	-9.085	5.728	-34.184	1.00	16.36
ATOM	629	CE1	TYR	A	81	-8.561	5.568	-32.882	1.00	17.45
ATOM	630	CZ	TYR	A	81	-9.146	4.646	-32.009	1.00	16.35
ATOM	631	OH	TYR	A	81	-8.654	4.457	-30.724	1.00	17.06
ATOM	632	CE2	TYR	A	81	-10.238	3.890	-32.423	1.00	17.51
ATOM	633	CD2	TYR	A	81	-10.754	4.055	-33.729	1.00	17.00
ATOM	634	C	TYR	A	81	-9.271	3.197	-36.686	1.00	18.04
ATOM	635	O	TYR	A	81	-8.098	3.083	-36.321	1.00	17.85
ATOM	636	N	ILE	A	82	-10.096	2.159	-36.746	1.00	17.99
ATOM	637	CA	ILE	A	82	-9.661	0.839	-36.295	1.00	19.35
ATOM	638	CB	ILE	A	82	-10.844	-0.166	-36.187	1.00	18.93
ATOM	639	CG1	ILE	A	82	-11.753	0.233	-35.017	1.00	19.40
ATOM	640	CD1	ILE	A	82	-13.093	-0.565	-34.896	1.00	20.46
ATOM	641	CG2	ILE	A	82	-10.301	-1.587	-35.984	1.00	20.61
ATOM	642	C	ILE	A	82	-8.547	0.292	-37.194	1.00	19.92
ATOM	643	O	ILE	A	82	-7.543	-0.239	-36.708	1.00	20.26
ATOM	644	N	THR	A	83	-8.713	0.432	-38.503	1.00	20.05
ATOM	645	CA	THR	A	83	-7.709	-0.100	-39.406	1.00	21.11
ATOM	646	CB	THR	A	83	-8.241	-0.297	-40.845	1.00	21.63
ATOM	647	OG1	THR	A	83	-8.830	0.902	-41.306	1.00	25.88
ATOM	648	CG2	THR	A	83	-9.330	-1.347	-40.851	1.00	21.56
ATOM	649	C	THR	A	83	-6.410	0.690	-39.337	1.00	20.59
ATOM	650	O	THR	A	83	-5.338	0.105	-39.511	1.00	20.72
ATOM	651	N	ALA	A	84	-6.494	1.997	-39.050	1.00	19.51
ATOM	652	CA	ALA	A	84	-5.292	2.809	-38.777	1.00	19.37
ATOM	653	CB	ALA	A	84	-5.652	4.290	-38.507	1.00	19.42
ATOM	654	C	ALA	A	84	-4.436	2.231	-37.643	1.00	19.32
ATOM	655	O	ALA	A	84	-3.208	2.370	-37.649	1.00	19.47
ATOM	656	N	GLN	A	85	-5.063	1.535	-36.695	1.00	19.34
ATOM	657	CA	GLN	A	85	-4.325	0.998	-35.544	1.00	18.78
ATOM	658	CB	GLN	A	85	-5.266	0.609	-34.396	1.00	19.29
ATOM	659	CG	GLN	A	85	-6.260	1.735	-34.007	1.00	17.98
ATOM	660	CD	GLN	A	85	-5.593	3.098	-33.830	1.00	17.20
ATOM	661	OE1	GLN	A	85	-6.021	4.095	-34.418	1.00	20.82
ATOM	662	NE2	GLN	A	85	-4.540	3.143	-33.034	1.00	13.47
ATOM	663	C	GLN	A	85	-3.447	-0.178	-35.932	1.00	19.08
ATOM	664	O	GLN	A	85	-2.478	-0.473	-35.251	1.00	17.94
ATOM	665	N	VAL	A	86	-3.808	-0.838	-37.032	1.00	19.32
ATOM	666	CA	VAL	A	86	-2.999	-1.928	-37.588	1.00	20.79
ATOM	667	CB	VAL	A	86	-3.670	-2.581	-38.823	1.00	21.18

ATOM	725	CG	PRO	A	94	10.988	7.653	-30.753	1.00	19.96
ATOM	726	CD	PRO	A	94	9.952	6.717	-31.325	1.00	19.99
ATOM	727	C	PRO	A	94	10.870	4.898	-28.263	1.00	20.64
ATOM	728	O	PRO	A	94	11.756	4.727	-27.430	1.00	20.54
ATOM	729	N	SER	A	95	9.610	4.485	-28.073	1.00	20.36
ATOM	730	CA	SER	A	95	9.264	3.674	-26.902	1.00	21.00
ATOM	731	CB	SER	A	95	7.770	3.736	-26.587	1.00	20.05
ATOM	732	OG	SER	A	95	7.413	5.036	-26.147	1.00	19.97
ATOM	733	C	SER	A	95	9.679	2.204	-27.066	1.00	21.73
ATOM	734	O	SER	A	95	9.809	1.499	-26.072	1.00	22.10
ATOM	735	N	GLY	A	96	9.853	1.748	-28.306	1.00	21.90
ATOM	736	CA	GLY	A	96	10.229	0.350	-28.562	1.00	23.56
ATOM	737	C	GLY	A	96	9.506	-0.196	-29.774	1.00	24.14
ATOM	738	O	GLY	A	96	9.121	0.557	-30.664	1.00	24.24
ATOM	739	N	SER	A	97	9.315	-1.510	-29.828	1.00	25.24
ATOM	740	CA	SER	A	97	8.703	-2.116	-31.000	1.00	25.77
ATOM	741	CB	SER	A	97	9.751	-2.874	-31.834	1.00	27.15
ATOM	742	OG	SER	A	97	10.120	-4.086	-31.189	1.00	30.57
ATOM	743	C	SER	A	97	7.590	-3.042	-30.571	1.00	25.27
ATOM	744	O	SER	A	97	7.346	-3.199	-29.376	1.00	24.85
ATOM	745	N	LEU	A	98	6.930	-3.655	-31.543	1.00	24.82
ATOM	746	CA	LEU	A	98	5.826	-4.559	-31.252	1.00	25.88
ATOM	747	CB	LEU	A	98	4.982	-4.813	-32.504	1.00	25.31
ATOM	748	CG	LEU	A	98	3.714	-5.673	-32.420	1.00	25.89
ATOM	749	CD1	LEU	A	98	2.745	-5.169	-31.337	1.00	25.58
ATOM	750	CD2	LEU	A	98	3.006	-5.724	-33.778	1.00	26.27
ATOM	751	C	LEU	A	98	6.310	-5.866	-30.604	1.00	26.75
ATOM	752	O	LEU	A	98	5.607	-6.438	-29.762	1.00	27.41
ATOM	753	N	ALA	A	99	7.528	-6.290	-30.950	1.00	27.23
ATOM	754	CA	ALA	A	99	8.074	-7.590	-30.533	1.00	27.89
ATOM	755	CB	ALA	A	99	9.566	-7.700	-30.935	1.00	27.68
ATOM	756	C	ALA	A	99	7.893	-7.911	-29.053	1.00	27.86
ATOM	757	O	ALA	A	99	7.450	-9.007	-28.711	1.00	28.77
ATOM	758	N	ASP	A	100	8.241	-6.966	-28.181	1.00	27.75
ATOM	759	CA	ASP	A	100	8.030	-7.137	-26.741	1.00	27.20
ATOM	760	CB	ASP	A	100	9.328	-6.937	-25.966	1.00	27.10
ATOM	761	CG	ASP	A	100	9.845	-5.525	-26.038	1.00	30.19
ATOM	762	OD1	ASP	A	100	10.891	-5.281	-25.419	1.00	32.28
ATOM	763	OD2	ASP	A	100	9.225	-4.654	-26.694	1.00	30.36
ATOM	764	C	ASP	A	100	6.905	-6.256	-26.173	1.00	25.74
ATOM	765	O	ASP	A	100	6.761	-6.108	-24.956	1.00	26.33
ATOM	766	N	GLY	A	101	6.118	-5.683	-27.075	1.00	24.93
ATOM	767	CA	GLY	A	101	4.982	-4.853	-26.707	1.00	23.22
ATOM	768	C	GLY	A	101	5.326	-3.418	-26.342	1.00	22.68
ATOM	769	O	GLY	A	101	4.419	-2.580	-26.287	1.00	21.48
ATOM	770	N	SER	A	102	6.609	-3.117	-26.126	1.00	21.53
ATOM	771	CA	SER	A	102	6.996	-1.815	-25.563	1.00	21.49
ATOM	772	CB	SER	A	102	8.483	-1.739	-25.199	1.00	22.07
ATOM	773	OG	SER	A	102	9.283	-1.958	-26.345	1.00	21.77
ATOM	774	C	SER	A	102	6.604	-0.643	-26.449	1.00	20.66
ATOM	775	O	SER	A	102	6.279	0.403	-25.925	1.00	20.67
ATOM	776	N	GLY	A	103	6.636	-0.819	-27.771	1.00	19.97
ATOM	777	CA	GLY	A	103	6.257	0.255	-28.707	1.00	19.46
ATOM	778	C	GLY	A	103	4.824	0.777	-28.539	1.00	18.94
ATOM	779	O	GLY	A	103	4.525	1.903	-28.945	1.00	18.13
ATOM	780	N	LEU	A	104	3.939	-0.043	-27.956	1.00	18.13
ATOM	781	CA	LEU	A	104	2.517	0.326	-27.818	1.00	16.92

ATOM	839	CB	LEU	A	111	-1.265	13.510	-39.163	1.00	16.57
ATOM	840	CG	LEU	A	111	-1.770	13.908	-37.756	1.00	18.11
ATOM	841	CD1	LEU	A	111	-1.819	15.405	-37.574	1.00	21.43
ATOM	842	CD2	LEU	A	111	-3.151	13.204	-37.506	1.00	18.74
ATOM	843	C	LEU	A	111	-0.409	11.436	-40.350	1.00	17.37
ATOM	844	O	LEU	A	111	-1.426	11.023	-40.944	1.00	17.23
ATOM	845	N	THR	A	112	0.833	11.258	-40.815	1.00	17.42
ATOM	846	CA	THR	A	112	1.144	10.301	-41.887	1.00	17.92
ATOM	847	CB	THR	A	112	2.512	10.619	-42.499	1.00	17.98
ATOM	848	OG1	THR	A	112	3.476	10.702	-41.445	1.00	18.32
ATOM	849	CG2	THR	A	112	2.486	11.945	-43.228	1.00	19.47
ATOM	850	C	THR	A	112	1.215	8.846	-41.356	1.00	18.90
ATOM	851	O	THR	A	112	1.535	7.917	-42.117	1.00	17.68
ATOM	852	N	LEU	A	113	0.944	8.664	-40.055	1.00	18.48
ATOM	853	CA	LEU	A	113	1.041	7.379	-39.348	1.00	19.78
ATOM	854	CB	LEU	A	113	0.061	6.319	-39.904	1.00	19.45
ATOM	855	CG	LEU	A	113	-1.411	6.699	-40.074	1.00	21.71
ATOM	856	CD1	LEU	A	113	-2.194	5.470	-40.477	1.00	23.46
ATOM	857	CD2	LEU	A	113	-2.005	7.323	-38.800	1.00	21.59
ATOM	858	C	LEU	A	113	2.481	6.866	-39.338	1.00	20.43
ATOM	859	O	LEU	A	113	2.737	5.704	-39.653	1.00	20.96
ATOM	860	N	LYS	A	114	3.406	7.769	-39.024	1.00	20.07
ATOM	861	CA	LYS	A	114	4.826	7.460	-38.863	1.00	20.25
ATOM	862	CB	LYS	A	114	5.662	8.209	-39.899	1.00	20.95
ATOM	863	CG	LYS	A	114	5.432	7.725	-41.314	1.00	25.23
ATOM	864	CD	LYS	A	114	6.636	8.059	-42.184	1.00	33.76
ATOM	865	CE	LYS	A	114	6.551	7.360	-43.537	1.00	38.31
ATOM	866	NZ	LYS	A	114	5.285	7.711	-44.251	1.00	41.29
ATOM	867	C	LYS	A	114	5.252	7.874	-37.471	1.00	19.64
ATOM	868	O	LYS	A	114	4.576	8.708	-36.845	1.00	19.39
ATOM	869	N	PRO	A	115	6.376	7.318	-36.973	1.00	19.06
ATOM	870	CA	PRO	A	115	6.750	7.626	-35.601	1.00	18.72
ATOM	871	CB	PRO	A	115	7.963	6.712	-35.326	1.00	19.82
ATOM	872	CG	PRO	A	115	8.101	5.814	-36.500	1.00	20.93
ATOM	873	CD	PRO	A	115	7.339	6.412	-37.639	1.00	19.08
ATOM	874	C	PRO	A	115	7.156	9.093	-35.434	1.00	18.70
ATOM	875	O	PRO	A	115	7.694	9.724	-36.375	1.00	17.25
ATOM	876	N	PHE	A	116	6.844	9.628	-34.256	1.00	18.55
ATOM	877	CA	PHE	A	116	7.342	10.918	-33.805	1.00	18.27
ATOM	878	CB	PHE	A	116	6.359	11.566	-32.809	1.00	18.41
ATOM	879	CG	PHE	A	116	6.908	12.804	-32.151	1.00	17.33
ATOM	880	CD1	PHE	A	116	6.942	14.014	-32.847	1.00	16.98
ATOM	881	CE1	PHE	A	116	7.457	15.173	-32.254	1.00	16.22
ATOM	882	CZ	PHE	A	116	7.950	15.138	-30.935	1.00	15.88
ATOM	883	CE2	PHE	A	116	7.902	13.917	-30.216	1.00	16.74
ATOM	884	CD2	PHE	A	116	7.380	12.767	-30.825	1.00	16.05
ATOM	885	C	PHE	A	116	8.701	10.695	-33.141	1.00	19.14
ATOM	886	O	PHE	A	116	8.808	9.987	-32.134	1.00	19.66
ATOM	887	N	THR	A	117	9.746	11.299	-33.713	1.00	19.53
ATOM	888	CA	THR	A	117	11.116	11.020	-33.315	1.00	20.15
ATOM	889	CB	THR	A	117	12.042	10.999	-34.567	1.00	20.83
ATOM	890	OG1	THR	A	117	11.988	12.277	-35.222	1.00	22.59
ATOM	891	CG2	THR	A	117	11.576	9.895	-35.557	1.00	21.40
ATOM	892	C	THR	A	117	11.685	11.969	-32.263	1.00	20.34
ATOM	893	O	THR	A	117	12.813	11.768	-31.774	1.00	21.13
ATOM	894	N	GLY	A	118	10.943	13.017	-31.914	1.00	19.25
ATOM	895	CA	GLY	A	118	11.451	14.018	-30.974	1.00	19.41

ATOM	953	CB	ARG	A	125	1.331	2.567	-19.256	1.00	14.28
ATOM	954	CG	ARG	A	125	2.864	2.703	-19.249	1.00	15.16
ATOM	955	CD	ARG	A	125	3.503	1.577	-18.439	1.00	18.07
ATOM	956	NE	ARG	A	125	4.924	1.827	-18.132	1.00	17.46
ATOM	957	CZ	ARG	A	125	5.944	1.334	-18.833	1.00	19.43
ATOM	958	NH1	ARG	A	125	5.728	0.601	-19.925	1.00	20.02
ATOM	959	NH2	ARG	A	125	7.197	1.596	-18.453	1.00	18.94
ATOM	960	C	ARG	A	125	-0.829	3.335	-20.359	1.00	14.48
ATOM	961	O	ARG	A	125	-1.424	2.262	-20.343	1.00	14.40
ATOM	962	N	ASP	A	126	-1.462	4.509	-20.374	1.00	14.03
ATOM	963	CA	ASP	A	126	-2.919	4.568	-20.542	1.00	13.39
ATOM	964	CB	ASP	A	126	-3.488	5.922	-20.067	1.00	13.17
ATOM	965	CG	ASP	A	126	-2.926	7.092	-20.845	1.00	14.17
ATOM	966	OD1	ASP	A	126	-1.713	7.108	-21.143	1.00	12.29
ATOM	967	OD2	ASP	A	126	-3.705	8.003	-21.187	1.00	16.69
ATOM	968	C	ASP	A	126	-3.350	4.306	-21.974	1.00	13.60
ATOM	969	O	ASP	A	126	-4.452	3.806	-22.189	1.00	13.56
ATOM	970	N	GLY	A	127	-2.491	4.634	-22.948	1.00	12.78
ATOM	971	CA	GLY	A	127	-2.886	4.558	-24.358	1.00	13.20
ATOM	972	C	GLY	A	127	-3.473	3.213	-24.794	1.00	12.77
ATOM	973	O	GLY	A	127	-4.579	3.150	-25.327	1.00	12.56
ATOM	974	N	PRO	A	128	-2.720	2.120	-24.613	1.00	13.94
ATOM	975	CA	PRO	A	128	-3.262	0.810	-24.978	1.00	12.97
ATOM	976	CB	PRO	A	128	-2.135	-0.162	-24.552	1.00	14.15
ATOM	977	CG	PRO	A	128	-0.907	0.656	-24.721	1.00	14.39
ATOM	978	CD	PRO	A	128	-1.323	2.010	-24.150	1.00	13.67
ATOM	979	C	PRO	A	128	-4.571	0.455	-24.255	1.00	13.30
ATOM	980	O	PRO	A	128	-5.433	-0.161	-24.869	1.00	13.72
ATOM	981	N	ALA	A	129	-4.718	0.852	-22.985	1.00	12.95
ATOM	982	CA	ALA	A	129	-5.963	0.611	-22.258	1.00	13.49
ATOM	983	CB	ALA	A	129	-5.806	1.016	-20.808	1.00	13.00
ATOM	984	C	ALA	A	129	-7.162	1.329	-22.923	1.00	13.43
ATOM	985	O	ALA	A	129	-8.217	0.721	-23.159	1.00	13.26
ATOM	986	N	LEU	A	130	-6.998	2.619	-23.221	1.00	12.51
ATOM	987	CA	LEU	A	130	-8.068	3.409	-23.813	1.00	12.69
ATOM	988	CB	LEU	A	130	-7.678	4.903	-23.806	1.00	12.56
ATOM	989	CG	LEU	A	130	-7.458	5.555	-22.426	1.00	14.76
ATOM	990	CD1	LEU	A	130	-6.959	6.991	-22.643	1.00	15.23
ATOM	991	CD2	LEU	A	130	-8.776	5.544	-21.651	1.00	15.30
ATOM	992	C	LEU	A	130	-8.410	2.934	-25.228	1.00	12.78
ATOM	993	O	LEU	A	130	-9.571	2.863	-25.607	1.00	12.83
ATOM	994	N	ARG	A	131	-7.386	2.601	-26.015	1.00	13.70
ATOM	995	CA	ARG	A	131	-7.630	2.070	-27.351	1.00	14.52
ATOM	996	CB	ARG	A	131	-6.316	1.925	-28.135	1.00	14.04
ATOM	997	CG	ARG	A	131	-6.550	1.438	-29.566	1.00	15.60
ATOM	998	CD	ARG	A	131	-5.278	1.522	-30.428	1.00	15.59
ATOM	999	NE	ARG	A	131	-4.118	0.915	-29.779	1.00	16.77
ATOM	1000	CZ	ARG	A	131	-2.860	1.205	-30.098	1.00	16.26
ATOM	1001	NH1	ARG	A	131	-2.610	2.104	-31.054	1.00	16.37
ATOM	1002	NH2	ARG	A	131	-1.856	0.618	-29.448	1.00	15.96
ATOM	1003	C	ARG	A	131	-8.408	0.729	-27.283	1.00	14.44
ATOM	1004	O	ARG	A	131	-9.350	0.533	-28.050	1.00	15.71
ATOM	1005	N	ALA	A	132	-8.025	-0.164	-26.364	1.00	14.50
ATOM	1006	CA	ALA	A	132	-8.738	-1.456	-26.195	1.00	15.06
ATOM	1007	CB	ALA	A	132	-8.069	-2.348	-25.112	1.00	15.02
ATOM	1008	C	ALA	A	132	-10.194	-1.197	-25.846	1.00	15.43
ATOM	1009	O	ALA	A	132	-11.101	-1.808	-26.416	1.00	15.57

ATOM	1067	NZ	LYS A 140	-18.940	-2.725	-22.954	1.00	26.78
ATOM	1068	C	LYS A 140	-21.126	-5.001	-29.584	1.00	24.17
ATOM	1069	O	LYS A 140	-22.053	-5.823	-29.670	1.00	24.94
ATOM	1070	N	TRP A 141	-21.062	-3.898	-30.321	1.00	23.60
ATOM	1071	CA	TRP A 141	-22.054	-3.613	-31.338	1.00	24.29
ATOM	1072	CB	TRP A 141	-21.847	-2.226	-31.953	1.00	24.36
ATOM	1073	CG	TRP A 141	-22.973	-1.833	-32.874	1.00	24.25
ATOM	1074	CD1	TRP A 141	-24.113	-1.170	-32.531	1.00	25.06
ATOM	1075	NE1	TRP A 141	-24.921	-1.016	-33.638	1.00	25.22
ATOM	1076	CE2	TRP A 141	-24.302	-1.575	-34.722	1.00	24.07
ATOM	1077	CD2	TRP A 141	-23.078	-2.115	-34.276	1.00	24.80
ATOM	1078	CE3	TRP A 141	-22.248	-2.766	-35.203	1.00	25.40
ATOM	1079	CZ3	TRP A 141	-22.669	-2.858	-36.532	1.00	25.72
ATOM	1080	CH2	TRP A 141	-23.891	-2.304	-36.940	1.00	24.95
ATOM	1081	CZ2	TRP A 141	-24.721	-1.666	-36.051	1.00	25.14
ATOM	1082	C	TRP A 141	-22.078	-4.666	-32.448	1.00	24.47
ATOM	1083	O	TRP A 141	-23.155	-5.152	-32.831	1.00	24.52
ATOM	1084	N	LEU A 142	-20.904	-4.991	-32.985	1.00	24.39
ATOM	1085	CA	LEU A 142	-20.806	-6.024	-34.010	1.00	25.05
ATOM	1086	CB	LEU A 142	-19.361	-6.199	-34.473	1.00	24.56
ATOM	1087	CG	LEU A 142	-18.754	-5.023	-35.252	1.00	24.44
ATOM	1088	CD1	LEU A 142	-17.274	-5.304	-35.441	1.00	23.72
ATOM	1089	CD2	LEU A 142	-19.424	-4.793	-36.624	1.00	25.76
ATOM	1090	C	LEU A 142	-21.406	-7.364	-33.556	1.00	25.97
ATOM	1091	O	LEU A 142	-22.195	-7.966	-34.283	1.00	26.49
ATOM	1092	N	ILE A 143	-21.045	-7.814	-32.359	1.00	27.04
ATOM	1093	CA	ILE A 143	-21.596	-9.040	-31.792	1.00	28.46
ATOM	1094	CB	ILE A 143	-20.959	-9.362	-30.425	1.00	28.30
ATOM	1095	CG1	ILE A 143	-19.474	-9.722	-30.609	1.00	27.97
ATOM	1096	CD1	ILE A 143	-18.707	-9.814	-29.301	1.00	29.85
ATOM	1097	CG2	ILE A 143	-21.720	-10.494	-29.717	1.00	29.57
ATOM	1098	C	ILE A 143	-23.124	-8.992	-31.682	1.00	29.52
ATOM	1099	O	ILE A 143	-23.813	-9.928	-32.118	1.00	30.10
ATOM	1100	N	ASN A 144	-23.655	-7.916	-31.111	1.00	30.37
ATOM	1101	CA	ASN A 144	-25.109	-7.768	-30.988	1.00	32.18
ATOM	1102	CB	ASN A 144	-25.479	-6.522	-30.186	1.00	32.73
ATOM	1103	CG	ASN A 144	-26.960	-6.489	-29.792	1.00	36.88
ATOM	1104	OD1	ASN A 144	-27.444	-7.350	-29.041	1.00	42.25
ATOM	1105	ND2	ASN A 144	-27.685	-5.488	-30.291	1.00	40.10
ATOM	1106	C	ASN A 144	-25.820	-7.760	-32.341	1.00	32.17
ATOM	1107	O	ASN A 144	-27.012	-8.029	-32.411	1.00	32.73
ATOM	1108	N	ASN A 145	-25.094	-7.460	-33.411	1.00	32.19
ATOM	1109	CA	ASN A 145	-25.705	-7.403	-34.726	1.00	32.78
ATOM	1110	CB	ASN A 145	-25.526	-6.014	-35.331	1.00	33.16
ATOM	1111	CG	ASN A 145	-26.397	-4.986	-34.639	1.00	34.32
ATOM	1112	OD1	ASN A 145	-27.576	-4.841	-34.969	1.00	37.42
ATOM	1113	ND2	ASN A 145	-25.834	-4.289	-33.647	1.00	34.31
ATOM	1114	C	ASN A 145	-25.285	-8.533	-35.671	1.00	33.13
ATOM	1115	O	ASN A 145	-25.412	-8.415	-36.902	1.00	33.03
ATOM	1116	N	ASN A 146	-24.789	-9.618	-35.065	1.00	33.43
ATOM	1117	CA	ASN A 146	-24.475	-10.885	-35.736	1.00	34.14
ATOM	1118	CB	ASN A 146	-25.710	-11.459	-36.461	1.00	34.85
ATOM	1119	CG	ASN A 146	-26.994	-11.280	-35.657	1.00	37.41
ATOM	1120	OD1	ASN A 146	-27.033	-11.543	-34.450	1.00	41.43
ATOM	1121	ND2	ASN A 146	-28.047	-10.814	-36.321	1.00	41.54
ATOM	1122	C	ASN A 146	-23.266	-10.795	-36.652	1.00	33.92
ATOM	1123	O	ASN A 146	-23.216	-11.419	-37.724	1.00	33.76

ATOM	1181	ND2 ASN A 153	-10.917	-14.444	-38.383	1.00	37.61
ATOM	1182	C ASN A 153	-10.060	-10.272	-37.787	1.00	32.10
ATOM	1183	O ASN A 153	-8.850	-10.213	-38.020	1.00	32.79
ATOM	1184	N VAL A 154	-10.810	-9.193	-37.577	1.00	30.55
ATOM	1185	CA VAL A 154	-10.251	-7.854	-37.750	1.00	28.93
ATOM	1186	CB VAL A 154	-11.217	-6.925	-38.537	1.00	29.03
ATOM	1187	CG1 VAL A 154	-10.565	-5.577	-38.827	1.00	29.23
ATOM	1188	CG2 VAL A 154	-11.654	-7.585	-39.860	1.00	29.87
ATOM	1189	C VAL A 154	-9.824	-7.211	-36.414	1.00	27.28
ATOM	1190	O VAL A 154	-8.722	-6.678	-36.306	1.00	26.96
ATOM	1191	N ILE A 155	-10.685	-7.288	-35.403	1.00	25.13
ATOM	1192	CA ILE A 155	-10.525	-6.459	-34.197	1.00	23.05
ATOM	1193	CB ILE A 155	-11.900	-5.972	-33.670	1.00	23.10
ATOM	1194	CG1 ILE A 155	-12.596	-5.128	-34.741	1.00	22.49
ATOM	1195	CD1 ILE A 155	-14.006	-4.680	-34.375	1.00	22.72
ATOM	1196	CG2 ILE A 155	-11.731	-5.144	-32.399	1.00	23.05
ATOM	1197	C ILE A 155	-9.710	-7.136	-33.092	1.00	22.44
ATOM	1198	O ILE A 155	-8.789	-6.537	-32.533	1.00	21.14
ATOM	1199	N TRP A 156	-10.006	-8.409	-32.822	1.00	21.48
ATOM	1200	CA TRP A 156	-9.392	-9.099	-31.696	1.00	21.75
ATOM	1201	CB TRP A 156	-9.958	-10.520	-31.511	1.00	22.50
ATOM	1202	CG TRP A 156	-9.298	-11.245	-30.371	1.00	23.43
ATOM	1203	CD1 TRP A 156	-8.420	-12.298	-30.461	1.00	24.92
ATOM	1204	NE1 TRP A 156	-8.011	-12.680	-29.198	1.00	24.85
ATOM	1205	CE2 TRP A 156	-8.600	-11.863	-28.269	1.00	26.38
ATOM	1206	CD2 TRP A 156	-9.416	-10.941	-28.970	1.00	25.03
ATOM	1207	CE3 TRP A 156	-10.139	-9.983	-28.236	1.00	25.01
ATOM	1208	CZ3 TRP A 156	-10.024	-9.982	-26.844	1.00	24.30
ATOM	1209	CH2 TRP A 156	-9.206	-10.910	-26.185	1.00	23.97
ATOM	1210	CZ2 TRP A 156	-8.495	-11.861	-26.875	1.00	24.60
ATOM	1211	C TRP A 156	-7.845	-9.109	-31.699	1.00	21.52
ATOM	1212	O TRP A 156	-7.235	-8.945	-30.648	1.00	21.78
ATOM	1213	N PRO A 157	-7.209	-9.303	-32.870	1.00	21.66
ATOM	1214	CA PRO A 157	-5.726	-9.258	-32.878	1.00	21.40
ATOM	1215	CB PRO A 157	-5.378	-9.459	-34.360	1.00	21.26
ATOM	1216	CG PRO A 157	-6.583	-10.172	-34.955	1.00	22.82
ATOM	1217	CD PRO A 157	-7.762	-9.596	-34.207	1.00	21.45
ATOM	1218	C PRO A 157	-5.162	-7.898	-32.410	1.00	21.30
ATOM	1219	O PRO A 157	-4.092	-7.837	-31.795	1.00	21.11
ATOM	1220	N ILE A 158	-5.881	-6.821	-32.724	1.00	20.52
ATOM	1221	CA ILE A 158	-5.457	-5.467	-32.318	1.00	19.93
ATOM	1222	CB ILE A 158	-6.273	-4.348	-33.034	1.00	19.73
ATOM	1223	CG1 ILE A 158	-6.261	-4.527	-34.559	1.00	21.25
ATOM	1224	CD1 ILE A 158	-7.229	-3.640	-35.351	1.00	20.03
ATOM	1225	CG2 ILE A 158	-5.686	-2.971	-32.670	1.00	20.16
ATOM	1226	C ILE A 158	-5.632	-5.366	-30.816	1.00	19.58
ATOM	1227	O ILE A 158	-4.701	-5.023	-30.081	1.00	19.04
ATOM	1228	N VAL A 159	-6.840	-5.704	-30.359	1.00	19.39
ATOM	1229	CA VAL A 159	-7.201	-5.624	-28.953	1.00	19.15
ATOM	1230	CB VAL A 159	-8.687	-6.026	-28.744	1.00	19.06
ATOM	1231	CG1 VAL A 159	-9.046	-6.028	-27.253	1.00	20.39
ATOM	1232	CG2 VAL A 159	-9.604	-5.090	-29.511	1.00	20.08
ATOM	1233	C VAL A 159	-6.280	-6.501	-28.105	1.00	19.39
ATOM	1234	O VAL A 159	-5.794	-6.089	-27.036	1.00	18.63
ATOM	1235	N ARG A 160	-6.022	-7.721	-28.585	1.00	18.93
ATOM	1236	CA ARG A 160	-5.171	-8.633	-27.833	1.00	19.64
ATOM	1237	CB ARG A 160	-5.078	-10.005	-28.513	1.00	19.17

ATOM	1295	C	VAL A 166	-1.258	-4.829	-18.865	1.00	17.83
ATOM	1296	O	VAL A 166	-0.741	-4.483	-17.792	1.00	18.00
ATOM	1297	N	ALA A 167	-1.520	-6.099	-19.188	1.00	18.26
ATOM	1298	CA	ALA A 167	-1.233	-7.218	-18.285	1.00	18.92
ATOM	1299	CB	ALA A 167	-1.716	-8.532	-18.899	1.00	18.25
ATOM	1300	C	ALA A 167	0.251	-7.325	-17.956	1.00	19.08
ATOM	1301	O	ALA A 167	0.611	-7.757	-16.854	1.00	20.02
ATOM	1302	N	GLN A 168	1.097	-6.955	-18.920	1.00	19.13
ATOM	1303	CA	GLN A 168	2.558	-7.022	-18.749	1.00	19.21
ATOM	1304	CB	GLN A 168	3.218	-7.201	-20.115	1.00	19.08
ATOM	1305	CG	GLN A 168	4.739	-7.373	-20.053	1.00	20.55
ATOM	1306	CD	GLN A 168	5.337	-7.891	-21.355	1.00	20.26
ATOM	1307	OE1	GLN A 168	4.634	-8.378	-22.238	1.00	22.69
ATOM	1308	NE2	GLN A 168	6.643	-7.772	-21.476	1.00	23.10
ATOM	1309	C	GLN A 168	3.182	-5.807	-18.048	1.00	19.60
ATOM	1310	O	GLN A 168	4.104	-5.942	-17.205	1.00	18.87
ATOM	1311	N	TYR A 169	2.709	-4.609	-18.404	1.00	19.23
ATOM	1312	CA	TYR A 169	3.399	-3.377	-18.011	1.00	19.45
ATOM	1313	CB	TYR A 169	3.760	-2.560	-19.266	1.00	20.43
ATOM	1314	CG	TYR A 169	4.773	-3.203	-20.203	1.00	21.30
ATOM	1315	CD1	TYR A 169	6.125	-3.243	-19.872	1.00	23.63
ATOM	1316	CE1	TYR A 169	7.065	-3.822	-20.723	1.00	24.59
ATOM	1317	CZ	TYR A 169	6.651	-4.359	-21.926	1.00	23.11
ATOM	1318	OH	TYR A 169	7.580	-4.924	-22.779	1.00	25.26
ATOM	1319	CE2	TYR A 169	5.309	-4.330	-22.288	1.00	22.49
ATOM	1320	CD2	TYR A 169	4.375	-3.754	-21.422	1.00	20.87
ATOM	1321	C	TYR A 169	2.675	-2.449	-17.015	1.00	19.49
ATOM	1322	O	TYR A 169	3.205	-1.386	-16.691	1.00	19.69
ATOM	1323	N	TRP A 170	1.508	-2.850	-16.498	1.00	18.91
ATOM	1324	CA	TRP A 170	0.735	-1.981	-15.588	1.00	19.29
ATOM	1325	CB	TRP A 170	-0.610	-2.626	-15.208	1.00	18.85
ATOM	1326	CG	TRP A 170	-0.489	-3.743	-14.215	1.00	21.04
ATOM	1327	CD1	TRP A 170	-0.342	-5.083	-14.489	1.00	20.67
ATOM	1328	NE1	TRP A 170	-0.259	-5.793	-13.317	1.00	22.09
ATOM	1329	CE2	TRP A 170	-0.336	-4.928	-12.258	1.00	19.19
ATOM	1330	CD2	TRP A 170	-0.481	-3.621	-12.789	1.00	20.35
ATOM	1331	CE3	TRP A 170	-0.582	-2.530	-11.905	1.00	19.61
ATOM	1332	CZ3	TRP A 170	-0.546	-2.769	-10.542	1.00	22.33
ATOM	1333	CH2	TRP A 170	-0.404	-4.090	-10.038	1.00	21.08
ATOM	1334	CZ2	TRP A 170	-0.297	-5.179	-10.884	1.00	20.76
ATOM	1335	C	TRP A 170	1.526	-1.592	-14.336	1.00	19.20
ATOM	1336	O	TRP A 170	1.395	-0.475	-13.808	1.00	19.24
ATOM	1337	N	ASN A 171	2.371	-2.504	-13.858	1.00	19.13
ATOM	1338	CA	ASN A 171	3.054	-2.280	-12.596	1.00	20.12
ATOM	1339	CB	ASN A 171	3.178	-3.603	-11.820	1.00	20.59
ATOM	1340	CG	ASN A 171	3.646	-3.419	-10.392	1.00	22.31
ATOM	1341	OD1	ASN A 171	4.531	-4.155	-9.938	1.00	23.68
ATOM	1342	ND2	ASN A 171	3.081	-2.435	-9.684	1.00	18.77
ATOM	1343	C	ASN A 171	4.392	-1.557	-12.797	1.00	20.93
ATOM	1344	O	ASN A 171	5.333	-1.724	-12.022	1.00	20.35
ATOM	1345	N	GLN A 172	4.449	-0.712	-13.826	1.00	20.64
ATOM	1346	CA	GLN A 172	5.644	0.061	-14.156	1.00	22.31
ATOM	1347	CB	GLN A 172	6.262	-0.452	-15.469	1.00	22.04
ATOM	1348	CG	GLN A 172	6.784	-1.895	-15.312	1.00	25.79
ATOM	1349	CD	GLN A 172	7.536	-2.450	-16.515	1.00	27.61
ATOM	1350	OE1	GLN A 172	8.276	-1.735	-17.214	1.00	35.65
ATOM	1351	NE2	GLN A 172	7.367	-3.755	-16.752	1.00	33.80

ATOM	1409	CG	GLU	A	179	1.165	14.344	-22.280	1.00	13.03
ATOM	1410	CD	GLU	A	179	1.274	14.434	-23.785	1.00	14.68
ATOM	1411	OE1	GLU	A	179	0.895	15.478	-24.340	1.00	15.98
ATOM	1412	OE2	GLU	A	179	1.730	13.457	-24.405	1.00	15.44
ATOM	1413	C	GLU	A	179	3.667	14.853	-19.374	1.00	15.00
ATOM	1414	O	GLU	A	179	4.626	15.292	-20.004	1.00	14.90
ATOM	1415	N	GLU	A	180	3.561	14.932	-18.048	1.00	14.78
ATOM	1416	CA	GLU	A	180	4.476	15.745	-17.246	1.00	16.76
ATOM	1417	CB	GLU	A	180	3.719	16.928	-16.630	1.00	16.95
ATOM	1418	CG	GLU	A	180	3.282	17.972	-17.654	1.00	18.69
ATOM	1419	CD	GLU	A	180	2.240	18.969	-17.122	1.00	19.72
ATOM	1420	OE1	GLU	A	180	1.587	18.715	-16.077	1.00	19.00
ATOM	1421	OE2	GLU	A	180	2.076	20.020	-17.793	1.00	24.62
ATOM	1422	C	GLU	A	180	5.124	14.954	-16.104	1.00	16.50
ATOM	1423	O	GLU	A	180	6.265	15.202	-15.750	1.00	17.36
ATOM	1424	N	VAL	A	181	4.364	14.056	-15.488	1.00	16.77
ATOM	1425	CA	VAL	A	181	4.775	13.426	-14.218	1.00	16.87
ATOM	1426	CB	VAL	A	181	3.672	13.555	-13.130	1.00	16.78
ATOM	1427	CG1	VAL	A	181	4.030	12.732	-11.893	1.00	18.56
ATOM	1428	CG2	VAL	A	181	3.490	15.008	-12.726	1.00	17.21
ATOM	1429	C	VAL	A	181	5.057	11.953	-14.451	1.00	17.22
ATOM	1430	O	VAL	A	181	4.177	11.205	-14.825	1.00	16.93
ATOM	1431	N	ASN	A	182	6.290	11.532	-14.201	1.00	18.39
ATOM	1432	CA	ASN	A	182	6.674	10.123	-14.394	1.00	18.57
ATOM	1433	CB	ASN	A	182	8.136	10.079	-14.845	1.00	19.77
ATOM	1434	CG	ASN	A	182	8.665	8.669	-15.056	1.00	23.96
ATOM	1435	OD1	ASN	A	182	9.881	8.470	-15.058	1.00	33.20
ATOM	1436	ND2	ASN	A	182	7.794	7.706	-15.258	1.00	23.63
ATOM	1437	C	ASN	A	182	6.440	9.375	-13.073	1.00	18.31
ATOM	1438	O	ASN	A	182	7.132	9.621	-12.087	1.00	18.80
ATOM	1439	N	GLY	A	183	5.436	8.508	-13.034	1.00	16.83
ATOM	1440	CA	GLY	A	183	5.091	7.828	-11.790	1.00	15.98
ATOM	1441	C	GLY	A	183	3.989	6.837	-12.033	1.00	15.59
ATOM	1442	O	GLY	A	183	3.937	6.228	-13.117	1.00	15.30
ATOM	1443	N	SER	A	184	3.119	6.670	-11.035	1.00	14.95
ATOM	1444	CA	SER	A	184	1.927	5.823	-11.151	1.00	15.45
ATOM	1445	CB	SER	A	184	1.844	4.792	-10.017	1.00	15.76
ATOM	1446	OG	SER	A	184	2.998	3.935	-10.027	1.00	17.33
ATOM	1447	C	SER	A	184	0.731	6.758	-11.073	1.00	15.14
ATOM	1448	O	SER	A	184	0.646	7.546	-10.148	1.00	15.83
ATOM	1449	N	SER	A	185	-0.151	6.706	-12.066	1.00	14.73
ATOM	1450	CA	SER	A	185	-1.169	7.755	-12.190	1.00	13.87
ATOM	1451	CB	SER	A	185	-0.991	8.535	-13.515	1.00	14.73
ATOM	1452	OG	SER	A	185	-1.793	9.721	-13.544	1.00	14.93
ATOM	1453	C	SER	A	185	-2.551	7.140	-12.127	1.00	13.49
ATOM	1454	O	SER	A	185	-2.834	6.134	-12.792	1.00	13.35
ATOM	1455	N	PHE	A	186	-3.427	7.782	-11.354	1.00	13.72
ATOM	1456	CA	PHE	A	186	-4.764	7.275	-11.092	1.00	13.43
ATOM	1457	CB	PHE	A	186	-5.511	8.319	-10.260	1.00	13.58
ATOM	1458	CG	PHE	A	186	-6.807	7.839	-9.662	1.00	13.52
ATOM	1459	CD1	PHE	A	186	-6.819	6.873	-8.655	1.00	16.11
ATOM	1460	CE1	PHE	A	186	-8.004	6.489	-8.036	1.00	17.80
ATOM	1461	CZ	PHE	A	186	-9.214	7.062	-8.442	1.00	16.18
ATOM	1462	CE2	PHE	A	186	-9.211	8.051	-9.432	1.00	15.77
ATOM	1463	CD2	PHE	A	186	-8.003	8.435	-10.030	1.00	14.62
ATOM	1464	C	PHE	A	186	-5.552	6.946	-12.372	1.00	13.57
ATOM	1465	O	PHE	A	186	-6.053	5.839	-12.524	1.00	13.36

ATOM	1523	N	ARG A 194	-10.185	-1.285	-15.995	1.00	15.27
ATOM	1524	CA	ARG A 194	-11.349	-1.437	-16.852	1.00	15.29
ATOM	1525	CB	ARG A 194	-11.922	-0.073	-17.234	1.00	14.30
ATOM	1526	CG	ARG A 194	-13.029	-0.212	-18.239	1.00	14.46
ATOM	1527	CD	ARG A 194	-13.614	1.102	-18.723	1.00	15.43
ATOM	1528	NE	ARG A 194	-14.589	0.780	-19.767	1.00	15.58
ATOM	1529	CZ	ARG A 194	-15.624	1.539	-20.125	1.00	17.92
ATOM	1530	NH1	ARG A 194	-15.815	2.744	-19.576	1.00	14.60
ATOM	1531	NH2	ARG A 194	-16.451	1.095	-21.060	1.00	16.15
ATOM	1532	C	ARG A 194	-11.047	-2.258	-18.111	1.00	15.74
ATOM	1533	O	ARG A 194	-11.842	-3.120	-18.504	1.00	15.56
ATOM	1534	N	ALA A 195	-9.918	-1.967	-18.758	1.00	15.60
ATOM	1535	CA	ALA A 195	-9.562	-2.638	-20.004	1.00	15.90
ATOM	1536	CB	ALA A 195	-8.254	-2.042	-20.591	1.00	15.40
ATOM	1537	C	ALA A 195	-9.436	-4.150	-19.798	1.00	15.65
ATOM	1538	O	ALA A 195	-9.959	-4.929	-20.610	1.00	16.79
ATOM	1539	N	LEU A 196	-8.763	-4.550	-18.721	1.00	16.36
ATOM	1540	CA	LEU A 196	-8.552	-5.976	-18.423	1.00	17.02
ATOM	1541	CB	LEU A 196	-7.625	-6.126	-17.235	1.00	16.96
ATOM	1542	CG	LEU A 196	-6.167	-5.744	-17.532	1.00	16.96
ATOM	1543	CD1	LEU A 196	-5.375	-5.857	-16.252	1.00	18.93
ATOM	1544	CD2	LEU A 196	-5.590	-6.636	-18.630	1.00	20.38
ATOM	1545	C	LEU A 196	-9.877	-6.685	-18.167	1.00	17.92
ATOM	1546	O	LEU A 196	-10.102	-7.795	-18.643	1.00	18.98
ATOM	1547	N	VAL A 197	-10.779	-6.014	-17.454	1.00	18.51
ATOM	1548	CA	VAL A 197	-12.112	-6.560	-17.181	1.00	18.81
ATOM	1549	CB	VAL A 197	-12.875	-5.702	-16.130	1.00	18.26
ATOM	1550	CG1	VAL A 197	-14.340	-6.173	-15.994	1.00	21.18
ATOM	1551	CG2	VAL A 197	-12.149	-5.784	-14.778	1.00	19.79
ATOM	1552	C	VAL A 197	-12.924	-6.779	-18.462	1.00	19.05
ATOM	1553	O	VAL A 197	-13.456	-7.884	-18.693	1.00	18.62
ATOM	1554	N	GLU A 198	-13.010	-5.752	-19.308	1.00	18.43
ATOM	1555	CA	GLU A 198	-13.747	-5.873	-20.556	1.00	19.38
ATOM	1556	CB	GLU A 198	-13.849	-4.517	-21.241	1.00	19.38
ATOM	1557	CG	GLU A 198	-14.609	-3.530	-20.417	1.00	20.22
ATOM	1558	CD	GLU A 198	-15.334	-2.537	-21.298	1.00	22.66
ATOM	1559	OE1	GLU A 198	-16.313	-2.940	-21.940	1.00	22.16
ATOM	1560	OE2	GLU A 198	-14.924	-1.369	-21.342	1.00	22.92
ATOM	1561	C	GLU A 198	-13.094	-6.861	-21.509	1.00	19.78
ATOM	1562	O	GLU A 198	-13.780	-7.506	-22.303	1.00	20.29
ATOM	1563	N	GLY A 199	-11.770	-6.944	-21.435	1.00	19.78
ATOM	1564	CA	GLY A 199	-10.998	-7.823	-22.314	1.00	20.88
ATOM	1565	C	GLY A 199	-11.288	-9.285	-21.986	1.00	21.53
ATOM	1566	O	GLY A 199	-11.546	-10.083	-22.879	1.00	22.36
ATOM	1567	N	ALA A 200	-11.256	-9.615	-20.702	1.00	21.79
ATOM	1568	CA	ALA A 200	-11.605	-10.956	-20.234	1.00	22.44
ATOM	1569	CB	ALA A 200	-11.463	-11.038	-18.728	1.00	22.21
ATOM	1570	C	ALA A 200	-13.016	-11.329	-20.696	1.00	22.54
ATOM	1571	O	ALA A 200	-13.237	-12.419	-21.214	1.00	22.25
ATOM	1572	N	THR A 201	-13.965	-10.403	-20.573	1.00	22.56
ATOM	1573	CA	THR A 201	-15.345	-10.671	-20.989	1.00	22.77
ATOM	1574	CB	THR A 201	-16.302	-9.527	-20.551	1.00	22.83
ATOM	1575	OG1	THR A 201	-16.219	-9.387	-19.134	1.00	24.92
ATOM	1576	CG2	THR A 201	-17.756	-9.819	-20.929	1.00	23.76
ATOM	1577	C	THR A 201	-15.435	-10.905	-22.485	1.00	22.78
ATOM	1578	O	THR A 201	-16.099	-11.851	-22.925	1.00	22.95
ATOM	1579	N	LEU A 202	-14.760	-10.069	-23.275	1.00	21.78

ATOM	1637	CB	SER A 211	-7.401	-17.353	-17.783	1.00	25.87
ATOM	1638	OG	SER A 211	-6.315	-17.789	-18.573	1.00	26.62
ATOM	1639	C	SER A 211	-6.509	-15.026	-17.498	1.00	24.55
ATOM	1640	O	SER A 211	-6.542	-14.676	-16.311	1.00	24.46
ATOM	1641	N	ALA A 212	-5.505	-14.712	-18.323	1.00	23.56
ATOM	1642	CA	ALA A 212	-4.423	-13.816	-17.906	1.00	23.42
ATOM	1643	CB	ALA A 212	-3.417	-13.622	-19.031	1.00	23.66
ATOM	1644	C	ALA A 212	-4.999	-12.450	-17.496	1.00	23.54
ATOM	1645	O	ALA A 212	-4.566	-11.848	-16.513	1.00	24.00
ATOM	1646	N	TYR A 213	-5.970	-11.979	-18.271	1.00	22.79
ATOM	1647	CA	TYR A 213	-6.594	-10.676	-18.017	1.00	22.18
ATOM	1648	CB	TYR A 213	-7.453	-10.241	-19.193	1.00	21.74
ATOM	1649	CG	TYR A 213	-6.761	-10.345	-20.515	1.00	20.05
ATOM	1650	CD1	TYR A 213	-7.461	-10.761	-21.637	1.00	20.58
ATOM	1651	CE1	TYR A 213	-6.854	-10.854	-22.868	1.00	21.95
ATOM	1652	CZ	TYR A 213	-5.503	-10.545	-22.988	1.00	20.62
ATOM	1653	OH	TYR A 213	-4.930	-10.668	-24.220	1.00	21.72
ATOM	1654	CE2	TYR A 213	-4.758	-10.149	-21.888	1.00	19.76
ATOM	1655	CD2	TYR A 213	-5.400	-10.038	-20.647	1.00	20.61
ATOM	1656	C	TYR A 213	-7.423	-10.710	-16.758	1.00	23.06
ATOM	1657	O	TYR A 213	-7.320	-9.804	-15.939	1.00	22.56
ATOM	1658	N	SER A 214	-8.226	-11.767	-16.578	1.00	23.15
ATOM	1659	CA	SER A 214	-9.064	-11.832	-15.392	1.00	23.90
ATOM	1660	CB	SER A 214	-10.244	-12.798	-15.580	1.00	24.54
ATOM	1661	OG	SER A 214	-9.776	-14.085	-15.939	1.00	27.95
ATOM	1662	C	SER A 214	-8.259	-12.122	-14.122	1.00	23.64
ATOM	1663	O	SER A 214	-8.676	-11.762	-13.026	1.00	23.43
ATOM	1664	N	SER A 215	-7.095	-12.743	-14.248	1.00	23.82
ATOM	1665	CA	SER A 215	-6.295	-12.970	-13.050	1.00	24.66
ATOM	1666	CB	SER A 215	-5.390	-14.205	-13.200	1.00	25.70
ATOM	1667	OG	SER A 215	-4.267	-13.914	-14.004	1.00	29.15
ATOM	1668	C	SER A 215	-5.491	-11.739	-12.610	1.00	23.98
ATOM	1669	O	SER A 215	-5.217	-11.561	-11.421	1.00	24.09
ATOM	1670	N	VAL A 216	-5.115	-10.894	-13.566	1.00	22.89
ATOM	1671	CA	VAL A 216	-4.347	-9.679	-13.272	1.00	22.50
ATOM	1672	CB	VAL A 216	-3.442	-9.296	-14.493	1.00	22.52
ATOM	1673	CG1	VAL A 216	-2.855	-7.888	-14.369	1.00	24.11
ATOM	1674	CG2	VAL A 216	-2.296	-10.317	-14.652	1.00	22.49
ATOM	1675	C	VAL A 216	-5.256	-8.520	-12.801	1.00	21.88
ATOM	1676	O	VAL A 216	-4.869	-7.745	-11.936	1.00	21.84
ATOM	1677	N	ALA A 217	-6.475	-8.440	-13.332	1.00	21.86
ATOM	1678	CA	ALA A 217	-7.374	-7.303	-13.050	1.00	21.59
ATOM	1679	CB	ALA A 217	-8.721	-7.479	-13.760	1.00	21.26
ATOM	1680	C	ALA A 217	-7.571	-6.968	-11.558	1.00	21.55
ATOM	1681	O	ALA A 217	-7.447	-5.804	-11.165	1.00	21.20
ATOM	1682	N	PRO A 218	-7.842	-7.988	-10.701	1.00	21.95
ATOM	1683	CA	PRO A 218	-8.030	-7.700	-9.282	1.00	21.59
ATOM	1684	CB	PRO A 218	-8.283	-9.104	-8.670	1.00	22.29
ATOM	1685	CG	PRO A 218	-8.789	-9.905	-9.789	1.00	22.61
ATOM	1686	CD	PRO A 218	-7.966	-9.435	-10.963	1.00	22.11
ATOM	1687	C	PRO A 218	-6.798	-7.065	-8.634	1.00	21.27
ATOM	1688	O	PRO A 218	-6.928	-6.299	-7.680	1.00	20.92
ATOM	1689	N	GLN A 219	-5.608	-7.386	-9.141	1.00	21.17
ATOM	1690	CA	GLN A 219	-4.378	-6.786	-8.609	1.00	21.51
ATOM	1691	CB	GLN A 219	-3.149	-7.569	-9.084	1.00	22.72
ATOM	1692	CG	GLN A 219	-3.113	-8.985	-8.516	1.00	24.90
ATOM	1693	CD	GLN A 219	-3.323	-8.982	-7.015	1.00	29.57

ATOM	1751	CD	ARG	A	226	-1.806	0.741	-1.204	1.00	32.16
ATOM	1752	NE	ARG	A	226	-3.035	0.843	-0.432	1.00	37.77
ATOM	1753	CZ	ARG	A	226	-3.997	-0.079	-0.413	1.00	41.09
ATOM	1754	NH1	ARG	A	226	-5.093	0.120	0.322	1.00	42.17
ATOM	1755	NH2	ARG	A	226	-3.874	-1.196	-1.127	1.00	42.78
ATOM	1756	C	ARG	A	226	-3.499	4.645	-2.915	1.00	21.23
ATOM	1757	O	ARG	A	226	-2.723	5.358	-2.288	1.00	20.95
ATOM	1758	N	PHE	A	227	-4.298	5.123	-3.869	1.00	20.28
ATOM	1759	CA	PHE	A	227	-4.280	6.545	-4.250	1.00	19.67
ATOM	1760	CB	PHE	A	227	-4.777	6.704	-5.693	1.00	19.40
ATOM	1761	CG	PHE	A	227	-3.814	6.195	-6.744	1.00	18.28
ATOM	1762	CD1	PHE	A	227	-3.733	4.831	-7.040	1.00	18.14
ATOM	1763	CE1	PHE	A	227	-2.855	4.355	-8.046	1.00	18.24
ATOM	1764	CZ	PHE	A	227	-2.034	5.264	-8.748	1.00	16.75
ATOM	1765	CE2	PHE	A	227	-2.113	6.641	-8.456	1.00	18.79
ATOM	1766	CD2	PHE	A	227	-3.005	7.091	-7.452	1.00	17.51
ATOM	1767	C	PHE	A	227	-5.126	7.435	-3.343	1.00	20.55
ATOM	1768	O	PHE	A	227	-4.967	8.659	-3.334	1.00	20.38
ATOM	1769	N	TRP	A	228	-6.032	6.820	-2.583	1.00	20.72
ATOM	1770	CA	TRP	A	228	-6.924	7.545	-1.671	1.00	20.71
ATOM	1771	CB	TRP	A	228	-8.036	6.596	-1.211	1.00	20.41
ATOM	1772	CG	TRP	A	228	-9.030	7.228	-0.283	1.00	20.59
ATOM	1773	CD1	TRP	A	228	-9.243	6.915	1.040	1.00	21.81
ATOM	1774	NE1	TRP	A	228	-10.255	7.722	1.557	1.00	22.69
ATOM	1775	CE2	TRP	A	228	-10.712	8.553	0.565	1.00	20.71
ATOM	1776	CD2	TRP	A	228	-9.958	8.280	-0.607	1.00	18.88
ATOM	1777	CE3	TRP	A	228	-10.225	9.014	-1.772	1.00	18.79
ATOM	1778	CZ3	TRP	A	228	-11.209	9.986	-1.734	1.00	20.13
ATOM	1779	CH2	TRP	A	228	-11.937	10.242	-0.552	1.00	21.18
ATOM	1780	CZ2	TRP	A	228	-11.710	9.537	0.601	1.00	21.65
ATOM	1781	C	TRP	A	228	-6.193	8.120	-0.463	1.00	21.38
ATOM	1782	O	TRP	A	228	-5.479	7.394	0.236	1.00	21.50
ATOM	1783	N	VAL	A	229	-6.379	9.416	-0.209	1.00	21.95
ATOM	1784	CA	VAL	A	229	-5.844	10.065	0.983	1.00	22.99
ATOM	1785	CB	VAL	A	229	-5.205	11.436	0.654	1.00	22.81
ATOM	1786	CG1	VAL	A	229	-4.490	12.026	1.871	1.00	23.48
ATOM	1787	CG2	VAL	A	229	-4.226	11.292	-0.493	1.00	23.28
ATOM	1788	C	VAL	A	229	-6.984	10.206	2.000	1.00	24.08
ATOM	1789	O	VAL	A	229	-7.803	11.119	1.899	1.00	23.70
ATOM	1790	N	SER	A	230	-7.044	9.298	2.974	1.00	25.37
ATOM	1791	CA	SER	A	230	-8.193	9.290	3.905	1.00	27.59
ATOM	1792	CB	SER	A	230	-8.254	8.000	4.728	1.00	27.67
ATOM	1793	OG	SER	A	230	-7.029	7.805	5.402	1.00	31.30
ATOM	1794	C	SER	A	230	-8.241	10.513	4.820	1.00	27.93
ATOM	1795	O	SER	A	230	-9.321	10.983	5.174	1.00	28.91
ATOM	1796	N	SER	A	231	-7.088	11.059	5.165	1.00	28.76
ATOM	1797	CA	SER	A	231	-7.059	12.237	6.030	1.00	29.72
ATOM	1798	CB	SER	A	231	-5.671	12.461	6.639	1.00	30.39
ATOM	1799	OG	SER	A	231	-4.703	12.713	5.635	1.00	34.43
ATOM	1800	C	SER	A	231	-7.566	13.491	5.323	1.00	29.39
ATOM	1801	O	SER	A	231	-8.154	14.364	5.966	1.00	30.97
ATOM	1802	N	GLY	A	232	-7.373	13.579	4.005	1.00	27.59
ATOM	1803	CA	GLY	A	232	-7.867	14.728	3.247	1.00	25.22
ATOM	1804	C	GLY	A	232	-9.181	14.518	2.493	1.00	23.25
ATOM	1805	O	GLY	A	232	-9.810	15.487	2.077	1.00	23.19
ATOM	1806	N	GLY	A	233	-9.589	13.265	2.320	1.00	20.97
ATOM	1807	CA	GLY	A	233	-10.809	12.937	1.578	1.00	19.35

ATOM	1865	C	ASN A 240	6.334	7.677	-7.571	1.00	23.27
ATOM	1866	O	ASN A 240	7.000	7.381	-8.562	1.00	23.15
ATOM	1867	N	THR A 241	6.261	8.919	-7.096	1.00	25.02
ATOM	1868	CA	THR A 241	6.939	10.038	-7.729	1.00	28.12
ATOM	1869	CB	THR A 241	6.044	10.720	-8.817	1.00	28.09
ATOM	1870	OG1	THR A 241	6.741	11.836	-9.369	1.00	28.75
ATOM	1871	CG2	THR A 241	4.727	11.208	-8.231	1.00	28.30
ATOM	1872	C	THR A 241	7.302	11.065	-6.674	1.00	29.96
ATOM	1873	O	THR A 241	6.749	11.037	-5.589	1.00	30.58
ATOM	1874	N	ASN A 242	8.209	11.984	-6.991	1.00	33.17
ATOM	1875	CA	ASN A 242	8.585	13.019	-6.024	1.00	36.07
ATOM	1876	CB	ASN A 242	10.059	12.880	-5.616	1.00	37.13
ATOM	1877	CG	ASN A 242	10.324	11.631	-4.771	1.00	40.96
ATOM	1878	OD1	ASN A 242	9.509	11.235	-3.921	1.00	45.33
ATOM	1879	ND2	ASN A 242	11.477	11.007	-4.998	1.00	44.43
ATOM	1880	C	ASN A 242	8.321	14.427	-6.528	1.00	37.00
ATOM	1881	O	ASN A 242	9.091	15.346	-6.245	1.00	37.94
ATOM	1882	N	GLU A 243	7.210	14.602	-7.233	1.00	37.54
ATOM	1883	CA	GLU A 243	6.895	15.869	-7.907	1.00	38.05
ATOM	1884	CB	GLU A 243	5.775	15.638	-8.925	1.00	38.77
ATOM	1885	CG	GLU A 243	5.650	16.732	-9.977	1.00	42.65
ATOM	1886	CD	GLU A 243	6.959	16.985	-10.709	1.00	47.49
ATOM	1887	OE1	GLU A 243	7.424	16.084	-11.453	1.00	49.14
ATOM	1888	OE2	GLU A 243	7.520	18.090	-10.532	1.00	50.15
ATOM	1889	C	GLU A 243	6.559	17.088	-7.015	1.00	37.15
ATOM	1890	O	GLU A 243	6.645	18.240	-7.469	1.00	38.39
ATOM	1891	N	GLY A 244	6.174	16.873	-5.766	1.00	35.69
ATOM	1892	CA	GLY A 244	5.858	18.019	-4.911	1.00	33.51
ATOM	1893	C	GLY A 244	4.609	18.775	-5.369	1.00	31.80
ATOM	1894	O	GLY A 244	4.634	19.999	-5.535	1.00	33.32
ATOM	1895	N	ARG A 245	3.529	18.036	-5.612	1.00	27.92
ATOM	1896	CA	ARG A 245	2.200	18.618	-5.781	1.00	24.21
ATOM	1897	CB	ARG A 245	1.638	18.224	-7.130	1.00	24.30
ATOM	1898	CG	ARG A 245	2.410	18.842	-8.275	1.00	24.62
ATOM	1899	CD	ARG A 245	1.625	18.681	-9.532	1.00	22.11
ATOM	1900	NE	ARG A 245	2.462	18.829	-10.713	1.00	21.13
ATOM	1901	CZ	ARG A 245	2.114	18.302	-11.878	1.00	21.50
ATOM	1902	NH1	ARG A 245	0.982	17.621	-11.945	1.00	18.57
ATOM	1903	NH2	ARG A 245	2.883	18.443	-12.951	1.00	20.83
ATOM	1904	C	ARG A 245	1.295	18.040	-4.718	1.00	21.84
ATOM	1905	O	ARG A 245	1.624	17.021	-4.128	1.00	20.65
ATOM	1906	N	THR A 246	0.140	18.652	-4.483	1.00	19.15
ATOM	1907	CA	THR A 246	-0.824	18.058	-3.540	1.00	17.46
ATOM	1908	CB	THR A 246	-1.989	18.997	-3.238	1.00	17.87
ATOM	1909	OG1	THR A 246	-2.752	19.155	-4.440	1.00	15.85
ATOM	1910	CG2	THR A 246	-1.495	20.370	-2.730	1.00	17.50
ATOM	1911	C	THR A 246	-1.426	16.769	-4.103	1.00	17.25
ATOM	1912	O	THR A 246	-1.884	15.914	-3.351	1.00	17.57
ATOM	1913	N	GLY A 247	-1.482	16.646	-5.430	1.00	15.60
ATOM	1914	CA	GLY A 247	-2.148	15.492	-6.054	1.00	15.02
ATOM	1915	C	GLY A 247	-3.609	15.761	-6.396	1.00	14.69
ATOM	1916	O	GLY A 247	-4.260	14.939	-7.059	1.00	14.45
ATOM	1917	N	LYS A 248	-4.137	16.890	-5.928	1.00	13.43
ATOM	1918	CA	LYS A 248	-5.508	17.286	-6.259	1.00	13.00
ATOM	1919	CB	LYS A 248	-5.969	18.453	-5.396	1.00	12.32
ATOM	1920	CG	LYS A 248	-5.965	18.179	-3.881	1.00	13.12
ATOM	1921	CD	LYS A 248	-6.133	19.493	-3.102	1.00	14.08

ATOM	1979	CB	SER A 256	-15.152	9.760	-11.282	1.00	13.40
ATOM	1980	OG	SER A 256	-16.332	9.252	-10.674	1.00	16.69
ATOM	1981	C	SER A 256	-15.610	8.705	-13.518	1.00	13.13
ATOM	1982	O	SER A 256	-16.360	7.711	-13.654	1.00	13.10
ATOM	1983	N	ILE A 257	-15.594	9.728	-14.377	1.00	12.32
ATOM	1984	CA	ILE A 257	-16.523	9.784	-15.513	1.00	12.32
ATOM	1985	CB	ILE A 257	-16.747	11.215	-16.072	1.00	11.55
ATOM	1986	CG1	ILE A 257	-15.482	11.773	-16.764	1.00	11.38
ATOM	1987	CD1	ILE A 257	-15.699	13.143	-17.441	1.00	13.23
ATOM	1988	CG2	ILE A 257	-17.257	12.166	-14.942	1.00	13.70
ATOM	1989	C	ILE A 257	-16.220	8.795	-16.653	1.00	12.79
ATOM	1990	O	ILE A 257	-17.150	8.319	-17.338	1.00	13.25
ATOM	1991	N	HIS A 258	-14.941	8.487	-16.855	1.00	12.71
ATOM	1992	CA	HIS A 258	-14.565	7.566	-17.931	1.00	13.41
ATOM	1993	CB	HIS A 258	-13.194	7.947	-18.498	1.00	12.06
ATOM	1994	CG	HIS A 258	-13.268	9.175	-19.341	1.00	13.92
ATOM	1995	ND1	HIS A 258	-13.942	9.196	-20.547	1.00	16.01
ATOM	1996	CE1	HIS A 258	-13.891	10.421	-21.047	1.00	18.57
ATOM	1997	NE2	HIS A 258	-13.256	11.199	-20.189	1.00	14.08
ATOM	1998	CD2	HIS A 258	-12.861	10.449	-19.108	1.00	13.51
ATOM	1999	C	HIS A 258	-14.649	6.091	-17.565	1.00	14.12
ATOM	2000	O	HIS A 258	-14.645	5.239	-18.454	1.00	14.90
ATOM	2001	N	THR A 259	-14.752	5.801	-16.274	1.00	13.93
ATOM	2002	CA	THR A 259	-15.034	4.420	-15.807	1.00	14.91
ATOM	2003	CB	THR A 259	-13.933	3.856	-14.899	1.00	14.46
ATOM	2004	OG1	THR A 259	-13.788	4.647	-13.705	1.00	15.66
ATOM	2005	CG2	THR A 259	-12.589	3.802	-15.677	1.00	15.81
ATOM	2006	C	THR A 259	-16.433	4.248	-15.173	1.00	14.21
ATOM	2007	O	THR A 259	-16.709	3.235	-14.546	1.00	14.95
ATOM	2008	N	PHE A 260	-17.290	5.238	-15.367	1.00	14.76
ATOM	2009	CA	PHE A 260	-18.691	5.194	-14.926	1.00	15.13
ATOM	2010	CB	PHE A 260	-19.377	6.492	-15.379	1.00	15.81
ATOM	2011	CG	PHE A 260	-20.886	6.508	-15.228	1.00	15.47
ATOM	2012	CD1	PHE A 260	-21.505	6.188	-14.015	1.00	17.59
ATOM	2013	CE1	PHE A 260	-22.903	6.259	-13.898	1.00	19.11
ATOM	2014	CZ	PHE A 260	-23.682	6.653	-14.991	1.00	17.18
ATOM	2015	CE2	PHE A 260	-23.082	6.994	-16.178	1.00	18.04
ATOM	2016	CD2	PHE A 260	-21.679	6.917	-16.296	1.00	17.22
ATOM	2017	C	PHE A 260	-19.436	3.977	-15.475	1.00	15.55
ATOM	2018	O	PHE A 260	-19.426	3.725	-16.684	1.00	15.81
ATOM	2019	N	ASP A 261	-20.093	3.235	-14.586	1.00	15.51
ATOM	2020	CA	ASP A 261	-21.008	2.176	-15.006	1.00	16.05
ATOM	2021	CB	ASP A 261	-20.303	0.813	-15.015	1.00	16.46
ATOM	2022	CG	ASP A 261	-21.205	-0.321	-15.490	1.00	17.60
ATOM	2023	OD1	ASP A 261	-22.440	-0.122	-15.579	1.00	18.97
ATOM	2024	OD2	ASP A 261	-20.656	-1.404	-15.810	1.00	18.29
ATOM	2025	C	ASP A 261	-22.117	2.185	-13.972	1.00	16.30
ATOM	2026	O	ASP A 261	-21.882	1.809	-12.840	1.00	15.53
ATOM	2027	N	PRO A 262	-23.320	2.610	-14.374	1.00	18.21
ATOM	2028	CA	PRO A 262	-24.438	2.716	-13.412	1.00	20.39
ATOM	2029	CB	PRO A 262	-25.589	3.308	-14.247	1.00	20.43
ATOM	2030	CG	PRO A 262	-25.235	3.044	-15.669	1.00	20.06
ATOM	2031	CD	PRO A 262	-23.709	2.994	-15.734	1.00	17.40
ATOM	2032	C	PRO A 262	-24.815	1.382	-12.753	1.00	22.31
ATOM	2033	O	PRO A 262	-25.356	1.374	-11.622	1.00	22.24
ATOM	2034	N	ASN A 263	-24.508	0.267	-13.421	1.00	22.99
ATOM	2035	CA	ASN A 263	-24.750	-1.048	-12.838	1.00	25.42

ATOM	2093	C	PHE A 271	-15.677	5.856	-8.551	1.00	16.63
ATOM	2094	O	PHE A 271	-15.479	6.764	-9.358	1.00	15.93
ATOM	2095	N	GLN A 272	-16.861	5.249	-8.439	1.00	15.21
ATOM	2096	CA	GLN A 272	-18.011	5.673	-9.251	1.00	14.97
ATOM	2097	CB	GLN A 272	-19.227	4.755	-9.013	1.00	14.93
ATOM	2098	CG	GLN A 272	-19.021	3.355	-9.615	1.00	16.30
ATOM	2099	CD	GLN A 272	-18.755	3.413	-11.102	1.00	15.81
ATOM	2100	OE1	GLN A 272	-19.575	3.909	-11.883	1.00	16.97
ATOM	2101	NE2	GLN A 272	-17.617	2.861	-11.512	1.00	18.50
ATOM	2102	C	GLN A 272	-18.402	7.118	-8.929	1.00	14.73
ATOM	2103	O	GLN A 272	-18.194	7.555	-7.800	1.00	15.60
ATOM	2104	N	PRO A 273	-18.955	7.859	-9.914	1.00	14.45
ATOM	2105	CA	PRO A 273	-19.342	9.255	-9.682	1.00	14.57
ATOM	2106	CB	PRO A 273	-20.157	9.597	-10.927	1.00	14.64
ATOM	2107	CG	PRO A 273	-19.443	8.767	-12.031	1.00	14.70
ATOM	2108	CD	PRO A 273	-19.156	7.458	-11.326	1.00	14.10
ATOM	2109	C	PRO A 273	-20.162	9.542	-8.407	1.00	15.22
ATOM	2110	O	PRO A 273	-19.910	10.562	-7.752	1.00	15.03
ATOM	2111	N	CYS A 274	-21.130	8.682	-8.075	1.00	15.76
ATOM	2112	CA	CYS A 274	-21.926	8.913	-6.853	1.00	16.22
ATOM	2113	CB	CYS A 274	-23.389	8.489	-7.039	1.00	16.57
ATOM	2114	SG	CYS A 274	-23.611	6.769	-7.423	1.00	17.39
ATOM	2115	C	CYS A 274	-21.331	8.281	-5.605	1.00	16.64
ATOM	2116	O	CYS A 274	-21.958	8.329	-4.529	1.00	16.55
ATOM	2117	N	SER A 275	-20.137	7.681	-5.715	1.00	15.61
ATOM	2118	CA	SER A 275	-19.476	7.117	-4.528	1.00	15.81
ATOM	2119	CB	SER A 275	-18.244	6.253	-4.877	1.00	15.06
ATOM	2120	OG	SER A 275	-17.144	7.041	-5.315	1.00	14.92
ATOM	2121	C	SER A 275	-19.097	8.232	-3.545	1.00	16.06
ATOM	2122	O	SER A 275	-18.818	9.366	-3.949	1.00	14.39
ATOM	2123	N	ASP A 276	-19.103	7.919	-2.248	1.00	16.42
ATOM	2124	CA	ASP A 276	-18.731	8.935	-1.271	1.00	16.52
ATOM	2125	CB	ASP A 276	-19.020	8.511	0.189	1.00	16.27
ATOM	2126	CG	ASP A 276	-18.244	7.281	0.656	1.00	19.14
ATOM	2127	OD1	ASP A 276	-18.371	7.001	1.873	1.00	19.62
ATOM	2128	OD2	ASP A 276	-17.544	6.593	-0.120	1.00	17.10
ATOM	2129	C	ASP A 276	-17.312	9.469	-1.492	1.00	16.17
ATOM	2130	O	ASP A 276	-17.084	10.683	-1.415	1.00	15.20
ATOM	2131	N	LYS A 277	-16.381	8.577	-1.823	1.00	15.43
ATOM	2132	CA	LYS A 277	-14.994	8.982	-2.115	1.00	15.34
ATOM	2133	CB	LYS A 277	-14.089	7.763	-2.326	1.00	15.23
ATOM	2134	CG	LYS A 277	-13.924	6.905	-1.059	1.00	17.01
ATOM	2135	CD	LYS A 277	-12.752	5.929	-1.204	1.00	21.20
ATOM	2136	CE	LYS A 277	-12.662	5.017	0.015	1.00	22.94
ATOM	2137	NZ	LYS A 277	-11.533	4.067	-0.165	1.00	29.19
ATOM	2138	C	LYS A 277	-14.900	9.915	-3.324	1.00	14.30
ATOM	2139	O	LYS A 277	-14.152	10.887	-3.288	1.00	14.70
ATOM	2140	N	ALA A 278	-15.644	9.620	-4.393	1.00	14.45
ATOM	2141	CA	ALA A 278	-15.588	10.464	-5.605	1.00	13.61
ATOM	2142	CB	ALA A 278	-16.250	9.775	-6.783	1.00	13.30
ATOM	2143	C	ALA A 278	-16.210	11.827	-5.357	1.00	13.50
ATOM	2144	O	ALA A 278	-15.730	12.840	-5.864	1.00	13.02
ATOM	2145	N	LEU A 279	-17.283	11.855	-4.565	1.00	13.22
ATOM	2146	CA	LEU A 279	-17.936	13.132	-4.239	1.00	12.92
ATOM	2147	CB	LEU A 279	-19.323	12.893	-3.625	1.00	13.21
ATOM	2148	CG	LEU A 279	-20.384	12.358	-4.601	1.00	13.94
ATOM	2149	CD1	LEU A 279	-21.707	11.969	-3.887	1.00	17.68

ATOM	2207	CB	ASP	A	287	-12.199	23.506	-2.440	1.00	13.12
ATOM	2208	CG	ASP	A	287	-13.637	23.441	-1.924	1.00	16.00
ATOM	2209	OD1	ASP	A	287	-14.541	24.002	-2.583	1.00	16.20
ATOM	2210	OD2	ASP	A	287	-13.857	22.835	-0.858	1.00	16.76
ATOM	2211	C	ASP	A	287	-10.727	24.564	-4.136	1.00	14.28
ATOM	2212	O	ASP	A	287	-10.425	25.722	-3.841	1.00	15.53
ATOM	2213	N	SER	A	288	-9.862	23.709	-4.677	1.00	14.50
ATOM	2214	CA	SER	A	288	-8.478	24.093	-4.949	1.00	14.58
ATOM	2215	CB	SER	A	288	-7.625	22.843	-5.229	1.00	14.15
ATOM	2216	OG	SER	A	288	-7.758	22.417	-6.565	1.00	13.73
ATOM	2217	C	SER	A	288	-8.326	25.186	-6.038	1.00	14.61
ATOM	2218	O	SER	A	288	-7.274	25.847	-6.143	1.00	14.59
ATOM	2219	N	PHE	A	289	-9.392	25.416	-6.809	1.00	13.99
ATOM	2220	CA	PHE	A	289	-9.419	26.447	-7.831	1.00	14.09
ATOM	2221	CB	PHE	A	289	-9.994	25.882	-9.135	1.00	13.52
ATOM	2222	CG	PHE	A	289	-9.169	24.807	-9.704	1.00	11.38
ATOM	2223	CD1	PHE	A	289	-7.976	25.114	-10.367	1.00	12.17
ATOM	2224	CE1	PHE	A	289	-7.184	24.095	-10.905	1.00	13.93
ATOM	2225	CZ	PHE	A	289	-7.572	22.783	-10.771	1.00	13.96
ATOM	2226	CE2	PHE	A	289	-8.756	22.452	-10.097	1.00	11.77
ATOM	2227	CD2	PHE	A	289	-9.555	23.472	-9.571	1.00	11.08
ATOM	2228	C	PHE	A	289	-10.219	27.698	-7.491	1.00	14.73
ATOM	2229	O	PHE	A	289	-10.092	28.713	-8.189	1.00	14.71
ATOM	2230	N	ARG	A	290	-11.054	27.621	-6.464	1.00	15.09
ATOM	2231	CA	ARG	A	290	-11.953	28.740	-6.140	1.00	16.64
ATOM	2232	CB	ARG	A	290	-12.842	28.401	-4.936	1.00	15.99
ATOM	2233	CG	ARG	A	290	-13.913	27.375	-5.230	1.00	15.65
ATOM	2234	CD	ARG	A	290	-14.821	27.163	-4.012	1.00	16.79
ATOM	2235	NE	ARG	A	290	-15.843	26.172	-4.330	1.00	15.04
ATOM	2236	CZ	ARG	A	290	-16.986	26.470	-4.933	1.00	17.22
ATOM	2237	NH1	ARG	A	290	-17.248	27.734	-5.243	1.00	15.41
ATOM	2238	NH2	ARG	A	290	-17.855	25.511	-5.239	1.00	15.94
ATOM	2239	C	ARG	A	290	-11.240	30.046	-5.864	1.00	18.04
ATOM	2240	O	ARG	A	290	-11.690	31.125	-6.279	1.00	19.61
ATOM	2241	N	SER	A	291	-10.150	29.984	-5.128	1.00	19.44
ATOM	2242	CA	SER	A	291	-9.571	31.246	-4.667	1.00	21.57
ATOM	2243	CB	SER	A	291	-9.146	31.101	-3.212	1.00	22.18
ATOM	2244	OG	SER	A	291	-7.998	30.284	-3.144	1.00	28.35
ATOM	2245	C	SER	A	291	-8.423	31.762	-5.534	1.00	20.65
ATOM	2246	O	SER	A	291	-7.865	32.851	-5.272	1.00	22.43
ATOM	2247	N	ILE	A	292	-8.066	31.019	-6.576	1.00	19.16
ATOM	2248	CA	ILE	A	292	-6.855	31.367	-7.330	1.00	17.65
ATOM	2249	CB	ILE	A	292	-5.805	30.185	-7.408	1.00	18.07
ATOM	2250	CG1	ILE	A	292	-6.379	28.972	-8.194	1.00	17.67
ATOM	2251	CD1	ILE	A	292	-5.315	27.924	-8.649	1.00	17.27
ATOM	2252	CG2	ILE	A	292	-5.341	29.795	-5.994	1.00	18.29
ATOM	2253	C	ILE	A	292	-7.065	31.973	-8.708	1.00	17.20
ATOM	2254	O	ILE	A	292	-6.136	32.563	-9.251	1.00	16.35
ATOM	2255	N	TYR	A	293	-8.252	31.797	-9.290	1.00	15.85
ATOM	2256	CA	TYR	A	293	-8.509	32.304	-10.648	1.00	15.83
ATOM	2257	CB	TYR	A	293	-9.301	31.270	-11.474	1.00	15.43
ATOM	2258	CG	TYR	A	293	-8.571	30.014	-11.886	1.00	15.10
ATOM	2259	CD1	TYR	A	293	-7.183	29.960	-11.965	1.00	14.38
ATOM	2260	CE1	TYR	A	293	-6.540	28.795	-12.395	1.00	14.38
ATOM	2261	CZ	TYR	A	293	-7.306	27.585	-12.743	1.00	14.90
ATOM	2262	OH	TYR	A	293	-6.700	26.522	-13.158	1.00	15.55
ATOM	2263	CE2	TYR	A	293	-8.670	27.722	-12.671	1.00	15.47

ATOM	2321	C	GLY A 302	-22.565	26.637	-4.537	1.00	19.78
ATOM	2322	O	GLY A 302	-23.661	26.283	-4.991	1.00	19.32
ATOM	2323	N	ALA A 303	-21.686	27.355	-5.235	1.00	17.97
ATOM	2324	CA	ALA A 303	-21.948	27.708	-6.635	1.00	17.13
ATOM	2325	CB	ALA A 303	-22.168	29.212	-6.812	1.00	16.73
ATOM	2326	C	ALA A 303	-20.784	27.245	-7.481	1.00	16.19
ATOM	2327	O	ALA A 303	-19.647	27.171	-7.004	1.00	16.23
ATOM	2328	N	ALA A 304	-21.067	26.956	-8.746	1.00	15.66
ATOM	2329	CA	ALA A 304	-20.069	26.378	-9.640	1.00	15.10
ATOM	2330	CB	ALA A 304	-20.750	25.795	-10.860	1.00	15.80
ATOM	2331	C	ALA A 304	-19.002	27.394	-10.044	1.00	14.74
ATOM	2332	O	ALA A 304	-19.270	28.587	-10.121	1.00	14.27
ATOM	2333	N	VAL A 305	-17.783	26.914	-10.300	1.00	14.18
ATOM	2334	CA	VAL A 305	-16.680	27.783	-10.698	1.00	13.54
ATOM	2335	CB	VAL A 305	-15.656	27.971	-9.543	1.00	13.42
ATOM	2336	CG1	VAL A 305	-16.224	28.881	-8.418	1.00	14.25
ATOM	2337	CG2	VAL A 305	-15.218	26.597	-8.966	1.00	14.99
ATOM	2338	C	VAL A 305	-15.952	27.141	-11.873	1.00	13.34
ATOM	2339	O	VAL A 305	-16.121	25.944	-12.126	1.00	12.46
ATOM	2340	N	ALA A 306	-15.130	27.921	-12.562	1.00	13.38
ATOM	2341	CA	ALA A 306	-14.233	27.376	-13.573	1.00	14.37
ATOM	2342	CB	ALA A 306	-13.709	28.504	-14.470	1.00	15.32
ATOM	2343	C	ALA A 306	-13.082	26.626	-12.938	1.00	14.68
ATOM	2344	O	ALA A 306	-12.457	27.116	-11.974	1.00	15.21
ATOM	2345	N	ILE A 307	-12.781	25.452	-13.484	1.00	13.50
ATOM	2346	CA	ILE A 307	-11.667	24.668	-12.975	1.00	13.67
ATOM	2347	CB	ILE A 307	-12.134	23.438	-12.163	1.00	14.45
ATOM	2348	CG1	ILE A 307	-12.756	22.386	-13.072	1.00	15.37
ATOM	2349	CD1	ILE A 307	-12.921	21.033	-12.368	1.00	19.15
ATOM	2350	CG2	ILE A 307	-13.119	23.848	-11.005	1.00	15.52
ATOM	2351	C	ILE A 307	-10.646	24.290	-14.059	1.00	12.52
ATOM	2352	O	ILE A 307	-10.974	24.232	-15.264	1.00	12.22
ATOM	2353	N	GLY A 308	-9.405	24.095	-13.604	1.00	11.71
ATOM	2354	CA	GLY A 308	-8.276	23.737	-14.452	1.00	11.64
ATOM	2355	C	GLY A 308	-7.853	22.306	-14.199	1.00	11.62
ATOM	2356	O	GLY A 308	-8.667	21.444	-13.806	1.00	12.05
ATOM	2357	N	ARG A 309	-6.583	22.026	-14.454	1.00	11.39
ATOM	2358	CA	ARG A 309	-6.091	20.661	-14.337	1.00	11.23
ATOM	2359	CB	ARG A 309	-4.896	20.467	-15.275	1.00	11.37
ATOM	2360	CG	ARG A 309	-5.220	20.697	-16.791	1.00	11.29
ATOM	2361	CD	ARG A 309	-4.066	20.130	-17.625	1.00	12.62
ATOM	2362	NE	ARG A 309	-2.845	20.919	-17.425	1.00	12.15
ATOM	2363	CZ	ARG A 309	-1.701	20.665	-18.047	1.00	15.00
ATOM	2364	NH1	ARG A 309	-1.630	19.633	-18.910	1.00	12.05
ATOM	2365	NH2	ARG A 309	-0.624	21.395	-17.778	1.00	13.85
ATOM	2366	C	ARG A 309	-5.654	20.425	-12.888	1.00	11.83
ATOM	2367	O	ARG A 309	-6.093	19.481	-12.221	1.00	11.38
ATOM	2368	N	TYR A 310	-4.806	21.322	-12.399	1.00	11.88
ATOM	2369	CA	TYR A 310	-4.293	21.215	-11.022	1.00	11.17
ATOM	2370	CB	TYR A 310	-3.225	20.082	-10.878	1.00	12.49
ATOM	2371	CG	TYR A 310	-2.065	20.201	-11.844	1.00	13.10
ATOM	2372	CD1	TYR A 310	-2.128	19.622	-13.138	1.00	12.57
ATOM	2373	CE1	TYR A 310	-1.069	19.772	-14.039	1.00	15.63
ATOM	2374	CZ	TYR A 310	0.065	20.475	-13.649	1.00	14.31
ATOM	2375	OH	TYR A 310	1.119	20.611	-14.529	1.00	14.42
ATOM	2376	CE2	TYR A 310	0.159	21.030	-12.379	1.00	12.68
ATOM	2377	CD2	TYR A 310	-0.909	20.906	-11.485	1.00	14.04

ATOM	2435	CB	ASN A 317	0.106	31.699	-16.921	1.00	20.01
ATOM	2436	CG	ASN A 317	1.171	32.489	-17.624	1.00	24.51
ATOM	2437	OD1	ASN A 317	2.363	32.384	-17.305	1.00	29.46
ATOM	2438	ND2	ASN A 317	0.756	33.269	-18.603	1.00	29.08
ATOM	2439	C	ASN A 317	-0.506	29.551	-15.842	1.00	18.28
ATOM	2440	O	ASN A 317	-0.706	30.001	-14.719	1.00	19.05
ATOM	2441	N	GLY A 318	-1.114	28.459	-16.300	1.00	17.74
ATOM	2442	CA	GLY A 318	-2.086	27.721	-15.475	1.00	15.34
ATOM	2443	C	GLY A 318	-3.458	28.356	-15.550	1.00	15.47
ATOM	2444	O	GLY A 318	-3.700	29.390	-14.932	1.00	15.75
ATOM	2445	N	ASN A 319	-4.369	27.733	-16.306	1.00	13.16
ATOM	2446	CA	ASN A 319	-5.672	28.305	-16.557	1.00	12.74
ATOM	2447	CB	ASN A 319	-5.693	28.883	-17.980	1.00	12.31
ATOM	2448	CG	ASN A 319	-4.676	29.979	-18.187	1.00	13.01
ATOM	2449	OD1	ASN A 319	-4.832	31.117	-17.699	1.00	14.18
ATOM	2450	ND2	ASN A 319	-3.640	29.665	-18.942	1.00	11.49
ATOM	2451	C	ASN A 319	-6.799	27.271	-16.442	1.00	12.27
ATOM	2452	O	ASN A 319	-6.545	26.071	-16.456	1.00	12.28
ATOM	2453	N	PRO A 320	-8.054	27.732	-16.334	1.00	12.96
ATOM	2454	CA	PRO A 320	-9.113	26.759	-16.472	1.00	12.58
ATOM	2455	CB	PRO A 320	-10.395	27.579	-16.324	1.00	13.28
ATOM	2456	CG	PRO A 320	-10.007	29.011	-16.183	1.00	14.34
ATOM	2457	CD	PRO A 320	-8.537	29.090	-15.991	1.00	12.66
ATOM	2458	C	PRO A 320	-9.101	26.090	-17.851	1.00	12.18
ATOM	2459	O	PRO A 320	-8.643	26.698	-18.820	1.00	11.99
ATOM	2460	N	TRP A 321	-9.589	24.852	-17.912	1.00	11.79
ATOM	2461	CA	TRP A 321	-9.739	24.116	-19.154	1.00	11.97
ATOM	2462	CB	TRP A 321	-8.988	22.775	-19.063	1.00	11.15
ATOM	2463	CG	TRP A 321	-7.469	22.900	-19.200	1.00	12.16
ATOM	2464	CD1	TRP A 321	-6.658	23.837	-18.627	1.00	13.28
ATOM	2465	NE1	TRP A 321	-5.347	23.636	-19.016	1.00	13.24
ATOM	2466	CE2	TRP A 321	-5.290	22.538	-19.831	1.00	13.51
ATOM	2467	CD2	TRP A 321	-6.617	22.054	-19.978	1.00	12.68
ATOM	2468	CE3	TRP A 321	-6.846	20.938	-20.787	1.00	14.41
ATOM	2469	CZ3	TRP A 321	-5.741	20.323	-21.428	1.00	13.49
ATOM	2470	CH2	TRP A 321	-4.436	20.819	-21.250	1.00	13.43
ATOM	2471	CZ2	TRP A 321	-4.193	21.948	-20.479	1.00	14.69
ATOM	2472	C	TRP A 321	-11.202	23.797	-19.342	1.00	11.99
ATOM	2473	O	TRP A 321	-11.875	23.448	-18.388	1.00	11.51
ATOM	2474	N	TYR A 322	-11.696	23.896	-20.579	1.00	11.47
ATOM	2475	CA	TYR A 322	-13.088	23.511	-20.841	1.00	11.31
ATOM	2476	CB	TYR A 322	-13.433	23.691	-22.322	1.00	12.14
ATOM	2477	CG	TYR A 322	-13.352	25.130	-22.793	1.00	12.81
ATOM	2478	CD1	TYR A 322	-12.260	25.574	-23.509	1.00	11.43
ATOM	2479	CE1	TYR A 322	-12.173	26.914	-23.965	1.00	12.91
ATOM	2480	CZ	TYR A 322	-13.216	27.802	-23.697	1.00	14.27
ATOM	2481	OH	TYR A 322	-13.127	29.104	-24.146	1.00	15.10
ATOM	2482	CE2	TYR A 322	-14.324	27.373	-22.982	1.00	13.40
ATOM	2483	CD2	TYR A 322	-14.378	26.031	-22.522	1.00	11.58
ATOM	2484	C	TYR A 322	-13.367	22.082	-20.433	1.00	11.31
ATOM	2485	O	TYR A 322	-14.380	21.795	-19.771	1.00	11.08
ATOM	2486	N	LEU A 323	-12.480	21.169	-20.814	1.00	10.96
ATOM	2487	CA	LEU A 323	-12.770	19.750	-20.561	1.00	11.04
ATOM	2488	CB	LEU A 323	-11.787	18.844	-21.315	1.00	11.26
ATOM	2489	CG	LEU A 323	-10.314	18.876	-20.903	1.00	10.53
ATOM	2490	CD1	LEU A 323	-10.074	17.902	-19.745	1.00	14.57
ATOM	2491	CD2	LEU A 323	-9.474	18.437	-22.112	1.00	13.19

ATOM	2549	O	GLN	A	331	-21.512	12.659	-11.556	1.00	12.45
ATOM	2550	N	LEU	A	332	-21.377	14.873	-11.844	1.00	12.57
ATOM	2551	CA	LEU	A	332	-22.628	15.138	-11.134	1.00	13.59
ATOM	2552	CB	LEU	A	332	-22.747	16.631	-10.868	1.00	13.17
ATOM	2553	CG	LEU	A	332	-21.681	17.142	-9.867	1.00	16.56
ATOM	2554	CD1	LEU	A	332	-21.718	18.678	-9.801	1.00	18.10
ATOM	2555	CD2	LEU	A	332	-21.851	16.476	-8.492	1.00	19.47
ATOM	2556	C	LEU	A	332	-23.861	14.600	-11.864	1.00	13.57
ATOM	2557	O	LEU	A	332	-24.770	14.053	-11.239	1.00	13.24
ATOM	2558	N	TYR	A	333	-23.909	14.766	-13.179	1.00	13.90
ATOM	2559	CA	TYR	A	333	-24.988	14.131	-13.972	1.00	14.37
ATOM	2560	CB	TYR	A	333	-24.901	14.523	-15.468	1.00	14.48
ATOM	2561	CG	TYR	A	333	-25.056	16.001	-15.721	1.00	13.91
ATOM	2562	CD1	TYR	A	333	-26.086	16.738	-15.118	1.00	14.64
ATOM	2563	CE1	TYR	A	333	-26.208	18.117	-15.350	1.00	15.65
ATOM	2564	CZ	TYR	A	333	-25.315	18.758	-16.196	1.00	16.47
ATOM	2565	OH	TYR	A	333	-25.431	20.101	-16.442	1.00	17.22
ATOM	2566	CE2	TYR	A	333	-24.310	18.050	-16.836	1.00	16.59
ATOM	2567	CD2	TYR	A	333	-24.192	16.669	-16.601	1.00	11.27
ATOM	2568	C	TYR	A	333	-25.022	12.613	-13.843	1.00	15.03
ATOM	2569	O	TYR	A	333	-26.108	12.012	-13.824	1.00	14.78
ATOM	2570	N	ASP	A	334	-23.836	11.998	-13.807	1.00	14.06
ATOM	2571	CA	ASP	A	334	-23.714	10.555	-13.602	1.00	14.83
ATOM	2572	CB	ASP	A	334	-22.239	10.114	-13.714	1.00	13.83
ATOM	2573	CG	ASP	A	334	-21.708	10.149	-15.136	1.00	15.84
ATOM	2574	OD1	ASP	A	334	-22.495	10.373	-16.081	1.00	13.95
ATOM	2575	OD2	ASP	A	334	-20.470	9.943	-15.313	1.00	15.50
ATOM	2576	C	ASP	A	334	-24.254	10.163	-12.224	1.00	15.21
ATOM	2577	O	ASP	A	334	-24.941	9.132	-12.080	1.00	15.93
ATOM	2578	N	ALA	A	335	-23.933	10.969	-11.213	1.00	15.09
ATOM	2579	CA	ALA	A	335	-24.454	10.735	-9.855	1.00	16.00
ATOM	2580	CB	ALA	A	335	-23.809	11.719	-8.864	1.00	15.13
ATOM	2581	C	ALA	A	335	-25.980	10.823	-9.803	1.00	16.10
ATOM	2582	O	ALA	A	335	-26.643	9.916	-9.245	1.00	16.77
ATOM	2583	N	ILE	A	336	-26.530	11.879	-10.398	1.00	16.35
ATOM	2584	CA	ILE	A	336	-27.987	12.087	-10.470	1.00	18.39
ATOM	2585	CB	ILE	A	336	-28.332	13.422	-11.162	1.00	18.85
ATOM	2586	CG1	ILE	A	336	-27.891	14.596	-10.279	1.00	19.14
ATOM	2587	CD1	ILE	A	336	-27.879	15.904	-10.986	1.00	22.50
ATOM	2588	CG2	ILE	A	336	-29.839	13.539	-11.506	1.00	20.14
ATOM	2589	C	ILE	A	336	-28.681	10.902	-11.156	1.00	18.83
ATOM	2590	O	ILE	A	336	-29.707	10.404	-10.675	1.00	18.06
ATOM	2591	N	TYR	A	337	-28.102	10.443	-12.267	1.00	18.50
ATOM	2592	CA	TYR	A	337	-28.642	9.287	-12.970	1.00	18.99
ATOM	2593	CB	TYR	A	337	-27.753	8.908	-14.169	1.00	19.80
ATOM	2594	CG	TYR	A	337	-28.328	7.737	-14.954	1.00	20.76
ATOM	2595	CD1	TYR	A	337	-27.988	6.429	-14.620	1.00	20.95
ATOM	2596	CE1	TYR	A	337	-28.511	5.345	-15.322	1.00	22.94
ATOM	2597	CZ	TYR	A	337	-29.382	5.559	-16.356	1.00	22.19
ATOM	2598	OH	TYR	A	337	-29.877	4.447	-17.018	1.00	24.87
ATOM	2599	CE2	TYR	A	337	-29.752	6.845	-16.721	1.00	22.31
ATOM	2600	CD2	TYR	A	337	-29.220	7.942	-16.009	1.00	21.58
ATOM	2601	C	TYR	A	337	-28.839	8.083	-12.057	1.00	18.60
ATOM	2602	O	TYR	A	337	-29.918	7.476	-12.041	1.00	18.61
ATOM	2603	N	VAL	A	338	-27.802	7.737	-11.297	1.00	18.67
ATOM	2604	CA	VAL	A	338	-27.837	6.573	-10.406	1.00	18.90
ATOM	2605	CB	VAL	A	338	-26.424	6.195	-9.919	1.00	18.99

ATOM	2663	CD1	ILE	A	345	-30.399	11.918	-3.599	1.00	23.24
ATOM	2664	CG2	ILE	A	345	-28.138	10.918	-1.670	1.00	22.00
ATOM	2665	C	ILE	A	345	-28.726	8.415	-0.378	1.00	23.13
ATOM	2666	O	ILE	A	345	-29.392	8.684	0.623	1.00	23.57
ATOM	2667	N	THR	A	346	-27.490	7.943	-0.307	1.00	22.23
ATOM	2668	CA	THR	A	346	-26.820	7.765	0.963	1.00	23.25
ATOM	2669	CB	THR	A	346	-26.246	6.338	1.101	1.00	23.78
ATOM	2670	OG1	THR	A	346	-27.327	5.396	1.020	1.00	27.42
ATOM	2671	CG2	THR	A	346	-25.507	6.129	2.443	1.00	24.74
ATOM	2672	C	THR	A	346	-25.753	8.849	1.138	1.00	23.03
ATOM	2673	O	THR	A	346	-24.916	9.067	0.260	1.00	23.47
ATOM	2674	N	VAL	A	347	-25.848	9.561	2.255	1.00	21.33
ATOM	2675	CA	VAL	A	347	-24.845	10.537	2.674	1.00	20.11
ATOM	2676	CB	VAL	A	347	-25.522	11.844	3.212	1.00	19.06
ATOM	2677	CG1	VAL	A	347	-24.489	12.834	3.700	1.00	19.66
ATOM	2678	CG2	VAL	A	347	-26.418	12.465	2.137	1.00	20.32
ATOM	2679	C	VAL	A	347	-24.066	9.865	3.785	1.00	20.14
ATOM	2680	O	VAL	A	347	-24.667	9.340	4.728	1.00	19.79
ATOM	2681	N	THR	A	348	-22.734	9.878	3.671	1.00	19.85
ATOM	2682	CA	THR	A	348	-21.851	9.274	4.660	1.00	19.92
ATOM	2683	CB	THR	A	348	-20.965	8.185	4.018	1.00	19.82
ATOM	2684	OG1	THR	A	348	-19.921	8.815	3.277	1.00	20.35
ATOM	2685	CG2	THR	A	348	-21.785	7.278	3.092	1.00	21.67
ATOM	2686	C	THR	A	348	-20.964	10.354	5.256	1.00	19.60
ATOM	2687	O	THR	A	348	-20.961	11.484	4.760	1.00	19.51
ATOM	2688	N	ALA	A	349	-20.191	10.006	6.292	1.00	19.18
ATOM	2689	CA	ALA	A	349	-19.243	10.932	6.885	1.00	20.02
ATOM	2690	CB	ALA	A	349	-18.494	10.275	8.044	1.00	20.61
ATOM	2691	C	ALA	A	349	-18.240	11.466	5.842	1.00	19.79
ATOM	2692	O	ALA	A	349	-17.756	12.601	5.947	1.00	20.15
ATOM	2693	N	THR	A	350	-17.906	10.619	4.873	1.00	18.87
ATOM	2694	CA	THR	A	350	-16.911	10.971	3.850	1.00	18.30
ATOM	2695	CB	THR	A	350	-16.435	9.717	3.093	1.00	18.67
ATOM	2696	OG1	THR	A	350	-15.780	8.850	4.027	1.00	19.82
ATOM	2697	CG2	THR	A	350	-15.426	10.097	1.974	1.00	17.73
ATOM	2698	C	THR	A	350	-17.463	12.003	2.871	1.00	17.30
ATOM	2699	O	THR	A	350	-16.747	12.930	2.487	1.00	17.99
ATOM	2700	N	SER	A	351	-18.716	11.847	2.467	1.00	16.16
ATOM	2701	CA	SER	A	351	-19.316	12.803	1.517	1.00	15.78
ATOM	2702	CB	SER	A	351	-20.214	12.076	0.512	1.00	15.85
ATOM	2703	OG	SER	A	351	-21.280	11.412	1.156	1.00	17.14
ATOM	2704	C	SER	A	351	-20.087	13.941	2.193	1.00	15.63
ATOM	2705	O	SER	A	351	-20.736	14.743	1.524	1.00	13.62
ATOM	2706	N	LEU	A	352	-20.048	14.006	3.527	1.00	15.09
ATOM	2707	CA	LEU	A	352	-20.901	14.985	4.212	1.00	16.29
ATOM	2708	CB	LEU	A	352	-20.759	14.851	5.736	1.00	16.64
ATOM	2709	CG	LEU	A	352	-21.713	15.734	6.570	1.00	17.22
ATOM	2710	CD1	LEU	A	352	-23.138	15.281	6.418	1.00	19.06
ATOM	2711	CD2	LEU	A	352	-21.263	15.636	8.032	1.00	20.02
ATOM	2712	C	LEU	A	352	-20.592	16.427	3.787	1.00	16.09
ATOM	2713	O	LEU	A	352	-21.499	17.219	3.601	1.00	16.35
ATOM	2714	N	ALA	A	353	-19.311	16.763	3.643	1.00	16.19
ATOM	2715	CA	ALA	A	353	-18.933	18.148	3.354	1.00	15.74
ATOM	2716	CB	ALA	A	353	-17.460	18.314	3.424	1.00	16.30
ATOM	2717	C	ALA	A	353	-19.459	18.544	1.972	1.00	16.11
ATOM	2718	O	ALA	A	353	-19.957	19.668	1.781	1.00	15.44
ATOM	2719	N	PHE	A	354	-19.367	17.607	1.021	1.00	16.10

ATOM	2777	CG	PRO A 360	-27.188	25.219	3.274	1.00	16.15
ATOM	2778	CD	PRO A 360	-27.854	24.127	2.471	1.00	14.54
ATOM	2779	C	PRO A 360	-27.692	22.385	5.611	1.00	15.31
ATOM	2780	O	PRO A 360	-28.918	22.262	5.555	1.00	15.07
ATOM	2781	N	GLY A 361	-26.936	21.842	6.560	1.00	15.94
ATOM	2782	CA	GLY A 361	-27.512	21.143	7.709	1.00	16.53
ATOM	2783	C	GLY A 361	-27.870	19.680	7.488	1.00	17.03
ATOM	2784	O	GLY A 361	-28.268	18.997	8.429	1.00	17.68
ATOM	2785	N	VAL A 362	-27.762	19.176	6.261	1.00	16.13
ATOM	2786	CA	VAL A 362	-28.163	17.769	6.037	1.00	16.72
ATOM	2787	CB	VAL A 362	-28.217	17.416	4.525	1.00	16.47
ATOM	2788	CG1	VAL A 362	-26.808	17.311	3.947	1.00	16.75
ATOM	2789	CG2	VAL A 362	-29.054	16.142	4.280	1.00	17.21
ATOM	2790	C	VAL A 362	-27.208	16.849	6.811	1.00	17.24
ATOM	2791	O	VAL A 362	-26.044	17.187	7.006	1.00	17.07
ATOM	2792	N	THR A 363	-27.695	15.703	7.274	1.00	18.15
ATOM	2793	CA	THR A 363	-26.821	14.789	8.025	1.00	19.86
ATOM	2794	CB	THR A 363	-27.388	14.459	9.405	1.00	20.59
ATOM	2795	OG1	THR A 363	-28.634	13.776	9.217	1.00	22.85
ATOM	2796	CG2	THR A 363	-27.610	15.742	10.182	1.00	22.71
ATOM	2797	C	THR A 363	-26.660	13.476	7.310	1.00	19.18
ATOM	2798	O	THR A 363	-27.398	13.184	6.371	1.00	18.87
ATOM	2799	N	ALA A 364	-25.697	12.679	7.769	1.00	19.67
ATOM	2800	CA	ALA A 364	-25.495	11.342	7.222	1.00	20.19
ATOM	2801	CB	ALA A 364	-24.361	10.637	7.930	1.00	20.38
ATOM	2802	C	ALA A 364	-26.783	10.541	7.343	1.00	21.17
ATOM	2803	O	ALA A 364	-27.551	10.720	8.293	1.00	21.92
ATOM	2804	N	GLY A 365	-27.041	9.687	6.360	1.00	21.67
ATOM	2805	CA	GLY A 365	-28.207	8.823	6.371	1.00	22.35
ATOM	2806	C	GLY A 365	-28.584	8.415	4.968	1.00	23.66
ATOM	2807	O	GLY A 365	-27.924	8.804	3.991	1.00	23.66
ATOM	2808	N	THR A 366	-29.639	7.615	4.862	1.00	23.70
ATOM	2809	CA	THR A 366	-30.148	7.183	3.582	1.00	24.56
ATOM	2810	CB	THR A 366	-30.188	5.644	3.491	1.00	25.67
ATOM	2811	OG1	THR A 366	-28.849	5.143	3.649	1.00	27.09
ATOM	2812	CG2	THR A 366	-30.715	5.216	2.159	1.00	25.47
ATOM	2813	C	THR A 366	-31.520	7.769	3.344	1.00	25.15
ATOM	2814	O	THR A 366	-32.427	7.612	4.177	1.00	25.01
ATOM	2815	N	TYR A 367	-31.668	8.447	2.210	1.00	24.20
ATOM	2816	CA	TYR A 367	-32.900	9.146	1.883	1.00	24.30
ATOM	2817	CB	TYR A 367	-32.616	10.648	1.701	1.00	23.51
ATOM	2818	CG	TYR A 367	-31.924	11.238	2.907	1.00	22.68
ATOM	2819	CD1	TYR A 367	-32.639	11.506	4.078	1.00	21.99
ATOM	2820	CE1	TYR A 367	-32.012	12.019	5.199	1.00	20.27
ATOM	2821	CZ	TYR A 367	-30.650	12.263	5.176	1.00	22.67
ATOM	2822	OH	TYR A 367	-30.036	12.789	6.287	1.00	21.24
ATOM	2823	CE2	TYR A 367	-29.897	11.994	4.023	1.00	20.71
ATOM	2824	CD2	TYR A 367	-30.541	11.479	2.904	1.00	20.37
ATOM	2825	C	TYR A 367	-33.531	8.542	0.641	1.00	25.39
ATOM	2826	O	TYR A 367	-32.900	8.456	-0.415	1.00	24.86
ATOM	2827	N	SER A 368	-34.782	8.109	0.758	1.00	25.82
ATOM	2828	CA	SER A 368	-35.416	7.454	-0.374	1.00	27.29
ATOM	2829	CB	SER A 368	-36.339	6.332	0.107	1.00	27.90
ATOM	2830	OG	SER A 368	-37.519	6.895	0.634	1.00	30.69
ATOM	2831	C	SER A 368	-36.171	8.466	-1.218	1.00	27.68
ATOM	2832	O	SER A 368	-36.361	9.612	-0.805	1.00	26.96
ATOM	2833	N	SER A 369	-36.629	8.025	-2.388	1.00	28.98

ATOM	2891	CA	ILE	A	377	-30.586	16.983	-2.916	1.00	18.66
ATOM	2892	CB	ILE	A	377	-30.081	15.651	-2.319	1.00	18.56
ATOM	2893	CG1	ILE	A	377	-29.834	15.813	-0.800	1.00	18.42
ATOM	2894	CD1	ILE	A	377	-29.634	14.481	-0.028	1.00	19.35
ATOM	2895	CG2	ILE	A	377	-28.787	15.233	-3.025	1.00	18.07
ATOM	2896	C	ILE	A	377	-30.546	16.964	-4.451	1.00	18.87
ATOM	2897	O	ILE	A	377	-29.655	17.575	-5.058	1.00	18.47
ATOM	2898	N	ILE	A	378	-31.513	16.293	-5.068	1.00	18.45
ATOM	2899	CA	ILE	A	378	-31.556	16.216	-6.539	1.00	19.78
ATOM	2900	CB	ILE	A	378	-32.738	15.359	-7.085	1.00	20.45
ATOM	2901	CG1	ILE	A	378	-32.593	13.891	-6.650	1.00	22.32
ATOM	2902	CD1	ILE	A	378	-31.414	13.145	-7.270	1.00	24.68
ATOM	2903	CG2	ILE	A	378	-32.829	15.472	-8.646	1.00	21.27
ATOM	2904	C	ILE	A	378	-31.561	17.588	-7.177	1.00	19.82
ATOM	2905	O	ILE	A	378	-30.760	17.849	-8.101	1.00	19.62
ATOM	2906	N	ASN	A	379	-32.441	18.470	-6.689	1.00	18.68
ATOM	2907	CA	ASN	A	379	-32.531	19.820	-7.224	1.00	19.13
ATOM	2908	CB	ASN	A	379	-33.738	20.578	-6.658	1.00	20.08
ATOM	2909	CG	ASN	A	379	-35.066	19.956	-7.087	1.00	25.11
ATOM	2910	OD1	ASN	A	379	-35.121	19.173	-8.044	1.00	29.37
ATOM	2911	ND2	ASN	A	379	-36.144	20.289	-6.369	1.00	29.08
ATOM	2912	C	ASN	A	379	-31.241	20.604	-7.040	1.00	17.96
ATOM	2913	O	ASN	A	379	-30.774	21.273	-7.981	1.00	17.85
ATOM	2914	N	ALA	A	380	-30.662	20.497	-5.841	1.00	15.93
ATOM	2915	CA	ALA	A	380	-29.458	21.241	-5.509	1.00	16.08
ATOM	2916	CB	ALA	A	380	-29.120	21.061	-4.033	1.00	16.14
ATOM	2917	C	ALA	A	380	-28.299	20.783	-6.389	1.00	15.64
ATOM	2918	O	ALA	A	380	-27.566	21.607	-6.938	1.00	16.56
ATOM	2919	N	VAL	A	381	-28.153	19.471	-6.519	1.00	15.22
ATOM	2920	CA	VAL	A	381	-27.039	18.912	-7.302	1.00	15.77
ATOM	2921	CB	VAL	A	381	-26.823	17.403	-6.999	1.00	15.61
ATOM	2922	CG1	VAL	A	381	-25.747	16.777	-7.940	1.00	14.83
ATOM	2923	CG2	VAL	A	381	-26.386	17.234	-5.551	1.00	14.84
ATOM	2924	C	VAL	A	381	-27.243	19.211	-8.794	1.00	16.08
ATOM	2925	O	VAL	A	381	-26.281	19.508	-9.505	1.00	16.62
ATOM	2926	N	SER	A	382	-28.482	19.112	-9.278	1.00	16.66
ATOM	2927	CA	SER	A	382	-28.772	19.453	-10.690	1.00	18.67
ATOM	2928	CB	SER	A	382	-30.246	19.212	-11.043	1.00	18.26
ATOM	2929	OG	SER	A	382	-30.538	17.855	-10.893	1.00	24.56
ATOM	2930	C	SER	A	382	-28.434	20.894	-11.005	1.00	18.10
ATOM	2931	O	SER	A	382	-27.815	21.183	-12.027	1.00	18.05
ATOM	2932	N	THR	A	383	-28.853	21.810	-10.132	1.00	17.66
ATOM	2933	CA	THR	A	383	-28.521	23.216	-10.298	1.00	17.72
ATOM	2934	CB	THR	A	383	-29.199	24.063	-9.180	1.00	18.48
ATOM	2935	OG1	THR	A	383	-30.606	23.985	-9.373	1.00	19.72
ATOM	2936	CG2	THR	A	383	-28.771	25.550	-9.227	1.00	19.59
ATOM	2937	C	THR	A	383	-27.017	23.470	-10.314	1.00	17.09
ATOM	2938	O	THR	A	383	-26.524	24.286	-11.109	1.00	17.00
ATOM	2939	N	TYR	A	384	-26.299	22.774	-9.435	1.00	15.62
ATOM	2940	CA	TYR	A	384	-24.858	22.925	-9.312	1.00	15.37
ATOM	2941	CB	TYR	A	384	-24.397	22.164	-8.068	1.00	15.00
ATOM	2942	CG	TYR	A	384	-22.958	22.345	-7.630	1.00	15.08
ATOM	2943	CD1	TYR	A	384	-22.361	23.601	-7.578	1.00	15.83
ATOM	2944	CE1	TYR	A	384	-21.049	23.752	-7.131	1.00	16.33
ATOM	2945	CZ	TYR	A	384	-20.321	22.623	-6.737	1.00	16.13
ATOM	2946	OH	TYR	A	384	-19.018	22.738	-6.302	1.00	16.22
ATOM	2947	CE2	TYR	A	384	-20.890	21.386	-6.778	1.00	13.72

ATOM	3005	C	ALA A 392	-18.478	28.098	-20.363	1.00	19.59
ATOM	3006	O	ALA A 392	-17.764	28.724	-21.157	1.00	18.65
ATOM	3007	N	ALA A 393	-19.808	28.117	-20.425	1.00	20.40
ATOM	3008	CA	ALA A 393	-20.526	28.820	-21.507	1.00	21.27
ATOM	3009	CB	ALA A 393	-22.035	28.524	-21.421	1.00	21.83
ATOM	3010	C	ALA A 393	-20.266	30.334	-21.574	1.00	21.79
ATOM	3011	O	ALA A 393	-20.283	30.920	-22.664	1.00	21.96
ATOM	3012	N	LYS A 394	-19.976	30.971	-20.435	1.00	21.37
ATOM	3013	CA	LYS A 394	-19.626	32.383	-20.447	1.00	22.02
ATOM	3014	CB	LYS A 394	-19.289	32.916	-19.043	1.00	23.11
ATOM	3015	CG	LYS A 394	-20.411	32.980	-18.044	1.00	25.98
ATOM	3016	CD	LYS A 394	-19.782	33.341	-16.700	1.00	28.89
ATOM	3017	CE	LYS A 394	-20.793	33.314	-15.576	1.00	34.05
ATOM	3018	NZ	LYS A 394	-20.097	33.674	-14.290	1.00	33.96
ATOM	3019	C	LYS A 394	-18.403	32.626	-21.310	1.00	21.55
ATOM	3020	O	LYS A 394	-18.188	33.742	-21.771	1.00	22.41
ATOM	3021	N	TYR A 395	-17.570	31.604	-21.488	1.00	19.98
ATOM	3022	CA	TYR A 395	-16.287	31.824	-22.132	1.00	19.46
ATOM	3023	CB	TYR A 395	-15.137	31.464	-21.185	1.00	20.82
ATOM	3024	CG	TYR A 395	-15.291	32.165	-19.872	1.00	22.04
ATOM	3025	CD1	TYR A 395	-15.644	31.450	-18.716	1.00	23.21
ATOM	3026	CE1	TYR A 395	-15.806	32.097	-17.508	1.00	23.70
ATOM	3027	CZ	TYR A 395	-15.661	33.473	-17.460	1.00	23.93
ATOM	3028	OH	TYR A 395	-15.828	34.143	-16.272	1.00	26.14
ATOM	3029	CE2	TYR A 395	-15.327	34.202	-18.593	1.00	24.38
ATOM	3030	CD2	TYR A 395	-15.157	33.548	-19.791	1.00	22.37
ATOM	3031	C	TYR A 395	-16.157	31.119	-23.451	1.00	19.22
ATOM	3032	O	TYR A 395	-15.045	30.940	-23.941	1.00	18.70
ATOM	3033	N	VAL A 396	-17.299	30.718	-24.018	1.00	18.16
ATOM	3034	CA	VAL A 396	-17.331	30.135	-25.352	1.00	19.03
ATOM	3035	CB	VAL A 396	-18.396	29.025	-25.458	1.00	18.18
ATOM	3036	CG1	VAL A 396	-18.469	28.465	-26.898	1.00	18.63
ATOM	3037	CG2	VAL A 396	-18.094	27.915	-24.452	1.00	18.97
ATOM	3038	C	VAL A 396	-17.654	31.288	-26.308	1.00	19.65
ATOM	3039	O	VAL A 396	-18.644	31.986	-26.098	1.00	19.66
ATOM	3040	N	PRO A 397	-16.810	31.507	-27.328	1.00	20.41
ATOM	3041	CA	PRO A 397	-17.016	32.626	-28.256	1.00	20.82
ATOM	3042	CB	PRO A 397	-15.794	32.561	-29.175	1.00	21.47
ATOM	3043	CG	PRO A 397	-14.819	31.725	-28.475	1.00	21.69
ATOM	3044	CD	PRO A 397	-15.598	30.741	-27.661	1.00	19.70
ATOM	3045	C	PRO A 397	-18.280	32.434	-29.073	1.00	21.11
ATOM	3046	O	PRO A 397	-18.844	31.339	-29.088	1.00	19.88
ATOM	3047	N	ALA A 398	-18.713	33.492	-29.765	1.00	21.26
ATOM	3048	CA	ALA A 398	-19.951	33.424	-30.559	1.00	21.44
ATOM	3049	CB	ALA A 398	-20.227	34.766	-31.230	1.00	22.38
ATOM	3050	C	ALA A 398	-19.971	32.297	-31.587	1.00	21.30
ATOM	3051	O	ALA A 398	-21.038	31.769	-31.901	1.00	22.15
ATOM	3052	N	ASP A 399	-18.804	31.896	-32.102	1.00	20.30
ATOM	3053	CA	ASP A 399	-18.780	30.858	-33.133	1.00	19.40
ATOM	3054	CB	ASP A 399	-17.587	31.032	-34.071	1.00	19.42
ATOM	3055	CG	ASP A 399	-16.233	30.835	-33.381	1.00	21.84
ATOM	3056	OD1	ASP A 399	-16.146	30.569	-32.159	1.00	20.91
ATOM	3057	OD2	ASP A 399	-15.229	30.950	-34.104	1.00	24.62
ATOM	3058	C	ASP A 399	-18.834	29.435	-32.579	1.00	18.14
ATOM	3059	O	ASP A 399	-18.802	28.465	-33.350	1.00	16.78
ATOM	3060	N	GLY A 400	-18.891	29.322	-31.245	1.00	16.82
ATOM	3061	CA	GLY A 400	-18.996	28.015	-30.607	1.00	15.41

ATOM	3119	O	ASP	A	407	-9.257	33.185	-17.800	1.00	15.12
ATOM	3120	N	ARG	A	408	-7.248	32.548	-17.018	1.00	14.63
ATOM	3121	CA	ARG	A	408	-7.644	32.530	-15.609	1.00	15.33
ATOM	3122	CB	ARG	A	408	-6.453	32.095	-14.753	1.00	15.32
ATOM	3123	CG	ARG	A	408	-5.236	33.062	-14.828	1.00	14.48
ATOM	3124	CD	ARG	A	408	-4.009	32.479	-14.122	1.00	16.22
ATOM	3125	NE	ARG	A	408	-4.237	32.248	-12.695	1.00	15.55
ATOM	3126	CZ	ARG	A	408	-3.613	31.323	-11.961	1.00	18.66
ATOM	3127	NH1	ARG	A	408	-3.878	31.231	-10.658	1.00	17.51
ATOM	3128	NH2	ARG	A	408	-2.717	30.499	-12.511	1.00	17.12
ATOM	3129	C	ARG	A	408	-8.167	33.886	-15.108	1.00	16.66
ATOM	3130	O	ARG	A	408	-8.898	33.943	-14.110	1.00	16.82
ATOM	3131	N	ASN	A	409	-7.781	34.964	-15.790	1.00	18.00
ATOM	3132	CA	ASN	A	409	-8.252	36.316	-15.421	1.00	20.06
ATOM	3133	CB	ASN	A	409	-7.069	37.275	-15.355	1.00	20.32
ATOM	3134	CG	ASN	A	409	-6.119	36.937	-14.224	1.00	21.65
ATOM	3135	OD1	ASN	A	409	-6.549	36.678	-13.111	1.00	24.42
ATOM	3136	ND2	ASN	A	409	-4.830	36.914	-14.516	1.00	23.96
ATOM	3137	C	ASN	A	409	-9.320	36.903	-16.336	1.00	21.43
ATOM	3138	O	ASN	A	409	-10.272	37.524	-15.857	1.00	22.03
ATOM	3139	N	SER	A	410	-9.152	36.724	-17.646	1.00	22.25
ATOM	3140	CA	SER	A	410	-10.007	37.410	-18.624	1.00	22.76
ATOM	3141	CB	SER	A	410	-9.146	38.159	-19.636	1.00	23.45
ATOM	3142	OG	SER	A	410	-8.470	37.260	-20.495	1.00	23.38
ATOM	3143	C	SER	A	410	-10.971	36.472	-19.343	1.00	22.82
ATOM	3144	O	SER	A	410	-11.898	36.925	-20.010	1.00	23.59
ATOM	3145	N	GLY	A	411	-10.758	35.161	-19.238	1.00	21.64
ATOM	3146	CA	GLY	A	411	-11.668	34.221	-19.877	1.00	20.39
ATOM	3147	C	GLY	A	411	-11.476	34.087	-21.379	1.00	19.99
ATOM	3148	O	GLY	A	411	-12.223	33.368	-22.029	1.00	20.85
ATOM	3149	N	THR	A	412	-10.478	34.750	-21.941	1.00	19.04
ATOM	3150	CA	THR	A	412	-10.268	34.658	-23.383	1.00	20.25
ATOM	3151	CB	THR	A	412	-9.447	35.853	-23.922	1.00	21.81
ATOM	3152	OG1	THR	A	412	-8.187	35.900	-23.257	1.00	26.24
ATOM	3153	CG2	THR	A	412	-10.160	37.163	-23.631	1.00	23.82
ATOM	3154	C	THR	A	412	-9.615	33.294	-23.732	1.00	19.17
ATOM	3155	O	THR	A	412	-8.786	32.796	-22.970	1.00	17.70
ATOM	3156	N	PRO	A	413	-9.996	32.688	-24.874	1.00	18.84
ATOM	3157	CA	PRO	A	413	-9.466	31.348	-25.234	1.00	18.32
ATOM	3158	CB	PRO	A	413	-10.220	31.002	-26.525	1.00	18.75
ATOM	3159	CG	PRO	A	413	-11.513	31.928	-26.451	1.00	19.42
ATOM	3160	CD	PRO	A	413	-10.943	33.195	-25.891	1.00	19.40
ATOM	3161	C	PRO	A	413	-7.959	31.399	-25.464	1.00	18.87
ATOM	3162	O	PRO	A	413	-7.436	32.406	-25.955	1.00	18.20
ATOM	3163	N	LEU	A	414	-7.253	30.353	-25.051	1.00	18.44
ATOM	3164	CA	LEU	A	414	-5.822	30.275	-25.305	1.00	18.90
ATOM	3165	CB	LEU	A	414	-4.992	30.974	-24.208	1.00	21.66
ATOM	3166	CG	LEU	A	414	-5.019	30.574	-22.754	1.00	24.35
ATOM	3167	CD1	LEU	A	414	-4.134	31.484	-21.892	1.00	27.42
ATOM	3168	CD2	LEU	A	414	-6.406	30.669	-22.224	1.00	30.77
ATOM	3169	C	LEU	A	414	-5.362	28.854	-25.518	1.00	17.24
ATOM	3170	O	LEU	A	414	-6.138	27.913	-25.406	1.00	15.97
ATOM	3171	N	SER	A	415	-4.091	28.733	-25.865	1.00	15.34
ATOM	3172	CA	SER	A	415	-3.473	27.481	-26.257	1.00	15.28
ATOM	3173	CB	SER	A	415	-3.434	26.468	-25.101	1.00	14.94
ATOM	3174	OG	SER	A	415	-2.632	25.355	-25.445	1.00	14.00
ATOM	3175	C	SER	A	415	-4.141	26.932	-27.528	1.00	15.13

ATOM	3233	C	SER A 422	-14.229	19.496	-26.257	1.00	11.40
ATOM	3234	O	SER A 422	-15.204	19.468	-25.530	1.00	12.11
ATOM	3235	N	TYR A 423	-14.320	19.281	-27.563	1.00	11.29
ATOM	3236	CA	TYR A 423	-15.617	18.990	-28.170	1.00	11.29
ATOM	3237	CB	TYR A 423	-15.502	19.020	-29.717	1.00	11.85
ATOM	3238	CG	TYR A 423	-15.132	20.389	-30.274	1.00	12.18
ATOM	3239	CD1	TYR A 423	-16.002	21.485	-30.145	1.00	10.35
ATOM	3240	CE1	TYR A 423	-15.668	22.741	-30.643	1.00	11.83
ATOM	3241	CZ	TYR A 423	-14.468	22.912	-31.316	1.00	12.29
ATOM	3242	OH	TYR A 423	-14.157	24.145	-31.783	1.00	13.08
ATOM	3243	CE2	TYR A 423	-13.588	21.845	-31.496	1.00	13.57
ATOM	3244	CD2	TYR A 423	-13.942	20.572	-30.991	1.00	12.74
ATOM	3245	C	TYR A 423	-16.217	17.673	-27.658	1.00	12.12
ATOM	3246	O	TYR A 423	-17.430	17.622	-27.323	1.00	12.13
ATOM	3247	N	ALA A 424	-15.385	16.623	-27.539	1.00	10.99
ATOM	3248	CA	ALA A 424	-15.853	15.337	-26.986	1.00	11.26
ATOM	3249	CB	ALA A 424	-14.717	14.294	-26.952	1.00	11.73
ATOM	3250	C	ALA A 424	-16.411	15.535	-25.588	1.00	10.93
ATOM	3251	O	ALA A 424	-17.465	14.974	-25.246	1.00	11.68
ATOM	3252	N	SER A 425	-15.696	16.308	-24.770	1.00	9.74
ATOM	3253	CA	SER A 425	-16.077	16.519	-23.379	1.00	10.92
ATOM	3254	CB	SER A 425	-14.948	17.228	-22.602	1.00	11.59
ATOM	3255	OG	SER A 425	-14.817	18.604	-22.957	1.00	13.86
ATOM	3256	C	SER A 425	-17.402	17.291	-23.219	1.00	11.65
ATOM	3257	O	SER A 425	-18.132	17.043	-22.276	1.00	11.86
ATOM	3258	N	PHE A 426	-17.683	18.220	-24.133	1.00	12.13
ATOM	3259	CA	PHE A 426	-18.983	18.891	-24.154	1.00	12.95
ATOM	3260	CB	PHE A 426	-19.018	20.053	-25.173	1.00	13.14
ATOM	3261	CG	PHE A 426	-20.410	20.575	-25.391	1.00	15.93
ATOM	3262	CD1	PHE A 426	-20.951	21.522	-24.516	1.00	17.76
ATOM	3263	CE1	PHE A 426	-22.279	21.980	-24.688	1.00	17.49
ATOM	3264	CZ	PHE A 426	-23.064	21.455	-25.716	1.00	17.22
ATOM	3265	CE2	PHE A 426	-22.561	20.496	-26.558	1.00	17.04
ATOM	3266	CD2	PHE A 426	-21.225	20.045	-26.396	1.00	17.29
ATOM	3267	C	PHE A 426	-20.079	17.878	-24.502	1.00	13.31
ATOM	3268	O	PHE A 426	-21.120	17.827	-23.850	1.00	13.38
ATOM	3269	N	LEU A 427	-19.834	17.077	-25.539	1.00	13.23
ATOM	3270	CA	LEU A 427	-20.811	16.090	-25.996	1.00	14.41
ATOM	3271	CB	LEU A 427	-20.339	15.410	-27.291	1.00	14.32
ATOM	3272	CG	LEU A 427	-20.363	16.336	-28.506	1.00	15.96
ATOM	3273	CD1	LEU A 427	-19.661	15.639	-29.689	1.00	18.66
ATOM	3274	CD2	LEU A 427	-21.773	16.800	-28.876	1.00	16.20
ATOM	3275	C	LEU A 427	-21.137	15.045	-24.959	1.00	14.86
ATOM	3276	O	LEU A 427	-22.307	14.667	-24.833	1.00	16.01
ATOM	3277	N	THR A 428	-20.130	14.551	-24.235	1.00	13.81
ATOM	3278	CA	THR A 428	-20.397	13.544	-23.196	1.00	13.67
ATOM	3279	CB	THR A 428	-19.134	12.732	-22.745	1.00	12.87
ATOM	3280	OG1	THR A 428	-18.127	13.597	-22.185	1.00	12.33
ATOM	3281	CG2	THR A 428	-18.533	11.902	-23.923	1.00	13.77
ATOM	3282	C	THR A 428	-21.146	14.133	-21.980	1.00	13.66
ATOM	3283	O	THR A 428	-22.102	13.517	-21.478	1.00	15.09
ATOM	3284	N	ALA A 429	-20.738	15.312	-21.524	1.00	13.72
ATOM	3285	CA	ALA A 429	-21.367	15.942	-20.355	1.00	14.65
ATOM	3286	CB	ALA A 429	-20.704	17.295	-20.036	1.00	14.11
ATOM	3287	C	ALA A 429	-22.852	16.158	-20.643	1.00	15.47
ATOM	3288	O	ALA A 429	-23.704	15.908	-19.783	1.00	15.97
ATOM	3289	N	THR A 430	-23.151	16.622	-21.854	1.00	15.48

ATOM	3347	N	PRO A 438	-23.497	5.208	-21.255	1.00	22.28
ATOM	3348	CA	PRO A 438	-22.837	4.291	-22.181	1.00	22.83
ATOM	3349	CB	PRO A 438	-21.365	4.642	-22.009	1.00	22.45
ATOM	3350	CG	PRO A 438	-21.248	5.054	-20.578	1.00	23.88
ATOM	3351	CD	PRO A 438	-22.575	5.707	-20.214	1.00	22.50
ATOM	3352	C	PRO A 438	-23.093	2.840	-21.753	1.00	22.80
ATOM	3353	O	PRO A 438	-23.580	2.604	-20.626	1.00	23.06
ATOM	3354	N	PRO A 439	-22.796	1.878	-22.639	1.00	22.65
ATOM	3355	CA	PRO A 439	-22.911	0.452	-22.283	1.00	22.08
ATOM	3356	CB	PRO A 439	-22.300	-0.269	-23.499	1.00	21.30
ATOM	3357	CG	PRO A 439	-22.526	0.664	-24.618	1.00	22.81
ATOM	3358	CD	PRO A 439	-22.391	2.062	-24.050	1.00	22.29
ATOM	3359	C	PRO A 439	-22.122	0.129	-21.037	1.00	21.88
ATOM	3360	O	PRO A 439	-21.075	0.750	-20.776	1.00	20.95
ATOM	3361	N	SER A 440	-22.628	-0.818	-20.253	1.00	22.34
ATOM	3362	CA	SER A 440	-21.932	-1.273	-19.060	1.00	23.42
ATOM	3363	CB	SER A 440	-22.818	-2.195	-18.224	1.00	24.01
ATOM	3364	OG	SER A 440	-23.805	-1.412	-17.566	1.00	26.78
ATOM	3365	C	SER A 440	-20.654	-1.992	-19.430	1.00	23.78
ATOM	3366	O	SER A 440	-20.540	-2.554	-20.522	1.00	23.97
ATOM	3367	N	TRP A 441	-19.681	-1.929	-18.536	1.00	24.15
ATOM	3368	CA	TRP A 441	-18.431	-2.646	-18.718	1.00	24.63
ATOM	3369	CB	TRP A 441	-17.255	-1.679	-18.819	1.00	22.62
ATOM	3370	CG	TRP A 441	-16.963	-0.837	-17.583	1.00	19.24
ATOM	3371	CD1	TRP A 441	-17.409	0.432	-17.339	1.00	16.95
ATOM	3372	NE1	TRP A 441	-16.909	0.878	-16.138	1.00	17.89
ATOM	3373	CE2	TRP A 441	-16.111	-0.098	-15.595	1.00	17.88
ATOM	3374	CD2	TRP A 441	-16.130	-1.194	-16.476	1.00	18.22
ATOM	3375	CE3	TRP A 441	-15.377	-2.338	-16.149	1.00	19.64
ATOM	3376	CZ3	TRP A 441	-14.658	-2.355	-14.961	1.00	18.61
ATOM	3377	CH2	TRP A 441	-14.670	-1.246	-14.094	1.00	20.62
ATOM	3378	CZ2	TRP A 441	-15.400	-0.114	-14.391	1.00	19.39
ATOM	3379	C	TRP A 441	-18.179	-3.661	-17.625	1.00	26.71
ATOM	3380	O	TRP A 441	-17.410	-4.592	-17.813	1.00	25.60
ATOM	3381	N	ALA A 442	-18.798	-3.471	-16.468	1.00	29.78
ATOM	3382	CA	ALA A 442	-18.442	-4.292	-15.330	1.00	33.94
ATOM	3383	CB	ALA A 442	-18.347	-3.447	-14.082	1.00	33.18
ATOM	3384	C	ALA A 442	-19.447	-5.412	-15.136	1.00	37.28
ATOM	3385	O	ALA A 442	-20.383	-5.561	-15.915	1.00	38.51
ATOM	3386	N	ASN A 443	-19.201	-6.222	-14.116	1.00	41.45
ATOM	3387	CA	ASN A 443	-20.226	-7.030	-13.467	1.00	45.10
ATOM	3388	CB	ASN A 443	-20.135	-8.490	-13.914	1.00	45.75
ATOM	3389	CG	ASN A 443	-18.815	-9.129	-13.531	1.00	48.14
ATOM	3390	OD1	ASN A 443	-18.620	-9.524	-12.380	1.00	50.51
ATOM	3391	ND2	ASN A 443	-17.888	-9.212	-14.492	1.00	50.01
ATOM	3392	C	ASN A 443	-19.946	-6.892	-11.972	1.00	46.93
ATOM	3393	O	ASN A 443	-18.878	-6.396	-11.580	1.00	47.13
ATOM	3394	N	SER A 444	-20.873	-7.343	-11.135	1.00	49.21
ATOM	3395	CA	SER A 444	-20.719	-7.201	-9.684	1.00	51.08
ATOM	3396	CB	SER A 444	-21.713	-8.096	-8.936	1.00	51.21
ATOM	3397	OG	SER A 444	-21.738	-7.735	-7.563	1.00	52.90
ATOM	3398	C	SER A 444	-19.291	-7.452	-9.165	1.00	51.89
ATOM	3399	O	SER A 444	-18.743	-6.610	-8.433	1.00	52.46
ATOM	3400	N	SER A 445	-18.700	-8.588	-9.558	1.00	52.45
ATOM	3401	CA	SER A 445	-17.400	-9.030	-9.029	1.00	52.98
ATOM	3402	CB	SER A 445	-17.138	-10.497	-9.385	1.00	53.12
ATOM	3403	OG	SER A 445	-16.901	-10.650	-10.775	1.00	54.45

ATOM	3461	OG	SER A 454	0.276	-10.251	-6.349	1.00	40.44
ATOM	3462	C	SER A 454	1.047	-7.450	-6.690	1.00	37.78
ATOM	3463	O	SER A 454	0.030	-7.187	-7.347	1.00	36.71
ATOM	3464	N	GLY A 455	2.275	-7.175	-7.111	1.00	37.06
ATOM	3465	CA	GLY A 455	2.514	-6.613	-8.431	1.00	36.79
ATOM	3466	C	GLY A 455	2.493	-7.658	-9.539	1.00	36.18
ATOM	3467	O	GLY A 455	3.410	-7.708	-10.367	1.00	36.73
ATOM	3468	N	ALA A 456	1.445	-8.480	-9.562	1.00	35.26
ATOM	3469	CA	ALA A 456	1.321	-9.584	-10.512	1.00	34.46
ATOM	3470	CB	ALA A 456	0.125	-10.454	-10.158	1.00	34.50
ATOM	3471	C	ALA A 456	1.195	-9.111	-11.963	1.00	34.16
ATOM	3472	O	ALA A 456	0.283	-8.353	-12.301	1.00	33.56
ATOM	3473	N	SER A 457	2.097	-9.588	-12.817	1.00	33.11
ATOM	3474	CA	SER A 457	2.013	-9.302	-14.241	1.00	32.60
ATOM	3475	CB	SER A 457	3.022	-8.219	-14.635	1.00	32.50
ATOM	3476	OG	SER A 457	4.352	-8.691	-14.519	1.00	33.28
ATOM	3477	C	SER A 457	2.228	-10.575	-15.044	1.00	32.31
ATOM	3478	O	SER A 457	2.641	-11.605	-14.494	1.00	32.32
ATOM	3479	N	VAL A 458	1.908	-10.511	-16.330	1.00	31.12
ATOM	3480	CA	VAL A 458	2.063	-11.629	-17.246	1.00	31.09
ATOM	3481	CB	VAL A 458	0.682	-12.199	-17.659	1.00	31.00
ATOM	3482	CG1	VAL A 458	0.806	-13.173	-18.830	1.00	30.72
ATOM	3483	CG2	VAL A 458	-0.014	-12.847	-16.459	1.00	31.08
ATOM	3484	C	VAL A 458	2.817	-11.144	-18.480	1.00	30.88
ATOM	3485	O	VAL A 458	2.401	-10.177	-19.126	1.00	29.70
ATOM	3486	N	VAL A 459	3.924	-11.811	-18.805	1.00	30.81
ATOM	3487	CA	VAL A 459	4.643	-11.525	-20.051	1.00	30.95
ATOM	3488	CB	VAL A 459	6.046	-12.172	-20.071	1.00	31.34
ATOM	3489	CG1	VAL A 459	6.664	-12.102	-21.492	1.00	30.45
ATOM	3490	CG2	VAL A 459	6.947	-11.522	-19.030	1.00	32.03
ATOM	3491	C	VAL A 459	3.805	-12.032	-21.227	1.00	31.37
ATOM	3492	O	VAL A 459	3.443	-13.214	-21.288	1.00	31.84
ATOM	3493	N	GLY A 460	3.480	-11.137	-22.154	1.00	30.71
ATOM	3494	CA	GLY A 460	2.596	-11.495	-23.258	1.00	30.77
ATOM	3495	C	GLY A 460	3.349	-11.799	-24.536	1.00	30.66
ATOM	3496	O	GLY A 460	4.585	-11.773	-24.582	1.00	30.90
ATOM	3497	N	SER A 461	2.606	-12.094	-25.584	1.00	30.44
ATOM	3498	CA	SER A 461	3.219	-12.227	-26.877	1.00	31.06
ATOM	3499	CB	SER A 461	3.301	-13.695	-27.308	1.00	31.44
ATOM	3500	OG	SER A 461	2.018	-14.278	-27.419	1.00	34.77
ATOM	3501	C	SER A 461	2.463	-11.357	-27.864	1.00	30.21
ATOM	3502	O	SER A 461	1.246	-11.156	-27.736	1.00	30.87
ATOM	3503	N	TYR A 462	3.192	-10.822	-28.836	1.00	28.84
ATOM	3504	CA	TYR A 462	2.651	-9.797	-29.712	1.00	28.13
ATOM	3505	CB	TYR A 462	3.365	-8.471	-29.426	1.00	26.74
ATOM	3506	CG	TYR A 462	3.264	-8.098	-27.976	1.00	25.28
ATOM	3507	CD1	TYR A 462	2.184	-7.335	-27.508	1.00	23.75
ATOM	3508	CE1	TYR A 462	2.066	-7.022	-26.162	1.00	23.41
ATOM	3509	CZ	TYR A 462	3.030	-7.458	-25.268	1.00	23.32
ATOM	3510	OH	TYR A 462	2.907	-7.155	-23.941	1.00	23.50
ATOM	3511	CE2	TYR A 462	4.113	-8.226	-25.698	1.00	22.57
ATOM	3512	CD2	TYR A 462	4.223	-8.537	-27.050	1.00	24.71
ATOM	3513	C	TYR A 462	2.844	-10.191	-31.152	1.00	28.83
ATOM	3514	O	TYR A 462	3.898	-10.697	-31.529	1.00	29.33
ATOM	3515	N	SER A 463	1.828	-9.973	-31.961	1.00	29.66
ATOM	3516	CA	SER A 463	1.970	-10.202	-33.388	1.00	30.77
ATOM	3517	CB	SER A 463	1.424	-11.574	-33.784	1.00	30.99

ATOM	3575	N	PRO A 471	-15.987	-5.931	-43.959	1.00	37.46
ATOM	3576	CA	PRO A 471	-16.983	-6.243	-44.985	1.00	38.04
ATOM	3577	CB	PRO A 471	-17.790	-7.383	-44.361	1.00	37.60
ATOM	3578	CG	PRO A 471	-16.877	-7.986	-43.337	1.00	38.09
ATOM	3579	CD	PRO A 471	-16.093	-6.828	-42.795	1.00	37.31
ATOM	3580	C	PRO A 471	-17.879	-5.033	-45.231	1.00	38.96
ATOM	3581	O	PRO A 471	-18.108	-4.245	-44.306	1.00	38.78
ATOM	3582	N	PRO A 472	-18.378	-4.869	-46.471	1.00	39.78
ATOM	3583	CA	PRO A 472	-19.238	-3.723	-46.771	1.00	39.87
ATOM	3584	CB	PRO A 472	-19.378	-3.780	-48.293	1.00	40.09
ATOM	3585	CG	PRO A 472	-19.171	-5.225	-48.635	1.00	40.28
ATOM	3586	CD	PRO A 472	-18.171	-5.740	-47.649	1.00	40.02
ATOM	3587	C	PRO A 472	-20.604	-3.864	-46.114	1.00	39.75
ATOM	3588	O	PRO A 472	-21.017	-4.980	-45.798	1.00	40.10
ATOM	3589	N	SER A 473	-21.268	-2.734	-45.881	1.00	39.71
ATOM	3590	CA	SER A 473	-22.675	-2.696	-45.467	1.00	39.61
ATOM	3591	CB	SER A 473	-23.571	-3.070	-46.651	1.00	40.16
ATOM	3592	OG	SER A 473	-23.468	-2.074	-47.658	1.00	42.55
ATOM	3593	C	SER A 473	-23.043	-3.509	-44.221	1.00	38.94
ATOM	3594	O	SER A 473	-24.041	-4.258	-44.210	1.00	39.07
ATOM	3595	N	GLN A 474	-22.257	-3.340	-43.159	1.00	37.75
ATOM	3596	CA	GLN A 474	-22.558	-3.993	-41.888	1.00	36.60
ATOM	3597	CB	GLN A 474	-21.291	-4.205	-41.057	1.00	36.41
ATOM	3598	CG	GLN A 474	-20.331	-5.169	-41.732	1.00	36.24
ATOM	3599	CD	GLN A 474	-19.295	-5.757	-40.795	1.00	36.45
ATOM	3600	OE1	GLN A 474	-18.478	-5.040	-40.211	1.00	35.30
ATOM	3601	NE2	GLN A 474	-19.304	-7.077	-40.671	1.00	36.85
ATOM	3602	C	GLN A 474	-23.620	-3.191	-41.149	1.00	36.40
ATOM	3603	O	GLN A 474	-23.329	-2.444	-40.208	1.00	35.99
ATOM	3604	N	THR A 475	-24.859	-3.350	-41.616	1.00	35.59
ATOM	3605	CA	THR A 475	-26.012	-2.595	-41.148	1.00	35.20
ATOM	3606	CB	THR A 475	-27.051	-2.478	-42.287	1.00	35.73
ATOM	3607	OG1	THR A 475	-27.120	-3.737	-42.959	1.00	36.85
ATOM	3608	CG2	THR A 475	-26.642	-1.418	-43.310	1.00	34.51
ATOM	3609	C	THR A 475	-26.635	-3.256	-39.910	1.00	35.16
ATOM	3610	O	THR A 475	-26.363	-4.420	-39.622	1.00	34.47
ATOM	3611	N	PRO A 476	-27.453	-2.510	-39.148	1.00	35.36
ATOM	3612	CA	PRO A 476	-27.990	-3.111	-37.923	1.00	36.40
ATOM	3613	CB	PRO A 476	-28.567	-1.910	-37.167	1.00	36.04
ATOM	3614	CG	PRO A 476	-28.890	-0.912	-38.230	1.00	35.98
ATOM	3615	CD	PRO A 476	-27.907	-1.119	-39.339	1.00	35.70
ATOM	3616	C	PRO A 476	-29.085	-4.171	-38.158	1.00	37.45
ATOM	3617	O	PRO A 476	-29.654	-4.244	-39.254	1.00	36.95
ATOM	3618	N	LYS A 477	-29.342	-4.984	-37.133	1.00	39.01
ATOM	3619	CA	LYS A 477	-30.472	-5.911	-37.111	1.00	41.20
ATOM	3620	CB	LYS A 477	-30.541	-6.641	-35.774	1.00	41.46
ATOM	3621	CG	LYS A 477	-29.665	-7.850	-35.604	1.00	41.87
ATOM	3622	CD	LYS A 477	-29.939	-8.517	-34.237	1.00	42.36
ATOM	3623	CE	LYS A 477	-29.996	-7.497	-33.076	1.00	44.55
ATOM	3624	NZ	LYS A 477	-29.705	-8.110	-31.718	1.00	44.56
ATOM	3625	C	LYS A 477	-31.766	-5.118	-37.230	1.00	42.27
ATOM	3626	O	LYS A 477	-31.818	-3.960	-36.798	1.00	42.18
ATOM	3627	N	PRO A 478	-32.831	-5.743	-37.780	1.00	43.46
ATOM	3628	CA	PRO A 478	-34.150	-5.106	-37.669	1.00	44.02
ATOM	3629	CB	PRO A 478	-35.106	-6.144	-38.267	1.00	43.89
ATOM	3630	CG	PRO A 478	-34.255	-7.033	-39.105	1.00	44.08
ATOM	3631	CD	PRO A 478	-32.885	-7.034	-38.493	1.00	43.41

ATOM	3689	CA	THR	A	487	-23.676	15.336	-42.986	1.00	31.43
ATOM	3690	CB	THR	A	487	-24.879	15.785	-43.869	1.00	31.94
ATOM	3691	OG1	THR	A	487	-25.321	14.665	-44.644	1.00	35.19
ATOM	3692	CG2	THR	A	487	-24.489	16.904	-44.810	1.00	32.95
ATOM	3693	C	THR	A	487	-23.110	16.561	-42.261	1.00	29.79
ATOM	3694	O	THR	A	487	-23.761	17.078	-41.363	1.00	29.20
ATOM	3695	N	PRO	A	488	-21.901	17.027	-42.644	1.00	29.20
ATOM	3696	CA	PRO	A	488	-21.309	18.228	-42.005	1.00	28.77
ATOM	3697	CB	PRO	A	488	-19.988	18.435	-42.763	1.00	28.75
ATOM	3698	CG	PRO	A	488	-19.684	17.126	-43.408	1.00	29.52
ATOM	3699	CD	PRO	A	488	-21.010	16.448	-43.667	1.00	29.41
ATOM	3700	C	PRO	A	488	-22.175	19.463	-42.194	1.00	28.44
ATOM	3701	O	PRO	A	488	-23.003	19.499	-43.116	1.00	28.51
ATOM	3702	N	LEU	A	489	-21.971	20.469	-41.345	1.00	27.28
ATOM	3703	CA	LEU	A	489	-22.606	21.775	-41.522	1.00	26.52
ATOM	3704	CB	LEU	A	489	-22.269	22.708	-40.365	1.00	27.19
ATOM	3705	CG	LEU	A	489	-22.805	22.303	-38.987	1.00	27.53
ATOM	3706	CD1	LEU	A	489	-22.233	23.242	-37.929	1.00	26.81
ATOM	3707	CD2	LEU	A	489	-24.332	22.323	-38.970	1.00	28.98
ATOM	3708	C	LEU	A	489	-22.137	22.402	-42.833	1.00	26.65
ATOM	3709	O	LEU	A	489	-20.983	22.210	-43.245	1.00	25.40
ATOM	3710	N	PRO	A	490	-23.030	23.153	-43.503	1.00	26.84
ATOM	3711	CA	PRO	A	490	-22.636	23.745	-44.786	1.00	26.44
ATOM	3712	CB	PRO	A	490	-23.983	24.107	-45.432	1.00	27.00
ATOM	3713	CG	PRO	A	490	-24.900	24.341	-44.289	1.00	27.68
ATOM	3714	CD	PRO	A	490	-24.425	23.475	-43.137	1.00	26.91
ATOM	3715	C	PRO	A	490	-21.737	24.982	-44.668	1.00	26.22
ATOM	3716	O	PRO	A	490	-21.826	25.729	-43.698	1.00	25.74
ATOM	3717	N	CYS	A	491	-20.858	25.182	-45.650	1.00	26.06
ATOM	3718	CA	CYS	A	491	-20.079	26.412	-45.754	1.00	26.88
ATOM	3719	CB	CYS	A	491	-18.630	26.194	-45.302	1.00	27.00
ATOM	3720	SG	CYS	A	491	-18.450	25.196	-43.819	1.00	27.23
ATOM	3721	C	CYS	A	491	-20.032	26.822	-47.217	1.00	27.27
ATOM	3722	O	CYS	A	491	-20.369	26.026	-48.083	1.00	27.34
ATOM	3723	N	ALA	A	492	-19.577	28.045	-47.484	1.00	28.05
ATOM	3724	CA	ALA	A	492	-19.205	28.449	-48.845	1.00	29.40
ATOM	3725	CB	ALA	A	492	-18.837	29.928	-48.866	1.00	29.49
ATOM	3726	C	ALA	A	492	-18.023	27.599	-49.320	1.00	30.37
ATOM	3727	O	ALA	A	492	-17.310	26.998	-48.497	1.00	30.36
ATOM	3728	N	THR	A	493	-17.828	27.508	-50.633	1.00	31.27
ATOM	3729	CA	THR	A	493	-16.612	26.883	-51.163	1.00	32.43
ATOM	3730	CB	THR	A	493	-16.845	26.234	-52.533	1.00	33.22
ATOM	3731	OG1	THR	A	493	-17.944	25.324	-52.431	1.00	38.55
ATOM	3732	CG2	THR	A	493	-15.590	25.464	-52.996	1.00	33.71
ATOM	3733	C	THR	A	493	-15.596	28.006	-51.254	1.00	31.35
ATOM	3734	O	THR	A	493	-15.916	29.068	-51.795	1.00	31.58
ATOM	3735	N	PRO	A	494	-14.390	27.815	-50.682	1.00	30.44
ATOM	3736	CA	PRO	A	494	-13.464	28.947	-50.696	1.00	30.01
ATOM	3737	CB	PRO	A	494	-12.414	28.555	-49.645	1.00	30.26
ATOM	3738	CG	PRO	A	494	-12.416	27.077	-49.658	1.00	30.56
ATOM	3739	CD	PRO	A	494	-13.815	26.635	-49.997	1.00	30.85
ATOM	3740	C	PRO	A	494	-12.809	29.089	-52.060	1.00	28.81
ATOM	3741	O	PRO	A	494	-12.801	28.137	-52.834	1.00	28.82
ATOM	3742	N	THR	A	495	-12.260	30.258	-52.352	1.00	28.43
ATOM	3743	CA	THR	A	495	-11.551	30.419	-53.623	1.00	28.44
ATOM	3744	CB	THR	A	495	-11.885	31.748	-54.319	1.00	28.68
ATOM	3745	OG1	THR	A	495	-11.449	32.839	-53.500	1.00	30.39

ATOM	3803	CA	GLU	A	503	8.678	19.821	-43.968	1.00	14.46
ATOM	3804	CB	GLU	A	503	9.434	20.712	-44.996	1.00	14.22
ATOM	3805	CG	GLU	A	503	10.782	20.121	-45.524	1.00	16.31
ATOM	3806	CD	GLU	A	503	10.620	18.973	-46.539	1.00	21.32
ATOM	3807	OE1	GLU	A	503	11.523	18.819	-47.393	1.00	21.21
ATOM	3808	OE2	GLU	A	503	9.609	18.230	-46.510	1.00	20.10
ATOM	3809	C	GLU	A	503	9.657	19.322	-42.917	1.00	14.22
ATOM	3810	O	GLU	A	503	10.175	20.121	-42.131	1.00	15.31
ATOM	3811	N	LEU	A	504	9.960	18.027	-42.927	1.00	14.92
ATOM	3812	CA	LEU	A	504	11.026	17.518	-42.052	1.00	15.49
ATOM	3813	CB	LEU	A	504	10.658	16.147	-41.489	1.00	16.33
ATOM	3814	CG	LEU	A	504	9.479	16.178	-40.498	1.00	17.19
ATOM	3815	CD1	LEU	A	504	8.922	14.753	-40.320	1.00	19.08
ATOM	3816	CD2	LEU	A	504	9.953	16.723	-39.198	1.00	17.28
ATOM	3817	C	LEU	A	504	12.318	17.428	-42.846	1.00	16.59
ATOM	3818	O	LEU	A	504	12.403	16.656	-43.785	1.00	16.72
ATOM	3819	N	VAL	A	505	13.317	18.201	-42.444	1.00	17.20
ATOM	3820	CA	VAL	A	505	14.592	18.235	-43.154	1.00	19.16
ATOM	3821	CB	VAL	A	505	14.548	19.141	-44.418	1.00	18.88
ATOM	3822	CG1	VAL	A	505	14.028	20.539	-44.090	1.00	19.28
ATOM	3823	CG2	VAL	A	505	15.948	19.219	-45.095	1.00	21.65
ATOM	3824	C	VAL	A	505	15.674	18.705	-42.188	1.00	20.00
ATOM	3825	O	VAL	A	505	15.595	19.785	-41.595	1.00	19.92
ATOM	3826	N	SER	A	506	16.685	17.868	-42.011	1.00	21.73
ATOM	3827	CA	SER	A	506	17.761	18.216	-41.104	1.00	23.33
ATOM	3828	CB	SER	A	506	18.570	16.974	-40.771	1.00	23.74
ATOM	3829	OG	SER	A	506	19.583	17.320	-39.847	1.00	28.30
ATOM	3830	C	SER	A	506	18.646	19.284	-41.759	1.00	23.03
ATOM	3831	O	SER	A	506	19.070	19.139	-42.908	1.00	23.20
ATOM	3832	N	THR	A	507	18.888	20.371	-41.049	1.00	24.01
ATOM	3833	CA	THR	A	507	19.685	21.464	-41.600	1.00	25.15
ATOM	3834	CB	THR	A	507	18.845	22.725	-41.833	1.00	25.01
ATOM	3835	OG1	THR	A	507	18.104	23.015	-40.650	1.00	24.43
ATOM	3836	CG2	THR	A	507	17.891	22.536	-43.000	1.00	24.71
ATOM	3837	C	THR	A	507	20.795	21.812	-40.623	1.00	27.09
ATOM	3838	O	THR	A	507	20.729	21.448	-39.451	1.00	26.15
ATOM	3839	N	GLN	A	508	21.798	22.536	-41.113	1.00	29.34
ATOM	3840	CA	GLN	A	508	22.912	22.986	-40.272	1.00	32.54
ATOM	3841	CB	GLN	A	508	24.239	22.542	-40.897	1.00	32.54
ATOM	3842	CG	GLN	A	508	24.369	21.010	-40.972	1.00	34.32
ATOM	3843	CD	GLN	A	508	25.400	20.515	-41.991	1.00	36.23
ATOM	3844	OE1	GLN	A	508	26.283	19.700	-41.660	1.00	41.79
ATOM	3845	NE2	GLN	A	508	25.279	20.977	-43.242	1.00	40.42
ATOM	3846	C	GLN	A	508	22.827	24.502	-40.100	1.00	33.06
ATOM	3847	O	GLN	A	508	22.136	25.178	-40.873	1.00	32.49
ATOM	3848	N	PHE	A	509	23.494	25.037	-39.075	1.00	33.80
ATOM	3849	CA	PHE	A	509	23.432	26.476	-38.782	1.00	35.03
ATOM	3850	CB	PHE	A	509	24.413	26.837	-37.651	1.00	36.75
ATOM	3851	CG	PHE	A	509	24.481	28.315	-37.340	1.00	39.07
ATOM	3852	CD1	PHE	A	509	23.592	28.893	-36.428	1.00	41.58
ATOM	3853	CE1	PHE	A	509	23.642	30.265	-36.140	1.00	42.61
ATOM	3854	CZ	PHE	A	509	24.603	31.073	-36.766	1.00	41.78
ATOM	3855	CE2	PHE	A	509	25.507	30.503	-37.678	1.00	42.48
ATOM	3856	CD2	PHE	A	509	25.441	29.127	-37.955	1.00	41.46
ATOM	3857	C	PHE	A	509	23.712	27.311	-40.040	1.00	34.58
ATOM	3858	O	PHE	A	509	24.614	26.990	-40.815	1.00	34.58
ATOM	3859	N	GLY	A	510	22.912	28.355	-40.256	1.00	33.85

ATOM	3917	C	ASN A 518	4.199	27.937	-60.232	1.00	27.20
ATOM	3918	O	ASN A 518	4.154	28.822	-61.079	1.00	28.68
ATOM	3919	N	ALA A 519	3.399	27.907	-59.163	1.00	27.04
ATOM	3920	CA	ALA A 519	2.424	28.978	-58.898	1.00	26.47
ATOM	3921	CB	ALA A 519	1.473	28.598	-57.747	1.00	27.02
ATOM	3922	C	ALA A 519	3.090	30.322	-58.629	1.00	26.35
ATOM	3923	O	ALA A 519	4.226	30.394	-58.135	1.00	25.27
ATOM	3924	N	ALA A 520	2.369	31.394	-58.954	1.00	26.25
ATOM	3925	CA	ALA A 520	2.887	32.741	-58.784	1.00	26.77
ATOM	3926	CB	ALA A 520	1.872	33.775	-59.298	1.00	27.50
ATOM	3927	C	ALA A 520	3.250	33.004	-57.317	1.00	26.68
ATOM	3928	O	ALA A 520	4.301	33.560	-57.030	1.00	26.01
ATOM	3929	N	ALA A 521	2.395	32.548	-56.399	1.00	26.75
ATOM	3930	CA	ALA A 521	2.628	32.712	-54.963	1.00	26.82
ATOM	3931	CB	ALA A 521	1.395	32.251	-54.167	1.00	26.85
ATOM	3932	C	ALA A 521	3.876	31.950	-54.504	1.00	26.51
ATOM	3933	O	ALA A 521	4.485	32.305	-53.494	1.00	26.63
ATOM	3934	N	LEU A 522	4.261	30.919	-55.259	1.00	26.79
ATOM	3935	CA	LEU A 522	5.452	30.113	-54.932	1.00	26.50
ATOM	3936	CB	LEU A 522	5.185	28.626	-55.155	1.00	26.64
ATOM	3937	CG	LEU A 522	4.224	27.946	-54.169	1.00	26.58
ATOM	3938	CD1	LEU A 522	4.049	26.489	-54.533	1.00	27.59
ATOM	3939	CD2	LEU A 522	4.718	28.092	-52.730	1.00	28.08
ATOM	3940	C	LEU A 522	6.696	30.559	-55.709	1.00	26.54
ATOM	3941	O	LEU A 522	7.779	29.987	-55.547	1.00	25.56
ATOM	3942	N	GLY A 523	6.518	31.575	-56.552	1.00	26.25
ATOM	3943	CA	GLY A 523	7.637	32.267	-57.199	1.00	26.16
ATOM	3944	C	GLY A 523	7.996	31.809	-58.607	1.00	26.84
ATOM	3945	O	GLY A 523	9.029	32.227	-59.152	1.00	25.81
ATOM	3946	N	ASN A 524	7.162	30.946	-59.193	1.00	27.13
ATOM	3947	CA	ASN A 524	7.413	30.419	-60.539	1.00	27.74
ATOM	3948	CB	ASN A 524	7.046	31.484	-61.591	1.00	28.43
ATOM	3949	CG	ASN A 524	7.123	30.960	-63.015	1.00	30.79
ATOM	3950	OD1	ASN A 524	6.856	29.780	-63.285	1.00	30.80
ATOM	3951	ND2	ASN A 524	7.515	31.838	-63.936	1.00	33.61
ATOM	3952	C	ASN A 524	8.845	29.857	-60.710	1.00	28.44
ATOM	3953	O	ASN A 524	9.531	30.104	-61.720	1.00	27.82
ATOM	3954	N	TRP A 525	9.280	29.111	-59.693	1.00	27.99
ATOM	3955	CA	TRP A 525	10.573	28.398	-59.659	1.00	28.92
ATOM	3956	CB	TRP A 525	10.787	27.507	-60.896	1.00	28.31
ATOM	3957	CG	TRP A 525	9.803	26.394	-61.060	1.00	27.68
ATOM	3958	CD1	TRP A 525	8.902	26.247	-62.078	1.00	27.96
ATOM	3959	NE1	TRP A 525	8.166	25.106	-61.907	1.00	27.55
ATOM	3960	CE2	TRP A 525	8.589	24.471	-60.762	1.00	30.58
ATOM	3961	CD2	TRP A 525	9.609	25.277	-60.184	1.00	27.84
ATOM	3962	CE3	TRP A 525	10.230	24.842	-59.001	1.00	26.50
ATOM	3963	CZ3	TRP A 525	9.787	23.655	-58.411	1.00	27.55
ATOM	3964	CH2	TRP A 525	8.752	22.889	-58.998	1.00	27.90
ATOM	3965	CZ2	TRP A 525	8.144	23.279	-60.168	1.00	26.22
ATOM	3966	C	TRP A 525	11.790	29.301	-59.452	1.00	29.66
ATOM	3967	O	TRP A 525	12.921	28.804	-59.346	1.00	30.61
ATOM	3968	N	SER A 526	11.570	30.613	-59.380	1.00	30.33
ATOM	3969	CA	SER A 526	12.645	31.536	-59.004	1.00	31.13
ATOM	3970	CB	SER A 526	12.213	32.993	-59.187	1.00	31.02
ATOM	3971	OG	SER A 526	13.166	33.838	-58.562	1.00	33.69
ATOM	3972	C	SER A 526	13.086	31.312	-57.560	1.00	31.29
ATOM	3973	O	SER A 526	12.271	31.381	-56.627	1.00	31.21

ATOM	4031	CA	VAL	A	536	10.138	27.861	-34.898	1.00	18.65
ATOM	4032	CB	VAL	A	536	8.824	28.719	-34.975	1.00	18.66
ATOM	4033	CG1	VAL	A	536	7.805	28.123	-35.971	1.00	19.98
ATOM	4034	CG2	VAL	A	536	8.208	28.962	-33.570	1.00	20.19
ATOM	4035	C	VAL	A	536	9.938	26.514	-34.155	1.00	18.51
ATOM	4036	O	VAL	A	536	10.124	26.437	-32.923	1.00	19.61
ATOM	4037	N	ASN	A	537	9.570	25.468	-34.883	1.00	18.59
ATOM	4038	CA	ASN	A	537	9.344	24.154	-34.261	1.00	19.07
ATOM	4039	CB	ASN	A	537	8.074	23.498	-34.816	1.00	19.28
ATOM	4040	CG	ASN	A	537	6.800	24.252	-34.448	1.00	21.02
ATOM	4041	OD1	ASN	A	537	6.742	24.940	-33.435	1.00	24.12
ATOM	4042	ND2	ASN	A	537	5.762	24.089	-35.265	1.00	20.99
ATOM	4043	C	ASN	A	537	10.518	23.182	-34.445	1.00	19.15
ATOM	4044	O	ASN	A	537	10.394	21.971	-34.196	1.00	18.60
ATOM	4045	N	TYR	A	538	11.653	23.699	-34.897	1.00	19.05
ATOM	4046	CA	TYR	A	538	12.767	22.830	-35.234	1.00	20.32
ATOM	4047	CB	TYR	A	538	13.816	23.618	-36.026	1.00	20.37
ATOM	4048	CG	TYR	A	538	14.916	22.747	-36.588	1.00	20.37
ATOM	4049	CD1	TYR	A	538	14.822	22.238	-37.886	1.00	20.39
ATOM	4050	CE1	TYR	A	538	15.853	21.436	-38.437	1.00	20.49
ATOM	4051	CZ	TYR	A	538	16.961	21.137	-37.670	1.00	20.65
ATOM	4052	OH	TYR	A	538	17.946	20.341	-38.218	1.00	21.53
ATOM	4053	CE2	TYR	A	538	17.066	21.602	-36.361	1.00	22.05
ATOM	4054	CD2	TYR	A	538	16.043	22.418	-35.825	1.00	21.95
ATOM	4055	C	TYR	A	538	13.436	22.209	-33.981	1.00	21.29
ATOM	4056	O	TYR	A	538	13.733	22.919	-33.036	1.00	21.89
ATOM	4057	N	ALA	A	539	13.695	20.902	-34.014	1.00	22.15
ATOM	4058	CA	ALA	A	539	14.646	20.258	-33.083	1.00	23.67
ATOM	4059	CB	ALA	A	539	13.909	19.536	-31.976	1.00	23.94
ATOM	4060	C	ALA	A	539	15.545	19.289	-33.849	1.00	24.35
ATOM	4061	O	ALA	A	539	15.117	18.698	-34.833	1.00	23.63
ATOM	4062	N	ASP	A	540	16.793	19.118	-33.405	1.00	25.69
ATOM	4063	CA	ASP	A	540	17.722	18.196	-34.099	1.00	27.42
ATOM	4064	CB	ASP	A	540	19.044	18.051	-33.339	1.00	28.62
ATOM	4065	CG	ASP	A	540	19.724	19.368	-33.140	1.00	33.80
ATOM	4066	OD1	ASP	A	540	19.875	20.115	-34.147	1.00	36.83
ATOM	4067	OD2	ASP	A	540	20.080	19.663	-31.970	1.00	40.32
ATOM	4068	C	ASP	A	540	17.150	16.818	-34.400	1.00	26.63
ATOM	4069	O	ASP	A	540	17.386	16.277	-35.485	1.00	27.28
ATOM	4070	N	ASN	A	541	16.403	16.247	-33.458	1.00	25.08
ATOM	4071	CA	ASN	A	541	15.827	14.922	-33.687	1.00	24.03
ATOM	4072	CB	ASN	A	541	15.988	14.032	-32.441	1.00	25.14
ATOM	4073	CG	ASN	A	541	15.337	14.623	-31.191	1.00	27.81
ATOM	4074	OD1	ASN	A	541	15.366	14.001	-30.118	1.00	31.57
ATOM	4075	ND2	ASN	A	541	14.771	15.824	-31.306	1.00	28.81
ATOM	4076	C	ASN	A	541	14.349	14.991	-34.118	1.00	22.46
ATOM	4077	O	ASN	A	541	13.660	13.979	-34.172	1.00	22.35
ATOM	4078	N	HIS	A	542	13.871	16.197	-34.403	1.00	19.85
ATOM	4079	CA	HIS	A	542	12.580	16.354	-35.083	1.00	18.22
ATOM	4080	CB	HIS	A	542	11.426	16.392	-34.062	1.00	16.89
ATOM	4081	CG	HIS	A	542	10.071	16.341	-34.699	1.00	17.32
ATOM	4082	ND1	HIS	A	542	9.211	17.417	-34.711	1.00	16.28
ATOM	4083	CE1	HIS	A	542	8.111	17.088	-35.371	1.00	14.64
ATOM	4084	NE2	HIS	A	542	8.217	15.834	-35.765	1.00	15.41
ATOM	4085	CD2	HIS	A	542	9.435	15.340	-35.358	1.00	15.14
ATOM	4086	C	HIS	A	542	12.662	17.650	-35.902	1.00	17.48
ATOM	4087	O	HIS	A	542	12.198	18.698	-35.446	1.00	17.79

ATOM	4145	CA	ASN	A	550	-2.356	31.107	-49.831	1.00	23.95
ATOM	4146	CB	ASN	A	550	-3.114	32.411	-49.649	1.00	24.39
ATOM	4147	CG	ASN	A	550	-3.367	32.706	-48.201	1.00	27.42
ATOM	4148	OD1	ASN	A	550	-3.811	31.838	-47.462	1.00	28.69
ATOM	4149	ND2	ASN	A	550	-3.041	33.911	-47.771	1.00	31.89
ATOM	4150	C	ASN	A	550	-2.278	30.733	-51.294	1.00	23.98
ATOM	4151	O	ASN	A	550	-1.598	31.400	-52.065	1.00	24.73
ATOM	4152	N	LEU	A	551	-2.973	29.667	-51.662	1.00	24.24
ATOM	4153	CA	LEU	A	551	-3.016	29.180	-53.020	1.00	24.78
ATOM	4154	CB	LEU	A	551	-2.348	27.797	-53.135	1.00	25.00
ATOM	4155	CG	LEU	A	551	-0.858	27.721	-52.787	1.00	25.19
ATOM	4156	CD1	LEU	A	551	-0.356	26.284	-52.803	1.00	27.45
ATOM	4157	CD2	LEU	A	551	-0.018	28.613	-53.718	1.00	26.73
ATOM	4158	C	LEU	A	551	-4.471	29.104	-53.488	1.00	25.46
ATOM	4159	O	LEU	A	551	-5.393	29.018	-52.675	1.00	24.27
ATOM	4160	N	GLU	A	552	-4.661	29.148	-54.804	1.00	26.15
ATOM	4161	CA	GLU	A	552	-6.004	29.165	-55.366	1.00	28.20
ATOM	4162	CB	GLU	A	552	-5.955	29.639	-56.823	1.00	28.30
ATOM	4163	CG	GLU	A	552	-7.326	29.739	-57.494	1.00	32.28
ATOM	4164	CD	GLU	A	552	-7.250	30.281	-58.926	1.00	33.44
ATOM	4165	OE1	GLU	A	552	-8.110	31.126	-59.274	1.00	41.80
ATOM	4166	OE2	GLU	A	552	-6.340	29.873	-59.695	1.00	39.14
ATOM	4167	C	GLU	A	552	-6.610	27.768	-55.253	1.00	26.97
ATOM	4168	O	GLU	A	552	-5.979	26.783	-55.622	1.00	26.49
ATOM	4169	N	ALA	A	553	-7.822	27.684	-54.723	1.00	27.21
ATOM	4170	CA	ALA	A	553	-8.502	26.399	-54.603	1.00	27.89
ATOM	4171	CB	ALA	A	553	-9.876	26.574	-53.953	1.00	28.37
ATOM	4172	C	ALA	A	553	-8.637	25.773	-55.979	1.00	28.57
ATOM	4173	O	ALA	A	553	-8.900	26.477	-56.952	1.00	28.83
ATOM	4174	N	GLY	A	554	-8.438	24.465	-56.064	1.00	28.44
ATOM	4175	CA	GLY	A	554	-8.556	23.753	-57.330	1.00	29.66
ATOM	4176	C	GLY	A	554	-7.274	23.693	-58.145	1.00	30.04
ATOM	4177	O	GLY	A	554	-7.122	22.814	-59.000	1.00	30.33
ATOM	4178	N	ASP	A	555	-6.347	24.606	-57.869	1.00	30.23
ATOM	4179	CA	ASP	A	555	-5.098	24.716	-58.630	1.00	30.61
ATOM	4180	CB	ASP	A	555	-4.313	25.939	-58.161	1.00	30.85
ATOM	4181	CG	ASP	A	555	-3.382	26.503	-59.236	1.00	34.49
ATOM	4182	OD1	ASP	A	555	-3.441	26.053	-60.407	1.00	37.19
ATOM	4183	OD2	ASP	A	555	-2.572	27.408	-58.901	1.00	36.59
ATOM	4184	C	ASP	A	555	-4.238	23.467	-58.486	1.00	30.14
ATOM	4185	O	ASP	A	555	-4.156	22.882	-57.419	1.00	30.07
ATOM	4186	N	VAL	A	556	-3.602	23.046	-59.572	1.00	29.55
ATOM	4187	CA	VAL	A	556	-2.628	21.963	-59.492	1.00	28.74
ATOM	4188	CB	VAL	A	556	-2.732	20.987	-60.680	1.00	29.35
ATOM	4189	CG1	VAL	A	556	-1.666	19.877	-60.569	1.00	28.99
ATOM	4190	CG2	VAL	A	556	-4.125	20.365	-60.720	1.00	30.44
ATOM	4191	C	VAL	A	556	-1.261	22.623	-59.448	1.00	28.04
ATOM	4192	O	VAL	A	556	-0.869	23.336	-60.384	1.00	27.25
ATOM	4193	N	VAL	A	557	-0.544	22.389	-58.352	1.00	26.81
ATOM	4194	CA	VAL	A	557	0.739	23.040	-58.100	1.00	26.14
ATOM	4195	CB	VAL	A	557	0.690	23.859	-56.759	1.00	26.71
ATOM	4196	CG1	VAL	A	557	2.073	24.140	-56.219	1.00	27.82
ATOM	4197	CG2	VAL	A	557	-0.088	25.175	-56.952	1.00	27.34
ATOM	4198	C	VAL	A	557	1.856	21.999	-58.092	1.00	25.64
ATOM	4199	O	VAL	A	557	1.646	20.845	-57.693	1.00	25.24
ATOM	4200	N	GLU	A	558	3.035	22.409	-58.553	1.00	24.16
ATOM	4201	CA	GLU	A	558	4.223	21.579	-58.516	1.00	24.38

ATOM	4259	CA	VAL	A	564	19.877	27.837	-49.206	1.00	28.74
ATOM	4260	CB	VAL	A	564	19.156	29.091	-49.832	1.00	28.91
ATOM	4261	CG1	VAL	A	564	19.461	30.408	-49.087	1.00	31.10
ATOM	4262	CG2	VAL	A	564	17.655	28.836	-50.079	1.00	28.92
ATOM	4263	C	VAL	A	564	20.886	28.181	-48.122	1.00	29.56
ATOM	4264	O	VAL	A	564	20.538	28.320	-46.954	1.00	29.10
ATOM	4265	N	GLY	A	565	22.150	28.266	-48.527	1.00	32.02
ATOM	4266	CA	GLY	A	565	23.252	28.423	-47.577	1.00	34.92
ATOM	4267	C	GLY	A	565	23.539	29.876	-47.248	1.00	37.47
ATOM	4268	O	GLY	A	565	22.969	30.788	-47.871	1.00	37.66
ATOM	4269	N	GLN	A	566	24.419	30.098	-46.267	1.00	39.85
ATOM	4270	CA	GLN	A	566	24.897	31.456	-45.926	1.00	42.75
ATOM	4271	CB	GLN	A	566	26.054	31.398	-44.918	1.00	42.83
ATOM	4272	CG	GLN	A	566	25.727	30.761	-43.565	1.00	44.99
ATOM	4273	CD	GLN	A	566	26.940	30.689	-42.626	1.00	44.88
ATOM	4274	OE1	GLN	A	566	27.972	30.089	-42.958	1.00	47.67
ATOM	4275	NE2	GLN	A	566	26.810	31.293	-41.441	1.00	47.62
ATOM	4276	C	GLN	A	566	25.373	32.195	-47.181	1.00	43.30
ATOM	4277	O	GLN	A	566	25.052	33.365	-47.389	1.00	44.01
ATOM	4278	N	ASP	A	567	26.118	31.479	-48.023	1.00	44.30
ATOM	4279	CA	ASP	A	567	26.739	32.029	-49.236	1.00	44.62
ATOM	4280	CB	ASP	A	567	27.916	31.139	-49.650	1.00	45.13
ATOM	4281	CG	ASP	A	567	27.492	29.702	-49.966	1.00	47.62
ATOM	4282	OD1	ASP	A	567	26.421	29.255	-49.485	1.00	48.73
ATOM	4283	OD2	ASP	A	567	28.245	29.010	-50.693	1.00	50.47
ATOM	4284	C	ASP	A	567	25.776	32.197	-50.421	1.00	44.04
ATOM	4285	O	ASP	A	567	26.196	32.575	-51.522	1.00	44.36
ATOM	4286	N	GLY	A	568	24.497	31.899	-50.205	1.00	42.85
ATOM	4287	CA	GLY	A	568	23.488	32.045	-51.247	1.00	41.38
ATOM	4288	C	GLY	A	568	23.359	30.851	-52.177	1.00	40.41
ATOM	4289	O	GLY	A	568	22.496	30.854	-53.054	1.00	40.62
ATOM	4290	N	SER	A	569	24.195	29.827	-51.990	1.00	39.02
ATOM	4291	CA	SER	A	569	24.137	28.623	-52.827	1.00	37.72
ATOM	4292	CB	SER	A	569	25.365	27.746	-52.600	1.00	38.07
ATOM	4293	OG	SER	A	569	25.454	27.359	-51.238	1.00	39.18
ATOM	4294	C	SER	A	569	22.868	27.819	-52.540	1.00	36.72
ATOM	4295	O	SER	A	569	22.474	27.672	-51.382	1.00	36.47
ATOM	4296	N	VAL	A	570	22.222	27.313	-53.583	1.00	35.25
ATOM	4297	CA	VAL	A	570	20.988	26.558	-53.365	1.00	34.26
ATOM	4298	CB	VAL	A	570	19.709	27.243	-53.987	1.00	34.42
ATOM	4299	CG1	VAL	A	570	18.992	26.358	-55.020	1.00	35.11
ATOM	4300	CG2	VAL	A	570	20.010	28.651	-54.506	1.00	35.12
ATOM	4301	C	VAL	A	570	21.113	25.080	-53.718	1.00	33.29
ATOM	4302	O	VAL	A	570	21.735	24.694	-54.714	1.00	32.88
ATOM	4303	N	THR	A	571	20.515	24.261	-52.864	1.00	31.66
ATOM	4304	CA	THR	A	571	20.480	22.825	-53.021	1.00	30.87
ATOM	4305	CB	THR	A	571	21.016	22.146	-51.752	1.00	30.96
ATOM	4306	OG1	THR	A	571	22.311	22.686	-51.442	1.00	33.18
ATOM	4307	CG2	THR	A	571	21.117	20.637	-51.935	1.00	30.95
ATOM	4308	C	THR	A	571	19.018	22.473	-53.210	1.00	29.72
ATOM	4309	O	THR	A	571	18.186	22.832	-52.373	1.00	28.84
ATOM	4310	N	TRP	A	572	18.697	21.846	-54.337	1.00	29.01
ATOM	4311	CA	TRP	A	572	17.331	21.388	-54.589	1.00	28.49
ATOM	4312	CB	TRP	A	572	17.004	21.367	-56.086	1.00	28.99
ATOM	4313	CG	TRP	A	572	16.950	22.690	-56.739	1.00	29.65
ATOM	4314	CD1	TRP	A	572	18.014	23.419	-57.217	1.00	30.67
ATOM	4315	NE1	TRP	A	572	17.564	24.603	-57.769	1.00	31.84

ATOM	4373	CA	THR	A	579	2.426	17.448	-57.254	1.00	25.34
ATOM	4374	CB	THR	A	579	2.092	16.568	-58.477	1.00	26.08
ATOM	4375	OG1	THR	A	579	3.162	16.672	-59.429	1.00	29.14
ATOM	4376	CG2	THR	A	579	0.749	16.979	-59.126	1.00	26.14
ATOM	4377	C	THR	A	579	1.259	17.480	-56.291	1.00	25.05
ATOM	4378	O	THR	A	579	0.977	16.487	-55.629	1.00	25.73
ATOM	4379	N	TYR	A	580	0.591	18.619	-56.213	1.00	25.23
ATOM	4380	CA	TYR	A	580	-0.450	18.802	-55.211	1.00	25.68
ATOM	4381	CB	TYR	A	580	0.098	19.556	-53.976	1.00	25.88
ATOM	4382	CG	TYR	A	580	-0.931	19.763	-52.866	1.00	26.21
ATOM	4383	CD1	TYR	A	580	-1.284	21.048	-52.429	1.00	26.22
ATOM	4384	CE1	TYR	A	580	-2.256	21.233	-51.399	1.00	27.53
ATOM	4385	CZ	TYR	A	580	-2.860	20.111	-50.841	1.00	27.08
ATOM	4386	OH	TYR	A	580	-3.806	20.207	-49.844	1.00	27.88
ATOM	4387	CE2	TYR	A	580	-2.510	18.841	-51.264	1.00	26.97
ATOM	4388	CD2	TYR	A	580	-1.562	18.671	-52.276	1.00	26.29
ATOM	4389	C	TYR	A	580	-1.634	19.523	-55.828	1.00	25.65
ATOM	4390	O	TYR	A	580	-1.490	20.596	-56.403	1.00	25.29
ATOM	4391	N	THR	A	581	-2.813	18.915	-55.732	1.00	25.95
ATOM	4392	CA	THR	A	581	-4.015	19.629	-56.117	1.00	25.78
ATOM	4393	CB	THR	A	581	-5.016	18.700	-56.806	1.00	26.75
ATOM	4394	OG1	THR	A	581	-4.332	18.000	-57.855	1.00	26.57
ATOM	4395	CG2	THR	A	581	-6.189	19.498	-57.397	1.00	27.62
ATOM	4396	C	THR	A	581	-4.627	20.285	-54.874	1.00	25.36
ATOM	4397	O	THR	A	581	-5.024	19.595	-53.935	1.00	25.22
ATOM	4398	N	VAL	A	582	-4.685	21.615	-54.880	1.00	24.54
ATOM	4399	CA	VAL	A	582	-5.255	22.382	-53.777	1.00	24.15
ATOM	4400	CB	VAL	A	582	-5.006	23.915	-53.953	1.00	24.21
ATOM	4401	CG1	VAL	A	582	-5.472	24.700	-52.744	1.00	23.87
ATOM	4402	CG2	VAL	A	582	-3.514	24.218	-54.219	1.00	25.33
ATOM	4403	C	VAL	A	582	-6.759	22.063	-53.706	1.00	24.32
ATOM	4404	O	VAL	A	582	-7.478	22.204	-54.700	1.00	23.26
ATOM	4405	N	PRO	A	583	-7.236	21.587	-52.546	1.00	24.10
ATOM	4406	CA	PRO	A	583	-8.665	21.230	-52.476	1.00	24.34
ATOM	4407	CB	PRO	A	583	-8.865	20.763	-51.022	1.00	24.33
ATOM	4408	CG	PRO	A	583	-7.516	20.538	-50.468	1.00	25.16
ATOM	4409	CD	PRO	A	583	-6.508	21.310	-51.294	1.00	24.72
ATOM	4410	C	PRO	A	583	-9.597	22.404	-52.768	1.00	24.50
ATOM	4411	O	PRO	A	583	-9.262	23.558	-52.487	1.00	23.93
ATOM	4412	N	ALA	A	584	-10.756	22.104	-53.350	1.00	24.61
ATOM	4413	CA	ALA	A	584	-11.817	23.084	-53.477	1.00	24.77
ATOM	4414	CB	ALA	A	584	-12.065	23.439	-54.943	1.00	25.29
ATOM	4415	C	ALA	A	584	-13.036	22.434	-52.847	1.00	24.94
ATOM	4416	O	ALA	A	584	-13.922	21.932	-53.537	1.00	25.03
ATOM	4417	N	VAL	A	585	-13.052	22.406	-51.517	1.00	24.24
ATOM	4418	CA	VAL	A	585	-14.075	21.673	-50.776	1.00	23.75
ATOM	4419	CB	VAL	A	585	-13.465	20.452	-50.029	1.00	24.50
ATOM	4420	CG1	VAL	A	585	-14.515	19.770	-49.151	1.00	24.48
ATOM	4421	CG2	VAL	A	585	-12.863	19.447	-51.026	1.00	25.32
ATOM	4422	C	VAL	A	585	-14.707	22.639	-49.781	1.00	23.20
ATOM	4423	O	VAL	A	585	-13.999	23.347	-49.065	1.00	22.13
ATOM	4424	N	ALA	A	586	-16.044	22.679	-49.739	1.00	22.43
ATOM	4425	CA	ALA	A	586	-16.749	23.546	-48.804	1.00	21.79
ATOM	4426	CB	ALA	A	586	-18.240	23.212	-48.820	1.00	22.19
ATOM	4427	C	ALA	A	586	-16.160	23.324	-47.389	1.00	21.57
ATOM	4428	O	ALA	A	586	-15.954	22.180	-46.990	1.00	20.89
ATOM	4429	N	CYS	A	587	-15.872	24.414	-46.679	1.00	21.59

ATOM	4487	OE2	GLU	A	594	2.107	16.507	-39.940	1.00	16.43
ATOM	4488	C	GLU	A	594	4.286	16.245	-45.323	1.00	17.34
ATOM	4489	O	GLU	A	594	3.973	15.177	-45.852	1.00	17.78
ATOM	4490	N	ASP	A	595	5.463	16.833	-45.487	1.00	17.05
ATOM	4491	CA	ASP	A	595	6.481	16.326	-46.405	1.00	17.21
ATOM	4492	CB	ASP	A	595	6.823	17.379	-47.475	1.00	16.63
ATOM	4493	CG	ASP	A	595	5.678	17.619	-48.455	1.00	17.91
ATOM	4494	OD1	ASP	A	595	5.023	16.631	-48.857	1.00	20.73
ATOM	4495	OD2	ASP	A	595	5.434	18.795	-48.844	1.00	18.08
ATOM	4496	C	ASP	A	595	7.734	15.955	-45.631	1.00	17.47
ATOM	4497	O	ASP	A	595	7.915	16.375	-44.492	1.00	16.44
ATOM	4498	N	THR	A	596	8.598	15.162	-46.277	1.00	18.11
ATOM	4499	CA	THR	A	596	9.917	14.835	-45.747	1.00	18.85
ATOM	4500	CB	THR	A	596	9.991	13.390	-45.188	1.00	19.58
ATOM	4501	OG1	THR	A	596	9.057	13.248	-44.116	1.00	20.97
ATOM	4502	CG2	THR	A	596	11.385	13.124	-44.598	1.00	20.94
ATOM	4503	C	THR	A	596	10.895	14.978	-46.914	1.00	19.34
ATOM	4504	O	THR	A	596	10.588	14.531	-48.024	1.00	19.05
ATOM	4505	N	TRP	A	597	12.050	15.581	-46.631	1.00	20.24
ATOM	4506	CA	TRP	A	597	13.074	15.921	-47.633	1.00	21.94
ATOM	4507	CB	TRP	A	597	14.325	16.453	-46.940	1.00	22.34
ATOM	4508	CG	TRP	A	597	15.445	16.854	-47.882	1.00	23.75
ATOM	4509	CD1	TRP	A	597	16.509	16.079	-48.275	1.00	25.08
ATOM	4510	NE1	TRP	A	597	17.327	16.801	-49.138	1.00	24.85
ATOM	4511	CE2	TRP	A	597	16.802	18.059	-49.300	1.00	25.25
ATOM	4512	CD2	TRP	A	597	15.611	18.128	-48.527	1.00	24.09
ATOM	4513	CE3	TRP	A	597	14.875	19.325	-48.519	1.00	24.91
ATOM	4514	CZ3	TRP	A	597	15.334	20.401	-49.262	1.00	23.38
ATOM	4515	CH2	TRP	A	597	16.520	20.299	-50.028	1.00	25.14
ATOM	4516	CZ2	TRP	A	597	17.265	19.137	-50.053	1.00	22.49
ATOM	4517	C	TRP	A	597	13.424	14.708	-48.473	1.00	23.42
ATOM	4518	O	TRP	A	597	13.675	13.635	-47.939	1.00	22.37
ATOM	4519	N	GLN	A	598	13.409	14.904	-49.788	1.00	25.26
ATOM	4520	CA	GLN	A	598	13.698	13.850	-50.755	1.00	27.05
ATOM	4521	CB	GLN	A	598	12.936	14.124	-52.052	1.00	26.51
ATOM	4522	CG	GLN	A	598	11.418	13.948	-51.895	1.00	26.10
ATOM	4523	CD	GLN	A	598	10.642	14.209	-53.156	1.00	26.76
ATOM	4524	OE1	GLN	A	598	11.194	14.620	-54.175	1.00	27.68
ATOM	4525	NE2	GLN	A	598	9.340	13.990	-53.095	1.00	25.96
ATOM	4526	C	GLN	A	598	15.204	13.787	-50.977	1.00	29.21
ATOM	4527	O	GLN	A	598	15.794	14.694	-51.574	1.00	28.61
ATOM	4528	N	SER	A	599	15.818	12.722	-50.453	1.00	32.41
ATOM	4529	CA	SER	A	599	17.273	12.530	-50.498	1.00	35.70
ATOM	4530	CB	SER	A	599	17.747	11.698	-49.302	1.00	35.61
ATOM	4531	OG	SER	A	599	17.374	12.296	-48.072	1.00	39.62
ATOM	4532	C	SER	A	599	17.703	11.831	-51.785	1.00	36.66
ATOM	4533	O	SER	A	599	16.916	11.145	-52.433	1.00	37.44
ATOM	4534	OXT	SER	A	599	18.863	11.922	-52.194	1.00	38.18
ATOM	4535	C1	MAN	A	601	-3.602	-3.018	-46.412	1.00	102.64
ATOM	4536	C2	MAN	A	601	-4.584	-2.109	-47.156	1.00	102.73
ATOM	4537	O2	MAN	A	601	-3.951	-1.548	-48.288	1.00	102.91
ATOM	4538	C3	MAN	A	601	-5.867	-2.845	-47.570	1.00	102.38
ATOM	4539	O3	MAN	A	601	-6.544	-2.112	-48.566	1.00	102.32
ATOM	4540	C4	MAN	A	601	-5.640	-4.269	-48.082	1.00	102.18
ATOM	4541	O4	MAN	A	601	-6.860	-4.967	-47.984	1.00	101.76
ATOM	4542	C5	MAN	A	601	-4.561	-5.018	-47.298	1.00	102.40
ATOM	4543	C6	MAN	A	601	-4.172	-6.307	-48.010	1.00	102.48

ATOM	4601	C1	MAN	A	608	3.870	15.416	-59.489	1.00	37.21
ATOM	4602	C2	MAN	A	608	5.134	15.938	-60.168	1.00	40.45
ATOM	4603	O2	MAN	A	608	6.091	14.903	-60.120	1.00	38.47
ATOM	4604	C3	MAN	A	608	4.872	16.381	-61.608	1.00	42.66
ATOM	4605	O3	MAN	A	608	6.071	16.726	-62.263	1.00	44.20
ATOM	4606	C4	MAN	A	608	4.122	15.321	-62.401	1.00	44.80
ATOM	4607	O4	MAN	A	608	3.708	15.907	-63.612	1.00	47.73
ATOM	4608	C5	MAN	A	608	2.893	14.887	-61.597	1.00	44.80
ATOM	4609	C6	MAN	A	608	2.042	13.861	-62.342	1.00	47.55
ATOM	4610	O6	MAN	A	608	1.085	14.582	-63.104	1.00	49.87
ATOM	4611	O5	MAN	A	608	3.262	14.423	-60.302	1.00	42.18
ATOM	4612	C1	NAG	A	611	3.450	-2.354	-8.282	1.00	23.44
ATOM	4613	C2	NAG	A	611	3.474	-0.875	-7.878	1.00	24.51
ATOM	4614	N2	NAG	A	611	4.425	-0.077	-8.630	1.00	21.95
ATOM	4615	C7	NAG	A	611	4.123	0.454	-9.818	1.00	22.94
ATOM	4616	O7	NAG	A	611	3.030	0.322	-10.367	1.00	20.93
ATOM	4617	C8	NAG	A	611	5.216	1.232	-10.481	1.00	21.54
ATOM	4618	C3	NAG	A	611	3.741	-0.713	-6.380	1.00	25.60
ATOM	4619	O3	NAG	A	611	3.676	0.655	-6.047	1.00	24.91
ATOM	4620	C4	NAG	A	611	2.741	-1.528	-5.554	1.00	25.70
ATOM	4621	O4	NAG	A	611	3.196	-1.598	-4.227	1.00	28.27
ATOM	4622	C5	NAG	A	611	2.648	-2.952	-6.086	1.00	26.18
ATOM	4623	C6	NAG	A	611	1.524	-3.738	-5.397	1.00	26.64
ATOM	4624	O6	NAG	A	611	0.278	-3.081	-5.497	1.00	25.38
ATOM	4625	O5	NAG	A	611	2.437	-2.975	-7.488	1.00	24.34
ATOM	4626	C1	NAG	A	612	2.499	-0.713	-3.326	1.00	32.04
ATOM	4627	C2	NAG	A	612	2.710	-1.192	-1.879	1.00	35.81
ATOM	4628	N2	NAG	A	612	2.254	-2.556	-1.666	1.00	37.89
ATOM	4629	C7	NAG	A	612	3.072	-3.605	-1.753	1.00	39.19
ATOM	4630	O7	NAG	A	612	4.277	-3.517	-2.031	1.00	40.58
ATOM	4631	C8	NAG	A	612	2.439	-4.947	-1.507	1.00	38.98
ATOM	4632	C3	NAG	A	612	2.012	-0.256	-0.899	1.00	37.96
ATOM	4633	O3	NAG	A	612	2.352	-0.666	0.403	1.00	41.23
ATOM	4634	C4	NAG	A	612	2.491	1.176	-1.129	1.00	37.63
ATOM	4635	O4	NAG	A	612	1.789	2.053	-0.278	1.00	40.85
ATOM	4636	C5	NAG	A	612	2.294	1.565	-2.604	1.00	35.10
ATOM	4637	C6	NAG	A	612	2.785	2.982	-2.903	1.00	31.93
ATOM	4638	O6	NAG	A	612	4.188	2.994	-3.008	0.58	32.70
ATOM	4639	O5	NAG	A	612	2.974	0.625	-3.425	1.00	31.95
ATOM	4640	O8	BTB	A	620	-1.213	18.638	-21.639	1.00	23.78
ATOM	4641	C8	BTB	A	620	-1.255	19.440	-22.838	1.00	17.50
ATOM	4642	C7	BTB	A	620	-2.257	18.851	-23.831	1.00	15.39
ATOM	4643	N	BTB	A	620	-1.808	17.505	-24.294	1.00	13.88
ATOM	4644	C5	BTB	A	620	-1.274	17.600	-25.684	1.00	12.99
ATOM	4645	C6	BTB	A	620	0.017	18.399	-25.786	1.00	14.67
ATOM	4646	O6	BTB	A	620	0.949	18.004	-24.768	1.00	16.93
ATOM	4647	C2	BTB	A	620	-2.926	16.495	-24.191	1.00	13.33
ATOM	4648	C4	BTB	A	620	-4.238	16.972	-24.835	1.00	13.45
ATOM	4649	O4	BTB	A	620	-4.167	17.018	-26.265	1.00	14.77
ATOM	4650	C3	BTB	A	620	-3.213	16.295	-22.703	1.00	13.18
ATOM	4651	O3	BTB	A	620	-1.984	15.920	-22.059	1.00	12.74
ATOM	4652	C1	BTB	A	620	-2.501	15.161	-24.845	1.00	13.57
ATOM	4653	O1	BTB	A	620	-3.463	14.138	-24.525	1.00	13.07
ATOM	4654	O	WAT	W	1	-7.741	16.530	-28.587	1.00	12.90
ATOM	4655	O	WAT	W	2	-1.955	18.721	-7.814	1.00	11.77
ATOM	4656	O	WAT	W	3	-17.101	16.033	-19.836	1.00	15.26
ATOM	4657	O	WAT	W	4	-1.389	7.464	-24.070	1.00	15.86

ATOM	4715	O	WAT W	62	-1.973	27.723	-11.521	1.00	21.99
ATOM	4716	O	WAT W	63	-1.159	-10.623	-29.592	1.00	36.68
ATOM	4717	O	WAT W	64	-1.943	16.930	-42.957	1.00	21.57
ATOM	4718	O	WAT W	65	-1.507	25.238	-40.032	1.00	31.36
ATOM	4719	O	WAT W	66	-4.023	5.499	-31.787	1.00	20.03
ATOM	4720	O	WAT W	67	-13.383	13.873	-21.065	1.00	12.01
ATOM	4721	O	WAT W	68	-15.098	10.726	-24.467	1.00	24.34
ATOM	4722	O	WAT W	69	-2.122	13.975	-13.435	1.00	12.51
ATOM	4723	O	WAT W	70	-4.807	19.360	-43.270	1.00	20.93
ATOM	4724	O	WAT W	71	-26.028	26.143	-33.768	1.00	28.78
ATOM	4725	O	WAT W	72	-19.347	21.638	3.482	1.00	19.92
ATOM	4726	O	WAT W	73	-27.299	24.219	-6.045	1.00	20.97
ATOM	4727	O	WAT W	74	-21.114	-0.343	-28.050	1.00	22.38
ATOM	4728	O	WAT W	75	-5.818	34.483	-11.645	1.00	20.61
ATOM	4729	O	WAT W	76	6.048	1.098	-23.393	1.00	16.77
ATOM	4730	O	WAT W	77	-3.946	23.711	-39.552	1.00	25.07
ATOM	4731	O	WAT W	78	-18.572	21.631	-41.884	1.00	25.98
ATOM	4732	O	WAT W	79	5.239	26.273	-31.646	1.00	27.95
ATOM	4733	O	WAT W	80	0.054	15.597	-45.905	1.00	28.45
ATOM	4734	O	WAT W	81	-3.130	21.534	-5.652	1.00	20.95
ATOM	4735	O	WAT W	82	-12.534	4.331	-20.095	1.00	17.49
ATOM	4736	O	WAT W	83	0.785	16.541	-14.558	1.00	14.65
ATOM	4737	O	WAT W	84	-5.197	12.827	-31.553	1.00	14.10
ATOM	4738	O	WAT W	85	-16.738	26.994	-34.463	1.00	23.74
ATOM	4739	O	WAT W	86	3.596	22.076	-36.828	1.00	22.68
ATOM	4740	O	WAT W	87	5.170	14.460	-40.572	1.00	26.56
ATOM	4741	O	WAT W	88	-12.322	21.050	0.328	1.00	30.36
ATOM	4742	O	WAT W	89	7.426	14.327	-48.857	1.00	26.44
ATOM	4743	O	WAT W	90	-13.702	19.025	1.863	1.00	28.28
ATOM	4744	O	WAT W	91	8.794	2.010	-23.444	1.00	34.69
ATOM	4745	O	WAT W	92	-6.185	5.529	-30.210	1.00	17.03
ATOM	4746	O	WAT W	93	-18.081	20.709	-4.839	1.00	17.61
ATOM	4747	O	WAT W	94	-15.469	13.082	-22.717	1.00	15.55
ATOM	4748	O	WAT W	95	13.101	16.811	-29.771	1.00	29.16
ATOM	4749	O	WAT W	96	-25.944	7.031	-2.628	1.00	27.42
ATOM	4750	O	WAT W	97	-4.552	34.207	-7.388	1.00	22.19
ATOM	4751	O	WAT W	98	-2.231	-9.858	-32.291	1.00	26.28
ATOM	4752	O	WAT W	99	5.314	10.271	-28.762	1.00	29.39
ATOM	4753	O	WAT W	100	-15.379	27.478	-46.620	1.00	37.77
ATOM	4754	O	WAT W	101	26.815	24.874	-36.295	1.00	31.11
ATOM	4755	O	WAT W	102	-18.489	-0.112	-24.256	1.00	23.63
ATOM	4756	O	WAT W	103	-23.763	26.890	-9.454	1.00	20.50
ATOM	4757	O	WAT W	104	-10.933	23.904	-50.315	1.00	25.63
ATOM	4758	O	WAT W	105	5.864	12.071	-41.668	1.00	29.27
ATOM	4759	O	WAT W	106	2.526	9.409	-13.116	1.00	20.75
ATOM	4760	O	WAT W	107	-11.557	-6.653	-10.981	1.00	30.68
ATOM	4761	O	WAT W	108	-14.882	7.238	-22.254	1.00	24.81
ATOM	4762	O	WAT W	109	-5.331	-13.390	-25.293	1.00	35.63
ATOM	4763	O	WAT W	110	-8.068	24.248	-40.534	1.00	39.14
ATOM	4764	O	WAT W	111	-0.779	14.419	-43.060	1.00	24.01
ATOM	4765	O	WAT W	112	-22.279	12.054	-26.750	1.00	32.13
ATOM	4766	O	WAT W	113	-26.829	1.352	-33.787	1.00	26.97
ATOM	4767	O	WAT W	114	-14.120	14.116	3.214	1.00	36.89
ATOM	4768	O	WAT W	115	0.582	-9.914	-21.103	1.00	23.30
ATOM	4769	O	WAT W	116	-24.305	22.723	6.995	1.00	21.67
ATOM	4770	O	WAT W	117	-28.275	12.468	-15.419	1.00	21.87
ATOM	4771	O	WAT W	118	3.699	27.669	-20.781	1.00	34.08

ATOM	4829	O	WAT W 176	-27.397	26.421	-12.489	1.00	29.06
ATOM	4830	O	WAT W 177	-17.506	35.918	-29.284	1.00	36.40
ATOM	4831	O	WAT W 178	-18.298	7.055	-19.628	1.00	30.04
ATOM	4832	O	WAT W 179	-24.383	14.811	-26.605	1.00	29.51
ATOM	4833	O	WAT W 180	-1.204	27.462	-35.328	1.00	29.93
ATOM	4834	O	WAT W 181	-14.112	33.822	-23.916	1.00	34.66
ATOM	4835	O	WAT W 182	2.887	26.714	-9.619	1.00	34.18
ATOM	4836	O	WAT W 183	-16.062	4.698	1.046	1.00	32.44
ATOM	4837	O	WAT W 184	-13.340	36.111	-4.359	1.00	39.14
ATOM	4838	O	WAT W 185	9.661	34.457	-47.977	1.00	37.66
ATOM	4839	O	WAT W 186	-8.465	24.284	-1.237	1.00	33.71
ATOM	4840	O	WAT W 187	16.971	15.520	-43.951	1.00	42.49
ATOM	4841	O	WAT W 188	-12.038	-14.614	-20.299	1.00	34.37
ATOM	4842	O	WAT W 189	-5.887	22.387	-40.784	1.00	33.70
ATOM	4843	O	WAT W 190	-3.962	-18.100	-17.720	1.00	31.33
ATOM	4844	O	WAT W 191	-30.888	11.643	-15.288	1.00	36.84
ATOM	4845	O	WAT W 192	11.576	13.142	-37.752	1.00	32.89
ATOM	4846	O	WAT W 193	-7.856	3.348	-41.927	1.00	34.02
ATOM	4847	O	WAT W 194	-20.849	7.518	7.652	1.00	32.37
ATOM	4848	O	WAT W 195	16.954	13.938	-58.514	1.00	42.65
ATOM	4849	O	WAT W 196	-31.884	7.593	-13.893	1.00	37.54
ATOM	4850	O	WAT W 197	4.560	-14.190	-17.137	1.00	36.09
ATOM	4851	O	WAT W 198	1.116	27.617	-39.051	1.00	37.08
ATOM	4852	O	WAT W 199	-1.019	-12.134	-21.800	1.00	36.12
ATOM	4853	O	WAT W 200	8.350	0.111	-21.198	1.00	36.56
ATOM	4854	O	WAT W 201	-2.691	31.235	-26.910	1.00	32.08
ATOM	4855	O	WAT W 202	13.222	30.530	-38.626	1.00	36.46
ATOM	4856	O	WAT W 203	-11.218	19.535	-54.549	1.00	35.12
ATOM	4857	O	WAT W 204	-5.623	10.865	-46.910	1.00	35.48
ATOM	4858	O	WAT W 205	-18.073	1.743	-43.946	1.00	40.62
ATOM	4859	O	WAT W 206	-32.195	23.231	2.102	1.00	34.73
ATOM	4860	O	WAT W 207	-24.204	8.994	-2.941	1.00	30.29
ATOM	4861	O	WAT W 208	-4.771	18.292	-48.610	1.00	31.87
ATOM	4862	O	WAT W 209	-17.156	23.843	-40.674	1.00	35.73
ATOM	4863	O	WAT W 210	8.319	13.422	-13.297	1.00	37.43
ATOM	4864	O	WAT W 211	-25.962	8.559	-33.791	1.00	33.46
ATOM	4865	O	WAT W 212	-36.129	8.276	3.147	1.00	40.24
ATOM	4866	O	WAT W 213	20.833	21.074	-56.185	1.00	39.11
ATOM	4867	O	WAT W 214	-17.726	14.087	8.330	1.00	39.10
ATOM	4868	O	WAT W 215	8.944	8.011	-10.493	1.00	41.24
ATOM	4869	O	WAT W 216	-16.566	35.858	-11.282	1.00	38.90
ATOM	4870	O	WAT W 217	-20.560	11.198	-43.128	1.00	34.83
ATOM	4871	O	WAT W 218	3.261	-0.833	-39.177	1.00	32.67
ATOM	4872	O	WAT W 219	-22.370	-13.152	-34.412	1.00	59.42
ATOM	4873	O	WAT W 220	-24.775	6.925	5.968	1.00	34.28
ATOM	4874	O	WAT W 221	-20.357	21.098	-45.702	1.00	36.83
ATOM	4875	O	WAT W 222	2.502	28.932	-40.686	1.00	36.85
ATOM	4876	O	WAT W 223	-17.630	-5.533	-21.334	1.00	35.08
ATOM	4877	O	WAT W 224	-19.358	-1.912	-43.190	1.00	35.83
ATOM	4878	O	WAT W 225	-14.632	25.995	-42.094	1.00	41.12
ATOM	4879	O	WAT W 226	-28.967	5.606	-22.103	1.00	45.63
ATOM	4880	O	WAT W 227	-4.326	9.934	5.097	1.00	44.46
ATOM	4881	O	WAT W 228	3.983	22.711	-17.336	1.00	46.21
ATOM	4882	O	WAT W 229	-17.238	16.931	6.949	1.00	42.44
ATOM	4883	O	WAT W 230	-25.871	18.809	10.364	1.00	36.15
ATOM	4884	O	WAT W 231	-23.524	31.294	-19.082	1.00	35.99
ATOM	4885	O	WAT W 232	-5.261	-9.321	-38.277	1.00	43.42

ATOM	4943	O	WAT W 298	-26.753	-3.087	-31.243	1.00	39.08
ATOM	4944	O	WAT W 300	-10.820	35.024	-53.050	1.00	55.39
ATOM	4945	O	WAT W 302	-1.992	7.169	-31.692	1.00	39.12
ATOM	4946	O	WAT W 303	-15.282	-19.000	-23.770	1.00	34.62
ATOM	4947	O	WAT W 304	12.106	10.568	-25.112	1.00	39.04
ATOM	4948	O	WAT W 305	2.585	2.766	1.880	1.00	53.88
ATOM	4949	O	WAT W 306	3.680	21.122	-19.818	1.00	46.35
ATOM	4950	O	WAT W 307	22.759	24.721	-48.099	1.00	40.35
ATOM	4951	O	WAT W 309	-17.062	-6.726	-19.202	1.00	41.54
ATOM	4952	O	WAT W 311	12.594	1.109	-31.461	1.00	47.85
ATOM	4953	O	WAT W 312	23.347	25.060	-50.638	1.00	49.64
ATOM	4954	O	WAT W 314	-18.291	4.422	-19.151	1.00	39.17
ATOM	4955	O	WAT W 315	-11.815	-7.807	-8.676	1.00	37.74
ATOM	4956	O	WAT W 316	-25.147	1.885	-4.649	1.00	44.72
ATOM	4957	O	WAT W 317	-36.473	13.592	5.315	1.00	44.38
ATOM	4958	O	WAT W 318	-17.587	20.023	-46.231	1.00	48.30
ATOM	4959	O	WAT W 319	-16.081	29.024	-54.668	1.00	39.40
ATOM	4960	O	WAT W 320	-14.210	32.143	-5.494	1.00	42.73
ATOM	4961	O	WAT W 321	-15.274	28.830	-38.916	1.00	46.47
ATOM	4962	O	WAT W 322	-32.792	22.221	-3.433	1.00	41.52
ATOM	4963	O	WAT W 323	-32.475	16.905	-12.401	1.00	46.29
ATOM	4964	O	WAT W 325	15.341	22.212	-60.490	1.00	34.67
ATOM	4965	O	WAT W 326	-12.668	8.518	-41.723	1.00	36.26
ATOM	4966	O	WAT W 327	4.709	20.490	-10.568	1.00	38.04
ATOM	4967	O	WAT W 328	13.937	10.625	-29.312	1.00	38.32
ATOM	4968	O	WAT W 329	-21.964	9.615	-24.896	1.00	40.43
ATOM	4969	O	WAT W 330	19.325	25.925	-40.199	1.00	51.36
ATOM	4970	O	WAT W 331	-19.010	8.073	-45.255	1.00	46.06
ATOM	4971	O	WAT W 332	-25.024	-2.892	-29.306	1.00	41.74
ATOM	4972	O	WAT W 333	-16.593	-7.067	-23.297	1.00	38.54
ATOM	4973	O	WAT W 334	-17.517	24.078	2.157	1.00	45.82
ATOM	4974	O	WAT W 335	-19.123	31.941	0.010	1.00	38.91
ATOM	4975	O	WAT W 337	10.677	21.901	-62.740	1.00	44.31
ATOM	4976	O	WAT W 338	4.510	15.230	-51.810	1.00	42.12
ATOM	4977	O	WAT W 339	13.979	14.161	-43.380	1.00	46.42
ATOM	4978	O	WAT W 341	5.979	-11.625	-28.739	1.00	43.09
ATOM	4979	O	WAT W 342	-19.453	13.347	10.394	1.00	42.44
ATOM	4980	O	WAT W 343	7.085	23.050	-30.796	1.00	34.94
ATOM	4981	O	WAT W 345	6.471	24.087	-63.943	1.00	45.16
ATOM	4982	O	WAT W 347	3.734	22.842	-12.031	1.00	43.85
ATOM	4983	O	WAT W 348	-17.739	7.564	5.723	1.00	43.77
ATOM	4984	O	WAT W 351	-22.014	31.372	-24.708	1.00	42.69
ATOM	4985	O	WAT W 352	25.016	25.103	-46.967	1.00	40.51
ATOM	4986	O	WAT W 353	7.969	32.464	-67.637	1.00	57.78
ATOM	4987	O	WAT W 354	-27.444	5.101	5.861	1.00	48.31
ATOM	4988	O	WAT W 356	8.012	11.087	-40.867	1.00	47.51
ATOM	4989	O	WAT W 357	4.974	29.116	-17.433	1.00	43.72
ATOM	4990	O	WAT W 358	-0.457	9.488	-45.288	1.00	45.63
ATOM	4991	O	WAT W 360	-3.090	36.536	-12.138	1.00	46.29
ATOM	4992	O	WAT W 361	20.072	19.772	-36.896	1.00	38.73
ATOM	4993	O	WAT W 363	-26.217	15.345	-28.735	1.00	49.07
ATOM	4994	O	WAT W 365	-25.308	0.100	-48.602	1.00	60.01
ATOM	4995	O	WAT W 367	19.369	29.586	-58.438	1.00	48.19
ATOM	4996	O	WAT W 369	12.808	11.144	-54.427	1.00	48.48
ATOM	4997	O	WAT W 370	9.410	2.674	-16.115	1.00	44.59
ATOM	4998	O	WAT W 372	-10.249	38.564	-13.215	1.00	48.60
ATOM	4999	O	WAT W 373	-24.151	16.211	10.617	1.00	42.16

ATOM	5000	O	WAT W 375	-6.459	31.697	-48.106	1.00	46.03
ATOM	5001	O	WAT W 376	-11.605	27.116	-1.562	1.00	44.58
ATOM	5002	O	WAT W 377	-4.703	24.150	-62.673	1.00	48.70
ATOM	5003	O	WAT W 379	6.889	0.036	-7.530	1.00	45.35
ATOM	5004	O	WAT W 381	-13.601	32.742	-32.002	1.00	51.37
ATOM	5005	O	WAT W 383	-28.077	5.243	-4.688	1.00	37.46
END								

REIVINDICAÇÕES

1. Variante de glucoamilase compreendendo uma ou mais substituições de aminoácido em posições de resíduo correspondendo às posições 4, 5, 12, 24, 43, 44, 45, 46, 47, 49, 51, 70, 75, 6, 94, 100, 108, 114, 116, 119, 122, 124, 125, 137, 141, 143, 146, 148, 169, 171, 172, 175, 178, 180, 181, 208, 211, 228, 242, 243, 245, 292, 294, 197, 309, 310, 313, 314, 315, 316, 317, 321, 340, 341, 350, 353, 356, 363, 368, 369, 375, 376, 395, 398, 401, 408, 409, 412, 415, 418, 421, 433, 436 e 451 de SEQ ID NO: 2 ou 3 e/ou uma posição equivalente em uma glucoamilase precursora.
2. Variante de glucoamilase de acordo com a reivindicação 1, em que a posição equivalente é determinada pela identidade de sequência e a dita glucoamilase precursora tem pelo menos 80% de identidade de sequência e menos de 100% de identidade de sequência com SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9.
3. Variante de glucoamilase de acordo com a reivindicação 2, em que a glucoamilase precursora é SEQ ID NO: 1, 2 ou 3.
4. Variante de glucoamilase de acordo com a reivindicação 1, em que a posição equivalente é determinada pela identidade estrutural à SEQ ID NO: 3.
5. Variante de glucoamilase de acordo com a reivindicação 1, em que uma ou mais substituições de aminoácido correspondem a uma posição selecionada das posições 4, 5, 24, 29, 43, 49, 70, 75, 76, 100, 108, 119, 124, 137, 146, 148, 169, 171, 172, 175, 178, 181, 208, 211, 243, 292, 294, 297, 314, 316, 317, 340, 341, 350, 356, 363, 368, 369, 376, 395, 401, 412, 433, 436 e 451 e a referida glucoamilase precursora tem pelo menos 90% de identidade de sequência à SEQ ID NO. 2.
6. Variante de glucoamilase de acordo com a reivindicação 1, em que uma ou mais substituições de aminoácido correspondem a uma posição selecionada das posições 5, 24, 43, 49, 70, 75, 76, 94, 119, 141, 146, 148, 172, 175, 178, 180, 181, 208, 211, 243, 294, 309, 314, 353, 369, 375, 409.
7. Glucoamilase de acordo com a reivindicação 1, em que a glu-

coamilase precursora é selecionada de uma glucoamilase obtida de *Trichoderma spp.*, *Aspergillus spp.*, *Humicola spp.*, *Penicillium spp.*, *Talaromyces spp.* ou *Schizosaccharmyces spp.*

8. Variante de glucoamilase de acordo com a reivindicação 7,
5 em que a glucoamilase precursora é obtida de *Trichoderma spp.* ou *Aspergillus spp.*

9. Variante de glucoamilase de acordo com a reivindicação 1,
em que a variante compreende uma substituição em uma posição correspondendo às posições: D4L/E/R/S/C/A/Q/W, F5C/M/N/R/S/T/V/W, I12L/R,
10 D24E/U/Y/T, F29L/I/D/C/S/V/W, I43F/R/D/Y/S, D44E/H/K/S/N/Y/F/R, Y47W, Y49N, Q70R/K/M/P/G/V/F, Q75R/K/A, R76L/M/K/T/P, P94L, D100W/I/Q/M/P/A/N, N119P/A/Y/D/E, N146S/G/C/H/E/D/T/W/L/M, Q148V/Y/H/A/C/D/G/M/R/S/T, Y169D/F, Q172C/A/D/R/E/F/H/V/L/M/N/S/T/V, E180A/C/G/H/I/L/N/P/Q/R/S/T/V/Y, V181E/C/D/G/H/I/P/T/Y/S/K/F/A, Q208L/A/C/E/N/F/H/T,
15 S211C/R/E/A/Y/W/M/H/L/I/R/Q/T, E243S/R/N/M/Y/A/L, R245A/E/M/I/P/V, I292D/H/P/R/T/N/V/F/L, G294D/E/T/Q/I/A, K297F/L/P/T/M/D/N/Q/A/R/H/S/R/W, R309A/C/G/H/I/N/P/Q/S/T/W/A/L, Y310E/G/L/P/S/W/R/Q, D313Q, V314A/R/N/D/C/E/Q/G/H/I/K/L/M/F/P/S/T/W/Y, Y315F, Y316Q/R, N317T/H, K340D/T, K341F/D/P/V/G/S, T350S/E/A/N, Q356H/D/E, T363L/R/C/H/W,
20 S368W/D/F/L, S369F, N376Q/T/H/S/V, Y395Q/R/S, A398S/I/T, S401C/V, R408S, N409W/A7K, T412A/h/K/G, R433H/Q, I436A/T e S451M/T/H.

10. Variante de glucoamilase de acordo com a reivindicação 1,
em que a substituição é na posição correspondendo à posição 172.

11. Variante de glucoamilase de acordo com a reivindicação 10,
25 ainda compreendendo uma substituição na posição correspondendo à posição 208 ou 211.

12. Variante de glucoamilase de acordo com a reivindicação 11,
em que a substituição é Q172F, Q208N ou S221R.

13. Variante de glucoamilase de acordo com a reivindicação 11,
30 ainda compreendendo uma substituição em uma posição correspondendo à posição 314.

14. Variante de glucoamilase de acordo com a reivindicação 1,

em que a uma ou mais substituições de aminoácido correspondem às posições 24, 181, 208, 243, 292, 294, 353, 375 e 409.

15 15. Variante de glucoamilase de acordo com a reivindicação 14, em que a substituição é na posição D24E/1VY, V181K/L, Q208C, E243Y I292V, G294A/Q, T353R, N375N/Q e N409K/W.

16. Variante de glucoamilase de acordo com a reivindicação 1, em que a referida variante exibe termoestabilidade aumentada quando comparada à glucoamilase precursora.

10 17. Variante de glucoamilase de acordo com a reivindicação 1, em que a referida variante exibe atividade específica aumentada comparada à glucoamilase precursora.

18. Polinucleotídeo que codifica a variante como definida na reivindicação 1.

15 19. Célula hospedeira compreendendo um polinucleotídeo de acordo como definido na reivindicação 18.

20. Composição enzimática compreendendo a variante de glucoamilase como definida na reivindicação 1.

20 21. Composição enzimática de acordo com a reivindicação 20, em que a referida composição é usada em um processo de conversão de amido.

22. Composição enzimática de acordo com a reivindicação 20, em que a referida composição é usada em uma formulação de ração para animal.

25 23. Composição enzimática de acordo com a reivindicação 20, em que a referida composição é usada em um processo de fermentação de álcool.

30 24. Método de produção de uma glucoamilase variante em uma célula hospedeira compreendendo transformação de uma célula hospedeira com um constructo de DNA compreendendo um polinucleotídeo como definido na reivindicação 18; cultura da célula hospedeira sob condições adequadas para a expressão e produção da referida variante de glucoamilase e produção da referida variante.

25. Método de acordo com a reivindicação 24, ainda compreendendo recuperação da variante de glucoamilase da referida cultura.

26. Variante de glucoamilase compreendendo uma sequência de aminoácido tendo pelo menos uma deleção ou inserção em uma sequência correspondendo a uma glucoamilase precursora tendo 90% de identidade de sequência à SEQ ID NO: 2 ou 3.

Proteína precursora de TrGA (632 aminoácidos) (SEQ ID NO: 1)

```

1  MHVLSTAVLL GSVAVQKVLG RPGSSGLSDV TKRSVDDEIS TETPIALNNL
51 LCNVGPDGCR AFGTSAGAVI ASPSTIDPDY YMWTRDSAL VFKNLIDRFT
101 ETYDAGLQRR IEQYITAQVT LQGLSNPSGS LADGSGLGEP KFELTLKPFT
151 GNWGRPQRDG PALRAIALIG YSKWLINNNY QSTVSNVIWP IVRNDLNYVA
201 QYWNQTGFDL WEEVNGSSFF TVANQHRALV EGATLAATLG QSGSAYSSVA
251 PQVLCFLQRF WVSSGGYVDS NINTNEGRTG KDVNSVLTSI HTFDPNLGCD
301 AGTFQPCSDK ALSNLKVVVD SFRSIYGVNK GIPAGAAVAI GRYAEDVYYN
351 GNPWYLATFA AAEQLYDAIY VWKKTGSITV TATSLAFFQE LVPGVTAGTY
401 SSSSSTFTNI INAVSTYADG FLSEAAKYVP ADGSLAEQFD RNSGTPLSAL
451 HLTWSYASFL TATARRAGIV PPSWANSSAS TIPSTCSGAS VVGSYSRPTA
501 TSEPPSQTPK PGVPSGTPYT PLPCATPTSV AVTFHELVST QFGOTVKVAG
551 NAAALGNWST SAAVALDAVN YADNHPLWIG TVNLEAGDVV EYKYINVGQD
601 GSVTWESDPN HTYTVPAVAC VTQVVKEDTW QS

```

FIG. 1A

Sequência de codificação de DNA de TrGA (1899 bp) (SEQ ID NO: 4)

```

1  ATGCACGTCC  TGTCGACTGC  GGTGCTGCTC  GGCTCCGTTG  CCGTTCAAAA
51  GGTCCCTGGGA  AGACCAGGAT  CAAGCGGTCT  GTCCGACGTC  ACCAAGAGGT
101 CTGTTGACGA  CTTTCATCAGC  ACCGAGACGC  CTATTGCACT  GAACAATCTT
151 CTTTGCAATG  TTGGTCCTGA  TGGATGCCGT  GCATTCGGCA  CATCAGCTGG
201 TGCGGTGATT  GCATCTCCCA  GCACAATTGA  CCCGGACTAC  TATTACATGT
251 GGACGCGAGA  TAGCGCTCTT  GTCTTCAAGA  ACCTCATCGA  CCGCTTCACC
301 GAAACGTACG  ATGCGGGCCT  GCAGCGCCGC  ATCGAGCAGT  ACATTACTGC
351 CCAGGTCACT  CTCCAGGGCC  TCTCTAACCC  CTCGGGCTCC  CTCGCGGACG
401 GCTCTGGTCT  CGGCGAGCCC  AAGTTTGAGT  TGACCCTGAA  GCCTTTCACC
451 GGCAACTGGG  GTCGACCGCA  GCGGGATGGC  CCAGCTCTGC  GAGCCATTGC
501 CTTGATTGGA  TACTCAAAGT  GGCTCATCAA  CAACAACAT  CAGTCGACTG
551 TGTCCAACGT  CATCTGGCCT  ATTGTGCGCA  ACGACCTCAA  CTATGTTGCC
601 CAGTACTGGA  ACCAAACCGG  CTTTGACCTC  TGGGAAGAAG  TCAATGGGAG
651 CTCATTCTTT  ACTGTTGCCA  ACCAGCACCG  AGCACTTGTC  GAGGGCGCCA
701 CTCTTGCTGC  CACTCTTGGC  CAGTCGGGAA  GCGCTTATTC  ATCTGTTGCT
751 CCCCAGGTTT  TGTGCTTTCT  CCAACGATTC  TGGGTGTCGT  CTGGTGGATA
801 CGTCGACTCC  AACATCAACA  CCAACGAGGG  CAGGACTGGC  AAGGATGTCA
851 ACTCCGTCCT  GACTTCCATC  CACACCTTCG  ATCCCAACCT  TGGCTGTGAC
901 GCAGGCACCT  TCCAGCCATG  CAGTGACAAA  GCGCTCTCCA  ACCTCAAGGT
951 TGTTGTGCGAC  TCCTTCCGCT  CCATCTACGG  CGTGAACAAG  GGCATTCCTG
1001 CCGGTGCTGC  CGTCGCCATT  GGCCGGTATG  CAGAGGATGT  GTACTACAAC
1051 GGCAACCCTT  GGTATCTTGC  TACATTTGCT  GCTGCCGAGC  AGCTGTACGA
1101 TGCCATCTAC  GTCTGGAAGA  AGACGGGCTC  CATCACGGTG  ACCGCCACCT
1151 CCCTGGCCTT  CTTCCAGGAG  CTTGTTCTTG  GCGTGACGGC  CGGGACCTAC
1201 TCCAGCAGCT  CTTGACCTT  TACCAACATC  ATCAACGCCG  TCTCGACATA
1251 CGCCGATGGC  TTCTCAGCG  AGGCTGCCAA  GTACGTCCCC  GCCGACGGTT
1301 CGCTGGCCGA  GCAGTTTGAC  CGCAACAGCG  GCACTCCGCT  GTCTGCGCTT
1351 CACCTGACGT  GGTCGTACGC  CTCGTTCTTG  ACAGCCACGG  CCCGTCGGGC
1401 TGGCATCGTG  CCCCCCTCGT  GGGCCAACAG  CAGCGCTAGC  ACGATCCCCT
1451 CGACGTGCTC  CGGCGCGTCC  GTGGTCGGAT  CCTACTCGCG  TCCCACCGCC
1501 ACGTCATTCC  CTCCGTCGCA  GACGCCCAAG  CCTGGCGTGC  CTTCCGGTAC
1551 TCCCTACACG  CCCCTGCCCT  GCGCGACCCC  AACCTCCGTG  GCCGTCACCT
1601 TCCACGAGCT  CGTGTCGACA  CAGTTTGGCC  AGACGGTCAA  GGTGGCGGGC
1651 AACGCCGCGG  CCCTGGGCAA  CTGGAGCACG  AGCGCCGCCG  TGGCTCTGGA
1701 CGCCGTCAAC  TATGCCGATA  ACCACCCCCT  GTGGATTGGG  ACGGTCAACC
1751 TCGAGGCTGG  AGACGTCGTG  GAGTACAAGT  ACATCAATGT  GGGCCAAGAT
1801 GGCTCCGTGA  CCTGGGAGAG  TGATCCCAAC  CACACTTACA  CGGTTCCCTG
1851 GGTGGCTTGT  GTGACGCAGG  TTGTCAAGGA  GGACACCTGG  CAGTCGTAA

```

FIG. 1B

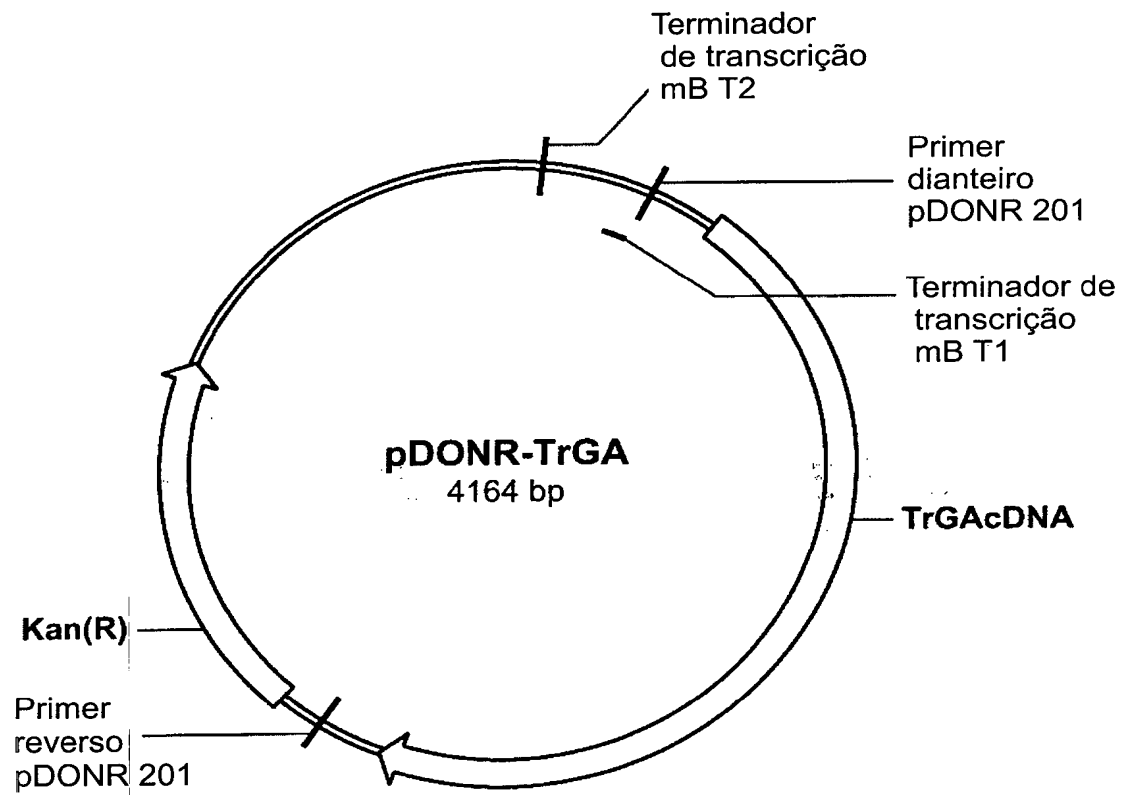
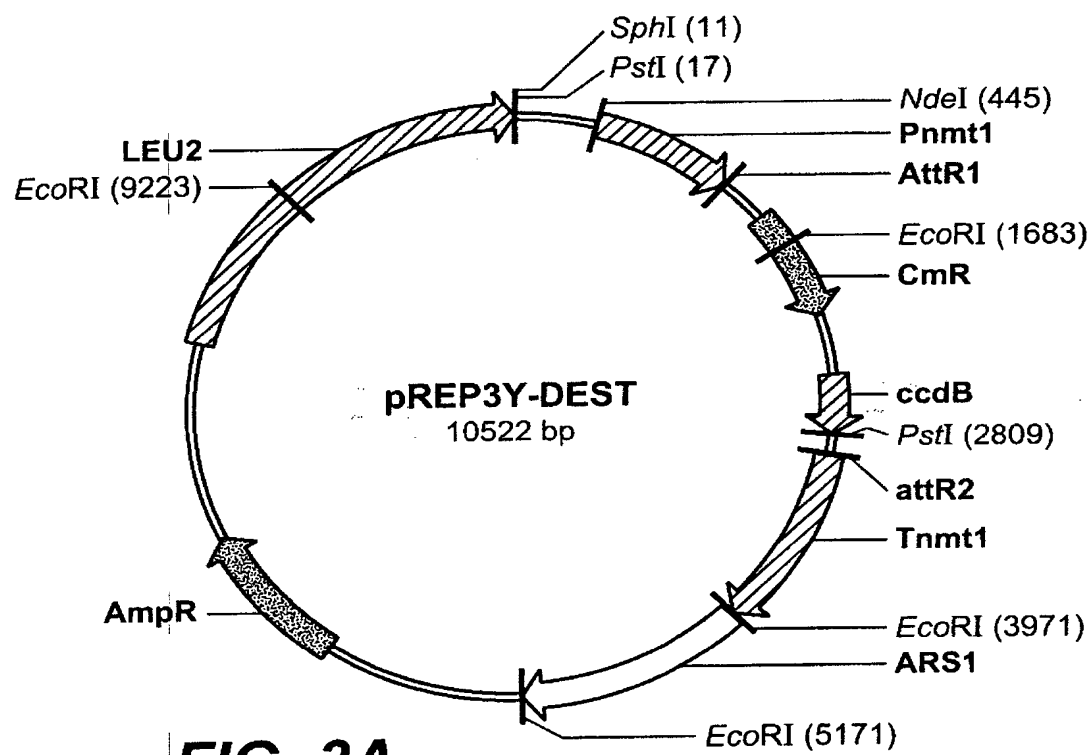
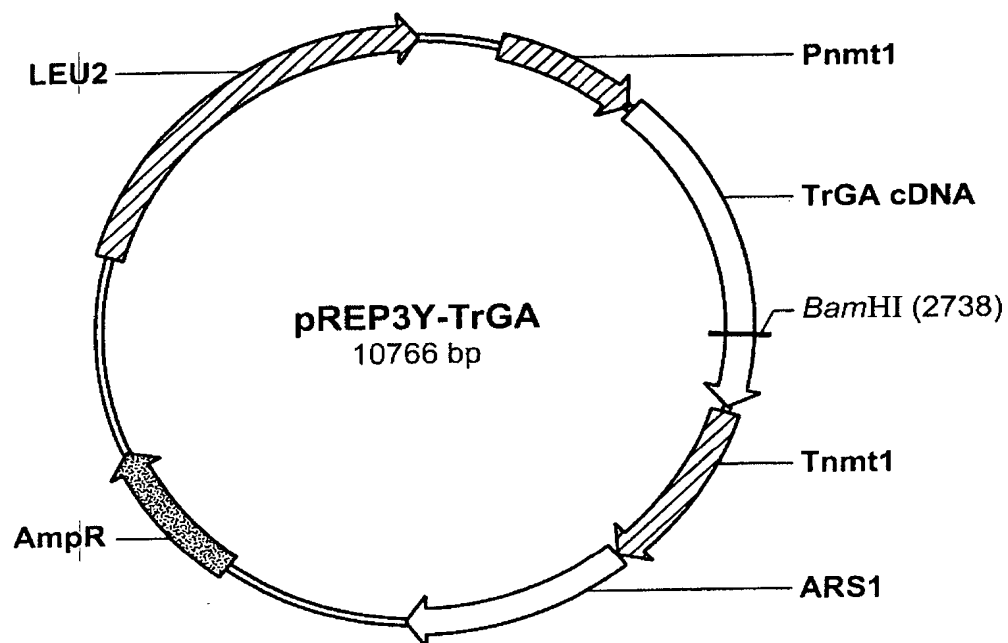


FIG. 2

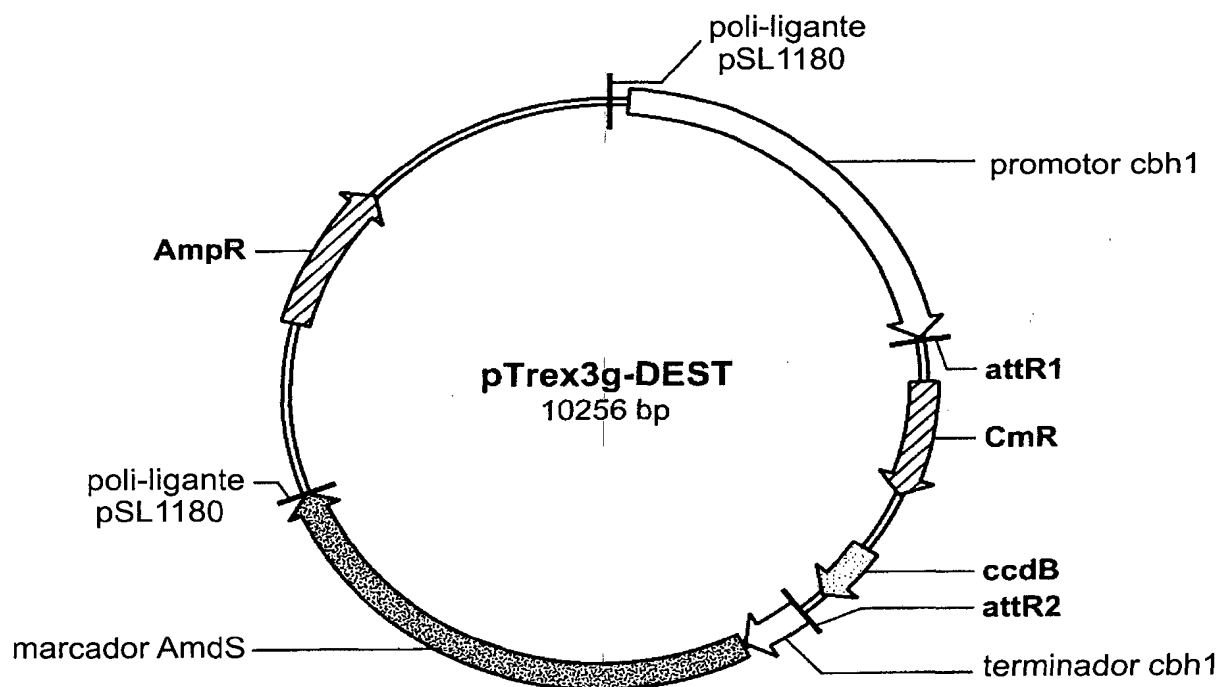
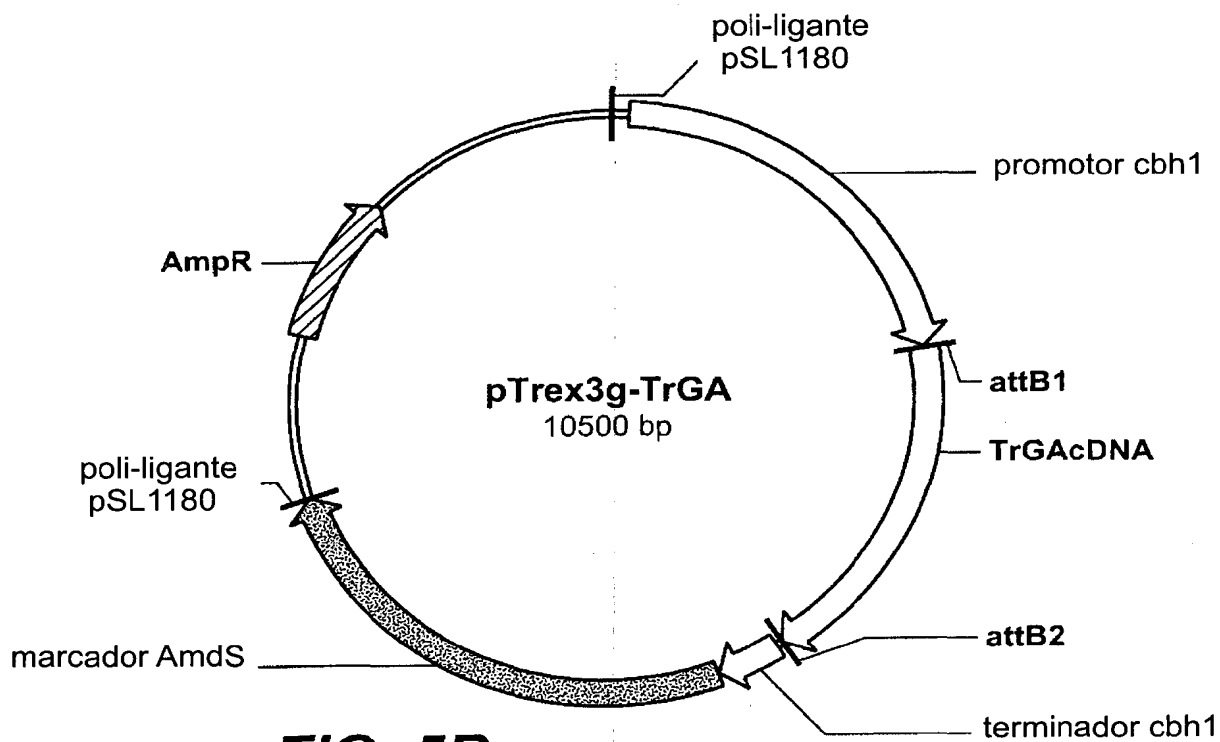
**FIG. 3A****FIG. 3B**

AaGA	(1)	-ATLDSWLSNEATVARTAILNNIGADGAWVSGADSGIVVASPSTDNPDYF
AnGA	(1)	-ATLDSWLSNEATVARTAILNNIGADGAWVSGADSGIVVASPSTDNPDYF
AoGA	(1)	QSDLNAFIEAQTPIAKQGYLNNIGADGKLVEGAAAGIVYASPSKSNPDYF
HgGA	(1)	-AAVDTFINTEKPIAWNKL LANIGPNGKAAPGAAAGVVIASPSRTDPPYF
HvGA	(1)	--SVDDFINTQTPIALNNLLCNVGPDCRAFGT SAGAVIASPSTTDPDY
TrGA	(1)	--SVDDFISTETPIALNNLLCNVGPDCRAFGT SAGAVIASPSTIDPDY
		* * * * *
AaGA	(50)	YTWTRDSGLVIKTLVDLFRNGDTD-LLSTIENYISSQAIVQGISNPSGDL
AnGA	(50)	YTWTRDSGLVLKTLVDLFRNGDTS-LLSTIENYISAQAIVQGISNPSGDL
AoGA	(51)	YTWTRDAGLTMEEYIEQFIGGDAT-LESTIQNYVDSQANEQAVSNPSGGL
HgGA	(50)	FTWTPDAALVLTGIIESLGHNYNT-----TLQQVSNPSGTF
HvGA	(49)	YMWTRDSALVFKNIVDRFTQQYDAGLQRRIEQYISAQVTLQGISNPSGSL
TrGA	(49)	YMWTRDSALVFKNLIDRFTETYDAGLQRRIEQYITAQVTLQGLSNPSGSL
		* * * * *
AaGA	(99)	SSGG-LGEPKFNVDETAYTGSWGRPQRDGPALRATAMIGFRQWLLDNGYT
AnGA	(99)	SSGAGLGEPKFNVDETAYTGSWGRPQRDGPALRATAMIGFGQWLLDNGYT
AoGA	(100)	SDGSGLAEPKFYYNISQFTDSWGRPQRDGPALRASALIAYGNSLISSDKQ
HgGA	(86)	ADGSGLGAEKFNVDLTAFTGEWGRPQRDGPPLRAIALIQYAKWLIANGYK
HvGA	(99)	SDGSGLGEPKFELTLSQFTGNWGRPQRDGPALRAIALIGYSKWLINNNYQ
TrGA	(99)	ADGSGLGEPKFELTLKPFTGNWGRPQRDGPALRAIALIGYSKWLINNNYQ
		* * * * *
AaGA	(148)	SAATEIIVWPLVRNDLSYVAQYWNQTGYDLWEEVNGSSFFTIAVQHRALVE
AnGA	(149)	STATDIWPLVRNDLSYVAQYWNQTGYDLWEEVNGSSFFTIAVQHRALVE
AoGA	(150)	SVVKANIWPIYQNDLSYVGQYWNQTGF DLWEEVQGSFFTIAVQHKALVE
HgGA	(136)	STAKSVVWPVKNDLAYTAQYWNQTGF DLWEEVPGSSFFTIASSHRA LTE
HvGA	(149)	STVSNIIWPIVRNDLNYVAQYWNQTGF DLWEEVNGSSFFTIVANQHRA LVE
TrGA	(149)	STVSNVIWPIVRNDLNYVAQYWNQTGF DLWEEVNGSSFFTIVANQHRA LVE
		* * * * *
AaGA	(198)	GSAFATAVGSSCSWCDSQAPQILCYLQSFWTG--EYILANFDSS--RSGK
AnGA	(199)	GSAFATAVGSSCSWCDSQAPEILCYLQSFWTG--SFILANFDSS--RSGK
AoGA	(200)	GDAFAKALGEECQACS-VAPQILCHLQDFWNG--SAVLNLPTNG-RSGL
HgGA	(186)	GAYLAAQLDTECPPCTTVAPQVLCFQQAFWNSKGNVYSTSTAGEYRSGK
HvGA	(199)	GATLAATLGQSGSTYSSVAPQILCFLQRFWVS-GGYIDSNINTNEGRTGK
TrGA	(199)	GATLAATLGQSGSAYSSVAPQVLCFLQRFWVSSGGYVDSNINTNEGRTGK
		* * * * *
AaGA	(244)	DTNTLLGSIHTFDPEAGCDDSTFQPCSPRALANHKEVVDSFRSIYTLNDG
AnGA	(245)	DANTLLGSIHTFDPEAACDDSTFQPCSPRALANHKEVVDSFRSIYTLNDG
AoGA	(246)	DTNSLLGSIHTFDPAACDDTTFQPCSSRALSNHKLVDVSFRSVYGINNG
HgGA	(236)	DANSILASIHNFDP EAGCDNLTFQPCSERALANH KAYVDSFRNLYA INKG
HvGA	(248)	DANSLLASIHNFDP SLGCDASTFQPCSDKALSNLKVVDVSFRSIYGVNKG
TrGA	(249)	DVNSVLTSIHNFDP NLGCDAGTFQPCSDKALSNLKVVDVSFRSIYGVNKG
		* * * * *

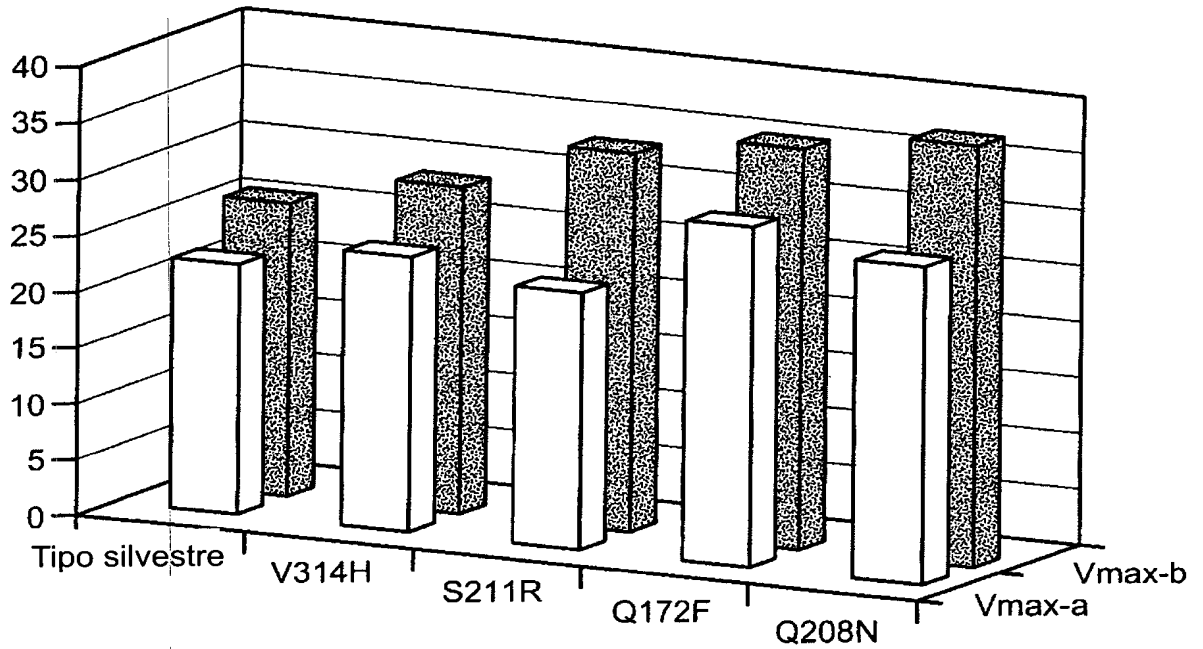
FIG. 4A

AaGA	(294)	LSDSEAVAVGRYPKDSYYNGNPWFLCTLAAAEQLYDALYQWDKQGSLEIT
AnGA	(295)	LSDSEAVAVGRYPEDTYYNGNPWFLCTLAAAEQLYDALYQWDKQGSLEVT
AoGA	(296)	RGAGKAAAVGPYAEDTYQCGNPWYLTTLVAAELLYDALYQWDKQGVNVT
HgGA	(286)	IAQGKAVAVGRYSEDVYYNGNPWYLANFAAAEQLYDAIYVWNKQGSITVT
HvGA	(298)	IPAGSAVAIGRYPEDVYFNGNPWYLATFAAAEQLYDSVYVWKKTGSIITVT
TrGA	(299)	IPAGAAVAIGRYAEDVYYNGNPWYLATFAAAEQLYDAIYVWKKTGSIITVT
		* * * * * * * * * * * * * * * *
AaGA	(344)	DVSLDFFQALYSDAATGTYSSTSSSTYSIIVDAVKTFADGFVSIVETHAAS
AnGA	(345)	DVSLDFFKALYSDAATGTYSSTSSSTYSIIVDAVKTFADGFVSIVETHAAS
AoGA	(346)	ETSLPFFKDLSSNVTTGSYAKSSSAYESLTSVVKTYADGFISVVQEYTPD
HgGA	(336)	SVSLPFFRDLVSSVSTGTYSKSSSTFTNIVNAVKAADGFIEVAAKYTPS
HvGA	(348)	STSSAFFQELVPGVAAGTYSSSQSTFTSIINAISTYADGFLSEAAKYVPA
TrGA	(349)	ATSLAFFQELVPGVTAGTYSSSSSTFTNIINAVSTYADGFLSEAAKYVPA
		* * * * * * * * * * * * * * * *
AaGA	(394)	NGSLSEQYDKSDGDELSARDLTWSYAALLTANNRRNSVMPPSWGETSAS-
AnGA	(395)	NGSMSEQYDKSDGEQLSARDLTWSYAALLTANNRRNSVVPASWGETSAS-
AoGA	(396)	GGALAEQYSRDQGTFVSASDLTWSYAFLSAVGRRNGTVPASWGSSTAN-
HgGA	(386)	NGALAEQYDRNTGKPDSAADLTWSYSAFLSAIDRRAGLVPPSWRASVAKS
HvGA	(398)	DGSLAEQFDRNTGTPLSAVHLTWSYASFLTAAARRAGVPPSWASSGAN-
TrGA	(399)	DGSLAEQFDRNSGTPLSALHLTWSYASFLTATARRAGIVPPSWANSSAS-
		* * * * * * * * * * * * * * * *
AaGA	(443)	SVPGTC
AnGA	(444)	SVPGTC
AoGA	(445)	AVPSQC
HgGA	(436)	QLPSTC
HvGA	(447)	TVPSSC
TrGA	(448)	TIPSTC
		* * *

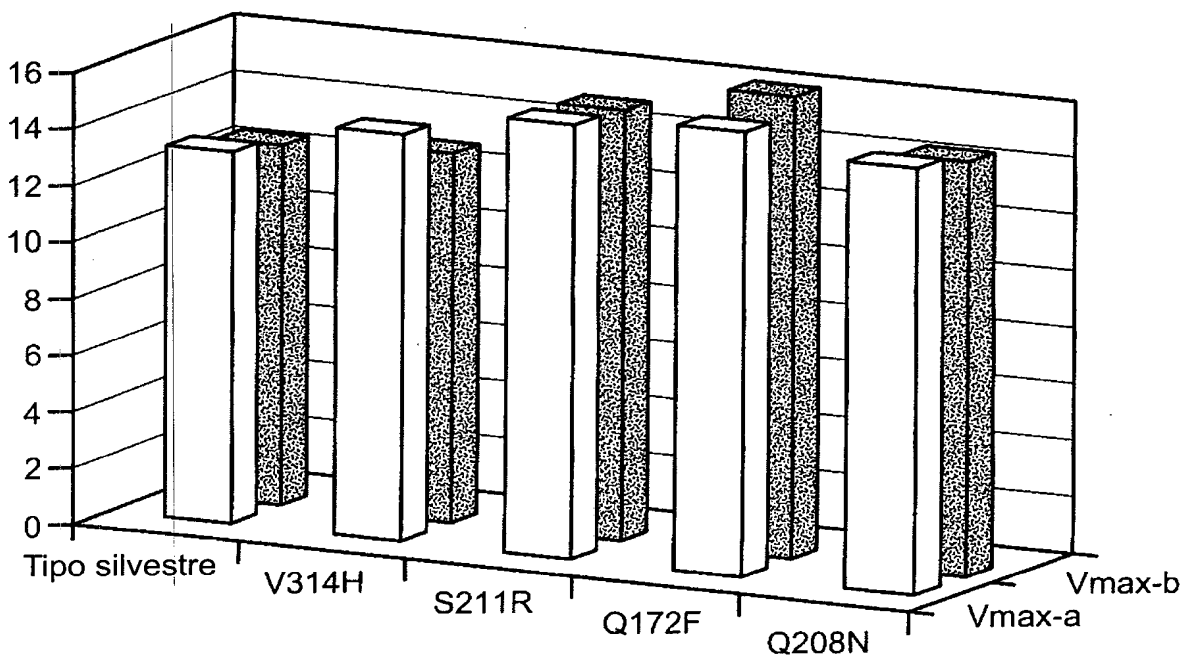
FIG. 4B

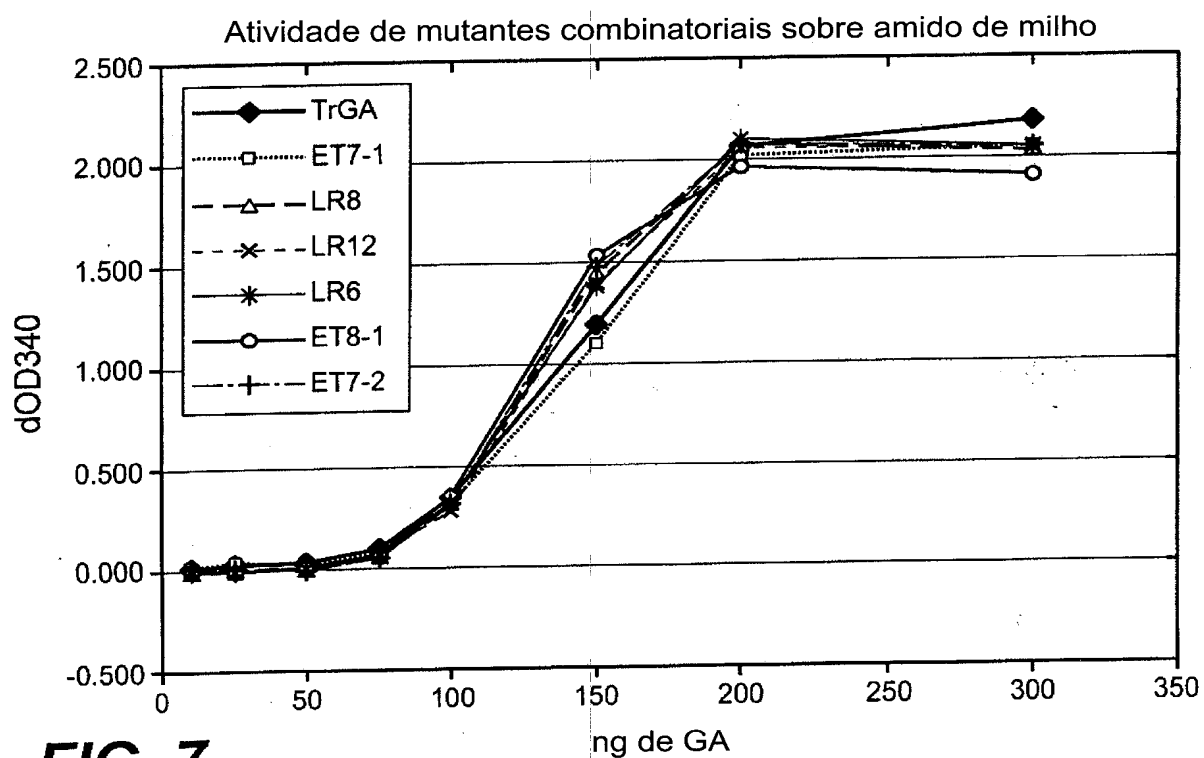
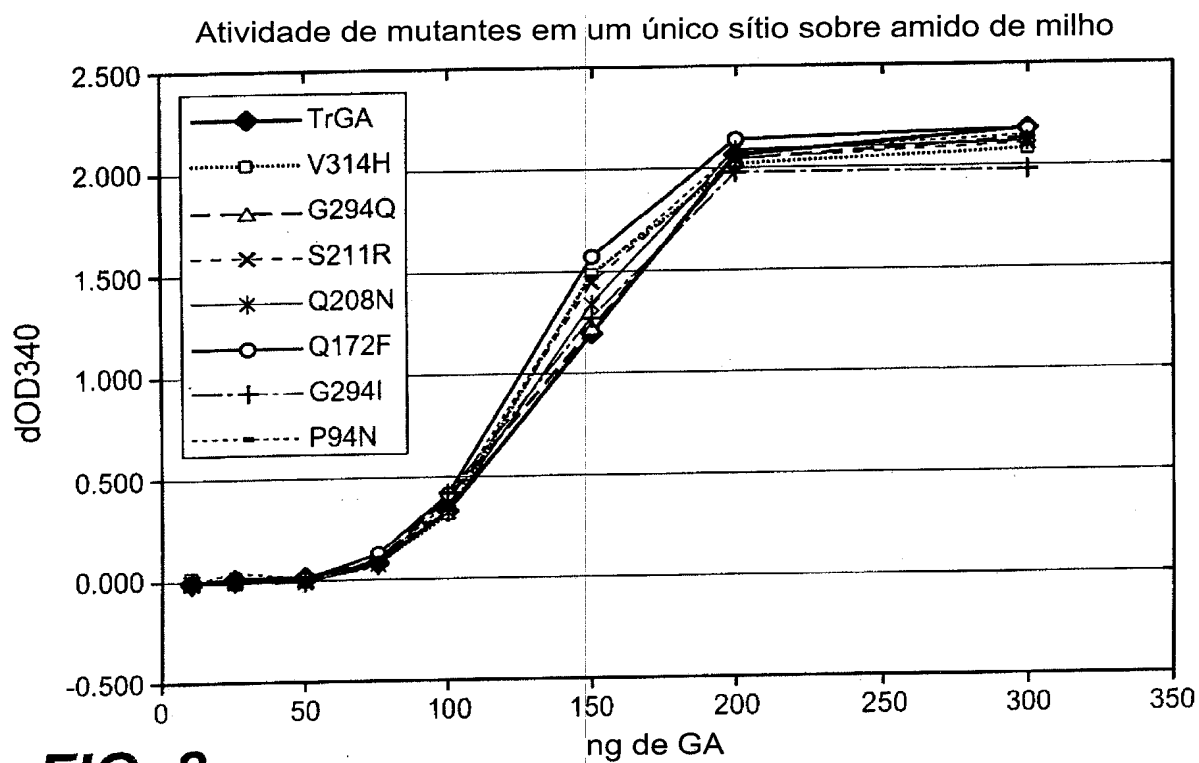
**FIG. 5A****FIG. 5B**

60C, comparações de Vmax

**FIG. 6A**

32C, comparações de Vmax

**FIG. 6B**

**FIG. 7****FIG. 8**

10/12

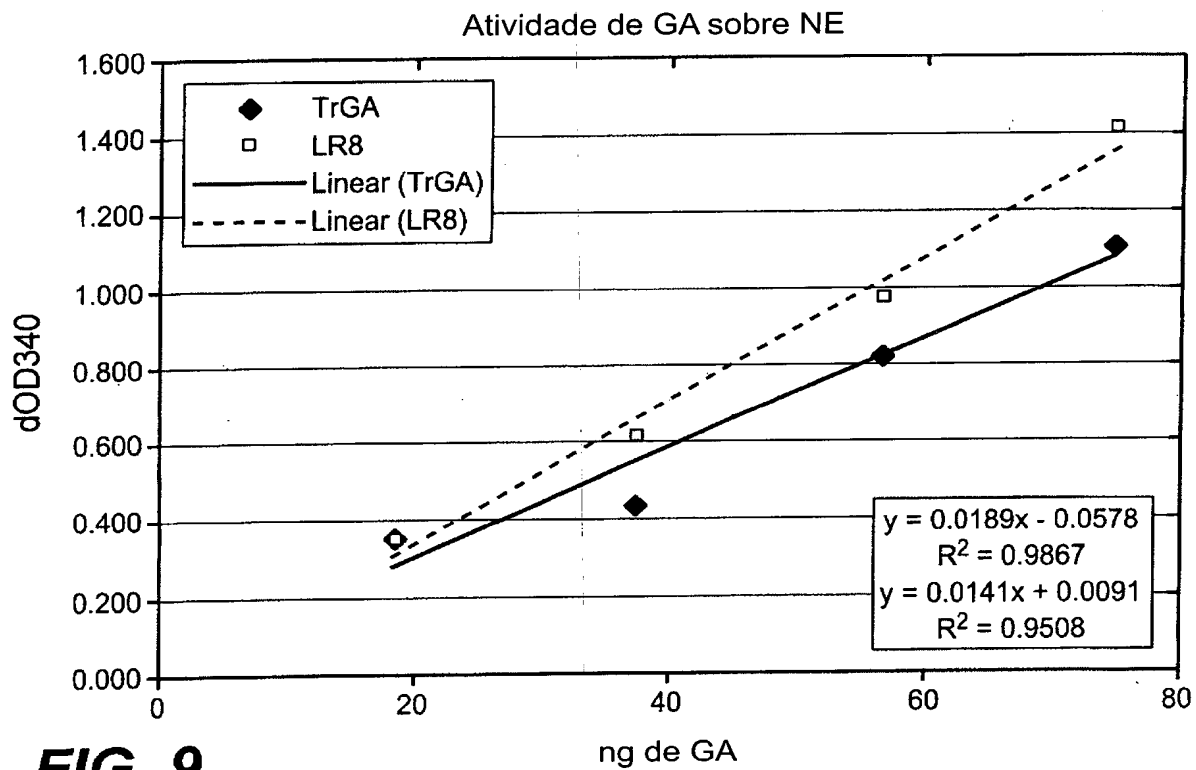


FIG. 9

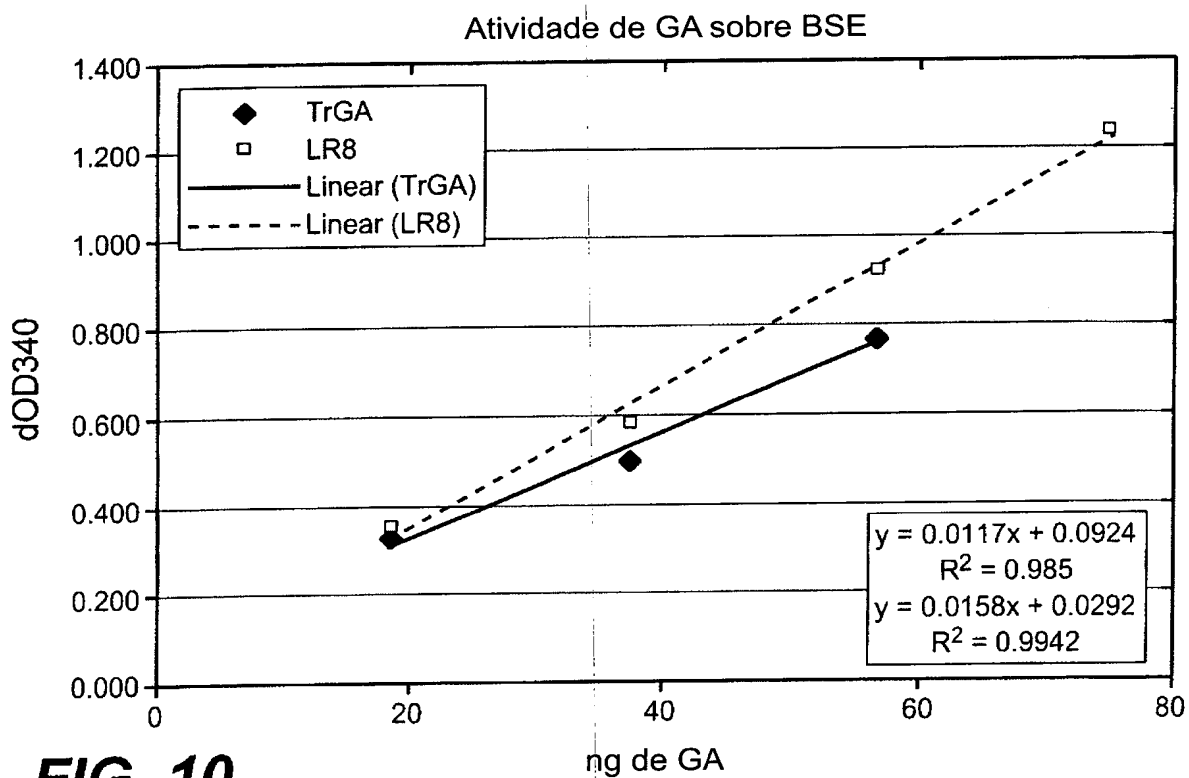
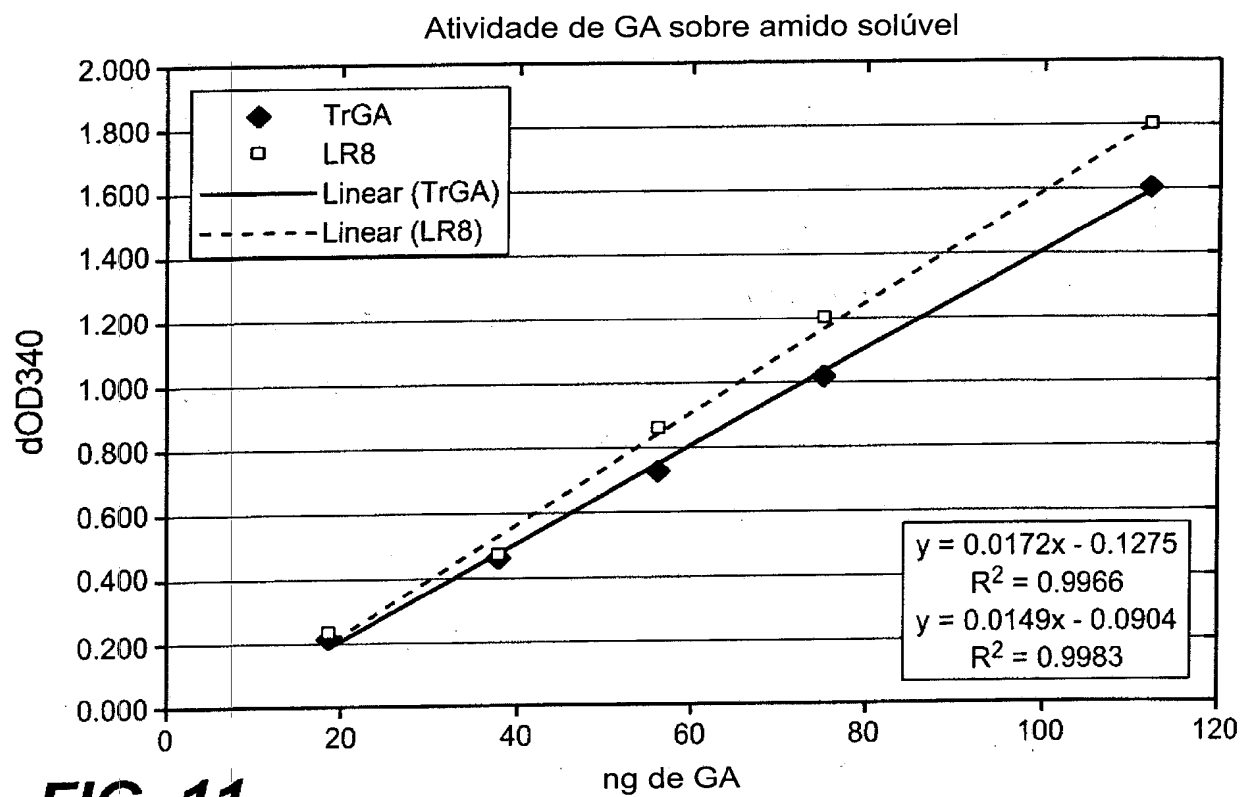


FIG. 10

**FIG. 11**

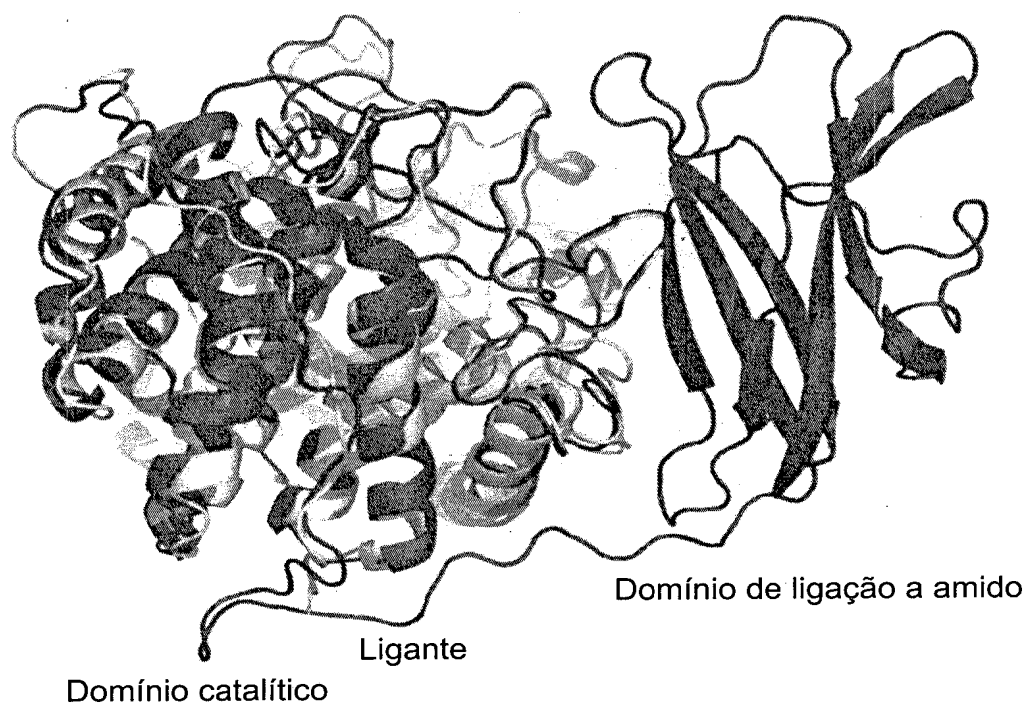


FIG. 12

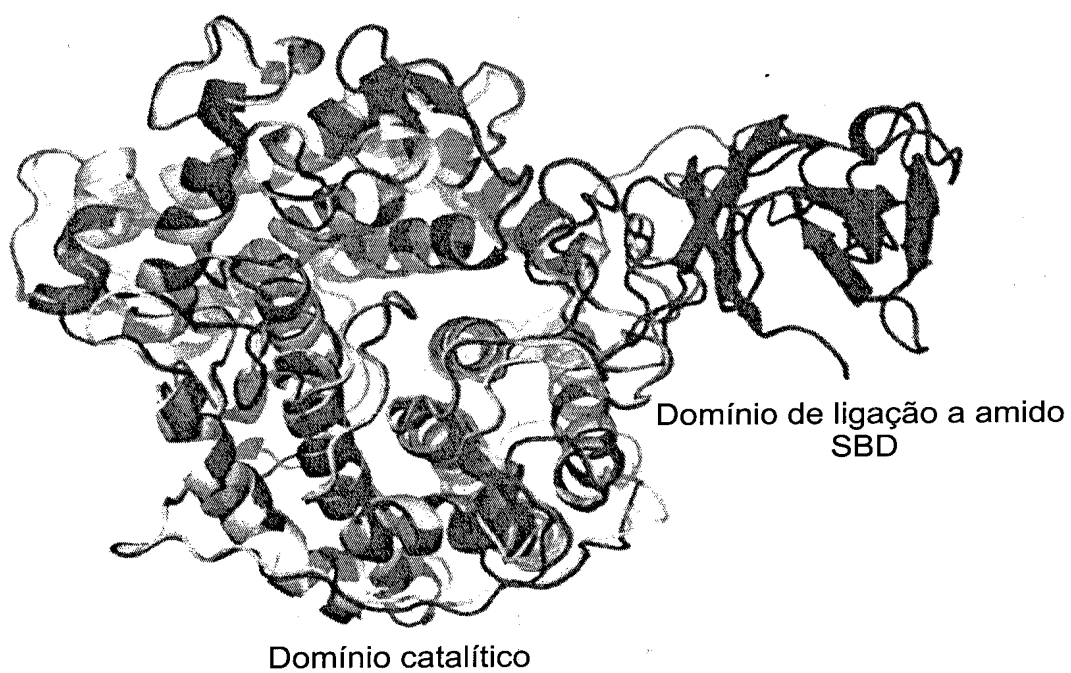


FIG. 13

RESUMO

Patente de Invenção: **"VARIANTES DE GLUCOAMILASE COM PROPRIEDADES ALTERADAS"**.

5 A presente invenção refere-se à variantes de uma glucoamilase precursora tendo propriedades alteradas (por exemplo, termoestabilidade e/ou atividade específica aperfeiçoada). Em particular, a presente invenção proporciona composições compreendendo as glucoamilases variantes, incluindo composições para hidrolise de amido, composições de ração para animais e composições de limpeza. A invenção também refere-se a constructos
10 de DNA que codificam as variantes e métodos de produção das variantes de glucoamilase em células hospedeiras.