



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 38 293 T2** 2009.03.12

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 064 360 B1**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 9/02** (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 38 293.9**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US99/06698**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 914 203.7**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1999/049019**

(86) PCT-Anmeldetag: **26.03.1999**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **30.09.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **03.01.2001**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **05.03.2008**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **12.03.2009**

(30) Unionspriorität:

79624 P	27.03.1998	US
89367 P	15.06.1998	US
102939 P	01.10.1998	US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

**Bryan, Bruce J., Beverly Hills, Calif., US; Prolume,
Ltd., Pinetop, Ariz., US**

(72) Erfinder:

**BRYAN, Bruce J., Beverly Hills, CA 90210, US;
SZENT-GYORGYI, Christopher, Pittsburgh, PA
15237, US**

(74) Vertreter:

**BEETZ & PARTNER Patentanwälte, 80538
München**

(54) Bezeichnung: **LUCIFERASE, GFP FLUORESCENZPROTEINE, KODIERENDE NUKLEINSAÜRE UND IHRE VER-
WENDUNG IN DER DIAGNOSE**

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

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

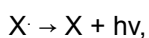
Beschreibung

GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft isolierte und gereinigte Nucleinsäuren und codierte Proteine aus der Gattung *Gaussia*. Genauer werden Nucleinsäuren bereitgestellt, die die Luciferase und die fluoreszierenden Proteine von Arten dieser Gattung codieren.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Lumineszenz ist ein Phänomen, bei dem Energie spezifisch in ein Molekül eingeschleust wird, um einen angeregten Zustand zu erzeugen. Die Rückkehr in einen niedrigeren Energiezustand wird von der Freisetzung eines Photons ($h\nu$) begleitet. Die Lumineszenz schließt die Fluoreszenz, die Phosphoreszenz, die Chemilumineszenz und die Biolumineszenz ein. Biolumineszenz ist der Vorgang, durch den lebende Organismen Licht emittieren, das für andere Organismen sichtbar ist. Die Lumineszenz kann folgendermaßen dargestellt werden:



worin X^* ein elektronisch angeregtes Molekül ist und $h\nu$ die Lichtemission bei der Rückkehr von X^* in einen niedrigeren Energiezustand darstellt. Wenn die Lumineszenz eine Biolumineszenz ist, stammt die Erzeugung des angeregten Zustands von einer enzymkatalysierten Reaktion. Die Farbe des in einer Biolumineszenzreaktion (oder Chemilumineszenz- oder sonstigen Lumineszenzreaktion) emittierten Lichts ist für das angeregte Molekül charakteristisch und unabhängig von der Anregungsquelle und der Temperatur.

[0003] Eine wesentliche Bedingung für Biolumineszenz ist die Verwendung von molekularem Sauerstoff, entweder gebunden oder frei in Gegenwart einer Luciferase. Luciferasen sind Oxygenasen, die auf ein Substrat, Luciferin, in Gegenwart von molekularem Sauerstoff einwirken und das Substrat in einen angeregten Zustand überführen. Bei der Rückkehr auf ein niedrigeres Energieniveau wird Energie in Form von Licht freigesetzt (für Überblicksartikel siehe z. B. McElroy et al. (1966) in *Molecular Architecture in Cell Physiology*, Hayashi et al., Hrsg., Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, NJ, S. 63–80; Ward et al., Kapitel 7 in *Chemical and Bioluminescence*, Burr, Hrsg., Marcel Dekker, Inc. NY, S. 321–358; Hastings, J. W. in (1995) *Cell Physiology: Source Book*, N. Sperelakis (Hrsg.), Academic Press, S. 665–681; *Luminescence, Narcosis and Life in the Deep Sea*, Johnson, Vantage Press, NY, siehe bes. S. 50–56).

[0004] Obwohl insgesamt selten, ist die Biolumineszenz in Meeresorganismen üblicher als in Erdorganismen. Die Biolumineszenz hat sich von nicht weniger als dreißig evolutionär verschiedenen Ursprüngen aus entwickelt und zeigt sich demnach in einer Vielzahl von Wegen, weshalb die biochemischen und physiologischen Mechanismen, die für die Biolumineszenz verantwortlich sind, in verschiedenen Organismen verschieden sind. Biolumineszierende Arten erstrecken sich über viele Gattungen und schließen mikroskopische Organismen, wie Bakterien (primär Meeresbakterien einschließlich *Vibrio*-Arten), Pilze, Algen und Dinoflagellaten, Meeresorganismen, einschließlich Arthropoden, Mollusken, Echinodermata und Chordatiere und Erdorganismen, einschließlich Ringelwürmer und Insekten, ein.

Assays unter Einsatz der Biolumineszenz

[0005] Im Laufe der letzten zwanzig Jahre haben hochempfindliche biochemische Assays, die in der Forschung und in der Medizin verwendet werden, zunehmend die Lumineszenz und die Fluoreszenz anstelle von Radioisotopen eingesetzt. Dieser Wandel wurde teilweise durch die steigenden Kosten für die Entsorgung der Radioisotope und teilweise durch den Bedarf an der Entwicklung schnellerer und bequemerer Assayverfahren angetrieben. In letzter Zeit hat der Bedarf an der Durchführung biochemischer Assays *in situ* in lebenden Zellen und in unversehrten Tieren die Forscher in Richtung Lumineszenz und Fluoreszenz auf Proteinbasis gelenkt. Die Verwendung der Leuchtkäfer-Luciferase für ATP-Assays, von Aequorin und Obelin als Calcium-Reporter, Vargula-Luciferase als neurophysiologischer Indikator und des grün fluoreszierenden Proteins von *Aequorea* als Protein-Tracer und pH-Indikator zeigen das Potential der Verfahren auf Biolumineszenzbasis in den Forschungslabors.

[0006] Die Biolumineszenz fängt auch an, einen direkten Einfluss auf die Medizin und die Biotechnologie zu

haben; beispielsweise wird das Aequorea-GFP für die Markierung von Zellen in murinen Modellsystemen und als Reporter bei der Durchmusterung von Arzneimitteln mit hohem Durchsatz eingesetzt. Die Renilla-Luciferase befindet sich in der Entwicklung für die Verwendung in diagnostischen Programmen.

Biolumineszenz-erzeugende Systeme

[0007] Die Biolumineszenz wird wie andere Typen der Chemilumineszenz für die quantitative Bestimmung bestimmter Substanzen in der Biologie und der Medizin verwendet. Beispielsweise sind Luciferase-Gene kloniert und als Reportergene in zahlreichen Assays für vielfältige Zwecke verwendet worden. Da die verschiedenen Luciferase-Systeme verschiedene spezielle Anforderungen stellen, können sie verwendet werden, um eine Vielzahl von Substanzen nachzuweisen und zu quantifizieren. Die Mehrheit der kommerziellen Biolumineszenzanwendungen basieren auf der Leuchtkäfer-Luciferase (*Photinus pyralis*). Einer der ersten und immer noch weit verbreitet verwendeten Assays schließt die Verwendung der Leuchtkäfer-Luciferase für den Nachweis des Vorhandenseins von ATP ein. Er wird auch für den Nachweis und die Quantifizierung anderer Substrate oder Cofaktoren in der Reaktion verwendet. Jede beliebige Reaktion, die NAD(H), NADP(H) oder ein langkettiges Aldehyd entweder direkt oder indirekt erzeugt oder verwendet, kann an die lichtemittierende Reaktion einer bakteriellen Luciferase gekoppelt werden.

[0008] Ein anderes Luciferase-System, das kommerziell für analytische Zwecke verwendet worden ist, ist das Aequorin-System. Das gereinigte Photoprotein Aequorin der Qualle wird verwendet, um intrazelluläres Ca^{2+} und seine Veränderungen unter verschiedenen experimentellen Bedingungen nachzuweisen und zu quantifizieren. Das Aequorin-Photoprotein ist relativ klein [~ 20 kDa], nicht toxisch und kann in Zellen in Mengen injiziert werden, die für den Nachweis von Calcium über einen großen Konzentrationsbereich (3×10^{-7} bis 10^{-4} M) geeignet sind.

[0009] Wegen ihrer analytischen Brauchbarkeit sind Luciferasen und Substrate untersucht und gut charakterisiert worden und im Handel erhältlich (z. B. ist Leuchtkäfer-Luciferase von Sigma, St. Louis, MO, und Boehringer Mannheim, Biochemicals, Indianapolis, IN erhältlich; rekombinant erzeugte Leuchtkäfer-Luciferase und andere Reagenzien auf der Basis dieses Gens oder zur Verwendung mit diesem Protein sind von Promega Corporation, Madison, WI, erhältlich; die Aequorin-Photoprotein-Luciferase der Qualle und die Luciferase von Renilla sind im Handel von Sealite Sciences, Bogart, GA, erhältlich; Coelenterazin, das natürlich vorkommende Substrat für diese Luciferasen, ist von Molecular Probes, Eugene, OR erhältlich). Diese Luciferasen und ähnliche Reagenzien werden als Reagenzien für die Diagnostik, die Qualitätskontrolle, Umweltuntersuchungen und andere derartige Analysen verwendet.

[0010] Wegen der Brauchbarkeit der Luciferasen als Reagenzien in analytischen Systemen und wegen ihres Potenzials für die Verwendung in Durchmusterungssystemen mit hohem Durchsatz gibt es einen Bedarf an dem Nachweis und der Isolierung einer Vielzahl von Luciferasen, die verbesserte oder andere spektrale Eigenschaften haben, verglichen mit denjenigen, die derzeit verfügbar sind. Aus all diesen Gründen wäre es vorteilhaft, Luciferasen von einer Vielzahl von Arten, wie von *Gussia* und von verschiedenen Renilla-Arten zur Verfügung zu haben.

Fluoreszierende Proteine

[0011] Reportergene liefern, wenn sie mit einem interessierenden Gen in Empfängerzellen cotransfiziert werden, ein Mittel für den Nachweis der Transfektion und anderer Ereignisse. Zu den Reportergenen gehören die Gene, die fluoreszierende Proteine codieren. Die Biolumineszenz-erzeugenden Systeme, die hier beschrieben werden, gehören zu denjenigen, die als Reportergene verwendet werden. Zur Erhöhung der Empfindlichkeit wurden Biolumineszenz-erzeugende Systeme mit fluoreszierenden Verbindungen und Proteinen, wie natürlich fluoreszierenden Phycobili-Proteinen, kombiniert. Ebenfalls interessant sind die fluoreszierenden Proteine, die in einer Vielzahl von wirbellosen Meerestieren vorkommen, wie die grün und blau fluoreszierenden Proteine, vor allem das grün fluoreszierende Protein (GFP) von *Aequorea victoria*.

[0012] Die grün fluoreszierenden Proteine (GFP) bilden eine Klasse von Chromoproteinen, die nur bei bestimmten biolumineszierenden Hohltieren (Coelenterata) gefunden werden. Diese akzessorischen Proteine fluoreszieren und haben in diesen Organismen die Funktion des Moleküls, das schlussendlich die Biolumineszenz emittiert, indem sie Energie vom enzymgebundenen Oxyluciferin im angeregten Zustand aufnehmen (siehe z. B. Ward et al. (1979) *J. Biol. Chem.* 254: 781–788; Ward et al. (1978) *Photochem. Photobiol.* 27: 389–396; Ward et al. (1982) *Biochemistry* 21: 4535–4540).

[0013] Die am besten charakterisierten GFPs sind diejenigen, die von den Quallenarten *Aequorea* isoliert werden, vor allem von *Aequorea victoria* (*A. victoria*) und *Aequorea forskålea* (Ward et al. 1982) *Biochemistry* 21: 4535–4540; Prendergast et al. (1978) *Biochemistry* 17: 3448–3453). Gereinigtes *A. victoria*-GFP ist ein monomeres Protein von etwa 27 kDa, das blaues Licht mit einem Maximum der Anregungswellenlänge bei 395 nm mit einem kleineren Peak bei 470 nm absorbiert und grüne Fluoreszenz mit einer Emissionswellenlänge von etwa 510 nm und einem kleineren Peak nahe 540 nm emittiert (Ward et al. (1979) *Photochem. Photobiol. Rev* 4: 1–57). Dieses GFP hat bestimmte Einschränkungen. Das Anregungsmaximum des Wildtyp-GFPs liegt nicht innerhalb des Wellenlängenbereichs von Standard-Fluorescein-Nachweisoptiken.

[0014] Für den Nachweis der grünen Fluoreszenz werden keine exogenen Substrate oder Cofaktoren benötigt. Stattdessen resultiert das hohe Niveau der Fluoreszenz von dem intrinsischen Chromophor des Proteins. Der Chromophor schließt modifizierte Aminosäurereste innerhalb der Polypeptidkette ein. Der fluoreszierende Chromophor des GFPs von *A. victoria*-GFP wird beispielsweise durch die Hexapeptidsequenz FSYGVQ codiert, die die Aminosäurereste 64–69 umfasst. Der Chromophor wird durch die intrazelluläre Cyclisierung des Polypeptidrückgrats bei den Resten Ser65 und Gly67 und die Oxidation der α,β -Bindung des Restes Tyr66 gebildet (siehe z. B. Cody et al. (1993) *Biochemistry* 32: 1212–1218; Shimomura (1978) *FEBS Letters* 104: 220–222; Ward et al. (1989) *Photochem. Photobiol.* 49: 62S). Das Emissionsspektrum des isolierten Chromophors und des denaturierten Proteins bei neutralem pH stimmen nicht mit dem Spektrum des nativen Proteins überein, was darauf hindeutet, dass die Chromophorbildung nach der Translation stattfindet (siehe z. B. Cody et al. (1993) *Biochemistry* 32: 1212–1218).

[0015] Zusätzlich ist die Kristallstruktur von gereinigtem *A. victoria*-GFP bestimmt worden (siehe z. B. Ormö (1996) *Science* 273: 1392–1395). Das vorherrschende Strukturmerkmal des Proteins ist eine 11-strängige β -Can (β -Barrel), die einen nahezu perfekten Zylinder bildet, der eine einzelne zentrale α -Helix einhüllt, die den modifizierte *p*-Hydroxybenzylidenimidaxolidinon-Chromophor enthält. Der Chromophor ist zentral innerhalb der β -Can-Struktur angeordnet und wird vollständig vor einem Kontakt mit dem Volumenlösemittel abgeschirmt.

[0016] Eine DNA, die einen Isotyp des *A. victoria*-GFPs codiert, ist isoliert worden, und ihre Nucleotidsequenz ist bestimmt worden (siehe z. B. Prasher (1992) *Gene* 111: 229–233). Die cDNA von *A. victoria* enthält einen offenen Leserahmen aus 714 Nucleotiden, der ein Polypeptid aus 238 Aminosäuren mit einem berechneten Mr von 26888 Da codiert. Rekombinant exprimierte *A. victoria*-GFPs behalten ihre Fähigkeit zu fluoreszieren *in vivo* in einer großen Vielzahl von Organismen, eingeschlossen Bakterien (siehe z. B. Chalfie et al. (1994) *Science* 263: 802–805; Miller et al. (1997) *Gene* 191: 149–153), Hefe und Pilze (Fey et al. (1995) *Gene* 165: 127–130; Straight et al. (1996) *Curr. Biol.* 6: 1599–1608; Cormack et al. (1997) *Microbiology* 143: 303–311), *Drosophila* (siehe z. B. Wang et al. (1994) *Nature* 369: 400–403; Plautz (1996) *Gene* 173: 83–87), Pflanzen (Heinlein et al. (1995); Casper et al. (1996) *Gene* 173: 69–73), Fische (Amsterdam et al. (1995)), und Säugetiere (Ikawa et al. 1995). *Aequorea*-GFP-Vektoren und isolierte *Aequorea*-GFP-Proteine sind als Marker für die Messung der Genexpression, der Zellwanderung und -Lokalisierung, der Bildung von Mikrotubuli und des Aufbaus funktionsfähiger Innenkanäle verwendet worden (siehe z. B. Terry et al. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 217: 21–27; Kain et al. (1995) *Biotechniques* 19: 650–655). Das *A. victoria*-GFP ist jedoch nicht ideal für die Verwendung in analytischen und diagnostischen Verfahren. Folglich sind GFP-Mutanten in der Hoffnung ausgewählt worden, dass Mutanten identifiziert werden, die einen einzelnen spektralen Anregungspeak aufweisen, der rotverschoben ist.

[0017] Tatsächlich bestand ein dargelegter Zweck bei der Konstruktion derartiger Mutanten darin, zu versuchen, das *A. victoria*-GFP ähnlicher dem GFP von *Renilla* zu machen, das bislang nicht kloniert wurde, das aber Eigenschaften aufweist, die es wesentlich idealer für die Verwendung als analytisches Werkzeug machen. Bei vielen praktischen Anwendungen wäre das Spektrum des *Renilla*-GFP dem Spektrum des *Aequorea*-GFPs gegenüber bevorzugt, weil die Wellenlängenunterscheidung zwischen verschiedenen Fluorophoren und der Nachweis des Resonanzenergietransfers einfacher sind, wenn die Komponentenspektren hoch und schmal und nicht niedrig und breit sind (siehe U.S.-Patent Nr. 5,625,048). Weiterhin ist der langwelligere Anregungspeak (475 nm) des *Renilla*-GFPs nahezu ideal für Fluorescein-Filtersätze, und er ist widerstandsfähig gegenüber einem Photobleichen, hat aber eine geringere Amplitude als der kurzwelligere Peak bei 395 nm, der mehr zu einem Photobleichen neigt (Chalfie et al. (1994) *Science* 263: 802–805).

[0018] Es gibt ein phylogenetisch mannigfaltiges und weitgehend unerforschtes Repertoire an biolumineszierenden Proteinen, die ein Reservoir für die zukünftige Entwicklung darstellen. Viele von ihnen, wie die Nucleinsäuren, die *Renilla*-GFPs codieren, haben dies jedoch nicht, trotz konzentrierter Bemühungen, so zu tun.

[0019] Aus diesen Gründen wäre es wünschenswert, eine Vielzahl neuer Luciferasen und fluoreszierender Proteine, vor allem Renilla-GFP, zur Verfügung zu haben, statt mutierte Proteine von *A. victoria*-GFP zu verwenden. Es ist noch nicht möglich gewesen, das Gen zu klonieren, das ein beliebiges der Renilla-GFPs codiert. Es wäre auch wünschenswert, eine Vielzahl von GFPs und Luciferasen zur Verfügung zu haben, um die Systeme für spezielle Anwendungen zu optimieren und um existierende Verfahren zu verbessern. Es ist hier daher eine Aufgabe, isolierte Nucleinsäuren, die bislang nicht verfügbare Luciferasen codieren, und das dadurch codierte Protein bereitzustellen. Es ist eine weitere Aufgabe, Biolumineszenz-erzeugende Systeme bereitzustellen, die die Luciferasen, Luciferine einschließen und die auch GFPs einschließen.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0020] Isolierte Nucleinsäuren, die Luciferasen codieren, werden bereitgestellt.

[0021] Nucleinsäuremoleküle, die die Luciferase einer *Gaussia*-Art codieren, werden bereitgestellt. Nucleinsäuresonden, die davon abgeleitet werden, werden ebenfalls bereitgestellt. Funktionell äquivalente Nucleinsäuren, wie diejenigen, die unter hohen Stringenzbedingungen mit den offenbarten Molekülen hybridisieren, werden ebenfalls betrachtet.

[0022] Bereitgestellt werden Wirtszellen, eingeschlossen bakterielle Wirtszellen, Hefe- und Säugetierwirtszellen, und Plasmide für die Expression der Nucleinsäuren, die die Luciferase codieren und Kombinationen der Luciferase und von GFPs, werden ebenfalls in diesen Wirten bereitgestellt. Die Gene können durch die Substitution von Codons, die für die Expression in ausgewählten Wirtszellen oder Wirten, wie Menschen und anderen Säugetieren, optimiert sind, modifiziert werden, oder sie können einer Mutagenese unterzogen werden, um die Emissionseigenschaften zu verändern.

[0023] Es wird darauf hingewiesen, dass die *Gaussia*-Luciferase Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist, während die Renilla mulleri-Luciferase und die Pleuromamma-Luciferase sowie das Renilla-GFP und das Ptilosarcus-GFP nur als Vergleichsbeispiele offenbart werden.

Luciferasen

[0024] Isolierte Nucleinsäuren, die Luciferasen von *Gaussia* codieren, werden hier bereitgestellt. Es werden vor allem Nucleinsäurefragmente, die die *Gaussia princeps*-Luciferase codieren, und Nucleinsäuresonden, die davon abgeleitet sind, bereitgestellt. In einer besonderen Ausführungsform wird die Luciferase durch die Nucleotidsequenz codiert, die in SEQ ID NO: 19 offenbart wird. Weiterhin werden Nucleinsäuremoleküle bereitgestellt, die unter mittlerer oder hoher Stringenz mit der Nucleotidsequenz hybridisieren, die in SEQ ID NO: 19 offenbart wird, vor allem wenn die Sonden verwendet werden, die hier bereitgestellt werden. Sonden, die von dieser Nucleinsäure abgeleitet werden, die in den hier beschriebenen Verfahren verwendet werden können, um Luciferasen aus beliebigen *Gaussia*-Arten zu isolieren, werden beschrieben. In einer beispielhaften Ausführungsform wird die Nucleinsäure, die die Luciferase von *Gaussia princeps* codiert, bereitgestellt. Diese Nucleinsäure codiert die Aminosäuresequenz, die in SEQ ID NO: 20 offenbart wird.

[0025] Expressionsvektoren, die DNA enthalten, die eine *Gaussia*-Luciferase codiert, die in funktionsfähiger Kombination mit einem Promotorelement verbunden ist, das die konstitutive oder induzierbare Expression der Luciferase ermöglicht, werden bereitgestellt. In bevorzugten Ausführungsformen sind die Vektoren imstande, die Renilla mulleri-Luciferase in einer großen Vielzahl von Wirtszellen zu exprimieren. Vektoren für die Erzeugung chimärer Renilla mulleri-Luciferase-Fusionsproteine, vorzugsweise chimärer Antikörper-Luciferase- oder Acetylcholinesterase-Fusionsproteine, die ein Promotorelement und eine multiple Klonierungsstelle enthalten, die stromaufwärts oder stromabwärts der DNA, die die Renilla mulleri-Luciferase codiert, angeordnet ist, werden ebenfalls bereitgestellt.

[0026] Rekombinante Zellen, die eine heterologe Nucleinsäure enthalten, die eine *Gaussia*-Luciferase codiert, werden ebenfalls bereitgestellt. Gereinigte *Gaussia*-Luciferasen und Zusammensetzungen, die eine *Gaussia*-Luciferase allein oder in Kombination mit anderen Komponenten eines Biolumineszenz-erzeugenden Systems, wie einem grün fluoreszierenden Protein von Renilla, enthalten, werden bereitgestellt. Die *Gaussia*-Luciferase kann beispielsweise verwendet werden, um für die Fluoreszenzbeleuchtung von eine Novität darstellenden Gegenständen oder Artikeln (im Folgenden kurz "Novitäten") zu sorgen, oder sie kann in Verfahren zum Nachweisen und Sichtbarmachen von neoplastischem Gewebe und anderer Gewebe, für den Nachweis infektiöser Stoffe unter Verwendung von Immunoassays, wie homogener Immunoassays und in vitro-Durchmusterungsassays auf Fluoreszenzbasis unter Verwendung von Multivertiefungen-Assayvorrichtungen

gen, verwendet werden; oder sie kann in Kits für die Durchführung all dieser beschriebenen Verfahren bereitgestellt werden. Die Gaussia-Luciferase kann vor allem in Verbindung mit geeigneten fluoreszierenden Proteinen in Assays verwendet werden, die hier bereitgestellt werden.

[0027] Verfahren, die die Sonden für die Isolierung und die Klonierung von Luciferase-codierender DNA in Gaussia verwenden, werden ebenfalls bereitgestellt. In bevorzugten Ausführungsformen sind die Nucleinsäuresonden entartete Sonden aus mindestens 14 Nucleotiden, vorzugsweise 16 bis 30 Nucleotiden, die auf den Aminosäuren basieren, die in SEQ ID NO: 19 offenbart werden.

[0028] Vektoren, die DNA enthalten, die eine Gaussia-Luciferase codiert, werden bereitgestellt. Es werden vor allem Expressionsvektoren bereitgestellt, die DNA enthalten, die die Luciferase codiert und die in funktionsfähiger Kombination mit einem Promotorelement verbunden ist, das die konstitutive oder induzierbare Expression der Luciferase ermöglicht. In bevorzugten Ausführungsformen sind die Vektoren imstande, die Luciferase in einer großen Vielfalt von Wirtszellen zu exprimieren. Vektoren für die Erzeugung von chimären Luciferase-Fusionsproteinen (siehe z. B. U.S.-Patent Nr. 5,464,745, das die Verwendung von proteinbindenden Domänen beschreibt; siehe SEQ ID NO: 21 und 22, die die Sequenzen eines Fusionsproteins aus einer Cellulose-Bindungsdomäne und Luciferase offenbaren; und die in den [Fig. 1](#) und [Fig. 2](#) dargestellt sind), die ein Promotorelement und eine multiple Klonierungsstelle, die stromaufwärts oder stromabwärts der DNA angeordnet ist, die die Gaussia-Luciferase codiert, werden ebenfalls bereitgestellt. In einer besonderen Ausführungsform ist die DNA, die die Luciferase codiert, mit DNA, die den N-terminalen Teilbereich der Cellulose-Bindungsdomäne codiert (CBD_{clos}; siehe SEQ ID NO: 21 und 22) in einem PET-Vektor verbunden (Novagen; siehe U.S.-Patente Nr. 5,719,044 und 5,738,984, 5,670,623 und 5,496,934 und den Novagen-Katalog; vollständige Sequenzen von jedem PET-Vektor werden mit dem Kauf des Vektors bereitgestellt).

[0029] Fusionen der Nucleinsäure, vor allem von DNA, die eine Gaussia-Luciferase codiert, mit DNA, die ein GFP oder ein Phycobili-Protein codiert, werden hier ebenfalls bereitgestellt. In diesen Fusionen kann die die Luciferase und das GFP codierende DNA zusammenhängend sein oder durch ein Abstandshalterpeptid getrennt sein. Die Fusionen werden verwendet, um Fusionsproteine herzustellen, die auf Grund der Wechselwirkung in dem von der Luciferase und dem GFP gebildeten Paar eine Vielzahl von einzigartigen analytischen Anwendungen haben. Die Wechselwirkung wird durch das Emissionsspektrum des Luciferase-GFP-Proteinpaares in Gegenwart eines Luciferins und geeigneter Bindungsfaktoren beurteilt.

[0030] Rekombinante Wirtszellen, die eine heterologe Nucleinsäure enthalten, die eine Gaussia-Luciferase codiert, werden bereitgestellt. In bestimmten Ausführungsformen werden die rekombinanten Zellen, die die heterologe DNA enthalten, die die Luciferase codiert, durch die Transfektion mit DNA, die eine Luciferase codiert, oder durch das Einschleusen von RNA-Transkripten von DNA, die das Protein codiert, erzeugt. Die DNA kann als ein lineares DNA-Fragment eingeführt werden, oder sie kann in einen Expressionsvektor für die stabile oder transiente Expression der codierenden DNA eingeschlossen werden.

[0031] Die Zellen, die eine funktionsfähige Luciferase exprimieren, können allein oder in Verbindung mit einem Biolumineszenz-erzeugenden System in Assays auf Zellbasis und in Durchmusterungsverfahren verwendet werden, wie denjenigen, die hier beschrieben werden. Derzeit bevorzugte Wirtszellen für die Expression der Luciferase sind Bakterien, Hefen, Pilze, Pflanzenzellen, Insektenzellen und Tierzellen.

[0032] Gereinigte Gaussia-Luciferase wird bereitgestellt. Diese Luciferase wird vorzugsweise durch die Expression der Nucleinsäure, die hier bereitgestellt wird, in prokaryotischen oder eukaryotischen Zellen, die die Nucleinsäure enthalten, die das Luciferaseprotein codiert, und das Isolieren des exprimierten Proteins erhalten.

[0033] Zusammensetzungen, die die Luciferase enthalten, werden bereitgestellt. Die Zusammensetzungen können eine beliebige Form aus einer Anzahl von Formen in Abhängigkeit von dem Verfahren, das für deren Anwendung beabsichtigt ist, einnehmen. In bestimmten Ausführungsformen enthalten die Zusammensetzungen zum Beispiel eine Gaussia-Luciferase, ein Gaussia-Luciferase-Peptid oder ein Gaussia-Luciferase-Fusionsprotein, die/das für die Verwendung in lumineszierenden Novitäten, in Immunoassays, Donoren in FET-Assays (Fluoreszenz-Energie-Transfer), FRET-Assays (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer), HTRF-Assays (Homogeneous Time-Resolved Fluorescence) oder in Verbindung mit Multivertiefungen-Assayvorrichtungen, die integrierte Photodetektoren enthalten, wie denjenigen, die hier beschrieben werden, formuliert ist.

[0034] In bevorzugteren Ausführungsformen schließt das Biolumineszenz-erzeugende System zusätzlich zu der Luciferase ein Renilla mulleri- oder Ptilosarcus-GFP ein. Diese Zusammensetzungen können in einer Viel-

zahl von Verfahren und Systemen, wie in Verbindung mit diagnostischen Systemen für den in vivo-Nachweis von neoplastischen Geweben und anderer Gewebe, wie in denjenigen Verfahren, die hier beschrieben werden, verwendet werden.

[0035] Kombinationen, die eine erste Zusammensetzung, die eine Luciferase enthält, und eine zweite Zusammensetzung umfassen, die einen oder mehrere zusätzliche Bestandteile eines Biolumineszenz-erzeugenden Systems enthält, zur Verwendung mit Herstellungsgegenständen, um Novitäten zu erzeugen, werden bereitgestellt. Diese Novitäten werden für die Unterhaltung, die Freizeit und den Zeitvertreib gestaltet und schließen nicht einschränkend ein: Spielzeuge vor allem Wasserspritzpistolen, Spielzeugzigaretten, Spielzeug-"Halloween"-Eier, Jonglierbälle vom Typ "Footbag" und Brettspiele/Kartenspiele; Fingerfarben und andere Farben, Spielzeuge aus glibberigen Materialien; Textilien, vor allem Kleidung, wie Hemden, Hüte und Sportbekleidungsanzüge, Zwirne und Garne; Luftblasen in blasenerzeugenden Spielzeugen und anderen Spielzeugen, die Blasen erzeugen; Ballons; Figürchen; Artikel für den persönlichen Gebrauch, wie Kosmetika, Badepulver, Körperlotionen, Gele, Puder und Cremes, Nagelpolituren, Make-up, Zahnpasten und andere Zahnputzmittel, Seifen, Körperfarben und Schaumbäder; Artikel wie Tinten, Papier; Nahrungsmittel, wie Gelatinen, Kuchenglasuren und Zuckerguss; Fischfutter, das Luciferine enthält, und transgene Fische, vor allem transgene Fische, die eine Luciferase exprimieren; Pflanzennahrung, die ein Luciferin oder eine Luciferase enthält, vorzugsweise ein Luciferin zur Verwendung mit transgenen Pflanzen, die Luciferase exprimieren; und Getränke, wie Bier, Wein, Sekt, Erfrischungsgetränke und Eiswürfel sowie Eis in anderen Gestaltungen; Springbrunnen, eingeschlossen flüssiges "Feuerwerk", und andere, wie Strahlen oder Sprühnebel oder Aerosole von Zusammensetzungen, die Lösungen, Gemische, Suspensionen, Puder, Pasten, Partikel oder andere geeignete Formen sind.

[0036] Jeder Herstellungsgegenstand, der mit einem Biolumineszenz-erzeugenden System kombiniert werden kann, wie es hier bereitgestellt wird, und der so für die Unterhaltung, die Freizeitgestaltung und/oder den Zeitvertreib sorgen kann, eingeschlossen die Verwendung der Gegenstände für die Freizeitgestaltung und das Erregen von Aufmerksamkeit, wie zum Bewerben von Waren und/oder Dienstleistungen, was mit einem Logo oder einer Marke zusammenhängt, wird hier ins Auge gefasst. Derartige Verwendungen können ein Zusatz zur oder in Verbindung mit der oder anstelle der gewöhnlichen oder normalen Verwendung derartiger Gegenstände sein. Als Ergebnis der Kombination leuchten die Gegenstände oder erzeugen, wie im Fall von Wasserspritzpistolen und Springbrunnen, eine leuchtende Flüssigkeit oder einen leuchtenden Sprühnebel einer Flüssigkeit oder von Partikeln. Die Neuheit der Novität ergibt sich aus seiner Biolumineszenz.

GFPs

[0037] Isolierte Nucleinsäuren, die GFPs von Renilla codieren, werden hier beschrieben. Weiterhin werden isolierte und gereinigte Nucleinsäuren, die eine Komponente des Biolumineszenz-erzeugenden Systems und ein grün fluoreszierendes Protein (GFP) einer Art aus der Gattung Renilla codieren, und die dadurch codierten Proteine beschrieben. Es werden vor allem Nucleinsäurefragmente, die die grün fluoreszierenden Proteine (GFPs) von Renilla und die Renilla mulleri-Luciferase codieren, und die davon abgeleiteten Nucleinsäuresonden beschrieben.

[0038] Nucleinsäuremoleküle, die ein Renilla-GFP codieren, werden beschrieben. Es werden vor allem Nucleinsäuremoleküle, die ein Renilla-GFP codieren, die den codierenden Teil der Nucleotidsequenz, die in SEQ ID NO: 15 offenbart wird, einschließen oder die unter mäßigen oder hohen Stringenzbedingungen mit der Nucleotidsequenz hybridisieren, die in SEQ ID NO: 15 offenbart wird, vor allem wenn Sonden verwendet werden, die hier bereitgestellt werden, beschrieben. Sonden, die von dieser Nucleinsäure abgeleitet werden, können in hier beschriebenen Verfahren verwendet werden, um GFPs von beliebigen Renilla-Arten zu isolieren. Eine Nucleinsäure, die das Renilla mulleri-GFP codiert, wird beschrieben. Diese Nucleinsäure codiert die Aminosäuresequenz, die in SEQ ID NO: 16 offenbart wird.

[0039] Nucleinsäuresonden können markiert werden, die erforderlichenfalls für den Nachweis mindestens etwa 14, vorzugsweise mindestens etwa 16 oder gewünschtenfalls 20 oder 30 oder mehr zusammenhängende Nucleotide einer Nucleotidsequenz enthalten, die ein Renilla-GFP, vor allem das Renilla mulleri-GFP, codiert. Die Nucleinsäuresonden für das Renilla-GFP werden vorzugsweise aus der Nucleotidsequenz ausgewählt, die in SEQ ID NO: 15 offenbart wird.

[0040] Verfahren unter Verwendung der Sonden für die Isolierung und Klonierung der GFP-codierenden DNA in Renilla und anderen Arten werden ebenfalls beschrieben. Die Nucleinsäuresonden sind vorzugsweise entartete Sonden, die auf den Regionen des GFPs basieren, die unter den Renilla-Arten konserviert sind, wie sie

in [Fig. 3](#) offenbart werden. Derartige entartete Sonden enthalten mindestens 14 Nucleotide, vorzugsweise 16 bis 30 Nucleotide, die auf den Aminosäuren 51 bis 68, 82 bis 98 und 198 bis 208, die in SEQ ID NO: 16 offenbart werden, der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID NO: 24 offenbart wird, den Aminosäuren 9–20, die in SEQ ID NO: 25 offenbart werden, und den Aminosäuren 39–53, die in SEQ ID NO: 27 offenbart werden, basieren. Die Nucleinsäuresonden, die die oben beschriebenen bevorzugten Aminosäureregionen codieren, werden vorzugsweise unter den Nucleotidsequenzen ausgewählt, die diese Regionen codieren, wie in SEQ ID NO: 15 offenbart. Alternativ können Nucleinsäuren, vor allem diejenigen, die in SEQ ID NO: 15 offenbart werden, die die angegebenen Regionen codieren, als Primer für die PCR-Amplifikation der Genbanken einer ausgewählten Renilla-Art verwendet werden, wodurch DNA, die ein Renilla-GFP codiert, isoliert wird.

[0041] Nucleinsäuren, die ein Ptilosarcus-GFP codieren, werden in den SEQ ID NO: 30 und 31 offenbart; das codierte GFP wird in SEQ ID NO: 32 offenbart. Weiterhin werden Nucleinsäuremoleküle beschrieben, die unter mäßiger oder hoher Stringenz mit den Nucleotidsequenzen hybridisieren, die in den SEQ ID NO: 28, 30 und 31 offenbart werden.

[0042] Vektoren, die eine DNA enthalten, die ein Renilla- oder Ptilosarcus-GFP codiert, werden beschrieben. Vor allem werden Expressionsvektoren, die eine DNA enthalten, die ein Renilla- oder Ptilosarcus-GFP codiert, die in funktionsfähiger Kombination mit einem Promotorelement verknüpft ist, das die konstitutive oder induzierbare Expression von Renilla- oder Ptilosarcus-GFP ermöglicht, beschrieben. Natives Renilla-GFP ist exprimiert worden.

[0043] Die Vektoren sind imstande, das Renilla-GFP in einer großen Vielzahl von Wirtszellen zu exprimieren. Vektoren für die Erzeugung chimärer Renilla-GFP-Fusionsproteine, die ein Promotorelement und eine multiple Klonierungsstelle enthalten, die stromaufwärts oder stromabwärts der DNA angeordnet ist, die das Renilla-GFP codiert, werden ebenfalls beschrieben.

[0044] Rekombinante Zellen, die eine heterologe Nucleinsäure enthalten, die ein Ptilosarcus-GFP, ein Renilla-GFP, eine Renilla-mulleri-Luciferase, eine Gaussia-Luciferase oder eine Pleuromamma-Luciferase codiert, werden ebenfalls bereitgestellt. Gereinigtes Renilla mulleri-GFP-Peptid, Renilla reniformis-GFP-Peptid und Zusammensetzungen, die ein Renilla-GFP und GFP-Peptide allein oder in Kombination mit mindestens einer Komponente eines Biolumineszenz-erzeugenden Systems, wie einer Renilla mulleri-Luciferase, enthalten, werden beschrieben. Die Renilla-GFP- und GFP-Peptid-Zusammensetzungen können beispielsweise verwendet werden, um für eine fluoreszierende Beleuchtung von Novitäten zu sorgen, oder sie können in Verfahren für den Nachweis und das Sichtbarmachen eines neoplastischen Gewebes und anderer Gewebe, für den Nachweis infektiöser Substanzen unter Verwendung von Immunoassays, wie homogener Immunoassays, und bei den in vitro-Durchmusterungsverfahren auf Fluoreszenzbasis unter Verwendung von Multivertiefungen-Assayvorrichtungen verwendet werden, oder sie können in Kits für die Durchführung jedes beliebigen der oben beschriebenen Verfahren bereitgestellt werden. Diese Proteine können vor allem in FP-Assays (FP = Fluoreszenzpolarisation), FET-Assays (FET = Fluoreszenzenergietransfer), FRET-Assays (FRET = Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer) und HTRF-Assays (HTRF = homogene zeitaufgelöste Fluoreszenz) verwendet werden.

[0045] Nicht radioaktive Energietransferreaktionen, wie FET- oder FRET-, FP- und HTRF-Assays, sind homogene Lumineszenzassays, die auf einem Energietransfer basieren, der zwischen einem Donorlumineszenzmarker und einem Akzeptormarker stattfindet (siehe z. B. Cardullo et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 8790–8794; Pearce et al. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83: 8092–8096; U.S.-Patent Nr. 4,777,128; U.S.-Patent Nr. 5,162,508; U.S.-Patent Nr. 4,927,923; U.S.-Patent Nr. 5,279,943; und Internationale PCT-Anmeldung Nr. WO 92/01225). Nicht radioaktive Energietransferreaktionen unter Verwendung von GFPs sind entwickelt worden (siehe Internationale PCT-Anmeldungen Nr. WO 98/02571 und WO 97/28261). Nicht radioaktive Energietransferreaktionen unter Verwendung von GFPs und Luciferasen, wie einer Luciferase und ihres verwandten GFPs (oder von Multimeren davon), wie in einem Fusionsprotein, werden hier ins Auge gefasst.

[0046] Nucleinsäuren, die eine beträchtliche Sequenzidentität mit den Nucleinsäuren zeigen, die hier bereitgestellt werden, werden ebenfalls ins Auge gefasst. Hierbei handelt es sich um Nucleinsäuren, die hergestellt werden können, indem Codons substituiert werden, die konservative Aminosäuren codieren, und um Nucleinsäuren, die mindestens etwa 80% und vorzugsweise 90 oder 95% Sequenzidentität zeigen. Die Sequenzidentität bezieht sich auf die Identität wie sie unter Verwendung von Standardprogrammen mit "Default-Gap-Penalties" und anderen "Default"-Werten, die von deren Herstellern bereitgestellt, ermittelt wird.

[0047] Die Nucleinsäuren bieten eine Möglichkeit für die Herstellung von Luciferasen und GFPs, die eine vor-

teilhafte Anwendung auf allen Gebieten haben, auf denen Luciferasen/Luciferine und GFPs eine Anwendung haben. Die Nucleinsäuren können verwendet werden, um GFPs und GFPs von anderen, vor allem von Renilla-Arten, unter Verwendung der Sonden, die hier beschrieben werden, die den konservierten Regionen entsprechen (siehe z. B. [Fig. 3](#)), zu erhalten und zu erzeugen. Diese GFPs haben vorteilhaften Anwendungen auf allen Gebieten, auf denen GFPs und/oder Luciferasen/Luciferine eine Anwendung haben. Die GFPs stellen beispielsweise ein Mittel dar, mit dem das Ausgabesignal von Biolumineszenz-erzeugenden Systemen verstärkt wird. Das Renilla-GFP hat einen einzigen Anregungsabsorptionspeak im Bereich von blauem Licht (und bei etwa 498 nm) und einen dominierenden einzigen Emissionspeak bei etwa 510 nm (mit einer schmalen Schulter nahe 540). Dieses Spektrum liefert ein Mittel für die Absorption von blauem Licht und dessen effiziente Umwandlung in grünes Licht. Dies führt zu einer Verstärkung des Ausgabewertes. Bei Verwendung in Verbindung mit einem Biolumineszenz-erzeugenden System, das blaues Licht liefert, wie *Aequorea* oder *Renilla* oder *Vargula* (*Cypridina*), wird das Ausgabesignal bei jeder beliebigen Anwendung, eingeschlossen diagnostische Anwendungen, verstärkt. Zusätzlich kann dieses grüne Licht als ein Energiedonor in Assays auf Fluoreszenzbasis dienen, wie in Fluoreszenzpolarisations-Assays, FET-Assays (Fluoreszenzenergieübertragung), FREI-Assays (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer) und HTRF-Assays (homogene zeitaufgelöste Fluoreszenz). Spezielle Assays, die hier als BRET-Assays bezeichnet werden (Biolumineszenz-Resonanzenergie-Transfer-Assays, in denen Energie von einer Biolumineszenzreaktion einer Luciferase auf ein fluoreszierendes Protein übertragen wird), werden beschrieben.

[0048] Nicht radioaktive Energietransferreaktionen, wie FET- oder FRET-, FP- und HTRF-Assays, sind homogene Lumineszenzassays, die auf einem Energietransfer basieren, der zwischen einem Donorlumineszenzmarker und einem Akzeptormarker stattfindet (siehe z. B. Cardullo et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 8790–8794; Pearce et al. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83: 8092–8096; U.S.-Patent Nr. 4,777,128; U.S.-Patent Nr. 5,162,508; U.S.-Patent Nr. 4,927,923; U.S.-Patent Nr. 5,279,943; und Internationale PCT-Anmeldung Nr. WO 92/01225). Nicht strahlende Energietransferreaktionen unter Verwendung von GFPs sind entwickelt worden (siehe Internationale PCT-Anmeldungen Nr. WO 98/02571 und WO 97/28261).

[0049] Die Mutagenese der GFPs wird hier ins Auge gefasst, vor allem eine Mutagenese, die zu modifizierten GFPs führt, die eine rotverschobenes Anregungsspektrum und Emissionsspektrum haben. Die resultierenden Systeme haben einen höheren Ausgabewert, verglichen mit den nicht mutierten Formen. Diese GFPs können durch eine zufällige Mutagenese und die Auswahl auf GFPs mit veränderten Spektren oder durch die gezielte Mutagenese der Chromophorregion des GFPs ausgewählt werden.

[0050] Rekombinante Wirtszellen, die eine heterologe Nucleinsäure enthalten, die ein Renilla- oder Ptilosarcus-GFP codiert, werden ebenfalls beschrieben. Die rekombinanten Zellen, die die heterologe DNA enthalten, die das Renilla- oder Ptilosarcus-GFP codiert, werden durch die Transfektion mit DNA, die ein Renilla- oder Ptilosarcus-GFP codiert, oder durch das Einführen von RNA-Transkripten von DNA, die ein Renilla- oder Ptilosarcus-Protein codiert, erzeugt. Die DNA kann als ein lineares DNA-Fragment eingeführt werden, oder sie kann in einen Expressionsvektor für die stabile oder transiente Expression der codierenden DNA eingeschlossen werden.

[0051] Die Zellen enthalten eine DNA oder RNA, die ein Renilla mulleri-GFP oder ein Ptilosarcus-GFP (vor allem von einer Art verschieden von *P. gurneyi*) codiert, und exprimieren auch das rekombinante Renilla mulleri-GFP oder Ptilosarcus-Polypeptid. Es ist bevorzugt, dass die Zellen so ausgewählt werden, dass sie funktionsfähige GFPs exprimieren, die die Fähigkeit zur Fluoreszenz behalten und die nicht toxisch für die Wirtszelle sind. Die Zellen können auch eine heterologe Nucleinsäure enthalten, die eine Komponente eines Biolumineszenz-erzeugenden Systems, vorzugsweise ein Photoprotein oder eine Luciferase, codiert. Die Nucleinsäure, die die Komponente des Biolumineszenz-erzeugenden Systems codiert, kann aus den Arten von *Aequorea*, *Vargula*, *Pleuromamma*, *Ptilosarcus* oder *Renilla* isoliert werden. Die Komponente des Biolumineszenz-erzeugenden Systems kann eine Renilla mulleri-Luciferase, die die Aminosäuresequenz einschließt, die in SEQ ID NO: 18 offenbart wird, oder die *Pleuromamma*-Luciferase, die in SEQ ID NO: 28 offenbart wird, oder die *Gaussia*-Luciferase, die in SEQ ID NO: 19 offenbart wird, sein.

[0052] Die hier beschriebenen GFPs können in Kombination mit jedem geeigneten Biolumineszenz-erzeugenden System verwendet werden, sie werden aber vorzugsweise in Kombination mit einer Renilla- oder *Aequorea*-, *Pleuromamma*- oder *Gaussia*-Luciferase verwendet.

[0053] Gereinigte Renilla-GFPs, vor allem Renilla mulleri-GFP und gereinigte Renilla reniformis-GFP-Peptide werden beschrieben. Derzeit bevorzugtes Renilla-GFP zur Verwendung in den Zusammensetzungen hier ist das Renilla mulleri-GFP, das die Aminosäuresequenz einschließt, die in SEQ ID NO: 16 offenbart wird. Derzeit

bevorzugte Renilla reniformis-GFP-Peptide sind diejenigen, die die GFP-Peptide enthalten, die unter den Aminosäuresequenzen ausgewählt werden, die in den SEQ ID NO: 19–23 offenbart werden.

[0054] Das Renilla-GFP, die GFP-Peptide und die Luciferase können aus natürlichen Quellen oder aus einer prokaryotischen oder eukaryotischen Zelle isoliert ist, die mit einer Nucleinsäure transfiziert sind, die das Renilla-GFP und/oder das Luciferase-Protein codiert.

[0055] Fusionen einer Nucleinsäure, vor allem einer DNA, die eine Renilla- oder Ptilosarcus-GFP codiert, mit einer DNA, die eine Luciferase codiert, werden hier ebenfalls beschrieben.

[0056] Die Zellen, die eine funktionsfähige Luciferase und/oder ein funktionsfähiges GFP exprimieren, können allein oder in Verbindung mit einem Biolumineszenz-erzeugenden System in Assays auf Zellbasis und in Durchmusterungsverfahren, wie denjenigen, die hier beschrieben werden, verwendet werden.

[0057] Derzeit bevorzugte Wirtszellen für die Expression eines GFPs und einer Luciferase sind Bakterien, Hefen, Pilze, Pflanzenzellen, Insektenzellen und Tierzellen.

[0058] Die Luciferasen und GFPs oder die Zellen, die sie exprimieren, können auch in Verfahren zur Durchmusterung auf eine bakterielle Verunreinigung und in Verfahren zur Durchmusterung auf metallische verunreinigende Stoffe verwendet werden. Für die Durchmusterung auf eine bakterielle Verunreinigung werden Bakterienzellen, die die Luciferase und/oder das GFP exprimieren, in Autoklaven oder in andere Bereiche gegeben, in denen ein Test ins Auge gefasst wird. Nach der Behandlung oder Verwendung des Bereichs wird der Bereich auf das Vorhandensein von leuchtenden Bakterien getestet. Das Vorhandensein derartiger Bakterien ist ein Hinweis auf das Misslingen der vollständigen Beseitigung anderer Bakterien. Die Durchmusterung im Hinblick auf Schwermetalle und andere Umweltverunreinigungen kann ebenfalls mit Zellen durchgeführt werden, die die Nucleinsäuren enthalten, die hier bereitgestellt werden, falls die Expression mit einem System verknüpft ist, das von dem speziellen Schwermetall oder der speziellen Verunreinigung abhängig ist.

[0059] Die hier bereitgestellten Systeme und Zellen können für Durchmusterungsprotokolle mit hohem Durchsatz, intrazelluläre Assays, medizinische diagnostische Assays, Umweltuntersuchungen, wie das Aufspüren von Bakterien in Wasserversorgungen, in Verbindung mit Enzymen für den Nachweis von Schwermetallen, in Sporen für das Prüfen von Autoklaven in Krankenhäuser, in Nahrungsmitteln und in industriellen Autoklaven verwendet werden. Nicht pathogene Bakterien, die die Systeme enthalten, können in Tierfutter eingebracht werden, um bakterielle Verunreinigungen in Tierprodukten und in Fleisch nachzuweisen.

[0060] Zusammensetzungen, die ein Renilla- oder Ptilosarcus-GFP enthalten, werden beschrieben. Die Zusammensetzungen können in Abhängigkeit von dem vorgesehenen Anwendungsverfahren eine beliebige Form aus einer Vielzahl von Formen einnehmen. Die Zusammensetzungen können beispielsweise ein Renilla-GFP oder ein GFP-Peptid enthalten, vorzugsweise das Renilla mulleri-GFP oder ein Renilla reniformis-GFP-Peptid, das für die Verwendung in leuchtenden bzw. lumineszierenden Novitäten, Immunoassays, FET-Assays (Fluoreszenzenergietransfer), FREI-Assays (Fluoreszenzresonanzenergietransfer), HTRF-Assays formuliert ist oder das in Verbindung mit Multivertiefungen-Assayvorrichtungen, die integrierte Photodetektoren enthalten, wie denjenigen, die hier beschrieben werden, verwendet wird. In anderen Fällen werden die GFPs in Getränken, Nahrungsmitteln oder Kosmetika verwendet.

[0061] Zusammensetzungen, die ein Renilla mulleri-GFP oder ein GFP-Peptid und mindestens eine Komponente eines Biolumineszenz-erzeugenden Systems, vorzugsweise eine Luciferase, ein Luciferin oder eine Luciferase und ein Luciferin, enthalten, werden beschrieben. Das Luciferase/Luciferin-Biolumineszenz-erzeugende System wird unter denjenigen Systemen ausgewählt, die isoliert werden aus: einem Insektensystem, einem Coelenterat-System, einem Ctenophor-System, einem bakteriellen System, einem Molluskensystem, einem Crustaceen-System, einem Fischsystem, einem Ringelwurm-System und einem Erdwurm-System. Biolumineszenz-erzeugende Systeme schließen diejenigen die, die aus Renilla, Aequorea und Vargula, Gaussia und Pleuromamma isoliert werden.

[0062] Kombinationen, die eine erste Zusammensetzung, die ein Renilla mulleri-GFP oder Ptilosarcus-GFP oder ein Gemisch davon enthält, und eine zweite Zusammensetzung, die ein Biolumineszenz-erzeugendes System enthält, umfassen, zur Verwendung mit unbelebten Herstellungsgegenständen zur Erzeugung von Novitäten werden beschrieben. Diese Novitäten, die Herstellungsgegenstände sind, werden für die Unterhaltung, die Freizeit und den Zeitvertreib gestaltet und schließen nicht einschränkend ein: Spielzeuge, vor allem Wasserspritzpistolen, Spielzeugzigaretten, Spielzeug-"Halloween"-Eier, Jonglierbälle vom Typ "Footbag" und

Brettspiele/Kartenspiele; Fingerfarben und andere Farben, Spielzeuge aus glibberigen Materialien; Textilien, vor allem Kleidung, wie Hemden, Hüte und Sportbekleidungsanzüge, Zwirne und Garne; Luftblasen in blasenerzeugenden Spielzeugen und andere Spielzeuge, die Blasen erzeugen; Ballons; Figürchen; Artikel für den persönlichen Gebrauch, wie Badepulver, Körperlotionen, Gele, Puder und Cremes, Nagelpolituren, Kosmetika einschließlich Make-up, Zahnpasten und andere Zahnputzmittel, Seifen, Kosmetika, Körperfarben und Schaumbäder, Blasen, die aus Quellen erzeugt werden, bei denen es sich nicht um Tenside handelt, vor allem Proteinen, wie Albumin und andere nicht toxische Proteine; in Fischereiköder, vor allem vernetztem Polyacrylamid, das ein fluoreszierendes Protein und/oder Komponenten eines Biolumineszenz-erzeugenden Systems enthält, die im Kontakt mit Wasser leuchten, Artikel wie Tinten, Papier; Nahrungsmittel, wie Gelatinen, Kuchenglasuren und Zuckerguss; Fischfutter, das Luciferine enthält und transgene Fische, vor allem transgene Fische, die eine Luciferase exprimieren; Pflanzennahrung, die ein Luciferin oder eine Luciferase enthält, vorzugsweise ein Luciferin zur Verwendung mit transgenen Pflanzen, die eine Luciferase exprimieren; und Getränke, wie Bier, Wein, Sekt, Erfrischungsgetränke und Eiswürfel sowie Eis in anderen Gestaltungen; Springbrunnen, eingeschlossen flüssiges "Feuerwerk", und andere, wie Strahlen oder Sprühnebel oder Aerosole von Zusammensetzungen, die Lösungen, Gemische, Suspensionen, Puder, Pasten, Partikel oder andere geeignete Formen sind.

[0063] Jeder Herstellungsgegenstand, der mit einem Biolumineszenz-erzeugenden System kombiniert werden kann, wie es hier bereitgestellt wird, und der so für die Unterhaltung, die Freizeitgestaltung und/oder den Zeitvertreib sorgt, eingeschlossen die Verwendung der Gegenstände für die Freizeit oder das Erregen von Aufmerksamkeit, wie zum Bewerben von Waren und/oder Dienstleistungen, was mit einem Logo oder einer Marke zusammenhängt, wird hier ins Auge gefasst. Derartige Verwendungen können ein Zusatz zur oder in Verbindung mit der oder anstelle der gewöhnlichen oder normalen Verwendung derartiger Gegenstände sein. Als Ergebnis der Kombination leuchten die Gegenstände oder erzeugen, wie im Fall von Wasserspritzpistolen und Springbrunnen, eine leuchtende Flüssigkeit oder einen leuchtenden Sprühnebel einer Flüssigkeit oder von Partikeln.

[0064] Verfahren für die Diagnose und das Sichtbarmachen von Geweben in vivo oder in situ unter Verwendung der Zusammensetzungen, die ein Renilla-mulleri-GFP und/oder eine Renilla-mulleri-Luciferase oder andere der hier beschriebenen Luciferasen und/oder GFPs enthalten, werden beschrieben. Das Renilla-mulleri-GFP-Protein kann beispielsweise in Verbindung mit diagnostischen Systemen verwendet werden, die sich auf die Biolumineszenz für das Sichtbarmachen von Geweben in situ stützen. Die Systeme sind besonders nützlich für das Sichtbarmachen und den Nachweis von neoplastischem Gewebe und Spezialgewebe, wie im Laufe von nicht invasiven und invasiven Verfahren. Die Systeme schließen Zusammensetzungen ein, die Konjugate enthalten, die ein gewebespezifisches, vor allem tumorspezifisches Ansteuerungsmittel (= das "Targeting-Mittel" oder "targeting agent" oder "Mittel für die zielgerichtete Ansteuerung) enthalten, das mit einer ausgerichteten Substanz (= die "Targeted-Substanz" oder das "targeted agent" oder die "an ein Ziel adressierte Substanz"), einem Renilla-mulleri-GFP, einer Luciferase oder einem Luciferin, verknüpft ist. Die Systeme schließen auch eine zweite Zusammensetzung ein, die die übrigen Bestandteile für eine Biolumineszenz-erzeugende Reaktion und/oder das Renilla-mulleri-GFP enthält. Alle Komponenten, mit Ausnahme der Aktivatoren, die in situ bereitgestellt werden oder die in dem Körper oder Gewebe vorhanden sind, können in eine einzige Zusammensetzung eingeschlossen sein.

[0065] Verfahren für die Diagnose und das Sichtbarmachen von Geweben in vivo oder in situ unter Verwendung von Zusammensetzungen, die eine Gaussia-Luciferase enthalten, werden beschrieben. Die Gaussia-Luciferase oder das Gaussia-Luciferase-Peptid kann beispielsweise in Verbindung mit diagnostischen Systemen verwendet werden, die sich auf die Biolumineszenz zum in situ-Sichtbarmachen von Geweben stützen. Die Systeme sind besonders gut brauchbar für das Sichtbarmachen und den Nachweis eines neoplastischen Gewebes und von Spezialgewebe, wie während nicht invasiven und invasiven Verfahren. Die Systeme schließen Zusammensetzungen ein, die Konjugate enthalten, die ein gewebespezifisches, vor allem tumorspezifisches Ansteuerungsmittel enthalten, das mit einer ausgerichteten Substanz, einer Gaussia-Luciferase, einem GFP oder einem Luciferin, verknüpft ist. Die Systeme schließen auch eine zweite Zusammensetzung ein, die die übrigen Bestandteile für eine Biolumineszenz-erzeugende Reaktion und/oder die Gaussia-Luciferase enthält. In einigen Ausführungsformen sind alle Bestandteile, mit Ausnahme der Aktivatoren, die in situ bereitgestellt werden oder die in dem Körper oder Gewebe vorhanden sind, in eine einzige Zusammensetzung eingeschlossen.

[0066] Die diagnostischen Systeme schließen vor allem zwei Zusammensetzungen ein. Eine erste Zusammensetzung wird bereitgestellt, die Konjugate enthält, die in bevorzugten Ausführungsformen Antikörper enthalten, die gegen Tumorantigene gerichtet sind, die mit einer Komponente des Biolumineszenz-erzeugenden

Reaktion, einer Luciferase oder einem Luciferin, vorzugsweise einer Luciferase, konjugiert sind. In bestimmten Ausführungsformen sind Konjugate, die tumorspezifische Ansteuerungsmittel enthalten, mit Luciferasen oder Luciferinen verknüpft. In anderen Ausführungsformen sind tumorspezifische Ansteuerungsmittel mit Mikroträgern verknüpft, die mit vorzugsweise mehr als einer der Biolumineszenz-erzeugenden Komponenten, vorzugsweise mehr als einem Luciferase-Molekül, gekoppelt sind.

[0067] Die zweite Zusammensetzung enthält die übrigen Komponenten eines Biolumineszenz-erzeugenden Systems, typischerweise das Luciferin oder das Luciferase-Substrat. In einigen Ausführungsformen sind diese Komponenten, vor allem das Luciferin, an ein Protein, wie ein Serumalbumin, oder andere Proteinträger, gebunden. Der Träger und Depot- bzw. Retard-Formulierungen ermöglichen es systemisch verabreichten Komponenten, ohne eine Wechselwirkung mit Blutzellbestandteilen, wie Hämoglobin, die/das das Luciferin oder die Luciferase deaktivieren/deaktiviert, zu dem angesteuerten Gewebe zu wandern.

[0068] Verfahren für die Diagnose von Krankheiten, insbesondere infektiöser Krankheiten, unter Verwendung der Chip-Methodik (siehe z. B. die gleichzeitig anhängige U.S.-Anmeldung Serien-Nr. 08/990,103), eines Luciferase/Luciferin-Biolumineszenz-erzeugenden Systems und eines Renilla mulleri- oder Ptilosarcus-GFPs werden beschrieben. Der Chip umfasst vor allem einen integrierten Photodetektor, der die Photonen nachweist, die von dem Biolumineszenz-erzeugenden System emittiert werden, vor allem unter Verwendung einer Luciferase, die von den Nucleinsäuren codiert wird, die hier bereitgestellt werden, und/oder von Renilla mulleri- oder Ptilosarcus-GFP.

[0069] In einer Ausführungsform wird der Chip unter Verwendung eines integrierten Schaltkreises mit einem Array, wie einem X-Y-Array, von Photodetektoren hergestellt. Die Oberfläche des Schaltkreises wird behandelt, um ihn den Bedingungen der diagnostischen Assays gegenüber, für den der Chip vorgesehen ist und an die er angepasst ist, inert zu machen, wie zum Beispiel durch die Derivatisierung für Verbindungsmoleküle, wie Antikörper. Ein ausgewählter Antikörper oder ein Panel von Antikörpern, wie ein Antikörper, der für ein bakterielles Antigen spezifisch ist, wird auf der Oberfläche des Chips oberhalb eines jeden Photodetektors fixiert. Nach dem Inkontaktbringen des Chips mit einer Testprobe wird der Chip mit einem zweiten Antikörper in Kontakt gebracht, der mit einem Renilla- oder Pleuromamma-GFP, einem chimären Antikörper-Renilla-GFP-Fusionsprotein oder einem Antikörper, der mit einer Komponente eines Biolumineszenz-erzeugenden Systems verbunden ist, wie einer Luciferase oder einem Luciferin, die für das Antigen spezifisch sind, verknüpft. Die übrigen Komponenten der Biolumineszenz-erzeugenden Reaktion werden zugegeben, und falls irgendeiner der Antikörper, die mit einer Komponente eines Biolumineszenz-erzeugenden Systems verbunden sind, auf dem Chip vorhanden ist, wird Licht erzeugt und durch den benachbarten Photodetektor nachgewiesen. Der Photodetektor ist betriebsbereit mit einem Computer verbunden, der mit Informationen programmiert ist, die die angebondenen Antikörper identifizieren, der das Ereignis aufzeichnet und dadurch Antigene identifiziert, die in der Testprobe vorhanden sind.

[0070] Verfahren zur Erzeugung chimärer GFP-Fusionsproteine werden beschrieben. Die Verfahren schließen das Verknüpfen der DNA, die ein interessierendes Gen oder einen Teil davon codiert, mit einer DNA, die eine GFP-codierende Region codiert, in dem gleichen Translationsleserahmen ein. Das interessierende codierte Protein kann innerhalb des Rahmens mit dem Amino- oder dem Carboxyterminus des GFPs verknüpft werden. Die DNA, die das chimäre Protein codiert, wird dann in einer funktionsfähigen Kombination mit einem Promotorelement eines geeigneten Expressionsvektors verknüpft. Alternativ kann das Promotorelement direkt von dem ausgerichteten interessierenden Gen erhalten werden, und das promotorhaltige Fragment kann stromaufwärts der GFP-codierenden Sequenz verknüpft werden, um chimäre GFP-Proteine zu erzeugen.

[0071] Verfahren für den Nachweis von Verbindungen unter Verwendung von rekombinanten Zellen, die eine heterologe DNA, die ein GFP codiert, unter der Kontrolle eines Promotorelements eines interessierenden Gens exprimieren, werden beschrieben. Die rekombinanten Zellen können verwendet werden, um neue Verbindungen oder Liganden zu identifizieren, die das Transkriptionsniveau des interessierenden Promotors modulieren, indem die GFP-vermittelte Fluoreszenz gemessen wird. Rekombinante Zellen, die die chimären Renilla- oder Ptilosarcus-GFPs exprimieren, können auch für die Überwachung der Genexpression oder des Proteintransports oder für die Bestimmung der zellulären Lokalisierung des Zielproteins ("target Protein") durch das Identifizieren lokalisierter Regionen einer GFP-vermittelten Fluoreszenz innerhalb der rekombinanten Zelle verwendet werden.

[0072] Andere Assays die die GFPs und/oder Luciferasen verwenden, werden hier ins Auge gefasst. Alle Assays oder diagnostischen Verfahren, die dem Fachmann bekannt sind, in denen Aequorea-GFPs und/oder andere Luciferasen verwendet werden, werden hier ins Auge gefasst.

[0073] Kits, die die GFPs zur Verwendung in den Verfahren, eingeschlossen die hier beschriebenen Verfahren, enthalten, werden beschrieben. Die Kits, die einen Herstellungsgegenstand und geeignete Reagenzien für die Erzeugung von Biolumineszenz enthalten, werden beschrieben. Die Kits, die derartige Seifenzusammensetzungen, vorzugsweise mit einem mittleren pH-Wert (zwischen 5 und 8), und Biolumineszenz-erzeugende Reagenzien, eingeschlossen Luciferase und Luciferin und das GFP, enthalten, werden hier beschrieben. Diese Kits können beispielsweise mit einem Blasen abgebenden oder Blasen erzeugenden Spielzeug verwendet werden. Diese Kits können auch eine Beladungs- oder Ladekartusche enthalten oder können in Verbindung mit einem Nahrungsmittel verwendet werden.

[0074] Die Kits können für den Nachweis und das Sichtbarmachen von neoplastischem Gewebe und anderer Gewebe verwendet werden, und sie können eine erste Zusammensetzung, die das GFP und mindestens eine Komponente eines Biolumineszenz-erzeugenden Systems enthält, und eine zweite Zusammensetzung, die die aktivierende Zusammensetzung enthält, die die übrigen Bestandteile des Biolumineszenz-erzeugenden Systems und jedes beliebige notwendige Aktivierungsmittel enthält, einschließen.

[0075] Diese Kits enthalten demnach typischerweise zwei Zusammensetzungen, eine erste Zusammensetzung, die das GFP enthält, formuliert für die systemische Verabreichung (oder in einigen Ausführungsformen für die lokale oder topische Anwendung), und eine zweite Zusammensetzung, die die Komponenten oder übrigen Bestandteile eines Biolumineszenz-erzeugenden Systems enthält, in Abhängigkeit von der Anwendung für die systemische, topische oder lokale Verabreichung formuliert. Die Gebrauchsanleitung für die Verabreichung wird beigefügt.

[0076] Die Kits können für den Nachweis und die Identifizierung von Krankheiten, insbesondere infektiöser Krankheiten, unter Verwendung von Multivertiefungen-Assayvorrichtungen verwendet werden, und sie umfassen eine Multivertiefungen-Assayvorrichtung, die eine Vielzahl von Vertiefungen aufweist, von denen jede einen integrierten Photodetektor hat, in denen ein Antikörper oder ein Panel von Antikörpern, der/das spezifisch für einen oder mehrere infektiöse Stoffe befestigt ist, und eine Zusammensetzung, die einen zweiten Antikörper enthält, wie einen Antikörper, der für den infektiösen Stoff spezifisch ist, der mit einem Renilla mulleri- oder Ptilosarcus-GFP-Protein, einem chimären Antikörper-Renilla mulleri(oder Ptilosarcus)-GFP-Fusionsprotein oder F(Ab)₂-Antikörperfragment-Renilla-mulleri-GFP-Fusionsprotein verknüpft ist. Eine zweite Zusammensetzung enthält ein Biolumineszenz-erzeugendes System, das eine Lichtwellenlänge innerhalb des Anregungsbereichs des Renilla-mulleri-GFP emittiert, wie Arten von Renilla oder Aequorea, mit der Renilla mulleri angeregt wird, das grüne Licht erzeugt, das durch den Photodetektor der Vorrichtung nachgewiesen wird, um das Vorhandensein des Stoffes nachzuweisen.

[0077] Wie oben angegeben, werden Fusionen einer Nucleinsäure, die die Luciferasen oder GFPs codiert, die hier bereitgestellt werden, mit anderen Luciferasen und GFPs bereitgestellt. Von besonderem Interesse sind die Fusionen, die Paare von Luciferasen und GFPs codieren, wie eine Renilla-Luciferase und ein Renilla-GFP (oder ein Homodimer oder anderes Vielfaches eines Renilla-GFPs). Die Luciferase und das GFP binden, und in Gegenwart eines Luciferins erzeugen sie eine Fluoreszenz, die rotverschoben ist, verglichen mit der Luciferase in Abwesenheit des GFPs. Diese Fusion oder Fusionen, in der/denen das GFP und die Luciferase über ein Zielmolekül, wie ein Peptid, verknüpft sind, kann/können als ein Werkzeug für die Untersuchung von allem, was mit dem Linker in Wechselwirkung tritt, verwendet werden.

[0078] Mutierte Proteine der GFPs und der Luciferasen werden beschrieben. Von besonderem Interesse sind mutierte Proteine, wie temperaturempfindliche Mutanten, des GFPs und der Luciferasen, die deren Wechselwirkung verändern, wie Mutationen in der Renilla-Luciferase und dem Renilla-GFP, die deren Wechselwirkung bei einer kritischen Temperatur verändern.

[0079] Antikörper, polyklonale und monoklonale Antikörper, die spezifisch an ein beliebiges Protein der Proteine binden, die durch die hier bereitgestellten Nucleinsäuren codiert werden, werden ebenfalls beschrieben. Diese Antikörper, monoklonal wie polyklonal, können unter Einsatz von Standardtechniken, die dem Fachmann bekannt sind, hergestellt werden. Vor allem werden Immunglobuline oder Antikörper, die aus dem Serum eines Tieres erhalten werden, das mit einer im Wesentlichen reinen Zubereitung einer Luciferase oder eines GFPs, die/das hier bereitgestellt wird, oder eines epitophaltigen Fragments davon immunisiert wurde, beschrieben. Monoklonale Antikörper werden ebenfalls bereitgestellt. Die Immunglobuline, die hergestellt werden, haben neben anderen Eigenschaften die Fähigkeit, spezifisch und bevorzugt an ein GFP oder eine Luciferase, vor allem ein Renilla- oder Ptilosarcus-GFP oder eine Pleuromamma-, Gaussia- oder Renilla-mulleri-Luciferase zu binden und/oder die Immunpräzipitation dieser GFPs oder Luciferasen hervorzurufen, die in einer biologischen Probe oder einer Lösung, die von einer solchen Probe abgeleitet wird, vorhanden sein kann.

Beschreibung der Figuren

- [0080] [Fig. 1](#) stellt die Komponenten des im Handel erhältlichen PET-34-Vektors (EK ist die Enterokinase) dar.
- [0081] [Fig. 2](#) zeigt einen Teilbereich des Vektors mit der insertierten Gaussia-codierenden Sequenz.
- [0082] [Fig. 3](#) stellt eine Aufstellung der abgeleiteten Aminosäuresequenz des grün fluoreszierenden Proteins von *Renilla mulleri* und der Aminosäuresequenz von isolierten *Renilla reniformis*-GFP-Peptiden dar, die durch den proteolytischen Abbau von gereinigtem *Renilla reniformis*-GFP erhalten werden. Die Positionen in der Aminosäuresequenz mit direkter Identität werden durch die durchgezogenen vertikalen Linien (I) zwischen den beiden *Renilla*-Arten markiert.
- [0083] [Fig. 4](#) zeigt das Fluoreszenzemissions- und das Anregungsspektrum des *Renilla mulleri*-GFPs mit einer Peakemission bei 506 nm.
- [0084] [Fig. 5](#) zeigt das Fluoreszenzemissions- und das Anregungsspektrum des *Ptiloscircus*-GFPs mit einer maximalen Emission bei 508 nm.
- [0085] [Fig. 6](#) zeigt eine Photoemission in Abhängigkeit vom Salz und vom pH-Wert für *Pleuromamma*-Luciferase.
- [0086] [Fig. 7](#) stellt die Komponenten eines *Renilla mulleri*-Luciferase-GFP-Fusionskonstrukts in pET-34 dar; rbs: Ribosomenbindungssequenz, CDS: codierende Domänensequenz, CBD; die Cellulose-Bindungsdomäne; thrombin: Thrombin-Spaltstelle; EK: Enterokinase-Spaltstelle; S Tag: das RNase-S-Peptid-Tag; und LIC: ligationsunabhängige Klonierungsstelle.
- [0087] [Fig. 8](#) zeigt eine Photoemission in Abhängigkeit vom Salz und vom pH-Wert für eine *Gaussia*-Luciferase.
- [0088] [Fig. 9](#) zeigt ein Photoemissionsspektrum einer *Gaussia*-Luciferase.
- [0089] [Fig. 10](#) zeigt ein Photoemissionsspektrum einer *Pleuromamma*-Luciferase.
- [0090] [Fig. 11](#) veranschaulicht das dem Biolumineszenz-Resonanzenergie-Transfer (BRET) zugrunde liegende Prinzip und seine Verwendung als Sensor: A) im isolierten Zustand emittiert eine Luciferase, vorzugsweise eine Anthozooan-Luciferase, blaues Licht von dem Coelenterazin-abgeleiteten Chromophor; B) im isolierten Zustand emittiert ein GFP, vorzugsweise ein Anthozooan-GFP, das an die Luciferase bindet, die mit blau-grünem Licht angeregt wird, grünes Licht von seinem integralen Fluorophor auf Peptidbasis; C) wenn die Luciferase und das GFP in vivo oder in vitro zu einem Komplex assoziieren, überträgt die Luciferase nichtstrahlend ihre Reaktionsenergie auf das GFP-Fluorophor, das dann das grüne Licht emittiert. D) jede molekulare Wechselwirkung, die den Luciferase-GFP-Komplex unterbricht, kann quantitativ untersucht werden, indem die spektrale Verschiebung vom grünen Licht zum blauen Licht beobachtet wird.
- [0091] Es wird darauf hingewiesen, dass die *Gaussia*-Luciferase den Gegenstand der vorliegenden Erfindung bildet, während die *Renilla mulleri*-Luciferase und die *Pleuromamma*-Luciferase sowie das *Renilla*-GFP und das *Ptilosarcus*-GFP als Vergleichsbeispiele angegeben werden.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

INHALTSVERZEICHNIS

- A. DEFINITIONEN
- B. BIOLUMINESZENZ-ERZEUGENDE SYSTEME
 - 1. Beispielhafte Biolumineszenz-erzeugende Systeme
 - a. Allgemeine Beschreibung
 - (1) Luciferasen
 - (2) Luciferine
 - (3) Aktivatoren
 - (4) Reaktionen

- b. Ctenophor-Systeme
 - (1) Das Aequorin-System
 - (a) Aequorin und verwandte Photoproteine
 - (b) Luciferin
 - (2) Das Renilla-System
 - c. Crustaceen, vor allem Cypridina-Systeme
 - (1) Varguia-Luciferase
 - (a) Reinigung aus Cypridina
 - (b) Herstellung durch rekombinante Verfahren
 - (2) Vargula-Luciferin
 - (3) Reaktion
 - d. Insekten-Biolumineszenz-Systeme, eingeschlossen Leuchtkäfer, Schnellkäfer und anderes Insekten-system
 - (1) Luciferase
 - (2) Luciferin
 - (3) Reaktion
 - e. Bakterielle Systeme
 - (1) Luciferasen
 - (2) Luciferine
 - (3) Reaktionen
 - f. Andere Systeme
 - (1) Dinoflagellat-Biolumineszenz-erzeugende Systeme
 - (2) Systeme von Mollusken, wie Latia und Pholas
 - (3) Erdwürmer und andere Ringelwürmer
 - (4) Glühwürmchen
 - (5) Marine Polychaet-Wurmsysteme
 - (6) Südamerikanischer Railroadwurm
 - (7) Fische
 - g. Fluoreszierende Proteine
 - (1) Grün und blau fluoreszierende Proteine
 - (2) Phycobili-Proteine
- C. ISOLIERUNG UND IDENTIFIZIERUNG VON NUCLEINSÄUREN, DIE LUCIFERASEN CODIEREN
ISOLIERUNG UND IDENTIFIZIERUNG EINER NUCLEINSÄURE, DIE Gaussia-LUCIFERASE CODIERT
- 1. Isolierung von Proben aus der Gattung Gaussia
 - 2. Herstellung von Gaussia-cDNA-Expressionsbanken
 - 3. Isolierung und Identifizierung von DNA, die eine Gaussia-Luciferase codiert
- ISOLIERUNG UND IDENTIFIZIERUNG EINER NUCLEINSÄURE, DIE Renilla-PROTEINE CODIERT
- 1. Isolierung von Proben aus der Gattung Renilla
 - 2. Herstellung von Renilla- cDNA-Expressionsbanken
- a. RNA-Isolierung und cDNA-Synthese
 - b. Konstruktion von cDNA-Expressionsbanken
 - 3. Isolierung und Identifizierung von DNA, die Renilla-GFP codiert
 - 4. Isolierung und Identifizierung von DNA, die Renilla-Luciferase codiert
- D. NUCLEINSÄURESONDEN UND VERFAHREN ZUR ISOLIERUNG UND KLONIERUNG VON LUCIFERASE- und GFP-CODIERENDEN NUCLEINSÄUREN VON ANDEREN ARTEN
- Gaussia
- NUCLEINSÄURSONDEN UND VERFAHREN ZUR ISOLIERUNG UND KLONIERUNG VON GFP-CODIERENDEN NUCLEINSÄUREN VON ANDEREN ARTEN VON Renilla
- Andere Arten
- E. REKOMBINANTE EXPRESSION VON PROTEINEN
- Gaussia
- 1. DNA, die Gaussia-Proteine codiert
 - 2. DNA-Konstrukte für die rekombinante Erzeugung von Gaussia-Proteinen
 - 3. Wirtsorganismen für die rekombinante Erzeugung von Gaussia-Proteinen
 - 4. Verfahren für die rekombinante Erzeugung von Gaussia-Proteinen
- Renilla
- 1. DNA, die Renilla-Proteine codiert
 - 2. DNA-Konstrukte für die rekombinante Erzeugung von Renilla-Proteinen
 - 3. Wirtsorganismen für die rekombinante Erzeugung von Renilla-Proteinen
 - 4. Verfahren für die rekombinante Erzeugung von Gaussia-Proteinen

F. REKOMBINANTE ZELLEN, DIE EINE HETEROLOGE NUCLEINSÄURE EXPRIMIEREN, DIE LUCIFERASEN UND GFPs CODIEREN

Gaussia

REKOMBINANTE ZELLEN, DIE EINE HETEROLOGE NUCLEINSÄURE EXPRIMIEREN, DIE EIN GRÜN FLUORESZIERENDES PROTEIN UND/ODER EINE LUCIFERASE VON RENILLA CODIERT

G. Luciferasen

H. Renilla- und Ptilosarcus-GFPs

I. ZUSAMMENSETZUNGEN

1. Gaussia-Luciferase-Zusammensetzungen

2. Renilla-Luciferase-Zusammensetzungen

3. Renilla-GFP-Zusammensetzungen

4. Konjugate

a. Linker

b. Ansteuerungsmittel ("Targeting-Mittel")

Anti-Tumor-Antigen-Antikörper

Herstellung der Konjugate

5. Formulierung der Zusammensetzungen zur Verwendung in der

a. Die erste Zusammensetzung: Formulierung der Konjugat-Diagnose-Systeme

b. Die zweite Zusammensetzung

c. Durchführung der Reaktionen in Kombination mit Ansteuerungsmitteln

J. KOMBINATIONEN

K. ANWENDUNGSVERFAHREN

1. Verfahren für die Diagnose von Neoplasmen und anderer Gewebe

2. Verfahren für die Diagnose von Krankheiten

3. Verfahren für die Erzeugung von chimärem Renilla- oder Ptilosarcus-GFP-, Renilla-mulleri-Luciferase, Pleuromamma-Luciferase- und Gaussia-Luciferase-Fusionsproteinen.

4. Assays auf Zellbasis für die Identifizierung von Verbindungen

L. KITS

1. Ausgabe- und Verpackungsapparat für die Kombination mit dem GFP und den Komponenten des Biolumineszenz-Systems

2. Kapseln, Pellets, Liposomen, Endosomen, Vakuolen, mikronisierte Partikel

a. Verkapselungsvehikel im Allgemeinen

b. Verkapselungsvehikel – Liposomen

c. Verkapselungsvehikel – Gelatine und polymere Vehikel

d. Endosomen und Vakuolen

e. Mikrovisierte Partikel

3. Immobilisierte Systeme

a. Matrixmaterialien

b. Immobilisierung und Aktivierung

M. Biolumineszenz-Resonanzenergie-Transfer-System (BRET)

N. BEISPIELE

A. DEFINITIONEN

[0092] Sofern nicht anders definiert, haben alle hier verwendeten technischen und wissenschaftlichen Ausdrücke die gleiche Bedeutung wie die Ausdrücke üblicherweise vom Fachmann auf dem Gebiet, zu dem diese Erfindung gehört, verstanden werden. Alle Patente und Veröffentlichungen, auf die hier Bezug genommen wird, werden durch die Bezugnahme in ihrem vollständigen Umfang hier aufgenommen.

[0093] So wie der Begriff "Chemilumineszenz" hier verwendet wird, bezieht er sich auf eine chemische Reaktion, in der Energie spezifisch zu einem Molekül kanalisiert wird, was zu dessen elektronischer Anregung und anschließend zur Freisetzung eines Photons führt, so dass es zur Emission von sichtbarem Licht kommt. Die Temperatur trägt nicht zu dieser kanalisierten Energie bei. Chemilumineszenz ist demnach mit der direkten Umwandlung von chemischer Energie in Lichtenergie verbunden.

[0094] So wie der Begriff "Lumineszenz" hier verwendet wird, bezieht er sich auf die nachweisbare elektromagnetische (EM) Strahlung, im Allgemeinen UV-, IR- oder sichtbare EM-Strahlung, die erzeugt wird, wenn das angeregte Produkt eines exergonischen chemischen Prozesses unter Emission von Licht in seinen Grundzustand zurückkehrt. Die Chemilumineszenz ist eine Lumineszenz, die aus einer chemischen Reaktion resultiert. Die Biolumineszenz ist eine Chemilumineszenz, die aus einer chemischen Reaktion resultiert, bei der bi-

ologische Moleküle (oder synthetische Varianten oder Analoges davon) als Substrate und/oder Enzyme verwendet werden.

[0095] So wie der Begriff verwendet wird, bezieht sich "Biolumineszenz", die ein Typ der Chemilumineszenz ist, auf die Emission von Licht durch biologische Moleküle, vor allem Proteine. Die wesentliche Bedingung für Biolumineszenz ist molekularer Sauerstoff, entweder gebunden oder frei in Gegenwart einer Oxygenase, einer Luciferase, die auf das Substrat, ein Luciferin, einwirkt. Die Biolumineszenz wird durch ein Enzym oder ein anderes Protein (Luciferase) erzeugt, das eine Oxygenase ist, die auf ein Substrat Luciferin (ein Biolumineszenzsubstrat) in Gegenwart von molekularem Sauerstoff einwirkt und das Substrat in einen angeregten Zustand umwandelt, der bei der Rückkehr auf ein niedrigeres Energieniveau die Energie in der Form von Licht freisetzt.

[0096] So wie die Begriffe "Substrate bzw. Enzyme für die Erzeugung von Biolumineszenz" hier verwendet werden, beziehen sie sich gattungsgemäß auf Luciferin bzw. Luciferase. Wenn auf eine spezielle Molekülsorte davon Bezug genommen wird, wird aus Gründen der Klarheit jeder gattungsgemäße Begriff mit dem Namen des Organismus verwendet, von dem das Molekül abgeleitet ist, beispielsweise bakterielles Luciferin oder Leuchtkäfer-Luciferase.

[0097] So wie der Begriff "Luciferase" hier verwendet wird, bezieht er sich auf Oxygenasen, die eine lichtemittierende Reaktion katalysieren. Bakterielle Luciferasen katalysieren beispielsweise die Oxidation von Flavinmononucleotid (FMN) und aliphatischen Aldehyden, wobei diese Reaktion Licht erzeugt. Eine andere Klasse von Luciferasen, die unter den Meeresarthropoden gefunden wird, katalysiert die Oxidation von Cypridina (Vargula)-Luciferin, und eine andere Klasse von Luciferasen katalysiert die Oxidation von Coleoptera-Luciferin.

[0098] Luciferase bezieht sich demnach auf ein Enzym oder Photoprotein, das eine Biolumineszenzreaktion katalysiert (eine Reaktion, die Biolumineszenz erzeugt). Die Luciferasen, wie Leuchtkäfer- und Gaussia- und Renilla-Luciferase, sind Enzyme, die katalytisch wirken und während der Biolumineszenz-erzeugenden Reaktion unverändert bleiben. Die Luciferase-Photoproteine, wie das Aequorin-Photoprotein, an die das Luciferin nicht kovalent gebunden ist, werden verändert, wie durch die Freisetzung des Luciferins während der Biolumineszenz-erzeugenden Reaktion. Die Luciferase ist ein Protein, das natürlich in einem Organismus oder in einer Variante oder einer Mutante davon vorkommt, wie einer abweichenden Form bzw. Variante, die durch Mutagenese erzeugt wird, die eine oder mehrere Eigenschaften, wie Wärmestabilität, hat, die verschieden von den Eigenschaften des natürlich vorkommenden Proteins sind. Luciferasen und modifizierte Mutanten oder abweichende Formen davon sind wohlbekannt. Für die Zwecke hier bedeutet die Bezugnahme auf eine Luciferase die Bezugnahme entweder auf die Photoproteine oder die Luciferasen.

[0099] Bei der Bezugnahme beispielsweise auf "Gaussia-Luciferase" geht es um ein Enzym, das aus einer Art der Gattung Gaussia isoliert wurde, oder ein äquivalentes Molekül, das von einer beliebigen anderen Quelle erhalten wird, wie von einem anderen verwandten Copepoden, oder das synthetisch hergestellt wurde. Es ist beabsichtigt, Gaussia-Luciferasen mit konservativen Aminosäuresubstitutionen einzuschließen, die die Aktivität nicht wesentlich verändern. Geeignete konservative Substitutionen von Aminosäuren sind dem Fachmann bekannt und können im Allgemeinen ohne Veränderung der biologischen Aktivität des resultierenden Moleküls erzeugt werden. Der Fachmann weiß dass einzelne Aminosäuresubstitutionen in nicht essentiellen Regionen eines Polypeptids die biologische Aktivität im Allgemeinen nicht verändern (siehe z. B. Watson et al., Molecular Biology of the Gene, 4. Auflage, 1987, The Bejacmin/Cummings. Pub. Co., S. 224).

[0100] Der Begriff "Renilla-GFP" bezieht sich auf die GFPs aus der Gattung Renilla und auf die Mutanten oder Varianten davon. Es ist beabsichtigt, die Renilla-GFPs mit konservativen Aminosäuresubstitutionen, die die Aktivität nicht wesentlich verändern, einzuschließen.

[0101] Diese Substitutionen werden vorzugsweise denjenigen Substitutionen gemäß durchgeführt, die in der folgenden TABELLE 1 offenbart werden.

TABELLE 1

Ursprünglicher Rest	Konservative Substitution
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys
Asn (N)	Gln; His
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Ala; Pro
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; Gln; Glu
Met (M)	Leu; Tyr; Ile
Phe (F)	Met; Leu; Tyr
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

[0102] Andere Substitutionen sind ebenfalls zulässig und können empirisch oder gemäß den bekannten konservativen Substitutionen ermittelt werden.

[0103] Die Luciferasen und Luciferin und die Aktivatoren davon werden als Biolumineszenz-erzeugende Reagenzien oder Komponenten bezeichnet. Typischerweise wird eine Teilmenge dieser Reagenzien bereitgestellt oder mit einem Herstellungsgegenstand kombiniert. Die Biolumineszenz wird beim Inkontaktbringen der Kombination mit den übrigen Reagenzien erzeugt. Somit werden, wie hier verwendet, die Komponenten Luciferasen, Luciferine und andere Faktoren, wie O_2 , Mg^{2+} , Ca^{2+} auch als Biolumineszenz-erzeugende Reagenzien (oder Mittel oder Komponenten) bezeichnet.

[0104] So wie der Begriff "Biolumineszenzsubstrat" hier verwendet wird, bezieht er sich auf die Verbindung, die in Gegenwart einer Luciferase und jedes sonstigen erforderlichen Aktivators oxidiert wird und Licht erzeugt. Diese Substrate werden hier als Luciferine bezeichnet, und sie sind Substrate, die in einer Biolumineszenzreaktion oxidiert werden. Diese Biolumineszenzsubstrate schließen jedes beliebige Luciferin oder Analogon davon oder jede synthetische Verbindung ein, die mit einer Luciferase unter Erzeugung von Licht in Wechselwirkung tritt. Bevorzugte Substrate sind diejenigen, die in Gegenwart einer Luciferase oder eines Proteins in einer lichterzeugenden Reaktion oxidiert werden. Die Biolumineszenzsubstrate schließen somit diejenigen Verbindungen ein, die der Fachmann als Luciferine kennt. Die Luciferine schließen beispielsweise das Leuchtkäfer-Luciferin, Cypridina-Luciferin (auch bekannt als Vargula-Luciferin) (Coelenterazin), bakterielles Luciferin sowie synthetische Analoga dieser Substrate oder andere Verbindungen ein, die in Gegenwart einer Luciferase in einer Reaktion unter Erzeugung von Biolumineszenz oxidiert werden.

[0105] So wie der Ausdruck "befähigt zur Umwandlung in ein Biolumineszenz-Substrat" hier verwendet wird, bedeutet er die Eignung für chemische Reaktionen, wie eine Oxidation oder Reduktion, die ein Biolumineszenzsubstrat liefert. Die Lumineszenz-erzeugende Reaktion von Biolumineszenz-Bakterien schließt beispielsweise die Reduktion einer Flavinmononucleotid-Gruppe (FMN) zu reduziertem Flavinmononucleotid ($FMNH_2$) durch ein Flavinreduktase-Enzym ein. Das reduzierte Flavinmononucleotid (Substrat) reagiert dann mit Sauerstoff (einem Aktivator) und bakterieller Luciferase, um ein Peroxyflavin als Zwischenprodukt zu bilden, das in Gegenwart eines langkettigen Aldehyds weitere Reaktionen durchläuft, wobei Licht erzeugt wird. In Bezug auf diese Reaktion sind das reduzierte Flavin und der langkettige Aldehyd die Substrate.

[0106] So wie der Begriff "Biolumineszenz-erzeugendes System" hier verwendet wird, bezieht er sich auf den Satz von Reagenzien, die benötigt werden, um eine Biolumineszenzreaktion durchzuführen. Somit bilden die spezielle Luciferase, das Luciferin und andere Substrate, Lösemittel und andere Reagenzien, die erforderlich sein können, um eine Biolumineszenzreaktion auszuführen, ein Biolumineszenzsystem. Ein Biolumineszenz-erzeugendes System bezieht sich somit auf jeden beliebigen Satz von Reagenzien, die unter geeigneten Reaktionsbedingungen eine Biolumineszenz liefern. Der Begriff "geeignete Reaktionsbedingungen" bezieht sich auf die Bedingungen, die erforderlich sind, damit eine Biolumineszenzreaktion stattfindet, wie pH-Wert, Salz-

konzentrationen und Temperatur. Im Allgemeinen schließen Biolumineszenzsysteme ein Biolumineszenz-Substrat, ein Luciferin, eine Luciferase, die die Enzyme Luciferasen und Photoproteine einschließt, und einen oder mehrere Aktivator ein. Ein spezielles Biolumineszenzsystem kann durch die Bezugnahme auf den speziellen Organismus gekennzeichnet werden, von dem die Luciferase abstammt; Das Vargula-Biolumineszenzsystem (Vargula wird auch als Cypridina bezeichnet) (oder Vargula-System) schließt beispielsweise eine Vargula-Luciferase, wie eine Luciferase, die aus dem Ostracod Vargula isoliert wurde oder die unter Verwendung von Rekombinationstechniken erzeugt wurde, oder Abwandlungen dieser Luciferasen ein. Dieses System würde auch die speziellen Aktivator ein schließen, die für die Ausführung der Biolumineszenzreaktion erforderlich sind, wie Sauerstoff und ein Substrat, mit dem die Luciferase in Gegenwart des Sauerstoffs unter Erzeugung von Licht reagiert.

[0107] Die hier bereitgestellten Luciferasen können in Biolumineszenz-erzeugende Systeme eingebracht werden und soweit erforderlich mit den GFPs, die hier bereitgestellt werden, oder mit anderen GFPs verwendet werden. Ähnlich können die hier bereitgestellten GFPs mit bekannten Biolumineszenz-erzeugenden Systemen verwendet werden.

[0108] Wie hier verwendet, werden die Aminosäuren, die in den verschiedenen hier erscheinenden Aminosäuresequenzen vorkommen, gemäß ihren allgemein bekannten Dreibuchstaben- oder Einbuchstabeabkürzungen bezeichnet. Die Nucleotide, die in den verschiedenen DNA-Fragmenten vorkommen, werden mit ihren Standardeinbuchstabenbezeichnungen, die routinemäßig auf dem Fachgebiet verwendet werden, bezeichnet.

[0109] So wie der Begriff "fluoreszierendes Protein" hier verwendet wird, bezieht er sich auf ein Protein, das die Fähigkeit besitzt, zu fluoreszieren (d. h. Energie bei einer Wellenlänge zu absorbieren und sie bei einer anderen Wellenlänge zu emittieren). Diese Proteine können als fluoreszierende Label oder Marker und in beliebigen Anwendungen verwendet werden, in denen derartige Label verwendet werden, wie Immunoassays, CRET-, FRET- und FET-Assays, und in den Assays, die hier als BRET-Assays bezeichnet werden. Ein grün fluoreszierendes Protein bezieht sich beispielsweise auf ein Polypeptid, das in seinem Emissionsspektrum einen Peak bei etwa 510 nm hat.

[0110] So wie der Begriff "BRET" (Biolumineszenz-Resonanzenergie-Transfer) hier verwendet wird, bezieht er sich auf einen nicht strahlenden Energietransfer von der Luciferase auf das FP. Er unterscheidet sich vom "FRET" (Fluoreszenz-Resonanzenergie-Transfer), der historisch für den Energietransfer zwischen chemischen Fluoren verwendet wurde, seit kurzem aber für den Energietransfer zwischen spektralen Aequorea-GFP-Varianten verwendet wird.

[0111] So wie der Begriff "BRET-System" hier verwendet wird, bezieht er sich auf die Kombination eines FP mit einer Luciferase für den Resonanzenergie-Transfer, und BRET bezieht sich auf jedes Verfahren, in dem die Luciferase verwendet wird, um das Licht durch die Umsetzung mit einem Luciferin zu erzeugen, das dann nicht strahlend auf ein FP übertragen wird. Die Energie wird auf ein FP, vor allem ein GFP, übertragen, das die Energie fokussiert und verschiebt und sie bei einer anderen Wellenlänge emittiert. In bevorzugten Ausführungsformen schließt das BRET-System ein Biolumineszenz-erzeugendes System und ein GFP aus der selben Quelle wie die Luciferase in dem System ein. Ein bevorzugtes Paar bilden eine Renilla-Luciferase und ein Renilla-GFP, die in einer spezifischen Wechselwirkung treten. Veränderungen in der Bindung äußern sich in Veränderungen in den Emissionsspektren des Lichts, das von der Luciferase erzeugt wird. Im Ergebnis kann das Paar als ein Sensor für externe Ereignisse funktionieren.

[0112] So wie der Begriff "Biosensor" (oder "Sensor") hier verwendet wird, bezieht er sich auf ein BRET-System, das verwendet wird, um Veränderungen in einer Umgebung in vitro oder in vivo nachzuweisen, in der das BRET-System verwendet wird.

[0113] So wie der Ausdruck "nicht streng katalytisch" hier verwendet wird, bedeutet er, dass das Photoprotein als Katalysator wirkt, der die Oxidation des Substrats fördert, dass es jedoch bei der Reaktion verändert wird, da das gebundene Substrat oxidiert wird und da in der Reaktion gebundener molekularer Sauerstoff verwendet wird. Derartige Photoproteine werden durch die Zugabe vom Substrat und von molekularem Sauerstoff unter geeigneten Bedingungen, die dem Fachmann bekannt sind, regeneriert.

[0114] So wie der Begriff "Nucleinsäuresonde" hier verwendet wird, handelt es sich hierbei um eine einzelsträngige DNA oder RNA, die eine Nucleotidsequenz aufweist, die mindestens 14 zusammenhängende Base, vorzugsweise mindestens 16, typischerweise etwa 30 zusammenhängende Basen aufweist, die identisch sind mit (oder Gegenstück zu) beliebigen 14 oder mehr als 14 zusammenhängenden Basen, die in einer der SEQ

ID NO, vor allem in SEQ ID NO: 15, 19, 21, 28, 30, 31, offenbart sind, und auch eine Nucleinsäure, die irgendeines der Peptide in den SEQ ID NO: 23–27 codiert. Zu den bevorzugten Regionen, aus denen die Sonden konstruiert werden sollen, gehören 5'- und 3'-codierende Sequenzen, bei denen es sich um Sequenzen handelt, für die vorhergesagt wird, dass sie Regionen codieren, die unter den Renilla-Arten konserviert sind. Sonden von Regionen, die unter den GFPs der Renilla-Arten konserviert sind, sind für das Isolieren der GFP-codierenden Nucleinsäure aus Renilla-Genbanken vorgesehen.

[0115] Die Nucleinsäuresonden können entartete Sonden von mindestens 14 Nucleotiden, vorzugsweise 16 bis 30 Nucleotiden, sein, die auf den Aminosäuren 51 bis 68, 82 bis 98 und 198 bis 208, die in SEQ ID NO: 16 offenbart werden, der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID No: 24 offenbart wird, den Aminosäuren 9–20, die in SEQ ID NO: 25 offenbart werden, und den Aminosäuren 39–53, die in SEQ ID NO: 27 offenbart werden, basieren. Die Nucleinsäuresonden, die die oben beschriebenen Aminosäureregionen codieren, werden unter den Nucleotidsequenzen ausgewählt, die diese Regionen codieren, die in SEQ ID NO: 15 offenbart werden.

[0116] Die Nucleinsäuresonden können entartete Sonden von mindestens 14 Nucleotiden, vorzugsweise 16 bis 30 Nucleotiden, sein, die auf den Aminosäuren basieren, die in SEQ ID NO: 20 offenbart werden. Die Nucleinsäuresonden, die die oben beschriebenen Aminosäureregionen codieren, werden unter den Nucleotidsequenzen ausgewählt, die diese Regionen codieren, die in SEQ ID NO: 19 offenbart werden.

[0117] So wie er Begriff "Vektor" (oder "Plasmid") hier verwendet wird, bezieht er sich auf eigenständige Elemente, die verwendet werden, um eine heterologe DNA entweder für deren Expression oder deren Replikation in Zellen einzubringen. Auswahl und Verwendung derartiger Vehikel gehören zum allgemeinen Fachwissen des Fachmanns. Ein Expressionsvektor schließt die Vektoren ein, die imstande sind, DNAs zu exprimieren, die funktionsfähig mit regulatorischen Sequenzen, wie Promotorregionen, verknüpft sind, die imstande sind, die Expression derartiger DNA-Fragmente herbeizuführen. Somit bezieht sich der Begriff "Expressionsvektor" auf ein rekombinantes DNA- oder RNA-Konstrukt, wie ein Plasmid, einen Phagen, ein rekombinantes Virus oder einen anderen Vektor, das nach dem Einbringen in eine geeignete Wirtszelle zur Expression der klonierten DNA führt. Geeignete Expressionsvektoren sind dem Fachmann wohlbekannt und schließen diejenigen ein, die in eukaryotischen Zellen und/oder prokaryotischen Zellen replizierbar sind, und diejenigen, die episomal bleiben, oder diejenigen, die sich in das Genom der Wirtszelle integrieren. Derzeit bevorzugte Plasmide für die Expression einer *Gussia*-Luciferase, eines Renilla-GFPs oder eines Renilla-Luciferase sind diejenigen, die in Bakterien und Hefe exprimiert werden, wie diejenigen, die hier beschrieben werden.

[0118] So wie hier die Begriff "Promotorregion" oder "Promotorelement" verwendet werden, beziehen sie sich auf ein DNA- oder RNA-Segment, das die Transkription der DNA oder der RNA, mit der es funktionsfähig verbunden ist, kontrolliert. Die Promotorregion schließt spezifische Sequenzen ein, die ausreichend sind für die RNA-Polymerase-Erkennung, das Binden und die Initiierung der Transkription. Dieser Bereich der Promotorregion wird als der Promotor bezeichnet. Zusätzlich schließt die Promotorregion Sequenzen ein, die diese Aktivitäten der Erkennung, der Bindung und der Initiierung der Transkription der RNA-Polymerase modulieren. Diese Sequenzen können cis-wirkend sein, oder sie können verantwortlich für trans-wirkende Faktoren sein. Promotoren können in Abhängigkeit von der Art der Regulation konstitutiv oder reguliert sein. Beispielhafte Promotoren, die für die Verwendung in Prokaryoten vorgesehen sind, schließen die Promotoren der Bakteriophagen T7 und T3 und dergleichen ein.

[0119] So wie die Ausdrücke "funktionsfähig verknüpft" oder "funktionsfähig kombiniert" hier verwendet werden, beziehen sie sich auf den funktionellen Zusammenhang zwischen der DNA und den regulatorischen Sequenzen und Effektor-Sequenzen von Nucleotiden, wie Promotoren, Verstärkern, Transkriptions- und Translationsstopstellen, und anderen Signalsequenzen. Die "funktionsfähige Verknüpfung" von DNA mit einem Promotor bezieht sich beispielsweise auf die physikalische und funktionelle Beziehung zwischen der DNA und dem Promotor, die so ist, dass die Transkription einer derartigen DNA von dem Promotor durch eine RNA-Polymerase initiiert wird, die spezifisch die DNA erkennt, daran bindet und sie transkribiert. Für die Optimierung der Expression und/oder die in vitro-Transkription kann es erforderlich sein, 5'-nicht translatierte Bereiche der Klone zu entfernen, hinzuzufügen oder zu verändern, um zusätzliche potentiell unpassende alternative Translationsinitiierungscodons (d. h. Startcodons) oder andere Sequenzen zu entfernen, die die Expression stören oder sie verringern können, entweder auf dem Niveau der Transkription oder der Translation. Alternativ können Konsensus-Ribosomenbindungsstellen (siehe z. B. Kozak (1991) J. Biol Chem. 266: 19867–19870) unmittelbar 5' des Startcodons inseriert werden, die die Expression verstärken können. Die Gewünschtheit (oder die Notwendigkeit) einer derartigen Abwandlung kann empirisch ermittelt werden.

[0120] So wie der Ausdruck "Ausrichten bzw. Adressieren einer ausgerichteten Substanz (targeted agent)",

wie einer Luciferase, verwendet wird, bedeutet er, die Substanz zielgerichtet zu einer Zelle zu lenken, die einen ausgewählten Rezeptor oder ein sonstiges Zelloberflächenprotein exprimiert, indem die Substanz mit einem derartigen Mittel verknüpft wird. Infolge des Bindens der ausgerichteten Substanz an oder ihrer Wechselwirkung mit dem Rezeptor oder dem Zelloberflächenprotein kann sie mit einem geeigneten Substrat und aktivierenden Stoffen umgesetzt werden, wodurch Biolumineszenzlicht erzeugt wird und das tumoröse Gewebe oder tumoröse Zellen von nicht tumorösem Gewebe unterschieden wird/werden.

[0121] So wie der Begriff "wirksame Menge einer Verbindung für die Behandlung einer speziellen Krankheit" hier verwendet wird, bedeutet er eine Menge, die ausreicht, um die Symptome, die mit dieser Krankheit verbunden sind, zu verbessern oder in irgendeiner Weise zu reduzieren. Eine derartige Menge kann in Form einer einzigen Dosis verabreicht werden, oder sie kann nach einem Einnahmeplan verabreicht werden, wodurch sie wirksam ist. Die Menge kann die Krankheit heilen, sie wird jedoch typischerweise verabreicht, um die Symptome der Krankheit zu lindern. Die wiederholte Verabreichung kann erforderlich sein, um die gewünschte Linderung der Symptome zu erreichen.

[0122] So wie der Begriff "wirksame Menge eines Konjugats für die Diagnose einer Krankheit" hier verwendet wird, bedeutet er eine Menge, die dazu führt, dass ein Gewebe nachgewiesen werden kann. Die Gewebe werden durch das Sichtbarmachen entweder ohne Hilfe eines Detektors, der empfindlicher als das menschliche Auge ist, oder unter Verwendung einer Lichtquelle, um beliebige fluoreszierende Produkte anzuregen, nachgewiesen.

[0123] So wie der Begriff "sichtbar machbar" hier verwendet wird, bedeutet er die Nachweisbarkeit mit dem Auge, vor allem während eines chirurgischen Eingriffs unter normalen chirurgischen Bedingungen, oder erforderlichenfalls bei leicht abgeblendetem Licht.

[0124] So wie der Begriff "pharmazeutisch akzeptable Salze, Ester oder Derivate der Konjugate" hier verwendet wird, schließt er beliebige Salze, Ester oder andere Derivate ein, die vom Fachmann unter Verwendung bekannter Verfahren, wie der Derivatisierung, leicht hergestellt werden können und die Verbindungen ergeben, die Tieren oder Menschen ohne wesentliche toxische Auswirkungen verabreicht werden können und die entweder pharmazeutisch wirksam sind oder Pro-Pharmaka darstellen.

[0125] So wie der Begriff "Behandlung" hier verwendet wird, bedeutet er jeden Weg, auf dem die Symptome eines Zustands, einer Störung oder einer Krankheit verbessert werden oder sonst wie günstig verändert werden. Die Behandlung schließt auch jede pharmazeutische Verwendung der hier beschriebenen Zusammensetzungen ein.

[0126] So wie der Begriff "Verbesserung der Symptome eines speziellen Leidens durch die Verabreichung einer speziellen pharmazeutischen Verbindung" hier verwendet wird, bezieht er sich auf jede beliebige Verminderung, ob nun dauerhaft oder vorübergehend, nachhaltig oder transient, die der Verabreichung der Zusammensetzung zugeschrieben oder mit ihr in Verbindung gebracht werden kann.

[0127] So wie der Ausdruck "im Wesentlichen rein" hier verwendet wird, bedeutet er ausreichend homogen, um frei von leicht nachweisbaren Verunreinigungen zu erscheinen, die durch Standardanalyseverfahren nachgewiesen werden, wie Dünnschichtchromatographie (TLC), Gelelektrophorese und Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC), die vom Fachmann verwendet werden, um eine derartigen Reinheit zu ermitteln, oder so ausreichend rein, dass die weitere Reinigung die physikalischen und chemischen Eigenschaften, wie enzymatische und biologische Aktivitäten, der Substanz nicht nachweisbar verändern würde. Verfahren für die Reinigung der Verbindungen zur Erzeugung von im Wesentlichen chemisch reinen Verbindungen sind dem Fachmann bekannt. Eine im Wesentlichen chemisch reine Verbindung kann jedoch ein Gemisch von Stereoisomeren oder Isomeren sein. In derartigen Fällen könnte die weitere Reinigung die spezifische Aktivität der Verbindung erhöhen.

[0128] So wie der Begriff "Pro-Pharmakon" hier verwendet wird, handelt es sich um eine Verbindung, die bei der in vivo-Verabreichung zu der biologisch, pharmazeutisch oder therapeutisch aktiven Form der Verbindung metabolisiert oder anderswie umgewandelt wird. Für die Erzeugung eines Pro-Pharmakons wird die pharmazeutisch aktive Verbindung so verändert, dass die aktive Verbindung durch metabolische Prozesse regeneriert wird. Das Pro-Pharmakon kann so entworfen sein, dass es die metabolische Stabilität oder die Transporteigenschaften eines Arzneimittels verändert, dass Nebenwirkungen oder eine Toxizität maskiert werden, dass der Geschmack eines Arzneimittels verbessert wird oder andere Merkmale oder Eigenschaften eines Arzneimittels verbessert werden. Auf Grund des Wissens über pharmakodynamische Vorgänge und die in vivo-Metabo-

lisierung von Arzneimitteln kann der Fachmann, sobald eine pharmazeutisch aktive Verbindung bekannt ist, Pro-Pharmaka der Verbindung entwerfen (siehe z. B. Nogrady (1985) Medicinal Chemistry A Biological Approach, Oxford University Press, New York, Seiten 388–392).

[0129] So wie der Begriff "biologische Aktivität" hier verwendet wird, bezieht er sich auf die in vivo-Aktivitäten einer Verbindung oder die physiologischen Antworten, die aus einer in vivo-Verabreichung einer Verbindung, einer Zusammensetzung oder eines anderen Gemischs resultieren. Die biologische Aktivität schließt somit therapeutische Effekte und die pharmazeutische Aktivität solcher Verbindungen, Zusammensetzungen und Gemische ein. Biologische Aktivitäten können in vitro-Systemen beobachtet werden, die für das Testen oder die Anwendung derartiger Aktivitäten entwickelt worden sind. Für die Zwecke hier ist daher die biologische Aktivität einer Luciferase ihre Oxygenase-Aktivität, durch, die infolge der Oxidation eines Substrats, Licht erzeugt wird.

[0130] So wie der Begriff "Ansteuerungsmittel" (Targeting-Mittel) hier verwendet wird, bezieht er sich auf ein Mittel, das eine damit verknüpfte ausgerichtete Substanz, ein Luciferin oder eine Luciferase, spezifisch oder bevorzugt auf eine neoplastische Zelle oder ein neoplastisches Gewebe zielgerichtet ausrichtet.

[0131] So wie der Begriff "Tumorantigen" hier verwendet wird, bezieht er sich auf ein Zelloberflächenprotein, das auf der Oberfläche von Tumorzellen exprimiert wird oder dort lokalisiert ist.

[0132] So wie der Begriff "neoplastische Zellen" hier verwendet wird, schließt er jeden Typ von transformierten oder veränderten Zellen ein, die Eigenschaften zeigen, die typisch für transformierte Zellen sind, wie das Fehlen einer Kontakthemmung und das Erwerben von tumorspezifischen Antigenen. Derartige Zellen schließen Leukämiezellen und Zellen, die von einem Tumor abgeleitet sind, ein, sind jedoch nicht auf diese Zellen beschränkt.

[0133] So wie der Begriff "neoplastische Krankheit" hier verwendet wird, handelt es sich hierbei um jede beliebige Krankheit, in der neoplastische Zellen in dem Individuum, das von der Krankheit betroffen ist, vorhanden sind. Derartige Krankheiten schließen alle Krankheiten ein, die als Krebs charakterisiert werden.

[0134] So wie der Begriff "metastatische Tumore" hier verwendet wird, bezieht er sich auf Tumore, die nicht an einer Stelle lokalisiert sind.

[0135] So wie der Begriff "Spezialgewebe" hier verwendet wird, bezieht er sich auf nicht tumoröses Gewebe, über das Informationen hinsichtlich seiner Lokalisierung gewünscht sind. Derartige Gewebe schließen beispielsweise endometriotisches Gewebe, ektopische Schwangerschaften, Gewebe, die mit bestimmten Störungen und Myopathien oder Pathologien zusammenhängen, ein.

[0136] So wie der Begriff "Rezeptor" hier verwendet wird, bezieht er sich auf ein Molekül, das eine Affinität für einen gegebenen Liganden hat. Rezeptoren können natürlich vorkommende oder synthetische Moleküle sein. Rezeptoren können auf dem Fachgebiet auch als Anti-Liganden bezeichnet werden. So wie sie hier verwendet werden, sind die Begriffe Rezeptor und Anti-Ligand austauschbar. Rezeptoren können in ihrem unveränderten Zustand oder als Aggregate mit anderen Molekülsorten verwendet werden. Rezeptoren können kovalent oder nicht kovalent an einem Bindungselement befestigt sein, oder sich damit in physikalischem Kontakt befinden, entweder direkt oder indirekt über eine spezifische Bindungssubstanz oder einen spezifischen Linker. Beispiele für Rezeptoren schließen nicht einschränkend ein: Antikörper, Zellmembranrezeptoren, Oberflächenrezeptoren und internalisierende Rezeptoren, monoklonale Antikörper und Antiseren, die mit spezifischen Antigen-determinanten reaktiv sind (wie gegenüber Viren, Zellen oder anderen Materialien), Arzneimittel, Polynucleotide, Nucleinsäuren, Peptide, Cofaktoren, Lektine, Zucker, Polysaccharide, Zellen, Zellmembranen und Organellen ein.

[0137] Beispiele für Rezeptoren und Anwendungen unter Verwendung derartiger Rezeptoren schließen nicht einschränkend ein:

- a) Enzyme: spezifische Transportproteine oder Enzyme, die für das Überleben von Mikroorganismen wesentlich sind, die als Ziele für die antibiotische Selektion (Ligand) dienen können;
- b) Antikörper: die Identifizierung einer Liganden-bindenden Stelle auf dem Antikörpermolekül, die mit dem Epitop eines interessierenden Antigens kombiniert, kann untersucht werden, die Bestimmung einer Sequenz, die ein antigenes Epitop imitiert, kann zur Entwicklung von Impfstoffen führen, bei dem das Immunogen auf einer oder mehreren derartigen Sequenzen basiert, oder kann zur Entwicklung von verwandten diagnostischen Mitteln oder Verbindungen führen, die bei therapeutischen Behandlungen, wie von Autoim-

munerkrankungen, brauchbar sind.

c) Nucleinsäuren: Identifizierung eines Liganden, wie eines Proteins oder einer RNA, für Bindungsstellen.

d) katalytische Polypeptide: Polymere, vorzugsweise Polypeptide, die imstande sind, eine chemische Reaktion zu fördern, die die Umwandlung eines oder mehrerer Reaktanden in ein oder mehrere Produkte einschließt; derartige Polypeptide umfassen im Allgemeinen eine Bindungsstelle, die spezifisch für mindestens einen Reaktanden oder ein Reaktionszwischenprodukt ist, und eine aktive Funktionalität benachbart zu der Bindungsstelle, worin die Funktionalität imstande ist, den gebundenen Reaktanden chemisch zu verändern. [siehe z. B. U.S.-Patent Nr. 5,215,899];

e) Hormonrezeptoren: die Ermittlung der Liganden, die mit einer hohen Affinität an einen Rezeptor binden, ist nützlich für die Entwicklung von Hormonersatztherapien; die Identifizierung von Liganden, die an derartige Rezeptoren binden, kann beispielsweise zur Entwicklung von Arzneimitteln für die Kontrolle des Blutdrucks führen.

f) Opiatrezeptoren: die Ermittlung der Liganden, die an die Opiatrezeptoren im Gehirn binden, ist nützlich für die Entwicklung von weniger süchtig machenden Ersatzstoffen für Morphin und verwandte Arzneimittel.

[0138] So wie der Begriff "Antikörper" hier verwendet wird, schließt er Antikörperfragmente, wie Fab-Fragmente, ein, die aus einer leichten Kette und dem variablen Bereich einer schweren Kette zusammengesetzt sind.

[0139] So wie der Begriff "Antikörper-Konjugat" verwendet wird, bezieht er sich auf ein Konjugat, in dem das Ansteuerungsmittel ein Antikörper ist.

[0140] So wie der Begriff "Antikörperaktivierung" hier verwendet wird, bezieht er sich auf den Vorgang, durch den aktivierte Antikörper erzeugt werden. Antikörper werden durch die Umsetzung mit einem Linker, wie einem heterobifunktionellen Reagens, aktiviert.

[0141] So wie der Begriff "chirurgisches Betrachten" hier verwendet wird, bezieht er sich auf jedes Verfahren, bei dem in dem Körper eines Tieres eine Öffnung erzeugt wird. Derartige Verfahren schließen herkömmliche chirurgische Eingriffe und diagnostische Verfahren ein, wie Laparoskopien und arthroskopische Verfahren.

[0142] So wie der Begriff "humanisierte Antikörper" hier verwendet wird, bezieht er sich auf Antikörper, die so verändert sind, dass sie "humane" Aminosäuresequenzen einschließen, damit die Verabreichung beim Menschen keine Immunantwort auslöst. Verfahren für die Herstellung derartiger Antikörper sind bekannt. Das Hybridom, das den monoklonalen Antikörper exprimiert, wird beispielsweise durch rekombinante DNA-Techniken so verändert, dass es einen Antikörper exprimiert, in dem die Aminosäurezusammensetzung der nicht variablen Regionen auf humanen Antikörpern basiert. Es sind Computerprogramme entwickelt worden, um derartige Regionen zu identifizieren.

[0143] So wie die Begriffe "ATP, AMP, NAD⁺ und NADH" hier verwendet werden, beziehen sie sich auf Adenosintriphosphat, Adenosinmonophosphat, Nicotinamidadenindinucleotid (oxidierte Form) bzw. Nicotinamidadenindinucleotid (reduzierte Form).

[0144] So wie der Ausdruck "Herstellung durch rekombinante Mittel unter Verwendung von rekombinanten DNA-Verfahren" hier verwendet wird, bedeutet er die Anwendung der wohlbekannten Verfahren der Molekularbiologie für die Expression von Proteinen, die von klonierter DNA codiert werden.

[0145] So wie der Ausdruck "im Wesentlichen identisch mit einem Produkt" hier verwendet wird, bedeutet er so ausreichend ähnlich, dass die interessierende Eigenschaft ausreichend unverändert ist, so dass das im Wesentlichen identische Produkt anstelle des Produkts verwendet werden kann.

[0146] So wie der Begriff "äquivalent" hier verwendet wird, wenn es um zwei Nucleinsäuresequenzen geht, bedeutet er, dass die beiden besagten Sequenzen die gleiche Aminosäuresequenz oder äquivalente Protein codieren. Wenn der Begriff "äquivalent" verwendet wird, um auf zwei Proteine oder Peptide zu verweisen, bedeutet er, dass die beiden Proteine oder Peptide eine im Wesentlichen gleiche Aminosäuresequenz abschließend mit konservativen Aminosäuresubstitutionen haben (siehe z. B. Tabelle 1 weiter oben), die die Aktivität oder die Funktion des Proteins oder Peptids nicht wesentlich verändern. Wenn sich "äquivalent" auf eine Eigenschaft bezieht, muss die Eigenschaft nicht im gleichen Ausmaß vorhanden sein (z. B. können zwei Peptide verschiedene Geschwindigkeiten des gleichen Typs einer enzymatischen Aktivität zeigen), aber die Aktivitäten sind vorzugsweise im Wesentlichen gleich. "Komplementär" bedeutet, wenn sich der Begriff auf zwei Nucleotidsequenzen bezieht, dass die beiden Nucleotidsequenzen imstande sind, zu hybridieren, vorzugs-

weise mit weniger als 25%, noch bevorzugter mit weniger als 15%, noch bevorzugter mit weniger als 5% und am bevorzugtesten ohne falsche Basenpaarungen zwischen gegenüberliegenden Nucleotiden. Die beiden Moleküle hybridisieren vorzugsweise unter hohen Stringenzbedingungen.

[0147] Wie hier verwendet ist die Stringenz der Hybridisierung bei der Bestimmung des prozentualen Anteils falscher Basenpaarungen wie folgt:

- 1) hohe Stringenz: $0,1 \times \text{SSPE}$, $0,1\%$ SDS, 65°C
- 2) mittlere Stringenz: $0,2 \times \text{SSPE}$, $0,1\%$ SDS, 50°C
- 3) niedrige Stringenz: $1,0 \times \text{SSPE}$, $0,1\%$ SDS, 50°C

[0148] Offensichtlich können äquivalente Stringenzen unter Verwendung alternativer Puffer, Salze und Temperaturen erzielt werden.

[0149] Der Ausdruck "im Wesentlichen" identisch oder homolog oder ähnlich variiert mit dem Zusammenhang, wie er vom Fachmann auf dem relevanten Fachgebiet verstanden wird, und er bedeutet im Allgemeinen mindestens 70%, vorzugsweise mindestens 80%, noch bevorzugter mindestens 90% und am bevorzugtesten mindestens 95% Identität.

[0150] So wie der Begriff "Zusammensetzung" hier verwendet wird, bezieht er sich auf jedes beliebige Gemisch. Es kann sich um eine Lösung, eine Suspension, eine Flüssigkeit, ein Pulver, eine Paste, wässrig, nicht wässrig, oder jede Kombination davon handeln.

[0151] So wie der Begriff "Kombination" hier verwendet wird, bezieht er sich auf jede beliebige Vereinigung von zwei oder mehr als zwei Einheiten oder Artikeln.

[0152] So wie der Begriff "Fluid" hier verwendet wird, bezieht er sich auf jede Zusammensetzung, die zu fließen vermag. Fluide umfassen demnach Zusammensetzungen, die in Form von halbfesten Stoffen, Pasten, Lösungen, wässrigen Gemischen, Gelen, Lotionen, Cremes und anderen derartigen Zusammensetzungen vorliegen.

[0153] Beispiele für Rezeptoren und Anwendungen unter Verwendung derartiger Rezeptoren schließen die folgenden Beispiele ein, sind aber nicht auf diese beschränkt:

- a) Enzyme: spezifische Transportproteine oder Enzyme, die für das Überleben von Mikroorganismen wesentlich sind, die als Ziele für die antibiotische Selektion (Ligand) dienen können;
- b) Antikörper: die Identifizierung einer Liganden-bindenden Stelle auf dem Antikörpermolekül, die mit dem Epitop eines interessierenden Antigens kombiniert, kann untersucht werden. Die Bestimmung einer Sequenz, die ein antigenes Epitop imitiert, kann zur Entwicklung von Impfstoffen führen, bei denen das Immunogen auf einer oder mehreren derartigen Sequenzen basiert, oder kann zur Entwicklung von verwandten diagnostischen Mitteln oder Verbindungen führen, die bei therapeutischen Behandlungen, wie von Autoimmunerkrankungen, brauchbar sind.
- c) Nucleinsäuren: Identifizierung von Liganden-Bindungsstellen, wie eines Proteins oder einer RNA.
- d) katalytische Polypeptide: Polymere, vorzugsweise Polypeptide, die imstande sind, eine chemische Reaktion zu fördern, die die Umwandlung eines oder mehrerer Reaktanden in ein oder mehrere Produkte einschließt; derartige Polypeptide umfassen im Allgemeinen eine Bindungsstelle, die spezifisch für mindestens einen Reaktanden oder ein Reaktionszwischenprodukt ist, und eine aktive Funktionalität benachbart zu der Bindungsstelle, wobei die Funktionalität imstande ist, den gebundenen Reaktanden chemisch zu verändern. [siehe z. B. U.S.-Patent Nr. 5,215,899];
- e) Hormonrezeptoren: die Ermittlung von Liganden, die mit einer hohen Affinität an einen Rezeptor binden, ist nützlich für die Entwicklung von Hormonersatztherapien; die Identifizierung von Liganden, die an derartige Rezeptoren binden, kann beispielsweise zur Entwicklung von Arzneimitteln für die Kontrolle des Blutdrucks führen.
- f) Opiatrezeptoren: die Ermittlung von Liganden, die an die Opiatrezeptoren im Gehirn binden, ist nützlich für die Entwicklung von weniger süchtig machenden Ersatzstoffen für Morphin und verwandte Arzneimittel.

[0154] So wie der Begriff "komplementär" hier verwendet wird, bezieht er sich auf die topologische Kompatibilität oder die Übereinstimmung ("matching") wechselwirkender Oberflächen eines Ligandenmoleküls und seines Rezeptors. Demnach können der Rezeptor und sein Ligand als komplementär beschrieben werden, und weiterhin sind die Kontaktoberflächeneigenschaften zueinander komplementär.

[0155] So wie der Begriff "Ligand-Rezeptor-Paar" hier verwendet wird, handelt es sich um einen Komplex,

der gebildet wird, wenn zwei Makromoleküle durch molekulare Erkennung unter Bildung eines Komplexes miteinander kombinieren.

[0156] So wie der Begriff "Träger" hier verwendet wird, bezieht er sich auf jede Matrix, die entweder direkt oder nach einer geeigneten Derivatisierung als ein fester Träger für chemische Synthesen, Assays und andere derartige Verfahren verwendet wird. Bevorzugte Träger sind hier Siliciumträger oder silicierte Träger, die auf der Oberfläche derivatisiert sind, die für die Anbindung von Anti-Liganden und Liganden und anderer Makromoleküle, eingeschlossen die fluoreszierenden Proteine, Phycobili-Proteine und andere die Emission verschiebende Stoffe, vorgesehen sind.

[0157] So wie der Begriff "Matrix" hier verwendet wird, bezieht er sich auf jeden festen oder halbfesten oder unlöslichen Träger, auf dem das interessierende Molekül, typischerweise ein biologisches Molekül, Makromolekül, organisches Molekül oder biospezifischer Ligand, angebunden ist oder mit dem es in Kontakt gebracht wird. Typischerweise ist eine Matrix ein Trägermaterial, das eine steife oder halbsteife Oberfläche hat. In vielen Ausführungsformen ist mindestens eine Oberfläche des Trägers im Wesentlichen flach, obwohl es in einigen Ausführungsformen wünschenswert sein kann, Syntheseregionen für verschiedene Polymere beispielsweise mit Vertiefungen, erhöhten Regionen, geätzten Gräben oder einer anderen derartigen Topologie physikalisch zu trennen. Matrixmaterialien schließen beliebige Materialien ein, die als Affinitätsmatrizes oder Träger für chemische und biologische Molekülsynthesen und -analysen verwendet werden, wie nicht einschränkend: Polystyrol, Polycarbonat, Polypropylen, Nylon, Glas, Dextran, Chitin, Sand, Bims, Polytetrafluorethylen, Agarose, Polysaccharide, Dendrimere, Fullerene, Polyacrylamid, nicht kovalentes Kieselguhr-Polyacrylamid-Verbundmaterial, kovalentes Polystyrol-Polyacrylamid-Verbundmaterial, Polystyrol-PEG-(Polyethylenglycol)-Verbundmaterial, Silicium, Gummi und andere Materialien, die als Träger für Festphasensynthesen, Affinitätstrennungen und -reinigungen, Hybridisierungsreaktionen, Immunoassays und andere derartige Anwendungen verwendet werden.

[0158] So wie der Begriff "Befestigungsschicht" hier verwendet wird, bezieht er sich auf die Oberfläche der Chipvorrichtung, an die Moleküle gebunden sind. Der Chip ist typischerweise eine Halbleitervorrichtung, die auf mindestens einem Teil der Oberfläche beschichtet ist, um sie für das Anbinden von Molekülen geeignet zu machen und inert gegenüber beliebigen Reaktionen zu machen, denen die Vorrichtung ausgesetzt ist. Moleküle werden direkt oder indirekt mit der Oberfläche verbunden, wobei die Bindungen durch Adsorption oder Adsorption, durch kovalente Bindungen, ionische Wechselwirkungen oder eine beliebige andere Wechselwirkung erreicht werden kann. Wo erforderlich ist die Befestigungsschicht, wie durch eine Derivatisierung, für die Anbindung der Moleküle angepasst.

B. BIOLUMINESZENZ-ERZEUGENDE SYSTEME UND KOMPONENTEN

[0159] Das Folgende ist eine Beschreibung von Biolumineszenz-erzeugenden Systemen und deren Komponenten. Diese Luciferasen und Luciferine und fluoreszierenden Protein können mit den hier bereitgestellten Luciferasen und GFPs verwendet werden.

1. Beispielhafte Biolumineszenz-erzeugende Systeme

[0160] Ein Biolumineszenz-erzeugendes System bezieht sich auf die Komponenten, die notwendig und hinreichend sind, um Biolumineszenz zu erzeugen. Diese schließen eine Luciferase, ein Luciferin und alle sonstigen notwendigen Cofaktoren oder Bedingungen ein. Praktisch jedes Biolumineszenz-erzeugende System, das dem Fachmann bekannt ist, ist zugänglich für die Verwendung in den Vorrichtungen, Systemen, Kombinationen und Verfahren, die hier bereitgestellt werden. Faktoren, die bei der Auswahl eines Biolumineszenz-erzeugenden Systems berücksichtigt werden müssen, schließen ein, ohne darauf beschränkt zu sein: das Ansteuerungsmittel, das in Kombination mit der Biolumineszenz verwendet wird; das Medium, in dem die Reaktion durchgeführt wird; die Stabilität der Komponenten, wie Temperatur- oder pH-Empfindlichkeit; Haltbarkeit der Komponenten; Nachhaltigkeit der Lichtemission, ob sie konstant oder vorübergehend ist; Verfügbarkeit der Komponenten; gewünschte Lichtintensität; Farbe des Lichts; und andere derartige Faktoren.

a. Allgemeine Beschreibung

[0161] Im Allgemeinen bezieht sich Biolumineszenz auf eine energieliefernde chemische Reaktion, bei der ein spezielles chemisches Substrat, ein Luciferin, eine Oxidation durchmacht, die von einem Enzym, einer Luciferase, katalysiert wird. Biolumineszenzreaktionen können leicht aufrechterhalten werden, da sie nur das Nachfüllen von verbrauchtem Luciferin oder eines anderen Substrats oder Cofaktors oder eines anderen Pro-

teins erfordert, damit die Reaktion fortgesetzt wird oder wieder auflebt. Biolumineszenz-erzeugende Reaktionen sind dem Fachmann wohlbekannt, und jede derartige Reaktion kann an die Verwendung in Kombination mit Herstellungsgegenständen, wie sie hier beschrieben werden, angepasst werden.

[0162] Es gibt zahlreiche Organismen und Quellen für Biolumineszenz-erzeugende Systeme, und einige repräsentative Gattungen und Arten, die Biolumineszenz zeigen, werden in der folgenden Tabelle offenbart (teilweise kopiert von Hastings in (1995) Cell Physiology: Source Book, N. Sperelakis (Hrsg.), Academic Press, S. 665–681):

TABELLE 2

Repräsentative leuchtende Organismen

Typ des Organismus	Repräsentative Gattungen
Bakterien	Photobacterium
	Vibrio
	Xenorhabdus
Pilze	Panus, Armillaria
	Pleurotus
	Gonyaulax
	Pyrocystis
Dinoflagellaten	Noctiluca
Cnidaria (Coelenterata)	
Qualle	Aequorea
Polyp	Obelia
Seefeder	Renella
Ctenophora	Mnemiopsis
	Beroe
Anneliden	
Erdwürmer	Diplocardia
Marine Polychaeta	Chaetopterus, Phtyxotrix
Sylliden-Feuerwurm	Odontosyllis
Mollusken	
Napfschnecke	Latia
Muschel	Pholas
Kalmar	Heteroteuthis
	Heterocarpus
Crustacea	
Ostracoda	Vargula (Cypridina)
Garnelen (Ephasia)	Meganctiphanes
	Acanthephyra
	Oplophorus
	Gnathophausia
Decapoda	Sergestes
Copepoda	
Insekten	
Coleoptera (Käfer)	

Leuchtkäfer	Photinus, Photuris
Schnellkäfer	Pyrophorus
Railroadwurm	Phengodes, Phrixothrix
Diptera (Fliegen)	Arachnocampa
Echinodermata	
Schlangensterne	Ophiopsila
Seewalzen	Laetmogone
Chordata	
Tunicata	Pyrosoma
Fische	
Knorpelfische	Squalus
Knochenfische	
Ponyfisch	Leiognathus
Blitzlichtfisch	Photoblepharon
Anglerfisch	Cryptopsaras
Bootsmannfisch	Porichthys
Laternenfisch	Benia
Weichstrahlenfisch	Aristostomias
Silberbeil-Fisch	Argryopelecus
und andere Fische	Pachystomias
	Malacosteus
Pelagialfisch	Cyclothone
	Neoscopelus
	Tarletonbeania

[0163] Andere biolumineszierende Organismen, die für die Verwendung hier in Betracht gezogen werden, sind Gonadostomias, Gaussia (Copepoden), Watensia, Halisturia, Vampirtintenfisch, Glyphus, Mycotophiden (Fisch), Vinciguerra, Howella, Florenciella, Chaudiodus, Melanocostus und Seefedern.

[0164] Ganz offensichtlich kann ein Biolumineszenz-erzeugendes System aus natürlichen Quellen isoliert werden, wie denjenigen in der obigen Tabelle, es kann aber auch synthetisch hergestellt werden. Zusätzlich müssen die Komponenten für die Verwendung hier nur ausreichend rein sein, damit ein Gemisch davon unter geeigneten Reaktionsbedingungen ein Leuchten produziert, durch das Zellen und Gewebe während eines chirurgischen Eingriffs sichtbar gemacht werden können.

[0165] Demnach kann ein Rohextrakt oder das Zermahlen des Organismus angemessen sein. Ganz allgemein werden jedoch im Wesentlichen reine Komponenten verwendet. Die Komponenten können auch synthetische Komponenten sein, die nicht aus natürlichen Quellen isoliert werden. DNA, die Luciferasen codiert, steht zur Verfügung (siehe z. B. SEQ ID NO: 1–13) und ist modifiziert worden (siehe z. B. SEQ ID NO: 3 und 10–13), und synthetische und alternative Substrate sind ausgedacht worden. Die DNA, die hier aufgezählt wird, ist nur repräsentativ für die DNA, die Luciferasen codiert, die verfügbar ist.

[0166] Alle Biolumineszenz-erzeugenden Systeme, unabhängig davon, ob sie synthetisch sind oder aus natürlichen Quellen isoliert werden, wie diejenigen, die in Tabelle 2 oder hier an anderer Stelle offenbart werden oder die dem Fachmann bekannt sind, sind für die Verwendung in den hier bereitgestellten Kombinationen und Systemen vorgesehen. Chemilumineszenzsysteme an sich, die nicht auf Oxygenasen (Luciferasen) zurückgreifen, sind hier nicht umfasst.

(1) Luciferasen

[0167] Die ausgerichteten bzw. adressierten Substanzen hier schließen Luciferasen oder Luciferine ein. Luciferasen bezieht sich auf jede Verbindung, die in Gegenwart aller notwendigen Aktivatoren die Oxidation eines

Biolumineszenz-Substrats (Luciferin) in Gegenwart von molekularem Sauerstoff, unabhängig davon, ob dieser frei oder gebunden vorliegt, von einem niedrigeren Energiezustand in einen höheren Energiezustand katalysiert, so dass das Substrat bei der Rückkehr in den niedrigeren Energiezustand Licht emittiert. Für die Zwecke hier wird der Begriff Luciferase so allgemein verwendet, dass er Enzyme, die katalytisch wirken und dabei Licht durch die Oxidation eines Substrats erzeugen, und auch Photoproteine, wie Aequorin, umfasst, die, wenn gleich nicht streng katalytisch (da diese Proteine bei der Umsetzung verbraucht werden), in Verbindung mit einem Substrat in Gegenwart von Sauerstoff unter Erzeugung von Licht wirken. Diese Luciferasen, eingeschlossen die Photoproteine, wie Aequorin, werden hier ebenfalls unter den Luciferasen zusammengefasst. Diese Reagenzien schließen die natürlich vorkommenden Luciferasen (eingeschlossen Photoproteine), die Proteine, die durch rekombinante DNA erzeugt werden, und die mutierten oder modifizierten Varianten davon, die die Fähigkeit zur Erzeugung von Licht in Gegenwart eines geeigneten Substrats, von Cofaktoren und Aktivatoren, erhalten haben, und jedes beliebige sonstige Protein, das die Wirkung eines Katalysators hat, ein Substrat zu oxidieren, durch die Licht erzeugt wird, ein.

[0168] Allgemein wird das Protein, das die Biolumineszenzreaktion katalysiert oder initiiert, als eine Luciferase bezeichnet, und das oxidierbare Substrat wird als ein Luciferin bezeichnet. Das oxidierte Reaktionsprodukt wird als Oxyluciferin bezeichnet, und bestimmte Luciferin-Vorläufer werden als Etioluciferin bezeichnet. Für die Zwecke hier umfasst der Ausdruck Biolumineszenz das Licht, das durch Reaktionen erzeugt wird, die (im Fall von Luciferasen, die enzymatisch wirken) durch ein biologisches Protein oder ein Analogon, ein Derivat oder eine Mutante davon katalysiert werden oder die (im Fall der Photoproteine, wie Aequorin, das in der Reaktion nicht regeneriert wird) durch ein biologisches Protein oder ein Analogon, ein Derivat oder eine Mutante davon initiiert werden.

[0169] Aus Gründen der Klarheit werden diese katalytischen Proteine hier als Luciferasen bezeichnet und schließen die Enzyme, wie die Luciferasen, die die Oxidation von Luciferin katalysieren, Licht emittieren und Oxyluciferin freisetzen, ein. Ebenfalls eingeschlossen unter den Luciferasen sind die Photoproteine, die die Oxidation von Luciferin unter Lichtemission katalysieren, die jedoch bei der Umsetzung verändert werden und die wieder hergestellt werden müssen, um erneut verwendet zu werden. Die Luciferasen können natürlich vorkommend sein, oder sie können modifiziert sein, wie gentechnisch modifiziert sein, um bestimmte Eigenschaften zu verbessern oder zu verändern. So lange das resultierende Molekül die Fähigkeit beibehält, die Biolumineszenzreaktion zu katalysieren, ist es hier eingeschlossen.

[0170] Jedes Protein, das eine Luciferase-Aktivität hat (ein Protein, das die Oxidation eines Substrats in Gegenwart von molekularem Sauerstoff unter Erzeugung von Licht katalysiert, wie dies hier definiert ist), kann verwendet werden. Die bevorzugten Luciferasen sind diejenigen, die hier beschrieben werden oder die kleinere Sequenzabweichungen haben. Derartige kleinere Sequenzabweichungen schließen nicht einschränkend kleinere Allelabweichungen oder Artabweichungen und Insertionen oder Deletionen von Resten, vor allem von Cysteinresten, ein. Geeignete konservative Substitutionen von Aminosäuren sind dem Fachmann bekannt und können im Allgemeinen erzeugt werden, ohne dass dadurch die biologische Aktivität des resultierenden Moleküls verändert wird. Derartige Substitutionen werden vorzugsweise den Substitutionen entsprechend erzeugt, die in der oben beschriebenen TABELLE 1 offenbart werden.

[0171] Die Luciferasen können im Handel erworben werden, aus natürlichen Quellen isoliert werden, in Wirtszellen unter Verwendung von DNA, die die Luciferase codiert, exprimiert werden oder in jeder sonstigen Weise erhalten werden, die dem Fachmann bekannt ist. Für die Zwecke hier können Rohextrakte, die durch das Zermahlen ausgewählter Quellorganismen erhalten werden, ausreichend sein. Da große Mengen der Luciferase erwünscht sein können, ist die Isolierung der Luciferase aus Wirtszellen bevorzugt. Die DNA für derartige Zwecke ist weit verbreitet verfügbar, wie dies auch die modifizierten Formen davon sind.

[0172] Beispiele für Luciferasen schließen nicht einschränkend diejenigen ein, die aus den Ctenophoren Mnemiopsis (Mnemiopsin) und Beroe ovata (Berovin) isoliert werden, diejenigen, die aus den Coelenteraten Aequorea (Aequorin), Obelia (Obelin), Pelagia, isoliert werden, die Renilla-Luciferase, die Luciferasen, die aus den Mollusken Pholas (Pholasin) isoliert werden, die Luciferasen, die aus Fischen isoliert werden, wie Aristostomias, Pachystomias und Porichthys, und aus den Ostracoden, wie Cypridina (auch als Vargula bezeichnet), isoliert werden. Bevorzugte Luciferasen sind das Aequorin-Protein, die Renilla-Luciferase und die Cypridina-Luciferase (auch als Vargula bezeichnet) (siehe z. B. SEQ ID NO: 1, 2 und 4–13). Ebenfalls bevorzugt sind die Luciferasen, die unter Erzeugung von rotem Licht und/oder Licht im nahen Infrarot reagieren. Diese schließen die Luciferasen ein, die in Arten von Aristostomias, wie A. scintillans, Pachystomias, Malacosteus, wie M. niger, gefunden werden.

(2) Luciferine

[0173] Die Substrate für die Reaktion oder für den Einschluss in die Konjugate schließen beliebige Moleküle ein, mit denen die Luciferase unter Erzeugung von Licht reagiert. Derartige Moleküle schließen die natürlich vorkommenden Substrate, die modifizierten Formen davon und synthetische Substrate ein (siehe z. B. U.S.-Patent Nr. 5,374,534 und 5,098,828). Beispielhafte Luciferine schließen diejenigen ein, die hier beschrieben werden, wie Derivate davon, Analoga davon, synthetische Substrate, wie Dioxetane (siehe z. B. U.S.-Patente Nr. 5,004,565 und 5,455,357), und andere Verbindungen, die von einer Luciferase in einer lichterzeugenden Reaktion oxidiert werden (siehe z. B. U.S.-Patente Nr. 5,374,534, 5,098,828 und 4,950,588). Derartige Substrate können auch empirisch identifiziert werden, indem Verbindungen ausgewählt werden, die in einer Biolumineszenzreaktion oxidiert werden.

(3) Aktivatoren

[0174] Die Biolumineszenz-erzeugenden Systeme benötigen außerdem zusätzliche Komponenten, die hier diskutiert werden und die dem Fachmann bekannt sind. Alle Biolumineszenzreaktionen benötigen molekularen Sauerstoff in der Form von gelöstem oder gebundenem Sauerstoff. Demnach ist molekularer Sauerstoff, gelöst in Wasser oder in Luft oder gebunden an ein Photoprotein, der Aktivator für Biolumineszenzreaktionen. In Abhängigkeit von der Form der Komponenten schließen anderen Aktivatoren nicht einschränkend ATP (für die Leuchtkäfer-Luciferase), die Flavin-Reduktase (bakterielle Systeme) für die Regeneration von FMNH₂ aus FMN, und Ca²⁺ oder andere geeignete Metallionen (Aequorin) ein.

[0175] Die meisten der hier bereitgestellten Systeme erzeugen Licht, wenn die Luciferase und das Luciferin vermischt und Luft oder Wasser ausgesetzt werden. Die Systeme, die Photoproteine verwenden, die gebundenen Sauerstoff haben, wie Aequorin, müssen jedoch Ca²⁺ ausgesetzt werden (oder einem anderen geeigneten Metallion), das in Form einer wässrigen Zusammensetzung eines Calciumsalzes bereitgestellt werden kann. In diesen Fällen führt die Zugabe von Ca²⁺ (oder anderer geeigneter Metallionen) zu einem Gemisch aus Luciferase (Aequorin) und Luciferin (wie Coelenterazin) zur Erzeugung von Licht. Das Renilla-System und andere Anthozoa-Systeme benötigen ebenfalls Ca²⁺ (oder ein anderes geeignetes Metallion).

[0176] Wenn Rohzubereitungen verwendet werden, wie gemahlene Cypridina (Garnelen) oder gemahlene Leuchtkäfer, kann es sein, dass nur Wasser zugegeben werden muss. In Fällen, in denen Leuchtkäfer (oder ein Leuchtkäfer- oder Käferluciferase) verwendet werden, kann es sein, dass nur ATP zu der Reaktion zugegeben werden muss. Die genauen Komponenten sind dem Fachmann im Lichte der hier vorliegenden Offenbarung ersichtlich oder können leicht empirisch ermittelt werden.

[0177] Es versteht sich weiterhin, dass diese Gemische auch beliebige zusätzliche Salze oder Puffer oder Ionen enthalten, die für den Ablauf jeder Reaktion erforderlich sind. Da diese Reaktionen gut charakterisiert sind, sind die Fachleute imstande, die genauen Mengenanteile und die erforderlichen Komponenten zu bestimmen. Die Auswahl der Komponenten hängt von der Vorrichtung, dem Herstellungsgegenstand und der Luciferase ab. Verschiedene Ausführungsformen werden hier beschrieben und beispielhaft dargestellt; angesichts dieser Beschreibung werden andere Ausführungsformen ersichtlich.

(4) Reaktionen

[0178] In allen Ausführungsformen werden bis auf eine Komponente, entweder die Luciferase oder das Luciferin, alle Komponenten des Biolumineszenz-erzeugenden System vermischt oder miteinander verpackt oder anderweitig kombiniert. Die verbleibende Komponente ist an ein Ansteuerungsmittel als Konjugat gebunden und ist dafür vorgesehen, einem Tier verabreicht zu werden.

[0179] Vor einem chirurgischen Verfahren wird das Konjugat auf einem beliebigen geeigneten Weg verabreicht, wodurch das Ansteuerungsmittel auf Grund seiner spezifischen Wechselwirkung mit einem gewebespezifischen Zelloberflächenprotein an das anvisierte Gewebe bindet.

[0180] Während des chirurgischen Eingriffs wird das Gewebe mit der oder den übrigen Komponenten) in Kontakt gebracht, typischerweise durch das Besprühen des Gebietes oder durch eine lokale Injektion, und jedes Gewebe, an das Konjugat gebunden ist, leuchtet. Das Leuchten sollte ausreichend sein, um es bei gedämpftem Licht oder erforderlichenfalls im Dunkeln zu sehen.

[0181] Da im Allgemeinen das zu erreichende Ergebnis die Erzeugung von Licht, das mit dem bloßen Auge

gesehen werden kann, für qualitative, nicht quantitative diagnostische Zwecke ist, müssen die genauen Mengenverhältnisse und Mengen der Komponenten der Biolumineszenzreaktion nicht streng ermittelt oder eingehalten werden. Sie müssen ausreichend sein, damit es zur Erzeugung von Licht kommt. Im Allgemeinen wird eine Menge Luciferin und Luciferase verwendet, die ausreichend ist, um ein sichtbares Leuchten zu erzeugen; diese Menge kann leicht empirisch ermittelt werden und hängt von dem ausgewählten System und der ausgewählten Anwendung ab. Wo quantitative Messungen benötigt werden, kann eine höhere Präzision erforderlich sein.

[0182] Für die Zwecke hier entspricht eine derartige Menge vorzugsweise mindestens den Konzentrationen und Mengenverhältnissen, die vom Fachmann für analytische Zwecke verwendet werden: Höhere Konzentrationen können verwendet werden, wenn das Leuchten nicht ausreichend hell ist. Alternativ kann ein Mikroträger, der an mehr als ein Luciferasemolekül gekoppelt ist, der mit einem Ansteuerungsmittel verknüpft ist, verwendet werden, um die Signalstärke zu erhöhen. Da außerdem die Bedingungen, unter denen die Reaktionen verwendet werden, keine Laborbedingungen sind und die Komponenten einer Lagerung unterzogen werden, kann eine höhere Konzentration verwendet werden, um jeden Aktivitätsverlust zu überwinden. Typischerweise betragen die Mengen 1 mg, vorzugsweise 10 mg und noch bevorzugter 100 mg einer Luciferase pro Liter Reaktionsgemisch oder 1 mg, vorzugsweise 10 mg, noch bevorzugter 100 mg. Die Zusammensetzungen können mindestens etwa 0,01 mg/l und typischerweise 0,1 mg/l, 1 mg/l, 10 mg/l oder mehr einer jeden Komponente auf dem Gegenstand enthalten. Die Menge Luciferin liegt ebenfalls zwischen etwa 0,01 und 100 mg/l, vorzugsweise zwischen 0,1 und 10 mg/l, zusätzliches Luciferin kann zu vielen der Reaktionen gegeben werden, um die Reaktion fortauern zu lassen. In Ausführungsformen, in denen die Luciferase katalytisch wirkt und nicht regeneriert werden muss, können geringere Mengen Luciferase verwendet werden. In denjenigen Ausführungsformen, in denen sie während der Reaktion verändert wird, kann sie auch wieder nachgefüllt werden; typischerweise werden höhere Konzentrationen ausgewählt. Konzentrationsbereiche pro Liter (oder die Menge der Beschichtung auf dem Träger, die aus dem Kontaktieren mit einer derartigen Zusammensetzung resultiert) einer jeden Verbindung in der Größenordnung von 0,1 bis 20 mg, vorzugsweise 0,1 bis 10 mg, noch bevorzugter im Bereich von etwa 1 bis 10 mg einer jeden Komponente, sind ausreichend. Wenn beschichtete Träger wie hier beschrieben hergestellt werden, können größere Mengen der Beschichtungszusammensetzungen, die höhere Konzentrationen der Luciferase oder des Luciferins enthalten, verwendet werden.

[0183] Beispielsweise leuchten 5 mg Luciferin, wie Coelenterazin, in Gegenwart von Calcium in einem Liter Wasser in Abhängigkeit von der Temperatur des Wassers mindestens etwa 10 bis 20 min hell, wenn etwa 10 mg Luciferase, wie Aequorin-Photoprotein-Luciferase oder Luciferase von Renilla, dazugegeben werden. Das Erhöhen der Konzentration der Luciferase beispielsweise auf 100 mg/l sorgt für eine besonders brillante Lichtanzeige.

[0184] Es ist offensichtlich, dass die Konzentrationen und Mengen, die verwendet werden sollen, von dem ausgewählten Biolumineszenz-erzeugenden System abhängen, aber diese können leicht empirisch ermittelt werden. Mengenverhältnisse, vor allem diejenigen, die verwendet werden, wenn eine empirische Bestimmung beginnt, sind im Allgemeinen diejenigen, die für analytische Zwecke verwendet werden, und die Mengen oder Konzentrationen sind mindestens diejenigen, die für analytische Zwecke verwendet werden, die Mengen können aber erhöht werden, vor allem wenn ein anhaltendes und helleres Leuchten erwünscht sind.

2. Das Renilla-System

[0185] Renilla, auch bekannt als Seefeder-Weichkorallen ("sea pansy"), sind Mitglieder der Klasse der Coelenteraten Anthozoa, die andere biolumineszierende Gattungen, wie Cavarnularia, Ptilosarcus, Stylatula, Acanthoptilum und Parazoanthus einschließt. Biolumineszierende Arten der Gattung Anthozoa enthalten Luciferasen und Luciferine, die hinsichtlich der Struktur ähnlich sind (siehe z. B. Comier et al. (1973) J. Cell. Physiol. 81: 291–298; siehe auch Ward et al. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72: 2530–2534). Die Luciferasen und Luciferine all dieser Anthozoane zeigen untereinander eine Kreuzreaktion und erzeugen eine charakteristische blaue Lumineszenz.

[0186] Renilla-Luciferase und die anderen Coelenterat- und Ctenophor-Luciferasen, wie das Aequorin-Photoprotein, verwenden Imidazopyrazin-Substrate, vor allem die Substrate, die gattungsgemäß als Coelenterazin bezeichnet werden (siehe die Formeln (I) und (II) in obigem Abschnitt B.1.b). Andere Gattungen, die Luciferasen haben, die ein Coelenterazin verwenden, schließen ein: Kalmare, wie Chiroteuthis, Eucleoteuthis, Onychoteuthis, Watasenia, Tintenfisch, Sepiolina; Garnelen, wie Oplophorus, Acanthophyra, Sergestes und Gnathopausia; Tiefseefische, wie Aryropelecus, Yarella, Diaphus, Gonadostomias und Neoscopelus ein.

[0187] Renilla-Luciferase hat jedoch keinen gebundenen Sauerstoff und benötigt daher gelösten Sauerstoff, um Licht in Gegenwart eines geeigneten Luciferin-Substrats zu erzeugen. Da die Renilla-Luciferase wie ein echtes Enzym wirkt (d. h. es muss für die weitere Verwendung nicht wieder hergestellt werden), kann die resultierende Lumineszenz in Gegenwart von Sättigungsmengen an Luciferin lang andauernd sein. Renilla-Luciferase ist außerdem relativ stabil gegenüber Hitze.

[0188] Renilla-Luciferasen, DNA, die Renilla reniformis-Luciferase codiert, und die Verwendung der Renilla reniformis-DNA für die Herstellung von rekombinanter Luciferase sowie DNA, die die Luciferase von anderen Coelenteraten codiert, sind wohlbekannt und verfügbar (siehe z. B. SEQ ID NO: 1, U.S.-Patente Nr. 5,418,155 und 5,292,658; siehe auch Prasher et al. (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 126: 1259–1268; Cormier (1981) "Renilla and Aequorea bioluminescence" in *Bioluminescence and Chemiluminescence*, S. 225–233; Charbonneau et al. (1979) *J. Biol. Chem.* 254: 769–780; Ward et al. (1979) *J. Biol. Chem.* 254: 781–788; Lorenz et al. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 4438–4442; Hori et al. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 4285–4287; Hori et al. (1975) *Biochemistry* 14: 2371–2376; Hori et al. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 4285–4287; Inouye et al. (1975) *Jap. Soc. Chem. Lett.* 141m144; und Matthews et al. (1979) *Biochemistry* 16: 85–91). Die DNA, die die Renilla-reniformis-Luciferase codiert, und Wirtszellen, die eine derartige DNA enthalten, stellen ein bequemes Mittel für die Herstellung großer Mengen des Renilla-reniformis-Enzyms dar, wie in diejenigen, die dem Fachmann bekannt sind (siehe z. B. U.S.-Patente Nr. 5,418,155 und 5,292,658, die die rekombinante Erzeugung der Renilla reniformis-Luciferase beschreiben).

[0189] Die Renilla-Luciferase kann in lyophilisierter Form, verkapselt in einem Vehikel, entweder allein oder in Kombination mit dem Luciferin-Substrat, verpackt werden. Vor der Verwendung wird das Gemisch mit einer wässrigen Zusammensetzung, vorzugsweise einer phosphatgepufferten Kochsalzlösung pH 7–8, in Kontakt gebracht. Gelöster O₂ aktiviert die Reaktion. Endkonzentrationen der Luciferase in dem leuchtenden Gemisch liegen in der Größenordnung von 0,01 bis 1 mg/l oder darüber. Die Konzentrationen des Luciferins betragen mindestens etwa 10⁻⁴ M, sind aber 1 bis 100 Größenordnungen größer, um eine lang andauernde Biolumineszenz zu erzeugen.

[0190] Etwa 1 bis 10 mg oder vorzugsweise 2–5 mg, noch bevorzugter etwa 3 mg Coelenterazin werden mit etwa 100 mg Renilla-Luciferase verwendet. Die genauen Mengen können selbstverständlich empirisch bestimmt werden und hängen auch in gewissem Maß von der Endkonzentration und der Anwendung ab. Insbesondere war die Zugabe von etwa 0,25 ml eines Rohextrakts der Bakterien, die Renilla exprimieren, zu 100 ml eines geeigneten Assay-Puffers und etwa 0,005 µg ausreichend, um ein sichtbares und lang andauerndes Leuchten zu erzeugen (siehe U.S.-Patente Nr. 5,418,155 und 5,292,658, die die rekombinante Erzeugung von Renilla-reniformis-Luciferase beschreiben).

[0191] Lyophilisierte Gemische und Zusammensetzungen, die die Renilla-Luciferase enthalten, werden ebenfalls beschrieben. Die Luciferase oder die Gemische aus Luciferase und Luciferin können in geeigneten Zufuhrvehikeln verkapselt sein, wie Liposomen, Glaspartikel, Kapillarröhrchen, Arzneimittelzufuhrvehikel, Gelatine, Überzügen mit verzögerter Freisetzung oder anderen derartigen Vehikeln.

b. Ctenophor-Systeme

[0192] Ctenophore, wie Mnemiopsis (Mnemiopsin) und Beroe ovata (Berovin) und Coelenterate, wie Aequorea (Aequorin), Obelia (Obelin) und Pelagia, erzeugen Biolumineszenzlicht unter Verwendung ähnlicher chemischer Systeme (siehe z. B. Stephenson et al. (1981) *Biochimica et Biophysica Acta* 678: 65–75; Hart et al. (1979) *Biochemistry* 18: 2204–2210; Internationale PCT-Anmeldung Nr. WO 94/18342, die auf der U.S.-Anmeldung Seriennummer 08/017,116 basiert, U.S.-Patent Nr. 5,486,455 und andere hier zitierte Literaturstellen und Patente). Das Aequorin-System und das Renilla-System sind repräsentativ und werden hier beispielhaft und als zu den derzeit bevorzugten Systemen gehörend im Detail beschrieben. Das Aequorin-System und das Renilla-System können das gleiche Luciferin verwenden und Licht unter Ausnutzung der gleichen chemischen Vorgänge erzeugen, aber jede Luciferase ist anders. Die Aequorin-Luciferase Aequorin, ebenso beispielsweise die Luciferasen Mnemiopsin und Berovin, ist ein Photo-Protein, das gebundenen Sauerstoff und gebundenes Luciferin einschließt, benötigt Ca²⁺ (oder ein anderes geeignetes Metallion), um die Reaktion auszulösen, und muss für die wiederholte Verwendung regeneriert werden; während die Renilla-Luciferase wie ein echtes Enzym wirkt, weil sie während der Reaktion unverändert bleibt, und sie benötigt gelösten molekularen Sauerstoff.

(1) Das Aequorin-System

[0193] Das Aequorin-System ist allgemein bekannt (siehe z. B. Tsuji et al. (1986) "Site-specific mutagenesis of the calcium-binding Photoprotein aequorin", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83: 8107–8111; Prasher et al. (1985) "Cloning and Expression of the cDNA Coding for Aequorin, a Bioluminescent Calcium-Binding Protein" *Biochemical and Biophysical Research Communications* 126: 1259–1268; Prasher et al. (1986) *Methods in Enzymology* 133: 288–297; Prasher, et al. (1987) "Sequence Comparisons of cDNAs Encoding for Aequorin Iso-types," *Biochemistry* 26: 1326–1332; Charbonneau et al. (1985) "Amino Acid Sequence of the Calcium-Dependent Photoprotein Aequorin," *Biochemistry* 24: 6762–6771; Shimomura et al. (1981) "Resistivity to denaturation of the apoprotein of aequorin and reconstitution of the luminescent Photoprotein from the partially denatured apoprotein," *Biochem. J.* 199: 825–828; Inouye et al. (1989) *J. Biochem.* 105: 473–477; Inouye et al. (1986) "Expression of Apoaequorin Complementary DNA in *Escherichia coli*," *Biochemistry* 25: 8425–8429; Inouye et al. (1985) "Cloning and sequence analysis of cDNA for the luminescent Protein aequorin," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82: 3154–3158; Prendergast, et al. (1978) "Chemical and Physical Properties of Aequorin and the Green Fluorescent Protein Isolated from *Aequorea forskalea*" *J. Am. Chem. Soc.* 100: 3448–3453; Europäische Patentanmeldung 0 540 064 A1; Europäische Patentanmeldung 0 226 979 A2, Europäische Patentanmeldung 0 245 093 A1 und Europäische Patentanmeldung 0 245 093 B1; U.S.-Patent Nr. 5,093,240; U.S.-Patent Nr. 5,360,728; U.S.-Patent Nr. 5,139,937; U.S.-Patent Nr. 5,422,266; U.S.-Patent Nr. 5,023,181; U.S.-Patent Nr. 5,162,227; und SEQ ID NO: 5–13, die DNA offenbaren, die das Apoprotein codiert; und eine Form, die in dem U.S.-Patent Nr. 5,162,227, der Europäischen Patentanmeldung 0 540 064 A1 und Sealite Sciences Technical Report Nr. 3 (1994) beschrieben wird, ist von Sealite, Sciences, Bogart, GA als AQUALITE® im Handel erhältlich.

[0194] Dieses System gehört zu den bevorzugten Systemen. Da das Aequorin-Photoprotein nicht kovalent gebundenes Luciferin und molekularen Sauerstoff enthält, ist es, wie ersichtlich sein wird, in dieser Form für die Lagerung als lyophilisiertes Pulver oder verkapselt in einem ausgewählten Zufuhrvehikel geeignet. Das System kann in Pellets, wie Liposomen, oder anderen Zufuhrvehikeln verkapselt sein. Wenn Vehikel verwendet werden, werden diese mit einer Zusammensetzung, sogar Leitungswasser, in Kontakt gebracht, die Ca^{2+} (oder andere geeignete Metallionen) enthält, um ein Gemisch zu erzeugen, das leuchtet.

(a) Aequorin und verwandte Photoproteine

[0195] Das Photoprotein Aequorin, das aus der Qualle *Aequorea* isoliert wird, emittiert Licht bei der Zugabe von Ca^{2+} (oder anderer geeigneten Metallionen). Das Aequorin-Photoprotein, das gebundenes Luciferin und gebundenen Sauerstoff enthält, der durch Ca^{2+} freigesetzt wird, benötigt keinen gelösten Sauerstoff. Die Lumineszenz wird durch Calcium ausgelöst, das den Sauerstoff und das Luciferin-Substrat unter Bildung von Apoaequorin freisetzt.

[0196] Das Biolumineszenz-Photoprotein Aequorin wird aus einer Anzahl von Arten der Qualle *Aequorea* isoliert. Es ist ein Peptidkomplex mit einem Molekulargewicht von 22 Kilodalton (kD) (siehe z. B. Shimomura et al. (1962) *J. Cellular and Corp. Physiol.* 59: 233–238; Shimomura et al. (1969) *Biochemistry* 8: 3991–3997; Kohama et al. (1971) *Biochemistry* 10: 4149–4152; und Shimomura et al. (1972) *Biochemistry* 11: 1602–1608). Das native Protein enthält Sauerstoff und eine heterocyclische Verbindung Coelenterazin, ein Luciferin, (siehe weiter unten), das nicht kovalent daran gebunden ist. Das Protein enthält drei Calciumbindungsstellen. Bei der Zugabe von Spuren Mengen Ca^{2+} (oder anderer geeigneter Metallionen, wie Strontium) zu dem Photoprotein macht dieses eine Änderung der Konformation durch, die die Oxidation des gebundenen Coelenterazins unter Verwendung des Protein-gebundenen Sauerstoffs katalysiert. Die Energie aus dieser Oxidation wird als Blitz aus blauem Licht, das sein Zentrum bei 469 nm hat, freigesetzt. Calciumionen-Konzentrationen von nur 10^{-6} M sind ausreichend, um die Oxidationsreaktion auszulösen.

[0197] Natürlich vorkommendes Apoaequorin ist nicht eine einzelne Verbindung, sondern vielmehr ein Gemisch von mikroheterogenen Molekülsorten. Extrakte einer *Aequorea*-Qualle enthalten nicht weniger als zwölf verschiedene Varianten des Proteins (siehe z. B. Prasher et al. (1987) *Biochemistry* 26: 1326–1332; Blinks et al. (1975) *Fed. Proc.* 34: 474): DNA, die zahlreiche Formen codiert, ist isoliert worden (siehe z. B. SEQ ID NO: 5–9 und 13).

[0198] Das Photoprotein kann rekonstituiert werden (siehe z. B. U.S.-Patent Nr. 5,023,181), indem das Apoprotein, wie ein rekombinant in *E. coli* erzeugtes Protein, mit einem Coelenterazin, wie einem synthetischen Coelenterazin, in Gegenwart von Sauerstoff und eines Reduktionsmittels (siehe z. B. Shimomura et al. (1975) *Nature* 256: 236–238; Shimomura et al. (1981) *Biochemistry J.* 199: 825–828), wie 2-Mercaptoethanol, und

auch von EDTA oder EGTA (Konzentrationen im Bereich von etwa 5 bis etwa 100 mM oder darüber für die Anwendungen hier), die jegliches Ca^{2+} aufnehmen, um das Auslösen der Oxidationsreaktion bis erwünscht zu verhindern, kombiniert wird. Eine DNA, die eine modifizierte Form des Apoproteins codiert, das kein 2-Mercaptoethanol für die Rekonstitution benötigt, ist ebenfalls verfügbar (siehe z. B. U.S.-Patent Nr. 5,093,240). Das rekonstituierte Photoprotein ist ebenfalls im Handel erhältlich (es wird z. B. unter der Marke AQUALITE[®] verkauft und in dem U.S.-Patent Nr. 5,162,227 beschrieben).

[0199] Die Lichtreaktion wird durch die Zugabe von Ca^{2+} in einer Konzentration ausgelöst, die ausreichend groß ist, um die Wirkungen des Chelatbildners zu überkommen und die 10^{-6} M-Konzentration zu erreichen. Da derartig niedrige Konzentrationen an Ca^{2+} die Reaktion auslösen können, können höhere Konzentrationen des Chelatbildners in den Zusammensetzungen des Photoproteins enthalten sein. Dem gemäß sind höhere Konzentrationen an zugegebenem Ca^{2+} in der Form eines Calciumsalzes erforderlich. Genaue Mengen können empirisch ermittelt werden. Es kann ausreichend sein, lediglich Wasser zu dem Photoprotein zu geben, das in der Form einer konzentrierten Zusammensetzung oder in lyophilisierter Form oder pulverförmig bereitgestellt wird. Für die Zwecke hier sollte die Zugabe kleiner Mengen Ca^{2+} , wie derjenigen, die in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (BPS) oder anderen geeigneten Puffern oder der Feuchtigkeit auf dem Gewebe, mit dem die Zusammensetzungen in Kontakt gebracht werden, vorhanden sind, die Biolumineszenzreaktion auslösen.

[0200] Zahlreiche Isoforme des Aequorin-Apoproteins sind identifiziert und isoliert worden. DNA, die diese Proteine codiert, ist kloniert worden, und die Proteine und die modifizierten Formen davon sind unter Verwendung geeigneter Wirtszellen erzeugt worden (siehe z. B. U.S.-Patente Nr. 5,162,227, 5,360,728, 5,093,240; siehe auch Prasher et al. (1985) *Biophys. Biochem. Res. Commun.* 126: 1259–1268; Inouye et al. (1986) *Biochemistry* 25: 8425–8429). U.S.-Patent Nr. 5,093,240; U.S.-Patent Nr. 5,360,728; U.S.-Patent Nr. 5,139,937; U.S.-Patent Nr. 5,288,623; U.S.-Patent Nr. 5,422,266, U.S.-Patent Nr. 5,162,227 und SEQ ID NO: 5–13, die DNAs offenbaren, die das Apoprotein codieren; und eine Form ist im Handel von Sealite, Sciences, Bogart, GA als AQUALITE[®] erhältlich. Eine DNA, die das Apoaequorin oder Varianten davon codiert, ist für die rekombinante Herstellung großer Mengen des Apoproteins brauchbar. Das Photoprotein wird bei der Zugabe des Luciferins, des Coelenterazins, vorzugsweise eines sulfatierten Derivats oder eines Analogons davon, und von molekularem Sauerstoff rekonstituiert (siehe z. B. U.S.-Patent Nr. 5,023,181). Das Apoprotein und andere Bestandteile des Photoproteins und der Biolumineszenz-erzeugenden Reaktion können unter geeigneten Bedingungen vermischt werden, um das Photoprotein zu regenerieren und gleichzeitig das Photoprotein zur Lichterzeugung zu veranlassen. Die Rekonstitution erfordert das Vorhandensein eines Reduktionsmittels, wie von Mercaptoethanol, mit Ausnahme der modifizierten Formen, die weiter unten diskutiert werden, die so gestaltet sind, dass kein Reduktionsmittel benötigt wird (siehe z. B. U.S.-Patent Nr. 5,093,240).

[0201] Es ist bevorzugt, das Aequorin unter Verwendung von DNAs zu erzeugen, wie denjenigen, die in SEQ ID NO: 5–13 offenbart werden und die dem Fachmann bekannt sind, oder von modifizierten Formen davon. Die DNA, die Aequorin codiert, wird in einer Wirtszelle exprimiert, wie *E. coli*, isoliert und unter Erzeugung des Photoproteins rekonstituiert (siehe z. B. U.S.-Patente Nr. 5,418,155, 5,292,658, 5,360,728, 5,422,266, 5,162,227).

[0202] Von Interesse sind hier die Formen des Apoproteins, die so modifiziert worden sind, dass die Biolumineszenzaktivität größer als bei dem nicht modifizierten Apoaequorin ist (siehe z. B. U.S.-Patent Nr. 5,360,728, SEQ ID NO: 10–12). Modifizierte Formen, die eine größere Biolumineszenzaktivität als das nicht modifizierte Apoaequorin zeigen, schließen die Proteine ein, die die Sequenzen haben, die in SEQ ID NO: 10–12 offenbart werden, in denen das Aspartat 124 durch Serin ersetzt ist, das Glutamat 135 durch Serin ersetzt ist bzw. das Glycin 129 durch Alanin ersetzt ist. Andere modifizierte Formen mit erhöhter Biolumineszenz stehen ebenfalls zur Verfügung.

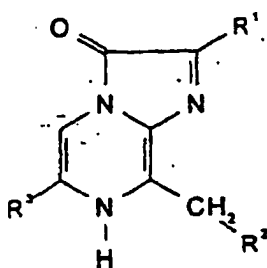
[0203] Für die Verwendung in bestimmten hier angegebenen Ausführungsformen werden das Apoprotein und andere Komponenten des Aequorin-Biolumineszenz-erzeugenden Systems als ein Gemisch verpackt oder bereitgestellt, das, sobald dies erwünscht ist, Bedingungen ausgesetzt wird, unter denen das Photoprotein aus dem Apoprotein, Luciferin und Sauerstoff rekonstituiert wird (siehe z. B. U.S.-Patent Nr. 5,023,181; und U.S.-Patent Nr. 5,093,240). Besonders bevorzugt sind Formen des Apoproteins, die für die Rekonstitution kein Reduktionsmittel wie 2-Mercaptoethanol benötigen. Diese Formen, die beispielsweise in dem U.S.-Patent Nr. 5,093,240 beschrieben werden (siehe auch Tsuji et al. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83: 8107–8111), werden durch den Austausch eines oder mehrerer, vorzugsweise aller drei Cysteinreste beispielsweise durch Serin modifiziert. Der Austausch kann beispielsweise durch die Veränderung der DNA, die das Aequorin-Apoprotein codiert, wie denjenigen, die in SEQ ID NO: 5 offenbart wird, und Ersetzen des Cystein-Codons durch das Serin-Codon erfolgen.

[0204] Die Photoproteine und die Luciferasen verwandter Arten, wie Obelia, werden hier auch für eine Verwendung ins Auge gefasst. Die DNA, die das Ca^{2+} -aktivierte Photoprotein Obelin des Hydroidpolypen Obelia longissima codiert, ist bekannt und verfügbar (siehe z. B. Illarionov et al. (1995) Gene 153: 273–274; und Bondar et al. (1995) Biochim. Biophys. Acta 1231: 29–32). Dieses Photoprotein kann auch durch Mn^{2+} aktiviert werden (siehe z. B. Vysotski et al. (1995) Arch. Biochem. Biophys. 316: 92–93, Vysotski et al. (1993) J. Biolumin. Chemilumin. 8: 301–305).

[0205] Für die Verwendung hier werden die Komponenten der Biolumineszenz im Allgemeinen so verpackt oder bereitgestellt, dass es nicht genügend Metallionen gibt, um die Reaktion zu starten. Bei der Verwendung werden die Spuren Mengen der die Reaktion auslösenden Metallionen, vor allem Ca^{2+} , mit den anderen Komponenten in Kontakt gebracht. Für ein länger andauerndes Leuchten kann da Aequorin kontinuierlich rekonstituiert werden, oder es kann zugegeben oder in großem Überschuss bereitgestellt werden.

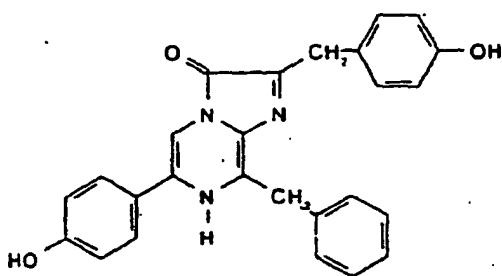
(b) Luciferin

[0206] Das Aequorin-Luciferin ist ein Coelenterazin oder ein Analogon davon, wobei die Moleküle eingeschlossen sind, die die Struktur (Formel (I))



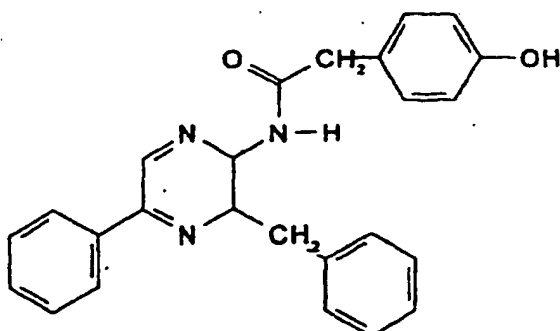
haben, worin R^1 $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ oder CH_3 ist; R^2 C_6H_5 ist und R^3 $p\text{-C}_6\text{H}_4\text{OH}$ oder CH_3 ist, oder andere derartige Analoga, die eine Aktivität zeigen. Ein bevorzugtes Coelenterazin hat die Struktur, in der R^1 $p\text{-CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$ ist, R^2 C_6H_5 ist und R^3 $p\text{-C}_6\text{H}_4\text{OH}$ ist, das durch bekannte Verfahren hergestellt werden kann (siehe z. B. Inouye et al. (1975) Jap. Chem. Soc., Chemistry Letters, S. 141–144 und Hart et al. (1979) Biochemistry 18: 2204–2210). Zu den bevorzugten Analoga gehören diejenigen, die in einer Weise modifiziert sind, dass die Spektralfrequenz des resultierenden Lichts zu einer anderen Frequenz verschoben ist.

[0207] Das bevorzugte Coelenterazin hat die Struktur (Formel (II)):



und sulfatierte Derivate davon.

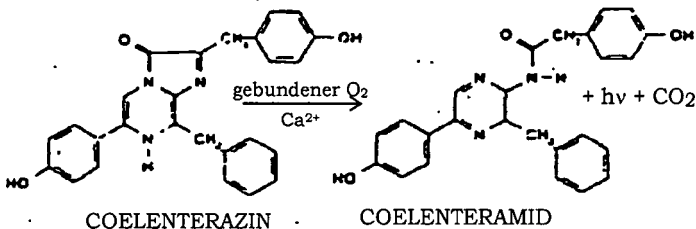
[0208] Ein anderes Coelenterazin hat die Formel (V)



(siehe Hart et al. (1997) Biochemistry 18: 2204–2210). Bei Verwendung dieses Derivats in Gegenwart von Lu-

ciferase ist das gesamte Licht im Ultraviolettbereich mit einem Peak bei 390 nm. Bei der Zugabe von GFP liegt das gesamte emittierte Licht dann im sichtbaren Bereich mit einem Peak bei 509 nm, begleitet von einer etwa 200-fachen Zunahme der emittierten Lichtmenge. Mit einem Kantenfilter bei 470 nm gesehen wäre die Lichtausbeute in Abwesenheit von GFP etwa Null, und sie wäre nachweisbar in Gegenwart von GFP. Dies liefert die Grundlage für einen Immunoassay, der in den BEISPIELEN beschrieben wird.

[0209] Die Reaktion des Coelenterazins, wenn es an das Aequorin-Photoprotein mit gebundenem Sauerstoff gebunden ist und in Gegenwart von Ca^{2+} kann wie folgt dargestellt werden:



[0210] Das Photoprotein Aequorin (das das Apoaequorin gebunden an ein Coelenterat-Luciferase-Molekül gebunden enthält) und die Renilla-Luciferase, die weiter unten diskutiert wird, können das gleiche Coelenterat-Luciferin verwenden. Das Aequorin-Photoprotein katalysiert die Oxidation des Coelenterat-Luciferins (Coelenterazin) zum Oxyluciferin (Coelenteramid) unter gleichzeitiger Erzeugung von blauem Licht ($\lambda_{\text{max}} = 469 \text{ nm}$).

[0211] Es ist wichtig darauf hinzuweisen, dass das Sulfatderivat des Coelenterat-Luciferins (Laurylluciferin) in Wasser besonders stabil ist, so dass es in einem Coelenterat-artigen Biolumineszenz-System verwendet werden kann. In diesem System werden Adenosindiphosphat (ADP) und eine Sulpha-Kinase verwendet, um das Coelenterazin in die sulfatierte Form umzuwandeln. Anschließend wird Sulfatase verwendet, um das Laurylluciferin in das native Coelenterazin zurück umzuwandeln. Das stabilere Laurylluciferin wird demnach in dem Gegenstand verwendet, der beleuchtet werden soll, und die Luciferase in Kombination mit der Sulfatase werden zu dem Luciferingemisch gegeben, wenn die Beleuchtung erwünscht ist.

[0212] Demnach ist das Biolumineszenzsystem von Aequorea besonders gut für die Verwendung in den hier beschriebenen Verfahren geeignet. Die jeweiligen Mengen und die Art und Weise, in der die Komponenten bereitgestellt werden, hängen vom Typ der Neoplasie oder des Spezialgewebes, die/das sichtbar gemacht werden soll, ab. Dieses System kann in lyophilisierter Form bereitgestellt werden, das bei der Zugabe von Ca^{2+} leuchtet. Es kann verkapselt werden, gebunden an einen Mikroträger sein, wie Mikrokügelchen, oder in einer Zusammensetzung sein, wie einer Lösung oder Suspension, vorzugsweise in Gegenwart von genügend Chelatbildner, um das Auslösen der Reaktion zu verhindern. Die Konzentration des Aequorin-Photoproteins variiert und kann empirisch ermittelt werden. Typischerweise werden Konzentrationen von mindestens 0,1 mg/l, noch bevorzugter von mindestens 1 mg/l und darüber ausgewählt. In einigen Ausführungsformen werden 1 bis 10 mg Luciferin pro 100 mg Luciferase in ausgewählten Volumina und in den gewünschten Konzentrationen verwendet.

c. Crustaceen, vor allem Cypridina

[0213] Die Ostracoden, wie *Vargula serata*, *hilgendorffii* und *noctiluca* sind kleine marine Crustaceen, die manchmal auch als Meeresleuchtkäfer bezeichnet werden. Diese Meeresleuchtkäfer werden in den Gewässern vor der Küsten von Japan gefunden und emittieren Licht, indem sie Luciferin und Luciferase in das Wasser spritzen, wo die Reaktion stattfindet, die eine helle blau leuchtende Wolke hervorruft. An der Reaktion sind nur Luciferin, Luciferase und molekularer Sauerstoff beteiligt, und sie ist daher für die Anwendung hier sehr gut geeignet.

[0214] Die Systeme, wie die *Vargula*-Biolumineszenzsysteme, sind hier besonders bevorzugt, da die Komponenten bei Raumtemperatur stabil sind, wenn sie getrocknet und pulverisiert sind, und weil sie selbst dann weiterhin reagieren, wenn sie verunreinigt sind. Außerdem benötigt die Biolumineszenzreaktion für ihren Ablauf nur die Komponenten Luciferin/Luciferase in Konzentrationen von nur 1:40 Teilen pro Milliarde bis 1:100 Teilen pro Milliarde, Wasser und molekularen Sauerstoff. Ein erschöpftes System kann durch die Zugabe von Luciferin aufgefrischt werden.

(1) Vargula-Luciferase

[0215] Die Vargula-Luciferase ist wasserlöslich und gehört zu den Luciferasen, die für die Verwendung in den hier dargestellten Verfahren bevorzugt ist. Die Vargula-Luciferase ist ein Polypeptid aus 555 Aminosäuren, das durch das Isolieren aus Vargula und auch unter Verwendung der Rekombinationstechnik durch die Expression der DNA in geeigneten bakteriellen Wirtszellen und Säugetierwirtszellen hergestellt wurde (siehe z. B. Thomson et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 6567–6571; Inouye et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89: 9584–9587; Johnson et al. (1978) Methods in Enzymology LVII: 331–349; Tsuji et al. (1978) Methods Enzymol. 57: 364–72; Tsuji (1974) Biochemistry 13: 5204–5209; Japanische Patentanmeldung Nr. JP-3-30678 Osaka; und Europäische Patentanmeldung Nr. EP 0 387 355 A1).

(a) Reinigung aus Cypridina

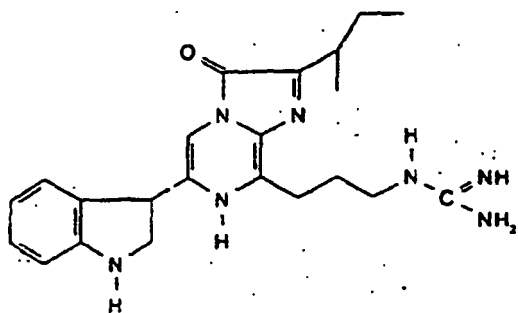
[0216] Die Verfahren für die Reinigung von Vargula-Luciferase (Cypridina-Luciferase) sind wohlbekannt. Der Rohextrakt, der den Wirkstoff enthält, kann beispielsweise leicht durch das Zermahlen oder Zerdrücken der Vargula-Garnele hergestellt werden. In anderen Ausführungsformen kann eine Zubereitung von Cypridina hilgendorffii-Luciferase durch das Eintauchen von gelagertem gefrorenem *C. hilgendorffii* in destilliertes Wasser, das 0,5 bis 5,0 M Salz, vorzugsweise 0,5 bis 2,0 M Natrium- oder Kaliumchlorid, Ammoniumsulfat, enthält, bei 0 bis 30°C, vorzugsweise 0 bis 10°C, über 1 bis 48 h, vorzugsweise 10 bis 24 h, für die Extraktion, auf die eine hydrophobe Chromatographie und anschließend eine Ionenaustausch- oder Affinitätschromatographie folgt, hergestellt werden (TORAY IND INC, Japanische Patentanmeldung JP 4258288, veröffentlicht am 14. September 1993; siehe auch Tsuji et al. (1978) Methods Enzymol. 57: 364–72 für andere Verfahren).

(b) Herstellung durch Rekombinationstechniken

[0217] Die Luciferase wird vorzugsweise durch die Expression von klonierter DNA, die die Luciferase codiert, hergestellt (Europäische Patentanmeldung Nr. 0 387 355 A1; Internationale PCT-Anmeldung Nr. WO 95/001542; siehe auch SEQ ID NO: 5, die die Sequenz aus der Japanischen Patentanmeldung Nr. JP 3-30678 offenbart, und Thomson et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 6567–6571). Die DNA, die die Luciferase oder eine Variante davon codiert, wird in *E. coli* unter Verwendung von geeigneten Vektoren eingebracht und unter Anwendung von Standardverfahren isoliert.

(2) Vargula-Luciferin

[0218] Das natürliche Luciferin ist ein substituierter Imidazopyrazin-Kern, wie eine Verbindung der Formel (III)



[0219] Das Luciferin kann aus zermahlener getrockneter Vargula durch Erhitzen des Extrakts isoliert werden, durch das die Luciferase zerstört wird, das Luciferin aber intakt bleibt (siehe z. B. U.S.-Patent Nr. 4,853,327).

[0220] Analoga davon und andere Verbindungen, die mit der Luciferase in einer lichterzeugenden Reaktion reagieren, können ebenfalls verwendet werden.

[0221] Andere biolumineszierende Organismen, die Luciferasen haben, die mit dem Vargula-Luciferin reagieren können, schließen die Gattungen Apogon, Parapriacanthus und Porichthys ein.

(3) Reaktionen

[0222] Das Luciferin bildet bei der Reaktion mit Sauerstoff ein Dioxetanon-Zwischenprodukt (das ein cyclisches Peroxid ähnlich dem Zwischenprodukt des Leuchtkäfers aus einem cyclischen Peroxidmolekül). Im abschließenden Schritt der Biolumineszenzreaktion zerfällt das Peroxid unter Bildung von CO₂ und eines ange-

regten Carbonyls. Das angeregte Molekül emittiert dann ein blaues bis blaugrünes Licht.

[0223] Der optimale pH-Wert für die Reaktion beträgt etwa 7. Für die Zwecke hier kann jeder pH-Wert, bei dem die Reaktion stattfindet, verwendet werden. Die Konzentrationen der Reagenzien entsprechen den Konzentrationen, die normalerweise für analytische Reaktionen verwendet werden, oder liegen darüber (siehe z. B. Thompson et al. (1990) *Gene* 96: 257–262). Typischerweise wird die Luciferase in einer Konzentration im Bereich von 0,1 bis 10 mg/l, vorzugsweise 0,5 bis 2,5 mg/l, oder darüber verwendet. Ähnliche Konzentrationen oder höhere Konzentrationen des Luciferins können verwendet werden.

d. Insekten-Biolumineszenz-System eingeschlossen das Leuchtkäfer, das Schnellkäfer-, und andere Insekten-systeme

[0224] Die Biochemie der Leuchtkäfer-Biolumineszenz war das erste Biolumineszenz-System, das charakterisiert wurde (siehe z. B. Wienhausen et al. (1985) *Photochemistry and Photobiology* 42: 609–611; McElroy et al. (1966) in *Molecular Architecture in cell Physiology*, Hayashi et al., Hrsg. Prentice Hall, Inc., Englewood Cliffs, NJ, S. 63–80), und es ist ein System, das im Handel erhältlich ist (z. B. von Promega Corporation, Madison, WI, siehe z. B. Leach et al. (1986) *Methods in Enzymology* 133: 51–70, insb. Tabelle 1). Die Luciferasen der verschiedenen Leuchtkäfer-Arten sind hinsichtlich der Antigenität ähnlich. Diese Arten schließen Mitglieder der Gattungen *Photinus*, *Photurins* und *Luciola* ein. Weiterhin erzeugt die Biolumineszenzreaktion bei 30°C mehr Licht als bei 20°C, die Luciferase wird durch kleine Mengen Rinderserumalbumin stabilisiert, und die Reaktion kann mit Tricin gepuffert werden.

(1) Luciferase

[0225] DNA-Klone, die Luciferasen verschiedener Insekten codieren, und ihre Verwendung für die Herstellung der codierten Luciferase sind allgemein bekannt. Beispielsweise sind DNA-Klone, die die Luciferase von *Photinus pyralis*, *Luciola cruciata* codieren, erhältlich (siehe z. B. de Wet et al. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82: 7870–7873; de Wet et al. (1986) *Methods in Enzymology* 133: 3; U.S.-Patent Nr. 4,968,613, siehe auch SEQ ID NO: 3). Die DNA wurde auch in *Saccharomyces* (siehe z. B. Japanische Patentanmeldung Nr. JP 63317079, veröffentlicht am 26. Dezember 1988, KIKKOMAN CORP) und in Tabak exprimiert.

[0226] Zusätzlich zu der Wildtyp-Luciferase sind modifizierten Insekten-Luciferasen hergestellt worden. Beispielsweise sind hitzestabile Luciferase-Mutanten, DNA-codierende Mutanten, Vektoren und transformierte Zellen für die Herstellung der Luciferasen erhältlich. Ein Protein mit 60% Aminosäuresequenzhomologie mit den Luciferasen von *Photinus pyralis*, *Luciola mingrelica*, *L. cruciata* oder *L. lateralis*, das eine Luciferase-Aktivität hat, ist erhältlich (siehe z. B. Internationale PCT-Anmeldung Nr. WO 95/25798. Es ist oberhalb von 30°C stabiler als die natürlich vorkommenden Insekten-Luciferasen und kann auch bei 37°C oder darüber in hoher Ausbeute hergestellt werden.

[0227] Modifizierte Luciferasen, die Licht bei anderen Wellenlängen erzeugen (verglichen mit der nativen Luciferase) sind bekannt und können daher im Hinblick auf ihre farberzeugenden Eigenschaften ausgewählt werden. Beispielsweise sind synthetische mutierte Käfer-Luciferasen und DNAs, die derartige Luciferasen codieren, die eine Biolumineszenz bei einer Wellenlänge erzeugen, die verschieden von der Wildtyp-Luciferase ist, bekannt (Promega Corp, Internationale PCT-Anmeldung Nr. WO 95/18853, die auf der U.S.-Anmeldung Serien-Nr. 08/177,081 basiert). Die mutierte Käfer-Luciferase hat eine Aminosäuresequenz, die von der Sequenz der entsprechenden Wildtyp-Luciferase von *Luciola cruciata* (siehe z. B. U.S.-Patente Nr. 5,182,202, 5,219,737, 5,352,598, siehe auch SEQ ID NO: 3) durch Substitutionen) in einer oder zwei Positionen verschieden ist. Die mutierte Luciferase erzeugt eine Biolumineszenz mit einer Wellenlänge mit einer Peakintensität, die um mindestens 1 nm von der Wellenlänge verschieden ist, die von Wildtyp-Luciferasen erzeugt wird.

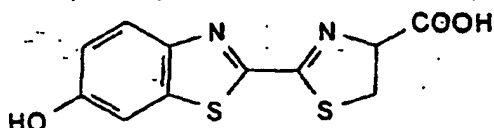
[0228] Andere mutierte Luciferasen können erzeugt werden. Mutierte Luciferasen mit der Aminosäuresequenz der Wildtyp-Luciferase, jedoch mit mindestens einer Mutation, in der Valin durch Isoleucin bei der Aminosäurenummer 233, Valin durch Isoleucin bei 239, Serin durch Asparagin bei 286, Glycin durch Serin bei 326, Histidin durch Tyrosin bei 433 oder Prolin durch Serin bei 452 ersetzt ist, sind bekannt (siehe z. B. U.S.-Patente Nr. 5,219,737 und 5,330,906). Die Luciferasen werden durch die Expression der DNAs, die die mutierten Luciferasen codieren, in *E. coli* und das Isolieren des Proteins erzeugt. Die Luciferasen erzeugen Licht mit Farben, die von der Farbe des Wildtyps verschieden sind. Die mutierten Luciferasen katalysieren Luciferin unter Erzeugung von rotem (λ 609 nm und 612 nm), orangefarbenem (λ 595 und 607 nm) oder grünem (λ 558 nm) Licht. Die übrigen physikalischen und chemischen Eigenschaften der mutierten Luciferase sind im Wesentlichen identisch mit der nativen Wildtyp-Luciferase. Die mutierte Luciferase hat die Aminosäuresequenz der Lu-

ciola-cruciata-Luciferase mit einer Veränderung, die ausgewählt wird unter Ser 286 ersetzt durch Asn, Gly 326 ersetzt durch Ser, His 433 ersetzt durch Tyr oder Pro 452 ersetzt durch Ser. Hitzestabile Luciferasen sind ebenfalls erhältlich (siehe z. B. U.S.-Patent Nr. 5,229,285; siehe auch Internationale PCT-Anmeldung Nr. WO 95/25798, die eine Photinus-Luciferase, in der Glutamin in der Position 354 durch Lysin ersetzt ist, und eine Luciola-Luciferase, in der Glutamat bei 356 durch Lysin ersetzt ist, bereitstellt).

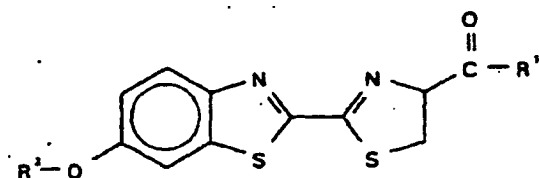
[0229] Diese mutierten Luciferasen sowie die Wildtyp-Luciferasen können in Kombination mit den hier beschriebenen GFPs verwendet werden, vor allem in Situationen, in denen eine Vielzahl von Farben erwünscht ist oder in denen Stabilität bei höheren Temperaturen erwünscht ist.

(2) Luciferin

[0230] Das Leuchtkäfer-Luciferin ist ein Benzothiazol:



[0231] Analoga dieses Luciferins und synthetische Leuchtkäfer-Luciferine sind dem Fachmann ebenfalls bekannt (siehe z. B. U.S.-Patent Nr. 5,374,534 und 5,098,828). Diese schließen Verbindungen der Formel (IV) (siehe U.S.-Patent Nr. 5,098,828)



ein, in der

R^1 Hydroxy, Amino, geradkettiges oder verzweigtes C_1 - C_{20} -Alkoxy, C_2 - C_{20} -Alkenyloxy, ein L-Aminosäurerest, der über die α -Aminogruppe angebunden ist, ein Oligopeptidrest mit bis zu zehn L-Aminosäureeinheiten, der über die α -Aminogruppe der endständigen Einheit angebunden ist, ist;

R^2 Wasserstoff, H_2PO_3 , HSO_3 , nicht substituiertes oder phenylsubstituiertes geradkettiges oder verzweigtes C_1 - C_{20} -Alkyl oder C_2 - C_{20} -Alkenyl, Aryl, das 6 bis 18 Kohlenstoffatome enthält, oder R_3 -C(O)- ist,

R^3 nicht substituiertes oder phenylsubstituiertes geradkettiges oder verzweigtes C_1 - C_{20} -Alkyl oder C_2 - C_{20} -Alkenyl, Aryl, das 6 bis 18 Kohlenstoffatome enthält, ein Nucleotidrest mit 1 bis 3 Phosphatgruppen oder ein glykosidisch angebundenes Mono- oder Disaccharid ist mit der Ausnahme, wenn Formel (IV) ein D-Luciferin oder D-Luciferinmethylester ist.

[0232] Modifizierte Luciferine, die so modifiziert wurden, dass sie Licht bei verschobenen Frequenzen erzeugen, sind dem Fachmann bekannt.

(3) Reaktionen

[0233] Die Reaktion, die durch die Leuchtkäfer-Luciferase und verwandete Insekten-Luciferasen katalysiert wird, benötigt ATP, Mg^{2+} sowie molekularen Sauerstoff. Luciferin muss exogen zugegeben werden. Die Leuchtkäfer-Luciferase katalysiert die Aktivierung des Leuchtkäfer-Luciferins und die nachfolgenden Schritte, die zu dem angeregten Produkt führen. Das Luciferin reagiert mit ATP unter Bildung eines Luciferin-Adenylat-Zwischenprodukts. Das Zwischenprodukt reagiert dann mit Sauerstoff unter Bildung eines cyclischen Luciferinperoxy-moleküls, das dem Coelenterat-Zwischenprodukt in Form eines cyclischen Peroxids ähnelt, das unter Entstehung von CO_2 und eines angeregten Zustands des Carbonylprodukts zerfällt. Das angeregte Molekül emittiert dann ein gelbes Licht; die Farbe ist jedoch abhängig vom pH-Wert. Mit sinkendem pH-Wert wechselt die Farbe der Biolumineszenz von gelbgrün hin zu rot.

[0234] Verschiedene Leuchtkäfer-Arten emittieren Biolumineszenz mit unterschiedlichen Farben, so dass die Farbe der Reaktion von der Art abhängt, von der die Luciferase erhalten wird. Zusätzlich ist die Reaktion für einen pH-Wert von 7,8 optimiert.

[0235] Die Zugabe von ATP und Luciferin zu einer Reaktion, die erschöpft ist, erzeugt eine zusätzliche Licht-

temission. Demnach kann das System, sobald es eingerichtet ist, relativ leicht aufrechterhalten werden. Daher ist es bestens für die Verwendung hier in den Ausführungsformen geeignet, in denen ein lang andauerndes Leuchten erwünscht ist.

e. Bakterielle Systeme

[0236] Leuchtende Bakterien emittieren typischerweise ein kontinuierliches, üblicherweise blaugrünes Licht. Bei starker Expression kann ein einziges Bakterium 10^4 bis 10^5 Photonen pro Sekunde emittieren. Bakterielle Biolumineszenz-Systeme schließen unter anderem diejenigen Systeme ein, die in biolumineszierenden Arten der Gattungen *Photobacterium*, *Vibrio* und *Xenorhabdus* gefunden werden. Diese Systeme sind wohlbekannt und gut charakterisiert (siehe z. B. Baldwin et al. (1984) *Biochemistry* 23: 3663–3667; Nicoli et al. (1974) *J. Biol. Chem.* 249: 2393–2396; Welches et al. (1981) *Biochemistry* 20: 512–517; Engebrecht et al. (1986) *Methods in Enzymology* 133: 83–99; Frackman et al. (1990) *J. of Bacteriology* 172: 5767–5773; Miyamoto et al. (1986) *Methods in Enzymology* 133: 70; U.S.-Patent Nr. 4,581,335).

(1) Luciferasen

[0237] Bakterielle Luciferasen, wie sie durch die Luciferase beispielhaft angegeben werden können, die von *Vibrio harveyi* stammt (EC 1.14.14.3, Alkanol-reduzierte-FMN-Sauerstoff Oxidoreduktase 1-hydroxylierend, lumineszierend), ist eine Oxidase mit gemischten Funktionen, die durch die Assoziation von zwei verschiedenen Proteinuntereinheiten α und β gebildet wird. Die α -Untereinheit hat ein apparentes Molekulargewicht von etwa 42000 kD, und die β -Untereinheit hat ein apparentes Molekulargewicht von 37000 kD (siehe z. B. Cohn et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 102–123). Diese Untereinheiten assoziieren miteinander unter Bildung eines 2-Kettenkomplex-Luciferaseenzym, das die lichtemittierende Reaktion biolumineszierender Bakterien, wie von *Vibrio harveyi* (U.S.-Patent Nr. 4,581,335; Belas et al. (1982) *Science* 218: 791–793), *Vibrio fischeri* (Engebrecht et al. (1983) *Cell* 32: 773–781; Engebrecht et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81: 4154–4158) und anderer Bakterien, katalysiert.

[0238] Bakterielle Luciferase-Gene sind kloniert worden (siehe z. B. U.S.-Patent Nr. 5,221,623; U.S.-Patent Nr. 4,581,335; Europäische Patentanmeldung Nr. EP 386 691 A). Plasmide für die Expression einer bakteriellen Luciferase, wie von *Vibrio harveyi*, schließen pFIT001 (NRRL B-18080), pPALE001 (NRRL B-18082) und pMR19 (NRRL B-18081)) ein und sind bekannt. Beispielsweise ist die Sequenz des vollständigen lux-Regulons von *Vibrio fischeri* ermittelt worden (Baldwin et al. (1984), *Biochemistry* 23: 3663–3667; Baldwin et al. (1981) *Biochem.* 20: 512–517; Baldwin et al. (1984) *Biochem.* 23: 3663–3667; siehe auch z. B. U.S.-Patente Nr. 5,196,318, 5,221,623 und 4,581,335). Dieses Regulon schließt das luxI-Gen, das ein Protein codiert, das für die Autoinducer-Synthese benötigt wird (siehe z. B. Engebrecht et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81: 4154–4158), das luxC-, luxD- und luxE-Gen, die Enzyme codieren, die die Luciferase mit einem Aldehydsubstrat versorgen, und das luxA-Gen und das luxB-Gen ein, die die α -Untereinheit und die β -Untereinheit der Luciferase codieren.

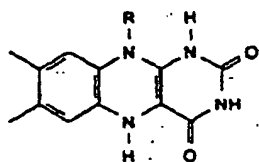
[0239] Lux-Gene anderer Bakterien sind ebenfalls kloniert worden und sind im Handel erhältlich (siehe z. B. Cohn et al. (1985) *J. Biol. Chem.* 260: 6139–6146; U.S.-Patent Nr. 5,196,524, das eine Fusion des luxA-Gens und des luxB-Gens von *Vibrio harveyi* bereitstellt). Demnach wird eine DNA bereitgestellt, die die α -Untereinheit und die β -Untereinheit der Luciferase codiert, die verwendet werden kann, um die Luciferase herzustellen. Die DNA, die die α -Untereinheit (1065 bp) und die β -Untereinheit (984 bp) codiert, die DNA, die ein Luciferase-Gen von 2124 bp enthält, das die α -Untereinheit und die β -Untereinheit codiert, ein rekombinanter Vektor, der die DNA enthält, die beide Untereinheiten codiert, und ein transformiertes *E. coli* und andere bakterielle Wirte für die Expression und Herstellung der codierten Luciferase, sind im Handel erhältlich. Zusätzlich sind bakterielle Luciferasen im Handel erhältlich.

(2) Luciferine

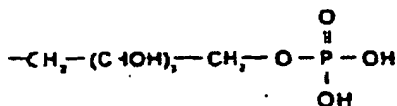
[0240] Bakterielle Luciferine schließen



oder



ein, worin R beispielsweise



ist, worin das Tetradecanal und das reduzierte Flavin-Nucleotid als Luciferin eingestuft werden, da beide während der lichtemittierenden Reaktion oxidiert werden.

(3) Reaktionen

[0241] Die bakteriellen Systeme benötigen zusätzlich zu reduziertem Flavin fünf Polypeptide, um die Biolumineszenzreaktion zu vervollständigen: zwei Untereinheiten α und β des bakteriellen Luciferins und drei Einheiten eines Fettsäure-Reduktasesystem-Komplexes, der das Tetradecanalaldehyd liefert. Beispiele für bakterielle Biolumineszenz-Systeme, die in der Vorrichtung und den Verfahren, die hier bereitgestellt werden, brauchbar sind, schießen diejenigen ein, die von *Vibrio fisheri* und *Vibrio harveyi* stammen. Ein Vorteil dieses Systems ist seine Fähigkeit, bei niedrigen Temperaturen zu funktionieren; bestimmte chirurgische Verfahren werden durchgeführt, indem der Körper auf niedrigere Temperaturen gekühlt wird.

[0242] Bakterielle Luciferase katalysiert die Flavin-vermittelte Hydroxylierung eines langkettigen Aldehyds unter Erhalt einer Carbonsäure und eines angeregten Flavins; das Flavin kehrt unter gleichzeitiger Emission von blauem Licht ($\lambda_{\text{max}} = 490 \text{ nm}$; siehe z. B. Legocki et al. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81: 9080; siehe auch U.S.-Patent Nr. 5,196,524) in den Grundzustand zurück:



[0243] Die Reaktion kann initiiert werden, indem reduziertes Flavinmononucleotid (FMNH_2) mit einem Gemisch aus bakterieller Luciferase, Sauerstoff und einem langkettigem Aldehyd, üblicherweise n-Decylaldehyd, in Kontakt gebracht wird.

[0244] Die DNA, die die Luciferase des fluoreszierenden Bakteriums *Alteromonas hanedai* codiert, ist bekannt (CHISSO CORP; siehe auch Japanische Anmeldung JP 7222590, veröffentlicht am 22. August 1995). Das reduzierte Flavinmononucleotid (FMNH_2 ; Luciferin) reagiert mit Sauerstoff in Gegenwart von bakterieller Luciferase unter Erzeugung eines Peroxyflavins als Zwischenprodukt. Dieses Zwischenprodukt reagiert mit einem langkettigen Aldehyd (Tetradecanal) unter Bildung der Säure und des Luciferase-gebundenen Hydroxyflavins in seinem angeregten Zustand. Das angeregte Luciferase-gebundene Hydroxyflavin emittiert dann Licht und löst sich von der Luciferase als oxidiertes Flavinmononucleotid (FMN) und Wasser. In vivo wird FMN wieder reduziert und in den Prozess zurückgeführt, und der Aldehyd wird aus der Säure regeneriert.

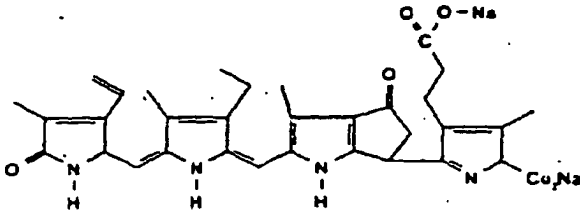
[0245] Flavinreduktasen sind kloniert worden (siehe z. B. U.S.-Patent Nr. 5,484,723; siehe SEQ ID NO: 14 für eine repräsentative Sequenz aus diesem Patent). Diese wie auch NAD(P)H können in der Reaktion für die Regeneration von FMNH_2 für die Reaktion mit der bakteriellen Luciferase und dem langkettigen Aldehyd eingesetzt werden. Die Flavinreduktase katalysiert die Umsetzung von FMN zu FMNH_2 , bei der es sich um die Luciferase-Reaktion handelt; Wenn die Luciferase und die Reduktase in das Reaktionssystem eingebracht werden, ist es demnach möglich, die Biolumineszenzreaktion aufrechtzuerhalten. Da die bakterielle Luciferase mehrmals umgesetzt wird, hält die Biolumineszenz so lange an, wie ein langkettiger Aldehyd in dem Reaktionssystem vorhanden ist.

[0246] Die Farbe des durch die biolumineszierenden Bakterien erzeugten Lichts resultiert auch aus einem blau fluoreszierenden Protein (BFP), das an der Biolumineszenzreaktion teilnimmt. Dieses Protein, das wohl bekannt ist (siehe z. B. Lee et al. (1978) Methods in Enzymology LVII: 226–234), kann ebenfalls zu bakteriellen Biolumineszenzreaktionen gegeben werden, um eine Verschiebung der Farbe zu verursachen.

f. Andere Systeme

(1) Dinoflagellat-Biolumineszenz-erzeugende Systeme

[0247] In Dinoflagellaten findet die Biolumineszenz in Organellen statt, die als Scintillonen bezeichnet werden. Diese Organellen sind Ausstülpungen des Cytoplasmas in die Zellvakuole. Die Scintillonen enthalten ausschließlich Dinoflagellat-Luciferase und Luciferin (mit seinem Bindungsprotein), wobei andere cytoplasmische Komponenten mehr oder weniger ausgeschlossen sind. Das Dinoflagellat-Luciferin ist ein mit dem Chlorophyll verwandtes Tetrapyrrol

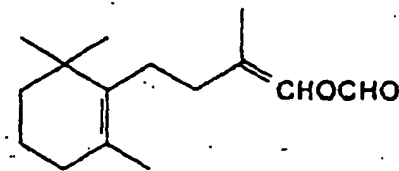


oder ein Analogon davon.

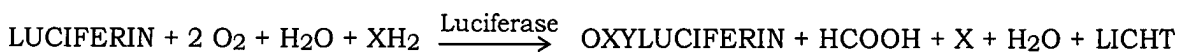
[0248] Die Luciferase ist ein Protein von 135 kD aus einer Kette, das bei pH 6,5 aktiv, bei pH 8 jedoch inaktiv ist (siehe z. B. Hastings (1981) Bioluminescence and Chemiluminescence, DeLuca et al., Hrsg. Academic Press, NY, S. 343–360). In den Extrakten kann eine Lumineszenzaktivität erhalten werden, die bei pH 8 hergestellt wurden, indem einfach der pH-Wert von 8 nach 6 verschoben wird. Dies geschieht in löslichen und teilchenförmigen Fraktionen. In dem intakten Scintillon dauert der Lumineszenzblitz ~100 ms, was der Dauer des Blitzes in vivo entspricht. In Lösung hängen die Kinetiken von der Verdünnung ab, wie bei jeder sonstigen enzymatischen Reaktion. Bei pH 8 ist das Luciferin an ein Protein gebunden (Luciferin-Bindungsprotein), das die Reaktion des Luciferins mit der Luciferase verhindert. Bei pH 6 wird das Luciferin jedoch freigesetzt und ist frei für die Reaktion mit dem Enzym.

(2) Systeme von Mollusken, wie Latia und Pholas

[0249] Die Mollusken *Latia neritoides* und Arten von *Pholas* sind biolumineszierende Tiere. Das Luciferin hat die Struktur



und ist synthetisiert worden (siehe z. B. Shimomura et al. (1968) Biochemistry 7: 1734–1738; Shimomura et al. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 69: 2086–2089). Zusätzlich zu einer Luciferase und Luciferin hat die Reaktion eine dritte Komponente, ein "Purpurprotein". Die Reaktion, die durch ein exogenes Reduktionsmittel gestartet werden kann, wird durch das folgende Schema dargestellt:

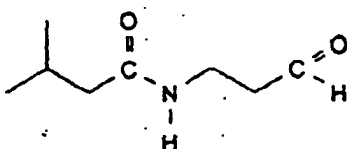


XH_2 ist ein Reduktionsmittel

[0250] Für die Anwendung hier benötigt die Reaktion das Purpurprotein sowie ein Reduktionsmittel.

(3) Erdwürmer und andere Ringelwürmer

[0251] Erdwormarten wie *Diplocardia longa*, *Chaetopterus* und *Harmothoe*, zeigen Biolumineszenz. Das Luciferin hat die Struktur



[0252] Die Reaktion benötigt Wasserstoffperoxid zusätzlich zum Luciferin und zur Luciferase. Die Luciferase ist ein Photoprotein.

(4) Glühwürmchen

[0253] Das Luciferase/Luciferin-System der Glühwürmchen, die in Großbritannien und in Australien und Neuseeland in Höhlen gefunden werden, sind ebenfalls für eine Anwendung vorgesehen.

(5) Marine Polychaetwurmsysteme

[0254] Marine Polychaetwurm-Biolumineszenz-erzeugende Systeme wie *Phrixotrix* und *Chaetopterus*, werden hier ebenfalls für eine Verwendung in Betracht gezogen.

(6) Südamerikanischer Eisenbahnwurm

[0255] Das Biolumineszenz-erzeugende System des Südamerikanischen Eisenbahnwurms ("railway beetle") ist ebenfalls für die Verwendung hier vorgesehen.

(7) Fische

[0256] Von Interesse sind hier die Luciferasen und die Biolumineszenz-erzeugenden Systeme, die rotes Licht erzeugen. Diese schließen die Luciferasen ein, die in Arten von *Aristostomias*, wie *A. scintillans* (siehe z. B. O'Day et al. (1974) *Vision Res.* 14: 545–550), *Pachystomias*, *Malacosteus*, wie *M. niger*, gefunden werden.

[0257] Blau/grün-Emitter schließen *Cyclithon*, *Mycophiden*, Silberpfeilfische (*Agyropelecus*), *Vinciguerria*, *Howella*, *Florenciella* und *Chauliodus* ein.

g. Fluoreszierende Proteine

[0258] Das GFP von *Aequorea* und das der Seenadel *Renilla reniformis* haben den gleichen Chromophor, allerdings hat das *Aequorea*-GFP zwei Absorptionspeaks bei 395 und 475 nm, während das *Renilla*-GFP einen einzigen Absorptionspeak bei 498 nm hat, mit etwa 5,5-fach größerem Monomerektinktionskoeffizienten als der Hauptpeak des *Aequorea*-Proteins bei 395 nm (Ward, W. W. in *Bioluminescence and Chemiluminescence* (Hrsg. DeLuca, M. A. & McElroy, W. D.) 235–242 (Academic Press, New York, 1981)). Die Spektren des isolierten Chromophors und von denaturiertem Protein bei neutralem pH-Wert stimmen nicht mit den Spektren beider nativen Proteine überein (Cody, C. W. et al. (1993) *Biochemistry* 32: 1212–1218).

(1) Grün und blau fluoreszierende Proteine

[0259] Wie hier beschrieben wird blaues Licht bei Verwendung der *Renilla*-Luciferase oder des *Aequorea*-Photoproteins in Gegenwart von Ca^{2+} und des Coelenterazins Luciferin oder eines Analogons davon erzeugt. Dieses Licht kann in grünes Licht umgewandelt werden, wenn ein grün fluoreszierendes Protein (GFP) zu der Reaktion gegeben wird. Grün fluoreszierende Proteine, die gereinigt worden sind (siehe z. B. Prasher et al. (1992) *Gene* 111: 229–233) und auch kloniert worden sind (siehe z. B. Internationale PCT-Anmeldung Nr. WO 95/07463, die auf der U.S.-Anmeldung mit der Seriennummer 08/119,678 und der U.S.-Anmeldung mit der Seriennummer 08/192,274 basiert, werden von Cnidarianen (Nesseltiere) als Energietransferakzeptoren verwendet. GFPs fluoreszieren in vivo bei der Aufnahme von Energie von einem Luciferase-Oxyluciferin-Komplex im angeregten Zustand oder von einem Ca^{2+} -aktivierten Photoprotein. Der Chromophor ist modifizierte Aminosäurereste in dem Polypeptid. Die am besten charakterisierten GFPs sind diejenigen von *Aequorea* und *Renilla* (siehe z. B. Prasher et al. (1992) *Gene* 111: 229–233; Hart et al., (1979) *Biochemistry* 18: 2204–2210). Beispielsweise enthält ein grün fluoreszierendes Protein (GFP) von *Aequorea victoria* 238 Aminosäuren, absorbiert blaues Licht und emittiert grünes Licht. Der Einschluß dieses Proteins in eine Zusammensetzung, die das *Aequorin*-Photoprotein enthält, beladen mit Coelenterazin und Sauerstoff, kann in Gegenwart von Calcium zur Erzeugung von grünem Licht führen. Es wird daher ins Auge gefasst, dass GFPs in die Biolumineszenz-erzeugenden Reaktionen eingeschlossen werden können, die die *Aequorin*- oder die *Renilla*-Luciferase oder eine andere geeignete Luciferase enthalten, um die Farbe der resultierenden Biolumineszenz zu verstärken oder zu ändern.

[0260] GFPs werden durch blaues Licht zur Emission von grünem Licht angeregt und können daher in Abwesenheit von Luciferase und in Verbindung mit einer äußeren Lichtquelle bei Novitäten verwendet werden, wie

dies hier beschrieben wird. Ähnlich können blau fluoreszierende Proteine (BFs), wie von *Vibrio fischeri*, *Vibrio harveyi* oder *Photobacterium phosphoreum*, in Verbindung mit einer äußeren Lichtquelle mit einer geeigneten Wellenlänge verwendet werden, um blaues Licht zu erzeugen. (siehe beispielsweise Karatani et al., "A blue fluorescent Protein from a yellow-emitting luminous bacterium", *Photochem. Photobiol.* 55(2): 293–299 (1992); Lee et al., "Purification of a bluefluorescent Protein from the bioluminescent bacterium *Photobacterium phosphoreum*" *Methods Enzymol.* (Biolumin. Chemilumin.) 57: 226–234 (1978); und Gast et al. "Separation of a blue fluorescence Protein from bacterial luciferase" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80(1): 14–21 (1978), wobei jedes dieser Dokumente sowie die darin angegebenen Literaturstellen hier durch die Bezugnahme vollständig aufgenommen werden). GFPs und/oder BFPs oder andere derartige fluoreszierende Proteine können vor allem in den Getränk- und/oder Nahrungsmittel-Kombinationen, die hier beschrieben werden, verwendet werden und in Räumen serviert werden, die mit Licht mit einer geeigneten Wellenlänge beleuchtet werden, um die fluoreszierenden Proteine zum Fluoreszieren zu bringen.

[0261] GFPs und/oder BFPs oder andere derartige fluoreszierende Proteine können in jeder beliebigen Novität und in den Kombinationen, die hier beschrieben werden, verwendet werden, wie in Getränken und Spielzeugen, eingeschlossen blasenerzeugenden Spielzeugen, vor allem blasenerzeugenden Zusammensetzungen und Gemischen. Von besonderem Interesse ist ebenfalls die Verwendung dieser Proteine in Kosmetika, vor allem in Gesichtsfarben oder Make-ups, Haarfärbemitteln oder Haarkonditioniermitteln, Schäumen oder anderen derartigen Produkten. Derartige Systeme sind von besonderem Interesse, da keine Luciferase benötigt wird, um das Photoprotein zu aktivieren und weil die Proteine nicht toxisch und sicher bei der Anwendung auf der Haut, den Haaren, den Augen und beim Verzehr sind. Diese fluoreszierenden Proteine können auch zusätzlich zu Biolumineszenz-erzeugenden Systemen verwendet werden, um ein Array verschiedener Farben zu verstärken oder zu bilden.

[0262] Diese Proteine können einzeln oder in Kombination mit Biolumineszenz-erzeugenden Systemen verwendet werden, um ein Array von Farben zu erzeugen. Sie können in solchen Kombinationen verwendet werden, dass sich die Farbe beispielsweise von Getränken mit der Zeit ändert oder Schichten mit verschiedenen Farben einschließt.

(2) Phycobili-Proteine

[0263] Phycobili-Proteine sind wasserlösliche fluoreszierende Proteine, die von Cyanobakterien und eukaryotischen Algen abgeleitet werden (siehe z. B. Apt et al. (1995) *J. Mol. Biol.* 238: 79–96; Glazer (1982) *Ann. Rev. Microbiol.* 36: 173–198; und Fairchild et al. (1994) *J. of Biol. Chem.* 269: 8686–8694). Diese Proteine sind als fluoreszierende Marker in Immunosassays verwendet worden (siehe Kronick (1986) *J. of Immunolog. Meth.* 92: 1–13), die Proteine wurden isoliert und die DNA, die sie codiert, steht ebenfalls im Handel zur Verfügung (siehe z. B. Pilot et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81: 6983–6987; Lui et al. (1993) *Plant Physiol* 103: 293–294; und Houmard et al. (1988) *J. Bacteriol.* 170: 5512–5521; die Proteine sind im Handel beispielsweise von ProZyme Inc., San Leandro, CA, verfügbar).

[0264] In diesen Organismen sind die Phycobili-Proteine in subzellulären Strukturen, die als Phycobilisomen bezeichnet werden, angeordnet, und sie haben die Funktion von akzessorischen Pigmenten, die an Photosynthesereaktionen teilnehmen, indem sie sichtbares Licht absorbieren und die abgeleitete Energie über einen direkten Fluoreszenzenergie-Transfermechanismus auf das Chlorophyll übertragen.

[0265] Zwei Klassen von Phycobili-Proteinen sind auf der Basis ihrer Farbe bekannt: Phycoerythrine (rot) und Phycocyanine (blau), über die berichtet wurde, dass sie Absorptionsmaxima zwischen 490 und 570 nm bzw. zwischen 610 und 665 nm haben.

[0266] Phycoerythrine und Phycocyanine sind heterogene Komplexe, die in unterschiedlichen Verhältnissen aus dem α -Monomer und dem β -Monomer zusammengesetzt sind, an die eine oder mehrere Klassen linearer Tetrapyrrol-Chromophore kovalent gebunden sind. Spezielle Phycobili-Proteine können auch eine dritte γ -Untereinheit enthalten, die oft mit aggregierten ($\alpha\beta$)₆-Proteinen assoziiert.

[0267] Alle Phycobili-Proteine enthalten entweder das Phycothrombilin- oder das Phycoerythrobilin-Chromophor, und sie können außerdem andere Biline, Phycourobilin, Cryptoviolin oder das 697-nm-Bilin enthalten. Die γ -Untereinheit ist kovalent mit Phycourobilin verbunden, was zu dem Absorptionsspeak des B- und des R-Phycoerythrins bei 495–500 nm führt. Die spektralen Eigenschaften der Phycobiliprotein können demnach durch die Kombination der verschiedenen Chromophore, die Zusammensetzung der Untereinheiten der Apophycobili-Proteine und/oder die lokale Umgebung, die die tertiäre und quartäre Struktur der Phycobiliproteine hervor-

rufen, beeinflusst werden.

[0268] Wie oben für die GFPs und die BFPs beschrieben werden auch die Phycobili-Proteine durch sichtbares Licht mit der geeigneten Wellenlänge aktiviert und können demnach in Abwesenheit von Luciferase und in Verbindung mit einer äußeren Lichtquelle verwendet werden, um Neoplasien und Spezialgewebe wie hier beschrieben zu beleuchten. Weiterhin ist die Befestigung der Phycobili-Proteine an festen Trägermatrizes bekannt (siehe z. B. U.S.-Patente Nr. 4,714,682; 4,767,206; 4,774,189 und 4,867,908). Wie oben erwähnt können diese Proteine in Kombination mit anderen fluoreszierenden Proteinen und/oder Biolumineszenz-erzeugenden Systemen verwendet werden, um ein Array von Farben zu erzeugen oder zeitabhängig verschiedene Farben bereitzustellen.

[0269] Wie weiter oben beschrieben ist die Befestigung von Phycobili-Proteinen auf festen Trägermatrizes bekannt (siehe z. B. U.S.-Patente Nr. 4,714,682; 4,767,206; 4,774,189 und 4,867,908). Daher können Phycobili-Proteine an Mikroträger gekoppelt werden, die an eine oder mehrere Komponenten der Biolumineszenzreaktion, vorzugsweise eine Luciferase, gekoppelt sind, um die Wellenlänge des durch die Biolumineszenzreaktion erzeugten Lichts umzuwandeln. Mikroträger, die an ein oder mehrere Phycobiliproteine gekoppelt sind, können in jedem der hier beschriebenen Verfahren verwendet werden.

[0270] Die Umwandlung von blauem oder grünem Licht in Licht mit einer längeren Wellenlänge, d. h. in rotes Licht oder Licht im nahen Infrarot, ist für die Sichtbarmachung von tiefen Neoplasien oder tiefem Spezialgewebe unter Verwendung eines Laparoscops oder eines Computertomogramm-Bildgebungssystems wie hier beschrieben besonders bevorzugt.

[0271] Wenn demnach eine Änderung der Frequenz des emittierten Lichts erwünscht ist, kann das Phycobili-Protein in die Biolumineszenz-erzeugenden Komponenten einbezogen werden.

C. ISOLIERUNG UND IDENTIFIZIERUNG VON NUCLEINSÄUREN, DIE LUCIFERASEN UND GFPs codieren

[0272] Nucleinsäuren und Biolumineszenzproteine, die zwei neue grün fluoreszierende Proteine (GFPs) und drei Coelenterazin-verwendende Luciferasen einschließen, werden beschrieben. Ein Vorteil der Coelenterazin-verwendenden Luciferasen besteht in vielen Anwendungen, vor allem analytischen Anwendungen, darin, dass nur das lichtemittierende Luciferin und molekularer Sauerstoff benötigt werden; Cofaktoren wie ATP oder Ca^{2+} sind nicht erforderlich.

[0273] Die Nucleinsäuren, die diese Luciferasen und GFPs codieren, können auch verwendet werden, um verwandte Nucleinsäuren von verwandten Arten zu isolieren. Ebenfalls beschrieben werden hier Verfahren zum Isolieren von zusätzlichen Genen, die Luciferasen und vor allem GFPs codieren, aus verwandten Arten, für die es sich bislang gezeigt hat, dass die Isolierung schwierig ist.

[0274] Nucleinsäuren, die die Luciferasen von *Renilla mulleri*, *Pleuromamma*, *Gaussia* und *Ptilosarcus* codieren, sind isoliert worden. Diese Nucleinsäuren sind in Plasmide und Expressionsvektoren und in geeignete Wirtszellen eingeführt worden oder können darin eingeführt werden. Die Wirtszellen sind verwendet worden und können verwendet werden, um das codierte Protein herzustellen, das für jede der hier beschriebenen oder dem Fachmann bekannten Anwendungen verwendet werden kann.

[0275] Die klonierten DNA-Fragmente können in Bakterienzellen, vorzugsweise in *E. coli*, repliziert werden. Ein bevorzugtes DNA-Fragment schließt auch einen bakteriellen Replikationsursprung ein, um das Fortbestehen des DNA-Fragments von Generation zu Generation der Bakterien zu gewährleisten. Auf diese Weise können große Mengen des DNA-Fragments durch die Replikation in Bakterien erzeugt werden. Bevorzugte bakterielle Replikationsursprünge schließen nicht einschränkend den *f1-ori*- und den *co1-E1*-Replikationsursprung ein. Bevorzugte Wirte enthalten chromosomale Kopien der DNA, die die T7-RNA-Polymerase codiert, funktionsfähig verbunden mit einem induzierbaren Promotor, wie dem *lacUV*-Promotor (siehe U.S.-Patent Nr. 4,952,496). Derartige Wirte schließen nicht einschränkend die lysogenen *E. coli*-Stämme HMS174(DE3)pLysS, BL21(DE3)pLysS, HMS174(DE3) und BL21(DE3) ein. Der Stamm BL21(DE3) ist bevorzugt. Die pLys-Stämme liefern niedrige Konzentrationen an T7-Lysozym, einem natürlichen Inhibitor der T7-RNA-Polymerase.

[0276] Für die Expression und für die Herstellung von mutierten Proteinen, wie temperaturempfindlichen mutierten Proteinen, sind eukaryotische Zellen, darunter Hefezellen, wie *Saccharomyces*, bevorzugt.

[0277] Fusionsproteine aus den Luciferasen und den GFPs werden ebenfalls bereitgestellt. Verfahren für deren Verwendung werden ebenfalls beschrieben.

[0278] Die Verfahren werden in Bezug auf die Nucleinsäuren und die Proteine von *Renilla* und *Gaussia* beschrieben. Ähnliche Verfahren wurden verwendet, um die Nucleinsäuren und Proteine von *Ptilosarcus* und *Pleuromamma* zu identifizieren und isolieren, die hier bereitgestellt werden.

[0279] Das GFP, das aus *Renilla mulleri* kloniert wurde, hat spektrale Eigenschaften, die es besonders nützlich machen. Zu diesen Eigenschaften gehören eine sehr hohe Quantenausbeute, ein hohes molares Absorptionsvermögen und eine effiziente Verwendung mit den allgemein verfügbaren Fluorescein-Filtern (z. B. Endo-GFP-Filterset, von Chroma im Handel erhältlich). Es ist bekannt, dass *Renilla reniformis*-GFP sechsfach heller als das Wildtyp-*Aequorea*-GFP ist, auf einer molaren Basis, und dreifach bis vierfach heller als die hellste Mutante. Das *Renilla mulleri*-GFP, das durch die Nucleinsäureklone codiert wird, die hier bereitgestellt werden, zeigt ähnliche funktionelle Charakteristika, und die Spektren erscheinen identisch mit den Spektren des nativen *reniformis*-GFPs.

[0280] Auf der Basis der Form der Anregungskurve und der Form der Emissionskurve hat das hier bereitgestellte *Ptilosarcus*-GFP ein molares Absorptionsvermögen, das sogar größer als das molare Absorptionsvermögen des *R. mulleri*-GFPs ist, und es sollte daher sogar noch heller sein.

[0281] Die *Gaussia*-Luciferase und die *Pleuromama*-Luciferase sind die ersten beiden Copepod-Luciferasen, die kloniert wurden; beide werden ausgeschieden und sollten so effektive Marker für sezernierte Proteine sein. Die *Gaussia*-Luciferase ist die kleinste Luciferase, die bislang gefunden wurde (MG 19900). Alle Luciferasen zeigen das typische Ausgabespektrum der Coelenterazin-verwendenden Luciferasen. Alle zeigen eine starke Abhängigkeit von der Kationenkonzentration, benötigen aber keine zweiwertigen Kationen (Daten nicht gezeigt). Keine der Luciferasen hat eine erhebliche Homologie mit den Luciferasen, die aus anderen Arten isoliert wurden.

[0282] Es gibt jedoch eine beträchtliche Homologie zwischen dem *Ptilosarcus*-GFP und dem *R. mulleri*-GFP (~80%), jedoch nur eine geringe Homologie mit dem *A. victoria*-GFP (~25%). Unabhängig hiervon haben alle drei Proteine eine Länge von 238 AS, was darauf schließen lässt, dass die Strukturen der drei Proteine ähnlich sind. Der Sequenzvergleich zwischen den GFPs, die aus *Aequorea victoria*, *Renilla mulleri* und *Ptilosarcus* isoliert wurden, zeigt, dass die Chromophor-Sequenzen von *R. mulleri* und *Ptilosarcus* identisch sind und von der von *A. victoria* abweichen. Diese Sequenzunterschiede weisen auf Proteinstellen hin, die verändert werden können, ohne dass die wesentlichen Fluoreszenzeigenschaften beeinträchtigt werden, und sie stellen auch einen Weg für die Identifizierung von Resten dar, die diese Eigenschaften verändern.

ISOLIERUNG UND IDENTIFIZIERUNG EINER NUCLEINSÄURE, DIE EINE *Gaussia*-LUCIFERASE CODIERT

1. Isolierung von Proben aus der Gattung *Gaussia*

[0283] Proben von *Gaussia* sind leicht aus den Weltmeeren erhältlich, eingeschlossen der Golf von Mexiko, der Pazifische Ozean und der Atlantische Ozean. Die Arten, die hier für die Isolierung der beispielhaften Nucleinsäure verwendet werden, wurden aus dem Pazifischen Ozean vor der Küste Südkaliforniens im San Pedro- und San Clemente-Becken isoliert. Die Lebewesen werden durch das Sieben von Meerwasserproben im Dunkeln und das Auswählen der leuchtenden Copepoden identifiziert. Nach dem Einfangen werden die Proben sorgfältig gewaschen und können auch sezirt werden, um eine Anreicherung in Bezug auf lichtemittierende Gewebe zu erhalten. Die unversehrten Organismen oder die sezirten Gewebe werden dann schockgefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert.

[0284] Wie in den folgenden Beispielen detailliert beschrieben wurden unversehrte *Gaussia* als Quelle für die Isolierung von Nucleinsäuren verwendet, die eine *Gaussia*-Luciferase codieren (siehe z. B. SEQ ID NO: 19).

2. Herstellung einer *Gaussia*-cDNA-Expressionsbank

[0285] *Gaussia*-cDNA-Expressionsbanken können aus intakter RNA gemäß den hier beschriebenen Verfahren oder durch andere dem Fachmann bekannte Verfahren hergestellt werden (siehe z. B. Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.; U.S.-Patent Nr. 5,292,658).

[0286] Die Herstellung von cDNA-Banken schließt typischerweise die Isolierung der polyadenylierten RNA aus dem ausgewählten Organismus ein, auf die die Einzelstrang-DNA-Synthese unter Verwendung von Reverser Transkriptase, der Verdau des RNA-Strangs des DNA/RNA-Hybrids und die nachfolgende Umwandlung der einzelsträngigen DNA in doppelsträngige cDNA folgen.

a. RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

[0287] Vollständige Gaussia wurde als Quelle für die gesamte cytoplasmische RNA für die Herstellung der Gaussia-cDNA verwendet. Die gesamte intakte RNA kann unter Verwendung von Standardtechniken isoliert werden, die dem Fachmann wohlbekannt sind (siehe z. B. Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Nach dem Isolieren der kompletten zellulären RNA werden dann die polyadenylierten RNA-Moleküle leicht von den nicht polyadenylierten Molekülen unter Verwendung der Affinitätschromatographie auf Oligodeoxythymidylat-Cellulose-Säulen getrennt (wie z. B. von Aviv et al., (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69: 1408 beschrieben).

[0288] Die gereinigte Gaussia-polyA-mRNA wird dann einer cDNA-Synthesereaktion unterzogen, um aus der vollständigen polyA-mRNA eine cDNA-Genbank zu erzeugen. Kurz gesagt wird eine Reverse Transkriptase verwendet, um einen angelagerten polydT-Primer zu verlängern, um ein RNA/DNA-Duplex zu erzeugen. Der RNA-Strang wird dann unter Verwendung einer RNase, z. B. der RNase H, verdaut, und nach der Synthese des zweiten Stranges werden bei den cDNA-Molekülen mit S1-Nuclease oder einer anderen geeigneten Nuclease glatte Enden erzeugt. Die resultierenden doppelsträngigen cDNA-Fragmente können direkt in einen geeigneten Expressionsvektor ligiert werden, alternativ können Oligonucleotid-Linker, die Restriktionsendonucleasestellen codieren, mit dem 5'-Ende der cDNA-Moleküle verknüpft werden, um die Klonierung der cDNA-Moleküle zu erleichtern.

b. Konstruktion der cDNA-Expressionsbanken

[0289] Die am besten charakterisierten Vektoren für die Konstruktion der cDNA-Expressionsbanken sind Lambda-Vektoren. Vektoren auf Lambda-Basis tolerieren cDNA-Insertionen von etwa 12 kb und bieten eine größere Einfachheit beim Durchmustern der Genbank, bei der Amplifikation und der Lagerung, verglichen mit standardmäßigen Plasmidvektoren. Derzeit bevorzugte Vektoren für die Herstellung der Gaussia-cDNA-Expressionsbanken (und der anderen hier angegebenen Genbanken) sind die Vektoren Lambda, Uni-Zap, Lambda-Zap II oder Lambda-ZAP Express/EcoRI/XhoI, die dem Fachmann bekannt sind (siehe z. B. U.S.-Patent Nr. 5,128,256), die auch im Handel erhältlich sind (Stratagene, La Jolla, CA).

[0290] Allgemein kombinieren die Lambda-Zap-Vektoren die hohe Effizienz eines Bakteriophagen-Lambda-Vektorsystems mit der Vielseitigkeit eines Plasmidsystems. Fragmente, die in diese Vektoren kloniert werden, können automatisch unter Verwendung eines Helfer-Phagen herausgeschnitten werden und wieder in die Ringform gebracht werden, um Subklone in dem pBK-abgeleiteten Phagemid zu erzeugen. Das pBK-Phagemid trägt das Ampicillin-Resistenzgen (AMP^R) für die Selektion in Bakterien und die G418-Selektion in eukaryotischen Zellen oder kann das β -Lactamase-Resistenzgen enthalten. Die Expression des rekombinanten Polypeptids erfolgt unter der Kontrolle des lacZ-Promotors in Bakterien und des CMV-Promotors in Eukaryoten.

[0291] Genauer sind diese Vektoren auf Lambda-Basis aus einer Initiator-Terminator-Kassette zusammengesetzt, die das Plasmidsystem, z. B. das wohlbekanntes pBK-Bluescript-Derivate (erhältlich von Stratagene), eingeklammert vom rechten und linken Arm des Bakteriophagen Lambda, enthält. Die Lambda-Arme ermöglichen das effiziente Verpacken von replizierter DNA, während die herauschneidbare Initiator-Terminator-Kassette die einfache Klonierung der cDNA-Fragmente und die Erzeugung einer Plasmid-Bank ohne das Erfordernis der zusätzlichen Subklonierung ermöglicht.

[0292] Wenn sie hier verwendet werden, werden die cDNA-Fragmente in die multiple Klonierungsstelle inseriert, die innerhalb der Initiator-Terminator-Kassette des Lambda-Zap-Vektors enthalten ist, um einen Satz von cDNA-Expressionsvektoren zu erzeugen. Mit dem Satz von cDNA-Expressionsvektoren infiziert man geeignete E. coli-Zellen, gefolgt von der Coinfektion mit einem filamentösen Helfer-Phagen. Innerhalb der Zelle erkennen transwirkende Proteine, die von dem Helfer-Phagen codiert werden, z. B. das Gen II-Protein von M13, zwei getrennte Domänen, die innerhalb der Lambda-Arme des Vektors positioniert sind, und führen einzelsträngige Nicks ein, die die Initiator-Terminator-Kassette flankieren. Bei einer nachfolgenden Runde der DNA-Synthese wird ein neuer DNA-Strang synthetisiert, der den vorhandenen Nick-Strang ersetzt unter Freisetzung der Initiator-Terminator-Kassette. Der ersetzte Strang wird dann ringförmig gemacht, von den Helferproteinen als filamentöser Phage verpackt und aus der Zelle abgesondert. Das BK-Plasmid, das die cDNA ent-

hält, wird durch die Infektion eines F'-Stammes von *E. coli* und die Plattierung der infizierten Zellen auf festem Medium, das für die Selektion von pBK-haltigen Zellen mit Ampicillin ergänzt ist, gewonnen.

[0293] Die Gaussia-cDNA-Expressionsbank kann unter Verwendung einer Vielzahl von Verfahren, die dem Fachmann bekannt sind, durchgemustert werden. Die Identifizierung der Gaussia-Luciferase kann beispielsweise unter Verwendung eines funktionellen Durchmusterungsverfahrens durch die visuelle Beobachtung der Kolonien im Hinblick auf die Emission von blauem Licht oder durch die Beobachtung der Lichtemission unter Verwendung eines oder mehrerer Bandpassfilter erreicht werden.

3. Isolierung und Identifizierung von DNA, die eine Gaussia-Luciferase codiert

[0294] Eine DNA, die eine Gaussia-Luciferase codiert, kann unter Verwendung der hier beschriebenen Verfahren oder von Verfahren, die dem Fachmann bekannt sind, isoliert werden. Wie weiter unten detailliert beschrieben, wurde eine Gaussia- λ -Uni-Zap-cDNA-Expressionsplasmid-Bank hergestellt, in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert und auf modifizierte L-Broth-Platten plattiert, die Ruß enthielten, um die Hintergrundfluoreszenz zu absorbieren (siehe z. B. die BEISPIELE).

[0295] Die Transformanten wurden mit einer Lösung besprüht, die IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid; siehe z. B. Nakamura et al. (1979) *Cell* 18: 1109–1117) enthielt, um die Expression der rekombinanten Gaussia-Luciferase durch die heterologe DNA hervorzurufen. Andere Induktionssysteme können ebenfalls verwendet werden. Bevorzugte Promotorregionen sind diejenigen, die in *E. coli* induzierbar und funktionsfähig sind, oder frühe Gene in Vektoren viraler Herkunft. Beispiele für geeignete induzierbare Promotoren und Promotorregionen schließen nicht einschränkend ein: den *E. coli*-lac-Operator, der auf Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid reagiert (IPTG; siehe z. B. Nakamura et al. (1979) *Cell* 18: 1109–1117), den Metallothionein-Promotor, Metall-regulatorische Elemente, die auf eine Induktion durch Schwermetalle (z. B. Zink) reagieren (siehe z. B. U.S.-Patent Nr. 4,870,009 von Evans et al.); den Phagen-T7-lac-Promotor, der auf IPTG reagiert (siehe z. B. U.S.-Patent Nr. 4,952,496; und Studier et al. (1990) *Meth. Enzymol.* 185: 60–89) und den TAC-Promotor. Andere Promotoren schließen nicht einschränkend den T7-Phagen-Promotor und andere T7-artige Phagen-Promotoren, wie den T3-, T5- und SP6-Promotor, den *trp*-, *lpp*- und *lac*-Promotor, wie den lacUV5-Promotor von *E. coli*; den P10- oder Polyhedrin-Gen-Promotor von Baculovirus/Insektenzellen-Expressionssystemen (siehe z. B. U.S.-Patente Nr. 5,243,041, 5,242,687, 5,266,317, 4,745,051 und 5,169,784) und induzierbare Promotoren anderer eukaryotischer Expressionssystemen ein.

[0296] Besonders bevorzugte Plasmide für die Transformation von *E. coli*-Zellen schließen die pET-Expressionsvektoren ein (siehe U.S.-Patent 4,952,496; im Handel erhältlich von NOVAGEN, Madison, WI; siehe auch die Literatur, die von Novagen veröffentlicht wurde, die das System beschreibt). Derartige Plasmide schließen ein: pET 34 (siehe [Fig. 1](#)), pET 11a, das den T7-lac-Promotor, T7-Terminator, den induzierbaren *E. coli*-lac-Operator und das lac-Regressorgen enthält; pET 12a-c, das den T7-Promotor, den T7-Terminator, und das *E. coli*ompT-Sekretionssignal enthält; und pET 15b (NOVAGEN, Madison, WI), das eine His-TagTM-Leadersequenz zur Verwendung bei der Reinigung mit einer His-Säule und einer Thrombinspaltungsstelle, die die Spaltung nach der Reinigung über die Säule ermöglicht; die T7-lac-Promotorregion und den T7-Terminator enthält. Das Plasmid pET34 enthält weiterhin die CBD, die bei der Reinigung hilft.

[0297] Besonders bevorzugte Plasmide für die Transformation von *E. coli*-Zellen schließen die pET-Expressionsvektoren ein (siehe U.S.-Patent 4,952,496; im Handel von NOVAGEN, Madison, WI, erhältlich). Das Plasmid pET34-LIC ist beispielsweise ein prokaryotischer Expressionsvektor, der eine multiple Klonierungsstelle für die Insertion von heterologen DNA-Templates stromabwärts eines Bakteriophagen-T7-Promotors enthält. Die Transformation in einen bakteriellen Wirt, der die T7-RNA-Polymerase exprimiert, z. B. in den *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) führt zu einer starken rekombinanten Expression des heterologen Proteins. DNA, die die Gaussia-Luciferase codiert, wurde in den pET34-Vektor in Form einer Fusion mit der Cellulose-Bindungsdomäne inseriert (CBD; siehe SEQ ID NO: 21 und 22) und in *E. coli*-Wirtszellen exprimiert.

[0298] Über 120 verschiedene CBD-Sequenzen sind identifiziert worden und auf der Basis von Sequenzähnlichkeiten in mindestens 10 Klassen eingeteilt worden (Tomme et al. (1995) in *Enzymatic Degradation of Insoluble Polysaccharides*; Saddler, J. M., und Penner, M., Hrsg.; American Chemical Society, Washington D. C.; S. 142–161). Die CBD-clos-Tag-Sequenz wird von dem Cellulose-Bindungsprotein A (CbpA) von *Clostridium cellulovorans* (Goldstein et al. (1993) *J. Bacteriol.* 175: 5762–5768) abgeleitet und hat eine hohe Affinität für kristalline Cellulose.

[0299] Um Luciferase-exprimierende Klone zu identifizieren, wurden die Transformanten, die auf schwarzem

Agar gezüchtet wurden, mit Coelenterazin besprüht wurden.

[0300] Die Expression war offensichtlich auf Grund der Kolonien, die ein intensives blau-grünes Licht emittierten. Die leuchtenden Kolonien wurden ausgewählt. Die Nucleotidsequenz der cDNA-Insertion eines blau-grün emittierenden Transformanten wurde ermittelt (siehe z. B. SEQ ID NO: 19). Wie hier beschrieben codiert die 765-DNA-Insertion ein Polypeptid aus 185 Aminosäuren.

ISOLIERUNG UND IDENTIFIZIERUNG VON NUCLEINSÄUREN, DIE Renilla-PROTEINE CODIEREN

1. Isolierung von Proben aus der Gattung Renilla

[0301] Exemplare von Renilla sind einfach aus den Weltmeeren einschließlich dem Golf von Mexiko, dem Pazifik und dem Atlantik verfügbar. Renilla lebt typischerweise auf dem Meeresboden in einer Tiefe von 30 bis 100 Fuß und kann durch Losreißen gesammelt werden. Exemplare von *R. kollikeri* können beispielsweise vor der Küste von Kalifornien oder Baja, Mexiko, erhalten werden. Lebende Exemplare von Renilla können alternativ von einem kommerziellen Anbieter erworben werden (z. B. Gulf Marine Incorporated, Panacea, Fla). Beim Ergreifen oder beim Erhalt werden die Exemplare sorgfältig gewaschen und können auch seziiert werden im Hinblick auf eine Anreicherung der lichtemittierenden Gewebe. Die vollständigen Organismen oder die seziierten Gewebe werden dann schockgefroren und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

[0302] Wie in den Beispielen weiter unten detailliert beschrieben, wurden die gefrorenen Gewebe als Quelle verwendet, um Nucleinsäuren zu isolieren, die das Renilla mulleri-GFP und die Renilla mulleri-Luciferase codieren (siehe z. B. SEQ ID NO: 15 bzw. SEQ NO: 17).

2. Herstellung von Renilla-cDNA-Expressionsbanken

[0303] Renilla-cDNA-Expressionsbanken können aus intakter RNA gemäß den hier beschriebenen Verfahren oder durch andere Verfahren, die dem Fachmann wohlbekannt sind, hergestellt werden (siehe z. B. Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.; U.S.-Patent Nr. 5,292,658).

[0304] Die Herstellung der cDNA-Banken schließt typischerweise die Isolierung von polyadenylierter RNA aus dem ausgewählten Organismus ein, auf die die Einzelstrang-DNA-Synthese unter Verwendung der Reversen Transkriptase, der Verdau des RNA-Stranges des DNA/RNA-Hybrids und die nachfolgende Umwandlung der einzelsträngigen DNA in doppelsträngige cDNA folgen.

a. RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

[0305] Vollständige Renilla oder herausgeschnittene Renilla-Gewebe können als Quelle für die vollständige cytoplasmische RNA für die Herstellung von Renilla-cDNA verwendet werden. Vollständige intakte RNA kann aus zerkleinertem Renilla-Gewebe isoliert werden, beispielsweise unter Verwendung einer Abwandlung der Verfahren, die auf dem Fachgebiet allgemein bekannt sind (siehe z. B. Chirgwin et al. (1970) Biochemistry 18: 5294–5299). Nach dem Isolieren der vollständigen zellulären RNA werden dann die polyadenylierten RNA-Moleküle problemlos unter Verwendung der Affinitätschromatographie auf Oligodeoxythymidylat-Cellulose-Säulen von den nicht polyadenylierten Molekülen getrennt (z. B. wie von Aviv et al., (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 69: 1408 beschrieben).

[0306] Die gereinigte Renilla-polyA-mRNA wird dann einer cDNA-Synthesereaktion unterzogen, um eine cDNA-Bank aus der vollständigen polyA-mRNA zu erzeugen. Kurz gesagt wird Reverse Transkriptase verwendet, um einen angelagerten polydT-Primer zu verlängern, um ein RNA/DNA-Duplex zu erzeugen. Der RNA-Strang wird dann unter Verwendung einer RNase, z. B. RNase H, verdaut, und nach der Synthese des zweiten Strangs werden die cDNA-Moleküle mit Hilfe von S1-Nuclease oder einer anderen geeigneten Nuclease mit glatten Enden versehen. Die resultierenden doppelsträngigen cDNA-Fragmente können dann direkt in einen geeigneten Expressionsvektor ligiert werden, oder alternativ können Oligonucleotid-Linker, die Restriktionsendonucleasestellen codieren, mit den 5'-Enden der cDNA-Moleküle verknüpft werden, um die Klonierung der cDNA-Fragmente zu erleichtern.

b. Konstruktion von cDNA-Expressionsbanken

[0307] Die am besten charakterisierten Vektoren für die Konstruktion von cDNA-Expressionsbanken sind

Lambda-Vektoren. Vektoren auf Lambda-Basis vertragen cDNA-Insertionen von etwa 12 kb und bieten eine größere Einfachheit bei der Durchmusterung der Bank, der Amplifikation und der Lagerung, verglichen mit standardisierten Plasmidvektoren. Derzeit bevorzugte Vektoren für die Herstellung von Renilla-cDNA-Expressionsbanken sind der Lambda-, Uni-Zap-, Lambda-Zap II- oder Lambda-ZAP Express/EcoRI/XhoI-Vektor, die dem Fachmann bekannt sind (siehe z. B. U.S.-Patent Nr. 5,128,256) und die auch im Handel erhältlich sind (Stratagene, La Jolla, CA).

[0308] Allgemein kombinieren die Lambda-Zap-Vektoren die hohe Effizienz eines Bakteriophagen-Lambda-Vektor-Systems mit der Vielseitigkeit eines Plasmidsystems. Fragmente, die in diese Vektoren kloniert wurden, können automatisch unter Verwendung eines Helfer-Phagen herausgeschnitten werden und wieder in die Ringform übergeführt werden, um Subklone in dem pBK-abgeleiteten Phagemid zu erzeugen. Das pBK-Phagemid trägt das Neomycin-Resistenzgen für die Selektion in Bakterien und die G418-Selektion in eukaryotischen Zellen oder kann das β -Lactamase-Resistenzgen tragen. Die Expression des rekombinanten Polypeptids erfolgt in Bakterien unter der Kontrolle des lacZ-Promotors und in Eukaryoten unter der Kontrolle des CMV-Promotors.

[0309] Genauer sind diese Vektoren auf Lambda-Basis aus einer Initiator-Terminator-Kassette, die das Plasmidsystem enthält, z. B. ein pBK-Bluescript-Derivat (Stratagene, San Diego), das vom rechten und linken Arm des Bakteriophagen Lambda eingeklammert wird, zusammengesetzt. Die Lambda-Arme ermöglichen das effiziente Verpacken der replizierten DNA, während die herauschneidbare Initiator-Terminator-Kassette das leichte Klonieren der cDNA-Fragmente und die Erzeugung einer Plasmidbank ohne die Notwendigkeit einer zusätzlichen Subklonierung ermöglicht.

[0310] Wenn hier verwendet, werden die cDNA-Fragmente in die multiple Klonierungsstelle inseriert, die innerhalb der Initiator-Terminator-Kassette des Lambda-Zap-Vektors enthalten ist, um einen Satz cDNA-Expressionsvektoren zu erzeugen. Mit dem Satz cDNA-Expressionsvektoren werden geeignete *E. coli*-Zellen infiziert, gefolgt von der Coinfektion mit einem filamentösen Helfer-Pphagen. Innerhalb der Zelle erkennen trans-wirkende Proteine, die von dem Helferphagen codiert werden, z. B. das Gen II-Protein von M13, zwei getrennte Domänen, die innerhalb der Lambdaarme des Vektors positioniert sind, und führen einzelsträngige Nicks ein, die die Initiator-Terminator-Kassette flankieren. Bei einer darauf folgenden Runde der DNA-Synthese wird ein neuer DNA-Strang synthetisiert, der den vorhandenen Nickstrang unter Freisetzung der Initiator-Terminator-Kassette ersetzt. Der ersetzte Strang wird dann in die Ringform gebracht, durch die Helferproteine als filamentöser Phage verpackt und aus der Zelle abgesondert. Das BK-Plasmid, das die cDNA enthält, wird durch die Infektion eines F'-Stammes von *E. coli* und die Plattierung der infizierten Zellen auf festes Medium, das für die Selektion der pBK-haltige Zellen mit Kanamycin ergänzt ist, gewonnen.

[0311] Die Renilla-cDNA-Expressionsbank kann unter Verwendung einer Vielzahl von Verfahren, die dem Fachmann wohlbekannt sind, durchgemustert werden. Die Identifizierung des Renilla-GFPs kann beispielsweise unter Verwendung eines funktionellen Durchmusterungsverfahrens, bei dem blaues Licht eingesetzt wird, und Beobachtung der Kolonien mit dem bloßen Auge im Hinblick auf die Emission von grünem Fluoreszenzlicht oder durch die Beobachtung der Lichtemission unter Verwendung eines oder mehrerer Bandpassfilter erreicht werden.

3. Isolierung und Identifizierung von DNA, die Renilla-GFP codiert

[0312] Eine DNA, die ein Renilla-GFP codiert, kann unter Anwendung der hier beschriebenen Verfahren oder unter Anwendung anderer dem Fachmann bekannten Verfahren isoliert werden. Wie weiter unten detailliert beschrieben, wurde eine R.-mulleri- λ -Uni-Zap-cDNA-Expressionsplasmid-Bank hergestellt, in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert und auf modifizierte L-Broth-Platten plattiert, die Ruß enthielten, um die Hintergrundfluoreszenz zu absorbieren (siehe z. B. BEISPIEL 4). Die Transformanten wurden mit einer Lösung besprüht, die IPTG enthielt, um die Expression des rekombinanten Renilla-GFP durch die heterologe cDNA zu induzieren. Für die Identifizierung der GFP-exprimierenden Klone wurden die Transformanten in blauem Licht, vorzugsweise Licht von 470 bis 490 nm, angeordnet, und die Kolonien, die eine grüne Fluoreszenz emittieren, wurden isoliert und in Reinkultur gezüchtet.

[0313] Die Nucleotidsequenz der cDNA-Insertion eines grün fluoreszierenden Transformanten wurde bestimmt (siehe z. B. SEQ ID NO: 15). Wie in BEISPIEL 4 beschrieben, codiert die 1079-cDNA-Insertion ein Polypeptid aus 238 Aminosäuren, das nur zu 23,5% identisch mit dem *A. victoria*-GFP ist, dem einzigen anderen GFP, das auf molekularer Ebenen charakterisiert worden ist. Das rekombinante Protein zeigt ein Anregungs- und ein Emissionsspektrum, die den Spektren ähneln, über die für lebende Renilla-Arten berichtet wurde.

4. Isolierung und Identifizierung von DNA, die eine Renilla-Luciferase codiert

[0314] Die oben beschriebene R. mulleri-cDNA-Expressionsbank wurde auch verwendet, um DNA zu klonieren, die eine R. mulleri-Luciferase codiert (siehe z. B. BEISPIEL 5). Einzelkolonie-Transformanten wurden auf modifizierten L-Broth-Platten gezüchtet, die Ruß enthielten, und die Expression der heterologen DNA wurde im Wesentlichen wie oben beschrieben mit IPTG induziert. Nachdem man Zeit für die Expression hat vergehen lassen, wurden die Transformanten mit Coelenterazin besprüht und im Hinblick auf die Kolonien durchgemustert, die blaues Licht emittieren. Die lichtemittierenden Kolonien wurden isoliert und in Reinkultur gezüchtet.

[0315] Die Nucleotidsequenz der cDNA-Insertion, die in dem lichtemittierenden Transformanten enthalten war, wurde bestimmt. Wie in BEISPIEL 5 beschrieben, codiert die 1217-cDNA-Insertion ein Polypeptid aus 311 Aminosäuren. Das rekombinante Protein zeigt ein Anregungs- und ein Emissionsspektrum, die den Spektren ähneln, über die für lebende Renilla-Arten berichtet wurde.

D. NUCLEINSÄURESONDEN UND VERFAHREN FÜR DIE ISOLIERUNG UND KLONIERUNG VON LUCIFERASE- UND GFP-CODIERENDEN NUCLEINSÄUREN ANDERER ARTEN

Gaussia

[0316] Die Nucleinsäure, die hier als Beispiel dient, die die Gaussia-Luciferase codiert, kann als eine Bezugsquelle für Sonden für die Isolierung der Luciferasen von anderen Gaussia-Arten verwendet werden. Jede geeignete Sonde, die auf der beispielhaften Nucleotidsequenz basiert, kann in jedem Verfahren verwendet werden. Eine derartige Sonde sollte unter den Bedingungen einer zumindest geringen Stringenz, bevorzugter unter mittleren Stringenzbedingungen und am bevorzugtesten unter hohen Stringenzbedingungen mit verwandten Nucleinsäuren in einer geeigneten Gaussia-Bank hybridisieren.

[0317] Ebenfalls beschrieben werden hier spezifische Nucleinsäuresonden für die Isolierung und die Klonierung der Luciferase-codierenden Nucleinsäure von anderen Gaussia-Arten. Typischerweise sind die Nucleinsäuresonden entartete Sonden, die dann als Hybridisierungssonden für die Durchmusterung von cDNA-Banken verwendet werden, die von den ausgewählten Gaussia-Arten hergestellt wurden, um einen DNA-Klon zu erhalten, der eine Gaussia-Luciferase mit der vollen Länge codiert.

[0318] Bevorzugte Nucleinsäuresonden werden so ausgeführt, dass sie entartete Sonden aus mindestens 14 Nucleotiden, vorzugsweise 16 bis 30 Nucleotiden, sind, die auf diesen konservierten Aminosäurepositionen basieren. Besonders bevorzugte Regionen für die Entwicklung von Sonden basieren beispielsweise auf den Aminosäuren 1 bis 185, die in SEQ ID NO: 20 offenbart werden. In anderen bevorzugten Ausführungsformen werden die Nucleinsäuresonden, die die oben beschriebenen bevorzugten Aminosäureregionen codieren, aus der Nucleotidsequenz ausgewählt, die diese Regionen codiert, die in SEQ ID NO: 19 offenbart wird.

[0319] Alternativ können Peptide, die diesen Aminosäurepositionen entsprechen, unter Verwendung der Verfahren, die dem Fachmann wohlbekannt sind (siehe z. B. Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY), hergestellt und als Immunogene für die Immunisierung von Tieren verwendet werden, die dann Luciferase-spezifische polyklonale oder monoklonale Antikörper erzeugen. Die Antikörper können verwendet werden, um cDNA-Expressionsbanken durchzumustern, wie diejenigen, die gemäß den hier beschriebenen Verfahren hergestellt werden, um Klone zu identifizieren, die partielle Klone oder Klone mit der vollen Länge exprimieren.

NUCLEINSÄURESONDEN UND VERFAHREN FÜR DIE ISOLIERUNG UND KLONIERUNG VON GFP-CODIERENDEN NUCLEINSÄUREN ANDERER Renilla-ARTEN

[0320] Die hier als Beispiel dienende Nucleinsäure, die das Renilla mulleri-GFP codiert, kann als eine Quelle für Sonden für die Isolierung der GFPs von anderen Renilla-Arten verwendet werden. Jede geeignete Sonde, die auf der beispielhaften Nucleotidsequenz basiert, kann in jedem Verfahren verwendet werden. Eine derartige Sonde sollte unter den Bedingungen einer niedrigen Stringenz mit verwandten Nucleinsäuren in einer geeigneten Renilla-Bank hybridisieren.

[0321] Ebenfalls hier beschrieben werden spezifische Nucleinsäuresonden für die Isolierung und Klonierung der GFP-codierenden Nucleinsäure von anderen Renilla-Arten. Diese Sonden basieren auf Regionen des Renilla-GFP-Proteins, die die verschiedenen Mitglieder aus der Gattung Renilla gemeinsam haben (siehe [Fig. 1](#)). Die Nucleinsäuresonden sind typischerweise entartete Sonden, die dann als Hybridisierungssonden für die

Durchmusterung von cDNA-Banken verwendet werden, die von ausgewählten Renilla-Arten hergestellt wurden, um einen DNA-Klon zu erhalten, der ein Renilla-GFP mit der vollen Länge codiert.

[0322] Für die Aufklärung der Regionen des GFPs, die die Renilla-Arten gemeinsam haben, wurde gereinigtes Renilla reniformis-GFP einem spezifischen chemischen und proteolytischen Abbau, z. B. mit Trypsin und Proteinase Q, unterzogen, um eine Vielzahl kurzer Peptide für die Analyse zu erzeugen, wonach die Aminosäuresequenz der Renillareniformis-Peptide ermittelt wurde.

[0323] [Fig. 1](#) zeigt eine Anordnung der abgeleiteten Aminosäuresequenz des grün fluoreszierenden Proteins von Renilla mulleri und die Aminosäuresequenz, die für die isolierten Renilla reniformis-GFP-Peptide ermittelt wurde. Obwohl die beiden Arten nahe verwandt sind, sind die Aminosäuresequenzen der Renilla-GFPs verschieden. Der Unterschied kann jedoch ausgenutzt werden, um spezifische Sonden zu konstruieren, da es hoch konservierte Regionen gibt. Die R. mulleri- und die R. reniformis-Sequenz sind bei 103 von 187 Resten identisch, die in Peptiden mit einer ausreichenden Länge vorhanden sind, für die zufriedenstellende Ausrichtungen erhalten werden.

[0324] Bestimmte Regionen der Aminosäuresequenzen sind in einem hohen Maß konserviert. Beispielsweise sind 18 von 19 Aminosäuren, die den Positionen 51 bis 69 der Renilla mulleri-Sequenz entsprechen, zwischen den beiden Renilla-GFPs identisch, eingeschlossen ein zusammenhängender Abschnitt von 16 identischen Aminosäureresten, der den Aminosäurepositionen 51 bis 65 entspricht. Ebenfalls wie in [Fig. 1](#) gezeigt, hat das Renilla reniformis-GFP (siehe z. B. SEQ ID NO: 20) einen relativ hohen Grad an Sequenzähnlichkeit mit den Aminosäureresten, die den Aminosäuren 81 bis 106 der R. mulleri-Sequenz entsprechen (60,9%; 18 von 26 Aminosäuren sind identisch). Diese Regionen stellen daher die Sequenz für die Konstruktion von Sonden bereit.

[0325] Bevorzugte Nucleinsäuresonden werden so entworfen, dass sie entartete Sonden aus mindestens 14 Nucleotiden, vorzugsweise 16 bis 30 Nucleotiden, sind, die auf diesen konservierten Aminosäurepositionen basieren. Besonders bevorzugte Regionen für die Entwicklung von Sonden basieren beispielsweise auf den Aminosäuren 51 bis 68, 82 bis 98 und 198 bis 208, die in SEQ ID NO: 16 offenbart sind, auf der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID NO: 20 offenbart ist, den Aminosäuren 9–20, die in SEQ ID NO: 21 offenbart sind, und den Aminosäuren 39–53, die in SEQ ID NO: 23 offenbart sind. In anderen Ausführungsformen werden die Nucleinsäuresonden, die die oben beschriebenen bevorzugten Aminosäureregionen codieren, aus der Nucleotidsequenz ausgewählt, die diese Regionen codiert, die in SEQ ID NO: 15 offenbart wird. Diese entarteten Nucleinsäuresonden können als Hybridisierungs sonden für die Isolierung und Klonierung der GFP-codierenden DNA in Renilla reniformis und in anderen Arten verwendet werden. Alternativ oder zusätzlich können diese Sonden als Primer in Nucleinsäureamplifikationsreaktionen verwendet werden.

[0326] Alternativ können Peptide, die diesen Aminosäurepositionen entsprechen, unter Verwendung der Verfahren, die dem Fachmann wohlbekannt sind (siehe z. B. Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY), hergestellt und als Immunogene für die Immunisierung von Tieren verwendet werden, die dann Renilla-GFP-spezifische polyklonale oder monoklonale Antikörper erzeugen. Die Antikörper können verwendet werden, um cDNA-Expressionsbanken durchzumustern, wie diejenigen, die gemäß den hier beschriebenen Verfahren hergestellt werden, um Klone zu identifizieren, die einen partiellen Klon oder einen Klon mit der vollen Länge exprimieren, der alle Aminosäurereste 51 bis 69 des Renilla mulleri-GFPs oder einen Teil davon exprimiert (siehe z. B. [Fig. 1](#); SEQ ID NO: 15 und 16).

Andere Arten

[0327] Ähnliche Verfahren können mit den hier beschriebenen Nucleinsäuren verwendet werden, die die Ptilosarcus- und die Pleuromamma-Proteine codieren.

E. REKOMBINANTE EXPRESSION VON PROTEINEN

Gaussia

1. DNA, die Gaussia-Proteine codiert

[0328] Wie weiter oben beschrieben kann DNA, die eine Gaussia-Luciferase codiert, aus natürlichen Quellen isoliert werden, auf der Basis der Gaussia-Nucleinsäuresequenzen, die hier bereitgestellt werden, synthetisiert

werden oder unter Verwendung einer Anzahl an rekombinanten DNA-Klonierungs- und Amplifikationstechniken, z. B. der Polymerasekettenreaktion (PCR), erzeugt werden.

[0329] In bevorzugten Ausführungsformen hat das DNA-Fragment, das eine Gaussia-Luciferase codiert, die Aminosäuresequenz, die in SEQ ID NO: 20 offenbart wird. In bevorzugteren Ausführungsformen codiert das DNA-Fragment die Aminosäuresequenz, die durch die Nucleotide 37–591 der Nucleotidsequenz codiert wird, die in SEQ ID NO: 19 offenbart wird.

2. DNA-Konstrukte für die rekombinante Erzeugung von Gaussia-Proteinen

[0330] DNA wird in ein Plasmid für die Expression in einem gewünschten Wirt eingeführt. In bevorzugten Ausführungsformen ist der Wirt ein bakterieller Wirt. Die Nucleotidsequenzen in den Plasmiden, die regulatorische Regionen, wie Promotoren und Operatoren, sind, werden funktionsfähig für die Transkription der Nucleotidsequenz miteinander kombiniert, die eine Gaussia-Luciferase codiert. Die Nucleotidsequenz, die die Gaussia-Luciferase codiert, kann auch eine DNA einschließen, die ein Sekretionssignal codiert, wobei dann das resultierende Peptid ein Vorläufer der Gaussia-Luciferase ist.

[0331] In bevorzugten Ausführungsformen schließen die DNA-Plasmide auch eine Transkriptionsterminationssequenz ein. Die Promotorregionen und Transkriptionsterminatoren werden unabhängig voneinander vom gleichen oder von verschiedenen Genen ausgesucht.

[0332] Eine große Vielzahl von Vielzweckvektoren, die für die Expression von heterologen Proteinen geeignet sind, sind dem Fachmann bekannt und im Handel erhältlich. Expressionsvektoren, die induzierbare Promotoren oder konstitutive Promotoren enthalten, die mit regulatorischen Regionen verknüpft sind, sind bevorzugt. Derartige Promotoren schließen nicht einschränkend den T7-Phagen-Promotor und andere T7-artige Phagen-Promotoren, wie den T3-, den T5- und den SP6-Promotor, den trp-, lpp-, tet- und den lac-Promotor, wie den lac-UV5-Promotor von *E. coli*; den SV40-Promotor, den P10- oder Polyeder-Gen-Promotor des Baculovirus/Insektzellen-Expressionssystems, retrovirale LTRs (long-terminal repeats) und induzierbare Promotoren anderer eukaryotischer Expressionssysteme ein.

3. Wirtsorganismen für die rekombinante Erzeugung von Gaussia-Proteinen

[0333] Wirtsorganismen schließen die Organismen ein, in denen die rekombinante Erzeugung heterologer Proteine durchgeführt worden ist, wie z. B. nicht einschränkend Bakterien (zum Beispiel *E. coli*), Hefe (zum Beispiels *Saccharomyces cerevisiae* und *Pichia pastoris*), Pilze, Baculovirus/Insekten- Systeme, Amphibienzellen, Säugetierzellen, Pflanzenzellen und Insektzellen. Die bevorzugtesten Wirtsorganismen sind die Stämme von *E. coli* oder *Saccharomyces cerevisiae*.

4. Verfahren für die rekombinante Erzeugung von Gaussia-Proteinen

[0334] Die DNA, die eine Gaussia-Luciferase codiert, wird in ein Plasmid in funktionsfähiger Verknüpfung mit einem geeigneten Promotor für die Expression von Polypeptiden in einem ausgewählten Wirtsorganismus eingeführt. Das DNA-Fragment, das die Gaussia-Luciferase codiert, kann auch ein Proteinsekretionssignal einschließen, das in dem ausgewählten Wirt die Funktion hat, das reife Polypeptid in das Periplasma oder das Kulturmedium zu lenken. Die resultierende Luciferase kann durch Verfahren gereinigt werden, die auf dem Fachgebiet routinemäßig eingesetzt werden, eingeschlossen die Verfahren, die im Folgenden in den Beispielen beschrieben werden.

[0335] Verfahren für die Transformation geeigneter Wirtszellen, vorzugsweise von Bakterienzellen und noch bevorzugter *E. coli*-Zellen, sowie Verfahren, die für die Kultivierung dieser Zellen, die ein Gen enthalten, das ein heterologes Protein codiert, sind auf dem Fachgebiet allgemein bekannt. Siehe beispielsweise Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

[0336] Sobald das Gaussia-codierende Nucleinsäuremolekül in die Wirtszelle eingeführt worden ist, wird das gewünschte Protein erzeugt, indem die Wirtszelle den Bedingungen ausgesetzt wird, unter denen der Promotor induziert wird, wodurch die funktionsfähig verknüpfte DNA transkribiert wird. Die zellulären Extrakte der lysierten Zellen, die das Protein enthalten, können hergestellt werden, und die resultierenden "geklärten Lysate" können als Quelle für die Luciferase eingesetzt werden. Alternativ kann das Lysat zusätzlichen Reinigungsschritten unterzogen werden (z. B. Ionenaustauschchromatographie oder Immunaффinitätschromatographie),

um das Lysat weiter anzureichern oder um eine homogene Quelle für das gereinigte Enzym bereitzustellen (siehe z. B. U.S.-Patente Nr. 5,292,658 und 5,418,155).

Renilla

1. DNA, die Renilla-Proteine codiert

[0337] Wie oben beschrieben kann eine DNA, die ein Renilla-GFP oder eine Renilla-Luciferase codiert, aus natürlichen Quellen isoliert werden, auf der Basis von Renilla-Sequenzen synthetisiert werden, die hier beschrieben werden, oder unter Verwendung einer Anzahl an rekombinanten DNA-Klonierungs- und DNA-Amplifikationstechniken, z. B. Polymerasekettenreaktion (PCR), kloniert werden.

[0338] Das DNA-Fragment, das ein Renilla-GFP codiert, kann die Aminosäuresequenz haben, die in SEQ ID NO: 16 offenbart wird. Das DNA-Fragment codiert die Aminosäuresequenz, die durch die Nucleotide 259–972 der Nucleotidsequenz codiert wird, die in SEQ ID NO: 15 offenbart wird.

[0339] Das DNA-Fragment, das eine Renilla-Luciferase codiert, kann die Aminosäuresequenz haben, die in SEQ ID NO: 18 offenbart wird. Das DNA-Fragment codiert die Aminosäuresequenz, die von den Nucleotiden 31–963 der Nucleotidsequenz codiert wird, die in SEQ ID NO: 17 offenbart wird.

2. DNA-Konstrukte für die rekombinante Erzeugung von Renilla-Proteinen

[0340] DNA wird für die Expression in einem gewünschten Wirt in ein Plasmid eingeführt. Es wird ins Auge gefasst, dass der Wirt ein bakterieller Wirt ist. Die Nucleotidsequenzen in den Plasmiden, die regulatorische Sequenzen sind, wie Promotoren und Operatoren, werden funktionsfähig miteinander für die Transkription der Nucleotidsequenz kombiniert, die ein Renilla-GFP oder eine Renilla-Luciferase codiert. Die Nucleotidsequenz, die das mutierte FGF-Protein codiert, kann auch DNA einschließen, die ein Sekretionssignal codiert, wobei dann das resultierende Peptid ein Vorläufer des Renilla-GFPs ist.

[0341] Die DNA-Plasmide schließen vorzugsweise auch eine Transkriptionsterminatorsequenz ein. Die Promotorregionen und die Transkriptionsterminatoren werden unabhängig voneinander vom gleichen Gen oder von verschiedenen Genen ausgewählt.

[0342] Eine große Vielzahl von Vielzweckvektoren, die für die Expression von heterologen Proteinen geeignet sind, sind dem Fachmann bekannt und im Handel erhältlich. Expressionsvektoren, die induzierbare Promotoren oder konstitutive Promotoren enthalten, die mit regulatorischen Regionen verknüpft sind, sind bevorzugt. Derartige Promotoren schließen nicht einschränkend den T7-Phagen-Promotor und andere T7-artige Phagen-Promotoren, wie den T3-, T5- und SP6-Promotor, den trp-, lpp-, tet- und lac-Promotor, wie den lacUV5-Promotor von *E. coli*; den SV40-Promotor; den P10- oder Polyeder-Gen-Promotor von Baculovirus/Insektenzellen-Expressionssystemen, retrovirale LTRs (long-terminal repeats) und induzierbare Promotoren anderer eukaryotischer Expressionssysteme ein.

[0343] Besonders bevorzugte Vektoren für die rekombinante Expression von Renilla mulleri in prokaryotischen Organismen sind die Vektoren auf lac- und T7-Promotorbasis, wie die wohlbekannteren Bluescript-Vektoren, die im Handel erhältlich sind (Stratagene, La Jolla, CA).

3. Wirtsorganismen für die rekombinante Erzeugung von Renilla-Proteinen

[0344] Die Wirtsorganismen schließen die Organismen ein, in denen die rekombinante Erzeugung heterologer Proteine durchgeführt worden ist, wie z. B. nicht einschränkend Bakterien (zum Beispiel *E. coli*), Hefe (zum Beispiel *Saccharomyces cerevisiae* und *Pichia pastoris*), Pilze, Baculovirus/Insekten-Systeme, Amphibienzellen, Säugetierzellen, Pflanzenzellen und Insektenzellen. Die bevorzugtesten Wirtsorganismen sind die Stämme von *E. coli* oder *Saccharomyces cerevisiae*.

4. Verfahren für die rekombinante Erzeugung von Renilla-Proteinen

[0345] Die DNA, die eine Renilla-GFP oder eine Renilla mulleri-Luciferase codiert, wird in ein Plasmid in funktionsfähiger Verknüpfung mit einem geeigneten Promotor für die Expression von Polypeptiden in einem ausgewählten Wirtsorganismus eingeführt. Das DNA-Fragment, das das Renilla-GFP oder die Renilla-Luciferase codiert, kann auch ein Proteinsekretionssignal einschließen, das in dem ausgewählten Wirt die Funktion hat,

das reife Polypeptid in das Periplasma oder das Kulturmedium zu lenken. Das resultierende Renilla-GFP oder die resultierende Renilla-Luciferase kann durch Verfahren gereinigt werden, die auf dem Fachgebiet routinemäßig eingesetzt werden, eingeschlossen die Verfahren, die im Folgenden in den Beispielen beschrieben werden.

[0346] Verfahren für die Transformation geeigneter Wirtszellen, vorzugsweise Bakterienzellen und noch bevorzugter *E. coli*-Zellen, sowie Verfahren, die für die Kultivierung der Zellen, die ein Gen enthalten, das ein heterologes Protein codiert, sind auf dem Fachgebiet allgemein bekannt. Siehe beispielsweise Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

[0347] Sobald das Renilla-codierende Nucleinsäuremolekül in die Wirtszelle eingeführt worden ist, wird das gewünschte Renilla-GFP erzeugt, indem die Wirtszelle den Bedingungen ausgesetzt wird, unter denen der Promotor induziert wird, wodurch die funktionsfähig verknüpfte DNA transkribiert wird. Die zellulären Extrakte der lysierten Zellen, die das Protein enthalten, können hergestellt werden, und das resultierende "geklärte Lysat" wurde als Quelle für das rekombinante Renilla-GFP oder die rekombinante Renilla mulleri-Luciferase eingesetzt. Alternativ kann das Lysat zusätzlichen Reinigungsschritten unterzogen werden (z. B. Ionenaustauschchromatographie oder Immunitätschromatographie), um das Lysat weiter anzureichern oder um eine homogene Quelle für das gereinigte Enzym bereitzustellen (siehe z. B. U.S.-Patente Nr. 5,292,658 und 5,418,155).

F. REKOMBINANTE ZELLEN, DIE HETEROLOGE NUCLEINSÄUREN EXPRIMIEREN, DIE LUCIFERASEN UND GFPs CODIEREN

[0348] Diese Zellen, Vektoren und Verfahren werden beispielhaft unter Bezugnahme auf Renilla und Gaussia dargestellt. Die gleichen Zellen, Vektoren und Verfahren können für die Expression der Proteine von Pleuro-mamma und *Ptilosarcus* verwendet werden.

Gaussia

[0349] Rekombinante Zellen, die eine heterologe Nucleinsäure enthalten, die eine Gaussia-Luciferase codiert, werden bereitgestellt. In bevorzugten Ausführungsformen exprimieren die rekombinanten Zellen die codierte Gaussia-Luciferase, die funktionsfähig und für die Zelle nicht toxisch ist. In noch bevorzugteren Ausführungsformen enthält die Gaussia-Luciferase die Aminosäuresequenz, die in SEQ ID NO: 20 offenbart wird.

[0350] In bestimmten Ausführungsformen können die rekombinanten Zellen auch eine heterologe Nucleinsäure einschließen, die eine oder mehrere Komponenten eines Biolumineszenz-erzeugenden Systems, vorzugsweise ein fluoreszierendes Protein, codiert. In bevorzugten Ausführungsformen wird die Nucleinsäure, die die Komponente(n) des Biolumineszenz-erzeugenden Systems codiert, aus den Arten von *Aequorea*, *Vargula* oder *Renilla* isoliert. In bevorzugteren Ausführungsformen ist die zusätzliche Komponente des Biolumineszenz-erzeugenden Systems ein *Renilla mulleri*- oder *Renilla reniformis*-GFP.

[0351] Das *Renilla*-GFP und die *Renilla*-Peptide können aus natürlichen Quellen isoliert werden oder aus einer prokaryotischen oder eukaryotischen Zelle isoliert werden, die mit einer Nucleinsäure, wie den obigen Nucleinsäuren, transfiziert ist, die das *Renilla*-GFP und/oder die GFP-Peptide codiert.

[0352] Beispielhafte Zellen schließen Bakterien (z. B. *E. coli*), Pflanzenzellen, von Säugetieren stammende Zellen (z. B. COS-Zellen, Mäuse-L-Zellen, CHO-Zellen (Zellen aus den Ovarien chinesischer Hamster), HEK-Zellen (menschliche embryonale Nierenzellen), GMK-Zellen (African green monkey cells) und andere derartige Zellen, die dem Fachmann bekannt sind, Amphibienzellen (z. B. *Xenopus laevis* oocytes), Hefezellen (z. B. *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*) und dergleichen ein. Beispielhafte Zellen für die Expression injizierter RNA-Transkripte schließen *Xenopus laevis*-Oocyten ein. Eukaryotische Zellen, die für die Transfektion von DNA bevorzugt sind, sind dem Fachmann bekannt oder können empirisch identifiziert werden und schließen HEK293-Zellen (die von ATCC unter der Zugangsnummer #CRL 1573 erhältlich sind); Ltk-Zellen (die von ATCC unter der Zugangsnummer #CCL1.3 erhältlich sind); COS-7-Zellen (die von ATCC unter der Zugangsnummer #CRL 1651 erhältlich sind); und DG44-Zellen (dhfr CHO-Zellen; siehe z. B. Urlaub et al. (1986) *Cell. Molec. Genet.* 12: 555) ein. Derzeit bevorzugte Zellen schließen Stämme von Bakterien und Hefe ein.

[0353] Die rekombinanten Zellen, die die heterologe DNA enthalten, die die Gaussia-Luciferase codiert, werden durch die Transfektion mit einer DNA, die eine Gaussia-Luciferase codiert, oder durch das Einführen von

RNA-Transkripten von DNA, die ein Gaussia-Protein codiert, unter Verwendung von Verfahren, die dem Fachmann wohlbekannt sind, hergestellt. Die DNA kann als ein lineares DNA-Fragment eingeführt werden oder kann in einen Expressionsvektor für die stabile oder transiente Expression der codierenden DNA eingeschlossen werden.

[0354] Die heterologe DNA kann als episomales Element in der Zelle gehalten werden, oder sie kann in die chromosomale DNA der Zelle integriert werden. Die resultierenden rekombinanten Zellen können dann von einer derartigen Kultur oder Subkultur kultiviert oder subkultiviert werden (oder im Fall von Säugetierzellen einer Passage unterzogen werden). Die DNA kann auch stabil in Zellen eingebracht werden, oder sie kann unter Verwendung von Verfahren, die auf dem Fachgebiet bekannt sind, transient exprimiert werden.

[0355] Die rekombinanten Zellen können in einer großen Vielzahl von Assayverfahren auf der Basis von Zellen verwendet werden, wie denjenigen Verfahren, die für Zellen beschrieben werden, die Wildtyp-GFPs oder modifizierte *A. victoria*-GFPs oder GFP-Fusionsproteine exprimieren (siehe z. B. U.S.-Patent Nr. 5,625,048; Internationale Patentanmeldungen, Veröffentlichungsnummern WO 95/21191; WO 96/23810; WO 96/27675; WO 97/26333; WO 97/28261; WO 97/41228; und WO 98/02571).

REKOMBINANTE ZELLEN, DIE HETEROLOGE NUCLEINSÄUREN EXPRIMIEREN, DIE EIN GRÜN FLUORESZIERENDES PROTEIN VON Renilla UND/ODER EINE Renilla-LUCIFERASE CODIEREN

[0356] Rekombinante Zellen, die eine heterologe Nucleinsäure enthalten, die ein Renilla-GFP codiert, werden beschrieben. Die rekombinanten Zellen exprimieren das codierte Renilla-GFP, das funktionsfähig und für die Zelle nicht toxisch ist.

[0357] Die rekombinanten Zellen können auch eine heterologe Nucleinsäure einschließen, die eine Komponente eines Biolumineszenz-erzeugenden Systems, vorzugsweise ein Photoprotein oder eine Luciferase, codiert. Die Nucleinsäure, die die Komponente des Biolumineszenz-erzeugenden Systems codiert, wird vorzugsweise aus den Arten von *Aequorea*, *Vargula* oder *Renilla* isoliert. Die Komponente des Biolumineszenz-erzeugenden Systems ist vorzugsweise eine *Renilla mulleri*-Luciferase, die die Aminosäuresequenz hat, die in SEQ ID NO: 18 offenbart wird.

[0358] Rekombinante Wirtszellen, die eine heterologe Nucleinsäure enthalten, die eine *Renilla mulleri*-Luciferase codiert, werden ebenfalls beschrieben. Die heterologe Nucleinsäure codiert vorzugsweise die Aminosäuresequenz, die in SEQ ID NO: 18 offenbart wird. Noch bevorzugter codiert die heterologe Nucleinsäure die Nucleotidsequenz, die in SEQ ID NO: 17 offenbart wird.

[0359] Beispielhafte Zellen schließen Bakterien (z. B. *E. coli*), Pflanzenzellen, von Säugetieren stammende Zellen (z. B. COS-Zellen, Mäuse-L-Zellen, CHO-Zellen (Zellen aus den Ovarien chinesischer Hamster), HEK-Zellen (menschliche embryonale Nierenzellen), GMK-Zellen (African green monkey cells) und andere derartige Zellen, die dem Fachmann bekannt sind, Amphibienzellen (z. B. *Xenopus laevis* oocytes), Hefezellen (z. B. *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*) und dergleichen ein. Beispielhafte Zellen für die Expression injizierter RNA-Transkripte schließen *Xenopus laevis*-Oocyten ein. Eukaryotische Zellen, die für die Transfektion von DNA bevorzugt sind, sind dem Fachmann bekannt oder können empirisch identifiziert werden und schließen HEK293-Zellen (die von ATCC unter der Zugangsnummer #CRL 1573 erhältlich sind); Ltk-Zellen (die von ATCC unter der Zugangsnummer #CCL1.3 erhältlich sind); COS-7-Zellen (die von ATCC unter der Zugangsnummer #CRL 1651 erhältlich sind); und DG44-Zellen (dhfr CHO-Zellen; siehe z. B. Urlaub et al. (1986) *Cell. Molec. Genet.* 12: 555) ein. Derzeit bevorzugte Zellen schließen Stämme von Bakterien und Hefe ein.

[0360] Die rekombinanten Zellen, die die heterologe DNA enthalten, die das Renilla-GFP codiert, werden durch die Transfektion mit einer DNA, die ein Renilla-GFP oder eine Renilla-Luciferase codiert, oder durch das Einführen von RNA-Transkripten von DNA, die ein Renilla-Protein codiert, unter Verwendung von Verfahren, die dem Fachmann wohlbekannt sind, hergestellt. Die DNA kann als ein lineares DNA-Fragment eingeführt werden oder kann in einen Expressionsvektor für die stabile oder transiente Expression der codierenden DNA eingeschlossen werden.

[0361] Die heterologe DNA kann als episomales Element in der Zelle gehalten werden, oder sie kann in die chromosomale DNA der Zelle integriert werden. Die resultierenden rekombinanten Zellen können dann von einer derartigen Kultur oder einer Subkultur davon kultiviert oder subkultiviert werden (oder im Fall von Säugetierzellen einer Passage unterzogen werden). Die DNA kann auch stabil in Zellen eingebracht werden, oder

sie kann unter Verwendung von Verfahren, die auf dem Fachgebiet bekannt sind, transient exprimiert werden.

[0362] Die rekombinanten Zellen können in einer großen Vielzahl von Assayverfahren auf der Basis von Zellen verwendet werden, wie denjenigen Verfahren, die für Zellen beschrieben werden, die Wildtyp-GFPs oder modifizierte *A. victoria*-GFPs oder GFP-Fusionsproteine exprimieren (siehe z. B. U.S.-Patent Nr. 5,625,048; Internationale Patentanmeldungen Veröffentlichungsnummern WO 95/21191; WO 96/23810; WO 96/27675; WO 97/26333; WO 97/28261; WO 97/41228; und WO 98/02571).

G. Luciferasen

[0363] Gereinigte Gaussia-Luciferase und Gaussia-Luciferase-Peptide werden bereitgestellt. Pleuromamma- und Renilla mulleri-Luciferasen werden beschrieben. Die Luciferase wird durch die Expression des Proteins in ausgewählten Wirtszellen und das Isolieren der resultierenden Luciferase erzeugt.

[0364] Eine Nucleinsäure, die eine Renilla mulleri-Luciferase codiert, wird ebenfalls beschrieben. Die derzeit bevorzugte Renilla mulleri-Luciferase zur Verwendung in Zusammensetzungen, Kombinationen und Verfahren hat die Aminosäuresequenz, die in SEQ ID NO: 18 offenbart wird. Die Luciferase kann für Zusammensetzungen und Kombinationen formuliert werden, die eine große Vielzahl von Endanwendungen haben, wie diejenigen, die hier beschrieben werden.

H. Renilla- und Ptilosarcus-GFPs

[0365] Gereinigte Renilla-GFPs, vor allem Renilla mulleri-GFP, und gereinigte Renilla reniformis-GFP-Peptide, werden beschrieben. Das derzeit bevorzugte Renilla-GFP zur Verwendung in den Zusammensetzungen hier ist das Renilla mulleri-GFP, das die Aminosäuresequenz hat, die in SEQ ID NO: 16 offenbart wird. Derzeit bevorzugte Renilla reniformis-GFP-Peptide sind diejenigen, die die GFP-Peptide enthalten, die unter den Aminosäuresequenzen ausgewählt werden, die in den SEQ ID NO: 19–23 offenbart werden.

[0366] Das Renilla-GFP und die Renilla-GFP-Peptide können aus natürlichen Quellen isoliert werden, oder sie können aus prokaryotischen oder eukaryotischen Zellen isoliert werden, die mit einer Nucleinsäure transkribiert sind, die das Renilla-GFP und/oder die Renilla-GFP-Peptide codiert, wie denjenigen, die in dem obigen Abschnitt F beschrieben werden.

I. ZUSAMMENSETZUNGEN

[0367] Wie weiter oben werden die Zusammensetzungen und Konjugate und Anwendungsverfahren unter Bezugnahme auf Gaussia- und Renilla-Proteine und Gaussia- und Renilla-Nucleinsäuren beschrieben. Die gleichen Zusammensetzungen und Herstellungsverfahren und Verwendungen davon sind für die Anwendung mit Pleuromamma- und Ptilosarcus-Proteinen und Pleuromamma- und Ptilosarcus-Nucleinsäuren vorgesehen.

1. Gaussia-Luciferase-Zusammensetzungen

[0368] Zusammensetzungen, die eine Gaussia-Luciferase enthalten, werden bereitgestellt. Die Zusammensetzungen können auch ein Renilla-GFP oder Renilla-GFP-Peptid enthalten. Die Zusammensetzungen können eine beliebige Zahl von Formen einnehmen in Abhängigkeit von dem dafür vorgesehenen Anwendungsverfahren. In bestimmten Ausführungsformen werden die Zusammensetzungen für die Verwendung in biolumineszierenden Novitäten (neuartigen Gegenständen), Immunoassays oder FREI- und FET-Assays hergestellt. Die Zusammensetzungen können auch in Verbindung mit Multi-Vertiefungen-Assayvorrichtungen, die integrierte Photodetektoren enthalten (siehe z. B. die gleichzeitig anhängige U.S.-Anmeldung Serien-Nr. 08/990,103), für den Nachweis von Tumoren (siehe z. B. die U.S.-Anmeldung Serien-Nr. 08/908,909) oder in biolumineszierenden Novitäten (siehe U.S.-Anmeldungen Seriennummern 08/597,274 und 08/757,046) verwendet werden.

[0369] Diese Zusammensetzungen können in einer Vielzahl von Verfahren und Systemen verwendet werden, wie in Verbindung mit diagnostischen Systemen für den in vivo-Nachweis von neoplastischen Geweben und anderer Gewebe, und in denjenigen Verfahren, die weiter unten detailliert beschrieben werden. Diese Verfahren und Produkte schließen alle Verfahren und Produkte ein, die dem Fachmann bekannt sind, in denen eine Luciferase verwendet wird, eingeschlossen in nicht einschränkender Weise: U.S.-Anmeldung Serien-Nr. 08/757,046, 08/597,274 und 08/990,103, U.S.-Patent Nr. 5,625,048; Internationale Patentanmeldungen mit

den Veröffentlichungsnummern WO 95/21191; WO 96/23810; WO 96/27676; WO 97/26333; WO 97/28261; WO 97/41228; und WO 98/02571).

2. Renilla-Luciferase-Zusammensetzungen

[0370] Die DNA, die die Renilla mulleri-Luciferase codiert, wird verwendet, um die codierte Luciferase herzustellen, die diagnostische Anwendungen wie auch die Verwendung als eine Komponente der hier beschriebenen Biolumineszenz-erzeugenden Systeme, wie in Getränken, in Verfahren für die Diagnose von Neoplasien und in diagnostischen Chips, die hier beschrieben werden, findet. Diese Verfahren und Produkte schließen alle dem Fachmann bekannten Verfahren und Produkte ein, in denen Luciferase verwendet wird, wobei nicht einschränkend eingeschlossen sind: U.S.-Anmeldung Serien-Nr. 08/757,046, 08/597,274 und 08/990,103, U.S.-Patent Nr. 5,625,048; Internationale Patentanmeldungen mit den Veröffentlichungsnummern WO 95/21191; WO 96/23810; WO 96/27676; WO 97/26333; WO 97/28261; WO 97/41228; und WO 98/02571).

[0371] Die Renilla mulleri-Luciferase und die übrigen Komponenten können als getrennte Zusammensetzungen verpackt werden, die beim Vermischen leuchten. Beispielsweise kann eine Zusammensetzung, die Renilla mulleri-Luciferase enthält, getrennt von und zur Verwendung mit einer getrennten Zusammensetzung bereitgestellt werden, die ein Biolumineszenz-Substrat und einen Biolumineszenz-Aktivator enthält. In einem anderen Fall können die Luciferase- und Luciferin-Zusammensetzungen getrennt bereitgestellt werden, und der Biolumineszenz-Aktivator kann nach dem oder gleichzeitig mit dem Vermischen der beiden Zusammensetzungen zugegeben werden.

3. Renilla-GFP-Zusammensetzungen

[0372] Zusammensetzungen, die ein Renilla-GFP oder ein Renilla-GFP-Peptid enthalten, werden beschrieben. Die Zusammensetzungen können eine beliebige Form aus einer Vielzahl von Formen einnehmen in Abhängigkeit von dem dafür vorgesehenen Anwendungsverfahren. Die Zusammensetzungen enthalten beispielsweise ein Renilla-GFP oder ein Renilla-GFP-Peptid, vorzugsweise ein Renilla mulleri-GFP oder ein Renilla reniformis-GFP-Peptid, das für die Verwendung in biolumineszierenden Novitäten, Immunoassays oder FREI- und FET-Assays formuliert wird. Die Zusammensetzungen können auch in Verbindung mit Multi-Vertiefungen-Assayvorrichtungen, die integrierte Photodetektoren enthalten, verwendet werden, wie denjenigen, die hier beschrieben werden.

[0373] Zusammensetzungen, die ein Renilla mulleri-GFP oder Renilla mulleri-GFP-Peptid und mindestens eine Komponente eines Biolumineszenz-erzeugenden Systems, vorzugsweise eine Luciferase, ein Luciferin oder eine Luciferase und ein Luciferin enthalten, werden beschrieben. Das Luciferase/Luciferin-Biolumineszenz-erzeugende System wird vorzugsweise unter den Systemen ausgewählt, die isoliert werden aus: einem Insektensystem, einem Coelenteratsystem, einem Ctenophorsystem, einem bakteriellen System, einem Molluskensystem, einem Crustaceensystem, einem Fischsystem, einem Ringelwurmssystem, einem Erdwurmssystem. Derzeit bevorzugte Biolumineszenz-erzeugende Systeme sind diejenigen, die aus Renilla, Aequorea und Vargula isoliert werden.

[0374] Noch bevorzugter ist die Komponente des Biolumineszenz-erzeugenden Systems eine Renilla mulleri-Luciferase, die die Aminosäuresequenz hat, die in SEQ ID NO: 18 offenbart wird. Diese Zusammensetzungen können in einer Vielzahl von Verfahren und Systemen verwendet werden, wie z. B. in Verbindung mit diagnostischen Systemen für den in vivo-Nachweis von neoplastischen Geweben und anderer Gewebe, und in denjenigen Verfahren, die weiter unten detailliert beschrieben werden.

[0375] Diese Verfahren und Produkte schließen alle Verfahren und Produkte ein, die dem Fachmann bekannt sind, in denen Luciferase verwendet wird, eingeschlossen in nicht einschränkender Weise: U.S.-Anmeldung Serien-Nr. 08/757,046, 08/597,274 und 08/990,103, U.S.-Patent Nr. 5,625,048; Internationale Patentanmeldungen mit den Veröffentlichungsnummern WO 95/21191; WO 96/23810; WO 96/27676; WO 97/26333; WO 97/28261; WO 97/41228; und WO 98/02571).

4. Konjugate

[0376] Die Konjugate, die hier beschrieben werden, enthalten ein Ansteuerungsmittel, wie einen gewebespezifischen oder tumorspezifischen monoklonalen Antikörper oder ein Fragment davon, der/das entweder direkt oder über einen Linker mit einer ausgerichteten Substanz, einem Renilla-GFP, einer Renilla mulleri- oder Gaussia-Luciferase und anderen Luciferasen (eingeschlossen Photoproteine oder Luciferase-Enzyme) oder

einem Luciferin verknüpft ist. Die ausgerichtete Substanz kann auch an einen Mikroträger gekoppelt sein. Die Verknüpfung wird entweder chemisch, durch die rekombinante Expression eines Fusionsproteins in Fällen, in denen die ausgerichtete Substanz ein Protein ist, oder durch die Kombination von chemischer Verknüpfung und rekombinanter Expression, herbeigeführt. Das Ansteuerungsmittel ist ein Stoff, der vorzugsweise an einen ausgewählten Gewebe- oder Zelltyp bindet, wie ein Tumorzellenoberflächenantigen oder ein anderes gewebespezifisches Antigen.

[0377] Verfahren für die Herstellung von Konjugaten sind dem Fachmann bekannt. Beispielsweise sind ein Aequorin, das für die Konjugation entwickelt wurde, und Konjugate, die ein derartiges Aequorin enthalten, hergestellt worden (siehe z. B. Internationale PCT-Anmeldung Nr. WO 94/18342; siehe auch Smith et al. (1995) in American Biotechnology Laboratory). Aequorin ist mit Hilfe eines Sulfhydryl-reagierenden Bindungsmittel an ein Antikörpermolekül konjugiert worden (Stultz et al. (1992) Use of Recombinant Biotinylated Apoaquorin from Escherichia coli. Biochemistry 31, 1433–1442). Derartige Verfahren können an eine Verwendung für die Erzeugung der Luciferase, die an ein Protein oder andere derartige Moleküle gekoppelt ist, die als Ansteuerungsmittel brauchbar sind, angepasst werden. Vargula-Luciferase ist ebenfalls mit anderen Molekülen verknüpft worden (siehe z. B. Japanische Anmeldung Nr. JP 5064583, 19. März 1993). Derartige Verfahren können hier an eine Verwendung für die Erzeugung einer Luciferase, die an Moleküle gekoppelt ist, die als Ansteuerungsmittel brauchbar sind, angepasst werden.

[0378] Die Konjugate können eingesetzt werden, um das Vorhandensein oder die Menge eines speziellen Antigens in einer biologischen Probe durch die direkte Korrelation mit dem Licht, das bei der Biolumineszenzreaktion emittiert wird, nachzuweisen.

[0379] Als eine Alternative kann eine Komponente des Biolumineszenz-erzeugenden Systems für die Verknüpfung modifiziert werden, wie durch die Hinzufügung von Aminosäureresten, die besonders geeignet sind für die Anbindung an den ausgewählten Träger. Dies kann leicht bewirkt werden, indem die DNA modifiziert wird und eine derartige modifizierte DNA exprimiert wird, wodurch eine Luciferase mit zusätzlichen Resten am N- oder C-Terminus erzeugt wird.

[0380] Verfahren für die Herstellung von Konjugaten sind dem Fachmann bekannt. Beispielsweise sind ein Aequorin, das für die Konjugation entwickelt wurde, und Konjugate, die ein derartiges Aequorin enthalten, hergestellt worden (siehe z. B. Internationale PCT-Anmeldung Nr. WO 94/18342; siehe auch Smith et al. (1995) in American Biotechnology Laboratory). Aequorin ist mit Hilfe eines Sulfhydryl-reagierenden Bindungsmittel an ein Antikörpermolekül konjugiert worden (Stultz et al. (1992) Use of Recombinant Biotinylated Apoaquorin from Escherichia coli. Biochemistry 31, 1433–1442). Derartige Verfahren können an eine Verwendung hier für die Erzeugung der Luciferase, die an ein Protein oder andere derartige Moleküle gekoppelt ist, die als Ansteuerungsmittel brauchbar sind, angepasst werden. Vargula-Luciferase ist ebenfalls mit anderen Molekülen verknüpft worden (siehe z. B. Japanische Anmeldung Nr. JP 5064583, 19. März 1993). Derartige Verfahren können hier an eine Verwendung für die Erzeugung eines Aequorins, das an ein Protein oder andere derartige Moleküle gekoppelt ist, die als Ansteuerungsmittel brauchbar sind, angepasst werden.

[0381] Aequorin-Antikörper-Konjugate sind eingesetzt worden, um das Vorhandensein oder die Menge eines bestimmten Antigens in einer biologischen Probe durch die direkte Korrelation mit dem Licht, das bei der Biolumineszenzreaktion emittiert wird, nachzuweisen.

[0382] Die Auswahl des Systems hängt von Faktoren wie der gewünschten Farbe und gewünschten Dauer der Biolumineszenz sowie dem speziellen Gegenstand ab. Die Auswahl des Ansteuerungsmittels hängt primär vom Typ und den Charakteristika der Neoplasie oder des Gewebes, die/das sichtbar gemacht werden soll, und der Situation, in der das Sichtbarmachen durchgeführt wird, ab. Die Luciferase, die aus *Aristostomias* isoliert wird, emittiert beispielsweise rotes Licht, das besonders nützlich für die präoperative Diagnose ist, weil das rote Licht unter Verwendung eines Photomultipliers durch Gewebe nachweisbar ist.

a. Linker

[0383] Jeder dem Fachmann bekannte Linker kann hier verwendet werden. Andere Linker sind für den Einbau in chemisch erzeugte Konjugate geeignet. Linker, die für chemisch verknüpfte Konjugate geeignet sind, schließen Disulfidbindungen, Thioesterbindungen, gehinderte Disulfidbindungen und kovalente Bindungen zwischen freien reaktiven Gruppen, wie Amino- und Thiolgruppen, ein. Diese Bindungen werden unter Verwendung von heterobifunktionellen Reagenzien erzeugt, mit denen reaktive Thiolgruppen auf einem oder beiden Polypeptiden erzeugt werden, wonach die Thiolgruppen auf dem einen Polypeptid mit reaktiven Thiolgruppen

oder Aminogruppen, an die reaktive Maleimidogruppen oder Thiolgruppen angebunden werden können, auf dem anderen umgesetzt werden. Andere Linker schließen säurespaltbare Linker, wie Bismaleimideothoxypropan, säurelabile Transferrin-Konjugate und Adipinsäuredihydrazid, die in stärker sauren intrazellulären Kompartimenten gespalten werden; Verbindende Vernetzungsmittel, die bei Belichtung mit UV-Licht oder sichtbarem Licht gespalten werden, und Linker, wie die verschiedenen Domänen, wie C_H1, C_H2 und C_H3 aus der konstanten Region von humanem IgG₁, ein (siehe Batra et al. (1993) *Molecular Immunol.* 30: 379–386). In einigen Ausführungsformen können mehrere Linker eingeschlossen werden, um sich die gewünschten Eigenschaften eines jeden Linkers zunutze zu machen.

[0384] Chemische Linker und Peptid-Linker können durch die kovalente Kopplung des Linkers mit dem Ansteuerungsmittel und der ausgerichteten Substanz eingesetzt werden. Die weiter unten beschriebenen heterobifunktionellen Mittel können verwendet werden, um eine derartige kovalente Kopplung zu bewirken. Peptid-Linker können auch verbunden werden, indem eine DNA exprimiert wird, die den Linker und das TA, den Linker und die ausgerichtete Substanz oder den Linker, die ausgerichtete Substanz und das Ansteuerungsmittel als ein Fusionsprotein codiert.

[0385] Flexible Linker und Linker, die die Löslichkeit der Konjugate erhöhen, werden für die Verwendung in Betracht gezogen, sie werden hier entweder allein oder mit anderen Linker in Betracht gezogen.

[0386] Zahlreiche heterobifunktionelle Vernetzungsmittel, die verwendet werden, um kovalente Bindungen zwischen Aminogruppen und Thiolgruppen zu bilden und um Thiolgruppen in Proteine einzuführen, sind dem Fachmann bekannt (siehe z. B. den PIERCE CATALOG, *ImmunoTechnology Catalog & Handbook*, 1992–1993, der die Herstellung von Verwendung derartiger Reagenzien beschreibt und eine kommerzielle Quelle für derartige Reagenzien bereitstellt; siehe auch z. B. Cumber et al. (1992) *Bioconjugate Chem.* 3: 397–401; Thorpe et al. (1987) *Cancer Res.* 47: 5924–5931; Gordon et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 308–312; Walden et al. (1986) *J. Mol. Cell Immunol.* 2: 191–197; Carlsson et al. (1978) *Biochem. J.* 173: 723–737; Mahan et al. (1987) *Anal. Biochem.* 162: 163–170; Wawryznaczak et al. (1992) *Br. J. Cancer* 66: 361–366; Fattom et al. (1992) *Infection & Immun.* 60: 584–589). Diese Reagenzien können verwendet werden, um kovalente Bindungen zwischen dem Ansteuerungsmittel und der ausgerichteten Substanz zu bilden. Diese Reagenzien schließen nicht einschränkend ein: N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionat (SPDP; Disulfid-Linker); Sulfosuccinimidyl 6-[3-(2-Pyridyldithio)propionamido]hexanoat (Sulfo-LC-SPDP); Succinimidyl-oxycarbonyl- α -methylbenzylthiosulfat (SMBT, gehinderter Disulfat-Linker); Succinimidyl-6-[3-(2-pyridyldithio)propionamido]-hexanoat (LC-SPDP); Sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexan-1-carboxylat (Sulfo-SMCC); Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)butyrat (SPDB; gehinderter Disulfidbindungs-Linker); Sulfosuccinimidyl-2-(7-azido-4-methylcumarin-3-acetamid)ethyl-1,3'-dithiopropionat (SAED); Sulfosuccinimidyl-7-azido-4-methylcumarin-3-acetat (SAMCA); Sulfosuccinimidyl-6-(α -methyl- α -(2-pyridyldithio)toluolamido)hexanoat (Sulfo-LC-SMPT); 1,4-Di-[3'-(2'-pyridyldithio)propionamido]butan (DPDPB); 4-Succinimidyl-oxycarbonyl- α -methyl- α -(2-pyridylthio)toluol (SMPT, gehinderter Disulfat-Linker); Sulfosuccinimidyl-6-(α -methyl- α -(2-pyridyldithio)-toluamido)hexanoat (Sulfo-LC-SMPT); m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimidester (MBS); m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysulfosuccinimidester (Sulfo-MBS); N-Succinimidyl-(4-iodoacetyl)aminobenzoat (SIAB; Thioether-Linker); Sulfosuccinimidyl-(4-iodoacetyl)-aminobenzoat (Sulfo-SIAB); Succinimidyl-4-(p-maleimidophenyl)-butyrat (SMPB), Sulfosuccinimidyl-4-(p-maleimidophenyl)-butyrat (Sulfo-SMPB); Azidobenzoylhydrazid (ABH).

[0387] Säurespaltbare Linker, photospaltbare und wärmeempfindliche Linker können auch verwendet werden, vor allem dort, wo es erforderlich sein kann, die ausgerichtete Substanz zu spalten, um es ihr zu ermöglichen, leichter für die Umsetzung zugänglich zu sein.

[0388] Säurespaltbare Linker schließen nicht einschränkend ein: Bismaleimideothoxypropan; und Adipinsäuredihydrazid-Linker (siehe z. B. Fattom et al. (1992) *Infection & Immun.* 60: 584–589) und säurelabile Transferrin-Konjugate, die einen ausreichend großen Anteil an Transferrin enthalten, um den Eintritt in den intrazellulären Transferrin-Kreislaufweg einzuführen (siehe z. B. Welhöner et al. (1991) *J. Biol. Chem.* 266: 4309–4314).

[0389] Photospaltbare Linker sind Linker, die gespalten werden, wenn sie Licht ausgesetzt werden (siehe z. B. Goldmacher et al. (1992) *Biocconj. Chem.* 3: 104–107), wodurch die ausgerichtete Substanz bei der Belichtung mit Licht freigesetzt wird. Photospaltbare Linker, die bei der Belichtung mit Licht gespalten werden, sind bekannt (siehe z. B. Hazum et al. (1981) in *Pept. Proc. Eur. Pept. Symp.* 16th, Brunfeldt, K. (Hrsg.), S. 105–110, worin die Verwendung einer Nitrobenzylgruppe als eine photospaltbare Schutzgruppe für Cystein beschrieben wird; Yen et al. (1989) *Makromol. Chem.* 190: 69–82, worin wasserlösliche photospaltbare Copolymere ein-

schließlich Hydroxypropylmethacrylamid-Copolymer, Glycincopolymer, Fluoresceincopolymer und Methylrhodaminpolymer beschrieben werden.; Goldmacher et al. (1992) Bioconj. Chem. 3: 104–107, worin ein Vernetzungsmittel und Reagens beschrieben wird, das bei der Belichtung mit nahem UV-Licht (350 nm) einen photolytischen Abbau durchmacht; und Senter et al. (1985) Photochem. Photobiol 42: 231–237, worin Nitrobenzylloxycarbonylchlorid-Vernetzungsmittel beschrieben werden, die photospaltbare Bindungen erzeugen, wodurch die ausgerichtete Substanz bei Belichtung mit Licht freigesetzt wird. Derartige Linker können eine spezielle Anwendung bei der Behandlung von dermatologischen oder ophthalmischen Zuständen finden, die Licht unter Verwendung einer Faseroptik ausgesetzt werden können. Nach der Verabreichung des Konjugats kann das Auge oder die Haut oder ein sonstiges Körperteil dem Licht ausgesetzt werden, was zur Freisetzung der ausgerichteten Einheit aus dem Konjugat führt. Derartige photospaltbare Linker sind in Verbindung mit diagnostischen Protokollen brauchbar, in denen es wünschenswert ist, das Ansteuerungsmittel zu entfernen, um eine schnelle Ausscheidung aus dem Tierkörper zu ermöglichen.

b. Ansteuerungsmittel

[0390] Ansteuerungsmittel schließen alle Substanzen ein, die mit Zellen in einem Tumor oder einem spezialisierten Gewebe (dem anvisierten Gewebe) in Wechselwirkung treten und die ausgerichtete Substanz bei Zellen in dem Tumor oder Gewebe lokalisieren. Derartige Mittel schließen alle Substanzen ein, die spezifisch mit einem Zelloberflächenprotein oder einem Rezeptor in Wechselwirkung tritt, das/der in ausreichend höheren Konzentrationen oder Mengen auf dem anvisierten Gewebe vorhanden ist, so dass Licht erzeugt wird, wenn es mit einem geeigneten Biolumineszenz-erzeugenden Reagens und Aktivatoren in Kontakt gebracht wird. Diese Substanzen schließen nicht einschränkend Wachstumsfaktoren, die vorzugsweise so modifiziert sind, dass sie nicht internalisiert werden, Methotrexat und Antikörper, vor allem Antikörper, die gegen tumorspezifische Antigene gerichtet sind, ein. Ein Unmenge tumorspezifischer Antigene wurde bei einer Vielzahl humaner Neoplasmen identifiziert.

Anti-Tumorantigen-Antikörper

[0391] Polyklonale und monoklonale Antikörper können gegen ausgewählte Antigene erzeugt werden. Alternativ sind viele derartige Antikörper derzeit erhältlich. Eine beispielhafte Liste von Antikörpern und des Tumorantigens, gegen das jeder dieser Antikörper gerichtet ist, wird in der U.S.-Anmeldung Seriennummer bereitgestellt. Es wird in Betracht gezogen, dass jeder aufgezählte Antikörper mit einer Biolumineszenz-erzeugenden Komponente gemäß den hier bereitgestellten Verfahren konjugiert werden kann.

[0392] Zu den bevorzugten Antikörpern zur Verwendung in den hier beschriebenen Verfahren gehören diejenigen, die vom Menschen stammen, noch bevorzugter die humanisierten monoklonalen Antikörper. Diese sind für die diagnostische Untersuchung von Menschen bevorzugt.

Herstellung der Konjugate

[0393] Jedes beliebige Verfahren für die Verbindung von Proteinen kann verwendet werden. Beispielsweise werden in dem U.S.-Patent Nr. 5,486,455 Verfahren für die Anbindung einer Luciferase an einen Antikörper beschrieben. Wie oben festgestellt können das Ansteuerungsmittel und das Luciferin oder die Luciferase direkt verbunden werden, wie über kovalente Bindungen, d. h. Sulfhydryl-Bindungen oder andere geeignete Bindungen, oder sie können über einen Linker miteinander verbunden werden. Es kann mehr als eine Luciferase oder ein Luciferin pro Ansteuerungsmittel oder mehr als ein Ansteuerungsmittel pro Luciferase oder Luciferin vorhanden sein.

[0394] Alternativ kann ein Antikörper oder ein F(Ab)₂-Antigen-bindendes Fragment davon oder ein anderes Protein-Ansteuerungsmittel mit der Luciferase unter Anwendung der rekombinanten DNA-Technologie verbunden werden (direkt oder über ein Verbindungspeptid). Beispielsweise kann die DNA, die einen beliebigen Antikörper von den Antitumor-Antikörpern in Tabelle 3 codiert, in dem gleichen Translationsleserahmen mit DNA, die eine der oben beschriebenen Luciferasen, z. B. SEQ ID NO: 1–14, codiert, verknüpft werden und in einen Expressionsvektor inseriert werden. Die DNA, die die rekombinante Antikörper-Luciferase-Fusion codiert, kann in einen geeigneten Wirt, wie Bakterien oder Hefe, für die Expression eingeführt werden.

5. Formulierung der Zusammensetzungen für die Verwendung in den diagnostischen Systemen

[0395] In den meisten Ausführungsformen werden die Renilla-GFPs und die Komponenten der hier beschriebenen diagnostischen Systeme, wie die Renilla mulleri-Luciferase, in zwei Zusammensetzungen formuliert: in

einer ersten Zusammensetzung, die das Konjugat enthält; und in einer zweiten Zusammensetzung, die die übrigen Komponenten des Biolumineszenz-erzeugenden Systems enthält. Die Zusammensetzungen werden in jeder beliebigen Weise für die Verabreichung beim Tier, vor allem Säuger, und noch spezieller beim Menschen, formuliert. Derartige Formulierungen schließen diejenigen Formulierungen ein, die für topische, lokale, enterale, parenterale, intracystale, intrakutane, intravitreale, subkutane, intramuskuläre oder intravenöse Verabreichung geeignet sind.

[0396] Beispielsweise werden die Konjugate, die vorzugsweise ein Ansteuerungsmittel sind, das mit einer Luciferase (oder einem Photoprotein) verbunden ist, für die systemische oder lokale Verabreichung formuliert. Die übrigen Komponenten sind in einer getrennten zweiten Zusammensetzung für die topische oder lokale Anwendung formuliert. Die zweite Zusammensetzung enthält typischerweise alle anderen Substanzen, wie Spektralverschieber, die an der Reaktion beteiligt sind. Es ist bevorzugt, dass die Komponenten der zweiten Zusammensetzung in einer Formulierung mit Depot- oder Retardwirkung oder in einer sonstigen Weise formuliert sind, die den Abbau und/oder die Wechselwirkung mit Blutbestandteilen verhindert.

a. Die erste Zusammensetzung: Formulierung der Konjugate

[0397] Wie weiter oben angegeben enthalten die Konjugate entweder eine Luciferase oder ein Luciferin und ein Ansteuerungsmittel. Die bevorzugten Konjugate werden zwischen einem Ansteuerungsmittel und einer Luciferase, vor allem der Gaussia-, Renilla mulleri- oder Pleuromamma-Luciferase gebildet. Die Konjugate können zu pharmazeutischen Zusammensetzungen formuliert werden, die für die topische, lokale, intravenöse und systemische Anwendung geeignet sind. Effektive Konzentrationen eines oder mehrerer Konjugate werden mit einem geeigneten pharmazeutischen Träger oder Vehikel vermischt. Die Konzentrationen oder Mengen der Konjugate, die effektiv sind, entsprechen der Zufuhr einer Menge bei der Verabreichung, die zu einer ausreichenden Menge der ausgerichteten Einheit führt, die mit den anvisierten Zellen oder dem anvisierten Gewebe verbunden ist, wodurch die Zellen oder das Gewebe während des chirurgischen Verfahrens sichtbar gemacht werden können/kann. Die Zusammensetzungen werden typischerweise für eine Verabreichung in einer Einzeldosis formuliert. Effektive Konzentrationen und Mengen können empirisch durch das Testen der Konjugate in bekannten in vitro- und in vivo-Systemen, wie denjenigen, die hier beschrieben werden, ermittelt werden; Dosierungen für Menschen oder andere Tiere können dann davon extrapoliert werden.

[0398] Beim Vermischen mit oder bei der Zugabe des oder der Konjugate zu dem Vehikel kann das resultierende Gemisch eine Lösung, Suspension, Emulsion oder dergleichen sein. Die Form des resultierenden Gemischs hängt von einer Anzahl an Faktoren ab, eingeschlossen die beabsichtigte Art der Verabreichung und die Löslichkeit des Konjugats in dem ausgewählten Träger oder Vehikel. Die effektive Konzentration ist ausreichend für die Ausrichtung einer ausreichenden Menge der ausgerichteten Substanz auf die interessierende Stelle, wodurch die Stelle, wenn die Substanz während des chirurgischen Verfahrens mit den übrigen Reagenzien kombiniert wird, leuchtet. Eine derartige Konzentration oder Menge kann auf der Basis von in vitro- und/oder in vivo-Daten, wie den Daten vom Maus-Heterotransplantat-Modell für Tumoren oder vom Kaninchen-Modell am Auge, ermittelt werden. Erforderlichenfalls können pharmazeutisch akzeptable Salze oder andere Derivate der Konjugate hergestellt werden.

[0399] Pharmazeutische Träger oder Vehikel, die für die Verabreichung der hier beschriebenen Konjugate geeignet sind, schließen all diejenigen Träger ein, von denen der Fachmann weiß, dass sie für die spezielle Art der Verabreichung geeignet sind. Zusätzlich können die Konjugate als der einzige pharmazeutische Bestandteil in der Zusammensetzung formuliert werden, oder sie können mit anderen Wirkstoffen kombiniert werden.

[0400] Die Konjugate können auf jedem beliebigen geeigneten Weg verabreicht werden, zum Beispiel oral, parenteral, intravenös, intradermal, subkutan oder topisch, in flüssiger, halbflüssiger oder fester Form, und sie werden in einer Weise formuliert, die für jeden Verabreichungsweg geeignet ist. Die intravenöse oder lokale Verabreichung ist derzeit bevorzugt. Tumore und Störungen bei der Gefäßbildung werden typischerweise durch die systemischen, intradermalen oder intramuskulären Verabreichungsformen sichtbar gemacht.

[0401] Das Konjugat wird in den pharmazeutisch akzeptablen Träger in einer Menge eingeschlossen, die ausreichend ist, um ein nachweisbares Gewebe zu erzeugen, und die nicht zu unerwünschten Nebenwirkungen beim Patienten oder dem Tier führt. Offenbar hängen die Anzahl und das Ausmaß der Nebenwirkungen von dem Zustand ab, auf Grund dessen die Konjugate verabreicht werden. Beispielsweise werden bestimmte toxische und unerwünschte Nebenwirkungen toleriert, wenn versucht wird, lebensbedrohliche Krankheiten, wie Tumore, zu diagnostizieren, die nicht toleriert würden, wenn Störungen mit weniger Konsequenzen diagnostiziert werden.

[0402] Die Konzentration des Konjugats in der Zusammensetzung hängt von der Absorption-, Inaktivierungs- und Ausscheidungsgeschwindigkeit des Konjugats, dem Dosierungszeitplan und der verabreichten Menge sowie anderen Faktoren ab, die dem Fachmann bekannt sind. Typischerweise sollte eine effektive Dosis eine Serumkonzentration des Wirkstoffs von etwa 0,1 ng/ml bis etwa 50–1000 µg/ml, vorzugsweise 50–100 µg/ml, hervorrufen. Die pharmazeutischen Zusammensetzungen sollten typischerweise eine Dosis von etwa 0,01 mg bis etwa 100–2000 mg Konjugat, abhängig von dem ausgewählten Konjugat, pro Kilogramm Körpergewicht pro Tag liefern. Typischerweise sollte für die intravenöse Verabreichung eine Dosis von etwa 0,05 bis 1 mg/kg ausreichend sein. Die lokale Anwendung sollte, wie für das Sichtbarmachen von ophthalmischen Geweben oder die lokale Injektion in Gelenke, für 1 ng bis zu 1000 µg, vorzugsweise etwa 1 µg bis etwa 100 µg, pro verabreichter Einzeldosis sorgen. Selbstverständlich hängt die zu verabreichende Menge von dem ausgewählten Konjugat, der Indikation und möglicherweise den Nebenwirkungen, die toleriert werden, ab. Die Dosierungen können unter Anwendung der anerkannten Modelle empirisch ermittelt werden.

[0403] Der Wirkstoff kann auf einmal verabreicht werden, oder er kann in einer Anzahl kleinerer Dosen unterteilt werden, die in Zeitabständen zu verabreichen sind. Ganz offensichtlich hängen die genaue Dosis und die Dauer der Verabreichung von dem Krankheitszustand ab, der diagnostiziert wird, und sie können empirisch unter Verwendung bekannter Testprotokolle oder durch die Extrapolation von in vivo- oder in vitro-Testdaten bestimmt werden. Es wird darauf hingewiesen, dass die Konzentrationen und die Dosierungswerte auch mit der Schwere des Zustands variieren können, der gelindert werden soll. Es ist weiterhin offensichtlich, dass für jedes individuelle Subjekt die spezifischen Dosierungspläne mit der Zeit gemäß den individuellen Bedürfnissen und der professionellen Einschätzung durch die Person, die die Zusammensetzungen verabreicht oder die die Verabreichung überwacht, angepasst werden sollen, und dass die Konzentrationsbereiche, die hier offenbart werden, nur beispielhaft sind und nicht dafür gedacht sind, den Gegenstand oder die Anwendung der beanspruchten Zusammensetzungen einzuschränken.

[0404] Lösungen oder Suspensionen, die für die parenterale, intradermale, subkutane oder topische Anwendung verwendet werden, können beliebige der folgenden Komponenten enthalten: ein steriles Verdünnungsmittel, wie Wasser für die Injektion, eine Salzlösung, ein fettes Öl, Polyethylenglycol, Glycerin, Propylenglycol oder ein anderes synthetisches Lösemittel; antimikrobielle Mittel, wie Benzylalkohol und die Methylparabene; Antioxidantien, wie Ascorbinsäure und Natriumhydrogensulfid; Chelatbildner, wie Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA); Puffer, wie Acetate, Citrate und Phosphate; und Mittel für die Einstellung der Tonizität, wie Natriumchlorid oder Dextrose. Parenterale Zubereitungen können in Ampullen, Wegwerfspritzen oder Vials für mehrere Dosen, die aus Glas, Kunststoff oder einem anderen geeigneten Material hergestellt sind, verpackt sein.

[0405] Im Fall der intravenösen Verabreichung schließen geeignete Träger eine physiologische Salzlösung oder eine phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) und Lösungen, die Verdickungsmittel und Solubilisierungsmittel, wie Glucose, Polyethylenglycol, und Propylenglycol und Gemische davon enthalten, ein. Liposomale Suspensionen können auch als pharmazeutisch akzeptable Träger geeignet sein. Diese können gemäß den Verfahren hergestellt werden, die dem Fachmann bekannt sind.

[0406] Die Konjugate können mit Trägern hergestellt werden, die sie vor der schnellen Ausscheidung aus dem Körper schützen, wie in Formulierungen mit oder Überzügen für eine protrahierte Freisetzung (Depot- oder Retardarzneiformen). Derartige Träger schließen Formulierungen für die kontrollierte Freisetzung, wie nicht einschränkend Implantate und mikroverkapselte Zufuhrsysteme und biologisch abbaubare, biokompatible Polymere, wie Ethylenvinylacetat, Polyanhydride, Polyglycolsäure, Polyorthoester, Polymilchsäure und dergleichen, ein.

[0407] Die Konjugate können für die lokale oder topische Anwendung, wie für die topische Anwendung auf den Haut- und Schleimhautmembranen, wie im Auge, in der Form von Gelen, Cremes und Lotionen, und für die Anwendung am Auge oder für die intracisternale oder intraspinale Anwendung formuliert werden. Derartige Lösungen, vor allem diejenigen, die für die ophthalmische Verwendung vorgesehen sind, können als 0,01%ige bis 10%ige isotonische Lösungen, pH etwa 5–7, mit geeigneten Salzen formuliert werden. Die ophthalmischen Zusammensetzungen können auch zusätzliche Komponenten einschließen, wie Hyaluronsäure. Die Konjugate können als Aerosole für die topische Anwendung formuliert werden (siehe z. B. U.S.-Patente Nr. 4,044,126, 4,414,209 und 4,364,923).

[0408] Außerdem können die Zusammensetzungen für die in vivo-Aktivierung des Konjugats während der chirurgischen Verfahren als ein Aerosol formuliert werden. Diese Zusammensetzungen enthalten die Aktivator und weiterhin die übrige Biolumineszenz-erzeugende Substanz, wie Luciferin, wenn das Konjugat eine Luciferase adressiert, oder eine Luciferase, wenn das Konjugat ein Luciferin, wie Coelenterazin, an sein Ziel

adressiert.

[0409] Wenn die orale Verabreichung erwünscht ist, sollte das Konjugat in einer Zusammensetzung bereitgestellt werden, die es vor der sauren Umgebung des Magens schützt. Die Zusammensetzung kann beispielsweise in einem enterischen Überzug formuliert sein, der im Magen unversehrt bleibt und die wirksame Verbindung im Darm freisetzt. Orale Zusammensetzungen enthalten allgemein ein inertes Verdünnungsmittel oder einen essbaren Träger und können zu Tabletten gepresst oder in Gelatinekapseln eingeschlossen werden. Für den Zweck der oralen Verabreichung kann die wirksame Verbindung oder können die wirksamen Verbindungen mit Exzipientien eingebracht werden und in der Form von Tabletten, Kapseln oder Pastillen verwendet werden. Pharmazeutisch kompatible Bindemittel und Hilfsstoffe können als Teil der Zusammensetzung eingeschlossen werden.

[0410] Die Tabletten, Pillen, Kapseln, Pastillen und dgl. können jeden der folgenden Bestandteile oder Verbindungen von einer ähnlichen Beschaffenheit enthalten: ein Bindemittel, wie mikrokristalline Cellulose, Tragantgummi und Gelatine; ein Exzipiens, wie Stärke und Lactose, ein Sprengmittel wie nicht einschränkend Alginsäure und Maisstärke; ein Schmiermittel wie nicht einschränkend Magnesiumstearat; ein Gleitmittel wie nicht einschränkend kolloidales Siliciumdioxid; ein Süßungsmittel wie Saccharose oder Saccharin; und einen Aromastoff, wie Pfefferminze, Methylsalicylat und Fruchtaroma.

[0411] Wenn die Dosiereinheit die Form einer Kapsel hat, kann sie zusätzlich zu dem Material vom obigen Typ einen flüssigen Träger wie ein Fettöl enthalten. Zusätzlich können Dosiereinheitsformen verschiedene andere Materialien enthalten, die die physikalische Form der Dosiereinheit verändern, zum Beispiel Überzüge aus Zucker und anderen enterischen Mitteln. Die Konjugate können auch als Komponente eines Elixirs, einer Suspension, eines Sirups, einer Oblate, eines Kaugummis oder dgl. verabreicht werden. Ein Sirup kann zusätzlich zu den wirksamen Verbindungen Saccharose als Süßungsmittel und bestimmte Konservierungsstoffe, Farbstoffe, Farbmittel und Aromastoffe enthalten.

[0412] Die Wirkstoffe können auch mit anderen Wirkstoffen vermischt werden, die die gewünschte Wirkung nicht beeinträchtigen, oder mit Materialien, die die gewünschte Wirkung ergänzen, wie cis-Platin für die Behandlung von Tumoren.

[0413] Schließlich können die Verbindungen als Herstellungsgegenstände verpackt werden, die ein Verpackungsmaterial, ein oder mehrere Konjugate oder Zusammensetzungen, wie sie hier bereitgestellt werden, innerhalb des Verpackungsmaterials, und ein Etikett, das die Indikation angibt, für die das Konjugat bereitgestellt wird, enthalten.

b. Die zweite Zusammensetzung

[0414] Die zweite Zusammensetzung enthält die übrigen Komponenten der Biolumineszenz-erzeugenden Reaktion. Wenn diese Komponenten systemisch verabreicht werden, schließen die übrigen Komponenten vorzugsweise das Luciferin oder Substrat und optional zusätzliche Substanzen ein, wie eine Spektralverschieber, vor allem die hier beschriebenen GFPs. Diese Komponenten, wie das Luciferin, können wie oben für die Konjugate beschrieben formuliert werden. In einigen Fällen wird das Luciferin oder die Luciferase in dieser Zusammensetzung an einen Proteinträger oder einen anderen Träger gebunden, um den Abbau oder das Auflösen in Blutzellen oder andere zelluläre Komponenten hinein zu vermeiden.

[0415] In Fälle, in denen die zweite Zusammensetzung lokal oder topisch angewendet wird, kann sie in einem Spray oder einem Aerosol oder sonstigen geeigneten Mitteln für die topische Anwendung formuliert werden.

[0416] In bestimmten hier beschriebenen Fällen werden alle Komponenten mit Ausnahme eines Aktivators zusammen formuliert, wie durch die Verkapselung in einer Formulierung für die protrahierte Freisetzung (Retard-Formulierung), die gezielt auf das Gewebe gerichtet ist. Bei der Freisetzung ist die Zusammensetzung an der gewünschten Stelle lokalisiert und beginnt zu leuchten.

[0417] In der Praxis können die beiden Zusammensetzungen gleichzeitig oder nacheinander verabreicht werden. Typischerweise wird die erste Zusammensetzung, die das Konjugat enthält, als erste verabreicht, im Allgemeinen eine Stunde oder zwei Stunden vor der Operation, und die zweite Zusammensetzung wird dann verabreicht, entweder präoperativ oder während des chirurgischen Eingriffs.

[0418] Die Konjugate, die hier beschrieben werden, enthalten ein Ansteuerungsmittel, wie einen gewebespe-

zifischen oder tumorspezifischen monoklonalen Antikörper oder ein Fragment davon, der/das entweder direkt oder über einen Linker mit einer ausgerichteten Substanz verknüpft wird, eine Luciferase (eingeschlossen Photoproteine oder Luciferase-Enzyme) oder ein Luciferin. Die ausgerichtete Substanz kann an einen Mikroträger gebunden sein. Die Verbindung erfolgt entweder chemisch, durch die rekombinante Expression eines Fusionsproteins in Fällen, in denen die ausgerichtete Substanz ein Protein ist, und durch Kombinationen von chemischer Verbindung und rekombinanter Expression. Das Ansteuerungsmittel ist eine Substanz, die vorzugsweise an einen ausgewählten Gewebe- oder Zelltyp bindet, wie ein Tumorzelloberflächenantigen oder ein anderes gewebespezifisches Antigen.

[0419] Verfahren für die Herstellung der Konjugate sind dem Fachmann bekannt. Ein Aequorin, das für die Konjugation entworfen wurde, und Konjugate, die ein derartiges Aequorin enthalten, sind beispielsweise hergestellt worden (siehe z. B. Internationale PCT-Anmeldung Nr. WO 94/18342; siehe auch Smith et al. (1995) in American Biotechnology Laboratory). Aequorin ist mit Hilfe eines Sulfhydryl-reagierenden Bindungsmittel an ein Antikörpermolekül konjugiert worden (Stultz et al. (1992) Use of Recombinant Biotinylated Apoaequorin from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 31, 1433–1442). Diese Verfahren können an eine Verwendung hier angepasst werden, um ein Aequorin zu erzeugen, das an ein Protein oder andere derartige Moleküle gekoppelt ist, die als Ansteuerungsmittel brauchbar sind. Vargula-Luciferase ist ebenfalls mit anderen Molekülen verknüpft worden (siehe z. B. Japanische Patentanmeldung Nr. JP 5064583, 19. März 1993). Derartige Verfahren können an die Verwendung hier angepasst werden, um ein Aequorin zu erzeugen, das an ein Protein oder andere derartige Moleküle gekoppelt ist, die als Ansteuerungsmittel brauchbar sind.

[0420] Aequorin-Antikörper-Konjugate sind eingesetzt worden, um das Vorhandensein eines speziellen Antigens in einer biologischen Probe nachzuweisen oder um dessen Menge durch die direkte Korrelation mit dem Licht, das bei der Biolumineszenz-Reaktion emittiert wird, zu quantifizieren.

[0421] Alternativ kann das Renilla-GFP oder die Renilla mulleri- oder die Gaussia-Luciferase oder eine Komponente des Biolumineszenz-erzeugenden Systems für die Verknüpfung mit dem ausgewählten Träger modifiziert werden, wie durch die Addition von Aminosäureresten, die für die Verknüpfung mit dem ausgewählten Substrat besonders geeignet sind. Dies kann leicht durchgeführt werden, indem die DNA modifiziert wird und die so modifizierte DNA exprimiert wird, um eine Luciferase mit den zusätzlichen Resten am N- oder C-Terminus zu erzeugen.

[0422] Die Auswahl des Systems hängt von Faktoren wie der gewünschten Farbe und der gewünschten Dauer der Biolumineszenz sowie dem speziellen Gegenstand ab. Die Auswahl des Ansteuerungsmittels hängt primär vom Typ und den Eigenschaften der Neoplasie oder des Gewebes, die/das sichtbar gemacht werden soll, und dem Aufbau, in dem die Sichtbarmachung durchgeführt wird, ab.

c. Anwendung der Reaktionen in Kombination mit Ansteuerungsmitteln

[0423] Die spezielle Weise, in der jedes Biolumineszenzsystem mit einem ausgewählten Ansteuerungsmittel kombiniert wird, hängt von dem Mittel und der Neoplasie oder dem Gewebe ab, die/das sichtbar gemacht werden soll. Im Allgemeinen wird jedoch ein Luciferin, ein Renilla-GFP, eine Renilla mulleri-, Pleuromamma- oder Gaussia-Luciferase oder eine andere Luciferase der Reaktion mit dem Ansteuerungsmittel konjugiert und dem Tier vor dem chirurgischen Eingriff verabreicht. Während der Operation werden die interessierenden Gewebe mit der oder den übrigen Komponenten des Biolumineszenz-erzeugenden Systems in Kontakt gebracht. Jedes Gewebe, auf das oder mit dem das Ansteuerungsmittel reagiert, leuchtet dann.

[0424] Jede Farbe des sichtbaren Lichtes, das durch ein Biolumineszenz-erzeugendes System erzeugt wird, wird für die Verwendung in den hier beschriebenen Verfahren in Betracht gezogen. Das sichtbare Licht ist vorzugsweise eine Kombination aus blauem, grünem und/oder rotem Licht mit variierenden Intensitäten und Wellenlängen. Für das Sichtbarmachen von Neoplasien und speziellen Geweben durch Säugetiergewebe oder von Tumoren, die tief ins Gewebe eingebettet sind, sind längere Wellenlängen des sichtbaren Lichts, d. h. rotes Licht und nahes Infrarot-Licht, bevorzugt, weil für die Wellenlängen des nahen Infrarotlichts von etwa 700–1300 nm bekannt ist, dass sie Weichgewebe und Knochen durchdringen (siehe z. B. U.S.-Patent Nr. 4,281,645).

[0425] Das Konjugat kann während der Operation auf die Gewebe aufgebracht werden, wie durch Versprühen einer sterilen Lösung über den Geweben, gefolgt vom Aufbringen der übrigen Komponenten. Gewebe, die das anvisierte Antigen exprimieren, leuchten dann.

[0426] Die Reagenzien können in Zusammensetzungen, wie Suspensionen, Pulvern, Pasten oder in jeder

sonstigen sterilen Form bereitgestellt werden. Sie können als Sprays, Aerosole oder in jeder sonstigen geeigneten Form bereitgestellt werden. Die Reagenzien können mit einer Matrix, vor allem Mikrokügelchen, die für die in vivo-Verwendung geeignet sind und eine solche Größe haben, dass sie durch die Kapillare passen, verknüpft werden. Typischerweise werden alle Komponenten bis auf eine oder mehrere Komponenten, vorzugsweise alle Komponenten bis auf eine Komponente, die für die Reaktion erforderlich sind, vermischt und zusammen bereitgestellt; die Reaktion wird ausgelöst, indem die gemischte(n) Komponente(n) mit der oder den übrigen Komponente(n) vermischt werden, wie durch die Zugabe von Ca^{2+} , FMN mit Reduktase, FMNH_2 , ATP, Luft oder Sauerstoff.

[0427] Die Luciferase oder Luciferase/Luciferin werden vorzugsweise in Kombination mit dem Ansteuerungsmittel bereitgestellt, bevor sie dem Patienten verabreicht werden. Das Ansteuerungsmittel-Konjugat wird dann in vivo mit den übrigen Komponenten in Kontakt gebracht. Wie es sich hier im offensichtlicher Weise ergibt, gibt es eine Vielzahl von Wegen, auf denen jedes System mit einem ausgewählten Ansteuerungsmittel kombiniert werden kann.

J. KOMBINATIONEN

[0428] Zusätzlich können die oben beschriebenen Pleuromamma-, Gaussia- oder Renilla-Luciferasen und/oder Renilla- und Ptilosarcus-GFPs in Kombination mit Herstellungsgegenständen verwendet werden, um Novitäten (neuartige Produkte) zu erzeugen. Derartige Gegenstände und Herstellungsverfahren werden detailliert in der gleichzeitig anhängigen U.S.-Anmeldung mit den Seriennummern 08/597,274 und 08/757,046 beschrieben. Die Luciferasen und/oder GFPs, die hier bereitgestellt werden, können in den Verfahren und Gegenständen, die in den gleichzeitig anhängigen Anmeldungen bereitgestellt werden, verwendet werden. Diese Novitäten, die Herstellungsgegenstände sind, werden für die Unterhaltung, die Freizeit und den Zeitvertreib gestaltet und schließen nicht einschränkend ein: Spielzeuge, vor allem Wasserspritzpistolen, Spielzeugzigaretten, Spielzeug-"Halloween"-Eier, Jonglierbälle vom Typ "Footbag" und Brettspiele/Kartenspiele; Fingerfarben und andere Farben, Spielzeuge aus glibberigen Materialien; Textilien, vor allem Kleidung, wie Hemden, Hüte und Sportbekleidungsanzüge, Zwirne und Garne; Luftblasen in blasenerzeugenden Spielzeugen und anderen Spielzeugen, die Blasen erzeugen; Ballons; Figürchen; Artikel für den persönlichen Gebrauch, wie Badepulver, Körperlotionen, Gele, Puder und Cremes, Nagelpolituren, Kosmetika, eingeschlossen Make-up, Zahnpasten und andere Zahnputzmittel, Seifen, Körperfarben und Schaumbäder; Artikel wie Tinten, Papier; Nahrungsmittel, wie Gelatinen, Kuchenglasuren und Zuckerguss; Fischfutter, das Luciferine enthält und transgene Fische, vor allem transgene Fische, die eine Luciferase exprimieren; Pflanzennahrung, die ein Luciferin oder eine Luciferase enthält, vorzugsweise ein Luciferin zur Verwendung mit transgenen Pflanzen, die Luciferase exprimieren; und Getränke, wie Bier, Wein, Sekt, Erfrischungsgetränke und Eiswürfel sowie Eis in anderen Gestaltungen; Springbrunnen, eingeschlossen flüssiges "Feuerwerk", und andere, wie Strahlen oder Sprühnebel oder Aerosole von Zusammensetzungen, die Lösungen, Gemische, Suspensionen, Puder, Pasten, Partikel oder andere geeignete Formen sind.

[0429] Jeder Herstellungsgegenstand, der mit einem Biolumineszenz-erzeugenden System kombiniert werden kann, wie es hier bereitgestellt wird, und der so für die Unterhaltung, die Freizeitgestaltung und/oder den Zeitvertreib sorgen kann, eingeschlossen die Verwendung der Gegenstände für Freizeit und Erholung oder für das Erregen von Aufmerksamkeit, wie zum Bewerben von Waren und/oder Dienstleistungen, was mit einem Logo oder einer Marke zusammenhängt, wird hier ins Auge gefasst. Derartige Verwendungen können ein Zusatz zur oder in Verbindung mit der oder anstelle der gewöhnlichen oder normalen Verwendung derartiger Gegenstände sein. Als Ergebnis der Kombination leuchten die Gegenstände oder erzeugen, wie im Fall von Wasserpistolen und Springbrunnen, eine leuchtende Flüssigkeit oder einen leuchtenden Sprühnebel einer Flüssigkeit oder von Partikeln.

K. Verwendungsverfahren

1. Verfahren für die Diagnose von Neoplasmen und anderer Gewebe

[0430] Verfahren für die Diagnose und das Sichtbarmachen von Geweben in vivo oder in situ, vorzugsweise von neoplastischem Gewebe, unter Verwendung der Zusammensetzungen, die ein Renilla mulleri-GFP oder ein Ptilosarcus-GFP und/oder eine Renilla mulleri-, Pleuromamma- oder Gaussia-Luciferase enthalten, werden beschrieben. Beispielsweise kann das Renilla mulleri-GFP-Protein in Verbindung mit diagnostischen Systemen verwendet werden, die auf Biolumineszenz für das in situ-Sichtbarmachen von Geweben basieren, wie denjenigen, die in der gleichzeitig anhängigen Anmeldung mit der Seriennummer 08/908,909 beschrieben werden. Die Systeme sind besonders nützlich für das Sichtbarmachen und Nachweisen eines neoplastischen Ge-

webes und von Spezialgewebe, wie während nicht invasiver und invasiver Verfahren. Die Systeme schließen Zusammensetzungen ein, die Konjugate enthalten, die ein gewebespezifisches, vor allem tumorspezifisches Ansteuerungsmittel einschließen, das mit einer ausgerichteten Substanz, wie einem Renilla mulleri-GFP, einer Luciferase oder einem Luciferin, verknüpft ist. Die Systeme schließen auch eine zweite Zusammensetzung ein, die die übrigen Komponenten einer Biolumineszenz-erzeugenden Reaktion und/oder das GFP enthält. In einigen Fällen sind mit Ausnahme der Aktivatoren, die in situ bereitgestellt werden oder die in dem Körper oder dem Gewebe vorhanden sind, alle Komponenten in einer einzigen Zusammensetzung enthalten.

[0431] Die diagnostischen Systeme schließen vor allem zwei Zusammensetzungen ein: Eine erste Zusammensetzung, die Konjugate enthält, die in bevorzugten Fällen Antikörper einschließen, die gegen Tumorantigene gerichtet sind, die an eine Komponente der Biolumineszenz-erzeugenden Reaktion, eine Luciferase oder ein Luciferin, vorzugsweise eine Luciferase, konjugiert sind, wird bereitgestellt. In bestimmten Fällen werden Konjugate, die tumorspezifische Ansteuerungsmittel enthalten, mit Luciferasen oder Luciferinen verknüpft. In anderen Fällen werden tumorspezifische Ansteuerungsmittel mit Mikroträgern verknüpft, die mit vorzugsweise mehr als einer der Biolumineszenz-erzeugenden Komponenten, vorzugsweise mehr als einem Luciferase-Molekül, gekoppelt sind.

[0432] Die zweite Zusammensetzung enthält die übrigen Komponenten eines Biolumineszenz-erzeugenden Systems, typischerweise das Luciferin oder das Luciferase-Substrat. In einigen Fällen sind diese Komponenten, vor allem das Luciferin, mit einem Protein, wie einem Serumalbumin, oder einem anderen Proteinträger verbunden. Der Träger und die Retardformulierungen (Formulierungen mit protrahierter Freisetzung) ermöglichen es systemisch verabreichten Komponenten, sich ohne eine Wechselwirkung mit Blutzellbestandteilen, wie Hämoglobin, die das Luciferin oder die Luciferase deaktivieren, zu dem anvisierten Gewebe zu bewegen.

2. Verfahren für die Diagnose von Krankheiten

[0433] Verfahren für die Diagnose von Krankheiten, vor allem infektiöser Krankheiten, unter Verwendung der Chip-Methodik, eines Luciferase/Luciferin-Biolumineszenz-erzeugenden Systems, eingeschlossen eine Gaussia-, Pleuromamma- oder Renilla mulleri-Luciferase und/oder ein Ptilosarcus- oder Renilla mulleri-GFP, werden beschrieben. Der Chip enthält vor allem einen integrierten Photodetektor, der die Photonen nachweist, die von dem Biolumineszenz-erzeugenden System und/oder dem GFP emittiert werden.

[0434] In einem Fall wird der Chip unter Verwendung eines integrierten Schaltkreises mit einem Array, wie einem X-Y-Array, und von Photodektoren erzeugt, wie demjenigen, der in der gleichzeitig anhängigen U.S.-Anmeldung mit der Seriennummer 08/990,103 beschrieben wird. Die Oberfläche des Schaltkreises ist so behandelt, dass sie unter den Bedingungen des diagnostischen Assays, für den der Chip vorgesehen ist, inert ist, und sie ist, wie z. B. durch eine Derivatisierung, für die Anbindung von Molekülen, wie Antikörpern, angepasst. Ein ausgewählter Antikörper oder ein Panel von Antikörpern, wie ein Antikörper, der spezifisch für ein spezielles bakterielles Antigen ist, wird auf der Oberfläche des Chips oberhalb eines jeden Photodetektors befestigt. Nach dem Inkontaktbringen des Chips mit einer Testprobe wird der Chip mit einem zweiten Antikörper in Kontakt gebracht, der mit dem GFP verknüpft ist, wie dem Renilla-GFP, um ein chimäres Antikörper-GFP-Fusionsprotein oder einen Antikörper, der mit einer Komponente eines Biolumineszenz-erzeugenden Systems verbunden ist, wie einer Pleuromamma-, Gaussia- oder R. mulleri-Luciferase, zu bilden. Der Antikörper ist spezifisch für das Antigen. Die übrigen Komponenten der Biolumineszenz-erzeugenden Reaktion werden zugegeben, und falls einer der Antikörper, der mit einer Komponente eines Biolumineszenz-erzeugenden Systems verbunden ist, auf dem Chip vorhanden ist, wird Licht erzeugt und durch den benachbarten Photodetektor nachgewiesen. Der Photodetektor ist betriebsbereit mit einem Computer verbunden, der mit Informationen für die Identifizierung der angebundenen Antikörper programmiert ist, der das Ereignis aufzeichnet und dadurch die Antigene, die in der Testprobe enthalten sind, identifiziert.

3. Verfahren für die Erzeugung chimärer Renilla- oder Ptilosarcus-GFP- Renilla mulleri-Luciferase-, Pleuromamma-Luciferase- und Gaussia-Luciferase-Fusionsproteine

[0435] Verfahren für die Erzeugung chimärer GFP- und Luciferase-Fusionsproteine werden beschrieben. Die Verfahren schließen das Verbinden einer DNA, die ein interessierendes Gen codiert, oder eines Teils davon, mit DNA, die ein GFP oder eine Luciferase codiert, die hier breitgestellt wird, im gleichen Translationsleserahmen ein. Das interessierende codierte Protein kann innerhalb des Rahmens mit dem Amino-Terminus oder dem Carboxy-Terminus des GFPs oder der Luciferase verbunden sein. Die DNA, die das chimäre Protein codiert, wird dann in einer funktionsfähigen Assoziierung mit einem Promotorelement eines geeigneten Expressionsvektors verbunden. Alternativ kann das Promotorelement direkt von dem interessierenden anvisierten

Gen erhalten werden, und das promotorhaltige Fragment wird stromaufwärts der GFP- oder Luciferase-codierenden Sequenz verknüpft, um die chimären GFP-Proteine zu erzeugen.

[0436] Es wird beispielsweise eine chimäre Fusion bereitgestellt, die die DNA enthält die die Gaussia-Luciferase codiert, die mit dem N-terminalen Bereich einer Cellulose-Bindungsdomäne verbunden ist (siehe SEQ ID NO: 21 und 22).

4. Assays auf Zellbasis für die Identifizierung von Verbindungen

[0437] Verfahren für die Identifizierung von Verbindungen unter Verwendung von rekombinanten Zellen, die eine heterologe DNA, die ein Renilla mulleri- oder Ptilosarcus-GFP codiert, unter der Kontrolle eines Promotorelements eines interessierenden Gens exprimieren, werden beschrieben. Die rekombinanten Zellen können verwendet werden, um Verbindungen oder Liganden zu identifizieren, die das Transkriptionsniveau eines interessierenden Promotors modulieren, indem die GFP-vermittelte Fluoreszenz gemessen wird. Rekombinante Zellen, die chimäre GFPs modulieren, können ebenfalls verwendet werden, um die Genexpression oder den Proteintransport zu überwachen oder um die zelluläre Lokalisierung des Zielproteins zu ermitteln, indem örtlich begrenzte Regionen mit GFP-vermittelter Fluoreszenz innerhalb der rekombinanten Zelle identifiziert werden.

L. KITS

[0438] Es können Kits hergestellt werden, die die Gaussia-, Pleuromamma- oder Renilla mulleri-Luciferase oder das Renilla- oder das Ptilosarcus-GFP enthalten, die in diagnostischen Verfahren und Immunassayverfahren und mit Novitäten, eingeschlossen diejenigen, die hier beschrieben werden, verwendet werden.

[0439] In einem Fall enthalten die Kits die passenden Reagenzien und einen Herstellungsgegenstand für die Erzeugung der Biolumineszenz in Kombination mit einem Gegenstand. Diese Kits, können beispielsweise mit einem Blasen ausblasenden oder erzeugenden Spielzeug oder mit einer Spritzpistole verwendet werden. Diese Kits können auch eine nachladende oder aufladende Kartusche einschließen.

[0440] In einem anderen Fall werden die Kits für den Nachweis und das Sichtbarmachen eines neoplastischen Gewebes und anderer Gewebe verwendet und schließen eine erste Zusammensetzung, die die Luciferase und/oder das Renilla mulleri- oder Ptilosarcus-GFP und mindestens eine Komponente eines Biolumineszenz-erzeugenden Systems enthält, und eine zweite Zusammensetzung ein, die die aktivierende Zusammensetzung enthält, die die übrigen Komponenten des Biolumineszenz-erzeugenden Systems und alle erforderlichen aktivierenden Stoffe enthält.

[0441] In anderen Fällen werden die Kits für den Nachweis und die Identifizierung von Krankheiten, vor allem infektiöser Krankheiten, verwendet unter Verwendung von Multivertiefungen-Assayvorrichtungen und schließen ein: eine Multivertiefungen-Assayvorrichtung, die eine Vielzahl von Vertiefungen aufweist, von denen jede einen integrierten Photodetektor aufweist, an denen ein Antikörper oder ein Panel von Antikörpern, die für ein oder mehrere infektiöse Stoffe spezifisch sind, befestigt sind, und eine Zusammensetzung, die einen zweiten Antikörper enthält, wie einen Antikörper, der spezifisch für den infektiösen Stoff ist, der beispielsweise an ein Renilla mulleri-GFP-Protein, ein chimäres Antikörper-Renilla mulleri-GFP-Fusionsprotein, ein F(Ab)₂-Antikörperfragment-Renilla mulleri-GFP-Fusionsprotein oder an solche Konjugate gebunden ist, die beispielsweise die Gaussia- oder Renilla mulleri-Luciferase enthalten, und eine zweite Zusammensetzung, die die übrigen Komponenten eines Biolumineszenz-erzeugenden Systems enthält, wie eines Systems, das eine Lichtwellenlänge innerhalb des Anregungsbereichs des GFPs emittiert, wie von den Arten von Renilla oder Aequorea, für die Anregung der Renilla mulleri-Luciferase, die grünes Licht erzeugt, das durch den Photodetektor der Vorrichtung nachgewiesen wird, wodurch auf das Vorhandensein des Stoffes hingewiesen wird.

[0442] In weiteren Fällen enthalten die Kits die Komponenten der diagnostischen Systeme. Die Kits umfassen Zusammensetzungen, die die Konjugate, vorzugsweise mit Renilla- oder Ptilosarcus-GFP oder Gaussia- oder Pleuromamma- oder Renilla mulleri-Luciferase und die übrigen Komponenten des Biolumineszenz-erzeugenden Systems enthalten. Die erste Zusammensetzung in dem Kit enthält typischerweise das Ansteuerungsmittel konjugiert an ein GFP oder eine Luciferase. Die zweite Zusammensetzung enthält mindestens das Luciferin (Substrat) und/oder die Luciferase. Beide Zusammensetzungen sind für die systemische, lokale oder topische Anwendung bei einem Säugetier formuliert. In alternativen Fällen enthält die erste Zusammensetzung das Luciferin, verbunden mit einem Ansteuerungsmittel, und die zweite Zusammensetzung enthält die Luciferase oder die Luciferase und ein GFP.

[0443] Im Allgemeinen ist die Verpackung nicht reaktiv mit den darin enthaltenen Zusammensetzungen, und wo erforderlich sollten sie Wasser und/oder Luft in dem Maß ausschließen, in dem diese Substanzen für den Ablauf der Lumineszenzreaktion erforderlich sind.

[0444] Diagnostische Anwendungen können spezielle Verpackungen erforderlich machen. Die Biolumineszenz-erzeugenden Reagenzien können in Pellets, eingekapselt als Mikro- oder Makrokapseln, verbunden mit Matrices, vorzugsweise biokompatiblen Matrices, noch bevorzugter biologisch abbaubaren Matrices, und eingeschlossen in oder auf Herstellungsgegenständen oder als Gemische in Kammern innerhalb eines Herstellungsgegenstands oder in einer anderen Konfiguration bereitgestellt werden. Die Zusammensetzung, die das Luciferase-Konjugat enthält, wird beispielsweise getrennt von und zur Verwendung mit einer getrennten Zusammensetzung bereitgestellt, die ein Biolumineszenz-Substrat und einen Biolumineszenz-Aktivator enthält.

[0445] Ähnlich kann das Renilla- oder Ptilosarcus-GFP, die Pleuromamma-, Renilla mulleri- oder Gaussia-Luciferase oder das Luciferin in einer Zusammensetzung, die ein Gemisch, eine Suspension, eine Lösung, ein Pulver, eine Paste oder eine andere geeignete Zusammensetzung ist, getrennt von oder in Kombination mit den übrigen Komponenten, jedoch in Abwesenheit einer aktivierenden Komponente, bereitgestellt werden. Beim Inkontaktbringen des Konjugats, das auf ein ausgewähltes Gewebe ausgerichtet (targeted) worden ist, mit dieser Zusammensetzung setzt die Reaktion ein, und das Gewebe leuchtet. Das Gewebe leuchtet vorzugsweise grün unter Emission von Licht nahe 510 nm. Die Luciferase, das GFP und das Biolumineszenz-Substrat werden beispielsweise so verpackt, dass Wasser und/oder Luft, der Biolumineszenz-Aktivator, ausgeschlossen ist. Bei der Verabreichung und Freisetzung an der anvisierten Stelle aktiviert die Reaktion mit Salzen oder anderen Komponenten an der Stelle, eingeschlossen die Luft im Fall von chirurgischen Eingriffen, die Komponenten.

1. Ausgabe- und Verpackungsvorrichtung für die Kombination mit dem GFP und den Komponenten des Biolumineszenz-Systems

[0446] Die Biolumineszenz-Systeme, die hier detailliert beschrieben werden, schließen mindestens drei Komponenten ein: ein Biolumineszenz-Substrat (z. B. ein Luciferin), eine Luciferase (z. B. eine Luciferase oder ein Photoprotein), vorzugsweise Gaussia-, Pleuromamma- oder Renilla mulleri-Luciferase, und einen oder mehrere Biolumineszenz-Aktivatoren (z. B. molekularen Sauerstoff oder Ca^{2+}), und optional ein Renilla- oder Ptilosarcus-GFP. Die Ausgabe- und Verpackungsvorrichtungen sind so gestaltet, dass mindestens eine der Komponenten von den übrigen Komponenten getrennt bleibt, bis die Erzeugung der Biolumineszenz erwünscht ist. Detaillierte Beschreibungen derartiger Vorrichtungen finden sich in den gleichzeitig anhängigen U.S.-Anmeldungen mit den Seriennummern 08/757,046 und 08/597,274 des gleichen Inhabers.

2. Kapseln, Pellets, Liposomen, Endosomen, Vakuolen, mikronisierte Partikel

[0447] In bestimmten Ausführungsformen kann das Maskieren der Komponenten von einer der Zusammensetzungen gegenüber der Umgebung vor der Verwendung oder das Vorsehen der Komponenten in Partikelform, wie in Form von Mikropartikeln, erforderlich sein. Beispiele für geeignete Mittel für eine derartige Verwendung schließen das Verkapseln von Komponenten des Biolumineszenz-erzeugenden Systems in einem oder mehreren Mikropartikeln (Größe bis zu etwa 100 μm) oder Makropartikeln (größer als 100 μm) eines Materials ein, das die Freisetzung des Inhalts erlaubt, z. B. durch Diffusion oder durch das Auflösen des verkapselnden Materials. Mikropartikel, an die eine Vielzahl von Konjugaten gebunden werden können, gehören zu den bevorzugten Ausführungsformen. Die Mikropartikel sind biokompatibel und haben vorzugsweise eine solche Größe, dass sie durch Kapillarwände hindurchtreten können.

[0448] Liposomen und andere verkapselnde Vehikel (siehe z. B. U.S.-Patent Nr. 4,525,306, in dem die Verkapselung von Verbindungen in Gelatine beschrieben wird; die U.S.-Patente Nr. 4,021,364, 4,225,581, 4,269,821, 4,322,311, 4,324,683, 4,329,332, 4,525,306, 4,963,368 beschreiben die Verkapselung von biologisch aktiven Materialien in verschiedenen Polymeren) sind dem Fachmann bekannt, eingeschlossen diejenigen, die hier diskutiert werden und die dem Fachmann bekannt sind (wie lösliches Papier, siehe U.S.-Patent Nr. 3,859,125).

a. Verkapselungsvehikel im Allgemeinen

[0449] Die Komponenten des Biolumineszenz-erzeugenden Systems können mit Ausnahme des Sauerstoffs oder des Wassers oder von Ca^{2+} in Abhängigkeit vom ausgewählten System in ein verkapselndes Material, wie Liposomen, eingebracht werden, die den Inhalt von der Umgebung schützen, bis er in Bedingungen gebracht

wird, die die Freisetzung des Inhalts in die Umgebung verursachen. Verkapselungsmaterialien, die hier für eine Verwendung ins Auge gefasst werden, schließen Liposomen und andere derartige Materialien ein, die für die Verkapselung von Chemikalien verwendet werden, wie Vehikel für die Zufuhr von Arzneimitteln, ein.

b. Verkapselungsvehikel – Liposomen

[0450] Liposomen, die sich auflösen und die Komponenten langsam in das Medium, wie das Blut, freisetzen, das gelösten Sauerstoff oder Ca^{2+} oder sogar ATP für das Luciferase-System enthält, werden hier beispielsweise ins Auge gefasst. Sie können in Zusammensetzungen, wie Lösungen, Suspensionen, Gels, Lotionen, Cremes und Salben, für topische Anwendungen, wie Verfahren für die Diagnose oder das Sichtbarmachen von Melanomen, formuliert werden. Liposomen und andere Verkapselungszusammensetzungen für die langsame Freisetzung sind wohlbekannt und können an die Verwendung für die Zufuhr unter langsamer Freisetzung der Biolumineszenz-erzeugenden Komponenten angepasst werden. Typischerweise werden das GFP, das Luciferin und/oder die Luciferase in Abwesenheit von Sauerstoff oder Ca^{2+} oder ATP oder anderer aktivierender Komponenten verkapselt. Bei der Freisetzung in die Umgebung oder das Medium, das diese Komponente in einer geeigneten Konzentration enthält, findet die Reaktion statt und wird ein Leuchten erzeugt. Ganz allgemein sollten die Konzentrationen der verkapselten Komponenten relativ hoch sein, etwa 0,1 bis 1 mg/ml oder darüber, um für eine Sichtbarkeit ausreichend hohe lokale Konzentrationen bei der Freisetzung zu gewährleisten.

[0451] Liposomen oder ein anderes Zufuhrsystem für die anhaltende Freisetzung, die in einer Salbe oder einem topischen Vehikel für die anhaltende Freisetzung formuliert sind, wären zum Beispiel für die Verwendung in einer Körperfarbe, einer Lotion geeignet. Diejenigen, die als eine Suspension formuliert werden, wären als Spray brauchbar. Zahlreiche Salben und geeignete Liposomenformulierungen sind bekannt (siehe z. B. Liposome Technology, Targeted Drug Delivery and Biological Interaction, Bd. III, G. Gregoriadis Hrsg., CRC Press, Inc., 1984; U.S.-Patente Nr. 5,470,881; 5,366,881; 5,296,231; 5,272,079; 5,225,212; 5,190,762; 5,188,837; 5,188,837; 4,921,757; 4,522,811). Ein geeignetes Salbenvehikel würde beispielsweise Petrolatum, ein Mineralöl und/oder wasserfreies flüssiges Lanolin enthalten. Vehikel für die anhaltende Freisetzung, wie Liposomen, Membran- oder Kontaktlinzenuzufuhrsysteme oder gelbildende Kunststoffpolymere, wären ebenfalls geeignete Zufuhrvehikel. Liposomen für die topische Zufuhr sind wohlbekannt (siehe z. B. U.S.-Patent Nr. 5,296,231; Mezei et al. (1980) "Liposomes – A selective drug delivery system for the topical route of administration, I. lotion dosage forms" *Life Sciences* 26: 1473–1477; Mezei et al. (1981) "Liposomes – A selective drug delivery system for the topical route of administration: gel dosage form" *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 34: 473–474; Gesztes et al. (1988) "Topical anaesthesia of the skin by liposome – encapsulated tetracaine" *Anesthesia and Analgesia* 67: 1079–1081; Patel (1985) "Liposomes as a controlled-release system", *Biochemical Soc. Trans.* 13: 513–516; Wohlrab et al. (1987) "Penetration kinetics of liposomal hydrocortisone in human skin" *Dermatologica* 174: 18–22).

[0452] Liposomen sind Mikrokapseln (Durchmesser typischerweise in der Größenordnung von weniger als 0,1 bis 20 μm), die ausgewählte Gemische enthalten und ihren Inhalt langsam in einer anhaltenden Weise freisetzen. Ausgerichtete Liposomen oder andere Kapseln, vor allem mit einem Überzug für die verlängerte Freisetzung, die sich auflösen, wenn sie Sauerstoff, Luft, Feuchtigkeit, sichtbarem Licht oder Ultraviolettlicht (UV) oder einem bestimmten pH-Wert oder einer bestimmten Temperatur ausgesetzt werden, können verwendet werden (siehe z. B. U.S.-Patent Nr. 4,882,165; Kusumi et al. (1989) *Chem. Lett.* Nr. 3 433–436; Koch Troels et al. (1990) *Bioconjugate Chem.* 4: 296–304; U.S.-Patent Nr. 5,482,719; U.S.-Patent Nr. 5,411,730; U.S.-Patent Nr. 4,891,043; Straubinger et al. (1983) *Cell* 32: 1069–1079; und Straubinger et al. (1985) *FEBS Lett.* 179: 148–154; und Duzgunes et al. in Kapitel 11 des Buches *CELL FUSION*; Hrsg. A. E. Sowers; Ellens et al. (1984) *Biochemistry* 23: 1532–1538; Yatvin et al. (1987) *Methods in Enzymology* 149: 77–87). Liposomenformulierungen zur Verwendung beim Backen stehen zur Verfügung (siehe z. B. U.S.-Patent Nr. 4,999,208). Sie setzen ihren Inhalt frei, wenn sie gegessen oder erhitzt werden. Derartige Liposomen können für die intravenöse oder lokale Verabreichung geeignet sein.

[0453] Liposomen werden durch Verfahren hergestellt, die dem Fachmann bekannt sind (siehe z. B. Kimm et al. (1983) *Bioch. Bioph. Acta* 728: 339–398; Assil et al. (1987) *Arch Ophthalmol.* 105: 400; und U.S.-Patent Nr. 4,522,811, und andere Literaturangaben darin und sind dem Fachmann bekannt).

[0454] Liposomen, die gegenüber einem niedrigen pH-Wert empfindlich sind (siehe z. B. U.S.-Patente Nr. 5,352,448, 5,296,231; 5,283,122; 5,277,913, 4,789,633) sind besonders gut geeignet für die Verwendung mit alkalischen Mitteln. Beim Kontakt mit der Tensid- oder Seifenzusammensetzung mit dem niedrigerem pH-Wert oder einer Zusammensetzung mit einem hohen pH-Wert wird der Inhalt der Liposomen freigesetzt. Andere Komponenten, vor allem Ca^{2+} , oder das Vorhandensein von gelöstem O_2 in dem Wasser führt dazu, dass die

Komponenten leuchten, wenn sie freigesetzt werden. Temperaturempfindliche Liposomen sind ebenfalls für die Verwendung in Badepulvern für die Freisetzung in das warme Badewasser geeignet.

c. Verkapselungsvehikel – Gelatine und polymere Vehikel

[0455] Makro- oder Mikrokapseln, die aus Gelatine oder einem anderen derartigen Polymer bestehen, die sich auflösen oder ihren Inhalt beim Kontakt mit der Luft oder Licht oder Temperaturänderungen freisetzen, können ebenfalls verwendet werden, um Komponenten der Biolumineszenz-erzeugenden Systeme zu verkapseln.

[0456] Derartige Mikrokapseln oder Makrokapseln können auch an ein Ansteuerungsmittel, z. B. einen Antikörper, konjugiert werden, so dass das GFP oder die Luciferase und die Biolumineszenz-erzeugenden Komponenten durch den Antikörper dem Ziel zugeführt werden, wo die Komponenten unter Erzeugung eines Leuchtens freigesetzt werden.

[0457] Das Aequorin-System ist für diese Anwendung besonders gut geeignet. Es kann in Suspension oder Lösung oder als eine Paste, oder in einer anderen geeigneten Form, in einem Puffer mit ausreichend Chelatbildner, wie EDTA, verkapselt werden, um das Einsetzen der Biolumineszenz zu verhindern. Wenn die Kapsel (Mikrokapsel oder Makrokapsel) Feuchtigkeit ausgesetzt wird, die Ca^{2+} enthält, wie in einem Puffer oder im Blut, fangen die freigesetzten Komponenten an zu leuchten.

[0458] Die verkapselten Biolumineszenz-erzeugenden Komponenten können demnach in Kombination mit einer Vielzahl von Ansteuerungsmitteln verwendet werden und dadurch die Luciferase/das Luciferin, wie das Renilla mulleri-, Pleuromamma-, Ptilosarcus- oder Gaussia-System, freisetzen, das leuchtet, wenn es der Luft ausgesetzt wird.

[0459] Andere Verkapselungsbehälter oder -vehikel zur Verwendung mit den Biolumineszenz-Systemen sind diejenigen, die sich in Wasser genügend auflösen und dadurch ihren Inhalt freisetzen, oder diejenigen, die sich leicht öffnen, wenn sie in der Hand zusammengedrückt werden, oder aus denen der Inhalt diffundiert, wenn sie mit einem wässrigen Gemisch vermischt werden. Diese Behälter können so hergestellt werden, dass Wasser ausgeschlossen ist, so dass die Komponenten des Biolumineszenz-Systems getrocknet und darin eingebracht werden können. Wenn das Vehikel Wasser ausgesetzt wird, wie in einer wässrigen Zusammensetzungslösung oder in der Atmosphäre, löst es sich auf oder setzt den Inhalt auf andere Weise frei, und die Komponenten reagieren und leuchten. Ähnlich können etwas weniger als alle Komponenten des Biolumineszenz-Systems in Pelletform hergestellt werden. Es können beispielsweise eine oder mehrere Komponenten mit Gelatine oder ähnlichen Härtungsmitteln vermischt werden, falls erforderlich in eine Form gegossen werden und zu einem harten, wasserlöslichen Pellet getrocknet werden. Die Verkapselungsbehälter oder -vehikel können aus Gelatine oder einem ähnlichen wasserlöslichen Material, das biokompatibel ist, hergestellt werden.

d. Endosome und Vakuolen

[0460] Vehikel können unter Verwendung von Endosomen oder Vakuolen von rekombinanten Wirtszellen hergestellt werden, in denen die Renilla-GFPs oder Ptilosarcus-GFPs oder die Renilla mulleri-, Pleuromamma- oder Gaussia-Luciferase unter Verwendung von Verfahren, die dem Fachmann bekannt sind, exprimiert werden (siehe z. B. U.S.-Patente Nr. 5,284,646, 5,342,607, 5,352,432, 5,484,598, 5,192,679, 5,206,161 und 5,360,726). Beispielsweise kann Aequorin, das durch die Expression in einem Wirt, wie E. coli, erzeugt wird, nach der Proteinsynthese innerhalb von Vesikeln, wie Endosomen oder Vakuolen, isoliert werden. Unter Verwendung von Routineverfahren werden die Zellen lysiert, und die Vesikeln werden mit intaktem Inhalt freigesetzt. Die Vesikeln dienen als Zufuhrvehikel. Wenn sie verwendet werden, werden sie mit einem Luciferin, wie einem Coelenterazin, und gelöstem Sauerstoff, wie durch Diffusion unter Druck oder auf andere geeignete Weise, beladen.

e. Mikronisierte Partikel

[0461] Die Komponenten des Biolumineszenz-erzeugenden Systems, die für eine Lyophilisierung geeignet sind, wie das Aequorin-Photoprotein, das Renilla-System, die Ptilosarcus-, Pleuromamma- und die Gaussia-Systeme, können unter Erzeugung eines feinen Pulvers mikronisiert werden und unter Trocknungsbedingungen, wie mit einem Trockenmittel, gelagert werden. Der Kontakt mit gelöstem Sauerstoff oder Ca^{2+} an der Luft oder in einem Nebel, die zugeführt werden können, oder in einer zugegebenen Lösung führen dazu, dass sich die Partikel auflösen und leuchten.

3. Immobilisierte Systeme

a. Matrixmaterialien

[0462] In einigen Ausführungsformen ist es wünschenswert, mindestens die GFPs oder eine Komponente des Biolumineszenz-erzeugenden Systems gebunden an einen Matrixträger bereitzustellen, der dann lokal oder systemisch verabreicht werden kann. Der Matrixträger ist biokompatibel. Wenn erwünscht wird ein Gemisch oder werden Gemische, das/die die übrigen Komponenten enthält/enthalten, typischerweise ein flüssiges Gemisch, durch Gießen oder Versprühen auf den Matrixträger aufgebracht, wodurch das Leuchten erzeugt wird. Das Aequorin-Photoprotein, eingeschlossen Coelenterazin und Sauerstoff, wird beispielsweise an den Träger gebunden. Wenn erwünscht wird eine Flüssigkeit wie Leitungswasser, die Ca^{2+} enthält, oder vorzugsweise ein flüssiges Gemisch, das das Ca^{2+} in einem geeigneten Puffer enthält, beispielsweise durch Sprühen mit der Matrix mit der angebondenen Luciferase in Kontakt gebracht. Beim Inkontaktbringen in Gegenwart eines GFPs leuchtet das Material grün.

[0463] In anderen Ausführungsformen wird das Renilla-GFP, die Renilla mulleri- oder Gaussia-, Pleuromamma-Luciferase oder eine andere Luciferase, wie eine Vargula-Luciferase, mit dem Trägermaterial verbunden und mit einem flüssigen Gemisch in Kontakt gebracht, das das Luciferin in einem geeigneten Puffer enthält. Das Inkontaktbringen kann durch Besprühen oder Gießen oder einem sonstigen geeigneten Weg erfolgen. Das Matrixmaterial wird in einen Herstellungsgegenstand eingebracht, auf diesen Gegenstand aufgebracht oder zu diesem Gegenstand geformt, wie einem chirurgischen Schwamm oder als Teil einer Mikrokugel.

[0464] Es ist offensichtlich, dass die exakten Komponenten und optimalen Mittel für die Anwendung oder die Lagerung vom ausgewählten Biolumineszenz-System abhängen. Die Konzentrationen der Komponenten, die empirisch ermittelt werden können, sind nicht kritisch, müssen aber so hoch sein, dass ein sichtbares Leuchten erzeugt wird, wenn sie kombiniert werden. Typische Konzentrationen können bis herunter in den Nanomol/Liter-Bereich reichen und liegen vorzugsweise im Milligramm/Liter-Bereich oder darüber. Die Konzentration auf dem Träger ist diejenige, die erzeugt wird, wenn eine Zusammensetzung, die eine derartige typische Konzentration enthält, auf das Material aufgebracht wird. Es wird nochmals darauf hingewiesen, dass derartige ideale Konzentrationen einfach empirisch ermittelt werden können, indem die erste Zusammensetzung angewendet wird, man sie trocknen lässt und dann die zweite Zusammensetzung aufgesprüht und das Ergebnis beobachtet wird.

[0465] Die Matrixmaterialträger, die hier in Betracht gezogen werden, sind im Allgemeinen unlösliche Materialien, die verwendet werden, um Liganden und andere Moleküle zu immobilisieren, und es sind diejenigen Materialien, die in vielen chemischen Synthesen und Trennungen verwendet werden. Derartige Matrizes werden vorzugsweise aus biokompatiblen, noch bevorzugter aus biologisch abbaubaren Materialien hergestellt. Derartige Träger, die auch als Matrizes bezeichnet werden, werden beispielsweise bei der Affinitätschromatographie, der Immobilisierung biologisch aktiver Materialien und im Laufe von chemischen Synthesen von Biomolekülen eingeschlossen Proteine und Aminosäuren, und von anderen organischen Molekülen und Polymeren verwendet. Die Herstellung und die Verwendung der Matrizen sind dem Fachmann wohlbekannt; es sind viele derartige Materialien und Verfahren für ihre Herstellung bekannt. Beispielsweise können natürlich vorkommende Matrixmaterialien, wie Agarose und Cellulose, aus ihren jeweiligen Quellen isoliert werden und gemäß den bekannten Protokollen aufbereitet werden. Andere verwendbare Matrizes können Proteine, zum Beispiel Trägermoleküle, wie Albumin, umfassen.

[0466] Die Trägermatrizes sind typischerweise unlösliche Materialien, die fest, porös, verformbar oder hart sind und die eine beliebige erforderliche Struktur und Geometrie haben, die nicht einschränkend einschließen: Kügelchen, Pellets, Scheiben, Kapillare, Hohlfasern, Nadeln, feste Fasern, Zufallsformen, dünne Filme und Membranen. Der Gegenstand kann demnach aus dem Matrixmaterial hergestellt oder damit kombiniert werden, zum Beispiel durch das Beschichten der gesamten Oberfläche oder eines Teiles davon oder durch das Imprägnieren der Partikel.

[0467] Wenn die Matrix partikelförmig ist, haben die Partikel typischerweise eine Größe von 10–2000 μm , sie können aber je nach der ausgewählten Anwendung kleiner oder größer sein. Die Auswahl der Matrizes wird mindestens teilweise durch ihre physikalischen und chemischen Eigenschaften, wie Löslichkeit, funktionelle Gruppen, mechanische Stabilität, Oberfläche, Neigung zum Quellen, hydrophobe oder hydrophile Eigenschaften, und die beabsichtigte Verwendung beeinflusst. Für die Verwendung in der vorliegenden Erfindung sind die Matrizes vorzugsweise biokompatible, noch bevorzugter biologisch abbaubare Matrizes.

[0468] Falls erforderlich kann das Trägermatrixmaterial so behandelt werden, dass es einen geeigneten reaktiven Rest enthält, oder in einigen Fällen kann es im Handel erworben werden und den reaktiven Rest bereits enthalten und kann so als der Matrixträger dienen, auf dem die Moleküle angebunden werden. Materialien, die reaktive Oberflächenreste aufweisen, wie Amino-Silan-Bindungen, Hydroxybindungen oder Carboxysilan-Bindungen, können durch gut eingeführte Techniken der Oberflächenchemie, an denen Silanisierungsreaktionen oder dergleichen beteiligt sind, hergestellt werden. Beispiele für diese Materialien sind diejenigen, die Oberflächensiliciumoxidreste aufweisen, die kovalent mit γ -Aminopropylsilan und anderen organischen Resten; N-[3-(Triethyloxysilyl)propyl]phthalamidsäure; und Bis-(2-hydroxyethyl)aminopropyltriethoxysilan, verbunden sind. Beispielhaft für einfach verfügbare Materialien, die reaktive Aminogruppen enthalten, schließen nicht einschränkend p-Aminophenyltriethoxysilan ein. Derivatisierte Polystyrole und andere derartige Polymere sind ebenfalls wohlbekannt und dem Fachmann einfach verfügbar (z. B. sind die Tentagel[®]-Harze mit einer Vielzahl funktioneller Gruppen erhältlich und von Rapp Polymere, Tübingen, Deutschland, im Handel erhältlich; siehe U.S.-Patent Nr. 4,908,405 und U.S.-Patent Nr. 5,292,814; siehe auch Butz et al. (1994) *Peptide Res.* 7: 20–23; Kleine et al. (1994) *Immunobiol.* 190: 53–66).

[0469] Diese Matrixmaterialien schließen alle Materialien ein, die als Trägermatrix für die Befestigung der interessierenden Moleküle wirken können. Derartige Materialien sind dem Fachmann bekannt und schließen die Materialien ein, die als Trägermatrix verwendet werden. Diese Materialien schließen nicht einschränkend anorganische, natürliche Polymere und synthetische Polymere ein, die nicht einschränkend einschließen: Cellulose, Cellulosederivate, Acrylharze, Glas, Kieselsäuregele, Polystyrol, Gelatine, Polyvinylpyrrolidon, Copolymere von Vinyl- und Acrylamid, Polystyrol vernetzt mit Divinylbenzol oder dergleichen (siehe Merrifield (1964) *Biochemistry* 3: 1385–1390), Polyacrylamide, Latexgele, Polystyrol, Dextran, Polyacrylamide, Kautschuk, Silicon, Kunststoffe, Nitrocellulose, Cellulosen, natürliche Schwämme. Von besonderem Interesse sind hier hoch poröse Gläser (siehe z. B. U.S.-Patent Nr. 4,244,721) und andere Materialien, die durch das Vermischen eines Borsilikats, von Alkohol und Wasser hergestellt werden.

[0470] Synthetische Matrizes schließen nicht einschränkend ein: Acrylamide, Dextran-Derivate und Dextran-Copolymere, Agarose-Polyacrylamid-Mischungen, andere Polymere und Copolymere mit verschiedenen funktionellen Gruppen, Methacrylatderivate und -Copolymere, Polystyrol und Polystyrol-Copolymere, (siehe z. B. Merrifield (1964) *Biochemistry* 3: 1385–1390; Berg et al. (1990) in *Innovation Perspect. Solid Phase Synth. Collect. Pap.*, 1. Int. Symp., Epton Roger (Hrsg.) S. 453–459; Berg et al. (1989) in *Pept.*, 20. Proc. Eur. Pept. Symp., Jung, G. et al. (Hrsg.) S. 196–198; Berg et al. (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111: 8024–8026; Kent et al. (1979) *Isr. J. Chem.* 17: 243–247; Kent et al. (1978) *J. Org. Chem.* 43: 2845–2852; Mitchell et al. (1976) *Tetrahedron Lett.* 42: 3795–3798; U.S.-Patent Nr. 4,507,230; U.S.-Patent Nr. 4,006,117; und U.S.-Patent Nr. 5,389,449). Verfahren zur Herstellung derartiger Matrizes sind dem Fachmann wohlbekannt.

[0471] Synthetische Matrizes schließen diejenigen ein, die aus Polymeren und Copolymeren erzeugt werden, wie Polyvinylalkoholen, Acrylaten und Acrylsäuren, wie Polyethylen-co-acrylsäure, Polyethylen-co-methacrylsäure, Polyethylen-co-ethylacrylat, Polyethylen-co-methacrylat, Polypropylen-co-acrylsäure, Polypropylen-co-methacrylsäure, Polypropylen-co-ethylacrylat, Polypropylen-co-methylacrylat, Polyethylen-co-vinylacetat, Polypropylen-co-vinylacetat und diejenigen, die Säureanhydridgruppen enthalten, wie Polyethylen-co-maleinsäureanhydrid, Polypropylen-co-maleinsäureanhydrid und dergleichen. Liposomen sind ebenfalls als feste Träger für Affinitätsreinigungen verwendet worden (Powell et al. (1989) *Biotechnol. Bioeng.* 33: 173).

[0472] In dem U.S.-Patent Nr. 5,403,750 wird beispielsweise die Herstellung von Polymeren auf Polyurethanbasis beschrieben. In dem U.S.-Patent Nr. 4,241,537 wird ein Pflanzenwachstumsmedium beschrieben, das eine hydrophile Polyurethangelzusammensetzung enthält, die aus kettenverlängerten Polyolen hergestellt wird; die Random-Copolymerisation ist bevorzugt mit bis zu 50% Propylenoxideinheiten, damit das Prepolymer bei Raumtemperatur flüssig ist. In dem U.S.-Patent Nr. 3,939,123 werden schwach vernetzte Polyurethanpolymere von Prepolymeren mit endständigem Isocyanat beschrieben, die Poly(ethylenoxy)glycol mit bis zu 35% Polypropylenoxy)glycol oder Po1y(butylenoxy)glycol enthalten. Bei der Herstellung dieser Polymere wird ein organisches Polyamin als ein Vernetzungsmittel verwendet. Andere Matrizes und deren Herstellung werden in den U.S.-Patenten Nr. 4,177,038, 4,175,183, 4,439,585, 4,485,227, 4,569,981, 5,092,992, 5,334,640, 5,328,603 beschrieben.

[0473] In dem U.S.-Patent Nr. 4,162,355 wird ein Polymer beschrieben, das für die Verwendung bei der Affinitätschromatographie geeignet ist, das ein Polymer aus einem Aminimid und einer Vinylverbindung ist, das mindestens eine seitenständige Halogenmethylgruppe aufweist. Ein Aminligand, der Stellen für die Bindung in der Affinitätschromatographie liefert, ist durch die Umsetzung mit einem Teil der seitenständigen Halogenmethylgruppen an das Polymer gekoppelt, und die restlichen seitenständigen Halogenmethylgruppen werden mit

einem Amin umgesetzt, das eine seitenständige hydrophile Gruppe enthält. Ein Verfahren zur Beschichtung eines Trägers mit diesem Polymer wird ebenfalls beschrieben. Ein beispielhaftes Aminimid ist das 1,1-Dimethyl-1-(2-hydroxyoctyl)amidmetharylimid, und eine Vinylverbindung ist ein Chlormethylstyrol.

[0474] In dem U.S.-Patent Nr. 4,171,412 werden spezielle Matrizes beschrieben, die Matrizes auf der Basis hydrophiler polymerer Gele sind, vorzugsweise mit einem makroporösen Charakter, die kovalent angebundene D-Aminosäuren oder Peptide tragen, die D-Aminosäureeinheiten enthalten. Der Grundträger wird durch die Copolymerisation von Hydroxyalkylestern oder Hydroxyalkylamiden von Acryl- und Methacrylsäure mit vernetzenden Acrylat- oder Methacrylatcomonomeren hergestellt, die durch die Umsetzung mit Diaminen, Aminosäuren oder Dicarbonsäuren modifiziert werden, und die resultierenden carboxyterminalen oder aminoterminalen Gruppen werden mit D-Analoga von Aminosäuren oder Peptiden kondensiert. Die Peptide, die D-Aminosäuren enthalten, können auch schrittweise auf der Oberfläche des Trägers synthetisiert werden.

[0475] In dem U.S.-Patent Nr. 4,178,439 wird ein kationischer Ionenaustauscher und ein Verfahren für dessen Herstellung beschrieben. In dem U.S.-Patent Nr. 4,180,524 werden chemische Synthesen auf einem Kieselsäureträger beschrieben.

[0476] Immobilisierte künstliche Membranen (Immobilized Artificial Membranes = IAMs, siehe z. B. U.S.-Patente Nr. 4,931,498 und 4,927,879) können ebenfalls verwendet werden. IAMs imitieren Zellmembranumgebungen und können verwendet werden, um Moleküle zu binden, die vorzugsweise mit Zellmembranen assoziieren (siehe z. B. Pidgeon et al. (1990) *Enzyme Microb. Technol.* 12: 149).

[0477] Diese Materialien sind auch für die Herstellung von Herstellungsgegenständen, chirurgischen Schwämmen, Seifen und anderer Gegenstände verwendet worden und sind demnach für die Anbindung von Molekülen, entweder der Luciferase, des Luciferins oder von Gemischen davon, zugänglich. Matrixpartikel können beispielsweise in Gegenstände hinein imprägniert werden, die dann mit einem Aktivator in Kontakt gebracht werden.

[0478] Kits, die den Gegenstand, der das Matrixmaterial mit oder ohne die Beschichtung aus den GFPs oder den Biolumineszenz-erzeugenden Komponenten einschließt, und Zusammensetzungen enthalten, die die übrigen Komponenten enthalten, werden beschrieben.

b. Immobilisierung und Aktivierung

[0479] Es sind zahlreiche Verfahren für die Immobilisierung von Proteinen und anderer Biomoleküle auf unlöslichen oder flüssigen Trägern entwickelt worden (siehe z. B. Mosbach (1976) *Methods in Enzymology* 44; Weetall (1975) *Immobilized Enzymes, Antigens, Antibodies, and Peptides*; und Kennedy et al. (1983) *Solid Phase Biochemistry, Analytical and Synthetic Aspects*, Scouten, Hrsg. S. 253–391; siehe allgemein *Affinity Techniques, Enzyme Purification: Part B. Methods in Enzymology*, Bd. 34, Hrsg. W. B. Jakoby, M. Wilchek, Acad. Press, N.Y. (1974); *Immobilized Biochemicals and Affinity Chromatography, Advances in Experimental Medicine and Biology*, Bd. 42, Hrsg. R. Dunlap, Plenum Press, N.Y. (1974)).

[0480] Zu dem am häufigsten angewendeten Verfahren gehören die Absorption und die Adsorption oder die kovalente Anbindung auf dem Träger, entweder direkt oder über einen Linker, wie die zahlreichen Disulfidbindungen, Thioetherbindungen, gehinderten Disulfidbindungen, und kovalenten Bindungen zwischen freien reaktiven Gruppen, wie Amin- und Thiolgruppen, die dem Fachmann bekannt sind (siehe z. B. den PIERCE CATALOG, *ImmunoTechnology Catalog & Handbook*, 1992–1993, in dem die Herstellung und die Verwendung derartiger Reagenzien beschrieben wird und eine kommerzielle Quelle für derartige Reagenzien angegeben wird; und Wong (1993) *Chemistry of Protein Conjugation and Cross Linking*, CRC Press; siehe auch De-Witt et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 6909; Zuckermann et al. (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114: 10646; Kurth et al. (1994) *J. Am. Chem. Soc.* 116: 2661; Ellman et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 4708; Sucholeiki (1994) *Tetrahedron Lett.* 35: 7307; und Su-Sun Wang (1976) *J. Org. Chem.* 41: 3258; Padwa et al. (1971) *J. Org. Chem.* 41: 3550 und Vedejs et al. (1984) *J. Org. Chem.* 49: 575, worin photosensitive Linker beschrieben werden).

[0481] Für die Durchführung der Immobilisierung wird eine Lösung des Proteins oder eines anderen Biomoleküls mit einem Trägermaterial, wie Aluminiumoxid, Kohlenstoff, ein Ionenaustauscherharz, Cellulose, Glas oder ein Keramikmaterial, in Kontakt gebracht. Fluorkohlenstoffpolymere sind als Träger verwendet worden, an denen Biomoleküle durch Adsorption befestigt wurden (siehe U.S.-Patent Nr. 3,843,443; Veröffentlichte Internationale PCT-Anmeldung WO/86 03840). Für die Zwecke hier ist das Trägermaterial biokompatibel (d. h.

für die Verwendung im Körper geeignet).

[0482] Es ist eine große Vielzahl von Verfahren für die Befestigung biologischer Moleküle, eingeschlossen Proteine und Nucleinsäuren, auf festen Trägern bekannt (siehe z. B. U.S.-Patent Nr. 5451683). In dem U.S.-Patent Nr. 4,681,870 wird beispielsweise ein Verfahren für das Aufbringen freier Amino- oder Carboxygruppen auf eine Kieselsäurematrix beschrieben. Diese Gruppen können anschließend in Gegenwart eines Carbodiimids kovalent mit anderen Gruppen verbunden werden, wie einem Protein oder einem anderen Anti-Liganden. Alternativ kann eine Kieselsäurematrix durch die Behandlung mit einem Cyanogenhalogenid unter alkalischen Bedingungen aktiviert werden. Der Anti-Ligand wird beim Aufbringen auf die aktivierte Oberfläche kovalent auf der Oberfläche befestigt. Ein anderes Verfahren schließt die Veränderung einer Polymeroberfläche durch das aufeinanderfolgende Auftragen von mehreren Schichten von Biotin, Avidin und Verlängerern (Extender) ein (siehe z. B. U.S.-Patent Nr. 4,282,287); andere Verfahren schließen die Photoaktivierung ein, bei der eine Polypeptidkette durch das Einbringen einer lichtempfindlichen Gruppe aus einer nicht natürlichen Aminosäuregruppe in die Polypeptidkette und das Belichten des Produkts mit Ultraviolettlicht von geringer Energie auf einem festen Träger befestigt wird (siehe z. B. U.S.-Patent Nr. 4,762,881). Oligonucleotide sind ebenfalls befestigt worden unter Verwendung von photochemisch aktiven Reagenzien, wie einer Psoralen-Verbindung, und eines Kupplungsmittels, das das Photoreagens auf dem Träger befestigt (siehe z. B. U.S.-Patent Nr. 4,542,102 und U.S.-Patent Nr. 4,562,157). Die Photoaktivierung des Photoreagens bindet ein Nucleinsäuremolekül an den Träger unter Erhalt einer oberflächengebundenen Sonde.

[0483] Die kovalente Anbindung des Proteins oder eines anderen Biomoleküls oder organischen Moleküls oder biologischen Partikels an einen chemisch aktivierten festen Matrixträger, wie Glas, synthetische Polymere, und vernetzte Polysaccharide, ist eine häufiger verwendete Immobilisierungstechnik. Das Molekül oder das biologische Partikel kann direkt an den Matrixträger gebunden werden oder über einen Linker, wie ein Metall, angebunden werden (siehe z. B. U.S.-Patent Nr. 4,179,402; und Smith et al. (1992) *Methods: A Companion to Methods in Enz.* 4: 73–78). Ein Beispiel für dieses Verfahren ist die Cyanogenbromid-Aktivierung von Polysaccharid-Trägern, wie Agarose. Die Verwendung von Trägern auf Perfluorkohlenstoffpolymer-Basis für die Enzymimmobilisierung und die Affinitätschromatographie wird in dem U.S.-Patent Nr. 4,885,250 beschrieben. In diesem Verfahren wird das Biomolekül zunächst durch die Umsetzung mit einem Perfluoralkylierungsmittel, wie Perfluoroctylpropylisocyanat, das in dem U.S.-Patent Nr. 4,954,444 beschrieben wird, modifiziert. Anschließend wird das modifizierte Protein auf den Fluorkohlenstoffträger adsorbiert, wo es zur Immobilisierung kommt.

[0484] Die Aktivierung und die Verwendung der Matrices sind wohlbekannt und können unter Anwendung jedes beliebigen bekannten Verfahrens erfolgen (siehe z. B. Hermanson et al. (1992) *Immobilized Affinity Ligand Techniques*, Academic Press, Inc., San Diego). Die Kopplung der Aminosäuren kann beispielsweise durch Techniken erreicht werden, die dem Fachmann geläufig sind und die beispielsweise in Stewart and Young, 1984; *Solid Phase Synthesis*, 2. Auflage, Pierce Chemical Co., Rockford, zur Verfügung gestellt werden.

[0485] Andere geeignete Verfahren für die Anbindung von Molekülen auf festen Trägern sind dem Fachmann wohlbekannt (siehe z. B. U.S.-Patent Nr. 5,416,193). Diese Verfahren schließen Linker ein, die für das chemische Verbinden von Molekülen, wie Proteinen, mit Trägern geeignet sind, die nicht einschränkend Disulfidbindungen, Thioetherbindungen, gehinderte Disulfidbindungen und kovalente Bindungen zwischen freien reaktiven Gruppen, wie Amin- und Thiolgruppen, einschließen. Diese Bindungen können unter Verwendung von heterobifunktionellen Reagenzien erzeugt werden, die reaktive Thiolgruppen auf einem oder beiden Resten bilden, wonach die Thiolgruppen auf einem Rest mit reaktiven Thiolgruppen oder Amingruppen umgesetzt werden, woran reaktive Maleimidogruppen oder Thiolgruppen an dem anderen Rest gebunden werden können. Andere Linker schließen säurespaltbare Linker, wie Bismaleimidoethoxypropan, säurelabile Transferrinkonjugate und Adipinsäuredihydrazid ein, die in stärker sauren intrazellulären Kompartimenten gespalten werden; Vernetzungsmittel, die bei der Belichtung mit UV-Licht oder sichtbarem Licht gespalten werden, und Linker wie die verschiedenen Domänen, wie C_H1, C_H2 und C_H3, der konstanten Region von humanem IgG₁ ein (siehe Batra et al. (1993) *Molecular Immunol.* 30: 379–386). Die derzeit bevorzugten Bindungen sind die direkten Bindungen, die durch die Adsorption des Moleküls auf der Oberfläche der Matrix entstehen. Andere Bindungen sind photospaltbare Bindungen, die aktiviert werden können, indem sie Licht ausgesetzt werden (siehe z. B. Goldmacher et al. (1992) *Bioconj. Chem.* 3: 104–107. Der photospaltbare Linker wird so ausgewählt, dass die spaltende Wellenlänge die verbundenen Reste nicht beschädigt. Photospaltbare Linker sind Linker, die gespalten werden, wenn sie Licht ausgesetzt werden (siehe z. B. Hazum et al. (1981) in *Pept., Proc. Eur. Pept. Symp.*, 16., Brunfeldt, K. (Hrsg.), S. 105–110, worin die Verwendung einer Nitrobenzylgruppe als photospaltbare Schutzgruppe für Cystein beschrieben wird; Yen et al. (1989) *Makromol. Chem.* 190: 69–82, worin wasserlösliche photospaltbare Copolymere, eingeschlossen Hydroxypropylmethacrylamidcopolymer, Glycincopolymer,

Fluoresceincopolymer und Methylrhodamincopolymer, beschrieben werden; Goldmacher et al. (1992) *Bioconj. Chem.* 3: 104–107, worin ein Vernetzungsmittel und Reagens beschrieben wird, das einen photolytischen Abbau erleidet, wenn es nahem UV-Licht (350 nm) ausgesetzt wird; und Senter et al. (1985) *Photochem. Photobiol.* 42: 231–237, worin Nitrobenzylloxycarbonylchlorid-Vernetzungsmittelreagenzien beschrieben werden, die photospaltbare Bindungen erzeugen). Der ausgewählte Linker hängt von der speziellen Anwendung ab und kann erforderlichenfalls empirisch ausgewählt werden.

[0486] Diese Verfahren für die Verbindung von Molekülen mit Trägern können an eine Verwendung für die Verbindung der Ansteuerungsmittel mit den ausgerichteten Mitteln angepasst werden.

M. Biolumineszenz-Resonanzenergie-Transfer-System (BRET-System)

[0487] In der Natur emittieren Luciferasen, die Coelenterazin verwenden, breitbandiges blaugrünes Licht (Max. ~480 nm). Der Biolumineszenz-Resonanzenergie-Transfer (BRET) ist ein natürliches Phänomen, auf das erstmals bei Untersuchungen der Hydrozoa *Obelia* (Morin & Hastings (1971) *J. Cell Physiol.* 77: 313–318) geschlossen wurde, bei denen für die grüne Biolumineszenzemission, die in vivo beobachtet wurde, gezeigt wurde, dass sie das Ergebnis der strahlungslosen Übertragung von Energie auf ein akzessorisches grün fluoreszierendes Protein (GFP) ist. Der BRET wurde kurz darauf in der Hydrozoa *Aequorea victoria* und der Anthozoa *Renilla reniformis* beobachtet. Auch wenn der Energietransfer in vitro zwischen gereinigter Luciferase und GFP in *Aequorea*-Systemen (Morise et al. (1974), *Biochemistry* 13: 2656–62) und *Renilla*-Systemen (Ward & Cormier (1976) *J. Phys. Chem.* 80: 2289–91) nachgewiesen worden ist, besteht ein Schlüsselunterschied darin, dass in Lösung ein effizienter strahlungsloser Energietransfer nur in *Renilla* stattfindet, ganz offensichtlich auf Grund der Vorassoziation eines Luciferase-Moleküls mit einem GFP-Homodimer (Ward & Cormier (1978) *Photochem. Photobiol.* 27: 389–96). Die blaue (486 nm) Lumineszenzemission der *Renilla*-Luciferase kann bei Zugabe geeigneter Mengen *Renilla*-GFP vollständig in eine schmalbandige grüne Emission (508 nm) umgewandelt werden (Ward & Cormier (1976) *J. Phys. Chem.* 80: 2289–91). Die GFPs nehmen Energie von den angeregten Zuständen der Luciferase-Substrat-Komplexe auf und emittieren das Licht wieder als schmalbandiges grünes Licht (~510 nm). Auf Grund des nicht strahlenden Energietransfers wird die Quantenausbeute der Luciferase erhöht.

[0488] Luciferasen und fluoreszierende Proteine haben viele gut entwickelte und nützliche Anwendungen als Protein-Tags und Transkriptionsreporter; BRET hat das Potential, die Empfindlichkeit und den Umfang dieser Anwendungen zu vergrößern. Ein GFP erhöht die Empfindlichkeit des Luciferase-Reporters, indem es die Quantenausbeute erhöht. Eine einzige Luciferase, die mit mehreren spektral verschiedenen GFPs vereinigt ist, ermöglicht die gleichzeitige Verwendung mehrerer Luciferase-Reporter, die durch die Zugabe eines einzigen Luciferins aktiviert werden. Durch die Herstellung von zwei Fusionsproteinen, von denen jedes ein GFP enthält, das eine andere Emissionswellenlänge hat, wobei jedes GFP mit einer identischen Luciferase verbunden ist, können zwei oder mehr als zwei Reporter mit einer einzigen Substratzugabe verwendet werden. Somit können mehrere Ereignisse überwacht werden oder können mehrere Assays unter Verwendung einer einzigen Reagenszugabe durchgeführt werden. Ein derartiges Reportersystem ist selbststrahlend, wenn die Verteilung des Luciferins homogen oder reproduzierbar ist.

[0489] Die Möglichkeit, verschiedenen simultane makromolekulare Ereignisse innerhalb einer Zelle bequem überwachen zu können, stellt eine wesentliche Verbesserung gegenüber der derzeitigen Biolumineszenztechnologie dar. BRET ermöglicht auch völlig neue Arten des Reportings durch das Ausnützen von Änderungen in der Assoziierung oder der Orientierung der Luciferase und des fluoreszierenden Proteins. Durch die Herstellung von Fusionsproteinen kann das Luciferase-GFP-Akzeptorpaar dazu gebracht werden, auf Änderungen in der Assoziation oder der Konformation zwischen den verbundenen Resten zu antworten, es dient somit als ein Sensor.

[0490] Über den Energietransfer zwischen zwei fluoreszierenden Proteinen (FRET) als physiologische Reporter ist berichtet worden (Miyawaki et al. (1997) *Nature* 338: 882–7), worin zwei verschiedene GFPs mit dem Carboxy- und dem Amino-Terminus von Calmodulin verbunden wurden. Änderungen in der Calciumionenkonzentration verursachten eine ausreichende Änderung der Konformation im Calmodulin, wodurch das Ausmaß des Energietransfers zwischen den GFP-Resten verändert wurde. Die beobachtete Änderung der Donoremmission betrug ~10%, während die Änderung des Quotienten ~1,8 betrug.

[0491] Die ähnliche Verwendung eines Luciferase-GFP-Paares in Gegenwart des Substrats Luciferin, wie sie hier bereitgestellt wird, bringt wesentliche Vorteile mit sich. Erstens gibt es keinen Hintergrund und keine Anregung des Akzeptors durch das primär anregende Licht. Zweitens fällt der Hintergrund durch die Donoremis-

sion geringer aus und ist das Signal des Akzeptors relativ größer, weil die Quantenausbeute der Luciferase durch den nicht strahlenden Transfer auf das GFP beträchtlich erhöht wird. Drittens ist die Wellenlängenverschiebung der Peakemission der Luciferase (~480 nm) zu der Peakemission des GFPs (typischerweise 508–510 nm) groß, wodurch die Signalüberlappung minimiert wird. Alle drei Faktoren kombinieren zu einer Erhöhung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses. Die Konzentration des GFP-Akzeptors kann unabhängig unter Verwendung der Fluoreszenz ermittelt werden.

[0492] Für einige Anwendungen werden in vitro vernetzte oder anders in vitro veränderte Versionen der nativen Proteine ins Auge gefasst. Die genetisch codierten Fusionsproteine haben viele große Vorteile: A) bei der in vivo-Verwendung können die Fusionsproteine anders als die auf chemischen Molekülen basierenden Lumineszenzassays oder die Assays auf der Basis von Radioaktivität genetisch in lebende Zellen oder vollständige Organismen eingeführt werden. Hierdurch wird der Bereich der möglichen Anwendungen deutlich erhöht. B) Flexible und genaue Änderung – viele verschiedene, die Antwort modifizierende Elemente können reproduzierbar und quantitativ in ein gegebenes Luciferase-GFP-Paar eingebracht werden; C) Einfache Reinigung – nur ein Reagens muss gereinigt werden, und seine Reinigung kann mit Hilfe des fluoreszierenden Proteinrestes überwacht werden. Liganden-bindende Einheiten können eingebracht werden, um die Affinitätsreinigungsverfahren zu vereinfachen.

1. Gestaltung von Sensoren auf der Basis von BRET

[0493] Der Resonanzenergietransfer zwischen zwei Chromophoren ist ein quantenmechanischer Vorgang, der außerordentlich empfindlich auf den Abstand zwischen dem Donor- und dem Akzeptorchromophor und ihrer relativen Anordnung im Raum reagiert (Wu & Brand (1994) *Anal. Biochem.* 218 1–13). Die Effizienz des Energietransfers ist umgekehrt proportional zur sechsten Potenz des Chromophorabstands. In der Praxis liegt der brauchbare Abstandsbereich bei etwa 10 bis etwa 100 Å, was den Resonanzenergietransfer zu einer sehr brauchbaren Technik für die Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen biologischen Makromolekülen gemacht hat. Eine Vielzahl von FRET-Biosensoren auf Fluoreszenzbasis ist konstruiert worden, in denen anfänglich chemische Fluorophore eingesetzt wurden, die an Proteine oder Membrankomponenten konjugiert waren, und seit kurzem Paare von spektral verschiedenen GFP-Mutanten verwendet werden (Giuliano & Taylor (1998) *Trends Biotech.* 16: 99–146; Tsien (1998) *Annu. Rev. Biochem.* 67: 509–44).

[0494] Auch wenn diese Biosensoren auf der Basis der Biolumineszenz von genetisch codiertem GFP Vorteile gegenüber den weniger bequemen und weniger genauen Biosensoren auf der Basis chemischer Konjugate haben, weisen sie alle eine Beschränkung in ihrer Gestaltung auf: es ist ganz allgemein schwierig, einen Biosensor zu konstruieren, in dem der Energietransfer quantitativ ist, wenn sich die Chromophore in nächster Gegenüberstellung befinden. Es ist nahezu unmöglich, die komplexe Stereochemie von Proteinen beliebig so zu beeinflussen, dass konjugierte oder intrinsische Chromophore stabil mit einem minimalen Abstand und einer optimalen Orientierung positioniert sind. Die Effizienz derartiger Biosensoren wird häufig auch durch stöchiometrische Ungleichgewichte zwischen dem Resonanzenergiedonor und dem Akzeptor eingeschränkt; das Donor- und das Akzeptormakromolekül müssen quantitativ komplexiert sein, um ein Hintergrundsignal zu vermeiden, das aus nicht komplexierten Chromophoren hervorgeht. Diese Einschränkungen in der allgemeinen Gestaltung werden wichtig, wenn die Biosensoren robust, bequem und billig sein müssen. Bei der Entwicklung von Technologien, wie der Durchmusterung mit hohem Durchsatz auf Arzneimittelkandidaten (unter Verwendung von Durchmusterungsprotokollen mit hohem Durchsatz (HTS = high throughput screening)), würden Biochips und Systeme zur Umweltüberwachung stark von modularen Biosensoren profitieren, bei denen das Signal eines seltenen Ziel-"Treffers" (z. B. der Komplexbildung zwischen zwei Polypeptiden) (statistisch) eindeutig unterscheidbar ist von dem hohen Überschuss der "Nicht-Treffer". Derzeitige genetisch codierte FRET-Biosensoren und Biosensoren auf Biolumineszenzbasis zeigen die Treffersignale an, die sehr oft weniger als zweimal größer und bestenfalls mehrfach größer als Nicht-Treffer-Signale sind (Xu et al. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 96: 151–156; Miyawaki et al. (1997) *Nature* 388: 882–7).

[0495] Für die Lösung dieser Probleme können die Anthozoan-GFPs, wie die Renilla-GFPs, die hier bereitgestellt werden, in Kombination mit ihren verwandten Luciferasen verwendet werden. Anthozoan-Luciferase-GFP-Komplexe liefern ein "Gerüst", auf dem Proteindomänen, die die biologischen Eigenschaften liefern, die für einen gegebenen Sensor spezifisch sind, angebunden werden können. Obwohl man viele brauchbare Zweikomponenten-Biosensoren auf der Basis dieses Gerüsts konstruieren kann, werden in einem hier ins Auge gefassten Biosensor unabhängige Proteindomänen, die potentiell miteinander komplexieren, jeweils mit der Luciferase und dem GFP verbunden.

[0496] Isoliert emittiert eine Anthozoan-Luciferase blaues Licht aus dem Coelenterazin-abgeleiteten Chromo-

phor (A), und ein Anthozoan-GFP, das mit blaugrünem Licht angeregt wird, emittiert grünes Licht aus seinem vollständigen Fluorophor (B) auf Peptidbasis. Wenn die Luciferase und das GFP in vivo oder in vitro zu einem Komplex assoziieren, überträgt die Luciferase nicht strahlend ihre Reaktionsenergie auf den GFP-Fluorophor, der dann das grüne Licht (C) emittiert. Demnach kann jede molekulare Wechselwirkung, die den Luciferase-GFP-Komplex aufbricht, quantitativ überwacht werden, indem das Verhältnis von blauem zu grünem Licht (D) beobachtet wird.

[0497] Zu diesem Thema gibt es viele mögliche Variationen. In einem Dreikomponentensystem kann beispielsweise entweder die Luciferase oder das Luciferin an eine Liganden-bindende Domäne eines interessierenden Proteins oder eines anderen Zielpeptids oder einen anderen interessierenden Rest gebunden werden. Wenn die Gestaltung des Fusionsproteins korrekt ist, verhindert dann das Anbinden eines kleinen Moleküls oder eines Proteinliganden die Luciferase-GFP-Assoziation, und somit hat man einen Biosensor auf BRET-Basis. Komplexere Proteinfusionen können entwickelt werden, um Zweikomponenten- und sogar Einkomponenten-BRET-Biosensoren für eine Vielzahl von Anwendungen zu entwickeln.

[0498] Fig. 11 veranschaulicht das dem Biolumineszenz-Resonanzenergie-Transfer (BRET) zugrundeliegende Prinzip und seine Anwendung als Sensor: A) im isolierten Zustand emittiert eine Luciferase, vorzugsweise eine Anthozoan-Luciferase, blaues Licht von dem Coelenterazin-abgeleiteten Chromophor; B) im isolierten Zustand emittiert ein GFP, vorzugsweise ein Anthozoan-GFP, das an die Luciferase bindet, das mit blaugrünem Licht angeregt wird, grünes Licht aus seinem vollständigen Fluorophor auf Peptidbasis; C) wenn die Luciferase und das GFP in vivo oder in vitro zu einem Komplex assoziieren, überträgt die Luciferase nicht strahlend ihre Reaktionsenergie auf das GFP-Fluorophor, das dann das grüne Licht emittiert. D) jede molekulare Wechselwirkung, die den Luciferase-GFP-Komplex aufbricht, kann quantitativ untersucht werden, indem die spektrale Verschiebung vom grünen Licht zum blauen Licht beobachtet wird.

[0499] Die Nucleinsäuren und die Konstrukte und Plasmide, die hier offenbart werden, ermöglichen die Herstellung einer Vielzahl von Konfigurationen von Fusionsproteinen, die ein Anthozoan-GFP, wie Renilla-GFP, mit seiner verwandten Anthozoan-Luciferase einschließen. Die Nucleinsäure, die das GFP codiert, kann benachbart zu der Nucleinsäure, die die Luciferase codiert, oder davon durch die Insertion einer Nucleinsäure getrennt, die beispielsweise eine Liganden-bindende Domäne eines interessierenden Proteins codiert, angebunden werden. Das GFP und die Luciferase werden gebunden. Bei der Wechselwirkung der Liganden-bindenden Domäne mit einer Testverbindung oder einem anderen Rest wird die Wechselwirkung des GFPs mit der Luciferase verändert, wodurch das Emissionssignal des Komplexes verändert wird. Falls erforderlich können das GFP und die Luciferase verändert werden, um die Wechselwirkung fein einzustellen, um das System empfindlicher für Änderungen der Konformation oder der Temperatur oder anderer Parameter zu machen.

2. Vorteile von BRET-Sensoren

[0500] Die hier beschriebenen BRET-Sensoren bringen viele Vorteile mit sich. BRET-Sensoren sind beispielsweise selbststrahlend. Der Reporter und das Ziel sind in ein einziges Polypeptid integriert. Dies gewährleistet eine 1:1:1-Stöchiometrie zwischen der Luciferase, dem GFP und dem Ziel (oder eine 1:N:1-Stöchiometrie, wenn mehr als ein GFP, typischerweise ein GFP-Homodimer, an eine Luciferase gebunden werden kann). Die GFP-Fluoreszenz erlaubt die absolute Quantifizierung des Sensors. Der Nullzustand gibt ein Signal, das die Funktionsfähigkeit des Sensors nachweist. Ein quantifizierbarer Nullzustand vereinfacht die DBRET-Sensoren ("Disruption-of-BRET sensors). BRET-Sensoren haben ein besseres Signal-zu-Rausch-Verhältnis als GFP-FRET-Sensoren, weil es hier keine zelluläre Autofluoreszenz, keine Anregung des Akzeptors durch das primär anregende Licht gibt und weil die Quantenausbeute der Luciferase durch die nicht strahlende Energieübertragung auf das GFP deutlich erhöht wird und weil es nur eine minimale Signalüberlappung zwischen der Emission der Luciferase und der Emission des GFPs gibt. Außerdem haben Anthozoan-GFPs 6-fach höhere Extinktionskoeffizienten als das Aequorea-GFP.

[0501] Die BRET-Sensoren können für die Treffer-Identifizierung und die Stromabwärts-Beurteilung in in vitro-Durchmusterungsassays in vitro oder in vivo oder in situ, eingeschlossen in kultivierten Zellen und Geweben und Tieren, verwendet werden. Die BRET-Sensoren können durch die thermische Endpunkt-Selektion erzeugt werden, die für DBRET (Disruption-of-BRET) geeignet ist und bei der die Notwendigkeit der Kenntnis der Ziel-3D-Struktur und der funktionellen Dynamiken geringer ist. Existierende Durchmusterungsautomaten für die Optimierung der Biosensoren. BRET-Sensoren profitieren von der großen genetischen Vielfalt. Anthozoa haben effiziente Luciferase-GFP-Energietransfer-Systeme hervorgebracht, und die Komponenten können vermischt und aufeinander abgestimmt werden. Hoch effiziente heterologe Luciferasen können weniger aktive Luciferasen ersetzen. Es kann beispielsweise eine aktive Stelle einer Copepod-Luciferase mit einer Anthozo-

an-Luciferase-GFP-Bindungsdomäne verbunden werden. Es gibt viele verschiedene Coelenterazin-verwendende Luciferasen.

[0502] BRET-Sensoren sind modular, so dass ein optimiertes Sensorgerüst für verschiedene Ziele verwendet werden kann. Der BRET-Akzeptor kann ebenfalls variiert werden, um verschobene Emissionen zu erhalten, was das mehrfache gleichzeitige Auslesen vereinfacht. Die Anthozooan-GFPs können mutiert werden. GFPs oder andere Proteine können mit verschiedenen chemischen Fluoren modifiziert werden, Fluor-modifizierte FRET-Akzeptoren für die Durchmusterung mit hohem Durchsatz (HTS high throughput screening) können angepasst werden, der BRET-Donor (Luciferase) kann variiert werden, zum Beispiel indem ein Aequorin-Photoprotein (Ca^{2+} -aktiviert) oder eine Leuchtkäfer-Luciferase (benötigt ATP und ein Leuchtkäfer-Luciferin) verwendet wird, um eine einer Bedingung unterliegende Aktivierung zu erhalten. Das Sensorgerüst kann in eine Vielzahl von Immobilisierungseinheiten, eingeschlossenen Platten mit freiem Format, die die Reagenzvolumina verringern können, wiederverwendbare Mikrotiterplatten, Miniatursäulen und Biochips eingegliedert werden. Schließlich sind BRET-Sensoren preiswerte und reproduzierbare Reagenzien, weil sie durch eine standardisierte Proteinerzeugung hergestellt werden können und weil sie Reinigungs-Tags einschließen können. Genetisch codierte Reporter sind besser reproduzierbar als chemisch modifizierte Reporter. Die lineare Translation von BRET-Modulen gewährleistet die Sensor-Tag.

[0503] Die folgenden Beispiele sind nur für den Zweck der Veranschaulichung beigefügt.

BEISPIEL 1

[0504] Es wird darauf hingewiesen, dass die Gaussia-Luciferase den Gegenstand der vorliegende Erfindung bildet, während die Renilla mulleri-Luciferase und die Pleuromamma-Luciferase und auch das Renilla-GFP und das Ptilosarcus-GFP nur als Vergleichsbeispiele offenbart sind.

I. TOXIKOLOGIE

1. Löslichkeit des Coelenterazins

[0505] Coelenterazin ist in nicht reizenden Vehikeln nicht besonders gut löslich. Coelenterazin ist in einer 2%igen Lösung (G/V) von PEG 400, das etwa 0,8% NaCl enthält, bis zu einer Konzentration von mindestens 200 µg/ml löslich. Obwohl diese Lösung leicht hypertonisch ist, ist sie für die Zwecke als Vehikel nicht reizend.

2. Toxikologie des Coelenterazins

A. Topische Verabreichung

[0506] Für die Untersuchung der Toxikologie der oben beschriebenen Coelenterazin-Lösung wurde die Lösung in die Augen von narkotisierten Kaninchen unter Befolgung von Standardverfahren verabreicht, und die Reizung der Bindehaut wurde gemessen. Die Tiere wurden mit Diazepam (etwa 2 mg/kg) sediert, und 100 µl der Coelenterazinhaltigen PEG-Lösung wurden in ein Auge geträufelt, während in das andere Auge nur das PEG-Vehikel geträufelt wurde. Die Tiere wurden über einen Zeitraum von 30 min beobachtet, und anschließend wurden die Tiere sorgfältig im Hinblick auf eine Reizung der Bindehaut sowie jede sonstige Geschwürbildung auf der Hornhaut untersucht. Die Untersuchung wurde unter Verwendung einer Schlitzlampe durchgeführt, um das Auge gut sichtbar zu machen. In beiden Augen wurde eine nur geringe Reizung der Bindehaut durch das Vehikel beobachtet (n = 3). Demnach verursachte die direkte Verabreichung von etwa 20 µg Coelenterazin in dieser Lösung am Auge keine Reizung, Geschwürbildung oder andere Anzeichen einer Toxizität in diesem topischen Assay.

B. Intravenöse Verabreichung

[0507] In einem zweiten Experiment wird Mäusen das Coelenterazin (n = 6) in einer Konzentration von 1 mg/kg i. p. oder das Vehikel (n = 6) über einen Zeitraum von sieben Tagen verabreicht. Die Mäuse werden im Verlauf der Studie im Hinblick auf alle größeren Anzeichen einer Toxizität, wie sie sich aus ihrem Verhalten ergibt, untersucht.

[0508] Am Ende des einwöchigen Zeitraums wird Blut durch Herzpunktur unmittelbar vor dem Töten der Tiere gesammelt. Die Tiere werden getötet, und zehn verschiedene Gewebeproben werden post mortem von jedem Tier entnommen. Die isolierten Gewebe werden fixiert, gefärbt, blockiert und unterteilt. Der pathologische Zu-

stand der Gewebeproben wird analysiert, und die toxikologischen Daten werden zusammengestellt. Die tägliche Verabreichung des Coelenterazins über drei Tage führte zu keinen größeren Verhaltensänderungen in den Testtieren.

C. Stabilität des Coelenterazins

[0509] Die Stabilität des Coelenterazins kann durch die Analyse biologischer Proben im Hinblick auf das Vorhandensein von Coelenterazin und davon abstammende metabolische Produkt ermittelt werden. In diesem Experiment wird das Blut gesammelt und das Serum aufbereitet, und dieses Serum kann auf Coelenterazin und seine Metaboliten untersucht werden. Wenig Störung durch das Serum (Maus) wurde bei der für das Coelenterazin notwendigen Emissionswellenlänge beobachtet.

[0510] Alternativ kann ein Leberlappen von jedem Tier herausgeschnitten werden und getrennt aufbewahrt, fixiert, in kaltem saurem Aceton homogenisiert und im Hinblick auf Coelenterazin und seine Metaboliten durch standardisierte biochemische Analysen untersucht werden.

D. Coelenterazin-Assays

[0511] Die Coelenterazin-Konzentration kann unter Verwendung seiner inhärenten Fluoreszenzeigenschaften bestimmt werden. Das Coelenterazin kann beispielsweise in einer alkoholischen Lösung durch Messung der Fluoreszenz bei einer spezifischen Wellenlänge gemessen werden. Bisher liegt die Nachweisgrenze bei weniger als 10 ng/ml. Unter Berücksichtigung der hier ins Auge gefassten Dosierungen sollte dieses Empfindlichkeitsniveau für die genaue Messung ausreichend sein.

[0512] Die Coelenterazin-Konzentration kann auch durch die Verwendung der HPLC in Kombination mit einem Fluoreszenznachweis bestimmt werden. Zusätzlich zu dem Nachweissystem auf HPLC-Basis können das Coelenterazin und seine Metaboliten durch Gaschromatographie-(GC) oder Massenspektrophotometrie-Analyse identifiziert werden. Die abschließende Bestätigung der Identität des Coelenterazins und seiner Metaboliten kann mit kernmagnetischer Resonanz (NMR) durchgeführt werden.

Verfahren zur Herstellung der Photoprotein-Konjugate:

[0513] Ein Verfahren für die Herstellung der Photoprotein-Konjugate, die die Biolumineszenzaktivität behalten, ist beschrieben worden (siehe U.S.-Patent Nr. 5,486,455). Im Allgemeinen werden zusätzliche Sulfhydrylgruppen durch die Behandlung des Photoproteins mit Trauts-Reagens (2-Iminothiolan) in das Photoprotein eingebracht, um ein Sulfhydryl-aktiviertes Photoprotein zu erzeugen. Das Sulfhydryl-aktivierte Photoprotein wird an ein Sulfhydryl-reaktives Bindungsreagens konjugiert (z. B. ein Makromolekül, das chemisch mit einem heterobifunktionellen Linker modifiziert worden ist, der zur Sulfhydryl-Vernetzung imstande ist, wie Maleimido- oder Sulfo-SMCC, Sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexan-1-carboxylat). Das konjugierte Photoprotein kann in Rohform verwendet werden, oder es kann durch Verfahren, die dem Fachmann bekannt sind, wie Ionenaustausch- oder Affinitätschromatographie, weiter gereinigt werden.

BEISPIEL 2

Nagetiermodell

[0514] Ein monoklonaler Antikörper, der gegen ein humanes Tumorantigen (z. B. Lewis-Antigen oder karzinoembryonales Antigen (CEA)) oder ein humanisiertes Derivat davon gerichtet ist, wird an ein Photoprotein, vorzugsweise Aequorin, oder die Vargula-Luciferase über das Sulfhydryl-Bindungsverfahren konjugiert (siehe U.S.-Patent Nr. 5,486,455), wonach das Konjugat gereinigt wird. Etwa 10–100 µg des Antikörper-Photoprotein-Konjugats werden i. v. in die Schwanzvene einer transgenen Maus, injiziert, die ein humanes Tumorantigen exprimiert. Die Injektion sollte von dem Tier gut toleriert werden.

[0515] Nachdem eine ausreichende Zeit für das Anbinden des Antikörpers gegeben wurde (2–48 h), wird etwa 1 µg Coelenterazin oder werden 10 µl Rohlysat, das die übrigen Biolumineszenz-erzeugenden Komponenten enthält, i. p. direkt in den Bereich des vorgeschlagenen Neoplasmas injiziert. Alternativ werden 10 µl Lysat oder wird 1 µg Coelenterazin i. p. injiziert, wonach man dem Coelenterazin Zeit gibt, in die Zielregion zu zirkulieren (25 min bis 2 Tage).

[0516] Die Maus wird dann narkotisiert, und die Region, die das Neoplasma enthält, wird in einer Dunkelkam-

mer exponiert. Regionen, die Lichtemittieren, was mit einem Photometer oder mit dem bloßen menschlichen Auge ermittelt wird, bilden das Ziel für das chirurgische Abtragen. Alternativ kann die interessierende Region durch das Einführen eines Laparoscops in der Nähe der Stelle des Neoplasmas und die nachfolgende Positionierung der bildgebenden Kamera in einer Position zur Beobachtung des Lichts sichtbar gemacht werden.

BEISPIEL 3

ISOLIERUNG UND IDENTIFIZIERUNG DER DNA, DIE DAS Renilla mulleri-GFP CODIERT

1. Herstellung einer R. mulleri-cDNA-Expressionsbank

[0517] Eine R. mulleri-cDNA-Expressionsbank wurde unter Verwendung des kommerziell erhältlichen Lambda-UniZap-XR-Vektor-Kits (Stratagene) gemäß der bereitgestellten Gebrauchsanleitung hergestellt. Kurz gesagt wurden EcoRI- und XhoI-Adaptoren mit dem 5'-Ende der cDNA-Fragmente verbunden, und die verbundenen cDNA-Fragmente wurden von den verbleibenden nicht verbundenen Adaptoren gereinigt. Die gereinigten cDNAs wurden in EcoRI- und XhoI-verdauten λ -Uni-ZAP-XR-Vektor ligiert, in kompetente E. coli-XL-1-Blue-Zellen transformiert, und die resultierende DNA wurde unter Verwendung von λ -Phagen-Helferextrakten in Viruspartikel verpackt (Gigapak Plus Kit, Stratagene). Die verpackte lambda-Genbank wurde in E. coli-XL-1-Blue-Zellen titriert, und für die Sequenzkomplexität der Renilla mulleri-cDNA-Expressionsbank wurde berechnet, dass sie etwa $1,73 \times 10^6$ unabhängige Plaques betrug.

[0518] Durch das Herausschneiden der Initiator-Terminator-Kassette, die die klonierte Renilla-cDNA beherbergt, wurde eine Plasmidbank aus der lambda-cDNA-Expressionsbank abgeleitet. Etwa 2×10^8 unabhängige Plaque-Isolate wurden zusammengefasst und verwendet, um E. coli-SOLR-Zellen (Stratagene) zu infizieren, die dann mit einem filamentösen Helferphagen VCSM13, R408 oder ExAssist-Helferphagen (Stratagene) coinfiziert wurden. Die cDNA-haltigen Plasmide wurden durch Plattieren der infizierten Zellen auf festes Medium gewonnen, das mit 200 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin für die Selektion der Zellen ergänzt war, die herausgeschnittenes pBK-Plasmid enthalten.

[0519] In E. coli-XL-1-Blue-Zellen erfolgt die Expression des Renilla mulleri-GFPs in dem pBK-Plasmid unter der Kontrolle des lacZ-Promotors, dessen Transkription durch die Zugabe von Isopropylthio- β -D-galactopyranosid (IPTG) zu dem Kulturmedium leicht ausgelöst werden kann, wobei das IPTG auch direkt in Sprayform oder in Form von anderen Aerosolen zu den Kolonien gegeben werden kann.

2. cDNA-Bank-Durchmusterung

[0520] Für die Identifizierung der Klone, die ein Renilla-GFP exprimieren, wurde ein funktionelles Durchmusterungsverfahren verwendet, bei dem blaues Licht, z. B. 490 nm, eingesetzt wird, um fluoreszierende GFP-Transformanten, die ein Renilla-GFP exprimieren, zu identifizieren. Die Renilla-cDNA-Expressionsplasmidbank wurde durchgemustert, indem kompetente E. coli-XL-1-Blue-Zellen transformiert wurden und ein Teil des Transformationsgemischs auf L-Broth-Platten (LB-Platten) plattiert wurde, wobei das Medium mit 200 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin ergänzt war, die Ruß enthielten, der zugegeben wurde, um die Hintergrundfluoreszenz (z. B. vom Agar) vollständig zu absorbieren. Die Platten wurden mit Licht mit einer geringen Bandbreite das um 490 nm zentriert war, beleuchtet und durch einen schmalbandigen 510 nm-Bandpassfilter unter Verwendung der Verfahren, die auf dem Fachgebiet allgemein bekannt sind, beobachtet (siehe z. B. Ward et al. (1978) J. Biol. Chem. 254: 781–788).

[0521] Etwa $3\text{--}4 \times 10^6$ einzelne Kolonien wurden durchgemustert, und etwa drei lichtemittierende Kolonien wurden identifiziert. Um zu bestätigen, dass der oben beschriebene Stamm ein Plasmid beherbergte, das ein GFP codiert, wurden die spektralen Eigenschaften des Plasmid-codierten Proteins unter Verwendung von Zelllysaten und teilweise gereinigten Zellextrakten (siehe z. B. BEISPIEL 4) untersucht. Das Fluoreszenzanregungsspektrum für teilweise gereinigtes rekombinantes Renilla mulleri-GFP war ähnlich denjenigen Spektren, über die für andere Renilla-Arten (Maximum nahe 498 nm) berichtet wurde; allerdings hat das Emissionsspektrum von rekombinantem R. mulleri-GFP ein Wellenlängenmaximum nahe 506 nm, was ein etwas kurzwelligeres Wellenlängenmaximum als beim in vitro- und in vivo-Emissionsspektrum ist, das für natürlich vorkommendes Renilla-GFP erhalten wird (z. B. 590 nm; siehe Wampler et al. (1973) Biochem. Biophys. Acta 314: 104–109).

3. Bestimmung und Charakterisierung der Nucleotidsequenz der DNA, die das *Renilla mulleri*-GFP codiert

[0522] Plasmid-DNA wurde aus den Kulturen eines fluoreszierenden Transformanten gereinigt, und die Nucleotidsequenz der *Renilla*-cDNA-Plasmidinsertion wurde unter Verwendung der Verfahren, die dem Fachmann wohlbekannt sind, ermittelt (siehe z. B. Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Sanger et al. () *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*).

[0523] Die Nucleotidsequenz einer cDNA, die ein *Renilla mulleri*-GFP voller Länge codiert, ist in SEQ ID NO: 15 offenbart. Das cDNA-Fragment, das das *Renilla mulleri*-GFP codiert, hat eine Länge von 1079 nt, eingeschlossen eine 5'-nicht codierende Sequenz von 258 nt, ein offener Leserahmen von 714 nt, der ein Polypeptid aus 238 Aminosäuren codiert, und eine 3'-nicht codierende Sequenz von 107 nt.

[0524] Die Nucleotidsequenz der cDNA, die das *Renilla*-GFP codiert, wurde mit der Nucleotidsequenz des *A. victoria*-GFPs verglichen, dem einzigen sonstigen GFP, dessen vollständige Nucleotidsequenz bekannt ist (siehe z. B. SEQ ID NO: 1). Die Nucleinsäuren, die von den beiden Organismen isoliert wurden, codieren Proteine von identischer Länge, die Nucleotidsequenz, die die 136 Amino-terminalen Aminosäurereste des *Renilla mulleri*-GFPs codiert, ist jedoch nur zu 48,8% identisch, verglichen mit *A. victoria*. Weiterhin weicht die Nucleotidsequenz, die die 102 Carboxy-terminalen Aminosäurereste des *Renilla mulleri*-GFPs codiert, noch stärker ab, die nur zu 31,4% identisch ist.

[0525] Ein Vergleich der hergeleiteten Aminosäuresequenzen des *Renilla mulleri*-GFPs und des *A. victoria*-GFPs ergab, dass die Proteinsequenzen ebenfalls hochgradig voneinander abweichend sind. Nur 56 von 238 Aminosäureresten sind zwischen den hergeleiteten Aminosäuresequenzen identisch (d. h. 23,5% direkte Aminosäureidentität). Weiterhin ist die hergeleitete Sequenz des vermuteten Hexapeptid-Chromophors in *R. mulleri* (FQYGNR) ziemlich verschieden von dem Chromophor von *A. victoria* (FSYGVQ), zwischen denen nur 3 von 6 Aminosäureresten identisch sind. Der *R. mulleri*-Chromophor ist auch an einer etwas anderen Stelle in der Polypeptidkette lokalisiert, verglichen mit dem *A. victoria*-GFP. Der *R. mulleri*-Chromophor wird durch die Aminosäurereste 68–73 codiert, während der *A. victoria*-Chromophor durch die Aminosäurereste 64–69 codiert wird. Die etwas verschiedene Positionen und die veränderten Chromophorsequenzen tragen wahrscheinlich zu den unterschiedlichen spektralen Eigenschaften bei, die die beiden Proteine zeigten.

BEISPIEL 4

Identifizierung und Isolierung DER DNA, die eine *Renilla mulleri*-LUCIFERASE codiert

[0526] Die *R. mulleri*-cDNA-Plasmidbank, die in BEISPIEL 3 beschrieben wird, wurde in *E. coli*-XL-1-Blue-Zellen transformiert, und einzelne Kolonien wurden erhalten, indem ein Teil des Transformationsgemischs auf L-Broth-Platten plattiert wurde, die mit 200 µg/ml Ampicillin ergänzt waren und die auch mit Ruß für die Absorption der Hintergrundfluoreszenz ergänzt waren. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Ampicillin-resistenten Transformanten wurden mit 1 mM IPTG-Lösung besprüht, um die Luciferase-Expression auszulösen. Nachdem den Zellen Zeit gelassen wurde, die Luciferase zu exprimieren, wurde die Oberfläche der Platten mit einer Lösung besprüht, die 20 mM Coelenterazin enthielt, und die Kolonien, die blaues Licht emittierten, wurden unter Verwendung eines blauen Bandbreitefilters sichtbar gemacht. Die Plasmid-DNA wurde aus den Kulturen der biolumineszierenden Transformanten isoliert, und die Nucleotidsequenz einer cDNA-Insertion eines positiven Klons wurde ermittelt. Die Nucleotidsequenz der DNA, die eine *Renilla mulleri*-Luciferase voller Länge codiert, und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz werden in SEQ ID NO: 17 offenbart. Das cDNA-Fragment, das die *Renilla mulleri*-Luciferase codiert, hat eine Länge von 1217 nt eingeschlossen eine 5'-nicht codierende Region von 30 nt, ein offener Leserahmen von 933 nt, der ein Polypeptid aus 311 Aminosäuren codiert, und eine 3'-nicht codierende Sequenz von 254 nt.

BEISPIEL 5

REKOMBINANTE ERZEUGUNG VON *Renilla*-LUCIFERASE1. Rekombinante Erzeugung von *Renilla reniformis*-Luciferase

[0527] Das Phagemid pTZ18R (Pharmacia) ist ein Vielzweck-DNA-Vektor, der für in vitro-Transkriptionen entwickelt wurde und der für die Expression von rekombinanten Proteinen in bakteriellen Wirten brauchbar ist. Der Vektor enthält das bla-Gen, das die Selektion der Transformanten über die Ampicillinresistenz ermöglicht, und eine Polylinker-Stelle benachbart zu dem lacZ'-Gen. Das interessierende heterologe Gen wird in den Polylinker

insertiert und vom lac-Promotor durch die Induktion beispielweise mit Isopropyl- β -thiogalactopyranosid (IPTG) transkribiert.

[0528] Die DNA, die die Renilla reniformis-Luciferase codiert, ist kloniert worden (siehe z. B. die U.S.-Patente Nr. 5,292,658 und 5,418,155). Das Plasmid pTZRLuc-1 codiert die Renilla-Luciferase auf einem 2,2 Kbp EcoRI-bis-Sst1-DNA-Fragment, das in die EcoRI- und Sst1-Stellen von pTZ18R insertiert wird (die Plasmidkonstruktion wird in den U.S.-Patenten Nr. 5,292,658 und 5,418,155 beschrieben, siehe auch Lorenz et al. (1991) Isolation and Expression of cDNA encoding Renilla reniformis Luciferase, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88, 4438–4442). Die Initiierung der Transkription der Renilla-Luciferase-cDNA erfolgt unter der Kontrolle durch den lacZ'-Promotor. E. coli-Stämme, die das Plasmid pTZRLuc-1 beherbergen, exprimieren eine Renilla-Luciferase, die in Biolumineszenz-Assays funktionsfähig ist und weiterhin die Eigenschaften des nativen Enzyms hat (siehe z. B. U.S.-Patente Nr. 5,292,658 und 5,418,155).

[0529] Ein Derivat von pTZRLuc-1, pTZRLuc-3.6, erzeugt etwa 7-fach höhere Konzentrationen der rekombinanten Renilla-Luciferase als pTZRLuc-1, wenn es in den gleichen E. coli-Wirt transformiert wird. Der kompetente E. coli-Stamm XL-1 wurde unter Verwendung von gereinigtem pTZRLuc-3.6 gemäß der Gebrauchsanleitung, die vom Hersteller geliefert wird, gereinigt (XL-1 Supercompetent cells and protocol; Stratagene, Inc., La Jolla, CA). Die Transfektanten wurden durch die Plattierung auf Luria-Both-Platten (LB), die mit 100 μ g/ml Ampicillin ergänzt waren, selektiert.

[0530] Einzelne Ampicillin-resistente Kolonien wurden in LB-Medium, das mit 100 μ g/ml Ampicillin ergänzt war, bei Umgebungstemperatur unter Verwendung eines kontinuierlichen Schüttelns gezüchtet, bis das Zellwachstum die mid-log-Phase erreicht hatte (d. h. die Zellkultur erreicht eine O.D._{500nm} = 0,6–0,8 Einheiten). Die Transkription vom lac-Promotor wurde durch die Zugabe von 1 mM IPTG ausgelöst, und die Zellkultur wurde bei Umgebungstemperatur zusätzliche 8 Stunden geschüttelt.

[0531] Die Zellen wurden durch Zentrifugieren bei 10000 \times g geerntet und bei -20°C eingefroren. Das Zellpellet wurde aufgetaut und erneut in einer 1:5-Verhältnis (G/G) in einer Lösung von 10 mM EDTA, pH 8,0, die 4 mg/ml Lysozym enthielt (Sigma Chemical Corp.), suspendiert. Die Zellen wurden 30 min in einem Wasserbad bei einer Temperatur von 25°C gehalten und dann über 1 Stunde in Eis gelagert. Die Zellen wurden mit Ultraschall bei 0°C unter Verwendung eines einmütigen Pulses von einem Ultrasonics, Inc. Zellzerkleinerer lysiert.

[0532] Die lysierten Zellbruchstücke wurden durch Zentrifugieren bei 30000 \times g über 3 h entfernt, und der Überstand wurde dekantiert und behalten. Das Pellet wurde erneut in einem 1:5-Verhältnis in den oben beschriebenen Lösungen suspendiert, und die nachfolgenden Inkubationen, Lyse- und Zentrifugierschritte wurden wiederholt. Die beiden Überstände wurden kombiniert und bei -70°C gelagert. Das resultierende "geklärte Lysat" wurde als eine Quelle für rekombinante Luciferase eingesetzt. Alternativ kann das Lysat zusätzlichen Reinigungsschritten unterzogen werden (z. B. Ionenaustauschchromatographie oder Immunaффinitätschromatographie), um das Lysat weiter anzureichern oder um eine homogene Quelle für das gereinigte Enzym bereitzustellen (siehe z. B. U.S.-Patente Nr. 5,292,658 und 5,418,155).

[0533] Alternativ kann die rekombinante Renilla mulleri-Luciferase durch die Substitution der DNA, die die R. reniformis-Luciferase codiert, durch die DNA, die eine R. mulleri-Luciferase codiert, wie die DNA, die die Aminosäuresequenz codiert, die in SEQ ID NO: 18 offenbart wird, exprimiert werden.

BEISPIEL 6

NACHWEIS VON KREBSZELLEN

[0534] Das Biolumineszenz-Nachweisverfahren auf Luciferase-Basis findet breite Anwendung bei der Sichtbarmachung und der genauen Lokalisierung von Krebszellen. In derartigen Anwendungen kann das Renilla-GFP, die Renilla mulleri-Luciferase oder das Luciferin-Molekül an ein Steuerungsmittel konjugiert werden, wie einen Antitumorantigen-Antikörper, der spezifisch bestimmte Krebszellen erkennt, die das Antigen exprimieren. Alternativ ist die Luciferase an einen Mikroträger gekoppelt, und das Steuerungsmittel ist an die Luciferase und/oder den Mikroträger konjugiert. Das Konjugat wird in ein Subjekt eingebracht, zum Beispiel durch intravenöse, intraperitoneale oder subkutane Injektion oder durch die topische Anwendung oder die direkte Anwendung während einer Operation unter Verwendung eines Laparoscops oder eine Kanüle (Trokar). Durch die Bildung eines Antikörper-Antigen-Komplexes wird die Luciferase oder das Luciferin mit den Zielkrebszellen verbunden und steht dann für die Wechselwirkung mit dem Luciferin-Substrat (falls das Konjugat eine Luciferase enthält) oder dem Luciferase-Enzym (falls das Konjugat das Luciferin enthält) zur Verfügung. Demnach

wird das Substrat oder das Enzym dann in das Subjekt eingebracht, z. B. durch die Injektion oder das Auftragen, und man lässt es mit dem Partnermolekül reagieren, das in dem Antikörperkonjugat enthalten ist, wodurch die einfach nachweisbare Lichtemission nur in den genauen Gebieten erhalten wird, wo das Konjugat stabil als Antikörper-Antigen-Komplex vorhanden ist.

[0535] Die Empfindlichkeit und Biokompatibilität dieses Biolumineszenz-Nachweissystems ermöglicht es, Krebs in seinen frühen Stadien zu entdecken, zum Beispiel kleine Anzahlen an Krebszellen, im Gegensatz zu anderen weniger empfindlichen Verfahren, die imstande sind, Krebszellen erst dann nachzuweisen, wenn sich das Neoplasma in ein weiter vorgeschrittenes und potentiell lebensbedrohliches Stadium entwickelt hat. Zusätzlich können die hier offenbarten diagnostischen Verfahren in Abwesenheit von invasiven chirurgischen Verfahren verwendet werden. Beispielsweise können auch chirurgische Beobachtungsgeräte, Computertomogramme oder chirurgische Beobachtungsgeräte in Miniaturform, siehe weiter oben, die so modifiziert worden sind, dass sie geringe Intensitätsniveaus an sichtbarem roten Licht und nahem Infrarot-Licht nachweisen, das durch die Gewebe des Patienten emittiert wird, ebenfalls verwendet werden, um den Chirurgen zu unterstützen, wie diejenigen, die in der gleichzeitig anhängigen, dem gleichen Inhaber gehörenden U.S.-Anmeldung mit der Seriennummer 08/990,103 beschrieben werden.

[0536] Das Biolumineszenz-Nachweissystem ist vor allem in chirurgischen Verfahren anwendbar, in denen kanzeröse Läsionen entfernt werden. Das gezielte Ausrichten eines Renilla-GFPs, einer Renilla mulleri-Luciferase und/oder von Luciferin z. B. auf einen Tumor führt zur genauen Darstellung der Grenzen der Läsion und erleichtert so ein exakteres Herausschneiden und die vollständige Eradikation des Krebses ohne das Entfernen von umgebendem gesundem Gewebe. Dies ist von kritischer Wichtigkeit beim Herausschneiden von kanzerösen Läsionen in komplexen, vitalen Geweben, wie Nervengewebe. Die Empfindlichkeit des Biolumineszenz-erzeugenden Systems macht es auch gut geeignet für die Untersuchungen nach der Operation und die Identifizierung von Metastasen, bei der die Fähigkeit zum Nachweis einer kleinen Zahl von verbleibenden Krebszellen eine akkuratere Beurteilung der Effektivität des Verfahrens bei der Eradikation des Krebses ermöglicht.

[0537] Das Biolumineszenz-erzeugende System findet weiterhin Anwendung bei der Überwachung des Fortschreitens und der Ausbreitung von Krebs. Derartige Informationen sind von unschätzbarem Wert bei der Beurteilung der Effektivität von Therapien, wie einer Chemotherapie und einer Strahlentherapie, sowie der Effizienz von Therapien auf Arzneimittelbasis zur Behandlung von Krebspatienten.

Nachweis von Gebärmutterhalskrebs

[0538] Ein Biolumineszenz-Nachweissystem auf Luciferase-Basis kann beim Nachweis von Gebärmutterhalskrebs verwendet werden. Luciferin oder Luciferase kann beispielsweise direkt oder über einen Linker oder einen Mikroträger an Antikörper konjugiert werden, die spezifisch für Zellantigene von Gebärmutterhalskrebs sind (siehe z. B. Tabelle 3). Das Konjugat wird dann direkt in einer geeigneten Formulierung auf das Gebärmutterhalsgewebe aufgetragen, das dann abgewaschen wird, um nicht gebundenes Konjugat zu entfernen. Die übrigen Komponenten der Biolumineszenzreaktion, d. h. Luciferin, falls das Konjugat Luciferase enthält, oder Luciferase, falls das Konjugat Luciferin enthält, wird dann zusammen mit allen erforderlichen Aktivatoren auf das Gebärmutterhalsgewebe aufgetragen, wo man sie mit dem gebundenen Konjugat in Wechselwirkung treten lässt. Die Lichtemission wird dann beobachtet. Das emittierte Licht kann eine beliebige sichtbare, mit dem menschlichen Auge wahrnehmbare Wellenlänge haben. Wenn Krebszellen, die das erkannte Antigen präsentieren, in dem Gewebe vorhanden sind, leuchten diese Zellen und werden dadurch sichtbar gemacht. Die Biolumineszenz dient einer genaueren Lokalisierung des Krebses, die den Chirurgen beim Entfernen der kanzerösen Läsion leitet.

Nachweis des Karzinoembryonalen Antigens (CEA)

[0539] Ein Biolumineszenz-Nachweissystem kann auch für den Nachweis von neoplastischen Zellen verwendet werden, die CEA präsentieren, wie z. B. die kanzeröse Zellen, die in kolorektalen Krebsformen vorhanden sind (siehe z. B. Tabelle 3). In dieser Anwendung wird die Luciferase oder das Luciferin direkt oder indirekt an einen Antikörper konjugiert, der für CEA spezifisch ist, und der Nachweis erfolgt wie weiter oben für den Nachweis von Gebärmutterhalskrebs beschrieben wurde. Die Wanderung von CEA-tragenden Krebszellen, zum Beispiel in die Wand des Dickdarms und weiter in die Lymphbahnen, kann mit diesem Nachweissystem ebenfalls beobachtet werden. Das modifizierte Laparoskop, das sichtbares Licht von geringer Intensität nachweist, kann weiterhin eingesetzt werden, um den Nachweis und das Sichtbarmachen der CEA-tragenden Krebszellen zu verstärken.

Nachweis von Harnblasenkrebs

[0540] Für den Nachweis von Harnblasenkrebs wird die Luciferase oder das Luciferin an ein Ansteuerungsmittel konjugiert, z. B. einen Antikörper, der Antigene erkennt, die auf Blasenkrebszellen präsentiert werden, der dazu dient, das Konjugat an die kanzerösen Läsionen zu binden. Das Konjugat wird in die Blase eingebracht, zum Beispiel durch einen Katheter, und die Läsionen werden beim nachfolgenden Einbringen der übrigen Komponenten der Biolumineszenzreaktion in die Blase sichtbar gemacht. Diese Technik ist besonders nützlich für Formen des Harnblasenkrebses, die derzeit operativ durch transurethrales Verbrennen des Tumors, der in der Blasenwand lokalisiert ist, unter Verwendung einer Elektrokauterisierung entfernt werden. Diese Technik minimiert die Verbrennung von gesundem Blasengewebe, identifiziert mögliche Gebiete von Metastasen und gewährleistet die vollständige chirurgische Entfernung des Zieles.

[0541] Der Ort und die Ränder von neoplastischem Blasengewebe können mit größerer Genauigkeit definiert werden, indem das Vorhandensein des Tumors mit dem Ansteuerungsmittel, das an die Luciferase-gebundenen Mikropartikel gekoppelt ist, nachgewiesen wird. Nach der Verabreichung des Ansteuerungsmittel-Konjugats wird die Biolumineszenzreaktion gestartet (d. h. durch die Zugabe eines Luciferins und/oder aller Aktivatoren). Ein zweiter GFP-gebundener Mikropartikel wird kovalent an ein Ansteuerungsmittel gebunden, das gegen benachbartes umgebendes Gewebe gerichtet ist oder das vorzugsweise auf identisches, nicht tumoröses Gewebe abzielt. Das GFP-Konjugat wird dem Patienten verabreicht. Folglich leuchtet das neoplastische Gewebe beispielsweise unter Emission von blauem Licht, z. B. bei Verwendung von Aequorin oder eines Renilla-Luciferase-Ansteuerungsmittel-Konjugats, während das GFP-gebundene umgebende Gewebe das blaue Licht absorbieren würde und grünes Licht emittieren würde, wodurch für einen zusätzlichen Kontrast für die eindeutige Festlegung der Ränder des Gewebes, das chirurgisch entfernt werden soll, gesorgt wird.

Nachweis der Verbreitung von Wandernden Krebszellen

[0542] Die Infiltration des lymphatischen Systems durch wandernde Krebszellen, wie von Hautmelanomen, tiefen Brusttumoren und Lebermetastasen, die ihren Ursprung in Darmkrebs haben, können einfach unter Verwendung des Biolumineszenz-Nachweissystems nachgewiesen werden. Die Luciferase oder das Luciferin, die/das an ein Ansteuerungsmittel konjugiert ist, wie einen Antikörper, der ein Krebszellenantigen erkennt, komplexiert spezifisch mit den Zellen, unabhängig davon, wo sie sich im Wanderungsprozess befinden. Die übrigen Biolumineszenz-erzeugenden Komponenten lässt man durch den Körper zirkulieren, wo sie nur mit den Zellen in Wechselwirkung treten, an die das Konjugat gebunden ist. In Fällen, in denen die Krebszellen in die Epithelgewebe auf der Hautoberfläche oder in der Nähe der Hautoberfläche eingedrungen sind, kann das Konjugat und/oder das Partnermolekül topisch angewendet werden, und die resultierende Lichtemission kann einfach mit dem bloßen menschlichen Auge ohne invasive Verfahren nachgewiesen werden. Zusätzlich kann auch ein Photomultiplier oder können chirurgische Beobachtungsinstrumente verwendet werden, um die durch die Haut abgegebene Lichtmenge zu verstärken. In dieser Weise kann es möglich sein, die lymphatische Wanderung von Tumorzellen zu verfolgen, bevor eine Operation versucht wird.

Nachweis von Brustkrebs

[0543] Die Nutzen eines frühen Nachweises von Brustkrebs, z. B. erhöhte Überlebensrate und mehr Optionen für die Behandlung, sind zahlreich und gut dokumentiert. Das Biolumineszenz-Nachweissystem bietet ein empfindliches Verfahren, durch das die frühe Diagnose der verschiedenen Formen von Brustkrebs erleichtert wird. In derartigen Anwendungen kann die Luciferase oder das Luciferin beispielsweise an Anti-Östrogen- oder Anti-Progesteron-Rezeptor-Antikörper konjugiert werden, die auf Moleküle abzielen, die in Brustkrebsgewebe in einer deutlich erhöhten Anzahl vorkommen, verglichen mit normalem Brustgewebe. In diesem im Wesentlichen quantitativen Assaysystem hängt die Diagnose von der Stärke der nachgewiesenen Lumineszenz, beispielsweise in einem durch Biopsie erhaltenen Brustgewebe, ab. Die Stärke der Lumineszenz kann unter Verwendung eines Photometers, eines Photomultipliers oder anderer geeigneter Einrichtungen quantifiziert werden.

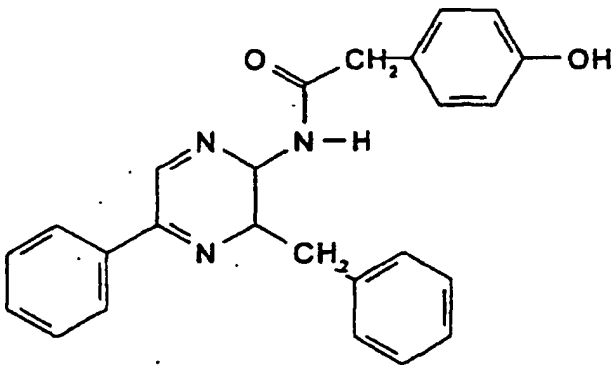
[0544] Alternativ kann das Ansteuerungsmittel direkt oder indirekt an die Luciferase gekoppelt werden, die aus *Aristostomias*, *Malacosteus* oder *Pachystomias* isoliert wurde, die rotes Licht emittiert (siehe z. B. Widder et al. (1984) *Science* 225: 512–514). Besonders bevorzugt sind die Biolumineszenz-Komponenten, die aus den Arten *Aristostomias scintillans* und *Malacosteus niger* isoliert werden. In dieser Anwendung wird das Luciferase-haltige Ansteuerungsmittel dem Patienten verabreicht, gefolgt von den übrigen Komponenten des Biolumineszenz-erzeugenden Systems (z. B. ein Luciferin und/oder Aktivatoren). Die Lichtemissionen bei dieser Wellenlänge werden direkt durch das Gewebe ohne ein invasives chirurgisches Verfahren unter Verwendung

eines Photomultipliers, eines Computertomographen oder unter Verwendung eines chirurgischen Beobachtungsgeräts, das hochempfindlich für rotes Licht ist, nachgewiesen. Alternativ kann ein chirurgisches Beobachtungsgerät verwendet werden, in dem die optische Detektoreinrichtung einen CCD-Bildgeber oder einen Bildverstärker enthält, der für rote Lichtemissionen besonders empfindlich ist.

BEISPIEL 7

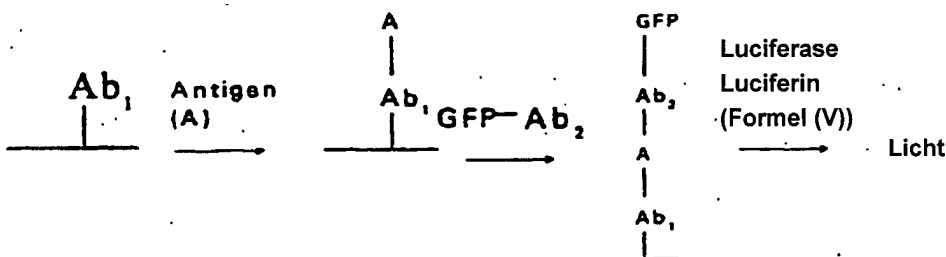
VERSTÄRKUNG DER FLUORESCENZEMISSIONEN UNTER VERWENDUNG VON RENILLA-GFP

[0545] In Gegenwart von Renilla-GFP wird die Quantenausbeute der Biolumineszenz der Renilla-Luciferase-Coelenterazin-Reaktion von 6,9% auf 13% erhöht, eine Verstärkung um nahezu den Faktor 2. Derivate von Coelenterazin, in denen eine oder mehrere Gruppen der Coelenterazin-Struktur ersetzt worden sind, sind bekannt (siehe z. B. Hart et al. (1979) *Biochemistry* 18: 2004). Von besonderem Interesse ist hier das Coelenterazin der Formel (V), das weiter oben diskutiert wird:



[0546] Wie erwähnt wird durch die Reaktion dieser Verbindung in Gegenwart von Renilla-Luciferase Ultraviolettlicht, λ -Maximum bei 390 nm, erzeugt, und die Quantenausbeute der Biolumineszenz ist relativ niedrig (etwa 0,012%). Bei der Zugabe von GFP emittiert der Renilla-Luciferase/GFP-Komplex jedoch grünes Licht, und die Quantenausbeute der Biolumineszenz-Reaktion wird auf 2,3% erhöht. Die Zugabe des GFPs führt daher zu einer ca. 200-fachen Erhöhung der durch die Renilla-Luciferase emittierten Lichtmenge. Weiterhin können durch die Verwendung eines Bandpassfilters mit einer Ausschlussgrenze von weniger als 470 nm nur diejenigen Lichtwellenlängen oberhalb von 470 nm beobachtet werden. Unter diesen Bedingungen hängt die Sichtbarmachung der Lichtemissionen direkt von der Gegenwart eines GFPs ab, durch das die blauen Lichtphotonen zu Photonen mit einer Wellenlänge oberhalb von 470 nm verschoben werden (z. B. grünes Licht mit $\lambda = 510$ nm).

[0547] Die Verwendung eines Renilla-GFPs in Kombination mit einer Luciferase, die blaues Licht emittiert, und dieses Coelenterazin-Derivats und des Bandpassfilters erlaubt die Entwicklung von Immunoassays, in denen eine nachweisbare Lichterzeugung vom Vorhandensein eines GFPs abhängt. Eine Anzahl an Konfigurationen für derartige Immunoassays ist möglich, und ein beispielhafter Immunoassay für eine Anwendung, in der die Reaktion auf einem festen Träger durchgeführt wird, wie ein Mikrotiterarray-Format, sieht folgendermaßen aus:



[0548] Wenn hier verwendet, wird eine Testprobe, von der vermutet wird, dass sie das oder die Zielantigene enthält, zu einer Mikrotiterplatte gegeben, die eine Vielzahl von Antikörpern enthält, die spezifisch für das oder die anvisierten Antigene ist, die einzeln in den Vertiefungen befestigt werden. Nach der Bildung eines Antikörper-Antigen-Komplexes wird ein Antikörper-Konjugat, das einen zweiten Antikörper, der spezifisch für das Antigen ist, oder ein $F(Ab)_2$ -Fragment davon enthält, das mit einem Renilla-GFP verknüpft ist, wie denjenigen, die hier beschrieben werden, zugegeben. Der spezifisch gebundene zweite Antikörper wird durch die Zugabe einer Luciferase, vorzugsweise einer Renilla reniformis- oder Renilla mulleri-Luciferase, und der Verbindung der

Formel (V) nachgewiesen, und die Lichterzeugung wird unter Verwendung eines 470 nm-Bandpassfilters beobachtet. Die Lichtintensität sollte ein Maß für die Menge an vorhandenem GFP-Ab₂ sein, die wiederum ein Maß für die Menge an Antigen ist, die an AB₁ gebunden ist.

[0549] Bei Verwendung dieses Systems wird das Vorhandensein des Antigens in der Probe durch den Nachweis des Lichts für die einzelnen Vertiefungen, für die der Antikörper spezifisch ist, bestätigt. Wenn man die Spezifität des Antikörpers kennt, kann das spezifische Antigen, das in der Probe vorhanden ist, identifiziert werden. Es sollte demnach möglich sein, Immunoassays durchzuführen, die vor der Luciferin/Luciferase keinen aus einem Waschen bestehenden Zwischenschritt Zugabe benötigen.

BEISPIEL 8

IDENTIFIZIERUNG UND ISOLIERUNG VON DNA, DIE EINE *Gaussia mulleri*-LUCIFERASE CODIERT

1. Herstellung einer *Gaussia*-DNA-Expressionsbank

[0550] Eine *Gaussia*-cDNA-Expressionsbank wurde unter Verwendung des im Handel erhältlichen Lambda-UniZap-XR-Vektor-Kits (Stratagene) gemäß der bereitgestellten Gebrauchsanleitung hergestellt. Kurz gesagt wurden EcoRI- und XhoI-Adaptoren mit dem 5'-Ende der cDNA-Fragmente verknüpft und die verknüpften cDNA-Fragmente wurden von den verbleibenden nicht verknüpften Adaptoren gereinigt. Die gereinigten cDNAs wurden in EcoRI- und XhoI-verdauten λ-Uni-ZAP-XR-Vektor ligiert, in kompetente *E. coli*-CL-1-Blue-Zellen transformiert, und die resultierende DNA wurde unter Verwendung von λ-Phagen-Helferextrakten (Gigapak Plus Kit, Stratagene) in Viruspartikel verpackt. Die verpackte Lambda-Bank wurde in *E. coli*-XL-1-Blue-Zellen titriert, und die Sequenzkomplexität der cDNA-Expressionsbibliothek wurde berechnet.

[0551] Eine Plasmidbank wurde durch das Herausschneiden der Initiator-Terminator-Kassette, die die klonierte *Gaussia*-Luciferase-codierende DNA beherbergt, von der Lambda-cDNA-Expressionsbank abgeleitet. Etwa 2×10^8 unabhängige Plaque-Isolate wurden gesammelt und für die Infektion von *E. coli*-SOLR-Zellen (Stratagene) verwendet, die dann mit einem filamentösen Helferphagen VCSM13, R408 oder ExAssist-Helferphagen (Stratagene) coinfiziert wurden. Die cDNA-haltigen Plasmide wurden durch die Plattierung der infizierten Zellen auf festem Medium gewonnen, das für die Selektion der Zellen, die herausgeschnittenes pBK-Plasmid enthalten, mit 200 µg/ml Ampicillin ergänzt war.

[0552] In *E. coli*-XL-1-Blue-Zellen erfolgt die Expression der DNA, die die Luciferase in dem pBK-Plasmid codiert, unter der Kontrolle des lacZ-Promotors, dessen Transkription leicht durch die Zugabe von Isopropylthio-β-D-galactopyranosid (IPTG) zu dem Kulturmedium induziert wird oder das den Kolonien direkt in Sprayform oder in Form von anderen Aerosolen zugeführt werden kann.

2. Durchmusterung der cDNA-Bank

[0553] Für die Identifizierung der Klone, die eine *Gaussia*-Luciferase exprimieren, wurde ein funktionelles Durchmusterungsverfahren verwendet. Die cDNA-Plasmidbank, die in *E. coli*-XL-1 Blue-Zellen transformiert wurde, und einzelne Kolonien wurden durch die Plattierung eines Teils des Transformationsgemischs auf L-Broth-Platten erhalten, die mit 200 µg/ml Ampicillin und außerdem mit Ruß ergänzt waren, der die Hintergrundfluoreszenz absorbiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Ampicillin-Resistenz-Transformanten wurden mit einer 1 mM-IPTG-Lösung besprüht, um die Expression der Luciferase zu induzieren. Nachdem den Zellen Zeit gelassen worden war, die Luciferase zu exprimieren, wurde die Oberfläche der Platten mit einer Lösung besprüht, die 20 mM Coelenterazin enthielt, und die Kolonien, die blaues Licht emittieren, wurden unter Verwendung eines blauen Bandbreitfilters sichtbar gemacht.

[0554] Die Plasmid-DNA wurde aus den Kulturen der biolumineszierenden Transformanten isoliert, und die Nucleotidsequenz einer cDNA-Insertion eines positiven Klons wurde ermittelt. Die Nucleotidsequenz der DNA, die eine *Gaussia*-Luciferase voller Länge codiert, und die Aminosäuresequenz werden in SEQ ID NO: 19 und 20 offenbart. Das cDNA-Fragment, das die *Gaussia*-Luciferase codiert, hat eine Länge von 765 nt, eingeschlossen die 5'-nicht-codierende Region, ein offener Leserahmen von 455 nt, der ein Polypeptid aus 185 Aminosäuren codiert, und die 3'-nicht codierende Sequenz.

BEISPIEL 9

KLONIERUNG ZUSÄTZLICHER LUCIFERASE- UND GFP-PROTEINE

[0555] Unter Verwendung der in den vorherigen Beispielen beschriebenen Verfahren wurden eine Nucleinsäure erhalten, die ein GFP einer *Ptilosarcus*-Art (eine Seefeder, die aus der Cortez-See erhalten wurde) und eine Luciferase einer *Pleuromamma*-Art (ein Copepod) codiert. Die Sequenzen werden in SEQ ID NO: 28–32 offenbart. Die *Pleuromamma*-Luciferase wurde aus einer gemischten Copepod-Genbank von *Gaussia*- und *Pleuromamma* ("Riesen"-Calenoidcopepoden, ~6 mm bzw. 3 mm) kloniert. Die *Pleuromamma*-Luciferase wurde durch ihre grünere in vivo-Emission identifiziert.

[0556] Die Emissionsspektren und pH- und Salzkurven der codierten Proteine werden in den [Fig. 4–Fig. 6](#) und [Fig. 8–Fig. 10](#) bereitgestellt.

BEISPIEL 10

[0557] *Gaussia*-, *Renilla mulleri*- und *Pleuromamma*-Luciferase und *Renilla mulleri*- und *Ptilosarcus*-GFP sind kloniert worden. Verschiedene Nucleinsäurekonstrukte und Plasmide, die eine Nucleinsäure enthalten, die diese Proteine codiert, sind hergestellt worden und sind für die Expression der codierten Proteine für die Verwendung in Diagnostika, in analytischen Verfahren und in Novitäten, wie sie hier beschrieben wurden, verwendet worden.

Konstrukte

A. *Renilla mulleri*-Luciferase und GFP-codierende Konstrukte und Plasmide

[0558] Das Wirtsplasmid ist ein pBluescript SK(–)-Phagemid (Stratagene). Das gezeigte Konstrukt ist ein Konstrukt, das durch die funktionelle Durchmusterung einer großen Population von Phagemiden isoliert wurde, die von einer Massenexcision einer amplifizierten Lambda-Zap-cDNA-Bank (Stratagene) stammen. Alle hier beschriebenen klonierten Biolumineszenz-Gene wurden in einem ähnlichen Phagemid als eine Insertion zwischen der EcoRI-Stelle und der XhoI-Stelle der multiplen Klonierungsstelle (MCS) isoliert. Jede Insertion schließt DNA ein, die die gesamte codierende Region (CDS) des funktionellen Proteins sowie eine variable Zahl von Nucleotiden 5' und 3' der codierenden Region umfasst. Zusätzlich zu den Aminosäuren des nativen Proteins können die Polypeptide, die in den funktional durchgemusterten Isolaten exprimiert werden (hier die lacZ-*Renilla mulleri*-Luciferase-cDNA-Fusions-CDS oder die lacZ-*Renilla mulleri*-GFP-cDNA-Fusions-CDS), zusätzliche N-terminale Reste enthalten.

1) *Renilla mulleri*-Luciferase in pBluescript SK-(r) (4147 bp)

[0559] Eine lacZ-*Renilla mulleri*-Luciferase-CDS-Fusion (CDS = codierende Domänensequenz) wurde in das pBluescript SK-(r) (Stratagene) kloniert. Dieser wohlbekannte, im Handel erhältliche Vektor enthält unter anderem einen bakteriellen Replikationsursprung (ColE1-Ursprung), einen bakteriellen selektierbaren Marker (Ampicillin), einen Phagenreplikationsursprung (f1-Ursprung), T3-Primersequenz, T3-20-mer-Sequenz, NIH-Oligo-0495-Sequenz, T3-Promotor, SK-Primersequenz, T7-Promotor, KS-Primersequenz, T7-Primersequenz, T7-22-mer-Sequenz, NIH-oligo-0436-Sequenz, Phagen-Plasmid-PCR1-Sequenz, Phagen-Plasmid-PCR2-Sequenz, Phagen-Plasmid-PCR2(b)-Sequenz und verschiedene Restriktionsklonierungsstellen. Die Expression des lacZ-*Renilla mulleri*-Luciferase-Fusionsproteins erfolgt unter der Kontrolle des lacZ-Promotors.

2) *Renilla mulleri*-Luciferase in pBluescript SK (4147 bp)

[0560] Eine lacZ-*Renilla mulleri*-Luciferase-CDS-Fusion (CDS = codierende Domänensequenz) wurde in das pBluescript SK-(r) (Stratagene) kloniert, das unter anderem einen bakteriellen Replikationsursprung (ColE1-Ursprung), einen bakteriellen selektierbaren Marker (Ampicillin), einen Phagenreplikationsursprung (f1-Ursprung), T3-Primersequenz, T3-Promotor, SK-Primersequenz, T7-Promotor, KS-Primersequenz, T7-Primersequenz und verschiedene Restriktionsklonierungsstellen enthält. Die Expression des lacZ-*Renilla mulleri*-Luciferase-Fusionsproteins erfolgt unter der Kontrolle des lacZ-Promotors.

B. Plasmide für die Expression von nativem Renilla mulleri-GFP und nativer Renilla mulleri-Luciferase in Säugetierzellen

[0561] Die Renilla mulleri-GFP- oder Renilla mulleri-Luciferase-codierende Region wurde durch die Nucleinsäureamplifikation (PCR) amplifiziert, wobei eine EcoRI-Stelle und eine XhoI-Stelle unmittelbar 5' und 3' zur codierenden Sequenz beigefügt wird. Das PCR-Produkt wurde zwischen den EcoRI-XhoI-Stellen in den Polylinker von pcDNA3.1(+) (Invitrogen) inseriert und in Bakterien (z. B. XLI-Blue-Stamm, Stratagene) für den Zweck der Erzeugung großer Mengen von Plasmid-DNA transformiert. Diese Plasmide enthalten den CMV-Promotor (Pcmv), um die Expression in Säugetierzellen anzutreiben.

1) Renilla mulleri-GFP in pcDNA3.1(+) (6122 bp)

[0562] Eine Renilla mulleri-GFP-CDS wurde in das pcDNA3.1(+) (Invitrogen, San Diego) kloniert, das unter anderem einen bakteriellen Replikationsursprung (ColE1-Ursprung), einen bakteriellen selektierbaren Marker (Amp), einen Säugetier-selektierbaren Marker (Neo), einen Phagenreplikationsursprung (f1-Ursprung), einen viralen Replikationsursprung (SV40-Ursprung) und verschiedene Restriktionsklonierungsstellen enthält. Die Expression des Renilla mulleri-GFPs erfolgt unter der Kontrolle des CMV-Promotors.

2) Renilla mulleri-Luciferase in pcDNA3.1(+) (6341 bp)

[0563] Eine Renilla mulleri-Luciferase-CDS wurde in das pcDNA3.1(+) (Invitrogen, San Diego) kloniert, das unter anderem einen bakteriellen Replikationsursprung (ColE1-Ursprung), einen bakteriellen selektierbaren Marker (Amp), einen Säugetier-selektierbaren Marker (Neo), einen Phagenreplikationsursprung (f1-Ursprung), einen viralen Replikationsursprung (SV40-Ursprung) und verschiedene Restriktionsklonierungsstellen enthält. Die Expression der Renilla-mulleri-Luciferase erfolgt unter der Kontrolle durch den CMV-Promotor.

4. Plasmide, die für die Expression von nativem Renilla mulleri-GFP und von Renilla mulleri-Luciferase in Hefezellen verwendet werden.

[0564] Das Renilla mulleri-GFP oder die Renilla mulleri-Luciferase wurde PCR-amplifiziert und zwischen den Polylinker-EcoRI-XhoI-Stellen von pYES2 (Invitrogen) inseriert. Diese Plasmide sind für die Galactose-induzierbare Expression in Hefe unter der Regulation durch den GAL1-Promotor entwickelt worden.

1) Renilla mulleri-GFP in pYES2 (6547 bp)

[0565] Eine Renilla mulleri-GFP-CDS wurde in das Hefeexpressionsplasmid pYES2 (Invitrogen, San Diego) kloniert, das unter anderem einen bakteriellen Replikationsursprung (ColE1-Ursprung) einen bakteriellen selektierbaren Marker (Amp), einen Hefereplikationsursprung (2-Mikron-Ursprung), einen Hefe-selektierbaren Marker (URA3), einen Phagenreplikationsursprung (f1-Ursprung) und verschiedene Restriktionsklonierungsstellen enthält. Die Expression des Renilla mulleri-GFPs erfolgt unter der Kontrolle von Hefe-GAL1. Dieser Vektor ist für die Expression in *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen konzipiert.

2) Renilla mulleri-Luciferase in pYES2 (6766 bp)

[0566] Eine Renilla mulleri-Luciferase-CDS wurde in pYES2 (Invitrogen) kloniert, das unter anderem einen bakteriellen Replikationsursprung (ColE1-Ursprung), einen bakteriellen selektierbaren Marker (Amp), einen Hefereplikationsursprung (2-Mikron-Ursprung), einen Hefeselektierbaren Marker (URA3), einen Phagenreplikationsursprung (f1-Ursprung) und verschiedene Restriktionsklonierungsstellen enthält. Die Expression der Renilla mulleri-Luciferase erfolgt unter der Kontrolle durch Hefe-GAL1.

D. Plasmide, die für die Expression von nativem Renilla mulleri-GFP oder von Renilla mulleri-Luciferase in Bakterienzellen verwendet werden.

[0567] Unter Verwendung des pET-34 CBD-Renilla mulleri-Luciferase-Plasmids oder des pET-34-CBD-Renilla mulleri-GFP-Plasmids als Template wurde die inverse High-Fidelity-PCR angewendet, um die CBD und alle anderen codierenden Sequenzen 5' zu der nativen Renilla mulleri-Luciferase oder zum GFP-Startcodon präzise zu entfernen. Die Plasmide wurden wieder ringförmig gemacht und in BL21 (DE3)-Zellen eingeführt (Novagen, Madison, WI). Diese Plasmide sind so konzipiert, dass sie bei der Induktion mit IPTG große Mengen an Polypeptid mit natürlicher Länge exprimieren. In Abhängigkeit von der Beschaffenheit des exprimierten Polypeptids kann sich das Protein korrekt falten und sich in einer funktionsfähigen Form in dem Cytosol befinden

oder in das Kulturmedium freigesetzt werden. Wenn in dieser Weise exprimiert, wird für alle biolumineszierenden Proteine, die hier beschrieben werden, eine beträchtliche funktionale Aktivität beobachtet. Die *Gaussia-Luciferase* wird in das Kulturmedium freigesetzt.

1) Natives *Ptilosarcus*-GFP in pET-34 (6014 bp)

[0568] Eine *Ptilosarcus*-GFP-CDS wurde in pET-34 (Novagen) kloniert, das unter anderem einen bakteriellen Replikationsursprung (ColE1-Ursprung), einen bakteriellen selektierbaren Marker (Kan), einen Phagenreplikationsursprung (f1-Ursprung), *lacI*-Sequenz, T7-Promotor, *lac*-Operator, Ribosomenbindungssequenz (rbs), LIC-Stelle (ligation independent cloning), 3'-LIC-Überlappungssequenz, His-tag CDS, His-tag-Sequenz, T7-Terminator und verschiedene Restriktionsklonierungsstellen enthält. Die Expression des *Ptilosarcus*-GFPs erfolgt unter der gemeinsamen Kontrolle durch den *lac*-Operator und den T7-Promotor, der durch IPTG induzierbar ist.

2) Natives *Renilla mulleri*-GFP in pET-34 (6014 bp)

[0569] Eine *Renilla mulleri*-GFP-CDS wurde in pET-34 (Novagen) kloniert, das unter anderem einen bakteriellen Replikationsursprung (ColE1-Ursprung), einen bakteriellen selektierbaren Marker (Kan), einen Phagenreplikationsursprung (f1-Ursprung), *lacI*-Sequenz, T7-Promotor, *lac*-Operator, rbs, LIC-Stelle, 3'-LIC-Überlappungssequenz, His-tag-CDS, His-tag-Sequenz, T7-Terminator und verschiedene Restriktionsklonierungsstellen enthält. Die Expression des *Renilla mulleri*-GFPs erfolgt unter der gemeinsamen Kontrolle durch den *lac*-Operator und den T7-Promotor, der durch IPTG induzierbar ist.

3) Native *Gaussia-Luciferase* in pET-34 (5855 bp)

[0570] Eine *Gaussia-Luciferase*-CDS wurde in pET-34 (Novagen) kloniert, das unter anderem einen bakteriellen Replikationsursprung (ColE1-Ursprung), einen bakteriellen selektierbaren Marker (Kan), einen Phagenreplikationsursprung (f1-Ursprung), *lacI*-Sequenz, T7-Promotor, *lac*-Operator, rbs, LIC-Stelle, 3'-LIC-Überlappungssequenz, His-tag CDS, His-tag-Sequenz, T7-Terminator und verschiedene Restriktionsklonierungsstellen enthält. Die Expression der *Gaussia-Luciferase* erfolgt unter der gemeinsamen Kontrolle durch den *lac*-Operator und den T7-Promotor, der durch IPTG induzierbar ist.

4) Native *Pleuromamma-Luciferase* in pET-34 (5894 bp)

[0571] Eine *Pleuromamma-Luciferase*-CDS wurde in pET-34 (Novagen) kloniert, das unter anderem einen bakteriellen Replikationsursprung (ColE1-Ursprung), einen bakteriellen selektierbaren Marker (Kan), einen Phagenreplikationsursprung (f1-Ursprung), *lacI*-Sequenz, T7-Promotor, *lac*-Operator, rbs, LIC-Stelle, 3'-LIC-Überlappungssequenz, His-tag CDS, His-tag-Sequenz, T7-Terminator und verschiedene Restriktionsklonierungsstellen enthält. Die Expression der *Pleuromamma-Luciferase* erfolgt unter der gemeinsamen Kontrolle durch den *lac*-Operator und den T7-Promotor, der durch IPTG induzierbar ist.

5) Native *Renilla mulleri-Luciferase* in pET-34 (6233 bp)

[0572] Eine *Renilla mulleri-Luciferase*-CDS wurde in pET-34 (Novagen) kloniert, das unter anderem einen bakteriellen Replikationsursprung (ColE1-Ursprung), einen bakteriellen selektierbaren Marker (Kan), einen Phagenreplikationsursprung (f1-Ursprung), *lacI*-Sequenz, T7-Promotor, *lac*-Operator, rbs, LIC-Stelle, 3'-LIC-Überlappungssequenz, His-tag-CDS, His-tag-Sequenz, T7-Terminator und verschiedene Restriktionsklonierungsstellen enthält. Die Expression der *Renilla mulleri-Luciferase* erfolgt unter der gemeinsamen Kontrolle durch den *lac*-Operator und den T7-Promotor, der durch IPTG induzierbar ist.

5. Plasmide, verwendet für die Reinigung eines Cellulose-Bindungsdomäne-*Renilla mulleri-Luciferase*-Fusionsproteins oder Cellulose-Bindungsdomäne-*Renilla mulleri-GFP*-Fusionsproteins aus Bakterienzellen

[0573] Die codierende Region der *Renilla mulleri-Luciferase* oder des *Renilla mulleri-GFPs* wurde mit einer High Fidelity-Polymerase (Pfu turbo, Stratagene) unter Verwendung des klonierten pBluescript-Phagemids als Template amplifiziert und unter Verwendung einer Ligationsunabhängigen Klonierungsstelle (ligation independent cloning site – LIC-Stelle) in den pET-34-LIC-Vektor (Novagen) inseriert. Das resultierende CBD-*Luciferase*-Fusionsprotein (CBD = Cellulose-Bindungsdomäne) oder CBD-*GFP*-Fusionsprotein kann in hohem Ausmaß in BLI(DE3)-Zellen (Novagen) nach der Induktion mit IPTG exprimiert werden. Auf Grund der Beschaffenheit von CBD-clos bleibt der überwiegende Anteil des exprimierten Proteins in den unlöslichen Einschlusskör-

pern. Die Einschlusskörper können in halb reinem Zustand isoliert werden, und funktionsfähige CBD-Fusionsproteine können durch die Renaturierung zurückgewonnen werden. Der Einschluss der Thrombin- und der Enterokinase-(EK)-Spaltungsstelle in das Fusionsprotein erlaubt die Isolierung von hoch gereinigten nativen oder nahezu nativen Proteinen für die Zwecke der strengen Analyse.

1) CBD-Renilla mulleri-Luciferase in pET-34 (6824 bp)

[0574] Eine CBD-Renilla mulleri-Luciferase-CDS wurde in pET-34 (Novagen) kloniert, das unter anderem einen bakteriellen Replikationsursprung (ColE1-Ursprung), einen bakteriellen selektierbaren Marker (Kan), einen Phagenreplikationsursprung (f1-Ursprung), lacI-Sequenz, T7-Promotor, lac-Operator, rbs, LIC-Stelle, 3'-LIC-Überlappungssequenz, His-tag-CDS, His-tag-Sequenz, T7-Terminator, die Thrombinspaltungsstelle, RNase-S-peptid-Tag (S Tag) CDS-Sequenz, EK-Spaltungsstelle und verschiedene Restriktionsklonierungsstellen enthält. Die Expression der CBD-Renilla mulleri-Luciferase erfolgt unter der gemeinsamen Kontrolle durch den lac-Operator und den T7-Promotor, der durch IPTG induzierbar ist.

2) CBD-Gaussia-Luciferase in pET 34-(6446 bp)

[0575] Eine CBD-Gaussia-Luciferase-CDS wurde in pET-34 (Novagen) kloniert, das unter anderem einen bakteriellen Replikationsursprung (ColE1-Ursprung), einen bakteriellen selektierbaren Marker (Kan), einen Phagenreplikationsursprung (f1-Ursprung), lacI-Sequenz, T7-Promotor, lac-Operator, rbs, LIC-Stelle, 3'-LIC-Überlappungssequenz, His-Tag-CDS, His-Tag-Sequenz, T7-Terminator, die Thrombinspaltungsstelle, S-Tag-CDS-Sequenz, die EK-Spaltungsstelle und verschiedene Restriktionsklonierungsstellen enthält. Die Expression der CBD-Gaussia-Luciferase erfolgt unter der gemeinsamen Kontrolle durch den lac-Operator und den T7-Promotor, der durch IPTG induzierbar ist.

3) CBD-Pleuromamma-Luciferase in pET-34 (6485 bp)

[0576] Eine CBD-Pleuromamma-Luciferase-CDS wurde in pET-34 (Novagen) kloniert, das unter anderem einen bakteriellen Replikationsursprung (ColE1-Ursprung), einen bakteriellen selektierbaren Marker (Kan), einen Phagenreplikationsursprung (f1-Ursprung), lacI-Sequenz, T7-Promotor, lac-Operator, rbs-Sequenz, LIC-Stelle, 3'-LIC-Überlappungssequenz, His-Tag-CDS, His-Tag-Sequenz, T7-Terminator, die Thrombinspaltungsstelle, S-Tag-CDS-Sequenz, EK-Spaltungsstelle und verschiedene Restriktionsklonierungsstellen enthält. Die Expression der CBD-Pleuromamma-Luciferase erfolgt unter der gemeinsamen Kontrolle durch den lac-Operator und den T7-Promotor, der durch IPTG induzierbar ist.

4) CBD-Ptilosarcus-GFP in pET-34 (6605 bp)

[0577] Eine CBD-Ptilosarcus-GFP-CDS wurde in pET-34 (Novagen) kloniert, das unter anderem einen bakteriellen Replikationsursprung (ColE1-Ursprung), einen bakteriellen selektierbaren Marker (Kan), einen Phagenreplikationsursprung (f1-Ursprung), lacI-Sequenz, T7-Promotor, lac-Operator, rbs-Sequenz, LIC-Stelle, 3'-LIC-Überlappungssequenz, His-tag-CDS, His-Tag-Sequenz, T7-Terminator, Thrombinspaltungsstelle, S-Tag-CDS-Sequenz, EK-Spaltungsstelle und verschiedene Restriktionsklonierungsstellen enthält. Die Expression des CBD-Ptilosarcus-GFPs erfolgt unter der gemeinsamen Kontrolle durch den lac-Operator und den T7-Promotor, der durch IPTG induzierbar ist.

5) CBD-Renilla mulleri-GFP in pET-34 (6605 bp)

[0578] Eine CBD-Renilla mulleri-GFP-CDS wurde in pET-34 (Novagen) kloniert, das unter anderem einen bakteriellen Replikationsursprung (ColE1-Ursprung), einen bakteriellen selektierbaren Marker (Kan), einen Phagenreplikationsursprung (f1-Ursprung), lacI-Sequenz, T7-Promotor, lac-Operator, rbs-Sequenz, LIC-Stelle, 3'-LIC-Überlappungssequenz, His-Tag-CDS, His-Tag-Sequenz, T7-Terminator, Thrombinspaltungsstelle, S-Tag-CDS-Sequenz, EK-Spaltungsstelle und verschiedene Restriktionsklonierungsstellen enthält. Die Expression des CBD-Renilla mulleri-GFPs erfolgt unter der gemeinsamen Kontrolle durch den lac-Operator und den T7-Promotor, der durch IPTG induzierbar ist.

F. Plasmid für die Expression eines Renilla mulleri-Luciferase-GFP-Fusionsproteins

[0579] Wie in [Fig. 7](#) anschaulich dargestellt wurde das Renilla mulleri-GFP in die LIC-Stelle (LIC = ligation independent cloning) des pET-34-Vektors (Novagen) inseriert. Die CBD (Cellulose-Bindungsdomäne), die normalerweise in pET-34 vorhanden ist, wurde unter Verwendung der inversen PCR entfernt. Um die Optimierung

des resultierenden Fusionsproteins für die analytischen Verwendungen (wie für BRET) zu erleichtern, wurden zusätzliche Restriktionsstellen (nicht gezeigte) in die Linkerregion eingeführt, was die Insertion gewünschter Verbindungsproteine und Zielproteine oder -Reste ermöglicht. Unter Verwendung von zwei dieser Stellen wurde die Renilla mulleri-Luciferase-CDS in die Standardposition der CBD insertiert. In diesem Plasmid oder in ähnlichen Konstrukten, die die CBD beibehalten, kann nahezu natives und natives GFP vom Fusionsprotein durch die Behandlung mit Thrombin bzw. Enterokinase (EK) abgespalten werden. Das RNase-S-Peptid-Tag (S-Tag CDS) erleichtert die Reinigung des GFPs oder des Fusionsproteins durch Immunaффinität und ermöglicht die Quantifizierung dieser Proteine in Rohextrakten unter Verwendung eines kommerziellen RNase-Assays (Novagen). Falls die Luciferase getrennt in einem zweiten getrennten Plasmid mit dem S-Tag vereinigt wird, erzeugt die Assoziation oder die Coexpression von S-Protein/Luciferase und S-Protein/GFP über die RNase-Domäne ein Testsystem für den intermolekularen BRET.

G. Funktionsfähige Expression des Renilla mulleri-GFPs in Säugetierzellen

[0580] HeLa-Zellen wurden mit dem Plasmid pcDNA3.1(+) transfiziert, das das Renilla mulleri-GFP unter der Kontrolle eines CMV-Promotors (Konstrukt Nr. B(1) wie weiter oben beschrieben) enthält. HeLa-Zellen wurden mit 1,5 µg pcDNA3.1 pro Platte unter Verwendung des LipofectAMINE-plus-Kits (Gibco) "burst"-transfiziert.

[0581] Wenn HeLa-Zellen mit 30 µg pcDNA-Renilla mulleri-GFP-DNA "burst"-transfiziert und 8 h bei 37°C gezüchtet wurden, wurde eine Subpopulation von Zellen beobachtet, die eine starke Fluoreszenz zeigte. Die Fluoreszenz wurde bei Paaren von Zellen lokalisiert, die dabei waren, sich zu teilen oder die sich offensichtlich gerade einmal geteilt hatten. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass natives Renilla mulleri-GFP in Säugetierzellen korrekt exprimiert, gefaltet und mit dem Chromophor komplexiert werden kann und dass es seine Funktion, grünes Fluoreszenzlicht zu erzeugen, in Säugetierzellen behält. Dies ist anders als beim Aequorea-GFP, das unter den physiologischen Bedingungen ineffizient in die funktionsfähige Form gefaltet wird.

[0582] Die Filter (470/40-Anregungsfilter, dichroitischer 495-Anregungsfilter und 525/50-Emissionsfilter, die für das Sichtbarmachen der R. mulleri-GFP-Fluoreszenz in HeLa-Zellen verwendet wurden, gehörten zum Endo-GFP-Filtersatz, der von Chroma im Handel erhältlich ist.

Zusammenfassung des Sequenzprotokolls

1. SEQ ID NO: 1 Renilla reniformis-Luciferase [U.S.-Patent Nr. 5,418,155]
2. SEQ ID NO: 2 Cypridina hilgendorffii-Luciferase [EP 0 387 355]
3. SEQ ID NO: 3 modifizierte Luciola cruciata-Luciferase [Leuchtkäfer; U.S.-Patent Nr. 4,968,613]
4. SEQ ID NO: 4 Vargula (Cypridina)-Luciferase [Thompson et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6567–6571 und aus JP3-30678 Osaka]
5. SEQ ID NO: 5 Apoaequorin-codierendes Gen [U.S.-Patent Nr. 5,093,240, PAQ440]
6. SEQ ID NO: 6 codiertes Aequorin AEQ1 [Prasher et al. (1987) "Sequence Comparisons of cDNAs Encoding for Aequorin Isoforms," Biochemistry 26: 1326–1332]
7. SEQ ID NO: 7 codiertes Aequorin AEQ2 [Prasher et al. (1987)]
8. SEQ ID NO: 8 codiertes Aequorin AEQ3 [Prasher et al. (1987)]
9. SEQ ID NO: 9 Aequorin-Photoprotein [Charbonneau et al. (1985) "Amino Acid Sequence of the Calcium-Dependent Photoprotein Aequorin," Biochemistry 24: 6762–6771]
10. SEQ ID NO: 10 Aequorin-Mutante mit erhöhter Biolumineszenz-Aktivität [U.S.-Patent Nr. 5,360,728, Asp 124 ersetzt durch Ser]
11. SEQ ID NO: 11 Aequorin-Mutante mit erhöhter Biolumineszenz-Aktivität [U.S.-Patent Nr. 5,360,728, Glu 135 ersetzt durch Ser]
12. SEQ ID NO: 12 Aequorin-Mutante mit erhöhter Biolumineszenz-Aktivität [U.S.-Patent Nr. 5,360,728, Gly 129 ersetzt durch Ala]
13. SEQ ID NO: 13 codiertes Apoaequorin [im Handel erhältlich von Sealite, Sciences, Bogart, GA als AQUA-LITE®, wenn rekonstituiert Bildung von Aequorin].
14. SEQ ID NO: 14 Vibrio fischeri-Flavinreduktase [U.S.-Patent Nr. 5,484,723]
15. SEQ ID NO: 15 Nucleinsäure, die das grün fluoreszierende Protein (GFP) von Renilla mulleri codiert
16. SEQ ID NO: 16 codiertes grün fluoreszierendes Protein (GFP) von Renilla mulleri
17. SEQ ID NO: 17 Nucleinsäure, die Renilla mulleri-Luciferase codiert
18. SEQ ID NO: 18 codierte Renilla mulleri-Luciferase
19. SEQ ID NO: 19 Nucleinsäure, die eine Gaussia-Luciferase codiert
20. SEQ ID NO: 20 Codierte Gaussia-Luciferase
21. SEQ ID NO: 21 Nucleinsäure, die ein Gaussia-Luciferase-Fusionsprotein codiert

22. SEQ ID NO: 22 Codiertes Gaussia-Luciferase-Fusionsprotein
23. SEQ ID NO: 23 Renilla reniformis-GFP-Peptid, das Aminosäuresequenzen in der Nähe des Amino-Terminus des R. mulleri-GFPs entspricht
24. SEQ ID NO: 24 Renilla reniformis-GFP-Peptid, das Aminosäuresequenzen in der Nähe des Amino-Terminus des R. mulleri-GFPs entspricht
25. SEQ ID NO: 25 Renilla reniformis-GFP-Peptid, das Aminosäuresequenzen in der Nähe der Mitte des R. mulleri-GFPs entspricht
26. SEQ ID NO: 26 Renilla reniformis-GFP-Peptid, das Aminosäuresequenzen in der Nähe der Mitte des R. mulleri-GFPs entspricht
27. SEQ ID NO: 27 Renilla reniformis-GFP-Peptid, das Aminosäuresequenzen in der Nähe des Carboxy-Terminus des Renilla mulleri-GFPs entspricht
28. SEQ ID NO: 28 Pleuromamma-Luciferase\Insertion 861 bp
29. SEQ ID NO: 29 codierte Pleuromamma-Luciferase 198 AS
30. SEQ ID NO: 30 Ptilosarcus-GFP\Insertion A\1104 bp
31. SEQ ID NO: 31 Ptilosarcus-GFP\Insertion B\1279 bp
32. SEQ ID NO: 32 Ptilosarcus-GFP 238 AS

SEQUENZLISTE

- (1) ALLGEMEINE INFORMATIONEN
- (i) ANMELDER:
- (A) NAME: PROLUME, LTD.
 - (B) STRASSE: 1085 William Pitt Way
 - (D) STAAT: Pennsylvania
 - (D) Land: USA
 - (E) POSTLEITZAHL (ZIP): 15236
- (i) ERFINDER/ANMELDER:
- (A) NAME: Bryan, Bruce
 - (B) STRASSE: 716 Arden Drive
 - (C) Stadt: Beverly Hills
 - (D) STAAT: Kalifornien
 - (D) Land: USA
 - (E) POSTLEITZAHL (ZIP): 90210
- (i) ERFINDER/ANMELDER:
- (A) NAME: Szent-Gyorgyi, Christopher
 - (B) STRASSE: 719 Duncan Avenue
 - (C) STADT: Pittsburgh
 - (D) STAAT: Pennsylvania
 - (D) LAND: USA
 - (E) POSTLEITZAHL (ZIP): 15237
- (ii) TITEL DER ERFINDUNG: LUCIFERASES, FLUORESCENT PROTEINS, NUCLEIC ACIDS ENCODING THE LUCIFERASES AND FLUORESCENT PROTEINS AND THE USE THEREOF IN DIAGNOSTICS, HIGH THROUGHPUT SCREENING AND NOVELTY ITEMS
- (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 32
- (iv) KORRESPONDENZADRESSE:
- (A) ADRESSAT: Heller Ehrman White & McAuliffe
 - (B) STRASSE: 4250 Executive Square, 7th Floor
 - (C) Stadt: La Jolla
 - (D) STAAT: CA
 - (D) Land: USA
 - (E) ZIP: 92037
- (v) COMPUTER-LESBARE FORM:
- (A) MEDIUM-TYP
 - (B) COMPUTER: IBM-kompatibel
 - (C) BETRIEBSSYSTEM: DOS
 - (D) SOFTWARE: FastSEQ Version 1.5 und ASCII
- (vi) AKTUELLE ANMELDEDATEN
- (A) ANMELDUNGSNUMMER:
 - (B) TAG DER EINREICHUNG: 2. MÄRZ 1999

- (C) Klassifikation
- (vii) DATEN ZUR PRIORITÄTSANMELDUNG:
 (A) ANMELDUNGSNUMMER: 60/102, 939
 (B) TAG DER EINREICHUNG: 1. OKTOBER 1998
- (vii) DATEN ZUR PRIORITÄTSANMELDUNG:
 (A) ANMELDUNGSNUMMER: 60/089, 367
 (B) TAG DER EINREICHUNG: 15. JUNI 1998
- (vii) DATEN ZUR PRIORITÄTSANMELDUNG:
 (A) ANMELDUNGSNUMMER: 60/079, 624
 (B) TAG DER EINREICHUNG: 27. MÄRZ 1998
- (viii) INFORMATIONEN ZUM ANWALT/VERTRETER
 (A) NAME: Seidman, Stephanie L
 (B) REGISTRIERUNGSNUMMER: 33,779
 (C) REFERENZ/AKTENNUMMER: 24729-P121
- (ix) TELEKOMUNIKATIONSINFORMATIONEN:
 (A) TELEFON: 619 450-8400
 (B) TELEFAX: 619-450-8499
 (C) TELEX:
- (2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO: 1:
- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 1196 Basenpaare
 (B) TYP: Nucleinsäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig
 (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
- (vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:
- (ix) MERKMAL:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: Codierende Sequenz
 (B) ORT: 1 ... 942
 (D) ANDERE INFORMATIONEN: Renilla reniformis-Luciferase
- (x) INFORMATIONEN ZUR VERÖFFENTLICHUNG:
 PATENT NR.: 5,418,155
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:1:
- | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| AGC | TTA | AAG | ATG | ACT | TCG | AAA | GTT | TAT | GAT | CCA | GAA | CAA | AGG | AAA | CGG | 48 |
| Ser | Leu | Lys | Met | Thr | Ser | Lys | Val | Tyr | Asp | Pro | Glu | Gln | Arg | Lys | Arg | |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | | |
| ATG | ATA | ACT | GGT | CCG | CAG | TGG | TGG | GCC | AGA | TGT | AAA | CAA | ATG | AAT | GTT | 96 |
| Met | Ile | Thr | Gly | Pro | Gln | Trp | Trp | Ala | Arg | Cys | Lys | Gln | Met | Asn | Val | |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | | |
| CTT | GAT | TCA | TTT | ATT | AAT | TAT | TAT | GAT | TCA | GAA | AAA | CAT | GCA | GAA | AAT | 144 |
| Leu | Asp | Ser | Phe | Ile | Asn | Tyr | Tyr | Asp | Ser | Glu | Lys | His | Ala | Glu | Asn | |
| | | 35 | | | | 40 | | | | | | 45 | | | | |
| GCT | GTT | ATT | TTT | TTA | CAT | GGT | AAC | GCG | GCC | TCT | TCT | TAT | TTA | TGG | CGA | 192 |
| Ala | Val | Ile | Phe | Leu | His | Gly | Asn | Ala | Ala | Ser | Ser | Tyr | Leu | Trp | Arg | |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | | |
| CAT | GTT | GTG | CCA | CAT | ATT | GAG | CCA | GTA | GCG | CGG | TGT | ATT | ATA | CCA | GAT | 240 |
| His | Val | Val | Pro | His | Ile | Glu | Pro | Val | Ala | Arg | Cys | Ile | Ile | Pro | Asp | |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 | |

CTT ATT GGT ATG GGC AAA TCA GGC AAA TCT GGT AAT GGT TCT TAT AGG	288
Leu Ile Gly Met Gly Lys Ser Gly Lys Ser Gly Asn Gly Ser Tyr Arg	
85 90 95	
TTA CTT GAT CAT TAC AAA TAT CTT ACT GCA TGG TTG AAC TTC TTA ATT	336
Leu Leu Asp His Tyr Lys Tyr Leu Thr Ala Trp Leu Asn Phe Leu Ile	
100 105 110	
TAC CAA AGA AGA TCA TTT TTT GTC GGC CAT GAT TGG GGT GCT TGT TTG	384
Tyr Gln Arg Arg Ser Phe Phe Val Gly His Asp Trp Gly Ala Cys Leu	
115 120 125	
GCA TTT CAT TAT AGC TAT GAG CAT CAA GAT AAG ATC AAA GCA ATA GTT	432
Ala Phe His Tyr Ser Tyr Glu His Gln Asp Lys Ile Lys Ala Ile Val	
130 135 140	
CAC GCT GAA AGT GTA GTA GAT GTG ATT GAA TCA TGG GAT GAA TGG CCT	480
His Ala Glu Ser Val Val Asp Val Ile Glu Ser Trp Asp Glu Trp Pro	
145 150 155 160	
GAT ATT GAA GAA GAT ATT GCG TTG ATC AAA TCT GAA GAA GGA GAA AAA	528
Asp Ile Glu Glu Asp Ile Ala Leu Ile Lys Ser Glu Glu Gly Glu Lys	
165 170 175	
ATG GTT TTG GAG AAT AAC TTC TTC GTG GAA ACC ATG TTG CCA TCA AAA	576
Met Val Leu Glu Asn Asn Phe Phe Val Glu Thr Met Leu Pro Ser Lys	
180 185 190	
ATC ATG AGA AAG TTA GAA CCA GAA GAA TTT GCA GCA TAT CTT GAA CCA	624
Ile Met Arg Lys Leu Glu Pro Glu Glu Phe Ala Ala Tyr Leu Glu Pro	
195 200 205	
TTC AAA GAG AAA GGT GAA GTT CGT CGT CCA ACA TTA TCA TGG CCT CGT	672
Phe Lys Glu Lys Gly Glu Val Arg Arg Pro Thr Leu Ser Trp Pro Arg	
210 215 220	
GAA ATC CCG TTA GTA AAA GGT GGT AAA CCT GAC GTT GTA CAA ATT GTT	720
Glu Ile Pro Leu Val Lys Gly Gly Lys Pro Asp Val Val Gln Ile Val	
225 230 235 240	
AGG AAT TAT AAT GCT TAT CTA CGT GCA AGT GAT GAT TTA CCA AAA ATG	768
Arg Asn Tyr Asn Ala Tyr Leu Arg Ala Ser Asp Asp Leu Pro Lys Met	
245 250 255	
TTT ATT GAA TCG GAT CCA GGA TTC TTT TCC AAT GCT ATT GTT GAA GGC	816
Phe Ile Glu Ser Asp Pro Gly Phe Phe Ser Asn Ala Ile Val Glu Gly	
260 265 270	
GCC AAG AAG TTT CCT AAT ACT GAA TTT GTC AAA GTA AAA GGT CTT CAT	864
Ala Lys Lys Phe Pro Asn Thr Glu Phe Val Lys Val Lys Gly Leu His	
275 280 285	
TTT TCG CAA GAA GAT GCA CCT GAT GAA ATG GGA AAA TAT ATC AAA TCG	912
Phe Ser Gln Glu Asp Ala Pro Asp Glu Met Gly Lys Tyr Ile Lys Ser	
290 295 300	
TTC GTT GAG CGA GTT CTC AAA AAT GAA CAA TAA TTA CTT TGGT TTTTATTTA	965
Phe Val Glu Arg Val Leu Lys Asn Glu Gln	
305 310	
CATTTTCCC GGGTTTAATA ATATAAATGT CATTTTCAAC AATTTTATTT TAACTGAATA	1025

TTTCACAGGG AACATTCATA TATGTTGATT AATTTAGCTC GAACTTTACT CTGTCATATC 1085
 ATTTTGGAAAT ATTACCTCTT TCAATGAAAC TTTATAAACA GTGGTTCAAT TAATTAATAT 1145
 ATATTATAAT TACATTTGTT ATGTAATAAA CTCGGTTTA TTATAAAAAA A 1196

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 1822 Basenpaare
 (B) TYP: Nucleinsäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Codierende Sequenz
 (B) ORT: 1 ... 1665
 (D) ANDERE INFORMATIONEN: Cypridina hilgendorffii-Luciferase

(x) INFORMATIONEN ZUR VERÖFFENTLICHUNG:

PATENT NR.: EP 0 387 3535 TORAY

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

ATG	AAG	CTA	ATA	ATT	CTG	TCT	ATT	ATA	TTG	GCC	TAC	TGT	GTC	ACA	GTC	48
Met	Lys	Leu	Ile	Ile	Leu	Ser	Ile	Ile	Leu	Ala	Tyr	Cys	Val	Thr	Val	
1			5					10					15			
AAC	TGC	CAG	GAT	GCA	TGT	CCT	GTA	GAA	GCT	GAA	GCA	CCG	TCA	AGT	ACA	96
Asn	Cys	Gln	Asp	Ala	Cys	Pro	Val	Glu	Ala	Glu	Ala	Pro	Ser	Ser	Thr	
		20						25				30				
CCA	ACA	GTC	CCA	ACA	TCT	TGT	GAA	GCT	AAA	GAA	GGA	GAA	TGT	ATC	GAT	144
Pro	Thr	Val	Pro	Thr	Ser	Cys	Glu	Ala	Lys	Glu	Gly	Glu	Cys	Ile	Asp	
		35					40					45				
ACC	AGA	TGC	GCA	ACA	TGT	AAA	CGA	GAC	ATA	CTA	TCA	GAC	GGA	CTG	TGT	192
Thr	Arg	Cys	Ala	Thr	Cys	Lys	Arg	Asp	Ile	Leu	Ser	Asp	Gly	Leu	Cys	
	50					55					60					
GAA	AAT	AAA	CCA	GGG	AAG	ACA	TGC	TGT	AGA	ATG	TGC	CAG	TAT	GTA	ATT	240
Glu	Asn	Lys	Pro	Gly	Lys	Thr	Cys	Cys	Arg	Met	Cys	Gln	Tyr	Val	Ile	
65				70					75					80		
GAA	TCC	AGA	GTA	GAA	GCT	GCT	GGA	TAT	TTT	AGA	ACG	TTT	TAC	GCC	AAA	288
Glu	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Ala	Gly	Tyr	Phe	Arg	Thr	Phe	Tyr	Ala	Lys	
			85					90						95		
AGA	TTT	AAT	TTT	CAG	GAA	CCT	GGT	AAA	TAT	GTG	CTG	GCT	CGA	GGA	ACC	336
Arg	Phe	Asn	Phe	Gln	Glu	Pro	Gly	Lys	Tyr	Val	Leu	Ala	Arg	Gly	Thr	
			100					105					110			
AAG	GGT	GGC	GAC	TGG	TCT	GTA	ACC	CTC	ACC	ATG	GAG	AAT	CTA	GAT	GGA	384
Lys	Gly	Gly	Asp	Trp	Ser	Val	Thr	Leu	Thr	Met	Glu	Asn	Leu	Asp	Gly	
		115					120					125				
CAG	AAG	GGA	GCT	GTA	CTG	ACT	AAG	ACA	ACA	CTG	GAG	GTA	GTA	GGA	GAC	432
Gln	Lys	Gly	Ala	Val	Leu	Thr	Lys	Thr	Thr	Leu	Glu	Val	Val	Gly	Asp	
		130					135				140					

GTA	ATA	GAC	ATT	ACT	CAA	GCT	ACT	GCA	GAT	CCT	ATC	ACA	GTT	AAC	GGA	480
Val	Ile	Asp	Ile	Thr	Gln	Ala	Thr	Ala	Asp	Pro	Ile	Thr	Val	Asn	Gly	
145					150					155					160	
GGA	GCT	GAC	CCA	GTT	ATC	GCT	AAC	CCG	TTC	ACA	ATT	GGT	GAG	GTG	ACC	528
Gly	Ala	Asp	Pro	Val	Ile	Ala	Asn	Pro	Phe	Thr	Ile	Gly	Glu	Val	Thr	
				165					170					175		
ATT	GCT	GTT	GTC	GAA	ATA	CCC	GGC	TTC	AAT	ATT	ACA	GTC	ATC	GAA	TTC	576
Ile	Ala	Val	Val	Glu	Ile	Pro	Gly	Phe	Asn	Ile	Thr	Val	Ile	Glu	Phe	
			180					185					190			
TTT	AAA	CTA	ATC	GTG	ATA	GAT	ATT	CTG	GGA	GGA	AGA	TCT	GTG	AGA	ATT	624
Phe	Lys	Leu	Ile	Val	Ile	Asp	Ile	Leu	Gly	Gly	Arg	Ser	Val	Arg	Ile	
	195					200					205					
GCT	CCA	GAC	ACA	GCA	AAC	AAA	GGA	CTG	ATA	TCT	GGT	ATC	TGT	GGT	AAT	672
Ala	Pro	Asp	Thr	Ala	Asn	Lys	Gly	Leu	Ile	Ser	Gly	Ile	Cys	Gly	Asn	
	210					215					220					
CTG	GAG	ATG	AAT	GAC	GCT	GAT	GAC	TTT	ACT	ACA	GAC	GCA	GAT	CAG	CTG	720
Leu	Glu	Met	Asn	Asp	Ala	Asp	Asp	Phe	Thr	Thr	Asp	Ala	Asp	Gln	Leu	
225					230					235					240	
GCG	ATC	CAA	CCC	AAC	ATA	AAC	AAA	GAG	TTC	GAC	GGC	TGC	CCA	TTC	TAC	768
Ala	Ile	Gln	Pro	Asn	Ile	Asn	Lys	Glu	Phe	Asp	Gly	Cys	Pro	Phe	Tyr	
				245					250					255		
GGG	AAT	CCT	TCT	GAT	ATC	GAA	TAC	TGC	AAA	GGT	CTC	ATG	GAG	CCA	TAC	816
Gly	Asn	Pro	Ser	Asp	Ile	Glu	Tyr	Cys	Lys	Gly	Leu	Met	Glu	Pro	Tyr	
			260					265					270			
AGA	GCT	GTA	TGT	CGT	AAC	AAT	ATC	AAC	TTC	TAC	TAT	TAC	ACT	CTG	TCC	864
Arg	Ala	Val	Cys	Arg	Asn	Asn	Ile	Asn	Phe	Tyr	Tyr	Tyr	Thr	Leu	Ser	
		275					280						285			
TGC	GCC	TTC	GCT	TAC	TGT	ATG	GGA	GGA	GAA	GAA	AGA	GCT	AAA	CAC	GTC	912
Cys	Ala	Phe	Ala	Tyr	Cys	Met	Gly	Gly	Glu	Glu	Arg	Ala	Lys	His	Val	
	290					295					300					
CTT	TTC	GAC	TAT	GTT	GAG	ACA	TGC	GCT	GCA	CCG	GAA	ACG	AGA	GGA	ACG	960
Leu	Phe	Asp	Tyr	Val	Glu	Thr	Cys	Ala	Ala	Pro	Glu	Thr	Arg	Gly	Thr	
305					310					315					320	
TGT	GTT	TTA	TCA	GGA	CAT	ACT	TTC	TAT	GAC	ACA	TTC	GAC	AAA	GCC	AGA	1008
Cys	Val	Leu	Ser	Gly	His	Thr	Phe	Tyr	Asp	Thr	Phe	Asp	Lys	Ala	Arg	
				325					330					335		
TAT	CAA	TTC	CAG	GGC	CCA	TGC	AAA	GAG	CTT	CTG	ATG	GCC	GCA	GAC	TGT	1056
Tyr	Gln	Phe	Gln	Gly	Pro	Cys	Lys	Glu	Leu	Leu	Met	Ala	Ala	Asp	Cys	
			340					345					350			
TAC	TGG	AAC	ACA	TGG	GAT	GTA	AAG	GTT	TCA	CAT	AGA	GAT	GTT	GAG	TCA	1104
Tyr	Trp	Asn	Thr	Trp	Asp	Val	Lys	Val	Ser	His	Arg	Asp	Val	Glu	Ser	
		355					360					365				
TAC	ACT	GAG	GTA	GAG	AAA	GTA	ACA	ATC	AGG	AAA	CAG	TCA	ACT	GTA	GTA	1152
Tyr	Thr	Glu	Val	Glu	Lys	Val	Thr	Ile	Arg	Lys	Gln	Ser	Thr	Val	Val	
	370					375					380					
GAT	TTG	ATT	GTG	GAT	GGC	AAG	CAG	GTC	AAG	GTT	GGA	GGA	GTG	GAT	GTA	1200

Asp 385	Leu	Ile	Val	Asp	Gly 390	Lys	Gln	Val	Lys	Val 395	Gly	Gly	Val	Asp	Val 400	
TCT	ATC	CCG	TAC	AGT	TCT	GAG	AAC	ACA	TCC	ATA	TAC	TGG	CAG	GAT	GGA	1248
Ser	Ile	Pro	Tyr	Ser	Ser	Glu	Asn	Thr	Ser	Ile	Tyr	Trp	Gln	Asp	Gly	
				405					410					415		
GAC	ATC	CTG	ACG	ACG	GCC	ATC	CTA	CCT	GAA	GCT	CTT	GTC	GTT	AAG	TTC	1296
Asp	Ile	Leu	Thr	Thr	Ala	Ile	Leu	Pro	Glu	Ala	Leu	Val	Val	Lys	Phe	
			420					425					430			
AAC	TTT	AAG	CAG	CTC	CTT	GTA	GTT	CAT	ATC	AGA	GAT	CCA	TTC	GAT	GGA	1344
Asn	Phe	Lys	Gln	Leu	Leu	Val	Val	His	Ile	Arg	Asp	Pro	Phe	Asp	Gly	
		435					440					445				
AAG	ACA	TGC	GGC	ATA	TGT	GGT	AAC	TAT	AAT	CAA	GAT	TCA	ACT	GAT	GAT	1392
Lys	Thr	Cys	Gly	Ile	Cys	Asn	Asn	Tyr	Asn	Gln	Asp	Ser	Thr	Asp	Asp	
		450				455					460					
TTC	TTT	GAC	GCA	GAA	GGA	GCA	TGC	GCT	CTG	ACC	CCC	AAT	CCC	CCA	GGA	1440
Phe	Phe	Asp	Ala	Glu	Gly	Ala	Cys	Ala	Leu	Thr	Pro	Asn	Pro	Pro	Gly	
465					470					475					480	
TGT	ACA	GAG	GAG	CAG	AAA	CCA	GAA	GCT	GAG	CGA	CTC	TGC	AAT	AGT	CTA	1488
Cys	Thr	Glu	Glu	Gln	Lys	Pro	Glu	Ala	Glu	Arg	Leu	Cys	Asn	Ser	Leu	
				485					490					495		
TTT	GAT	AGT	TCT	ATC	GAC	GAG	AAA	TGT	AAT	GTC	TGC	TAC	AAG	CCT	GAC	1536
Phe	Asp	Ser	Ser	Ile	Asp	Glu	Lys	Cys	Asn	Val	Cys	Tyr	Lys	Pro	Asp	
			500					505					510			
CGT	ATT	GCA	CGA	TGT	ATG	TAC	GAG	TAT	TGC	CTG	AGG	GGA	CAG	CAA	GGA	1584
Arg	Ile	Ala	Arg	Cys	Met	Tyr	Glu	Tyr	Cys	Leu	Arg	Gly	Gln	Gln	Gly	
		515					520					525				
TTC	TGT	GAC	CAT	GCT	TGG	GAG	TTC	AAA	AAA	GAA	TGC	TAC	ATA	AAG	CAT	1632
Phe	Cys	Asp	His	Ala	Trp	Glu	Phe	Lys	Lys	Glu	Cys	Tyr	Ile	Lys	His	
	530					535					540					
GGA	GAC	ACT	CTA	GAA	GTA	CCA	CCT	GAA	TGC	CAA	TAA	ATGAACAAAG				1678
Gly	Asp	Thr	Leu	Glu	Val	Pro	Pro	Glu	Cys	Gln						
545				550						555						
ATACAGAAGC TAAGACTACT ACAGCAGAAG ATAAAAGAGA AGCTGTAGTT CTTCAAAAAC															1738	
AGTATATTTT GATGACTCA TTGTTTACTT ACATAAAAAT AAATTGTTAT TATCATAACG															1798	
TAAAGAAAAA AAAAAAAAAA AAAA															1822	

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO: 3:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 1644 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
- (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: Codierende Sequenz
 - (B) ORT: 1 ... 1644

(D) ANDERE INFORMATIONEN: *Luciola cruciata*-Luciferase (Leuchtkäfer)

(x) INFORMATIONEN ZUR VERÖFFENTLICHUNG:

PATENT NR.: 4,968,613

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

ATG	GAA	AAC	ATG	GAA	AAC	GAT	GAA	AAT	ATT	GTA	GTT	GGA	CCT	AAA	CCG	48
Met	Glu	Asn	Met	Glu	Asn	Asp	Glu	Asn	Ile	Val	Val	Gly	Pro	Lys	Pro	
1				5					10					15		
TTT	TAC	CCT	ATC	GAA	GAG	GGA	TCT	GCT	GGA	ACA	CAA	TTA	CGC	AAA	TAC	96
Phe	Tyr	Pro	Ile	Glu	Glu	Gly	Ser	Ala	Gly	Thr	Gln	Leu	Arg	Lys	Tyr	
			20					25					30			
ATG	GAG	CGA	TAT	GCA	AAA	CTT	GGC	GCA	ATT	GCT	TTT	ACA	AAT	GCA	GTT	144
Met	Glu	Arg	Tyr	Ala	Lys	Leu	Gly	Ala	Ile	Ala	Phe	Thr	Asn	Ala	Val	
		35					40					45				
ACT	GGT	GTT	GAT	TAT	TCT	TAC	GCC	GAA	TAC	TTG	GAG	AAA	TCA	TGT	TGT	192
Thr	Gly	Val	Asp	Tyr	Ser	Tyr	Ala	Glu	Tyr	Leu	Glu	Lys	Ser	Cys	Cys	
	50					55					60					
CTA	GGA	AAA	GCT	TTG	CAA	AAT	TAT	GGT	TTG	GTT	GTT	GAT	GGC	AGA	ATT	240
Leu	Gly	Lys	Ala	Leu	Gln	Asn	Tyr	Gly	Leu	Val	Val	Asp	Gly	Arg	Ile	
65				70					75						80	
GCG	TTA	TGC	AGT	GAA	AAC	TGT	GAA	GAA	TTT	TTT	ATT	CCT	GTA	ATA	GCC	288
Ala	Leu	Cys	Ser	Glu	Asn	Cys	Glu	Glu	Phe	Phe	Ile	Pro	Val	Ile	Ala	
				85					90					95		
GGA	CTG	TTT	ATA	GGT	GTA	GGT	GTT	GCA	CCC	ACT	AAT	GAG	ATT	TAC	ACT	336
Gly	Leu	Phe	Ile	Gly	Val	Gly	Val	Ala	Pro	Thr	Asn	Glu	Ile	Tyr	Thr	
			100					105					110			
TTA	CGT	GAA	CTG	GTT	CAC	AGT	TTA	GGT	ATC	TCT	AAA	CCA	ACA	ATT	GTA	384
Leu	Arg	Glu	Leu	Val	His	Ser	Leu	Gly	Ile	Ser	Lys	Pro	Thr	Ile	Val	
		115						120				125				
TTT	AGT	TCT	AAA	AAA	GGC	TTA	GAT	AAA	GTT	ATA	ACA	GTA	CAG	AAA	ACA	432
Phe	Ser	Ser	Lys	Lys	Gly	Leu	Asp	Lys	Val	Ile	Thr	Val	Gln	Lys	Thr	
	130					135					140					
GTA	ACT	ACT	ATT	AAA	ACC	ATT	GTT	ATA	CTA	GAT	AGC	AAA	GTT	GAT	TAT	480
Val	Thr	Thr	Ile	Lys	Thr	Ile	Val	Ile	Leu	Asp	Ser	Lys	Val	Asp	Tyr	
145				150						155				160		
CGA	GGA	TAT	CAA	TGT	CTG	GAC	ACC	TTT	ATA	AAA	AGA	AAC	ACT	CCA	CCA	528
Arg	Gly	Tyr	Gln	Cys	Leu	Asp	Thr	Phe	Ile	Lys	Arg	Asn	Thr	Pro	Pro	
				165					170					175		
GGT	TTT	CAA	GCA	TCC	AGT	TTC	AAA	ACT	GTG	GAA	GTT	GAC	CGT	AAA	GAA	576
Gly	Phe	Gln	Ala	Ser	Ser	Phe	Lys	Thr	Val	Glu	Val	Asp	Arg	Lys	Glu	
			180					185					190			
CAA	GTT	GCT	CTT	ATA	ATG	AAC	TCT	TCG	GGT	TCT	ACC	GGT	TTG	CCA	AAA	624
Gln	Val	Ala	Leu	Ile	Met	Asn	Ser	Ser	Gly	Ser	Thr	Gly	Leu	Pro	Lys	
		195					200					205				
GGC	GTA	CAA	CTT	ACT	CAC	GAA	AAT	ACA	GTC	ACT	AGA	TTT	TCT	CAT	GCT	672

Gly	Val	Gln	Leu	Thr	His	Glu	Asn	Thr	Val	Thr	Arg	Phe	Ser	His	Ala		
210						215					220						
AGA	GAT	CCG	ATT	TAT	GGT	AAC	CAA	GTT	TCA	CCA	GGC	ACC	GCT	GTT	TTA	720	
Arg	Asp	Pro	Ile	Tyr	Gly	Asn	Gln	Val	Ser	Pro	Gly	Thr	Ala	Val	Leu		
225					230					235					240		
ACT	GTC	GTT	CCA	TTC	CAT	CAT	GGT	TTT	GGT	ATG	TTC	ACT	ACT	CTA	GGG	768	
Thr	Val	Val	Pro	Phe	His	His	Gly	Phe	Gly	Met	Phe	Thr	Thr	Leu	Gly		
				245					250					255			
TAT	TTA	ATT	TGT	GGT	TTT	CGT	GTT	GTA	ATG	TTA	ACA	AAA	TTC	GAT	GAA	816	
Tyr	Leu	Ile	Cys	Gly	Phe	Arg	Val	Val	Met	Leu	Thr	Lys	Phe	Asp	Glu		
			260						265					270			
GAA	ACA	TTT	TTA	AAA	ACT	CTA	CAA	GAT	TAT	AAA	TGT	ACA	AGT	GTT	ATT	864	
Glu	Thr	Phe	Leu	Lys	Thr	Leu	Gln	Asp	Tyr	Lys	Cys	Thr	Ser	Val	Ile		
		275					280					285					
CTT	GTA	CCG	ACC	TTG	TTT	GCA	ATT	CTC	AAC	AAA	AGT	GAA	TTA	CTC	AAT	912	
Leu	Val	Pro	Thr	Leu	Phe	Ala	Ile	Leu	Asn	Lys	Ser	Glu	Leu	Leu	Asn		
	290					295					300						
AAA	TAC	GAT	TTG	TCA	AAT	TTA	GTT	GAG	ATT	GCA	TCT	GGC	GGA	GCA	CCT	960	
Lys	Tyr	Asp	Leu	Ser	Asn	Leu	Val	Glu	Ile	Ala	Ser	Gly	Gly	Ala	Pro		
305					310					315					320		
TTA	TCA	AAA	GAA	GTT	GGT	GAA	GCT	GTT	GCT	AGA	CGC	TTT	AAT	CTT	CCC	1008	
Leu	Ser	Lys	Glu	Val	Gly	Glu	Ala	Val	Ala	Arg	Arg	Phe	Asn	Leu	Pro		
				325					330						335		
GGT	GTT	CGT	CAA	GGT	TAT	GGT	TTA	ACA	GAA	ACA	ACA	TCT	GCC	ATT	ATT	1056	
Gly	Val	Arg	Gln	Gly	Tyr	Gly	Leu	Thr	Glu	Thr	Thr	Ser	Ala	Ile	Ile		
			340					345					350				
ATT	ACA	CCA	GAA	GGA	GAC	GAT	AAA	CCA	GGA	GCT	TCT	GGA	AAA	GTC	GTG	1104	
Ile	Thr	Pro	Glu	Gly	Asp	Asp	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Gly	Lys	Val	Val		
		355					360					365					
CCG	TTG	TTT	AAA	GCA	AAA	GTT	ATT	GAT	CTT	GAT	ACC	AAA	AAA	TCT	TTA	1152	
Pro	Leu	Phe	Lys	Ala	Lys	Val	Ile	Asp	Leu	Asp	Thr	Lys	Lys	Ser	Leu		
	370					375					380						
GGT	CCT	AAC	AGA	CGT	GGA	GAA	GTT	TGT	GTT	AAA	GGA	CCT	ATG	CTT	ATG	1200	
Gly	Pro	Asn	Arg	Arg	Gly	Glu	Val	Cys	Val	Lys	Gly	Pro	Met	Leu	Met		
385					390					395					400		
AAA	GGT	TAT	GTA	AAT	AAT	CCA	GAA	GCA	ACA	AAA	GAA	CTT	ATT	GAC	GAA	1248	
Lys	Gly	Tyr	Val	Asn	Asn	Pro	Glu	Ala	Thr	Lys	Glu	Leu	Ile	Asp	Glu		
				405					410					415			
GAA	GGT	TGG	CTG	CAC	ACC	GGA	GAT	ATT	GGA	TAT	TAT	GAT	GAA	GAA	AAA	1296	
Glu	Gly	Trp	Leu	His	Thr	Gly	Asp	Ile	Gly	Tyr	Tyr	Asp	Glu	Glu	Lys		
			420					425					430				
CAT	TTC	TTT	ATT	GTC	GAT	CGT	TTG	AAG	TCT	TTA	ATC	AAA	TAC	AAA	GGA	1344	
His	Phe	Phe	Ile	Val	Asp	Arg	Leu	Lys	Ser	Leu	Ile	Lys	Tyr	Lys	Gly		
			435				440					445					
TAC	CAA	GTA	CCA	CCT	GCC	GAA	TTA	GAA	TCC	GTT	CTT	TTG	CAA	CAT	CCA	1392	
Tyr	Gln	Val	Pro	Pro	Ala	Glu	Leu	Glu	Ser	Val	Leu	Leu	Gln	His	Pro		

450	455	460	
TCT ATC TTT GAT GCT GGT GTT GCC GGC GTT CCT GAT CCT GTA GCT GGC Ser Ile Phe Asp Ala Gly Val Ala Gly Val Pro Asp Pro Val Ala Gly 465 470 475 480			1440
GAG CTT CCA GGA GCC GTT GTT GTA CTG GAA AGC GGA AAA AAT ATG ACC Glu Leu Pro Gly Ala Val Val Val Leu Glu Ser Gly Lys Asn Met Thr 485 490 495			1488
GAA AAA GAA GTA ATG GAT TAT GTT GCA AGT CAA GTT TCA AAT GCA AAA Glu Lys Glu Val Met Asp Tyr Val Als Ser Gln Val Ser Asn Ala Lys 500 505 510			1536
CGT TTA CGT GGT GGT GTT CGT TTT GTG GAT GAA GTA CCT AAA GGT CTT Arg Leu Arg Gly Gly Val Arg Phe Val Asp Glu Val Pro Lys Gly Leu 515 520 525			1584
ACT GGA AAA ATT GAC GGC AGA GCA ATT AGA GAA ATC CTT AAG AAA CCA Thr Gly Lys Ile Asp Gly Arg Ala Ile Arg Glu Ile Leu Lys Lys Pro 530 535 540			1632
GTT GCT AAG ATG Val Ala Lys Met 545			1644

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 1820 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Codierende Sequenz
- (B) ORT: 1 ... 1664
- (D) ANDERE INFORMATIONEN: Vargula (Cypridina) Luciferase

(x) INFORMATIONEN ZUR VERÖFFENTLICHUNG:

- JP 3-30678 Osaka (Tsuji)
- (A) Autoren: Thompson et al.
- (C) Zeitschrift: Proc. Natl. Acad. Sci. USA
- (D) BAND: 86
- (F) SEITEN: 1326-1332
- (G) DATUM: (1989)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4

ATG AAG ATA ATA ATT CTG TCT GTT ATA TTG GCC TAC TGT GTC ACC GAC Met Lys Ile Ile Ile Leu Ser Val Ile Leu Ala Tyr Cys Val Thr Asp 1 5 10 15	48
AAC TGT CAA GAT GCA TGT CCT GTA GAA GCG GAA CCG CCA TCA AGT ACA Asn Cys Gln Asp Ala Cys Pro Val Glu Ala Glu Pro Pro Ser Ser Thr 20 25 30	96
CCA ACA GTT CCA ACT TCT TGT GAA GCT AAA GAA GGA GAA TGT ATA GAT Pro Thr Val Pro Thr Ser Cys Glu Ala Lys Glu Gly Glu Cys Ile Asp	144

35					40					45						
ACC	AGA	TGC	GCA	ACA	TGT	AAA	CGA	GAT	ATA	CTA	TCA	GAT	GGA	CTG	TGT	192
Thr	Arg	Cys	Ala	Thr	Cys	Lys	Arg	Asp	Ile	Leu	Ser	Asp	Gly	Leu	Cys	
	50					55					60					
GAA	AAT	AAA	CCA	GGG	AAG	ACA	TGC	TGT	AGA	ATG	TGC	CAG	TAT	GTG	ATT	240
Glu	Asn	Lys	Pro	Gly	Lys	Thr	Cys	Cys	Arg	Met	Cys	Gln	Tyr	Val	Ile	
65				70					75					80		
GAA	TGC	AGA	GTA	GAA	GCA	GCT	GGT	TAT	TTT	AGA	ACG	TTT	TAC	GGC	AAA	288
Glu	Cys	Arg	Val	Glu	Ala	Ala	Gly	Tyr	Phe	Arg	Thr	Phe	Tyr	Gly	Lys	
				85				90					95			
AGA	TTT	AAT	TTT	CAG	GAA	CCT	GGT	AAA	TAT	GTG	CTG	GCT	AGG	GGA	ACC	336
Arg	Phe	Asn	Phe	Gln	Glu	Pro	Gly	Lys	Tyr	Val	Leu	Ala	Arg	Gly	Thr	
			100				105						110			
AAG	GGT	GGC	GAT	TGG	TCT	GTA	ACC	CTC	ACC	ATG	GAG	AAT	CTA	GAT	GGA	384
Lys	Gly	Gly	Asp	Trp	Ser	Val	Thr	Leu	Thr	Met	Glu	Asn	Leu	Asp	Gly	
	115					120					125					
CAG	AAG	GGA	GCT	GTG	CTG	ACT	AAG	ACA	ACA	CTG	GAG	GTT	GCA	GGA	GAC	432
Gln	Lys	Gly	Ala	Val	Leu	Thr	Lys	Thr	Thr	Leu	Glu	Val	Ala	Gly	Asp	
130					135					140						
GTA	ATA	GAC	ATT	ACT	CAA	GCT	ACT	GCA	GAT	CCT	ATC	ACA	GTT	AAC	GGA	480
Val	Ile	Asp	Ile	Thr	Gln	Ala	Thr	Ala	Asp	Pro	Ile	Thr	Val	Asn	Gly	
145				150					155					160		
GGA	GCT	GAC	CCA	GTT	ATC	GCT	AAC	CCG	TTC	ACA	ATT	GGT	GAG	GTG	ACC	528
Gly	Ala	Asp	Pro	Val	Ile	Ala	Asn	Pro	Phe	Thr	Ile	Gly	Glu	Val	Thr	
				165				170						175		
ATT	GCT	GTT	GTT	GAA	ATA	CCG	GGC	TTC	AAT	ATC	ACA	GTC	ATC	GAA	TTC	576
Ile	Ala	Val	Val	Glu	Ile	Pro	Gly	Phe	Asn	Ile	Thr	Val	Ile	Glu	Phe	
			180				185						190			
TTT	AAA	CTA	ATC	GTG	ATT	GAT	ATT	CTG	GGA	GGA	AGA	TCT	GTC	AGA	ATT	624
Phe	Lys	Leu	Ile	Val	Ile	Asp	Ile	Leu	Gly	Gly	Arg	Ser	Val	Arg	Ile	
	195					200						205				
GCT	CCA	GAC	ACA	GCA	AAC	AAA	GGA	CTG	ATA	TCT	GGT	ATC	TGT	GGT	AAT	672
Ala	Pro	Asp	Thr	Ala	Asn	Lys	Gly	Leu	Ile	Ser	Gly	Ile	Cys	Gly	Asn	
	210					215					220					
CTG	GAG	ATG	AAT	GAC	GCT	GAT	GAC	TTT	ACT	ACA	GAT	GCA	GAT	CAG	CTG	720
Leu	Glu	Met	Asn	Asp	Ala	Asp	Asp	Phe	Thr	Thr	Asp	Ala	Asp	Gln	Leu	
225				230				235						240		
GCG	ATC	CAA	CCC	AAC	ATA	AAC	AAA	GAG	TTC	GAC	GGC	TGC	CCA	TTC	TAT	768
Ala	Ile	Gln	Pro	Asn	Ile	Asn	Lys	Glu	Phe	Asp	Gly	Cys	Pro	Phe	Tyr	
				245				250						255		
GGC	AAT	CCT	TCT	GAT	ATC	GAA	TAC	TGC	AAA	GGT	CTG	ATG	GAG	CCA	TAC	816
Gly	Asn	Pro	Ser	Asp	Ile	Glu	Tyr	Cys	Lys	Gly	Leu	Met	Glu	Pro	Tyr	
			260					265					270			
AGA	GCT	GTA	TGT	CGT	AAC	AAT	ATC	AAC	TTC	TAC	TAT	TAC	ACT	CTA	TCC	864
Arg	Ala	Val	Cys	Arg	Asn	Asn	Ile	Asn	Phe	Tyr	Tyr	Tyr	Thr	Leu	Ser	
		275					280						285			

TGT GCC TTC GCT TAC TGT ATG GGA GGA GAA GAA AGA GCT AAA CAC GTC Cys Ala Phe Ala Tyr Cys Met Gly Gly Glu Glu Arg Ala Lys His Val 290 295 300	912
CTT TTC GAC TAT GTT GAG ACA TGC GCT GCG CCG GAA ACG AGA GGA ACG Leu Phe Asp Tyr Val Glu Thr Cys Ala Ala Pro Glu Thr Arg Gly Thr 305 310 315 320	960
TGT GTT TTA TCA GGA CAT ACT TTC TAT GAC ACA TTC GAC AAA GCA AGA Cys Val Leu Ser Gly His Thr Phe Tyr Asp Thr Phe Asp Lys Ala Arg 325 330 335	1008
TAT CAA TTC CAG GGC CCA TGC AAG GAG ATT CTG ATG GCC GCA GAC TGT Tyr Gln Phe Gln Gly Pro Cys Lys Glu Ile Leu Met Ala Ala Asp Cys 340 345 350	1056
TAC TGG AAC ACA TGG GAT GTA AAG GTT TCA CAT AGA GAC GTC GAA TCA Tyr Trp Asn Thr Trp Asp Val Lys Val Ser His Arg Asp Val Glu Ser 355 360 365	1104
TAC ACT GAG GTA GAG AAA GTA ACA ATC AGG AAA CAG TCA ACT GTA GTA Tyr Thr Glu Val Glu Lys Val Thr Ile Arg Lys Gln Ser Thr Val Val 370 375 380	1152
GAT CTC ATT GTG GAT GGC AAG CAG GTC AAG GTT GGA GGA GTG GAT GTA Asp Leu Ile Val Asp Gly Lys Gln Val Lys Val Gly Gly Val Asp Val 385 390 395 400	1200
TCT ATC CCG TAC AGC TCT GAG AAC ACT TCC ATA TAC TGG CAG GAT GGA Ser Ile Pro Tyr Ser Ser Glu Asn Thr Ser Ile Tyr Trp Gln Asp Gly 405 410 415	1248
GAC ATC CTG ACG ACG GCC ATC CTA CCT GAA GCT CTT GTC GTT AAG TTC Asp Ile Leu Thr Thr Ala Ile Leu Pro Glu Ala Leu Val Val Lys Phe 420 425 430	1296
AAC TTT AAG CAG CTC CTT GTA GTT CAT ATC AGA GAT CCA TTC GAT GCA Asn Phe Lys Gln Leu Leu Val Val His Ile Arg Asp Pro Phe Asp Ala 435 440 445	1344
AAG ACA TGC GGC ATA TGT GGT AAC TAT AAT CAA GAT TCA ACT GAT GAT Lys Thr Cys Gly Ile Cys Gly Asn Tyr Asn Gln Asp Ser Thr Asp Asp 450 455 460	1392
TTC TTT GAC GCA GAA GGA GCA TGC GCT CTA ACC CCC AAC CCC CCA GGA Phe Phe Asp Ala Glu Gly Ala Cys Ala Leu Thr Pro Asn Pro Pro Gly 465 470 475 480	1440
TGT ACA GAG GAA CAG AAA CCA GAA GCT GAG CGA CTT TGC AAT AAT CTC Cys Thr Glu Glu Gln Lys Pro Glu Ala Glu Arg Leu Cys Asn Asn Leu 485 490 495	1488
TTT GAT TCT TCT ATC GAC GAG AAA TGT AAT GTC TGC TAC AAG CCT GAC Phe Asp Ser Ser Ile Asp Glu Lys Cys Asn Val Cys Tyr Lys Pro Asp 500 505 510	1536
CGG ATT GCC CGA TGT ATG TAC GAG TAT TGC CTG AGG GGA CAA CAA GGA Arg Ile Ala Arg Cys Met Tyr Glu Tyr Cys Leu Arg Gly Gln Gln Gly 515 520 525	1584
TTT TGT GAC CAT GCT TGG GAG TTC AAG AAA GAA TGC TAC ATA AAA CAT Phe Cys Asp His Ala Trp Glu Phe Lys Lys Glu Cys Tyr Ile Lys His	1632

530	535	540	
GGA GAC ACT CTA GAA GTA CCA CCT GAA TGT CAA TAA ACGTACAAAG			1678
Gly Asp Thr Leu Glu Val Pro Pro Glu Cys Gln			
545	550	555	
ATACAGAAGC TAAGGCTACT ACAGCAGAAG ATAAAAAGA AACTGTAGTT CCTTCAAAAA			1738
CCGTGTATTT TATGTACTCA TTGTTTAATT AGAGCAAAAT AAATTGTTAT TATCATAACT			1798
TAAACTAAAA AAAAAAAAAA AA			1820

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 958 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(v) FRAGMENT-TYP:

(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Codierende Sequenz

(B) ORT: 115 ... 702

(D) ANDERE INFORMATIONEN: apo-Aequorin-codierendes Gen

(x) INFORMATIONEN ZUR VERÖFFENTLICHUNG:

PATENT NR.: 5,093,240

(A) AUTOREN: Inouye *et al.*

(C) ZEITSCHRIFT: Proc. Natl. Acad. Sci. USA

(D) BAND: 82

(F) SEITEN: 3154-3158

(G) DATUM: (1985)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

GGGGGGGGGG	GGGGGGGGGG	GGGGGGGGGG	GGAATGCAA	TTCATCTTG	CATCAAAGAA	60
TTACATCAA	TCTCTAGTTG	ATCAACTAAA	TTGTCTCGAC	AACAACAAGC	AAAC ATG	117
					Met 1	
ACA AGC AAA CAA TAC TCA GTC AAG CTT ACA TCA GAC TTC GAC AAC CCA						165
Thr Ser Lys Gln Tyr Ser Val Lys Leu Thr Ser Asp Phe Asp Asn Pro	5	10	15			
AGA TGG ATT GGA CGA CAC AAG CAT ATG TTC AAT TTC CTT GAT GTC AAC						213
Arg Trp Ile Gly Arg His Lys His Met Phe Asn Phe Leu Asp Val Asn	20	25	30			
CAC AAT GGA AAA ATC TCT CTT GAC GAG ATG GTC TAC AAG GCA TCT GAT						261
His Asn Gly Lys Ile Ser Leu Asp Glu Met Val Tyr Lys Ala Ser Asp	35	40	45			
ATT GTC ATC AAT AAC CTT GGA GCA ACA CCT GAG CAA GCC AAA CGA CAC						309
Ile Val Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln Ala Lys Arg His	50	55	60	65		

AAA GAT GCT GTA GAA GCC TTC TTC GGA GGA GCT GGA ATG AAA TAT GGT	357
Lys Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Gly Gly Ala Gly Met Lys Tyr Gly	
70 75 80	
GTG GAA ACT GAT TGG CCT GCA TAT ATT GAA GGA TGG AAA AAA TTG GCT	405
Val Glu Thr Asp Trp Pro Ala Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Lys Leu Ala	
85 90 95	
ACT GAT GAA TTG GAG AAA TAC GCC AAA AAC GAA CCA ACG CTC ATC CGT	453
Thr Asp Glu Leu Glu Lys Tyr Ala Lys Asn Glu Pro Thr Leu Ile Arg	
100 105 110	
ATA TGG GGT GAT GCT TTG TTT GAT ATC GTT GAC AAA GAT CAA AAT GGA	501
Ile Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Val Asp Lys Asp Gln Asn Gly	
115 120 125	
GCC ATT ACA CTG GAT GAA TGG AAA GCA TAC ACC AAA GCT GCT GGT ATC	549
Ala Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Thr Lys Ala Ala Gly Ile	
130 135 140 145	
ATC CAA TCA TCA GAA GAT TGC GAG GAA ACA TTC AGA GTG TGC GAT ATT	597
Ile Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu Thr Phe Arg Val Cys Asp Ile	
150 155 160	
GAT GAA AGT GGA CAA CTC GAT GTT GAT GAG ATG ACA AGA CAA CAT TTA	645
Asp Glu Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln His Leu	
165 170 175	
GGA TTT TGG TAC ACC ATG GAT CCT GCT TGC GAA AAG CTC TAC GGT GGA	693
Gly Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys Leu Tyr Gly Gly	
180 185 190	
GCT GTC CCC TAAGAAGCTC TACGGTGGTG ATGCACCCTA GGAAGATGAT GTGATTTTGA	752
Ala Val Pro	
195	
ATAAAACACT GATGAATTCA ATCAAAATTT TCCAAATTT TGAACGATTT CAATCGTTTG	812
TGTTGATTTT TGTAATTAGG AACAGATTAA ATCGAATGAT TAGTTGTTTT TTTAATCAAC	872
AGAACTTACA AATCGAAAAA GTAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA	932
AAAAAAA AAAAAAAA AAAAA	958

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 591 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(v) FRAGMENT-TYP:

(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Codierende Sequenz

(B) ORT: 1 ... 588

(D) ANDERE INFORMATIONEN: Rekombinantes Aequorin AEQ1

(x) INFORMATIONEN ZUR VERÖFFENTLICHUNG:

- (A) AUTOREN: Prasher et al.
 (B) TITEL: Sequence Comparisons of Complementary DNAs Encoding
 Aequorin Isotypes
 (C) ZEITSCHRIFT: Biochemistry
 (D) BAND: 26
 (F) SEITEN: 1326-1332
 (G) DATUM: 1987

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:6:

ATG ACC AGC GAA CAA TAC TCA GTC AAG CTT ACA CCA GAC TTC GAC AAC	48
Met Thr Ser Glu Gln Tyr Ser Val Lys Leu Thr Pro Asp Phe Asp Asn	
1 5 10 15	
CCA AAA TGG ATT GGA CGA CAC AAG CAC ATG TTT AAT TTT CTT GAT GTC	96
Pro Lys Trp Ile Gly Arg His Lys His Met Phe Asn Phe Leu Asp Val	
20 25 30	
AAC CAC AAT GGA AGG ATC TCT CTT GAC GAG ATG GTC TAC AAG GCG TCC	144
Asn His Asn Gly Arg Ile Ser Leu Asp Glu Met Val Tyr Lys Ala Ser	
35 40 45	
GAT ATT GTT ATA AAC AAT CTT GGA GCA ACA CCT GAA CAA GCC AAA CGT	192
Asp Ile Val Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln Ala Lys Arg	
50 55 60	
CAC AAA GAT GCT GTA GAA GCC TTC TTC GGA GGA GCT GGA ATG AAA TAT	240
His Lys Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Gly Gly Ala Gly Met Lys Tyr	
65 70 75 80	
GGT GTA GAA ACT GAA TGG CCT GAA TAC ATC GAA GGA TGG AAA AGA CTG	288
Gly Val Glu Thr Glu Trp Pro Glu Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Arg Leu	
85 90 95	
GCT TCC GAG GAA TTG AAA AGG TAT TCA AAA AAC CAA ATC ACA CTT ATT	336
Ala Ser Glu Glu Leu Lys Arg Tyr Ser Lys Asn Gln Ile Thr Leu Ile	
100 105 110	
CGT TTA TGG GGT GAT GCA TTG TTC GAT ATC ATT GAC AAA GAC CAA AAT	384
Arg Leu Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Ile Asp Lys Asp Gln Asn	
115 120 125	
GGA GCT ATT TCA CTG GAT GAA TGG AAA GCA TAC ACC AAA TCT GAT GGC	432
Gly Ala Ile Ser Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Thr Lys Ser Asp Gly	
130 135 140	
ATC ATC CAA TCG TCA GAA GAT TGC GAG GAA ACA TTC AGA GTG TGC GAT	480
Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu Thr Phe Arg Val Cys Asp	
145 150 155 160	
ATT GAT GAA AGT GGA CAG CTC GAT GTT GAT GAG ATG ACA AGA CAA CAT	528
Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln His	
165 170 175	
TTA GGA TTT TGG TAC ACC ATG GAT CCT GCT TGC GAA AAG CTC TAC GGT	576
Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys Leu Tyr Gly	
180 185 190	
GGA GCT GTC CCC TAA	591
Gly Ala Val Pro *	
195	

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 591 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(v) FRAGMENT-TYP:

(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Codierende Sequenz

(B) ORT: 1 ... 588

(D) ANDERE INFORMATIONEN: Rekombinantes Aequorin AEQ2

(x) INFORMATIONEN ZUR VERÖFFENTLICHUNG:

(A) AUTOREN: Prasher et al.

(B) TITEL: Sequence Comparisons of Complementary DNAs Encoding Aequorin Isotypes

(C) ZEITSCHRIFT: Biochemistry

(D) BAND: 26

(F) SEITEN: 1326-1332

(G) DATUM: 1987

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:7:

ATG ACC AGC GAA CAA TAC TCA GTC AAG CTT ACA TCA GAC TTC GAC AAC	48
Met Thr Ser Glu Gln Tyr Ser Val Lys Leu Thr Ser Asp Phe Asp Asn	
1 5 10 15	
CCA AGA TGG ATT GGA CGA CAC AAG CAT ATG TTC AAT TTC CTT GAT GTC	96
Pro Arg Trp Ile Gly Arg His Lys His Met Phe Asn Phe Leu Asp Val	
20 25 30	
AAC CAC AAT GGA AAA ATC TCT CTT GAC GAG ATG GTC TAC AAG GCA TCT	144
Asn His Asn Gly Lys Ile Ser Leu Asp Glu Met Val Tyr Lys Ala Ser	
35 40 45	
GAT ATT GTC ATC AAT AAC CTT GGA GCA ACA CCT GAG CAA GCC AAA CGA	192
Asp Ile Val Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln Ala Lys Arg	
50 55 60	
CAC AAA GAT GCT GTA GAA GCC TTC TTC GGA GGA GCT GGA ATG AAA TAT	240
His Lys Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Gly Gly Ala Gly Met Lys Tyr	
65 70 75 80	
GGT GTG GAA ACT GAT TGG CCT GCA TAT ATT GAA GGA TGG AAA AAA TTG	288
Gly Val Glu Thr Asp Trp Pro Ala Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Lys Leu	
85 90 95	
GCT ACT GAT GAA TTG GAG AAA TAC GCC AAA AAC GAA CCA ACG CTC ATC	336
Ala Thr Asp Glu Leu Glu Lys Tyr Ala Lys Asn Glu Pro Thr Leu Ile	
100 105 110	
CGT ATA TGG GGT GAT GCT TTG TTC GAT ATC GTT GAC AAA GAT CAA AAT	384
Arg Ile Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Val Asp Lys Asp Gln Asn	

115	120	125	
GGA GCC ATT ACA CTG GAT GAA TGG AAA GCA TAC ACC AAA GCT GCT GGT			432
Gly Ala Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Thr Lys Ala Ala Gly			
130	135	140	
ATC ATC CAA TCA TCA GAA GAT TGC GAG GAA ACA TTC AGA GTG TGC GAT			480
Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu Thr Phe Arg Val Cys Asp			
145	150	155	160
ATT GAT GAA AGT GGA CAA CTC GAT GTT GAT GAG ATG ACA AGA CAA CAT			528
Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln His			
165	170	175	
TTA GGA TTT TGG TAC ACC ATG GAT CCT GCT TGC GAA AAG CTC TAC GGT			576
Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys Leu Tyr Gly			
180	185	190	
GGA GCT GTC CCC TAA			591
Gly Ala Val Pro *			
195			

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 591 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(v) FRAGMENT-TYP:

(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Codierende Sequenz

(B) ORT: 1 ... 588

(D) ANDERE INFORMATIONEN: Rekombinantes Aequorin AEQ3

(x) INFORMATIONEN ZUR VERÖFFENTLICHUNG:

(A) AUTOREN: Prasher et al.

(B) TITEL: Sequence Comparisons of Complementary DNAs Encoding Aequorin Isotypes

(C) ZEITSCHRIFT: Biochemistry

(D) BAND: 26

(F) SEITEN: 1326-1332

(G) DATUM: 1987

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:8:

ATG ACC AGC GAA CAA TAC TCA GTC AAG CTT ACA TCA GAC TTC GAC AAC	48		
Met Thr Ser Glu Gln Tyr Ser Val Lys Leu Thr Ser Asp Phe Asp Asn			
1	5	10	15
CCA AGA TGG ATT GGA CGA CAC AAG CAT ATG TTC AAT TTC CTT GAT GTC	96		
Pro Arg Trp Ile Gly Arg His Lys His Met Phe Asn Phe Leu Asp Val			
20	25	30	

AAC CAC AAT GGA AAA ATC TCT CTT GAC GAG ATG GTC TAC AAG GCA TCT Asn His Asn Gly Lys Ile Ser Leu Asp Glu Met Val Tyr Lys Ala Ser 35 40 45	144
GAT ATT GTC ATC AAT AAC CTT GGA GCA ACA CCT GAG CAA GCC AAA CGA Asp Ile Val Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln Ala Lys Arg 50 55 60	192
CAC AAA GAT GCT GTA GGA GAC TTC TTC GGA GGA GCT GGA ATG AAA TAT His Lys Asp Ala Val Gly Asp Phe Phe Gly Gly Ala Gly Met Lys Tyr 65 70 75 80	240
GGT GTG GAA ACT GAT TGG CCT GCA TAC ATT GAA GGA TGG AAA AAA TTG Gly Val Glu Thr Asp Trp Pro Ala Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Lys Leu 85 90 95	288
GCT ACT GAT GAA TTG GAG AAA TAC GCC AAA AAC GAA CCA ACG CTC ATC Ala Thr Asp Glu Leu Glu Lys Tyr Ala Lys Asn Glu Pro Thr Leu Ile 100 105 110	336
CGT ATA TGG GGT GAT GCT TTG TTC GAT ATC GTT GAC AAA GAT CAA AAT Arg Ile Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Val Asp Lys Asp Gln Asn 115 120 125	384
GGA GCC ATT ACA CTG GAT GAA TGG AAA GCA TAC ACC AAA GCT GCT GGT Gly Ala Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Thr Lys Ala Ala Gly 130 135 140	432
ATC ATC CAA TCA TCA GAA GAT TGC GAG GAA ACA TTC AGA GTG TGC GAT Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu Thr Phe Arg Val Cys Asp 145 150 155 160	480
ATT GAT GAA AAT GGA CAA CTC GAT GTT GAT GAG ATG ACA AGA CAA CAT Ile Asp Glu Asn Gly Gln Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln His 165 170 175	528
TTA GGA TTT TGG TAC ACC ATG GAT CCT GCT TGC GAA AAG CTC TAC GGT Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys Leu Tyr Gly 180 185 190	576
GGA GCT GTC CCC TAA Gly Ala Val Pro * 195	591

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 567 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(v) FRAGMENT-TYP:

(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Codierende Sequenz

(B) ORT: 1 ... 567

(D) ANDERE INFORMATIONEN: Aequorin-Photoprotein

(x) INFORMATIONEN ZUR VERÖFFENTLICHUNG:

(A) AUTOREN: Charbonneau et al.

(B) TITEL: Amino acid sequence of the calcium-dependent photoprotein
aequorin

(C) ZEITSCHRIFT: Am. Chem. Soc.

(D) BAND: 24

(E) HEFT: 24

(F) SEITEN: 6762-6771

(G) DATUM: 1985

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:9

GTC Val 1	AAG Lys	CTT Leu	ACA Thr	CCA Pro	GAC Asp	TTC Phe	GAC Asp	AAC Asn	CCA Pro	AAA Lys	TGG Trp	ATT Ile	GGA Gly	CGA Arg	CAC His	48
				5					10					15		
AAG Lys	CAC His	ATG Met	TTT Phe	AAT Asn	TTT Phe	CTT Leu	GAT Asp	GTC Val	AAC Asn	CAC His	AAT Asn	GGA Gly	AGG Arg	ATC Ile	TCT Ser	96
			20					25					30			
CTT Leu	GAC Asp	GAG Glu	ATG Met	GTC Val	TAC Tyr	AAG Lys	GCG Ala	TCC Ser	GAT Asp	ATT Ile	GTT Val	ATA Ile	AAC Asn	AAT Asn	CTT Leu	144
		35					40					45				
GGA Gly	GCA Ala	ACA Thr	CCT Pro	GAA Glu	CAA Gln	GCC Ala	AAA Lys	CGT Arg	CAC His	AAA Lys	GAT Asp	GCT Ala	GTA Val	GAA Glu	GCC Ala	192
		50				55					60					
TTC Phe	TTC Phe	GGA Gly	GGA Gly	GCT Ala	GCA Ala	ATG Met	AAA Lys	TAT Tyr	GGT Gly	GTA Val	GAA Glu	ACT Thr	GAA Glu	TGG Trp	CCT Pro	240
65				70					75					80		
GAA Glu	TAC Tyr	ATC Ile	GAA Glu	GGA Gly	TGG Trp	AAA Lys	AGA Arg	CTG Leu	GCT Ala	TCC Ser	GAG Glu	GAA Glu	TTG Leu	AAA Lys	AGG Arg	288
				85				90					95			
TAT Tyr	TCA Ser	AAA Lys	AAC Asn	CAA Gln	ATC Ile	ACA Thr	CTT Leu	ATT Ile	CGT Arg	TTA Leu	TGG Trp	GGT Gly	GAT Asp	GCA Ala	TTG Leu	336
		100					105						110			
TTC Phe	GAT Asp	ATC Ile	ATT Ile	GAC Asp	AAA Lys	GAC Asp	CAA Gln	AAT Asn	GGA Gly	GCT Ala	ATT Ile	TCA Ser	CTG Leu	GAT Asp	GAA Glu	384
		115					120					125				
TGG Trp	AAA Lys	GCA Ala	TAC Tyr	ACC Thr	AAA Lys	TCT Ser	GCT Ala	GGC Gly	ATC Ile	ATC Ile	CAA Gln	TCG Ser	TCA Ser	GAA Glu	GAT Asp	432
		130				135					140					
TGC Cys	GAG Glu	GAA Glu	ACA Thr	TTC Phe	AGA Arg	GTG Val	TGC Cys	GAT Asp	ATT Ile	GAT Asp	GAA Glu	AGT Ser	GGA Gly	CAG Gln	CTC Leu	480
145					150				155					160		
GAT Asp	GTT Val	GAT Asp	GAG Glu	ATG Met	ACA Thr	AGA Arg	CAA Gln	CAT His	TTA Leu	GGA Gly	TTT Phe	TGG Trp	TAC Tyr	ACC Thr	ATG Met	528
				165				170						175		
GAT Asp	CCT Pro	GCT Ala	TGC Cys	GAA Glu	AAG Lys	CTC Leu	TAC Tyr	GGT Gly	GGA Gly	GCT Ala	GTC Val	CCC Pro				567
				180				185								

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 588 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(v) FRAGMENT-TYP:

(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Codierende Sequenz

(B) ORT: 1 ... 588

(D) ANDERE INFORMATIONEN: Aequorin-Mutante w/erhöhte Biolumineszenz-Aktivität

(x) INFORMATIONEN ZUR VERÖFFENTLICHUNG:

PATENT NR.: 5,360,728

(K) Relevante Reste in SEQ ID NO: 10:

Asp 123 ersetzt durch Ser

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10

ATG ACC AGC GAA CAA TAC TCA GTC AAG CTT ACA CCA GAC TTC GAC AAC	48
Met Thr Ser Glu Gln Tyr Ser Val Lys Leu Thr Pro Asp Phe Asp Asn	
1 5 10 15	
CCA AAA TGG ATT GGA CGA CAC AAG CAC ATG TTT AAT TTT CTT GAT GTC	96
Pro Lys Trp Ile Gly Arg His Lys His Met Phe Asn Phe Leu Asp Val	
20 25 30	
AAC CAC AAT GGA AGG ATC TCT CTT GAC GAG ATG GTC TAC AAG GCG TCC	144
Asn His Asn Gly Arg Ile Ser Leu Asp Glu Met Val Tyr Lys Ala Ser	
35 40 45	
GAT ATT GTT ATA AAC AAT CTT GGA GCA ACA CCT GAA CAA GCC AAA CGT	192
Asp Ile Val Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln Ala Lys Arg	
50 55 60	
CAC AAA GAT GCT GTA GAA GCC TTC TTC GGA GGA GCT GCA ATG AAA TAT	240
His Lys Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Gly Gly Ala Ala Met Lys Tyr	
65 70 75 80	
GGT GTA GAA ACT GAA TGG CCT GAA TAC ATC GAA GGA TGG AAA AGA CTG	288
Gly Val Glu Thr Glu Trp Pro Glu Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Arg Leu	
85 90 95	
GCT TCC GAG GAA TTG AAA AGG TAT TCA AAA AAC CAA ATC ACA CTT ATT	336
Ala Ser Glu Glu Leu Lys Arg Tyr Ser Lys Asn Gln Ile Thr Leu Ile	
100 105 110	
CGT TTA TGG GGT GAT GCA TTG TTC GAT ATC ATT TCC AAA GAC CAA AAT	384
Arg Leu Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Ile Ser Lys Asp Gln Asn	
115 120 125	

GGA GCT ATT TCA CTG GAT GAA TGG AAA GCA TAC ACC AAA TCT GCT GGC	432
Gly Ala Ile Ser Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Thr Lys Ser Ala Gly	
130 135 140	
ATC ATC CAA TCG TCA GAA GAT TGC GAG GAA ACA TTC AGA GTG TGC GAT	480
Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu Thr Phe Arg Val Cys Asp	
145 150 155 160	
ATT GAT GAA AGT GGA CAG CTC GAT GTT GAT GAG ATG ACA AGA CAA CAT	528
Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln His	
165 170 175	
TTA GGA TTT TGG TAC ACC ATG GAT CCT GCT TGC GAA AAG CTC TAC GGT	576
Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys Leu Tyr Gly	
180 185 190	
GGA GCT GTC CCC	588
Gly Ala Val Pro	
195	

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 588 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(v) FRAGMENT-TYP:

(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Codierende Sequenz

(B) ORT: 1 ... 588

(D) ANDERE INFORMATIONEN: Rekombinante ortsspezifische Aequorin-Mutante w / erhöhte Biolumineszenz-Aktivität

(x) INFORMATIONEN ZUR VERÖFFENTLICHUNG:

PATENT NR.: 5,360,728

(K) Relevante Reste in SEQ ID NO: 11:

Glu 135 ersetzt durch Ser

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

ATG ACC AGC GAA CAA TAC TCA GTC AAG CTT ACA CCA GAC TTC GAC AAC	48
Met Thr Ser Glu Gln Tyr Ser Val Lys Leu Thr Pro Asp Phe Asp Asn	
1 5 10 15	
CCA AAA TGG ATT GGA CGA CAC AAG CAC ATG TTT AAT TTT CTT GAT GTC	96
Pro Lys Trp Ile Gly Arg His Lys His Met Phe Asn Phe Leu Asp Val	
20 25 30	
AAC CAC AAT GGA AGG ATC TCT CTT GAC GAG ATG GTC TAC AAG GCG TCC	144
Asn His Asn Gly Arg Ile Ser Leu Asp Glu Met Val Tyr Lys Ala Ser	

35	40	45	
GAT ATT GTT ATA AAC AAT CTT GGA GCA ACA CCT GAA CAA GCC AAA CGT Asp Ile Val Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln Ala Lys Arg 50 55 60			192
CAC AAA GAT GCT GTA GAA GCC TTC TTC GGA GGA GCT GCA ATG AAA TAT His Lys Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Gly Gly Ala Ala Met Lys Tyr 65 70 75 80			240
GGT GTA GAA ACT GAA TGG CCT GAA TAC ATC GAA GGA TGG AAA AGA CTG Gly Val Glu Thr Glu Trp Pro Glu Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Arg Leu 85 90 95			288
GCT TCC GAG GAA TTG AAA AGG TAT TCA AAA AAC CAA ATC ACA CTT ATT Ala Ser Glu Glu Leu Lys Arg Tyr Ser Lys Asn Gln Ile Thr Leu Ile 100 105 110			336
CGT TTA TGG GGT GAT GCA TTG TTC GAT ATC ATT TCC AAA GAC CAA AAT Arg Leu Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Ile Ser Lys Asp Gln Asn 115 120 125			384
GGA GCT ATT TCA CTG GAT TCA TGG AAA GCA TAC ACC AAA TCT GCT GGC Gly Ala Ile Ser Leu Asp Ser Trp Lys Ala Tyr Thr Lys Ser Ala Gly 130 135 140			432
ATC ATC CAA TCG TCA GAA GAT TGC GAG GAA ACA TTC AGA GTG TGC GAT Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu Thr Phe Arg Val Cys Asp 145 150 155 160			480
ATT GAT GAA AGT GGA CAG CTC GAT GTT GAT GAG ATG ACA AGA CAA CAT Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln His 165 170 175			528
TTA GGA TTT TGG TAC ACC ATG GAT CCT GCT TGC GAA AAG CTC TAC GGT Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys Leu Tyr Gly 180 185 190			576
GGA GCT GTC CCC Gly Ala Val Pro 195			588

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 588 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(v) FRAGMENT-TYP:

(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Codierende Sequenz

(B) ORT: 1 ... 588

(D) ANDERE INFORMATIONEN: Rekombinante ortsspezifische Aequorin-Mutante w / erhöhte Biolumineszenz-Aktivität

(x) INFORMATIONEN ZUR VERÖFFENTLICHUNG:
PATENT NR.: 5,360,728

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

ATG ACC AGC GAA CAA TAC TCA GTC AAG CTT ACA CCA GAC TTC GAC AAC	48
Met Thr Ser Glu Gln Tyr Ser Val Lys Leu Thr Pro Asp Phe Asp Asn	
1 5 10 15	
CCA AAA TGG ATT GGA CGA CAC AAG CAC ATG TTT AAT TTT CTT GAT GTC	96
Pro Lys Trp Ile Gly Arg His Lys His Met Phe Asn Phe Leu Asp Val	
20 25 30	
AAC CAC AAT GGA AGG ATC TCT CTT GAC GAG ATG GTC TAC AAG GCG TCC	144
Asn His Asn Gly Arg Ile Ser Leu Asp Glu Met Val Tyr Lys Ala Ser	
35 40 45	
GAT ATT GTT ATA AAC AAT CTT GGA GCA ACA CCT GAA CAA GCC AAA CGT	192
Asp Ile Val Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln Ala Lys Arg	
50 55 60	
CAC AAA GAT GCT GTA GAA GCC TTC TTC GGA GGA GCT GCA ATG AAA TAT	240
His Lys Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Gly Gly Ala Ala Met Lys Tyr	
65 70 75 80	
GGT GTA GAA ACT GAA TGG CCT GAA TAC ATC GAA GGA TGG AAA AGA CTG	288
Gly Val Glu Thr Glu Trp Pro Glu Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Arg Leu	
85 90 95	
GCT TCC GAG GAA TTG AAA AGG TAT TCA AAA AAC CAA ATC ACA CTT ATT	336
Ala Ser Glu Glu Leu Lys Arg Tyr Ser Lys Asn Gln Ile Thr Leu Ile	
100 105 110	
CGT TTA TGG GGT GAT GCA TTG TTC GAT ATC ATT TCC AAA GAC CAA AAT	384
Arg Leu Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Ile Ser Lys Asp Gln Asn	
115 120 125	
GCA GCT ATT TCA CTG GAT GAA TGG AAA GCA TAC ACC AAA TCT GCT GGC	432
Ala Ala Ile Ser Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Thr Lys Ser Ala Gly	
130 135 140	
ATC ATC CAA TCG TCA GAA GAT TGC GAG GAA ACA TTC AGA GTG TGC GAT	480
Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu Thr Phe Arg Val Cys Asp	
145 150 155 160	
ATT GAT GAA AGT GGA CAG CTC GAT GTT GAT GAG ATG ACA AGA CAA CAT	528
Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln His	
165 170 175	
TTA GGA TTT TGG TAC ACC ATG GAT CCT GCT TGC GAA AAG CTC TAC GGT	576
Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys Leu Tyr Gly	
180 185 190	
GGA GCT GTC CCC	588
Gly Ala Val Pro	
195	

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO: 13

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 567 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Codierende Sequenz
- (B) ORT: 1 ... 567
- (D) ANDERE INFORMATIONEN: Rekombinantes Apoaequorin (AQUALITE®)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13

GTC	AAG	CTT	ACA	CCA	GAC	TTC	GAC	AAC	CCA	AAA	TGG	ATT	GGA	CGA	CAC	48
Val	Lys	Leu	Thr	Pro	Asp	Phe	Asp	Asn	Pro	Lys	Trp	Ile	Gly	Arg	His	
1				5					10					15		
AAG	CAC	ATG	TTT	AAT	TTT	CTT	GAT	GTC	AAC	CAC	AAT	GGA	AGG	ATC	TCT	96
Lys	His	Met	Phe	Asn	Phe	Leu	Asp	Val	Asn	His	Asn	Gly	Arg	Ile	Ser	
			20					25					30			
CTT	GAC	GAG	ATG	GTC	TAC	AAG	GCG	TCC	GAT	ATT	GTT	ATA	AAC	AAT	CTT	144
Leu	Asp	Glu	Met	Val	Tyr	Lys	Ala	Ser	Asp	Ile	Val	Ile	Asn	Asn	Leu	
		35					40					45				
GGA	GCA	ACA	CCT	GAA	CAA	GCC	AAA	CGT	CAC	AAA	GAT	GCT	GTA	GAA	GCC	192
Gly	Ala	Thr	Pro	Glu	Gln	Ala	Lys	Arg	His	Lys	Asp	Ala	Val	Glu	Ala	
	50					55					60					
TTC	TTC	GGA	GGA	GCT	GGA	ATG	AAA	TAT	GGT	GTA	GAA	ACT	GAA	TGG	CCT	240
Phe	Phe	Gly	Gly	Ala	Gly	Met	Lys	Tyr	Gly	Val	Glu	Thr	Glu	Trp	Pro	
65					70					75					80	
GAA	TAC	ATC	GAA	GGA	TGG	AAA	AAA	CTG	GCT	TCC	GAG	GAA	TTG	AAA	AGG	288
Glu	Tyr	Ile	Glu	Gly	Trp	Lys	Lys	Leu	Ala	Ser	Glu	Glu	Leu	Lys	Arg	
				85					90					95		
TAT	TCA	AAA	AAC	CAA	ATC	ACA	CTT	ATT	CGT	TTA	TGG	GGT	GAT	GCA	TTG	336
Tyr	Ser	Lys	Asn	Gln	Ile	Thr	Leu	Ile	Arg	Leu	Trp	Gly	Asp	Ala	Leu	
			100					105					110			
TTC	GAT	ATC	ATT	GAC	AAA	GAC	CAA	AAT	GGA	GCT	ATT	CTG	TCA	GAT	GAA	384
Phe	Asp	Ile	Ile	Asp	Lys	Asp	Gln	Asn	Gly	Ala	Ile	Leu	Ser	Asp	Glu	
		115					120					125				
TGG	AAA	GCA	TAC	ACC	AAA	TCT	GAT	GGC	ATC	ATC	CAA	TCG	TCA	GAA	GAT	432
Trp	Lys	Ala	Tyr	Thr	Lys	Ser	Asp	Gly	Ile	Ile	Gln	Ser	Ser	Glu	Asp	
	130					135					140					
TGC	GAG	GAA	ACA	TTC	AGA	GTG	TGC	GAT	ATT	GAT	GAA	AGT	GGA	CAG	CTC	480
Cys	Glu	Glu	Thr	Phe	Arg	Val	Cys	Asp	Ile	Asp	Glu	Ser	Gly	Gln	Leu	
145					150					155				160		
GAT	GTT	GAT	GAG	ATG	ACA	AGA	CAA	CAT	TTA	GGA	TTT	TGG	TAC	ACC	ATG	528
Asp	Val	Asp	Glu	Met	Thr	Arg	Gln	His	Leu	Gly	Phe	Trp	Tyr	Thr	Met	
				165					170					175		

GAT CCT GCT TGC GAA AAG CTC TAC GGT GGA GCT GTC CCC
 Asp Pro Ala Cys Glu Lys Leu Tyr Gly Gly Ala Val Pro
 180 185

567

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO: 14:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 236 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Protein
- (x) INFORMATIONEN ZUR VERÖFFENTLICHUNG:
 - PATENT NR.: 5,484,723
- (ix) MERKMAL:
 - (D) ANDERE INFORMATIONEN: *Vibrio fisheri* Flavin-Reduktase
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14

```

Met Pro Ile Asn Cys Lys Val Lys Ser Ile Glu Pro Leu Ala Cys Asn
 1           5           10
Thr Phe Arg Ile Leu Leu His Pro Glu Gln Pro Val Ala Phe Lys Ala
          20           25           30
Gly Gln Tyr Leu Thr Val Val Met Gly Glu Lys Asp Lys Arg Pro Phe
          35           40           45
Ser Ile Ala Ser Ser Pro Cys Arg His Glu Gly Glu Ile Glu Leu His
 50           55           60
Ile Gly Ala Ala Glu His Asn Ala Tyr Ala Gly Glu Val Val Glu Ser
 65           70           75
Met Lys Ser Ala Leu Glu Thr Gly Gly Asp Ile Leu Ile Asp Ala Pro
          85           90           95
His Gly Glu Ala Trp Ile Arg Glu Asp Ser Asp Arg Ser Met Leu Leu
          100          105
Ile Ala Gly Gly Thr Gly Phe Ser Tyr Val Arg Ser Ile Leu Asp His
          115          120          125
Cys Ile Ser Gln Gln Ile Gln Lys Pro Ile Tyr Leu Tyr Trp Gly Gly
 130           135           140
Arg Asp Glu Cys Gln Leu Tyr Ala Lys Ala Glu Leu Glu Ser Ile Ala
 145           150           155           160
Gln Ala His Ser His Ile Thr Phe Val Pro Val Val Glu Lys Ser Glu
          165           170           175
Gly Trp Thr Gly Lys Thr Gly Asn Val Leu Glu Ala Val Lys Ala Asp
          180           185           190
Phe Asn Ser Leu Ala Asp Met Asp Ile Tyr Ile Ala Gly Arg Phe Glu
          195           200           205

```

Met Ala Gly Ala Ala Arg Glu Gln Phe Thr Thr Glu Lys Gln Ala Lys
 210 215 220

Lys Glu Gln Leu Phe Gly Asp Ala Phe Ala Phe Ile
 225 230 235

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO: 15:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 1079 Basenpaare
 (B) TYP: Nucleinsäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: doppelsträngig
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(v) FRAGMENT-TYP:

(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Codierende Sequenz

(B) ORT: 258 ... 975

(D) ANDERE INFORMATIONEN: *Renilla mulleri*-GFP

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

```

GGTTATACAC AAGTGTATCG CGTATCTGCA GACGCATCTA GTGGGATTAT TCGAGCGGTA      60
GTATTTACGT CAGACCTGTC TAATCGAAAC CACAACAAC TCTTAAAATA AGCCACATTT      120
ACATAATATC TAAGAGACGC CTCATTTAAG AGTAGTAAAA ATATAATATA TGATAGAGTA      180
TACAACCTCTC GCCTTAGACA GACAGTGTGC AACAGAGTAA CTCTTGTTAA TGCAATCGAA      240
AGCGTCAAGA GAGATAAG ATG AGT AAA CAA ATA TTG AAG AAC ACT TGT TTA      291
                Met Ser Lys Gln Ile Leu Lys Asn Thr Cys Leu
                1                5                10

CAA GAA GTA ATG TCG TAT AAA GTA AAT CTG GAA GGA ATT GTA AAC AAC      339
Gln Glu Val Met Ser Tyr Lys Val Asn Leu Glu Gly Ile Val Asn Asn
                15                20                25

CAT GTT TTT ACA ATG GAG GGT TGC GGC AAA GGG AAT ATT TTA TTC GGC      387
His Val Phe Thr Met Glu Gly Cys Gly Lys Gly Asn Ile Leu Phe Gly
                30                35                40

AAT CAA CTG GTT CAG ATT CGT GTC ACG AAA GGG GCC CCA CTG CCT TTT      435
Asn Gln Leu Val Gln Ile Arg Val Thr Lys Gly Ala Pro Leu Pro Phe
                45                50                55

GCA TTT GAT ATT GTG TCA CCA GCT TTT CAA TAT GGC AAC CGT ACT TTC      483
Ala Phe Asp Ile Val Ser Pro Ala Phe Gln Tyr Gly Asn Arg Thr Phe
        60                65                70                75

ACG AAA TAT CCG AAT GAT ATA TCA GAT TAT TTT ATA CAA TCA TTT CCA      531
Thr Lys Tyr Pro Asn Asp Ile Ser Asp Tyr Phe Ile Gln Ser Phe Pro
                80                85                90

GCA GGA TTT ATG TAT GAA CGA ACA TTA CGT TAC GAA GAT GGC GGA CTT      579
Ala Gly Phe Met Tyr Glu Arg Thr Leu Arg Tyr Glu Asp Gly Gly Leu
                95                100                105

GTT GAA ATT CGT TCA GAT ATA AAT TTA ATA GAA GAC AAG TTC GTC TAC      627
Val Glu Ile Arg Ser Asp Ile Asn Leu Ile Glu Asp Lys Phe Val Tyr

```

110	115	120	
AGA GTG GAA TAC AAA GGT AGT AAC TTC CCA GAT GAT GGT CCC GTC ATG			675
Arg Val Glu Tyr Lys Gly Ser Asn Phe Pro Asp Asp Gly Pro Val Met			
125	130	135	
CAG AAG ACT ATC TTA GGA ATA GAG CCT TCA TTT GAA GCC ATG TAC ATG			723
Gln Lys Thr Ile Leu Gly Ile Glu Pro Ser Phe Glu Ala Met Tyr Met			
140	145	150	155
AAT AAT GGC GTC TTG GTC GGC GAA GTA ATT CTT GTC TAT AAA CTA AAC			771
Asn Asn Gly Val Leu Val Gly Glu Val Ile Leu Val Tyr Lys Leu Asn			
160	165		
TCT GGG AAA TAT TAT TCA TGT CAC ATG AAA ACA TTA ATG AAG TCG AAA			819
Ser Gly Lys Tyr Tyr Ser Cys His Met Lys Thr Leu Met Lys Ser Lys			
175	180	185	
GGT GTA GTA AAG GAG TTT CCT TCG TAT CAT TTT ATT CAA CAT CGT TTG			867
Gly Val Val Lys Glu Phe Pro Ser Tyr His Phe Ile Gln His Arg Leu			
190	195	200	
GAA AAG ACT TAC GTA GAA GAC GGG GGG TTC GTT GAA CAG CAT GAG ACT			915
Glu Lys Thr Tyr Val Glu Asp Gly Gly Phe Val Glu Gln His Glu Thr			
205	210	215	
GCT ATT GCT CAA ATG ACA TCT ATA GGA AAA CCA CTA GGA TCC TTA CAC			963
Ala Ile Ala Gln Met Thr Ser Ile Gly Lys Pro Leu Gly Ser Leu His			
220	225	230	235
GAA TGG GTT TAA ACACAGTTAC ATTACTTTTT CCAATTCGTG TTTCATGTCA AATAAT			1021
Glu Trp Val *			
AATTTTTTAA ACAATTATCA ATGTTTTGTG ATATGTTTGT AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA			1079

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO: 16:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 238 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Protein
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN
- (v) FRAGMENT-TYP: innen liegend
- (vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

Met	Ser	Lys	Gln	Ile	Leu	Lys	Asn	Thr	Cys	Leu	Gln	Glu	Val	Met	Ser
1				5					10					15	
Tyr	Lys	Val	Asn	Leu	Glu	Gly	Ile	Val	Asn	Asn	His	Val	Phe	Thr	Met
			20					25					30		
Glu	Gly	Cys	Gly	Lys	Gly	Asn	Ile	Leu	Phe	Gly	Asn	Gln	Leu	Val	Gln
		35				40						45			
Ile	Arg	Val	Thr	Lys	Gly	Ala	Pro	Leu	Pro	Phe	Ala	Phe	Asp	Ile	Val
	50					55					60				
Ser	Pro	Ala	Phe	Gln	Tyr	Gly	Asn	Arg	Thr	Phe	Thr	Lys	Tyr	Pro	Asn

```

65          70          75          80
Asp Ile Ser Asp Tyr Phe Ile Gln Ser Phe Pro Ala Gly Phe Met Tyr
      85          90          95
Glu Arg Thr Leu Arg Tyr Glu Asp Gly Gly Leu Val Glu Ile Arg Ser
      100         105         110
Asp Ile Asn Leu Ile Glu Asp Lys Phe Val Tyr Arg Val Glu Tyr Lys
      115         120         125
Gly Ser Asn Phe Pro Asp Asp Gly Pro Val Met Gln Lys Thr Ile Leu
      130         135         140
Gly Ile Glu Pro Ser Phe Glu Ala Met Tyr Met Asn Asn Gly Val Leu
      145         150         155         160
Val Gly Glu Val Ile Leu Val Tyr Lys Leu Asn Ser Gly Lys Tyr Tyr
      165         170         175
Ser Cys His Met Lys Thr Leu Met Lys Ser Lys Gly Val Val Lys Glu
      180         185         190
Phe Pro Ser Tyr His Phe Ile Gln His Arg Leu Glu Lys Thr Tyr Val
      195         200         205
Glu Asp Gly Gly Phe Val Glu Gln His Glu Thr Ala Ile Ala Gln Met
      210         215         220
Thr Ser Ile Gly Lys Pro Leu Gly Ser Leu His Glu Trp Val
      225         230         235

```

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO: 17:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 1217 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: doppelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: genomische DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(v) FRAGMENT-TYP:

(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Codierende Sequenz

(B) ORT: 31 ... 963

(D) ANDERE INFORMATIONEN: *Renilla mulleri*-Luciferase

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

```

CGGCACGAGG TTTAAGAATC AATAAAAAAA ATG ACG TCA AAA GTT TAC GAT CCT      54
                               Met Thr Ser Lys Val Tyr Asp Pro
                               1                               5

GAA TTA AGA AAA CGC ATG ATT ACT GGT CCA CAA TGG TGG GCA AGA TGT      102
Glu Leu Arg Lys Arg Met Ile Thr Gly Pro Gln Trp Trp Ala Arg Cys
 10                               15                               20

AAA CAA ATG AAT GTT CTT GAT TCA TTT ATT AAT TAT TAT GAT TCA GAA      150
Lys Gln Met Asn Val Leu Asp Ser Phe Ile Asn Tyr Tyr Asp Ser Glu
 25                               30                               35                               40

AAA CAT GCA GAA AAT GCA GTT ATA TTT TTA CAT GGT AAT GCA GCA TCT      198
Lys His Ala Glu Asn Ala Val Ile Phe Leu His Gly Asn Ala Ala Ser
 45                               50                               55

TCT TAT TTA TGG CGT CAT GTT GTA CCA CAT GTT GAA CCA GTG GCG CGA      246

```

Ser	Tyr	Leu	Trp	Arg	His	Val	Val	Pro	His	Val	Glu	Pro	Val	Ala	Arg		
		60						65					70				
TGT	ATT	ATA	CCA	GAT	CTT	ATA	GGT	ATG	GGT	AAA	TCA	GGC	AAG	TCT	GGT	294	
Cys	Ile	Ile	Pro	Asp	Leu	Ile	Gly	Met	Gly	Lys	Ser	Gly	Lys	Ser	Gly		
		75					80					85					
AAT	GGT	TCC	TAT	AGA	TTA	CTA	GAT	CAT	TAC	AAA	TAT	CTT	ACT	GAA	TGG	342	
Asn	Gly	Ser	Tyr	Arg	Leu	Leu	Asp	His	Tyr	Lys	Tyr	Leu	Thr	Glu	Trp		
	90				95					100							
TTC	AAA	CAT	CTT	AAT	TTA	CCA	AAG	AAG	ATC	ATT	TTT	GTC	GGT	CAT	GAT	390	
Phe	Lys	His	Leu	Asn	Leu	Pro	Lys	Lys	Ile	Ile	Phe	Val	Gly	His	Asp		
	105				110				115						120		
TGG	GGT	GCT	TGT	TTA	GCA	TTT	CAT	TAT	TGC	TAT	GAA	CAT	CAG	GAT	CGC	438	
Trp	Gly	Ala	Cys	Leu	Ala	Phe	His	Tyr	Cys	Tyr	Glu	His	Gln	Asp	Arg		
			125						130					135			
ATC	AAA	GCA	GTT	GTT	CAT	GCT	GAA	AGT	GTA	GTA	GAT	GTG	ATT	GAA	TCG	486	
Ile	Lys	Ala	Val	Val	His	Ala	Glu	Ser	Val	Val	Asp	Val	Ile	Glu	Ser		
			140					145					150				
TGG	GAC	GAA	TGG	CCT	GAT	ATT	GAA	GAA	GAT	ATT	GCT	TTG	ATT	AAA	TCT	534	
Trp	Asp	Glu	Trp	Pro	Asp	Ile	Glu	Glu	Asp	Ile	Ala	Leu	Ile	Lys	Ser		
		155				160						165					
GAA	GAA	GGA	GAA	AAA	ATG	GTT	TTA	GAG	AAT	AAC	TTC	TTC	GTG	GAA	ACC	582	
Glu	Glu	Gly	Glu	Lys	Met	Val	Leu	Glu	Asn	Asn	Phe	Phe	Val	Glu	Thr		
		170				175					180						
ATG	TTG	CCA	TCA	AAA	ATC	ATG	AGA	AAG	TTG	GAA	CCA	GAG	GAA	TTT	GCT	630	
Met	Leu	Pro	Ser	Lys	Ile	Met	Arg	Lys	Leu	Glu	Pro	Glu	Glu	Phe	Ala		
					190					195					200		
GCT	TAT	CTT	GAA	CCA	TTT	AAA	GAG	AAA	GGT	GAA	GTT	CGT	CGT	CCA	ACA	678	
Ala	Tyr	Leu	Glu	Pro	Phe	Lys	Glu	Lys	Gly	Glu	Val	Arg	Arg	Pro	Thr		
				205					210					215			
TTA	TCA	TGG	CCT	CGT	GAA	ATC	CCT	TTG	GTA	AAA	GGT	GGT	AAA	CCG	GAT	726	
Leu	Ser	Trp	Pro	Arg	Glu	Ile	Pro	Leu	Val	Lys	Gly	Gly	Lys	Pro	Asp		
			220					225					230				
GTA	GTA	GAA	ATT	GTC	AGG	AAT	TAT	AAT	GCT	TAT	CTT	CGT	GCA	AGT	CAT	774	
Val	Val	Glu	Ile	Val	Arg	Asn	Tyr	Asn	Ala	Tyr	Leu	Arg	Ala	Ser	His		
		235					240					245					
GAT	TTA	CCA	AAA	ATG	TTT	ATT	GAA	TCT	GAT	CCA	GGA	TTC	TTT	TCC	AAT	822	
Asp	Leu	Pro	Lys	Met	Phe	Ile	Glu	Ser	Asp	Pro	Gly	Phe	Phe	Ser	Asn		
		250				255					260						
GCT	ATT	GTT	GAA	GGT	GCT	AAG	AAA	TTC	CCT	AAT	ACT	GAA	TTT	GTT	AAA	870	
Ala	Ile	Val	Glu	Gly	Ala	Lys	Lys	Phe	Pro	Asn	Thr	Glu	Phe	Val	Lys		
		265			270					275					280		
GTC	AAA	GGT	CTT	CAT	TTT	TCA	CAA	GAA	GAT	GCA	CCT	GAT	GAA	ATG	GGA	918	
Val	Lys	Gly	Leu	His	Phe	Ser	Gln	Glu	Asp	Ala	Pro	Asp	Glu	Met	Gly		
				285					290					295			
AAT	TAT	ATA	AAA	TCG	TTT	GTT	GAG	CGT	GTT	CTT	AAA	AAT	GAA	CAA	TAAACT	969	
Asn	Tyr	Ile	Lys	Ser	Phe	Val	Glu	Arg	Val	Leu	Lys	Asn	Glu	Gln			

300	305	310	
ACCAGGTTTC	CATGTTGCCA	CTTTAGCTGG	GTTTAATAAA
TTTCACTATC	AATTTGAACA	1029	
ATTTACATT	AATTTTAACT	ATTAATAAAT	TATGGACACA
GGGATTATAT	CAGATGATTA	1089	
ATTTAGTTGG	GAACAATGAA	TACCGAATAT	TATGAATTCT
CTTTAGCTAT	TTATAATAAT	1149	
CACATTCTTA	TGTAATAAAA	CTTTGTTTTA	ATAAATTAAT
GATTCAGAAA	AAAAAAAAAA	1209	
AAAAAAAAAA		1217	

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO: 18:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 311 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(v) FRAGMENT-TYP: innen liegend

(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

Met	Thr	Ser	Lys	Val	Tyr	Asp	Pro	Glu	Leu	Arg	Lys	Arg	Met	Ile	Thr
1				5					10					15	
Gly	Pro	Gln	Trp	Trp	Ala	Arg	Cys	Lys	Gln	Met	Asn	Val	Leu	Asp	Ser
		20						25					30		
Phe	Ile	Asn	Tyr	Tyr	Asp	Ser	Glu	Lys	His	Ala	Glu	Asn	Ala	Val	Ile
		35					40					45			
Phe	Leu	His	Gly	Asn	Ala	Ala	Ser	Ser	Tyr	Leu	Trp	Arg	His	Val	Val
	50					55					60				
Pro	His	Val	Glu	Pro	Val	Ala	Arg	Cys	Ile	Ile	Pro	Asp	Leu	Ile	Gly
	65				70					75				80	
Met	Gly	Lys	Ser	Gly	Lys	Ser	Gly	Asn	Gly	Ser	Tyr	Arg	Leu	Leu	Asp
				85					90					95	
His	Tyr	Lys	Tyr	Leu	Thr	Glu	Trp	Phe	Lys	His	Leu	Asn	Leu	Pro	Lys
			100					105					110		
Lys	Ile	Ile	Phe	Val	Gly	His	Asp	Trp	Gly	Ala	Cys	Leu	Ala	Phe	His
		115					120					125			
Tyr	Cys	Tyr	Glu	His	Gln	Asp	Arg	Ile	Lys	Ala	Val	Val	His	Ala	Glu
	130					135					140				
Ser	Val	Val	Asp	Val	Ile	Glu	Ser	Trp	Asp	Glu	Trp	Pro	Asp	Ile	Glu
	145				150					155				160	
Glu	Asp	Ile	Ala	Leu	Ile	Lys	Ser	Glu	Glu	Gly	Glu	Lys	Met	Val	Leu
				165					170					175	
Glu	Asn	Asn	Phe	Phe	Val	Glu	Thr	Met	Leu	Pro	Ser	Lys	Ile	Met	Arg
			180					185					190		
Lys	Leu	Glu	Pro	Glu	Glu	Phe	Ala	Ala	Tyr	Leu	Glu	Pro	Phe	Lys	Glu
		195					200					205			
Lys	Gly	Glu	Val	Arg	Arg	Pro	Thr	Leu	Ser	Trp	Pro	Arg	Glu	Ile	Pro
	210					215					220				
Leu	Val	Lys	Gly	Gly	Lys	Pro	Asp	Val	Val	Glu	Ile	Val	Arg	Asn	Tyr
	225				230					235				240	
Asn	Ala	Tyr	Leu	Arg	Ala	Ser	His	Asp	Leu	Pro	Lys	Met	Phe	Ile	Glu
				245					250					255	
Ser	Asp	Pro	Gly	Phe	Phe	Ser	Asn	Ala	Ile	Val	Glu	Gly	Ala	Lys	Lys
			260					265					270		
Phe	Pro	Asn	Thr	Glu	Phe	Val	Lys	Val	Lys	Gly	Leu	His	Phe	Ser	Gln
		275					280					285			
Glu	Asp	Ala	Pro	Asp	Glu	Met	Gly	Asn	Tyr	Ile	Lys	Ser	Phe	Val	Glu

290
Arg Val Leu Lys Asn Glu Gln
305 310

300

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO: 19:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 765 Basenpaare
 (B) TYP: Nucleinsäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: doppelsträngig
 (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
 (iv) ANTISENSE: NEIN
 (v) FRAGMENT-TYP:
 (vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:
 (ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Codierende Sequenz
 (B) ORT: 37 ... 594
 (D) ANDERE INFORMATIONEN:

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:

GCACGAGGGT	ACTCAAAGTA	TCTTCTGGCA	GGGAAA	ATG	GGA	GTG	AAA	GTT	CTT		54					
				Met	Gly	Val	Lys	Val	Leu							
				1				5								
TTT	GCC	CTT	ATT	TGT	ATT	GCT	GTG	GCC	GAG	GCC	AAA	CCA	ACT	GAA	AAC	102
Phe	Ala	Leu	Ile	Cys	Ile	Ala	Val	Ala	Glu	Ala	Lys	Pro	Thr	Glu	Asn	
			10					15					20			
AAT	GAA	GAT	TTC	AAC	ATT	GTA	GCT	GTA	GCT	AGC	AAC	TTT	GCT	ACA	ACG	150
Asn	Glu	Asp	Phe	Asn	Ile	Val	Ala	Val	Ala	Ser	Asn	Phe	Ala	Thr	Thr	
		25					30						35			
GAT	CTC	GAT	GCT	GAC	CGT	GGT	AAA	TTG	CCC	GGA	AAA	AAA	TTA	CCA	CTT	198
Asp	Leu	Asp	Ala	Asp	Arg	Gly	Lys	Leu	Pro	Gly	Lys	Lys	Leu	Pro	Leu	
	40					45					50					
GAG	GTA	CTC	AAA	GAA	ATG	GAA	GCC	AAT	GCT	AGG	AAA	GCT	GGC	TGC	ACT	246
Glu	Val	Leu	Lys	Glu	Met	Glu	Ala	Asn	Ala	Arg	Lys	Ala	Gly	Cys	Thr	
	55				60					65					70	
AGG	GGA	TGT	CTG	ATA	TGC	CTG	TCA	CAC	ATC	AAG	TGT	ACA	CCC	AAA	ATG	294
Arg	Gly	Cys	Leu	Ile	Cys	Leu	Ser	His	Ile	Lys	Cys	Thr	Pro	Lys	Met	
				75					80					85		
AAG	AAG	TTT	ATC	CCA	GGA	AGA	TGC	CAC	ACC	TAT	GAA	GGA	GAC	AAA	GAA	342
Lys	Lys	Phe	Ile	Pro	Gly	Arg	Cys	His	Thr	Tyr	Glu	Gly	Asp	Lys	Glu	
			90					95					100			
AGT	GCA	CAG	GGA	GGA	ATA	GGA	GAG	GCT	ATT	GTT	GAC	ATT	CCT	GAA	ATT	390
Ser	Ala	Gln	Gly	Gly	Ile	Gly	Glu	Ala	Ile	Val	Asp	Ile	Pro	Glu	Ile	
		105				110						115				
CCT	GGG	TTT	AAG	GAT	TTG	GAA	CCC	ATG	GAA	CAA	TTC	ATT	GCA	CAA	GTT	438
Pro	Gly	Phe	Lys	Asp	Leu	Glu	Pro	Met	Glu	Gln	Phe	Ile	Ala	Gln	Val	
	120					125					130					

```

GAC CTA TGT GTA GAC TGC ACA ACT GGA TGC CTC AAA GGT CTT GCC AAT      486
Asp Leu Cys Val Asp Cys Thr Thr Gly Cys Leu Lys Gly Leu Ala Asn
135                140                145                150

GTG CAA TGT TCT GAT TTA CTC AAG AAA TGG CTG CCA CAA AGA TGT GCA      534
Val Gln Cys Ser Asp Leu Leu Lys Lys Trp Leu Pro Gln Arg Cys Ala
                155                160                165

ACT TTT GCT AGC AAA ATT CAA GGC CAA GTG GAC AAA ATA AAG GGT GCC      582
Thr Phe Ala Ser Lys Ile Gln Gly Gln Val Asp Lys Ile Lys Gly Ala
                170                175                180

GGT GGT GAT TAA TCCTAATAGA ATACTGCATA ACTGGATGAT GATATACTAG CTTATT    640
Gly Gly Asp *
                185

GCTCATAAAA TGGCCATTTT TTGTAACAAA TCGAGTCTAT GTAATTCAAA ATACCTAATT    700
AATTGTTAAT ACATATGTAA TTCCTATAAA TATAATTTAT GCAATCCAAA AAAAAAAAAA    760
AAAAA                                           765

```

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO: 20:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 186 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(v) FRAGMENT-TYP: innen liegend

(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:

```

Met Gly Val Lys Val Leu Phe Ala Leu Ile Cys Ile Ala Val Ala Glu
 1                5                10                15
Ala Lys Pro Thr Glu Asn Asn Glu Asp Phe Asn Ile Val Ala Val Ala
                20                25                30
Ser Asn Phe Ala Thr Thr Asp Leu Asp Ala Asp Arg Gly Lys Leu Pro
 35                40                45
Gly Lys Lys Leu Pro Leu Glu Val Leu Lys Glu Met Glu Ala Asn Ala
 50                55                60
Arg Lys Ala Gly Cys Thr Arg Gly Cys Leu Ile Cys Leu Ser His Ile
 65                70                75
Lys Cys Thr Pro Lys Met Lys Lys Phe Ile Pro Gly Arg Cys His Thr
 85                90
Tyr Glu Gly Asp Lys Glu Ser Ala Gln Gly Gly Ile Gly Glu Ala Ile
 100                105                110
Val Asp Ile Pro Glu Ile Pro Gly Phe Lys Asp Leu Glu Pro Met Glu
 115                120                125
Gln Phe Ile Ala Gln Val Asp Leu Cys Val Asp Cys Thr Thr Gly Cys
 130                135                140
Leu Lys Gly Leu Ala Asn Val Gln Cys Ser Asp Leu Leu Lys Lys Trp
 145                150                155                160
Leu Pro Gln Arg Cys Ala Thr Phe Ala Ser Lys Ile Gln Gly Gln Val
 165                170                175
Asp Lys Ile Lys Gly Ala Gly Gly Asp
 180                185

```

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO: 21:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 1146 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: doppelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(v) FRAGMENT-TYP:

(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CBD-codierende Sequenz

(B) ORT: 1 ... 1146

(D) ANDERE INFORMATIONEN: DNA, die ein CBD-*Gaussia*-Luciferase-Fusionsprotein codiert

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CBD-codierende Sequenz

(B) ORT: 1 ... 591

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: *Gaussia*-Luciferase

(B) ORT: 591 - 1146

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 21:

ATG	TCA	GTT	GAA	TTT	TAC	AAC	TCT	AAC	AAA	TCA	GCA	CAA	ACA	AAC	TCA	48
Met	Ser	Val	Glu	Phe	Tyr	Asn	Ser	Asn	Lys	Ser	Ala	Gln	Thr	Asn	Ser	
1				5				10						15		
ATT	ACA	CCA	ATA	ATC	AAA	ATT	ACT	AAC	ACA	TCT	GAC	AGT	GAT	TTA	AAT	96
Ile	Thr	Pro	Ile	Ile	Lys	Ile	Thr	Asn	Thr	Ser	Asp	Ser	Asp	Leu	Asn	
			20					25					30			
TTA	AAT	GAC	GTA	AAA	GTT	AGA	TAT	TAT	TAC	ACA	AGT	GAT	GGT	ACA	CAA	144
Leu	Asn	Asp	Val	Lys	Val	Arg	Tyr	Tyr	Tyr	Thr	Ser	Asp	Gly	Thr	Gln	
		35					40					45				
GGA	CAA	ACT	TTC	TGG	TGT	GAC	CAT	GCT	GGT	GCA	TTA	TTA	GGA	AAT	AGC	192
Gly	Gln	Thr	Phe	Trp	Cys	Asp	His	Ala	Gly	Ala	Leu	Leu	Gly	Asn	Ser	
	50					55					60					
TAT	GTT	GAT	AAC	ACT	AGC	AAA	GTG	ACA	GCA	AAC	TTC	GTT	AAA	GAA	ACA	240
Tyr	Val	Asp	Asn	Thr	Ser	Lys	Val	Thr	Ala	Asn	Phe	Val	Lys	Glu	Thr	
65				70				75						80		
GCA	AGC	CCA	ACA	TCA	ACC	TAT	GAT	ACA	TAT	GTT	GAA	TTT	GGA	TTT	GCA	288
Ala	Ser	Pro	Thr	Ser	Thr	Tyr	Asp	Thr	Tyr	Val	Glu	Phe	Gly	Phe	Ala	
			85					90						95		
AGC	GGA	GCA	GCT	ACT	CTT	AAA	AAA	GGA	CAA	TTT	ATA	ACT	ATT	CAA	GGA	336
Ser	Gly	Ala	Ala	Thr	Leu	Lys	Lys	Gly	Gln	Phe	Ile	Thr	Ile	Gln	Gly	
			100					105					110			
AGA	ATA	ACA	AAA	TCA	GAC	TGG	TCA	AAC	TAC	ACT	CAA	ACA	AAT	GAC	TAT	384
Arg	Ile	Thr	Lys	Ser	Asp	Trp	Ser	Asn	Tyr	Thr	Gln	Thr	Asn	Asp	Tyr	
		115				120						125				
TCA	TTT	GAT	GCA	AGT	AGT	TCA	ACA	CCA	GTT	GTA	AAT	CCA	AAA	GTT	ACA	432

Ser	Phe	Asp	Ala	Ser	Ser	Ser	Thr	Pro	Val	Val	Asn	Pro	Lys	Val	Thr	
130						135					140					
GGG	TAT	ATA	GGT	GGA	GCT	AAA	GTT	CTT	GGT	ACA	GCA	CCA	GGT	TCC	GCG	480
Gly	Tyr	Ile	Gly	Gly	Ala	Lys	Val	Leu	Gly	Thr	Ala	Pro	Gly	Ser	Ala	
145					150					155					160	
GGT	CTG	GTG	CCA	CGC	GGT	AGT	ACT	GCA	ATT	GGT	ATG	AAA	GAA	ACC	GCT	528
Gly	Leu	Val	Pro	Arg	Gly	Ser	Thr	Ala	Ile	Gly	Met	Lys	Glu	Thr	Ala	
				165					170					175		
GCT	GCT	AAA	TTC	GAA	CGC	CAG	CAC	ATG	GAC	AGC	CCA	GAT	CTG	GGT	ACC	576
Ala	Ala	Lys	Phe	Glu	Arg	Gln	His	Met	Asp	Ser	Pro	Asp	Leu	Gly	Thr	
			180					185					190			
GAT	GAC	GAC	GAC	AAG	ATG	GGA	GTG	AAA	GTT	CTT	TTT	GCC	CTT	ATT	TGT	624
Asp	Asp	Asp	Asp	Lys	Met	Gly	Val	Lys	Val	Leu	Phe	Ala	Leu	Ile	Cys	
			195				200					205				
ATT	GCT	GTG	GCC	GAG	GCC	AAA	CCA	ACT	GAA	AAC	AAT	GAA	GAT	TTC	AAC	672
Ile	Ala	Val	Ala	Glu	Ala	Lys	Pro	Thr	Glu	Asn	Asn	Glu	Asp	Phe	Asn	
	210					215					220					
ATT	GTA	GCT	GTA	GCT	AGC	AAC	TTT	GCT	ACA	ACG	GAT	CTC	GAT	GCT	GAC	720
Ile	Val	Ala	Val	Ala	Ser	Asn	Phe	Ala	Thr	Thr	Asp	Leu	Asp	Ala	Asp	
	225				230					235					240	
CGT	GGT	AAA	TTG	CCC	GGA	AAA	AAA	TTA	CCA	CTT	GAG	GTA	CTC	AAA	GAA	768
Arg	Gly	Lys	Leu	Pro	Gly	Lys	Lys	Leu	Pro	Leu	Glu	Val	Leu	Lys	Glu	
				245					250					255		
ATG	GAA	GCC	AAT	GCT	AGG	AAA	GCT	GGC	TGC	ACT	AGG	GGA	TGT	CTG	ATA	816
Met	Glu	Ala	Asn	Ala	Arg	Lys	Ala	Gly	Cys	Thr	Arg	Gly	Cys	Leu	Ile	
			260					265					270			
TGC	CTG	TCA	CAC	ATC	AAG	TGT	ACA	CCC	AAA	ATG	AAG	AAG	TTT	ATC	CCA	864
Cys	Leu	Ser	His	Ile	Lys	Cys	Thr	Pro	Lys	Met	Lys	Lys	Phe	Ile	Pro	
		275					280					285				
GGA	AGA	TGC	CAC	ACC	TAT	GAA	GGA	GAC	AAA	GAA	AGT	GCA	CAG	GGA	GGA	912
Gly	Arg	Cys	His	Thr	Tyr	Glu	Gly	Asp	Lys	Glu	Ser	Ala	Gln	Gly	Gly	
	290					295					300					
ATA	GGA	GAG	GCT	ATT	GTT	GAC	ATT	CCT	GAA	ATT	CCT	GGG	TTT	AAG	GAT	960
Ile	Gly	Glu	Ala	Ile	Val	Asp	Ile	Pro	Glu	Ile	Pro	Gly	Phe	Lys	Asp	
	305				310					315					320	
TTG	GAA	CCC	ATG	GAA	CAA	TTC	ATT	GCA	CAA	GTT	GAC	CTA	TGT	GTA	GAC	1008
Leu	Glu	Pro	Met	Glu	Gln	Phe	Ile	Ala	Gln	Val	Asp	Leu	Cys	Val	Asp	
				325					330					335		
TGC	ACA	ACT	GGA	TGC	CTC	AAA	GGT	CTT	GCC	AAT	GTG	CAA	TGT	TCT	GAT	1056
Cys	Thr	Thr	Gly	Cys	Leu	Lys	Gly	Leu	Ala	Asn	Val	Gln	Cys	Ser	Asp	
			340					345					350			
TTA	CTC	AAG	AAA	TGG	CTG	CCA	CAA	AGA	TGT	GCA	ACT	TTT	GCT	AGC	AAA	1104
Leu	Leu	Lys	Lys	Trp	Leu	Pro	Gln	Arg	Cys	Ala	Thr	Phe	Ala	Ser	Lys	
		355					360					365				
ATT	CAA	GGC	CAA	GTG	GAC	AAA	ATA	AAG	GGT	GCC	GGT	GGT	GAT			1146
Ile	Gln	Gly	Gln	Val	Asp	Lys	Ile	Lys	Gly	Ala	Gly	Gly	Asp			
	370					375					380					

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO: 22:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 382 Aminosäuren
 (B) TYP: Aminosäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(v) FRAGMENT-TYP: innen liegend

(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE: CBD-*Gaussia*-Luciferase-Fusionsprotein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 22:

```

Met Ser Val Glu Phe Tyr Asn Ser Asn Lys Ser Ala Gln Thr Asn Ser
 1      5      10
Ile Thr Pro Ile Lys Ile Thr Asn Thr Ser Asp Ser Asp Leu Asn
      20      25      30
Leu Asn Asp Val Lys Val Arg Tyr Tyr Tyr Thr Ser Asp Gly Thr Gln
      35      40      45
Gly Gln Thr Phe Trp Cys Asp His Ala Gly Ala Leu Leu Gly Asn Ser
      50      55      60
Tyr Val Asp Asn Thr Ser Lys Val Thr Ala Asn Phe Val Lys Glu Thr
      65      70      75      80
Ala Ser Pro Thr Ser Thr Tyr Asp Thr Tyr Val Glu Phe Gly Phe Ala
      85      90      95
Ser Gly Ala Ala Thr Leu Lys Lys Gly Gln Phe Ile Thr Ile Gln Gly
      100      105      110
Arg Ile Thr Lys Ser Asp Trp Ser Asn Tyr Thr Gln Thr Asn Asp Tyr
      115      120      125
Ser Phe Asp Ala Ser Ser Ser Thr Pro Val Val Asn Pro Lys Val Thr
      130      135      140
Gly Tyr Ile Gly Gly Ala Lys Val Leu Gly Thr Ala Pro Gly Ser Ala
      145      150      155      160
Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser Thr Ala Ile Gly Met Lys Glu Thr Ala
      165      170      175
Ala Ala Lys Phe Glu Arg Gln His Met Asp Ser Pro Asp Leu Gly Thr
      180      185      190
Asp Asp Asp Asp Lys Met Gly Val Lys Val Leu Phe Ala Leu Ile Cys
      195      200      205
Ile Ala Val Ala Glu Ala Lys Pro Thr Glu Asn Asn Glu Asp Phe Asn
      210      215      220
Ile Val Ala Val Ala Ser Asn Phe Ala Thr Thr Asp Leu Asp Ala Asp
      225      230      235      240
Arg Gly Lys Leu Pro Gly Lys Lys Leu Pro Leu Glu Val Leu Lys Glu
      245      250      255
Met Glu Ala Asn Ala Arg Lys Ala Gly Cys Thr Arg Gly Cys Leu Ile
      260      265      270
Cys Leu Ser His Ile Lys Cys Thr Pro Lys Met Lys Lys Phe Ile Pro
      275      280      285
Gly Arg Cys His Thr Tyr Glu Gly Asp Lys Glu Ser Ala Gln Gly Gly
      290      295      300
Ile Gly Glu Ala Ile Val Asp Ile Pro Glu Ile Pro Gly Phe Lys Asp
      305      310      315      320
Leu Glu Pro Met Glu Gln Phe Ile Ala Gln Val Asp Leu Cys Val Asp
      325      330      335

```

Cys	Thr	Thr	Gly	Cys	Leu	Lys	Gly	Leu	Ala	Asn	Val	Gln	Cys	Ser	Asp
			340					345					350		
Leu	Leu	Lys	Lys	Trp	Leu	Pro	Gln	Arg	Cys	Ala	Thr	Phe	Ala	Ser	Lys
		355					360					365			
Ile	Gln	Gly	Gln	Val	Asp	Lys	Ile	Lys	Gly	Ala	Gly	Gly	Asp		
	370					375					380				

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO: 23:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 41 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN
- (v) FRAGMENT-TYP: N-terminal
- (vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL:
 - (B) ORT:
 - (D) ANDERE INFORMATIONEN: Amino-terminales *Renilla reniformis*-GFP-Peptid (Identität des Restes Nr. 5 unbekannt)
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 23

Met	Asp	Leu	Ala	Xaa	Lys	Leu	Gly	Leu	Lys	Glu	Val	Met	Pro	Thr	Lys
1				5					10					15	
Ile	Asn	Leu	Glu	Gly	Leu	Val	Gly	Asp	His	Ala	Phe	Ser	Met	Glu	Gly
			20					25					30		
Val	Gly	Glu	Gly	Asn	Ile	Leu	Glu	Gly							
		35					40								

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO: 24:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 22 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN
- (v) FRAGMENT-TYP: N-terminal
- (vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 24:

Val	Lys	Ile	Ser	Val	Thr	Lys	Gly	Ala	Pro	Leu	Pro	Phe	Ala	Phe	Asp	Ile
1				5					10					15		
Val	Ser	Val	Ala	Phe												
		20														

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO: 25:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 40 Aminosäuren
 (B) TYP: Aminosäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig
 (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid
 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
 (iv) ANTISENSE: NEIN
 (v) FRAGMENT-TYP: N-terminal
 (vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL:
 (B) ORT:
 (D) ANDERE INFORMATIONEN: *Renilla reniformis*-GFP-Peptid
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 25:

Ala Tyr Thr Gly Tyr Pro Glu Glu Ile Ser Asp Tyr Phe Leu Gln Ser Phe
 1 5 10 15
 Pro Glu Gly Phe Thr Tyr Glu Arg Gly Asn Ile Arg Tyr Gln Asp Gly Gly
 20 25 30
 Thr Ala Ile Val Lys Ser
 35 40

- (2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO: 26:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 12 Aminosäuren
 (B) TYP: Aminosäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig
 (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid
 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
 (iv) ANTISENSE: NEIN
 (v) FRAGMENT-TYP: N-terminal
 (vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL:
 (B) ORT:
 (D) ANDERE INFORMATIONEN: *Renilla reniformis*-GFP-Peptid
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 26:

Ile Val Gly Met Gln Pro Ser Tyr Glu Ser Met Tyr
 1 5 10

- (2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO: 27:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 81 Aminosäuren
 (B) TYP: Aminosäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig
 (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid
 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
 (iv) ANTISENSE: NEIN
 (v) FRAGMENT-TYP: N-terminal

- (vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL:
 (B) ORT:
 (D) ANDERE INFORMATIONEN: Carboxy-terminales *Renilla reniformis*-GFP-Peptid
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 27:

```

Thr Asn Val Thr Ser Val Ile Gly Gln Ile Ile Ala Phe Lys Leu Gln
 1                               5                               10
Thr Gly Lys His Phe Thr Tyr His Met Arg Thr Val Tyr Lys Ser Lys
                               20                               25                               30
Lys Pro Val Glu Thr Met Pro Leu Tyr His Phe Ile Gln His Arg Leu
                               35                               40                               45
Val Lys Thr Asn Val Asp Thr Ala Ser Gly Tyr Val Val Gln His Glu
 50                               55                               60
Thr Ala Ile Ala Ala His Ser Thr Ile Lys Lys Ile Glu Gly Ala Ala
65                               70                               75                               80
Arg
  
```

- (2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO: 28:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 861 Basenpaare
 (B) TYP: Nucleinsäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig
 (D) TOPOLOGIE: unbekannt
- (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
- (vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE: Pleuromamma
- (ix) MERKMAL:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: Codierende Sequenz
 (B) ORT: 148 ... 741
 (D) ANDERE INFORMATIONEN: Pleuromamma luciferase
- (x) INFORMATIONEN ZUR VERÖFFENTLICHUNG:
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 28:

```

CGGCACGAGA TTTTGTCTGT GGTGATTGGG ATTGTCTGTC TCTCAGGTCA AGCAGAAAGT 60
TCGCTGAAAG GTGATTTCTG TAGTGATGTT TCCTTCTGGG ATGTGATCAA GTACAACACT 120
GAGAGTCGAC AATGCTGTGA CACAAA ATG CTT AGA AAT TGC GCT AGG AAG CAA 174
                               Met Leu Arg Asn Cys Ala Arg Lys Gln
                               1                               5

GAG CAA GTT TGC GCC GAT GTG ACC GAG ATG AAA TGC CAA GCA GTT GCT 222
Glu Gln Val Cys Ala Asp Val Thr Glu Met Lys Cys Gln Ala Val Ala
 10                               15                               20                               25

TGG GCC GAC TGT GGA CCC AGA TTT GAT TCC ACT GGC AGG AAT AGA TGC 270
  
```

Trp	Ala	Asp	Cys	Gly	Pro	Arg	Phe	Asp	Ser	Thr	Gly	Arg	Asn	Arg	Cys	
				30					35					40		
CAA	GTT	CAA	TAC	AAG	GAC	TAC	GCG	TAC	AAG	TCC	TGC	GTG	GAA	GTT	GAT	318
Gln	Val	Gln	Tyr	Lys	Asp	Tyr	Ala	Tyr	Lys	Ser	Cys	Val	Glu	Val	Asp	
			45					50					55			
TAC	ACT	GTA	CCG	CAC	AGG	AAG	CAA	GTT	CCA	GAG	TGC	AAA	CAA	GTC	ACT	366
Tyr	Thr	Val	Pro	His	Arg	Lys	Gln	Val	Pro	Glu	Cys	Lys	Gln	Val	Thr	
		60					65					70				
AAA	GAT	AAC	TGC	GTT	ACT	GAT	TGG	GAA	GTT	GAC	GCC	AAT	GGC	AAC	AAG	414
Lys	Asp	Asn	Cys	Val	Thr	Asp	Trp	Glu	Val	Asp	Ala	Asn	Gly	Asn	Lys	
	75					80					85					
GTT	TGG	GGT	GGT	ACC	GAG	AAA	TGC	ACT	CCT	GTC	ACT	TGG	GAA	GAA	TGT	462
Val	Trp	Gly	Gly	Thr	Glu	Lys	Cys	Thr	Pro	Val	Thr	Trp	Glu	Glu	Cys	
90					95					100					105	
AAT	ATC	GTG	GAG	AAA	GAT	GTA	GAT	TTT	CCA	ACT	GTC	AAG	ACG	GAA	TGC	510
Asn	Ile	Val	Glu	Lys	Asp	Val	Asp	Phe	Pro	Thr	Val	Lys	Thr	Glu	Cys	
					110					115					120	
GGC	ATC	CTG	TCT	CAC	CTT	AAG	TAT	GCA	GAC	TTC	ATA	GAG	GGA	CCT	TCC	558
Gly	Ile	Leu	Ser	His	Leu	Lys	Tyr	Ala	Asp	Phe	Ile	Glu	Gly	Pro	Ser	
			125					130					135			
CAC	TCT	TTG	TCT	ATG	AGA	ACC	AAT	TGT	CAG	GTC	AAG	AGT	TCA	TTG	GAC	606
His	Ser	Leu	Ser	Met	Arg	Thr	Asn	Cys	Gln	Val	Lys	Ser	Ser	Leu	Asp	
			140					145					150			
TGC	CGG	CCT	GTT	AAG	ACC	AGG	AAG	TGT	GCA	ACG	GTC	GAG	TAC	CAC	GAA	654
Cys	Arg	Pro	Val	Lys	Thr	Arg	Lys	Cys	Ala	Thr	Val	Glu	Tyr	His	Glu	
		155					160					165				
TGC	AGC	ATG	AAG	CCC	CAA	GAA	GAC	TGC	AGC	CCA	GTC	ACT	GTT	CAT	ATT	702
Cys	Ser	Met	Lys	Pro	Gln	Glu	Asp	Cys	Ser	Pro	Val	Thr	Val	His	Ile	
170					175					180					185	
CCT	GAC	CAG	GAG	AAA	GTT	CAC	CAG	AAG	AAG	TGC	CTC	ACA	TAA			744
Pro	Asp	Gln	Glu	Lys	Val	His	Gln	Lys	Lys	Cys	Leu	Thr				
					190					195						
ATGTTATCAA	TTTTAGCTCT	TACTAATTTA	AACATAATAA	ATATCACATC	GAAGCCCTTT											804
ATTTTATAGA	AGTGTAATGC	TTGAATAAAT	CTAGTGAATA	AAAAAAAAAA	AAAAAAA											861

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO: 29:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 198 Aminosäuren

(B) TYP: Polypeptid

(C) STRÄNGIGKEIT: keine Angaben

(D) TOPOLOGIE: unbekannt

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Pleuromamma-Luciferase

(B) ORT:

(D) ANDERE INFORMATIONEN: Pleuromamma-Luciferase

- (vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE: Pleuromamma
- (x) INFORMATIONEN ZUR VERÖFFENTLICHUNG:
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 29:

```

Met Leu Arg Asn Cys Ala Arg Lys Gln Glu Gln Val Cys Ala Asp Val
 1           5           10           15
Thr Glu Met Lys Cys Gln Ala Val Ala Trp Ala Asp Cys Gly Pro Arg
 20           25           30
Phe Asp Ser Thr Gly Arg Asn Arg Cys Gln Val Gln Tyr Lys Asp Thr
 35           40           45
Ala Tyr Lys Ser Cys Val Glu Val Asp Tyr Thr Val Pro His Arg Lys
 50           55           60
Gln Val Pro Glu Cys Lys Gln Val Thr Lys Asp Asn Cys Val Thr Asp
 65           70           75           80
Trp Glu Val Asp Ala Asn Gly Asn Lys Val Trp Gly Gly Thr Glu Lys
 85           90           95
Cys Thr Pro Val Thr Trp Glu Glu Cys Asn Ile Val Glu Lys Asp Val
 100          105          110
Asp Phe Pro Thr Val Lys Thr Glu Cys Gly Ile Leu Ser His Leu Lys
 115          120          125
Tyr Ala Asp Phe Ile Glu Gly Pro Ser His Ser Leu Ser Met Arg Thr
 130          135          140
Asn Cys Gln Val Lys Ser Ser Leu Asp Cys Arg Pro Val Lys Thr Arg
 145          150          155          160
Lys Cys Ala Thr Val Glu Tyr His Glu Cys Ser Met Lys Pro Gln Glu
 165          170          175
Asp Cys Ser Pro Val Thr Val His Ile Pro Asp Gln Glu Lys Val His
 180          185          190
Gln Lys Lys Cys Leu Thr
 195

```

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO: 30:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 1104 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig
 - (D) TOPOLOGIE: unbekannt
- (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
- (vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE: Ptilosarcus gurneyi
- (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: Codierende Sequenz (Insertion A)

(B) ORT: 34 ... 747

(D) ANDERE INFORMATIONEN: grün fluoreszierendes Protein (GFP) von Ptilosarcus

(x) INFORMATIONEN ZUR VERÖFFENTLICHUNG:

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 30:

TCGGCACGAG CTGGCCTCCA CACTTTAGAC AAA ATG AAC CGC AAC GTA TTA AAG	54
Met Asn Arg Asn Val Leu Lys	
1 5	
AAC ACT GGA CTG AAA GAG ATT ATG TCG GCA AAA GCT AGC GTT GAA GGA	102
Asn Thr Gly Leu Lys Glu Ile Met Ser Ala Lys Ala Ser Val Glu Gly	
10 15 20	
ATC GTG AAC AAT CAC GTT TTT TCC ATG GAA GGA TTT GGA AAA GGC AAT	150
Ile Val Asn Asn His Val Phe Ser Met Glu Gly Phe Gly Lys Gly Asn	
25 30 35	
GTA TTA TTT GGA AAC CAA TTG ATG CAA ATC CGG GTT ACA AAG GGA GGT	198
Val Leu Phe Gly Asn Gln Leu Met Gln Ile Arg Val Thr Lys Gly Gly	
40 45 50 55	
CCG TTG CCA TTC GCT TTC GAT ATT GTT TCC ATA GCT TTC CAA TAC GGG	246
Pro Leu Pro Phe Ala Phe Asp Ile Val Ser Ile Ala Phe Gln Tyr Gly	
60 65 70	
AAT CGC ACT TTC ACG AAA TAC CCA GAC GAC ATT GCG GAC TAC TTT GTT	294
Asn Arg Thr Phe Thr Lys Tyr Pro Asp Ile Ala Asp Tyr Phe Val	
75 80 85	
CAA TCA TTC CCG GCT GGA TTT TTC TAC GAA AGA AAT CTA CGC TTT GAA	342
Gln Ser Phe Pro Ala Gly Phe Phe Tyr Glu Arg Asn Leu Arg Phe Glu	
90 95 100	
GAT GGC GCC ATT GTT GAC ATT CGT TCA GAT ATA AGT TTA GAA GAT GAT	390
Asp Gly Ala Ile Val Asp Ile Arg Ser Asp Ile Ser Leu Glu Asp Asp	
105 110 115	
AAG TTC CAC TAC AAA GTG GAG TAT AGA GGC AAC GGT TTC CCT AGT AAC	438
Lys Phe His Tyr Lys Val Glu Tyr Arg Gly Asn Gly Phe Pro Ser Asn	
120 125 130 135	
GGA CCC GTG ATG CAA AAA GCC ATC CTC GGC ATG GAG CCA TCG TTT GAG	486
Gly Pro Val Met Gln Lys Ala Ile Leu Gly Met Glu Pro Ser Phe Glu	
140 145 150	
GTG GTC TAC ATG AAC AGC GGC GTT CTG GTG GGC GAA GTA GAT CTC GTT	534
Val Val Tyr Met Asn Ser Gly Val Leu Val Gly Glu Val Asp Leu Val	
155 160 165	
TAC AAA CTC GAG TCA GGG AAC TAT TAC TCG TGC CAC ATG AAA ACG TTT	582
Tyr Lys Leu Glu Ser Gly Asn Tyr Tyr Ser Cys His Met Lys Thr Phe	
170 175 180	
TAC AGA TCC AAA GGT GGA GTG AAA GAA TTC CCG GAA TAT CAC TTT ATC	630
Tyr Arg Ser Lys Gly Gly Val Lys Glu Phe Pro Glu Tyr His Phe Ile	
185 190 195	

```

CAT CAT CGT CTG GAG AAA ACC TAC GTG GAA GAA GGA AGC TTC GTG GAA 678
His His Arg Leu Glu Lys Thr Tyr Val Glu Gly Ser Phe Val Glu
200                205                210                215

CAA CAC GAG ACG GCC ATT GCA CAA CTG ACC ACA ATT GGA AAA CCT CTG 726
Gln His Glu Thr Ala Ile Ala Gln Leu Thr Thr Ile Gly Lys Pro Leu
                220                225                230

GGC TCC CTT CAT GAA TGG GTG TAG AAAATGACCA ATATACTGGG GAAACCGATA 780
Gly Ser Leu His Glu Trp Val
                235

ACCGTTTGGG AGCTTGTGTA TACAAATTAT TTGGGGTCAT TTTGTAATGT GTATGTGTGT 840
TGTATGATCA ATAGACGTCG TCATTCATAG CTTGAATCCT TCAGCAAAAAG AAACCTCGAA 900
GCATATTGAA ACCTCGAAGC ATATTGAAAC CTCGACGGAG AGCGTAAAGA GACCGCACAA 960
ATTAACGCGT TTCAACCAGC AGTTGGAATC TTTAAACCGA TCAAAACTAT TAATATAAAT 1020
ATATATACCC TGTATAACTT ATATATATCT ATATAGTTTG ATATTGATTA AATCTGTTCT 1080
TGATCAAAAA AAAAAAAAAA AAAA 1104

```

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO: 31:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 1279 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: unbekannt

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE: *Ptilosarcus gurneyi*

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Codierende Sequenz (Insertion B)
- (B) ORT: 7 ... 720
- (D) ANDERE INFORMATIONEN: grün fluoreszierendes Protein (GFP) von *Ptilosarcus*

(x) INFORMATIONEN ZUR VERÖFFENTLICHUNG:

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 31:

```

                GACAAA ATG AAC CGC AAC GTA TTA AAG 27
                Met Asn Arg Asn Val Leu Lys
                1                5

AAC ACT GGA CTG AAA GAG ATT ATG TCG GCA AAA GCT AGC GTT GAA GGA 75
Asn Thr Gly Leu Lys Glu Ile Met Ser Ala Lys Ala Ser Val Glu Gly
                10                15                20

ATC GTG AAC AAT CAC GTT TTT TCC ATG GAA GGA TTT GGA AAA GGC AAT 123
Ile Val Asn Asn His Val Phe Ser Met Glu Gly Phe Gly Lys Gly Asn
                25                30                35

GTA TTA TTT GGA AAC CAA TTG ATG CAA ATC CGG GTT ACA AAG GGA GGT 171
Val Leu Phe Gly Asn Gln Leu Met Gln Ile Arg Val Thr Lys Gly Gly
                40                45                50                55

CCG TTG CCA TTC GCT TTC GAC ATT GTT TCC ATA GCT TTC CAA TAC GGG 219

```

Pro	Leu	Pro	Phe	Ala	Phe	Asp	Ile	Val	Ser	Ile	Ala	Phe	Gln	Tyr	Gly	
				60					65					70		
AAT	CGC	ACT	TTC	ACG	AAA	TAC	CCA	GAC	GAC	ATT	GCG	GAC	TAC	TTT	GTT	267
Asn	Arg	Thr	Phe	Thr	Lys	Tyr	Pro	Asp	Asp	Ile	Ala	Asp	Tyr	Phe	Val	
			75					80					85			
CAA	TCA	TTT	CCG	GCT	GGA	TTT	TTC	TAC	GAA	AGA	AAT	CTA	CGC	TTT	GAA	315
Gln	Ser	Phe	Pro	Ala	Gly	Phe	Phe	Tyr	Glu	Arg	Asn	Leu	Arg	Phe	Glu	
		90					95					100				
GAT	GGC	GCC	ATT	GTT	GAC	ATT	CGT	TCA	GAT	ATA	AGT	TTA	GAA	GAT	GAT	363
Asp	Gly	Ala	Ile	Val	Asp	Ile	Arg	Ser	Asp	Ile	Ser	Leu	Glu	Asp	Asp	
	105					110					115					
AAG	TTC	CAC	TAC	AAA	GTG	GAG	TAT	AGA	GGC	AAC	GGT	TTC	CCT	AGT	AAC	411
Lys	Phe	His	Tyr	Lys	Val	Glu	Tyr	Arg	Gly	Asn	Gly	Phe	Pro	Ser	Asn	
	120				125					130					135	
GGA	CCC	GTG	ATG	CAA	AAA	GCC	ATC	CTC	GGC	ATG	GAG	CCA	TCG	TTT	GAG	459
Gly	Pro	Val	Met	Gln	Lys	Ala	Ile	Leu	Gly	Met	Glu	Pro	Ser	Phe	Glu	
				140					145					150		
GTG	GTC	TAC	ATG	AAC	AGC	GGC	GTT	CTG	GTG	GGC	GAA	GTA	GAT	CTC	GTT	507
Val	Val	Tyr	Met	Asn	Ser	Gly	Val	Leu	Val	Gly	Glu	Val	Asp	Leu	Val	
			155					160					165			
TAC	AAA	CTC	GAG	TCA	GGG	AAC	TAT	TAC	TCG	TGC	CAC	ATG	AAA	ACG	TTT	555
Tyr	Lys	Leu	Glu	Ser	Gly	Asn	Tyr	Tyr	Ser	Cys	His	Met	Lys	Thr	Phe	
		170					175					180				
TAC	AGA	TCC	AAA	GGT	GGA	GTG	AAA	GAA	TTC	CCG	GAA	TAT	CAC	TTT	ATC	603
Tyr	Arg	Ser	Lys	Gly	Gly	Val	Lys	Glu	Phe	Pro	Glu	Tyr	His	Phe	Ile	
	185					190					195					
CAT	CAT	CGT	CTG	GAG	AAA	ACC	TAC	GTG	GAA	GAA	GGA	AGC	TTC	GTG	GAA	651
His	His	Arg	Leu	Glu	Lys	Thr	Tyr	Val	Glu	Glu	Gly	Ser	Phe	Val	Glu	
	200				205					210					215	
CAA	CAC	GAG	ACG	GCC	ATT	GCA	CAA	CTG	ACC	ACA	ATT	GGA	AAA	CCT	CTG	699
Gln	His	Glu	Thr	Ala	Ile	Ala	Gln	Leu	Thr	Thr	Ile	Gly	Lys	Pro	Leu	
				220					225					230		
GGC	TCC	CTT	CAT	GAA	TGG	GTG	TAG	AAAATGACCA	ATATACTGGG	GAAAATCACC						753
Gly	Ser	Leu	His	Glu	Trp	Val										
AATATACTGG	GGAAAATGAC	CAATTTACTG	GGGAAAATGA	CCAATATACT	GTAGAAAATC											813
ACCAATATAC	TGGGGAAAAT	GACCAATTTA	CTGGGGAAAT	GACCAATTTA	CTGTAGAAAA											873
TCACCAATAT	ACTGTGGAAA	ATGACCAAAA	TACTGTAGAA	ATGTTACAC	TGGGTTGATA											933
ACCGTTTCGA	TAACCGTTG	GAAGCTTGTG	TATACAAGTT	ATTTGGGGTC	ATTTTGTAAAT											993
GTGTATGTGT	GTTGTATGAT	CTATAGACGT	CGTCATTCAT	AGCTTGAATC	CTTCAGCAAA											1053
AGAAACCTCG	AAGCATATTG	AAACCTCGAC	GGAGAGCATA	AAGAGACCGC	ACGTACACAA											1113
ATTATAATAC	CAGCAGTTGG	AATCTTTAAA	CCGATCAAAA	CTATTAATAT	ATATATACAC											1173
CCTGTATAAC	ATATATATAT	ATATATATCT	ACATAGTTTG	ATATTGATTA	AATCTGTTCT											1233
TGATCACTAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAA												1279

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO: 32:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- (A) LÄNGE: 238 Aminosäuren

- (B) TYP: Polypeptid
 (C) STRÄNGIGKEIT: keine Angaben
 (D) TOPOLOGIE: unbekannt

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: grün fluoreszierendes Protein (GFP) von *Ptilosarcus gurneyi*
 (B) ORT:
 (D) ANDERE INFORMATIONEN: grün fluoreszierendes Protein (GFP) von *Ptilosarcus-gurneyi*

(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE: *Ptilosarcus gurneyi*

(x) INFORMATIONEN ZUR VERÖFFENTLICHUNG:

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 32:

```

Met Asn Arg Asn Val Leu Lys Asn Thr Gly Leu Lys Glu Ile Met Ser
 1          5          10          15
Ala Lys Ala Ser Val Glu Gly Ile Val Asn Asn His Val Phe Ser Met
 20          25          30
Glu Gly Phe Gly Lys Gly Asn Asn Val Leu Phe Gly Asn Gln Leu Met Gln
 35          40          45
Ile Arg Val Thr Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Phe Asp Ile Val
 50          55          60
Ser Ile Ala Phe Gln Tyr Gly Asn Arg Thr Phe Thr Lys Tyr Pro Asp
 65          70          75          80
Asp Ile Ala Asp Tyr Phe Val Gln Ser Phe Pro Ala Gly Phe Phe Tyr
 85          90          95
Glu Arg Asn Leu Arg Phe Glu Asp Gly Ala Ile Val Asp Ile Arg Ser
 100         105         110
Asp Ile Ser Leu Glu Asp Asp Lys Phe His Tyr Lys Val Glu Tyr Arg
 115         120         125
Gly Asn Gly Phe Pro Ser Asn Gly Pro Val Met Gln Lys Ala Ile Leu
 130         135         140
Gly Met Glu Pro Ser Phe Glu Val Val Tyr Met Asn Ser Gly Val Leu
 145         150         155         160
Val Gly Glu Val Asp Leu Val Tyr Lys Leu Glu Ser Gly Asn Tyr Tyr
 165         170         175
Ser Cys His Met Lys Thr Phe Tyr Arg Ser Lys Gly Gly Val Lys Glu
 180         185         190
Phe Pro Glu Tyr His Phe Ile His His Arg Leu Glu Lys Thr Tyr Val
 195         200         205
Glu Glu Gly Ser Phe Val Glu Gln His Glu Thr Ala Ile Ala Gln Leu
 210         215         220
Thr Thr Ile Gly Lys Pro Leu Gly Ser Leu His Glu Trp Val
 225         230

```

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Bryan, Bruce
Szent-Gyorgyi, Christopher
PROLUME, LTD

<120> LUCIFERASEN, FLUORESZIERENDE PROTEINE, NUCLEINSÄUREN, DIE DIE LUCIFERASEN UND DIE FLUORESZIERENDEN PROTEINE CODIEREN UND DIE VERWENDUNG DAVON IN DER DIAGNOSTIK, BEI DER DURCHMUSTERUNG MIT HOHEM DURCHSATZ UND FÜR NOVITÄTEN

<130> 24729-121PC

<140> PCT/US99/06698

<141> 1999-03-26

<150> 60/102,939

<151> 1998-10-01

<150> 60/089,367

<151> 1998-06-15

<150> 60/079,624

<151> 1998-03-27

<160> 32

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1196

<212> DNA

<213> Renilla reniformis

<220>

<221> CDS

<222> (1) ... (942)

<220>

<223> Renilla reniformis-Luciferase

<300>

<310> 5,418,155

<311> 1993-12-14

<312> 1995-05-23

<400> 1

```

agc tta aag atg act tcg aaa gtt tat gat cca gaa caa agg aaa cgg      48
Ser Leu Lys Met Thr Ser Lys Val Tyr Asp Pro Glu Gln Arg Lys Arg
 1                               5                               10                               15

atg ata act ggt ccg cag tgg tgg gcc aga tgt aaa caa atg aat gtt      96
Met Ile Thr Gly Pro Gln Trp Trp Ala Arg Cys Lys Gln Met Asn Val
 20                               25                               30

ctt gat tca ttt att aat tat tat gat tca gaa aaa cat gca gaa aat      144
Leu Asp Ser Phe Ile Asn Tyr Tyr Asp Ser Glu Lys His Ala Glu Asn
 35                               40                               45

gct gtt att ttt tta cat ggt aac gcg gcc tct tct tat tta tgg cga      192
Ala Val Ile Phe Leu His Gly Asn Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Trp Arg
 50                               55                               60

cat gtt gtg cca cat att gag cca gta gcg egg tgt att ata cca gat      240
His Val Val Pro His Ile Glu Pro Val Ala Arg Cys Ile Ile Pro Asp
 65                               70                               75                               80

```


Leu	Ile	Gly	Met	Gly	Lys	Ser	Gly	Lys	Ser	Gly	Asn	Gly	Ser	Tyr	Arg		
				85					90					95			
tta	ctt	gat	cat	tac	aaa	tat	ctt	act	gca	tgg	ttg	aac	ttc	tta	att		336
Leu	Leu	Asp	His	Tyr	Lys	Tyr	Leu	Thr	Ala	Trp	Leu	Asn	Phe	Leu	Ile		
			100				105						110				
tac	caa	aga	aga	tca	ttt	ttt	gtc	ggc	cat	gat	tgg	ggg	gct	tgt	ttg		384
Tyr	Gln	Arg	Arg	Ser	Phe	Phe	Val	Gly	His	Asp	Trp	Gly	Ala	Cys	Leu		
		115					120					125					
gca	ttt	cat	tat	agc	tat	gag	cat	caa	gat	aag	atc	aaa	gca	ata	gtt		432
Ala	Phe	His	Tyr	Ser	Tyr	Glu	His	Gln	Asp	Lys	Ile	Lys	Ala	Ile	Val		
	130					135					140						
cac	gct	gaa	agt	gta	gta	gat	gtg	att	gaa	tca	tgg	gat	gaa	tgg	cct		480
His	Ala	Glu	Ser	Val	Val	Asp	Val	Ile	Glu	Ser	Trp	Asp	Glu	Trp	Pro		
	145			150					155						160		
gat	att	gaa	gaa	gat	att	gcg	ttg	atc	aaa	tct	gaa	gaa	gga	gaa	aaa		528
Asp	Ile	Glu	Glu	Asp	Ile	Ala	Leu	Ile	Lys	Ser	Glu	Glu	Gly	Glu	Lys		
			165						170					175			
atg	ggt	ttg	gag	aat	aac	ttc	ttc	gtg	gaa	acc	atg	ttg	cca	tca	aaa		576
Met	Val	Leu	Glu	Asn	Asn	Phe	Phe	Val	Glu	Thr	Met	Leu	Pro	Ser	Lys		
			180					185					190				
atc	atg	aga	aag	tta	gaa	cca	gaa	gaa	ttt	gca	gca	tat	ctt	gaa	cca		624
Ile	Met	Arg	Lys	Leu	Glu	Pro	Glu	Glu	Phe	Ala	Ala	Tyr	Leu	Glu	Pro		
		195					200					205					
ttc	aaa	gag	aaa	ggg	gaa	ggt	cgt	cgt	cca	aca	tta	tca	tgg	cct	cgt		672
Phe	Lys	Glu	Lys	Gly	Glu	Val	Arg	Arg	Pro	Thr	Leu	Ser	Trp	Pro	Arg		
	210					215					220						
gaa	atc	ccg	tta	gta	aaa	ggt	ggt	aaa	cct	gac	ggt	gta	caa	att	ggt		720
Glu	Ile	Pro	Leu	Val	Lys	Gly	Gly	Lys	Pro	Asp	Val	Val	Gln	Ile	Val		
	225			230						235					240		
agg	aat	tat	aat	gct	tat	cta	cgt	gca	agt	gat	gat	tta	cca	aaa	atg		768
Arg	Asn	Tyr	Asn	Ala	Tyr	Leu	Arg	Ala	Ser	Asp	Asp	Leu	Pro	Lys	Met		
			245						250					255			
ttt	att	gaa	tcg	gat	cca	gga	ttc	ttt	tcc	aat	gct	att	ggt	gaa	ggc		816
Phe	Ile	Glu	Ser	Asp	Pro	Gly	Phe	Phe	Ser	Asn	Ala	Ile	Val	Glu	Gly		
			260					265					270				
gcc	aag	aag	ttt	cct	aat	act	gaa	ttt	gtc	aaa	gta	aaa	ggg	ctt	cat		864
Ala	Lys	Lys	Phe	Pro	Asn	Thr	Glu	Phe	Val	Lys	Val	Lys	Gly	Leu	His		
		275					280					285					
ttt	tcg	caa	gaa	gat	gca	cct	gat	gaa	atg	gga	aaa	tat	atc	aaa	tcg		912
Phe	Ser	Gln	Glu	Asp	Ala	Pro	Asp	Glu	Met	Gly	Lys	Tyr	Ile	Lys	Ser		
	290					295					300						
ttc	ggt	gag	cga	ggt	ctc	aaa	aat	gaa	caa	taa	ttactttggt	tttttattta					965
Phe	Val	Glu	Arg	Val	Leu	Lys	Asn	Glu	Gln								
	305				310												
catttttccc	gggtttaata	atataaatgt	cattttcaac	aattttattt	taactgaata												1025
tttcacaggg	aacattcata	tatggtgatt	aatttagctc	gaactttact	ctgtcatatc												1085
attttggaat	attacctctt	tcaatgaaac	tttataaaca	gtggttcaat	taattaatat												1145
atattataat	tacatttggt	atgtaataaa	ctcggtttta	ttataaaaaa	a												1196

<210> 2
 <211> 1822
 <212> DNA

<213> Cypridina hilgendorffii
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) ... (1665)
 <220>
 <223> Cypridina hilgendorffii-Luciferase
 <300>
 <310> EP 0 387 355
 <311> 1989-08-09
 <312> 1990-09-19
 <400> 2

```

atg aag cta ata att ctg tct att ata ttg gcc tac tgt gtc aca gtc      48
Met Lys Leu Ile Ile Leu Ser Ile Ile Leu Ala Tyr Cys Val Thr Val
  1                               5                               10                               15

aac tgc cag gat gca tgt cct gta gaa gct gaa gca ccg tca agt aca      96
Asn Cys Gln Asp Ala Cys Pro Val Glu Ala Glu Ala Pro Ser Ser Thr
                20                               25                               30

cca aca gtc cca aca tct tgt gaa gct aaa gaa gga gaa tgt atc gat     144
Pro Thr Val Pro Thr Ser Cys Glu Ala Lys Glu Gly Glu Cys Ile Asp
                35                               40                               45

acc aga tgc gca aca tgt aaa cga gac ata cta tca gac gga ctg tgt     192
Thr Arg Cys Ala Thr Cys Lys Arg Asp Ile Leu Ser Asp Gly Leu Cys
                50                               55                               60

gaa aat aaa cca ggg aag aca tgc tgt aga atg tgc cag tat gta att     240
Glu Asn Lys Pro Gly Lys Thr Cys Cys Arg Met Cys Gln Tyr Val Ile
  65                               70                               75                               80

gaa tcc aga gta gaa gct gct gga tat ttt aga acg ttt tac gcc aaa     288
Glu Ser Arg Val Glu Ala Ala Gly Tyr Phe Arg Thr Phe Tyr Ala Lys
                85                               90                               95

aga ttt aat ttt cag gaa cct ggt aaa tat gtg ctg gct cga gga acc     336
Arg Phe Asn Phe Gln Glu Pro Gly Lys Tyr Val Leu Ala Arg Gly Thr
                100                              105                              110

aag ggt ggc gac tgg tct gta acc ctc acc atg gag aat cta gat gga     384
Lys Gly Gly Asp Trp Ser Val Thr Leu Thr Met Glu Asn Leu Asp Gly
                115                              120                              125

cag aag gga gct gta ctg act aag aca aca ctg gag gta gta gga gac     432
Gln Lys Gly Ala Val Leu Thr Lys Thr Thr Leu Glu Val Val Gly Asp
                130                              135                              140

gta ata gac att act caa gct act gca gat cct atc aca gtt aac gga     480
Val Ile Asp Ile Thr Gln Ala Thr Ala Asp Pro Ile Thr Val Asn Gly
  145                              150                              155                              160

gga gct gac cca gtt atc gct aac ccg ttc aca att ggt gag gtg acc     528
Gly Ala Asp Pro Val Ile Ala Asn Pro Phe Thr Ile Gly Glu Val Thr
                165                              170                              175

att gct gtt gtc gaa ata ccc ggc ttc aat att aca gtc atc gaa ttc     576
Ile Ala Val Val Glu Ile Pro Gly Phe Asn Ile Thr Val Ile Glu Phe
                180                              185                              190

ttt aaa cta atc gtg ata gat att ctg gga gga aga tct gtg aga att     624
Phe Lys Leu Ile Val Ile Asp Ile Leu Gly Gly Arg Ser Val Arg Ile
                195                              200                              205

```

gct cca gac aca gca aac aaa gga ctg ata tct ggt atc tgt ggt aat	672
Ala Pro Asp Thr Ala Asn Lys Gly Leu Ile Ser Gly Ile Cys Gly Asn	
210 215 220	
ctg gag atg aat gac gct gat gac ttt act aca gac gca gat cag ctg	720
Leu Glu Met Asn Asp Ala Asp Asp Phe Thr Thr Asp Ala Asp Gln Leu	
225 230 235 240	
gcg atc caa ccc aac ata aac aaa gag ttc gac ggc tgc cca ttc tac	768
Ala Ile Gln Pro Asn Ile Asn Lys Glu Phe Asp Gly Cys Pro Phe Tyr	
245 250 255	
ggg aat cct tct gat atc gaa tac tgc aaa ggt ctc atg gag cca tac	816
Gly Asn Pro Ser Asp Ile Glu Tyr Cys Lys Gly Leu Met Glu Pro Tyr	
260 265 270	
aga gct gta tgt cgt aac aat atc aac ttc tac tat tac act ctg tcc	864
Arg Ala Val Cys Arg Asn Asn Ile Asn Phe Tyr Tyr Tyr Thr Leu Ser	
275 280 285	
tgc gcc ttc gct tac tgt atg gga gga gaa gaa aga gct aaa cac gtc	912
Cys Ala Phe Ala Tyr Cys Met Gly Gly Glu Glu Arg Ala Lys His Val	
290 295 300	
ctt ttc gac tat gtt gag aca tgc gct gca ccg gaa acg aga gga acg	960
Leu Phe Asp Tyr Val Glu Thr Cys Ala Ala Pro Glu Thr Arg Gly Thr	
305 310 315 320	
tgt gtt tta tca gga cat act ttc tat gac aca ttc gac aaa gcc aga	1008
Cys Val Leu Ser Gly His Thr Phe Tyr Asp Thr Phe Asp Lys Ala Arg	
325 330 335	
tat caa ttc cag ggc cca tgc aaa gag ctt ctg atg gcc gca gac tgt	1056
Tyr Gln Phe Gln Gly Pro Cys Lys Glu Leu Leu Met Ala Ala Asp Cys	
340 345 350	
tac tgg aac aca tgg gat gta aag gtt tca cat aga gat gtt gag tca	1104
Tyr Trp Asn Thr Trp Asp Val Lys Val Ser His Arg Asp Val Glu Ser	
355 360 365	
tac act gag gta gag aaa gta aca atc agg aaa cag tca act gta gta	1152
Tyr Thr Glu Val Glu Lys Val Thr Ile Arg Lys Gln Ser Thr Val Val	
370 375 380	
gat ttg att gtg gat ggc aag cag gtc aag gtt gga gga gtg gat gta	1200
Asp Leu Ile Val Asp Gly Lys Gln Val Lys Val Gly Gly Val Asp Val	
385 390 395 400	
tct atc ccg tac agt tct gag aac aca tcc ata tac tgg cag gat gga	1248
Ser Ile Pro Tyr Ser Ser Glu Asn Thr Ser Ile Tyr Trp Gln Asp Gly	
405 410 415	
gac atc ctg acg acg gcc atc cta cct gaa gct ctt gtc gtt aag ttc	1296
Asp Ile Leu Thr Thr Ala Ile Leu Pro Glu Ala Leu Val Val Lys Phe	
420 425 430	
aac ttt aag cag ctc ctt gta gtt cat atc aga gat cca ttc gat gga	1344
Asn Phe Lys Gln Leu Leu Val Val His Ile Arg Asp Pro Phe Asp Gly	
435 440 445	
aag aca tgc ggc ata tgt ggt aac tat aat caa gat tca act gat gat	1392
Lys Thr Cys Gly Ile Cys Gly Asn Tyr Asn Gln Asp Ser Thr Asp Asp	
450 455 460	
ttc ttt gac gca gaa gga gca tgc gct ctg acc ccc aat ccc cca gga	1440
Phe Phe Asp Ala Glu Gly Ala Cys Ala Leu Thr Pro Asn Pro Pro Gly	
465 470 475 480	

```

tgt aca gag gag cag aaa cca gaa gct gag cga ctc tgc aat agt cta 1488
Cys Thr Glu Glu Gln Lys Pro Glu Ala Glu Arg Leu Cys Asn Ser Leu
          485          490          495

ttt gat agt tct atc gac gag aaa tgt aat gtc tgc tac aag cct gac 1536
Phe Asp Ser Ser Ile Asp Glu Lys Cys Asn Val Cys Tyr Lys Pro Asp
          500          505          510

cgt att gca cga tgt atg tac gag tat tgc ctg agg gga cag caa gga 1584
Arg Ile Ala Arg Cys Met Tyr Glu Tyr Cys Leu Arg Gly Gln Gln Gly
          515          520          525

ttc tgt gac cat gct tgg gag ttc aaa aaa gaa tgc tac ata aag cat 1632
Phe Cys Asp His Ala Trp Glu Phe Lys Lys Glu Cys Tyr Ile Lys His
          530          535          540

gga gac act cta gaa gta cca cct gaa tgc caa taa atgaacaaag 1678
Gly Asp Thr Leu Glu Val Pro Pro Glu Cys Gln
          545          550          555

atacagaagc taagactact acagcagaag ataaaagaga agctgtagtt cttcaaaaac 1738
agtatatttt gatgtactca ttgtttactt acataaaaat aaattgttat tatcataacg 1798
taaagaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 1822

```

```

<210> 3
<211> 1644
<212> DNA
<213> Luciola cruciata

<220>
<221> CDS
<222> (1) ... (1644)

<220>
<223> Luciola cruciata (Leuchtkäfer) Luciferase

<300>
<310> 4,968,613
<311> 1988-07-26
<312> 1990-11-06

<400> 3

```

```

atg gaa aac atg gaa aac gat gaa aat att gta gtt gga cct aaa ccg 48
Met Glu Asn Met Glu Asn Asp Glu Asn Ile Val Val Gly Pro Lys Pro
 1          5          10          15

ttt tac cct atc gaa gag gga tct gct gga aca caa tta cgc aaa tac 96
Phe Tyr Pro Ile Glu Glu Gly Ser Ala Gly Thr Gln Leu Arg Lys Tyr
          20          25          30

atg gag cga tat gca aaa ctt ggc gca att gct ttt aca aat gca gtt 144
Met Glu Arg Tyr Ala Lys Leu Gly Ala Ile Ala Phe Thr Asn Ala Val
          35          40          45

act ggt gtt gat tat tct tac gcc gaa tac ttg gag aaa tca tgt tgt 192
Thr Gly Val Asp Tyr Ser Tyr Ala Glu Tyr Leu Glu Lys Ser Cys Cys
          50          55          60

cta gga aaa gct ttg caa aat tat ggt ttg gtt gtt gat ggc aga att 240
Leu Gly Lys Ala Leu Gln Asn Tyr Gly Leu Val Val Asp Gly Arg Ile
          65          70          75          80

gcg tta tgc agt gaa aac tgt gaa gaa ttt ttt att cct gta ata gcc 288
Ala Leu Cys Ser Glu Asn Cys Glu Glu Phe Phe Ile Pro Val Ile Ala
          85          90          95

```

gga ctg ttt ata ggt gta ggt gtt gca ccc act aat gag att tac act Gly Leu Phe Ile Gly Val Gly Val Ala Pro Thr Asn Glu Ile Tyr Thr 100 105 110	336
tta cgt gaa ctg gtt cac agt tta ggt atc tct aaa cca aca att gta Leu Arg Glu Leu Val His Ser Leu Gly Ile Ser Lys Pro Thr Ile Val 115 120 125	384
ttt agt tct aaa aaa ggc tta gat aaa gtt ata aca gta cag aaa aca Phe Ser Ser Lys Lys Gly Leu Asp Lys Val Ile Thr Val Gln Lys Thr 130 135 140	432
gta act act att aaa acc att gtt ata cta gat agc aaa gtt gat tat Val Thr Thr Ile Lys Thr Ile Val Ile Leu Asp Ser Lys Val Asp Tyr 145 150 155 160	480
cga gga tat caa tgt ctg gac acc ttt ata aaa aga aac act cca cca Arg Gly Tyr Gln Cys Leu Asp Thr Phe Ile Lys Arg Asn Thr Pro Pro 165 170 175	528
ggt ttt caa gca tcc agt ttc aaa act gtg gaa gtt gac cgt aaa gaa Gly Phe Gln Ala Ser Ser Phe Lys Thr Val Glu Val Asp Arg Lys Glu 180 185 190	576
caa gtt gct ctt ata atg aac tct tcg ggt tct acc ggt ttg cca aaa Gln Val Ala Leu Ile Met Asn Ser Ser Gly Ser Thr Gly Leu Pro Lys 195 200 205	624
ggc gta caa ctt act cac gaa aat aca gtc act aga ttt tct cat gct Gly Val Gln Leu Thr His Glu Asn Thr Val Thr Arg Phe Ser His Ala 210 215 220	672
aga gat ccg att tat ggt aac caa gtt tca cca ggc acc gct gtt tta Arg Asp Pro Ile Tyr Gly Asn Gln Val Ser Pro Gly Thr Ala Val Leu 225 230 235 240	720
act gtc gtt cca ttc cat cat ggt ttt ggt atg ttc act act cta ggg Thr Val Val Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Phe Thr Thr Leu Gly 245 250 255	768
tat tta att tgt ggt ttt cgt gtt gta atg tta aca aaa ttc gat gaa Tyr Leu Ile Cys Gly Phe Arg Val Val Met Leu Thr Lys Phe Asp Glu 260 265 270	816
gaa aca ttt tta aaa act cta caa gat tat aaa tgt aca agt gtt att Glu Thr Phe Leu Lys Thr Leu Gln Asp Tyr Lys Cys Thr Ser Val Ile 275 280 285	864
ctt gta ccg acc ttg ttt gca att ctc aac aaa agt gaa tta ctc aat Leu Val Pro Thr Leu Phe Ala Ile Leu Asn Lys Ser Glu Leu Leu Asn 290 295 300	912
aaa tac gat ttg tca aat tta gtt gag att gca tct ggc gga gca cct Lys Tyr Asp Leu Ser Asn Leu Val Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro 305 310 315 320	960
tta tca aaa gaa gtt ggt gaa gct gtt gct aga cgc ttt aat ctt ccc Leu Ser Lys Glu Val Gly Glu Ala Val Ala Arg Arg Phe Asn Leu Pro 325 330 335	1008
ggt gtt cgt caa ggt tat ggt tta aca gaa aca aca tct gcc att att Gly Val Arg Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala Ile Ile 340 345 350	1056
att aca cca gaa gga gac gat aaa cca gga gct tct gga aaa gtc gtg Ile Thr Pro Glu Gly Asp Asp Lys Pro Gly Ala Ser Gly Lys Val Val 355 360 365	1104

```

ccg ttg ttt aaa gca aaa gtt att gat ctt gat acc aaa aaa tct tta      1152
Pro Leu Phe Lys Ala Lys Val Ile Asp Leu Asp Thr Lys Lys Ser Leu
370                               375                               380

ggt cct aac aga cgt gga gaa gtt tgt gtt aaa gga cct atg ctt atg      1200
Gly Pro Asn Arg Arg Gly Glu Val Cys Val Lys Gly Pro Met Leu Met
385                               390                               395                               400

aaa ggt tat gta aat aat cca gaa gca aca aaa gaa ctt att gac gaa      1248
Lys Gly Tyr Val Asn Asn Pro Glu Ala Thr Lys Glu Leu Ile Asp Glu
405                               410                               415

gaa ggt tgg ctg cac acc gga gat att gga tat tat gat gaa gaa aaa      1296
Glu Gly Trp Leu His Thr Gly Asp Ile Gly Tyr Tyr Asp Glu Glu Lys
420                               425                               430

cat ttc ttt att gtc gat cgt ttg aag tct tta atc aaa tac aaa gga      1344
His Phe Phe Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly
435                               440                               445

tac caa gta cca cct gcc gaa tta gaa tcc gtt ctt ttg caa cat cca      1392
Tyr Gln Val Pro Pro Ala Glu Leu Glu Ser Val Leu Leu Gln His Pro
450                               455                               460

tct atc ttt gat gct ggt gtt gcc ggc gtt cct gat cct gta gct ggc      1440
Ser Ile Phe Asp Ala Gly Val Ala Gly Val Pro Asp Pro Val Ala Gly
465                               470                               475                               480

gag ctt cca gga gcc gtt gtt gta ctg gaa agc gga aaa aat atg acc      1488
Glu Leu Pro GLY Ala Val Val Val Leu Glu Ser Gly Lys Asn Met Thr
485                               490                               495

gaa aaa gaa gta atg gat tat gtt gca agt caa gtt tca aat gca aaa      1536
Glu Lys Glu Val Met Asp Tyr Val Ala Ser Gln Val Ser Asn Ala Lys
500                               505                               510

cgt tta cgt ggt ggt gtt cgt ttt gtg gat gaa gta cct aaa ggt ctt      1584
Arg Leu Arg Gly Gly Val Arg Phe Val Asp Glu Val Pro Lys Gly Leu
515                               520                               525

act gga aaa att gac ggc aga gca att aga gaa atc ctt aag aaa cca      1632
Thr Gly Lys Ile Asp Gly Arg Ala Ile Arg Glu Ile Leu Lys Lys Pro
530                               535                               540

ggt gct aag atg
Val Ala Lys Met
545

```

```

<210> 4
<211> 1820
<212> DNA
<213> Vargula cypridina

<220>
<221> CDS
<222> (1) ... (1664)

<220>
<223> Vargula (cypridina) Luciferase

<300>
<310> JP 3-30678
<311> 1989-06-29
<312> 1991-02-08

<300>
<301> Thompson, E.M.

```

Nagata, S.

Tsuji, F.I.

- <302> Cloning and expression of cDNA for the luciferase from the marine ostracod *Vargula hilgendorffii*
 <303> Proc. Natl. Acad. Sci. USA
 <304> 86(17)
 <306> 1326-1332
 <307> 1989-09
 <400> 4

```

atg aag ata ata att ctg tct gtt ata ttg gcc tac tgt gtc acc gac      48
Met Lys Ile Ile Ile Leu Ser Val Ile Leu Ala Tyr Cys Val Thr Asp
  1                               5                               10                               15

aac tgt caa gat gca tgt cct gta gaa gcg gaa ccg cca tca agt aca      96
Asn Cys Gln Asp Ala Cys Pro Val Glu Ala Glu Pro Pro Ser Ser Thr
                20                               25                               30

cca aca gtt cca act tct tgt gaa gct aaa gaa gga gaa tgt ata gat      144
Pro Thr Val Pro Thr Ser Cys Glu Ala Lys Glu Gly Glu Cys Ile Asp
                35                               40                               45

acc aga tgc gca aca tgt aaa cga gat ata cta tca gat gga ctg tgt      192
Thr Arg Cys Ala Thr Cys Lys Arg Asp Ile Leu Ser Asp Gly Leu Cys
                50                               55                               60

gaa aat aaa cca ggg aag aca tgc tgt aga atg tgc cag tat gtg att      240
Glu Asn Lys Pro Gly Lys Thr Cys Cys Arg Met Cys Gln Tyr Val Ile
  65                               70                               75                               80

gaa tgc aga gta gaa gca gct ggt tat ttt aga acg ttt tac ggc aaa      288
Glu Cys Arg Val Glu Ala Ala Gly Tyr Phe Arg Thr Phe Tyr Gly Lys
                85                               90                               95

aga ttt aat ttt cag gaa cct ggt aaa tat gtg ctg gct agg gga acc      336
Arg Phe Asn Phe Gln Glu Pro Gly Lys Tyr Val Leu Ala Arg Gly Thr
                100                               105                               110

aag ggt ggc gat tgg tct gta acc ctc acc atg gag aat cta gat gga      384
Lys Gly Gly Asp Trp Ser Val Thr Leu Thr Met Glu Asn Leu Asp Gly
                115                               120                               125

cag aag gga gct gtg ctg act aag aca aca ctg gag gtt gca gga gac      432
Gln Lys Gly Ala Val Leu Thr Lys Thr Thr Leu Glu Val Ala Gly Asp
                130                               135                               140

gta ata gac att act caa gct act gca gat cct atc aca gtt aac gga      480
Val Ile Asp Ile Thr Gln Ala Thr Ala Asp Pro Ile Thr Val Asn Gly
  145                               150                               155                               160

gga gct gac cca gtt atc gct aac ccg ttc aca att ggt gag gtg acc      528
Gly Ala Asp Pro Val Ile Ala Asn Pro Phe Thr Ile Gly Glu Val Thr
                165                               170                               175

att gct gtt gtt gaa ata ccg ggc ttc aat atc aca gtc atc gaa ttc      576
Ile Ala Val Val Glu Ile Pro Gly Phe Asn Ile Thr Val Ile Glu Phe
                180                               185                               190

ttt aaa cta atc gtg att gat att ctg gga gga aga tct gtc aga att      624
Phe Lys Leu Ile Val Ile Asp Ile Leu Gly Gly Arg Ser Val Arg Ile
                195                               200                               205

gct cca gac aca gca aac aaa gga ctg ata tct ggt atc tgt ggt aat      672
Ala Pro Asp Thr Ala Asn Lys Gly Leu Ile Ser Gly Ile Cys Gly Asn
                210                               215                               220

ctg gag atg aat gac gct gat gac ttt act aca gat gca gat cag ctg      720

```

Leu 225	Glu	Met	Asn	Asp	Ala 230	Asp	Asp	Phe	Thr	Thr 235	Asp	Ala	Asp	Gln	Leu 240	
gcg	atc	caa	ccc	aac	ata	aac	aaa	gag	ttc	gac	ggc	tgc	cca	ttc	tat	768
Ala	Ile	Gln	Pro	Asn 245	Ile	Asn	Lys	Glu	Phe 250	Asp	Gly	Cys	Pro	Phe 255	Tyr	
ggc	aat	cct	tct	gat	atc	gaa	tac	tgc	aaa	ggc	ctg	atg	gag	cca	tac	816
Gly	Asn	Pro	Ser 260	Asp	Ile	Glu	Tyr	Cys 265	Lys	Gly	Leu	Met	Glu 270	Pro	Tyr	
aga	gct	gta	tgt	cgt	aac	aat	atc	aac	ttc	tac	tat	tac	act	cta	tcc	864
Arg	Ala	Val 275	Cys	Arg	Asn	Asn	Ile 280	Asn	Phe	Tyr	Tyr	Tyr 285	Thr	Leu	Ser	
tgt	gcc	ttc	gct	tac	tgt	atg	gga	gga	gaa	gaa	aga	gct	aaa	cac	gtc	912
Cys	Ala	Phe 290	Ala	Tyr	Cys	Met 295	Gly	Gly	Glu	Glu	Arg 300	Ala	Lys	His	Val	
ctt	ttc	gac	tat	gtt	gag	aca	tgc	gct	gcg	ccg	gaa	acg	aga	gga	acg	960
Leu 305	Phe	Asp	Tyr	Val 310	Glu	Thr	Cys	Ala	Ala 315	Pro	Glu	Thr	Arg	Gly	Thr 320	
tgt	ggt	tta	tca	gga	cat	act	ttc	tat	gac	aca	ttc	gac	aaa	gca	aga	1008
Cys	Val	Leu	Ser 325	Gly	His	Thr	Phe	Tyr	Asp 330	Thr	Phe	Asp	Lys	Ala 335	Arg	
tat	caa	ttc	cag	ggc	cca	tgc	aag	gag	att	ctg	atg	gcc	gca	gac	tgt	1056
Tyr	Gln	Phe 340	Gln	Gly	Pro	Cys	Lys	Glu	Ile 345	Leu	Met	Ala	Ala	Asp 350	Cys	
tac	tgg	aac	aca	tgg	gat	gta	aag	ggt	tca	cat	aga	gac	gtc	gaa	tca	1104
Tyr	Trp	Asn 355	Thr	Trp	Asp	Val	Lys 360	Val	Ser	His	Arg	Asp 365	Val	Glu	Ser	
tac	act	gag	gta	gag	aaa	gta	aca	atc	agg	aaa	cag	tca	act	gta	gta	1152
Tyr 370	Thr	Glu	Val	Glu	Lys 375	Val	Thr	Ile	Arg	Lys	Gln 380	Ser	Thr	Val	Val	
gat	ctc	att	gtg	gat	ggc	aag	cag	gtc	aag	ggt	gga	gga	gtg	gat	gta	1200
Asp 385	Leu	Ile	Val	Asp	Gly 390	Lys	Gln	Val	Lys	Val 395	Gly	Gly	Val	Asp	Val 400	
tct	atc	ccg	tac	agc	tct	gag	aac	act	tcc	ata	tac	tgg	cag	gat	gga	1248
Ser	Ile	Pro	Tyr 405	Ser	Ser	Glu	Asn	Thr	Ser 410	Ile	Tyr	Trp	Gln	Asp 415	Gly	
gac	atc	ctg	acg	acg	gcc	atc	cta	cct	gaa	gct	ctt	gtc	ggt	aag	ttc	1296
Asp	Ile	Leu 420	Thr	Thr	Ala	Ile	Leu	Pro 425	Glu	Ala	Leu	Val	Val	Lys 430	Phe	
aac	ttt	aag	cag	ctc	ctt	gta	ggt	cat	atc	aga	gat	cca	ttc	gat	gca	1344
Asn	Phe	Lys 435	Gln	Leu	Leu	Val	Val 440	His	Ile	Arg	Asp	Pro 445	Phe	Asp	Ala	
aag	aca	tgc	ggc	ata	tgt	ggt	aac	tat	aat	caa	gat	tca	act	gat	gat	1392
Lys	Thr	Cys 450	Gly	Ile	Cys	Gly 455	Asn	Tyr	Asn	Gln	Asp 460	Ser	Thr	Asp	Asp	
ttc	ttt	gac	gca	gaa	gga	gca	tgc	gct	cta	acc	ccc	aac	ccc	cca	gga	1440
Phe 465	Phe	Asp	Ala	Glu	Gly 470	Ala	Cys	Ala	Leu	Thr 475	Pro	Asn	Pro	Pro	Gly 480	
tgt	aca	gag	gaa	cag	aaa	cca	gaa	gct	gag	cga	ctt	tgc	aat	aat	ctc	1488
Cys	Thr	Glu	Glu 485	Gln	Lys	Pro	Glu	Ala	Glu 490	Arg	Leu	Cys	Asn	Asn	Leu 495	


```

ttt gat tct tct atc gac gag aaa tgt aat gtc tgc tac aag cct gac 1536
Phe Asp Ser Ser Ile Asp Glu Lys Cys Asn Val Cys Tyr Lys Pro Asp
      500                      505                      510
cgg att gcc cga tgt atg tac gag tat tgc ctg agg gga caa caa gga 1584
Arg Ile Ala Arg Cys Met Tyr Glu Tyr Cys Leu Arg Gly Gln Gln Gly
      515                      520                      525
ttt tgt gac cat gct tgg gag ttc aag aaa gaa tgc tac ata aaa cat 1632
Phe Cys Asp His Ala Trp Glu Phe Lys Lys Glu Cys Tyr Ile Lys His
      530                      535                      540
gga gac act cta gaa gta cca cct gaa tgt caa taa acgtacaaag 1678
Gly Asp Thr Leu Glu Val Pro Pro Glu Cys Gln
      545                      550                      555
atacagaagc taaggctact acagcagaag ataaaaaaga aactgtagtt ccttcaaaaa 1738
ccgtgtattt tatgtactca ttgtttaatt agagcaaaat aaattggtat tatcataact 1798
taaactaaaa aaaaaaaaaa aa 1820

```

- <210> 5
- <211> 958
- <212> DNA
- <213> Aequorea (lumineszierende Qualle)
- <220>
- <221> CDS
- <222> (115) ... (702)
- <220>
- <223> Apoaequorin-codierendes Gen
- <300>
- <310> 5,093,240
- <311> 1987-10-08
- <312> 1992-03-03
- <300>
- <301> Inouye, S.
Noguchi, M.
Sakaki, Y.
Takagi, Y.
Miyata, T.
Iwanaga, ,S.
Miyata, T.
Tsudji, F.I.
- <302> Cloning and sequence analysis of cDNA for the luminescent protein aequorin
- <303> Proc. Natl. Acad. Sci. USA
- <304> 82 (10)
- <306> 3154-3158
- <307> 1985-05

```

<400> 5
ggggggggggg ggggggggggg ggggggggggg ggggaatgcaa ttcattcttg catcaaagaa 60
ttacatcaaa tctctagttg atcaactaaa ttgtctcgac aacaacaagc aac atg
Met
1
aca agc aaa caa tac tca gtc aag ctt aca tca gac ttc gac aac cca 165
Thr Ser Lys Gln Tyr Ser Val Lys Leu Thr Ser Asp Phe Asp Asn Pro
      5                      10                      15
aga tgg att gga cga cac aag cat atg ttc aat ttc ctt gat gtc aac 213
Arg Trp Ile Gly Arg His Lys His Met Phe Asn Phe Leu Asp Val Asn

```

20	25	30	
cac aat gga aaa atc tct ctt gac gag atg gtc tac aag gca tct gat His Asn Gly Lys Ile Ser Leu Asp Glu Met Val Tyr Lys Ala Ser Asp 35 40 45			261
att gtc atc aat aac ctt gga gca aca cct gag caa gcc aaa cga cac Ile Val Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln Ala Lys Arg His 50 55 60 65			309
aaa gat gct gta gaa gcc ttc ttc gga gga gct gga atg aaa tat ggt Lys Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Gly Gly Ala Gly Met Lys Tyr Gly 70 75 80			357
gtg gaa act gat tgg cct gca tat att gaa gga tgg aaa aaa ttg gct Val Glu Thr Asp Trp Pro Ala Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Lys Leu Ala 85 90 95			405
act gat gaa ttg gag aaa tac gcc aaa aac gaa cca acg ctc atc cgt Thr Asp Glu Leu Glu Lys Tyr Ala Lys Asn Glu Pro Thr Leu Ile Arg 100 105 110			453
ata tgg ggt gat gct ttg ttt gat atc gtt gac aaa gat caa aat gga Ile Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Val Asp Lys Asp Gln Asn Gly 115 120 125			501
gcc att aca ctg gat gaa tgg aaa gca tac acc aaa gct gct ggt atc Ala Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Thr Lys Ala Ala Gly Ile 130 135 140 145			549
atc caa tca tca gaa gat tgc gag gaa aca ttc aga gtg tgc gat att Ile Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu Thr Phe Arg Val Cys Asp Ile 150 155 160			597
gat gaa agt gga caa ctc gat gtt gat gag atg aca aga caa cat tta Asp Glu Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln His Leu 165 170 175			645
gga ttt tgg tac acc atg gat cct gct tgc gaa aag ctc tac ggt gga Gly Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys Leu Tyr Gly Gly 180 185 190			693
gct gtc ccc taagaagctc tacggtggtg atgcacccta ggaagatgat gtgattttga Ala Val Pro 195			752
ataaaacact gatgaattca atcaaaattt tccaaatttt tgaacgattt caatcgtttg tgttgatttt tgtaattagg aacagattaa atcgaatgat tagttgtttt ttttaatcaac agaacttaca aatcgaaaaa gtaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa			812 872 932 958

<210> 6
 <211> 591
 <212> DNA
 <213> Aequorea (lumineszierende Qualle)
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) ... (588)
 <220>
 <223> Rekombinantes Aequorin AEQ1
 <300>
 <301> Prasher, D.C.
 McCann, R.O.

Longiaru, M.
Cormier, M.J.

<302> Sequence comparisons of complementary DNAs encoding aequorin isotypes
<303> Biochemistry
<304> 26 (5)
<306> 1326-1332
<307> 1987-03-10
<400> 6

```

atg acc agc gaa caa tac tca gtc aag ctt aca cca gac ttc gac aac      48
Met Thr Ser Glu Gln Tyr Ser Val Lys Leu Thr Pro Asp Phe Asp Asn
  1                               5                               10                               15

cca aaa tgg att gga cga cac aag cac atg ttt aat ttt ctt gat gtc      96
Pro Lys Trp Ile Gly Arg His Lys His Met Phe Asn Phe Leu Asp Val
                20                               25                               30

aac cac aat gga agg atc tct ctt gac gag atg gtc tac aag gcg tcc      144
Asn His Asn Gly Arg Ile Ser Leu Asp Glu Met Val Tyr Lys Ala Ser
                35                               40                               45

gat att gtt ata aac aat ctt gga gca aca cct gaa caa gcc aaa cgt      192
Asp Ile Val Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln Ala Lys Arg
  50                               55                               60

cac aaa gat gct gta gaa gcc ttc ttc gga gga gct gga atg aaa tat      240
His Lys Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Gly Gly Ala Gly Met Lys Tyr
  65                               70                               75                               80

ggt gta gaa act gaa tgg cct gaa tac atc gaa gga tgg aaa aga ctg      288
Gly Val Glu Thr Glu Trp Pro Glu Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Arg Leu
                85                               90                               95

gct tcc gag gaa ttg aaa agg tat tca aaa aac caa atc aca ctt att      336
Ala Ser Glu Glu Leu Lys Arg Tyr Ser Lys Asn Gln Ile Thr Leu Ile
                100                               105                               110

cgt tta tgg ggt gat gca ttg ttc gat atc att gac aaa gac caa aat      384
Arg Leu Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Ile Asp Lys Asp Gln Asn
                115                               120                               125

gga gct att tca ctg gat gaa tgg aaa gca tac acc aaa tct gat ggc      432
Gly Ala Ile Ser Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Thr Lys Ser Asp Gly
                130                               135                               140

atc atc caa tcg tca gaa gat tgc gag gaa aca ttc aga gtg tgc gat      480
Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu Thr Phe Arg Val Cys Asp
  145                               150                               155                               160

att gat gaa agt gga cag ctc gat gtt gat gag atg aca aga caa cat      528
Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln His
                165                               170                               175

tta gga ttt tgg tac acc atg gat cct gct tgc gaa aag ctc tac ggt      576
Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys Leu Tyr Gly
                180                               185                               190

gga gct gtc ccc taa
Gly Ala Val Pro *
                195

```

<210> 7
<211> 591
<212> DNA
<213> Aequorea (lumineszierende Qualle)

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) ... (588)
 <220>
 <223> Rekombinantes Aequorin AEQ2
 <300>
 <301> Prasher, D.C.
 McCann, R.O.
 Longiaru, M.
 Cormier, M.J.
 <302> Sequence comparisons of complementary DNAs encoding aequorin isotypes
 <303> Biochemistry
 <304> 26 (5)
 <306> 1326-1332
 <307> 1987-03-10
 <400> 7

atg acc agc gaa caa tac tca gtc aag ctt aca tca gac ttc gac aac	48
Met Thr Ser Glu Gln Tyr Ser Val Lys Leu Thr Ser Asp Phe Asp Asn	
1 5 10 15	
cca aga tgg att gga cga cac aag cat atg ttc aat ttc ctt gat gtc	96
Pro Arg Trp Ile Gly Arg His Lys His Met Phe Asn Phe Leu Asp Val	
20 25 30	
aac cac aat gga aaa atc tct ctt gac gag atg gtc tac aag gca tct	144
Asn His Asn Gly Lys Ile Ser Leu Asp Glu Met Val Tyr Lys Ala Ser	
35 40 45	
gat att gtc atc aat aac ctt gga gca aca cct gag caa gcc aaa cga	192
Asp Ile Val Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln Ala Lys Arg	
50 55 60	
cac aaa gat gct gta gaa gcc ttc ttc gga gga gct gga atg aaa tat	240
His Lys Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Gly Gly Ala Gly Met Lys Tyr	
65 70 75 80	
ggt gtg gaa act gat tgg cct gca tat att gaa gga tgg aaa aaa ttg	288
Gly Val Glu Thr Asp Trp Pro Ala Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Lys Leu	
85 90 95	
gct act gat gaa ttg gag aaa tac gcc aaa aac gaa cca acg ctc atc	336
Ala Thr Asp Glu Leu Glu Lys Tyr Ala Lys Asn Glu Pro Thr Leu Ile	
100 105 110	
cgt ata tgg ggt gat gct ttg ttc gat atc gtt gac aaa gat caa aat	384
Arg Ile Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Val Asp Lys Asp Gln Asn	
115 120 125	
gga gcc att aca ctg gat gaa tgg aaa gca tac acc aaa gct gct ggt	432
Gly Ala Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Thr Lys Ala Ala Gly	
130 135 140	
atc atc caa tca tca gaa gat tgc gag gaa aca ttc aga gtg tgc gat	480
Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu Thr Phe Arg Val Cys Asp	
145 150 155 160	
att gat gaa agt gga caa ctc gat gtt gat gag atg aca aga caa cat	528
Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln His	
165 170 175	
tta gga ttt tgg tac acc atg gat cct gct tgc gaa aag ctc tac ggt	576
Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys Leu Tyr Gly	
180 185 190	

gga gct gtc ccc taa
 Gly Ala Val Pro *
 195

- <210> 8
 <211> 591
 <212> DNA
 <213> Aequorea (lumineszierende Qualle)
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) ... (588)
 <220>
 <223> Rekombinantes Aequorin AEQ3
 <300>
 <301> Prasher, D.C.
 McCann, R.O.
 Longiaru, M.
 Cormier, M.J.
 <302> Sequence comparisons of complementary DNAs encoding aequorin isotypes
 <303> Biochemistry
 <304> 26(5)
 <306> 1326-1332
 <307> 1987-03-10
 <400> 8

atg acc agc gaa caa tac tca gtc aag ctt aca tca gac ttc gac aac	48
Met Thr Ser Glu Gln Tyr Ser Val Lys Leu Thr Ser Asp Phe Asp Asn	
1 5 10 15	
cca aga tgg att gga cga cac aag cat atg ttc aat ttc ctt gat gtc	96
Pro Arg Trp Ile Gly Arg His Lys His Met Phe Asn Phe Leu Asp Val	
20 25 30	
aac cac aat gga aaa atc tct ctt gac gag atg gtc tac aag gca tct	144
Asn His Asn Gly Lys Ile Ser Leu Asp Glu Met Val Tyr Lys Ala Ser	
35 40 45	
gat att gtc atc aat aac ctt gga gca aca cct gag caa gcc aaa cga	192
Asp Ile Val Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln Ala Lys Arg	
50 55 60	
cac aaa gat gct gta gga gac ttc ttc gga gga gct gga atg aaa tat	240
His Lys Asp Ala Val Gly Asp Phe Phe Gly Gly Ala Gly Met Lys Tyr	
65 70 75 80	
ggg gtg gaa act gat tgg cct gca tac att gaa gga tgg aaa aaa ttg	288
Gly Val Glu Thr Asp Trp Pro Ala Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Lys Leu	
85 90 95	
gct act gat gaa ttg gag aaa tac gcc aaa aac gaa cca acg ctc atc	336
Ala Thr Asp Glu Leu Glu Lys Tyr Ala Lys Asn Glu Pro Thr Leu Ile	
100 105 110	
cgt ata tgg ggt gat gct ttg ttc gat atc gtt gac aaa gat caa aat	384
Arg Ile Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Val Asp Lys Asp Gln Asn	
115 120 125	
gga gcc att aca ctg gat gaa tgg aaa gca tac acc aaa gct gct ggt	432
Gly Ala Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Thr Lys Ala Ala Gly	
130 135 140	
atc atc caa tca tca gaa gat tgc gag gaa aca ttc aga gtg tgc gat	480
Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu Thr Phe Arg Val Cys Asp	

145		150		155		160	
att gat gaa aat gga caa ctc gat gtt gat gag atg aca aga caa cat							528
Ile Asp Glu Asn Gly Gln Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln His							
		165		170		175	
tta gga ttt tgg tac acc atg gat cct gct tgc gaa aag ctc tac ggt							576
Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys Leu Tyr Gly							
		180		185		190	
gga gct gtc ccc taa							591
Gly Ala Val Pro *							
		195					
<210>	9						
<211>	567						
<212>	DNA						
<213>	Aequorea (lumineszierende Qualle)						
<220>							
<221>	CDS						
<222>	(1) ... (567)						
<220>							
<223>	Aequorin-Photoprotein						
<300>							
<301>	Charbonneau, H. Walsh, K.A. McCann, R.O. Prendergast, F.G. Cormier, M.J. Varaman, T.C.						
<302>	Amino acid sequence of the calcium-dependent photoprotein aequorin						
<303>	Biochemistry						
<304>	24 (24)						
<306>	6762-6771						
<307>	1985-11-19						
<400>	9						
gtc aag ctt aca cca gac ttc gac aac cca aaa tgg att gga cga cac							48
Val Lys Leu Thr Pro Asp Phe Asp Asn Pro Lys Trp Ile Gly Arg His							
1		5		10		15	
aag cac atg ttt aat ttt ctt gat gtc aac cac aat gga agg atc tct							96
Lys His Met Phe Asn Phe Leu Asp Val Asn His Asn Gly Arg Ile Ser							
		20		25		30	
ctt gac gag atg gtc tac aag gcg tcc gat att gtt ata aac aat ctt							144
Leu Asp Glu Met Val Tyr Lys Ala Ser Asp Ile Val Ile Asn Asn Leu							
		35		40		45	
gga gca aca cct gaa caa gcc aaa cgt cac aaa gat gct gta gaa gcc							192
Gly Ala Thr Pro Glu Gln Ala Lys Arg His Lys Asp Ala Val Glu Ala							
		50		55		60	
ttc ttc gga gga gct gca atg aaa tat ggt gta gaa act gaa tgg cct							240
Phe Phe Gly Gly Ala Ala Met Lys Tyr Gly Val Glu Thr Glu Trp Pro							
65		70		75		80	
gaa tac atc gaa gga tgg aaa aga ctg gct tcc gag gaa ttg aaa agg							288
Glu Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Arg Leu Ala Ser Glu Glu Leu Lys Arg							
		85		90		95	
tat tca aaa aac caa atc aca ctt att cgt tta tgg ggt gat gca ttg							336
Tyr Ser Lys Asn Gln Ile Thr Leu Ile Arg Leu Trp Gly Asp Ala Leu							
		100		105		110	

```

ttc gat atc att gac aaa gac caa aat gga gct att tca ctg gat gaa      384
Phe Asp Ile Ile Asp Lys Asp Gln Asn Gly Ala Ile Ser Leu Asp Glu
      115                      120                      125

tgg aaa gca tac acc aaa tct gct ggc atc atc caa tcg tca gaa gat      432
Trp Lys Ala Tyr Thr Lys Ser Ala Gly Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp
      130                      135                      140

tgc gag gaa aca ttc aga gtg tgc gat att gat gaa agt gga cag ctc      480
Cys Glu Glu Thr Phe Arg Val Cys Asp Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu
      145                      150                      155                      160

gat gtt gat gag atg aca aga caa cat tta gga ttt tgg tac acc atg      528
Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln His Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Met
      165                      170                      175

gat cct gct tgc gaa aag ctc tac ggt gga gct gtc ccc      567
Asp Pro Ala Cys Glu Lys Leu Tyr Gly Gly Ala Val Pro
      180                      185

<210> 10
<211> 588
<212> DNA
<213> Aequorea (lumineszierende Qualle)

<220>
<221> CDS
<222> (1) ... (588)

<220>
<223> Aequorin-Mutante (Asp-124 ersetzt durch Ser-124) mit erhöhter Biolumineszenz-
Aktivität

<300>
<310> 5,360,728
<311> 1992-12-01
<312> 1994-11-01

<400> 10

atg acc agc gaa caa tac tca gtc aag ctt aca cca gac ttc gac aac      48
Met Thr Ser Glu Gln Tyr Ser Val Lys Leu Thr Pro Asp Phe Asp Asn
      1                      5                      10                      15

cca aaa tgg att gga cga cac aag cac atg ttt aat ttt ctt gat gtc      96
Pro Lys Trp Ile Gly Arg His Lys His Met Phe Asn Phe Leu Asp Val
      20                      25                      30

aac cac aat gga agg atc tct ctt gac gag atg gtc tac aag gcg tcc      144
Asn His Asn Gly Arg Ile Ser Leu Asp Glu Met Val Tyr Lys Ala Ser
      35                      40                      45

gat att gtt ata aac aat ctt gga gca aca cct gaa caa gcc aaa cgt      192
Asp Ile Val Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln Ala Lys Arg
      50                      55                      60

cac aaa gat gct gta gaa gcc ttc ttc gga gga gct gca atg aaa tat      240
His Lys Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Gly Gly Ala Ala Met Lys Tyr
      65                      70                      75                      80

ggt gta gaa act gaa tgg cct gaa tac atc gaa gga tgg aaa aga ctg      288
Gly Val Glu Thr Glu Trp Pro Glu Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Arg Leu
      85                      90                      95

gct tcc gag gaa ttg aaa agg tat tca aaa aac caa atc aca ctt att      336
Ala Ser Glu Glu Leu Lys Arg Tyr Ser Lys Asn Gln Ile Thr Leu Ile
      100                      105                      110

```

```

cgt tta tgg ggt gat gca ttg ttc gat atc att tcc aaa gac caa aat      384
Arg Leu Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Ile Ser Lys Asp Gln Asn
      115                               120                               125

gga gct att tca ctg gat gaa tgg aaa gca tac acc aaa tct gct ggc      432
Gly Ala Ile Ser Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Thr Lys Ser Ala Gly
      130                               135                               140

atc atc caa tcg tca gaa gat tgc gag gaa aca ttc aga gtg tgc gat      480
Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu Thr Phe Arg Val Cys Asp
      145                               150                               155                               160

att gat gaa agt gga cag ctc gat gtt gat gag atg aca aga caa cat      528
Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln His
      165                               170                               175

tta gga ttt tgg tac acc atg gat cct gct tgc gaa aag ctc tac ggt      576
Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys Leu Tyr Gly
      180                               185                               190

gga gct gtc ccc
Gly Ala Val Pro
      195

```

<210> 11

<211> 588

<212> DNA

<213> Aequorea (lumineszierende Qualle)

<220>

<221> CDS

<222> (1) ... (588)

<220>

<223> Aequorin-Mutante (Glu-135 ersetzt durch Ser-135) mit erhöhter Biolumineszenz-Aktivität

<300>

<310> 5,360,728

<311> 1992-12-01

<312> 1994-11-01

<400> 11

```

atg acc agc gaa caa tac tca gtc aag ctt aca cca gac ttc gac aac      48
Met Thr Ser Glu Gln Tyr Ser Val Lys Leu Thr Pro Asp Phe Asp Asn
      1                               5                               10                               15

cca aaa tgg att gga cga cac aag cac atg ttt aat ttt ctt gat gtc      96
Pro Lys Trp Ile Gly Arg His Lys His Met Phe Asn Phe Leu Asp Val
      20                               25                               30

aac cac aat gga agg atc tct ctt gac gag atg gtc tac aag gcg tcc      144
Asn His Asn Gly Arg Ile Ser Leu Asp Glu Met Val Tyr Lys Ala Ser
      35                               40                               45

gat att gtt ata aac aat ctt gga gca aca cct gaa caa gcc aaa cgt      192
Asp Ile Val Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln Ala Lys Arg
      50                               55                               60

cac aaa gat gct gta gaa gcc ttc ttc gga gga gct gca atg aaa tat      240
His Lys Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Gly Gly Ala Ala Met Lys Tyr
      65                               70                               75                               80

ggt gta gaa act gaa tgg cct gaa tac atc gaa gga tgg aaa aga ctg      288
Gly Val Glu Thr Glu Trp Pro Glu Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Arg Leu
      85                               90                               95

```


gct tcc gag gaa ttg aaa agg tat tca aaa aac caa atc aca ctt att	336
Ala Ser Glu Glu Leu Lys Arg Tyr Ser Lys Asn Gln Ile Thr Leu Ile	
100 105 110	
cgt tta tgg ggt gat gca ttg ttc gat atc att tcc aaa gac caa aat	384
Arg Leu Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Ile Ser Lys Asp Gln Asn	
115 120 125	
gga gct att tca ctg gat tca tgg aaa gca tac acc aaa tct gct ggc	432
Gly Ala Ile Ser Leu Asp Ser Trp Lys Ala Tyr Thr Lys Ser Ala Gly	
130 135 140	
atc atc caa tcg tca gaa gat tgc gag gaa aca ttc aga gtg tgc gat	480
Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu Thr Phe Arg Val Cys Asp	
145 150 155 160	
att gat gaa agt gga cag ctc gat gtt gat gag atg aca aga caa cat	528
Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln His	
165 170 175	
tta gga ttt tgg tac acc atg gat cct gct tgc gaa aag ctc tac ggt	576
Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys Leu Tyr Gly	
180 185 190	
gga gct gtc ccc	588
Gly Ala Val Pro	
195	

<210> 12

<211> 588

<212> DNA

<213> Aequorea (lumineszierende Qualle)

<220>

<221> CDS

<222> (1) ... (588)

<220>

<223> Rekombinante ortsspezifische Aequorin-Mutante mit erhöhter Biolumineszenz-Aktivität

<300>

<310> 5,360,728

<311> 1992-12-01

<312> 1994-11-01

<400> 12

atg acc agc gaa caa tac tca gtc aag ctt aca cca gac ttc gac aac	48
Met Thr Ser Glu Gln Tyr Ser Val Lys Leu Thr Pro Asp Phe Asp Asn	
1 5 10 15	
cca aaa tgg att gga cga cac aag cac atg ttt aat ttt ctt gat gtc	96
Pro Lys Trp Ile Gly Arg His Lys His Met Phe Asn Phe Leu Asp Val	
20 25 30	
aac cac aat gga agg atc tct ctt gac gag atg gtc tac aag gcg tcc	144
Asn His Asn Gly Arg Ile Ser Leu Asp Glu Met Val Tyr Lys Ala Ser	
35 40 45	
gat att gtt ata aac aat ctt gga gca aca cct gaa caa gcc aaa cgt	192
Asp Ile Val Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln Ala Lys Arg	
50 55 60	
cac aaa gat gct gta gaa gcc ttc ttc gga gga gct gca atg aaa tat	240
His Lys Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Gly Gly Ala Ala Met Lys Tyr	

65	70	75	80	
ggt gta gaa act gaa tgg cct gaa tac atc gaa gga tgg aaa aga ctg				288
Gly Val Glu Thr	Glu Trp Pro Glu Tyr	Ile Glu Gly Trp	Lys Arg Leu	
	85	90	95	
gct tcc gag gaa ttg aaa agg tat tca aaa aac caa atc aca ctt att				336
Ala Ser Glu Glu Leu Lys Arg Tyr Ser Lys Asn Gln Ile Thr Leu Ile				
	100	105	110	
cgt tta tgg ggt gat gca ttg ttc gat atc att tcc aaa gac caa aat				384
Arg Leu Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Ile Ser Lys Asp Gln Asn				
	115	120	125	
gca gct att tca ctg gat gaa tgg aaa gca tac acc aaa tct gct ggc				432
Ala Ala Ile Ser Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Thr Lys Ser Ala Gly				
	130	135	140	
atc atc caa tcg tca gaa gat tgc gag gaa aca ttc aga gtg tgc gat				480
Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu Thr Phe Arg Val Cys Asp				
	145	150	155	160
att gat gaa agt gga cag ctc gat gtt gat gag atg aca aga caa cat				528
Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln His				
	165	170	175	
tta gga ttt tgg tac acc atg gat cct gct tgc gaa aag ctc tac ggt				576
Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys Leu Tyr Gly				
	180	185	190	
gga gct gtc ccc				588
Gly Ala Val Pro				
	195			
<210>	13			
<211>	567			
<212>	DNA			
<213>	Aequorea (lumineszierende Qualle)			
<220>				
<221>	CDS			
<222>	(1) ... (567)			
<220>				
<223>	Rekombinantes Apoaequorin (AQUALITE®)			
<400>	13			
gtc aag ctt aca cca gac ttc gac aac cca aaa tgg att gga cga cac				48
Val Lys Leu Thr Pro Asp Phe Asp Asn Pro Lys Trp Ile Gly Arg His				
	1	5	10	15
aag cac atg ttt aat ttt ctt gat gtc aac cac aat gga agg atc tct				96
Lys His Met Phe Asn Phe Leu Asp Val Asn His Asn Gly Arg Ile Ser				
	20	25	30	
ctt gac gag atg gtc tac aag gcg tcc gat att gtt ata aac aat ctt				144
Leu Asp Glu Met Val Tyr Lys Ala Ser Asp Ile Val Ile Asn Asn Leu				
	35	40	45	
gga gca aca cct gaa caa gcc aaa cgt cac aaa gat gct gta gaa gcc				192
Gly Ala Thr Pro Glu Gln Ala Lys Arg His Lys Asp Ala Val Glu Ala				
	50	55	60	
ttc ttc gga gga gct gga atg aaa tat ggt gta gaa act gaa tgg cct				240
Phe Phe Gly Gly Ala Gly Met Lys Tyr Gly Val Glu Thr Glu Trp Pro				
	65	70	75	80

gaa tac atc gaa gga tgg aaa aaa ctg gct tcc gag gaa ttg aaa agg 288
 Glu Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Lys Leu Ala Ser Glu Glu Leu Lys Arg
 85 90 95

tat tca aaa aac caa atc aca ctt att cgt tta tgg ggt gat gca ttg 336
 Tyr Ser Lys Asn Gln Ile Thr Leu Ile Arg Leu Trp Gly Asp Ala Leu
 100 105 110

ttc gat atc att gac aaa gac caa aat gga gct att ctg tca gat gaa 384
 Phe Asp Ile Ile Asp Lys Asp Gln Asn Gly Ala Ile Leu Ser Asp Glu
 115 120 125

tgg aaa gca tac acc aaa tct gat ggc atc atc caa tcg tca gaa gat 432
 Trp Lys Ala Tyr Thr Lys Ser Asp Gly Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp
 130 135 140

tgc gag gaa aca ttc aga gtg tgc gat att gat gaa agt gga cag ctc 480
 Cys Glu Glu Thr Phe Arg Val Cys Asp Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu
 145 150 155 160

gat gtt gat gag atg aca aga caa cat tta gga ttt tgg tac acc atg 528
 Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln His Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Met
 165 170 175

gat cct gct tgc gaa aag ctc tac ggt gga gct gtc ccc 567
 Asp Pro Ala Cys Glu Lys Leu Tyr Gly Gly Ala Val Pro
 180 185

<210> 14
 <211> 236
 <212> PRT
 <213> Vibrio fisheri
 <220>
 <223> Vibrio fisheri Flavin-Reduktase
 <300>
 <310> 5,484,723
 <311> 1994-06-28
 <312> 1996-01-16
 <400> 14

Met Pro Ile Asn Cys Lys Val Lys Ser Ile Glu Pro Leu Ala Cys Asn
 1 5 10 15

Thr Phe Arg Ile Leu Leu His Pro Glu Gln Pro Val Ala Phe Lys Ala
 20 25 30

Gly Gln Tyr Leu Thr Val Val Met Gly Glu Lys Asp Lys Arg Pro Phe
 35 40 45

Ser Ile Ala Ser Ser Pro Cys Arg His Glu Gly Glu Ile Glu Leu His
 50 55 60

Ile Gly Ala Ala Glu His Asn Ala Tyr Ala Gly Glu Val Val Glu Ser
 65 70 75 80

Met Lys Ser Ala Leu Glu Thr Gly Gly Asp Ile Leu Ile Asp Ala Pro
 85 90 95

His Gly Glu Ala Trp Ile Arg Glu Asp Ser Asp Arg Ser Met Leu Leu
 100 105 110

Ile Ala Gly Gly Thr Gly Phe Ser Tyr Val Arg Ser Ile Leu Asp His
 115 120 125

Cys Ile Ser Gln Gln Ile Gln Lys Pro Ile Tyr Leu Tyr Trp Gly Gly
130 135 140
Arg Asp Glu Cys Gln Leu Tyr Ala Lys Ala Glu Leu Glu Ser Ile Ala
145 150 155 160
Gln Ala His Ser His Ile Thr Phe Val Pro Val Val Glu Lys Ser Glu
165 170 175
Gly Trp Thr Gly Lys Thr Gly Asn Val Leu Glu Ala Val Lys Ala Asp
180 185 190
Phe Asn Ser Leu Ala Asp Met Asp Ile Tyr Ile Ala Gly Arg Phe Glu
195 200 205
Met Ala Gly Ala Ala Arg Glu Gln Phe Thr Thr Glu Lys Gln Ala Lys
210 215 220
Lys Glu Gln Leu Phe Gly Asp Ala Phe Ala Phe Ile
225 230 235

<210> 15

<211> 1079

<212> DNA

<213> Renilla mulleri

<220>

<221> CDS

<222> (259) ... (975)

<220>

<223> grün fluoreszierendes Protein (GFP) von Renilla mulleri

<400> 14

ggttatacac aagtgtatcg cgtatctgca gacgcatcta gtgggattat tcgagcggta 60
gtatttacgt cagacctgtc taatcgaaac cacaacaac tcttaaaata agccacatt 120
acataatatac taagagacgc ctcatttaag agtagtaaaa atataatata tgatagagta 180
tacaactctc gccttagaca gacagtggtc aacagagtaa ctcttgtaa tgcaatcgaa 240
agcgtcaaga gagataag atg agt aaa caa ata ttg aag aac act tgt tta 291
Met Ser Lys Gln Ile Leu Lys Asn Thr Cys Leu
1 5 10
caa gaa gta atg tcg tat aaa gta aat ctg gaa gga att gta aac aac 339
Gln Glu Val Met Ser Tyr Lys Val Asn Leu Glu Gly Ile Val Asn Asn
15 20 25
cat gtt ttt aca atg gag ggt tgc ggc aaa ggg aat att tta ttc ggc 387
His Val Phe Thr Met Glu Gly Cys Gly Lys Gly Asn Ile Leu Phe Gly
30 35 40
aat caa ctg gtt cag att cgt gtc acg aaa ggg gcc cca ctg cct ttt 435
Asn Gln Leu Val Gln Ile Arg Val Thr Lys Gly Ala Pro Leu Pro Phe
45 50 55
gca ttt gat att gtg tca cca gct ttt caa tat ggc aac cgt act ttc 483
Ala Phe Asp Ile Val Ser Pro Ala Phe Gln Tyr Gly Asn Arg Thr Phe
60 65 70 75
acg aaa tat ccg aat gat ata tca gat tat ttt ata caa tca ttt cca 531
Thr Lys Tyr Pro Asn Asp Ile Ser Asp Tyr Phe Ile Gln Ser Phe Pro
80 85 90
gca gga ttt atg tat gaa cga aca tta cgt tac gaa gat ggc gga ctt 579
Ala Gly Phe Met Tyr Glu Arg Thr Leu Arg Tyr Glu Asp Gly Gly Leu
95 100 105

```

gtt gaa att cgt tca gat ata aat tta ata gaa gac aag ttc gtc tac      627
Val Glu Ile Arg Ser Asp Ile Asn Leu Ile Glu Asp Lys Phe Val Tyr
      110                      115                      120

aga gtg gaa tac aaa ggt agt aac ttc cca gat gat ggt ccc gtc atg      675
Arg Val Glu Tyr Lys Gly Ser Asn Phe Pro Asp Asp Gly Pro Val Met
      125                      130                      135

cag aag act atc tta gga ata gag cct tca ttt gaa gcc atg tac atg      723
Gln Lys Thr Ile Leu Gly Ile Glu Pro Ser Phe Glu Ala Met Tyr Met
      140                      145                      150

aat aat ggc gtc ttg gtc ggc gaa gta att ctt gtc tat aaa cta aac      771
Asn Asn Gly Val Leu Val Gly Glu Val Ile Leu Val Tyr Lys Leu Asn
      160                      165                      170

tct ggg aaa tat tat tca tgt cac atg aaa aca tta atg aag tcg aaa      819
Ser Gly Lys Tyr Tyr Ser Cys His Met Lys Thr Leu Met Lys Ser Lys
      175                      180                      185

ggt gta gta aag gag ttt cct tcg tat cat ttt att caa cat cgt ttg      867
Gly Val Lys Glu Phe Pro Ser Tyr His Phe Ile Gln His Arg Leu
      190                      195                      200

gaa aag act tac gta gaa gac ggg ggg ttc gtt gaa cag cat gag act      915
Glu Lys Thr Tyr Val Glu Asp Gly Gly Phe Val Glu Gln His Glu Thr
      205                      210                      215

gct att gct caa atg aca tct ata gga aaa cca cta gga tcc tta cac      963
Ala Ile Ala Gln Met Thr Ser Ile Gly Lys Pro Leu Gly Ser Leu His
      220                      225                      230                      235

gaa tgg gtt taa acacagttac attacttttt ccaattcgtg tttcatgtca aataat 1021
Glu Trp Val *

aattttttaa acaattatca atgttttgtg atatgtttgt aaaaaaaaaa aaaaaaaaa 1079

```

<210> 16

<211> 238

<212> PRT

<213> Renilla mulleri

<220>

<223> grün fluoreszierendes Protein (GFP) von Renilla mulleri

<400> 16

```

Met Ser Lys Gln Ile Leu Lys Asn Thr Cys Leu Gln Glu Val Met Ser
  1                      5                      10                      15

Tyr Lys Val Asn Leu Glu Gly Ile Val Asn Asn His Val Phe Thr Met
      20                      25                      30

Glu Gly Cys Gly Lys Gly Asn Ile Leu Phe Gly Asn Gln Leu Val Gln
      35                      40                      45

Ile Arg Val Thr Lys Gly Ala Pro Leu Pro Phe Ala Phe Asp Ile Val
      50                      55                      60

Ser Pro Ala Phe Gln Tyr Gly Asn Arg Thr Phe Thr Lys Tyr Pro Asn
      65                      70                      75                      80

Asp Ile Ser Asp Tyr Phe Ile Gln Ser Phe Pro Ala Gly Phe Met Tyr
      85                      90                      95

Glu Arg Thr Leu Arg Tyr Glu Asp Gly Gly Leu Val Glu Ile Arg Ser

```

```

                100                105                110
Asp Ile Asn Leu Ile Glu Asp Lys Phe Val Tyr Arg Val Glu Tyr Lys
      115                120                125
Gly Ser Asn Phe Pro Asp Asp Gly Pro Val Met Gln Lys Thr Ile Leu
      130                135                140
Gly Ile Glu Pro Ser Phe Glu Ala Met Tyr Met Asn Asn Gly Val Leu
      145                150                155
Val Gly Glu Val Ile Leu Val Tyr Lys Leu Asn Ser Gly Lys Tyr Tyr
      165                170
Ser Cys His Met Lys Thr Leu Met Lys Ser Lys Gly Val Val Lys Glu
      180                185                190
Phe Pro Ser Tyr His Phe Ile Gln His Arg Leu Glu Lys Thr Tyr Val
      195                200                205
Glu Asp Gly Gly Phe Val Glu Gln His Glu Thr Ala Ile Ala Gln Met
      210                215                220
Thr Ser Ile Gly Lys Pro Leu Gly Ser Leu His Glu Trp Val
      225                230                235

```

- <210> 17
- <211> 1217
- <212> DNA
- <213> Renilla mulleri
- <220>
- <221> CDS
- <222> (31) ... (963)
- <220>
- <223> Renilla mulleri Luciferase
- <400> 17

```

eggcaccgagg tttaagaatc aataaaaaaa atg acg tca aaa gtt tac gat cct      54
                               Met Thr Ser Lys Val Tyr Asp Pro
                               1                5
gaa tta aga aaa cgc atg att act ggt cca caa tgg tgg gca aga tgt      102
Glu Leu Arg Lys Arg Met Ile Thr Gly Pro Gln Trp Trp Ala Arg Cys
      10                15                20
aaa caa atg aat gtt ctt gat tca ttt att aat tat tat gat tca gaa      150
Lys Gln Met Asn Val Leu Asp Ser Phe Ile Asn Tyr Tyr Asp Ser Glu
      25                30                35                40
aaa cat gca gaa aat gca gtt ata ttt tta cat ggt aat gca gca tct      198
Lys His Ala Glu Asn Ala Val Ile Phe Leu His Gly Asn Ala Ala Ser
      45                50                55
tct tat tta tgg cgt cat gtt gta cca cat gtt gaa cca gtg gcg cga      246
Ser Tyr Leu Trp Arg His Val Val Pro His Val Glu Pro Val Ala Arg
      60                65                70
tgt att ata cca gat ctt ata ggt atg ggt aaa tca ggc aag tct ggt      294
Cys Ile Ile Pro Asp Leu Ile Gly Met Gly Lys Ser Gly Lys Ser Gly
      75                80                85
aat ggt tcc tat aga tta cta gat cat tac aaa tat ctt act gaa tgg      342

```

Asn	Gly	Ser	Tyr	Arg	Leu	Leu	Asp	His	Tyr	Lys	Tyr	Leu	Thr	Glu	Trp	
90						95					100					
ttc	aaa	cat	ctt	aat	tta	cca	aag	aag	atc	att	ttt	gtc	ggt	cat	gat	390
Phe	Lys	His	Leu	Asn	Leu	Pro	Lys	Lys	Ile	Ile	Phe	Val	Gly	His	Asp	120
105					110					115						
tgg	ggt	gct	tgt	tta	gca	ttt	cat	tat	tgc	tat	gaa	cat	cag	gat	cgc	438
Trp	Gly	Ala	Cys	Leu	Ala	Phe	His	Tyr	Cys	Tyr	Glu	His	Gln	Asp	Arg	135
				125					130							
atc	aaa	gca	gtt	gtt	cat	gct	gaa	agt	gta	gta	gat	gtg	att	gaa	tcg	486
Ile	Lys	Ala	Val	Val	His	Ala	Glu	Ser	Val	Val	Asp	Val	Ile	Glu	Ser	150
			140					145								
tgg	gac	gaa	tgg	cct	gat	att	gaa	gaa	gat	att	gct	ttg	att	aaa	tct	534
Trp	Asp	Glu	Trp	Pro	Asp	Ile	Glu	Glu	Asp	Ile	Ala	Leu	Ile	Lys	Ser	165
		155					160									
gaa	gaa	gga	gaa	aaa	atg	gtt	tta	gag	aat	aac	ttc	ttc	gtg	gaa	acc	582
Glu	Glu	Gly	Glu	Lys	Met	Val	Leu	Glu	Asn	Asn	Phe	Phe	Val	Glu	Thr	180
	170					175					180					
atg	ttg	cca	tca	aaa	atc	atg	aga	aag	ttg	gaa	cca	gag	gaa	ttt	gct	630
Met	Leu	Pro	Ser	Lys	Ile	Met	Arg	Lys	Leu	Glu	Pro	Glu	Glu	Phe	Ala	200
185					190					195						
gct	tat	ctt	gaa	cca	ttt	aaa	gag	aaa	ggt	gaa	gtt	cgf	cgf	cca	aca	678
Ala	Tyr	Leu	Glu	Pro	Phe	Lys	Glu	Lys	Gly	Glu	Val	Arg	Arg	Pro	Thr	215
				205					210							
tta	tca	tgg	cct	cgf	gaa	atc	cct	ttg	gta	aaa	ggt	ggt	aaa	ccg	gat	726
Leu	Ser	Trp	Pro	Arg	Glu	Ile	Pro	Leu	Val	Lys	Gly	Gly	Lys	Pro	Asp	230
			220					225								
gta	gta	gaa	att	gtc	agg	aat	tat	aat	gct	tat	ctt	cgf	gca	agt	cat	774
Val	Val	Glu	Ile	Val	Arg	Asn	Tyr	Asn	Ala	Tyr	Leu	Arg	Ala	Ser	His	245
		235					240									
gat	tta	cca	aaa	atg	ttt	att	gaa	tct	gat	cca	gga	ttc	ttt	tcc	aat	822
Asp	Leu	Pro	Lys	Met	Phe	Ile	Glu	Ser	Asp	Pro	Gly	Phe	Phe	Ser	Asn	260
	250					255										
gct	att	ggt	gaa	ggt	gct	aag	aaa	ttc	cct	aat	act	gaa	ttt	ggt	aaa	870
Ala	Ile	Val	Glu	Gly	Ala	Lys	Lys	Phe	Pro	Asn	Thr	Glu	Phe	Val	Lys	280
265					270					275						
gtc	aaa	ggt	ctt	cat	ttt	tca	caa	gaa	gat	gca	cct	gat	gaa	atg	gga	918
Val	Lys	Gly	Leu	His	Phe	Ser	Gln	Glu	Asp	Ala	Pro	Asp	Glu	Met	Gly	295
				285					290							
aat	tat	ata	aaa	tcg	ttt	ggt	gag	cgf	ggt	ctt	aaa	aat	gaa	caa	taaact	969
Asn	Tyr	Ile	Lys	Ser	Phe	Val	Glu	Arg	Val	Leu	Lys	Asn	Glu	Gln		310
			300					305								
accagggttc	catggtgcca	ctttagctgg	gtttaataaa	tttcactatc	aatttgaaca											1029
atttcacatt	aattttaact	attaaaaaat	tatggacaca	gggattatat	cagatgatta											1089
atthagttgg	gaacaatgaa	taccgaatat	tatgaattct	ctttagctat	ttataataat											1149
cacattctta	tgtaataaaa	ctttgtttta	ataaattaat	gattcagaaa	aaaaaaaaaa											1209
aaaaaaaa																1217

<210> 18
 <211> 311
 <212> PRT
 <213> Renilla mulleri

<220>

<223> Renilla mulleri-Luciferase

<400> 18

Met Thr Ser Lys Val Tyr Asp Pro Glu Leu Arg Lys Arg Met Ile Thr
1 5 10 15

Gly Pro Gln Trp Trp Ala Arg Cys Lys Gln Met Asn Val Leu Asp Ser
20 25 30

Phe Ile Asn Tyr Tyr Asp Ser Glu Lys His Ala Glu Asn Ala Val Ile
35 40 45

Phe Leu His Gly Asn Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Trp Arg His Val Val
50 55 60

Pro His Val Glu Pro Val Ala Arg Cys Ile Ile Pro Asp Leu Ile Gly
65 70 75 80

Met Gly Lys Ser Gly Lys Ser Gly Asn Gly Ser Tyr Arg Leu Leu Asp
85 90 95

His Tyr Lys Tyr Leu Thr Glu Trp Phe Lys His Leu Asn Leu Pro Lys
100 105 110

Lys Ile Ile Phe Val Gly His Asp Trp Gly Ala Cys Leu Ala Phe His
115 120 125

Tyr Cys Tyr Glu His Gln Asp Arg Ile Lys Ala Val Val His Ala Glu
130 135 140

Ser Val Val Asp Val Ile Glu Ser Trp Asp Glu Trp Pro Asp Ile Glu
145 150 155 160

Glu Asp Ile Ala Leu Ile Lys Ser Glu Glu Gly Glu Lys Met Val Leu
165 170 175

Glu Asn Asn Phe Phe Val Glu Thr Met Leu Pro Ser Lys Ile Met Arg
180 185 190

Lys Leu Glu Pro Glu Glu Phe Ala Ala Tyr Leu Glu Pro Phe Lys Glu
195 200 205

Lys Gly Glu Val Arg Arg Pro Thr Leu Ser Trp Pro Arg Glu Ile Pro
210 215 220

Leu Val Lys Gly Gly Lys Pro Asp Val Val Glu Ile Val Arg Asn Tyr
225 230 235 240

Asn Ala Tyr Leu Arg Ala Ser His Asp Leu Pro Lys Met Phe Ile Glu
245 250 255

Ser Asp Pro Gly Phe Phe Ser Asn Ala Ile Val Glu Gly Ala Lys Lys
260 265 270

Phe Pro Asn Thr Glu Phe Val Lys Val Lys Gly Leu His Phe Ser Gln
275 280 285

Glu Asp Ala Pro Asp Glu Met Gly Asn Tyr Ile Lys Ser Phe Val Glu
290 295 300

Arg Val Leu Lys Asn Glu Gln
305 310

<210> 19

<211> 765

<212> DNA
 <213> Gaussia
 <220>
 <221> CDS
 <222> (37) ... (594)
 <220>
 <223> Gaussia-Luciferase
 <400> 19

```

gcacgagggt actcaaagta tcttctggca gggaaa atg gga gtg aaa gtt ctt      54
                               Met Gly Val Lys Val Leu
                               1           5

ttt gcc ctt att tgt att gct gtg gcc gag gcc aaa cca act gaa aac      102
Phe Ala Leu Ile Cys Ile Ala Val Ala Glu Ala Lys Pro Thr Glu Asn
                               10           15           20

aat gaa gat ttc aac att gta gct gta gct agc aac ttt gct aca acg      150
Asn Glu Asp Phe Asn Ile Val Ala Val Ala Ser Asn Phe Ala Thr Thr
                               25           30           35

gat ctc gat gct gac cgt ggt aaa ttg ccc gga aaa aaa tta cca ctt      198
Asp Leu Asp Ala Asp Arg Gly Lys Leu Pro Gly Lys Lys Leu Pro Leu
                               40           45           50

gag gta ctc aaa gaa atg gaa gcc aat gct agg aaa gct ggc tgc act      246
Glu Val Leu Lys Glu Met Glu Ala Asn Ala Arg Lys Ala Gly Cys Thr
                               55           60           65           70

agg gga tgt ctg ata tgc ctg tca cac atc aag tgt aca ccc aaa atg      294
Arg Gly Cys Leu Ile Cys Leu Ser His Ile Lys Cys Thr Pro Lys Met
                               75           80           85

aag aag ttt atc cca gga aga tgc cac acc tat gaa gga gac aaa gaa      342
Lys Lys Phe Ile Pro Gly Arg Cys His Thr Tyr Glu Gly Asp Lys Glu
                               90           95           100

agt gca cag gga gga ata gga gag gct att gtt gac att cct gaa att      390
Ser Ala Gln Gly Gly Ile Gly Glu Ala Ile Val Asp Ile Pro Glu Ile
                               105           110           115

cct ggg ttt aag gat ttg gaa ccc atg gaa caa ttc att gca caa gtt      438
Pro Gly Phe Lys Asp Leu Glu Pro Met Glu Gln Phe Ile Ala Gln Val
                               120           125           130

gac cta tgt gta gac tgc aca act gga tgc ctc aaa ggt ctt gcc aat      486
Asp Leu Cys Val Asp Cys Thr Thr Gly Cys Leu Lys Gly Leu Ala Asn
                               135           140           145           150

gtg caa tgt tct gat tta ctc aag aaa tgg ctg cca caa aga tgt gca      534
Val Gln Cys Ser Asp Leu Leu Lys Lys Trp Leu Pro Gln Arg Cys Ala
                               155           160           165

act ttt gct agc aaa att caa ggc caa gtg gac aaa ata aag ggt gcc      582
Thr Phe Ala Ser Lys Ile Gln Gly Gln Val Asp Lys Ile Lys Gly Ala
                               170           175           180

ggt ggt gat taa tctaataga atactgcata actggatgat gatatactag cttatt      640
Gly Gly Asp *
                               185

gctcataaaa tggccatttt ttgtaacaaa tcgagtctat gtaattcaaa atacctaatt      700
aattgttaat acatagttaa ttctataaaa tataatttat gcaatccaaa aaaaaaaaaa      760
aaaaa                                           765

```

<210> 20
 <211> 186
 <212> PRT
 <213> Gaussia
 <220>
 <223> Gaussia-Luciferase
 <400> 20

Met Gly Val Lys Val Leu Phe Ala Leu Ile Cys Ile Ala Val Ala Glu
 1 5 10 15
 Ala Lys Pro Thr Glu Asn Asn Glu Asp Phe Asn Ile Val Ala Val Ala
 20 25 30
 Ser Asn Phe Ala Thr Thr Asp Leu Asp Ala Asp Arg Gly Lys Leu Pro
 35 40 45
 Gly Lys Lys Leu Pro Leu Glu Val Leu Lys Glu Met Glu Ala Asn Ala
 50 55 60
 Arg Lys Ala Gly Cys Thr Arg Gly Cys Leu Ile Cys Leu Ser His Ile
 65 70 75 80
 Lys Cys Thr Pro Lys Met Lys Lys Phe Ile Pro Gly Arg Cys His Thr
 85 90 95
 Tyr Glu Gly Asp Lys Glu Ser Ala Gln Gly Gly Ile Gly Glu Ala Ile
 100 105 110
 Val Asp Ile Pro Glu Ile Pro Gly Phe Lys Asp Leu Glu Pro Met Glu
 115 120 125
 Gln Phe Ile Ala Gln Val Asp Leu Cys Val Asp Cys Thr Thr Gly Cys
 130 135 140
 Leu Lys Gly Leu Ala Asn Val Gln Cys Ser Asp Leu Leu Lys Lys Trp
 145 150 155 160
 Leu Pro Gln Arg Cys Ala Thr Phe Ala Ser Lys Ile Gln Gly Gln Val
 165 170 175
 Asp Lys Ile Lys Gly Ala Gly Gly Asp
 180 185

<210> 21
 <211> 1146
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz: Fusionskonstrukt
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) ... (1146)
 <220>
 <223> DNA, die ein Cellulose-Bindungsdomäne-(CBD)-Gaussia-Luciferase-Fusionsprotein
 codiert
 <400> 21

atg tca gtt gaa ttt tac aac tct aac aaa tca gca caa aca aac tca 48
 Met Ser Val Glu Phe Tyr Asn Ser Asn Lys Ser Ala Gln Thr Asn Ser
 1 5 10 15
 att aca cca ata atc aaa att act aac aca tct gac agt gat tta aat 96
 Ile Thr Pro Ile Ile Lys Ile Thr Asn Thr Ser Asp Ser Asp Leu Asn
 20 25 30

tta aat gac gta aaa gtt aga tat tat tac aca agt gat ggt aca caa	144
Leu Asn Asp Val Lys Val Arg Tyr Tyr Tyr Thr Ser Asp Gly Thr Gln	
35 40 45	
gga caa act ttc tgg tgt gac cat gct ggt gca tta tta gga aat agc	192
Gly Gln Thr Phe Trp Cys Asp His Ala Gly Ala Leu Leu Gly Asn Ser	
50 55 60	
tat gtt gat aac act agc aaa gtg aca gca aac ttc gtt aaa gaa aca	240
Tyr Val Asp Asn Thr Ser Lys Val Thr Ala Asn Phe Val Lys Glu Thr	
65 70 75 80	
gca agc cca aca tca acc tat gat aca tat gtt gaa ttt gga ttt gca	288
Ala Ser Pro Thr Ser Thr Tyr Asp Thr Tyr Val Glu Phe Gly Phe Ala	
85 90 95	
agc gga gca gct act ctt aaa aaa gga caa ttt ata act att caa gga	336
Ser Gly Ala Ala Thr Leu Lys Lys Gly Gln Phe Ile Thr Ile Gln Gly	
100 105 110	
aga ata aca aaa tca gac tgg tca aac tac act caa aca aat gac tat	384
Arg Ile Thr Lys Ser Asp Trp Ser Asn Tyr Thr Gln Thr Asn Asp Tyr	
115 120 125	
tca ttt gat gca agt agt tca aca cca gtt gta aat cca aaa gtt aca	432
Ser Phe Asp Ala Ser Ser Ser Thr Pro Val Val Asn Pro Lys Val Thr	
130 135 140	
gga tat ata ggt gga gct aaa gtt ctt ggt aca gca cca ggt tcc gcg	480
Gly Tyr Ile Gly Gly Ala Lys Val Leu Gly Thr Ala Pro Gly Ser Ala	
145 150 155 160	
ggt ctg gtg cca cgc ggt agt act gca att ggt atg aaa gaa acc gct	528
Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser Thr Ala Ile Gly Met Lys Glu Thr Ala	
165 170 175	
gct gct aaa ttc gaa cgc cag cac atg gac agc cca gat ctg ggt acc	576
Ala Ala Lys Phe Glu Arg Gln His Met Asp Ser Pro Asp Leu Gly Thr	
180 185 190	
gat gac gac gac aag atg gga gtg aaa gtt ctt ttt gcc ctt att tgt	624
Asp Asp Asp Asp Lys Met Gly Val Lys Val Leu Phe Ala Leu Ile Cys	
195 200 205	
att gct gtg gcc gag gcc aaa cca act gaa aac aat gaa gat ttc aac	672
Ile Ala Val Ala Glu Ala Lys Pro Thr Glu Asn Asn Glu Asp Phe Asn	
210 215 220	
att gta gct gta gct agc aac ttt gct aca acg gat ctc gat gct gac	720
Ile Val Ala Val Ala Ser Asn Phe Ala Thr Thr Asp Leu Asp Ala Asp	
225 230 235 240	
cgt ggt aaa ttg ccc gga aaa aaa tta cca ctt gag gta ctc aaa gaa	768
Arg Gly Lys Leu Pro Gly Lys Lys Leu Pro Leu Glu Val Leu Lys Glu	
245 250 255	
atg gaa gcc aat gct agg aaa gct ggc tgc act agg gga tgt ctg ata	816
Met Glu Ala Asn Ala Arg Lys Ala Gly Cys Thr Arg Gly Cys Leu Ile	
260 265 270	
tgc ctg tca cac atc aag tgt aca ccc aaa atg aag aag ttt atc cca	864
Cys Leu Ser His Ile Lys Cys Thr Pro Lys Met Lys Lys Phe Ile Pro	
275 280 285	
gga aga tgc cac acc tat gaa gga gac aaa gaa agt gca cag gga gga	912
Gly Arg Cys His Thr Tyr Glu Gly Asp Lys Glu Ser Ala Gln Gly Gly	
290 295 300	

ata gga gag gct att gtt gac att cct gaa att cct ggg ttt aag gat 960
 Ile Gly Glu Ala Ile Val Asp Ile Pro Glu Ile Pro Gly Phe Lys Asp
 305 310 315 320
 ttg gaa ccc atg gaa caa ttc att gca caa gtt gac cta tgt gta gac 1008
 Leu Glu Pro Met Glu Gln Phe Ile Ala Gln Val Asp Leu Cys Val Asp
 325 330 335
 tgc aca act gga tgc ctc aaa ggt ctt gcc aat gtg caa tgt tct gat 1056
 Cys Thr Thr Gly Cys Leu Lys Gly Leu Ala Asn Val Gln Cys Ser Asp
 340 345 350
 tta ctc aag aaa tgg ctg cca caa aga tgt gca act ttt gct agc aaa 1104
 Leu Leu Lys Lys Trp Leu Pro Gln Arg Cys Ala Thr Phe Ala Ser Lys
 355 360 365
 att caa ggc caa gtg gac aaa ata aag ggt gcc ggt ggt gat 1146
 Ile Gln Gly Gln Val Asp Lys Ile Lys Gly Ala Gly Gly Asp
 370 375 380

<210> 22

<211> 382

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz: Fusionsprotein

<220>

<223> Cellulose-Bindungsdomäne-(CBD)-Gaussia-Luciferase-Fusionsprotein

<400> 22

Met Ser Val Glu Phe Tyr Asn Ser Asn Lys Ser Ala Gln Thr Asn Ser
 1 5 10 15
 Ile Thr Pro Ile Ile Lys Ile Thr Asn Thr Ser Asp Ser Asp Leu Asn
 20 25 30
 Leu Asn Asp Val Lys Val Arg Tyr Tyr Tyr Thr Ser Asp Gly Thr Gln
 35 40 45
 Gly Gln Thr Phe Trp Cys Asp His Ala Gly Ala Leu Leu Gly Asn Ser
 50 55 60
 Tyr Val Asp Asn Thr Ser Lys Val Thr Ala Asn Phe Val Lys Glu Thr
 65 70 75 80
 Ala Ser Pro Thr Ser Thr Tyr Asp Thr Tyr Val Glu Phe Gly Phe Ala
 85 90 95
 Ser Gly Ala Ala Thr Leu Lys Lys Gly Gln Phe Ile Thr Ile Gln Gly
 100 105 110
 Arg Ile Thr Lys Ser Asp Trp Ser Asn Tyr Thr Gln Thr Asn Asp Tyr
 115 120 125
 Ser Phe Asp Ala Ser Ser Ser Thr Pro Val Val Asn Pro Lys Val Thr
 130 135 140
 Gly Tyr Ile Gly Gly Ala Lys Val Leu Gly Thr Ala Pro Gly Ser Ala
 145 150 155 160
 Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser Thr Ala Ile Gly Met Lys Glu Thr Ala
 165 170 175
 Ala Ala Lys Phe Glu Arg Gln His Met Asp Ser Pro Asp Leu Gly Thr
 180 185 190
 Asp Asp Asp Asp Lys Met Gly Val Lys Val Leu Phe Ala Leu Ile Cys

195	200	205
Ile Ala Val Ala Glu Ala Lys Pro Thr Glu Asn Asn Glu Asp Phe Asn 210 215 220		
Ile Val Ala Val Ala Ser Asn Phe Ala Thr Thr Asp Leu Asp Ala Asp 225 230 235 240		
Arg Gly Lys Leu Pro Gly Lys Lys Leu Pro Leu Glu Val Leu Lys Glu 245 250 255		
Met Glu Ala Asn Ala Arg Lys Ala Gly Cys Thr Arg Gly Cys Leu Ile 260 265 270		
Cys Leu Ser His Ile Lys Cys Thr Pro Lys Met Lys Lys Phe Ile Pro 275 280 285		
Gly Arg Cys His Thr Tyr Glu Gly Asp Lys Glu Ser Ala Gln Gly Gly 290 295 300		
Ile Gly Glu Ala Ile Val Asp Ile Pro Glu Ile Pro Gly Phe Lys Asp 305 310 315 320		
Leu Glu Pro Met Glu Gln Phe Ile Ala Gln Val Asp Leu Cys Val Asp 325 330 335		
Cys Thr Thr Gly Cys Leu Lys Gly Leu Ala Asn Val Gln Cys Ser Asp 340 345 350		
Leu Leu Lys Lys Trp Leu Pro Gln Arg Cys Ala Thr Phe Ala Ser Lys 355 360 365		
Ile Gln Gly Gln Val Asp Lys Ile Lys Gly Ala Gly Gly Asp 370 375 380		

<210> 23

<211> 41

<212> PRT

<213> Renilla reniformis

<220>

<223> grün fluoreszierendes Protein (GFP) von Renilla-reniformis N-terminales Peptid

<400> 23

Met Asp Leu Ala Xaa Lys Leu Gly Leu Lys Glu Val Met Pro Thr Lys 1 5 10 15
Ile Asn Leu Glu Gly Leu Val Gly Asp His Ala Phe Ser Met Glu Gly 20 25 30
Val Gly Glu Gly Asn Ile Leu Glu Gly 35 40

<210> 24

<211> 22

<212> PRT

<213> Renilla reniformis

<220>

<223> grün fluoreszierendes Protein (GFP) von Renilla-reniformis Peptid

<400> 24

Val Lys Ile Ser Val Thr Lys Gly Ala Pro Leu Pro Phe Ala Phe Asp Ile 1 5 10 15
--

Val Ser Val Ala Phe
20

- <210> 25
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Renilla reniformis
 <220>
 <223> grün fluoreszierendes Protein (GFP) von Renilla-reniformis Peptid
 <400> 25

Ala Tyr Thr Gly Tyr Pro Glu Glu Ile Ser Asp Tyr Phe Leu Gln Ser Phe
1 5 10 15

Pro Glu Gly Phe Thr Tyr Glu Arg Gly Asn Ile Arg Tyr Gln Asp Gly Gly
20 25 30

Thr Ala Ile Val Lys Ser
35 40

- <210> 26
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Renilla reniformis
 <220>
 <223> grün fluoreszierendes Protein (GFP) von Renilla-reniformis Peptid
 <400> 26

Ile Val Gly Met Gln Pro Ser Tyr Glu Ser Met Tyr
1 5 10

- <210> 27
 <211> 81
 <212> PRT
 <213> Renilla reniformis
 <220>
 <223> grün fluoreszierendes Protein (GFP) von Renilla-reniformis C-terminales Peptid
 <400> 27

Thr Asn Val Thr Ser Val Ile Gly Gln Ile Ile Ala Phe Lys Leu Gln
1 5 10 15

Thr Gly Lys His Phe Thr Tyr His Met Arg Thr Val Tyr Lys Ser Lys
20 25 30

Lys Pro Val Glu Thr Met Pro Leu Tyr His Phe Ile Gln His Arg Leu
35 40 45

Val Lys Thr Asn Val Asp Thr Ala Ser Gly Tyr Val Val Gln His Glu
50 55 60

Thr Ala Ile Ala Ala His Ser Thr Ile Lys Lys Ile Glu Gly Ala Ala
65 70 75 80

Arg

- <210> 28
 <211> 861
 <212> DNA

<213> Pleuromamma

<220>

<221> CDS

<222> (148) ... (741)

<220>

<223> Pleuromamma-Luciferase

<400> 28

```

cggcacgaga ttttgtctgt ggtgattggg attgtctgtc tctcaggtca agcagaaagt 60
tcgctgaaag gtgatttctg tagtgatggt tccttctggg atgtgatcaa gtacaacact 120
gagagtcgac aatgctgtga cacaaaa atg ctt aga aat tgc gct agg aag caa 174
                               Met Leu Arg Asn Cys Ala Arg Lys Gln
                               1                               5

gag caa gtt tgc gcc gat gtg acc gag atg aaa tgc caa gca gtt gct 222
Glu Gln Val Cys Ala Asp Val Thr Glu Met Lys Cys Gln Ala Val Ala
 10                               15                               20                               25

tgg gcc gac tgt gga ccc aga ttt gat tcc act ggc agg aat aga tgc 270
Trp Ala Asp Cys Gly Pro Arg Phe Asp Ser Thr Gly Arg Asn Arg Cys
 30                               35                               40

caa gtt caa tac aag gac tac gcg tac aag tcc tgc gtg gaa gtt gat 318
Gln Val Gln Tyr Lys Asp Tyr Ala Tyr Lys Ser Cys Val Glu Val Asp
 45                               50                               55

tac act gta ccg cac agg aag caa gtt cca gag tgc aaa caa gtc act 366
Tyr Thr Val Pro His Arg Lys Gln Val Pro Glu Cys Lys Gln Val Thr
 60                               65                               70

aaa gat aac tgc gtt act gat tgg gaa gtt gac gcc aat ggc aac aag 414
Lys Asp Asn Cys Val Thr Asp Trp Glu Val Asp Ala Asn Gly Asn Lys
 75                               80                               85

gtt tgg ggt ggt acc gag aaa tgc act cct gtc act tgg gaa gaa tgt 462
Val Trp Gly Gly Thr Glu Lys Cys Thr Pro Val Thr Trp Glu Glu Cys
 90                               95                               100                               105

aat atc gtg gag aaa gat gta gat ttt cca act gtc aag acg gaa tgc 510
Asn Ile Val Glu Lys Asp Val Asp Phe Pro Thr Val Lys Thr Glu Cys
 110                               115                               120

ggc atc ctg tct cac ctt aag tat gca gac ttc ata gag gga cct tcc 558
Gly Ile Leu Ser His Leu Lys Tyr Ala Asp Phe Ile Glu Gly Pro Ser
 125                               130                               135

cac tct ttg tct atg aga acc aat tgt cag gtc aag agt tca ttg gac 606
His Ser Leu Ser Met Arg Thr Asn Cys Gln Val Lys Ser Ser Leu Asp
 140                               145                               150

tgc egg cct gtt aag acc agg aag tgt gca acg gtc gag tac cac gaa 654
Cys Arg Pro Val Lys Thr Arg Lys Cys Ala Thr Val Glu Tyr His Glu
 155                               160                               165

tgc agc atg aag ccc caa gaa gac tgc agc cca gtc act gtt cat att 702
Cys Ser Met Lys Pro Gln Glu Asp Cys Ser Pro Val Thr Val His Ile
 170                               175                               180                               185

cct gac cag gag aaa gtt cac cag aag aag tgc ctc aca taa 744
Pro Asp Gln Glu Lys Val His Gln Lys Lys Cys Leu Thr
 190                               195

atggtatcaa ttttagctct tactaattta aacataataa atatcacatc gaagcccttt 804

```

atattataga agtgtaatgc ttgaataaat ctagtgaata aaaaaaaaaa aaaaaaa

861

<210> 29
 <211> 198
 <212> PRT
 <213> Pleuromamma
 <220>
 <223> Pleuromamma-Luciferase
 <400> 29

Met Leu Arg Asn Cys Ala Arg Lys Gln Glu Gln Val Cys Ala Asp Val
 1 5 10 15
 Thr Glu Met Lys Cys Gln Ala Val Ala Trp Ala Asp Cys Gly Pro Arg
 20 25 30
 Phe Asp Ser Thr Gly Arg Asn Arg Cys Gln Val Gln Tyr Lys Asp Thr
 35 40 45
 Ala Tyr Lys Ser Cys Val Glu Val Asp Tyr Thr Val Pro His Arg Lys
 50 55 60
 Gln Val Pro Glu Cys Lys Gln Val Thr Lys Asp Asn Cys Val Thr Asp
 65 70 75 80
 Trp Glu Val Asp Ala Asn Gly Asn Lys Val Trp Gly Gly Thr Glu Lys
 85 90 95
 Cys Thr Pro Val Thr Trp Glu Glu Cys Asn Ile Val Glu Lys Asp Val
 100 105 110
 Asp Phe Pro Thr Val Lys Thr Glu Cys Gly Ile Leu Ser His Leu Lys
 115 120 125
 Tyr Ala Asp Phe Ile Glu Gly Pro Ser His Ser Leu Ser Met Arg Thr
 130 135 140
 Asn Cys Gln Val Lys Ser Ser Leu Asp Cys Arg Pro Val Lys Thr Arg
 145 150 155 160
 Lys Cys Ala Thr Val Glu Tyr His Glu Cys Ser Met Lys Pro Gln Glu
 165 170 175
 Asp Cys Ser Pro Val Thr Val His Ile Pro Asp Gln Glu Lys Val His
 180 185 190
 Gln Lys Lys Cys Leu Thr
 195

<210> 30
 <211> 1104
 <212> DNA
 <213> Ptilosarcus gurneyi
 <220>
 <221> CDS
 <222> (34) ... (747)
 <220>
 <223> grün fluoreszierendes Protein (GFP) von Ptilosarcus (Insertion A)
 <400> 30

tcggcagcag ctggcctcca cacttttagac aaa atg aac cgc aac gta tta aag
 Met Asn Arg Asn Val Leu Lys
 1 5

54

aac act gga ctg aaa gag att atg tcg gca aaa gct agc gtt gaa gga	102
Asn Thr Gly Leu Lys Glu Ile Met Ser Ala Lys Ala Ser Val Glu Gly	
10 15 20	
ATC GTG AAC AAT CAC GTT TTT TCC ATG GAA GGA TTT GGA AAA GGC AAT	150
Ile Val Asn Asn His Val Phe Ser Met Glu Gly Phe Gly Lys Gly Asn	
25 30 35	
gta tta ttt gga aac caa ttg atg caa atc cgg gtt aca aag gga ggt	198
Val Leu Phe Gly Asn Gln Leu Met Gln Ile Arg Val Thr Lys Gly Gly	
40 45 50 55	
ccg ttg cca ttc gct ttc gat att gtt tcc ata gct ttc caa tac ggg	246
Pro Leu Pro Phe Ala Phe Asp Ile Val Ser Ile Ala Phe Gln Tyr Gly	
60 65 70	
aat cgc act ttc acg aaa tac cca gac gac att gcg gac tac ttt gtt	294
Asn Arg Thr Phe Thr Lys Tyr Pro Asp Asp Ile Ala Asp Tyr Phe Val	
75 80 85	
caa tca ttc ccg gct gga ttt ttc tac gaa aga aat cta cgc ttt gaa	342
Gln Ser Phe Pro Ala Gly Phe Phe Tyr Glu Arg Asn Leu Arg Phe Glu	
90 95 100	
gat ggc gcc att gtt gac att cgt tca gat ata agt tta gaa gat gat	390
Asp Gly Ala Ile Val Asp Ile Arg Ser Asp Ile Ser Leu Glu Asp Asp	
105 110 115	
aag ttc cac tac aaa gtg gag tat aga ggc aac ggt ttc cct agt aac	438
Lys Phe His Tyr Lys Val Glu Tyr Arg Gly Asn Gly Phe Pro Ser Asn	
120 125 130 135	
gga ccc gtg atg caa aaa gcc atc ctc ggc atg gag cca tcg ttt gag	486
Gly Pro Val Met Gln Lys Ala Ile Leu Gly Met Glu Pro Ser Phe Glu	
140 145 150	
gtg gtc tac atg aac agc ggc gtt ctg gtg ggc gaa gta gat ctc gtt	534
Val Val Tyr Met Asn Ser Gly Val Leu Val Gly Glu Val Asp Leu Val	
155 160 165	
tac aaa ctc gag tca ggg aac tat tac tcg tgc cac atg aaa acg ttt	582
Tyr Lys Leu Glu Ser Gly Asn Tyr Tyr Ser Cys His Met Lys Thr Phe	
170 175 180	
tac aga tcc aaa ggt gga gtg aaa gaa ttc ccg gaa tat cac ttt atc	630
Tyr Arg Ser Lys Gly Gly Val Lys Glu Phe Pro Glu Tyr His Phe Ile	
185 190 195	
cat cat cgt ctg gag aaa acc tac gtg gaa gaa gga agc ttc gtg gaa	678
His His Arg Leu Glu Lys Thr Tyr Val Glu Glu Gly Ser Phe Val Glu	
200 205 210 215	
caa cac gag acg gcc att gca caa ctg acc aca att gga aaa cct ctg	726
Gln His Glu Thr Ala Ile Ala Gln Leu Thr Thr Ile Gly Lys Pro Leu	
220 225 230	
ggc tcc ctt cat gaa tgg gtg tag aaaatgacca atatactggg gaaaccgata	780
Gly Ser Leu His Glu Trp Val	
235	
accgtttgga agcttggtgta tacaattat ttgggggtcat tttgtaatgt gtatgtgtgt	840
tgtatgatca atagacgtcg tcattcatag cttgaaatcct tcagcaaaag aaacctcgaa	900
gcatattgaa acctcgaagc atattgaaac ctgcagcggag agcgtaaaga gaccgcacaa	960
attaacgcgt ttcaaccagc agttggaatc tttaaaccca tcaaaactat taatataaat	1020
atatataccc tgtataactt atatataatct atatagtttg atattgatta aatctgttct	1080

tgatcaaaaa aaaaaaaaaa aaaa

1104

<210> 31
 <211> 1179
 <212> DNA
 <213> Ptilosarcus gurneyi
 <220>
 <221> CDS
 <222> (7) ... (720)
 <220>
 <223> grün fluoreszierendes Protein (GFP) von Ptilosarcus (Insertion B)
 <400> 31

```

                                     gacaaa atg aac cgc aac gta tta aag      27
                                     Met Asn Arg Asn Val Leu Lys
                                     1                               5

aac act gga ctg aaa gag att atg tcg gca aaa gct agc gtt gaa gga      75
Asn Thr Gly Leu Lys Glu Ile Met Ser Ala Lys Ala Ser Val Glu Gly
                               10                               15                               20

atc gtg aac aat cac gtt ttt tcc atg gaa gga ttt gga aaa ggc aat      123
Ile Val Asn Asn His Val Phe Ser Met Glu Gly Phe Gly Lys Gly Asn
                               25                               30                               35

gta tta ttt gga aac caa ttg atg caa atc cgg gtt aca aag gga ggt      171
Val Leu Phe Gly Asn Gln Leu Met Gln Ile Arg Val Thr Lys Gly Gly
                               40                               45                               50                               55

ccg ttg cca ttc gct ttc gac att gtt tcc ata gct ttc caa tac ggg      219
Pro Leu Pro Phe Ala Phe Asp Ile Val Ser Ile Ala Phe Gln Tyr Gly
                               60                               65                               70

aat cgc act ttc acg aaa tac cca gac gac att gcg gac tac ttt gtt      267
Asn Arg Thr Phe Thr Lys Tyr Pro Asp Asp Ile Ala Asp Tyr Phe Val
                               75                               80                               85

caa tca ttt ccg gct gga ttt ttc tac gaa aga aat cta cgc ttt gaa      315
Gln Ser Phe Pro Ala Gly Phe Phe Tyr Glu Arg Asn Leu Arg Phe Glu
                               90                               95                               100

gat ggc gcc att gtt gac att cgt tca gat ata agt tta gaa gat gat      363
Asp Gly Ala Ile Val Asp Ile Arg Ser Asp Ile Ser Leu Glu Asp Asp
                               105                               110                               115

aag ttc cac tac aaa gtg gag tat aga ggc aac ggt ttc cct agt aac      411
Lys Phe His Tyr Lys Val Glu Tyr Arg Gly Asn Gly Phe Pro Ser Asn
                               120                               125                               130                               135

gga ccc gtg atg caa aaa gcc atc ctc ggc atg gag cca tcg ttt gag      459
Gly Pro Val Met Gln Lys Ala Ile Leu Gly Met Glu Pro Ser Phe Glu
                               140                               145                               150

gtg gtc tac atg aac agc ggc gtt ctg gtg ggc gaa gta gat ctc gtt      507
Val Val Tyr Met Asn Ser Gly Val Leu Val Gly Glu Val Asp Leu Val
                               155                               160                               165

tac aaa ctc gag tca ggg aac tat tac tcg tgc cac atg aaa acg ttt      555
Tyr Lys Leu Glu Ser Gly Asn Tyr Tyr Ser Cys His Met Lys Thr Phe
                               170                               175                               180

tac aga tcc aaa ggt gga gtg aaa gaa ttc ccg gaa tat cac ttt atc      603
Tyr Arg Ser Lys Gly Gly Val Lys Glu Phe Pro Glu Tyr His Phe Ile

```

185	190	195	
cat cat cgt ctg gag	aaa acc tac gtg gaa	gaa gga agc ttc gtg gaa	651
His His Arg Leu Glu	Lys Thr Tyr Val Glu	Glu Gly Ser Phe Val Glu	
200	205	210	215
caa cac gag acg gcc	att gca caa ctg acc	aca att gga aaa cct ctg	699
Gln His Glu Thr Ala	Ile Ala Gln Leu Thr	Thr Ile Gly Lys Pro Leu	
220	225	230	
ggc tcc ctt cat gaa	tgg gtg tag aaaatgacca	atatactggg gaaaatcacc	753
Gly Ser Leu His Glu	Trp Val		
aatatactgg ggaaaatgac	caatttactg gggaaaatga	ccaatatact gtagaaaatc	813
accaatatac tggggaaaat	gaccaattta ctggggaaat	gaccaattta ctgtagaaaa	873
tcaccaatat actgtggaaa	atgaccaaaa tactgtagaa	atgttcacac tgggttgata	933
accgtttcga taaccgtttg	gaagcttgtg tatacaagtt	atttggggtc atttttgtaat	993
gtgtatgtgt gttgtatgat	ctatagacgt cgtcattcat	agcttgaatc cttcagcaaa	1053
agaaacctcg aagcatattg	aaacctcgac ggagagcata	aagagaccgc acgtacacaa	1113
attataatac cagcagttgg	aatctttaa ccgatcaaaa	ctattaatat atatatacac	1173
cctgtataac atatatatat	atatatatct acatagtttg	atattgatta aatctgttct	1233
tgatcactaa aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	aaaaaa	1279

<210> 32

<211> 238

<212> PRT

<213> *Ptilosarcus gurneyi*

<220>

<223> grün fluoreszierendes Protein (GFP) von *Ptilosarcus gurneyi*

<400> 32

Met	Asn	Arg	Asn	Val	Leu	Lys	Asn	Thr	Gly	Leu	Lys	Glu	Ile	Met	Ser
1				5					10					15	
Ala	Lys	Ala	Ser	Val	Glu	Gly	Ile	Val	Asn	Asn	His	Val	Phe	Ser	Met
			20					25					30		
Glu	Gly	Phe	Gly	Lys	Gly	Asn	Val	Leu	Phe	Gly	Asn	Gln	Leu	Met	Gln
		35					40					45			
Ile	Arg	Val	Thr	Lys	Gly	Gly	Pro	Leu	Pro	Phe	Ala	Phe	Asp	Ile	Val
	50					55					60				
Ser	Ile	Ala	Phe	Gln	Tyr	Gly	Asn	Arg	Thr	Phe	Thr	Lys	Tyr	Pro	Asp
65				70						75				80	
Asp	Ile	Ala	Asp	Tyr	Phe	Val	Gln	Ser	Phe	Pro	Ala	Gly	Phe	Phe	Tyr
			85						90					95	
Glu	Arg	Asn	Leu	Arg	Phe	Glu	Asp	Gly	Ala	Ile	Val	Asp	Ile	Arg	Ser
			100					105					110		
Asp	Ile	Ser	Leu	Glu	Asp	Asp	Lys	Phe	His	Tyr	Lys	Val	Glu	Tyr	Arg
		115					120					125			
Gly	Asn	Gly	Phe	Pro	Ser	Asn	Gly	Pro	Val	Met	Gln	Lys	Ala	Ile	Leu
	130					135					140				
Gly	Met	Glu	Pro	Ser	Phe	Glu	Val	Val	Tyr	Met	Asn	Ser	Gly	Val	Leu
145					150					155					160
Val	Gly	Glu	Val	Asp	Leu	Val	Tyr	Lys	Leu	Glu	Ser	Gly	Asn	Tyr	Tyr
				165					170					175	
Ser	Cys	His	Met	Lys	Thr	Phe	Tyr	Arg	Ser	Lys	Gly	Gly	Val	Lys	Glu

	180					185					190				
Phe	Pro	Glu	Tyr	His	Phe	Ile	His	His	Arg	Leu	Glu	Lys	Thr	Tyr	Val
		195					200					205			
Glu	Glu	Gly	Ser	Phe	Val	Glu	Gln	His	Glu	Thr	Ala	Ile	Ala	Gln	Leu
	210					215					220				
Thr	Thr	Ile	Gly	Lys	Pro	Leu	Gly	Ser	Leu	His	Glu	Trp	Val		
225					230										

Patentansprüche

1. Isoliertes Nucleinsäurefragment, das eine Luciferase codiert und das die Nucleotidsequenz umfasst, die unter
 - einer Nucleotidsequenz, die in SEQ ID NO: 19 offenbart wird;
 - einer Nucleotidsequenz, die die Aminosäuresequenz codiert, die in SEQ ID NO: 20 offenbart wird; und
 - einer Nucleotidsequenz, die mindestens 90% Sequenzidentität mit der Nucleotidsequenz zeigt, die in SEQ ID NO: 19 offenbart wird, ausgewählt wird.
2. Isoliertes Nucleinsäurefragment nach Anspruch 1, wobei die Nucleinsäure eine DNA ist.
3. Isoliertes Nucleinsäurefragment nach Anspruch 1, wobei die Nucleinsäure eine RNA ist.
4. Isoliertes Nucleinsäurefragment nach Anspruch 1, wobei die Nucleinsäure für die Expression in Tierzellen, Bakterienzellen, Hefezellen, Pilzzellen, Pflanzenzellen und/oder Insektenzellen optimiert ist.
5. Isoliertes Nucleinsäurefragment nach Anspruch 1, wobei die Nucleinsäure für die Expression in Humanzellen optimiert ist.
6. Nucleinsäuresonde oder Primer, die/der mindestens 14 aufeinander folgende Nucleotide umfasst, die aus der Nucleotidsequenz ausgewählt werden, die in dem codierenden Bereich von SEQ ID NO: 19 offenbart wird.
7. Nucleinsäuresonde oder Primer nach Anspruch 6, die/der mindestens 16 aufeinander folgende Nucleotide umfasst, die aus der Nucleotidsequenz ausgewählt werden, die in dem codierenden Bereich von SEQ ID NO: 19 offenbart wird.
8. Nucleinsäuresonde oder Primer nach Anspruch 6, die/der mindestens 30 aufeinander folgende Nucleotide umfasst, die aus der Nucleotidsequenz ausgewählt werden, die in dem codierenden Bereich von SEQ ID NO: 19 offenbart wird.
9. Plasmid, das das Nucleinsäurefragment nach Anspruch 1 umfasst.
10. Plasmid nach Anspruch 9, das ein Expressionsvektor ist.
11. Plasmid nach Anspruch 10, das eine Nucleotidsequenz umfasst, die
 - einen Promotorbereich,
 - eine Gaussia-Luciferase der SEQ ID NO: 19 und
 - einen selektierbaren Marker
 codiert, wobei die Nucleotidsequenz, die die Luciferase codiert, funktionsfähig mit dem Promotor verknüpft ist, wodurch die Luciferase exprimiert wird.
12. Plasmid nach Anspruch 10, das weiterhin eine Nucleotidsequenz umfasst, die ein grün fluoreszierendes Protein (GFP) codiert.
13. Rekombinante Wirtszelle, die das Plasmid nach Anspruch 10 umfasst.
14. Zelle nach Anspruch 13, wobei die Zelle unter einer Bakterienzelle, einer Hefezelle, einer Pilzzelle, einer Pflanzenzelle, einer Insektenzelle und einer Tierzelle ausgewählt wird.
15. Verfahren zur Herstellung eines Gaussia-Luciferase-Proteins, das das Züchten der rekombinanten

Wirtszelle nach Anspruch 13, wobei das Luciferase-Protein durch die Zelle exprimiert wird, und das Gewinnen des exprimierten Luciferase-Proteins umfasst.

16. Isoliertes gereinigtes Gaussia-Luciferase-Protein, wobei das Protein die Aminosäuresequenz hat, die in SEQ ID NO: 20 offenbart wird.

17. Kombination, die umfasst:

- einen Produktionsgegenstand; und
- ein Biolumineszenz-erzeugendes System, wobei das Biolumineszenz-erzeugende System eine Luciferase umfasst, die durch die Nucleinsäure nach Anspruch 1 codiert wird.

18. Kombination nach Anspruch 17, die weiterhin ein Luciferin umfasst.

19. Kombination nach Anspruch 17, die weiterhin ein grün fluoreszierendes Protein (GFP) umfasst.

20. Kombination nach Anspruch 19, wobei das GFP ein Renilla-GFP oder ein Ptilosarcus-GFP ist.

21. Kombination nach Anspruch 17, wobei der Produktionsgegenstand unter Spielzeugen, Kosmetika, Springbrunnen, persönlichen Pflegegegenständen, Glitterpuder wie "fairy dust", Getränken, Erfrischungsgetränken, Nahrungsmitteln, Textilwaren, Schaumblasen, Ballons, Artikeln für den persönlichen Gebrauch, Zahnpasten, Seifen, Körperfarben, Schaumbädern, Tinte- und Papierprodukten ausgewählt wird.

22. Kombination nach Anspruch 21, die ein Spielzeuggewehr ist.

23. Kombination nach Anspruch 21, die ein Nahrungsmittel ist.

24. Kombination nach Anspruch 21, die ein Getränk ist.

25. Kombination nach Anspruch 21, die ein Kosmetikprodukt ist.

26. Kombination nach Anspruch 17, wobei der Produktionsgegenstand unter Wasserspritzpistolen, Spielzeugwaffen vom Typ der Soft-Air-Waffen (sog. "pellet guns"), Fingerfarben, Jonglierbällen vom Typ "Footbag", Grußkarten, Spielzeugen aus glibberigen Materialien, Kleidung, blasenerzeugenden Spielzeugen, Badpulvern, Kosmetika, Körperlotionen, Gelen, Körperpulvern, Körpercremes, Zahnpasten, Mundwassern, Seifen, Körperfarben, Schaumbädern, Tinten, Einpackpapier, Gelatinen, Kuchenglasuren, Zuckerguss, Grußkarten, Bier, Wein, Sekt, Erfrischungsgetränken, Eiswürfeln, Eis, Trockeneis und Springbrunnen ausgewählt wird.

27. Kombination nach Anspruch 26, die ein Spielzeuggewehr ist.

28. Kombination nach Anspruch 26, die ein Nahrungsmittel ist.

29. Kombination nach Anspruch 26, die ein Getränk ist.

30. Kombination nach Anspruch 26, die ein Kosmetikprodukt ist.

31. Antikörper, der immunspezifisch eine Gaussia-Luciferase bindet, oder Fragment oder Derivat dieses Antikörpers, das die Bindungsdomäne davon enthält.

32. Antikörper nach Anspruch 31, der ein monoklonaler Antikörper ist.

33. Antikörper nach einem der Ansprüche 30 oder 31, wobei der Antikörper ein humanisierter Antikörper ist.

34. Nucleinsäurekonstrukt, das eine Nucleotidsequenz, die eine Luciferase codiert, und eine Nucleotidsequenz, die ein grün fluoreszierendes Protein (GFP) codiert, umfasst, wobei die Luciferase durch:

- eine Nucleotidsequenz, die in SEQ ID NO: 19 offenbart wird;
 - eine Nucleotidsequenz, die die Aminosäuresequenz codiert, die in SEQ ID NO: 20 offenbart wird; und
 - eine Nucleotidsequenz, die mindestens 90% Sequenzidentität mit der Nucleotidsequenz zeigt, die in SEQ ID NO: 19 offenbart wird,
- codiert wird.

35. Nucleinsäurekonstrukt nach Anspruch 34, wobei das GFP ein Renilla-grün-fluoreszierendes-Protein (Renilla-GFP) oder ein Ptilosarcus-GFP ist.
36. Nucleinsäurekonstrukt nach Anspruch 35, wobei das Renilla-GFP ein Renilla-reniformis-, Renilla-kollokeri- oder Renilla-mulleri-GFP ist.
37. Nucleinsäurekonstrukt nach Anspruch 34, wobei das GFP durch
- eine Nucleotidsequenz, die in SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 30 oder SEQ ID NO: 31 offenbart wird,
 - eine Nucleotidsequenz, die die Aminosäuresequenz codiert, die in SEQ ID NO: 16 oder SEQ ID NO: 32 offenbart wird, und
 - eine Nucleotidsequenz, die mindestens 90% Sequenzidentität mit der Nucleotidsequenz zeigt, die in SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 30 oder SEQ ID NO: 31 offenbart wird, codiert wird.
38. Nucleinsäurekonstrukt nach Anspruch 34, wobei die Nucleotidsequenzen, die die Luciferase und das GFP codieren, unmittelbar aneinander grenzend miteinander verknüpft sind.
39. Nucleinsäurekonstrukt nach Anspruch 34, bei dem es sich um eine DNA handelt.
40. Nucleinsäurekonstrukt nach Anspruch 34, bei dem es sich um eine RNA handelt.
41. Nucleinsäurekonstrukt nach Anspruch 34, wobei das Nucleinsäurekonstrukt für die Expression in Tierzellen, Bakterienzellen, Hefezellen, Pilzzellen, Pflanzenzellen und/oder Insektenzellen optimiert ist.
42. Nucleinsäurekonstrukt nach Anspruch 34, wobei das Nucleinsäurekonstrukt für die Expression in Humanzellen optimiert ist.
43. Nucleinsäurekonstrukt nach Anspruch 34, wobei die Nucleotidsequenzen, die die Luciferase und das GFP codieren, nicht unmittelbar aneinander grenzen.
44. Nucleinsäurekonstrukt nach Anspruch 43, das eine Nucleotidsequenz umfasst, die eine Liganden-bindende Domäne eines Zielproteins codiert.
45. Plasmid, das das Nucleinsäurekonstrukt nach Anspruch 34 umfasst.
46. Plasmid nach Anspruch 45, das weiterhin eine Nucleotidsequenz umfasst, die
- ein Promotorelement;
 - einen selektierbaren Marker;
- codiert, wobei die Nucleotidsequenz, die die Luciferase und das GFP codiert, funktionsfähig mit dem Promotorelement verknüpft ist, so dass ein Fusionsprotein der Luciferase und des GFPs exprimiert wird.
47. Plasmid nach einem der Ansprüche 9 bis 12, 45 oder 46, wobei das Plasmid für die Expression in Tierzellen, Bakterienzellen, Hefezellen, Pilzzellen, Pflanzenzellen und/oder Insektenzellen optimiert ist.
48. Plasmid nach einem der Ansprüche 9 bis 12, 45 oder 46, wobei das Plasmid für die Expression in Humanzellen optimiert ist.
49. Rekombinante Wirtszelle, die das Plasmid nach Anspruch 45 umfasst.
50. Zelle nach Anspruch 49, wobei die Zelle unter einer Bakterienzelle, einer Hefezelle, einer Pilzzelle, einer Pflanzenzelle, einer Insektenzelle und einer Tierzelle ausgewählt wird.
51. Isoliertes, im Wesentlichen gereinigtes Fusionsprotein von Gaussia-Luciferase und GFP, wobei die Luciferase die Aminosäuresequenz hat, die in SEQ ID NO: 20 offenbart wird.
52. Zusammensetzung, die das Fusionsprotein nach Anspruch 51 umfasst.
53. Zusammensetzung nach Anspruch 52, die weiterhin mindestens eine Komponente eines Biolumineszenz-erzeugenden Systems umfasst.

54. Zusammensetzung nach Anspruch 53, wobei es sich bei der Komponente des Biolumineszenz-erzeugenden Systems um Luciferin handelt.

Es folgen 11 Blatt Zeichnungen

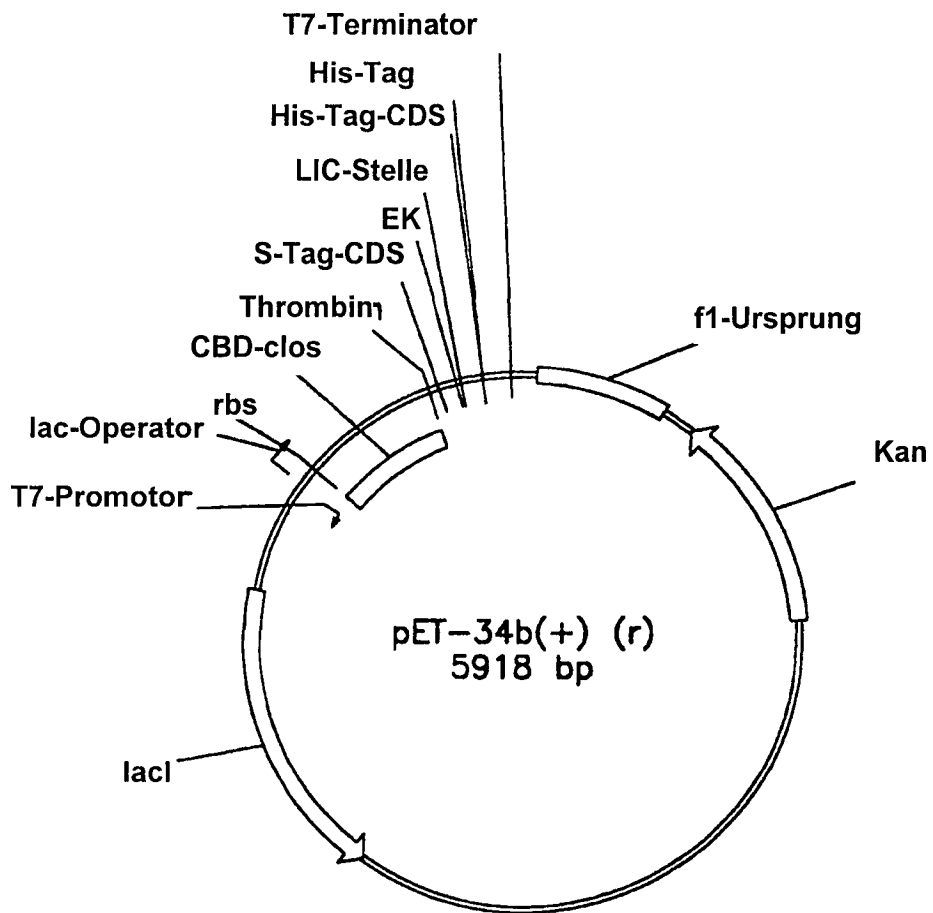
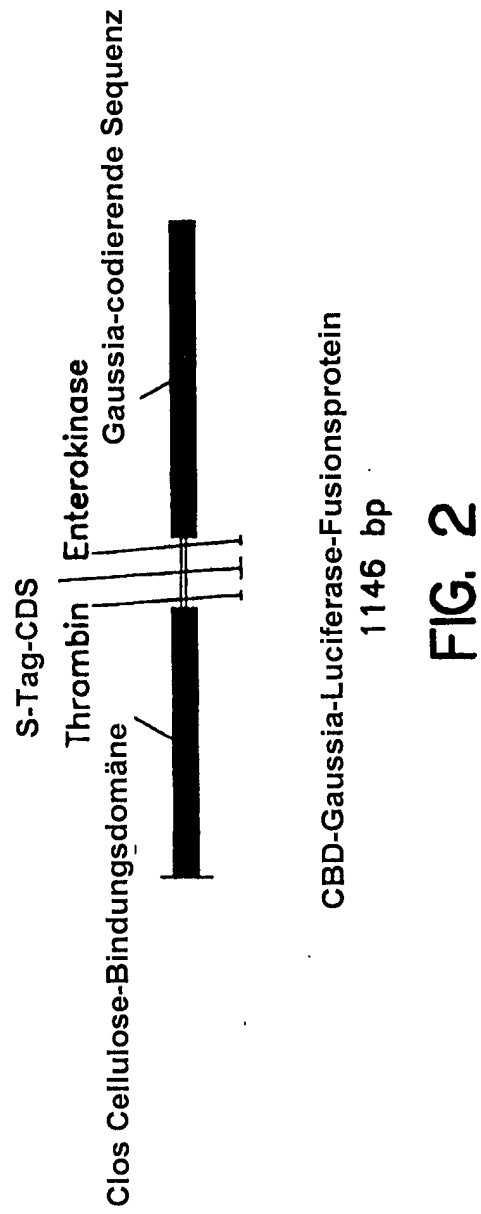


FIG. 1



```

R. reniformis      MDLAKLGLKEVMPFKINLEGLVGDHAFSMEGVGEGNILEG  VKIS
                   | | | | | | | | | | | | | | | | | |
R. mullerei       1 MSKQILKNTCLQEVMSYKVNLEGI VNNHVFTEGCGKGNILFGNQLVQIR

R. reniformis     VTKGAPLPFAFDIVSVAF  AYTGYPEEIS  DYFLQSFPEGFTYERG
                   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
R. mullerei      51 VTKGAPLPFAFDIVSPAFAQYGNRTFTKYPNDIS--DYFIQSFPAQFMYER

R. reniformis     N1RYQDGGTAIVKS
                   | | | | |
R. mullerei      99 TLR YEDGGLVEIRSDINLIEDKFVYRVEYKGSNFDDGPPVMQKTILGIEP

R. reniformis     eSMY TNVTSVIGqIIAFKL QTGKHFTYHMRTVYKSKKPVETMPLYH
                   | | | | | | | | | | | | | | | | | |
R. mullerei     149 SFEAMYMNNGVLVGEVILVYKL-NSGKYYSCHMKTLMKSKGVVKEFFPSYH

R. reniformis     F1QHRL VKTNVDTASGYVVQHETAIAAHSTIKKIEgaar
                   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
R. mullerei     198 F1QHRL--EKTYVED--GGFVEQHETAIAQMTSIGKPLGSLHEWV

```

FIG. 3

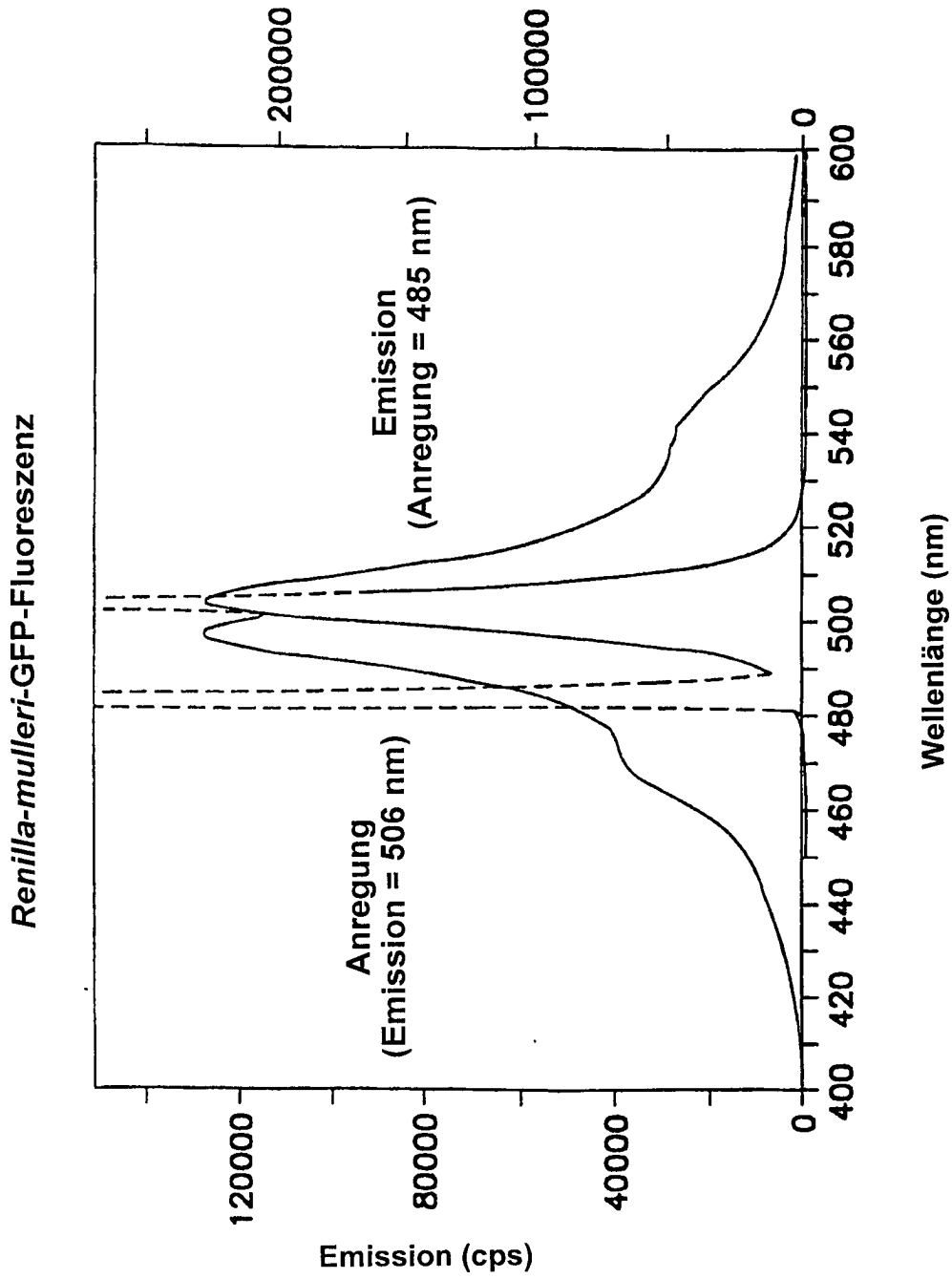


FIG. 4

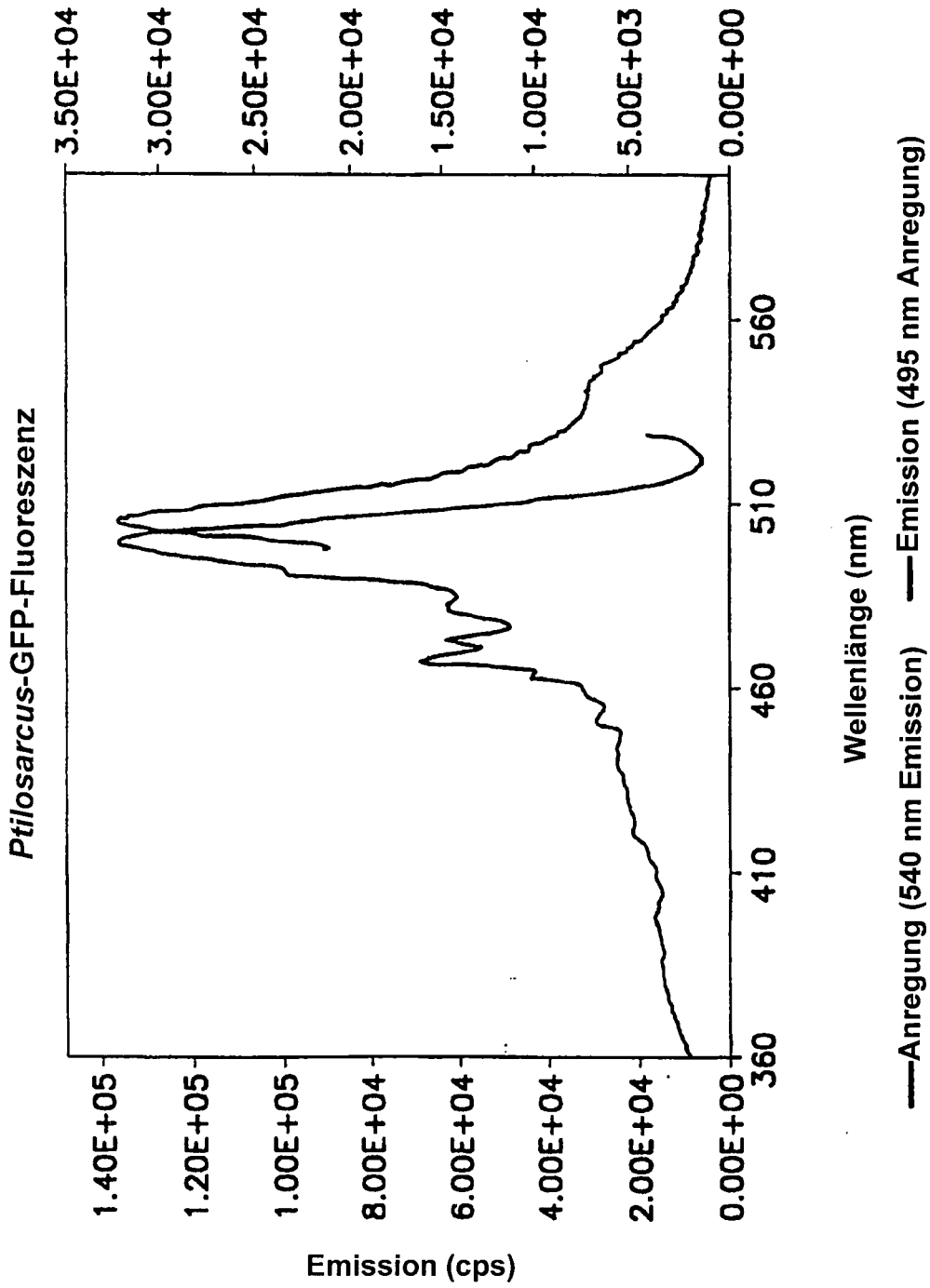


FIG. 5

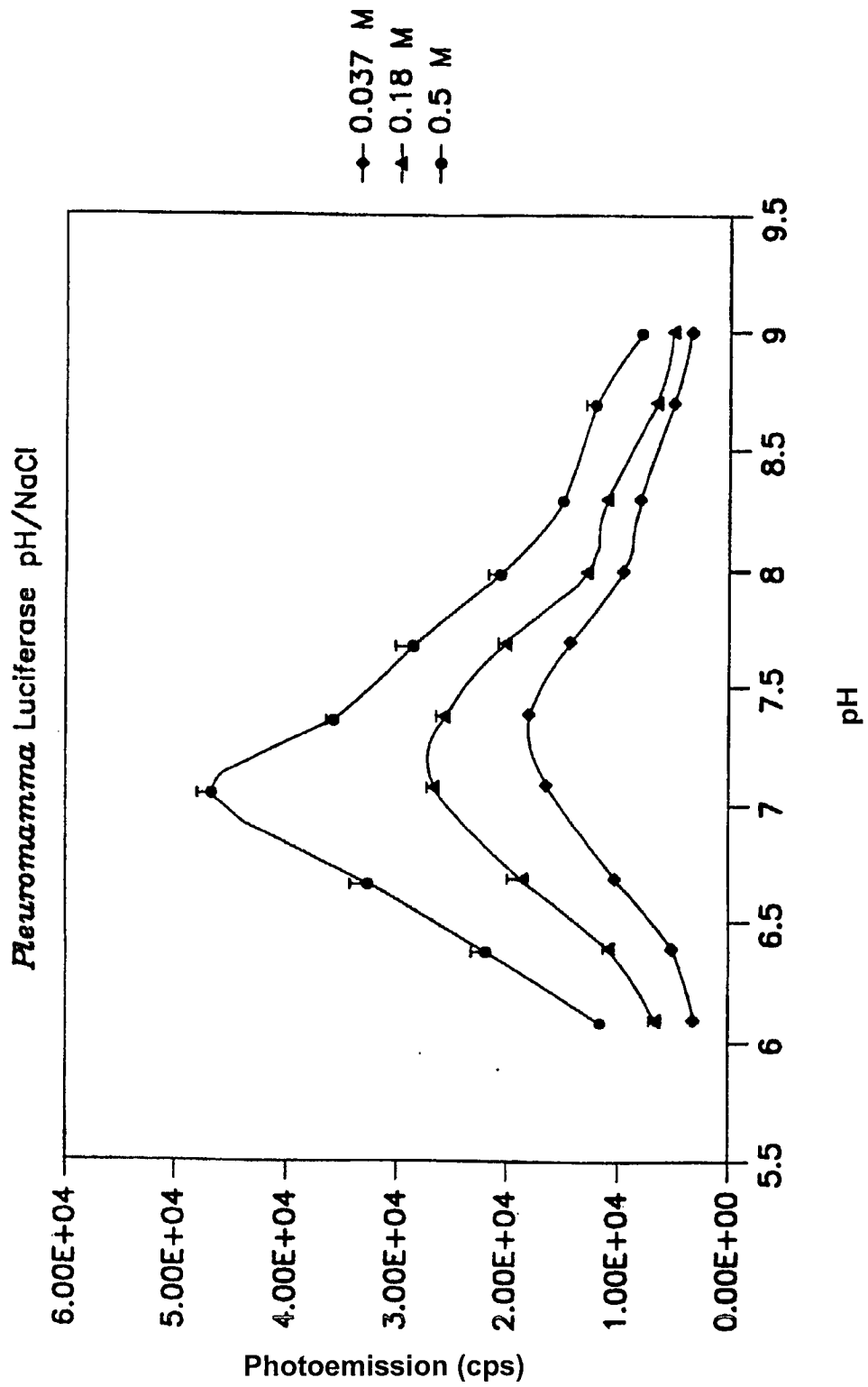
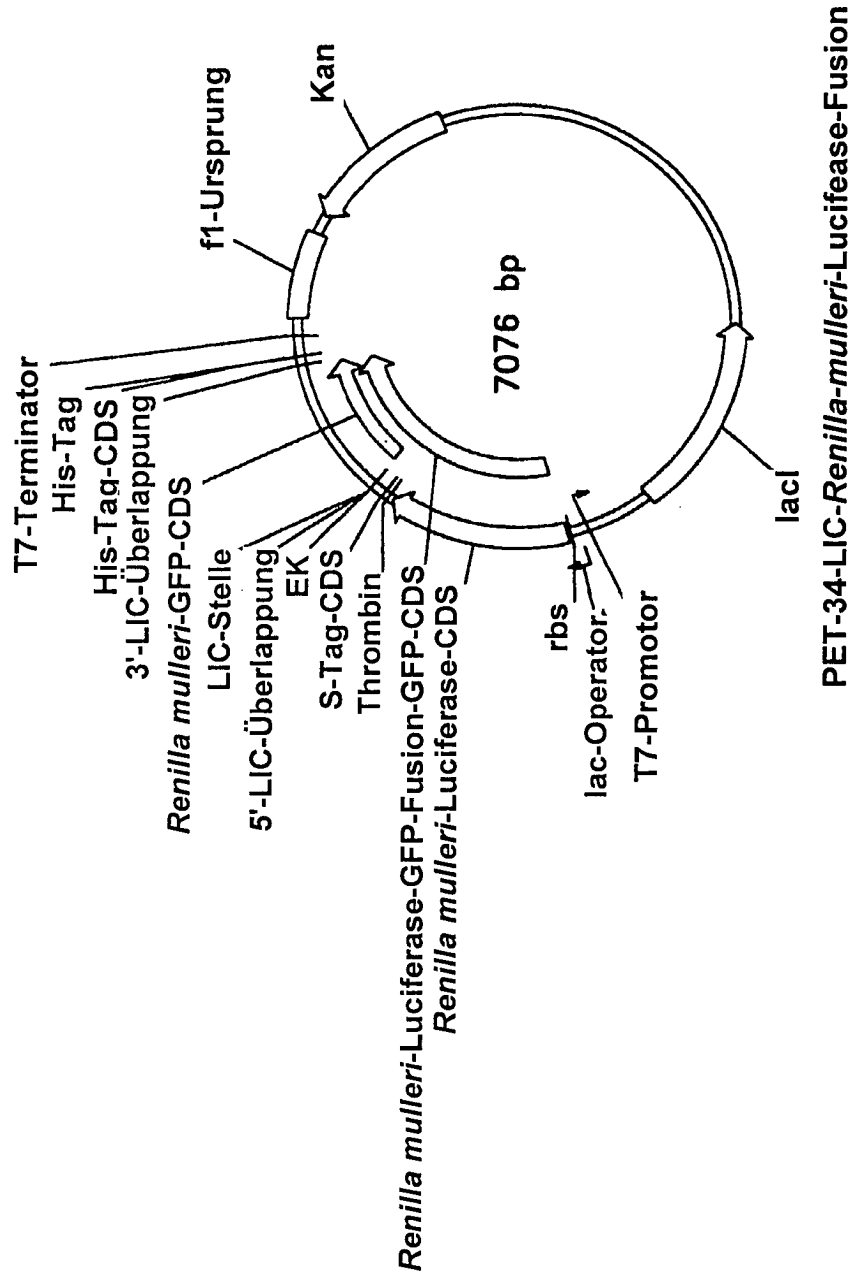


FIG. 6



PET-34-LIC-Renilla-mulleri-Luciferase-Fusion

FIG. 7

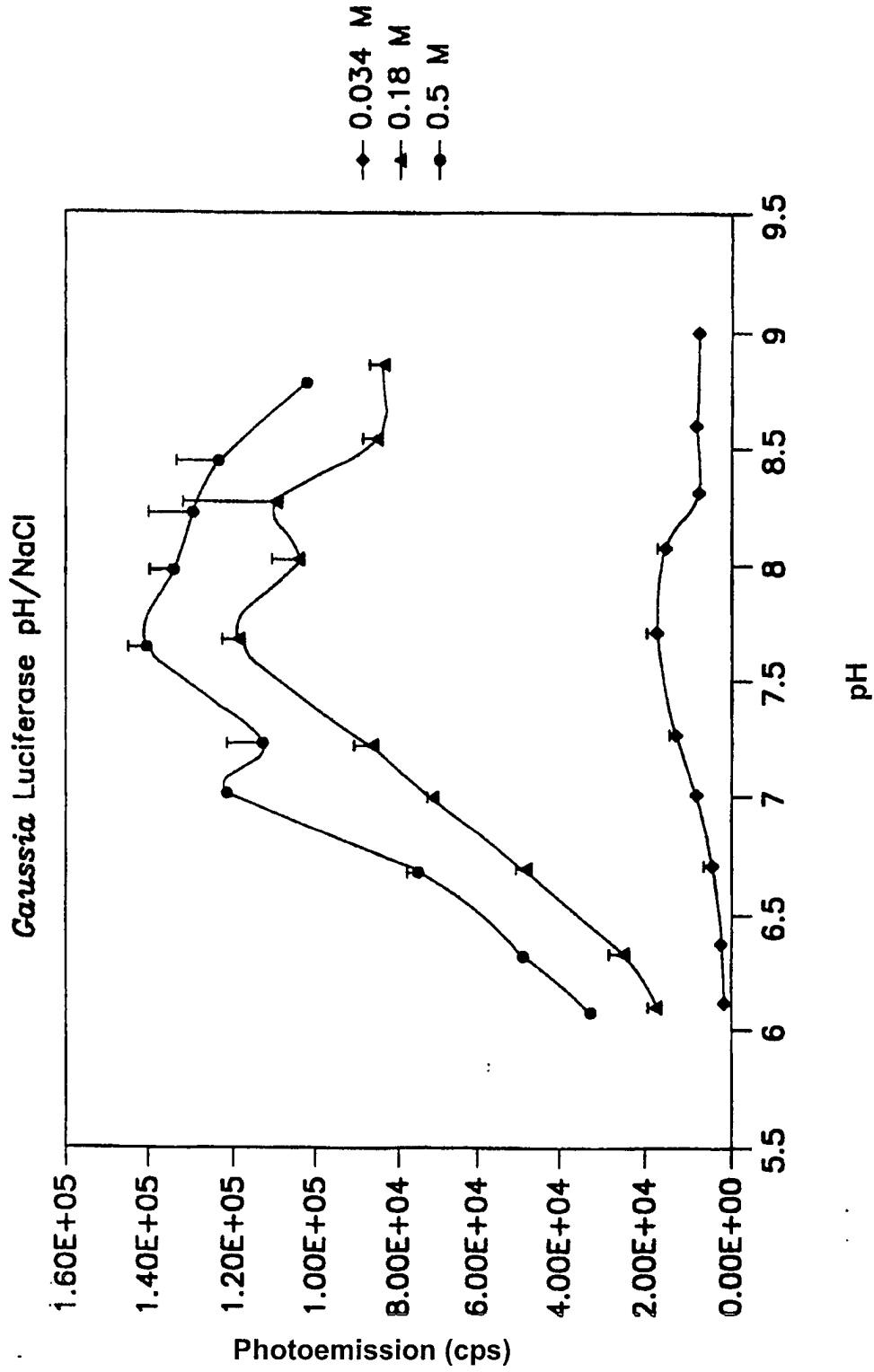


FIG. 8

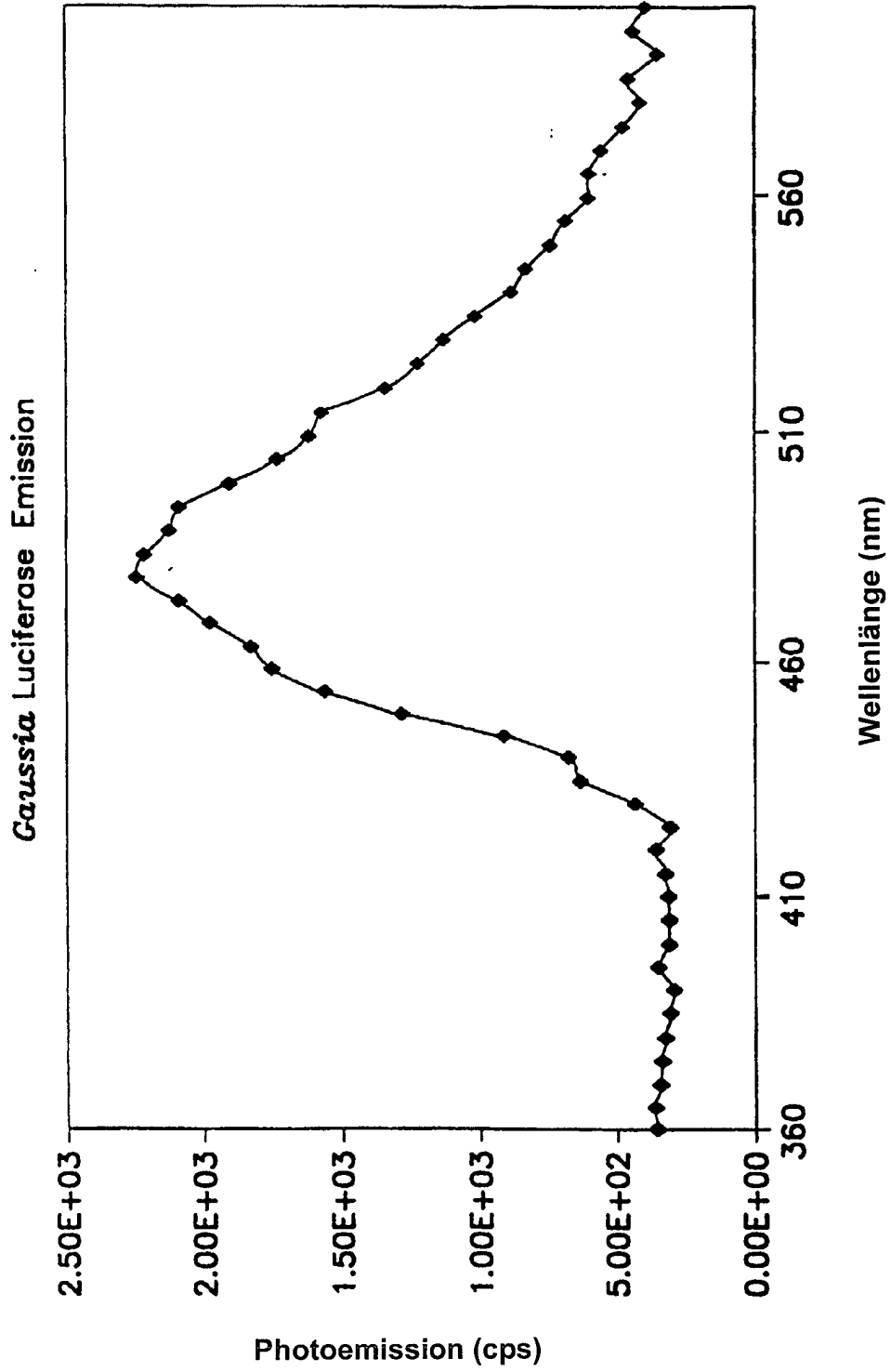


FIG. 9

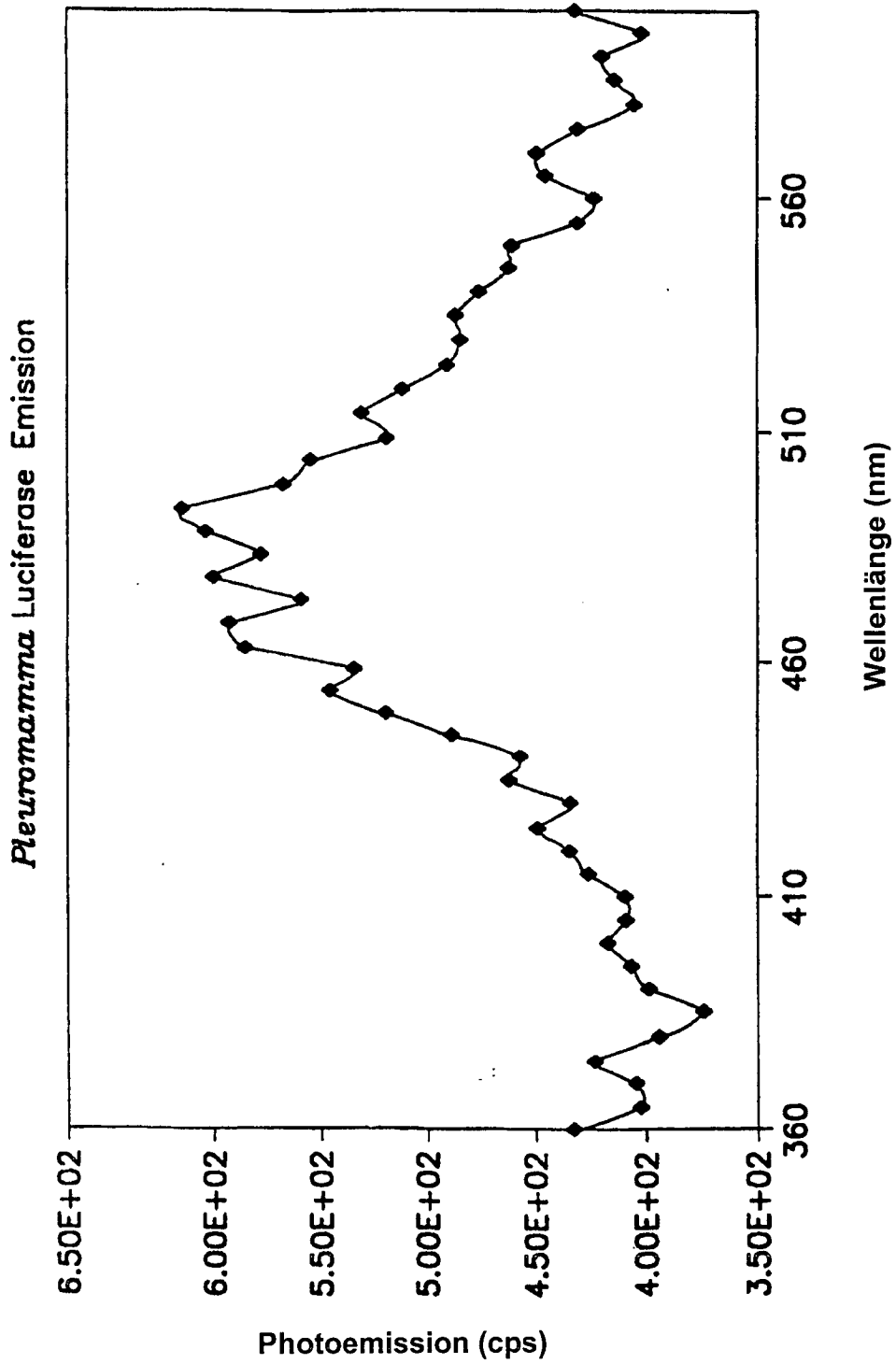


FIG. 10

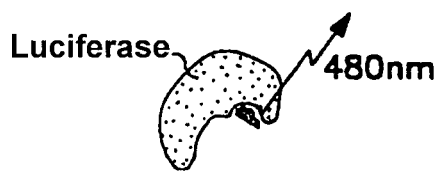


FIG. 1 IA

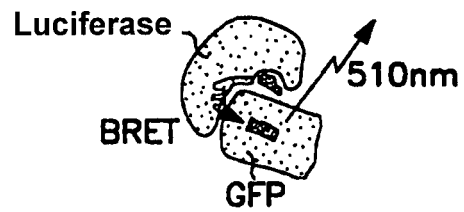


FIG. 1 IC

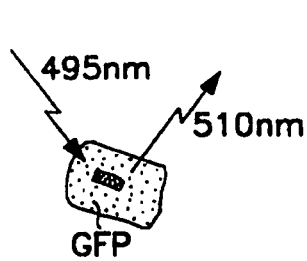


FIG. 1 IB

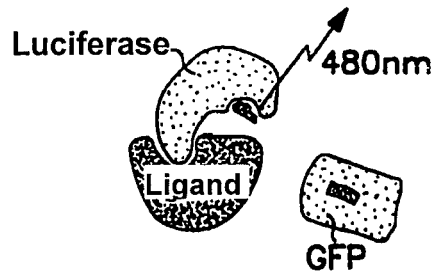


FIG. 1 ID