



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 699 28 687 T2 2006.08.24

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 131 441 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 699 28 687.5

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US99/30925

(96) Europäisches Aktenzeichen: 99 966 651.4

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 2001/020002

(86) PCT-Anmeldetag: 22.12.1999

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 22.03.2001

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 12.09.2001

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 30.11.2005

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 24.08.2006

(51) Int Cl.⁸: C12N 15/53 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

396154 15.09.1999 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:

Promega Corp., Madison, Wis., US

(72) Erfinder:

WOOD, V., Keith, Madison, US; HALL, P., Mary,
Madison, US; GRUBER, Monika, Madison, US

(74) Vertreter:

Strehl, Schübel-Hopf & Partner, 80538 München

(54) Bezeichnung: THERMOSTABILE LUCIFERASE AUS PHOTURIS PENNSYLVANICA UND PYROPHORUS PLAGIOPHTHALAMUS UND HERTELLUNGSMETHODEN

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 eingelebt, 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**Hinweis auf Rechte der Regierung**

[0001] Diese Erfindung wurde mit Forschungsgeldern der Regierung der Vereinigten Staaten von Amerika gemacht (Stipendium 1R43 GM506 23-01 und 2R44 GM506 23-02 von National Institutes of Health and Stipendien ISI-9160613 und III-9301865 von der National Science Foundation). Die Regierung hat möglicherweise bestimmte Rechte an dieser Erfindung.

Gebiet der Erfindung

[0002] Die Erfindung betrifft mutierte Luciferaseenzyme mit stark erhöhter Thermostabilität im Vergleich zu natürlichen Luciferasen oder zu Luciferasen, von denen sie abgeleitet sind, beispielsweise Halbwertszeiten von mindestens 2 Stunden bei 50°C in einer wässrigen Lösung, und sie sind gegenüber einer Hemmung durch einen Substratinhibitor, beispielsweise einem Substratanalogon, resistent. Die Erfindung betrifft auch Polynucleotide, die für die neuen Luciferasen kodieren, und transformierte Wirte zur Expression der Luciferasen. Die Erfindung betrifft außerdem die Verwendung dieser Luciferasen in einem beliebigen Verfahren, in dem bislang bekannte Luciferasen in herkömmlicher Weise verwendet werden. Einige dieser Verwendungen setzen Kits ein.

Hintergrund der Erfindung

[0003] Luciferasen sind durch ihre Fähigkeit zur Erzeugung von Lumineszenz definiert. Käferluciferasen bilden eine bestimmte Klasse mit einem einzigartigen evolutionären Ursprung und chemischen Mechanismen (Wood, 1995).

[0004] Obwohl die als Käferluciferasen bekannten Enzyme weit verbreitet in hochempfindlichen Lumineszenzassays eingesetzt werden, ist ihre Verwendung aufgrund der geringen Hitzestabilität beschränkt. Käferluciferasen mit Aminosäuresequenzen, die von cDNA-Sequenzen kodiert werden, die aus Leuchtkäfern kloniert wurden, sind selbst bei mäßigen Temperaturen nicht stabil. Beispielsweise hat selbst die stabilste Luciferase, LucPpe2, erhalten aus einer Feuerfliege, sehr geringe Stabilität bei einer Temperatur von 37°C. Feuerfliegenluciferasen sind eine Untergruppe der Käferluciferasen. Historisch gesehen bezieht sich der Ausdruck "Feuerfliegenluciferase" auf das Enzym LucPpy aus einer einzigen Spezies, Photinus pyralis (Luc+ ist eine mutierte Version von LucPpy, vergleiche US-Patent Nr. 5,670,356).

[0005] Es sind Versuche beschrieben worden, die natürlichen cDNA-Sequenzen, die für Luciferase kodieren, zu mutieren und Mutanten mit erhöhter Wärmestabilität zu selektieren (White et al., 1994; aus P. pyralis, und Kajiyama und Nekano, 1993; aus Luciola lateralis). Es besteht jedoch immer noch ein Bedarf daran, die Eigenschaften und die Einsetzbarkeit dieser wichtigen Klasse von Enzymen zu verbessern.

Zusammenfassende Darstellung der Erfindung

[0006] Die Erfindung betrifft neue und bemerkenswert hitzestabile Luciferasen, einschließlich Luciferaseenzyme mit Halbwertszeiten von mindestens 2 Stunden bei 50°C oder mindestens 5 Stunden bei 50°C in einer wässrigen Lösung und mit einer Resistenz gegenüber der Hemmung durch einen Luciferaseinhibitor. Wie im Folgenden beschrieben wird, verliert eine erfindungsgemäße thermostabile Luciferase nach 2 Stunden bei 50°C in einer wässrigen Lösung weniger als 5% ihrer Lumineszenzaktivität. Die erfindungsgemäßen mutierten Luciferasen zeigen eine bemerkenswerte und bislang nicht realisierbare Thermostabilität bei 22°C in einer wässrigen Lösung und bei Temperaturen von mindestens 60°C in einer wässrigen Lösung. Beispielsweise sind die erfindungsgemäßen Luciferasen mindestens 10 Stunden bei 50°C, mindestens 2 Stunden, vorzugsweise mindestens 5 Stunden, stärker bevorzugt mindestens 10 Stunden und noch stärker bevorzugt mindestens 24 Stunden bei 60°C und/oder mindestens 100 Tage, vorzugsweise mindestens 200 Tage, stärker bevorzugt mindestens 500 Tage und noch stärker bevorzugt mindestens 800 Tage bei 22°C in einer wässrigen Lösung stabil. Beispielsweise verliert eine thermostabile erfindungsgemäße Luciferase nach 30 Tagen bei 22°C in einer wässrigen Lösung weniger als 5% ihrer Lumineszenzaktivität. Vorzugsweise haben die erfindungsgemäßen thermostabilen Luciferasen eine erhöhte Lumineszenzintensität, erhöhte Signalstabilität, erhöhte Substratverwendung, und/oder verringerten K_m im Vergleich zu einer Referenz, beispielsweise einer nativen Wildtypluciferase. Die Erfindung betrifft außerdem mutierte Luciferasegene (beispielsweise cDNA oder RNA), welche für die neuen Luciferaseenzyme kodieren. Hier wird die Terminologie verwendet, dass beispielsweise Mutanten, die in Experiment 90, Platte Nummer 1, Loch B5, der E.-coli-Stamm 90-1B5 ist, das mutierte Gen Luc90-1B5

ist und die mutierte Luciferase luc90-1B5 ist.

[0007] Ein "thermostabiles" Enzym, beispielsweise eine Luciferase, oder ein Enzym mit "Thermostabilität" wird hier als ein Enzym definiert, das unter bestimmten Bedingungen, beispielsweise bei einer bestimmten Temperatur, in einer wässrigen Lösung und/oder während eines bestimmten Zeitraums im Vergleich zu einem Referenzenzym seine Aktivität in erhöhtem Maße beibehält. Beispielsweise kann für eine thermostabile Luciferase eine Referenzluciferase eine native Wildtypluciferase oder eine rekombinante Wildtypluciferase sein. Vorzugsweise ist bei der Käferluciferase die Aktivität eine Lumineszenz unter Sättigung mit Luciferin und ATP. Ein Maß für die Thermostabilität eines Enzyms ist die Halbwertszeit des Enzyms in einer wässrigen Lösung (der Zeitraum, in dem 50% der Aktivität verloren geht) bei einer vorgegebenen Temperatur.

[0008] Die vorliegende Erfindung umfasst außerdem Expressionsvektoren und andere genetische Konstrukte, welche die mutierten Luciferasen enthalten, sowie Wirs, bakterielle und andere, die transformiert sind, um die mutierten Luciferasen zu exprimieren. Die Erfindung betrifft außerdem Zusammensetzungen und Kits, welche die neuen Luciferasen enthalten, und die Verwendung dieser Luciferasen in beliebigen Verfahren, bei denen Luciferasen eingesetzt werden.

[0009] Es wurden verschiedene Arten von zufälliger Mutagenese auf ein Luciferasegen (Nucleotidsequenz) angewandt, insbesondere die Gensynthese unter Verwendung einer fehlerbehafteten Polymerase, um Bibliotheken mit modifizierten Luciferasegenen zu erzeugen. Diese Bibliotheken wurden in Kolonien von *E. coli* exprimiert und visuell auf effiziente Lumineszenz gescreent, um eine Unterbibliothek von modifizierten Luciferasen zu selektieren. Lysate dieser *E.-coli*-Stämme wurden dann erzeugt und auf Luciferaseaktivität und Thermostabilität quantitativ gemessen. Unter diesen wurde eine kleinere Unterbibliothek von modifizierten Luciferasen ausgewählt, und die selektierten Mutationen wurden kombiniert, um zusammengesetzte modifizierte Luciferasen zu erzeugen. Aus den zusammengesetzten modifizierten Luciferasen wurden neue Bibliotheken durch willkürliche Mutagenese hergestellt, und dieser Vorgang wurde wiederholt. Die Luciferasen mit der besten Gesamtleistung wurden nach mehreren Zyklen dieses Verfahrens selektiert.

[0010] Verfahren zur Herstellung verbesserter Luciferasen umfassen die direkte Evolution unter Verwendung einer Polynukleotidsequenz, die eine erste Käferluciferase als Ausgangs(Eltern)-Sequenz kodiert, wobei eine Polynukleotidsequenz hergestellt wird, die eine zweite Luciferase mit erhöhter Thermostabilität im Vergleich zu der ersten Luciferase kodiert, während die anderen Eigenschaften der Enzyme beibehalten werden. Eine *lucPpe2* genannte cDNA kodiert eine Feuerfliegenluciferase, die aus *Photuris pennsylvanica* abgeleitet ist, welche erhöhte Thermostabilität im Vergleich zu der verbreitet eingesetzten Luciferase *LucPpy* aus *Photinus pyralis* zeigt. Die für *lucPpe2* kodierende cDNA wurde isoliert, sequenziert und kloniert (vergleiche Leach et al., 1997). Eine Mutante dieses Gens kodiert eine erste Luciferase *lucPpe2[T249M]*.

[0011] Eine mutierte Luciferaseaminoäuresequenz ist die von *lucPpe2*, die in [Fig. 45](#) gezeigt ist, mit der Ausnahme, dass der Rest 249 ein M (als T249M bezeichnet) anstelle des von Leach et al. berichteten T vorhanden ist. Der unterstrichene Rest (249) zeigt eine Mutation von T nach M. Dieses Enzym erzeugte etwa 5-mal mehr Licht in vivo, wenn es in *E. coli* exprimiert wurde.

[0012] Verdünnte Extrakte von rekombinanten *E. coli*, welche die erfindungsgemäßen mutierten Luciferasen exprimierten, wurden gleichzeitig hinsichtlich verschiedener Eigenschaften, einschließlich Lichtintensität, Signalstabilität, Substratverwendung (K_m) und Thermostabilität gescreent. Ein vollautomatisches Robotersystem wurde eingesetzt, um eine große Zahl an Mutanten in jeder Generation der Evolution zu screenen. Nach mehreren Mutagenesezyklen und Screeningzyklen unter Erzeugung von Mutantenbibliotheken von Luciferasen wurde eine im Vergleich zu *lucPpe2[T249M]* in dem Klon Luc90-1B5 erhöhte Thermostabilität von etwa 35°C erzielt, wobei dieser Klon auch die enzymatische Aktivität (mit einem vernachlässigbaren Verlust der Aktivität von 5%) im Wesentlichen beibehält, wenn er in einer wässrigen Lösung 2 Stunden bei 50°C, 5 Stunden bei 65°C oder 6 Wochen bei 22°C gehalten wurde.

[0013] Erfindungsgemäße mutierte Luciferasen zeigen erhöhte Thermostabilität während mindestens 2 Stunden bei 50°C, vorzugsweise mindestens 5 Stunden bei 50°C, und in dem Bereich von mindestens 2 Stunden, vorzugsweise mindestens 24 Stunden und stärker bevorzugt mindestens 50 Stunden bei Temperaturen, einschließlich 50°C, 60°C und/oder bei Temperaturen von bis zu 65°C. Insbesondere umfasst die vorliegende Erfindung thermostabile mutierte Luciferasen, die, wenn sie in einer geeigneten wässrigen Lösung aufgelöst werden, eine Thermostabilität von mehr als etwa 2 Stunden bei 50°C, stärker bevorzugt von mehr als etwa 10 Stunden bei 50°C und noch stärker bevorzugt von mehr als 5 Stunden bei 50°C zeigen. Die vorliegende Erfindung umfasst auch mutierte Luciferasen, die, wenn sie in einer geeigneten wässrigen Lösung aufgelöst wer-

den, eine Thermostabilität von mehr als etwa 2 Stunden, stärker bevorzugt von mehr als 5 Stunden, noch stärker bevorzugt von mehr als 10 Stunden und noch stärker bevorzugt von mehr als 24 Stunden bei 60°C zeigen. Die vorliegende Erfindung umfasst auch mutierte Luciferasen, die, wenn sie in einer geeigneten wässrigen Lösung aufgelöst werden, eine Thermostabilität von mehr als etwa 3 Monaten bei etwa 22°C und stärker bevorzugt eine Thermostabilität von mindestens 6 Monaten bei 22°C aufweisen. Eine erfindungsgemäße Ausführungsform ist eine Luciferasemutante mit einer Thermostabilität bei 65°C, wobei der Verlust der Aktivität von etwa 5–6% nach 6 Stunden gefunden wurde (was einer Halbwertszeit von 2 Tagen entspricht). Die Halbwertszeiten der Enzyme aus den stabilsten erfindungsgemäßen Klonen war, extrapoliert aus Daten, die geringe relative Änderungen zeigen, höher als 2 Tage bei 65°C (was einem Verlust von 6% nach 6 Stunden entspricht) und etwa 2 Jahre bei 22°C (was einem Verlust von 5% nach 9 Wochen entspricht).

[0014] Luciferaseenzyme mit hier offenbarten Aminosäuresequenzen (beispielsweise mutierte Luciferasen, die als Luc49-7C6, Luc78-OB10, Luc90-1B5, Luc133-1B2, und Luc146-1H2 bezeichnet werden) haben eine als Halbwertszeiten ausgedrückte Thermostabilität von mindestens 2 Stunden bei 50°C. Es werden auch mutierte Polynukleotidsequenzen, welche Luciferaseenzyme kodieren, die eine beliebige einzelne Mutation oder beliebige Kombinationen von Mutationen eines Typs enthalten, der eine Aminosäure der Referenzkäferluciferasen in eine Konsensus-Aminosäure umwandelt, offenbart. Konservierte Aminosäuren sind als solche definiert, die in einer bestimmten Position in allen Sequenzen in einem bestimmten Satz von verwandten Enzymen auftreten. Konsensus-Aminosäuren sind als solche definiert, die an einer bestimmten Position in mehr als 50% der Sequenzen in einem bestimmten Satz von Enzymen auftreten. Ein Beispiel ist der Satz von Käferluciferasesequenzen, die in **Fig. 19** gezeigt sind, einschließlich LucPpe2.

[0015] Die Nukleotidsequenzen, die für Käferluciferasen kodieren, sind in **Fig. 19** übereinander angeordnet. 11 Sequenzen, die in der Natur in verschiedenen Gattungen und Arten innerhalb von Gattungen gefunden werden, einschließlich LucPpe2, wurden übereinander angeordnet. Es sind mindestens 3 Mutationen in jeder mutierten Luciferase vorhanden, welche erhöhte Thermostabilität zeigt. Im Allgemeinen befinden sich die Mutationen nicht bei einem konservierten Aminosäurerest. Die Mutationen in den mutierten Luciferasen sind in den **Fig. 22–Fig. 47** durch Unterstreichung angegeben.

[0016] Es werden auch Verfahren zur Herstellung von Enzymen mit einer oder mehreren gewünschten Eigenschaften offenbart, beispielsweise Resistenz gegenüber der Inhibition durch ein Substratanalogon des Enzyms oder erhöhte enzymologische Eigenschaften. Das Verfahren umfasst das Selektieren mindestens einer isolierten Polynukleotidsequenz, die für ein Enzym mit der gewünschten Eigenschaft, beispielsweise einer enzymologischen Eigenschaft, kodiert, aus einer ersten Population von mutierten Polynukleotidsequenzen. Die selektierte isolierte Polynukleotidsequenz wird dann mutiert, wobei eine zweite Population von mutierten Polynukleotidsequenzen erhalten wird. Beispielsweise wird ein Gemisch von selektierten isolierten Polynukleotidsequenzen mutiert, wobei eine zweite Population von mutierten Polynukleotidsequenzen erhalten wird. Dieses Verfahren kann wiederholt werden, bis eine weitere Polynukleotidsequenz erhalten wird, beispielsweise selektiert und/oder isoliert wird, wobei diese Polynukleotidsequenz für ein Enzym kodiert, das mindestens eine der gewünschten Eigenschaften hat. Der Ausdruck "isoliert" und/oder "gereinigt" bezieht sich hier auf die *in vitro* Isolierung einer RNA, DNA oder eines Polypeptids aus seiner natürlichen zellulären Umgebung und aus seiner Assoziation mit anderen Zellkomponenten, wie Nukleinsäuren oder Polypeptiden, sodass es beispielsweise sequenziert, repliziert und/oder exprimiert werden kann.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0017] **Fig. 1** ist eine graphische Darstellung der Thermostabilität bei 37°C von LucPpe2[T249M]; Luc39-5B10; und Luc49-7C6, normalisiert auf t = 0 [die X-Achse ist die Zeit in Minuten; die Y-Achse ist der %-Satz an verbleibender Aktivität; und "t" ist die Zeit].

[0018] **Fig. 2** ist eine graphische Darstellung der verbleibenden Aktivität von Luc49-7C6 und Luc78-OB10 bei 50°C, normalisiert auf t = 0 [die X-Achse ist die Zeit in Stunden; die Y-Achse ist der %-Satz an verbleibender Aktivität; und "t" ist die Zeit].

[0019] **Fig. 3** ist eine graphische Darstellung der durch Luc49-7C6 und Luc78-OB10 bei 60°C produzierten Lumineszenz, normalisiert auf t = 0 [die X-Achse ist die Zeit in Stunden; die Y-Achse ist der %-Satz an verbleibender Aktivität; und "t" ist die Zeit].

[0020] **Fig. 4** ist eine graphische Darstellung der Thermostabilität der Luciferasen LucPpe2[T249M]; Luc49-7C6; und Luc78-OB10 bei 22°C [die X-Achse ist die Zeit in Tagen; die Y-Achse gibt die normalisierten

Lichteinheiten wieder].

[0021] [Fig. 5](#) ist eine graphische Darstellung der Logarithmus der von (Y) Luc78-0B10 produzierten beobachteten Lumineszenz im Vergleich zum Logarithmus der Lumineszenz, der durch die Regressionsgleichung $Y = 0,0043X + 10,91$ vorhergesagt wird; die Halbwertszeit des Enzyms wird mit 144 Stunden (6 Tagen) berechnet [die X-Achse ist die Zeit in Stunden; die Y-Achse ist der Logarithmus der Lumineszenz].

[0022] [Fig. 6](#) ist eine graphische Darstellung des Logarithmus der von Luc78-0B10 bei 60°C produzierten beobachteten Lumineszenz im Vergleich zum Logarithmus der Lumineszenz, der durch die Regressionsgleichung $Y = 0,154X + 10,86$ berechnet wird; die Halbwertszeit des Enzyms wird mit 38 Stunden (1,58 Tagen) berechnet [die X-Achse ist die Zeit in Stunden; die Y-Achse ist der Logarithmus der Lumineszenz].

[0023] [Fig. 7](#) ist eine graphische Darstellung des Logarithmus der von Luc49-7C6 bei 50°C produzierten beobachteten Lumineszenz im Vergleich zum Logarithmus der Lumineszenz, der durch die Regressionsgleichung $Y = -0,0059X + 8,757$ vorhergesagt wird; die Halbwertszeit des Enzyms wird mit 100,5 Stunden (4,2 Tagen) berechnet [die X-Achse ist die Zeit in Stunden; die Y-Achse ist der Logarithmus der Lumineszenz].

[0024] [Fig. 8](#) ist eine graphische Darstellung des Logarithmus der von Luc49-7C6 bei 60°C produzierten beobachteten Lumineszenz im Vergleich zu dem Logarithmus der Lumineszenz, der durch die Regressionsgleichung $Y = -0,169X + 8,647$ berechnet wird; die berechnete Halbwertszeit der Enzyme ist 2,9 Stunden [die X-Achse ist die Zeit in Stunden; die Y-Achse ist der Logarithmus der Lumineszenz].

[0025] [Fig. 9](#) ist eine graphische Darstellung des Logarithmus der von Luc78-0B10 bei 22°C produzierten beobachteten Lumineszenz im Vergleich zum vorhergesagten Logarithmus der Lumineszenz, wobei die Halbwertszeit des Enzyms 109 Tage ist [die X-Achse ist die Zeit in Tagen; die Y-Achse ist der Logarithmus der Lumineszenz].

[0026] [Fig. 10](#) ist eine graphische Darstellung des Logarithmus der von Luc49-7C6 bei 22°C produzierten beobachteten Luciferaselumineszenz im Vergleich zum vorhergesagten Logarithmus der Lumineszenz; die Halbwertszeit des Enzyms ist 64 Tage ist [die X-Achse ist die Zeit in Tagen; die Y-Achse ist der Logarithmus der Lumineszenz].

[0027] [Fig. 11](#) ist eine graphische Darstellung des Logarithmus der von Luc49-7C6 bei 37°C produzierten beobachteten Lumineszenz im Vergleich zum vorhergesagten Logarithmus der Lumineszenz [die X-Achse ist die Zeit in Minuten; die Y-Achse ist der Logarithmus der Lumineszenz].

[0028] [Fig. 12](#) ist eine graphische Darstellung des Logarithmus der von LucPpe2[T249M] bei 22°C produzierten beobachteten Lumineszenz im Vergleich zum vorhergesagten Logarithmus der Lumineszenz [die X-Achse ist die Zeit in Tagen; die Y-Achse ist der Logarithmus der Lumineszenz].

[0029] [Fig. 13](#) ist eine graphische Darstellung des Logarithmus der von LucPpe2[T249M] bei 37°C produzierten beobachteten Lumineszenz im Vergleich zum vorhergesagten Logarithmus der Lumineszenz [die X-Achse ist die Zeit in Minuten; die Y-Achse ist der Logarithmus der Lumineszenz].

[0030] [Fig. 14](#) ist ein Fließdiagramm, welches die Stufen für einen Assay der in vivo und der in vitro Luciferaselumineszenz (Li); der Enzymstabilität (τ); der Assaykinetiken (S); und der Substratbindung (K_m) zeigt.

[0031] [Fig. 15](#) ist eine schematische Darstellung eines Roboters.

[0032] [Fig. 16A](#) ist eine graphische Darstellung der Luciferaselumineszenz der Mutanten Luc90-1B5 bei 65°C, pH 6,5 (die X-Achse ist die Zeit in Stunden; die Y-Achse ist der %-Satz an Lumineszenz).

[0033] [Fig. 16B](#) ist eine graphische Darstellung der Luciferaselumineszenz der Mutanten Luc90-1B5 bei 22°C, pH 6,5 (die X-Achse ist die Zeit in Tagen; die Y-Achse ist der %-Satz der Lumineszenz).

[0034] [Fig. 17](#) ist ein Diagramm, das die evolutionäre Beziehung zwischen den Käferluciferasen auf der Grundlage der Aminosäuresequenzen angibt.

[0035] [Fig. 18A](#) ist eine Darstellung der Sekundärstrukturen der Käferluciferaseenzyme (Helices sind durch Zylinder angegeben, Faltblätter sind durch Pfeilbündel angegeben, Schleifen verbinden Helices mit Faltblät-

tern).

[0036] [Fig. 18B](#) zeigt die Aminosäuresequenzen (Tertiärstrukturen) der LucPpe2-Luciferase, wobei die kleinen Spiralen den Zylindern der [Fig. 18A](#) entsprechen.

[0037] [Fig. 18C](#) zeigt, dass die allgemeine Käferluciferasearchitektur auf diejenige von Luc90-1B5 passt (übereinander passt).

[0038] [Fig. 19A](#) zeigt die übereinander gelegten Aminosäuresequenzen (SEQ ID NO: 27–37) der Luciferasen aus verschiedenen Käferarten (Lcr, Lla, Lmi, Pmi, Ppy, Lno, Ppe1, Phg, GR, YG bzw. Ppe2) und der mutierten Luciferasen.

[0039] (Luc49-7C6; Luc78-0B10; Luc90-1B5; Luc133-1B2; und Luc146-1H2, die SEQ ID NO: 14, 19, 24, 44 beziehungsweise 45); die Sequenzen sind übereinander gelegt, die Räume, wo Sequenzen nicht übereinander gelegt werden können, sind durch Punkte angegeben (beispielsweise ...); nur die Aminosäuren in den mutierten Luciferasen, die sich von denjenigen einiger Käferarten unterscheiden, sind gezeigt, jedoch nicht die vollen Sequenzen. "Cons" ist eine Sequenz, die konservierte Aminosäuren durch Einzelbuchstaben angibt, wobei nicht-konservierte Aminosäuren durch "—" angegeben sind.

[0040] [Fig. 19B](#) zeigt die übereinander gelegten Aminosäuresequenzen (SEQ ID NO: 27–37) der Luciferasen aus verschiedenen Käferarten (Lcr, Lla, Lmi, Pmi, Ppy, Lno, Ppe1, Phg, GR, YG, Ppe2) und der erfindungsgemäßen Luciferasen (Luc30-4B02 und Luc81-6G01, SEQ ID NO: 47 beziehungsweise 26); die Sequenzen sind übereinander gelegt, wobei die Räume, wo Sequenzen nicht übereinander gelegt werden konnten, durch Punkte angegeben sind (beispielsweise ...); die Aminosäuren, die sich in den erfindungsgemäßen Luciferasen von denjenigen bestimmter Käferarten unterscheiden, sind fett gedruckt angegeben.

[0041] [Fig. 19C](#) zeigt die übereinander gelegten Aminosäuresequenzen (SEQ ID NO: 27–34 und 36–37) der Luciferasen aus verschiedenen Käferarten (Lcr, Lla, Lmi, Pmi, Ppy, Lno, Ppe1, Phg, YG, Ppe2, Ppl); die Sequenzen sind übereinander gelegt, die Räume, wo die Sequenzen nicht übereinander gelegt werden können, sind durch Punkte angegeben (beispielsweise ...); in der Zeile unter YG gibt X die Positionen in YG an, wo die Mutationen eine Konsensus-Aminosäure ergeben können; O gibt die Positionen in YG an, wo die Mutationen keine Konsensus-Aminosäure ergeben können.

[0042] [Fig. 20](#) zeigt die Karte des 7216 bp Ppe2-Vektors in einem pRAM-Rückgrat.

[0043] [Fig. 21](#) ist ein Balkendiagramm, welches die in den rekombinanten Kolonien von *E. coli* exprimierten Lumineszenzen vergleicht; die Kolonien unterscheiden sich in der Identität des für die Luciferase kodierenden Vektors (Luc+; Luc90-1B5; Luc78-1B10; Luc49-7C6; LucPpe2[T249M] und LucPpe2); in der rekombinanten Kolonie, die in der Y-Achse gezeigt ist [die X-Achse gibt die normalisierten Lichteinheiten an].

[0044] [Fig. 22](#) zeigt eine Nucleotid(DNA)-Sequenz (SEQ ID NO: 1), welche für das mutierte Luciferaseenzym Luc49-7C6 kodiert; die Mutationen sind durch Unterstreichung angegeben.

[0045] [Fig. 23](#) zeigt eine Nucleotid(DNA)-Sequenz (SEQ ID NO: 2), welche für das mutierte Luciferaseenzym Luc49-6C10 kodiert; die Mutationen sind durch Unterstreichung angegeben.

[0046] [Fig. 24](#) zeigt eine Nucleotid(DNA)-Sequenz (SEQ ID NO: 3), welche für das mutierte Luciferaseenzym Luc49-0G12 kodiert; die Mutationen sind durch Unterstreichung angegeben.

[0047] [Fig. 25](#) zeigt eine Nucleotid(DNA)-Sequenz (SEQ ID NO: 4), welche für das mutierte Luciferaseenzym Luc49-7A5 kodiert; die Mutationen sind durch Unterstreichung angegeben.

[0048] [Fig. 26](#) zeigt eine Nucleotid(DNA)-Sequenz (SEQ ID NO: 5), welche für das mutierte Luciferaseenzym Luc49-4G11 kodiert; die Mutationen sind durch Unterstreichung angegeben.

[0049] [Fig. 27](#) zeigt eine Nucleotid(DNA)-Sequenz (SEQ ID NO: 14), welche für das mutierte Luciferaseenzym Luc49-7C6 kodiert; die Mutationen sind durch Unterstreichung angegeben.

[0050] [Fig. 28](#) zeigt eine Nucleotid(DNA)-Sequenz (SEQ ID NO: 15), welche für das mutierte Luciferaseenzym Luc49-6C10 kodiert; die Mutationen sind durch Unterstreichung angegeben.

[0051] [Fig. 29](#) zeigt eine Nucleotid(DNA)-Sequenz (SEQ ID NO: 16), welche für das mutierte Luciferaseen-zym Luc49-0G12 kodiert; die Mutationen sind durch Unterstreichung angegeben.

[0052] [Fig. 30](#) zeigt eine Nucleotid(DNA)-Sequenz (SEQ ID NO: 17), welche für das mutierte Luciferaseen-zym Luc49-7A5 kodiert; die Mutationen sind durch Unterstreichung angegeben.

[0053] [Fig. 31](#) zeigt eine Nucleotid(DNA)-Sequenz (SEQ ID NO: 18), welche für das mutierte Luciferaseen-zym Luc49-4G11 kodiert; die Mutationen sind durch Unterstreichung angegeben.

[0054] [Fig. 32](#) zeigt eine Nucleotid(DNA)-Sequenz (SEQ ID NO: 6), welche für das mutierte Luciferaseenzym Luc78-0B10 kodiert; die Mutationen sind durch Unterstreichung angegeben.

[0055] [Fig. 33](#) zeigt eine Nucleotid(DNA)-Sequenz (SEQ ID NO: 7), welche das mutierte Luciferaseenzym Luc78-0G8 kodiert; die Mutationen sind durch Unterstreichung angegeben. X gibt nicht-identifizierte Nucleoti-de an bestimmten Positionen an.

[0056] [Fig. 34](#) zeigt eine Nucleotid(DNA)-Sequenz (SEQ ID NO: 8), welche das mutierte Luciferaseenzym Luc78-1E1 kodiert; die Mutationen sind durch Unterstreichung angegeben. X gibt nicht-identifizierte Nucleotide an bestimmten Positionen an.

[0057] [Fig. 35](#) zeigt eine Nucleotid(DNA)-Sequenz (SEQ ID NO: 9), welche das mutierte Luciferaseenzym Luc78-2B4 kodiert; die Mutationen sind durch Unterstreichung angegeben. X gibt nicht-identifizierte Nucleotide an bestimmten Positionen an.

[0058] [Fig. 36](#) zeigt eine Aminosäuresequenz (SEQ ID NO: 19) der mutierten Luciferase Luc78-0B10; die un-terstrichenen Aminosäuren sind Mutationen.

[0059] [Fig. 37](#) zeigt eine Aminosäuresequenz (SEQ ID NO: 20) des mutierten Luciferaseenzyms Luc78-0G8; die unterstrichenen Aminosäuren sind Mutationen; X gibt eine unbekannte Aminosäure an einer Position an.

[0060] [Fig. 38](#) zeigt eine Aminosäuresequenz (SEQ ID NO: 21) des mutierten Luciferaseenzyms Luc78-1E1; die unterstrichenen Aminosäuren sind Mutationen; X gibt eine unbekannte Aminosäure an einer Position an.

[0061] [Fig. 39](#) zeigt eine Aminosäuresequenz (SEQ ID NO: 22) des mutierten Luciferaseenzyms Luc78-2B4; die unterstrichenen Aminosäuren sind Mutationen; X gibt eine unbekannte Aminosäure an einer Position an.

[0062] [Fig. 40](#) zeigt eine Nucleotid(DNA)-Sequenz (SEQ ID NO: 10), die das mutierte Luciferaseenzym Luc85-4F12 kodiert; die unterstrichenen Nucleotide sind Mutationen; X gibt eine unbekannte Aminosäure an der Position an.

[0063] [Fig. 41](#) zeigt eine Aminosäuresequenz (SEQ ID NO: 23) für das mutierte Luciferaseenzym Luc85-4F12; unterstrichene Aminosäuren sind Mutationen; X gibt eine unbekannte Aminosäure an der Positi-on an.

[0064] [Fig. 42](#) ist eine Nucleotid(DNA)-Sequenz (SEQ ID NO: 11), die für ein mutiertes Luciferaseenzym Luc90-1B5 kodiert; unterstrichene Nucleotide sind Mutationen.

[0065] [Fig. 43](#) ist eine Aminosäuresequenz (SEQ ID NO: 24) der mutierten Luciferase Luc90-1B5; unterstri-chene Aminosäuren sind Mutationen.

[0066] [Fig. 44](#) ist eine Nucleotid(DNA)-Sequenz (SEQ ID NO: 12), die für das Luciferaseenzym LucPpe2[T249M] kodiert.

[0067] [Fig. 45](#) ist eine Aminosäuresequenz (SEQ ID NO: 25) für LucPpe2[T249M]; die unterstrichene Amino-säure ist eine Mutation von Thr nach Met an dem Rest 249.

[0068] [Fig. 46](#) ist eine Aminosäuresequenz (SEQ ID NO: 26) für das Luciferaseenzym LucPpl81-6G1; die un-terstrichenen Aminosäuren sind Mutationen der Ausgangssequenz; X gibt eine Ungenauigkeit an.

[0069] [Fig. 47](#) ist eine Nucleotid(DNA)-Sequenz (SEQ ID NO: 13), die für das Luciferaseenzym Luc81-6G1

kodiert; unterstrichene Nucleotide sind Mutationen.

[0070] [Fig. 48](#) ist eine graphische Darstellung der Lumineszenz der mutierten Luciferasen Luc49-7C6 und Luc78-0B10 bei 60°C, normalisiert auf t = 0 [die X-Achse ist die Zeit in Stunden, die Y-Achse ist der Logarithmus der normalisierten Lumineszenz].

[0071] [Fig. 49](#) ist eine graphische Darstellung der Thermostabilität der Luciferasen LucPpe2[T249M], Luc49-7C6 und Luc78-0B10 bei 4°C, normalisiert auf die Anfangswerte [die X-Achse ist die Zeit in Tagen; Y gibt den Logarithmus der normalisierten Lichteinheiten an].

[0072] [Fig. 50](#) ist eine graphische Darstellung der Lumineszenz der mutierten Luciferasen Luc49-7C6 und Luc78-0B10 bei 50°C, normalisiert auf t = 0 [die X-Achse ist die Zeit in Stunden; die Y-Achse gibt den Logarithmus der Lumineszenz an].

[0073] [Fig. 51](#) ist eine graphische Darstellung der Lumineszenz der mutierten Luciferasen Luc49-7C6 und Luc78-0B10 bei 50°C, normalisiert auf t = 0.

[0074] [Fig. 52](#) ist eine graphische Darstellung der Lumineszenz der mutierten Luciferasen Luc49-7C6 und Luc78-0B10 bei 60°C, normalisiert auf t = 0 [die X-Achse ist die Zeit in Stunden; die Y-Achse ist die Lumineszenz].

[0075] [Fig. 53](#) ist eine graphische Darstellung der Thermostabilität der Luciferasen LucPpe2[T249M], Luc49-7C6 und Luc78-0B10 bei 22°C [die X-Achse ist die Zeit in Tagen; die Y-Achse gibt den Logarithmus der Lumineszenz an].

[0076] [Fig. 54A](#) ist eine graphische Darstellung der Lumineszenz von Luc90-1B5; Luc133-1B2; und Luc146-1H2 bei pH 4,5 und 48°C, normalisiert auf t = 0.

[0077] [Fig. 54B](#) ist eine graphische Darstellung der Halbwertszeit von Luc90-1B5; Luc133-1B2; und Luc146-1H2 bei pH 4,5 und 48°C. Die Halbwertszeit von Luc90-1B5 unter diesen Bedingungen ist etwa 3 Minuten, von Luc133-1B2 etwa 20 Minuten und von Luc146-1H2 etwa 62 Minuten.

[0078] [Fig. 55](#) ist eine Nucleotid(DNA)-Sequenz (SEQ ID NO: 42), die für das Luciferaseenzym Luc133-1B2 kodiert; die Mutationen sind durch Unterstreichung angegeben.

[0079] [Fig. 56](#) ist eine Nucleotid(DNA)-Sequenz (SEQ ID NO: 43), die für ein Luciferaseenzym Luc146-1H2 kodiert; die Mutationen sind durch Unterstreichungen angegeben.

[0080] [Fig. 57](#) ist eine Aminosäuresequenz (SEQ ID NO: 44) der mutierten Luciferase Luc133-1B2; die Mutationen sind durch Unterstreichungen angegeben.

[0081] [Fig. 58](#) ist eine Aminosäuresequenz (SEQ ID NO: 45) der mutierten Luciferase Luc146-1H2; die Mutationen sind durch Unterstreichungen angegeben.

[0082] [Fig. 59](#) ist eine graphische Darstellung der Signalkinetiken der Klone Luc49-7C6; Luc78-0B10; Luc90-1B5; Luc133-1B2; und Luc146-1H2 bei pH 7,8 bei Raumtemperatur.

[0083] [Fig. 60](#) ist eine graphische Darstellung der normalisierten Lumineszenz bei 50°C, pH 7,8, von Luc49-7C6; Luc78-0B10; Luc90-1B5; Luc133-1B2; und Luc146-1H2 von t = 0 bis etwa 8 Stunden.

[0084] [Fig. 61](#) ist eine graphische Darstellung der Resistenz von selektierten Luciferasen gegen einen Substratinhibitor. Die Daten sind als Logarithmus der Lumineszenz gegen die Zeit für Luc90-1B5; Luc133-1B5; und Luc146-1H2 angegeben.

[0085] [Fig. 62](#) ist eine graphische Darstellung des Logarithmus der Lumineszenz über die Zeit bei 22°C, pH 6,5, für Luc90-1B5 und LucPpe2 [T249M].

[0086] [Fig. 63](#) ist eine graphische Darstellung der Thermostabilität von selektierten mutierten Luciferasen und LucPpIYG bei Raumtemperatur in einer wässrigen Lösung, die 1% Triton X-100 enthält.

[0087] [Fig. 64](#) ist eine graphische Darstellung der aufrechterhaltenen Lumineszenzaktivität (ausgedrückt als Lumineszenz/O.D.) über die Zeit für bestimmte Luciferasen.

[0088] [Fig. 65](#) ist eine Nucleotid(DNA)-Sequenz (SEQ ID NO: 46), die für das Luciferaseenzym Luc81-0B11 kodiert; die Mutationen sind durch Unterstreichungen angegeben.

[0089] [Fig. 66](#) ist eine Aminosäuresequenz der mutierten Luciferase Luc81-0B11; die Mutationen sind durch Unterstreichungen angegeben.

Eingehende Beschreibung der Erfindung

[0090] Die vorliegende Erfindung betrifft Enzyme, beispielsweise Käferluciferasen, die durch Mutationen in den kodierenden Genen im Allgemeinen durch Mutagenese erzeugt werden, wobei die mutierten Enzyme zwei oder mehr gewünschte Eigenschaften, das heißt erhöhte Thermostabilität, erhöhte Resistenz gegen Inhibitoren und möglicherweise verbesserte enzymologische Eigenschaften, im Vergleich zu einem Referenzenzym, beispielsweise dem Wildtypenzym, haben. Die Polynukleotidsequenz, die für das erfindungsgemäß Enzym kodiert, umfasst Mutationen, die eine Vielzahl von Aminosäuresubstitutionen im Vergleich zu der Polynukleotidsequenz kodieren, welche für das Enzym kodiert, von dem das erfindungsgemäß Enzym abgeleitet ist. Beispielsweise betrifft die Erfindung Enzyme, beispielsweise Luciferasen, die thermostabil sind. Die erhöhte Thermostabilität erlaubt die Lagerung von Enzymen, wie Luciferasen, ohne Veränderung ihrer Aktivität und verbessert die Reproduzierbarkeit und Genauigkeit von Assays unter Verwendung der mutierten Luciferasen. Somit umfasst eine erfindungsgemäß Ausführungsform isolierte Polynukleotidsequenzen (cDNAs), die für mutierte Luciferasen mit erhöhter Thermostabilität und erhöhter Resistenz gegen Luciferaseinhibitoren kodieren, Vektoren, welche die Polynukleotidsequenzen enthalten, und transformierte Wirtz, welche die Polynukleotidsequenzen exprimieren. Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse von etwa 250 Klonen und die Eigenschaften der Luciferasen aus diesen Klonen, einschließlich der Thermostabilität. Die Erfindung umfasst auch die Verwendung der mutierten Luciferasen in jeglicher Anwendung, bei der Luciferasen herkömmlich eingesetzt werden, und Kits, die für einige der Anwendungen nützlich sind.

[0091] Unerwarteterweise wurden in der vorliegenden Erfindung Käferluciferasen mit den gewünschten verbesserten Eigenschaften durch rekursive Mutagenese und Selektion (manchmal als "gerichtete Evolution" bezeichnet) gewonnen. Die Strategie der rekursiven Mutagenese und Selektion ist ein Aspekt der vorliegenden Erfindung, insbesondere die Verwendung eines automatisierten Multiparameter-Screenings. Somit wurde anstelle des Screenings auf nur eine Eigenschaft, wie Thermostabilität, das gleichzeitige Screening für zusätzliche Eigenschaften der Enzymaktivität und Effizienz durchgeführt. Durch dieses Verfahren ist es weniger wahrscheinlich, dass eine Eigenschaft auf Kosten einer anderen "evolviert", was zu einer erhöhten Thermostabilität, jedoch beispielsweise zu einer verringerten Aktivität führt.

[0092] Tabelle 1 zeigt Beispiele von Parameterwerten (Li, Tau, K_m und S, siehe nachstehend), die von Experimenten unter Einsatz verschiedener Luciferasen als Ausgangs(Eltern)-Sequenzen abgeleitet sind. Die Überschriften beziehen sich auf Bezeichnungen der Temperatur, bei der die Enzymstabilität gemessen wurde, und auf die Ausgangsluciferase, beispielsweise Luc39-5B10 bei 51°C und dergleichen. Alle Parameter in jedem Experiment sind als relative Werte, bezogen auf die entsprechende Ausgangssequenz, angegeben, beispielsweise entsprechen die Parameterwerte für die Ausgangssequenz in jedem Experiment "1" (vergleiche Beispiel 2 wegen der Definitionen).

[0093] Thermostabilität hat sich in der Natur in verschiedenen Enzymen evolviert, beispielsweise in thermostabilen Isoenzymen, die in thermophilen Bakterien gefunden werden. Natürliche Evolution findet durch einen Prozess einer willkürlichen Mutagenese (Basensubstitutionen, Gendeletionen, Geninsertionen) und nachfolgende Selektion dieser Mutanten mit verbesserten Eigenschaften statt. Dieser Prozess wiederholt sich mit der Zeit. Obwohl die Existenz thermostabiler Enzyme in der Natur darauf hinweist, dass Thermostabilität durch Mutagenese auf der Ebene der Evolution erzielt werden kann, war die Möglichkeit, ein bestimmtes Niveau der Thermostabilität für eine bestimmte Klasse von Enzymen unter Einsatz kurzzeitiger Laborverfahren zu erhalten, nicht vorhersagbar. Der natürliche Prozess der Evolution, der im Allgemeinen extrem große Populationen und viele Millionen von Generationen und Genen erfordert, durch Mutation und Selektion kann die Möglichkeit eines Labors nicht vorhersagen, verbesserte Gene durch gerichtete Evolution zu produzieren, bis solche Mutanten erhalten werden.

[0094] Weil die gesamte dreidimensionale Struktur aller Käferluciferasen ziemlich ähnlich ist, ist nach dem Erfolg bezüglich eines Mitglieds dieser Klasse vorhersagbar, dass hohe Thermostabilität für andere Käferlucife-

rasen durch ähnliche Verfahren erzielt werden kann. [Fig. 17](#) zeigt die evolutionäre Beziehung zwischen Käferluciferasen, die alle eine ähnliche Gesamtarchitektur aufweisen. Die strukturelle Klasse, zu der Käferluciferasen gehören, wird durch die Sekundärstruktur bestimmt (beispielsweise sind Helices durch Zylinder dargestellt, Faltblätter sind durch Teilbündel dargestellt, Schleifen verbinden Helices mit Faltblättern ([Fig. 18A](#))). [Fig. 18B](#) zeigt die Aminosäuren der LucPpe2-Luciferase, worin kleine Spiralen den Zylindern der [Fig. 18A](#) entsprechen; [Fig. 18C](#) zeigt, dass die allgemeine Käferarchitektur derjenigen von LucPpe2 entspricht (sie können übereinander gelegt werden). Dies bestätigt die Erwartung, dass die in der vorliegenden Erfindung eingesetzten Verfahren auf alle Käferluciferasen verallgemeinert werden kann.

[0095] Enzyme gehören zu unterschiedlichen strukturellen Klassen auf der Grundlage der dreidimensionalen Anordnung von Sekundärelementen, wie Helices, Faltblätter und Schleifen. Die Thermostabilität wird dadurch bestimmt, wie effizient die Sekundärelemente in einer dreidimensionalen Struktur zusammengepackt sind. Für jede strukturelle Klasse gibt es auch eine theoretische Grenze für die Thermostabilität. Alle Käferluciferasen gehören einer gemeinsamen strukturellen Klasse an, was durch ihre gemeinsame Abstammung ([Fig. 17](#)), die homologen Aminosäuresequenzen und die gemeinsamen katalytischen Mechanismen gezeigt wird.

[0096] Die Ausführung einer begrenzten Zahl von Aminosäuresubstitutionen durch Mutagenese verändert die gesamte dreidimensionale Architektur wahrscheinlich nicht signifikant (das heißt die strukturelle Klasse für die mutierten Luciferasen wird wahrscheinlich nicht verändert). Weil die theoretische Grenze für die Thermostabilität für jede strukturelle Klasse nicht bekannt ist, war die potenzielle Thermostabilität von Käferluciferasen bis zu den Ergebnissen der vorliegenden Erfindung nicht bekannt.

[0097] A priori Schwierigkeiten beim Erreichen der erfindungsgemäßen Ziele umfassen:

1. Die Mutationstypen, die durch Laborverfahren erhalten werden können, sind begrenzt.
 - i) Durch willkürliche Punktmutation (beispielsweise fehlerbehaftete PCR) ist mehr als eine Basenänderung pro Codon selten. Somit sind die meisten potenziellen Aminosäureveränderungen selten.
 - ii) Andere Typen von willkürlichen genetischen Änderungen sind für Bereiche von mehr als 100 bp (beispielsweise willkürliche Gendeletionen oder Insertionen) schwer zu erzielen.
2. Die Anzahl der männlichen Luciferasemutanten, die gescreent werden kann, ist begrenzt.
 - i) Auf der Grundlage der Sequenzvergleiche von natürlichen Luciferasen können, wobei Deletionen und Insertionen ignoriert werden, mehr als 10^{189} funktionelle Enzymsequenzen möglich sein.
 - ii) Wenn 100 000 Klone pro Tag gescreent werden können, würde es mehr als 10^{179} Jahrhunderte dauern, um alle möglichen Mutanten zu screenen unter der Annahme, dass dieselbe Mutante niemals zweimal gescreent wird (die tatsächliche Screeningrate in der vorliegenden Erfindung war weniger als 5000 pro Tag).
3. Die Wahrscheinlichkeit, funktionelle Verbesserungen zu finden, die kooperative Mutationen erfordern, ist gering (die Wahrscheinlichkeit, ein spezifisches kooperatives Paar zu finden, ist 1 aus 10^8 Klonen).

[0098] Somit war, selbst wenn die theoretischen Grenzen der Thermostabilität bekannt gewesen wären, aufgrund der sehr geringen Anzahl der möglichen Luciferasemutanten, die gescreent werden können, die a priori Wahrscheinlichkeit, ein solches thermostabiles Enzym zu finden, gering.

[0099] Die vorliegende Erfindung zeigt jedoch, dass es möglich und durchführbar ist, neue Käferluciferasen mit hoher Thermostabilität zu erzeugen.

- a) Die etwa 250 Mutanten, die durch das in der vorliegenden Erfindung eingesetzte Verfahren hergestellt wurden, wobei die Anfangssequenz von lucPpe2 oder lucPpIYG abgeleitet ist, zeigen, dass es möglich und durchführbar ist, mindestens ein Mitglied dieser Enzymklasse mit hoher Thermostabilität zu erhalten.
- b) Eine beliebige Käferluciferase kann durch ähnliche Verfahren verbessert werden, weil die Luciferasen zu derselben strukturellen Klasse gehören.
- i) Weil alle Käferluciferasen zu derselben strukturellen Klasse gehören, haben sie gemeinsame potenziell stabilisierende Mutationen (diese Schlussfolgerung wird durch die Beobachtung gestützt, dass ein hoher Prozentsatz der stabilisierenden Mutationen, die in den erfindungsgemäßen Klonen gefunden wurden, Umwandlungen zu "Konsensus-Aminosäuren" in anderen Käferluciferasen waren, das heißt in Aminosäuren, die in der Mehrzahl der Käferluciferasesequenzen auftreten (vergleiche [Fig. 19](#)).
- ii) Ähnliche Ergebnisse wurden unter Verwendung einer Käferluciferase, die im Wesentlichen aus einer unterschiedlichen Aminosäuresequenz besteht, für den Leuchtkäfer Pyrophorus plagiophthalmus (LucPpIYG) erhalten. Der Wildtyp lucPpIYG hat 48% Nucleotidsequenzidentität zu dem Wildtyp lucPpe2. Die LucPpIYG-Mutanten wurden weniger Zyklen der gerichteten Evolution als die LucPpe2-Mutanten, die hier beschrieben werden, unterworfen. In einigen Fällen wurden Mutationen selektiert, wobei weniger Wert auf die Betonung der relativen Stabilität gelegt wurde.

[0100] Der stabilste Klon, der aus dieser Evolution erhalten wurde (Luc80-5E5) hatte eine Halbwertszeit von etwa 3,8 Stunden bei 50°C in Lösung.

[0101] Um einen statistischen Effekt zu kompensieren, der durch die hohe Anzahl von zerstörerischen zufälligen Mutationen bewirkt wird, die im Vergleich zu vorteilhaften Mutationen zu erwarten sind, wurden Verfahren eingesetzt, um die Genauigkeit der Tests zu maximieren und die vorher selektierten Mutationen in neuen Permutationen erneut zu screenen. Unter den Verfahren zur Maximierung der Testgenauigkeit waren die strenge Kontrolle der Kulturbedingungen unter Verwendung spezialisierter Medien, die Verringerung der Wachstumsraten, die Kontrolle der Wärmeübertragung und die Analyse von Parametern aus der mittleren logarithmischen Wachstumsphase der Kultur. Das Roboterverfahren, das hinsichtlich der Genauigkeit maximiert war, umfasst die Kontrolle des Mischens, der Wärmeübertragung und der Eindampfung von Proben in dem Roboter-Screeningverfahren, und die Normalisierung von Daten zu räumlich verteilten Kontrollproben. Neue Permutationen der selektierten Mutationen wurden durch ein Verfahren des Shuffling von DNA unter Einsatz von Korrekturlesopolymerasen erzeugt.

[0102] Die Schwierigkeit bei der Vorhersage des Ergebnisses des rekursiven Verfahrens wird beispielhaft veranschaulicht durch den wechselhaften Erfolg mit anderen Eigenschaften der Luciferase, auf die selektiert wurde. Obwohl das primäre Augenmerk auf die Enzymstabilität gelegt wurde, wurde auch versucht, eine Selektion auf Mutanten, die eine hellere Lumineszenz erzeugen, die eine effizientere Substratverwendung und ein verlängertes Lumineszenzsignal aufweisen, durchzuführen. Die Definitionen sind durch die Gleichungen angegeben. Das Selektionsverfahren wurde durch Veränderungen in Bezug auf die Ausgangsklone für jeden Wiederholungsschritt des rekursiven Verfahrens bestimmt. Das Ausmaß der Veränderung basierte auf der Beobachtung während des Screeningverfahrens. Die Expression von Luciferase in *E. coli* war relativ ineffizient für LucPpe2 im Vergleich zu Luc+. Andere Luciferasen variierten (vergleiche **Fig. 21**).

[0103] Um die Gesamteffizienz der Substratverwendung zu erhöhen, wurde versucht, eine Verringerung der zusammengesetzten apparenten Umsetzungskonstante (das heißt $K_m[\text{ATP} + \text{Luciferin}]$) sowohl für Luciferin als auch für ATP zu erzielen. Obwohl eine unerwartete systematische Änderung in jeder Umsetzungskonstante vorhanden war ($K_m[\text{ATP}]$, $K_m[\text{Luciferin}]$), war die Gesamtänderung gering. Schließlich konnte das Lumineszenzsignal ohne wesentliche Senkung der Enzymeffizienz nur mäßig beeinflusst werden. Obwohl die Enzymstabilität durch die erfindungsgemäßen Verfahren stark erhöht wurde, wurden andere Eigenschaften des Enzyms viel weniger beeinflusst.

[0104] [Fig. 1–Fig. 13](#), 16, [Fig. 48–Fig. 53](#), [Fig. 60](#) und [Fig. 62](#) zeigen Messungen der Thermostabilität von mutierten Luciferasen. [Fig. 48–Fig. 53](#) zeigen andere Ergebnisse der mutierten Luciferasen. Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen umfassen Luciferasen mit einer höheren als natürlichen Thermostabilität. Jede mutierte Luciferase ist neu, weil ihre individuellen Eigenschaften bislang nicht berichtet worden sind. Spezifische Luciferasen sind sowohl durch ihre Proteinsequenzen als auch Gensequenzen bekannt. Viele andere Luciferasen wurden isoliert, welche erhöhte Thermostabilität haben, deren Sequenzen jedoch nicht bekannt sind. Diese Luciferasen wurden während des gerichteten Evolutionsverfahrens identifiziert und wurden durch ihre enzymologischen Eigenschaften als individuelle Luciferasen erkannt. Die erfindungsgemäßen mutierten Luciferasen können eine deutliche und bislang nicht verwirklichte Thermostabilität bei Temperaturen im Bereich von 22°C bis mindestens 60°C zeigen.

[0105] Andere Aspekte der vorliegenden Erfindung umfassen Verfahren, welche die thermostabilen Luciferasen, insbesondere Käferluciferasen, mit hoher Thermostabilität und Resistenz gegenüber der Inhibition durch einen Substratinhibitor einsetzen.

[0106] Aus einer Population von Polynukleotidsequenzen, welche das Enzym kodieren, das aus einer ersten Polynukleotidsequenz abgeleitet ist, die für ein zu mutierendes Enzym kodiert, wurde mindestens eine Polynukleotidsequenz, die für ein Enzym kodiert, das verbesserte enzymologische Aktivität hat, selektiert und isoliert. In einer Ausführungsform wird dann eine durch Oligonukleotide vermittelte Mutagenese durchgeführt, um mindestens ein Codon, das für eine Konsensus-Aminosäure kodiert, in mindestens eine der selektierten isolierten Polynukleotidsequenzen einzuführen, welche für die Enzyme kodieren, wobei eine weitere Polynukleotidsequenz erhalten wird, die für das Enzym kodiert und ein Codon aufweist, das für die Konsensus-Aminosäure kodiert, wobei das Codon, das eingeführt wird, in der ersten Polynukleotidsequenz nicht vorhanden ist.

Produktion der erfindungsgemäßen Luciferasen

[0107] Das Verfahren zum Herstellen von Luciferasen mit erhöhter Thermostabilität ist die rekursive Mutage-

nese und anschließende Selektion. Ausführungsformen der hochthermostabilen erfindungsgemäßen mutierten Luciferasen wurden durch ein Reiterationsverfahren von zufälligen Punktmutationen ausgehend von einer Nucleotidsequenz, beispielsweise LucPpe2[T249M] cDNA, erzeugt. Rekombinationsmutagenese ist neben der Punktmutagenese ein Teil des Mutageneseverfahrens. Sowohl die Rekombinationsmutagenese als auch die Punktmutagenese werden rekursiv durchgeführt. Da das Mutationsverfahren Rekombination von individuellen Mutanten in einer Art und Weise bewirkt, die der Rekombination von genetischen Elementen während der geschlechtlichen Reproduktion ähnlich ist, wird das Verfahren manchmal als geschlechtliche polymerase Kettenreaktion (sPCR) bezeichnet. Vergleiche beispielsweise Stemmer, US-Patent Nr. 5,605,793 vom 25. Februar 1997.

[0108] Ausgehend von der lucPpe2-cDNA-Sequenz als Ausgangsmaterial wurde das Gen mutiert, wobei mutierte Luciferasen mit stark erhöhter Thermostabilität erhalten wurden. Eine einzelne Punktmutation in der lucPpe2-Sequenz ergab eine Luciferase, deren Sequenz als T249M bezeichnet wird. Diese Mutante ist *in vivo* etwa 5-mal heller als lucPpe2 und wurde für die weitere Mutation als Matrize eingesetzt. Sie wurde auch als Grundlinie für die Messung der Thermostabilität der anderen, hier beschriebenen mutierten Luciferasen verwendet.

[0109] [Fig. 45](#) zeigt die Aminosäuresequenz der LucPpe2-Luciferase (T249M). Die Sequenz enthält eine einzelne Mutation an der Position 249 von T nach M (unterstrichen), welche sie von der von Leach et al. (1997) berichteten Sequenz unterscheidet. Diese Luciferase hat ein Maximum im Spektrum bei 552 nm, welches im Vergleich zu dem Maximum der Luciferase von Leach et al. gelb verschoben ist. Diese Mutante wurde als ursprüngliche Matrize in einigen der Beispiele selektiert, weil sie *in vivo* etwa 5-mal heller ist als diejenige, die von Leach et al. berichtet wurde, wodurch ein effizienteres Screenen ermöglicht wurde. Diese Sequenzen zeigen Änderungen von der Ausgangssequenz (T249M) durch Unterstreichung. Man beachte, dass "x" in der Sequenz eine Ungenauigkeit angibt.

Gerichtete Evolution, ein rekursives Verfahren

[0110] Gerichtete Evolution ist ein rekursives Verfahren zur Erzeugung von Diversität durch Mutagenese und Screenen auf gewünschte Veränderungen. Bezüglich enzymologischer Eigenschaften, die aus einer kumulativen Wirkung mehrerer Aminosäuren resultiert, stellt die gerichtete Evolution ein Verfahren zur Änderung dieser Eigenschaften bereit. Jede Stufe des Verfahrens produziert typischerweise kleine Veränderungen in der Enzymfunktion, die kumulative Wirkung vieler Durchgänge dieses Verfahrens kann jedoch zu einer substantiellen Gesamtänderung führen.

[0111] Die Eigenschaft "Thermostabilität" ist ein Kandidat für die gerichtete Evolution, weil sie durch die kombinierte Wirkung vieler Aminosäuren, welche die Enzymstruktur bestimmen, bestimmt wird. Es wurde auch die Lumineszenzintensität und die Effizienz der Substratbindung der modifizierten Luciferase gescreent. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass die Veränderungen in der Thermostabilität nicht auch zu unerwünschten Änderungen in anderen wichtigen enzymologischen Eigenschaften führten.

[0112] Weil die Häufigkeit von zerstörerischen Mutationen viel höher ist als diejenige von nützlichen Mutationen, ist es wahrscheinlich, dass unerwünschte Klone bei jedem Screenen innerhalb der Genauigkeitsgrenzen der vorliegenden Erfindung selektiert werden. Um dies zu kompensieren, beinhaltete die Screeningstrategie eine Vielzahl von wiederholten Screeningdurchgängen der ursprünglich ausgewählten Mutationen. Vor dem wiederholten Screenen wurden jedoch die selektierten Mutationen gemischt "shuffled", um eine Bibliothek von zufälligen intragenetischen Rekombinationen zu erzeugen. Dieses Verfahren ermöglicht es, dass unter den verschiedenen Klonen günstige Mutationen unter Bildung weniger gemeinsamer kodierenden Sequenzen rekombiniert werden und dass zerstörerische Mutationen abgetrennt und ausgeschlossen werden. Obwohl im Wesentlichen derselbe Satz von selektierten Mutationen erneut gescreent wurde, wurden sie somit unter unterschiedlichen Permutationen als Ergebnis der Rekombination oder der Umbesetzung (shuffling) gescreent.

[0113] Obwohl die Ergebnisse jeder Stufe des Evolutionsverfahrens durch quantitative Messungen getestet wurden, wurden diese Messungen in Zelllysaten und nicht in gereinigten Enzymen durchgeführt. Außerdem wurde in jeder Stufe nur die Veränderung der Enzymleistungsfähigkeit in Bezug auf die vorherige Stufe gemessen, sodass Gesamtänderungen der Enzymfunktion schwierig zu beurteilen sind.

[0114] Tabelle 1 fasst die Eigenschaften verschiedener Klone, die unter Einsatz des vorstehend beschriebenen Verfahrens erhalten wurden, zusammen.

Tabelle 1

Die Kontrolle ist Luc39-5B10 bei 51°C

Experiment Klon ID Lumineszenz Enzym- Substrat- Signal-
 (Li) stabilität bindung stabilität
 (tau) (Km) (S)

| | | | | | |
|----|-----|------|-------|------|-------|
| 40 | 0a7 | 1.04 | 4.5 | 0.78 | 1 |
| 40 | 5h4 | 1.29 | 1.61 | 1.16 | 0.953 |
| 40 | 0c2 | 1.13 | 1.54 | 0.91 | 0.998 |
| 40 | 5g4 | 1 | 1.4 | 0.85 | 1 |
| 40 | 6d3 | 1.02 | 1.37 | 0.79 | 1 |
| 40 | 1g4 | 1.06 | 1.28 | 0.77 | 0.985 |
| 40 | 1d4 | 1.69 | 1.23 | 0.73 | 1 |
| 40 | 0h9 | 1.26 | 1.21 | 0.63 | 0.998 |
| 40 | 2f6 | 3 | 1.07 | 0.49 | 0.981 |
| 40 | 7d6 | 3.09 | 1.058 | 1.09 | 1.013 |
| 40 | 5a7 | 4.3 | 1.025 | 0.93 | 1.008 |
| 40 | 4c8 | 1 | 1 | 0.33 | 1.004 |

Experiment Klon ID Li tau Km S

| | | | | | |
|----|-------|------|------|-------|-------|
| 41 | 7h7 | 0.73 | 2.4 | 2.1 | 0.995 |
| 41 | 5a5 | 0.77 | 1.93 | 2.7 | 1.002 |
| 41 | 2c12 | 1.06 | 1.7 | 0.91 | 1.003 |
| 41 | 6e5- | 1.16 | 1.62 | 1.53 | 0.997 |
| 41 | 4e5- | 1.08 | 1.37 | 1.4 | 1.004 |
| 41 | 6g7 | 1.3 | 1.27 | 1.39 | 0.999 |
| 41 | 1h4 | 1.36 | 1.24 | 0.56 | 0.994 |
| 41 | 0c11 | 4.1 | 1.23 | 1.24 | 0.996 |
| 41 | 2h9 | 5.3 | 1.01 | 0.83 | 0.986 |
| 42 | 6b10 | 0.97 | 3.6 | 0.97 | 0.997 |
| 42 | 1c3 | 0.91 | 2.1 | 0.6 | 0.998 |
| 42 | 7h9 | 0.8 | 1.8 | 0.8 | 0.982 |
| 42 | 6b2 | 0.77 | 1.72 | 0.8 | 0.978 |
| 42 | 6d6 | 0.83 | 1.7 | 0.733 | 0.975 |
| 42 | 4e10- | 0.77 | 1.63 | 1.8 | 0.954 |
| 42 | 1b5 | 0.83 | 1.41 | 1.05 | 0.955 |
| 42 | 6e6- | 0.71 | 1.16 | 0.89 | 0.955 |

| | | | | | |
|----|------|------|------|------|-------|
| 42 | 3a9 | 0.85 | 1.3 | 0.86 | 0.997 |
| 42 | 6b6 | 2.7 | 1.3 | 0.91 | 1.02 |
| 42 | 6e9- | 1.5 | 1.27 | 0.98 | 1.01 |
| 42 | 3h11 | 1.73 | 1.21 | 0.63 | 0.985 |
| 42 | 1a2 | 1.11 | 1.17 | 0.77 | 1.005 |
| 42 | 3f7 | 0.49 | 1.16 | 1.13 | 0.944 |
| 42 | 1a4 | 2 | 1.01 | 0.76 | 0.996 |

Die Kontrolle ist Luc40-0A7 bei 54°C

Experiment Klon ID Li tau Km S

| | | | | | |
|----|------|------|------|------|--------|
| 46 | 2h3 | 0.86 | 6.4 | 0.37 | 0.96 |
| 46 | 4a9 | 0.67 | 5.7 | 0.66 | 0.997 |
| 46 | 2g4 | 0.65 | 5.3 | 0.78 | 0.96 |
| 46 | 5d12 | 0.94 | 4.9 | 0.94 | 1.002 |
| 46 | 1h11 | 1.02 | 4.8 | 0.84 | 0.998 |
| 46 | 5a10 | 1.23 | 4.4 | 0.81 | 0.9842 |
| 46 | 0a8 | 1.35 | 4.3 | 0.89 | 1 |
| 46 | 4d3 | 0.51 | 3.6 | 0.65 | 0.975 |
| 46 | 2a3 | 1.17 | 2.9 | 0.57 | 0.988 |
| 46 | 3b11 | 1.39 | 2.5 | 0.63 | 1.02 |
| 46 | 7g12 | 1.49 | 2.5 | 0.91 | 1.02 |
| 46 | 0g9 | 1.86 | 2.25 | 0.5 | 0.998 |
| 46 | 7h8 | 1.07 | 1.36 | 0.52 | 0.99 |
| 46 | 1g8 | 0.3 | 1.31 | 0.72 | 0.92 |
| 46 | 1d3 | 1.74 | 1.13 | 1.02 | 1.001 |
| 46 | 0c3 | 1.68 | 1.01 | 0.74 | 1.01 |
| 46 | 5c11 | 0.82 | 1.01 | 0.6 | 0.95 |

Die Kontrolle ist Luc46-2H3 bei 54°C

Experiment Klon ID Li tau Km S

| | | | | | |
|----|------|------|------|------|------|
| 49 | 6c10 | 0.57 | 2.2 | 0.98 | 1 |
| 49 | 7c6 | 1.12 | 1.9 | 0.93 | 1.01 |
| 49 | 0g12 | 1 | 1.58 | 0.69 | 1.08 |
| 49 | 7a5 | 1.08 | 1.44 | 1.1 | 0.99 |

| | | | | | |
|----|-----|------|------|------|-------|
| 49 | 1f6 | 0.66 | 1.13 | 1.04 | 1.006 |
| 49 | 0b5 | 0.76 | 1.07 | 1.03 | 0.98 |
| 49 | 4a3 | 0.94 | 1.06 | 0.77 | 1 |

Die Kontrolle ist Luc49-7C6 bei 56°C

| Experiment | Klon ID | Li | tau | Km | S |
|------------|---------|----|-----|----|---|
|------------|---------|----|-----|----|---|

| | | | | | |
|----|------|------|------|------|-------|
| 56 | 2d12 | 0.97 | 2.9 | 0.29 | 1.006 |
| 56 | 5g10 | 1.01 | 2.77 | 0.64 | 1.007 |
| 56 | 3d5 | 1.32 | 2.25 | 1.85 | 1.0 |

| Experiment | Klon ID | Li | tau | Km | S |
|------------|---------|----|-----|----|---|
|------------|---------|----|-----|----|---|

| | | | | | |
|----|------|------|------|-------|--------|
| 57 | 3d1 | 1.06 | 2.9 | 1.05 | 1.02 |
| 57 | 6g12 | 1 | 2.7 | 0.87 | 1.004 |
| 57 | 4c1 | 0.79 | 2.6 | 0.93 | 1.014 |
| 57 | 5f10 | 0.72 | 1.9 | 0.64 | 1.03 |
| 57 | 1e6- | 0.84 | 1.49 | 0.984 | 0.9871 |
| 57 | 1h2 | 0.94 | 1.43 | 0.68 | 0.991 |
| 57 | 2a6 | 1.08 | 1.08 | 0.89 | 0.9976 |

| Experiment | Klon ID | Li | tau | Km | S |
|------------|---------|----|-----|----|---|
|------------|---------|----|-----|----|---|

| | | | | | |
|----|-------|------|------|------|-------|
| 58 | 1g6 | 1.57 | 8.9 | 1.78 | 1.02 |
| 58 | 0a5 | 1.53 | 8.5 | 1.56 | 1.05 |
| 58 | 1b1 | 0.84 | 8.5 | 0.6 | 1.04 |
| 58 | 3g1 | 1 | 7.34 | 0.62 | 1.006 |
| 58 | 0f3 | 1.31 | 6.9 | 0.57 | 0.98 |
| 58 | 3e12- | 1.06 | 6.3 | 0.47 | 0.996 |
| 58 | 0c7 | 1.9 | 4 | 0.64 | 1.06 |
| 58 | 0d1 | 1.03 | 3.76 | 0.49 | 1.03 |
| 58 | 3c7 | 1.49 | 3.4 | 0.55 | 1.04 |
| 58 | 2a2 | 1.4 | 2.2 | 0.5 | 1.05 |
| 58 | 2a8 | 3.2 | 2 | 0.81 | 1.05 |
| 58 | 0f2 | 2.2 | 1.92 | 0.45 | 1.04 |

| | | | | | |
|----|-----|-----|------|------|------|
| 58 | 1b4 | 5.1 | 1.87 | 1.08 | 1.09 |
| 58 | 2b3 | 2.7 | 1.55 | 0.57 | 1.04 |
| 58 | 4g1 | 4.9 | 1.2 | 0.72 | 1.06 |

DE 699 28 687 T2 2006.08.24

Die Kontrolle ist Luc58-0A5 bei 58°C

| Experiment | Klon ID | Li | tau | Km | S |
|------------|---------|----|-----|----|---|
|------------|---------|----|-----|----|---|

| | | | | | |
|----|-------|------|------|------|-------|
| 61 | 4e9- | 1.03 | 1.84 | 0.76 | 1.01 |
| 61 | 1f1 | 1.02 | 1.43 | 0.7 | 1 |
| 61 | 2e12- | 1.56 | 1.34 | 0.48 | 1.003 |
| 61 | 2f2 | 1.5 | 1.3 | 0.32 | 1.01 |
| 61 | 6b4 | 1.2 | 1.26 | 0.88 | 0.98 |
| 61 | 4c10 | 1.46 | 1.12 | 1.06 | 0.99 |
| 61 | 4g11 | 1.31 | 1.03 | 1.43 | 1.03 |
| 61 | 2f1 | 1.41 | 1.02 | 0.79 | 0.995 |
| 61 | 2g1 | 1.3 | 1 | 1.17 | 1 |

| Experiment | Klon ID | Li | tau | Km | S |
|------------|---------|----|-----|----|---|
|------------|---------|----|-----|----|---|

| | | | | | |
|----|-------|------|------|------|--------|
| 65 | 6g12 | 0.87 | 2.3 | 0.73 | 0.9605 |
| 65 | 1h6 | 0.84 | 2.2 | 1.62 | 0.9598 |
| 65 | 7f5 | 1.2 | 1.56 | 2.07 | 1.0087 |
| 65 | 5g5 | 2.3 | 1.49 | 0.45 | 0.9985 |
| 65 | 7h2 | 1.56 | 1.27 | 0.91 | 1.0658 |
| 65 | 7b2 | 1.98 | 1.16 | 0.6 | 0.9289 |
| 65 | 0g9 | 1.36 | 1.09 | 1.46 | 0.9927 |
| 65 | 6c7 | 1.48 | 1.06 | 0.86 | 0.9967 |
| 65 | 1e12- | 1.59 | 1.05 | 1.03 | 0.9582 |
| 65 | 4e2- | 1.21 | 1.05 | 1.11 | 0.943 |
| 65 | 6a10 | 1.7 | 1.04 | 0.93 | 0.992 |
| 65 | 4b9 | 1.48 | 1.04 | 1.61 | 1.0009 |
| 65 | 6c1 | 1.36 | 1.02 | 0.72 | 0.9978 |

| Experiment | Klon ID | Li | tau | Km | S |
|------------|---------|----|-----|----|---|
|------------|---------|----|-----|----|---|

| | | | | | |
|----|------|------|------|------|--------|
| 68 | 2g6 | 1.39 | 3.9 | 1.17 | 0.9955 |
| 68 | 4g3 | 2 | 2.5 | 0.27 | 0.9927 |
| 68 | 5a3 | 1.04 | 1.64 | 0.65 | 0.8984 |
| 68 | 2b7 | 1.04 | 1.64 | 5.2 | 0.9237 |
| 68 | 5d10 | 2.75 | 1.36 | 0.73 | 1.0078 |
| 68 | 7d12 | 1.85 | 1.32 | 0.66 | 1.0084 |
| 68 | 7b9 | 1.8 | 1.19 | 0.56 | 1.0052 |
| 68 | 7b3 | 1.2 | 1.16 | 0.55 | 0.9951 |
| 68 | 1g10 | 1.48 | 1.05 | 1.22 | 1.0025 |

| Experiment | Klon ID | Li | tau | Km | S |
|------------|---------|----|-----|----|---|
|------------|---------|----|-----|----|---|

| | | | | | |
|----|------|------|------|------|--------|
| 70 | 2a7 | 1.94 | 4.6 | 0.7 | 1.0015 |
| 70 | 3d6 | 3.5 | 4.2 | 0.18 | 1.03 |
| 70 | 4f8 | 1.87 | 4.2 | 0.69 | 0.9979 |
| 70 | 7h5 | 2.4 | 2.6 | 0.18 | 1 |
| 70 | 5h6 | 3.1 | 2.3 | 0.6 | 0.999 |
| 70 | 7d6 | 3 | 2.2 | 2.29 | 0.9989 |
| 70 | 5a3 | 3.1 | 1.5 | 0.18 | 1.0058 |
| 70 | 7d2 | 2.5 | 1.4 | 0.66 | 1.0126 |
| 70 | 3h7 | 3.2 | 1.22 | 0.23 | 1.002 |
| 70 | 0h5 | 2.5 | 1.15 | 0.36 | 0.9992 |
| 70 | 0d7 | 1.86 | 1 | 1.83 | 0.993 |
| 70 | 1g12 | 2.42 | 1 | 0.26 | 0.965 |

| Experiment | Klon ID | Li | tau | Km | S |
|------------|---------|----|-----|----|---|
|------------|---------|----|-----|----|---|

| | | | | | |
|----|------|------|------|------|--------|
| 71 | 1d10 | 1.6 | 4.5 | 1.06 | 1.0065 |
| 71 | 6f11 | 1.8 | 4.3 | 0.98 | 0.953 |
| 71 | 7h4 | 3.4 | 3.6 | 0.56 | 1.0045 |
| 71 | 4h3 | 3.1 | 3.1 | 0.42 | 1.0171 |
| 71 | 1h5 | 1.31 | 3.01 | 1.31 | 0.9421 |
| 71 | 5e4- | 5.4 | 2.3 | 0.35 | 0.994 |
| 71 | 5c1 | 2.2 | 2.3 | 0.89 | 0.9746 |
| 71 | 0h7 | 3.6 | 1.8 | 0.59 | 1.0197 |

| | | | | | |
|----|-------|------|------|------|--------|
| 71 | 6h9 | 23.7 | 1.71 | 0.91 | 1.0064 |
| 71 | 7e3- | 5.3 | 1.7 | 0.7 | 1.0028 |
| 71 | 5d4 | 11.1 | 1.48 | 0.35 | 1.0213 |
| 71 | 2e3- | 4 | 1.47 | 0.45 | 0.9654 |
| 71 | 6h11 | 17.7 | 1.15 | 2.8 | 1.0064 |
| 71 | 2e10- | 3 | 1.1 | 0.66 | 0.9588 |
| 71 | 2g2 | 4.4 | 1.01 | 0.44 | 1.0046 |

DE 699 28 687 T2 2006.08.24

Die Kontrolle ist Luc71-5D4 bei 60°C

| Experiment | Klon ID | Li | tau | Km | S |
|------------|---------|----|-----|----|---|
|------------|---------|----|-----|----|---|

| | | | | | |
|----|------|------|------|------|--------|
| 72 | 2g6 | 0.38 | 3.1 | 1.58 | 1.0052 |
| 72 | 5f12 | 0.81 | 1.53 | 1.02 | 0.9678 |
| 72 | 0d7 | 0.76 | 1.44 | 1.4 | 0.9838 |
| 72 | 5c12 | 0.87 | 1.43 | 1.04 | 0.9718 |
| 72 | 1e1- | 1.04 | 1.41 | 1.15 | 0.9956 |
| 72 | 5b12 | 0.83 | 1.41 | 1.02 | 0.9731 |
| 72 | 0b7 | 1.11 | 1.04 | 0.91 | 1.0049 |
| 72 | 3b4 | 0.49 | 1.03 | 2.2 | 0.9581 |

| Experiment | Klon ID | Li | tau | Km | S |
|------------|---------|----|-----|----|---|
|------------|---------|----|-----|----|---|

| | | | | | |
|----|------|------|------|------|--------|
| 73 | 2h8 | 0.85 | 1.9 | 1.08 | 1.0123 |
| 73 | 4e6- | 0.95 | 1.76 | 0.94 | 0.9939 |
| 73 | 3g8 | 0.86 | 1.53 | 1.04 | 1 |
| 73 | 1g3 | 1.7 | 1.14 | 0.97 | 0.9921 |

| Experiment | Klon ID | Li | tau | Km | S |
|------------|---------|----|-----|----|---|
|------------|---------|----|-----|----|---|

| | | | | | |
|----|-------|------|------|------|---------|
| 74 | 2a9 | 0.96 | 1.77 | 0.86 | 0.999 |
| 74 | 4e10- | 0.8 | 1.36 | 1.33 | 0.09897 |
| 74 | 0d5 | 1.69 | 1.28 | 0.61 | 0.9927 |
| 74 | 6g7 | 1.75 | 1.07 | 1.33 | 1.0022 |
| 74 | 5d8 | 0.46 | 1.06 | 0.95 | 0.899 |
| 74 | 5e7- | 1.22 | 1.05 | 0.87 | 0.9977 |

| | | | | | |
|----|------|------|------|------|-------|
| 74 | 6el- | 1.19 | 1.02 | 0.96 | 0.999 |
|----|------|------|------|------|-------|

Experiment Klon ID Li tau Km S

| | | | | | |
|----|-------|------|------|------|--------|
| 76 | 6c3 | 2.3 | 6.4 | 1.2 | 0.9865 |
| 76 | 2a9 | 0.93 | 4.7 | 1.08 | 0.999 |
| 76 | 3h9 | 1.26 | 2.6 | 1.02 | 0.9973 |
| 76 | 0b10 | 1.52 | 2.4 | 1.4 | 0.992 |
| 76 | 0h9 | 1.71 | 1.44 | 1.05 | 1.018 |
| 76 | 2e9- | 0.44 | 1.15 | 1.2 | 0.9318 |
| 76 | 0e10- | 1.67 | 1.1 | 1.02 | 1.014 |
| 76 | 0c10 | 1.13 | 1.05 | 1 | 0.9974 |
| 76 | 3e8- | 1.35 | 1.03 | 1.1 | 0.9894 |
| 76 | 0d12 | 0.69 | 1 | 0.92 | 0.932 |
| 76 | 0f10 | 0.62 | 1 | 1.2 | 0.9478 |

Experiment Klon ID Li tau Km S

| | | | | | |
|----|------|------|------|------|--------|
| 78 | 1el- | 0.54 | 8.9 | 1.15 | 0.9877 |
| 78 | 0h7 | 1.4 | 5 | 0.97 | 1.014 |
| 78 | 0a6 | 1 | 4.3 | 1.5 | 0.9967 |
| 78 | 0b10 | 1.93 | 2 | 1 | 0.9926 |
| 78 | 0f11 | 1.6 | 2 | 0.91 | 0.9905 |
| 78 | 3f1 | 2.4 | 1.7 | 1.09 | 0.9936 |
| 78 | 2b4 | 1.97 | 1.36 | 0.98 | 1.0094 |
| 78 | 5b3 | 3.2 | 1.19 | 1.03 | 0.9735 |
| 78 | 2g12 | 2.5 | 1.03 | 1 | 1.0134 |
| 78 | 0h2 | 1.6 | 1 | 1.15 | 1.0168 |

Die Kontrolle ist Luc78-0B10 bei 62°C

Experiment Klon ID Li tau Km S

| | | | | | |
|----|------|--------|--------|--------|--------|
| 82 | 2g12 | 0.9811 | 2.09 | 0.8851 | 0.9939 |
| 82 | 4b9 | 1.0845 | 1.8419 | 0.8439 | 1.0078 |
| 82 | 0d1 | 0.7622 | 1.5171 | 1.11 | 0.9998 |

| | | | | | |
|----|------|--------|--------|--------|--------|
| 82 | 3g1 | 0.8805 | 1.504 | 0.9629 | 0.9927 |
| 82 | 1d1 | 0.9741 | 1.4497 | 0.8936 | 0.9986 |
| 82 | 1e8- | 0.8206 | 1.4433 | 0.9876 | 0.9968 |
| 82 | 0h9 | 1.1355 | 1.3626 | 0.9171 | 1.0094 |
| 82 | 2c6 | 1.0931 | 1.3402 | 0.9482 | 1.0022 |
| 82 | 3g9 | 1.0364 | 1.251 | 0.968 | 1.0009 |
| 82 | 4h8 | 0.8816 | 1.1667 | 0.9165 | 1.0045 |
| 82 | 0a10 | 1.0535 | 1.1128 | 1.0413 | 1 |
| 82 | 4g1 | 1.4305 | 1.0862 | 1.1734 | 1.0059 |

Experiment Klon ID Li tau Km S

| | | | | | |
|---------|-------|--------|---------|--------|--------|
| 84(121) | 6h7 | 0.3755 | 29.3639 | 2.3636 | 0.8905 |
| 84(121) | 2h9 | 0.4264 | 28.7958 | 1.819 | 0.904 |
| 84(121) | 3f7 | 0.4161 | 25.3058 | 1.8079 | 0.8988 |
| 84(121) | 2h10 | 0.9667 | 14.4658 | 0.8073 | 0.9947 |
| 84(121) | 3a2 | 0.3329 | 12.6 | 2.5444 | 0.855 |
| 84(121) | 3a6 | 1.2299 | 7.2384 | 0.7866 | 1.0046 |
| 84(121) | 5b12 | 1.0535 | 6.0315 | 0.7824 | 1.0056 |
| 84(121) | 5a7 | 1.0413 | 4.9054 | 0.8864 | 1.0071 |
| 84(121) | 3d2 | 0.2032 | 4.8 | 2.4623 | 0.7973 |
| 84(121) | 2a9 | 1.0847 | 4.7486 | 0.7746 | 1.0051 |
| 84(121) | 5e11- | 1.1918 | 4.0988 | 0.872 | 1.008 |
| 84(121) | 7h2 | 0.9115 | 3.9929 | 0.909 | 1.0077 |
| 84(121) | 3b5 | 1.2014 | 3.8251 | 0.7509 | 1.0086 |
| 84(121) | 1f8 | 1.07 | 3.06 | 0.8276 | 1.0093 |
| 84(121) | 2e2- | 1.4356 | 1.9315 | 0.7863 | 1.0175 |

Die Kontrolle ist Luc84-3A6 bei 64°C

Experiment Klon ID Li tau Km S

| | | | | | |
|--------|------|--------|---------|--------|--------|
| 85(86) | 2a2 | 0.2266 | 12.9013 | 3.326 | 0.8705 |
| 85(86) | 4f12 | 1.1167 | 4.7851 | 0.7439 | 1.0092 |
| 85(86) | 4e9- | 1.0869 | 4.4953 | 0.8539 | 1.0068 |
| 85(86) | 1f11 | 0.6994 | 4.0976 | 0.842 | 1.0124 |

| | | | | | |
|--------|-------|--------|--------|--------|--------|
| 85(86) | 5a4 | 1.2273 | 4.09 | 0.9683 | 1.0098 |
| 85(86) | 3e10- | 0.8902 | 3.5342 | 0.8106 | 1.0069 |
| 85(86) | 3e12- | 1.0512 | 3.4883 | 0.853 | 1.0054 |
| 85(86) | 5e4- | 0.9562 | 3.3886 | 1.0328 | 1.0069 |
| 85(86) | 0e6- | 0.1494 | 3.0145 | 3.6293 | 0.8269 |
| 85(86) | 6b1 | 0.7615 | 2.5712 | 0.8695 | 1.0055 |
| 85(86) | 6h7 | 1.0285 | 2.5401 | 0.8963 | 1.0057 |
| 85(86) | 4b11 | 0.9816 | 2.3899 | 0.7927 | 1.0063 |
| 85(86) | 6d7 | 1.1087 | 2.0607 | 0.9042 | 1.0088 |
| 85(86) | 2e10- | 0.3028 | 2.0603 | 1.9649 | 0.8738 |
| 85(86) | 2a9 | 1.448 | 1.1819 | 0.9722 | 1.0046 |

Die Kontrolle ist Luc85-4F12 bei 65°C

Experiment Klon ID Li tau Km S

| | | | | | |
|----|------|--------|--------|--------|--------|
| 88 | 3c1 | 1.4439 | 2.0938 | 0.9874 | 0.9976 |
| 88 | 6g1 | 1.0184 | 1.2665 | 1.2184 | 1.0019 |
| 88 | 3e4- | 1.331 | 1.0996 | 1.0669 | 0.9983 |

Experiment Klon ID Li tau Km S

| | | | | | |
|----|------|--------|--------|--------|--------|
| 89 | 1a4 | 1.2565 | 2.4796 | 1.0338 | 0.997 |
| 89 | 3b1 | 0.7337 | 1.9976 | 0.9628 | 1.0001 |
| 89 | 2b12 | 1.0505 | 1.8496 | 1.0069 | 1.0012 |
| 89 | 0b5 | 1.5671 | 1.1362 | 1.0912 | 0.9995 |
| 89 | 1f1 | 1.378 | 1.1018 | 0.9804 | 0.996 |
| 89 | 2f1 | 1.4637 | 1.0894 | 0.9189 | 0.9992 |

Experiment Klon ID Li tau Km S

| | | | | | |
|----|------|--------|--------|--------|--------|
| 90 | 0f1 | 1.4081 | 1.3632 | 1.027 | 0.9987 |
| 90 | 1b5 | 1.4743 | 1.1154 | 1.0812 | 1.0011 |
| 90 | 6g5 | 1.2756 | 1.0605 | 1.0462 | 1.0012 |
| 90 | 5e6- | 1.0556 | 1.0569 | 1.1037 | 1.0011 |
| 90 | 4e3- | 1.2934 | 1.0291 | 1.0733 | 1.0002 |

[0115] Um die Auswirkung der gerichteten Evolution auf die Enzymfunktion zu beurteilen, wurden Klone am Beginn, in der Mitte und am Ende des Verfahrens (Tabelle 2) gereinigt und analysiert. Die für diese ausgewählte Analyse selektierten Klone waren Luc[T249M], Luc49-7C6 und Luc78-0B10. Ein anderer Klon, Luc90-1B5, der durch die anschließende Oligonucleotid-gerichtete Mutagenese und Screenen erzeugt wurde, wurde für die Analyse ebenfalls gereinigt.

Tabelle 2: Thermostabilität der Luciferaseaktivität bei unterschiedlichen Temperaturen (Halbwertszeit in Stunden)

| | Raumtemperatur* | 37 °C | 50 °C | 60 °C |
|-------------|-----------------|-------|-------|-------|
| Luc [T249M] | 110 | 0,59 | 0,01 | |
| Luc49-7C6 | 430 | 68 | 31 | 6,3 |
| Luc78-0B10 | 3000 | 220 | 47 | 15 |

* etwa 25°C

[0116] Die Wirkung der gerichteten Evolution auf die Thermostabilität war dramatisch. Bei hohen Temperaturen, bei denen der Ausgangsklon fast augenblicklich inaktiviert wurde, zeigten die mutierten Enzyme aus den verwandten Klonen Thermostabilität über mehrere Stunden (vergleiche auch Tabelle 1 und die [Fig. 1–Fig. 3](#), [Fig. 5–Fig. 8](#), [Fig. 11](#), [Fig. 13](#), [Fig. 50–Fig. 52](#) und [Fig. 60](#)). Selbst bei Raumtemperatur sind diese Mutanten einige Male thermostabiler als das Ausgangsenzym (vergleiche [Fig. 4](#), [Fig. 9–Fig. 10](#), [Fig. 12](#), [Fig. 53](#) und [Fig. 62](#)). Die nachfolgende Analyse von Luc90-1B5 zeigte, dass dieses Enzym sogar noch thermostabiler mit einer Halbwertszeit von 27 Stunden bei 65°C war, wenn es unter denselben Pufferbedingungen gemessen wurde ([Fig. 16A](#)). Durch eine gewisse Optimierung der Pufferbedingungen zeigte dieses Enzym einen sehr geringen Aktivitätsverlust bei 65°C während mehrerer Stunden (Citratpuffer bei pH 6,5, [Fig. 16A](#)). Die Luciferase war bei 22°C über mehrere Wochen stabil, wenn sie bei pH 6,5 inkubiert wurde ([Fig. 16B](#)). Nach 100 Tagen bei 4°C zeigten die mutierten Enzyme eine erhöhte Thermostabilität. Nach weniger als 15 Tagen bei 4°C waren die Thermostabilitäten der Mutanten Luc49-7C6 und Luc78-0B10 von dem Ausgangsenzym nicht zu unterscheiden ([Fig. 49](#)).

[0117] Kajiyama und Nakano (1993) zeigten, dass eine einzige Aminosäuresubstitution von A in Position 217 nach entweder I, L oder V in der Feuerfliegenluciferase von *Luciola lateralis* zu einer Luciferase mit erhöhter Thermostabilität führte. Die Substitution mit Leucin führte zu einer Luciferase, die nach einer Inkubation während 1 Stunde bei 50°C 70% ihrer Aktivität behielt. Alle erfindungsgemäßen Enzyme, die durch gerichtete Evolution erzeugt wurden, sind viel stabiler als diese *L. lateralis* Mutante. Eine Mutante, Luc90-1B5, behielt 75% der Aktivität nach 120 Stunden (5 Tagen) der Inkubation unter ähnlichen Bedingungen (50°C, 25 mol/l Citrat, pH 6,5, 150 mmol/l NaCl, 1 mg/ml BSA, 0,1 mmol/l EDTA, 5% Glyzerin). Es ist interessant, dass LucPpe2, das von Leach et al. beschrieben wurde, an der für die Mutante *L. lateralis* beschriebenen homologen Position bereits ein Isoleucin enthielt.

[0118] Obwohl die Thermostabilität die Eigenschaft von Interesse war, wurden Klone auf der Grundlage der anderen enzymologischen Parameter in den Screeningverfahren selektiert. Durch die Selektion von Klonen mit einer höheren Lumineszenzexpression wurden Mutanten gefunden, die in Kolonien von *E. coli* eine höhere Lumineszenzintensität ergaben. Das Verfahren war jedoch wenig geeignet, das kinetische Profil der Lumineszenz durch die Enzyme zu ändern. Dieses Unvermögen deutet an, dass die Fähigkeit, eine Steady-State-Lumineszenz zu unterstützen, ein integraler Bestandteil des katalytischen Mechanismus ist und durch kumulative Wirkung vieler Aminosäuren nicht einfach beeinflusst werden kann.

[0119] Die Substratbindung wurde durch Messung einer apparenten zusammengesetzten K_m (vergleiche Beispiel 2) für Luciferin und ATP gescreent. Obwohl die apparetive zusammengesetzte K_m relativ konstant blieb, zeigte eine spätere Analyse, dass die einzelnen K_m s systematisch verändert wurden. Die K_m für Luciferin wurde höher, während die K_m für ATP sank (Tabelle 3). Die Ursache dafür ist nicht bekannt, obwohl spekuliert werden kann, dass eine effizientere Freisetzung von Oxyluciferin oder Luciferinhibitoren zu einem schnelleren Enzymumsatz führen können.

[0120] Jede Punktmutation für sich erhöht (mehr oder weniger) die Thermostabilität des mutierten Enzyms in Bezug auf die Wildtypluciferase. Die kumulative Wirkung der kombinierten individuellen Punktmutationen führt zu mutierten Luciferasen, deren Thermostabilität in Bezug auf den Wildtyp oft um eine Größenordnung oder mehr erhöht ist.

Tabelle 3: Michaelis-Menten-Konstanten für Mutanten, die durch gerichtete Evolution erzeugt wurden

| | K_m-Luciferin | K_m-ATP |
|-------------|--------------------------------|--------------------------|
| Luc [T249M] | 0,32 μM | 18 μM |
| Luc49-7C6 | 0,99 μM | 14 μM |
| Luc78-0B10 | 1,6 μM | 3,4 μM |
| Luc90-1B5 | 2,2 μM | 3,0 μM |

HINTERGRUNDBEISPIEL 1

Herstellung der erfundungsgemäßen thermostabilen Luciferasen

Mutageneseverfahren:

[0121] Eine anschauliche Mutagenesestrategie ist wie folgt: Der "beste" Wildtypluciferaseklon, das heißt ein Klon mit erhöhter Thermostabilität und nicht nennenswert verringerten Werten für andere Parameter wurde ausgewählt und durch drei Variationen von fehlerbehafteter PCR einer statistischen Mutagenese unterworfen. Aus jedem Zyklus der statistischen Mutagenese wurden 18 der besten Klone selektiert. Aus einer Gesamtzahl von 54 Klonen wurde die DNA präpariert. Diese Klone stellen eine neue genetische Vielfalt dar.

[0122] Diese 54 Klone wurden kombiniert, und eine Rekombinationsmutagenese wurde durchgeführt. Die 18 besten Klone dieser Population wurden selektiert.

[0123] Diese 18 Klone wurden mit den 18 Klonen der vorherigen Population vereint, und es wurde eine Rekombinationsmutagenese durchgeführt. Aus diesen Screeningverfahren wurde eine neue Luciferasepopulation von 18 Klonen, die 6 Gruppen von funktionellen Eigenschaften repräsentiert, selektiert.

[0124] Die neuen Mutationen der selektierten 54 Klone wurden entweder in ihren ursprünglichen Sequenzkonfigurationen oder in Rekombinationen davon ein zweites Mal gescreent. Jede Mutation wurde im Mittel etwa 10-mal analysiert. Bei den 90 Klonen, die in der Rekombinationsmutagenese eingesetzt wurden, war es wahrscheinlich, dass mindestens 10 dem besten Klon funktionell entsprachen. Somit sollte der beste Klon oder Rekombinanter davon mindestens 100-mal gescreent werden. Da dies größer war als die Anzahl der in der Rekombination eingesetzten Klone, bestand eine erhebliche Wahrscheinlichkeit, produktive Rekombinationen des besten Klons mit anderen Klonen zu finden.

Roboterverfahren:

[0125] Die Wärmeübertragung wurde in einem Roboterverfahren unter Einsatz von dickem Aluminium an vielen Positionen, an denen die 96 Lochplatten durch den Roboterarm bewegt wurden, kontrolliert. Beispielsweise bestanden alle Böden in den Inkubatoren oder Kühlschränken aus Aluminium mit einer Dicke von Zoll. Insbesondere war eine Position, die bei Raumtemperatur gehalten wurde, aus einem Aluminiumblock mit den Außenmaßen $4,5 \times 7 \times 6,5$ Zoll ausgeführt. Wenn eine 96-Lochplatte von einem Bereich mit hoher Temperatur (beispielsweise einem Inkubator) oder niedriger Temperatur (beispielsweise einem Kühlschrank) in ein Gerät bei Raumtemperatur gegeben wurde, wurde sie zunächst auf einem großen Aluminiumblock zur Temperaturinstellung gegeben. Durch dieses Verfahren erreichte die gesamte Platte rasch die neue Temperatur, sodass eine ungleichmäßige Verdampfung aus den verschiedenen Löchern der Platte aufgrund der Temperaturdifferenzen minimiert wurde. Die Wärmeübertragung in einem Stapel von 96 Lochplatten, die in einen Inkubator gegeben wurden (beispielsweise für das Wachstum von *E. coli* über Nacht), wurde dadurch kontrolliert, dass 1 mm dicke Aluminiumplatten zwischen die Platten gestellt wurden. Dies ermöglichte eine effizientere Wärmeübertragung von den Ecken der Stapel in die Mitte hinein. Das Mischen in dem Roboterverfahren wurde dadurch kontrolliert, dass die Platte während mehrerer Sekunden nach jeder Reagenszugabe auf einen Schüttler gegeben wurde.

[0126] [Fig. 14](#) zeigt schematisch die Reihenfolge, in welcher die Platten analysiert wurden, und [Fig. 15](#) zeigt die Robotervorrichtung, die programmiert werden kann, um die folgenden Funktionen durchzuführen:

1. Kulturverdünnungsverfahren:

[0127] Eine Platte mit einer Abdeckung (Falcon 3075), die Zellen enthielt (E. coli JM 109), wird auf einen Schüttler gegeben und 3–5 Minuten gemischt.

[0128] Eine Platte (mit einer Abdeckung) wird aus einem Karussell entnommen und in einen Reagensspender gegeben. 180 µl eines Mediums (M9 Minimalmedium) werden nach dem Entfernen der Abdeckung zugegeben. Die Platte wird dann in die Pipettierzustellung gesetzt.

[0129] Die Platte auf dem Schüttler wird in die Pipettierzustellung gesetzt, und die Abdeckung wird entfernt. Zellen wurden auf die neue Platte unter Einsatz eines Pipettierverfahrens übertragen ("Verdünnung von Zellen auf der neuen Zellplatte").

[0130] Die Abdeckungen wurden auf beiden Platten ersetzt. Die neue Platte wird in den Kühlschrank gegeben, und die alte Platte wird auf das Karussell zurückgeführt.

2. Lumineszenztestverfahren

[0131] Eine Platte, die Zellen enthielt, wird von dem Karussell genommen und 3–5 Minuten auf den Schüttler gegeben, um die Zellen vollständig zu mischen. Die Zellen neigen dazu, beim Stehenlassen sich abzusetzen.

[0132] Um die optische Dichte (O.D.) zu messen, wird die Platte von dem Schüttler zu dem Lokator in der Nähe des Luminometers gegeben, die Abdeckung wird entfernt, und die Platte wird in das Luminometer gesetzt. Die optische Dichte wird unter Verwendung eines Filters bei 620 nm gemessen.

[0133] Danach wird die Platte in einem Kühlschrank gelagert.

[0134] Die vorstehenden Stufen werden vor Durchführung der anschließenden Verarbeitung abgeschlossen.

[0135] Um ein Zelllysat herzustellen, wird die Platte mit den Zellen zuerst aus dem Kühlschrank genommen und auf einem Schüttler gemischt, um die Zellen zu resuspendieren. Eine neue Platte von dem Karussell ohne Abdeckung wird in den Reagensspender gegeben, und 20 µl Puffer A werden zu jedem Loch gegeben. Dieses wird dann in die Pipettierstation gegeben.

[0136] Die Platte mit den Zellen in dem Schüttler wird in die Pipettierstation gegeben. Eine Tochterplatte wird unter Einsatz eines Pipettierverfahrens (vergleiche "Pipettieren von Zellen auf die Lysisplatte") hergestellt, um eine Tochterplatte mit Zellen zu präparieren.

[0137] Nach dem Pipettieren wird die neue Tochterplatte auf einen Schüttler gegeben und gemischt.

[0138] Nach dem Mischen wird die Lysatplatte in eine CO₂-Gefrierstation gegeben, um die Proben einzufrieren. Die Platte wird dann in den Auftaublock gegeben, um die Proben während 10 Minuten aufzutauen.

[0139] Die Platte wird dann zu dem Reagensspender gegeben, um 175 µl Puffer B zuzugeben, und dann auf einem Schüttler während etwa 15 Minuten oder länger gemischt. Die Kombination des Gefrierens/Auftauens und Puffer B verursacht die Lysis der Zellen.

[0140] Eine neue Platte mit einer Abdeckung wird von dem Karussell genommen und eingesetzt, um die Verdünnungsplatte zu präparieren, von der alle Tests abgeleitet werden. Die Platte wird in den Reagensspender gegeben, und die Abdeckung wird auf den Lokator in der Nähe der Pipettierzustellung gegeben. 285 µl Puffer C werden zu jedem Loch mit dem Reagensspender gegeben, und dann wird die Platte in die Pipettierstation gegeben.

[0141] Die Lysatplatte in dem Schüttler wird in die Pipettierstation gegeben, und das Pipettierverfahren (vergleiche "Verdünnen von der Lysisplatte zu der Inkubationsplatte") wird durchgeführt. Nach dem Pipettieren wird die neue Tochterplatte für das Mischen auf den Schüttler gegeben. Die Lysatplatte wird verworfen.

[0142] Zwei weiße Testplatten (Labsystems #9502887) werden von der Plattenzuführvorrichtung erhalten und in den Pipettierer gegeben. Die Inkubationsplatte von dem Schüttler wird in die Pipettierzustellung gegeben, und die Abdeckung wird entfernt und auf den benachbarten Lokator gegeben. Zwei Tochterplatten werden

durch das Pipettierverfahren hergestellt (vergleiche "Erzeugung eines Paars von Tochterplatten von der Inkubatorplatte"). Danach wird die Abdeckung auf der Ausgangsplatte ersetzt, und die Platte wird in einen Hochtemperaturinkubator gegeben [mit einer Temperatur im Bereich von 31°C bis etwa 65°C in Abhängigkeit von dem Klon].

[0143] Eine Tochterplatte wird in das Luminometer gegeben, und es wird ein 1X-Testverfahren verwendet. Nach dem Test wird die Platte in den Umgebungsinkubator gegeben, und die zweite Tochterplatte wird in das Luminometer gesetzt. Für die zweite Platte wurde das 0,02X-Testverfahren verwendet. Diese Platte wird verworfen, und die erste Platte wird von dem Inkubator in das Luminometer zurückgeführt. Das Wiederholungstestverfahren wird durchgeführt (d.h. es wird kein Reagens zugeführt). Danach wird die Platte erneut in den Umgebungsinkubator zurückgeführt.

[0144] Die vorstehenden Stufen werden vor der Durchführung der nachfolgenden Stufen vervollständigt.

[0145] Um mit dem zweiten Satz der Messungen zu beginnen, wird die Platte von dem Hochtemperaturinkubator für das Mischen in den Schüttler gegeben.

[0146] Die Platte in dem Umgebungsinkubator wird in das Luminometer zurückgeführt, und es wird das Wiederholungstestverfahren erneut durchgeführt. Die Platte wird danach in den Umgebungsinkubator zurückgeführt.

[0147] Zwei weiße Testplatten werden erneut von der Plattenzuführungsvorrichtung erhalten und in das Pipettiergerät gegeben. Die Platte auf dem Schüttler wird in das Pipettiergerät gesetzt, und die Abdeckung wird entfernt und auf den benachbarten Lokator gesetzt. Es werden erneut zwei Tochterplatten unter Verwendung des Pipettierverfahrens erzeugt (vergleiche "Erzeugung eines Paars von Tochterplatten von der Inkubatorplatte"). Danach wird die Abdeckung auf der Ausgangsplatte ersetzt, und die Platte wird in den Hochtemperaturinkubator zurückgeführt.

[0148] Eine Tochterplatte wird in das Luminometer gegeben, und das 1X-Testverfahren wird erneut durchgeführt. Die Platte wird nach dem Test verworfen. Die zweite Tochterplatte wird dann in das Luminometer gesetzt, und das 0,06X-Testverfahren wird durchgeführt. Die Platte wird ebenfalls verworfen.

[0149] Die vorstehenden Stufen werden vor der Durchführung der weiteren Stufen für alle Platten vervollständigt.

[0150] Bei dem letzten Satz der Messungen wird die Platte aus dem Hochtemperaturinkubator erneut für das Mischen in den Schüttler gegeben.

[0151] Die Platte in dem Umgebungsinkubator wird in das Luminometer zurückgeführt, und das Wiederholungstestverfahren wird erneut durchgeführt. Die Platte wird danach verworfen.

[0152] Eine weiße Testplatte wird aus der Plattenzuführungsvorrichtung entnommen und in das Pipettiergerät gesetzt. Die Platte aus dem Schüttler wird in das Pipettiergerät gegeben, und die Abdeckung wird entfernt und auf den benachbarten Lokator gesetzt. Eine Tochterplatte wird unter Verwendung des Pipettierverfahrens hergestellt (vergleiche "Erzeugung einer einzelnen Tochterplatte von der Inkubatorplatte"). Die Abdeckung wird auf der Ausgangsplatte ersetzt, und die Platte wird verworfen.

[0153] Die Tochterplatte wird in das Luminometer gegeben, und das 1X-Testverfahren wird durchgeführt. Die Platte wird nach dem Test verworfen.

Puffer und Testreagenzien

Puffer A: 325 mM K₂HPO₄; 6,5 mM CDTA; 0,1% Triton X-100

Puffer B: 1X CCLR (Promega E153A); 1,25 mg/ml Lysozym; 0,04 Gelatine

Puffer C: 10 mM HEPES; 150 mM NaCl; 1 mg/ml BSA; 5% Glycerin; 0,1 mM EDTA

1X-Testreagens: 5 µM Luciferin; 175 µM ATP; 20 mM Tricin, pH 8,0; 0,1 mM EDTA

0,02X-Testreagens: 1:50 Verdünnung des 1X Testreagenses

0,06X-Testreagens: 1:16,7 Verdünnung des 1X Testreagenses

Pipettierverfahren

A. Pipettieren von Zellen auf die Lysisplatte

Nicht-aseptisches Verfahren unter Verwendung fixierter Spitzen

Auf der Pipettierplatte:

- Bereitstellen einer Platte, die etwa 200 µl JM109 Zellen pro Loch enthält, ohne Abdeckung.
- Lysatplatte, die 20 µl Puffer A enthält.

Verfahren:

1. Bewege die Spitzen zu der Waschstation und wasche sie mit 1 ml.
2. Bewege sie zu der Zellplatte und entferne 60 µl.
3. Bewege sie zu der Lysatplatte und gebe 45 µl hinein.
4. Wiederhole Stufen 1–3 für alle 96 Proben.
5. Am Ende des Verfahrens wird Stufe 1 wiederholt, um die Spitzen zu reinigen.

Nachverfahren:

- Setze die Lysatplatte auf den Schüttler.
- Setze die Abdeckung auf die Platte mit den Zellen und setze sie auf das Karussell.
- Setze die Lysatplatte in den CO₂-Gefrierschrank.

B. Verdünnung von der Lysisplatte auf die Inkubationsplatte Auf der Pipettierplatte:

- Lysatplatte, die 240 µl Lysat enthält
- Inkubationsplatte ohne Abdeckung, die 285 µl Puffer C enthält.

Verfahren:

1. Bewege die Spitzen zu der Waschstation und wasche sie mit 0,5 ml.
2. Bewege sie zu der Zellplatte und entnehme 30 µl.
3. Bewege sie zu der Inkubationsplatte und gebe 15 µl durch direkten Kontakt mit der Pufferlösung hinein.
4. Wiederhole die Stufen 1–3 für alle 96 Proben.
5. Am Ende dieses Verfahrens wird Stufe 1 zur Reinigung der Spitzen wiederholt.

Nachverfahren:

- Gebe die Inkubationsplatte auf einen Schüttler.
- Verwerfe die Lysatplatte.

C. Erzeugung eines Paars von Tochterplatten von der Inkubationsplatte

[0154] Dieses Verfahren wird zweimal durchgeführt.

Auf der Pipettierplatte:

- Inkubationsplatte, die 100–300 µl einer Lösung enthält, ohne Abdeckung.
- Zwei leere Testplatten (weiß).

Verfahren:

1. Bewege die Spitzen zu der Waschstation und wasche sie mit 0,5 ml.
2. Bewege sie zu der Inkubationsplatte und entnehme 50 µl.
3. Bewege sie zu der ersten Testplatte und gebe 20 µl hinein.
4. Bewege sie zu der zweiten Testplatte und gebe 20 µl hinein.
5. Wiederhole die Stufen 1–4 für alle 96 Proben.
6. Am Ende dieses Verfahrens wird die Stufe 1 zur Reinigung der Spitzen wiederholt.

Nachverfahren:

1. Ersetze die Abdeckung auf der Inkubationsplatte.
2. Gebe die Inkubationsplatte in den Inkubator.
3. Gebe die erste Testplatte in das Luminometer.
4. Gebe die zweite Testplatte auf das Karussell.

D. Erzeugung einer einzigen Tochterplatte von der Inkubationsplatte

Auf der Pipettierplatte:

- Bereitstellen einer Inkubationsplatte ohne Abdeckung, die 100–300 µl einer Lösung enthält.
- Leere Testplatte (weiß).

Verfahren:

1. Bewege die Spitzen zu der Waschstation und wasche sie mit 0,5 ml.
2. Bewege sie zu der Inkubationsplatte und entnehme 40 µl.
3. Bewege sie zu der Testplatte und gebe 20 µl hinein.
4. Wiederhole die Stufen 1–3 für alle 96 Proben.
5. Am Ende dieses Verfahrens wird die Stufe 1 zur Reinigung der Spitzen wiederholt.

Nachverfahren:

- Verwerfe die Inkubationsplatte und die Abdeckung auf der Inkubationsplatte.
- Gebe die Testplatte in das Luminometer.

E. Verdünnung von Zellen auf der neuen Zellplatte

Aseptisches Verfahren unter Verwendung fixierter Spitzen

Auf der Pipettierplatte:

- Platte ohne Abdeckung, die etwa 200 µl Zellen enthält.
- Neue Zellplatte ohne Abdeckung, die 180 µl Wachstumsmedium enthält.

Verfahren:

1. Begebe dich zu der Zellplatte und entnehme 45 µl.
2. Begebe dich zu der Zellplatte und gebe 20 µl durch direkte Flüssigübertragung hinein.
3. Begebe dich zu dem Abfallbehälter und gebe die überschüssigen Zellen hinein.
4. Begebe dich zu der Isopropanolwaschstation und nimm Isopropanol auf, um die Spitzen zu sterilisieren.
5. Begebe dich zu der Waschstation, gebe Isopropanol ab und wasche die Spitzen.
6. Wiederhole die Stufen 1–4 für alle 96 Proben.

Nachverfahren:

- Ersetze die Abdeckung auf der ursprünglichen Platte mit den Zellen und setze sie auf das Karussell.
- Ersetze die Abdeckung auf der neuen Zellplatte und gebe sie in den Kühlschrank.

Anmerkungen:

[0155] Dieses Verfahren wird eingesetzt, um Zellplatten herzustellen, die in dem Hauptanalyseverfahren verwendet werden. 180 µl eines M9-Minimalwachstumsmediums werden mittels Reagensspender zu jeder der neuen Zellplatten unmittelbar vor dem Beginnen des Pipettierverfahrens gegeben. Der Spender wird mit 75% Isopropanol vor der Zugabe in das Medium gewaschen. Das Medium enthält auch selektive Antibiotika, um eine potenzielle Verunreinigung zu vermeiden.

Luminometerverfahren

A. 1X-Testverfahren

1. Setze die Platte in das Luminometer.
2. Spritze 100 µl 1X-Testreagens ein.
3. Messe die Lumineszenz während 1 bis 3 Sekunden.
4. Wiederhole dasselbe für das nächste Loch.
5. Mache weiter, bis alle Löcher gemessen sind.

B. 0,02X-Testverfahren

1. Setze die Platte in das Luminometer.
2. Spritze 100 µl 0,02X-Testreagens ein.
3. Messe die Lumineszenz während 1 bis 3 Sekunden.
4. Wiederhole dasselbe für das nächste Loch.
5. Mache weiter, bis alle Löcher gemessen sind.

C. 0,06X-Testverfahren

1. Setze die Platte in das Luminometer.
2. Spritze 100 µl 0,06X-Testreagens ein.
3. Messe die Lumineszenz während 1 bis 3 Sekunden.
4. Wiederhole dasselbe für das nächste Loch.
5. Mache weiter, bis alle Löcher gemessen sind.

D. Wiederholungstest

1. Setze die Platte in das Luminometer.
2. Messe die Lumineszenz während 1 bis 3 Sekunden.
3. Wiederhole dasselbe für das nächste Loch.
4. Mache weiter, bis alle Löcher gemessen sind.

In vivo Selektionsverfahren

[0156] 5 bis 7 Nitrocellulosescheiben mit 200–500 Kolonien pro Scheibe (1000–3500 Kolonien insgesamt) werden pro 2 Mikroplatten (176 Kolonien) gescreent (Wood und DeLuca, 1987). Die Klone wurden bei hohen Temperaturen unter Verwendung von Standard screeningverfahren gescreent.

[0157] 8 Positionen auf jeder Mikroplatte sind für einen Referenzklon unter Verwendung der "besten" Luciferase reserviert (der Ausgangsklon für die zufällige Mutagenese und Codonmutagenese). Die Positionen der reservierten Löcher sind nachstehend als "X" gezeigt.

```
XooooooooooooX
oooooooooooooo
oooXooooXooo
oooooooooooooo
oooooooooooooo
oooXooooXooo
oooooooooooooo
XoooooooooooX
```

[0158] Die Referenzklone werden dadurch hergestellt, dass Kolonien von transformierter DNA von dem Ausgangsklon in die Referenzlöcher gegeben werden. Um diese Löcher vor dem Animpfen der Mikroplatte zu identifizieren, werden die Löcher mit einem schwarzen Markierungsstift auf der Unterseite jedes Lochs markiert.

Kriterien für das Screenen und die Selektion

[0159] Die folgenden Kriterien wurden für Screeningzwecke eingesetzt. Die für die Enzymstabilitätsparameter ausgewählte Temperatur wurde so ausgewählt, dass das Ausgangsenzym während 10 Stunden um den Faktor 100 bis 1000 zerfällt (vergleiche Tabelle 1). Kriterium 1 wird manuell erreicht; die Daten für die Kriterien 2–6

werden durch Roboteranalyse erzeugt. Für alle Kriterien wird der beschriebene maximale Wert ausgewählt.

1. In vivo Screening: Die hellsten Klone werden bei einer vorgegebenen Temperatur selektiert.
2. Expression/spezifische Aktivität: Der Wert für die normalisierte Lumineszenz wird als das Verhältnis der Lumineszenz zur optischen Dichte berechnet. Der Wert ist das Verhältnis zu dem Referenzwert.
3. Enzymstabilität: Die Messungen der normalisierten Lumineszenz der inkubierten Proben (3 entnommen während etwa 15 Stunden) werden in die Gleichung $\ln(L) = \ln(L_0) - (t/\tau)$ eingesetzt, wobei L die normalisierte Lumineszenz und t die Zeit ist. τ ist ein Maß für die Enzymstabilität. Der Wert ist das Verhältnis zu dem Referenzwert, und die Korrelationskoeffizienten werden berechnet.
4. Substratbindung: Die Messwerte der normalisierten Lumineszenz mit 1X und 0,02X werden am Anfang genommen, und 1X und 0,06X werden nach 5 Stunden genommen. Das Verhältnis von 0,02X:1X und 0,06X:1X gibt die relative Lumineszenz bei 0,02X- und 0,06X-Konzentrationen an. Diese Werte werden neben der relativen Lumineszenz bei 1X (d.h. 1) in einen Lineweaver-Burk-Plot eingesetzt, wobei der apparte K_m -Wert für die Gesamtheit der Substrate ATP, Luciferin und CoA erhalten wird. Die Werte werden im Verhältnis zu dem Referenzwert angegeben, und die Korrelationskoeffizienten werden berechnet.
5. Signalstabilität: Die Lumineszenz der anfänglichen 1X-Lumineszenzreaktionen werden 3 weitere Male während etwa 15 Stunden gemessen. Diese Werte werden in die Gleichung $\ln(L) = \ln(L_0) - (t/\tau)$ eingesetzt, und das Integral über t (15 Stunden) wird berechnet. Die Signalstabilität wird dann berechnet als $S=(1-\text{int}(L)/\text{Lot})^2$. Die Werte werden im Verhältnis zu dem Referenzwert angegeben, und die Korrelationskoeffizienten werden berechnet.
6. Gesamteigenschaften: Die Werte der Kriterien 2 bis 5 werden in einen einzigen Gesamtwert der Eignung (oder wirtschaftliche Verwertbarkeit) kombiniert. Dieser Wert basiert auf der Beurteilung der relativen Wichtigkeit der anderen Kriterien. Die Beurteilung wird nachstehend angegeben:

| Kriterien | Relativer Wert |
|----------------------|----------------|
| Enzymstabilität | 5 |
| Signalstabilität | 2 |
| Substratbindung | 2 |
| Expression/Aktivität | 1 |

[0160] Der Gesamtwert C = Sum(Kriterien 2–5, gewichtet mit einem relativen Wert, wobei beispielsweise ein höheres Gewicht auf die Stabilität gelegt wird, weil sie ein Hauptziel ist).

HINTERGRUNDBEISPIEL 2

Software

Organisation der Daten in die SQL-Datenbank

[0161] Jeder Datensatz, der von einem Luminometer (96 Löcher, Anthos, Österreich) erzeugt wird, repräsentiert die Daten von einer Mikroplatte. Diese Datensätze werden in den Computer, der das Luminometer kontrolliert, gespeichert und über ein Netzwerk an den Datenbankcomputer verknüpft. Aus jeder Mikroplatte der Proben werden 9 Mikroplatten durch das Luminometer gelesen (die ursprüngliche Mikroplatte für die optische Dichte und 8 Tochterplatten für die Lumineszenz).

[0162] Insgesamt wurden 90 Datensätze erzeugt, wobei jeder Datensatz für 96 Proben enthält. Jeder Datensatz enthält die Probennummer, den Zeitpunkt jeder Messung in Bezug auf die erste Messung der Platte, die Luminometermessergebnisse und die um den Hintergrund korrigierten Luminometermessergebnisse. Es werden auch andere Datensatzinformationen angegeben. Für die Analyse wird auch der Zeitpunkt benötigt, an dem jede Mikroplatte gelesen wird. Dieser kann aus dem Roboter oder dem Datensatzerzeugungszeitpunkt erhalten werden. Es wurden von dem Roboter während der Datensatzerzeugung eine bestimmte Systematik der Bezeichnung der Datensätze angewandt (beispielsweise YYMMDDPR.DAT, wobei YY das Jahr, MM der Monat, DD der Tag, P die ursprüngliche Platte [0–9] und R der gemessene Wert [0–8] ist).

Datenverarbeitung und Organisation

[0163] Normalisierung der Lumineszenzdaten: Für jede Messung der Lumineszenz in den 8 Tochterplatten wird die normalisierte Lumineszenz durch Teilen der relativen Lichteinheiten durch die optische Dichte der ursprünglichen Platte berechnet. Wenn ein Wert der normalisierten Lumineszenz unter Null ist, wird der Wert von 0,1 sL zugeordnet, wobei sL die Standardabweichung für die Messungen der normalisierten Lumineszenz ist.

[0164] Berechnung des relativen Messzeitpunktes: Für jede normalisierte Lumineszenzmessung wurde der Zeitpunkt der Messung in Bezug auf die erste Messung der Probe berechnet. Beispielsweise werden die Zeiten aller Lumineszenzmessungen der Probe B6 in der Platte 7 (d.h. 7:B06) in Bezug auf die ersten Messdaten von 7:B06 berechnet. Die Berechnung des Zeitpunkts umfasst sowohl den Zeitpunkt, an dem die Platte gemessen wird, als auch den relativen Zeitpunkt, an dem die Probe auf der Platte gemessen wird.

[0165] Berechnung der Enzymstabilität (τ): Für jede Probe wurde eine lineare Regression für $\ln(L_{1X}) = \ln(L_0) - (t/\tau)$ unter Verwendung der drei Lumineszenzmessungen mit 1X-Substratkonzentrationen (Platten 1, 5, 8) eingesetzt. Der Regressionskoeffizient wurde ebenfalls berechnet.

[0166] Berechnung der Substratbindung ($K_{m:app,total}$): Unter Verwendung von Mikroplatten aus dem ersten Satz der Messdaten (Platten 1 und 2) wurde $L_{0,2X,rel}$ durch Teilen der Messwerte, die mit den Substratkonzentrationen von 0,02X erhalten wurden, durch diejenigen von 1X berechnet. Auf ähnliche Weise wurde $L_{0,06X,rel}$ unter Verwendung von Mikroplatten des zweiten Satzes der Messwerte (Platten 5 und 6) durch Teilen der Messwerte, die mit Substratkonzentrationen von 0,06X erhalten werden, durch diejenigen von 1X berechnet.

[0167] Für jede Probe wurde die lineare Regression für $1/L = (K_{m:app,total}/L_{max:app})(1/[S] + (1/L_{max:app}))$ unter Verwendung der folgenden Werte durchgeführt:

| | |
|-----------------|------|
| L | [S] |
| $L_{0,2X,rel}$ | 0,02 |
| $L_{0,06X,rel}$ | 0,06 |
| $1(L_{1X,rel})$ | 1 |

[0168] $K_{m:app,total}$ wird als die Steigung berechnet. Der Regressionskoeffizient wurde ebenfalls berechnet.

[0169] Berechnung der Signalstabilität (S): Für jede Probe wurde die lineare Regression für $\ln(L) = \ln(L_0) - (t/\tau)$ unter Verwendung der 4 Lumineszenzmessungen der ursprünglichen Mikroplatte mit 1X-Substratkonzentrationen (Platten 1, 3, 4 und 7) verwendet. Der Regressionskoeffizient wurde ebenfalls berechnet. Aus den berechneten Werten von τ und L_0 wurde das Integral der Lumineszenz durch $\text{int}(L) = \tau L_0(1 - \exp(-t/\tau))$ berechnet, wobei t_i die mittlere Zeit der letzten Messung ist (beispielsweise 15 Stunden). Die Signalstabilität wird als $S = (1 - \text{int}(L)/L_i t_i)^2$ berechnet, wobei L_i die anfängliche Messung der normalisierten Lumineszenz mit der 1X-Substratkonzentration ist (Platte 1).

[0170] [Anmerkung: Um das Verdampfen zu korrigieren, kann eine Gleichung $S = (1 + K - \text{int}(L)/L_i t_i)^2$ verwendet werden, wobei $1/K = 2$ (relative Änderung des Flüssigkeitsvolumens bei t_i) verwendet wird].

[0171] Berechnung der Referenzoberflächen: Ein dreidimensionales Koordinatensystem kann unter Verwendung der Gitterpositionen der Proben innerhalb einer Mikroplatte als die horizontalen Koordinaten und der kalkulierten Werte für die Proben (L_i , τ , $K_{m:app,total}$, oder S) als die vertikalen Koordinaten definiert werden. Dieses dreidimensionale System wird als "Plattenkarte" bezeichnet. Eine glatte Oberfläche der Plattenkarten, welche ein Referenzniveau darstellt, kann anhand der für die 8 Referenzklone in jeder Mikroplatte durch die Methode der kleinsten Quadrate bestimmten Werte ermittelt werden. Für jede der 10 ursprünglichen Mikroplatten der Proben werden die jeweiligen Referenzoberflächen für die Kriterienparameter L_i , τ , $K_{m:app,total}$, und S (insgesamt 40 Oberflächen) bestimmt.

[0172] Bei der Methode der kleinsten Quadrate sind die vertikalen Koordinaten (d.h. die Kriterienparameter) die abhängigen Variablen, die horizontalen Koordinaten sind die unabhängigen Variablen. Eine Oberfläche erster Ordnung (d.h. $z = ax + by + c$) wird an die Werte der Referenzklone angepasst. Nachdem die Oberfläche berechnet worden ist, werden die Restfehler zu jedem Referenzklon berechnet. Wenn einer dieser Restfehler außerhalb eines vorgegebenen Ausschlussbereiches ist, wird die Referenzoberfläche erneut berechnet, wobei der fehlerhafte Referenzklon weggelassen wird.

[0173] Wenn eine Oberfläche erster Ordnung die Werte der Referenzklone nicht ausreichend repräsentiert, wird eine Oberfläche einer eingeschränkten zweiten Ordnung eingesetzt (d.h. $z = a(x^2 + ky^2) + bx + cy + d$, wobei k eine Konstante ist).

[0174] Berechnung der Referenz-normalisierten Werte: Für die Kriterienparameter jeder Probe wird der Referenz-normalisierte Wert durch Berechnen des Verhältnisses oder Umkehrverhältnisses mit dem jeweiligen Referenzwert bestimmt. Die Referenz-normalisierten Werte sind L_i/L_{ir} , τ/τ_r , $K_{mr}/K_{m:app,total}$, und S_r/S , wobei die Re-

ferenzwerte aus den Gleichungen der geeigneten Referenzoberflächen berechnet werden.

[0175] Berechnung der kombinierten Beurteilung: Für jede Probe wurde berechnet: $C = 5(\tau/\tau_r) + 2(S/S_r) + 2(K_{mr}/K_{m:app,total}) + (L_i/L_{ir})$.

[0176] Bestimmung der Untergruppierungen: Für die Kriterienparameter L_i , τ , $K_{m:app,total}$, S und C wurden die Abgrenzungswerte (d.h. die Größe der Gruppen) für die Untergruppierungen definiert als gL , $g\tau$, gK_m , gS und gC . Ausgehend von den höchsten Werten für L_i , τ oder C oder den niedrigsten Werten von $K_{m:app,total}$ oder S werden die Proben den Untergruppierungen für jeden Kriterienparameter zugeordnet (wobei die erste Gruppe #1 ist, und so weiter).

Anzeigen einer sortierten Tabelle von Referenz-normalisierten Werten:

[0177] Es wird eine Tabelle von Daten für jede Probe dargestellt, wobei in jeder Zeile die folgenden Daten gezeigt werden:

- Probenidentifikationsnummer (beispielsweise 7:B06)
- Gesamtbeurteilung (C)
- Referenz-normalisierte Enzymstabilität (τ/τ_r)
- Korrelationskoeffizient für die Enzymstabilität
- Gruppennummer für die Enzymstabilität
- Referenz-normalisierte Signalstabilität (S/S_r)
- Korrelationskoeffizient für die Signalstabilität
- Gruppennummer für die Signalstabilität
- Referenz-normalisierte Substratbindung ($K_{mr}/K_{m:app,total}$)
- Korrelationskoeffizient für die Substratbindung
- Gruppennummer für die Substratbindung
- Referenz-normalisierte Expression/spezifische Aktivität (L_i/L_{ir})
- Gruppennummer für die Expression/spezifische Aktivität

[0178] Die Tabelle ist nach der Gesamtbeurteilung (C) sortiert.

Darstellung einer sortierten Tabelle von Kriterienparametern:

[0179] Es wird eine Tabelle mit Daten für jede Probe dargestellt, die in jeder Zeile die folgenden Daten zeigt:

- Probenidentifikationsnummer
- Gesamtbeurteilung (C)
- Enzymstabilität (τ)
- Korrelationskoeffizient für die Enzymstabilität
- Gruppennummer für die Enzymstabilität
- Signalstabilität (S)
- Korrelationskoeffizient für die Signalstabilität
- Gruppennummer für die Signalstabilität
- Substratbindung ($K_{m:app,total}$)
- Korrelationskoeffizient für die Substratbindung
- Gruppennummer für die Substratbindung
- Expression/spezifische Aktivität (L_i)
- Gruppennummer für die Expression/spezifische Aktivität

[0180] Die Tabelle wird nach der Gesamtbeurteilung (C) sortiert; die Referenzklone sind in der Tabelle nicht angegeben. Die Standardabweichung wird wie vorstehend beschrieben angegeben.

Präsentieren einer sortierten Tabelle der Referenz-normalisierten Werten:

[0181] Dies ist dasselbe Verfahren wie die letzte Stufe des Datenverarbeitungsverfahrens. Die Tabelle zeigt:

- Probenidentifikationsnummer
- Gesamtbeurteilung (C)
- Referenz-normalisierte Enzymstabilität (τ/τ_r)
- Korrelationskoeffizient für die Enzymstabilität
- Gruppennummer für die Enzymstabilität
- Referenz-normalisierte Signalstabilität (S/S_r)

- Korrelationskoeffizient für die Signalstabilität
- Gruppennummer für die Signalstabilität
- Referenz-normalisierte Substratbindung ($K_{m,r}/K_{m:app,total}$)
- Korrelationskoeffizient für die Substratbindung
- Gruppennummer für die Substratbindung
- Referenz-normalisierte Expression/spezifische Aktivität (L_i/L_{ir})
- Gruppennummer der Expression/spezifischen Aktivität

[0182] Die Tabelle ist nach der Gesamtbeurteilung (C) sortiert; die Referenzklone sind in der Tabelle nicht angegeben. Die Standardabweichung wird wie vorstehend beschrieben angegeben.

Darstellung einer sortierten Tabelle der Kriterienparameter für die Referenzklone:

[0183] Dies ist dasselbe Verfahren wie vorstehend für die Kriterienparameter beschrieben, außer dass es nur für Referenzklone durchgeführt wird. Die Tabelle zeigt:

- Probenidentifikationsnummer
- Gesamtbeurteilung (C)
- Enzymstabilität (τ)
- Korrelationskoeffizient für die Enzymstabilität
- Gruppennummer für die Enzymstabilität
- Signalstabilität (S)
- Korrelationskoeffizient für die Signalstabilität
- Gruppennummer für die Signalstabilität
- Substratbindung ($K_{m:app,total}$)
- Korrelationskoeffizient für die Substratbindung
- Gruppennummer für die Substratbindung
- Expression/spezifische Aktivität (L_i)
- Gruppennummer für die Expression/spezifische Aktivität

[0184] Die Tabelle ist nach der Gesamtbeurteilung (C) sortiert. Die Standardabweichung wird wie vorstehend beschrieben angegeben.

Darstellung einer sortierten Tabelle von Referenz-normalisierten Werten:

[0185] Dies ist dasselbe Verfahren wie vorstehend für die Referenz-normalisierten Werte beschrieben, außer dass es nur für die Referenzklone durchgeführt wurde. Die Tabelle zeigt:

- Probenidentifikationsnummer
- Gesamtbeurteilung (C)
- Referenz-normalisierte Enzymstabilität (τ/τ_r)
- Korrelationskoeffizient für die Enzymstabilität
- Gruppennummer für die Enzymstabilität
- Referenz-normalisierte Signalstabilität (S_i/S)
- Korrelationskoeffizient für die Signalstabilität
- Gruppennummer für die Signalstabilität
- Referenz-normalisierte Substratbindung ($K_{m,r}/K_{m:app,total}$)
- Korrelationskoeffizient für die Substratbindung
- Gruppennummer für die Substratbindung
- Referenz-normalisierte Expression/spezifische Aktivität (L_i/L_{ir})
- Gruppennummer für die Expression/spezifische Aktivität

[0186] Die Tabelle ist nach der Gesamtbeurteilung (C) sortiert. Die Standardabweichung ist wie vorstehend beschrieben angegeben.

Sortierung der Tabelle

[0187] Jede Tabelle kann nach jedem Eintragungskriterium als primären oder sekundären Schlüssel sortiert werden.

Angabe des Histogramms der Tabelle

[0188] Für jede Tabelle kann ein Histogramm der Kriterienparameter gegen die Gruppennummer für jeden beliebigen Kriterienparameter angegeben werden.

Erstellung der Plattenkarte

[0189] Für jede Platte kann eine Plattenkarte angegeben werden, die eine Auswahl des Folgenden zeigt:

- Jede Lumineszenzmessung oder Messung der optischen Dichte
- L_i
- L_i -Referenzoberfläche
- L_i/L_{ir}
- τ
- τ -Referenzoberfläche
- (τ/τ_r)
- Korrelationskoeffizient von τ
- S
- S-Referenzoberfläche
- S/S
- Korrelationskoeffizient von S
- $K_{m:app,total}$
- K_m -Referenzoberfläche
- $K_{mr}/K_{m:app,total}$
- Korrelationskoeffizient für $K_{m:app,total}$
- Gesamtbeurteilung (C)

[0190] Die Plattenkarten werden als dreidimensionales Balkendiagramm angegeben. Vorzugsweise werden die Balken, die Referenzklone darstellen, farbig oder anderweitig angegeben.

Angabe der Zusammenfassung jedes Eintrags

[0191] Für L_i , τ , $K_{m:app,total}$ und S kann jeder eingetragene Wert in einer Tabelle ausgewählt werden, um den Lumineszenzwert oder den Messwert der optischen Dichte, welcher der Berechnung dieses Werts zugrunde liegt, und eine graphische Darstellung der Kurve, falls zweckmäßig, zu zeigen. Vorzugsweise werden die angewandten Gleichungen und das Endergebnis und der Korrelationskoeffizient ebenfalls angegeben.

[0192] L_i oder L_i/L_{ir} : Angabe des Wertes der optischen Dichte und der Lumineszenz der ausgewählten Probe in Platte 0 und Platte 1.

[0193] τ oder τ/τ_r : Angabe des Wertes der optischen Dichte und der Lumineszenz der ausgewählten Probe in Platte 0, Platte 1, Platte 5 und Platte 8. Anzeigen des Graphen von $\ln(L_1X)$ gegen t , wobei die Datenpunkte und der Graph angegeben ist.

[0194] S oder S/S : Anzeigen des Wertes der optischen Dichte und der Lumineszenz der ausgewählten Probe in Platte 0, Platte 1, Platte 3, Platte 4 und Platte 7. Anzeigen des Graphen von $\ln(L)$ gegen t , wobei die Datenpunkte und der Graph angegeben ist.

[0195] $K_{m:app,total}$ oder $K_{mr}/K_{m:app,total}$: Anzeigen des Wertes der optischen Dichte und der Lumineszenz für eine ausgewählte Probe in Platte 0, Platte 1, Platte 2, Platte 5 und Platte 6. Anzeigen des Graphen von $1/L$ gegen $1/[S]$, wobei die Datenpunkte und der Graph angegeben sind.

HINTERGRUNDBEISPIEL 3

Präparation neuer Luciferasen

[0196] Das in [Fig. 45](#) gezeigte Gen enthält eine einzige Basenpaarmutation, die eine Aminosäuresubstitution an Position 249 von T nach M kodiert. Dieser Klon hatte ein spektrales Maximum von 552 nm, was eine Gelbverschiebung von der Sequenz von Luc bedeutet. Diese Mutante wurde als ursprüngliche Matrize ausgewählt, weil sie in vivo eine etwa 5-mal höhere Lumineszenz zeigt, wodurch ein effizienteres Screenen möglich wurde.

C-terminale Mutagenese

[0197] Um das Peroxisomen-Zielsignal (SKL) auszuschalten, wurde L in ein Stoppcodon mutiert, und die 3 Codons unmittelbar stromaufwärts wurden nach dem hier beschriebenen Oligonucleotidmutageneseverfahren willkürlich verändert. Das konstruierte Mutageneseoligonucleotid führt auch eine einzigartige Spel-Schnittstelle ein, um die Mutante ohne Sequenzieren zu identifizieren. Die Mutanten wurden *in vivo* gescreent, und 13 Kolonien wurden aufgenommen, wobei 12 davon die Spel-Stelle enthielten.

N-terminale Mutagenese

[0198] Um zu testen, ob die Expression verbessert werden kann, wurden die 3 Codons unmittelbar stromabwärts von dem Initiationscodon Met wie beschrieben willkürlich verändert. Das dafür entworfene Mutageneseoligonucleotid führt auch eine einzigartige Apal-Schnittstelle ein, um die Identifizierung der Mutation ohne Sequenzieren zu ermöglichen. Es wurden 7 Klone ausgewählt, und es wurde bestätigt, dass 6 der isolierten Plasmide Mutanten waren.

Shuffling der C- und der N-terminalen Mutanten

[0199] Die Mutagenese am C- und am N-Terminus wurde Seite an Seite (side-by-side) durchgeführt. Um die Mutationen am N- und am C-Terminus zu kombinieren, wurden die aus jedem Mutageneseexperiment selektierten Klone durch Rekombinationsmutagenese gemäß dem hier beschriebenen Rekombinationsmutagenseprotokoll vereint. Die durch Shuffling erhaltenen Mutanten wurden in *amp^s* pRAM subkloniert und in DH5 F'IQ (BRL; Hanahan, 1985) gescreent. Es wurden insgesamt 24 Klone aufgenommen, wobei nur 4 sowohl die N- als auch die C-terminalen Mutationen enthielten. Diese 4 Klone wurden als Matrizen für die Randomisierung der Cysteinpositionen in dem Gen eingesetzt.

[0200] Mutagenese zur Randomisierung der Cysteinpositionen/Zufallsmutagenese und Rekombinationsmutagenese in dem Luc-Gen In LucPpe2 gibt es 7 Cysteinpositionen. Es ist bekannt, dass diese Positionen leicht oxidiert werden, was zu einer Destabilisierung des Proteins führen kann. Es wurden 7 Oligonucleotide zur Randomisierung der Cysteinpositionen eingesetzt.

[0201] Die Oligonucleotide wurden in 2 Gruppen auf der Grundlage der Konservierung des Cysteins in anderen Luciferasegenen aus unterschiedlichen Familien organisiert. Gruppe 1 randomisiert die konservierten Cysteinpositionen C-60, C-80 und C-162. Gruppe 2 randomisiert die Cysteine, die an den Positionen C-38, C-127, C-221 und C-257 nicht strikt konserviert sind.

[0202] Die 4 ausgewählten Matrizen aus der N- und C-terminalen Mutagenese wurden in ein Ampicillin-empfindliches Rückgrat subkloniert, und einzelsträngige DNA wurde für jede der Matrizen präpariert. Diese Matrizen wurden in identischen Mengen kombiniert, und die Oligonucleotidmutagenese wurde wie hier beschrieben durchgeführt. Durch Plattieren eines Aliquots der mutS-Transformation vor der Inkubation über Nacht wurde bestimmt, dass jede der 2 Gruppen 2×10^4 unabhängige Transformanten enthielt. MutS-DNA wurde für 2 Gruppen präpariert und dann in JM109-Zellen für das Screenen transformiert. Mutanten aus der Gruppe 1 wurden *in vivo* gescreent und aufgenommen und danach mit dem Robotersystem behandelt. Es wurden 5 Klone selektiert, die verbesserte Eigenschaften hatten. Mutationen aus der Gruppe 2 wurden *in vivo* gescreent und aufgenommen und danach der Roboterbehandlung unterworfen. Der Temperaturinkubator auf dem Roboter wurde für diesen Satz an Experimenten auf 33°C festgelegt. Es wurden 10 Klone selektiert, die verbesserte Eigenschaften hatten. Die 15 besten Klone aus beiden Gruppen der Cysteinmutageneseexperimente wurden wie vorstehend beschrieben einem Shuffling unterworfen, und 18 der besten Klone wurden nach der Roboterbehandlung selektiert.

[0203] Der "beste" Klon aus dem vorherigen Experiment (Luc31-1G8) wurde als Matrize für die nachfolgenden Mutageneserunden selektiert. (Der Hochtemperaturroboterinkubator wurde auf 42°C eingestellt). Es wurde eine weitere vollständige Mutageneserunde durchgeführt.

[0204] Die 18 besten Klone aus der vorstehenden Mutagenese wurden aufgenommen, und Klon (Luc39-5B10) wurde als der beste Klon selektiert und als Matrize für eine weitere Mutageneserunde verwendet. (Die Temperatur des Hochtemperaturroboterinkubators wurde auf 49°C eingestellt).

[0205] Nach diesem Zyklus wurden 6 der besten Klone für das Sequenzieren selektiert (die Nucleotidsequenz und die abgeleitete Aminosäuresequenz von 5 der Klone sind in den [Fig. 22–Fig. 26](#) beziehungsweise 27–31

gezeigt). Auf der Grundlage der Sequenzdaten wurden 9 Positionen für die Randomisierung selektiert, und 7 Oligos wurden konstruiert, um diese Positionen abzudecken. Auf der Grundlage der durch die Roboterbehandlung erzeugten Daten wurde bestimmt, dass der beste Klon aus der Gruppe der 6 Klone, die sequenziert wurden, der Klon (Luc49-7C6, [Fig. 22](#) und [Fig. 27](#)) war. Das Luciferasegen aus diesem Klon wurde in ein Ampicillin-empfindliches pRAM-Rückgrat subkloniert, und es wurde eine einzelsträngige DNA präpariert. Die Randomisierung der selektierten Positionen wurde gemäß dem hier beschriebenen Oligonucleotidmutageneseverfahren vollständig durchgeführt.

[0206] Die Randomisierungsoligonucleotide wurden in 4 Gruppen aufgeteilt, und Transformanten aus diesen Experimenten wurden aufgenommen, und es wurden 2 Roboterläufe vollständig durchgeführt. 10 Klone wurden aus den 2 Experimenten selektiert. (Die Temperatur des Hochtemperaturroboterinkubators wurde auf 56°C eingestellt).

[0207] Die besten 10 Klone aus den vorstehenden 2 Experimenten und die besten 18 Klone aus den vorherigen Klonpopulationen wurden miteinander vermischt (Rekombinationsmutageneseprotokoll).

[0208] Die 18 besten Klone wurden selektiert, und Klon Luc58-OA5 wurde als der beste Klon bestimmt. Dieser Klon wurde dann als Matrize für eine weitere Mutageneserunde verwendet. Die Temperatur des Hochtemperaturroboterinkubators wurde auf 58°C eingestellt. Klon Luc71-504 wurde als neuer Führungsklon selektiert, und es wurde eine weitere Mutageneserunde durchgeführt, wobei der Inkubator auf 60°C eingestellt wurde.

[0209] Die besten 18 Klone wurden selektiert. Die Nucleotidsequenz und die abgeleitete Aminosäuresequenz von 4 Klonen aus Experiment 78 sind in den [Fig. 32–Fig. 35](#) beziehungsweise 36–39 gezeigt, und der beste Klon aus dieser Gruppe war der Klon Luc78-0B10. Die Thermostabilität von Klonen bei verschiedenen Temperaturen ist in den Figuren gezeigt.

HINTERGRUNDBEISPIEL 4

Mutagenesestrategie von Klon Luc78-0B10 zu Luc90-1B5

[0210] 23 Oligonucleotide wurden präpariert, um 28 Positionen zu Konsensus-Positionen zu machen. Alle diese Oligonucleotide wurden unter Einsatz einer gerichteten Oligonucleotidmutagenese mit einer einzelsträngigen DNA aus Klon luc78-0B10 als Matrize einzeln untersucht, um zu bestimmen, welche Oligonucleotide eine Verbesserung der Thermostabilität ergaben. Tabelle 4 zeigt die Mutageneseoligonucleotide.

Tabelle 4

OLIGOSYNTHESE

| Beschreibung | Nummer | SEQ ID NO: |
|--------------------------------------|--------|------------|
| A17 zu T | 6215 | 48 |
| M25 zu L | 6216 | 49 |
| S36 zu P; Entfernen der Nsi I-Stelle | 6217 | 50 |
| A101 zu V, S105 zu N | 6218 | 51 |
| I125 zu V | 6219 | 52 |
| K139 zu Q | 6220 | 53 |
| V145 zu I | 6221 | 54 |
| V194 zu I | 6222 | 55 |
| V203 zu L, S204 zu P | 6231 | 56 |
| A216 zu V | 6232 | 57 |
| A229 zu Q | 6233 | 58 |
| M249 zu T (Reversion) | 6234* | 59 |
| T266 zu R, K270 zu E | 6235 | 60 |
| E301 zu D | 6236 | 61 |
| N333 zu P, F334 zu G | 6237 | 62 |
| R356 zu K | 6238 | 63 |
| I363 zu V | 6246 | 64 |
| A393 zu P | 6247 | 65 |
| R417 zu H | 6248 | 66 |
| G482 zu V | 6249 | 67 |
| N492 zu T | 6250 | 68 |
| F499 zu Y, S501 zu A | 6251 | 69 |
| L517 zu V | 6252 | 70 |
| F537 zu L | 6253 | 71 |

*Anmerkung: Oligonucleotid #6234 verändert keine Konsensus-Position. Dieses Oligonucleotid verursacht eine Reversion an Position 249 hin zu dem Wildtyp-Ppe2-Codon. Obwohl die Reversion dieser Position die Thermostabilität bei 62°C erhöht, führt die Reversion an dieser Position zu einer verringerten Lichtemission.

[0211] 3 Oligonucleotid-gerichtete Mutageneseexperimente mit Klon luc78-0B10 als Matrize wurden durchgeführt. Die Oligonucleotide für diese Experimente wurden auf die folgende Weise geteilt:

- a. 6215, 6234, 6236, 6248 (ergaben eine erhöhte Thermostabilität)
- b. 6215, 6217, 6218, 6219, 6220, 6221, 6222, 6231, 6233, 6234, 6236, 6238, 6247, 6248, 6249, 6251, 6253 (ergaben keine Änderung oder eine verringerte Thermostabilität).
- c. Alle 23 Oligonucleotide.

[0212] Die Selektionen aus den vorstehenden 3 Experimenten wurden mit dem Roboterscreeningverfahren (Experiment 84, Tabelle 1) unter Verwendung von luc78-0B10 als Kontrolle gescreent. Die Selektionen von Experiment 84 wurden unter Einsatz des Rekombinationsmutageneseverfahrens wieder vereint und dann mit dem Roboterscreeningverfahren (Experiment 85) gescreent.

[0213] Einzelsträngige DNA wurde aus 3 Klonen, luc85-3E12, luc85-4F12, luc85-5A4, präpariert. Die Nucleotidsequenz und die abgeleitete Aminosäuresequenz von luc85-4F12 sind in den [Fig. 40](#) beziehungsweise 41 gezeigt. Diese Klone wurden als Matrizen für die Oligonucleotid-gerichtete Mutagenese zur Verbesserung der Codonnutzung eingesetzt. Positionen wurden anhand der Codonnutzungstabelle, veröffentlicht in Nucleic Acids Research, Vol. 18 (supplement) 1990, Seite 2402, selektiert. Die nachstehende Tabelle listet Oligonucleotide auf, die eingesetzt wurden, um die Codonnutzung in E. coli zu verbessern.

Tabelle 5

| Beschreibung | Oligosynthese # | SEQ ID NO: |
|------------------------------------------------------|-----------------|------------|
| L7(tta-ctg) Entfernen der Apa ⁵⁵ I-Stelle | 6258 | 72 |
| L29(tta-ctg) | 6259 | 73 |
| T42(aca-acc) | 6260 | 74 |
| L51, L56(tta-ctg), L58(ttg-ctg) | 6261 | 75 |
| L71(ttg-ctg) | 6262 | 76 |
| L85(ttg-ctg) | 6263 | 77 |
| L95(ttg-ctg), L97(ctt-ctg) | 6273 | 78 |
| L113, L117(tta-ctg) | 6274 | 79 |
| L151, L153(tta-ctg) | 6275 | 80 |
| L163(ctc-ctg) | 6276 | 81 |
| R187(cga-cgt) | 6277 | 82 |
| L237(ttg-ctg) | 6279 | 83 |
| R260(cga-cgc) | 6280 | 84 |
| L285, L290(tta-ctg), L286(ctt-ctg) | 6281 | 85 |
| L308(tta-ctg) | 6282 | 86 |
| L318(tta-ctg) | 6283 | 87 |
| L341(tta-ctg), T342(aca-acc) | 6284 | 88 |
| L380(ttg-ctg) | 6285 | 89 |
| L439(tta-ctg) | 6286 | 90 |
| L456(ctc-ctg), L457(tta-ctg) | 6293 | 91 |
| T506(aca-acc), L510(cta-ctg) | 6305 | 92 |
| R530(aga-cgt) | 6306 | 93 |

[0214] In dem ersten Experiment wurden die 3 vorstehend aufgelisteten Matrizen aus Experiment 85 vereint und als Matrizen für die Oligonucleotid-gerichtete Mutagenese eingesetzt. Alle diese Oligonucleotide wurden in einem Experiment vereint, und Klone, die sich aus der Oligonucleotid-gerichteten Mutagenese ergaben, wurden unter Einsatz des Roboterscreeningverfahrens wie in Experiment 88 gescreent. Aus diesem Experiment ergab sich ein geringer Prozentsatz an lumineszierenden Kolonien, sodass ein weiteres Oligonucleotid-gerichtetes Mutageneseexperiment durchgeführt wurde, bei dem die Oligonucleotide in den folgenden Gruppen vereint wurden:

- a. 6258, 6273, 6280, 6286
- b. 6259, 6274, 6281, 6293
- c. 6260, 6275, 6282, 6294
- d. 6261, 6276, 6283, 6305
- e. 6262, 6277, 6284, 9306
- f. 6263, 6279, 6285

[0215] Es wurde entdeckt, dass Proben aus Gruppe b eine geringere Anzahl an lumineszierenden Kolonien aufwiesen, und es wurde die Hypothese aufgestellt, dass eines der Oligonucleotide in Gruppe b Probleme verursacht. Selektionen wurden mit allen Experimenten, mit Ausnahme von Experiment b, durchgeführt. Proben wurden dann durch das Roboterscreeningverfahren (Experiment 89) behandelt. Selektionen aus den Experimenten 88 und 89 wurden mit dem Rekombinationsmutageneseprotokoll vermischt und dann mit dem Roboterscreeningverfahren (Experiment 90) gescreent.

Materialien und Methoden

A. Mutageneseprotokoll

[0216] Die hier offenbarten mutierten Luciferasen wurden durch Zufallsmutagenese und anschließendes *in vivo* Screening der mutierten Gene auf mehrere Eigenschaften, einschließlich Lichtausstoß und Thermostabilität des kodierten Luciferasegenprodukts, gescreent. Die Mutagenese wurde im Allgemeinen durch das fol-

gende dreistufige Verfahren durchgeführt:

1. Erzeugung einer genetischen Vielfalt durch Zufallsmutagenese: Es wurde eine fehlerbehaftete PCR als Ausgangssequenz eingesetzt, um Punktmutationen in die Nucleotidsequenz einzuführen. Weil fehlerbehaftete PCR fast ausschließlich zu einzelnen Punktmutationen in einer DNA-Sequenz führt, ist ein theoretisches Maximum von 7 Aminosäureänderungen pro Nucleotidmutation möglich. In der Praxis sind jedoch etwa 6,1 Aminosäureänderungen pro Nucleotid erreichbar. Für die 550 Aminosäuren in Luciferase sind etwa 3300 Mutanten durch Punktmutationen möglich.
2. Konsolidierung der einzelnen Punktmutationen durch Rekombinationsmutagenese: Die genetische Vielfalt, die durch die anfängliche Mutagenese erzeugt wurde, wird durch sPCR in eine kleinere Anzahl Klone überführt. Dieses Verfahren reduziert nicht nur die Anzahl der mutierten Klone, es wird auch, weil die Mutageneserate hoch ist, die Wahrscheinlichkeit der Verknüpfung an negative Mutationen signifikant. Rekombinationsmutagenese entkoppelt positive Mutationen von negativen Mutationen. Die Mutationen werden durch Rekombinationsmutagenese in neue Gene "wieder verknüpft", wobei neue Permutationen erhalten werden. Dann werden nach dem erneuten Screenen der Rekombinationsmutanten die genetischen Permutationen, welche die "negativen Mutationen" haben, dadurch eliminiert, dass sie nicht selektiert werden. Rekombinationsmutagenese dient auch als sekundäres Screening der anfänglichen Mutanten, die durch fehlerbehaftete PCR präpariert werden.
3. Erweiterung der genetischen Vielfalt durch Zufallsmutagenese von selektierten Codons: Weil Zufalls-punktmutagenese nur zu einer begrenzten Anzahl von Aminosäuresubstitutionen führen kann, wird eine vollständige Randomisierung der selektierten Codons durch Oligonucleotidmutagenese erzielt. Die zu mutierenden Codons werden aus den Ergebnissen der vorherigen Mutageneseverfahren anhand der Annahme selektiert, dass für jede nützliche Substitution andere alternative Aminosäuresubstitutionen an derselben Position noch nützlicher sein könnten. Die zu mutierenden Positionen werden durch DNA-Sequenzierung von selektierten Klonen identifiziert.

B. Anfängliche Mutageneseeexperimente

[0217] Sowohl der N-Terminus als auch der C-Terminus der Ausgangssequenz wurden durch Oligonucleotid-gerichtete Mutagenese modifiziert, um die Expression zu optimieren und die Peroxisomen-Zielsequenz zu entfernen. An dem N-Terminus wurden 9 Basen stromabwärts des Initiationscodons randomisiert. An dem C-Terminus wurden 9 Basen stromaufwärts des Terminationscodons randomisiert. Mutanten wurden durch in vivo Screenen analysiert, was zu keiner signifikanten Änderung der Expression führte.

[0218] 6 Klone aus diesem Screenen wurden zusammengefasst und eingesetzt, um die Codons für 7 Cysteine zu mutieren. Diese Codons wurden durch Oligonucleotid-gerichtete Mutagenese randomisiert, und die Mutanten wurden mit dem Roboterscreeningverfahren gescreent. Aus diesem Screening wurden 15 Klone für die gerichtete Evolution selektiert.

C. Erzeugung und Testen von Klonen

[0219] Es werden einige sehr leistungsfähige und bekannte Protokolle zur Erzeugung und zur Untersuchung der erfindungsgemäßen Klone eingesetzt. Wenn nichts anderes angegeben ist, beziehen sich diese Laborverfahren auf solche, die dem Fachmann bekannt sind. Dies betrifft insbesondere die dem Fachmann geläufige polymerase Kettenreaktion (PCR) von Mullis und verschiedene Modifikationen des Standard-PCR-Protokolls (fehlerbehaftete PCR, sPCR und dergleichen), die DNA-Sequenzierung durch ein beliebiges Verfahren (Sanger or Maxxam & Gilbert's methodology), die Aminosäuresequenzierung durch ein beliebiges Verfahren (beispielsweise Edman-Abbau) und elektrophoretische Auftrennung von Polynukleotiden und Polypeptiden/Proteinen.

D. Vektorkonstruktion

[0220] Ein bevorzugter Vektor (pRAM) (vergleiche [Fig. 20](#)), der für das Mutageneseverfahren eingesetzt wird, enthält mehrere einzigartige Eigenschaften, die eine effiziente Mutagenesestrategie ermöglichen:
Der Vektor pRAM enthält den Ursprung f1 eines filamentösen Phagen, der für die Produktion von einzelsträngiger DNA erforderlich ist.

[0221] 2 Sfi-I-Stellen flankieren das Gen. Diese Stellen sind so ausgestaltet, dass das zu subklonierende Gen ausschließlich in der richtigen Orientierung eingeführt wird.

[0222] Der Vektor enthält einen tac-Promotor.

[0223] Die für die Oligonucleotidmutagenese einzusetzenden Matrizen enthalten eine 4-Basenpaardeletion in dem bla-Gen, welches den Vektor empfindlich gegen Ampicillin macht. Das Oligonucleotidmutageneseverfahren verwendet ein mutiertes Oligonucleotid sowie ein Ampicillin-Reparaturoligonucleotid, welches die Funktion des bla-Gens wiederherstellt. Somit wird die Selektion eines hohen Prozentsatzes an Mutanten ermöglicht. (Wenn keine Selektion durchgeführt wird, ist es schwierig, einen hohen Prozentsatz an Mutanten zu erhalten.)

E. Verwendungen der Luciferasen

[0224] Die erfindungsgemäßen mutierten Luciferasen sind für den Einsatz in einer beliebigen Verwendung geeignet, für die die bekannten Luciferasen bislang eingesetzt worden sind, einschließlich folgende:

ATP-Assays: Die höhere Enzymstabilität bedeutet, dass für den Nachweis von ATP eingesetzte Reagenzien eine längere Lebensdauer und Einsatzdauer bei höheren Temperaturen (beispielsweise bei Raumtemperatur) haben. Deshalb ist ein Verfahren zum Nachweisen von ATP unter Einsatz von Luciferasen mit erhöhter Thermostabilität neu und nützlich.

[0225] Lumineszenzmarkierungen für Nucleinsäuren, Proteine oder andere Moleküle: Analog zu den Vorteilen der erfindungsgemäßen Luciferasen in ATP-Assays ist eine längere Halbwertszeit und eine längere Einsatzdauer für die Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit von Lumineszenzmarkierungen vorteilhaft. Dies betrifft insbesondere die Markierung von Nucleinsäuren in Hybridisierungsverfahren, wobei die Hybridisierungstemperaturen relativ hoch sein können (beispielsweise über 40°C). Deshalb ist ein Verfahren zum Markieren von Nucleinsäuren, Proteinen oder anderen Molekülen unter Einsatz der erfindungsgemäßen Luciferasen neu und nützlich.

[0226] Genetischer Reporter: In einer weit verbreiteten Anwendung von Luciferase als genetischer Reporter, bei der der Nachweis des Reporters eingesetzt wird, um auf die Anwesenheit eines weiteren Gens oder das Ablauen eines interessierenden Verfahrens zu testen, stellt die erhöhte Thermostabilität der Luciferasen eine geringere Temperaturabhängigkeit ihrer Expression in lebenden Zellen und in zellfreien Translations- und Transkriptions/Translationssystemen bereit. Deshalb ist ein Verfahren unter Einsatz der erfindungsgemäßen Luciferasen als genetische Reporter neu und nützlich.

[0227] Enzymimmobilisierung: Enzyme in unmittelbarer Nachbarschaft zu physikalischen Oberflächen können durch ihre Wechselwirkung mit diesen Oberflächen denaturiert werden. Die Immobilisierung von Luciferasen in hoher Dichte auf einer Oberfläche, um eine stark lokalisierte Lumineszenz bereitzustellen, wird durch die Verwendung thermostabiler Luciferasen verbessert. Deshalb ist ein Verfahren zur Immobilisierung von Luciferasen auf einer festen Oberfläche unter Verwendung der erfindungsgemäßen Luciferasen neu und nützlich.

[0228] Hybridproteine: Hybridproteine, die durch genetische Fusionsgene, welche Luciferasen kodieren, oder andere Gene hergestellt werden, oder die durch chemische Kopplungsverfahren hergestellt werden, profitieren von einer längeren Halbwertszeit und Einsatzdauer der Luciferasen. Deshalb ist ein Verfahren zur Herstellung von Hybridproteinen durch genetische Verfahren oder chemische Kopplung unter Einsatz der erfindungsgemäßen Luciferasen neu und nützlich.

[0229] Hochtemperaturreaktionen: Die Lichtintensität einer Luciferasereaktion erhöht sich mit der Temperatur, bis die Luciferase zu denaturieren beginnt. Weil die Verwendung thermostabiler Luciferasen eine höhere Reaktionstemperatur erlaubt, sind die erfindungsgemäßen Luciferasen zur Durchführung von Hochtemperaturreaktionen neu und nützlich.

[0230] Lumineszenzlösungen: Lumineszenz wird weit verbreitet eingesetzt, einschließlich zu Lehrzwecken, Demonstrationszwecken und Unterhaltungszwecken. Diese Anwendungen profitieren von Enzymen mit höherer Halbwertszeit und Einsatzdauer. Deshalb ist ein Verfahren zur Herstellung von Lumineszenzlösungen unter Verwendung der erfindungsgemäßen Luciferasen neu und nützlich.

F. Feuerfliegenluciferase

[0231] Das Feuerfliegenluciferasegen, das für die gerichtete Evolution ausgewählt wurde, war LucPpe2, das aus Photuris pennsylvanica isoliert wurde. Die Luciferase wurde aus Feuerfliegen kloniert, die von Wood et al. in Maryland gesammelt wurden und später unabhängig davon von Dr. Leach aus Feuerfliegen kloniert wurde, die in Oklahoma gesammelt wurden (Ye et al., 1997). Eine Mutante dieser Luciferase (T249M) wurde von Wood et al. hergestellt und in der vorliegenden Erfindung eingesetzt, weil sie etwa 5-mal mehr Licht produziert,

wenn sie in *E. coli* exprimiert wird.

[0232] Überblick über das Evolutionsverfahren: Die gerichtete Evolution wurde mit einem rekursiven Verfahren durchgeführt, wobei jede Stufe aus vielen Zyklen bestand, bei denen 1) Mutationsbibliotheken der Feuerfliegenluciferase erzeugt wurden und danach 2) die Bibliotheken gescreent wurden, um neue mutierte Klone mit mehreren gewünschten enzymologischen Eigenschaften zu identifizieren.

[0233] Zu Beginn des Verfahrens wurden 3 Mutationsbibliotheken unter Verwendung der fehlerbehafteten PCR erzeugt (Fromant et al., 1995). Jede Bibliothek wurde zunächst durch visuelle Beurteilung der Lumineszenz in Kolonien von *E. coli* (Wood and De Luca, 1987) und dann durch quantitative Messungen der enzymologischen Eigenschaften in *E.-coli*-Zelllysaten gescreent. Etwa 10 000 Kolonien wurden bei dem visuellen Screenen untersucht, von denen 704 für die quantitative Analyse ausgewählt wurden. Aus jedem quantitativen Screening wurden 18 Klone selektiert. Die 3 Sätze von jeweils 18 Klonen wurden vereint, und es wurde eine neue Mutationsbibliothek unter Einsatz von DNA-shuffling erzeugt, um intragenetische Rekombinationen zu erzeugen (sPCR; Stemmer, 1994). Die Ergebnisse wurden gescreent, wobei ein weiterer Satz von 18 Klonen erhalten wurde. Das Gesamtverfahren wurde durch Kombinieren dieses Satzes von 18 Klonen mit 18 Klonen aus der vorherigen Evolutionsrunde, wobei eine weitere Mutationsbibliothek durch DNA-shuffling erzeugt wurde, und durch das wie zuvor durchgeführte Screenen vervollständigt.

[0234] Screeningverfahren: Bei dem qualitativen visuellen Screenen wurden Kolonien nur aufgrund ihrer Fähigkeit selektiert, relativ starke Lumineszenz aufrechtzuerhalten. Die thermische Stabilität der Luciferase innerhalb der Kolonien von *E. coli* wurde in den nachfolgenden Evolutionsrunden durch Erhöhen der Temperatur des Screenens zunehmend herausgefordert. Die selektierten Kolonien wurden in Löcher einer 96-Lochplatte geimpft, die jeweils 200 µl Wachstumsmedium enthielten.

[0235] Bei dem quantitativen Screening wurden Lysate der *E.-coli*-Kulturen auf 1) Lumineszenzaktivität, 2) Enzymstabilität, 3) nachhaltiger enzymatischer Umsatz und 4) Substratbindung gemessen.

[0236] "Lumineszenzaktivität" wurde als das Verhältnis der Lumineszenzintensität zu der optischen Dichte der Zellkultur gemessen.

[0237] "Enzymstabilität" wurde durch die Geschwindigkeit des Aktivitätsverlusts in Zelllysaten während 10 Stunden bestimmt. In den nachfolgenden Evolutionsrunden wurde die Inkubationstemperatur der Lysate erhöht.

[0238] "Nachhaltiger enzymatischer Umsatz" wurde durch die Geschwindigkeit des Lumineszenzverlusts einer enzymatischen Signalreaktion während 10 Stunden bei Raumtemperatur bestimmt.

[0239] "Substratbindung" wurde über die relative Aktivität des Lysats bestimmt, wenn es mit verdünnten Substratgemischen getestet wurde. Unter diesen 4 Parametern hatte die Thermostabilität die höchste Priorität bei der Selektion.

[0240] Automatisierung mit einem Roboter: Die Automatisierung mit einem Roboter wurde beim quantitativen Screenen eingesetzt, um die hohe Anzahl an erforderlichen quantitativen Tests der kultivierten Zellen genau durchzuführen. Zunächst wurden über Nacht Kulturen in ein frisches Medium verdünnt und 3 Stunden gezüchtet, um Kulturen in der logarithmischen Wachstumsphase zu erzeugen. Die optischen Dichten jeder Kultur wurden dann gemessen, und es wurden Aliquots der Kulturen durch Einfrieren/Auftauen und durch Einsatz von Lysozym lysiert. Die erhaltenen Lysate wurden vor der Analyse weiter verdünnt und bei erhöhten Temperatur inkubiert. Die Lumineszenz wurde in den Aliquoten der verdünnten Lysate, die zu verschiedenen Zeitpunkten genommen wurden, gemessen, wobei die Messungen unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt wurden, die durch das analytische Verfahren (vergleiche Beispiel 2) vorgeschrieben wurden. Die Computeranalyse dieser Daten ergab die quantitativen Selektionskriterien, die hier beschrieben sind.

[0241] Zusammenfassung des Evolutionsverlaufs: Nach der Mutagenese der N- und C-Termini und Randomisierung der Cysteincodons wurde ein Pool von 15 Klonen 2 Runden der gerichteten Evolution, wie vorstehend beschrieben, unterworfen. 5 der 18 Klone, die durch dieses Verfahren erhalten wurden, wurden zur Identifizierung der Mutationen sequenziert. Einer dieser Klone, der Luc49-7C6 genannt wurde, wurde zur Durchführung einer eingehenderen Analyse und für die weitere Mutagenese ausgewählt. Dieser Klon enthielt 14 neue Aminosäuresubstitutionen im Vergleich zur Luciferase Luc[T249M].

[0242] Um das Potenzial für weitere Aminosäureaustausche an den Stellen dieser Substitutionen zu untersuchen, wurde eine Oligonucleotid-gerichtete Mutagenese zur Randomisierung dieser Codons eingesetzt. Die erhaltenen Klone wurden wie vorstehend beschrieben gescreent, und 18 selektierte Klone wurden eingesetzt, um 2 neue Runden der gerichteten Evolution einzuleiten. Unter den 18 Klonen, die sich aus diesem zweiten Satz an Runden ergab, wurde der Klon Luc78-0B10 zur Durchführung zusätzlicher Untersuchungen und einer zusätzlichen Mutagenese ausgewählt. Dieser Klon kodiert für eine Luciferase, die im Vergleich zu Luc[T249M] 23 neue Aminosäuresubstitutionen enthielt.

[0243] Unter Einsatz einer Oligonucleotid-gerichteten Mutagenese mit Luc78-0B10 als Matrize wurden Codons für die Substitution von Konsensus-Aminosäuren, die vorher unter den Käferluciferasen bekannt waren, selektiert. Die Selektionen aus diesem Mutageneseexperiment wurden vermischt, und 3 Klone, die am stabilsten waren, wurden dann als Matrizen für die Oligonucleotidmutagenese zur Verbesserung der Codonnutzung in E. coli eingesetzt. Der Klon Luc90-1B5, der aus diesem Experiment selektiert wurde, enthielt 34 Aminosäuresubstitutionen bezogen auf Luc[T249M] (vergleiche [Fig. 42](#) und [Fig. 43](#) für die Nucleotidsequenz und die abgeleitete Aminosäuresequenz von luc90-1B5, und [Fig. 44](#) und [Fig. 45](#) für die Nucleotidsequenz und die abgeleitete Aminosäuresequenz von Luc[T249M]). Unter den 25 Codons, die für die Änderung zu Konsensus-Aminosäuren selektiert wurden, wurden 11 in den Klon Luc90-1B5 ausgetauscht. Nur 5 der 30 Positionen, die selektiert wurden, um die Codonnutzung zu verbessern, wurden substituiert und hatten eine geringe Auswirkung auf die Enzymexpression.

[0244] Proteinreinigung: 4 Mutanten, die hier beschrieben sind (Luc[T249M], Luc49-7C6, Luc78-0B10 und Luc90-1B5) wurden unter Einsatz eines beschriebenen Verfahrens gereinigt (Hastings et al., 1996).

[0245] Enzymologische Charakterisierung: Gereinigte Proteine wurden in 25 mmol/l HEPES pH 7,8, 150 mmol/l NaCl, 0,1 mmol/l EDTA, 1 mg/ml BSA verdünnt. Die Enzymstabilität wurde aus den verdünnten Proteinen, die bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert wurden, bestimmt, und Aliquots wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten entfernt. Eine lineare Regression des natürlichen Logarithmus der Lumineszenz und der Zeit wurde berechnet. Die Halbwertszeit wurde als $\ln(0,5)$ /Steigung der Regression berechnet.

G. PCR-Mutageneseprotokoll (zufällige Mutagenese) PCR-Mutagenesreaktionen

1. Herstellung von Plasmid-DNA aus einem Vektor, der das Gen von Interesse enthält, und Bestimmung der DNA-Konzentration aus einem Gel.
2. Bereiten von zwei 50 µl-Reaktionen pro Gruppe.

[0246] Es gibt 3 Gruppen von Mutagenesebedingungen unter Verwendung unterschiedlicher Nucleotidkonzentrationen.

[0247] Die hier aufgelisteten Bedingungen ergeben 8-10% Wildtyp-Luc-Kolonien nach dem Subklonieren jedes erzeugten Ausgangsklons. Die Mutageneserate wird anhand der Anzahl der lumineszierenden Kolonien, die nach der Mutagenese vorhanden sind, abgeschätzt. Auf der Grundlage der Ergebnisse für die Kolonien, die in dem Bereich von 8-10% mutierten, wurde bestimmt, dass dieses Ausmaß an Mutagenese im Mittel etwa 2-3 Aminosäureaustausche pro Gen verursacht. Wenn die Mutageneserate so ausgewählt wird, dass im Mittel ein Aminosäureaustausch pro Gen stattfindet, werden im Mittel 50% der Klone keine Mutationen aufweisen. (Bowie et al., 1990).

[0248] Herstellung eines Mastermixes: Alle Komponenten (vergleiche Tabelle 6), außer Polymerase, wurden zugegeben, geschüttelt, kurz geschleudert, Polymerase wurde dann zugegeben, und es wurde vorsichtig gemischt.

Tabelle 6

| Komponente | A zu T/T zu A | A zu C/T zu G | G zu A/C zu T |
|----------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| dATP | 0,3 mM | 0,1 mM | 0,25 mM |
| dCTP | 2,75 mM | 4 mM | 1 mM |
| dGTP | 0,06 mM | 0,02 mM | 0,05 mM |
| dTTP | 0,625 mM | 0,3 mM | 0,6 mM |
| ⁺⁺ pRAMtailUP | 0,4 pmol/µl | 0,4 pmol/µl | 0,4 pmol/µl |
| ⁺⁺ pRAMtailDN | 0,4 pmol/µl | 0,4 pmol/µl | 0,4 pmol/µl |
| *Taq-Polymerase | 1 U/µl | 1 U/µl | 1 U/µl |
| [°] MgCl ₂ | 6,77 mM | 5,12 mM | 2,7 mM |
| [°] MnCl ₂ | 0,5 mM | 0,5 mM | 0,3 mM |
| DNA | 50 ng insgesamt | 50 ng insgesamt | 50 ng insgesamt |
| 10X-PCR-Puffer | 1X | 1X | 1X |
| Autoklaviertes nanoreines Wasser | auf 50 µl | auf 50 µl | auf 50 µl |

*Taq-Polymerase wurde von Perkin Elmer gekauft (N808-0101).

[°]MnCl₂ und MgCl₂ wurden frisch aus einer 1 M Stammlösung hergestellt. Die Stammlösungen wurden filters-terilisiert und mit steriles Wasser gemischt, wobei Stammlösungen von 10 mM und 25 mM hergestellt wurden, die dann in Polystyrol-Nalgene-Behältern bei 4°C gelagert wurden.

⁺⁺pRAMtailUP: 5'-gtactgagacgacggccagccaaaggcttaggcctgatgt-3' (SEQ ID NO: 38);

⁺⁺pRAMtailDN: 5'-ggcatgagcgtgaactgactgaactagcgcccccag-3' (SEQ ID NO: 39)

10X-PCR-Polymerasepuffer:

- 100 mM Tris-HCL, pH 8,4, aus einer 1 M Stammlösung
- 500 mM KCl
- die Primer werden aus einer 1 nmol/µl-Stammlösung in eine 20 pmol/µl Arbeitsstammlösung verdünnt.

[0249] Zyklus in einem Thermozykler: 94°C während 1 Minute (94°C während 1 Minute, 72°C während 10 Minuten) 10X

3. Reinigung der Reaktionsprodukte mit einem Wizard PCR purification kit (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, part #A718c):
 - Überführung der PCR-Reaktion in ein neues Röhrchen, welches Promega 100 µl Direct Purification buffer enthält (Promega part #A724a)
 - Zugeben von 1 ml Wizard PCR Purification Resin (Promega part #A718c) und Inkubieren bei Raumtemperatur während 1 Minute.
 - Leiten des Harzes durch eine Wizard-Minisäule
 - Waschen mit 80% Ethanol
 - Zentrifugieren in einer Mikrozentrifuge, um überschüssiges Ethanol zu entfernen
 - Elution in 50 µl steriles nanoreines Wasser (wobei zugelassen wird, dass das Wasser mindestens 1 Minute auf der Säule verbleibt)

Amplifikation¹ der Mutagenesereaktion

1. Bereitstellen von fünf 50 µl-Reaktionen (vergleiche Tabelle 7 pro Gruppe).

Tabelle 7

| Komponenten | Konzentration | Menge in 50 µl | Endkonzentration |
|-------------------------|---------------|----------------|------------------|
| dATP | 10 mM | 1 µl | 0,2 mM |
| dCTP | 10 mM | 1 µl | 0,2 mM |
| dGTP | 10 mM | 1 µl | 0,2 mM |
| dTTP | 10 mM | 1 µl | 0,2 mM |
| ⁺ pRAM18UP | 20 pmol/µl | 1 µl | 0,4 pmol/µl |
| ⁺ pRAM19DN | 20 pmol/µl | 1 µl | 0,4 pmol/µl |
| Pfu-Polymerase | 2 U/µl | 1 µl | 0,04 µ/µl |
| [°] 10X-Puffer | 10X | 5 µl | 1X |
| DNA | | 10 µl | |
| Wasser | | 24,6 µl | |

– Zugabe aller Komponenten, außer Polymerase, zu dem Ausgangsgemisch, Schütteln, kurzes Zentrifugieren, Zugabe von Polymerase, vorsichtiges Mischen.

° 10X-Reaktionspuffer für die native Pfu-Polymerase enthält 20 mM MgCl₂, sodass MgCl₂ nicht zusätzlich zugegeben werden muss.

⁺Primer:

pRAM18UP – 5'-gtactgagacgacgcccag-3' (SEQ ID NO: 40)

pRAM19DN – 5'-ggcatgaggcgtaactgac-3' (SEQ ID NO: 41)

Zyklusbedingungen: 94°C während 30 Sekunden (94°C während 20 Sekunden, 65°C während 1 Minute, 72°C während 3 Minuten) 25X (Perkin-Eimer Gene Amp® PCR System 2400)

2. Laden von 1 µl auf ein Gel, um die Amplifikationsprodukte zu untersuchen

[0250] ¹ Diese Amplifizierungsstufe mit Pfu-Polymerase wurde aus 2 Gründen eingeführt: (a) Um die DNA-Ausbeuten für die Produktion einer großen Anzahl an Transformanten zu erhöhen. (b) Um die Menge an Matrizen-DNA zu verringern, die von der Mutagenese-PCR-Reaktion übertragen wird: (Die Primer für die zweite Amplifikationsreaktion befinden sich innerhalb der Mutageneseprimer. Die Mutageneseprimer wurden mit nicht-spezifischen Enden von 11 beziehungsweise 12 Basen für die stromaufwärtigen und stromabwärtigen Primer konstruiert. Die Primer für die zweite Amplifikationsreaktion amplifizieren DNA, die vorher mit den Mutageneseprimern amplifiziert worden sind, sie können jedoch pRAM-Matrizen-DNA nicht amplifizieren).

3. Reinigung der Amplifikationsreaktionsprodukte mit Wizard PCR purification kit (Promega Corporation, part #A718c):

- Übertragung der PCR-Reaktion in ein neues Röhrchen, das 100 µl Direct Purification buffer (Promega part #A724a) enthielt.
- Zugabe von 1 ml Wizard PCR Purification Resin (Promega part #A718c) und Inkubieren bei Raumtemperatur während 1 Minute.
- Leiten des Harzes durch eine Wizard-Minisäule
- Waschen mit 80% Ethanol
- Zentrifugieren in einer Mikrozentrifuge, um überschüssiges Ethanol zu entfernen
- Elution mit 88 µl sterilem nanoreinem Wasser (wobei zugelassen wird, dass das Wasser während mindestens 1 Minute auf der Säule verbleibt).

Subklonieren der amplifizierten PCR-Mutageneseprodukte

1. Verdauen der DNA mit Sfi I wie folgt:

- 2 µl Sfi I (Promega part #R639a)
- 10 µl 10X-Puffer B (Promega part #R002a)
- 88 µl DNA aus der Wizard-PCR-Präparation (vergleiche den vorstehenden Schritt 3)

- Mischen der Komponenten und Überschichten mit 2 Tropfen Mineralöl; Inkubieren bei 50°C während 1 Stunde.
- 2. Entfernen der Salze und der Sfi-I-Enden mit Wizard PCR purification wie vorstehend beschrieben, und Elution in 50 ml steriles nanoreines Wasser.
- 3. Ligation in ein pRAM (+/-)-Rückgrat (Bereitstellen von 4 Ligationen pro Gruppe):
 - 0,025 pmol pRAM-Rückgrat
 - 0,05 pmol Insert (üblicherweise im Bereich von 6 bis 12 µl Insert)
 - 1 µl T4-DNA-Ligase (Promega part M180a)
 - 2 µl 10X-Ligasepuffer (Promega part C126b, Aufteilen in 25 µl Aliquots, wobei das Einfrieren/Auftauen nicht mehr als zweimal durchgeführt werden darf)
 - Zugabe von Wasser auf 20 µl
 - Ligation während 2 Stunden bei Raumtemperatur
 - Hitzereaktionen während 15 Minuten bei 70°C, um die Ligase zu inaktivieren.

Transformation und Plattieren

- 1. Butanolausfällungsproben, um überschüssiges Salz zu entfernen (n-Butanol von Sigma, St. Louis, Missouri, part #BT-105):
(wenn Ethanolausfällung anstelle von Butanol verwendet wird, ist ein Waschschritt mit 70% Ethanol erforderlich. Überschüssiges Salz verursacht Probleme während der Elektroporation, sodass die Reaktion fehlschlägt).
 - Zugabe von Wasser auf 50 µl
 - Zugabe von 500 µl n-Butanol
 - Mischen bis der Butanol/Ligationsmix klar ist, und anschließendes Zentrifugieren während 20 Minuten bei Raumtemperatur
 - Entfernen von Butanol in einen Abfallbehälter unter einem Dunstabzug
 - Resuspendieren in 12 µl Wasser, 30 Sekunden Zentrifugation bei voller Geschwindigkeit.
 - 2. Präparation eines Zell/DNA-Gemisches (Bereitstellen von 4 Transformationen plus eine mit der Referenzklon-DNA):
 - während DNA ausgefällt wird, werden Elektroporationsküvetten auf Eis gegeben
 - Füllen von 15 ml Falcon-Röhrchen mit Schnappdeckel mit 3 ml S.O.C.-Medium und Stellen der Röhrchen auf Eis
 - Auftauen der JM109 elektrokompetenten Zellen auf Eis (50 µl) pro Ligationreaktion
 - Pipettieren von 10 µl der Bodenschicht aus Stufe 1 (oder 0,5 µl Referenzklon-DNA) in kompetente Zellen (kleine Mengen verschleppten Butanols haben keine schädliche Auswirkung auf die Transformationseffizienz)
 - Stellen des Zell/DNA-Gemisches auf Eis.
 - 3. Elektroporation:
 - die Röhrchen, Küvetten und das Zell/DNA-Gemisch werden auf Eis zur Elektroporationsvorrichtung getragen
 - das Zell/DNA-Gemisch wird in eine Küvette pipettiert und kurz geschüttelt.
- Instrumenteneinstellungen:
- Küvettenspalt: 0,2 cm
Spannung: 2,5 kV
Kapazität: 25 µF
Widerstand: 200 Ohm
Zeitkonstante: 4,5 msec
- 1 ml SOC (enthält KCl; Medienpräparation #KCLM) wird in die Küvette pipettiert, und das Gemisch wird rasch in ein Röhrchen gegossen (die Transformationseffizienz wird verringert, wenn zugelassen wird, dass sich die Zellen in der Küvette absetzen)
 - das Röhrchen wird auf Eis gestellt, bis alle Proben verarbeitet werden
 - es wird zugelassen, dass sich die Zellen bei 37°C während 30 bis 60 Minuten erholen
 - LB + amp-Platten werden mit Nitrocellulosefiltern bedeckt (die Anzahl der Kolonien ist etwa 20% höher, wenn die Zellen sich 60 Minuten erholen, was möglicherweise auf die Zellreplikation zurückzuführen ist). (Die beste Koloniedichte für das Screenen ist 500 pro Platte. Für die vorliegende Charge an Zellen soll etwa 500 bis 750 µl plattierte werden).

H. Rekombinationsmutageneseprotokoll oder DNA-shuffling

Verdauung von Plasmid-DNA mit DNase I

1. Es wird ein 2% Gel mit niedrigem Schmelzpunkt hergestellt
 - es wird 0,8 g Agarose in 40 ml verwendet (NuSieve #50082)
 - es wird ein Kamm für große Präparationen verwendet
 - es wird sichergestellt, dass das Gel vor der Verdauung verfestigt ist.
2. Es werden 4 µg vereinigte Plasmid-DNA für die Verdauung präpariert.
3. Es wird eine 1 U/µl-DNase-Verdünnung auf Eis gemäß der nachstehenden Tabelle präpariert:

Tabelle 8

| | |
|----------------------|---------|
| DNase I ⁺ | 0,74 µl |
| 10X-DNase-I-Puffer | 10 µl |
| 1% Gelatine* | 10 µl |
| Wasser auf 100 µl | |

*DNase I von Sigma (D5791)

*Gelatine wurde zugegeben, um zu verhindern, dass DNase I an die Wände der Röhrchen haftet. Diese Verdünnung kann mindestens 30 Minuten ohne Aktivitätsverlust auf Eis gehalten werden.

4. Verdauung (bei Raumtemperatur):

- es werden 2 Verdauungen mit 1,0 U und 1,5 U DNase I pro 100 µl Reaktion präpariert:
- 10 µl 10X-DNase-I-Puffer (500 mM Tris, 10 mM MgCl₂, pH 7,8)
 - x µl DNA (2 µg vereinigte Plasmid-DNA aus Stufe 2)
 - 1 oder 1,5 µl 1 U/µl Enzymverdünnung
 - steriles nanoreines Wasser auf 100 µl
 - Inkubation bei Raumtemperatur während 10 Minuten
 - Abbrechen der Reaktion durch Zugabe von 1 µl 100 mM CDTA.

Reinigung aus dem Agarosegel

1. Auftrennen der mit DNase verdauten Fragmente auf einem Gel

- Zugabe von 10 µl 10X-Ladungspuffer zu jeder der DNase-I-Verdauungen
- Laden aller Proben auf ein 2% Agarosegel mit niedrigem Schmelzpunkt
- Durchführen des Gellaufs etwa 30 Minuten bei 120–150 V
- Laden von pGEM-DNA-Marker in die mittlere Bahn.

2. Isolieren der Fragmente

- Ausschneiden des Agaroseteils, der die Fragmente im Größenbereich von 600–1000 bp enthält, mit einer Rasierklinge
- Schneiden des Teils in Teile mit einem Gewicht von etwa 0,3 g
- Schmelzen der Gelteile bei 70°C
- Zugeben von 300 µl Phenol (äquilibriert mit NaCl/Tris) zu der geschmolzenen Agarose, Vortexen bei etwa 1 Minute bei maximaler Geschwindigkeit
- Zentrifugieren bei 4°C während 10 Minuten
- Entfernen der oberen Schicht in ein Röhrchen, welches ein identisches Volumen von Phenol/Chloroform/Isoamyl (gesättigt mit 300 mM NaCl/100 mM Tris, pH 8,0) enthält, Vortexen und Zentrifugieren während 5 Minuten bei Raumtemperatur
- Entfernen der oberen Schicht in ein Röhrchen, das Chloroform enthält, und Vortexen und Zentrifugieren.
- Entfernen der oberen Schicht in ein Röhrchen mit 2 Vol. 95% kaltem Ethanol; Stellen des Röhrchens in einen –70°C Gefrierschrank während 10 Minuten (es ist wegen des Hochsalzphenols kein zusätzliches Salz erforderlich)
- Zentrifugieren bei 4°C während 15 Minuten
- Waschen mit 70% Ethanol, Entfernen des Ethanols und Lufttrocknen während etwa 10 Minuten
- Resuspendieren in 25 bis 50 µl sterilem nanoreinem Wasser
- Lagern bei –70°C bis zur Verwendung

Verknüpfungsreaktion

[0251] Es werden 4 Reaktionen (vergleiche Tabelle 9) bereitgestellt und dann vereint.

Tabelle 9

| Komponente | Konzentration | Menge in µl | Endkonzentration |
|-------------------|---------------|-------------|------------------|
| dATP | 10 mM | 1 | 200 µM |
| dCTP | 10 mM | 1 | 200 µM |
| dGTP | 10 mM | 1 | 200 µM |
| dTTP | 10 mM | 1 | 200 µM |
| DNA* | 1-10 ng | 5 | |
| Tli | 3 U/µl | 0,4 | 0,24 U/µl |
| 10X-Thermopuffer | 10X | 5 | 1X |
| MgCl ₂ | 25 mM | 4 | 2 mM |
| Gelatine | 1% | 5 | 0,1% |
| Wasser | | auf 50 µl | |

*Weil die für diese Reaktion eingesetzte DNA fragmentiert worden ist, ist es schwierig, eine Konzentration anzugeben. Am einfachsten ist es, 5 µl der mit DNase I verdauten DNA auf ein Agarosegel zu laden und den Gellauf durchzuführen, bis der Farbstoff durchgewandert ist (1-2 Minuten). Fragmente aus einer typischen Verdauung von 2 µg DNA, die in 100 µl Wasser resuspendiert worden sind, ergeben eine DNA-Konzentration von etwa 1 bis 10 ng/µl.

Zyklusbedingungen: 94°C während 30 Sekunden (94°C während 20 Sekunden, 65°C während 1 Minute, 72°C während 2 Minuten) 25X

Amplifizierung der Verknüpfung

[0252] Üblicherweise ergeben 5 Amplifikationsreaktionen (vergleiche Tabelle 10) genügend DNA für einen vollständigen 8-Platten-Roboterlauf.

Tabelle 10

| Komponente | Konzentration | Menge in µl | Endkonzentration |
|------------------------------------|---------------|------------------|------------------|
| dATP | 10 mM | 1 | 200 µM |
| dCTP | 10 mM | 1 | 200 µM |
| dGTP | 10 mM | 1 | 200 µM |
| dTTP | 10 mM | 1 | 200 µM |
| pRAMtailUP* | 20 pmol/µl | 2 | 0,8 pmol/µl |
| pRAMtailDN* | 20 pmol/µl | 2 | 0,8 pmol/µl |
| Pfu native Polymerase ⁺ | 2 U/µl | 1 | 0,04 U/µl |
| 10X native Pfu-Puffer ^o | 1X | 5 | 1X |
| DNA | 1-10 ng | 5 | |
| Wasser | | Wasser auf 50 µl | |

* Anmerkung: Die Konzentration der Primer ist zweimal so hoch wie in einer typischen Amplifikationsreaktion.

^o Der Pfu-10X-Puffer enthält 20 mM MgCl₂, sodass die Zugabe von MgCl₂ nicht erforderlich ist.

⁺ Pfu-Polymerase wurde von Stratagene part #600135 gekauft.

Zyklusbedingungen: 94°C während 30 Sekunden (94°C während 20 Sekunden, 65°C während 1 Minute, 72°C während 3 Minuten) 25X

Subklonieren der Verknüpfungsamplifikation

[0253] Reinigen der Amplifikationsprodukte mit Wizard PCR purification:

- Vereinigen der 5 Amplifikationsreaktionen
- Übertragung in ein neues Röhrchen, das 100 µl Direct Purification buffer enthält
- Zugabe von 1 ml Wizard PCR Purification Resin, Inkubieren bei Raumtemperatur während 1 Minute
- Leiten des Harzes durch eine Wizard-Minisäule
- Waschen mit 80% Ethanol und Zentrifugieren in einer Mikrozentrifuge, um überschüssiges Ethanol zu entfernen
- Elution mit 88 µl steriles nanoreinem Wasser (wobei zugelassen wird, dass das Wasser mindestens 1 Minute auf der Säule verbleibt)

2. Verdauen mit Sfi I

- 2 µl Sfi I
- 10 µl 10X-Puffer B
- 88 µl DNA von der Wizard-PCR-Präparation

– Mischen der Komponenten und Überschichten mit 2 Tropfen Mineralöl; Inkubieren bei 50°C während 1 Stunde.

3. Isolierung der Bande:

Manchmal wird nach der Amplifikation der Verknüpfungsreaktion eine Bande erzeugt, die kleiner ist als das Fragment in der Größe des Gens. Dieses kleine Fragment wurde etwa 10-mal häufiger subkloniert als das Fragment in der Größe des Gens, wenn keine Bandenisolierung der Probe durchgeführt wurde. Wenn diese kontaminierende Bande vorhanden ist, ist es notwendig, nach der Sfi-I-Verdauung eine Bandenisolierung durchzuführen.

- Laden der DNA auf ein 0,7% Agarosegel
- Bandenisolierung und Reinigung mit dem Gene Clean kit von Bio 101
- Elution von DNA mit 50 µl steriles nanoreinem Wasser, Überprüfen der Konzentration auf dem Gel (diese Art der Reinigung mit Standardagarose führte zur höchsten Anzahl an Transformanten nach dem Subklonieren. Ein anderes Verfahren, das versucht wurde, war folgendes: Niedrig schmelzende Agarose mit Phenolchloroform, Gene clean mit niedrig schmelzender Agarose, Wizard PCR Harz mit Standardagarose, Pierce Xtreme spin Säule mit niedrig schmelzender Agarose (funktionierte nicht mit Standardagarose)).

4. Ligation in pRAM [+/-]-Rückgrat: (Vergleiche das vorstehende Ligations- und Transformationsprotokoll)

Präparation des pRAM-Rückgrats im Großmaßstab

1. Ausstreichen von pRAMMCS [+/-] auf einer LB-amp-Platte (Dieser Vektor enthält ein synthetisches Insert mit einer Sac-II-Stelle anstelle eines Gens. Dieser Vektor enthält die neue Ribosomen-Bindungsstelle, wird jedoch ausgeschnitten, wenn der Vektor mit Sfi I verdaut wird).

2. Präparieren einer 10 ml-Übernachtkultur in LB, supplementiert mit amp.

3. Am nächsten Tag wird 1 l LB, supplementiert mit amp, angeimpft und es wird 16–20 Stunden gezüchtet.

4. Reinigen der DNA mit Wizard Maxi Prep kit (Promega #A7270) (Verwendung von 4 Präparationen für 1 l Zellen).

5. Verdauen des Plasmids mit Sfi I. (Verwendung von 5 U pro Mikrogramm), Überschichten mit Mineralöl und Verdauung während mindestens 2 Stunden.

6. Ethanolausfällung, um Salze zu entfernen. Resuspendieren in Wasser.

7. Verdauen mit Sac II während 2 Stunden. (Das Verdauungsreaktionsvolumen wird bei 2 ml oder weniger gehalten). Es ist möglich, dass ein Teil des Plasmids teilweise verdaut wird. Wenn der Vektor mit einem Enzym geschnitten wird, das innerhalb der 2 Sfi-I-Stellen schneidet, wird verhindert, dass die teilweise verdauten Fragmente in einer Ligationsreaktion verknüpft werden.

8. Die gesamte Verdauungslösung wird auf eine Säule geladen (vergleiche 9). Das Volumen der Probenladung sollte nicht mehr als 2 ml sein. Wenn dies jedoch der Fall ist, wird eine Ethanolausfällung erforderlich.

9. Die Säule enthält Sephadryl S-1000 und wird mit 20% Ethanol gelagert, um Bakterienkontamination zu verhindern. Vor dem Laden der Probe muss die Säule mit kaltem Laufpuffer während mindestens 24 Stunden äquilibriert werden. Wenn sich die Säule länger als einige Monate abgesetzt hat, ist es erforderlich, die Säule zu entleeren, das Harz mit 3–4 Waschdurchgängen mit kaltem Laufpuffer zu äquilibrieren und die Säule neu zu gießen. Nach dem Gießen der Säule sollte sie über Nacht äquilibriert werden, sodass das Harz vollständig gepackt ist.

10. Es werden Fraktionen von etwa 0,5 ml gesammelt. Typischerweise eluiert die DNA zwischen den Fraktionen 25 und 50. Ein 5 µl-Aliquot aus einer Reihe von Fraktionen wird geladen, um zu bestimmen, welche Fraktionen das Rückgratfragment enthalten. Das kleine Insertfragment beginnt zu eluieren, bevor das gesamte Rückgrat eluiert, sodass es erforderlich ist, zurückhaltend zu sein, wenn die Fraktionen vereint wer-

den. Aus diesem Grund gehen typischerweise 40–60% der DNA in dieser Stufe verloren.

11. Vereinigen der Fraktionen, die das Rückgrat enthalten.

12. Ethanolausfällung der Proben. Resuspendieren in einem Volumen, sodass etwa 10–50 ng/µl erhalten werden.

13. Lagern bei –70°C.

[0254] Säulenlaufpuffer: (Lagern bei 4°C)

5 mM EDTA

100 mM NaCl

50 mM Tris-HCl, pH 8,0

10 µg/ml tRNA (R-8759, Sigma)

I. Oligonucleotidmutagenese

[0255] Es wird eine Ampicillin-empfindliche einzelsträngige DNA der zu mutierenden Matrize präpariert. Der Mutageneserprimer wird so konstruiert, dass er alle möglichen Aminosäurecodons zufällig erzeugt.

Mutagenesereaktion:

Tabelle 11

| Komponente | Endkonzentration |
|-----------------------------------------|------------------|
| Einzelsträngige Matrize | 0,05 pmol |
| Mutageneseroligonukleotid | 1,25 pmol |
| Ampicillin Repair Oligo (Promega q631a) | 0,25 pmol |
| 10X-Annealing-Puffer* | 1X |
| Wasser auf 20 µl | |

*10X-Annealing-Puffer:

– 200 mM Tris-HCl, pH 7,5

– 100 mM MgCl₂

– 500 mM NaCl

[0256] Es wird eine Hitzereaktion bei 60°C während 15 Minuten durchgeführt, und unmittelbar danach wird der Reaktionsansatz auf Eis gegeben.

Synthesereaktion:

Tabelle 12

| Komponente | Menge |
|-----------------------------------|---------------------|
| Wasser | 5 µl |
| 10X-Synthesepuffer* | 3 µl |
| T4-DNA-Polymerase (Promega m421a) | 1 µl (10 Einheiten) |
| T4-DNA-Ligase (Promega 180a) | 1 µl (3 Einheiten) |

*10X-Synthesepuffer:

– 100 mM Tris-HCl, pH 7,5

– 5 mM dNTPs

– 10 mM ATP

– 20 mM DTT

[0257] Inkubieren bei 37°C während 90 Minuten.

Transformieren in Mut-S-Stamm BMH 71-18 (Promegastamm Q6321)

– Der Synthesereaktionsansatz wird in ein 17 × 100 mm-Röhrchen gegeben.

– Es werden BMH 71-18 kompetente Zellen, die auf Eis aufgetaut worden waren, zu der Synthesereaktion

gegeben.

- Es wird 30 Minuten auf Eis inkubiert.
- Die Zellen werden bei 42°C während 90 Sekunden hitzeschockiert.
- Es werden 4 ml LB-Medium zugegeben, und die Zellen werden 1 Std. bei 37°C gezüchtet. Es wird Ampicillin auf eine Endkonzentration von 1,25 µg/ml zugegeben, und dann wird über Nacht bei 37°C gezüchtet.

[0258] Die DNA wird mit Wizard Plus Purification system (Promega a7100) isoliert.

[0259] Die isolierte DNA wird in JM109 elektrokompetente Zellen transformiert, und die Zellen werden auf LB-Ampicillinplatten übertragen.

J. Screeningverfahren

[0260] JM109-Klone (aus einer Transformationsreaktion) werden auf Nitrocellulosefilter, die auf LB-amp-Platten gegeben worden waren, in einer Screeningdichte von etwa 500 Kolonien pro Platte plattiert.

[0261] Wie in dem Verfahren zur zufälligen Mutagenese angegeben worden ist, sollten etwa 10% der zu selektierenden Klone mindestens so stabil sein wie die Quelle. Anders ausgedrückt, sollen etwa 50 Kolonien pro Platte für die Selektion geeignet sein. Es sind 704 Löcher für einen vollständigen 8-Plattenroboterlauf verfügbar, sodass mindestens 15 LB-amp-Platten für einen vollständigen Röntgenlauf erforderlich sind.

[0262] Nach der Züchtung über Nacht bei 37°C werden Platten, welche die Transformanten enthalten, aus dem Inkubator entnommen und Raumtemperatur ausgesetzt.

[0263] Der Nitrocellulosefilter wird auf einer Seite angehoben, und 500 µl 10 mM IPTG werden zu jeder der Platten gegeben. Der Filter wird dann auf die Platte zurückgegeben, um die Diffusion von IPTG in die Zellen, die unterschiedliche mutierte Luciferasegene enthalten zu ermöglichen. Die Platten werden dann etwa 4 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

[0264] Ein (1) ml einer Lösung, die 1 mM Luciferin und 100 mM Natriumcitrat enthält, wird auf eine Heizvorrichtung, die auf 50°C eingestellt ist, pipettiert. Ein Nitrocellulosefilter, der mutierte Luciferasekolonien enthält und der mit IPTG behandelt worden war, wird dann auf die Luciferinlösung gegeben. Nach mehreren Minuten werden die hellsten Kolonien mit einem Zahntocher aufgenommen, der dann eingesetzt wird, um Löcher in einer Mikrotiterplatte, die M9-Minimalmedium mit 1% Gelatine enthalten, anzuimpfen.

[0265] Nachdem eine ausreichende Zahl von Kolonien in die 8 Mikrotiterplatten gegeben worden sind, werden die Platten in einen Inkubator bei 30°C gegeben und bei 350 Umdrehungen pro Minute über Nacht gezüchtet.

[0266] Am nächsten Morgen werden die Platten auf den Roboter geladen, und das Zellverdünnungsverfahren wird durchgeführt. (Dieses Verfahren verdünnt die Kulturen 1:10 im Induktionsmedium.) Die neuen Platten werden 3 Stunden bei 350 UpM bei 30°C gezüchtet.

[0267] Nach der Züchtung werden die Platten auf den Roboter gegeben, um den Haupttest durchzuführen.

Minimalmedium:

6 g/Liter Na₂HPO₄

3 g/Liter KH₂PO₄

0,5 g/Liter NaCl

1 g/Liter NH₄Cl

2 mM MgSO₄

0,1 mM

1 mM Thiamin-HCl

0,2% Glucose

12 g/ml Tetracyclin

100 µg/ml Ampicillin

*Das Übernachtmedium enthält 1% Gelatine

*Das Induktionsmedium enthält 1 mM IPTG und keine Gelatine.

- 10 mM NaCl
- 2,5 mM KCl
- 20 mM MgCl₂
- 20 mM Glucose
- 2% Bactotrypton
- 0,5% Hefeextrakt

Zusammenfassung des beispielhaften Evolutionsverlaufs

1. Beginne mit LucPpe2[T249M]
2. Mutiere 3 Aminosäuren am N- und am C-Terminus
3. Mutiere 7 Cysteine
4. Führe 2 Evolutionsdurchläufe durch → Luc49-7C6
5. Mutagenese der geänderten Codons (9)
6. 2 Wiederholungen der Evolution → Luc78-0B10
7. Mutagenese der Konsensus-Codons (28)
8. Mutagenese der Codonnutzung (24) → Luc90-1B5

Eine Wiederholung des rekursiven Verfahrens

1. 1 Klon → 3 Bibliotheken unter Einsatz der fehlerbehafteten PCR
 - 3 × Visuelles Screenen (jeweils etwa 10 000 Klone)
 - 3 × Quantitatives Screenen (jeweils 704 Klone)
2. 3 × 18 Klone → Bibliothek unter Einsatz von sPCR
 - Visuelles Screenen (etwa 10 000 Klone)
 - Quantitatives Screenen (704 Klone)
3. 18 + 18 → Bibliothek unter Einsatz von sPCR
 - Visuelles Screenen (etwa 10 000 Klone)
 - Quantitatives Screenen (704 Klone)
4. Ergebnis: 18 Klone

BEISPIEL 5

Mutagenesestrategie für Klon Luc90-1B5 zu Luc133-1B2 und Luc146-1H2

[0268] Beim Lagern zerfällt Luciferin, und die Abbauprodukte inhibieren Luciferase. Die Produktion von Inhibitoren verursacht eine apparente Instabilität in dem Reagens, das sowohl Luciferase als auch Luciferin enthält. Es gibt zwei Wege, dieses Problem zu verringern: 1) Lagern des Luciferins und der Luciferase bei pH 5,5–6,0, um die Luciferinabbaurate zu verringern und/oder 2) Bereitstellen eines Enzyms, das gegenüber Luciferinabprodukten resistent ist.

[0269] LucPpe2-Mutanten, die durch Evolution aus Klon Luc90-1B5 erhalten wurden, wurden dahingehend einer Evolution unterzogen, dass sie bei niedrigem pH stabiler sind und Resistenz gegenüber Luciferinabbauprodukten aufweisen. Diese mutierten Enzyme sind beispielsweise in einem ATP-Nachweiskit nützlich. Eine Ausführungsform eines solchen Kits umfasst ein Gemisch von Luciferin und Luciferase. Eine Lumineszenzreaktion findet statt, wenn eine Probe, die ATP enthält, zu dem Gemisch gegeben wird.

[0270] 3 Populationen von zufälligen Mutanten wurden unter Verwendung des Klons Luc90-1B5 als Matrize hergestellt. Diese 3 Populationen wurden auf dem Roboter in den Experimenten 114, 115 und 117 gescreent. Die Roboterscreeningverfahren in den Experimenten 114, 115, 116, 117, 118, 119 und 122 wurden wie vorstehend beschrieben durchgeführt, außer dass Puffer C mit Citratpuffer, pH 4,5, anstelle von HEPES-Puffer, pH 7,8, präpariert wurde, und das Assayreagens wurde mit HEPES, pH 7,1, mit 10 µM ATP anstelle von Tricin, pH 8,0, und 175 µM ATP präpariert. Es wurde erwartet, dass diese Screeningbedingungen Klone selektieren, welche die Lumineszenzaktivität bei pH 4,5 und 48°C über einen längeren Zeitraum beibehalten und eine erhöhte Lumineszenzaktivität zeigen, wenn sie bei pH 7,1 mit 10 µM ATP getestet werden. 17 Klone aus Experiment 114, 7 Klone aus Experiment 115 und 10 Klone aus Experiment 116 wurden unter Verwendung von sPCR gemischt, und selektive Mutanten für dieses Screening wurden als Experiment 117 mit dem Roboter getestet. 18 Klone wurden aus Experiment 117 selektiert.

[0271] Der Klon, bei dem festgestellt wurde, dass er die am stärksten verbesserten Eigenschaften hat (erhöhtes Beibehalten der Lumineszenzaktivität über eine längere Zeit bei pH 4,5 und 48°C und erhöhte Lumineszenzaktivität, wenn er bei pH 7,1 mit 10 µM ATP getestet wurde), war Klon Luc117-3C1, der dann als Matrize für die Zufallsmutagenese ausgewählt wurde. 2 Populationen von zufälligen Mutanten wurden gescreent und dann auf dem Roboter als Experimente 118 und 119 getestet. 7 Klone aus dem Experiment 118 und 5 Klone aus dem Experiment 119 wurden ausgewählt.

[0272] Die Klone aus den Experimenten 114, 115, 116, 117, 118 und 119 wurden nach den folgenden Eigenschaften selektiert: hellere Lumineszenz als Luc90-1B5 und erhöhtes Beibehalten der Lumineszenzaktivität über einen längeren Zeitraum bei pH 4,5. Diese selektierten Klone wurden vermischt und als Experiment 122 mit dem Roboter getestet. 11 Klone aus diesem Experiment wurden ausgewählt.

[0273] 3 Populationen von Zufallsmutanten wurden aus dem Klon Luc122-4D5 präpariert und als Experimente 125, 126 und 127 mit dem Roboter getestet. 13 Klone aus dem Experiment 125, 4 Klone aus dem Experiment 126 und 3 Klone aus dem Experiment 127 wurden vermischt und als Experiment 128 mit dem Roboter getestet. Für die Experimente 125, 126, 127 und 128 wurde das Screening auf K_m geändert, um Klone zu selektieren, die gegenüber Luciferinabbauprodukten resistenter sind. Die Klone wurden auch auf die Beibehaltung der Lumineszenz bei pH 4,5 über die Zeit gescreent.

[0274] Anstelle des Screenens auf Substratnutzung wurde ein Screenen auf Resistenz gegenüber Inhibitoren durchgeführt. Anstelle der 0,06X-Verdünnung von Substraten wurde ein 75:25-Gemisch von D zu L Luciferin in 1X-Assaypuffer eingesetzt und als "0,75X" bezeichnet. Anstelle der 0,02X-Verdünnung von Substraten wurde ein 50:50-Gemisch von D zu L Luciferin in 1X-Assaypuffer eingesetzt und als "0,5X" bezeichnet. Der 1X-Assaypuffer in diesen Experimenten enthielt das Folgende: 10 µM ATP, 50 mM HEPES, pH 7,8, 8 mM MgSO₄ und 0,1 mM EDTA. Die 0,75X-Probe enthielt 75 µM D-Luciferin und 25 µM L-Luciferin. Die 0,5X-Probe enthielt 50 µM D-Luciferin und 50 µM L-Luciferin. Die 1X-Probe enthielt 250 µM D-Luciferin. Eine K_m -Regression wurde wie vorstehend beschrieben durchgeführt, und der K_m -Wert wurde berechnet. Normalisierte Werte von größer als 1 zeigen eine höhere Resistenz gegen den Inhibitor an. Klone aus diesen Experimenten, die eine höhere Resistenz gegen L-Luciferin aufwiesen, waren auch resistenter gegen Luciferinabbauprodukte.

[0275] Um die Resistenz gegen den Inhibitor in dem Robotersystem einfacher messen zu können, wurde eine neue Variable "Q" eingeführt. Die Variable "Q" ersetzt die vorher verwendete Variable K_m . Das Lumineszenzverhältnis wird auf dieselbe Weise wie bei der K_m -Messung durchgeführt, dann wird der natürliche Logarithmus (ln) jedes Lumineszenzverhältnisses berechnet (Y-Achse). Die X-Achse ist eine willkürliche Zeit, die durch den Benutzer eingeführt wird. Der erste Zeitpunkt ist Null, und die Proben werden mit einem 1X-Assaypuffer gemessen, der 250 µM D-Luciferin enthält. Die nächsten zwei Zeitpunkte haben denselben Zeitwert (d.h. 4 Stunden, um die Inkubation von Luciferin zu stimulieren), und Proben werden mit 1X-Assaypuffer gemessen, der ein 50:50-Gemisch (wie vorstehend beschrieben) von D-Luciferin zu L-Luciferin enthält. Eine lineare Regression, die ln (Lumineszenzverhältnis) zu der Zeit korreliert, wird berechnet. Q wird als ln(0,5)/Steigung berechnet. Normalisierte Werte von "Q" von größer als 1 geben eine stärkere Resistenz gegen den Inhibitor an. Experimente 133 und folgende wurden unter Einsatz dieses Programms durchgeführt.

[0276] 16 Klone aus Experiment 128 wurden mit Klonen aus Experiment 122 vermischt und als Experiment 133 mit dem Roboter gemessen. 2 Proben, Luc133-1B2 und Luc133-0D11, wurden als Matrizen für die Zufallsmutagenese ausgewählt und als Experimente 145 beziehungsweise 146 mit dem Roboter getestet. Die Klone, die eine erhöhte Aufrechterhaltung der Lumineszenz über die Zeit bei pH 4,5 und die stärkste Resistenz gegen den Inhibitor zeigten, waren die Klone Luc146-1H2. Überdies hatten bei pH 4,5 und 48°C Luc133-1B2 und Luc146-1H2 bezogen auf Luc90-1B5 eine erhöhte Thermostabilität und eine erhöhte Resistenz gegen den Inhibitor ([Fig. 54–Fig. 61](#)). Ein Vergleich des Lumineszenzsignals für Luc49-7C6, Luc78-0B10, Luc90-1B5, Luc133-1B2 und Luc146-1H2 ist in [Fig. 59](#) gezeigt. Ein Vergleich der Thermostabilität bei 50°C für die Klone Luc49-7C6, Luc78-0B10, Luc90-1B5, Luc133-1B2 und Luc146-1H2 ist in [Fig. 60](#) gezeigt. [Fig. 55–Fig. 58](#) zeigen die kodierende Nucleotidsequenz und die abgeleitete Aminosäuresequenz von Luc133-1B2 und Luc146-1H2.

Materialien und Methoden

Test, um die Resistenz gegen Luciferaseinhibitor nachzuweisen

[0277] Eine 10 mM-Stammlösung von Luciferin wird bei 50°C in 50 mM HEPES, pH 7,8, inkubiert, um die Herstellung von Luciferinabbauprodukten zu beschleunigen. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wird ein Aliquot

entfernt und dann bei –20°C gelagert. Nach dem vollständigen Ablauf der Inkubation wird das Testreagens (100 µM Luciferin, 1 µM ATP, 50 mM HEPES, pH 7,8, und 8 mM MgSO₄) mit Luciferin aus jedem der unterschiedlichen Zeitpunkten hergestellt, und ein verdünntes Lysat wird dann mit jedem Testreagens getestet.

[0278] Das Lysat wird wie folgt hergestellt. Übernachtkulturen von zu testenden Klonen werden in LB, supplementiert mit 100 µg/ml AMP, hergestellt. Die Kulturen werden 1:10 in M-9-Minimalmedium, supplementiert mit 1 mM IPTG, 100 µg/ml AMP, verdünnt und 3 Stunden bei 30°C gezüchtet. 45 µl Zellen werden dann mit 20 µl Puffer A gemischt und eingefroren. Das Gemisch wird aufgetaut, es werden 175 µl Puffer B zugegeben, und das erhaltene Gemisch wird in Puffer C 1:10 verdünnt. Dann wird eine Regression der Lumineszenz gegen die Zeit der Luciferininkubation berechnet, und aus diesem Graph wird die Halbwertszeit extrapoliert. Eine längere Halbwertszeit bedeutet, dass die getestete Mutante resistenter gegen Luciferinabbauprodukte ist.

HINTERGRUNDBEISPIEL 6

Mutagenesestrategie für LucPplYG zu Klon Luc81-6G01

[0279] Die Luciferasen aus dem Leuchtkäfer Pyrophorus plagiophthalmus hatten in früheren Experimenten gezeigt, dass sie unterschiedliche Farben der Lumineszenz erzeugen (LucPpl). Die Analyse dieser Luciferasen zeigte, dass die unterschiedlichen Farben durch diskrete Aminosäuresubstitutionen in ihren Aminosäuresequenzen verursacht wurden. Dies ermöglichte es, ein Paar von genetischen Reportern zu erzeugen, die mehrere Lumineszenzsignale emittieren können, sodass eine Quantifizierung von zwei biomolekularen Ereignissen gleichzeitig innerhalb desselben lebenden Systems durchgeführt werden konnte.

[0280] LucPpl mit einer substituierten Aminosäure wurde mit den folgenden Eigenschaften hergestellt:

Physikalische Stabilität der Luciferasen

[0281] Obwohl die Lumineszenzaktivität von LucPpl innerhalb der Kolonien von E. coli bis über 60°C thermostabil zu sein schienen, hatten die Lysate dieser Luciferasen relativ geringe Stabilität. Insbesondere waren sie in Anwesenheit von Triton X-100 instabil. Wenn Lysate, welche die im Allgemeinen eingesetzte Feuerfliegen-luciferase enthielt, präpariert wurden, behielt das Enzym mehr als 90% seiner Aktivität während 5 Stunden bei Raumtemperatur. Im Gegensatz dazu nahm die Aktivität der LucPpl-Luciferasen über denselben Zeitraum um ein Mehrfaches ab.

[0282] Die Thermostabilitäten der LucPpl-Luciferasen befinden sich auch in der Nähe der physiologischen Temperatur von Säugerzellen. Die grüne Licht emittierende Luciferase (LucPplGR) und die rote Licht emittierende Luciferase (LucPplIRD) hatten unterschiedliche Thermostabilitäten, was zu Unterschieden im Verhalten als genetische Reporter innerhalb der Zellen führen konnte. Der Einfluss der Temperatur sollte in der Nähe des Denaturierungspunktes der Enzyme am größten sein, wo kleine Änderungen der Temperatur zu einer großen Wirkung auf die Proteinstruktur führen. Im Gegensatz dazu hat die Temperatur eine viel geringere Auswirkung auf die Proteinstruktur, wenn sie weit unter dem Denaturierungspunkt liegt. Somit sind die unterschiedlichen Wirkungen auf die 2 Enzyme, welche leicht unterschiedliche Denaturierungstemperaturen haben, bei relativ niedrigen Temperaturen geringer. Es könnte daher bevorzugt sein, die Denaturierungstemperatur des Reporterenzymes deutlich über der Wachstumstemperatur der Säugerzellen zu haben.

Überlappen der Spektren der Luciferasen

[0283] Obwohl ein Verfahren entwickelt wurde, um jede Luciferase in einem Gemisch unter Verwendung von Farbfiltern zu quantifizieren, ist die Möglichkeit, zwischen den Luciferasen zu unterscheiden, durch diese spektrale Überlappung gering. Diese Überlappung reduziert die Fähigkeit, beide Luciferasen genau zu messen, wenn ihre Lumineszenzintensitäten sich um mehr als das 10-fache unterscheiden. Wenn die Intensitäten sich um mehr als das 50-fache unterscheiden, wird das Lumineszenzsignal der schwächeren Luciferase durch die andere überdeckt. Somit könnte es bevorzugt sein, die Lumineszenzspektren der 2 Luciferasen weiter aufzutrennen.

[0284] Es wurden viele unterschiedliche Mutationen identifiziert, welche das Lumineszenzspektrum nach Rot verschoben. Die Grenze für die Rot-Lumineszenz scheint jedoch bei etwa 620 nm zu sein. Eine weitere Verschiebung des Spektrums der roten Licht emittierenden Luciferase nach noch längeren Wellenlängen könnte vorteilhaft sein. Es wurde gefunden, dass nach Grün verschobene Mutationen selten waren, eine umfangreiche Analyse wurde jedoch nicht durchgeführt. Messungen von nativen Luciferasen zeigen einige Beispiele von

Lumineszenz unter 530 nm, etwa 15 nm unter dem grünes Licht emittierenden Prototypenzy.

Differenzielle physikalische und enzymologische Eigenschaften

[0285] Idealerweise sollten die 2 Luciferasenreporter in allen Eigenschaften, außer der Farbe der Lumineszenz, identisch sein. Wie jedoch vorstehend ausgeführt wurde, ist die physikalische Stabilität der Luciferasen nicht identisch. Es wurde auch gefunden, dass Mutationen, die zu einer rot-verschobenen Lumineszenz führten, auch eine Erhöhung des K_m -Wertes für Luciferin bewirkten. Obwohl einige dieser Unterschiede nicht vermieden werden können, ist es nicht klar, ob diese Eigenschaften grundsätzlich miteinander in Verbindung stehen. Beispielsweise haben Luciferasen aus unterschiedlichen Käferspezies manchmal deutlich unterschiedliche K_m -Werte, obwohl ihre Luminesenzspektren ähnlich sind. Es könnte sein, dass die Unterschiede, die mit der Entwicklung einer rotes Licht emittierenden Luciferase zusammenhängen, auf die gleichzeitigen Störungen der Integrität der Enzymstruktur zurückzuführen sind, da die Thermostabilität eines Prototyps der rotes Licht emittierenden Luciferase erhöht wurde, ohne dass das Luminesenzspektrum signifikant verändert wurde.

Stabile Lumineszenzsignale

[0286] Als die Feuerfliegenluciferase zum ersten Mal als genetischer Reporter beschrieben wurde, war das Lumineszenzsignal ein relativ kurzer Lichtblitz, der durch Injektion des Reaktionssubstrats verursacht wurde. Die nachfolgende Entwicklung der Lumineszenzchemie machte den Test einfacher, indem ein stabiles Signal über mehrere Minuten ermöglicht wurde. Derzeit sind solche stabilisierten Tests für Laboranwendungen Standard. Um jedoch ein Hochdurchsatzscreenen in der pharmazeutischen Forschung zu ermöglichen, wurde das Lumineszenzsignal weiter stabilisiert, um es über mehrere Stunden zu verlängern. Dies war erforderlich, um ausreichend Zeit bereitzustellen, um mehrere tausend Proben in einer Charge zu testen. Obwohl das Lumineszenzsignal der neuen Luciferasen über Minuten stabil war, zeigten sie keine verlängerte Signalstabilität, die für das Hochdurchsatzscreenen erforderlich wäre. Es wäre deshalb bevorzugt, wenn die Signalstabilität weiter erhöht werden könnte, während gleichzeitig die anderen Eigenschaften optimiert werden.

Verfahren zur Optimierung der Luciferaseleistungsfähigkeit

[0287] Um Luciferasen mit bestimmten Leistungsfähigkeiten herzustellen, wurde ein Verfahren für die in vitro Evolution der Enzymfunktion wie vorstehend beschrieben durchgeführt. Kurz beschrieben ist das Verfahren ein rekursives Verfahren zur Erzeugung von zufälligen Mutationen und zum Screenen auf gewünschte Eigenschaften. Es wurde ursprünglich hauptsächlich zur Erhöhung der Thermostabilität von Luciferasen entwickelt, obwohl andere enzymologische Eigenschaften auch der Optimierung durch die Screeningkriterien unterliegen. Eine leicht veränderte Strategie wurde angewandt, um die vorstehend beschriebenen Eigenschaften zu erhalten, da 2 verwandte Luciferasen gleichzeitig optimiert werden mussten.

[0288] Ursprünglich wird ein einzelnes Prototypenzy einer in vitro Evolution unterworfen, um die physikalische Stabilität und das Lumineszenzsignal zu optimieren. In diesem Verfahren werden auch die Mutantenbibliotheken auf beliebige neue Mutationen gescreent, welche zu Farbveränderungen führen. Besonders betont wird die Isolierung von nach Grün verschobenen Mutanten.

[0289] Nach der ursprünglichen Optimierung eines allgemeinen Prototyps wird ein grünes Licht und rotes Licht emittierende Form des Enzyms erzeugt, und diese Formen werden getrennt voneinander weiter optimiert, um ihre physikalischen und chemischen Eigenschaften zu harmonisieren. Besonderes Augenmerk wird auf ihre physikalischen Stabilitäten und ihre Substratbindungsconstanten, insbesondere für Luciferin, gelegt.

[0290] Die Wahl des ursprünglichen Prototyps für die Optimierung viel auf die gelb-grünes Licht emittierende Wildtypluciferase, die aus Leuchtkäfern isoliert wurde (LucPpIYG). Unter den Luciferasen, die ursprünglich aus *P. plagiophthalmus* kloniert wurden, produzierte diese die hellste Lumineszenz, wenn sie in *E. coli* exprimiert wurde. Außerdem bestand die Gefahr, dass keine nach Grün verschobene Mutation resultierte, weil die vorherigen Mutagenesetests unter Verwendung von Luciferase durchgeführt wurden, die bereits die grünste Lumineszenz aufwies. Es war möglich, dass wenn eine zusätzliche nach Grün verschobene Mutation vorhanden war, diese sich deutlicher zeigte, wenn sie in einem nach Rot verschobenen Hintergrund gemessen wurde. Die Mutagenese wurde wie folgt durchgeführt:

Entfernen der Peroxisomen-Zielsequenz

[0291] Das Translokationssignal am C-Terminus der Luciferasen wurde entfernt. Dies wurde unter Einsatz der

Oligonucleotid-gerichteten Mutagenese durchgeführt, um die normale Sequenz -KSKL in -XXX* zu verändern (wobei X eine beliebige Aminosäure darstellt und * ein Terminationscodon darstellt). Mehrere Kolonien, welche zu heller Lumineszenz führten, wurden selektiert und als Matrizen für die nächste Mutagenesestufe eingesetzt.

Entfernen der sensitiven Cysteine

[0292] Die Luciferasen aus *P. plagiophthalmus* hatten 13 Cysteine, welche potenziell gegen Oxidation empfindlich sind. Dies ist im Gegensatz zu der üblicherweise eingesetzten Feuerfliegenluciferase, die nur 4 Cysteine hat. Um jegliche Cysteine zu entfernen, welche die Enzymstabilität begrenzen könnten, wurde eine Oligonucleotid-gerichtete Mutagenese durchgeführt, um die Cysteincodons zu randomisieren. 3 Sätze von Oligonucleotiden wurden eingesetzt: nicht-konservierte Cysteine in Regionen mit geringer Sequenzhomologie (Positionen 69, 114, 160, 194, 335 und 460), nicht-konservierte Cysteine in Regionen höherer Sequenzhomologie (Positionen 127, 213, 310 und 311), und hochkonservierte Cysteine (Positionen 60, 80 und 388). Die besten Klone jedes Screenings wurden isoliert, und es wurde durch sPCR eine neue Mutantenbibliothek erstellt und erneut gescreent. Bei der Screeningtemperatur von 29°C verringerte sich die Aktivität der gelb-grünes Licht emittierenden Wildtypluciferase während 10 Stunden um etwa das 500-fache. Die Aktivität der stabilsten Mutante (Luc20-4C10) war stabiler, wobei die Aktivität etwa nur um das 2-fache sank.

Erster Zyklus der Zufallsmutagenese

[0293] Unter Einsatz des vorstehend beschriebenen Verfahrens wurden 3 Mutantenbibliotheken unter Einsatz der fehlerbehafteten PCR erzeugt und gescreent. Die besten Mutanten daraus wurden in eine neue Bibliothek durch sPCR rekombiniert und erneut gescreent. Schließlich wurden die besten Klone dieses Screenings mit den besten Klonen aus der vorherigen Oligonucleotidgerichteten Mutagenese durch sPCR rekombiniert und erneut gescreent. Bei 41°C verringerte sich die Aktivität der besten Mutante aus diesem Verfahren (Luc30-4B02) während 10 Stunden um das 63-fache, während die Aktivität der Ausgangsmutante (Luc20-4C10) um mehr als das 100 000-fache sank.

Sequenzanalysen

[0294] 6 der besten Mutanten aus dem letzten Screening wurden isoliert und sequenziert. Diese zeigten, dass die Aminosäuren an 16 Positionen in den 6 Klonen verändert worden waren. 13 Positionen wurden in der bevorzugten Mutante, Luc30-4B02, verändert. 4 der Änderungen befanden sich am C-Terminus in einem isolierten Mutanten, wo die Oligonucleotidmutagenese die Wildtypequenz von -KSKL zu AGG* verändert hatte. Nur 2 der Cysteine waren durch die vorherige Oligonucleotidmutagenese verändert worden; ein hochkonserviertes Cystein in Position 60 wurde durch Valin ersetzt, und ein mäßig konserviertes Cystein in Position 127 wurde durch Threonin ersetzt. Die verbleibenden Aminosäureänderungen waren alle auf Punktmutationen in der DNA zurückzuführen, was mit der fehlerbehafteten PCR übereinstimmte. Interessanterweise veränderten 3 dieser Mutationen die Aminosäure in diejenige, die in der grünes Licht emittierenden Wildtypluciferase gefunden wurde (2 in der Mutante Luc30-4B02). 4 der verbleibenden Änderungen näherten die mutierten Sequenzen an die Konsensus-Aminosäure unter den anderen klonierten Käferluciferassen an (2 in der Mutante Luc30-4B02) ([Fig. 19B](#)). 4 zusätzliche Codons wurden ohne Auswirkung auf die Aminosäuresequenz verändert.

Ortsgerichtete Mutagenese

[0295] Um das Potenzial der in den sequenzierten Mutanten identifizierten Mutationen weiter zu untersuchen, wurden zusätzliche Mutageneseexperimente unter Einsatz von Oligonucleotiden durchgeführt. 8 der Codons, die durch fehlerbehaftete PCR mutiert wurden, wurden randomisiert oder teilweise randomisiert unter Einsatz der Oligonucleotid-gerichteten Mutagenese. 4 der verbleibenden Cysteincodons wurden randomisiert; 2 hochkonservierte Cysteine (Positionen 80 und 388) und 2 Cysteine in einer Region der Sequenzhomologie (Positionen 310 und 311). Ein Leucin wurde in ein Leucin/Prolin mutiert; Prolin ist die Konsensus-Aminosäure der anderen Käferluciferassen.

[0296] Die Mutagenese wurde mit 4 Sätzen von Oligonucleotiden durchgeführt (Tabelle 13), und die besten Klone aus jedem Satz wurden selektiert. Diese wurden durch sPCR mit den selektierten Klonen aus der vorherigen Zufallsmutagenese rekombiniert und erneut gescreent. Die Aktivität des besten Klons aus diesem Verfahren (Luc47-7A11) verringerte sich bei 42°C 2,3-fach; die Aktivität des Ausgangsklons (Luc30-4B02) verringerte sich mehr als 2000-fach.

Tabelle 13

| Experiment | Mutationen |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Satz A | $C_{80} \rightarrow X + K_{84} \rightarrow X + I_{91} \rightarrow (F, L, I, M, V, S, P, T, A)$ |
| Satz B | $I_{288} \rightarrow (F, L, I, M, V, S, P, T, A) \quad C_{310} \rightarrow X + C_{311} \rightarrow X$ |
| Satz C | $G_{351} \rightarrow (I, M, V, T, A, N, K, D, E, S, R, G) + L_{350} \rightarrow (L, P) + S_{356} \rightarrow P + L_{359} \rightarrow (F, L, I, M, V, S, P, T, A)$ |
| Satz D | $C_{388} \rightarrow X + V_{389} \rightarrow (N, Y, N) \quad K_{457} \rightarrow X$ |

Zweiter Zyklus der Zufallsmutagenese

[0297] Das Zufallsmutageneseverfahren unter Einsatz der fehlerbehafteten PCR wurde erneut auf den besten Klon aus der Oligonucleotid-gerichteten Mutagenese (Luc47-7A11) angewandt. Es wurden erneut 3 Bibliotheken erzeugt und gescreent, und die selektierten Mutanten wurden durch sPCR rekombiniert und erneut gescreent. Nach der Rekombination verringerte sich die Aktivität der besten Mutante (Luc53-0G01) bei 43°C 1,2-fach. Der Ausgangsklon (Luc47-7A11) verringerte sich 150-fach. Nach Rekombination der besten dieser neuen Mutanten mit den besten Mutanten aus der vorherigen Oligonucleotid-gerichteten Mutagenese verringerte sich die Aktivität der neuen besten Mutante (Luc55-2E09) bei 47°C um das 31-fache im Vergleich zum 80-fachen für den Ausgangsklon (Luc53-0G01).

Dritter Zyklus der Zufallsmutagenese

[0298] Das Zufallsmutageneseverfahren wurde unter Verwendung des besten Klons aus dem vorherigen Zyklus der Mutagenese (Luc53-0G01) wiederholt. Nach der Rekombination der selektierten Mutanten mit den Mutanten aus dem zweiten Zyklus der Mutagenese verringerte sich die Aktivität des besten Klons (Luc81-6G01) bei 47°C um das 100-fache im Vergleich zu dem 750-fachen für den Ausgangsklon (Luc53-0G01). Die Diskrepanz der gemessenen Aktivität von Luc53-0G01 in diesem Mutagenesezyklus im Vergleich zu dem vorherigen Zyklus kann auf die Veränderung des Testverfahrens und der Neueinstellung der Inkubatortemperatur zurückzuführen sein. Es sei angemerkt, dass die aufgenommenen Thermostabilitäten aus jeder Stufe der Mutagenese aus den Roboterdaten unter Verwendung verkürzter Testverfahren berechnet wurden. Die Daten sollen die relativen Stabilitäten der Enzymmutanten anzeigen, wenn sie durch dasselbe Screening getestet werden, sie sollen jedoch nicht eine genaue Quantifizierung der Thermostabilität bereitstellen.

Lumineszenz

[0299] Vor der letzten Selektion des besten Klons, aus dem die grünes Licht und rotes Licht emittierenden Luciferasen erzeugt werden sollten, wurde eine weitere Analyse der besten Klone aus dem letzten Screening durchgeführt. Insbesondere 3 Klone waren starke Kandidaten für die finale Auswahl: Luc81-0B11, Luc81-5F01 und Luc81-6G01. Die Luminesenzeigenschaften dieser 3 mutierten Enzyme wurden miteinander verglichen. Sie wurden auch mit der gelb-grünes Licht emittierenden Wildtypluciferase verglichen, um die Wirkung des *in vitro* Evolutionsverfahrens abzuschätzen.

[0300] Aus Kolonien von *E. coli*, welche die Luciferasen exprimierten, produzierten Luc81-5F01 und Luc81-6G01 Lumineszenz bei Raumtemperatur nach Zugabe von Luciferin am schnellsten. Die Lumineszenz war schneller und heller als in den Kolonien, welche die grünes und gelbes Licht emittierenden Wildtypluciferasen exprimierten. Die Lumineszenz aller selektierten Klone waren im Vergleich zu den gelb-grünen Ausgangsklonen nach Grün verschoben. Wenn die Kolonien auf 65°C erwärmt werden, verlieren die gelb-grünen Klone den größten Teil der Lumineszenz, und die Lumineszenz der grünen Klone wird schwächer. Einige der mutierten Klone verlieren ihre Lumineszenz bei 65°C, die 3 bevorzugten Klone verbleiben jedoch hell bis über 70°C. Es zeigten sich keine spektralen Änderungen beim Erhitzen der Kolonien bis über 70°C, wo solche Klone, die immer noch Aktivität hatten, eine leichte Rotverschiebung zeigten (manchmal werden die Anfangsphasen der Enzymdenaturierung von einer Rotverschiebung der Lumineszenz begleitet). Die Luminesenzeigenschaften dieser 3 bevorzugten Mutanten sind ziemlich ähnlich.

[0301] Die Thermostabilität der mutierten Luciferasen in Zelllysaten wurde bei Raumtemperatur verglichen

([Fig. 63](#)). Verdünnte Lysate wurden bei pH 7,5 gepuffert und enthielten 1% Triton X-100; typische Bedingungen für die Lysate von Säugetierzellen. Die Lumineszenzaktivität aller 3 mutierten Enzyme zeigte keine Verringerung nach 20 Stunden, während die Aktivität der gelbgrünes Licht emittierenden Wildtypluciferase deutlich sank.

[0302] Bei den Lumineszenztests, die nur einige Sekunden dauern, produzierten die gelb-grünes Licht emittierenden Wildtypluciferasen ein sehr stabiles Signal (der anfängliche Anstieg des Signals innerhalb der ersten 2 Sekunden ist auf die Ansprechzeit des Luminometers zurückzuführen, nicht jedoch auf die Kinetiken der Lumineszenzreaktion) ([Fig. 64A](#)). Die Signalintensität wurde jedoch um etwa 30% durch die Anwesenheit von 1% Triton X-100 in dem Lysat verringert (1:5 verdünnt durch die Zugabe des Testreagenses). Im Gegensatz dazu wurde die Lumineszenzintensität der mutierten Luciferasen durch die Anwesenheit von Triton X-100 nicht beeinträchtigt. Unter diesen Bedingungen wurde das stabilste Signal von Luc81-6G01 produziert, obwohl die Signalintensität in Luc81-5F01 etwas heller war. Die Daten sind jedoch nicht hinsichtlich der Effizienz der Enzymexpression in *E. coli* korrigiert. Somit kann es sein, dass die Unterschiede in den Lumineszenzintensitäten nicht mit den Änderungen der spezifischen Enzymaktivität korrelieren, und außerdem ist die Expressionseffizienz in *E. coli* für die Expression in Säugetierzellen nicht unbedingt relevant.

[0303] Bei Testchargen, die mehr als 1 Stunde erfordern, ist die Stabilität der gelb-grünes Licht emittierenden Luciferasen unter den getesteten Bedingungen nicht zweckmäßig. Die Lumineszenzintensität verringert sich pro Stunde um ein Mehrfaches ([Fig. 64B](#)). Versuche, dies durch die *in vitro* Evolution auszugleichen, führten zu gemischten Ergebnissen. Die Signalstabilität aller 3 mutierten Enzyme wurde im Allgemeinen gegenüber dem gelbes Licht emittierenden Ausgangsenzym während 3 Stunden nach Substratzugabe verbessert. Dies führte jedoch gleichzeitig zu einem stärkeren anfänglichen Abfall der Lumineszenz während der ersten halben Stunde. Der anfängliche Abfall wäre hinnehmbarer, wenn er schneller stattgefunden hätte, sodass die Verarbeitung der Proben nicht um 30 Minuten verzögert worden wäre, bis sich das Signal stabilisiert. Es kann möglich sein, dieses kinetische Verhalten durch Einstellen der Testbedingungen zu verbessern.

[0304] Unter diesen Mutanten wurde die Mutante Luc81-6G01 als der beste Klon ausgewählt, mit dem nachfolgend die grünes Licht und rotes Licht emittierenden Luciferasen erzeugt werden. Die Sequenz von Luc81-6G01 ([Fig. 46](#) und [Fig. 47](#)) und Luc81-0B11 wurden bestimmt und mit den Sequenzen von Luc30-4B02 aus vorherigen Stufen des *in vitro* Evolutionsverfahrens und mit der gelbes und grünes Licht emittierenden Wildtypluciferase, die als ursprünglicher Ausgangsklon eingesetzt wurde ([Fig. 19B](#)), verglichen. Verglichen mit Luc30-4B02 hatte Luc81-6G01 neue Mutationen in 9 Codons, von denen 8 Änderungen in der Aminosäuresequenz verursachten. 4 dieser 8 Aminosäureänderungen wurden wahrscheinlich durch die Rekombination mit den Klonen, die vor der Isolierung von Luc30-4B02 erzeugt wurden, erzeugt. 2 sind identisch zu den Mutationen, die in anderen Klonen gefunden wurden, die neben Luc30-4B02 sequenziert wurden, und 2 sind Revisionen des Wildtypausgangsstammes. Die verbleibenden 4 Mutationen sind in der Sequenz Luc81-6G01 neu. 2 der neuen Mutationen verändern die Aminosäuresequenz zu der Konsensus-Aminosäure unter den klonierten Luciferasen.

[0305] Interessanterweise gibt es in keiner der Sequenzen von Luc81-6G01 oder Luc81-0B11 einen Hinweis darauf, dass die Oligonucleotid-gerichtete Mutagenese irgendeine vorteilhafte Wirkung hatte. In keinem der Zielcodons traten neue Nucleotidsequenzen auf. Die verbesserte Enzymleistungsfähigkeit nach der Oligonucleotid-gerichteten Mutagenese war offenbar auf die Rekombination von vorher angenommenen Mutationen zurückzuführen. Alle neuen Aminosäureänderungen in Luc81-6G01 und Luc81-0B11 sind an Stellen, die keine Zielstellen der Oligonucleotide sind, und sind auf einzelne Basenmutationen der Codons zurückzuführen, was mit der fehlerbehafteten PCR konsistent ist. Obwohl die neuen Mutationen in Luc81-6G01 in den früheren Sequenzdaten nicht gefunden wurden, ist es nicht sicher, in welcher Stufe des Verfahrens sie erzeugt wurden. Höchstwahrscheinlich wurden sie in dem zweiten oder dritten Zyklus der Zufallsmutagenese produziert. Sie können jedoch auch in den selektierten Mutanten vor Luc30-4B02 vorhanden gewesen sein. Bezogen auf die ursprüngliche gelbes und grünes Licht emittierende Luciferase waren in Luc81-6G01 17 Aminosäureänderungen und 3 Codonmutationen vorhanden, welche die Aminosäuresequenz nicht beeinflussten.

[0306] Die Beobachtung, dass der Beginn der Lumineszenz in den Kolonien von *E. coli* schneller ist als in den neuen Mutanten und dass die Lumineszenz bei höheren Temperaturen heller ist, lässt sich wahrscheinlich auf die Unterschiede in der Proteinexpression zurückführen. Immunoblotanalyse von Zellen, welche die unterschiedlichen Luciferasen exprimieren, zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Menge des vorhandenen Polypeptids. Wie vorstehend angemerkt wurde, ist die höhere Lichtintensität bei höheren Temperaturen auf die erhöhte Thermostabilität der mutierten Luciferasen zurückzuführen. Die apparenten K_m -Werte für ATP und Luciferin wurden im Verlauf der *in vitro* Evolution ebenfalls verändert (Tabelle 14). Um die K_m -Werte abzu-

schätzen, wurden die mutierten Luciferasen aus den Lysaten von *E. coli* durch differenzielle Ausfällung unter Verwendung von Ammoniumsulfat teilweise gereinigt (40–65% Sättigungsfraktion). Die Ergebnisse zeigen, dass die K_m -Werte sowohl für ATP als auch für Luciferase mehr als 10-fach niedriger sind.

[0307] Wenn Luciferin zu einer Luciferase-exprimierenden *E.-coli*-Kolonie gegeben wird, verringert sich die intrazelluläre Konzentration von Luciferin aufgrund der Diffusion durch die Zellmembran allmählich. Somit erreicht die intrazelluläre Luciferinkonzentration bei den Luciferasen mit den niedrigsten K_m -Werten ihre Sättigung eher. Somit erscheinen die mutierten Luciferasen eher heller als die Wildtypausgangsklone. Dies erklärt auch, warum die Lumineszenz des rotes Licht emittierenden Prototypklons in *E.-coli*-Kolonien viel langsamer auftritt als in der grünen Licht emittierenden Luciferase. Die Analyse der K_m -Werte zeigt, dass die Mutationen, die rote Lumineszenz bewirken, auch den K_m -Wert für Luciferin wesentlich erhöhen.

Tabelle 14

| Luciferase | K_m für ATP (μM) | K_m für Luciferin (μM) |
|------------|---------------------------------|---------------------------------------|
| YG Wildtyp | 140 | 21 |
| Luc30-4B02 | 12 | 7,8 |
| Luc81-6G01 | 8,0 | 1,9 |

[0308] Die Analyse des Lumineszenzsignals *in vitro* lässt erwarten, dass die Lumineszenz aus den mutierten Luciferasen schneller nachlässt als in der Wildtypluciferase während der ersten 30 Minuten. Daraus folgt, dass die Lumineszenz in den Mutanten am stabilsten sein sollte. Dies ist jedoch in den Kolonien von *E. coli* nicht beobachtet worden, was daran liegen könnte, dass die Kinetiken der Lumineszenz sich innerhalb der Zellen im Vergleich zu dem verdünnten Enzym in Puffer unterscheiden.

Referenzen

- Bowie, J. U., Reindhaar-Olsen, J. F., Lim, W. A., und Sauer, R. T., Science, (1990) 247: 1306–1310.
 Fromant, M., Blanquet, S., Plateau, P., Analytical-Biochemistry (1995) 224: 347–53.
 Hanahan, D. (1985) in DNA Cloning, v.1.Hg. Glover, D. W. (IRL Press, Oxford, S. 109–135.
 Hastings, J. W., Kricka, L. J., Stanley, P. E., (Hrsg.) Bioluminescence and Chemiluminescence, Molecular reporting with Photons. Chichester: John Wiley & Sons (1996) 248–52.
 Kajiyama, N., Nakano, E., Bioscl. Biotech. (1994) 58(6): 1170–1171.
 Kajiyama, N., Nakano, E., Biochemistry (1993) 32: 13795–13799. Leach et al., Biochimica et Biophysica Acta, (1997) 1339(1): 39–52.
 Saiki, R. K., Gefand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Mullis, K. B., Erlich, H. A., Science (1988) 239: 487–91.
 Stemmer, W. P., DNA (1994) 91: 10747–51.
 Stemmer, W. P., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994) 91: 10747–51. Stemmer, US-Pat. Nr. 5,605,793.
 White, P. J. et al. (Hrsg.) Bioluminescence and Chemiluminescence, Fundamentals and Applied Aspects, Chichester: John Wiley & Sons (1994), 419–422.
 Wood, K. V., Photochemistry and Photobiology (1995) 62: 662–673.
 Wood, K. V., DeLuca, M., Analytical Biochemistry (1987) 161: 501–7.
 Ye, L., Buck, L. M., Schaeffer, H. J., Leach, F. R., Biochimica et Biophysica Acta (1997) 1339: 39–52.

SEQUENZLISTE

<110> Promega Corporation
 <120> THERMOSTABILE LUCIFERASEN UND HERSTELLUNGSMETHODEN
 <130> 341.012W01
 <150> US 09/396,154
 <151> 1999-09-15
 <150> US 09/156,946
 <151> 1998-09-18
 <150> PCT/US98/19494
 <151> 1998-09-18
 <150> US 60/059,379
 <151> 1997-09-19
 <160> 93
 <170> FastSEQ für Windows Version 3.0
 <210> 1
 <211> 1639
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> /Anmerkung = "mutierte Luciferase"
 <400> 1

| | | | | | | |
|--------------|-------------|------------|-------------|--------------|--------------|------|
| ggatccaatg | gcagataaaaa | atattttata | tgggccccaa | ccatTTTATC | ccttggctga | 60 |
| tgggacggct | ggagaacaga | tgttttacgc | attatctcgT | tatgcagata | tttcaggatg | 120 |
| catagcattg | acaaatgctc | atacaaaaga | aaatgtttta | tatgaagagt | ttttaaaatt | 180 |
| gtcgtgtcgt | ttagcggaaa | gttttaaaaa | gtatggatta | aaacaaaacg | acacaatagc | 240 |
| ggtgtgttagc | gaaaatggtt | tgcaattttt | ctttcctata | attgcatcat | tgtatcttgg | 300 |
| aataattgca | gcacctgtta | gtgataaata | cattgaacgt | gaattaatac | acagtcttgg | 360 |
| tattgtaaaa | ccacgcataa | tttttgctc | caagaatact | tttcaaaaag | tactgaatgt | 420 |
| aaaatctaaa | ttaaaatatg | tagaaactat | tattatatta | gacttaaatg | aagactttagg | 480 |
| aggtttatcaa | tgcctcaaca | actttatttc | tcaaaaattcc | gatattaatc | tggacgtaaa | 540 |
| aaaatttaaa | ccatattctt | ttaatcgaga | cgatcaggtt | gcgttggtaa | tgttttcttc | 600 |
| tggtacaact | ggtgtttcga | agggagtcat | gctaactcac | aagaatattg | ttgcacgatt | 660 |
| ttctcttgca | aaagatccta | cttttggtaa | cgcaattaat | ccaacgacag | caattttaac | 720 |
| ggtaataacct | ttccaccatg | gttttggtat | gatgaccaca | ttaggatact | ttacttgtgg | 780 |
| attccgagtt | gttctaatgc | acacgtttga | agaaaaacta | tttctacaat | cattacaaga | 840 |
| ttataaaagtg | gaaagtactt | tacttgtacc | aacattaatg | gcatttcttgc | caaaaagtgc | 900 |
| attagttgaa | aagtacgatt | tatcgcactt | aaaagaaaatt | gcattctggtg | gcgcacctt | 960 |
| atcaaaaagaa | attggggaga | tggtaaaaaa | acggtttaaa | ttaaacttttgc | tcaggcaagg | 1020 |
| gtatggatta | acagaaacca | cttcggctgt | ttaattaca | ccgaacaatgc | acgtcagacc | 1080 |
| gggatcaact | gttaaaatag | taccatttca | cgctgttaaa | gttgcgcata | ctacaacacgg | 1140 |
| aaaaatttttgc | gggccaaatg | aacctggaga | attgtatttt | aaaggcgcaca | tgataatgaa | 1200 |
| aggtttattat | aataatgaag | aagctactaa | agcaattatt | aacaaagacg | gatggttgcgc | 1260 |
| ctctgggtat | attgcttatt | atgacaatga | tggccatttt | tatattgtgg | acaggctgaa | 1320 |
| gtcattaatt | aaatataaaag | gttacgttgc | tgcacctgtc | gaaatttgagg | gaataactt | 1380 |
| acaacatccg | tatattgttg | atgccggcgt | tactggtata | ccggatgaag | ccgcgggcga | 1440 |
| gcttccagct | gcaggtgttgc | tagtacagac | tggaaaatat | ctaaacgaac | aaatcgatcaca | 1500 |
| aaattttgtt | tccagtcaag | tttcaacagc | caaatggcta | cgtggtgggg | tgaardttt | 1560 |
| ggtgaaatt | cccaaaggat | caactggaaa | aattgacaga | aaagtgttaa | gacaaatgtt | 1620 |

tgaaaaaacac accaatggg

1639

<210> 2
 <211> 1639
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Anmerkung = "mutierte Luciferase"

<400> 2

| | | | | | | |
|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|------------|------|
| ggatccaatg | gaagataaaaa | atattttata | tggacctgaa | ccattttatc | ccttggctga | 60 |
| tgggacggct | ggagaacaga | tgttttacgc | attatctcg | tatgcagata | tttcaggatg | 120 |
| catagcattg | acaaatgctc | atacaaaagc | ccctgttta | tatgaagagt | tttaaaatt | 180 |
| gtcgtgtcgt | ttagcggaaa | gtttaaaaaa | gtatggatta | aaacaaaacg | acacaatagc | 240 |
| ggtgtgtagc | gaaaatggtt | tgcaattttt | ccttcctata | attgcacat | tgtatcttgg | 300 |
| aataattgca | gcacctgtta | gtgataaata | cattgaacgt | gaattaatac | acagtcttgg | 360 |
| tattgtaaaa | ccacgcataa | tttttgctc | caagaataact | tttcaaaaag | tactgaatgt | 420 |
| aaaatctaaa | ttaaaatatg | tagaaactat | tattatatta | gacttaaatg | aagacttagg | 480 |
| aggttatcaa | tgcctcaaca | actttatttc | tcaaaaattcc | gatattaatc | tggacgtaaa | 540 |
| aaaattttaa | ccatattttt | ttaatcgaga | cgatcagg | gcgttggtaa | tgttttcttc | 600 |
| tggtacaact | ggtgtttcga | agggagtc | gctaactcac | aagaatattg | ttgcacgatt | 660 |
| ttctcatgca | aaagatccca | cttttggtaa | cgcaattaat | ccaacgcacag | caattttAAC | 720 |
| ggtataacct | ttccaccatg | gttttggtat | gatgaccaca | ttaggataact | ttacttgtgg | 780 |
| attccgagtt | gttctaattgc | acacgtttga | agaaaaacta | tttctacaat | cattacaaga | 840 |
| ttataaaatgt | gaaagtactt | tacttgtacc | aacattaatg | gcatttttg | caaaaagtgc | 900 |
| attagttgaa | aagtacgatt | tatcgactt | aaaagaaatt | gcatctgg | gcccacctt | 960 |
| atcaaaagaa | attggggaga | tggtaaaaaa | acggtttaaa | ttaaactttg | tcaggcaagg | 1020 |
| gtatggatta | acagaaacca | cttcggctgt | tttaattaca | ccgaacaatg | acgtcagacc | 1080 |
| gggatcaact | ggtaaaatag | taccattca | cgctgttaaa | gttgcgatc | ctacaacagg | 1140 |
| aaaaattttg | gggccaaatg | aaactggaga | attgtatttt | aaaggcgaca | tgataatgaa | 1200 |
| aggttattat | aataatgaag | aagctactaa | agcaattatt | aacaaagacg | gatggttcg | 1260 |
| ctctgggtat | attgcttatt | atgacaatga | tggccatttt | tatattgtgg | acaggctgaa | 1320 |
| gtcattaatt | aaatataaaag | gttacggt | tgcacctgct | gaaattgagg | gaataacttt | 1380 |
| acaacatccg | tatattgttg | atgccggcg | tactggata | ccggatgaag | ccgcgggcga | 1440 |
| gcttccagct | gcaggtgtt | tagtacagac | tggaaaatat | ctaaacgaac | aaatgtaca | 1500 |
| aaattttgtt | tccagtcaag | tttcaacagc | caaatggcta | cgtgggggg | tgaaattttt | 1560 |
| ggatgaaatt | cccaaaggat | caactggaaa | aattgacaga | aaagtgttaa | gacaaatgtt | 1620 |
| tgaaaaaacac | accaatggg | | | | | 1639 |

<210> 3
 <211> 1639
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Anmerkung = "mutierte Luciferase"

<400> 3

| | | | | | | |
|------------|-------------|------------|-------------|------------|------------|-----|
| ggatccaatg | gaagataaaaa | atattttata | tggacctgaa | ccattttatc | ccttggctga | 60 |
| tgggacggct | ggagaacaga | tgttttacgc | attatctcg | tatgcagata | tttcaggatg | 120 |
| catagcattg | acaaatgctc | atacaaaagc | ccctgttta | tatgaagagt | tttaaaatt | 180 |
| gtcgtgtcgt | ttagcggaaa | gtttaaaaaa | gtatggatta | aaacaaaacg | acacaatagc | 240 |
| ggtgtgtagc | gaaaatggtt | tgcaattttt | ccttcctata | attgcacat | tgtatcttgg | 300 |
| aataattgca | gcacctgtta | gtgataaata | cattgaacgt | gaattaatac | acagtcttgg | 360 |
| tattgtaaaa | ccacgcataa | tttttgctc | caagaataact | tttcaaaaag | tactgaatgt | 420 |
| aaaatctaaa | ttaaaatatg | tagaaactat | tattatatta | gacttaaatg | aagacttagg | 480 |
| aggttatcaa | tgcctcaaca | actttatttc | tcaaaaattcc | gatattaatc | tggacgtaaa | 540 |
| aaaattttaa | ccatattttt | ttaatcgaga | cgatcagg | gcgttggtaa | tgttttcttc | 600 |
| tggtacaact | ggtgtttcga | agggagtc | gctaactcac | aagaatattg | ttgtacgatt | 660 |

DE 699 28 687 T2 2006.08.24

```
<210> 4
<211> 1639
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
```

<220>
<223> /Anmerkung = "mutierte Luciferase"

<400> 4

ggatccaatg gaagataaaaa atattttata tggacctgaa ccattttatc ccttggctga
tgggcggct ggagaacaga tggtttacgc attatctcg ttatgcagata tttcaggatg
catagcattg acaaatgctc atacaaaaagc ccctgtttt tatgaagagt ttttaaaatt
gtcggtcggt tttagcgaaaa gttttaaaaaa gtatggatta aaacaaaacg acacaatacg
ggtgtgttagc gaaaatggtt tgcaattttt ccttcctata attgcatcat tgtatcttgg
aataattgca gcacctgtta gtgataaaata cattgaacgt gaattaatac acagtcttgg
tattgtaaaaa ccacgcataa tttttgctc caagaataact tttcaaaaag tactgaatgt
aaaatctaaa tttaaaatatg tagaaactat tattatatta gactttaaatg aagacttagg
aggttatcaa tgcctcaaca acttttatttc tcaaaaattcc gatattaatc ttgacgtaaa
aaaatttaaa ccatattctt ttaatcgaga cgatcaggtt gcgttggtaa tggtttcttc
tggtacaact ggtgtttcga agggagtcat gctaactcac aagaatatttgc
ttcttattgca aaagatccta cttttggtaa cgcaattaat ccaacgacag caattttaa
ggtaataacct ttccaccatg gttttggat gatgaccaca ttaggataact ttacttgg
attcccgagtt gttctaattgc acacgtttga agaaaaacta tttctacaat cattacaaga
ttataaaagtg gaaagtactt tacttgtaacc aacattaatgc
atttagttgaa aagtacgatt tattcgactt aaaagaaaatttgc
atcaaaaagaa attggggaga tggtaaaaaa acggttaaa tttaacttgc
gtatggatta acagaaaacca ctgcgttgc
gggatcaact ggtaaaatag taccattca cgctgttaaa gttgtcgatc
aaaaattttg gggccaaatg aaactggaga attgtatttt aaaggcgaca tgataatgaa
aggttattat aataatgaag aagctactaa agcaattattt aacaaggacg gatggttgc
ctctggtgat attgcttattt atgacaatga tggccatttt tatattgtgg acaggctgaa
gtcattaattt aaatataaaag gttatcgat tgcacccgt
acaacatccg tatattgtt atgcggcgat tactggat
gcttccagct gcaggtgtt tagtacagac tggaaaatattt
aaattttgtt tccagtcaag tttcaacagc caaatggct
ggatgaaattt cccaaaggat caactggaaa aattgacaga aaagtgttac
tqaaaaaacac accaatggq

```
<210> 5  
<211> 1639  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz
```

<220>

<223> /Anmerkung = "mutierte Luciferase"

<400> 5

| | | | | | | |
|-------------|------------|------------|-------------|-------------|------------|------|
| ggatccaatg | gaagataaaa | atattttata | tggacctgaa | ccattttatc | ccttggctga | 60 |
| tgggacggct | ggagaacaga | tgttgacgc | attatctcg | tatgcagata | tttccggatg | 120 |
| catagcattg | acaaatgctc | atacaaaagc | ccctgttta | tatgaagagt | tttaaaatt | 180 |
| gtcgtgtcgt | ttagcggaaa | gtttaaaaaa | gtatggatta | aaacaaaacg | acacaatagc | 240 |
| ggtgtgttagc | gaaaatggtt | tgcaattttt | ccttcctata | attgcatcat | tgtatcttgg | 300 |
| aataattgca | gcacctgtta | gtgataaata | cattgaacgt | gaattaatac | acagtcttgg | 360 |
| tattgtaaaa | ccacgcataa | tttttgctc | caagaataact | tttcaaaaag | tactgaatgt | 420 |
| aaaatctaaa | ttaaaatatg | tagaaactat | tattatatta | gacttaatg | aagacttagg | 480 |
| aggttatcaa | tgcctcaaca | actttatttc | tcaaaaattcc | gatattaatc | ttgacgtaaa | 540 |
| aaaattttaaa | ccatattttt | ttaatcgaga | cgatcagg | gcgttggtaa | tgtttcttc | 600 |
| tggtacaact | ggtgttgcga | agggagtcat | gctaactcac | aagaatattg | ttgcacgatt | 660 |
| ttctcatgca | aaagatccta | cttttggtaa | cgcaattaat | ccaacgacag | caattttaac | 720 |
| ggtataacct | ttccaccatg | gttttggat | gatgaccaca | ttaggataact | ttacttgtgg | 780 |
| attccgagtt | gttctaatgc | acacgttga | agaaaaacta | tttctacaat | cattacaaga | 840 |
| ttataaaagtg | gaaagtactt | tacttgtacc | aacattaatg | gcattttttg | caaaaagtgc | 900 |
| attagttgaa | aagtacgatt | tatcgcactt | aaaagaaatt | gcatctgg | gcmcacctt | 960 |
| atcaaaagaa | attggggaga | tggtaaaaaa | acggtttaaa | ttaaactttg | tcaggcaagg | 1020 |
| gtatggatta | acagaaacca | cttcggctgt | tttaattaca | ccgaacaatg | acgtcagacc | 1080 |
| gggatcaact | ggtaaaatag | taccatttca | cgctgttaaa | gttgcgcgc | ctacaacagg | 1140 |
| aaaaattttg | gggccaaatg | aaactggaga | attgtatTTT | aaaggcgaca | tgataatgaa | 1200 |
| aggttattat | aataatgaag | aagctactaa | agcaattatt | aacaaagacg | gatggtgtcg | 1260 |
| ctctgggtat | attgcttatt | atgacaatga | tggccatTTT | tatattgtgg | acaggctgaa | 1320 |
| gtcattaatt | aatataaaag | gttatcggt | tgcacctgct | gaaattgagg | gaatacttt | 1380 |
| acaacatccg | tatattgttg | atgccggcgt | tactggata | ccggatgaa | ccgcgggcga | 1440 |
| gcttccagct | gcaggtgttg | tagtacagac | tggaaaatat | ctaaacgaa | aaatcgata | 1500 |
| aaattttgtt | tccagtcaag | tttcaacagc | caaatggcta | cgtgggggg | tgaaattttt | 1560 |
| ggatgaaatt | cccaaaggat | caactggaaa | aattgacaga | aaagtgttaa | gacaaatgtt | 1620 |
| tgaaaaaacac | accatgggg | | | | | 1639 |

<210> 6

<211> 1639

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> /Anmerkung = "mutierte Luciferase"

<400> 6

| | | | | | | |
|-------------|------------|------------|-------------|-------------|------------|------|
| ggatccaatg | gcagataaga | atattttata | tggccccgaa | ccattttatc | ccttggctga | 60 |
| tgggacggct | ggagaacaga | tgttgacgc | attatctcg | tatgcagata | tttccggatg | 120 |
| catagcattg | acaaatgctc | atacaaaaga | aatgtttta | tatgaagagt | tttaaaatt | 180 |
| gtcgtgtcgt | ttagcggaaa | gtttaaaaaa | gtatggatta | aaacaaaacg | acacaatagc | 240 |
| ggtgtgttagc | gaaaatggtt | tgcaattttt | ccttcctgta | attgcatcat | tgtatcttgg | 300 |
| aataattgca | gcacctgtta | gtgataaata | cattgaacgt | gaattaatac | acagtcttgg | 360 |
| tattgtaaaa | ccacgcataa | tttttgctc | caagaataact | tttcaaaaag | tactgaatgt | 420 |
| aaaatctaaa | ttaaaatctg | tagaaactat | tattatatta | gacttaatg | aagacttagg | 480 |
| aggttatcaa | tgcctcaaca | actttatttc | tcaaaaattcc | gatagtaatc | tggacgtaaa | 540 |
| aaaattttaaa | ccatattttt | ttaatcgaga | cgatcagg | gcgttggtaa | tgtttcttc | 600 |
| tggtacaact | ggtgttccga | agggagtcat | gctaactcac | aagaatattg | ttgcacgatt | 660 |
| ttctcttgca | aaagatccta | cttttggtaa | cgcaattaat | cccacgacag | caattttaac | 720 |
| ggtataacct | ttccaccatg | gttttggat | gatgaccaca | ttaggataact | ttacttgtgg | 780 |
| attccgagtt | gttctaatgc | acacgttga | agaaaaacta | tttctacaat | cattacaaga | 840 |
| ttataaaagtg | gaaagtactt | tacttgtacc | aacattaatg | gcattttctg | caaaaagtgc | 900 |
| attagttgaa | aagtacgatt | tatcgcactt | aaaagaaatt | gcatctgg | gcmcacctt | 960 |
| atcaaaagaa | attggggaga | tggtaaaaaa | acggtttaaa | ttaaactttg | tcaggcaagg | 1020 |

| | | | | | |
|------------------------|------------|------------|-------------|------------|------|
| gtatggatta acagaaaacca | cttcggctgt | tttaattaca | ccgaaagggtg | acgccagacc | 1080 |
| gggatcaact ggtaaaatag | taccatttca | cgctgttaaa | gttgcgatc | ctacaacagg | 1140 |
| aaaaattttg gggccaaatg | aacctggaga | attgtatTTT | aaaggcgcca | tgataatgaa | 1200 |
| gggttattat aataatgaag | aagctactaa | agcaattatt | gataatgacg | gatggttgcg | 1260 |
| ctctgggtat attgcttatt | atgacaatga | tggccatttt | tatattgtgg | acaggctgaa | 1320 |
| gtcattaatt aaatataaaag | gttatcaggt | tgcacctgct | gaaattgagg | gaataacttt | 1380 |
| acaacatccg tatattgttg | atgccggcgt | tactggata | ccggatgaag | ccgcgggcga | 1440 |
| gcttccagct gcaggtgtt | tagtacagac | tggaaaat | ctaaacgaac | aaatcgta | 1500 |
| agattttgtt tccagtcaag | tttcaacagc | caaatggcta | cgtggtgggg | tgaaatttt | 1560 |
| ggatgaaatt cccaaaggat | caactggaaa | aattgacaga | aaagtgttaa | gacaaatgtt | 1620 |
| tgaaaaaacac accaatggg | | | | | 1639 |

<210> 7

<211> 1639

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> unsure

<222> (1067)...(1072)

<223> /Anmerkung = "unbekannte Nukleotide"

<223> /Anmerkung = "mutierte Luciferase"

<400> 7

| | | | | | |
|------------------------|------------|------------|-------------|-------------|------|
| ggatccaatg gcagataaaaa | atattttata | tgggcccga | ccatTTTATC | ccttggctga | 60 |
| tgggacggct ggagaacaga | tgttttacgc | attatctcg | tatgcagata | tttcaggatg | 120 |
| catagcattg acaaatgctc | atacaaaagc | ccctgtttt | tatgaagagt | ttttaaaatt | 180 |
| gtcgtgtcgt ttagcgaaa | gtttaaaaaa | gtatggatta | aaacaaaacg | acacaatagc | 240 |
| ggtgtgttagc gaaaatggtt | tgcattttt | ccttcctgt | attgcattat | tgtatcttgg | 300 |
| aataattgca gcacctgtt | gtgataaata | cattgaacgt | gaattaatac | acagtcttgg | 360 |
| tattgtaaaa ccacgcataa | tttttgctc | caagaatact | tttcaaaaag | tactgaatgt | 420 |
| aaaatctaaa taaaaatatg | tagaaactat | tattatatta | gacttaatg | aagacttagg | 480 |
| aggttatcaa tgcctcaaca | actttattt | tcaaaattcc | gatattaatc | ttgacgtaaa | 540 |
| aaaattttaa ccatattctt | ttaatcgaga | cgatcagg | gcgttggta | tgtttcttc | 600 |
| tggtacaact ggtgttccga | agggagtcat | gctactcac | aagaatattg | ttgcacgatt | 660 |
| ttctcttgca aaagatccta | cttttggtaa | cgcaattaat | ccaaacgacag | caattttAAC | 720 |
| ggtaataacct ttccaccat | gttttggat | gatgaccaca | ttaggataact | ttacttgg | 780 |
| attccgagtt gttctaattgc | acacgttga | agaaaaacta | tttctacaat | cattacaaga | 840 |
| ttataaaagt gaaagtactt | tacttgtacc | aacattaatg | gcatttctt | caaaaagtgc | 900 |
| attagttgaa aagtacgatt | tatcgactt | aaaagaaatt | gcatctgg | gcgcaccc | 960 |
| atcaaaaagaa attggggaga | tggtaaaaaa | acggtttaaa | ttaaacttt | tcaggcaagg | 1020 |
| gtatggatta acagaaaacca | cttcggctgt | tttaattaca | ccgaaannnn | nnntcgagacc | 1080 |
| gggatcaact ggtaaaatag | taccattca | cgctgttaaa | gttgcgatc | ctacaacagg | 1140 |
| aaaaattttg gggccaaatg | aacctggaga | attgtatTTT | aaaggcgaca | tgataatgaa | 1200 |
| agtttattat aataatgaag | aagctactaa | agcaattatt | gataaagacg | gatggttgcg | 1260 |
| ctctgggtat attgcttatt | atgacaatga | tggccatttt | tatattgtgg | acaggctgaa | 1320 |
| gtcattaatt aaatataaaag | gttatcaggt | tgcacctgct | gaaattgagg | gaataacttt | 1380 |
| acaacatccg tatattgtt | atgccggcgt | tactggata | ccggatgaag | ccgcgggcga | 1440 |
| gcttccagct gcaggtgtt | tagtacagac | tggaaaat | ctaaacgaac | aaatcgta | 1500 |
| aaattttgtt tccagtcaag | tttcaacagc | caaatggcta | cgggggtgggg | tgaaatttt | 1560 |
| ggatgaaatt cccaaaggat | caactggaaa | aattgacaga | aaagtgttaa | gacaaatgtt | 1620 |
| tgaaaaaacac accaatggg | | | | | 1639 |

<210> 8

<211> 1639

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

DE 699 28 687 T2 2006.08.24

```
<221> unsure
<222> (1067)...(1072)
<223> /Anmerkung = "unbekannte Nukleotide"

<223> Anmerkung = "Mutierte Luciferase"
```

<400> 8

ggatccaatg gcagataaaaa atattttata tggggcccgaa ccattttatc ccttggctga
tgggacggct ggagaacaga tggtttacgc attatctcg ttatgcagata tttcaggatg
catagcattg acaaatgctc atacaaaaagc ccctgtttt tatgaagagt tggtaaaatt
gtcggtcggt tttagcgaaaa gttttaaaaa gtatggatta aaacaaaacg acacaatagc
ggtgtgttagc gaaaatggtt tgcaatattt ccttcctgta attgcatcat tttatcttgg
aataattgca gcacctgtta gtgataaata cattgaacgt gaattaatac acagttttgg
tattgtaaaaa ccacgcataa tttttgtct caagaataact tttcaaaaag tactgaatgt
aaaatctaaa tttaaaatatg tagaaactat tattatatta gacttaaatg aagactttagg
aggttatcaa tgcctcaaca acttttattt tcaaaaattcc gatattaatc ttgacgtaaa
aaaatttaaa ccatattctt ttaatcgaga cgatcaggtt gcgttggtaa tttttcttc
tggtacaact ggtgttccga agggagtcat gctaactcac aagaatattt tttcgttttt
ttcttattgca aaagatccta cttttggtaa cgcaattaat ccaacgacag caattttaac
ggtaataacct ttccaccatg gttttggat gatgaccaca ttaggataact ttacttgg
attcccgagtt gttctaattgc acacgtttga agaaaaacta tttctacaat cattacaaga
ttataaaagtg gaaagtactt tacttgtaacc aacattaatg gcatttcttgc caaaaagtgc
attagttgaa aagtacgatt tatcgactt aaaagaaaatt gcatctggta ggcgcacctt
atcaaaaagaa attggggaga tggtaaaaaa acggtttaaa ttaaacttt tcaggcaagg
gtatggatta acagaaaacca ctgcgtgt ttaaattaca ccgaaannnn nngccagacc
gggatcaact ggtaaaatag taccatttca cgctgttaaa gttgtcgatc ctacaacagg
aaaaattttg gggccaaatg aacctggaga attgtatttt aaaggcgcca tgataatgaa
gggttattat aataatgaag aagctactaa agcaattatt aacaagacg gatggttgcg
ctctggtgat attgcttatt atgacaatga tggccatttt tatattgtgg acaggctgaa
gtcattaatt aaatataaaag gttatcgat tgcacgtgt gaaattgagg gaataactt
acaacatccg tatattgtt atgcggcgt tactggata ccggatgaa cccggggcga
gcttccagct gcaggtgtt tagtacagac tggaaaatat ctaaacgaac aaatcgatca
aaatttgtt tccagtcaag tttcaacagc ccaaatggcta cgtgggggg tggaaatttt
ggatgaaatt cccaaaggat caactggaaa aattgacaga aaagtgtttaa gacaaatgtt
tggaaaacac accaatqqq

<210> 9

<211> 1639

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> unsure

<222> 1067 1072

<223> /Anmerkung = "unbekannte Nukleotide"

<223> Anmerkung = "Mutierte Luciferase"

<400> 9

```

ggatccaatg gcagataaaa atattttata tggcccgaa ccattttatc ccttggctga 60
tggacggct ggagaacaga tggttgacgc attatctcg ttagcagata tttcaggatg 120
catagcattg acaaatgctc atacaaaaagc ccctgtttt tatgaagagt tgtaaaatt 180
gtcgtgtcgt ttagcggaaa gttttaaaaa gtatggatta aaacaaaacg acacaatagc 240
ggtgtgttagc gaaaatggtt tgcaattttt ccttcctgta attgcatcat tgtatcttgg 300
aataattgca gcacctgtta gtgataaaata cggtgaacgt gaattaatac acagtcttgg 360
tattgtaaaa ccacgcataa tttttgtctc caagaataact tttcaaaaag tactgaatgt 420
aaaatctaaa taaaaatatg tagaaactat tattatatta gacttaaatg aagactttagg 480
aggtttatcaa tgccctcaaca actttatttc tcaaaaattcc gatagtaatc tggacgtaaa 540
aaaatttaaa ccaaattctt ttaatcgaga cgatcaggtt gcgttggtaa tggtttcttc 600
tggatcaact ggtgtttcga aqqaqgtcat qctaactcac aqaaatattq ttqacgatt 660

```

| | | | | | | |
|-------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------|
| ttctcttgca | aaagatccta | ctttggtaa | cgcaattaat | ccaacgacag | caattttaac | 720 |
| ggtaataacct | ttccaccatg | gtttggtat | gatgaccaca | ttaggatact | ttacttgtgg | 780 |
| attccgagtt | gttctaattgc | acacgttga | agaaaaacta | tttctacaat | cattacaaga | 840 |
| ttataaagtg | gaaagtactt | tacttgtacc | aacattaatg | gcatttcttg | caaaaagtgc | 900 |
| attagttgaa | aagtacgatt | tatcgcactt | aaaagaaatt | gcatctggtg | gcmcacctt | 960 |
| atcaaaaagaa | attggggaga | tggtaaaaaa | acggtttaaa | ttaaactttg | tcaggcaagg | 1020 |
| gtatggatta | acagaaacca | cttcggctgt | ttaattaca | ccgaacnnnn | nngccagacc | 1080 |
| gggatcaact | ggtaaaatag | taccattca | cgctgttaaa | gttgcgatc | ctacaacagg | 1140 |
| aaaaattttg | ggccaaatag | aacctggaga | attgtatTTT | aaaggcgc | tgataatgaa | 1200 |
| gggttattat | aataatgaag | aagctactaa | agcaattatt | gataaagacg | gatgggtcg | 1260 |
| ctctggtgat | attgcttatt | atgacaatga | tggccatttt | tatattgtgg | acaggctgaa | 1320 |
| gtcattaatt | aaatataaaag | gttatcaggt | tgcacctgct | gaaattgagg | gaataactt | 1380 |
| acaacatccg | tatattgttg | atgccggcgt | tactggtata | ccggatgaag | ccgcgggcga | 1440 |
| gcttccagct | gcaggtgttg | tagtacagac | tggaaaatat | ctaaacgaac | aaatcgata | 1500 |
| aaattttgtt | tccagtcaag | tttcaacagc | caaatggcta | cgtggggggg | tgaaattttt | 1560 |
| ggatgaaatt | cccaaaggat | caactggaaa | aattgacaga | aaagtgttaa | gacaaatgtt | 1620 |
| tgaaaaaacac | accatggg | | | | | 1639 |

<210> 10

<211> 1639

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> unsure

<222> (1067)...(1072)

<223> /Anmerkung = "unbekannte Nukleotide"

<223> Anmerkung = "Mutierte Luciferase"

<400> 10

| | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|------|
| ggatccaatg | gcagataaaaa | atattttata | tggccccgaa | ccattttatc | ccttggctga | 60 |
| tgggacggct | ggagaacaga | tgttttacgc | attatctcg | tatgcagata | ttccgggctg | 120 |
| catagcattg | acaatgttc | ataaaaaagc | ccctgtttt | tatgaagagt | ttttaaaatt | 180 |
| gtcgtgtcg | ttagcgaaaa | gtttaaaaa | gtatggatta | aaacaaaacg | acacaatagc | 240 |
| ggtgtgttagc | gaaaatggtt | tgcaattttt | ccttcctgt | attgcatcat | tgtatcttgg | 300 |
| aataattgtg | gcacctgtta | acgataaata | cattgaacgt | gaattaatac | acagtcttgg | 360 |
| tattgtaaaa | ccacgcata | tttttgctc | caagaatact | tttcaaaaag | tactgaatgt | 420 |
| aaaatctaaa | ttaaaatctg | tagaaactat | tattatatta | gacttaaatg | aagactttagg | 480 |
| aggttatcaa | tgcctcaaca | actttatttc | tcaaaattcc | gatattaatc | ttgacgtaaa | 540 |
| aaaattttaa | ccatatttt | ttaatcgaga | cgatcagg | gcgttgatta | tttttcttc | 600 |
| tggtacaact | ggtctgccc | aggaggatcat | gctaactcac | aagaatattg | ttgcacgatt | 660 |
| ttctcttgca | aaagatccta | ctttggtaa | cgcaattaat | cccacgacag | caattttaac | 720 |
| ggtaataacct | ttccaccatg | gtttggtat | gatgaccaca | ttaggatact | ttacttgtgg | 780 |
| attccgagtt | gttctaattgc | acacgttga | agaaaaacta | tttctacaat | cattacaaga | 840 |
| ttataaagtg | gaaagtactt | tacttgtacc | aacattaatg | gcatttcttg | caaaaagtgc | 900 |
| attagttgaa | aagtacgatt | tatcgcactt | aaaagaaatt | gcatctggtg | gcmcacctt | 960 |
| atcaaaaagaa | attggggaga | tggtaaaaaa | acggtttaaa | ttaaactttg | tcaggcaagg | 1020 |
| gtatggatta | acagaaacca | cttcggctgt | ttaattaca | ccgaaacnnnn | nngccagacc | 1080 |
| gggatcaact | ggtaaaatag | taccattca | cgctgttaaa | gttgcgatc | ctacaacagg | 1140 |
| aaaaattttg | ggccaaatag | aacctggaga | attgtatTTT | aaaggcccga | tgataatgaa | 1200 |
| gggttattat | aataatgaag | aagctactaa | agcaattatt | gataatgacg | gatgggtcg | 1260 |
| ctctggtgat | attgcttatt | atgacaatga | tggccatttt | tatattgtgg | acaggctgaa | 1320 |
| gtcattaatt | aaatataaaag | gttatcaggt | tgcacctgct | gaaattgagg | gaataactt | 1380 |
| acaacatccg | tatattgttg | atgccggcgt | tactggtatt | ccggatgaag | ccgcgggcga | 1440 |
| gcttccagct | gcaggtgttg | tagtacagac | tggaaaatat | ctaaacgaac | aaatcgata | 1500 |
| aaattttgtt | tccagtcaag | tttcaacagc | caaatggcta | cgtggggggg | tgaaattttt | 1560 |
| ggatgaaatt | cccaaaggat | caactggaaa | aattgacaga | aaagtgttaa | gacaaatgtt | 1620 |
| tgaaaaaacac | accatggg | | | | | 1639 |

<210> 11
<211> 1639
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> /Anmerkung = "mutierte Luciferase"

<400> 11

| | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| ggatccaatg | gcagataaga | atattttata | tggcccgaa | ccatTTTATC | ccttggaaaga | 60 |
| tggacggct | ggagaacaga | tgttgacgc | attatCTCGT | tatgcagata | ttccggctg | 120 |
| catagcattg | acaaatgctc | atacaaaaga | aatgtttta | tatgaagagt | ttctgaaact | 180 |
| gtcgtgtcgt | ttagcggaaa | gtttaaaaaa | gtatggatta | aaacaaaacg | acacaatAGC | 240 |
| ggtgtgttagc | gaaaatggtc | tgcaattttt | cTTCCCTGTA | attgcATCAT | tgtatCTTGG | 300 |
| aataattgtg | gcacCTGTta | acgataaata | cattGAACGT | gaattaatac | acagtCTTGG | 360 |
| tattgtaaaa | ccacgcata | tTTTTGCTC | caagaataact | tttcaaaaag | tactgaatgt | 420 |
| aaaatctaaa | ttaaaatcta | ttgaaaactat | tattatatta | gacttaaatg | aagactttagg | 480 |
| aggTTtatcaa | tgcctcaaca | actttatttc | tcaaaATTCC | gatAGTAATC | tggacgtaaa | 540 |
| aaaatttaaa | ccatattttt | ttaatcgaga | cgatcaggTT | gcgttgatta | tgttttCTTC | 600 |
| tggTacaact | ggTCTGCCGA | agggagTCat | gtcaactcac | aagaatattg | ttgcacgatt | 660 |
| ttctcttgca | aaagatccta | cTTTGGTAA | cgcaattaat | cccacgacag | caattttAAC | 720 |
| ggtataac | ttccaccatg | gtttGGTAT | gatgaccaca | ttaggataact | ttacttGTGG | 780 |
| attccgagtt | gttctaATGC | acacgtttga | agaaaaacta | tttCTACAAT | cattacaaga | 840 |
| ttataaaagt | gaaagtactt | tacttgtacc | aacattaatg | gcatttCTTG | caaaaAGTGC | 900 |
| attagttgaa | aagtacgatt | tatcgcactt | aaaagaaatt | gcatCTGGT | gcgcacCTT | 960 |
| atcaaaaagaa | attggggaga | tggtaaaaaa | acggtttaaa | ttaaactttt | tcaggcaagg | 1020 |
| gtatggatta | acagaaacca | cTTCCGCTGT | ttaaattaca | ccgaaaggTG | acgcCAAACC | 1080 |
| gggatcaact | ggtaaaatag | taccatttca | cgctgttaaa | gttGTCGATC | ctacaacagg | 1140 |
| aaaaattttg | gggCCAAATG | aacctggaga | attgtatTTT | aaaggcccga | tgataatgaa | 1200 |
| gggttattat | aataatgaag | aagctactaa | agcaattatt | gataatgacg | gatggTTGCG | 1260 |
| ctctggTgtat | attgcttatt | atgacaatga | tggccatttt | tatattgtgg | acaggctgaa | 1320 |
| gtcactgatt | aaatataaaag | gttacaggt | tgcacCTGCT | gaaatttgagg | gaataacttt | 1380 |
| acaacatccg | tatattgttG | atGCCGCGT | tactggata | ccggatgaag | ccgcggcga | 1440 |
| gcttccagct | gcaggTGTG | tagacagac | tggaaaatat | ctaaacgaac | aaatcgTaca | 1500 |
| agattatgtt | gccagtcaag | tttcaacagc | caaATGGCTA | cgtggTgggg | tgaardttt | 1560 |
| ggatgaaatt | cccaaaggat | caactggaaa | aattgacaga | aaagtgttaa | gacaaatgtt | 1620 |
| tgaaaaaacac | accaatgg | | | | | 1639 |

<210> 12
<211> 1642
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> /Anmerkung = "mutierte Luciferase"

<400> 12

| | | | | | | |
|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|-----|
| ggatccaatg | gaagataaaaa | atattttata | tggacctgaa | ccatTTTATC | ccttggCTGA | 60 |
| tggacggct | ggagaacaga | tgtttacgc | attatCTCGT | tatgcagata | tttcaggatG | 120 |
| catagcattg | acaaatgctc | atacaaaaga | aatgtttta | tatgaagagt | ttttaaaatt | 180 |
| gtcgtgtcgt | ttagcggaaa | gtttaaaaaa | gtatggatta | aaacaaaacg | acacaatAGC | 240 |
| ggtgtgttagc | gaaaatggTT | tgcaattttt | cTTCCCTTA | attgcATCAT | tgtatCTTGG | 300 |
| aataattgca | gcacCTGTta | gtgataaata | cattGAACGT | gaattaatac | acagtCTTGG | 360 |
| tattgtaaaa | ccacgcataa | tTTTTGTTc | caagaataact | tttcaaaaag | tactgaatgt | 420 |
| aaaatctaaa | ttaaaatatg | tagaaactat | tattatatta | gacttaaatg | aagactttagg | 480 |
| aggTTtatcaa | tgcctcaaca | actttatttc | tcaaaATTCC | gatATTAATC | tggacgtaaa | 540 |
| aaaatttaaa | ccaaattttt | ttaatcgaga | cgatcaggTT | gcgttggtaa | tgttttCTTC | 600 |
| tggTacaact | ggTGTTCGA | agggagTCat | gtcaactcac | aagaatattg | ttgcacgatt | 660 |
| ttctcattgc | aaagatccta | cTTTGGTAA | cgcaattaat | ccaaacgacag | caattttAAC | 720 |

| | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|------|
| ggtaataacct | ttccaccatg | gttttgttat | gatgaccaca | ttaggatact | ttacttgtgg | 780 |
| attccgagtt | gctctaattgc | acacgttga | agaaaaacta | tttctacaat | cattacaaga | 840 |
| ttataaaagtg | gaaagtactt | tacttgtacc | aacattaatg | gcatttttg | caaaaagtgc | 900 |
| attagttgaa | aagtacgatt | tatcgactt | aaaagaaatt | gcatctggtg | gccccaccc | 960 |
| atcaaaaagaa | attggggaga | tggtaaaaaa | acggtttaaa | ttaaactttg | tcaggcaagg | 1020 |
| gtatggatta | acagaaacca | cttcggctgt | ttaaattaca | ccggacactg | acgtcagacc | 1080 |
| gggatcaact | ggtaaaatag | taccattca | cgctgttaaa | gttgtcgatc | ctacaacagg | 1140 |
| aaaaatttt | ggccaaatag | aaactggaga | attgtatTTT | aaaggcgaca | tgataatgaa | 1200 |
| aagttattat | aataatgaag | aagctactaa | agcaattatt | aacaaagacg | gatgggtcg | 1260 |
| ctctgggtat | attgcttatt | atgacaatga | tggccatttt | tatattgtgg | acaggctgaa | 1320 |
| gtcattaatt | aaatataaaag | gttacatcggt | tgcacctgct | gaaatttgggg | gaataactctt | 1380 |
| acaacatccg | tatattgttg | atgccggcgt | tactggtata | ccggatgaag | ccgcgggcga | 1440 |
| gcttccagct | gcaggtgttg | tagtacagac | tggaaaatat | ctaaacgaac | aaatcgataca | 1500 |
| aaattttgtt | tccagtcaag | tttcaacagc | caaatggcta | cgtggggggg | tgaaattttt | 1560 |
| ggtgaaattt | cccaaaggat | caactggaaa | aattgacaga | aaagtgttaa | gacaaatgttt | 1620 |
| tgaaaaaacac | aatctaaacg | tg | | | | 1642 |

<210> 13

<211> 1626

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> /Anmerkung = "mutierte Luciferase"

<400> 13

| | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| atgatgaagc | gagagaaaaaa | tgttatataat | ggacccgaac | ccctacaccc | cttggaaagac | 60 |
| ttaacagctg | gagaaatgct | cttccgtgcc | cttcgaaaac | atttcattt | accgcaggct | 120 |
| tttagtagatg | tggttggcga | cgaatcgctt | tcctataaaag | agtttttga | agcgacagtc | 180 |
| ctcctagcgc | aaagtctcca | caattgtgga | tacaagatga | atgatgttagt | gtcgatctgc | 240 |
| gccgagaata | atacaagatt | ttttattccc | gttattgcag | cttggtatat | tggtatgatt | 300 |
| gtagcacctg | ttaatgaaag | ttacatccca | gatgaactct | gtaaggtgat | gggtatatcg | 360 |
| aaaccacaaa | tagttttac | gacaaagaac | atttaaata | agttattgga | ggtacagacg | 420 |
| agaactaatt | tcataaaaaag | gatcatcata | cttgatactg | tagaaaacat | acacggttgt | 480 |
| gaaagtcttc | ccaattttat | ttctcggtat | tcggatggaa | atattgccaa | cttcaaacct | 540 |
| ttacatttcg | atcctgttga | gcaagtggca | gctatctt | gttcgtcagg | cactactgga | 600 |
| ttaccgaaag | gtgtaatgca | aactcacca | aatatttgc | tccgacttat | acatgcctta | 660 |
| gaccccaggg | caggaacgca | acttattcc | ggtgtgacag | tcttagtata | tctgccttt | 720 |
| ttccatgctt | ttgggttctc | tataaccttg | ggatacttca | tgggggtct | tcgtgttata | 780 |
| atgttcagac | gatttgatca | agaagcattt | ctaaaagcta | ttcaggattt | tgaagttcga | 840 |
| agtgtatTTT | acgttccatc | agtaatattg | ttcttatcga | aaagtccctt | ggttgacaaa | 900 |
| tacgatttt | caagtttaag | ggaattgtgt | tgcgggtcgg | caccattagc | aaaagaagtt | 960 |
| gctgaggttg | cagccaaacg | attaaacttg | ccaggaattc | gctgtggatt | tggtttgaca | 1020 |
| gaatctactt | cagctaataat | acacagtctt | agggatgaat | ttaaattcagg | atcacttgga | 1080 |
| agagttactc | cttaatggc | agctaaaata | gcagataggg | aaactggtaa | agcattggga | 1140 |
| ccaaatcaag | ttggtaatt | atgcattaa | ggccccatgg | tatcgaaagg | ttacgtgaac | 1200 |
| aatgtagaag | ctaccaaaga | agctattgtat | gatgtatggtt | ggcttcactc | tggagacttt | 1260 |
| ggatactatg | atgaggatga | gcatttctat | gtggtgacc | gttacaagga | attgatttttt | 1320 |
| tataagggtct | ctcaggtagc | acctgcagaa | ctagaagaga | ttttattgaa | aaatccatgt | 1380 |
| atcagagatg | ttgctgtgtt | ttgtattcc | gatctagaag | ctggagaact | gccatctgc | 1440 |
| tttgggttta | aacagccgg | aaaggagatt | acagctaaag | aagtgtacga | ttatcttgcc | 1500 |
| gagagggtct | cccatacaaa | gtatttgcgt | ggaggggttc | gattcgttga | tagcatacca | 1560 |
| aggaatgtta | caggtaaaaat | tacaagaaag | gaacttctga | agcagttgct | ggagaaggcg | 1620 |
| ggaggt | | | | | | 1626 |

<210> 14

<211> 544

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> /Anmerkung = "mutierte Luciferase"

Met Ala Asp Lys Asn Ile Leu Tyr Gly Pro Glu Pro Phe Tyr Pro Leu
 1 5 10 15
 Ala Asp Gly Thr Ala Gly Glu Gln Met Phe Tyr Ala Leu Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Ala Asp Ile Ser Gly Cys Ile Ala Leu Thr Asn Ala His Thr Lys Glu
 35 40 45
 Asn Val Leu Tyr Glu Glu Phe Leu Lys Leu Ser Cys Arg Leu Ala Glu
 50 55 60
 Ser Phe Lys Lys Tyr Gly Leu Lys Gln Asn Asp Thr Ile Ala Val Cys
 65 70 75 80
 Ser Glu Asn Gly Leu Gln Phe Phe Leu Pro Ile Ile Ala Ser Leu Tyr
 85 90 95
 Leu Gly Ile Ile Ala Ala Pro Val Ser Asp Lys Tyr Ile Glu Arg Glu
 100 105 110
 Leu Ile His Ser Leu Gly Ile Val Lys Pro Arg Ile Ile Phe Cys Ser
 115 120 125
 Lys Asn Thr Phe Gln Lys Val Leu Asn Val Lys Ser Lys Leu Lys Tyr
 130 135 140
 Val Glu Thr Ile Ile Ile Leu Asp Leu Asn Glu Asp Leu Gly Gly Tyr
 145 150 155 160
 Gln Cys Leu Asn Asn Phe Ile Ser Gln Asn Ser Asp Ile Asn Leu Asp
 165 170 175
 Val Lys Lys Phe Lys Pro Tyr Ser Phe Asn Arg Asp Asp Gln Val Ala
 180 185 190
 Leu Val Met Phe Ser Ser Gly Thr Thr Gly Val Ser Lys Gly Val Met
 195 200 205
 Leu Thr His Lys Asn Ile Val Ala Arg Phe Ser Leu Ala Lys Asp Pro
 210 215 220
 Thr Phe Gly Asn Ala Ile Asn Pro Thr Thr Ala Ile Leu Thr Val Ile
 225 230 235 240
 Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Met Thr Thr Leu Gly Tyr Phe Thr
 245 250 255
 Cys Gly Phe Arg Val Val Leu Met His Thr Phe Glu Glu Lys Leu Phe
 260 265 270
 Leu Gln Ser Leu Gln Asp Tyr Lys Val Glu Ser Thr Leu Leu Val Pro
 275 280 285
 Thr Leu Met Ala Phe Leu Ala Lys Ser Ala Leu Val Glu Lys Tyr Asp
 290 295 300
 Leu Ser His Leu Lys Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro Leu Ser Lys
 305 310 315 320
 Glu Ile Gly Glu Met Val Lys Lys Arg Phe Lys Leu Asn Phe Val Arg
 325 330 335
 Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala Val Leu Ile Thr Pro
 340 345 350
 Asn Asn Asp Val Arg Pro Gly Ser Thr Gly Lys Ile Val Pro Phe His
 355 360 365
 Ala Val Lys Val Val Asp Pro Thr Thr Gly Lys Ile Leu Gly Pro Asn
 370 375 380
 Glu Pro Gly Glu Leu Tyr Phe Lys Gly Asp Met Ile Met Lys Gly Tyr
 385 390 395 400
 Tyr Asn Asn Glu Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asn Lys Asp Gly Trp
 405 410 415
 Leu Arg Ser Gly Asp Ile Ala Tyr Tyr Asp Asn Asp Gly His Phe Tyr
 420 425 430
 Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Gln Val
 435 440 445
 Ala Pro Ala Glu Ile Glu Gly Ile Leu Leu Gln His Pro Tyr Ile Val

| | | |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 450 | 455 | 460 |
| Asp Ala Gly Val Thr Gly Ile Pro Asp Glu Ala Ala Gly Glu Leu Pro | | |
| 465 | 470 | 475 |
| Ala Ala Gly Val Val Val Gln Thr Gly Lys Tyr Leu Asn Glu Gln Ile | | 480 |
| 485 | 490 | 495 |
| Val Gln Asn Phe Val Ser Ser Gln Val Ser Thr Ala Lys Trp Leu Arg | | |
| 500 | 505 | 510 |
| Gly Gly Val Lys Phe Leu Asp Glu Ile Pro Lys Gly Ser Thr Gly Lys | | |
| 515 | 520 | 525 |
| Ile Asp Arg Lys Val Leu Arg Gln Met Phe Glu Lys His Thr Asn Gly | | |
| 530 | 535 | 540 |

<210> 15

<211> 544

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> /Anmerkung = "mutierte Luciferase"

<400> 15

| | | |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| Met Glu Asp Lys Asn Ile Leu Tyr Gly Pro Glu Pro Phe Tyr Pro Leu | | |
| 1 | 5 | 10 |
| Ala Asp Gly Thr Ala Gly Glu Gln Met Phe Tyr Ala Leu Ser Arg Tyr | | |
| 20 | 25 | 30 |
| Ala Asp Ile Ser Gly Cys Ile Ala Leu Thr Asn Ala His Thr Lys Glu | | |
| 35 | 40 | 45 |
| Asn Val Leu Tyr Glu Glu Leu Leu Lys Leu Ser Cys Arg Leu Ala Glu | | |
| 50 | 55 | 60 |
| Ser Phe Lys Lys Tyr Gly Leu Lys Gln Asn Asp Thr Ile Ala Val Cys | | |
| 65 | 70 | 75 |
| Ser Glu Asn Gly Leu Gln Phe Phe Leu Pro Ile Ile Ala Ser Leu Tyr | | |
| 85 | 90 | 95 |
| Leu Gly Ile Ile Ala Ala Pro Val Ser Asp Lys Tyr Ile Glu Arg Glu | | |
| 100 | 105 | 110 |
| Leu Ile His Ser Leu Gly Ile Val Lys Pro Arg Ile Ile Phe Cys Ser | | |
| 115 | 120 | 125 |
| Lys Asn Thr Phe Gln Lys Val Leu Asn Val Lys Ser Lys Leu Lys Tyr | | |
| 130 | 135 | 140 |
| Val Glu Thr Ile Ile Leu Asp Leu Asn Glu Asp Leu Gly Gly Tyr | | |
| 145 | 150 | 155 |
| Gln Cys Leu Asn Asn Phe Ile Ser Gln Asn Ser Asp Ile Asn Leu Asp | | |
| 165 | 170 | 175 |
| Val Lys Lys Phe Lys Pro Tyr Ser Phe Asn Arg Asp Asp Gln Val Ala | | |
| 180 | 185 | 190 |
| Leu Val Met Phe Ser Ser Gly Thr Thr Gly Val Ser Lys Gly Val Met | | |
| 195 | 200 | 205 |
| Leu Thr His Lys Asn Ile Val Ala Arg Phe Ser His Ala Lys Asp Pro | | |
| 210 | 215 | 220 |
| Thr Phe Gly Asn Ala Ile Asn Pro Thr Thr Ala Ile Leu Thr Val Ile | | |
| 225 | 230 | 235 |
| Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Met Thr Thr Leu Gly Tyr Phe Thr | | |
| 245 | 250 | 255 |
| Cys Gly Phe Arg Val Val Leu Met His Thr Phe Glu Glu Lys Leu Phe | | |
| 260 | 265 | 270 |
| Leu Gln Ser Leu Gln Asp Tyr Lys Val Glu Ser Thr Leu Leu Val Pro | | |
| 275 | 280 | 285 |
| Thr Leu Met Ala Phe Phe Ala Lys Ser Ala Leu Val Glu Lys Tyr Asp | | |
| 290 | 295 | 300 |
| Leu Ser His Leu Lys Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro Leu Ser Lys | | |

DE 699 28 687 T2 2006.08.24

| | | | |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 305 | 310 | 315 | 320 |
| Glu Ile Gly Glu Met Val Lys Lys Arg Phe Lys Leu Asn Phe Val Arg | | | |
| 325 | 330 | 335 | |
| Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala Val Leu Ile Thr Pro | | | |
| 340 | 345 | 350 | |
| Asn Asn Asp Val Arg Pro Gly Ser Thr Gly Lys Ile Val Pro Phe His | | | |
| 355 | 360 | 365 | |
| Ala Val Lys Val Val Asp Pro Thr Thr Gly Lys Ile Leu Gly Pro Asn | | | |
| 370 | 375 | 380 | |
| Glu Thr Gly Glu Leu Tyr Phe Lys Gly Asp Met Ile Met Lys Gly Tyr | | | |
| 385 | 390 | 395 | 400 |
| Tyr Asn Asn Glu Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asn Lys Asp Gly Trp | | | |
| 405 | 410 | 415 | |
| Leu Arg Ser Gly Asp Ile Ala Tyr Tyr Asp Asn Asp Gly His Phe Tyr | | | |
| 420 | 425 | 430 | |
| Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Gln Val | | | |
| 435 | 440 | 445 | |
| Ala Pro Ala Glu Ile Glu Gly Ile Leu Leu Gln His Pro Tyr Ile Val | | | |
| 450 | 455 | 460 | |
| Asp Ala Gly Val Thr Gly Ile Pro Asp Glu Ala Ala Gly Glu Leu Pro | | | |
| 465 | 470 | 475 | 480 |
| Ala Ala Gly Val Val Val Gln Thr Gly Lys Tyr Leu Asn Glu Gln Ile | | | |
| 485 | 490 | 495 | |
| Val Gln Asn Phe Val Ser Ser Gln Val Ser Thr Ala Lys Trp Leu Arg | | | |
| 500 | 505 | 510 | |
| Gly Gly Val Lys Phe Leu Asp Glu Ile Pro Lys Gly Ser Thr Gly Lys | | | |
| 515 | 520 | 525 | |
| Ile Asp Arg Lys Val Leu Arg Gln Met Phe Glu Lys His Thr Asn Gly | | | |
| 530 | 535 | 540 | |

<210> 16

<211> 544

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> /Anmerkung = "mutierte Luciferase"

<400> 16

| | | | |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| Met Glu Asp Lys Asn Ile Leu Tyr Gly Pro Glu Pro Phe Tyr Pro Leu | | | |
| 1 | 5 | 10 | 15 |
| Ala Asp Gly Thr Ala Gly Glu Gln Met Phe Tyr Ala Leu Ser Arg Tyr | | | |
| 20 | 25 | 30 | |
| Ala Asp Ile Ser Gly Cys Ile Ala Leu Thr Asn Ala His Thr Lys Glu | | | |
| 35 | 40 | 45 | |
| Asn Val Leu Tyr Glu Glu Phe Leu Lys Leu Ser Cys Arg Leu Ala Glu | | | |
| 50 | 55 | 60 | |
| Ser Phe Lys Lys Tyr Gly Leu Lys Gln Asn Asp Thr Ile Ala Val Cys | | | |
| 65 | 70 | 75 | 80 |
| Ser Glu Asn Gly Leu Gln Phe Phe Leu Pro Ile Ile Ala Ser Leu Tyr | | | |
| 85 | 90 | 95 | |
| Leu Gly Ile Ile Ala Ala Pro Val Ser Asp Lys Tyr Ile Glu Arg Glu | | | |
| 100 | 105 | 110 | |
| Leu Ile His Ser Leu Gly Ile Val Lys Pro Arg Ile Ile Phe Cys Ser | | | |
| 115 | 120 | 125 | |
| Lys Asn Thr Phe Gln Lys Val Leu Asn Val Lys Ser Lys Leu Lys Tyr | | | |
| 130 | 135 | 140 | |
| Val Glu Thr Ile Ile Ile Leu Asp Leu Asn Glu Asp Leu Gly Gly Tyr | | | |
| 145 | 150 | 155 | 160 |
| Gln Cys Leu Asn Asn Phe Ile Ser Gln Asn Ser Asp Ile Asn Leu Asp | | | |

DE 699 28 687 T2 2006.08.24

| | | | |
|-------------------------------------------------|-------------------------------------|-----------------|-----|
| | 165 | 170 | 175 |
| Val Lys Lys Phe Lys Pro Tyr Ser | Phe Asn Arg Asp Asp | Gln Val Ala | |
| 180 | 185 | 190 | |
| Leu Val Met Phe Ser Ser Gly | Thr Thr Gly Val Ser | Lys Gly Val Met | |
| 195 | 200 | 205 | |
| Leu Thr His Lys Asn Ile Val Val Arg Phe Ser | Leu Ala Lys Asp Pro | | |
| 210 | 215 | 220 | |
| Thr Phe Gly Asn Ala Ile Asn Pro Thr Thr | Ala Ile Leu Thr Val Ile | | |
| 225 | 230 | 235 | 240 |
| Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Met | Thr Thr Leu Gly Tyr Phe Thr | | |
| 245 | 250 | 255 | |
| Cys Gly Phe Arg Val Val Leu Met | His Thr Phe Glu Glu | Lys Leu Phe | |
| 260 | 265 | 270 | |
| Leu Gln Ser Leu Gln Asp Tyr Lys Val Glu Ser | Thr Leu Leu Val Pro | | |
| 275 | 280 | 285 | |
| Thr Leu Met Ala Phe Phe Ala Lys Ser Ala | Leu Val Glu Lys Tyr Asp | | |
| 290 | 295 | 300 | |
| Leu Ser His Leu Lys Glu Ile Ala Ser Gly | Gly Ala Pro Leu Ser Lys | | |
| 305 | 310 | 315 | 320 |
| Glu Ile Gly Glu Met Val Lys Lys Arg Phe | Lys Leu Asn Phe Val Arg | | |
| 325 | 330 | 335 | |
| Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr | Ser Ala Val Leu Ile Thr Pro | | |
| 340 | 345 | 350 | |
| Asn Asn Asp Val Arg Pro Gly Ser | Thr Gly Lys Ile Val Pro Phe His | | |
| 355 | 360 | 365 | |
| Ala Val Lys Val Val Asp Pro | Thr Thr Gly Lys Ile Leu Gly Pro Asn | | |
| 370 | 375 | 380 | |
| Glu Thr Gly Glu Leu Tyr Phe Lys Gly Asp | Met Ile Met Lys Gly Tyr | | |
| 385 | 390 | 395 | 400 |
| Tyr Asn Asn Glu Glu Ala Thr Lys Ala | Ile Ile Thr Lys Asp Gly Trp | | |
| 405 | 410 | 415 | |
| Leu Arg Ser Gly Asp Ile Ala Tyr Tyr Asp Asn Asp | Gly His Phe Tyr | | |
| 420 | 425 | 430 | |
| Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys | Gly Tyr Gln Val | | |
| 435 | 440 | 445 | |
| Ala Pro Ala Glu Ile Glu Gly Ile | Leu Leu Gln His Pro Tyr Ile Val | | |
| 450 | 455 | 460 | |
| Asp Ala Gly Val Thr Gly Ile Pro Asp Glu Ala | Ala Gly Glu Leu Pro | | |
| 465 | 470 | 475 | 480 |
| Ala Ala Gly Val Val Val Gln Thr Gly Lys | Tyr Leu Asn Glu Gln Ile | | |
| 485 | 490 | 495 | |
| Val Gln Asn Phe Val Ser Ser Gln Val | Ser Thr Ala Lys Trp Leu Arg | | |
| 500 | 505 | 510 | |
| Gly Gly Val Lys Phe Leu Asp Glu Ile Pro Lys | Gly Ser Thr Gly Lys | | |
| 515 | 520 | 525 | |
| Ile Asp Arg Lys Val Leu Arg Gln Met Phe Glu | Lys His Thr Asn Gly | | |
| 530 | 535 | 540 | |

<210> 17

<211> 544

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> /Anmerkung = "mutierte Luciferase"

<400> 17

| | | | |
|-------------------------------------|-----------------------------|----|----|
| Met Glu Asp Lys Asn Ile Leu Tyr Gly | Pro Glu Pro Phe Tyr Pro Leu | | |
| 1 | 5 | 10 | 15 |
| Ala Asp Gly Thr Ala Gly Glu Gln Met | Phe Tyr Ala Leu Ser Arg Tyr | | |

DE 699 28 687 T2 2006.08.24

| 20 | 25 | 30 |
|-----------------------------------------------------|-------------|-----|
| Ala Asp Ile Ser Gly Cys Ile Ala Leu Thr Asn Ala His | Thr Lys Glu | |
| 35 | 40 | 45 |
| Asn Val Leu Tyr Glu Glu Phe Leu Lys Leu Ser Cys Arg | Leu Ala Glu | |
| 50 | 55 | 60 |
| Ser Phe Lys Lys Tyr Gly Leu Lys Gln Asn Asp Thr Ile | Ala Val Cys | |
| 65 | 70 | 75 |
| Ser Glu Asn Gly Leu Gln Phe Phe Leu Pro Ile Ile Ala | Ser Leu Tyr | |
| 85 | 90 | 95 |
| Leu Gly Ile Ile Ala Ala Pro Val Ser Asp Lys Tyr Ile | Glu Arg Glu | |
| 100 | 105 | 110 |
| Leu Ile His Ser Leu Gly Ile Val Lys Pro Arg Ile Ile | Phe Cys Ser | |
| 115 | 120 | 125 |
| Lys Asn Thr Phe Gln Lys Val Leu Asn Val Lys Ser Lys | Leu Lys Tyr | |
| 130 | 135 | 140 |
| Val Glu Thr Ile Ile Leu Asp Leu Asn Glu Asp Leu Gly | Gly Tyr | |
| 145 | 150 | 155 |
| Gln Cys Leu Asn Asn Phe Ile Ser Gln Asn Ser Asp Ile | Asn Leu Asp | |
| 165 | 170 | 175 |
| Val Lys Lys Phe Lys Pro Tyr Ser Phe Asn Arg Asp Asp | Gln Val Ala | |
| 180 | 185 | 190 |
| Leu Val Met Phe Ser Ser Gly Thr Thr Gly Val Ser Lys | Gly Val Met | |
| 195 | 200 | 205 |
| Leu Thr His Lys Asn Ile Val Ala Arg Phe Ser Ile Ala | Lys Asp Pro | |
| 210 | 215 | 220 |
| Thr Phe Gly Asn Ala Ile Asn Pro Thr Thr Ala Ile Leu | Thr Val Ile | |
| 225 | 230 | 235 |
| Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Met Thr Thr Leu Gly | Tyr Phe Thr | |
| 245 | 250 | 255 |
| Cys Gly Phe Arg Val Val Leu Met His Thr Phe Glu Glu | Lys Leu Phe | |
| 260 | 265 | 270 |
| Leu Gln Ser Leu Gln Asp Tyr Lys Val Glu Ser Thr Leu | Leu Val Pro | |
| 275 | 280 | 285 |
| Thr Leu Met Ala Phe Leu Ala Lys Ser Ala Leu Val Glu | Lys Tyr Asp | |
| 290 | 295 | 300 |
| Leu Ser His Leu Lys Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro | Leu Ser Lys | |
| 305 | 310 | 315 |
| Glu Ile Gly Glu Met Val Lys Lys Arg Phe Lys Leu Asn | Phe Val Arg | |
| 325 | 330 | 335 |
| Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala Val Leu | Ile Thr Pro | |
| 340 | 345 | 350 |
| Asn Asn Asp Val Arg Pro Gly Ser Thr Gly Lys Ile Val | Pro Phe His | |
| 355 | 360 | 365 |
| Ala Val Lys Val Val Asp Pro Thr Thr Gly Lys Ile Leu | Gly Pro Asn | |
| 370 | 375 | 380 |
| Glu Thr Gly Glu Leu Tyr Phe Lys Gly Asp Met Ile Met | Lys Gly Tyr | |
| 385 | 390 | 395 |
| Tyr Asn Asn Glu Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asn Lys | Asp Gly Trp | |
| 405 | 410 | 415 |
| Leu Arg Ser Gly Asp Ile Ala Tyr Tyr Asp Asn Asp Gly | His Phe Tyr | |
| 420 | 425 | 430 |
| Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly | Tyr Gln Val | |
| 435 | 440 | 445 |
| Ala Pro Ala Glu Ile Glu Gly Ile Leu Leu Gln His Pro | Tyr Ile Val | |
| 450 | 455 | 460 |
| Asp Ala Gly Val Thr Gly Ile Pro Asp Glu Ala Ala Gly | Glu Leu Pro | |
| 465 | 470 | 475 |
| Ala Ala Gly Val Val Val Gln Thr Gly Lys Tyr Leu Asn | Glu Gln Ile | |
| 485 | 490 | 495 |
| Val Gln Asn Phe Val Ser Ser Gln Val Ser Thr Ala Lys | Trp Leu Arg | |

DE 699 28 687 T2 2006.08.24

| | | | |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 500 | 505 | 510 | |
| Gly Gly Val Lys Phe Leu Asp Glu Ile Pro Lys Gly Ser Thr Gly Lys | | | |
| 515 | 520 | 525 | |
| Ile Asp Arg Lys Val Leu Arg Gln Met Phe Glu Lys His Thr Asn Gly | | | |
| 530 | 535 | 540 | |
| | | | |
| <210> 18 | | | |
| <211> 544 | | | |
| <212> PRT | | | |
| <213> Künstliche Sequenz | | | |
| | | | |
| <220> | | | |
| <223> /Anmerkung = "mutierte Luciferase" | | | |
| | | | |
| <400> 18 | | | |
| Met Glu Asp Lys Asn Ile Leu Tyr Gly Pro Glu Pro Phe Tyr Pro Leu | | | |
| 1 | 5 | 10 | 15 |
| Ala Asp Gly Thr Ala Gly Glu Gln Met Phe Asp Ala Leu Ser Arg Tyr | | | |
| 20 | 25 | 30 | |
| Ala Asp Ile Ser Gly Cys Ile Ala Leu Thr Asn Ala His Thr Lys Glu | | | |
| 35 | 40 | 45 | |
| Asn Val Leu Tyr Glu Glu Phe Leu Lys Leu Ser Cys Arg Leu Ala Glu | | | |
| 50 | 55 | 60 | |
| Ser Phe Lys Lys Tyr Gly Leu Lys Gln Asn Asp Thr Ile Ala Val Cys | | | |
| 65 | 70 | 75 | 80 |
| Ser Glu Asn Gly Leu Gln Phe Phe Leu Pro Ile Ile Ala Ser Leu Tyr | | | |
| 85 | 90 | 95 | |
| Leu Gly Ile Ile Ala Ala Pro Val Ser Asp Lys Tyr Ile Glu Arg Glu | | | |
| 100 | 105 | 110 | |
| Leu Ile His Ser Leu Gly Ile Val Lys Pro Arg Ile Ile Phe Cys Ser | | | |
| 115 | 120 | 125 | |
| Lys Asn Thr Phe Gln Lys Val Leu Asn Val Lys Ser Lys Leu Lys Tyr | | | |
| 130 | 135 | 140 | |
| Val Glu Thr Ile Ile Ile Leu Asp Leu Asn Glu Asp Leu Gly Gly Tyr | | | |
| 145 | 150 | 155 | 160 |
| Gln Cys Leu Asn Asn Phe Ile Ser Gln Asn Ser Asp Ile Asn Leu Asp | | | |
| 165 | 170 | 175 | |
| Val Lys Lys Phe Lys Pro Tyr Ser Phe Asn Arg Asp Asp Gln Val Ala | | | |
| 180 | 185 | 190 | |
| Leu Val Met Phe Ser Ser Gly Thr Thr Gly Val Ser Lys Gly Val Met | | | |
| 195 | 200 | 205 | |
| Leu Thr His Lys Asn Ile Val Ala Arg Phe Ser His Ala Lys Asp Pro | | | |
| 210 | 215 | 220 | |
| Thr Phe Gly Asn Ala Ile Asn Pro Thr Thr Ala Ile Leu Thr Val Ile | | | |
| 225 | 230 | 235 | 240 |
| Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Met Thr Thr Leu Gly Tyr Phe Thr | | | |
| 245 | 250 | 255 | |
| Cys Gly Phe Arg Val Val Leu Met His Thr Phe Glu Glu Lys Leu Phe | | | |
| 260 | 265 | 270 | |
| Leu Gln Ser Leu Gln Asp Tyr Lys Val Glu Ser Thr Leu Leu Val Pro | | | |
| 275 | 280 | 285 | |
| Thr Leu Met Ala Phe Phe Ala Lys Ser Ala Leu Val Glu Lys Tyr Asp | | | |
| 290 | 295 | 300 | |
| Leu Ser His Leu Lys Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro Leu Ser Lys | | | |
| 305 | 310 | 315 | 320 |
| Glu Ile Gly Glu Met Val Lys Lys Arg Phe Lys Leu Asn Phe Val Arg | | | |
| 325 | 330 | 335 | |
| Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Ser Ala Val Leu Ile Thr Pro | | | |
| 340 | 345 | 350 | |
| Asn Asn Asp Val Arg Pro Gly Ser Thr Gly Lys Ile Val Pro Phe His | | | |

DE 699 28 687 T2 2006.08.24

| | | |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 355 | 360 | 365 |
| Ala Val Lys Val Val Asp Pro Thr Thr Gly Lys Ile Leu Gly Pro Asn | | |
| 370 | 375 | 380 |
| Glu Thr Gly Glu Leu Tyr Phe Lys Gly Asp Met Ile Met Lys Gly Tyr | | |
| 385 | 390 | 395 |
| Tyr Asn Asn Glu Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asn Lys Asp Gly Trp | | 400 |
| 405 | 410 | 415 |
| Leu Arg Ser Gly Asp Ile Ala Tyr Tyr Asp Asn Asp Gly His Phe Tyr | | |
| 420 | 425 | 430 |
| Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Gln Val | | |
| 435 | 440 | 445 |
| Ala Pro Ala Glu Ile Glu Gly Ile Leu Leu Gln His Pro Tyr Ile Val | | |
| 450 | 455 | 460 |
| Asp Ala Gly Val Thr Gly Ile Pro Asp Glu Ala Ala Gly Glu Leu Pro | | |
| 465 | 470 | 475 |
| Ala Ala Gly Val Val Gln Thr Gly Lys Tyr Leu Asn Glu Gln Ile | | 480 |
| 485 | 490 | 495 |
| Val Gln Asn Phe Val Ser Ser Gln Val Ser Thr Ala Lys Trp Leu Arg | | |
| 500 | 505 | 510 |
| Gly Gly Val Lys Phe Leu Asp Glu Ile Pro Lys Gly Ser Thr Gly Lys | | |
| 515 | 520 | 525 |
| Ile Asp Arg Lys Val Leu Arg Gln Met Phe Glu Lys His Thr Asn Gly | | |
| 530 | 535 | 540 |

<210> 19

<211> 544

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> /Anmerkung = "mutierte Luciferase"

<400> 19

| | | |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| Met Ala Asp Lys Asn Ile Leu Tyr Gly Pro Glu Pro Phe Tyr Pro Leu | | |
| 1 | 5 | 10 |
| 15 | | |
| Ala Asp Gly Thr Ala Gly Glu Gln Met Phe Asp Ala Leu Ser Arg Tyr | | |
| 20 | 25 | 30 |
| 30 | | |
| Ala Asp Ile Ser Gly Cys Ile Ala Leu Thr Asn Ala His Thr Lys Glu | | |
| 35 | 40 | 45 |
| 45 | | |
| Asn Val Leu Tyr Glu Glu Phe Leu Lys Leu Ser Cys Arg Leu Ala Glu | | |
| 50 | 55 | 60 |
| 60 | | |
| Ser Phe Lys Lys Tyr Gly Leu Lys Gln Asn Asp Thr Ile Ala Val Cys | | |
| 65 | 70 | 75 |
| 80 | | |
| Ser Glu Asn Gly Leu Gln Phe Phe Leu Pro Val Ile Ala Ser Leu Tyr | | |
| 85 | 90 | 95 |
| 95 | | |
| Leu Gly Ile Ile Ala Ala Pro Val Ser Asp Lys Tyr Ile Glu Arg Glu | | |
| 100 | 105 | 110 |
| 110 | | |
| Leu Ile His Ser Leu Gly Ile Val Lys Pro Arg Ile Ile Phe Cys Ser | | |
| 115 | 120 | 125 |
| 125 | | |
| Lys Asn Thr Phe Gln Lys Val Leu Asn Val Lys Ser Lys Leu Lys Ser | | |
| 130 | 135 | 140 |
| 140 | | |
| Val Glu Thr Ile Ile Ile Leu Asp Leu Asn Glu Asp Leu Gly Gly Tyr | | |
| 145 | 150 | 155 |
| 160 | | |
| Gln Cys Leu Asn Asn Phe Ile Ser Gln Asn Ser Asp Ser Asn Leu Asp | | |
| 165 | 170 | 175 |
| 175 | | |
| Val Lys Lys Phe Lys Pro Tyr Ser Phe Asn Arg Asp Asp Gln Val Ala | | |
| 180 | 185 | 190 |
| 190 | | |
| Leu Val Met Phe Ser Ser Gly Thr Thr Gly Val Pro Lys Gly Val Met | | |
| 195 | 200 | 205 |
| 205 | | |
| Leu Thr His Lys Asn Ile Val Ala Arg Phe Ser Leu Ala Lys Asp Pro | | |

DE 699 28 687 T2 2006.08.24

| | | |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 210 | 215 | 220 |
| Thr Phe Gly Asn Ala Ile Asn Pro Thr Thr Ala Ile Leu Thr Val Ile | | |
| 225 | 230 | 235 |
| Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Met Thr Thr Leu Gly Tyr Phe Thr | | 240 |
| 245 | 250 | 255 |
| Cys Gly Phe Arg Val Val Leu Met His Thr Phe Glu Glu Lys Leu Phe | | |
| 260 | 265 | 270 |
| Leu Gln Ser Leu Gln Asp Tyr Lys Val Glu Ser Thr Leu Leu Val Pro | | |
| 275 | 280 | 285 |
| Thr Leu Met Ala Phe Leu Ala Lys Ser Ala Leu Val Glu Lys Tyr Asp | | |
| 290 | 295 | 300 |
| Leu Ser His Leu Lys Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro Leu Ser Lys | | |
| 305 | 310 | 315 |
| Glu Ile Gly Glu Met Val Lys Lys Arg Phe Lys Leu Asn Phe Val Arg | | 320 |
| 325 | 330 | 335 |
| Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Ser Ala Val Leu Ile Thr Pro | | |
| 340 | 345 | 350 |
| Lys Gly Asp Ala Arg Pro Gly Ser Thr Gly Lys Ile Val Pro Phe His | | |
| 355 | 360 | 365 |
| Ala Val Lys Val Val Asp Pro Thr Thr Gly Lys Ile Leu Gly Pro Asn | | |
| 370 | 375 | 380 |
| Glu Pro Gly Glu Leu Tyr Phe Lys Gly Ala Met Ile Met Lys Gly Tyr | | |
| 385 | 390 | 395 |
| Tyr Asn Asn Glu Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asp Asn Asp Gly Trp | | 400 |
| 405 | 410 | 415 |
| Leu Arg Ser Gly Asp Ile Ala Tyr Tyr Asp Asn Asp Gly His Phe Tyr | | |
| 420 | 425 | 430 |
| Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Gln Val | | |
| 435 | 440 | 445 |
| Ala Pro Ala Glu Ile Glu Gly Ile Leu Leu Gln His Pro Tyr Ile Val | | |
| 450 | 455 | 460 |
| Asp Ala Gly Val Thr Gly Ile Pro Asp Glu Ala Ala Gly Glu Leu Pro | | |
| 465 | 470 | 475 |
| Ala Ala Gly Val Val Val Gln Thr Gly Lys Tyr Leu Asn Glu Gln Ile | | 480 |
| 485 | 490 | 495 |
| Val Gln Asp Phe Val Ser Ser Gln Val Ser Thr Ala Lys Trp Leu Arg | | |
| 500 | 505 | 510 |
| Gly Gly Val Lys Phe Leu Asp Glu Ile Pro Lys Gly Ser Thr Gly Lys | | |
| 515 | 520 | 525 |
| Ile Asp Arg Lys Val Leu Arg Gln Met Phe Glu Lys His Thr Asn Gly | | |
| 530 | 535 | 540 |

<210> 20

<211> 544

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> /Anmerkung = "mutierte Luciferase"

<221> unsure

<222> (354)...(355)

<223> /Anmerkung = "unbekannte Aminosäuren"

<400> 20

| | | |
|-----------------------------------------------------------------|----|----|
| Met Ala Asp Lys Asn Ile Leu Tyr Gly Pro Glu Pro Phe Tyr Pro Leu | | |
| 1 | 5 | 10 |
| Ala Asp Gly Thr Ala Gly Glu Gln Met Phe Tyr Ala Leu Ser Arg Tyr | | 15 |
| 20 | 25 | 30 |
| Ala Asp Ile Ser Gly Cys Ile Ala Leu Thr Asn Ala His Thr Lys Glu | | |

DE 699 28 687 T2 2006.08.24

| 35 | 40 | 45 |
|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Asn Val Leu Tyr Glu Glu Phe | Leu Lys Leu Ser Cys | Arg Leu Ala Glu |
| 50 | 55 | 60 |
| Ser Phe Lys Lys Tyr Gly | Leu Lys Gln Asn Asp | Thr Ile Ala Val Cys |
| 65 | 70 | 75 |
| Ser Glu Asn Gly Leu Gln Phe | Phe Leu Pro Val Ile | Ala Ser Leu Tyr |
| 85 | 90 | 95 |
| Leu Gly Ile Ile Ala Ala Pro | Val Ser Asp Lys Tyr | Ile Glu Arg Glu |
| 100 | 105 | 110 |
| Leu Ile His Ser Leu Gly Ile | Val Lys Pro Arg Ile | Ile Phe Cys Ser |
| 115 | 120 | 125 |
| Lys Asn Thr Phe Gln Lys | Val Leu Asn Val Lys | Ser Lys Leu Lys Tyr |
| 130 | 135 | 140 |
| Val Glu Thr Ile Ile Ile | Leu Asp Leu Asn Glu | Asp Leu Gly Gly Tyr |
| 145 | 150 | 155 |
| Gln Cys Leu Asn Asn Phe | Ile Ser Gln Asn Ser Asp | Ile Asn Leu Asp |
| 165 | 170 | 175 |
| Val Lys Lys Phe Lys Pro | Tyr Ser Phe Asn Arg Asp Asp | Gln Val Ala |
| 180 | 185 | 190 |
| Leu Val Met Phe Ser Ser | Gly Thr Thr Gly Val Pro | Lys Gly Val Met |
| 195 | 200 | 205 |
| Leu Thr His Lys Asn Ile | Val Ala Arg Phe Ser | Leu Ala Lys Asp Pro |
| 210 | 215 | 220 |
| Thr Phe Gly Asn Ala Ile | Asn Pro Thr Thr Ala | Ile Leu Thr Val Ile |
| 225 | 230 | 235 |
| Pro Phe His His Gly | Phe Gly Met Met | Thr Thr Leu Gly Tyr Phe Thr |
| 245 | 250 | 255 |
| Cys Gly Phe Arg Val Val | Leu Met His Thr Phe Glu Glu | Lys Leu Phe |
| 260 | 265 | 270 |
| Leu Gln Ser Leu Gln Asp | Tyr Lys Val Glu Ser Thr | Leu Leu Val Pro |
| 275 | 280 | 285 |
| Thr Leu Met Ala Phe | Leu Ala Lys Ser Ala | Leu Val Glu Lys Tyr Asp |
| 290 | 295 | 300 |
| Leu Ser His Leu Lys | Glu Ile Ala Ser Gly | Gly Ala Pro Leu Ser Lys |
| 305 | 310 | 315 |
| Glu Ile Gly Glu Met Val | Lys Lys Arg Phe | Lys Leu Asn Phe Val Arg |
| 325 | 330 | 335 |
| Gln Gly Tyr Gly Leu Thr | Glu Thr Thr Ser Ala Val | Leu Ile Thr Pro |
| 340 | 345 | 350 |
| Lys Xaa Xaa Val Arg Pro | Gly Ser Thr Gly Lys | Ile Val Pro Phe His |
| 355 | 360 | 365 |
| Ala Val Lys Val Val Asp | Pro Thr Thr Gly Lys | Ile Leu Gly Pro Asn |
| 370 | 375 | 380 |
| Glu Pro Gly Glu Leu Tyr | Phe Lys Gly Asp Met | Ile Met Lys Gly Tyr |
| 385 | 390 | 395 |
| Tyr Asn Asn Glu Glu Ala | Thr Lys Ala Ile | Ile Asp Lys Asp Gly Trp |
| 405 | 410 | 415 |
| Leu Arg Ser Gly Asp Ile | Ala Tyr Tyr Asp Asn Asp | Gly His Phe Tyr |
| 420 | 425 | 430 |
| Ile Val Asp Arg Leu Lys | Ser Leu Ile Lys Tyr | Lys Gly Tyr Gln Val |
| 435 | 440 | 445 |
| Ala Pro Ala Glu Ile Glu | Gly Ile Leu Leu Gln | His Pro Tyr Ile Val |
| 450 | 455 | 460 |
| Asp Ala Gly Val Thr Gly | Ile Pro Asp Glu Ala | Ala Gly Glu Leu Pro |
| 465 | 470 | 475 |
| Ala Ala Gly Val Val Gln | Thr Gly Lys Tyr | Leu Asn Glu Gln Ile |
| 485 | 490 | 495 |
| Val Gln Asn Phe Val Ser | Ser Gln Val Ser Thr | Ala Lys Trp Leu Arg |
| 500 | 505 | 510 |
| Gly Gly Val Lys Phe | Leu Asp Glu Ile | Pro Lys Gly Ser Thr Gly Lys |

| | | |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 515 | 520 | 525 |
| Ile Asp Arg Lys Val Leu Arg Gln Met Phe Glu Lys His Thr Asn Gly | | |
| 530 | 535 | 540 |
| | | |
| <210> 21 | | |
| <211> 544 | | |
| <212> PRT | | |
| <213> Künstliche Sequenz | | |
| | | |
| <220> | | |
| <223> /Anmerkung = "mutierte Luciferase" | | |
| | | |
| <221> unsure | | |
| <222> (354)...(355) | | |
| <223> /Anmerkung = "unbekannte Aminosäuren" | | |
| | | |
| <400> 21 | | |
| Met Ala Asp Lys Asn Ile Leu Tyr Gly Pro Glu Pro Phe Tyr Pro Leu | | |
| 1 | 5 | 10 |
| Ala Asp Gly Thr Ala Gly Glu Gln Met Phe Asp Ala Leu Ser Arg Tyr | | |
| 20 | 25 | 30 |
| Ala Asp Ile Pro Gly Cys Ile Ala Leu Thr Asn Ala His Thr Lys Glu | | |
| 35 | 40 | 45 |
| Asn Val Leu Tyr Glu Glu Phe Leu Lys Leu Ser Cys Arg Leu Ala Glu | | |
| 50 | 55 | 60 |
| Ser Phe Lys Lys Tyr Gly Leu Lys Gln Asn Asp Thr Ile Ala Val Cys | | |
| 65 | 70 | 75 |
| Ser Glu Asn Gly Leu Gln Tyr Phe Leu Pro Val Ile Ala Ser Leu Tyr | | |
| 85 | 90 | 95 |
| Leu Gly Ile Ile Ala Ala Pro Val Ser Asp Lys Tyr Ile Glu Arg Glu | | |
| 100 | 105 | 110 |
| Leu Ile His Ser Leu Gly Ile Val Lys Pro Arg Ile Ile Phe Cys Ser | | |
| 115 | 120 | 125 |
| Lys Asn Thr Phe Gln Lys Val Leu Asn Val Lys Ser Lys Leu Lys Tyr | | |
| 130 | 135 | 140 |
| Val Glu Thr Ile Ile Leu Asp Leu Asn Glu Asp Leu Gly Gly Tyr | | |
| 145 | 150 | 155 |
| Gln Cys Leu Asn Asn Phe Ile Ser Gln Asn Ser Asp Ile Asn Leu Asp | | |
| 165 | 170 | 175 |
| Val Lys Lys Phe Lys Pro Asn Ser Phe Asn Arg Asp Asp Gln Val Ala | | |
| 180 | 185 | 190 |
| Leu Val Met Phe Ser Ser Gly Thr Thr Gly Val Pro Lys Gly Val Met | | |
| 195 | 200 | 205 |
| Leu Thr His Lys Asn Ile Val Ala Arg Phe Ser Ile Ala Lys Asp Pro | | |
| 210 | 215 | 220 |
| Thr Phe Gly Asn Ala Ile Asn Pro Thr Thr Ala Ile Leu Thr Val Ile | | |
| 225 | 230 | 235 |
| Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Met Thr Thr Leu Gly Tyr Phe Thr | | |
| 245 | 250 | 255 |
| Cys Gly Phe Arg Val Val Leu Met His Thr Phe Glu Glu Lys Leu Phe | | |
| 260 | 265 | 270 |
| Leu Gln Ser Leu Gln Asp Tyr Lys Val Glu Ser Thr Leu Leu Val Pro | | |
| 275 | 280 | 285 |
| Thr Leu Met Ala Phe Leu Ala Lys Ser Ala Leu Val Glu Lys Tyr Asp | | |
| 290 | 295 | 300 |
| Leu Ser His Leu Lys Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro Leu Ser Lys | | |
| 305 | 310 | 315 |
| Glu Ile Gly Glu Met Val Lys Lys Arg Phe Lys Leu Asn Phe Val Arg | | |
| 325 | 330 | 335 |
| Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Ser Ala Val Leu Ile Thr Pro | | |

DE 699 28 687 T2 2006.08.24

| | | |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 340 | 345 | 350 |
| Lys Xaa Xaa Ala Arg Pro Gly Ser Thr Gly Lys Ile Val Pro Phe His | | |
| 355 | 360 | 365 |
| Ala Val Lys Val Val Asp Pro Thr Thr Gly Lys Ile Leu Gly Pro Asn | | |
| 370 | 375 | 380 |
| Glu Pro Gly Glu Leu Tyr Phe Lys Gly Ala Met Ile Met Lys Gly Tyr | | |
| 385 | 390 | 395 |
| Tyr Asn Asn Glu Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asp Lys Asp Gly Trp | | |
| 405 | 410 | 415 |
| Leu Arg Ser Gly Asp Ile Ala Tyr Tyr Asp Asn Asp Gly His Phe Tyr | | |
| 420 | 425 | 430 |
| Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Gln Val | | |
| 435 | 440 | 445 |
| Ala Pro Ala Glu Ile Glu Gly Ile Leu Leu Gln His Pro Tyr Ile Val | | |
| 450 | 455 | 460 |
| Asp Ala Gly Val Thr Gly Ile Pro Asp Glu Ala Ala Gly Glu Leu Pro | | |
| 465 | 470 | 475 |
| Ala Ala Gly Val Val Val Gln Thr Gly Lys Tyr Leu Asn Glu Gln Ile | | |
| 485 | 490 | 495 |
| Val Gln Asn Phe Val Ser Ser Gln Val Ser Thr Ala Lys Trp Leu Arg | | |
| 500 | 505 | 510 |
| Gly Gly Val Lys Phe Leu Asp Glu Ile Pro Lys Gly Ser Thr Gly Lys | | |
| 515 | 520 | 525 |
| Ile Asp Arg Lys Val Leu Arg Gln Met Phe Glu Lys His Thr Asn Gly | | |
| 530 | 535 | 540 |

<210> 22

<211> 544

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> /Anmerkung = "mutierte Luciferase"

<221> unsure

<222> (354)...(355)

<223> /Anmerkung = "unbekannte Aminosäuren"

<400> 22

| | | |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| Met Ala Asp Lys Asn Ile Leu Tyr Gly Pro Glu Pro Phe Tyr Pro Leu | | |
| 1 | 5 | 10 |
| Ala Asp Gly Thr Ala Gly Glu Gln Met Phe Asp Ala Leu Ser Arg Tyr | | |
| 20 | 25 | 30 |
| Ala Asp Ile Pro Gly Cys Ile Ala Leu Thr Asn Ala His Thr Lys Glu | | |
| 35 | 40 | 45 |
| Asn Val Leu Tyr Glu Glu Phe Leu Lys Leu Ser Cys Arg Leu Ala Glu | | |
| 50 | 55 | 60 |
| Ser Phe Lys Lys Tyr Gly Leu Lys Gln Asn Asp Thr Ile Ala Val Cys | | |
| 65 | 70 | 75 |
| 80 | | |
| Ser Glu Asn Gly Leu Gln Phe Phe Leu Pro Val Ile Ala Ser Leu Tyr | | |
| 85 | 90 | 95 |
| Leu Gly Ile Ile Ala Ala Pro Val Ser Asp Lys Tyr Val Glu Arg Glu | | |
| 100 | 105 | 110 |
| Leu Ile His Ser Leu Gly Ile Val Lys Pro Arg Ile Ile Phe Cys Ser | | |
| 115 | 120 | 125 |
| Lys Asn Thr Phe Gln Lys Val Leu Asn Val Lys Ser Lys Leu Lys Tyr | | |
| 130 | 135 | 140 |
| Val Glu Thr Ile Ile Ile Leu Asp Leu Asn Glu Asp Leu Gly Gly Tyr | | |
| 145 | 150 | 155 |
| Gln Cys Leu Asn Asn Phe Ile Ser Gln Asn Ser Asp Ser Asn Leu Asp | | |

DE 699 28 687 T2 2006.08.24

| | | | |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| | 165 | 170 | 175 |
| Val Lys Lys Phe Lys Pro Asn Ser Phe Asn Arg Asp Asp Gln Val Ala | | | |
| 180 | 185 | 190 | |
| Leu Val Met Phe Ser Ser Gly Thr Thr Gly Val Pro Lys Gly Val Met | | | |
| 195 | 200 | 205 | |
| Leu Thr His Lys Asn Ile Val Ala Arg Phe Ser Leu Ala Lys Asp Pro | | | |
| 210 | 215 | 220 | |
| Thr Phe Gly Asn Ala Ile Asn Pro Thr Thr Ala Ile Leu Thr Val Ile | | | |
| 225 | 230 | 235 | 240 |
| Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Met Thr Thr Leu Gly Tyr Phe Thr | | | |
| 245 | 250 | 255 | |
| Cys Gly Phe Arg Val Val Leu Met His Thr Phe Glu Glu Lys Leu Phe | | | |
| 260 | 265 | 270 | |
| Leu Gln Ser Leu Gln Asp Tyr Lys Val Glu Ser Thr Leu Leu Val Pro | | | |
| 275 | 280 | 285 | |
| Thr Leu Met Ala Phe Leu Ala Lys Ser Ala Leu Val Glu Lys Tyr Asp | | | |
| 290 | 295 | 300 | |
| Leu Ser His Leu Lys Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro Leu Ser Lys | | | |
| 305 | 310 | 315 | 320 |
| Glu Ile Gly Glu Met Val Lys Lys Arg Phe Lys Leu Asn Phe Val Arg | | | |
| 325 | 330 | 335 | |
| Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Ser Ala Val Leu Ile Thr Pro | | | |
| 340 | 345 | 350 | |
| Lys Xaa Xaa Ala Arg Pro Gly Ser Thr Gly Lys Ile Val Pro Phe His | | | |
| 355 | 360 | 365 | |
| Ala Val Lys Val Val Asp Pro Thr Thr Gly Lys Ile Leu Gly Pro Asn | | | |
| 370 | 375 | 380 | |
| Glu Thr Gly Glu Leu Tyr Phe Lys Gly Ala Met Ile Met Lys Gly Tyr | | | |
| 385 | 390 | 395 | 400 |
| Tyr Asn Asn Glu Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asp Lys Asp Gly Trp | | | |
| 405 | 410 | 415 | |
| Leu Arg Ser Gly Asp Ile Ala Tyr Tyr Asp Asn Asp Gly His Phe Tyr | | | |
| 420 | 425 | 430 | |
| Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Gln Val | | | |
| 435 | 440 | 445 | |
| Ala Pro Ala Glu Ile Glu Gly Ile Leu Leu Gln His Pro Tyr Ile Val | | | |
| 450 | 455 | 460 | |
| Asp Ala Gly Val Thr Gly Ile Pro Asp Glu Ala Ala Gly Glu Leu Pro | | | |
| 465 | 470 | 475 | 480 |
| Ala Ala Gly Val Val Val Gln Thr Gly Lys Tyr Leu Asn Glu Gln Ile | | | |
| 485 | 490 | 495 | |
| Val Gln Asn Phe Val Ser Ser Gln Val Ser Thr Ala Lys Trp Leu Arg | | | |
| 500 | 505 | 510 | |
| Gly Gly Val Lys Phe Leu Asp Glu Ile Pro Lys Gly Ser Thr Gly Lys | | | |
| 515 | 520 | 525 | |
| Ile Asp Arg Lys Val Leu Arg Gln Met Phe Glu Lys His Thr Asn Gly | | | |
| 530 | 535 | 540 | |

<210> 23

<211> 544

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> /Anmerkung = "mutierte Luciferase"

<221> unsure

<222> (354)...(355)

<223> /Anmerkung = "unbekannte Aminosäuren"

DE 699 28 687 T2 2006.08.24

<400> 23

Met Ala Asp Lys Asn Ile Leu Tyr Gly Pro Glu Pro Phe Tyr Pro Leu
 1 5 10 15
 Ala Asp Gly Thr Ala Gly Glu Gln Met Phe Asp Ala Leu Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Ala Asp Ile Pro Gly Cys Ile Ala Leu Thr Asn Ala His Thr Lys Glu
 35 40 45
 Asn Val Leu Tyr Glu Glu Phe Leu Lys Leu Ser Cys Arg Leu Ala Glu
 50 55 60
 Ser Phe Lys Lys Tyr Gly Leu Lys Gln Asn Asp Thr Ile Ala Val Cys
 65 70 75 80
 Ser Glu Asn Gly Leu Gln Phe Phe Leu Pro Val Ile Ala Ser Leu Tyr
 85 90 95
 Leu Gly Ile Ile Val Ala Pro Val Asn Asp Lys Tyr Ile Glu Arg Glu
 100 105 110
 Leu Ile His Ser Leu Gly Ile Val Lys Pro Arg Ile Ile Phe Cys Ser
 115 120 125
 Lys Asn Thr Phe Gln Lys Val Leu Asn Val Lys Ser Lys Leu Lys Ser
 130 135 140
 Val Glu Thr Ile Ile Leu Asp Leu Asn Glu Asp Leu Gly Gly Tyr
 145 150 155 160
 Gln Cys Leu Asn Asn Phe Ile Ser Gln Asn Ser Asp Ile Asn Leu Asp
 165 170 175
 Val Lys Lys Phe Lys Pro Tyr Ser Phe Asn Arg Asp Asp Gln Val Ala
 180 185 190
 Leu Ile Met Phe Ser Ser Gly Thr Thr Gly Leu Pro Lys Gly Val Met
 195 200 205
 Leu Thr His Lys Asn Ile Val Ala Arg Phe Ser Leu Ala Lys Asp Pro
 210 215 220
 Thr Phe Gly Asn Ala Ile Asn Pro Thr Thr Ala Ile Leu Thr Val Ile
 225 230 235 240
 Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Met Thr Thr Leu Gly Tyr Phe Thr
 245 250 255
 Cys Gly Phe Arg Val Val Leu Met His Thr Phe Glu Glu Lys Leu Phe
 260 265 270
 Leu Gln Ser Leu Gln Asp Tyr Lys Val Glu Ser Thr Leu Leu Val Pro
 275 280 285
 Thr Leu Met Ala Phe Leu Ala Lys Ser Ala Leu Val Glu Lys Tyr Asp
 290 295 300
 Leu Ser His Leu Lys Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro Leu Ser Lys
 305 310 315 320
 Glu Ile Gly Glu Met Val Lys Lys Arg Phe Lys Leu Asn Phe Val Arg
 325 330 335
 Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala Val Leu Ile Thr Pro
 340 345 350
 Lys Xaa Xaa Ala Arg Pro Gly Ser Thr Gly Lys Ile Val Pro Phe His
 355 360 365
 Ala Val Lys Val Val Asp Pro Thr Thr Gly Lys Ile Leu Gly Pro Asn
 370 375 380
 Glu Pro Gly Glu Leu Tyr Phe Lys Gly Pro Met Ile Met Lys Gly Tyr
 385 390 395 400
 Tyr Asn Asn Glu Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asp Asn Asp Gly Trp
 405 410 415
 Leu Arg Ser Gly Asp Ile Ala Tyr Tyr Asp Asn Asp Gly His Phe Tyr
 420 425 430
 Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Gln Val
 435 440 445
 Ala Pro Ala Glu Ile Glu Gly Ile Leu Leu Gln His Pro Tyr Ile Val
 450 455 460
 Asp Ala Gly Val Thr Gly Ile Pro Asp Glu Ala Ala Gly Glu Leu Pro

DE 699 28 687 T2 2006.08.24

| | | | |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 465 | 470 | 475 | 480 |
| Ala Ala Gly Val Val Gln Thr Gly Lys Tyr Leu Asn Glu Gln Ile | | | |
| 485 | 490 | 495 | |
| Val Gln Asp Phe Val Ser Ser Gln Val Ser Thr Ala Lys Trp Leu Arg | | | |
| 500 | 505 | 510 | |
| Gly Gly Val Lys Phe Leu Asp Glu Ile Pro Lys Gly Ser Thr Gly Lys | | | |
| 515 | 520 | 525 | |
| Ile Asp Arg Lys Val Leu Arg Gln Met Phe Glu Lys His Thr Asn Gly | | | |
| 530 | 535 | 540 | |

<210> 24

<211> 544

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> /Anmerkung = "mutierte Luciferase"

<400> 24

| | | | |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| Met Ala Asp Lys Asn Ile Leu Tyr Gly Pro Glu Pro Phe Tyr Pro Leu | | | |
| 1 | 5 | 10 | 15 |
| Glu Asp Gly Thr Ala Gly Glu Gln Met Phe Asp Ala Leu Ser Arg Tyr | | | |
| 20 | 25 | 30 | |
| Ala Asp Ile Pro Gly Cys Ile Ala Leu Thr Asn Ala His Thr Lys Glu | | | |
| 35 | 40 | 45 | |
| Asn Val Leu Tyr Glu Glu Phe Leu Lys Leu Ser Cys Arg Leu Ala Glu | | | |
| 50 | 55 | 60 | |
| Ser Phe Lys Lys Tyr Gly Leu Lys Gln Asn Asp Thr Ile Ala Val Cys | | | |
| 65 | 70 | 75 | 80 |
| Ser Glu Asn Gly Leu Gln Phe Phe Leu Pro Val Ile Ala Ser Leu Tyr | | | |
| 85 | 90 | 95 | |
| Leu Gly Ile Ile Val Ala Pro Val Asn Asp Lys Tyr Ile Glu Arg Glu | | | |
| Leu Ile His Ser Leu Gly Ile Val Lys Pro Arg Ile Val Phe Cys Ser | | | |
| 115 | 120 | 125 | |
| Lys Asn Thr Phe Gln Lys Val Leu Asn Val Lys Ser Lys Leu Lys Ser | | | |
| 130 | 135 | 140 | |
| Ile Glu Thr Ile Ile Ile Leu Asp Leu Asn Glu Asp Leu Gly Gly Tyr | | | |
| 145 | 150 | 155 | 160 |
| Gln Cys Leu Asn Asn Phe Ile Ser Gln Asn Ser Asp Ser Asn Leu Asp | | | |
| Val Lys Lys Phe Lys Pro Tyr Ser Phe Asn Arg Asp Asp Gln Val Ala | | | |
| 180 | 185 | 190 | |
| Leu Ile Met Phe Ser Ser Gly Thr Thr Gly Leu Pro Lys Gly Val Met | | | |
| 195 | 200 | 205 | |
| Leu Thr His Lys Asn Ile Val Ala Arg Phe Ser Leu Ala Lys Asp Pro | | | |
| 210 | 215 | 220 | |
| Thr Phe Gly Asn Ala Ile Asn Pro Thr Thr Ala Ile Leu Thr Val Ile | | | |
| 225 | 230 | 235 | 240 |
| Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Met Thr Thr Leu Gly Tyr Phe Thr | | | |
| 245 | 250 | 255 | |
| Cys Gly Phe Arg Val Val Leu Met His Thr Phe Glu Glu Lys Leu Phe | | | |
| Leu Gln Ser Leu Gln Asp Tyr Lys Val Glu Ser Thr Leu Leu Val Pro | | | |
| 275 | 280 | 285 | |
| Thr Leu Met Ala Phe Leu Ala Lys Ser Ala Leu Val Glu Lys Tyr Asp | | | |
| 290 | 295 | 300 | |
| Leu Ser His Leu Lys Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro Leu Ser Lys | | | |
| 305 | 310 | 315 | 320 |
| Glu Ile Gly Glu Met Val Lys Lys Arg Phe Lys Leu Asn Phe Val Arg | | | |
| Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala Val Leu Ile Thr Pro | | | |
| 340 | 345 | 350 | |
| Lys Gly Asp Ala Lys Pro Gly Ser Thr Gly Lys Ile Val Pro Phe His | | | |

DE 699 28 687 T2 2006.08.24

| | | |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 355 | 360 | 365 |
| Ala Val Lys Val Val Asp Pro Thr Thr Gly Lys Ile Leu Gly Pro Asn | | |
| 370 | 375 | 380 |
| Glu Pro Gly Glu Leu Tyr Phe Lys Gly Pro Met Ile Met Lys Gly Tyr | | |
| 385 | 390 | 395 |
| Tyr Asn Asn Glu Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asp Asn Asp Gly Trp | | |
| 405 | 410 | 415 |
| Leu Arg Ser Gly Asp Ile Ala Tyr Tyr Asp Asn Asp Gly His Phe Tyr | | |
| Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Gln Val | | |
| 435 | 440 | 445 |
| Ala Pro Ala Glu Ile Glu Gly Ile Leu Leu Gln His Pro Tyr Ile Val | | |
| 450 | 455 | 460 |
| Asp Ala Gly Val Thr Gly Ile Pro Asp Glu Ala Ala Gly Glu Leu Pro | | |
| 465 | 470 | 475 |
| Ala Ala Gly Val Val Val Gln Thr Gly Lys Tyr Leu Asn Glu Gln Ile | | |
| Val Gln Asp Tyr Val Ala Ser Gln Val Ser Thr Ala Lys Trp Leu Arg | | |
| 500 | 505 | 510 |
| Gly Gly Val Lys Phe Leu Asp Glu Ile Pro Lys Gly Ser Thr Gly Lys | | |
| 515 | 520 | 525 |
| Ile Asp Arg Lys Val Leu Arg Gln Met Phe Glu Lys His Thr Asn Gly | | |
| 530 | 535 | 540 |

<210> 25

<211> 545

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> /Anmerkung = "mutierte Luciferase"

<400> 25

| | | |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| Met Glu Asp Lys Asn Ile Leu Tyr Gly Pro Glu Pro Phe Tyr Pro Leu | 1 | 15 |
| 5 | 10 | |
| Ala Asp Gly Thr Ala Gly Glu Gln Met Phe Tyr Ala Leu Ser Arg Tyr | | |
| 20 | 25 | 30 |
| Ala Asp Ile Ser Gly Cys Ile Ala Leu Thr Asn Ala His Thr Lys Glu | | |
| 35 | 40 | 45 |
| Asn Val Leu Tyr Glu Glu Phe Leu Lys Leu Ser Cys Arg Leu Ala Glu | | |
| 50 | 55 | 60 |
| Ser Phe Lys Lys Tyr Gly Leu Lys Gln Asn Asp Thr Ile Ala Val Cys | | |
| 65 | 70 | 75 |
| Ser Glu Asn Gly Leu Gln Phe Phe Leu Pro Leu Ile Ala Ser Leu Tyr | | |
| 85 | 90 | 95 |
| Leu Gly Ile Ile Ala Ala Pro Val Ser Asp Lys Tyr Ile Glu Arg Glu | | |
| 100 | 105 | 110 |
| Leu Ile His Ser Leu Gly Ile Val Lys Pro Arg Ile Ile Phe Cys Ser | | |
| 115 | 120 | 125 |
| Lys Asn Thr Phe Gln Lys Val Leu Asn Val Lys Ser Lys Leu Lys Tyr | | |
| 130 | 135 | 140 |
| Val Glu Thr Ile Ile Ile Leu Asp Leu Asn Glu Asp Leu Gly Gly Tyr | | |
| 145 | 150 | 155 |
| Gln Cys Leu Asn Asn Phe Ile Ser Gln Asn Ser Asp Ile Asn Leu Asp | | |
| 165 | 170 | 175 |
| Val Lys Lys Phe Lys Pro Asn Ser Phe Asn Arg Asp Asp Gln Val Ala | | |
| 180 | 185 | 190 |
| Leu Val Met Phe Ser Ser Gly Thr Thr Gly Val Ser Lys Gly Val Met | | |
| 195 | 200 | 205 |
| Leu Thr His Lys Asn Ile Val Ala Arg Phe Ser His Cys Lys Asp Pro | | |
| 210 | 215 | 220 |
| Thr Phe Gly Asn Ala Ile Asn Pro Thr Thr Ala Ile Leu Thr Val Ile | | |

DE 699 28 687 T2 2006.08.24

| | | | |
|-----------------------------------------|-----------------------------|-----|-----|
| 225 | 230 | 235 | 240 |
| Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Met | Thr Thr Leu Gly Tyr Phe Thr | | |
| 245 | 250 | 255 | |
| Cys Gly Phe Arg Val Ala Leu Met His | Thr Phe Glu Glu Lys Leu Phe | | |
| 260 | 265 | 270 | |
| Leu Gln Ser Leu Gln Asp Tyr Lys Val | Glu Ser Thr Leu Leu Val Pro | | |
| 275 | 280 | 285 | |
| Thr Leu Met Ala Phe Phe Ala Lys Ser Ala | Leu Val Glu Lys Tyr Asp | | |
| 290 | 295 | 300 | |
| Leu Ser His Leu Lys Glu Ile Ala Ser Gly | Gly Ala Pro Leu Ser Lys | | |
| 305 | 310 | 315 | 320 |
| Glu Ile Gly Glu Met Val Lys Lys Arg | Phe Lys Leu Asn Phe Val Arg | | |
| 325 | 330 | 335 | |
| Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Ser Ala | Val Leu Ile Thr Pro | | |
| 340 | 345 | 350 | |
| Asp Thr Asp Val Arg Pro Gly Ser Thr Gly | Lys Ile Val Pro Phe His | | |
| 355 | 360 | 365 | |
| Ala Val Lys Val Val Asp Pro Thr Thr Gly | Lys Ile Leu Gly Pro Asn | | |
| 370 | 375 | 380 | |
| Glu Thr Gly Glu Leu Tyr Phe Lys Gly Asp | Met Ile Met Lys Gly Tyr | | |
| 385 | 390 | 395 | 400 |
| Tyr Asn Asn Glu Glu Ala Thr Lys Ala | Ile Ile Asn Lys Asp Gly Trp | | |
| 405 | 410 | 415 | |
| Leu Arg Ser Gly Asp Ile Ala Tyr Tyr Asp | Asn Asp Gly His Phe Tyr | | |
| 420 | 425 | 430 | |
| Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys | Tyr Lys Gly Tyr Gln Val | | |
| 435 | 440 | 445 | |
| Ala Pro Ala Glu Ile Glu Gly Ile Leu Leu | Gln His Pro Tyr Ile Val | | |
| 450 | 455 | 460 | |
| Asp Ala Gly Val Thr Gly Ile Pro Asp Glu | Ala Ala Gly Glu Leu Pro | | |
| 465 | 470 | 475 | 480 |
| Ala Ala Gly Val Val Val Gln Thr Gly Lys | Tyr Leu Asn Glu Gln Ile | | |
| 485 | 490 | 495 | |
| Val Gln Asn Phe Val Ser Ser Gln Val | Ser Thr Ala Lys Trp Leu Arg | | |
| 500 | 505 | 510 | |
| Gly Gly Val Lys Phe Leu Asp Glu Ile Pro | Lys Gly Ser Thr Gly Lys | | |
| 515 | 520 | 525 | |
| Ile Asp Arg Lys Val Leu Arg Gln Met Phe | Glu Lys His Lys Ser Lys | | |
| 530 | 535 | 540 | |
| Leu | | | |
| 545 | | | |

<210> 26
 <211> 542
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Anmerkung = "mutierte Luciferase"

<400> 26

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

DE 699 28 687 T2 2006.08.24

| 65 | 70 | 75 | 80 |
|-----|-------------------------------------------------------------|-----|-----|
| Ala | Glu Asn Asn Thr Arg Phe Phe Ile Pro Val Ile Ala Ala Trp Tyr | | |
| | 85 | 90 | 95 |
| Ile | Gly Met Ile Val Ala Pro Val Asn Glu Ser Tyr Ile Pro Asp Glu | | |
| | 100 | 105 | 110 |
| Leu | Cys Lys Val Met Gly Ile Ser Lys Pro Gln Ile Val Phe Thr Thr | | |
| | 115 | 120 | 125 |
| Lys | Asn Ile Leu Asn Lys Val Leu Glu Val Gln Ser Arg Thr Asn Phe | | |
| | 130 | 135 | 140 |
| Ile | Lys Arg Ile Ile Leu Asp Thr Val Glu Asn Ile His Gly Cys | | |
| | 145 | 150 | 160 |
| Glu | Ser Leu Pro Asn Gly Ile Ser Arg Tyr Ser Asp Gly Asn Ile Ala | | |
| | 165 | 170 | 175 |
| Asn | Phe Lys Pro Leu His Phe Asp Pro Val Glu Gln Val Ala Ala Ile | | |
| | 180 | 185 | 190 |
| Leu | Cys Ser Ser Gly Thr Thr Gly Leu Pro Lys Gly Val Met Gln Thr | | |
| | 195 | 200 | 205 |
| His | Gln Asn Ile Cys Val Arg Leu Ile His Ala Leu Asp Pro Arg Ala | | |
| | 210 | 215 | 220 |
| Gly | Thr Gln Leu Ile Pro Gly Val Thr Val Leu Val Tyr Leu Pro Phe | | |
| | 225 | 230 | 240 |
| Phe | His Ala Phe Gly Phe Ser Ile Thr Leu Gly Tyr Phe Met Val Gly | | |
| | 245 | 250 | 255 |
| Leu | Arg Val Ile Met Phe Arg Arg Phe Asp Gln Glu Ala Phe Leu Lys | | |
| | 260 | 265 | 270 |
| Ala | Ile Gln Asp Tyr Glu Val Arg Ser Val Ile Asn Val Pro Ser Val | | |
| | 275 | 280 | 285 |
| Ile | Leu Phe Leu Ser Lys Ser Pro Leu Val Asp Lys Tyr Asp Leu Ser | | |
| | 290 | 295 | 300 |
| Ser | Leu Arg Glu Leu Cys Cys Gly Ala Ala Pro Leu Ala Lys Glu Val | | |
| | 305 | 310 | 320 |
| Ala | Glu Val Ala Ala Lys Arg Leu Asn Leu Pro Gly Ile Arg Cys Gly | | |
| | 325 | 330 | 335 |
| Phe | Gly Leu Thr Glu Ser Thr Ser Ala Asn Ile His Ser Leu Arg Asp | | |
| | 340 | 345 | 350 |
| Glu | Phe Lys Ser Gly Ser Leu Gly Arg Val Thr Pro Leu Met Ala Ala | | |
| | 355 | 360 | 365 |
| Lys | Ile Ala Asp Arg Glu Thr Gly Lys Ala Leu Gly Pro Asn Gln Val | | |
| | 370 | 375 | 380 |
| Gly | Glu Leu Cys Ile Lys Gly Pro Met Val Ser Lys Gly Tyr Val Asn | | |
| | 385 | 390 | 400 |
| Asn | Val Glu Ala Thr Lys Glu Ala Ile Asp Asp Asp Gly Trp Leu His | | |
| | 405 | 410 | 415 |
| Ser | Gly Asp Phe Gly Tyr Tyr Asp Glu Asp Glu His Phe Tyr Val Val | | |
| | 420 | 425 | 430 |
| Asp | Arg Tyr Lys Glu Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Ser Gln Val Ala Pro | | |
| | 435 | 440 | 445 |
| Ala | Glu Leu Glu Glu Ile Leu Leu Lys Asn Pro Cys Ile Arg Asp Val | | |
| | 450 | 455 | 460 |
| Ala | Val Val Gly Ile Pro Asp Leu Glu Ala Gly Glu Leu Pro Ser Ala | | |
| | 465 | 470 | 480 |
| Phe | Val Val Lys Gln Pro Gly Lys Glu Ile Thr Ala Lys Glu Val Tyr | | |
| | 485 | 490 | 495 |
| Asp | Tyr Leu Ala Glu Arg Val Ser His Thr Lys Tyr Leu Arg Gly Gly | | |
| | 500 | 505 | 510 |
| Val | Arg Phe Val Asp Ser Ile Pro Arg Asn Val Thr Gly Lys Ile Thr | | |
| | 515 | 520 | 525 |
| Arg | Lys Glu Leu Leu Lys Gln Leu Leu Glu Lys Ala Gly Gly | | |
| | 530 | 535 | 540 |

DE 699 28 687 T2 2006.08.24

<210> 27

<212> PRT

<213> Luciola cruciata

<400> 27

Met Glu Asn Met Glu Asn Asp Glu Asn Ile Val Val Gly Pro Lys Pro
 1 5 10 15
 Phe Tyr Pro Ile Glu Glu Gly Ser Ala Gly Thr Gln Leu Arg Lys Tyr
 20 25 30
 Met Glu Arg Tyr Ala Lys Leu Gly Ala Ile Ala Phe Thr Asn Ala Val
 35 40 45
 Thr Gly Val Asp Tyr Ser Tyr Ala Glu Tyr Leu Glu Lys Ser Cys Cys
 50 55 60
 Leu Gly Lys Ala Leu Gln Asn Tyr Gly Leu Val Val Asp Gly Arg Ile
 65 70 75 80
 Ala Leu Cys Ser Glu Asn Cys Glu Glu Phe Phe Ile Pro Val Ile Ala
 85 90 95
 Gly Leu Phe Ile Gly Val Gly Val Ala Pro Thr Asn Glu Ile Tyr Thr
 100 105 110
 Leu Arg Glu Leu Val His Ser Leu Gly Ile Ser Lys Pro Thr Ile Val
 115 120 125
 Phe Ser Ser Lys Lys Gly Leu Asp Lys Val Ile Thr Val Gln Lys Thr
 130 135 140
 Val Thr Thr Ile Lys Thr Ile Val Ile Leu Asp Ser Lys Val Asp Tyr
 145 150 155 160
 Arg Gly Tyr Gln Cys Leu Asp Thr Phe Ile Lys Arg Asn Thr Pro Pro
 165 170 175
 Gly Phe Gln Ala Ser Ser Phe Lys Thr Val Glu Val Asp Arg Lys Glu
 180 185 190
 Gln Val Ala Leu Ile Met Asn Ser Ser Gly Ser Thr Gly Leu Pro Lys
 195 200 205
 Gly Val Gln Leu Thr His Glu Asn Thr Val Thr Arg Phe Ser His Ala
 210 215 220
 Arg Asp Pro Ile Tyr Gly Asn Gln Val Ser Pro Gly Thr Ala Val Leu
 225 230 235 240
 Thr Val Val Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Phe Thr Thr Leu Gly
 245 250 255
 Tyr Leu Ile Cys Gly Phe Arg Val Val Met Leu Thr Lys Phe Asp Glu
 260 265 270
 Glu Thr Phe Leu Lys Thr Leu Gln Asp Tyr Lys Cys Thr Ser Val Ile
 275 280 285
 Leu Val Pro Thr Leu Phe Ala Ile Leu Asn Lys Ser Glu Leu Leu Asn
 290 295 300
 Lys Tyr Asp Leu Ser Asn Leu Val Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro
 305 310 315 320
 Leu Ser Lys Glu Val Gly Glu Ala Val Ala Arg Arg Phe Asn Leu Pro
 325 330 335
 Gly Val Arg Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala Ile Ile
 340 345 350
 Ile Thr Pro Glu Gly Asp Asp Lys Pro Gly Ala Ser Gly Lys Val Val
 355 360 365
 Pro Leu Phe Lys Ala Lys Val Ile Asp Leu Asp Thr Lys Lys Ser Leu
 370 375 380
 Gly Pro Asn Arg Arg Gly Glu Val Cys Val Lys Gly Pro Met Leu Met
 385 390 395 400
 Lys Gly Tyr Val Asn Asn Pro Glu Ala Thr Lys Glu Leu Ile Asp Glu
 405 410 415
 Glu Gly Trp Leu His Thr Gly Asp Ile Gly Tyr Tyr Asp Glu Glu Lys
 420 425 430
 His Phe Phe Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly

DE 699 28 687 T2 2006.08.24

| | | |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 435 | 440 | 445 |
| Tyr Gln Val Pro Pro Ala Glu Leu Glu Ser Val Leu Leu Gln His Pro | | |
| 450 | 455 | 460 |
| Ser Ile Phe Asp Ala Gly Val Ala Gly Val Pro Asp Pro Val Ala Gly | | |
| 465 | 470 | 475 |
| Glu Leu Pro Gly Ala Val Val Val Leu Glu Ser Gly Lys Asn Met Thr | | 480 |
| 485 | 490 | 495 |
| Glu Lys Glu Val Met Asp Tyr Val Ala Ser Gln Val Ser Asn Ala Lys | | |
| 500 | 505 | 510 |
| Arg Leu Arg Gly Gly Val Arg Phe Val Asp Glu Val Pro Lys Gly Leu | | |
| 515 | 520 | 525 |
| Thr Gly Lys Ile Asp Gly Arg Ala Ile Arg Glu Ile Leu Lys Lys Pro | | |
| 530 | 535 | 540 |
| Val Ala Lys Met | | |
| 545 | | |

<210> 28
<211> 548
<212> PRT
<213> Luciola lateralis

| | | |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| <400> 28 | | |
| Met Glu Asn Met Glu Asn Asp Glu Asn Ile Val Tyr Gly Pro Glu Pro | | |
| 1 | 5 | 10 |
| Phe Tyr Pro Ile Glu Glu Gly Ser Ala Gly Ala Gln Leu Arg Lys Tyr | | |
| 20 | 25 | 30 |
| Met Asp Arg Tyr Ala Lys Leu Gly Ala Ile Ala Phe Thr Asn Ala Leu | | |
| 35 | 40 | 45 |
| Thr Gly Val Asp Tyr Thr Tyr Ala Glu Tyr Leu Glu Lys Ser Cys Cys | | |
| 50 | 55 | 60 |
| Leu Gly Glu Ala Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Val Val Asp Gly Arg Ile | | |
| 65 | 70 | 75 |
| Ala Leu Cys Ser Glu Asn Cys Glu Glu Phe Phe Ile Pro Val Leu Ala | | |
| 85 | 90 | 95 |
| Gly Leu Phe Ile Gly Val Gly Val Ala Pro Thr Asn Glu Ile Tyr Thr | | |
| 100 | 105 | 110 |
| Leu Arg Glu Leu Val His Ser Leu Gly Ile Ser Lys Pro Thr Ile Val | | |
| 115 | 120 | 125 |
| Phe Ser Ser Lys Lys Gly Leu Asp Lys Val Ile Thr Val Gln Lys Thr | | |
| 130 | 135 | 140 |
| Val Ala Thr Ile Lys Thr Ile Val Ile Leu Asp Ser Lys Val Asp Tyr | | |
| 145 | 150 | 155 |
| Arg Gly Tyr Gln Ser Met Asp Asn Phe Ile Lys Lys Asn Thr Pro Gln | | |
| 165 | 170 | 175 |
| Gly Phe Lys Gly Ser Ser Phe Lys Thr Val Glu Val Asn Arg Lys Glu | | |
| 180 | 185 | 190 |
| Gln Val Ala Leu Ile Met Asn Ser Ser Gly Ser Thr Gly Leu Pro Lys | | |
| 195 | 200 | 205 |
| Gly Val Gln Leu Thr His Glu Asn Ala Val Thr Arg Phe Ser His Ala | | |
| 210 | 215 | 220 |
| Arg Asp Pro Ile Tyr Gly Asn Gln Val Ser Pro Gly Thr Ala Ile Leu | | |
| 225 | 230 | 235 |
| Thr Val Val Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Phe Thr Thr Leu Gly | | |
| 245 | 250 | 255 |
| Tyr Leu Thr Cys Gly Phe Arg Ile Val Met Leu Thr Lys Phe Asp Glu | | |
| 260 | 265 | 270 |
| Glu Thr Phe Leu Lys Thr Leu Gln Asp Tyr Lys Cys Ser Ser Val Ile | | |
| 275 | 280 | 285 |
| Leu Val Pro Thr Leu Phe Ala Ile Leu Asn Arg Ser Glu Leu Leu Asp | | |
| 290 | 295 | 300 |

DE 699 28 687 T2 2006.08.24

Lys Tyr Asp Leu Ser Asn Leu Val Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro
 305 310 315 320
 Leu Ser Lys Glu Ile Gly Glu Ala Val Ala Arg Arg Phe Asn Leu Pro
 325 330 335
 Gly Val Arg Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala Ile Ile
 340 345 350
 Ile Thr Pro Glu Gly Asp Asp Lys Pro Gly Ala Ser Gly Lys Val Val
 355 360 365
 Pro Leu Phe Lys Ala Lys Val Ile Asp Leu Asp Thr Lys Lys Thr Leu
 370 375 380
 Gly Pro Asn Arg Arg Gly Glu Val Cys Val Lys Gly Pro Met Leu Met
 385 390 395 400
 Lys Gly Tyr Val Asp Asn Pro Glu Ala Thr Arg Glu Ile Ile Asp Glu
 405 410 415
 Glu Gly Trp Leu His Thr Gly Asp Ile Gly Tyr Tyr Asp Glu Glu Lys
 420 425 430
 His Phe Phe Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly
 435 440 445
 Tyr Gln Val Pro Pro Ala Glu Leu Glu Ser Val Leu Leu Gln His Pro
 450 455 460
 Asn Ile Phe Asp Ala Gly Val Ala Gly Val Pro Asp Pro Ile Ala Gly
 465 470 475 480
 Glu Leu Pro Gly Ala Val Val Val Leu Glu Lys Gly Lys Ser Met Thr
 485 490 495
 Glu Lys Glu Val Met Asp Tyr Val Ala Ser Gln Val Ser Asn Ala Lys
 500 505 510
 Arg Leu Arg Gly Gly Val Arg Phe Val Asp Glu Val Pro Lys Gly Leu
 515 520 525
 Thr Gly Lys Ile Asp Gly Lys Ala Ile Arg Glu Ile Leu Lys Lys Pro
 530 535 540
 Val Ala Lys Met
 545

<210> 29
 <211> 548
 <212> PRT
 <213> Luciola mingrellica

<400> 29

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Glu | Met | Glu | Lys | Glu | Glu | Asn | Val | Val | Tyr | Gly | Pro | Leu | Pro | Phe |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | 15 | | |
| Tyr | Pro | Ile | Glu | Glu | Gly | Ser | Ala | Gly | Ile | Gln | Leu | His | Lys | Tyr | Met |
| | | | | | | | | | 20 | | 25 | | 30 | | |
| His | Gln | Tyr | Ala | Lys | Leu | Gly | Ala | Ile | Ala | Phe | Ser | Asn | Ala | Leu | Thr |
| | | | | | | | | | 35 | | 40 | | 45 | | |
| Gly | Val | Asp | Ile | Ser | Tyr | Gln | Glu | Tyr | Phe | Asp | Ile | Thr | Cys | Arg | Leu |
| | | | | | | | | | 50 | | 55 | | 60 | | |
| Ala | Glu | Ala | Met | Lys | Asn | Phe | Gly | Met | Lys | Pro | Glu | Glu | His | Ile | Ala |
| | | | | | | | | | 65 | | 70 | | 75 | | 80 |
| Leu | Cys | Ser | Glu | Asn | Cys | Glu | Glu | Phe | Phe | Ile | Pro | Val | Leu | Ala | Gly |
| | | | | | | | | | 85 | | 90 | | 95 | | |
| Leu | Tyr | Ile | Gly | Val | Ala | Val | Ala | Pro | Thr | Asn | Glu | Ile | Tyr | Thr | Leu |
| | | | | | | | | | 100 | | 105 | | 110 | | |
| Arg | Glu | Leu | Asn | His | Ser | Leu | Gly | Ile | Ala | Gln | Pro | Thr | Ile | Val | Phe |
| | | | | | | | | | 115 | | 120 | | 125 | | |
| Ser | Ser | Arg | Lys | Gly | Leu | Pro | Lys | Val | Leu | Glu | Val | Gln | Lys | Thr | Val |
| | | | | | | | | | 130 | | 135 | | 140 | | |
| Thr | Cys | Ile | Lys | Lys | Ile | Val | Ile | Leu | Asp | Ser | Lys | Val | Asn | Phe | Gly |
| | | | | | | | | | 145 | | 150 | | 155 | | 160 |
| Gly | His | Asp | Cys | Met | Glu | Thr | Phe | Ile | Lys | Lys | His | Val | Glu | Leu | Gly |

DE 699 28 687 T2 2006.08.24

| | | | |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| | 165 | 170 | 175 |
| Phe Gln Pro Ser Ser Phe Val Pro Ile Asp Val Lys Asn Arg Lys Gln | | | |
| 180 | 185 | 190 | |
| His Val Ala Leu Leu Met Asn Ser Ser Gly Ser Thr Gly Leu Pro Lys | | | |
| 195 | 200 | 205 | |
| Gly Val Arg Ile Thr His Glu Gly Ala Val Thr Arg Phe Ser His Ala | | | |
| 210 | 215 | 220 | |
| Lys Asp Pro Ile Tyr Gly Asn Gln Val Ser Pro Gly Thr Ala Ile Leu | | | |
| 225 | 230 | 235 | 240 |
| Thr Val Val Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Phe Thr Thr Leu Gly | | | |
| 245 | 250 | 255 | |
| Tyr Phe Ala Cys Gly Tyr Arg Val Val Met Leu Thr Lys Phe Asp Glu | | | |
| 260 | 265 | 270 | |
| Glu Leu Phe Leu Arg Thr Leu Gln Asp Tyr Lys Cys Thr Ser Val Ile | | | |
| 275 | 280 | 285 | |
| Leu Val Pro Thr Leu Phe Ala Ile Leu Asn Lys Ser Glu Leu Ile Asp | | | |
| 290 | 295 | 300 | |
| Lys Phe Asp Leu Ser Asn Leu Thr Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro | | | |
| 305 | 310 | 315 | 320 |
| Leu Ala Lys Glu Val Gly Glu Ala Val Ala Arg Arg Phe Asn Leu Pro | | | |
| 325 | 330 | 335 | |
| Gly Val Arg Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala Phe Ile | | | |
| 340 | 345 | 350 | |
| Ile Thr Pro Glu Gly Asp Asp Lys Pro Gly Ala Ser Gly Lys Val Val | | | |
| 355 | 360 | 365 | |
| Pro Leu Phe Lys Val Lys Val Ile Asp Leu Asp Thr Lys Lys Thr Leu | | | |
| 370 | 375 | 380 | |
| Gly Val Asn Arg Arg Gly Glu Ile Cys Val Lys Gly Pro Ser Leu Met | | | |
| 385 | 390 | 395 | 400 |
| Leu Gly Tyr Ser Asn Asn Pro Glu Ala Thr Arg Glu Thr Ile Asp Glu | | | |
| 405 | 410 | 415 | |
| Glu Gly Trp Leu His Thr Gly Asp Ile Gly Tyr Tyr Asp Glu Asp Glu | | | |
| 420 | 425 | 430 | |
| His Phe Phe Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly | | | |
| 435 | 440 | 445 | |
| Tyr Gln Val Pro Pro Ala Glu Leu Glu Ser Val Leu Leu Gln His Pro | | | |
| 450 | 455 | 460 | |
| Asn Ile Phe Asp Ala Gly Val Ala Gly Val Pro Asp Pro Asp Ala Gly | | | |
| 465 | 470 | 475 | 480 |
| Glu Leu Pro Gly Ala Val Val Val Met Glu Lys Gly Lys Thr Met Thr | | | |
| 485 | 490 | 495 | |
| Glu Lys Glu Ile Val Asp Tyr Val Asn Ser Gln Val Val Asn His Lys | | | |
| 500 | 505 | 510 | |
| Arg Leu Arg Gly Gly Val Arg Phe Val Asp Glu Val Pro Lys Gly Leu | | | |
| 515 | 520 | 525 | |
| Thr Gly Lys Ile Asp Ala Lys Val Ile Arg Glu Ile Leu Lys Lys Pro | | | |
| 530 | 535 | 540 | |
| Gln Ala Lys Met | | | |
| 545 | | | |

<210> 30
<211> 548
<212> PRT
<213> Pyrocoelia miyako

<400> 30

| | | | |
|-----------------------------------------------------------------|----|----|----|
| Met Glu Asp Asp Ser Lys His Ile Met His Gly His Arg His Ser Ile | | | |
| 1 | 5 | 10 | 15 |
| Leu Trp Glu Asp Gly Thr Ala Gly Glu Gln Leu His Lys Ala Met Lys | | | |
| 20 | 25 | 30 | |

DE 699 28 687 T2 2006.08.24

Arg Tyr Ala Gln Val Pro Gly Thr Ile Ala Phe Thr Asp Ala His Ala
 35 40 45
 Glu Val Asn Ile Thr Tyr Ser Glu Tyr Phe Glu Met Ser Cys Arg Leu
 50 55 60
 Ala Glu Thr Met Lys Arg Tyr Gly Leu Gly Leu Gln His His Ile Ala
 65 70 75 80
 Val Cys Ser Glu Thr Ser Leu Gln Phe Phe Met Pro Val Cys Gly Ala
 85 90 95
 Leu Phe Ile Gly Val Gly Val Ala Pro Thr Asn Asp Ile Tyr Asn Glu
 100 105 110
 Arg Glu Leu Tyr Asn Ser Leu Phe Ile Ser Gln Pro Thr Ile Val Phe
 115 120 125
 Cys Ser Lys Arg Ala Leu Gln Lys Ile Leu Gly Val Gln Lys Lys Leu
 130 135 140
 Pro Val Ile Gln Lys Ile Val Ile Leu Asp Ser Arg Glu Asp Tyr Met
 145 150 155 160
 Gly Lys Gln Ser Met Tyr Ser Phe Ile Glu Ser His Leu Pro Ala Gly
 165 170 175
 Phe Asn Glu Tyr Asp Tyr Ile Pro Asp Ser Phe Asp Arg Glu Thr Ala
 180 185 190
 Thr Ala Leu Ile Met Asn Ser Ser Gly Ser Thr Gly Leu Pro Lys Gly
 195 200 205
 Val Asp Leu Thr His Met Asn Val Cys Val Arg Phe Ser His Cys Arg
 210 215 220
 Asp Pro Val Phe Gly Asn Gln Ile Ile Pro Asp Thr Ala Ile Leu Thr
 225 230 235 240
 Val Ile Pro Phe His His Val Phe Gln Met Phe Thr Thr Leu Gly Tyr
 245 250 255
 Leu Thr Cys Gly Phe Arg Ile Val Leu Met Tyr Arg Phe Glu Glu Glu
 260 265 270
 Leu Phe Leu Arg Ser Leu Gln Asp Tyr Lys Ile Gln Ser Ala Leu Leu
 275 280 285
 Val Pro Thr Leu Phe Ser Phe Phe Ala Lys Ser Thr Leu Val Asp Lys
 290 295 300
 Tyr Asp Leu Ser Asn Leu His Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro Leu
 305 310 315 320
 Ala Lys Glu Val Gly Glu Ala Val Ala Lys Arg Phe Lys Leu Pro Gly
 325 330 335
 Ile Arg Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala Ile Ile Ile
 340 345 350
 Thr Pro Glu Gly Asp Asp Lys Pro Gly Ala Cys Gly Lys Val Val Pro
 355 360 365
 Phe Phe Thr Ala Lys Ile Val Asp Leu Asp Thr Gly Lys Thr Leu Gly
 370 375 380
 Val Asn Gln Arg Gly Glu Leu Cys Val Lys Gly Pro Met Ile Met Lys
 385 390 395 400
 Gly Tyr Val Asn Asn Pro Glu Ala Thr Asn Ala Leu Ile Asp Lys Asp
 405 410 415
 Gly Trp Leu His Ser Gly Asp Ile Ala Tyr Tyr Asp Lys Asp Gly His
 420 425 430
 Phe Phe Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr
 435 440 445
 Gln Val Pro Pro Ala Glu Leu Glu Ser Ile Leu Leu Gln His Pro Phe
 450 455 460
 Ile Phe Asp Ala Gly Val Ala Gly Ile Pro Asp Pro Asp Ala Gly Glu
 465 470 475 480
 Leu Pro Ala Ala Val Val Val Leu Glu Glu Gly Lys Met Met Thr Glu
 485 490 495
 Gln Glu Val Met Asp Tyr Val Ala Gly Gln Val Thr Ala Ser Lys Arg
 500 505 510

DE 699 28 687 T2 2006.08.24

Leu Arg Gly Gly Val Lys Phe Val Asp Glu Val Pro Lys Gly Leu Thr
 515 520 525
 Gly Lys Ile Asp Ser Arg Lys Ile Arg Glu Ile Leu Thr Met Gly Gln
 530 535 540
 Lys Ser Lys Leu
 545

<210> 31
 <211> 550
 <212> PRT
 <213> Photinus pyralis

<400> 31

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---------|
| Met | Glu | Asp | Ala | Lys | Asn | Ile | Lys | Gly | Pro | Ala | Pro | Phe | Tyr | Pro |
| 1 | | | 5 | | | | 10 | | | | | 15 | | |
| Leu | Glu | Asp | Gly | Thr | Ala | Gly | Glu | Gln | Leu | His | Lys | Ala | Met | Lys Arg |
| | 20 | | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| Tyr | Ala | Leu | Val | Pro | Gly | Thr | Ile | Ala | Phe | Thr | Asp | Ala | His | Ile Glu |
| | 35 | | | | | | 40 | | | | 45 | | | |
| Val | Asn | Ile | Thr | Tyr | Ala | Glu | Tyr | Phe | Glu | Met | Ser | Val | Arg | Leu Ala |
| | 50 | | | | | | 55 | | | | 60 | | | |
| Glu | Ala | Met | Lys | Arg | Tyr | Gly | Leu | Asn | Thr | Asn | His | Arg | Ile | Val Val |
| | 65 | | | | | | 70 | | | | 75 | | 80 | |
| Cys | Ser | Glu | Asn | Ser | Leu | Gln | Phe | Phe | Met | Pro | Val | Leu | Gly | Ala Leu |
| | | | | | | | 85 | | | | 90 | | 95 | |
| Phe | Ile | Gly | Val | Ala | Val | Ala | Pro | Ala | Asn | Asp | Ile | Tyr | Asn | Glu Arg |
| | 100 | | | | | | | 105 | | | | 110 | | |
| Glu | Leu | Leu | Asn | Ser | Met | Asn | Ile | Ser | Gln | Pro | Thr | Val | Val | Phe Val |
| | 115 | | | | | | | 120 | | | | 125 | | |
| Ser | Lys | Lys | Gly | Leu | Gln | Lys | Ile | Leu | Asn | Val | Gln | Lys | Lys | Leu Pro |
| | 130 | | | | | | 135 | | | | 140 | | | |
| Ile | Ile | Gln | Lys | Ile | Ile | Met | Asp | Ser | Lys | Thr | Asp | Tyr | Gln | Gly |
| | 145 | | | | | | 150 | | | | 155 | | 160 | |
| Phe | Gln | Ser | Met | Tyr | Thr | Phe | Val | Thr | Ser | His | Leu | Pro | Pro | Gly Phe |
| | | | | | | | 165 | | | | 170 | | 175 | |
| Asn | Glu | Tyr | Asp | Phe | Val | Pro | Glu | Ser | Phe | Asp | Arg | Asp | Lys | Thr Ile |
| | | | | | | | 180 | | | | 185 | | 190 | |
| Ala | Leu | Ile | Met | Asn | Ser | Ser | Gly | Ser | Thr | Gly | Leu | Pro | Lys | Gly Val |
| | 195 | | | | | | | 200 | | | | 205 | | |
| Ala | Leu | Pro | His | Arg | Thr | Ala | Cys | Val | Arg | Phe | Ser | His | Ala | Arg Asp |
| | 210 | | | | | | | 215 | | | | 220 | | |
| Pro | Ile | Phe | Gly | Asn | Gln | Ile | Ile | Pro | Asp | Thr | Ala | Ile | Leu | Ser Val |
| | 225 | | | | | | | 230 | | | | 235 | | 240 |
| Val | Pro | Phe | His | His | Gly | Phe | Gly | Met | Phe | Thr | Thr | Leu | Gly | Tyr Leu |
| | | | | | | | 245 | | | | 250 | | 255 | |
| Ile | Cys | Gly | Phe | Arg | Val | Val | Leu | Met | Tyr | Arg | Phe | Glu | Glu | Leu |
| | | | | | | | 260 | | | | 265 | | 270 | |
| Phe | Leu | Arg | Ser | Leu | Gln | Asp | Tyr | Lys | Ile | Gln | Ser | Ala | Leu | Leu Val |
| | 275 | | | | | | | 280 | | | | 285 | | |
| Pro | Thr | Leu | Phe | Ser | Phe | Phe | Ala | Lys | Ser | Thr | Leu | Ile | Asp | Lys Tyr |
| | 290 | | | | | | | 295 | | | | 300 | | |
| Asp | Leu | Ser | Asn | Leu | His | Glu | Ile | Ala | Ser | Gly | Gly | Ala | Pro | Leu Ser |
| | 305 | | | | | | | 310 | | | | 315 | | 320 |
| Lys | Glu | Val | Gly | Glu | Ala | Val | Ala | Lys | Arg | Phe | His | Leu | Pro | Gly Ile |
| | | | | | | | | 325 | | | | 330 | | 335 |
| Arg | Gln | Gly | Tyr | Gly | Leu | Thr | Glu | Thr | Thr | Ser | Ala | Ile | Leu | Ile Thr |
| | | | | | | | 340 | | | | 345 | | 350 | |
| Pro | Glu | Gly | Asp | Asp | Lys | Pro | Gly | Ala | Val | Gly | Lys | Val | Val | Pro Phe |
| | 355 | | | | | | | 360 | | | | 365 | | |
| Phe | Glu | Ala | Lys | Val | Val | Asp | Leu | Asp | Thr | Gly | Lys | Thr | Leu | Gly Val |

DE 699 28 687 T2 2006.08.24

| | | |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 370 | 375 | 380 |
| Asn Gln Arg Gly Glu Leu Cys Val Arg Gly Pro Met Ile Met Ser Gly | | |
| 385 | 390 | 395 |
| Tyr Val Asn Asn Pro Glu Ala Thr Asn Ala Leu Ile Asp Lys Asp Gly | | 400 |
| 405 | 410 | 415 |
| Trp Leu His Ser Gly Asp Ile Ala Tyr Trp Asp Glu Asp Glu His Phe | | |
| 420 | 425 | 430 |
| Phe Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Gln | | |
| 435 | 440 | 445 |
| Val Ala Pro Ala Glu Leu Glu Ser Ile Leu Leu Gln His Pro Asn Ile | | |
| 450 | 455 | 460 |
| Phe Asp Ala Gly Val Ala Gly Leu Pro Asp Asp Ala Gly Glu Leu | | |
| 465 | 470 | 475 |
| Pro Ala Ala Val Val Val Leu Glu His Gly Lys Thr Met Thr Glu Lys | | 480 |
| 485 | 490 | 495 |
| Glu Ile Val Asp Tyr Val Ala Ser Gln Val Thr Thr Ala Lys Lys Leu | | |
| 500 | 505 | 510 |
| Arg Gly Gly Val Val Phe Val Asp Glu Val Pro Lys Gly Leu Thr Gly | | |
| 515 | 520 | 525 |
| Lys Leu Asp Ala Arg Lys Ile Arg Glu Ile Leu Ile Lys Ala Lys Lys | | |
| 530 | 535 | 540 |
| Gly Gly Lys Ser Lys Leu | | |
| 545 | 550 | |

<210> 32

<211> 547

<212> PRT

<213> Lampyris noctiluca

<400> 32

| | | |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| Met Glu Asp Ala Lys Asn Ile Met His Gly Pro Ala Pro Phe Tyr Pro | | |
| 1 | 5 | 10 |
| Leu Glu Asp Gly Thr Ala Gly Glu Gln Leu His Lys Ala Met Lys Arg | | |
| 20 | 25 | 30 |
| Tyr Ala Gln Val Pro Gly Thr Ile Ala Phe Thr Asp Ala His Ala Glu | | |
| 35 | 40 | 45 |
| Val Asn Ile Thr Tyr Ser Glu Tyr Phe Glu Met Ala Cys Arg Leu Ala | | |
| 50 | 55 | 60 |
| Glu Thr Met Lys Arg Tyr Gly Leu Gly Leu Gln His His Ile Ala Val | | |
| 65 | 70 | 75 |
| 80 | | |
| Cys Ser Glu Asn Ser Leu Gln Phe Phe Met Pro Val Cys Gly Ala Leu | | |
| 85 | 90 | 95 |
| Phe Ile Gly Val Gly Val Ala Ser Thr Asn Asp Ile Tyr Asn Glu Arg | | |
| 100 | 105 | 110 |
| Glu Leu Tyr Asn Ser Leu Ser Ile Ser Gln Pro Thr Ile Val Ser Cys | | |
| 115 | 120 | 125 |
| Ser Lys Arg Ala Leu Gln Lys Ile Leu Gly Val Gln Lys Lys Leu Pro | | |
| 130 | 135 | 140 |
| Ile Ile Gln Lys Ile Val Ile Leu Asp Ser Arg Glu Asp Tyr Met Gly | | |
| 145 | 150 | 155 |
| 160 | | |
| Lys Gln Ser Met Tyr Ser Phe Ile Glu Ser His Leu Pro Ala Gly Phe | | |
| 165 | 170 | 175 |
| Asn Glu Tyr Asp Tyr Ile Pro Asp Ser Phe Asp Arg Glu Thr Ala Thr | | |
| 180 | 185 | 190 |
| Ala Leu Ile Met Asn Ser Ser Gly Ser Thr Gly Leu Pro Lys Gly Val | | |
| 195 | 200 | 205 |
| Glu Leu Thr His Gln Asn Val Cys Val Arg Phe Ser His Cys Arg Asp | | |
| 210 | 215 | 220 |
| Pro Val Phe Gly Asn Gln Ile Ile Pro Asp Thr Ala Ile Leu Thr Val | | |
| 225 | 230 | 235 |
| | | 240 |

DE 699 28 687 T2 2006.08.24

Ile Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Phe Thr Thr Leu Gly Tyr Leu
 245 250 255
 Thr Cys Gly Phe Arg Ile Val Leu Met Tyr Arg Phe Glu Glu Glu Leu
 260 265 270
 Phe Leu Arg Ser Leu Gln Asp Tyr Lys Ile Gln Ser Ala Leu Leu Val
 275 280 285
 Pro Thr Leu Phe Ser Phe Phe Ala Lys Ser Thr Leu Val Asp Lys Tyr
 290 295 300
 Asp Leu Ser Asn Leu His Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro Leu Ala
 305 310 315 320
 Lys Glu Val Gly Glu Ala Val Ala Lys Arg Phe Lys Leu Pro Gly Ile
 325 330 335
 Arg Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala Ile Ile Ile Thr
 340 345 350
 Pro Glu Gly Asp Asp Lys Pro Gly Ala Cys Gly Lys Val Val Pro Phe
 355 360 365
 Phe Ser Ala Lys Ile Val Asp Leu Asp Thr Gly Lys Thr Leu Gly Val
 370 375 380
 Asn Gln Arg Gly Glu Leu Cys Val Lys Gly Pro Met Ile Met Lys Gly
 385 390 395 400
 Tyr Val Asn Asn Pro Glu Ala Thr Ser Ala Leu Ile Asp Lys Asp Gly
 405 410 415
 Trp Leu His Ser Gly Asp Ile Ala Tyr Tyr Asp Lys Asp Gly His Phe
 420 425 430
 Phe Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Gln
 435 440 445
 Val Pro Pro Ala Glu Leu Glu Ser Ile Leu Leu Gln His Pro Phe Ile
 450 455 460
 Phe Asp Ala Gly Val Ala Gly Ile Pro Asp Pro Asp Ala Gly Glu Leu
 465 470 475 480
 Pro Ala Ala Val Val Val Leu Glu Glu Gly Lys Thr Met Thr Glu Gln
 485 490 495
 Glu Val Met Asp Tyr Val Ala Gly Gln Val Thr Ala Ser Lys Arg Leu
 500 505 510
 Arg Gly Gly Val Lys Phe Val Asp Glu Val Pro Lys Gly Leu Thr Gly
 515 520 525
 Lys Ile Asp Gly Arg Lys Ile Arg Glu Ile Leu Met Met Gly Lys Lys
 530 535 540
 Ser Lys Leu
 545

<210> 33
 <211> 552
 <212> PRT
 <213> Photuris pennsylvanica

<400> 33

Met Ser Ile Glu Asn Asn Ile Leu Ile Gly Pro Pro Pro Tyr Tyr Pro
 1 5 10 15
 Leu Glu Glu Gly Thr Ala Gly Glu Gln Leu His Arg Ala Ile Ser Arg
 20 25 30
 Tyr Ala Ala Val Pro Gly Thr Leu Ala Tyr Thr Asp Val His Thr Glu
 35 40 45
 Leu Glu Val Thr Tyr Lys Glu Phe Leu Asp Val Thr Cys Arg Leu Ala
 50 55 60
 Glu Ala Met Lys Asn Tyr Gly Leu Gly Leu Gln His Thr Ile Ser Val
 65 70 75 80
 Cys Ser Glu Asn Cys Val Gln Phe Phe Met Pro Ile Cys Ala Ala Leu
 85 90 95
 Tyr Val Gly Val Ala Thr Ala Pro Thr Asn Asp Ile Tyr Asn Glu Arg

DE 699 28 687 T2 2006.08.24

| 100 | 105 | 110 | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Leu | Tyr | Asn | Ser | Leu | Ser | Ile | Ser | Gln | Pro | Thr | Val | Val | Phe | Thr | |
| 115 | | | | | | | 120 | | | | | 125 | | | | |
| Ser | Arg | Asn | Ser | Leu | Gln | Lys | Ile | Leu | Gly | Val | Gln | Ser | Arg | Leu | Pro | |
| Ile | Ile | Lys | Lys | Ile | Ile | Ile | Ile | Leu | Asp | Gly | Lys | Lys | Asp | Tyr | Leu | Gly |
| 145 | | | | | | | 150 | | | | 155 | | | | 160 | |
| Tyr | Gln | Ser | Met | Gln | Ser | Phe | Met | Lys | Glu | His | Val | Pro | Ala | Asn | Phe | |
| | | | | | | | 165 | | | 170 | | | | 175 | | |
| Asn | Val | Ser | Ala | Phe | Lys | Pro | Leu | Ser | Phe | Asp | Leu | Asp | Arg | Val | Ala | |
| | | | | | | | 180 | | | 185 | | | 190 | | | |
| Cys | Ile | Met | Asn | Ser | Ser | Gly | Ser | Thr | Gly | Leu | Pro | Lys | Gly | Val | Pro | |
| | | | | | | | 195 | | | 200 | | | 205 | | | |
| Ile | Ser | His | Arg | Asn | Thr | Ile | Tyr | Arg | Phe | Ser | His | Cys | Arg | Asp | Pro | |
| | | | | | | 210 | | 215 | | | 220 | | | | | |
| Val | Phe | Gly | Asn | Gln | Ile | Ile | Pro | Asp | Thr | Thr | Ile | Leu | Cys | Ala | Val | |
| | | | | | | 225 | | 230 | | | 235 | | | 240 | | |
| Pro | Phe | His | His | Ala | Phe | Gly | Thr | Phe | Thr | Asn | Leu | Gly | Tyr | Leu | Ile | |
| | | | | | | 245 | | | 250 | | | 255 | | | | |
| Cys | Gly | Phe | His | Val | Val | Leu | Met | Tyr | Arg | Phe | Asn | Glu | His | Leu | Phe | |
| | | | | | | 260 | | | 265 | | | 270 | | | | |
| Leu | Gln | Thr | Leu | Gln | Asp | Tyr | Lys | Cys | Gln | Ser | Ala | Leu | Leu | Val | Pro | |
| | | | | | | 275 | | | 280 | | | 285 | | | | |
| Thr | Val | Leu | Ala | Phe | Leu | Ala | Lys | Asn | Pro | Leu | Val | Asp | Lys | Tyr | Asp | |
| Leu | Ser | Asn | Leu | His | Glu | Ile | Ala | Ser | Gly | Gly | Ala | Pro | Leu | Ser | Lys | |
| | | | | | 305 | | 310 | | | 315 | | | 320 | | | |
| Glu | Ile | Ser | Glu | Ile | Ala | Ala | Lys | Arg | Phe | Lys | Leu | Pro | Gly | Ile | Arg | |
| | | | | | | 325 | | | 330 | | | 335 | | | | |
| Gln | Gly | Tyr | Gly | Leu | Thr | Glu | Thr | Thr | Cys | Ala | Ile | Val | Ile | Thr | Ala | |
| | | | | | | 340 | | | 345 | | | 350 | | | | |
| Glu | Gly | Glu | Phe | Lys | Leu | Gly | Ala | Val | Gly | Lys | Val | Val | Pro | Phe | Tyr | |
| | | | | | | 355 | | | 360 | | | 365 | | | | |
| Ser | Leu | Lys | Val | Leu | Asp | Leu | Asn | Thr | Gly | Lys | Lys | Leu | Gly | Pro | Asn | |
| | | | | | | 370 | | | 375 | | | 380 | | | | |
| Glu | Arg | Gly | Glu | Ile | Cys | Phe | Lys | Gly | Pro | Met | Ile | Met | Lys | Gly | Tyr | |
| | | | | | | 385 | | | 390 | | | 395 | | | 400 | |
| Ile | Asn | Asn | Pro | Glu | Ala | Thr | Arg | Glu | Leu | Ile | Asp | Glu | Glu | Gly | Trp | |
| | | | | | | 405 | | | 410 | | | 415 | | | | |
| Ile | His | Ser | Gly | Asp | Ile | Gly | Tyr | Phe | Asp | Glu | Asp | Gly | His | Val | Tyr | |
| | | | | | | 420 | | | 425 | | | 430 | | | | |
| Ile | Val | Asp | Arg | Leu | Lys | Ser | Leu | Ile | Lys | Tyr | Lys | Gly | Tyr | Gln | Val | |
| | | | | | | 435 | | | 440 | | | 445 | | | | |
| Pro | Pro | Ala | Glu | Leu | Glu | Ala | Leu | Leu | Gln | His | Pro | Phe | Ile | Glu | | |
| Asp | Ala | Gly | Val | Ala | Gly | Val | Pro | Asp | Glu | Val | Ala | Gly | Asp | Leu | Pro | |
| | | | | | | 465 | | | 470 | | | 475 | | | 480 | |
| Gly | Ala | Val | Val | Val | Leu | Lys | Glu | Gly | Lys | Ser | Ile | Thr | Glu | Lys | Glu | |
| | | | | | | 485 | | | 490 | | | 495 | | | | |
| Ile | Gln | Asp | Tyr | Val | Ala | Gly | Gln | Val | Thr | Ser | Ser | Lys | Lys | Leu | Arg | |
| | | | | | | 500 | | | 505 | | | 510 | | | | |
| Gly | Gly | Val | Glu | Phe | Val | Lys | Glu | Val | Pro | Lys | Gly | Phe | Thr | Gly | Lys | |
| | | | | | | 515 | | | 520 | | | 525 | | | | |
| Ile | Asp | Thr | Arg | Lys | Ile | Lys | Glu | Ile | Leu | Ile | Lys | Ala | Gln | Lys | Gly | |
| | | | | | | 530 | | | 535 | | | 540 | | | | |
| Lys | Ser | Lys | Ser | Lys | Ala | Lys | Leu | | | | | | | | | |
| | | | | | | 545 | | | 550 | | | | | | | |

<210> 34
 <211> 546
 <212> PRT
 <213> Phengodes sp.

DE 699 28 687 T2 2006.08.24

<400> 34

Met Ile Lys Met Glu Glu Glu His Val Met Pro Gly Ala Met Pro Arg
 1 5 10 15
 Asp Leu Leu Phe Glu Gly Thr Ala Gly Gln Gln Leu His Arg Ala Leu
 20 25 30
 Tyr Lys His Ser Tyr Phe Pro Glu Ala Ile Val Asp Ser His Thr His
 35 40 45
 Glu Ile Ile Ser Tyr Ala Lys Ile Leu Asp Met Ser Cys Arg Leu Ala
 50 55 60
 Val Ser Phe Gln Lys Tyr Gly Leu Thr Gln Asn Asn Ile Ile Gly Ile
 65 70 75 80
 Cys Ser Glu Asn Asn Leu Asn Phe Phe Asn Pro Val Ile Ala Ala Phe
 85 90 95
 Tyr Leu Gly Ile Thr Val Ala Thr Val Asn Asp Thr Tyr Thr Asp Arg
 100 105 110
 Glu Leu Ser Glu Thr Leu Asn Ile Thr Lys Pro Gln Met Leu Phe Cys
 115 120 125
 Ser Lys Gln Ser Leu Pro Ile Val Met Lys Thr Met Lys Ile Met Pro
 130 135 140
 Tyr Val Gln Lys Leu Leu Ile Ile Asp Ser Met Gln Asp Ile Gly Gly
 145 150 155 160
 Ile Glu Cys Val His Ser Phe Val Ser Arg Tyr Thr Asp Glu His Phe
 165 170 175
 Asp Pro Leu Lys Phe Val Pro Leu Asp Phe Asp Pro Arg Glu Gln Val
 180 185 190
 Ala Leu Ile Met Thr Ser Ser Gly Thr Thr Gly Leu Pro Lys Gly Val
 195 200 205
 Met Leu Thr His Arg Asn Ile Cys Val Arg Phe Val His Ser Arg Asp
 210 215 220
 Pro Leu Phe Gly Thr Arg Phe Ile Pro Glu Thr Ser Ile Leu Ser Leu
 225 230 235 240
 Val Pro Phe His His Ala Phe Gly Met Phe Thr Thr Leu Ser Tyr Phe
 245 250 255
 Ile Val Gly Leu Lys Ile Val Met Met Lys Arg Phe Asp Gly Glu Leu
 260 265 270
 Phe Leu Lys Thr Ile Gln Asn Tyr Lys Ile Pro Thr Ile Val Ile Ala
 275 280 285
 Pro Pro Val Met Val Phe Leu Ala Lys Ser His Leu Val Asp Lys Tyr
 290 295 300
 Asp Leu Ser Ser Ile Lys Glu Ile Ala Thr Gly Gly Ala Pro Leu Gly
 305 310 315 320
 Pro Ala Leu Ala Asn Ala Val Ala Lys Arg Leu Lys Leu Gly Gly Ile
 325 330 335
 Ile Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Cys Cys Ala Val Leu Ile Thr
 340 345 350
 Pro His Asn Lys Ile Lys Thr Gly Ser Thr Gly Gln Val Leu Pro Tyr
 355 360 365
 Val Thr Ala Lys Ile Val Asp Thr Lys Thr Gly Lys Asn Leu Gly Pro
 370 375 380
 Asn Gln Thr Gly Glu Leu Cys Phe Lys Ser Asp Ile Ile Met Lys Gly
 385 390 395 400
 Tyr Tyr Gln Asn Glu Glu Glu Thr Arg Leu Val Ile Asp Lys Asp Gly
 405 410 415
 Trp Leu His Ser Gly Asp Ile Gly Tyr Tyr Asp Thr Asp Gly Asn Phe
 420 425 430
 His Ile Val Asp Arg Leu Lys Glu Leu Ile Lys Tyr Lys Ala Tyr Gln
 435 440 445
 Val Ala Pro Ala Glu Leu Glu Ala Leu Leu Leu Gln His Pro Tyr Ile
 450 455 460
 Ala Asp Ala Gly Val Thr Gly Ile Pro Asp Glu Glu Ala Gly Glu Leu

DE 699 28 687 T2 2006.08.24

| | | | |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 465 | 470 | 475 | 480 |
| Pro Ala Ala Cys Val Val Leu Glu Pro Gly Lys Thr Met Thr Glu Lys | | | |
| 485 | 490 | 495 | |
| Glu Val Met Asp Tyr Ile Ala Glu Arg Val Thr Pro Thr Lys Arg Leu | | | |
| 500 | 505 | 510 | |
| Arg Gly Gly Val Leu Phe Val Asn Asn Ile Pro Lys Gly Ala Thr Gly | | | |
| 515 | 520 | 525 | |
| Lys Leu Val Arg Thr Glu Leu Arg Arg Leu Leu Thr Gln Arg Ala Ala | | | |
| 530 | 535 | 540 | |
| Lys Leu | | | |
| 545 | | | |

<210> 35
<211> 543
<212> PRT
<213> Pyrophorus plagiophthalmus

<400> 35

| | | | |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 1 | 5 | 10 | 15 |
| Pro Leu Glu Asp Leu Thr Ala Gly Glu Met Leu Phe Arg Ala Leu Arg | | | |
| 20 | 25 | 30 | |
| Lys His Ser His Leu Pro Gln Ala Leu Val Asp Val Tyr Gly Glu Glu | | | |
| 35 | 40 | 45 | |
| Trp Ile Ser Tyr Lys Glu Phe Phe Glu Thr Thr Cys Leu Leu Ala Gln | | | |
| 50 | 55 | 60 | |
| Ser Leu His Asn Cys Gly Tyr Lys Met Ser Asp Val Val Ser Ile Cys | | | |
| 65 | 70 | 75 | 80 |
| Ala Glu Asn Asn Lys Arg Phe Phe Val Pro Ile Ile Ala Ala Trp Tyr | | | |
| 85 | 90 | 95 | |
| Ile Gly Met Ile Val Ala Pro Val Asn Glu Gly Tyr Ile Pro Asp Glu | | | |
| 100 | 105 | 110 | |
| Leu Cys Lys Val Met Gly Ile Ser Arg Pro Gln Leu Val Phe Cys Thr | | | |
| 115 | 120 | 125 | |
| Lys Asn Ile Leu Asn Lys Val Leu Glu Val Gln Ser Arg Thr Asp Phe | | | |
| 130 | 135 | 140 | |
| Ile Lys Arg Ile Ile Leu Asp Ala Val Glu Asn Ile His Gly Cys | | | |
| 145 | 150 | 155 | 160 |
| Glu Ser Leu Pro Asn Phe Ile Ser Arg Tyr Ser Asp Gly Asn Ile Ala | | | |
| 165 | 170 | 175 | |
| Asn Phe Lys Pro Leu His Tyr Asp Pro Val Glu Gln Val Ala Ala Ile | | | |
| 180 | 185 | 190 | |
| Leu Cys Ser Ser Gly Thr Thr Gly Leu Pro Lys Gly Val Met Gln Thr | | | |
| 195 | 200 | 205 | |
| His Arg Asn Val Cys Val Arg Leu Ile His Ala Leu Asp Pro Arg Val | | | |
| 210 | 215 | 220 | |
| Gly Thr Gln Leu Ile Pro Gly Val Thr Val Leu Val Tyr Leu Pro Phe | | | |
| 225 | 230 | 235 | 240 |
| Phe His Ala Phe Gly Phe Ser Ile Asn Leu Gly Tyr Phe Met Val Gly | | | |
| 245 | 250 | 255 | |
| Leu Arg Val Ile Met Leu Arg Arg Phe Asp Gln Glu Ala Phe Leu Lys | | | |
| 260 | 265 | 270 | |
| Ala Ile Gln Asp Tyr Glu Val Arg Ser Val Ile Asn Val Pro Ala Ile | | | |
| 275 | 280 | 285 | |
| Ile Leu Phe Leu Ser Lys Ser Pro Leu Val Asp Lys Tyr Asp Leu Ser | | | |
| 290 | 295 | 300 | |
| Ser Leu Arg Glu Leu Cys Cys Gly Ala Ala Pro Leu Ala Lys Glu Val | | | |
| 305 | 310 | 315 | 320 |
| Ala Glu Ile Ala Val Lys Arg Leu Asn Leu Pro Gly Ile Arg Cys Gly | | | |
| 325 | 330 | 335 | |
| Phe Gly Leu Thr Glu Ser Thr Ser Ala Asn Ile His Ser Leu Arg Asp | | | |

DE 699 28 687 T2 2006.08.24

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 340 | 345 | 350 | | | | | | | | | | | | | | |
| Glu | Phe | Lys | Ser | Gly | Ser | Leu | Gly | Arg | Val | Thr | Pro | Leu | Met | Ala | Ala | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 355 | | | 360 | | | | | | | 365 | | | | | |
| Lys | Ile | Ala | Asp | Arg | Glu | Thr | Gly | Lys | Ala | Leu | Gly | Pro | Asn | Gln | Val | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 370 | | | 375 | | | | | | 380 | | | | | | |
| Gly | Glu | Leu | Cys | Ile | Lys | Gly | Pro | Met | Val | Ser | Lys | Gly | Tyr | Val | Asn | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 385 | | | 390 | | | | | 395 | | | 400 | | | | |
| Asn | Val | Glu | Ala | Thr | Lys | Glu | Ala | Ile | Asp | Asp | Asp | Gly | Trp | Leu | His | | |
| | | | | | | | | | | | | | | 405 | 410 | 415 | |
| Ser | Gly | Asp | Phe | Gly | Tyr | Tyr | Asp | Glu | Asp | Glu | His | Phe | Tyr | Val | Val | | |
| | | | | | | | | | | | | | | 420 | 425 | 430 | |
| Asp | Arg | Tyr | Lys | Glu | Leu | Ile | Lys | Tyr | Lys | Gly | Ser | Gln | Val | Ala | Pro | | |
| | | | | | | | | | | | | | | 435 | 440 | 445 | |
| Ala | Glu | Leu | Glu | Glu | Ile | Leu | Leu | Lys | Asn | Pro | Cys | Ile | Arg | Asp | Val | | |
| | | | | | | | | | | | | | | 450 | 455 | 460 | |
| Ala | Val | Val | Gly | Ile | Pro | Asp | Leu | Glu | Ala | Gly | Glu | Leu | Pro | Ser | Ala | | |
| | | | | | | | | | | | | | | 465 | 470 | 475 | 480 |
| Phe | Val | Val | Ile | Gln | Pro | Gly | Lys | Glu | Ile | Thr | Ala | Lys | Glu | Val | Tyr | | |
| | | | | | | | | | | | | | | 485 | 490 | 495 | |
| Asp | Tyr | Leu | Ala | Glu | Arg | Val | Ser | His | Thr | Lys | Tyr | Leu | Arg | Gly | Gly | | |
| | | | | | | | | | | | | | | 500 | 505 | 510 | |
| Val | Arg | Phe | Val | Asp | Ser | Ile | Pro | Arg | Asn | Val | Thr | Gly | Lys | Ile | Thr | | |
| | | | | | | | | | | | | | | 515 | 520 | 525 | |
| Arg | Lys | Glu | Leu | Leu | Lys | Gln | Leu | Leu | Glu | Lys | Ser | Ser | Lys | Leu | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | 530 | 535 | 540 | |

<210> 36

<211> 543

<212> PRT

<213> Pyrophorus plagiophthalmus

<400> 36

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Met | Lys | Arg | Glu | Lys | Asn | Val | Ile | Tyr | Gly | Pro | Glu | Pro | Leu | His |
| | | | | | | | 1 | 5 | 10 | | | | | 15 | |
| Pro | Leu | Glu | Asp | Leu | Thr | Ala | Gly | Glu | Met | Leu | Phe | Arg | Ala | Leu | Arg |
| | | | | | | | 20 | | 25 | | | | | 30 | |
| Lys | His | Ser | His | Leu | Pro | Gln | Ala | Leu | Val | Asp | Val | Phe | Gly | Asp | Glu |
| | | | | | | | 35 | | 40 | | | 45 | | | |
| Ser | Leu | Ser | Tyr | Lys | Glu | Phe | Phe | Glu | Ala | Thr | Cys | Leu | Leu | Ala | Gln |
| | | | | | | 50 | | 55 | | | 60 | | | | |
| Ser | Leu | His | Asn | Cys | Gly | Tyr | Lys | Met | Asn | Asp | Val | Val | Ser | Ile | Cys |
| | | | | | | 65 | | 70 | | 75 | | | 80 | | |
| Ala | Glu | Asn | Asn | Lys | Arg | Phe | Phe | Ile | Pro | Ile | Ile | Ala | Ala | Trp | Tyr |
| | | | | | | 85 | | | 90 | | | 95 | | | |
| Ile | Gly | Met | Ile | Val | Ala | Pro | Val | Asn | Glu | Ser | Tyr | Ile | Pro | Asp | Glu |
| | | | | | | 100 | | 105 | | | 110 | | | | |
| Leu | Cys | Lys | Val | Met | Gly | Ile | Ser | Lys | Pro | Gln | Ile | Val | Phe | Cys | Thr |
| | | | | | | 115 | | 120 | | | 125 | | | | |
| Lys | Asn | Ile | Leu | Asn | Lys | Val | Leu | Glu | Val | Gln | Ser | Arg | Thr | Asn | Phe |
| | | | | | | 130 | | 135 | | | 140 | | | | |
| Ile | Lys | Arg | Ile | Ile | Ile | Leu | Asp | Thr | Val | Glu | Asn | Ile | His | Gly | Cys |
| | | | | | | 145 | | 150 | | 155 | | | 160 | | |
| Glu | Ser | Leu | Pro | Asn | Phe | Ile | Ser | Arg | Tyr | Ser | Asp | Gly | Asn | Ile | Ala |
| | | | | | | 165 | | | 170 | | | 175 | | | |
| Asn | Phe | Lys | Pro | Leu | His | Tyr | Asp | Pro | Val | Glu | Gln | Val | Ala | Ala | Ile |
| | | | | | | 180 | | 185 | | | 190 | | | | |
| Leu | Cys | Ser | Ser | Gly | Thr | Thr | Gly | Leu | Pro | Lys | Gly | Val | Met | Gln | Thr |
| | | | | | | 195 | | 200 | | | 205 | | | | |
| His | Gln | Asn | Ile | Cys | Val | Arg | Leu | Ile | His | Ala | Leu | Asp | Pro | Arg | Ala |
| | | | | | | 210 | | 215 | | | 220 | | | | |

DE 699 28 687 T2 2006.08.24

Gly Thr Gln Leu Ile Pro Gly Val Thr Val Leu Val Tyr Leu Pro Phe
 225 230 235 240
 Phe His Ala Phe Gly Phe Ser Ile Asn Leu Gly Tyr Phe Met Val Gly
 245 250 255
 Leu Arg Val Ile Met Leu Arg Arg Phe Asp Gln Glu Ala Phe Leu Lys
 260 265 270
 Ala Ile Gln Asp Tyr Glu Val Arg Ser Val Ile Asn Val Pro Ala Ile
 275 280 285
 Ile Leu Phe Leu Ser Lys Ser Pro Leu Val Asp Lys Tyr Asp Leu Ser
 290 295 300
 Ser Leu Arg Glu Leu Cys Cys Gly Ala Ala Pro Leu Ala Lys Glu Val
 305 310 315 320
 Ala Glu Val Ala Val Lys Arg Leu Asn Leu Pro Gly Ile Arg Cys Gly
 325 330 335
 Phe Gly Leu Thr Glu Ser Thr Ser Ala Asn Ile His Ser Leu Gly Asp
 340 345 350
 Glu Phe Lys Ser Gly Ser Leu Gly Arg Val Thr Pro Leu Met Ala Ala
 355 360 365
 Lys Ile Ala Asp Arg Glu Thr Gly Lys Ala Leu Gly Pro Asn Gln Val
 370 375 380
 Gly Glu Leu Cys Val Lys Gly Pro Met Val Ser Lys Gly Tyr Val Asn
 385 390 395 400
 Asn Val Glu Ala Thr Lys Glu Ala Ile Asp Asp Asp Gly Trp Leu His
 405 410 415
 Ser Gly Asp Phe Gly Tyr Tyr Asp Glu Asp Glu His Phe Tyr Val Val
 420 425 430
 Asp Arg Tyr Lys Glu Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Ser Gln Val Ala Pro
 435 440 445
 Ala Glu Leu Glu Glu Ile Leu Leu Lys Asn Pro Cys Ile Arg Asp Val
 450 455 460
 Ala Val Val Gly Ile Pro Asp Leu Glu Ala Gly Glu Leu Pro Ser Ala
 465 470 475 480
 Phe Val Val Lys Gln Pro Gly Lys Glu Ile Thr Ala Lys Glu Val Tyr
 485 490 495
 Asp Tyr Leu Ala Glu Arg Val Ser His Thr Lys Tyr Leu Arg Gly Gly
 500 505 510
 Val Arg Phe Val Asp Ser Ile Pro Arg Asn Val Thr Gly Lys Ile Thr
 515 520 525
 Arg Lys Glu Leu Leu Lys Gln Leu Leu Glu Lys Ser Ser Lys Leu
 530 535 540

<210> 37
 <211> 545
 <212> PRT
 <213> Photuris pennsylvanica

<400> 37

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Glu | Asp | Lys | Asn | Ile | Leu | Tyr | Gly | Pro | Glu | Pro | Phe | Tyr | Pro | Leu |
| 1 | | | | | 5 | | | | 10 | | | | 15 | | |
| Ala | Asp | Gly | Thr | Ala | Gly | Glu | Gln | Met | Phe | Tyr | Ala | Leu | Ser | Arg | Tyr |
| | | | | | | 20 | | 25 | | | | 30 | | | |
| Ala | Asp | Ile | Ser | Gly | Cys | Ile | Ala | Leu | Thr | Asn | Ala | His | Thr | Lys | Glu |
| | | | | | | 35 | | 40 | | | | 45 | | | |
| Asn | Val | Leu | Tyr | Glu | Glu | Phe | Leu | Lys | Leu | Ser | Cys | Arg | Leu | Ala | Glu |
| | | | | | | 50 | | 55 | | | 60 | | | | |
| Ser | Phe | Lys | Lys | Tyr | Gly | Leu | Lys | Gln | Asn | Asp | Thr | Ile | Ala | Val | Cys |
| | | | | | | 65 | | 70 | | | 75 | | | 80 | |
| Ser | Glu | Asn | Gly | Leu | Gln | Phe | Phe | Leu | Pro | Leu | Ile | Ala | Ser | Leu | Tyr |
| | | | | | | 85 | | 90 | | | 95 | | | | |
| Leu | Gly | Ile | Ile | Ala | Ala | Pro | Val | Ser | Asp | Lys | Tyr | Ile | Glu | Arg | Glu |

DE 699 28 687 T2 2006.08.24

| 100 | 105 | 110 |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| Leu Ile His Ser Leu Gly Ile Val Lys Pro Arg Ile Ile Phe Cys Ser | | |
| 115 | 120 | 125 |
| Lys Asn Thr Phe Gln Lys Val Leu Asn Val Lys Ser Lys Leu Lys Tyr | | |
| 130 | 135 | 140 |
| Val Glu Thr Ile Ile Leu Asp Leu Asn Glu Asp Leu Gly Gly Tyr | | |
| 145 | 150 | 155 |
| Gln Cys Leu Asn Asn Phe Ile Ser Gln Asn Ser Asp Ile Asn Leu Asp | | |
| 165 | 170 | 175 |
| Val Lys Lys Phe Lys Pro Asn Ser Phe Asn Arg Asp Asp Gln Val Ala | | |
| 180 | 185 | 190 |
| Leu Val Met Phe Ser Ser Gly Thr Thr Gly Val Ser Lys Gly Val Met | | |
| 195 | 200 | 205 |
| Leu Thr His Lys Asn Ile Val Ala Arg Phe Ser His Cys Lys Asp Pro | | |
| 210 | 215 | 220 |
| Thr Phe Gly Asn Ala Ile Asn Pro Thr Thr Ala Ile Leu Thr Val Ile | | |
| 225 | 230 | 235 |
| Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Thr Thr Leu Gly Tyr Phe Thr | | |
| 245 | 250 | 255 |
| Cys Gly Phe Arg Val Ala Leu Met His Thr Phe Glu Glu Lys Leu Phe | | |
| 260 | 265 | 270 |
| Leu Gln Ser Leu Gln Asp Tyr Lys Val Glu Ser Thr Leu Leu Val Pro | | |
| 275 | 280 | 285 |
| Thr Leu Met Ala Phe Phe Ala Lys Ser Ala Leu Val Glu Lys Tyr Asp | | |
| 290 | 295 | 300 |
| Leu Ser His Leu Lys Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro Leu Ser Lys | | |
| 305 | 310 | 315 |
| Glu Ile Gly Glu Met Val Lys Lys Arg Phe Lys Leu Asn Phe Val Arg | | |
| 325 | 330 | 335 |
| Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala Val Leu Ile Thr Pro | | |
| 340 | 345 | 350 |
| Asp Thr Asp Val Arg Pro Gly Ser Thr Gly Lys Ile Val Pro Phe His | | |
| 355 | 360 | 365 |
| Ala Val Lys Val Val Asp Pro Thr Thr Gly Lys Ile Leu Gly Pro Asn | | |
| 370 | 375 | 380 |
| Glu Thr Gly Glu Leu Tyr Phe Lys Gly Asp Met Ile Met Lys Ser Tyr | | |
| 385 | 390 | 395 |
| Tyr Asn Asn Glu Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asn Lys Asp Gly Trp | | |
| 405 | 410 | 415 |
| Leu Arg Ser Gly Asp Ile Ala Tyr Tyr Asp Asn Asp Gly His Phe Tyr | | |
| 420 | 425 | 430 |
| Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Gln Val | | |
| 435 | 440 | 445 |
| Ala Pro Ala Glu Ile Glu Gly Ile Leu Leu Gln His Pro Tyr Ile Val | | |
| 450 | 455 | 460 |
| Asp Ala Gly Val Thr Gly Ile Pro Asp Glu Ala Ala Gly Glu Leu Pro | | |
| 465 | 470 | 475 |
| Ala Ala Gly Val Val Val Gln Thr Gly Lys Tyr Leu Asn Glu Gln Ile | | |
| 485 | 490 | 495 |
| Val Gln Asn Phe Val Ser Ser Gln Val Ser Thr Ala Lys Trp Leu Arg | | |
| 500 | 505 | 510 |
| Gly Gly Val Lys Phe Leu Asp Glu Ile Pro Lys Gly Ser Thr Gly Lys | | |
| 515 | 520 | 525 |
| Ile Asp Arg Lys Val Leu Arg Gln Met Phe Glu Lys His Lys Ser Lys | | |
| 530 | 535 | 540 |
| Leu | | |
| 545 | | |

<210> 38
<211> 38

| | | |
|---------------------------------------------------------------------|-----|--|
| <212> DNA | | |
| <213> Künstliche Sequenz | | |
| | | |
| <220> | | |
| <223> /Anmerkung = "ein Primer" | | |
| | | |
| <400> 38 | | |
| gtactgagac gacgccagcc caagcttagg cctgagtg | 38 | |
| | | |
| <210> 39 | | |
| <211> 38 | | |
| <212> DNA | | |
| <213> Künstliche Sequenz | | |
| | | |
| <220> | | |
| <223> /Anmerkung = "ein Primer" | | |
| | | |
| <400> 39 | | |
| ggcatgagcg tgaactgact gaactagcgg ccgcccag | 38 | |
| | | |
| <210> 40 | | |
| <211> 18 | | |
| <212> DNA | | |
| <213> Künstliche Sequenz | | |
| | | |
| <220> | | |
| <223> /Anmerkung = "ein Primer" | | |
| | | |
| <400> 40 | | |
| gtactgagac gacgccag | 18 | |
| | | |
| <210> 41 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> DNA | | |
| <213> Künstliche Sequenz | | |
| | | |
| <220> | | |
| <223> /Anmerkung = "ein Primer" | | |
| | | |
| <400> 41 | | |
| ggcatgagcg tgaactgac | 19 | |
| | | |
| <210> 42 | | |
| <211> 1639 | | |
| <212> DNA | | |
| <213> Künstliche Sequenz | | |
| | | |
| <220> | | |
| <223> /Anmerkung = "mutierte Luciferase" | | |
| | | |
| <400> 42 | | |
| agatccaatg gcagataaga atattttata tgggcccggaa ccattttatc ccttggaaaga | 60 | |
| tgggacggct ggagaacaga tgtttgcgc attatctcgat tatgcagata ttccgggctg | 120 | |
| catagcattg acaaatgctc atacaaaaga aaatgtttta tatgaagagt ttctgaaaact | 180 | |
| gtcgtgtcggt ttagcggaaa gttttaaaaa gtatggatta aaacaaaacgg acacaatagc | 240 | |
| ggtgtgttagc gaaaatagtc tgcaattttt ccttcctgta attgcatcat tgttatcttgg | 300 | |
| aataattgtg gcacctgtta acgataaata cattgaacgt gaattaatac acagtcgttgg | 360 | |
| tattgtaaaa ccacgcatac tttttgctc caagaataact ttcaaaaaag tactgaatgt | 420 | |
| aaaatctaaa ttaaatcta ttgaaactat tattatatta gacttaaatg atgacttagg | 480 | |
| aggttatcaa tgcctcaaca actttatttc tcaaaaattcc gatagtaatc tggacgtaaa | 540 | |

| | | | | | | |
|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|------|
| aaaatttaaa | ccatattctt | ttaatcgaga | cgatcagggtt | gcgttgatta | tgtttcttc | 600 |
| tggtacaact | ggtctgccga | agggagtcat | gctaactcac | aagaatattt | ttgcacgatt | 660 |
| ttctattgca | aaagatccct | ctttggtaa | cgcaattaat | cccacgtcag | caattttAAC | 720 |
| ggtaatacct | ttccaccatg | gtttggtat | gatgaccaca | ttaggatact | ttacttgtgg | 780 |
| attccgagtt | gttctaattgc | acacgttga | agaaaaacta | tttctacaat | cattacaaga | 840 |
| ttataaaagt | gaaagtactt | tacttgtacc | aacattaatg | gcatttcttgc | caaaaagtgc | 900 |
| attagttgaa | aagtacgatt | tatcgcactt | aaaagaaatt | gcattctggtg | gcgcacctt | 960 |
| atcaaaaagaa | attggggaga | tggtaaaaaa | acggtttaaa | ttaaactttt | tcaggcaagg | 1020 |
| gtatggatta | acagaaacca | cttcggctgt | tttaattaca | ccgaaagggtg | acgccaacc | 1080 |
| gggatcaact | ggtaaaatag | taccatttca | cgctgtttaaa | gttgcgtatc | ctacaacagg | 1140 |
| aaaaattttg | gggc当地atg | aacctggaga | attgtatttt | aaaggcccga | tgataatgaa | 1200 |
| gggttattat | aataatgaag | aagctactaa | agcaattatt | gataatgacg | gatgggtcg | 1260 |
| ctctgggtat | attgcttatt | atgacaatga | tggccatttt | tatattgtgg | acaggctgaa | 1320 |
| gtcaactgatt | aaatataaaag | gttacaggt | tgcacctgct | gaaatttgggg | gaataactt | 1380 |
| acaacatccg | tatattgttg | atgc当地gggt | tactggtata | ccggatgaag | ccgc当地ggcga | 1440 |
| gcttccagct | gcaggtgtt | tagtacagac | tggaaaatat | ctaaacgaac | aaatcgtaa | 1500 |
| agattatgtt | gccagtcaag | tttcaacagc | caaattggct | cgtggtgggg | tgatattttt | 1560 |
| ggatgaaatt | cccaaaggat | caactggaaa | aattgacaga | aaagtgttaa | gacaaatgtt | 1620 |
| agaaaaacac | accatggg | | | | | 1639 |

<210> 43

<211> 1639

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> /Anmerkung = "mutierte Luciferase"

<400> 43

| | | | | | | |
|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|------|
| ggatccaatg | gcagataaga | atattttata | tgggcccga | ccattttatc | ccttggaaaga | 60 |
| tgggacggct | ggagaacaga | tgttgacgc | attatctcg | tatgcagct | ttccgggtg | 120 |
| catagcattg | acaaatgctc | atacaaaaga | aatgtttt | tatgaagagt | ttctgaaaact | 180 |
| gtcgtgtcg | ttagcggaaa | gtttaaaaa | gtatggatta | aaacaaaacg | acacaatagc | 240 |
| gggtgttagc | gaaaatagtc | tgcaattttt | ccttcctgt | attgcacat | tgtatcttgg | 300 |
| aataattgt | gcacctgtt | acgataaata | cattgaacgt | gaattaatac | acagtcttgg | 360 |
| tattgtaaaa | ccacgcata | tttttgctc | caagaatact | tttcaaaaag | tactgaatgt | 420 |
| aaaatctaaa | ttaaaatcta | ttgaaactat | tattatatta | gacttaaatg | aagactttagg | 480 |
| aggttatcaa | tgcctcaaca | actttattt | tcaaaattcc | gataatgac | tggacgtaaa | 540 |
| aaaattttaa | ccctatttt | ttaatcgaga | cgatcagggt | gcgtcgatta | tgtttcttc | 600 |
| ttgttacaact | ggtctgccga | agggagtcat | gctaactcac | aagaatattt | ttgcacgatt | 660 |
| ttctattgca | aaagatccct | ctttggtaa | cgcaattaat | cccacgtcag | caattttAAC | 720 |
| ggtaatacct | ttccaccatg | gtttggtat | gatgaccaca | ttaggatact | ttacttgtgg | 780 |
| attccgagtt | gttctaattgc | acacgttga | agaaaaacta | tttctacaat | cattacaaga | 840 |
| ttataaaagt | gaaagtactt | tacttgtacc | aacattaatg | gcatttcttgc | caaaaagtgc | 900 |
| attagttgaa | aagtacgatt | tatcgcactt | aaaagaaatt | gcattctggtg | gcgcacctt | 960 |
| atcaaaaagaa | attggggaga | tggtaaaaaa | acggtttaaa | ttaaactttt | tcaggcaagg | 1020 |
| gtatggatta | acagaaacca | cttcggctgt | tttaattaca | ccgaaagggtg | acgccaacc | 1080 |
| gggatcaact | ggtaaaatag | taccattaca | cgctgtttaaa | gttgcgtatc | ctacaacagg | 1140 |
| aaaaattttg | gggc当地atg | aacctggaga | attgtatttt | aaaggcccga | tgataatgaa | 1200 |
| gggttattat | aataatgaag | aagctactaa | agcaattatt | gataatgacg | gatgggtcg | 1260 |
| ctctgggtat | attgcttatt | atgacaatga | tggccatttt | tatattgtgg | acaggctgaa | 1320 |
| gtcaactgatt | aaatataaaag | gttacaggt | tgcacctgct | gaaatttgggg | gaataactt | 1380 |
| acaacatccg | tatattgttg | atgc当地gggt | tactggtata | ccggatgaag | ccgc当地ggcga | 1440 |
| gcttccagct | gcaggtgtt | tagtacagac | tggaaaatat | ctaaacgaac | aaatcgtaa | 1500 |
| agattatgtt | gccagtcaag | tttcaacagc | caaattggct | cgtggtgggg | tgaaattttt | 1560 |
| ggatgaaatt | cccaaaggat | caactggaaa | aattgacaga | aaagtgttaa | gacaaatgtt | 1620 |
| agaaaaacac | accatggg | | | | | 1639 |

<210> 44

<211> 544

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> /Anmerkung = "mutierte Luciferase"

<400> 44

Met Ala Asp Lys Asn Ile Leu Tyr Gly Pro Glu Pro Phe Tyr Pro Leu
 1 5 10 15
 Glu Asp Gly Thr Ala Gly Glu Gln Met Phe Asp Ala Leu Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Ala Asp Ile Pro Gly Cys Ile Ala Leu Thr Asn Ala His Thr Lys Glu
 35 40 45
 Asn Val Leu Tyr Glu Glu Phe Leu Lys Leu Ser Cys Arg Leu Ala Glu
 50 55 60
 Ser Phe Lys Lys Tyr Gly Leu Lys Gln Asn Asp Thr Ile Ala Val Cys
 65 70 75 80
 Ser Glu Asn Ser Leu Gln Phe Phe Leu Pro Val Ile Ala Ser Leu Tyr
 85 90 95
 Leu Gly Ile Ile Val Ala Pro Val Asn Asp Lys Tyr Ile Glu Arg Glu
 100 105 110
 Leu Ile His Ser Leu Gly Ile Val Lys Pro Arg Ile Val Phe Cys Ser
 115 120 125
 Lys Asn Thr Phe Gln Lys Val Leu Asn Val Lys Ser Lys Leu Lys Ser
 130 135 140
 Ile Glu Thr Ile Ile Leu Asp Leu Asn Asp Asp Leu Gly Gly Tyr
 145 150 155 160
 Gln Cys Leu Asn Asn Phe Ile Ser Gln Asn Ser Asp Ser Asn Leu Asp
 165 170 175
 Val Lys Lys Phe Lys Pro Tyr Ser Phe Asn Arg Asp Asp Gln Val Ala
 180 185 190
 Leu Ile Met Phe Ser Ser Gly Thr Thr Gly Leu Pro Lys Gly Val Met
 195 200 205
 Leu Thr His Lys Asn Ile Val Ala Arg Phe Ser Ile Ala Lys Asp Pro
 210 215 220
 Thr Phe Gly Asn Ala Ile Asn Pro Thr Ser Ala Ile Leu Thr Val Ile
 225 230 235 240
 Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Met Thr Thr Leu Gly Tyr Phe Thr
 245 250 255
 Cys Gly Phe Arg Val Val Leu Met His Thr Phe Glu Glu Lys Leu Phe
 260 265 270
 Leu Gln Ser Leu Gln Asp Tyr Lys Val Glu Ser Thr Leu Leu Val Pro
 275 280 285
 Thr Leu Met Ala Phe Leu Ala Lys Ser Ala Leu Val Glu Lys Tyr Asp
 290 295 300
 Leu Ser His Leu Lys Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro Leu Ser Lys
 305 310 315 320
 Glu Ile Gly Glu Met Val Lys Lys Arg Phe Lys Leu Asn Phe Val Arg
 325 330 335
 Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala Val Leu Ile Thr Pro
 340 345 350
 Lys Gly Asp Ala Lys Pro Gly Ser Thr Gly Lys Ile Val Pro Phe His
 355 360 365
 Ala Val Lys Val Val Asp Pro Thr Thr Gly Lys Ile Leu Gly Pro Asn
 370 375 380
 Glu Pro Gly Glu Leu Tyr Phe Lys Gly Pro Met Ile Met Lys Gly Tyr
 385 390 395 400
 Tyr Asn Asn Glu Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asp Asn Asp Gly Trp
 405 410 415
 Leu Arg Ser Gly Asp Ile Ala Tyr Tyr Asp Asn Asp Gly His Phe Tyr

DE 699 28 687 T2 2006.08.24

| | | | |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| | 420 | 425 | 430 |
| Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Gln Val | | | |
| 435 | 440 | 445 | |
| Ala Pro Ala Glu Ile Glu Gly Ile Leu Leu Gln His Pro Tyr Ile Val | | | |
| 450 | 455 | 460 | |
| Asp Ala Gly Val Thr Gly Ile Pro Asp Glu Ala Ala Gly Glu Leu Pro | | | |
| 465 | 470 | 475 | 480 |
| Ala Ala Gly Val Val Val Gln Thr Gly Lys Tyr Leu Asn Glu Gln Ile | | | |
| 485 | 490 | 495 | |
| Val Gln Asp Tyr Val Ala Ser Gln Val Ser Thr Ala Lys Trp Leu Arg | | | |
| 500 | 505 | 510 | |
| Gly Gly Val Ile Phe Leu Asp Glu Ile Pro Lys Gly Ser Thr Gly Lys | | | |
| 515 | 520 | 525 | |
| Ile Asp Arg Lys Val Leu Arg Gln Met Leu Glu Lys His Thr Asn Gly | | | |
| 530 | 535 | 540 | |

<210> 45

<211> 544

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> /Anmerkung = "mutierte Luciferase"

<400> 45

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

| | | | |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| Ser Glu Asn Ser Leu Gln Phe Phe Leu Pro Val Ile Ala Ser Leu Tyr | | | |
| 85 | 90 | 95 | |
| Leu Gly Ile Ile Val Ala Pro Val Asn Asp Lys Tyr Ile Glu Arg Glu | | | |
| 100 | 105 | 110 | |
| Leu Ile His Ser Leu Gly Ile Val Lys Pro Arg Ile Val Phe Cys Ser | | | |
| 115 | 120 | 125 | |
| Lys Asn Thr Phe Gln Lys Val Leu Asn Val Lys Ser Lys Leu Lys Ser | | | |
| 130 | 135 | 140 | |
| Ile Glu Thr Ile Ile Leu Asp Leu Asn Glu Asp Leu Gly Gly Tyr | | | |
| 145 | 150 | 155 | 160 |
| Gln Cys Leu Asn Asn Phe Ile Ser Gln Asn Ser Asp Ser Asn Leu Asp | | | |
| 165 | 170 | 175 | |
| Val Lys Lys Phe Lys Pro Tyr Ser Phe Asn Arg Asp Asp Gln Val Ala | | | |
| 180 | 185 | 190 | |
| Ser Ile Met Phe Ser Ser Gly Thr Thr Gly Leu Pro Lys Gly Val Met | | | |
| 195 | 200 | 205 | |
| Leu Thr His Lys Asn Ile Val Ala Arg Phe Ser Ile Ala Lys Asp Pro | | | |
| 210 | 215 | 220 | |
| Thr Phe Gly Asn Ala Ile Asn Pro Thr Ser Ala Ile Leu Thr Val Ile | | | |
| 225 | 230 | 235 | 240 |
| Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Met Thr Thr Leu Gly Tyr Phe Thr | | | |
| 245 | 250 | 255 | |
| Cys Gly Phe Arg Val Val Leu Met His Thr Phe Glu Glu Lys Leu Phe | | | |
| 260 | 265 | 270 | |
| Leu Gln Ser Leu Gln Asp Tyr Lys Val Glu Ser Thr Leu Leu Val Pro | | | |

DE 699 28 687 T2 2006.08.24

| 275 | 280 | 285 |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| Thr Leu Met Ala Phe Leu Ala Lys Ser Ala Leu Val Glu Lys Tyr Asp | | |
| 290 | 295 | 300 |
| Leu Ser His Leu Lys Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro Leu Ser Lys | | |
| 305 | 310 | 315 |
| Glu Ile Gly Glu Met Val Lys Lys Arg Phe Lys Leu Asn Phe Val Arg | | |
| 325 | 330 | 335 |
| Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala Val Leu Ile Thr Pro | | |
| 340 | 345 | 350 |
| Lys Gly Asp Ala Lys Pro Gly Ser Thr Gly Lys Ile Val Pro Leu His | | |
| 355 | 360 | 365 |
| Ala Val Lys Val Val Asp Pro Thr Thr Gly Lys Ile Leu Gly Pro Asn | | |
| 370 | 375 | 380 |
| Glu Pro Gly Glu Leu Tyr Phe Lys Gly Pro Met Ile Met Lys Gly Tyr | | |
| 385 | 390 | 395 |
| Tyr Asn Asn Glu Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asp Asn Asp Gly Trp | | |
| 405 | 410 | 415 |
| Leu Arg Ser Gly Asp Ile Ala Tyr Tyr Asp Asn Asp Gly His Phe Tyr | | |
| 420 | 425 | 430 |
| Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Gln Val | | |
| 435 | 440 | 445 |
| Ala Pro Ala Glu Ile Glu Gly Ile Leu Leu Gln His Pro Tyr Ile Val | | |
| 450 | 455 | 460 |
| Asp Ala Gly Val Thr Gly Ile Pro Asp Glu Ala Ala Gly Glu Leu Pro | | |
| 465 | 470 | 475 |
| Ala Ala Gly Val Val Val Gln Thr Gly Lys Tyr Leu Asn Glu Gln Ile | | |
| 485 | 490 | 495 |
| Val Gln Asp Tyr Val Ala Ser Gln Val Ser Thr Ala Lys Trp Leu Arg | | |
| 500 | 505 | 510 |
| Gly Gly Val Lys Phe Leu Asp Glu Ile Pro Lys Gly Ser Thr Gly Lys | | |
| 515 | 520 | 525 |
| Ile Asp Arg Lys Val Leu Arg Gln Met Leu Glu Lys His Thr Asn Gly | | |
| 530 | 535 | 540 |

<210> 46

<211> 1633

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> /Anmerkung = "mutierte Luciferase"

<400> 46

| | |
|---------------------------------------------------------------------|------|
| ggatccatg atgaagcgag agaaaaatgt tatatatggc cccgaacccc tacaccctt | 60 |
| ggaagactta acagctggag aaatgctttt ccgtgcctt cgaaaacatt ctcatttacc | 120 |
| gcaggcttta gtagatgtgg ttggcgcacga atcgctttcc tataaaagagt tttttgaagc | 180 |
| gacagtcctc ctagcgcaaa gtctccacaa ttgtggatac aagatgaatg atgttgtgtc | 240 |
| gatctgcgcc gagaataata caagatttt tattccgtt attgcagctt ggtatattgg | 300 |
| tatgattgttgcacatgaaatgtt catcccgat gaactctgtt aggtcatggg | 360 |
| tatatacgaaa ccacaaatag ttttacgac aaagaacatt ttaaataagg tattggaggt | 420 |
| acagagcaga actaatttca taaaaaggat catcgactt gatactgttgaaaacataca | 480 |
| cgggttgaa agtcttccca atttttatttc tcgttatttcg gatggaaata ttgccaactt | 540 |
| caaaccttta catttcgatc ctgttagagca agtggcagct atcttatgtt cgtcaggcac | 600 |
| tactggatta ccgaaagggtg taatgcaaac tcacccaaat atttgtgtcc gacttataca | 660 |
| tgcttttagac cccagggcag gaacgcaact tattcctggt gtgacagtc tagtatatct | 720 |
| gccttttttc catgcttttggttcttat aaccttgggta tacttcatgg tgggtcttcg | 780 |
| tgtttatcatgtcaagacatgttgcaga agcatttcta aaagctattc aggattatga | 840 |
| agttcgaagt gtaattaaacgttccatcagt aatattgttc ttatcgaaaa gtccttgg | 900 |
| tgacaaatac gatttatcaa gtttaaggga attgtgttgc ggtgcggcac cattagcaaa | 960 |
| agaagttgct gaggttgcag caaaacgatt aaacttgcca ggaattcgct gtggatttgg | 1020 |

tttgacagaa tctacttcag ctaatataca cagtcttagg gatgaattta aaccaggatc 1080
 acttggaga gttactccct taatggcagc taaaatagca gatagggaaa ctggtaaagc 1140
 attgggacca aatcaagttg gtgaattatg cattaaaggt cccatggtat cgaaagggtta 1200
 cgtgaacaat gtagaagcta ccaaagaagc tattgtatgtat gatgggttggc ttcactctgg 1260
 agactttgga tactatgtatg aggatgagca tttctatgtg gtggaccgtt acaaggaaatt 1320
 gattaaatat aagggccttc aggttagcacc tgcaacta gaagagattt tattgaaaaaa 1380
 tccatgtatc agagatgtt gttgttgg tattcctgtat ctagaagctg gagaactgcc 1440
 atctgcgtt gtggtaaac agcccggaaa ggagattaca gctaaagaag tgtacgatta 1500
 tcttgccgag agggtctccc atacaaagta ttgcgttgg ggggttcgat tcgtttag 1560
 cataccacgg aatgttacag gtaaaaattac aagaaaggaa ctctgaagc agttgttgg 1620
 gaaggcggga ggt 1633

<210> 47

<211> 542

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> /Anmerkung = "mutierte Luciferase"

<400> 47

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Met | Lys | Arg | Glu | Lys | Asn | Val | Ile | Tyr | Gly | Pro | Glu | Pro | Leu | His |
| 1 | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | | | |
| Pro | Leu | Glu | Asp | Leu | Thr | Ala | Gly | Glu | Met | Leu | Phe | Arg | Ala | Leu | Arg |
| | | | | | | | 20 | | | 25 | | | 30 | | |
| Lys | His | Ser | His | Leu | Pro | Gln | Ala | Leu | Val | Asp | Val | Val | Gly | Asp | Glu |
| | | | | | | | 35 | | 40 | | | 45 | | | |
| Ser | Leu | Ser | Tyr | Lys | Glu | Phe | Phe | Glu | Ala | Thr | Val | Leu | Leu | Ala | Gln |
| | | | | | | | 50 | | 55 | | | 60 | | | |
| Ser | Leu | His | Asn | Cys | Gly | Tyr | Lys | Met | Asn | Asp | Val | Val | Ser | Ile | Cys |
| | | | | | | | 65 | | 70 | | | 75 | | | 80 |
| Ala | Glu | Asn | Asn | Thr | Arg | Phe | Phe | Ile | Pro | Val | Ile | Ala | Ala | Trp | Tyr |
| | | | | | | | 85 | | | 90 | | | 95 | | |
| Ile | Gly | Met | Ile | Val | Ala | Pro | Val | Asn | Glu | Ser | Tyr | Ile | Pro | Asp | Glu |
| | | | | | | | 100 | | 105 | | | 110 | | | |
| Leu | Cys | Lys | Val | Met | Gly | Ile | Ser | Lys | Pro | Gln | Ile | Val | Phe | Thr | Thr |
| | | | | | | | 115 | | 120 | | | 125 | | | |
| Lys | Asn | Ile | Leu | Asn | Lys | Val | Leu | Glu | Val | Gln | Ser | Arg | Thr | Asn | Phe |
| | | | | | | | 130 | | 135 | | | 140 | | | |
| Ile | Lys | Arg | Ile | Ile | Val | Leu | Asp | Thr | Val | Glu | Asn | Ile | His | Gly | Cys |
| | | | | | | | 145 | | 150 | | | 155 | | | 160 |
| Glu | Ser | Leu | Pro | Asn | Phe | Ile | Ser | Arg | Tyr | Ser | Asp | Gly | Asn | Ile | Ala |
| | | | | | | | 165 | | | 170 | | | 175 | | |
| Asn | Phe | Lys | Pro | Leu | His | Phe | Asp | Pro | Val | Glu | Gln | Val | Ala | Ala | Ile |
| | | | | | | | 180 | | | 185 | | | 190 | | |
| Leu | Cys | Ser | Ser | Gly | Thr | Thr | Gly | Leu | Pro | Lys | Gly | Val | Met | Gln | Thr |
| | | | | | | | 195 | | 200 | | | 205 | | | |
| His | Gln | Asn | Ile | Cys | Val | Arg | Leu | Ile | His | Ala | Leu | Asp | Pro | Arg | Ala |
| | | | | | | | 210 | | 215 | | | 220 | | | |
| Gly | Thr | Gln | Leu | Ile | Pro | Gly | Val | Thr | Val | Leu | Val | Tyr | Leu | Pro | Phe |
| | | | | | | | 225 | | 230 | | | 235 | | | 240 |
| Phe | His | Ala | Phe | Gly | Phe | Ser | Ile | Thr | Leu | Gly | Tyr | Phe | Met | Val | Gly |
| | | | | | | | 245 | | | 250 | | | 255 | | |
| Leu | Arg | Val | Ile | Met | Ser | Arg | Arg | Phe | Asp | Pro | Glu | Ala | Phe | Leu | Lys |
| | | | | | | | 260 | | 265 | | | 270 | | | |
| Ala | Ile | Gln | Asp | Tyr | Glu | Val | Arg | Ser | Val | Ile | Asn | Val | Pro | Ser | Val |
| | | | | | | | 275 | | 280 | | | 285 | | | |
| Ile | Leu | Phe | Leu | Ser | Lys | Ser | Pro | Leu | Val | Asp | Lys | Tyr | Asp | Leu | Ser |
| | | | | | | | 290 | | 295 | | | 300 | | | |
| Ser | Leu | Arg | Glu | Leu | Cys | Cys | Gly | Ala | Ala | Pro | Leu | Ala | Lys | Glu | Val |

DE 699 28 687 T2 2006.08.24

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|
| 305 | 310 | 315 | 320 | | | | | | | | | | | | |
| Ala | Glu | Val | Ala | Ala | Lys | Arg | Leu | Asn | Leu | Pro | Gly | Ile | Arg | Cys | Gly |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 325 | | | | | 330 | | | | | | | | 335 |
| Phe | Gly | Leu | Thr | Glu | Ser | Thr | Ser | Ala | Asn | Ile | His | Ser | Leu | Arg | Asp |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 340 | | | | | 345 | | | | | | | | 350 |
| Glu | Phe | Lys | Pro | Gly | Ser | Leu | Gly | Arg | Val | Thr | Pro | Leu | Met | Ala | Ala |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 355 | | | | | 360 | | | | | | | | 365 |
| Lys | Ile | Ala | Asp | Arg | Glu | Thr | Gly | Lys | Ala | Leu | Gly | Pro | Asn | Gln | Val |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 370 | | | | | 375 | | | | | | | | 380 |
| Gly | Glu | Leu | Cys | Ile | Lys | Gly | Pro | Met | Val | Ser | Lys | Gly | Tyr | Val | Asn |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 385 | | | | | 390 | | | | | | | | 400 |
| Asn | Val | Glu | Ala | Thr | Lys | Glu | Ala | Ile | Asp | Asp | Asp | Gly | Trp | Leu | His |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 405 | | | | | 410 | | | | | | | | 415 |
| Ser | Gly | Asp | Phe | Gly | Tyr | Tyr | Asp | Glu | Asp | Glut | His | Phe | Tyr | Val | Val |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 420 | | | | | 425 | | | | | | | | 430 |
| Asp | Arg | Tyr | Lys | Glu | Leu | Ile | Lys | Tyr | Lys | Gly | Ser | Gln | Val | Ala | Pro |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 435 | | | | | 440 | | | | | | | | 445 |
| Ala | Glu | Leu | Glu | Glu | Ile | Leu | Leu | Lys | Asn | Pro | Cys | Ile | Arg | Asp | Val |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 450 | | | | | 455 | | | | | | | | 460 |
| Ala | Val | Val | Gly | Ile | Pro | Asp | Leu | Glu | Ala | Gly | Glu | Leu | Pro | Ser | Ala |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 465 | | | | | 470 | | | | | | | | 480 |
| Phe | Val | Val | Lys | Gln | Pro | Gly | Lys | Glu | Ile | Thr | Ala | Lys | Glu | Val | Tyr |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 485 | | | | | 490 | | | | | | | | 495 |
| Asp | Tyr | Leu | Ala | Glu | Arg | Val | Ser | His | Thr | Lys | Tyr | Leu | Arg | Gly | Gly |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 500 | | | | | 505 | | | | | | | | 510 |
| Val | Arg | Phe | Val | Asp | Ser | Ile | Pro | Arg | Asn | Val | Thr | Gly | Lys | Ile | Thr |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 515 | | | | | 520 | | | | | | | | 525 |
| Arg | Lys | Glu | Leu | Leu | Lys | Gln | Leu | Leu | Glu | Lys | Ala | Gly | Gly | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 530 | | | | | 535 | | | | | | | | 540 |

<210> 48

<211> 23

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> /Anmerkung = "ein Primer"

<400> 48

ttatcccttg gaagatggga cgg 23

<210> 49

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> /Anmerkung = "ein Primer"

<400> 49

ctggagaaca gctgttgc ac gc 22

<210> 50

<211> 32

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> /Anmerkung = "ein Primer"

| | |
|----------------------------------------------|----|
| <400> 50 | |
| gttatgcaga tattccgggc tgcatagcat tg | 32 |
| <210> 51 | |
| <211> 40 | |
| <212> DNA | |
| <213> Künstliche Sequenz | |
| <220> | |
| <223> /Anmerkung = "ein Primer" | |
| <400> 51 | |
| cttggaaataa ttgtggcacc tgttaacgat aaatacattg | 40 |
| <210> 52 | |
| <211> 23 | |
| <212> DNA | |
| <213> Künstliche Sequenz | |
| <220> | |
| <223> /Anmerkung = "ein Primer" | |
| <400> 52 | |
| aaccacgcat agtttttgc tcc | 23 |
| <210> 53 | |
| <211> 31 | |
| <212> DNA | |
| <213> Künstliche Sequenz | |
| <220> | |
| <223> /Anmerkung = "ein Primer" | |
| <400> 53 | |
| aagtactgaa tgtacagtct aaattaaaat c | 31 |
| <210> 54 | |
| <211> 31 | |
| <212> DNA | |
| <213> Künstliche Sequenz | |
| <220> | |
| <223> /Anmerkung = "ein Primer" | |
| <400> 54 | |
| ttaaaatcta ttgaaactat tattatatta g | 31 |
| <210> 55 | |
| <211> 23 | |
| <212> DNA | |
| <213> Künstliche Sequenz | |
| <220> | |
| <223> /Anmerkung = "ein Primer" | |
| <400> 55 | |
| gttgcggtga ttatgttttc ttc | 23 |
| <210> 56 | |
| <211> 26 | |

| | | |
|------------------------------------------------|--|----|
| <212> DNA | | |
| <213> Künstliche Sequenz | | |
| | | |
| <220> | | |
| <223> /Anmerkung = "ein Primer" | | |
| | | |
| <400> 56 | | |
| gtacaactgg tctgccgaag ggagtc | | 26 |
| | | |
| <210> 57 | | |
| <211> 29 | | |
| <212> DNA | | |
| <213> Künstliche Sequenz | | |
| | | |
| <220> | | |
| <223> /Anmerkung = "ein Primer" | | |
| | | |
| <400> 57 | | |
| caagaatatt gttgtgcgat tttctcttg | | 29 |
| | | |
| <210> 58 | | |
| <211> 29 | | |
| <212> DNA | | |
| <213> Künstliche Sequenz | | |
| | | |
| <220> | | |
| <223> /Anmerkung = "ein Primer" | | |
| | | |
| <400> 58 | | |
| ctacttttgg taaccagatt aatcccacg | | 29 |
| | | |
| <210> 59 | | |
| <211> 32 | | |
| <212> DNA | | |
| <213> Künstliche Sequenz | | |
| | | |
| <220> | | |
| <223> /Anmerkung = "ein Primer" | | |
| | | |
| <400> 59 | | |
| ccaccatggc ttgggtatga cgaccacatt ag | | 32 |
| | | |
| <210> 60 | | |
| <211> 43 | | |
| <212> DNA | | |
| <213> Künstliche Sequenz | | |
| | | |
| <220> | | |
| <223> /Anmerkung = "ein Primer" | | |
| | | |
| <400> 60 | | |
| ttgttctaat gcaccgctt gaagaagaac tatttctaca atc | | 43 |
| | | |
| <210> 61 | | |
| <211> 31 | | |
| <212> DNA | | |
| <213> Künstliche Sequenz | | |
| | | |
| <220> | | |
| <223> /Anmerkung = "ein Primer" | | |

| | |
|-------------------------------------|----|
| <400> 61 | |
| aagtgcatta gttgataagt acgatttatac g | 31 |
| <210> 62 | |
| <211> 28 | |
| <212> DNA | |
| <213> Künstliche Sequenz | |
| <220> | |
| <223> /Anmerkung = "ein Primer" | |
| <400> 62 | |
| cggtttaaat taccgggtgt caggcaag | 28 |
| <210> 63 | |
| <211> 19 | |
| <212> DNA | |
| <213> Künstliche Sequenz | |
| <220> | |
| <223> /Anmerkung = "ein Primer" | |
| <400> 63 | |
| aagacgccaa accgggatc | 19 |
| <210> 64 | |
| <211> 28 | |
| <212> DNA | |
| <213> Künstliche Sequenz | |
| <220> | |
| <223> /Anmerkung = "ein Primer" | |
| <400> 64 | |
| atcaactggt aaagtagtac catttcac | 28 |
| <210> 65 | |
| <211> 28 | |
| <212> DNA | |
| <213> Künstliche Sequenz | |
| <220> | |
| <223> /Anmerkung = "ein Primer" | |
| <400> 65 | |
| tattttaaag gcccgatgat aatgaagg | 28 |
| <210> 66 | |
| <211> 25 | |
| <212> DNA | |
| <213> Künstliche Sequenz | |
| <220> | |
| <223> /Anmerkung = "ein Primer" | |
| <400> 66 | |
| ggatgggtgc actctggta tattg | 25 |
| <210> 67 | |

<211> 23
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> /Anmerkung = "ein Primer"

cagctgcagt tggtagta cag 23

<210> 68
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> /Anmerkung = "ein Primer"

<400> 68 gaaaatatct aaccgaacaa atc 23

<210> 69
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> /Anmerkung = "ein Primer"

<400> 69 aatcgatcaa gattatgttccagtcaggat ttc 33

<210> 70
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> /Anmerkung = "ein Primer"

<400> 70 gggtgaaatt tgtggatgaa attc 24

<210> 71
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> /Anmerkung = "ein Primer"

<400> 71 ttaagacaaa tgctggaaaa acacac 26

<210> 72
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> /Anmerkung = "ein Primer"

| | |
|---------------------------------------------------------------|----|
| <400> 72 ataaaaaat tctgtatggt cccgaacc | 28 |
| <210> 73 <211> 28 <212> DNA <213> Künstliche Sequenz | |
| <220> <223> /Anmerkung = "ein Primer" | |
| <400> 73 atgttgacg cactgtctcg ttatgcag | 28 |
| <210> 74 <211> 23 <212> DNA <213> Künstliche Sequenz | |
| <220> <223> /Anmerkung = "ein Primer" | |
| <400> 74 atagcattga ccaatgctca tac | 23 |
| <210> 75 <211> 43 <212> DNA <213> Künstliche Sequenz | |
| <220> <223> /Anmerkung = "ein Primer" | |
| <400> 75 aagaaaaatgt tctgtatgaa gagtttctga aactgtcgtg tcg | 43 |
| <210> 76 <211> 28 <212> DNA <213> Künstliche Sequenz | |
| <220> <223> /Anmerkung = "ein Primer" | |
| <400> 76 taaaaagtat ggactgaaac aaaacgac | 28 |
| <210> 77 <211> 22 <212> DNA <213> Künstliche Sequenz | |
| <220> <223> /Anmerkung = "ein Primer" | |
| <400> 77 cgaaaaatggt ctgcaatttt tc | 22 |
| <210> 78 | |

| | | |
|-------------------------------------------|--|----|
| <211> 29 | | |
| <212> DNA | | |
| <213> Künstliche Sequenz | | |
| | | |
| <220> | | |
| <223> /Anmerkung = "ein Primer" | | |
| | | |
| <400> 78 | | |
| aattgcatca ctgttatctgg gaataattg | | 29 |
| | | |
| <210> 79 | | |
| <211> 39 | | |
| <212> DNA | | |
| <213> Künstliche Sequenz | | |
| | | |
| <220> | | |
| <223> /Anmerkung = "ein Primer" | | |
| | | |
| <400> 79 | | |
| ttgaacgtga actgatacac agtctggta ttgtaaaac | | 39 |
| | | |
| <210> 80 | | |
| <211> 36 | | |
| <212> DNA | | |
| <213> Künstliche Sequenz | | |
| | | |
| <220> | | |
| <223> /Anmerkung = "ein Primer" | | |
| | | |
| <400> 80 | | |
| aaactattat tatactggac ctgaatgaag acttag | | 36 |
| | | |
| <210> 81 | | |
| <211> 28 | | |
| <212> DNA | | |
| <213> Künstliche Sequenz | | |
| | | |
| <220> | | |
| <223> /Anmerkung = "ein Primer" | | |
| | | |
| <400> 81 | | |
| gttatcaatg cctgaacaac tttatttc | | 28 |
| | | |
| <210> 82 | | |
| <211> 22 | | |
| <212> DNA | | |
| <213> Künstliche Sequenz | | |
| | | |
| <220> | | |
| <223> /Anmerkung = "ein Primer" | | |
| | | |
| <400> 82 | | |
| tcttttaatc gtgacgatca gg | | 22 |
| | | |
| <210> 83 | | |
| <211> 25 | | |
| <212> DNA | | |
| <213> Künstliche Sequenz | | |
| | | |
| <220> | | |

| | |
|--------------------------------------------|----|
| <223> /Anmerkung = "ein Primer" | |
| <400> 83 | |
| cgacagcaat tctgacggta atacc | 25 |
| <210> 84 | |
| <211> 25 | |
| <212> DNA | |
| <213> Künstliche Sequenz | |
| <220> | |
| <223> /Anmerkung = " ein Primer" | |
| <400> 84 | |
| tgtggattcc gcgttgttct aatgc | 25 |
| <210> 85 | |
| <211> 39 | |
| <212> DNA | |
| <213> Künstliche Sequenz | |
| <220> | |
| <223> /Anmerkung = "ein Primer" | |
| <400> 85 | |
| tggaaagtac tctgctggta ccaacactga tggcatttc | 39 |
| <210> 86 | |
| <211> 30 | |
| <212> DNA | |
| <213> Künstliche Sequenz | |
| <220> | |
| <223> /Anmerkung = "ein Primer" | |
| <400> 86 | |
| cgatttatcg cacctgaaaag aaattgcata | 30 |
| <210> 87 | |
| <211> 30 | |
| <212> DNA | |
| <213> Künstliche Sequenz | |
| <220> | |
| <223> /Anmerkung = "ein Primer" | |
| <400> 87 | |
| ggtggcgcac ctctgtcaaa agaaattggg | 30 |
| <210> 88 | |
| <211> 27 | |
| <212> DNA | |
| <213> Künstliche Sequenz | |
| <220> | |
| <223> /Anmerkung = "ein Primer" | |
| <400> 88 | |
| agggtatgga ctgaccgaaa ccacttc | 27 |

| | |
|---------------------------------------------------------------|----|
| <210> 89 <211> 18 <212> DNA <213> Künstliche Sequenz | |
| <220> <223> /Anmerkung = "ein Primer" | |
| <400> 89 aggaaaaatt ctggggcc | 18 |
| <210> 90 <211> 28 <212> DNA <213> Künstliche Sequenz | |
| <220> <223> /Anmerkung = "ein Primer" | |
| <400> 90 ggctgaagtc actgattaaa tataaagg | 28 |
| <210> 91 <211> 23 <212> DNA <213> Künstliche Sequenz | |
| <220> <223> /Anmerkung = "ein Primer" | |
| <400> 91 aggaaatact gctgcaacat ccg | 23 |
| <210> 92 <211> 38 <212> DNA <213> Künstliche Sequenz | |
| <220> <223> /Anmerkung = "ein Primer" | |
| <400> 92 cagtcaagtt tcaaccgccca aatggctgcg tgggggg | 38 |
| <210> 93 <211> 25 <212> DNA <213> Künstliche Sequenz | |
| <220> <223> /Anmerkung = "ein Primer" | |
| <400> 93 aaaaaattga ccgtaaagtg ttaag | 25 |

Patentansprüche

1. Thermostabile Luciferase mit einer Halbwertszeit von mindestens 2 Stunden bei 50°C, **dadurch gekennzeichnet**, dass die thermostabile Luciferase die SEQ ID NO: 44 oder SEQ ID NO: 45 oder einen enzymatisch aktiven Teil davon umfasst und gegenüber einem Inhibitor der Biolumineszenzreaktion resistent ist.
2. Isoliertes und gereinigtes Nucleinsäuremolekül, das ein Nucleinsäuresegment enthält, das für die Luciferase nach Anspruch 1 oder das Komplement davon kodiert.

3. Isoliertes und gereinigtes Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 2, das ein Nucleinsäuresegment enthält, das die SEQ ID NO: 42 oder SEQ ID NO: 43 aufweist.
4. Vektor, der das Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 2 enthält.
5. Wirtszelle, deren Genom mit dem Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 2 vergrößert worden ist.
6. Festes Substrat, das die Luciferase nach Anspruch 1 enthält.
7. Fusionsprotein, das die Luciferase nach Anspruch 1 enthält.
8. Isoliertes und gereinigtes Nucleinsäuremolekül, das ein Nucleinsäuresegment enthält, das für das Fusionsprotein nach Anspruch 7 kodiert.
9. Verfahren zur Verwendung einer Luciferase, welches umfasst: Verbinden eines Mittels mit Luciferase nach Anspruch 1 unter Bildung eines markierten Mittels.
10. Verwendung der Luciferase nach Anspruch 1 zum Nachweisen von ATP, zum Markieren eines Moleküls, als genetischer Reporter, für die Immobilisierung auf einer festen Oberfläche, zum Herstellen eines Hybridproteins, für Hochtemperaturreaktionen oder für die Bildung von Lumineszenzlösungen.
11. Verfahren zur Verwendung eines Vektors, der für Luciferase kodiert, welches umfasst:
 - a) Einführen des Vektors nach Anspruch 4 in eine Wirtszelle; und
 - b) Nachweisen oder Bestimmen der Anwesenheit von Luciferase in der Wirtszelle.
12. Kit, der einen Behälter umfaßt, der die Luciferase nach Anspruch 1 enthält.
13. Kit nach Anspruch 12, worin der Behälter ein wässriges Gemisch umfasst, das die Luciferase enthält.
14. Kit nach Anspruch 12, worin der Behälter lyophilisierte Luciferase enthält.
15. Kit nach Anspruch 12, der außerdem einen Behälter umfasst, der Luciferin enthält.
16. Kit nach Anspruch 12, worin der Behälter außerdem Luciferin enthält.
17. Kit nach Anspruch 14, worin der Behälter außerdem lyophilisiertes Luciferin enthält.
18. Kit nach Anspruch 15, worin der Behälter, der Luciferin enthält, lyophilisiertes Luciferin enthält.
19. Kit nach Anspruch 12, der außerdem ein Verpackungsmaterial enthält, das getrennt voneinander verpackt den Behälter und Anweisungsmittel enthält, die den Anwender anweisen, die Luciferaseaktivität in einer Probe, die mutmaßlich ATP enthält, mit der Konzentration von ATP in der Probe zu korrelieren.
20. Kit nach Anspruch 12, der außerdem ein Verpackungsmaterial enthält, das getrennt voneinander verpackt den Behälter und Anweisungsmittel enthält, die den Anwender anweisen, die Luciferaseaktivität in einer Probe, die mutmaßlich ein ATP-produzierendes infektiöses Mittel enthält, mit der Konzentration oder der Anwesenheit des Mittels in der Probe zu korrelieren.

Es folgen 70 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

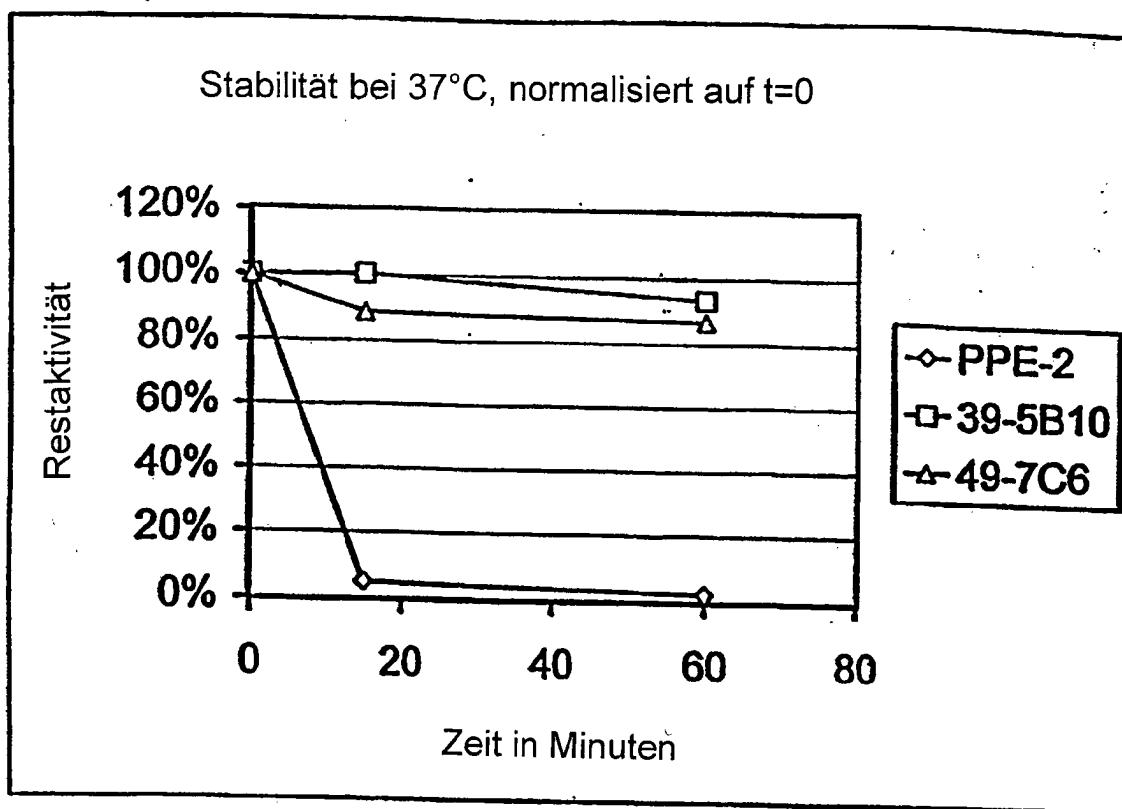


FIG. 1

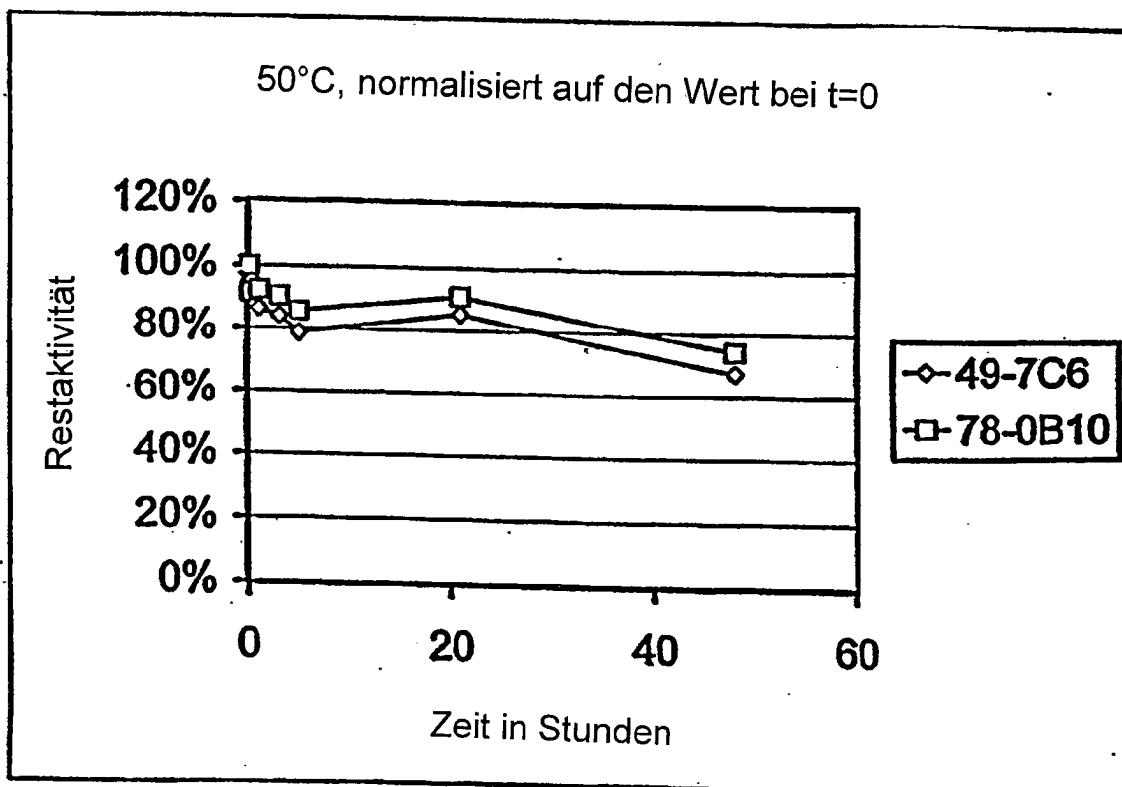


FIG. 2

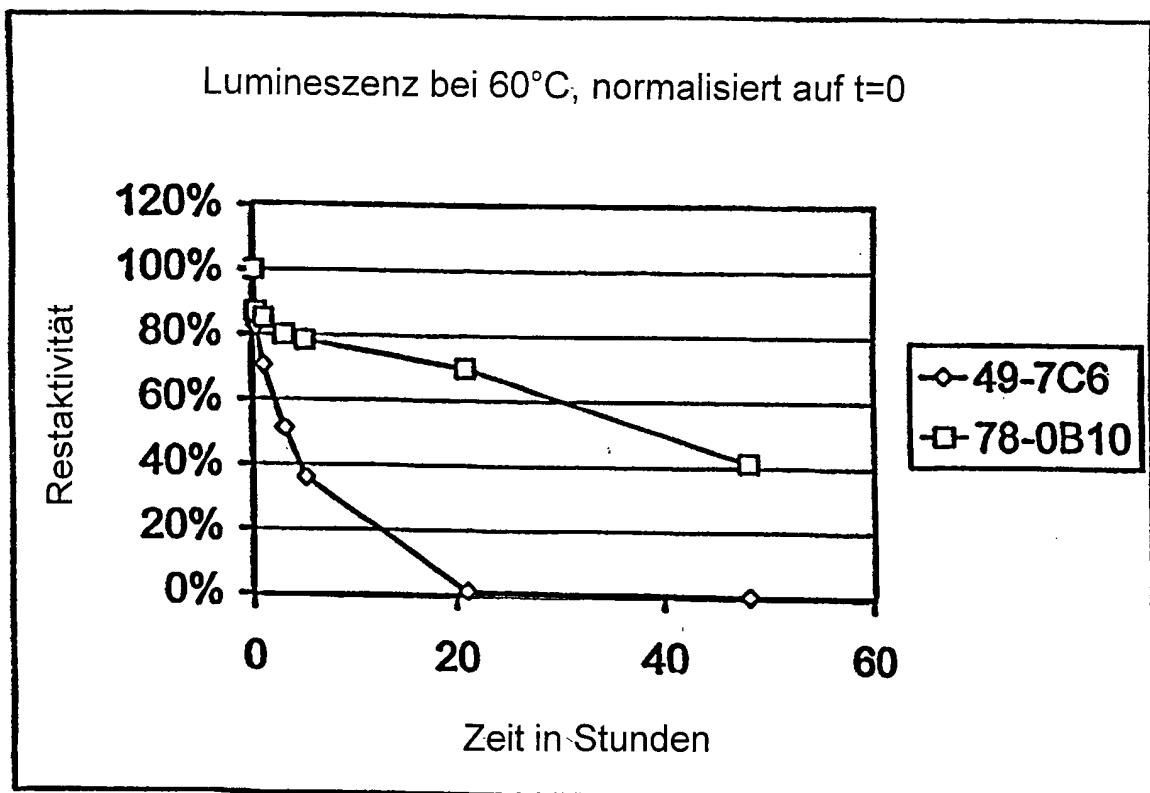


FIG. 3

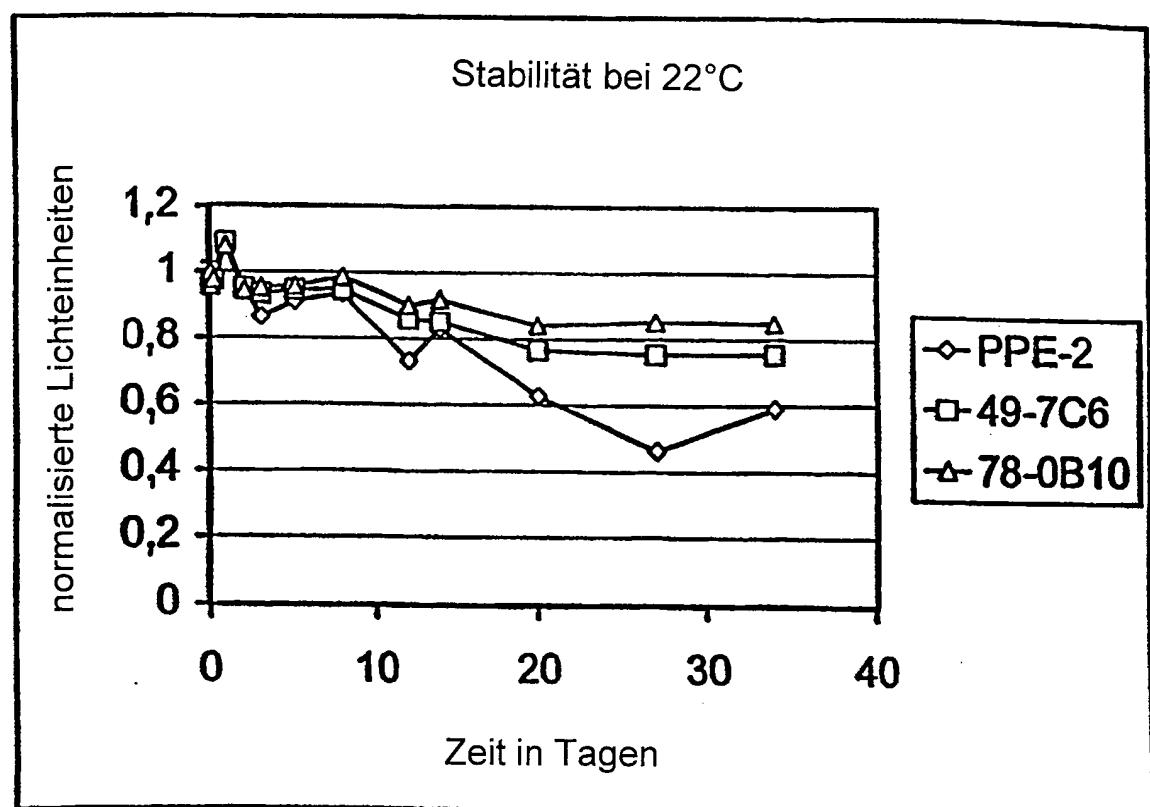


FIG. 4

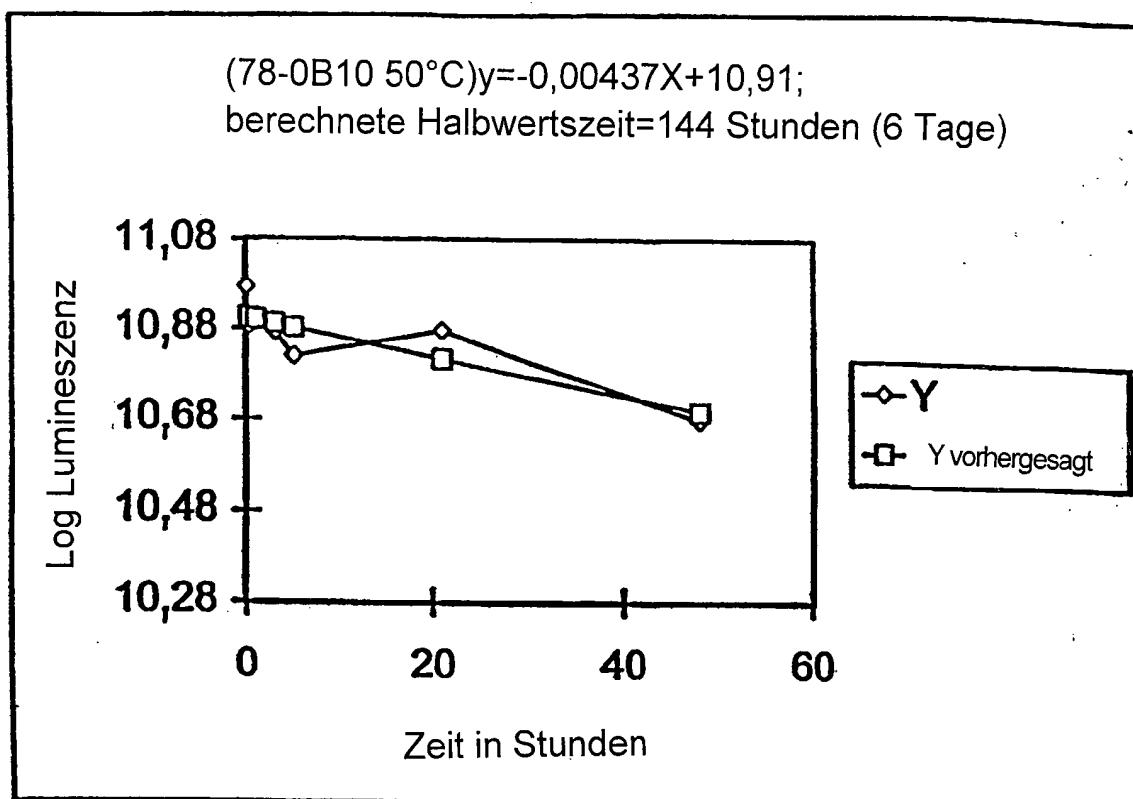


FIG. 5

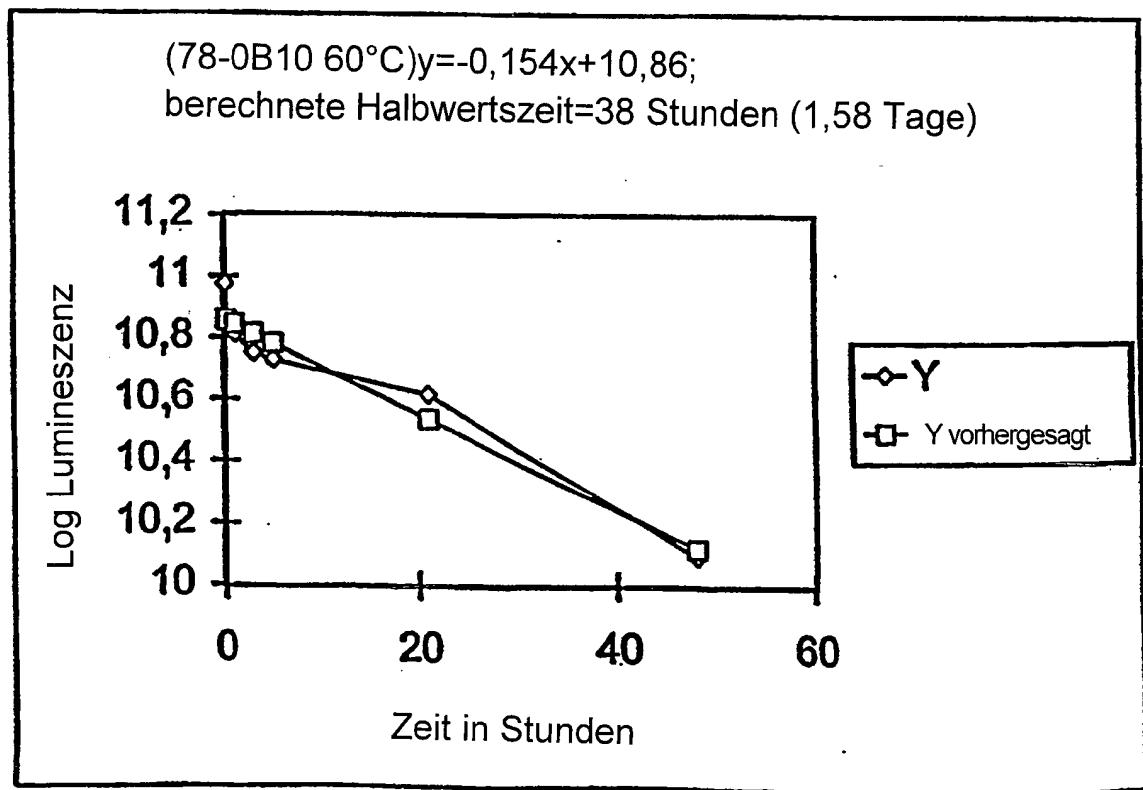


FIG. 6

(49-7C6 50°C) $y=-0,0059x+8,757$;
berechnete Halbwertszeit=100,5 Stunden (4,2 Tage)

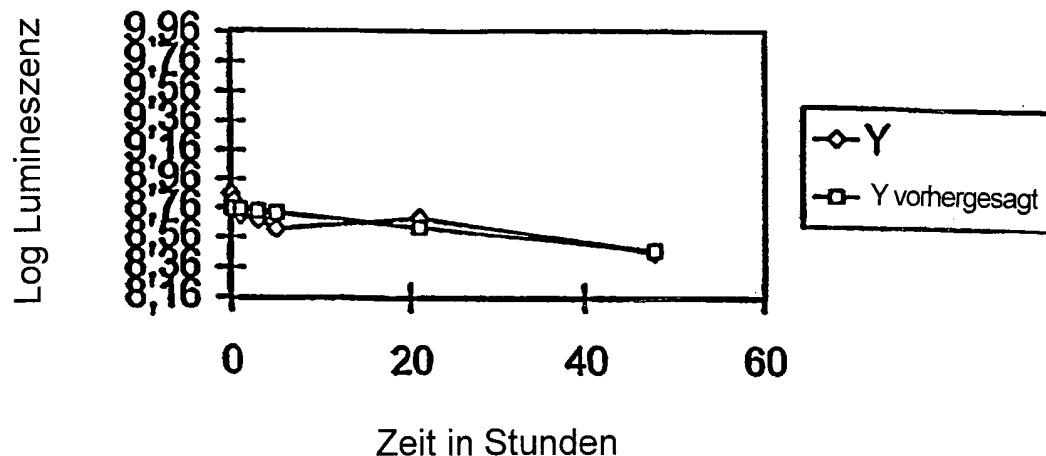


FIG. 7

(49-7C6 60°C) $y=-0,169x+8,647$;
berechnete Halbwertszeit=2,9 Stunden

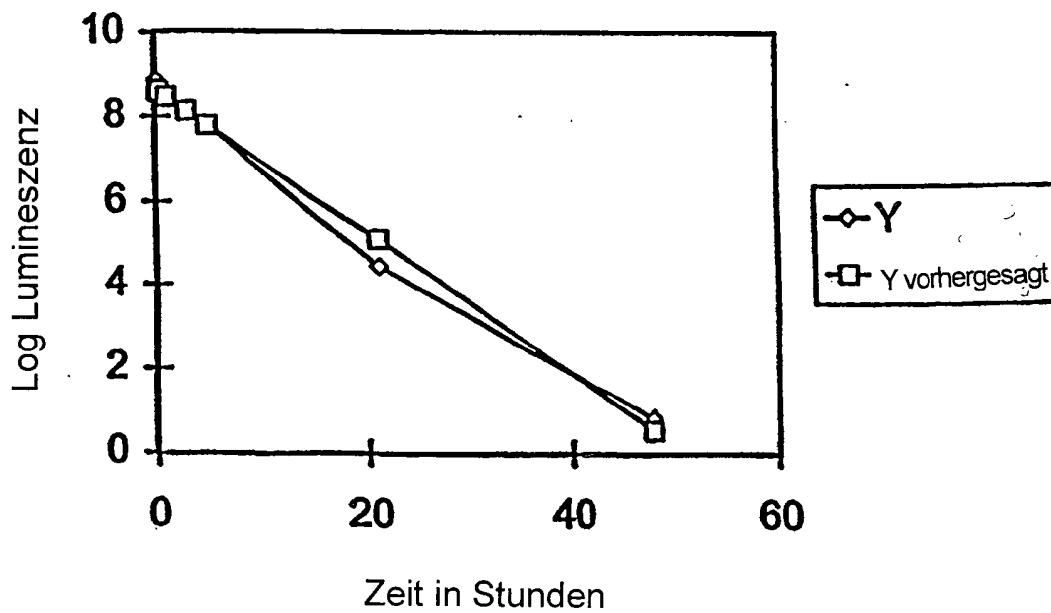


FIG. 8

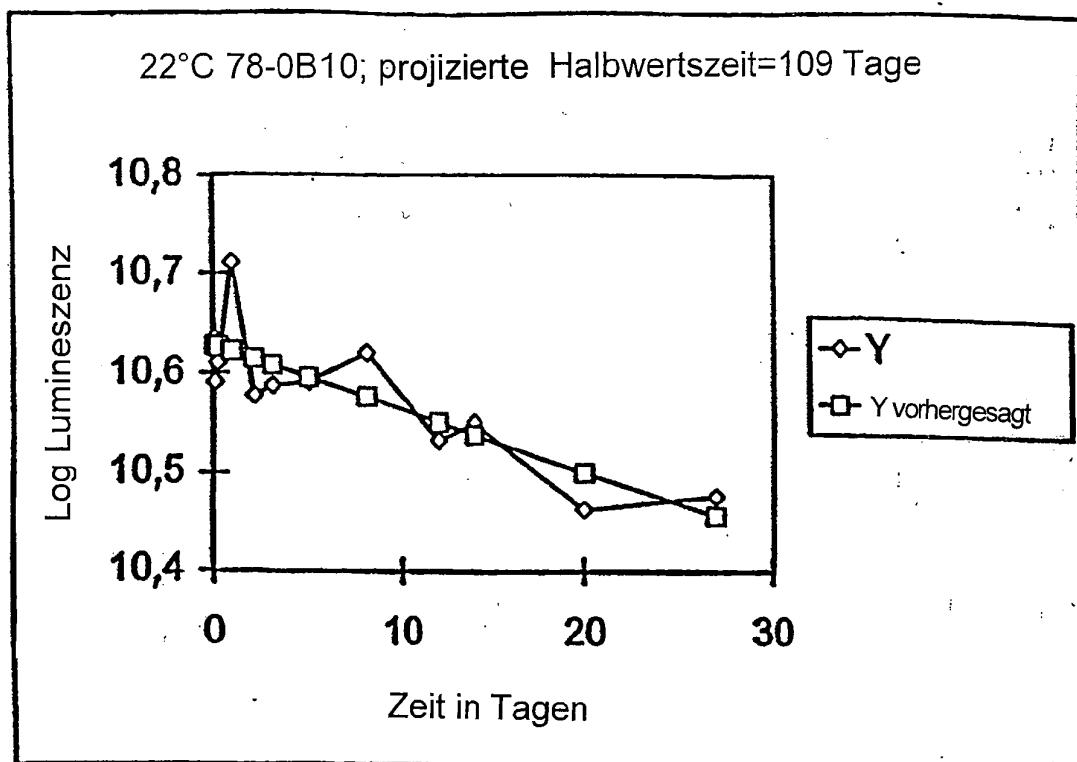


FIG. 9

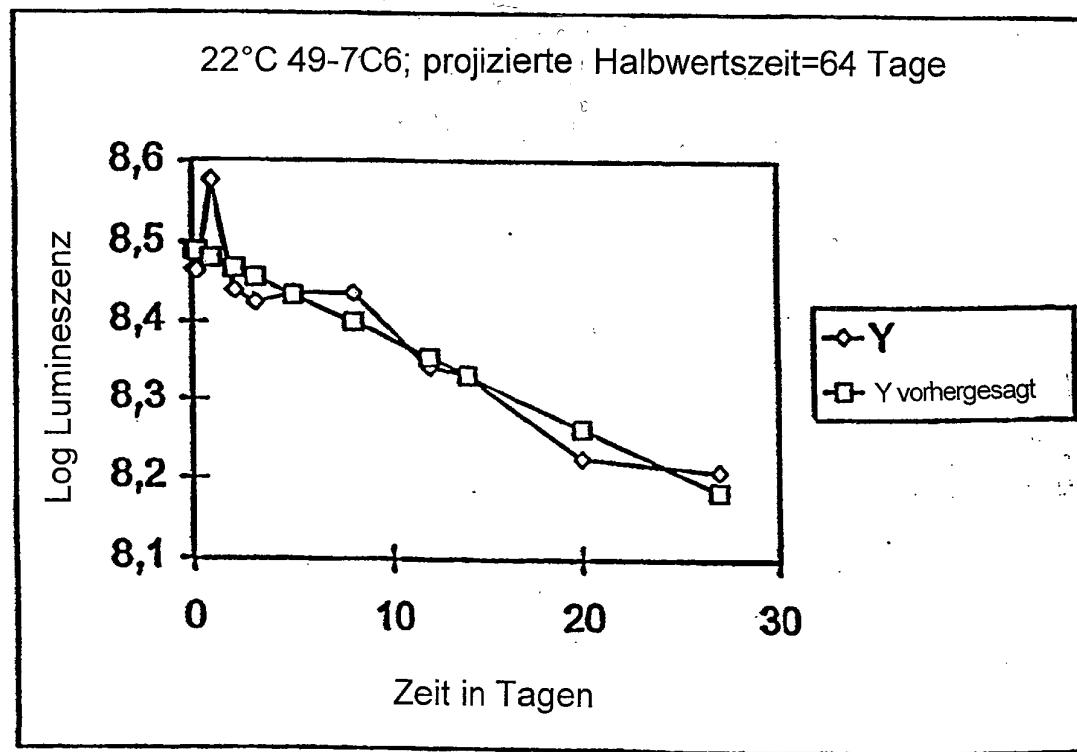


FIG. 10

37°C 49-7C6; berechnete Halbwertszeit=111 Stunden (4,7 Tage)

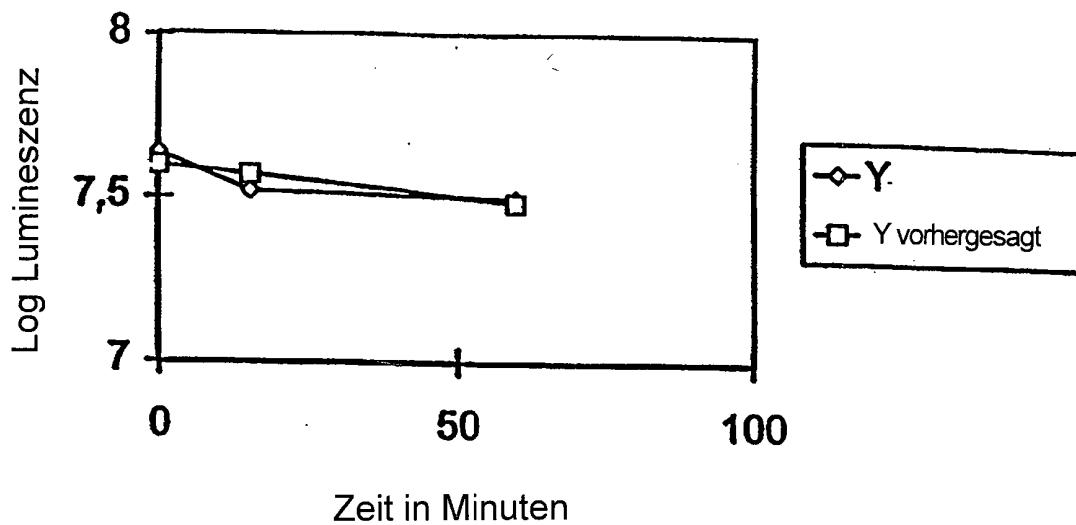


FIG. 11

22°C PPE-2(w.t.); berechnete Halbwertszeit=27,7 Tage

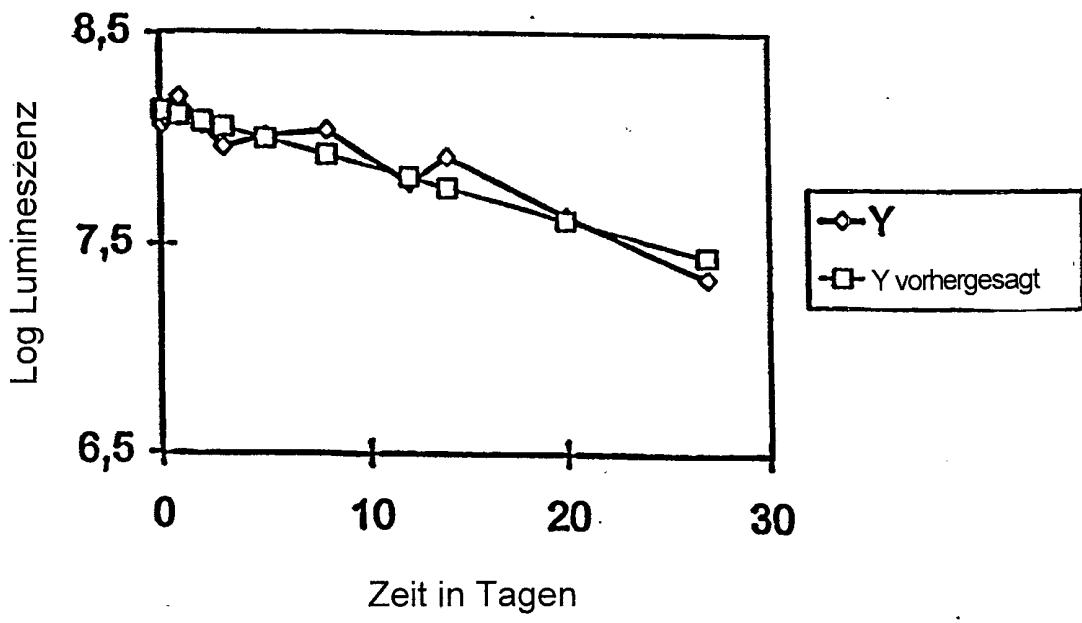


FIG. 12

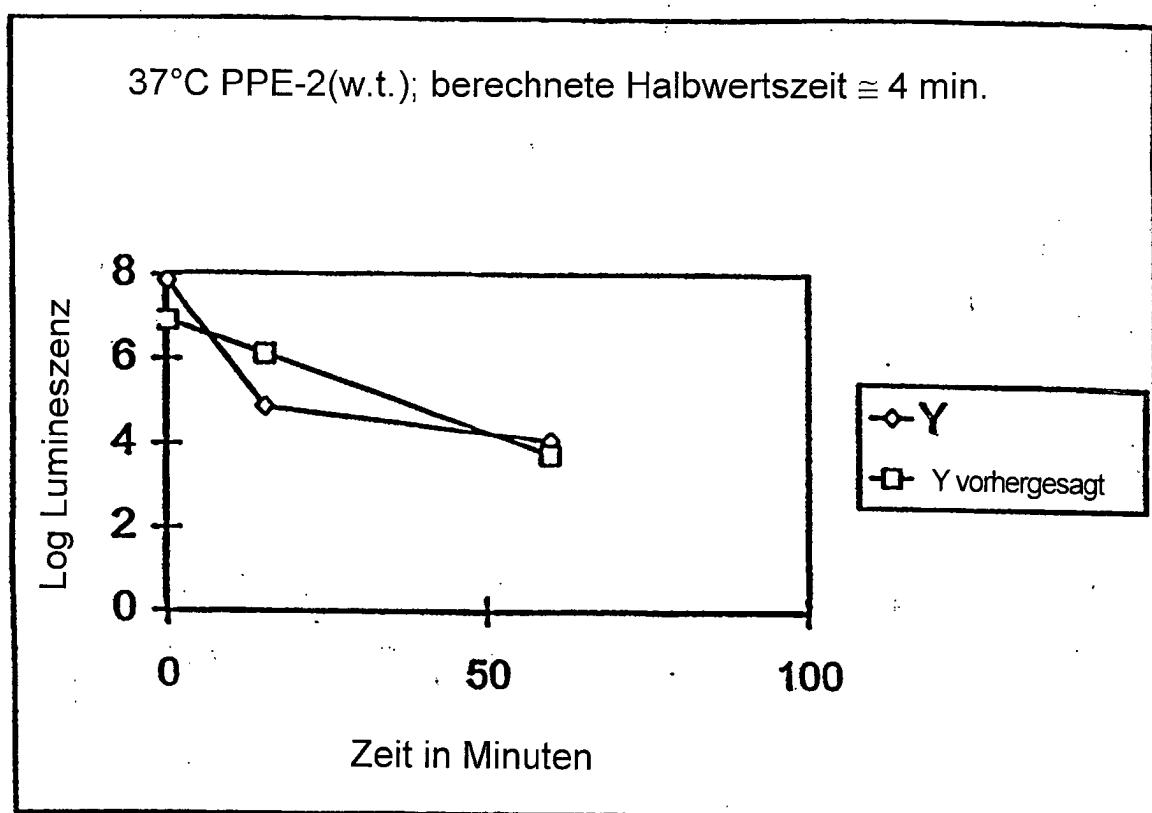


FIG. 13

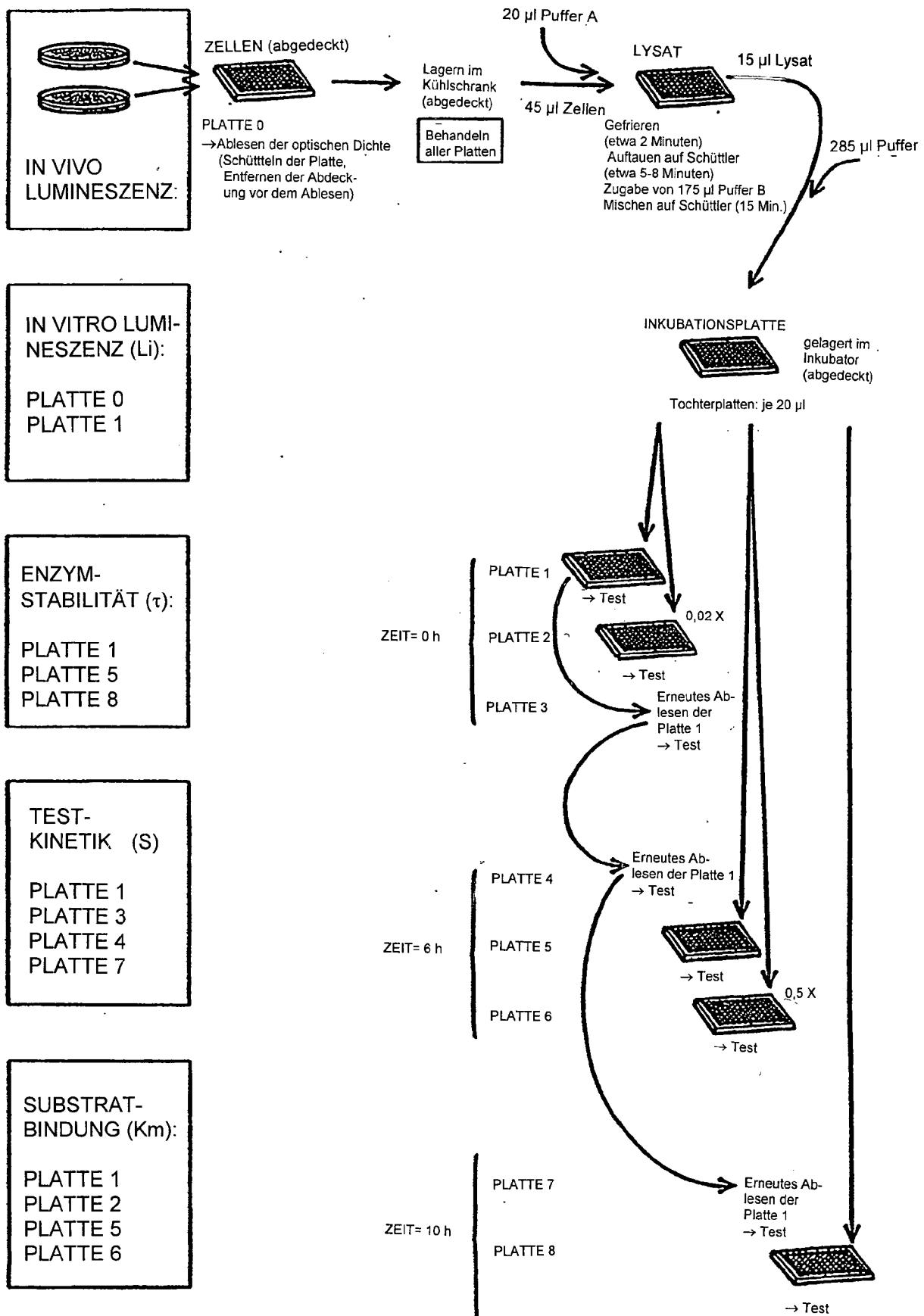
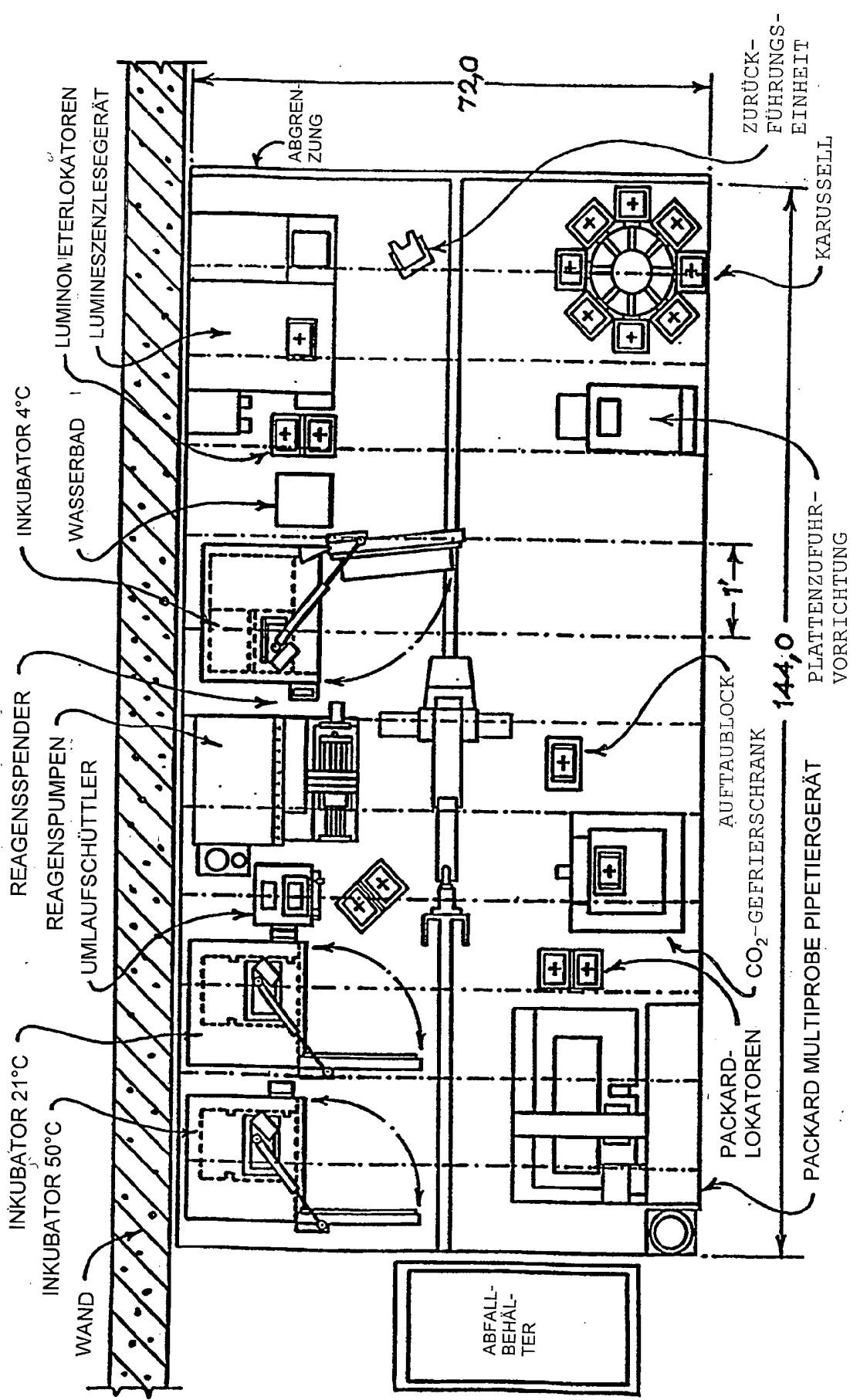


FIG. 14

FIG. 15

PROMEGA-DARSTELLUNG DES
T265 ROBOT AUF EINEM 3M TRACK



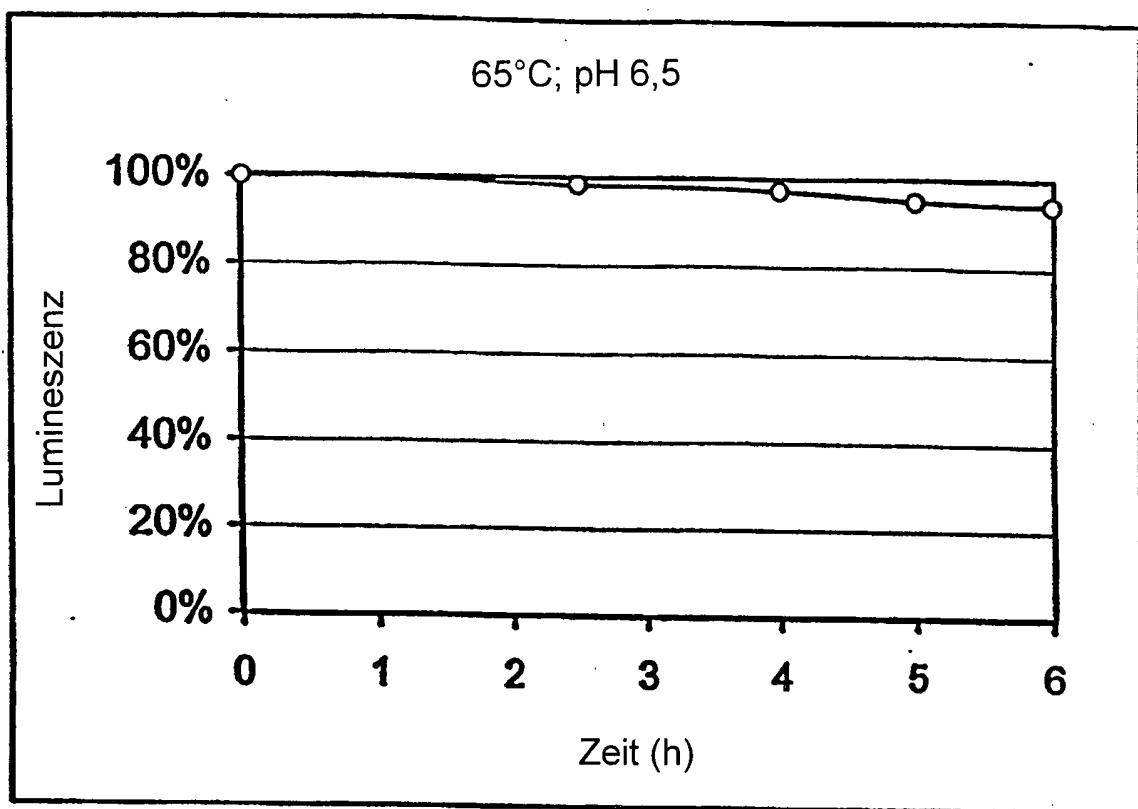


FIG. 16A

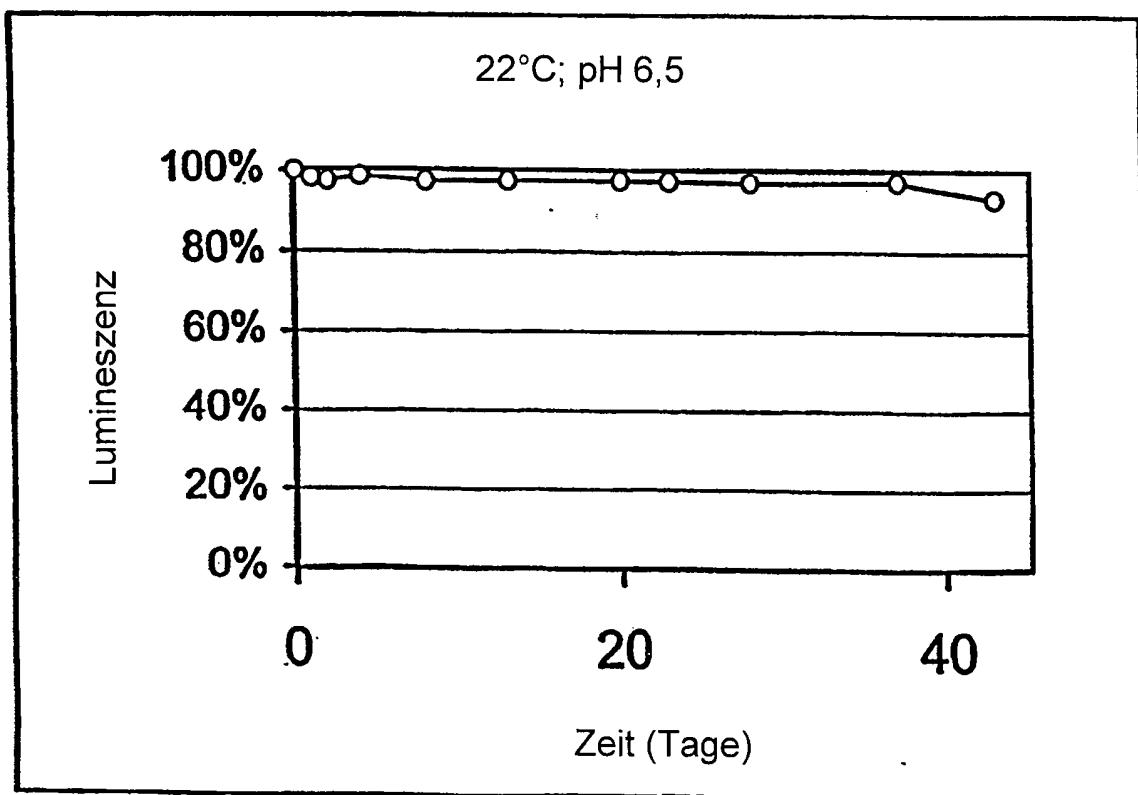


FIG. 16B

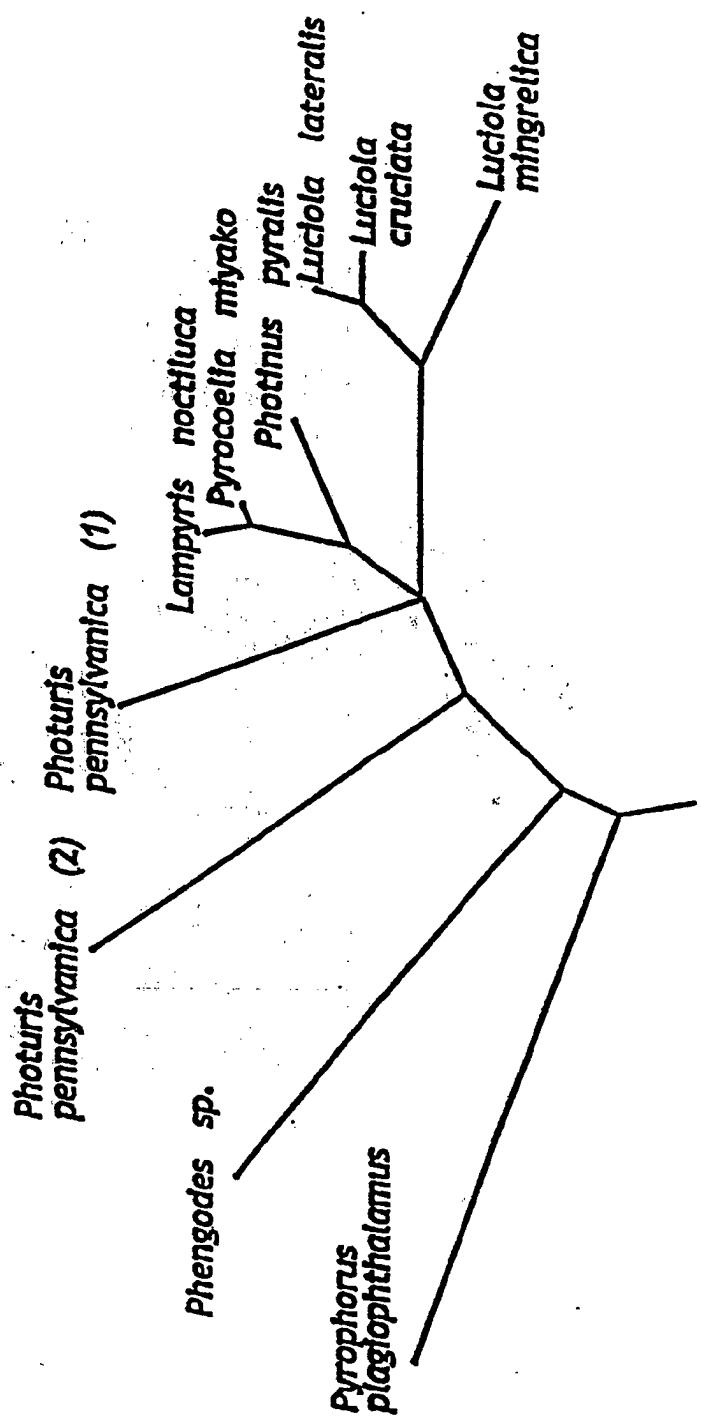


FIG. 17

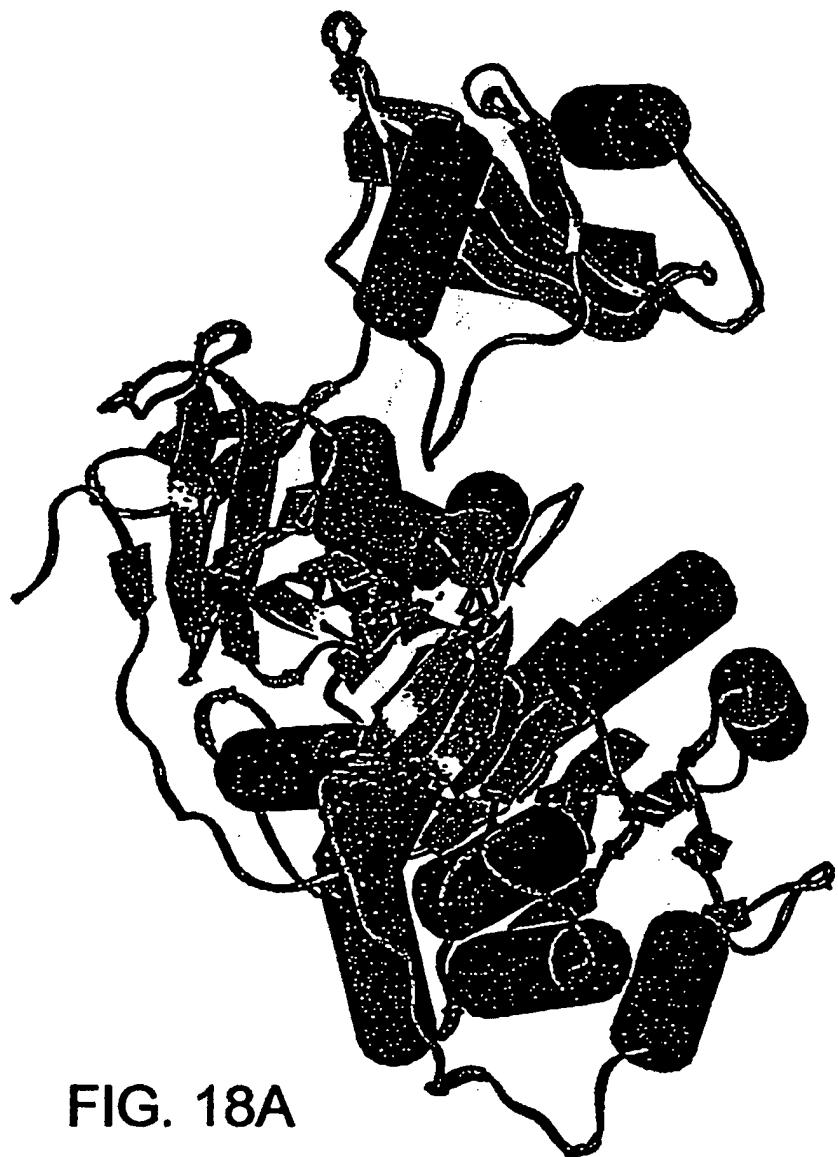


FIG. 18A

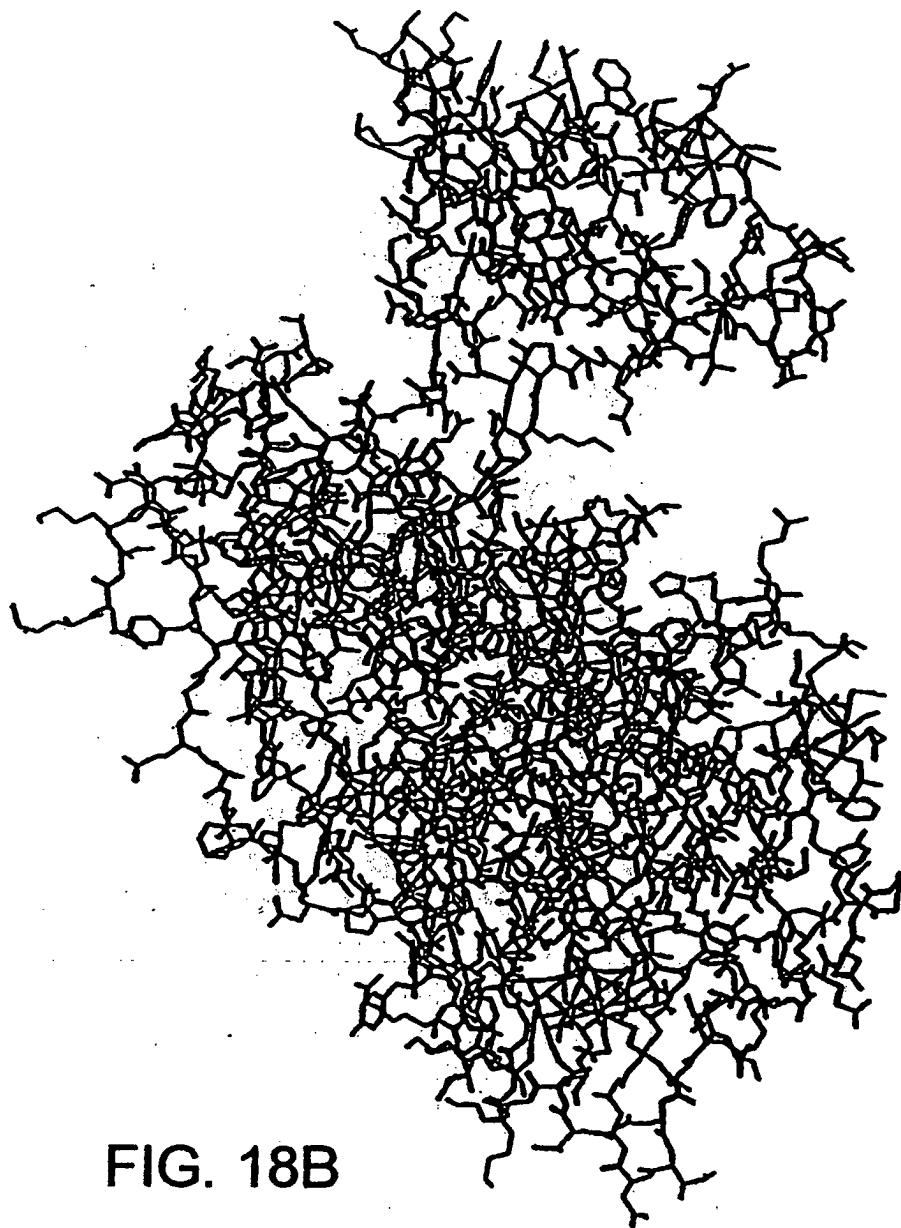


FIG. 18B

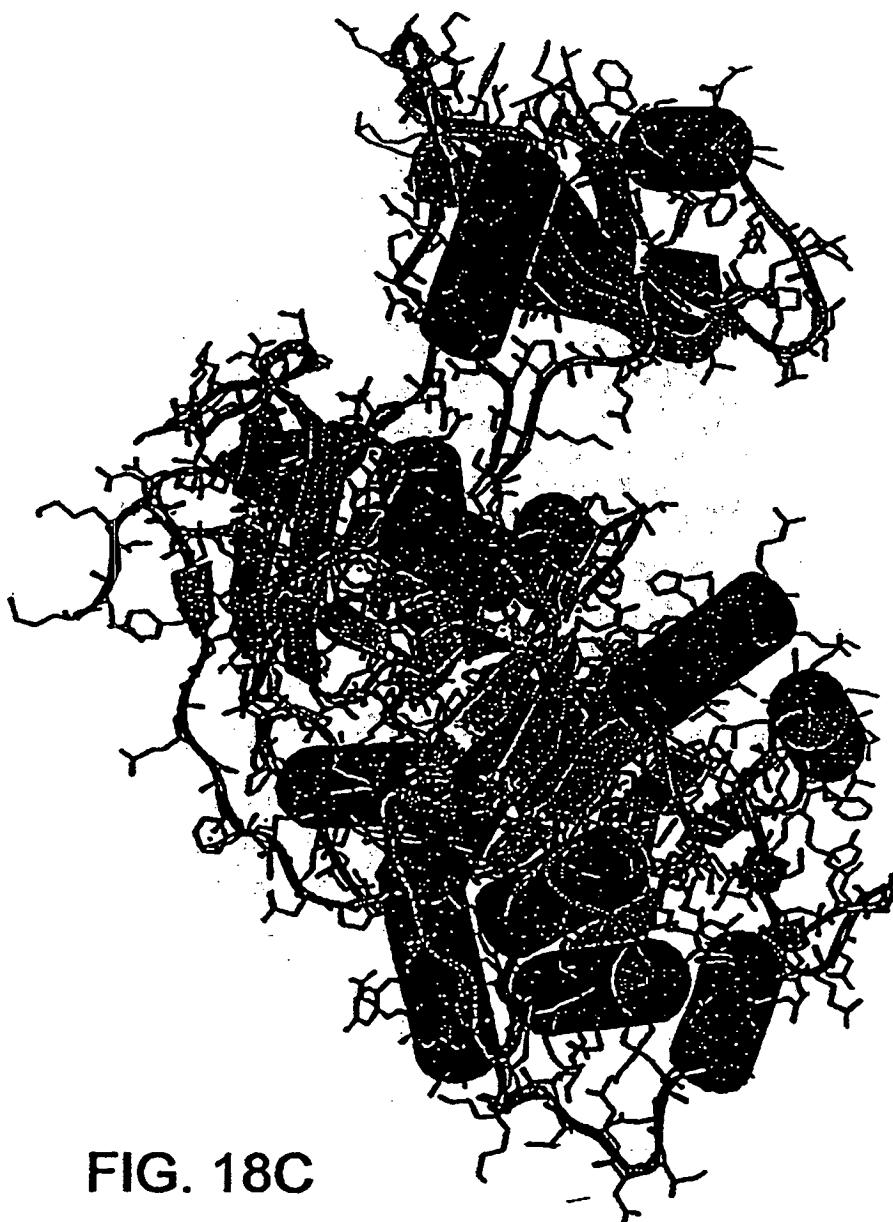


FIG. 18C

1

50

Lcr MENMENDE.N IVVGPKPYP IREGSAGTQL RKYMDRYAKL .GALAFNAV
 Lla MENMENDE.N IVYGPEPFYP IREGSAGAQL RKYMDRYAKL .GALAFNAL
 Lmi MEKEB.N VVYGPLPFYP IREGSAGIQL RKYMHQYAKL .GALAFNAL
 Pmi ...MED.ARN IKKGPAFPYP LEDGTAGEQL HKAMKRYAQV PGTIAFTDAH
 Ppy ...MED.ARN IKKGPAFPYP LEDGTAGEQL HKAMKRYALV PGTIAFTDAH
 Lno ...MED.ARN IMHGPAPFYP LEDGTAGEQL HKAMKRYAQV PGTIAFTDAH
 Ppe1 ...MSI.ENN ILIGPPPPYP LERGTAGEQL HRAISRYAAV PGTLAYTDVH
 Phg MIKME..EEH VMPGAMPRDL LFEGTAGQQL HRALYKHSYF PE..AIVDSH
 GR ...MMKREKN VVYGPPEPLHP LEDLTAGEML FRALRKHSHL PQ..ALVDVY
 YG ...MMKREKN VIYGPEPLHP LEDLTAGEML FRALRKHSHL PQ..ALVDVY
 Ppe2 ...MED..KN ILYGPEPFYP LADGTAGEQM FYALSRYADI SGCIALTNAH
 49-7C6 A
 78-0B10 A
 90-1B5 A E D P
 133-1B2 A E D P
 146-1H2 A E D A P
 Cons ---M--- G AG -----A-----

51

100

Lcr TGVDYSYAEY LEKSCCLGKA LQNYGLVVDG RIALCSENCE EPPIPVIAGL
 Lla TGVDYTYYAEY LEKSCCLGKA LQNYGLVVDG RIALCSENCE EPPIPVLAGL
 Lmi TGVDISYQEY PDITCRLARA MKNPGMKPEE HIALCSENCE EPPIPVLAGL
 Pmi AEVNITYSEY PEMSCRLAET MKRYGLGLQH HIAVCSETSL QFFMPVCGAL
 Ppy IEVNITYSEY PEMSVRLARA MKRYGLATNH RIVVCSSENSL QFFMPVILGAL
 Lno AEVNITYSEY PEMACRLAET MKRYGLGLQH HIAVCSENSL QFFMPVCGAL
 Ppe1 TELEVTYKEF LDVTCRLABA MKNYGLGLQH TISVCSENCV QFFMPICAAL
 Phg THEIISYAKI LDMSCRLAVS PQKYGLTQNN IIIGICSENNL NFFNPVIAAF
 GR GEEWISYKEF FETTCILLAQS LHNCGYKMSD VVSICAENNPK RFFVPIAAW
 YG GDESLSYKEF FEATCILLAQS LHNCGYKMND VVSICAENNPK RFFIPIAAW
 Ppe2 TKENVLYKEF LKLSCRLAES FKKYGLQND TIAVCSENGQ QFFLPLIASL
 49-7C6 I
 78-0B10 V
 90-1B5 V
 133-1B2 S V
 146-1H2 S V
 Cons -----Y--- L--- G -----C-E--- -PP-P-----

101

150

Lcr FIGVGVAPTN EIYTLRELVH SLGISKPTIV FSSKKGLDKV ITVQKTVTTI
 Lla FIGVGVAPTN EIYTLRELVH SLGISKPTIV FSSKKGLDKV ITVQKTVVATI
 Lmi YIGVAVAPTN EIYTLRELNH SLGIAQPTIV FSSRKGLPKV LEVQKTVTCI
 Pmi FIGVGVAPTN DIYNERELYN SLFISQPTIV FCSKRALQKI LGVQKKLPVI
 Ppy FIGVAVAPAN DIYNERELLN SMNISQPTVV FVSKKGLQKI LNVQKKLPPI
 Lno FIGVGVASTN DIYNERELYN SLSISQPTIV FCSKRALQKI LGVQKKLPPI
 Ppe1 YVGVATAPTN DIYNERELYN SLSISQPTVV FTSRNSLQKI LGVQSRRLPPI
 Phg YLGITVATVN DTYTDRELSE TLNITKPQML FCSKQSLPIV MTKMKIIMPYV
 GR YIGMIVAPVN EGYIPDELCK VMG16RPQLV FCTKN1LNKV LEVQSRRTDFI
 YG YIGMIVAPVN ESYIPDELCK VMG16KPQIV FCTKN1LNKV LEVQSRRTNFI
 Ppe2 YLGIIAAPVS DKYIERELIH SLGIVVKPRII FCSKNTFPQKV LNVKSKLKYV
 49-7C6 S
 78-0B10 S
 90-1B5 V N V SI
 133-1B2 V N V SI
 146-1H2 V N V SI
 Cons --G---A--- Y---EL--- I---P---

FIG. 19A

151 200

| | | | | | |
|------|------------|------------|----------------|------------|------------|
| Lcr | KTIVILD8KV | DYRGYQCLDT | PIKRNTPPGF | QASSFKTVEV | .DRKEQVALI |
| Lla | KTIVILD8KV | DYRGYQSMDN | PIKKNTPQGF | KGSSFKTVEV | .NRKEQVALI |
| Lm1 | KKIVILD8KV | NFGGHDCMET | PIKKHVELGF | QPSSFVPIDV | KNRKQHVALL |
| Pmi | QKIVILD8RE | DYMGKQSMYS | FIESHLPGF | NEYDYIPDSF | .DRETATALI |
| Ppy | QKIIIMD8KT | DYQGPQSMYT | FVTSHLPPGF | NEYDFVPESF | .DRDKTIALI |
| Lno | QKIVILD8RE | DYMGKQSMYS | FIESHLPGF | NEYDYIPDSF | .DRETATALI |
| Ppe1 | KKIIIIDGKK | DYLGYQSMQS | PMKEHVPANF | NVSAFKPLSF | .DLDR.VACI |
| Phg | QKLLIIDSMQ | DIGGIECVHS | FVSRYTDHF | DPLKFVPLDF | .DPREQVALI |
| GR | KRIIILDAVE | NIHGCESLPN | FISRYSDGNI A.. | NPKPLHY | .DPVBQVAII |
| YG | KRIIILDTVE | NIHGCESLPN | FISRYSDGNI A.. | NPKPLHY | .DPVBQVAII |
| Ppe2 | ETIIIIDLNE | DLGGYQCLNN | FISQNSDINL | DVKFKPNSF | .NRDDQVALV |

49-7C6 Y

| | | | | |
|---------|---|---|---|----|
| 78-0B10 | | S | Y | |
| 90-1B5 | | S | Y | I |
| 133-1B2 | D | S | Y | I |
| 146-1H2 | | S | Y | SI |

Cons ----I-D---- ---G---- F----- -----A--

201 250

| | | | | | |
|------|------------|-------------|------------|------------|------------|
| Lcr | MNSSGSTGLP | KGVQLTHEENT | VTRFSHARDP | IYGNQVSPGT | AVLTVVPFHH |
| Lla | MNSSGSTGLP | KGVQLTHENA | VTRFSHARDP | IYGNQVSPGT | AILTVVPFH |
| Lm1 | MNSSGSTGLP | KGVRITHEGA | VTRFSHAKDP | IYGNQVSPGT | AILTVVPFH |
| Pmi | MNSSGSTGLP | KGVDLTHMV | CVRFSHCRDP | VPGNQIIPDT | AILTVIPFH |
| Ppy | MNSSGSTGLP | KGVALPHRTA | CVRFSHARDP | IYGNQIIPDT | AILSVVPFH |
| Lno | MNSSGSTGLP | KGVBLTHQNV | CVRFSHCRDP | VPGNQIIPDT | AILTVIPFH |
| Ppe1 | MNSSGSTGLP | KGVPISHRNT | IYRFSHCRDP | VPGNQIIPDT | TILCAVPFH |
| Phg | MTSSGTTGLP | KGVMLTHRNI | CVRFVHSRDP | LFGTRFIPET | SILSLVPFH |
| GR | LCSSGTTGLP | KGVMQTHRNV | CVRLIHALDP | RVTQLIPGV | TVLVYLPFFF |
| YG | LCSSGTTGLP | KGVMQTHQNI | CVRLIHALDP | RAGTQLIPGV | TVLVYLPFFF |
| Ppe2 | MFSSGTTGVS | KGVMLTHKNI | VARFSHCKDP | TFGNAINPTT | AILTVIPFH |

49-7C6 LA

| | | | |
|---------|----|----|---|
| 78-0B10 | P | LA | |
| 90-1B5 | LP | LA | |
| 133-1B2 | LP | IA | S |
| 146-1H2 | LP | IA | S |

Cons --SSG-TG-- KGV---H--- --R--H--DP --G----P-- --L---PF-H

251 300

| | | | | | |
|------|-------------|------------|------------|------------|------------|
| Lcr | GPGMFTTLGY | LICGFRVVML | TKFDEETFLK | TLQDYKCTSV | ILVPTLFAIL |
| Lla | GPGMFTTLGY | LTCGFRIVML | TKFDEETFLK | TLQDYKCSV | ILVPTLFAIL |
| Lm1 | GPGMFTTLGY | FACGYRVVML | TKFDEELFLR | TLQDYKCTSV | ILVPTLFAIL |
| Pmi | VPGMFTTLGY | LTCGFRIVLM | YRFEEELFLR | SLQDYKIQSA | LLVPTLFSFF |
| Ppy | GPGMFTTLGY | LICGFRVVLM | YRFEEELFLR | SLQDYKIQSA | LLVPTLFSFF |
| Lno | GPGMFTTLGY | LTCGFRIVLM | YRFEEELFLR | SLQDYKIQSA | LLVPTLFSFF |
| Ppe1 | AFGFTFTNLGY | LICGFRVVLM | YRFNEHFLQ | TLQDYKCQSA | LLVPTVLAFL |
| Phg | AFGMFTTLSY | FIVGLKIVMM | KRFDGELFLK | TIQNYKIPTI | VIAPPVMVFL |
| GR | AFGFSINLGY | FMVGLRVIML | RRFDQEAFLK | AIQDYEVRSV | INVPAIILFL |
| YG | AFGFSINLGY | FMVGLRVIML | RRFDQEAFLK | AIQDYEVRSV | INVPAIILFL |
| Ppe2 | GPGMFTTLGY | FTCGFRVALM | HTFEEKLFLQ | SLQDYKVEST | LLVPTLMAFF |

49-7C6 M V L

| | | | |
|---------|---|---|---|
| 78-0B10 | M | V | L |
| 90-1B5 | M | V | L |
| 133-1B2 | M | V | L |
| 146-1H2 | M | V | L |

Cons -F----L-Y ---G---- --F----FL- --Q-Y---- --P----

FIG. 19A (Fortsetzung)

301

| | | |
|------|---------------------------------------------------------|-----|
| Lcr | NKSELINKYD LSNLVEIASG GAPLSKEVGE AVARRPNLPG VRQGYGLTET | 350 |
| Lla | NRSELIDKYD LSNLVEIASG GAPLSKEIGE AVARRPNLPG VRQGYGLTET | |
| Lmi | NKSELIDKPD LSNLTEIASG GAPLAKEVGE AVARRPNLPG VRQGYGLTET | |
| Pmi | AKSTLVDKYD LSNLHRIASG GAPLAKEVGE AVAKRFLPLPG IRQGYGLTET | |
| Ppy | AKSTLIDKYD LSNLHRIASG GAPLSKEVGE AVAKRFLPLPG IRQGYGLTET | |
| Lno | AKSTLVDKYD LSNLHRIASG GAPLAKEVGE AVAKRFLPLPG IRQGYGLTET | |
| Ppe1 | AKNPLVDKYD LSNLHRIASG GAPLSKEISE IAAKRFKLPG IRQGYGLTET | |
| Phg | AKSHLVDKYD LSSIKELATG GAPLGPALAN AVAKRLKLGG IIQGYGLTET | |
| GR | SKSPLVDKYD LSSLRELCCG AAPLAKEVAR IAVKRLNLPG IRCGFGLTES | |
| YG | SKSPLVDKYD LSSLRELCCG AAPLAKEVAR VAVKRLNLPG IRCGFGLTES | |
| Ppe2 | AKSALVEKYD LSHLKEIASG GAPLSKEIGE MVKIRFKLNF VRQGYGLTET | |

49-7C6

78-0B10

90-1B5

133-1B2

146-1H2

Cons ----L--K-D LS---E---G -APL----- -----R--L-- ---G-GLTE-

351

| | | |
|------|---------------------------------------------------------|-----|
| Lcr | TSAIITPEG DDKPGASGKV VPLFKAKVID LDTKKSLGPN RRGEVCVKGP | 400 |
| Lla | TSAIITPEG DDKPGASGKV VPLFKAKVID LDTKKTLGPN RRGEVCVKGP | |
| Lmi | TSAPIITPEG DDKPGASGKV VPLFKVKVID LDTKKTLGVN RRGEICVKGP | |
| Pmi | TSAIITPEG DDKPGACGKV VPFFTAKIVD LDTGKTLGVN QRGEILCVKGP | |
| Ppy | TSAILITPEG DDKPGAVGKV VPPFEAKVVD LDTGKTLGVN QRGEILCVRGP | |
| Lno | TSAIITPEG DDKPGACGKV VPPFSAKIVD LDTGKTLGVN QRGEILCVKGP | |
| Ppe1 | TCAIVITTAEG EFKLGAVGKV VPFFSLKVLD LNTGKKLGPN ERGEICFKGP | |
| Phg | CCAVLITPHN KIKTGSTGQV LPYVTAKIVD TKTGKNLGPN QTGEILCFKSD | |
| GR | TSANIHSLRD EFKSGSLGRV TPLMAAKIAD RETGKALGPN QVGELCIKGP | |
| YG | TSANIHSLGD EFKSGSLGRV TPLMAAKIAD RETGKALGPN QVGELCVKGP | |
| Ppe2 | TSAVLITPDT DVRPGSTGKI VPFHAVKVVD PTGKILGPN ETGELYFKGD | |

49-7C6 NN P

78-0B10 KG A P A

90-1B5 KG AK P P

133-1B2 KG AK P P

146-1H2 KG AK L P P

Cons --A----- ---G--G--- -P----K--D --T-K-LG-N --GE-----

401

| | | |
|------|---------------------------------------------------------|-----|
| Lcr | MLMKGYVNNP EATKELIDEE GWLHTGDIGY YDEERHFFIV DRLKSLIKYK | 450 |
| Lla | MLMKGYVDNP EATREIIDEE GWLHTGDIGY YDEERHFFIV DRLKSLIKYK | |
| Lmi | SMLGYSNNP EATRETIIDEE GWLHTGDIGY YDEDEHFFIV DRLKSLIKYK | |
| Pmi | MIMKGYVNNP EATNALIDKD GWLHSGDIAY YDKDGHFFIV DRLKSLIKYK | |
| Ppy | MIMSGYVNNP EATNALIDKD GWLHSGDIAY WDEDEHFFIV DRLKSLIKYK | |
| Lno | MIMKGYVNNP EATSALIDKD GWLHSGDIAY YDKDGHFFIV DRLKSLIKYK | |
| Ppe1 | MIMKGYINNP EATRELIIDEE GWIHSGDIGY FDEDGHVFIV DRLKSLIKYK | |
| Phg | IIMKGYYQNE ETRLVIDKD GWLHSGDIGY YDTDGNFHV DRLKELIKYK | |
| GR | MVSKGYVNNV EATKEAIDDD GWLHSGDFGY YDEDEHFYVV DRYKELIKYK | |
| YG | MVSKGYVNNV EATKEAIDDD GWLHSGDFGY YDEDEHFYVV DRYKELIKYK | |
| Ppe2 | MIMKSYYNNE EATKAIINKD GWLRSGDIAY YDNDGHFYIV DRLKSLIKYK | |

49-7C6 G

78-0B10 G DN

90-1B5 G DN

133-1B2 G DN

146-1H2 G DN

Cons -----Y--N- E-T---I--- GW---GD--Y -D-----V DR-K-LIKYK

FIG. 19A (Fortsetzung)

451 500

| | |
|------|----------------------------------------------------------|
| Lcr | GYQVPPAEL E SVLLQHPSIF DAGVAGVPDP VAGELPGAVV VLESGKMMTE |
| Lla | GYQVPPAEL E SVLLQHPNIF DAGVAGVPDP IAGELPGAVV VLEKGKMMTE |
| Lmi | GYQVPPAEL E SVLLQHPNIF DAGVAGVPDP DAGELPGAVV VMERGKMMTE |
| Pmi | GYQVPPAEL E SILLQHPFIF DAGVAGIPDP DAGELPAAVV VLEEGKMMTE |
| Ppy | GYQVAPAAEL E SILLQHPNIF DAGVAGLPDD DAGELPAAVV VLEEGKMMTE |
| Lno | GYQVPPAEL E SILLQHPFIF DAGVAGIPDP DAGELPAAVV VLEEGKMMTE |
| Ppe1 | GYQVPPAEL E ALLLQHPFIE DAGVAGVPDE VAGDLPGAVV VLKBGKSITE |
| Phg | AYQVAPAAEL E ALLLQHPYIA DAGVTGIPDE EAGELPAACV VLEPGKMMTE |
| GR | GSQVAPAAEL E IILLKNPCIR DVAVVGIPDL EAGELPSAFV VIQPGKEITA |
| YG | GSQVAPAAEL E IILLKNPCIR DVAVVGIPDL EAGELPSAFV VKQPGKEITA |
| Ppe2 | GYQVAPAAEL E GILLQHPYIV DAGVTGIPDE AAGELPAAGV VVQTGKYLNE |

49-7C6

78-0B10

90-1B5

133-1B2

146-1H2

Cons --QV-PAE-E --LL--P-I- D--V-G-PD- -AG-LP-A-V V---GK---

501 550

| | |
|------|---------------------------------------------------------|
| Lcr | KEVMDYVASQ VSNAKRLRGG VRPVDEVPKG LTGKIDGRA. IREILKKPV. |
| Lla | KEVMDYVASQ VSNAKRLRGG VRPVDEVPKG LTGKIDGKA. IREILKKPV. |
| Lmi | KEIVDYVNSQ VVNHKRLRGG VRPVDEVPKG LTGKIDAKV. IREILKKPQ. |
| Pmi | QEVMDYVAGQ VTASKRLRGG VKPVDEVPKG LTGKIDSRK. IREILTMGQK |
| Ppy | KEIVDYVASQ VTTAKLRGG VVFVDEVPKG LTGKLDARK. IREILIKAKK |
| Lno | QEVMDYVAGQ VTASKRLRGG VKPVDEVPKG LTGKIDGRK. IREILMMGKK |
| Ppe1 | KEIQDYVAGQ VTSSKLRGG VRPVKEVPKG FTGKIDTRK. IKEILIKAQK |
| Phg | KEVMDYLAER VTPTKRLRGG VLFVNINIPKG ATGKLVRTE. LRRLLTQRA. |
| GR | KEVVDYLAER VSHTKYLRRGG VRFVDSIPRN VTGKITRREL LKQLLEKS.. |
| YG | KEVVDYLAER VSHTKYLRRGG VRFVDSIPRN VTGKITRREL LKQLLEKS.. |
| Ppe2 | QIVQNFVSSQ VSTAKWLRGG VKFLDEIPKG STGKIDRKV. LRQMFEKH.. |

49-7C6

78-0B10 D

90-1B5 DY A

133-1B2 DY A

146-1H2 DY A

Cons ----- V---K-LRGG V-P----P-- -TGK----- -----

I

L

L

551

| | |
|---------|------------|
| Lcr |AKM |
| Lla |AKM |
| Lmi |AKM |
| Pmi |SKL |
| Ppy | G...GSKL |
| Lno |SKL |
| Ppe1 | GSKSKSKAKL |
| Phg |AKL |
| GR |SKL |
| YG |SKL |
| Ppe2 |KSCL |
| 49-7C6 | TNG* |
| 78-0B10 | TNG* |
| 90-1B5 | TNG* |
| 133-1B2 | TNG* |
| 146-1H2 | TNG* |

FIG. 19A (Fortsetzung)

| | | | |
|--------|-----------------------------------|------------|----------------------------|
| Lcr: | <i>Luciola cruciata</i> | Phg: | <i>Phengodes</i> sp. |
| Lla: | <i>Luciola lateralis</i> | Lmi: | <i>Luciola mingrellica</i> |
| Gr: | <i>Pyrophorus plagiophthalmus</i> | (grün) | |
| YG: | <i>Pyrophorus plagiophthalmus</i> | (gelbgrün) | |
| Pmi: | <i>Pyrocoelia miyako</i> | Ppy: | <i>Photinus pyralis</i> |
| Lno: | <i>Lampyris noctiluca</i> | | |
| Ppe-2: | <i>Photuris pennsylvanica</i> (2) | | |
| Ppe-1: | <i>Photuris pennsylvanica</i> (1) | | |
| Cons: | Streng konservierte Positionen | | |

FIG. 19A (Fortsetzung)

1

50

| | | | | | |
|---------|------------|---------------------------|------------|-------------|------------|
| Lcr | MENMENDE.N | IVVGPKPFYP | IIEGSAGTQL | RKYMYERYAKL | .GAIAPTN |
| Lla | MENMENDE.N | IVYGPEPFYP | IIEGSAGAQL | RKYMHDYRAKL | .GAIAPTNAL |
| Lmi | ME.MEKRB.N | VVYGPLPFYP | IIEGSAGIQL | RKYMHQYAKL | .GAIAPSNAL |
| Pmi | ...MEDDSKH | IMHGHRHSIL | WEDGTAGEQL | HKAMKRYAQV | PGTIAFTDAH |
| Ppy | ...MED.AKN | IKKGPAFFYP | LEDGTAGEQL | HKAMKRYALV | PGTIAFTDAH |
| Lno | ...MED.AKN | IMHGPAFFYP | LEDGTAGEQL | HKAMKRYAQV | PGTIAFTDAH |
| Ppe1 | ...MSI.ENN | ILIGPPPYYP | LEEGTAGEQL | HRAISRYAAV | PGTLAYTDVH |
| Ppe2 | ...MED..KN | ILYGPEPFYP | LADGTAGEQM | FYALSRYADI | SGCIALTNAH |
| Phg | MIKME..EEH | VMPGAMPRDL | LFEGTAGQQL | HRALYKHSYF | PE..AIVDSH |
| GR | ...MMKREKN | VVYGPPEPLHP | LEDLTAGEML | FRALRKHSHL | PQ..ALVDVY |
| YG | ...MMKREKN | VIYGPEPLHP | LEDLTAGEML | FRALRKHSHL | PQ..ALVDVF |
| 30-4B02 | ...MMKREKN | VIYGPEPLHP | LEDLTAGEML | FRALRKHSHL | PQ..ALVDVV |
| 81-6G01 | ...MMKREKN | VIYGPEPLHP | LEDLTAGEML | FRALRKHSHL | PQ..ALVDVV |
| Cons | --- | M-----G-----AG-----A----- | | | |

51

100

| | | | | | |
|---------|------------------------------------------|-------------|------------|------------|------------|
| Lcr | TGVDYSYAEY | LEKSCLLGKA | LQNYGLVVDG | RIALCSENCE | EFFIPVIAGL |
| Lla | TGVDYTYAEY | LEKSCLLGEA | LQNYGLVVDG | RIALCSENCE | EFFIPVLAGL |
| Lmi | TGVDISYQEY | FDITCRLARA | MKNPGMKPER | HIALCSENCE | EFFIPVLAGL |
| Pmi | AEVNITYSEY | FEMSCRLAET | MKRYGLGLQH | HIAVCSETSL | QFFMPVCGAL |
| Ppy | IEVNITYAEY | FEMSVRLAEA | MKRYGLNTNR | RIVVCSENSL | QFFMPVLGAL |
| Lno | AEVNITYSEY | FEMACRLAET | MKRYGLGLQH | HIAVCSENSL | QFFMPVCGAL |
| Ppe1 | TELEVITYKEF | LDVTCRLAEA | MKNYGLGLQH | TISVCSENCV | QFFMPICAAL |
| Ppe2 | TKENVLYEEF | LKLSCRLLAES | FKKYGLKQND | TIAVCSENGL | QFFLPLIASL |
| Phg | THEIIISYAKI | LDMSCRLAVS | FQKYGLTQNN | IIGICSENNL | NFFNPVIAAF |
| GR | GEEWISYKEF | FETTCLLAQS | LHNCGYKMSD | VVSICAENN | RFFVPIIAAW |
| YG | GDESLSYKEF | FEATCLLAQS | LHNCGYKMND | VVSICAENN | RFFIPVIAAW |
| 30-4B02 | GDESLSYKEF | FEATVLLAQS | LHNCGYKMND | VVSICAENN | RFFIPVIAAW |
| 81-6G01 | GDESLSYKEF | FEATVLLAQS | LHNCGYKMND | VVSICAENN | RFFIPVIAAW |
| Cons | -----Y-----L-----G-----C-E--- -FP-P----- | | | | |

101

150

| | | | | | |
|---------|-----------------------------------|-------------|------------|-------------|------------|
| Lcr | FIGVGVAPTN | EIYTLRELVH | SLG1SKPTIV | FSSKGLDKV | ITVQKTVTI |
| Lla | FIGVGVAPTN | EIYTLRELVH | SLG1SKPTIV | FSSKGLDKV | ITVQKTVTI |
| Lmi | YIGVAVAPTN | EIYTLRELNH | SLG1AQPTIV | FSSRKGLPKV | LEVQKTVTCI |
| Pmi | FIGVGVAPTN | DIYNEREELYN | SLF1SQPTIV | FCSKRALQKI | LGVQKKLPVI |
| Ppy | FIGVAVAPAN | DIYNEREELLN | SMN1SQPTVV | FVSKGLQKI | LNVQKKLPPI |
| Lno | FIGVGVASTN | DIYNEREELYN | SLS1SQPTIV | SCSKRALQKI | LGVQKKLPPI |
| Ppe1 | YVGVATAPTN | DIYNEREELYN | SLS1SQPTVV | PTSRNSLQKI | LGVQSRLPPI |
| Ppe2 | YLGIIAAPVS | DKYIERELIH | SLGIVKPRII | FCSKNTFPQKV | LNVKS8KLKV |
| Phg | YLGITVATVN | DTYTDRELSE | TLNITKPQML | FCSKQSLPIV | MKTMK1MPYV |
| GR | YIGMIVAPVN | EGYIPDELCK | VMG18RPQLV | FCTKNILNKV | LEVQSRTDFI |
| YG | YIGMIVAPVN | ESYIPDELCK | VMG1SKPQIV | FCTKNILNKV | LEVQSRTNF |
| 30-4B02 | YIGMIVAPVN | ESYIPDELCK | VMG1SKPQIV | FCTKNILNKV | LEVQSRTNF |
| 81-6G01 | YIGMIVAPVN | ESYIPDELCK | VMG1SKPQIV | FCTKNILNKV | LEVQSRTNF |
| Cons | --G---A--- --Y---EL--- --I---P--- | | | | |

FIG. 19B

151

200

| | |
|---------|----------------------------------------------------------|
| Lcr | KTIVILD SKV DYRGYQCLDT FIKRNTPPGP QASSPKTVEV .DRKEQVALI |
| Lla | KTIVILD SKV DYRGYQSMDN FIKKNTPQGP KGSSPKTVEV .NRKEQVALI |
| Lmi | KKIVILD SKV NFGGHDCMFT FIKKHVELGF QPSSFPVIDV KNRKQHVALL |
| Pmi | QKIVILDSRE DYM GKQSMYS FIESHLPAGF NEYDYIPDSF .DRETATALI |
| Ppy | QKIIIMDSKT DYQGFQSMYT FVTSHLPPGP NEYDFVPESF .DRDKTIALI |
| Lno | QKIVILDSRE DYM GKQSMYS FIESHLPAGF NEYDYIPDSF .DRETATALI |
| Ppe1 | KKIII LDGKK DYLGYQSMQS FMKBEHVPANF NVSAFKPLSF .DLDR.VACI |
| Ppe2 | ETIII ILDLNE DLGGYQCLNN FISQNSDINL DVKKFKPNSF .NRDDQVALV |
| Phg | QKLLI IDSMQ DIGGIECVHS FVSRYTDEHF DPLKPVPLDF .DPREQVALI |
| GR | KRIII ILDAVE NIHGCESLPN FISRYSDGNI A..NPKPLHY .DPVEQVAII |
| YG | KRIII ILDTVE NIHGCESLPN FISRYSDGNI A..NPKPLHY .DPVEQVAII |
| 30-4B02 | KRIII ILDTVE NIHGCESLPN FISRYSDGNI A..NPKPLHY .DPVEQVAII |
| 81-6G01 | KRIII ILDTVE NIHGCESLPN FISRYSDGNI A..NPKPLHY .DPVEQVAII |
| Cons | ---I-D--- G----- F----- A-- |

201

250

| | |
|---------|----------------------------------------------------------|
| Lcr | MNSSGSTGLP KGVQLTHENT VTRFSHARDP IYGNQVSPGT AVLTVVPFH |
| Lla | MNSSGSTGLP KGVQLTHENA VTRFSHARDP IYGNQVSPGT AILTVPFH |
| Lmi | MNSSGSTGLP KGVRIITHBGA VTRFSHAKDP IYGNQVSPGT AILTVPFH |
| Pmi | MNSSGSTGLP KGVDLTHMV CVRFSHCRDP VFGNQIIPDT AILTVPFH |
| Ppy | MNSSGSTGLP KGVALPHRTA CVRFSHARDP IFGNQIIPDT AILSVVPFH |
| Lno | MNSSGSTGLP KGVELTHQNV CVRFSHCRDP VFGNQIIPDT AILTVPFH |
| Ppe1 | MNSSGSTGLP KGVPISHRNT IYRFSHCRDP VFGNQIIPDT TILCAVPPFH |
| Ppe2 | MNSSGSTTGVS KGVMLTHRNI VARFSHCKDP TFGNAINPTT AILTVPFH |
| Phg | MTSSGSTGLP KGVMLTHRNI CVRFVHSRDP LFGTRFIPET SILSLVPPFH |
| GR | LCSSGSTTGGLP KGVMQTHRNV CVRLIHALDP RAGTQLIPGV TVLVYLPPFH |
| YG | LCSSGSTTGGLP KGVMQTHQNI CVRLIHALDP RAGTQLIPGV TVLVYLPPFH |
| 30-4B02 | LCSSGSTTGGLP KGVMQTHQNI CVRLIHALDP RAGTQLIPGV TVLVYLPPFH |
| 81-6G01 | LCSSGSTTGGLP KGVMQTHQNI CVRLIHALDP RAGTQLIPGV TVLVYLPPFH |
| Cons | --SSG-TG-- KGV---H--- --R--H--DP --G---P-- --L---PF-H |

251

300

| | |
|---------|--------------------------------------------------------|
| Lcr | GFGMFTTLGY LICGFRVVML TKPDEETPLK TLQDYKCTSV ILVPTLFAIL |
| Lla | GFGMFTTLGY LTCGFRIVML TKFDEETFLK TLQDYKCSV ILVPTLFAIL |
| Lmi | GFGMFTTLGY FACGYRVVML TKPDEELFLR TLQDYKCTSV ILVPTLFAIL |
| Pmi | VFQMFTTLGY LTCGFRIVLM YRFEELFLR SLQDYKIQSA LLVPTLFSFF |
| Ppy | GFGMFTTLGY LICGFRVVLM YRFEELFLR SLQDYKIQSA LLVPTLFSFF |
| Lno | GFGMFTTLGY LTCGFRIVLM YRFEELFLR SLQDYKIQSA LLVPTLFSFF |
| Ppe1 | AFGFTFNLGY LICGFRVVLM YRFNEHLFLQ TLQDYKCQSA LLVPTVIAFL |
| Ppe2 | GFGMFTTLGY FTCGFRVALM HTFEELFLR SLQDYKVEST LLVPTLMAFF |
| Phg | AFGMFTTSLY FIVGLKIVMM KRFDGEFLK TIQNYKIPTI VIAPPVMFL |
| GR | AFGFSINLGY FMVGLRVIML RRFDQEAFLK AIQDYEVRSV INVPAIILFL |
| YG | AFGFSINLGY FMVGLRVIML RRFDQEAFLK AIQDYEVRSV INVPAIILFL |
| 30-4B02 | AFGFSINLGY FMVGLRVIML RRFDQEAFLK AIQDYEVRSV INVPAIILFL |
| 81-6G01 | AFGFSITLGY FMVGLRVIMF RRFDQEAFLK AIQDYEVRSV INVPSVILFL |
| Cons | -F----L-Y ---G----- F----FL- --Q-Y----- P----- |

FIG. 19B (Fortsetzung)

301

350

| | |
|---------|--------------------------------------------------------|
| Lcr | NKSELLNKYD LSNLVEIASG GAPLSKEVGE AVARRFNLPG VRQGYGLTET |
| Lla | NRSELLDKYD LSNLVEIASG GAPLSKEIGE AVARRFNLPG VRQGYGLTET |
| Lmi | NKSELIDKFD LSNLTEIASG GAPLAKEVGE AVARRFNLPG VRQGYGLTET |
| Pmi | AKSTLVDKYD LSNLHEIASG GAPLAKEVGE AVAKRFLPG IRQGYGLTET |
| Ppy | AKSTLIDKYD LSNLHEIASG GAPLSKEVGE AVAKRFLPG IRQGYGLTET |
| Lno | AKSTLVDKYD LSNLHEIASG GAPLAKEVGE AVAKRFLPG IRQGYGLTET |
| Ppe1 | AKNPLVDKYD LSNLHEIASG GAPLSKEIIS EAAKRFKLPG IRQGYGLTET |
| Ppe2 | AKSALVEKYD LSHLKEIASG GAPLSKEIGE MVKKRFKLFN VRQGYGLTET |
| Phg | AKSHLVDKYD LSSIKEIATG GAPLGPALAN AVAKRLKLGG IIQGYGLTET |
| GR | SKSPLVDKYD LSSLRELCCG AAPLAKEVAE IAVKRNLPG IRCGFGLTES |
| YG | SKSPLVDKYD LSSLRELCCG AAPLAKEVAE VAVKRNLPG IRCGFGLTES |
| 30-4B02 | SKSPLVDKYD LSSLRELCCG AAPLAKEVAE VAAKRLNLPG IRCGFGLTES |
| 81-6G01 | SKSPLVDKYD LSSLRELCCG AAPLAKEVAE VAAKRLNLPG IRCGFGLTES |
| Cons | ----L--K-D LS---E---G -APL----- R--L-- G-GLTE- |

351

400

| | |
|---------|----------------------------------------------------------|
| Lcr | TSALIIITPEG DDKPGASGKV VPLPKAKVID LDTKSLGP N RRGEVCVKGP |
| Lla | TSALIIITPEG DDKPGASGKV VPLPKAKVID LDTKSLGP N RRGEVCVKGP |
| Lmi | TSALIIITPEG DDKPGASGKV VPLPKAKVID LDTKSLGP N RRGEVCVKGP |
| Pmi | TSALIIITPEG DDKPGACGKV VPFPTAKIVD LDTGKTLGVN QRGECLCVKGP |
| Ppy | TSAILITPEG DDKPGAVGKV VPFFPEAKVVD LDTGKTLGVN QRGECLCVRGP |
| Lno | TSALIIITPEG DDKPGACGKV VPPPSAKIVD LDTGKTLGVN QRGECLCVKGP |
| Ppe1 | TCAIVITABG EFKLGAVGKV VPFYSLKVL D LDTGKTLGVN ERGECLCPKGP |
| Ppe2 | TSAVLITPDT DVPGSTGKI VPFHAVKVV PTTGKILGP ETGELYFKGD |
| Phg | CCAVLITPEN KIKTGSTGQV LPYVTAKIVD TRTGKNLGP QTGECLCFKSD |
| GR | TSANIHSLRD EFKSGSLGRV TPLMAAKIAD RETGKALGP QVGELCIKGP |
| YG | TSANIHSLGD EFKSGSLGRV TPLMAAKIAD RETGKALGP QVGELCVKGP |
| 30-4B02 | TSANIHSLRD EFKSGSIGRV TPLMAAKIAD RETGKALGP QVGELCIKGP |
| 81-6G01 | TSANIHSLRD EFKSGSLGRV TPLMAAKIAD RETGKALGP QVGELCIKGP |
| Cons | --A----- G-G- -P---K--D --T-K-LG-N --GE----- |

401

450

| | |
|---------|--------------------------------------------------------|
| Lcr | MIMKGYVNPN EATKELIDE GWLHTGDIG YDEEKHFFIV DRLKSLIKYK |
| Lla | MIMKGYVDNP EATREIIDE GWLHTGDIG YDEEKHFFIV DRLKSLIKYK |
| Lmi | SLMLGYSNNP EATRETIIDE GWLHTGDIG YDEDEEHFFIV DRLKSLIKYK |
| Pmi | MIMKGYVNPN EATNALIDKD GWLHSGDIAY YDKDGHFFIV DRLKSLIKYK |
| Ppy | MIMSGYVNPN EATNALIDKD GWLHSGDIAY WDEDEHFFIV DRLKSLIKYK |
| Lno | MIMKGYVNPN EATSALIDKD GWLHSGDIAY YDKDGHFFIV DRLKSLIKYK |
| Ppe1 | MIMKGYINNP EATRELIIDE GWLHSGDIY FDEDGHVYIV DRLKSLIKYK |
| Ppe2 | MIMKSYNNB EATKAIINKD GWLRSGDIAY YDNDGHFYIV DRLKSLIKYK |
| Phg | IIMKGYYQNE BETRLVIDKD GWLHSGDIG YDTDGNFHIV DRLKELIKYK |
| GR | MVKSGYVNPN EATKEAIDDD GWLHSGDFGY YDEDEHFYVV DRYKELIKYK |
| YG | MVKSGYVNPN EATKEAIDDD GWLHSGDFGY YDEDEHFYVV DRYKELIKYK |
| 30-4B02 | MVKSGYVNPN EATKEAIDDD GWLHSGDFGY YDEDEHFYVV DRYKELIKYK |
| 81-6G01 | MVKSGYVNPN EATKEAIDDD GWLHSGDFGY YDEDEHFYVV DRYKELIKYK |
| Cons | ----Y--N- E-T---I--- GW---GD--Y -D-----V DR-K-LIKYK |

FIG. 19B (Fortsetzung)

451**500**

| | |
|----------------|----------------------------------------------------------------|
| Lcr | GYQVPPAEL E SVLLQHPSIF DAGVAGVPDP VAGELPGAVV VLESGKNMTE |
| Lla | GYQVPPAEL E SVLLQHPNIF DAGVAGVPDP IAGELPGAVV VLEKGKSMTB |
| Lni | GYQVPPAEL E SVLLQHPNIF DAGVAGVPDP DAGELPGAVV VMEKGKTMTE |
| Pmi | GYQVPPAEL S ILLQHPIF DAGVAGIPDP DAGELPAAVV VLEBGKMMTE |
| Ppy | GYQVAPAELE S ILLQHPNIF DAGVAGLPDD DAGELPAAVV VLEHGKTMTE |
| Lno | GYQVPPAEL S ILLQHPIF DAGVAGIPDP DAGELPAAVV VLEBGKTMTE |
| Ppe1 | GYQVPPAEL ALLLQHPFIE DAGVAGVPDE VAGELPGAVV VLKEGKSITB |
| Ppe2 | GYQVAPAEIE GILLQHPYIV DAGVTGIPDE AAGELPAAGV VVQTGKYLN |
| Phg | AYQVAPAELE ALLLQHPYIA DAGVTGIPDE EAGELPAACV VLEPGKTMTE |
| GR | GSQVAPAELE EILLKNPCIR DVAVVGIPDL EAGELPSAFV VIQPGKEITA |
| YG | GSQVAPAELE EILLKNPCIR DVAVVGIPDL EAGELPSAFV VKQPGKEITA |
| 30-4B02 | GSQVAPAELE EILLTNP CIR DVAVVGIPDL EAGELPSAFV VKQPGKEITA |
| 81-6G01 | GSQVAPAELE EILLKNPCIR DVAVVGIPDL EAGELPSAFV VKQPGKEITA |
| Cons | --QV-PAE-B --LL--P-I- D--V-G-PD- -AG-LP-A-V V---GK--- |

501**550**

| | |
|----------------|----------------------------------------------------------------|
| Lcr | KEVMDYVASQ VSNAKRLRGG VRPVDEVPKG LTGKIDGRA. IREILKKPV. |
| Lla | KEVMDYVASQ VSNAKRLRGG VRPVDEVPKG LTGKIDGKA. IREILKKPV. |
| Lni | KEIVDYVNSQ VVNHKRLRGG VRPVDEVPKG LTGKIDARV. IREILKKPQ. |
| Pmi | QEVMMDYVAGQ VTASKRLRGG VKFVDEVPKG LTGKIDSRK. IREILTMQK |
| Ppy | KEIVDYVASQ VTTAKKLRRGG VVPVDEVPKG LTGKILDARK. IREILIKAKK |
| Lno | QEVMMDYVAGQ VTASKRLRGG VKFVDEVPKG LTGKIDGRK. IREILMMGKK |
| Ppe1 | KEIQDYVAGQ VTSSKKLRGG VFVFKEVPKG FTGKIDTRK. IKEILIKAQK |
| Ppe2 | QIVQNPFVSSQ VSTAKWLRGG VKFLDEIPKG STGKIDRKV. LRQMPEKH.. |
| Phg | KEVMDYIAER VTPTKRLRGG VLTVNNIPKG ATGKIVRTE. LRRLLTQRA. |
| GR | KEVVDYLAER VSHTKYLRRGG VRFDVSIPRN VTGKITRREL LKQLLEKS.. |
| YG | KEVVDYLAER VSHTKYLRRGG VRFDVSIPRN VTGKITRREL LKQLLEKS.. |
| 30-4B02 | KEVVDYLAER VSHTKYLRRGG VRFDVSIPRN VTGKITRREL LKQLLEK... |
| 81-6G01 | KEVVDYLAER VSHTKYLRRGG VRFDVSIPRN VTGKITRREL LKQLLEK... |
| Cons | ----- V---K-LRGG V-F---P--- -TGK----- |

551

| | |
|----------------|-----------------|
| Lcr |AKM |
| Lla |AKM |
| Lni |AKM |
| Pmi |SKL |
| Ppy | G...GKSCL |
| Lno |SKL |
| Ppe1 | GKS SKAKL |
| Ppe2 |KSCL |
| Phg |AKL |
| GR |SKL |
| YG |SKL |
| 30-4B02 |AGG* |
| 81-6G01 |AGG* |
| Cons | -----K- |

FIG. 19B (Fortsetzung)

1**50**

| | |
|------|---------------------------------------------------------|
| Lcr | MENMENDE.N IVVGPKPFPYP IEEGSAGTQL RKYMDRYAKL .GAIAPTN |
| Lla | MENMENDE.N IVVGPPEPFYP IEEGSAGAQL RKYMDRYAKL .GAIAPTN |
| Lni | ME.MEKEE.N VVYGPLPFYP IEEGSAGIQL HKYMHQYAKL .GAIAPSN |
| Pmi | ...MEDDSKH IMHGHHRHSIL WEDGTAGEQL HKAMKRYAQV PGTIAFTDAH |
| Ppy | ...MED.AKN IKKGPAFFYP LEDGTAGEQL HKAMKRYALV PGTIAFTDAH |
| Lno | ...MED.AKN IMHGPAPPYP LEDGTAGEQL HKAMKRYAQV PGTIAFTDAH |
| Ppe1 | ...MSI.ENN ILIGPPPYYP LEETGTAGEQL HRAISRYAAV PGTLAYTDVH |
| Ppe2 | ...MED..KN ILYGPEPFYP LADGTAGEQM FYALSRYADI SGCIALTNAH |
| Phg | MIKME..KEH VMPGAMPRLD LFEGTAGQQL HRALYKHSYF PE..AIVDSH |
| YG | ...MMKREKN VIYGPEPLHP LEDLTAGEML FRALRKHSHL PQ..ALVDVF |
| | ---XXOOOOO XOO-OOOXO OOXO--OXO XOOXXXXOO OXOO-XXOOX |

51**100**

| | |
|------|---------------------------------------------------------|
| Lcr | TGVDYSYAEY LEKSCCLGKA LQNYGLVVDG RIALCSENCE KFFIPVIAGL |
| Lla | TGVDYTYAEY LEKSCCLGEA LKNYGLVVDG RIALCSENCE KFFIPVLAGL |
| Lni | TGVDISYQEY FDITCRLAKA MKNFGMKPEE HIALCSENCE KFFIPVLAGL |
| Pmi | AEVNITYSEY FEMSCRLAFT MKRYGLGLQH HIAVCSETSL QFFMPVCGAL |
| Ppy | IEVNITYAEY FEMSVRLAKA MKRYGLNTNH RIVVCSENLS QFFMPVILGAL |
| Lno | AEVNITYSEY FEMACRLAFT MKRYGLGLQH HIAVCSENLS QFFMPVCGAL |
| Ppe1 | TKLEVITYKEF LDVTCRЛАКА MKNYGLGLQH TISVCSENCS QFFMPICAAL |
| Ppe2 | TKENVLYKEF LKLSCRLAES FKYYGLKQND TIAVCSENGL QFFLPLIASL |
| Phg | THEIIISYAKI LDMSCRLAVS FKYYGLTONN IIGICSENNL NFFNPVIAAF |
| YG | GDESLSYKEF FEATCLLAQS LHNCGYKMND VVSICAENNk RFFIPIIAAW |
| | XOXOXX--X XOOXOXOOX- XXOX-XOOOO OXO-X-OX X--O-XOOX |

101**150**

| | |
|------|---------------------------------------------------------|
| Lcr | FIGVGVAPTN EIYTLRELVH SLGISKPTIV FSSSKGLDKV ITVQKTVTTI |
| Lla | FIGVGVAPTN EIYTLRELVH SLGISKPTIV FSSSKGLDKV ITVQKTVATI |
| Lni | YIGVAVAPTN EIYTLRELNH SLGIAQPTIV FSSRKGLPKV LEVQKTVTCI |
| Pmi | FIGVGVAPTN DIYNERELYN SLFISQPTIV FC8KRALQKI LGVQKKLPVI |
| Ppy | FIGVAVAPAN DIYNERELLN SMNISQPTVV FV8KGLQKI LNVQKKLPPII |
| Lno | FIGVGVASTN DIYNERELYN SLSISQPTIV SC8KRALQKI LGVQKKLPPII |
| Ppe1 | YVGVATAPTN DIYNERELYN SLSISQPTVV FT8RNSLQKI LGVQSRLPPII |
| Ppe2 | YLGIIAAPVS DKYIERELIH SLGIVKPRII FC8KNTFQKV LNVKSILKYV |
| Phg | YLGITVATVN DTETDRELSE TLNITKPQML FC8KQSLPIV M8TMKIMPYV |
| YG | YIGMIVAPVN ESYIPDELCK VMGISKPQIV FCTKNILNKV LEVQSRNFV |
| | XO-XOO-OXO XX-OX--OO XO-OX-XOO OOXOOOOXOO OOO-XOXOO |

FIG. 19C

151

200

| | |
|------|---------------------------------------------------------|
| Lcr | KTIVILD8KV DYRGYQCLDT FIKRNTPPGF QASSFKTVEV .DRKBQVALI |
| Lla | KTIVILD8KV DYRGYQEMDN PIKKNTPQGF KGSSFKTVEV .NRKEQVALI |
| Lmi | KKIVILD8KV NFGGHDCMET PIKKHVELGF QPSSFVPIDV KNRKQHVALL |
| Pmi | QKIVILD8RE DYM GKQSMYS FIESHLPGF NEYDYIPDSF .DRETATALI |
| Ppy | QKIIIMDSKT DYQGFQSMYT FVTSHLPPGF NEYDFVPESF .DRDKTLALI |
| Lno | QKIVILD8RE DYM GKQSMYS FIESHLPGF NEYDYIPDSF .DRETATALI |
| Ppe1 | KKIIILDGKK DYLGYQSMQS FMKEHVPANF NVSAFKPLSF .DLDR.VACI |
| Ppe2 | ETIIILDLN E DLGGYQCLNN FISQNSDINL DVKKFKPNMF .NRDDQVALV |
| Phg | QKLLIIDSMQ DIGGIECVHS FVSRYTDEHF DPLKFVPLDF .DPREQVALI |
| YG | KRIIILDTE V NIHGCESLPN FISRYSDGNI A..NFKPLHY .DPVEQVAI |
| | OXOX-O-XXO XXO-OXOXOO -OOOXOXOXX O--OOOOOXX -OXOOOO-XO |

201

250

| | |
|------|---------------------------------------------------------|
| Lcr | MNSSGSTGLP KGVQLTHENT VTRFSHARDP IYGNQVSPGT AVLTVVPFH |
| Lla | MNSSGSTGLP KGVQLTHENA VTRFSHARDP IYGNQVSPGT AILTVPFH |
| Lmi | MNSSGSTGLP KGVRIITHGA VTRFSHARDP IYGNQVSPGT AILTVPFH |
| Pmi | MNSSGSTGLP KGVDLTHMNV CVRFSHCRDP VFGNQIIPDT AILTVPFH |
| Ppy | MNSSGSTGLP KGVALPHRTA CVRFSHARDP IFGNQIIPDT AILSVVPFH |
| Lno | MNSSGSTGLP KGVLTHQNV CVRFSHCRDP VFGNQIIPDT AILTVPFH |
| Ppe1 | MNSSGSTGLP KGVPISHRNT IYRFSHCRDP VFGNQIIPDT TILCAVPFH |
| Ppe2 | MFSSGTTGVS KGVMITHONI VARFSHECKDP TFGNAINPTT AILTVPFH |
| Phg | MTSSGTTGLP KGVMITHONI CVRFVHSRDP LFGTRFIPET SISLVPFH |
| YG | LCSSGTTGLP KGVMQTHONI CVRLIHALDP RAGTQLIPGV TVLVYLPPFH |
| | XX---X---OO ---OXO-OOO OO-XX-OX-- OX-XOXO-OX XX-XXX--X- |

251

300

| | |
|------|---------------------------------------------------------|
| Lcr | GFGMFTTLGY LICGFRVVML TKFDEETFLK TLQDYKCTSV ILVPTLFAIL |
| Lla | GFGMFTTLGY LTCGFRIVML TKFDEETFLK TLQDYKCSV ILVPTLFAIL |
| Lmi | GFGMFTTLGY PACGYRVVML TKFDEELFLR TLQDYKCTBV ILVPTLFAIL |
| Pmi | VFQMFTTLGY LTCGFRIVLM YRFEEELFLR SLQDYKIQS A LLVPTLFSFF |
| Ppy | GFGMFTTLGY LICGFRVVLM YRFEEELFLR SLQDYKIQS A LLVPTLFSFF |
| Lno | GFGMFTTLGY LTCGFRIVLM YRFEEELFLR SLQDYKIQS A LLVPTLFSFF |
| Ppe1 | AFGFTFTNLGY LICGFRVVLM YRFNEHFLQ TLQDYKQS A LLVPTVLAFL |
| Ppe2 | GFGMFTTLGY FTCGFRVALM HTFEEKLFQ SLQDYKVEST LLVPTLMAPP |
| Phg | AFGFTFTLSY FIVGLKIVMM KRFDGEFLFK TIQNYKIPTI VIAPPVMVFL |
| YG | AFGFSINLGY FMVGLRVIML RRFDQEAFLK AIQDYEVRSV INVPAIILFL |
| | X-XXXXX-O- XOX-XOOXXX OO-OXOX--O XX-O-X0000 XXO-XXXOO |

FIG. 19C (Fortsetzung)

301

350

| | |
|------|---------------------------------------------------------|
| Lcr | NKSELINKYD LSNLVEIASG GAPLSKEVGE AVARRFNLPG VRQGYGLTET |
| Lla | NRSBLLDKYD LSNLVEIASG GAPLSKEIGE AVARRFNLPG VRQGYGLTET |
| Lmi | NKSELIDKFD LSNLTEIASG GAPLAKEVGE AVARRFNLPG VRQGYGLTET |
| Pmi | AKSTLVVDKYD LENLHEIASG GAPLAKEVGE AVAKRFLPG IRQGYGLTET |
| Ppy | AKSTLIDKFD LENLHEIASG GAPLSKEVGE AVAKRFLPG IRQGYGLTET |
| Lno | AKSTLVVDKYD LENLHEIASG GAPLAKEVGE AVAKRFLPG IRQGYGLTET |
| Ppe1 | AKNPLVVDKYD LENLHEIASG GAPLSKEISE LAAKRFLPG IRQGYGLTET |
| Ppe2 | AKSALVEKYD LSHLKRIASG GRPLSKEIGE MVKKRFLNP VRQGYGLTET |
| Phg | AKSHLVVDKYD LSSIKIATG GAPLGPALAN AVAKRFLGG IIQGYGLTET |
| YG | SKSPLVVDKYD LSSLRELCCG AAPLAKEVAE VAVKRLNLPG IRCGFGLTES |
| | X000-00-0- --X00-XXX- X---X000XO XXXO-XX-00 OOX-X----X |

351

400

| | |
|------|--------------------------------------------------------|
| Lcr | TSALIIITPEG DDKPGASGKV VPLPKAKVID LDTKSLGPN RRGEVCVKG |
| Lla | TSALIIITPEG DDKPGASGKV VPLPKAKVID LDTKETLGPN RRGEVCVKG |
| Lmi | TSAPIITPEG DDKPGASGKV VPLPKVKVID LDTKETLGVN RRGEICVKG |
| Pmi | TSALIIITPEG DDKPGACGKV VPFFTAKIVD LDTGKTLGVN QRGELCVKG |
| Ppy | TSAILITPEG DDKPGAVGKV VPFFBAKVV D LDTGKTLGVN QRGELCVRG |
| Lno | TSALIIITPEG DDKPGACGKV VPFFSAKIVD LDTGKTLGVN QRGELCVKG |
| Ppe1 | TCAIVITAEG EFKLGAVGKV VPFFSLKVL D LNTGKKLGPN ERGEICPKG |
| Ppe2 | TSAVLITPDT DVRPGSTGKI VPFHAVKVVD PTIGKILGPN ETGELYPKGD |
| Phg | CCAVLITPHN KIKTGSTGQV LPYVTAKIVD TKTGKMLGPN QTGELCFKSD |
| YG | TSANIHSLSGD EFKSGSLGRV TPLMAAKIAD RETGRALGPN QVGELCVKG |
| | OO-XXXXXX XXOX-XO-XO X-XXOO-XX- XX-O-X--O- OX--000000 |

401

450

| | |
|------|--------------------------------------------------------|
| Lcr | MIMKGYVNND EATKELIDEE GWLETGDIY YDKEKHFIV DRLKSLIKYK |
| Lla | MIMKGYVDNP EATREIIDEE GWLETGDIY YDKEKHFIV DRLKSLIKYK |
| Lmi | SIMLGYSNNP EATRETIIDEE GWLETGDIY YDKEKHFIV DRLKSLIKYK |
| Pmi | MIMKGYVNND EATNALIDKD GWLHSGDIAY YDKDGHFFIV DRLKSLIKYK |
| Ppy | MIMKGYVNND EATNALIDKD GWLHSGDIAY WDEDEHFFIV DRLKSLIKYK |
| Lno | MIMKGYVNND EATSALIDKD GWLHSGDIAY YDKDGHFFIV DRLKSLIKYK |
| Ppe1 | MIMKGYDNND EATRELIIDEE GWIESGDIY FDEDEHVFIV DRLKSLIKYK |
| Ppe2 | MIMKSYNNNE EATKAIINKD GWLRSGDIAY YDNDGHFFIV DRLKSLIKYK |
| Phg | IIMKGYYYQNE EETRLVIDKD GWLHSGDIY YDTDGNFHIV DRLKSLIKYK |
| YG | MVKSGYVNND EATKEAIDDD GWLHSGDFGY YDEDEHVFVV DRYKELIKYK |
| | OXXOO-00-X -O-0OX-0XO --000--XO- O-0OXOOXX- --X-X---- |

FIG. 19C (Fortsetzung)

451

500

| | |
|------|---------------------------------------------------------|
| Lcr | GYQVPPAEL E SVLLQEPSIF DAGVAGVPDP VAGELPGAVV VLESGKNMTE |
| Lla | GYQVPPAEL E SVLLQEPNIF DAGVAGVPDP IAGELPGAVV VLEKGKSMTE |
| Lmi | GYQVPPAEL E SVLLQHPNIF DAGVAGVPDP DAGELPGAVV VMEKGKTMTB |
| Pmi | GYQVPPAEL E SILLQHPPIF DAGVAGIPDP DAGELPAAVV VLEEGKMMTE |
| Ppy | GYQVAPAELE SILLQHPNIF DAGVAGLPDD DAGELPAAVV VLEHGKTMTB |
| Lno | GYQVPPAEL E SILLQHPFIF DAGVAGIPDP DAGELPARVV VLEEGKTMTB |
| Ppe1 | GYQVPPAEL E ALLLQHPFIE DAGVAGVPDE VAGDLPGAVV VLKEGKSITH |
| Ppe2 | GYQVAPAEIE GILLQHPYIV DAGVTGIPDE AAGELPAAGV VVQTQKYLNE |
| Phg | AYQVAPAELE ALLLQHPYIA DAGVTGIPDE EAGELPAACV VLEPGKTMTB |
| TG | GSQVAPAELE EILLKNPCIR DVAVVGIPDL EAGELPSAFV VKQPGKEITA |

OX---X---O- XO--XX-O-X -XX-X-O--X O--O--X-X- -XXO--OXOX

501

550

| | |
|------|----------------------------------------------------------|
| Lcr | KEVMDYVASQ VSNAKRLRGG VRFVDEVPKG LTGKIDGRA. IREILKKPV. |
| Lla | KEVMDYVASQ VSNAKRLRGG VRFVDEVPKG LTGKIDGKA. IREILKKPV. |
| Lmi | KEIVDYVNSQ VVNHKRLRGG VRFVDEVPKG LTGKIDAKV. IREILKKPQ. |
| Pmi | QEVMFYVAGQ VTASKRLRGG VKFVDEVPKG LTGKIDSRK. IREILTMGOK |
| Ppy | KEIVDYVASQ VTTAKRLRGG VVFVDEVPKG LTGKILDARK. IREILIKAKK |
| Lno | QEVMFYVAGQ VTASKRLRGG VKFVDEVPKG LTGKIDGRK. IREILMMGKK |
| Ppe1 | KEIODYVAGQ VTSSKRLRGG VEFVKEVPIG FTGKIDTRK. IKEILIKAQK |
| Ppe2 | QIVQNPVSQ VSTAKRLRGG VKFLDEIPKG STGKIDRKV. LRQMPERKH.. |
| Phg | KEVMDYIAER VTPTRKLRRGG VLFPVNNIPKG ATGKLVRTE. IRRLLTQRA. |
| TG | KEVVDYLAER VSHTKYLRRGG VRFDVSIPRN VTGKIDTRKEL LKOLLEKS.. |

OOOXOOXX -000-X---- -0-00XX-XX X---OXOXOO XXXX000000

551

| | |
|------|------------|
| Lcr |AKM |
| Lla |AKM |
| Lmi |AKM |
| Pmi |SKL |
| Ppy | G...GKSCL |
| Lno |SKL |
| Ppe1 | GKSCKSKAKL |
| Ppe2 |KSCL |
| Phg |AKL |
| TG |SKL |

000000X-O

FIG. 19C (Fortsetzung)

Erläuterungen zu den Käferluciferasesequenzen:

| | |
|------|-----------------------------------------------------------|
| Lcr | <i>Luciola cruciata</i> |
| Lla | <i>Luciola lateralis</i> |
| Lmi | <i>Luciola mingrellica</i> |
| Pmi | <i>Pyrocoelia miyako</i> |
| Ppy | <i>Photinus pyralis</i> |
| Lno | <i>Lampyris noctiluca</i> |
| Ppe1 | <i>Photuris pennsylvanica</i> (1) |
| Ppe2 | <i>Photuris pennsylvanica</i> (2) |
| Phg | <i>Phengodes</i> sp. |
| YG | <i>Pyrophorus plagiophthalmus</i> – gelbgrüne Lumineszenz |

FIG. 19D

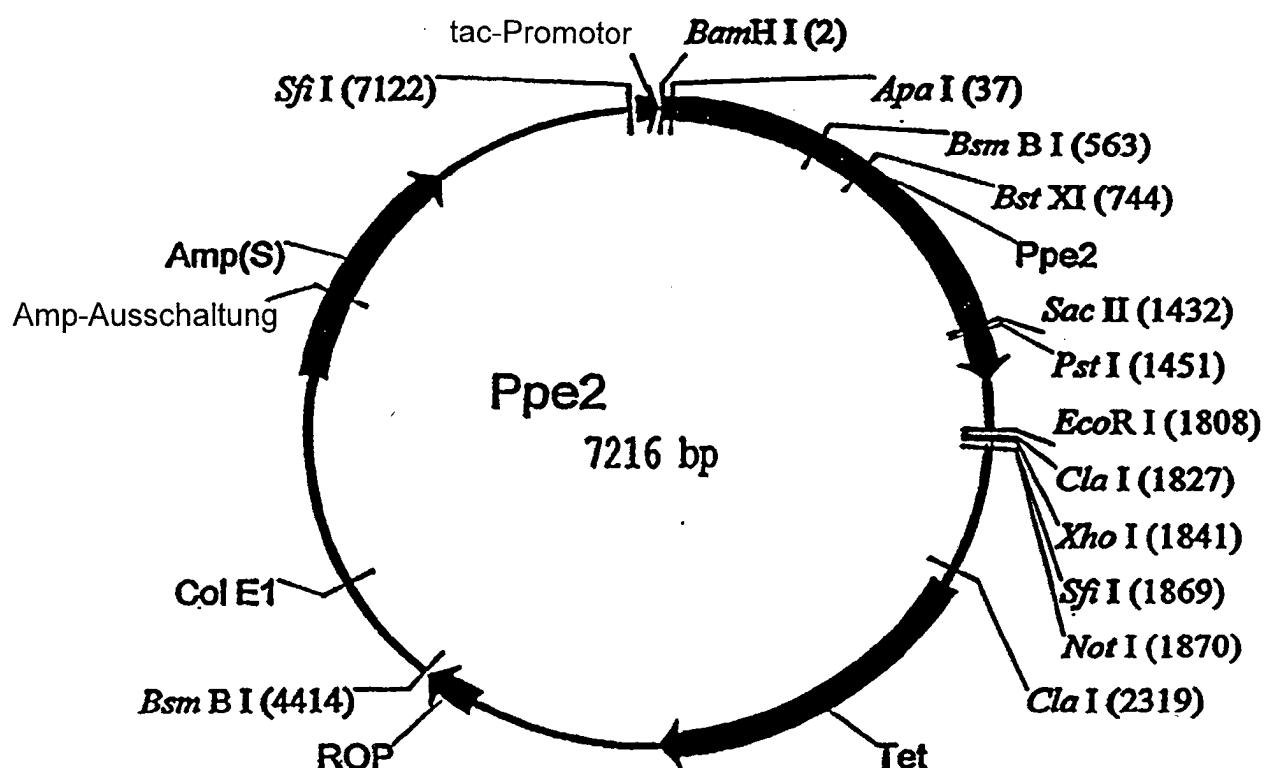


FIG. 20

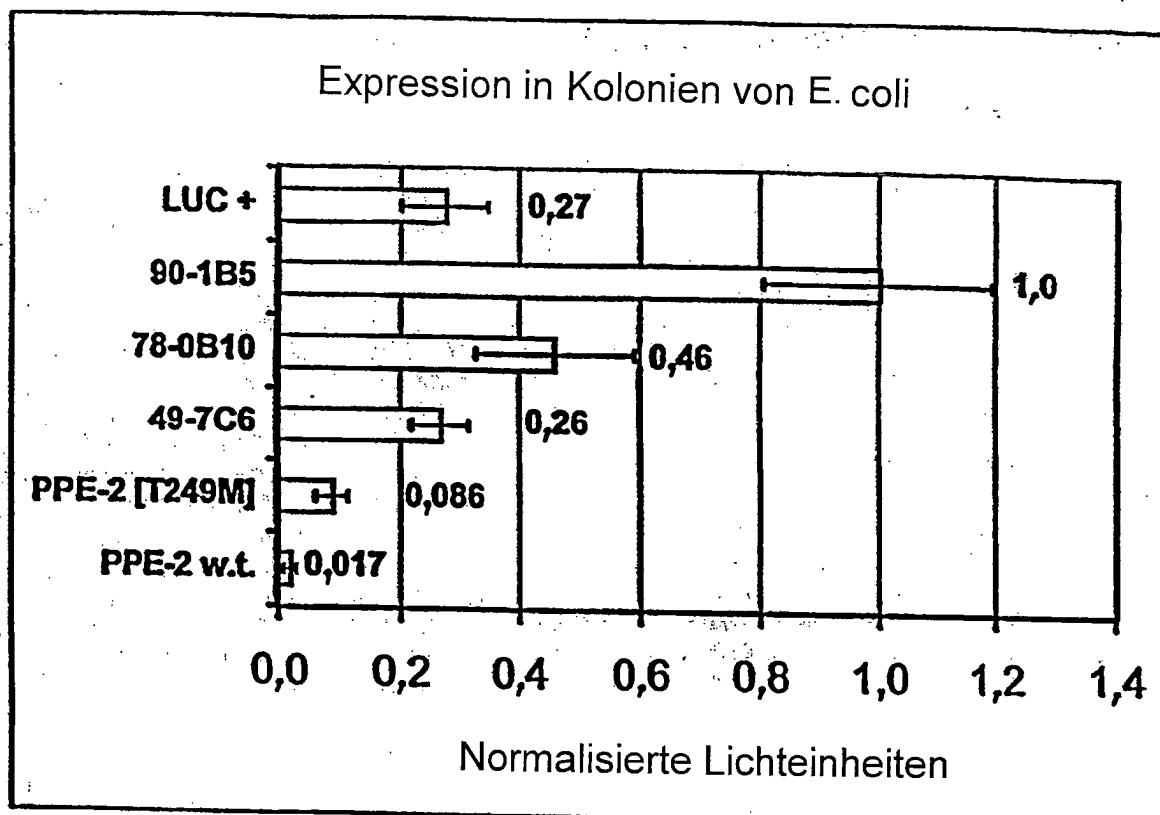


FIG. 21

luc49-7C6 (SEQ ID NO:1)

| | | | | | | |
|------------|-------------|------------------|-------------|-------------|-------------|------|
| GGATCCAATG | GCAGATAAAA | ATATTTATA | TGGGCCCGAA | CCATTTATC | CCTTGGCTGA | 60 |
| TGGGACGGCT | GGAGAACAGA | TGTTTACGC | ATTATCTCGT | TATGCAGATA | TTTCAGGATG | 120 |
| CATAGCATTG | ACAATGCTC | ATACAAAAGA | AAATGTTTA | TATGAAGAGT | TTTAAAATT | 180 |
| GTCGTGTCGT | TTAGCGGAAA | GTTTAAAAAA | GTATGGATTA | AAACAAAACG | ACACAATAGC | 240 |
| GGTGTGTCG | AAAAATGGTT | TGCAATTTT | CCTTCCTATA | ATTGCATCAT | TGTATCTTGG | 300 |
| AATAATTGCA | GCACCTGTTA | GTGATAAATA | CATTGAACGT | GAATTAATAC | ACAGTCTTGG | 360 |
| TATTGAAAAA | CCACGCATAA | TTTTTGTC | CAAGAATACT | TTTCAAAAAG | TACTGAATGT | 420 |
| AAAATCTAAA | TTAAAATATG | TAGAAACTAT | TATTATATA | GACTTAAATG | AAGACTTAGG | 480 |
| AGGTATCAA | TGCCTCAACA | ACTTTATTC | TCAAAATTCC | GATATTAATC | TGGACGTAAA | 540 |
| AAAATTTAAA | CCAAATTCTT | TTAATCGAGA | CGATCAGGTT | CGGTGGTAA | TGTTTCTTC | 600 |
| TGGTACAAC | GGTGTTCGA | AGGGAGTCAT | GCTAATCAC | AAGAATATTG | TTGCACGATT | 660 |
| TCTCTTGA | AAAGATCTA | CTTTGGTAA | CGCAATTAAAT | CCAACGACAG | CAATTTAAC | 720 |
| GGTAATACCT | TTCCACCAG | GTTTGGTAT | GTGACCAACA | TTAGGATACT | TTACTTGTGG | 780 |
| ATTCGAGTT | GTTCTAATGC | ACACGTTGA | AGAAAAACTA | TTTCTACAAAT | CATTACAAGA | 840 |
| TTATAAAGTG | GAAAGTACTT | TACTGTACC | AACATTAATG | GCATTTCTTG | CAAAAAGTGC | 900 |
| ATTAGTTGAA | AAAGTACGATT | TATGCACCTT | AAAAGAAATT | GCATCTGGTG | GGGCACCTTT | 960 |
| ATCAAAAGAA | ATGGGGAGA | TGGTAAAAAA | ACGGTTAAA | TTAAACCTTG | TCAGGCAAGG | 1020 |
| GTATGGATTA | ACAGAAACCA | CTTCGGCTGT | TTAATTACA | CGGACACATG | ACGTCAGACC | 1080 |
| GGGATCAACT | GGTAAAATAG | TACCAATTCA | CGCTGTAAA | GTGTCGATC | CTACAAACAGG | 1140 |
| AAAAATTTG | GGGCCAAATG | AACTGGAGA | ATTGTATTT | AAAGGGACCA | TGATAATGAA | 1200 |
| AGGTATTAT | AATAATGAG | AAGCTACTAA | AGCAATTATT | AAACAAAGACG | GATGGTTGCG | 1260 |
| CTCTGGTGAT | ATTGCTTATT | ATGACAATGA | TGGCCATT | TATATTGTGG | ACAGGCTGAA | 1320 |
| GTCATTAATT | AAATATAAAG | GTATCAGGT | TGCACCTGCT | GAAATTGAGG | GAATACTCTT | 1380 |
| ACAACATCCG | TATATTGTTG | ATGCOGGCGT | TACTGGTATA | CCGGATGAAG | CCGGGGCGA | 1440 |
| GCTTCCAGCT | GCAGGTGGTG | TAGTACAGAC | TGGAAAATAT | CTAAACGAAC | AAATCGTACA | 1500 |
| AAATTTGTT | TCCAGTCAG | TTTCAACAGC | CAAATGGCTA | CGTGGTGGGG | TGAAATTTT | 1560 |
| GGATGAAATT | CCCAAAGGAT | CAACTGGAAA | AATTGACAGA | AAAGTGTAA | GACAAATGTT | 1620 |
| GGATGAAATT | CCCAAACAC | <u>ACCAATGGG</u> | | | | 1639 |

FIG. 22

Luc49-6C10 (SEQ ID NO:2)

| | | | | | | |
|------------|------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| GGATCCAATG | GAAGATAAAA | ATATTTATA | TGGACCTGAA | CCATTTCATC | CCTTGGCTGA | 60 |
| TGGGACCGCT | GGAGAACAGA | TGTTTACGC | ATTATCTCGT | TATGCAGATA | TTTCAGGATG | 120 |
| CATAGCATTG | ACAAATGCTC | ATACRAAAGC | CCCTGTTTA | TATGAAGAGT | TGTTAAAATT | 180 |
| GTCGTGTCGT | TTAGCGAAA | GTTTAAAAAA | GTATGGATTA | AAACAAAACG | ACACAATAGC | 240 |
| GGTGTGTAGC | GAAAATGGTT | TGCCATTTC | CCTTCCTATA | ATTGCATCAT | TGTATCTTGG | 300 |
| AATAATTGCA | GCACCTGTTA | GTGATAAAATA | CATTGAAACGT | GAATTAATAC | ACAGTCTTGG | 360 |
| TATTGTAAAA | CCACGCATAA | TTTTTGCTC | CAAGAATACT | TTTCAAAAG | TACTGAATGT | 420 |
| AAAATCTAAA | TTAAAATATG | TAGAAACTAT | TATTATATA | GACTTAAATG | AAGACTTAGG | 480 |
| AGGTTATCAA | TGCTCAACA | ACTTTATTC | TCAAAATTCC | GATATTAATC | TGGACGTAAA | 540 |
| AAAATTAAA | CCATATTCTT | TTAACGAGA | CGATCAGGTT | GCGTTGGTAA | TGTTTTCTTC | 600 |
| TGGTACAAC | GGTGTTCGA | AGGGAGTCAT | GCTAACTCAC | AAGAATATTG | TTGCACGATT | 660 |
| TTCTCATCCA | AAAGATCCCA | CTTTGGTAA | CGCAATTAAAT | CCAACGACAG | CAATTTAAC | 720 |
| GGTAATACCT | TTCCACCATG | TTTTGGTAT | GATGACCAAA | TTAGGAACT | TTACTTGTGG | 780 |
| ATTCCGAGTT | GTCTTAATGC | ACACGTTGAA | AGAAAAACTA | TTTCTACAAT | CATTACAAGA | 840 |
| TTATAAATG | GAAAGTACTT | TACTTGTACC | AACATTAATG | GCATTTTTG | CAAAAAGTGC | 900 |
| ATTAGTTGAA | AAGTACCGATT | TATGCACTT | AAAAGAAATT | GCATCTGGTG | GCGCACCTTT | 960 |
| ATCAAAAGAA | ATGGGGAGA | TGGTAAAAAA | ACGGTTAAA | TTAAACTTTG | TCAGGCAAGG | 1020 |
| GTATGGATTA | ACAGAAACCA | CTTCGGCTGT | TTTAATTACA | CCGAACAAATG | ACGTCAGACC | 1080 |
| GGGATCAACT | GGTAAAATAG | TACCATTTCA | CGCTGTTAAA | GTGTGOGATC | CTACAAACAGG | 1140 |
| AAAAATTTCG | GGGCCAAATG | AAACTGGAGA | ATTGTATTTC | AAAGGGGACA | TGATAATGAA | 1200 |
| AGGTATTAT | AAATAATGAG | AAGCTACTAA | AGCAATTATT | AAACAAAGACG | GATGGTTGCG | 1260 |
| CTCTGGTGAT | ATTGCTTATT | ATGACAATGA | TGGCCATTTC | TATATTGTGG | ACAGGCTGAA | 1320 |
| GTCATTAATT | AAATATAAAG | GTATACAGGT | TGCACCTGCT | GAATTGAGG | GAATACTCTT | 1380 |
| ACAACATCCG | TAATTTGTTG | ATGCCGGCGT | TACTGGTATA | CCGGATGAAG | CCGCAGGGCGA | 1440 |
| GCTTCCAGCT | GCAGGGTGTG | TAGTACAGAC | TGGAAAATAT | CTAACGAAAC | AAATCGTACA | 1500 |
| AAATTTGTT | TCCAGTCAAG | TTTCAACAGC | CAAATGGCTA | CGTGGTGGGG | TGAAATTTT | 1560 |
| GGATGAAATT | CCAAAGGAT | CAACTGGAAA | AATTGACAGA | AAAGTGTAA | GACAAATGTT | 1620 |
| TGAAAAACAC | <u>ACCAATGGG</u> | | | | | 1639 |

FIG. 23

luc49-0G12 (SEQ ID NO:3)

| | | | | | | |
|-------------|------------------|------------|-------------|-------------|------------|------|
| GGATCCAATG | GAAGATAAAA | ATATTTATA | TGGACCTGAA | CCATTTTATC | CCCTGGCTGA | 60 |
| TGGGACGGCT | GGAGAACAGA | TGTTTACGC | ATTATCTCGT | TATGCAGATA | TTTCAGGATG | 120 |
| CATAGCATTG | ACAAATGCTC | ATACAAAAGC | CCCTGTTTA | TATGAAGAGT | TTTTAAAATT | 180 |
| GTCGTGTCGT | TTAGCGGAAA | GTTTTAAAAA | GTATGGATTA | AAACAAAACG | ACACAATAGC | 240 |
| GGTGTGTCGC | GAAAATGGTT | TGCAATTTC | CTTCCTATA | ATTGCATCAT | TGTATCTTGG | 300 |
| AATAATTGCA | GCACCTGTTA | GTGATAAATA | CATTGAACGT | GAATTAAATAC | ACAGTCTTGG | 360 |
| TATTTGTTAA | CCACGCATAA | TTTTTGCTC | CAAGAATACT | TTTCAAAAAG | TACTGAATGT | 420 |
| AAAATCTAAA | TIAAAATATG | TAGAAACTAT | TATTATATA | GACTTAAATG | AAGACTTGG | 480 |
| AGGTATCAA | TGCCCTAACAA | ACTTTATTC | TCAAAATTCC | GATTTAAATC | TTGACGTAAC | 540 |
| AAAATTAAA | CCATATTCTT | TTAATCGAGA | CGATCAGGTT | CGCTTGGTAA | TGTTTTCTTC | 600 |
| TGGTACAAC | GGTGTTCGAA | AGGGAGTCAT | GCTAACTCAC | AAGAATATTG | TTGACGATT | 660 |
| TTCTTATGCA | AAAGATCTA | CTTTTGGTAA | CGCAATTAA | CCAAACGACAG | CAATTAAAC | 720 |
| GGTAATACCT | TTCCACCAGT | GTTTTGGTAT | GATGACCAACA | TTAGGATACT | TTACTTGTGG | 780 |
| ATTCGAGTT | GTTCTAATGC | ACACGTTGAA | AGAAAAACTA | TTTCTACAAAT | CATEACAGA | 840 |
| TTATAAAGTG | GAAAGTACTT | TACTTGTACC | AAACATTAATG | GCATTCTTGC | CAAAAAGTGC | 900 |
| ATTAGTTGAA | AAAGTACGATT | TATCGCACTT | AAAAGAAATT | GCATCTGGTG | GGCGACCTTT | 960 |
| ATCAAAAGAA | ATTGGGGAGA | TGGTGAAAAA | ACGGTTTAAA | TTAAACTTTG | TCAGGCAAGG | 1020 |
| GTATGGATTA | ACAGAAACCA | CTTCGGCTGT | TTTAAATTACA | CCGAACATG | ACGTCAGACC | 1080 |
| GGGATCAACT | GGTAAAATAG | TACCATTTCA | CGCTGTTAAA | GTIGTOGATC | CTACAACAGG | 1140 |
| AAAAATTTCG | GGGCCAAATG | AAACTGGAGA | ATTGTATTTC | AAAGGCGACA | TGATAATGAA | 1200 |
| AGGTATTAT | AATAATGAG | AAGCTACTAA | AGCAATTATT | AAACAAGACG | GATGGTTGCG | 1260 |
| CTCTGGTGAT | ATTGCTTATT | ATGACAATGA | TGGCCATTTC | TATATTGTGG | ACAGGCTGAA | 1320 |
| GTCATTAAATT | AAATATAAAG | GTATCAGGT | TGCACCTGCT | GAATTTGAGG | GAATACTCTT | 1380 |
| ACAACATCGG | TATATTGTTG | ATGCCGGCGT | TACTGGTATA | CGGGATGAG | CCGGGGCGGA | 1440 |
| GCTTCCAGCT | GCAGGTGTTG | TAGTACAGAC | TGGAAAATAT | CTAAACGAAC | AAATCGTACA | 1500 |
| AAATTTGTT | TCCAGTCAG | TTTCAACAGC | CAAATGGCTA | CGTGGTGGGG | TGAAATTTC | 1560 |
| GGATGAAATT | CCCAAAGGAT | CAACTGGAAA | AATTGACAGA | AAAGTGTAA | GACAAATGTT | 1620 |
| TGAAAAACAC | <u>ACCAATGGG</u> | | | | | 1639 |

FIG. 24

Luc49-7A5 (SEQ ID NO:4)

| | | | | | | |
|-------------|------------------|------------|-------------|-------------|------------|------|
| GGATCCAATG | GAAGATAAAA | ATATTTATA | TGGACCTGAA | CCATTTTATC | CCTTGGCTGA | 60 |
| TGGGACGGCT | GGAGAACAGA | TGTTTACGC | ATTATCTCGT | TATGCAGATA | TTTCAGGATG | 120 |
| CATAGCATTG | ACAAATGCTC | ATACAAAAGC | CCCTGTTTA | TATGAAGAGT | TTTTAAAATT | 180 |
| GTCGTGTCGT | TTAGCGGAAA | GTTTAAAAAA | GTATGGATTA | AAACAAAACG | ACACAATAGC | 240 |
| GGTGTGTAGC | GAAAATGGTT | TGCAATTTT | CCTTCCTATA | ATTGCATCAT | TGTATCTTGG | 300 |
| AATAATTGCA | GCACCTGTTA | GTGATAAATA | CATTGAACGT | GAATTAATAC | ACAGTCTTGG | 360 |
| TATTGAAAAA | CCACGCATAA | TTTTTGCTC | CAAGAATACT | TTTCAAAAAG | TACTGAATGT | 420 |
| AAAATCTAAA | TTAAAATATG | TAGAAACTAT | TATTATATTA | GAECTAAATG | AAGACTTAGG | 480 |
| AGGTTATCAA | TGCCTCAACA | ACTTTATTC | TCAAAATTCC | GATATTAATC | TTGACGTAAA | 540 |
| AAAATTAAA | CCATATTCTT | TTAACCGAGA | CGATCAGGTT | GCGTTGGTAA | TGTTTCTTC | 600 |
| TGGTACAAC | GGTGTTCGA | AGGGAGTCAT | GCTAACTCAC | AAGAATATTG | TTGCACGATT | 660 |
| TTCTATTGCA | AAAGATCCTA | CTTTGGTAA | CGCAATTAT | CCAACGACAG | CAATTTAAC | 720 |
| GGTAATACCT | TTCCACCAGT | GTTTTGGTAT | GATGACCACA | TTAGGATACT | TTACTGGTGG | 780 |
| ATTCCGAGTT | GTTCTAATGC | ACACGTTGA | AGAAAAAACTA | TTTCTACAAT | CATTACAAGA | 840 |
| TTATAAAGTG | GAAAGTACTT | TACTTGTACC | AACATTAATG | GCATTTTTG | CAAAAAGTGC | 900 |
| ATTAGTTGAA | AAGTACGATT | TATCGACTT | AAAAGAAATT | GCATCTGGTG | GCGCACCTT | 960 |
| ATCAAAAGAA | ATTGGGGAGA | TGGTAAAAAA | ACGGTTAAA | TTAAACTTTG | TCAGGCAAGG | 1020 |
| GTATGGATTA | ACAGAAACCA | CTTCGGCTGT | TTAATTACA | CCGAACATG | ACGTCAGACC | 1080 |
| GGGATCAACT | GGTAAAATAG | TACCATTTCA | CGCTGTTAAA | GTTGTCGATC | CTACAACAGG | 1140 |
| AAAAATTITG | GGGCCAAATG | AAACTGGAGA | ATTGTATTT | AAAGGCAGA | TGATAATGAA | 1200 |
| AGGTTATTAT | ARTAATGAAG | AAGCTACTAA | AGCAATTATT | AAACAAAGACG | GATGGTTGCG | 1260 |
| CTCTGGTGTAT | ATTGCTTATT | ATGACAATGA | TGGCCATTTC | TATATTGTTGG | ACAGGCTGAA | 1320 |
| GTCATTAAATT | AAATATAAAG | GTATCAGGT | TGCACCTGCT | GAAATTGAGG | GAATACTCTT | 1380 |
| ACAACATCGG | TATATTGTTG | ATGCCGGCGT | TACTGGTATA | CCGGATGAAG | CGCGGGCGGA | 1440 |
| GCTTCCAGCT | GCAGGTGTTG | TAGTACAGAC | TGGAAAATAT | CTAAACGAAC | AAATCGTACA | 1500 |
| AAATTTGTT | TCCAGTCAG | TTTCAACAGC | CAAATGGCTA | CGTGGTGGGG | TGAAATTTT | 1560 |
| GGATGAAATT | CCCAAAGGAT | CAACTGGAAA | AATTGACAGA | AAAGTGTAA | GACAAATGTT | 1620 |
| TGAAAAACAC | <u>ACCAATGGG</u> | | | | | 1639 |

FIG. 25

luc49-4G11 (SEQ ID NO:5)

| | | | | | | |
|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|------|
| GGATCCAATG | GAAGATAAAA | ATATTTATA | TGGACCTGAA | CCATTTCATC | CCTTGGCTGA | 60 |
| TGGGACGGCT | GGAGAACAGA | TGTTTQACGC | ATTATCTCGT | TATGCAGATA | TTTCAGGATG | 120 |
| CATAGCATTG | ACAAATGCTC | ATACAAAAGC | CCCTGTTTA | TATGAAGAGT | TGTTAAATT | 180 |
| GTCGTGTCGT | TTAGCGGAAA | GTTTAAAAA | GTATGGATTA | AAACAAAACG | ACACAATAGC | 240 |
| GGTGTGTAGC | GAAAATGGTT | TGCAATTTC | CCTTCCTATA | ATTGCATCAT | TGTATCTTGG | 300 |
| AATAATTGCA | GCACCTGTTA | GTGATAAATA | CATTGAACGT | GAATTAATAC | ACAGTCTTGG | 360 |
| TATTGTAAAA | CCACGCATAA | TTTTTGCTC | CAAGAATACT | TTTCAAAARG | TACTGAATGT | 420 |
| AAAATCTAAA | TTAAAATATG | TAGAAACTAT | TATTATATTA | GACTTAAATG | AAGACTTAGG | 480 |
| AGGTTATCAA | TGCCCTCAACA | ACTTTATTC | TCAAAATTCC | GATATTAATC | TTGACGTAAA | 540 |
| AAAATTAAA | CCAAATTCTT | TTAATCGAGA | CGATCAGGTT | GGGTGGTAA | TGTTTTCTTC | 600 |
| TGGTACAACT | GGTGTGTTGGA | AGGGAGTCAT | GCTAACTCAC | AAGAATATTG | TTGCACGATT | 660 |
| TTCTCATGCA | AAAGATCCTA | CTTTGGTAA | CGCAATTAA | CCAACGACAG | CAATTAAAC | 720 |
| GGTAATAACCT | TTCCACCATG | GTTTGGTAT | GATGACCAACA | TAGGATACT | TTACTTGTGG | 780 |
| ATTCCGAGTT | GTTCTAAATGC | ACACGTTGAA | AGAAAAACTA | TTTCTACAAAT | CATTACAAGA | 840 |
| TTATAAAGTG | GAAAGTACTT | TACTTGTACC | AACATTAATG | GCATTTTIG | CAAAAGTGC | 900 |
| ATTAGTTGAA | AACTACGATT | TATGCACTT | AAAAGAAAATT | GCATCTGGTG | GCGCACCTT | 960 |
| ATCAAAAGAA | ATTGGGGAGA | TGGTGA | ACGGTTAAA | TTAAACTTTG | TCAGGCAAGG | 1020 |
| GTATGGATTA | ACAGAAACCA | CTTCGGCTGT | TTAATTACA | CCGACACATG | ACGTCAGACC | 1080 |
| GGGATCAACT | GGTAAAATAG | TACCATTC | CGCTGTTAAA | GTTGTCGATC | CTACAAACAGG | 1140 |
| AAAAATTTC | GGGCCAAATG | AAACTGGAGA | ATTGTATT | AAAGGCGACA | TGATAATGAA | 1200 |
| AGGTTATTAT | ATAATGAAG | AAGCTACTAA | AGCAATTATT | AACAAAGACG | GATGGTTGCG | 1260 |
| CTCTGGTGAT | ATTGCTTATT | ATGACAATGA | TGGCCATT | TATATTGTGG | ACAGGCTGAA | 1320 |
| GTCATTAATT | AAATATAAAG | GTTATCAGGT | TGCACCTGCT | GAATTGAGG | GAATACTCTT | 1380 |
| ACAACATCCG | TATATTGTG | ATGCCGGCGT | TACTGGTATA | CGGATGAAG | CCGGGGCGA | 1440 |
| GCTTCCAGCT | GCAGGTGTG | TAGTACAGAC | TGGAAAATAT | CTAACGAC | AAATCGTACA | 1500 |
| AAATTTGTT | TCCAGTCAAG | TTTCAACAGC | CAAATGGCTA | CGTGGTGGGG | TGAAATT | 1560 |
| GGATGAAATT | CCCAAAGGAT | CAACTGGAAA | AATTGACAGA | AAAGTGTAA | GACAAATGTT | 1620 |
| TGAAAAACAC | ACCAATGGG | | | | | 1639 |

FIG. 26

luc49-7C6 (SEQ ID NO:14)

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|-----|
| G | T | M | A | D | K | N | I | L | Y | G | P | F | Y | P | I | L | S | A | D | 20 |
| I | A | T | A | G | E | Q | M | F | A | L | S | A | E | F | D | C | L | C | 40 | |
| S | C | R | L | T | N | A | H | T | E | K | V | E | K | F | F | G | I | G | 60 | |
| V | I | I | S | S | E | N | A | F | K | F | G | P | E | D | E | L | L | G | 80 | |
| I | V | A | A | P | R | V | I | D | K | F | P | E | N | E | N | S | I | G | 100 | |
| K | S | K | K | P | R | I | S | I | S | C | T | I | S | E | N | S | I | L | 120 | |
| G | Y | Q | Q | L | K | Y | N | F | I | K | T | I | N | D | E | L | N | N | 140 | |
| K | F | K | K | C | L | N | F | N | R | C | S | I | Q | D | E | H | V | L | 160 | |
| G | T | T | T | P | X | S | S | F | D | F | S | I | N | Q | F | V | E | L | 180 | |
| S | L | A | A | K | D | P | T | F | G | G | V | I | L | D | L | S | V | S | 200 | |
| V | I | P | F | H | H | H | M | N | M | N | M | A | N | Q | F | A | R | F | 220 | |
| F | R | V | V | V | L | M | H | T | F | F | E | R | T | T | L | C | T | G | 240 | |
| Y | K | V | V | E | S | T | L | L | V | G | P | K | L | T | F | Q | A | G | 260 | |
| L | V | V | E | K | Y | D | L | S | H | L | E | R | T | L | G | S | P | Q | 280 | |
| S | K | E | I | G | E | E | M | V | K | R | K | L | M | A | F | A | R | G | 300 | |
| Y | G | L | T | E | T | T | S | A | V | L | F | T | I | N | G | V | D | P | 320 | |
| G | S | T | G | K | I | N | E | P | F | H | A | T | K | M | P | N | T | G | 340 | |
| K | I | L | G | P | N | N | E | P | G | E | L | A | I | I | G | N | D | K | 360 | |
| G | Y | Y | N | A | Y | Y | D | A | T | K | A | H | F | I | Y | I | W | L | 380 | |
| S | G | D | I | K | Y | K | Y | Y | Q | N | D | G | H | P | E | I | E | R | 400 | |
| S | L | I | K | Y | I | V | D | A | G | V | V | A | T | P | D | E | G | I | 420 | |
| Q | H | P | Y | I | V | D | A | G | Y | G | V | T | G | I | P | D | E | G | 440 | |
| L | P | A | A | G | V | V | V | V | Q | T | Q | T | G | K | L | N | E | G | 460 | |
| N | F | V | S | S | Q | V | V | S | T | G | K | A | K | W | R | R | G | V | 480 | |
| D | E | V | I | P | K | G | G | S | T | G | K | I | D | R | R | K | V | F | 500 | |
| E | K | H | T | N | G | | | | | | | | | | | | | | F | 520 |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 540 | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 546 | |

FIG. 27

Luc49-6C10 (SEQ ID NO:15)

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|-----|
| M | E | D | K | N | I | L | Y | G | P | E | P | F | Y | P | L | A | D | | 20 | |
| G | T | A | G | E | Q | M | F | Y | A | L | S | R | Y | A | D | I | S | G | C | 40 |
| I | A | L | T | N | A | H | T | K | E | N | V | L | Y | E | E | L | L | K | L | 60 |
| S | C | R | L | A | E | S | F | K | K | Y | G | L | K | Q | N | D | T | I | A | 80 |
| V | C | S | E | N | G | L | Q | F | F | L | P | I | I | A | S | L | Y | L | G | 100 |
| I | I | A | A | P | V | S | D | K | Y | I | E | R | E | L | I | H | S | L | G | 120 |
| I | V | K | P | R | I | I | F | C | S | K | N | T | F | Q | K | V | L | N | V | 140 |
| K | S | K | L | K | Y | V | E | T | I | I | I | L | D | L | N | E | D | L | G | 160 |
| G | Y | Q | C | L | N | N | F | I | S | Q | N | S | D | I | N | L | D | V | K | 180 |
| K | F | K | P | X | S | F | N | R | D | D | Q | V | A | L | V | M | F | S | S | 200 |
| G | T | T | G | V | S | K | G | V | M | L | T | H | K | N | I | V | A | R | F | 220 |
| S | H | A | K | D | P | T | F | G | N | A | I | N | P | T | T | A | I | L | T | 240 |
| V | I | P | F | H | H | G | F | G | M | M | T | T | L | G | Y | F | T | C | G | 260 |
| F | R | V | Y | L | M | H | T | F | E | E | K | L | F | L | Q | S | L | Q | D | 280 |
| Y | K | V | E | S | T | L | L | V | P | T | L | M | A | F | F | A | K | S | A | 300 |
| L | V | E | K | Y | D | L | S | H | L | K | E | I | A | S | G | G | A | P | L | 320 |
| S | K | E | I | G | E | M | V | K | K | R | F | K | L | N | F | V | R | Q | G | 340 |
| Y | G | L | T | E | T | T | S | A | V | L | I | T | P | N | N | D | V | R | P | 360 |
| G | S | T | G | K | I | V | P | F | H | A | V | K | V | V | D | P | T | T | G | 380 |
| K | I | L | G | P | N | E | T | G | E | L | Y | F | K | G | D | M | I | M | K | 400 |
| G | Y | Y | N | N | E | E | A | T | K | A | I | I | N | K | D | G | W | L | R | 420 |
| S | G | D | I | A | Y | Y | D | N | D | G | H | F | Y | I | V | D | R | L | K | 440 |
| S | L | I | K | Y | K | G | Y | Q | V | A | P | A | E | I | E | G | I | L | L | 460 |
| Q | H | P | Y | I | V | D | A | G | V | T | G | I | P | D | E | A | A | G | E | 480 |
| L | P | A | A | G | V | V | V | Q | T | G | K | Y | L | N | E | Q | I | V | Q | 500 |
| N | F | V | S | S | Q | V | S | T | A | K | W | L | R | G | G | V | K | F | L | 520 |
| D | E | I | P | K | G | S | T | G | K | I | D | R | K | V | L | R | Q | M | F | 540 |
| E | K | H | T | N | G | | | | | | | | | | | | | | | 546 |

FIG. 28

Luc49-0G12 (SEQ ID NO:16)

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|---|-----|-----|
| M | E | D | K | N | I | L | Y | G | P | E | P | F | Y | P | L | A | D | 20 | | | |
| G | T | A | G | E | Q | M | F | Y | A | L | S | R | Y | A | D | I | S | G | C | 40 | |
| I | A | L | T | N | A | H | T | K | E | N | V | L | Y | E | E | F | L | K | L | 60 | |
| S | C | R | L | A | E | S | F | K | K | Y | G | L | K | Q | N | D | T | I | A | 80 | |
| V | C | S | E | N | G | L | Q | F | F | L | P | I | I | A | S | L | Y | L | G | 100 | |
| I | I | A | A | P | V | S | D | K | Y | I | E | R | E | L | I | H | S | L | G | 120 | |
| I | V | K | P | R | I | I | F | C | S | K | N | T | F | Q | K | V | L | N | V | 140 | |
| K | S | K | L | K | Y | V | E | T | I | I | I | L | D | L | N | E | D | L | G | 160 | |
| G | Y | Q | C | L | N | N | F | I | S | Q | N | S | D | I | N | L | D | V | K | 180 | |
| K | F | K | P | Y | S | F | N | R | R | D | D | Q | V | A | L | V | M | F | S | S | 200 |
| G | T | T | G | V | S | K | G | V | M | L | T | H | K | N | I | V | V | R | F | 220 | |
| S | L | A | K | D | P | T | F | G | N | A | I | N | P | T | T | A | I | L | T | 240 | |
| V | I | P | F | H | H | G | F | G | M | M | T | T | L | G | Y | F | T | C | G | 260 | |
| F | R | V | Y | L | M | H | T | F | E | E | K | L | F | L | Q | S | L | Q | D | 280 | |
| Y | K | V | E | S | T | L | L | V | P | T | L | M | A | F | F | A | K | S | A | 300 | |
| L | V | E | K | Y | D | L | S | H | L | K | E | I | A | S | G | G | A | P | L | 320 | |
| S | K | E | I | G | E | M | V | K | K | R | F | K | L | N | F | V | R | Q | G | 340 | |
| Y | G | L | T | E | T | T | S | A | V | L | I | T | P | N | N | D | V | R | P | 360 | |
| G | S | T | G | K | I | V | P | F | H | A | V | K | V | V | D | P | T | T | G | 380 | |
| K | I | L | G | P | N | E | T | G | E | L | Y | F | K | G | D | M | I | M | K | 400 | |
| G | Y | Y | N | N | E | E | A | T | K | A | I | I | T | K | D | G | W | L | R | 420 | |
| S | G | D | I | A | Y | Y | D | N | D | G | H | F | Y | I | V | D | R | L | K | 440 | |
| S | L | I | K | Y | K | G | Y | Q | V | A | P | A | E | I | E | G | I | L | L | 460 | |
| Q | H | P | Y | I | V | D | A | G | V | T | G | I | P | D | E | A | A | G | E | 480 | |
| L | P | A | A | G | V | V | V | Q | T | G | K | Y | L | N | E | Q | I | V | Q | 500 | |
| N | F | V | S | S | Q | V | S | T | A | K | W | L | R | G | G | V | K | F | L | 520 | |
| D | E | I | P | K | G | S | T | G | K | I | D | R | K | V | L | R | Q | M | F | 540 | |
| E | K | H | T | N | G | | | | | | | | | | | | | | | 546 | |

FIG. 29

Luc49-7A5 (SEQ ID NO:17)

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|-----|
| M | E | D | K | N | I | L | Y | G | P | E | P | F | Y | P | L | A | D | | 20 | |
| G | T | A | G | E | Q | M | F | Y | A | L | S | R | Y | A | D | I | S | G | C | 40 |
| I | A | L | T | N | A | H | T | K | E | N | V | L | Y | E | E | F | L | K | L | 60 |
| S | C | R | L | A | E | S | F | K | K | Y | G | L | K | Q | N | D | T | I | A | 80 |
| V | C | S | E | N | G | L | Q | F | F | L | P | I | I | A | S | L | Y | L | G | 100 |
| I | I | A | A | P | V | S | D | K | Y | I | E | E | L | I | H | S | L | G | 120 | |
| I | V | K | P | R | I | I | F | C | S | K | N | T | F | Q | K | V | L | N | V | 140 |
| K | S | K | L | K | Y | V | E | T | I | I | I | L | D | L | N | E | D | L | G | 160 |
| G | Y | Q | C | L | N | N | F | I | S | Q | N | S | D | I | N | L | D | V | K | 180 |
| K | F | K | P | Y | S | F | N | R | D | D | Q | V | A | L | V | M | F | S | S | 200 |
| G | T | T | G | V | S | K | G | V | M | L | T | H | K | N | I | V | A | R | F | 220 |
| S | I | A | K | D | P | T | F | G | N | A | I | N | P | T | T | A | I | L | T | 240 |
| V | I | P | F | H | H | G | F | G | M | M | T | T | L | G | Y | F | T | C | G | 260 |
| F | R | V | Y | L | M | H | T | F | E | E | K | L | F | L | Q | S | L | Q | D | 280 |
| Y | K | V | E | S | T | L | L | V | P | T | L | M | A | F | L | A | K | S | A | 300 |
| L | V | E | K | Y | D | L | S | H | L | K | E | I | A | S | G | G | A | P | L | 320 |
| S | K | E | I | G | E | M | V | K | K | R | F | K | L | N | F | V | R | Q | G | 340 |
| Y | G | L | T | E | T | T | S | A | V | L | I | T | P | N | N | D | V | R | P | 360 |
| G | S | T | G | K | I | V | P | F | H | A | V | K | V | V | D | P | T | T | G | 380 |
| K | I | L | G | P | N | E | T | G | E | L | Y | F | K | G | D | M | I | M | K | 400 |
| G | Y | Y | N | N | E | E | A | T | K | A | I | I | N | K | D | G | W | L | R | 420 |
| S | G | D | I | A | Y | Y | D | N | D | G | H | F | Y | I | V | D | R | L | K | 440 |
| S | L | I | K | Y | K | G | Y | Q | V | A | P | A | E | I | E | G | I | L | L | 460 |
| Q | H | P | Y | I | V | D | A | G | V | T | G | I | P | D | E | A | A | G | E | 480 |
| L | P | A | A | G | V | V | V | Q | T | G | K | Y | L | N | E | Q | I | V | Q | 500 |
| N | F | V | S | S | Q | V | S | T | A | K | W | L | R | G | G | V | K | F | L | 520 |
| D | E | I | P | K | G | S | T | G | K | I | D | R | K | V | L | R | Q | M | F | 540 |
| E | K | H | T | N | G | | | | | | | | | | | | | | | 546 |

FIG. 30

Luc49-4G11 (SEQ ID NO:18)

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|---|-----|
| M | E | D | K | N | I | L | Y | G | P | E | P | F | Y | P | L | A | D | 20 | | |
| G | T | A | G | E | Q | M | F | D | A | L | S | R | Y | A | D | I | S | G | C | 40 |
| I | A | L | T | N | A | H | T | K | E | N | V | L | Y | E | E | F | L | K | L | 60 |
| S | C | R | L | A | E | S | F | K | K | Y | G | L | K | Q | N | D | T | I | A | 80 |
| V | C | S | E | N | G | L | Q | F | F | L | P | I | I | A | S | L | Y | L | G | 100 |
| I | I | A | A | P | V | S | D | K | Y | I | E | R | E | L | I | H | S | L | G | 120 |
| I | V | K | P | R | I | I | F | C | S | K | N | T | F | Q | K | V | L | N | V | 140 |
| K | S | K | L | K | Y | V | E | T | I | I | I | L | D | L | N | E | D | L | G | 160 |
| G | Y | Q | C | L | N | N | F | I | S | Q | N | S | D | I | N | L | D | V | K | 180 |
| K | F | K | P | Y | S | F | N | R | D | D | Q | V | A | L | V | M | F | S | S | 200 |
| G | T | T | G | V | S | K | G | V | M | L | T | H | K | N | I | V | A | R | F | 220 |
| S | H | A | K | D | P | T | F | G | N | A | I | N | P | T | T | A | I | L | T | 240 |
| V | I | P | F | H | H | G | F | G | M | M | T | T | L | G | Y | F | T | C | G | 260 |
| F | R | V | Y | L | M | H | T | F | E | E | K | L | F | L | Q | S | L | Q | D | 280 |
| Y | K | V | E | S | T | L | L | V | P | T | L | M | A | F | F | A | K | S | A | 300 |
| L | V | E | K | Y | D | L | S | H | L | K | E | I | A | S | G | G | A | P | L | 320 |
| S | K | E | I | G | E | M | V | K | K | R | F | K | L | N | F | V | R | Q | G | 340 |
| Y | G | L | T | E | T | T | S | A | V | L | I | T | P | N | N | D | V | R | P | 360 |
| G | S | T | G | K | I | V | P | F | H | A | V | K | V | V | D | P | T | T | G | 380 |
| K | I | L | G | P | N | E | T | G | E | L | Y | F | K | G | D | M | I | M | K | 400 |
| G | Y | Y | N | N | E | E | A | T | K | A | I | I | N | K | D | G | W | L | R | 420 |
| S | G | D | I | A | Y | Y | D | N | D | G | H | F | Y | I | V | D | R | L | K | 440 |
| S | L | I | K | Y | K | G | Y | Q | V | A | P | A | E | I | E | G | I | L | L | 460 |
| Q | H | P | Y | I | V | D | A | G | V | T | G | I | P | D | E | A | A | G | E | 480 |
| L | P | A | A | G | V | V | V | Q | T | G | K | Y | L | N | E | Q | I | V | Q | 500 |
| N | F | V | S | S | Q | V | S | T | A | K | W | L | R | G | G | V | K | F | L | 520 |
| D | E | I | P | K | G | S | T | G | K | I | D | R | K | V | L | R | Q | M | F | 540 |
| E | K | H | T | N | G | | | | | | | | | | | | | | | 546 |

FIG. 31

Luc78-0B10 (SEQ ID NO:6)

| | | | | |
|---------------|-------------------------------|------------------------|-------------|------|
| GGATCCAATG G | CAGATAAGA ATATTTATA | TGGGCCGAA CCATTTATC | CCTGGCTGA | 60 |
| TGGGACGGCT GG | AGAACAGA TGTTCACGC ATTATCTCGT | TATGCAGATA TTTCCGGATG | | 120 |
| CATAGCATTG A | CAAAATGCTC ATACAAAAGA | AAATGTTTA TATGAAGAGT | TTTAAAATT | 180 |
| GTCGTGTCGT T | TAGCGAAA GTTTAAAAA | GTATGGATTA AAACAAAACG | ACACAATAGC | 240 |
| GGTGTGTCG | GAAAATGGTT TGCAATTTT | CCTCCCTGTA ATTGCATCAT | TGTATCTGG | 300 |
| AATAATTGCA G | CACCTGTTA GTGATAAATA | CATTGAAACGT GAATTAATAC | ACAGTCCTGG | 360 |
| TATTGAAAAA C | CACGCATAA TTTTGTC | CAAGAATACT TTCAAAAAG | TACTGAATGT | 420 |
| AAAATCTAAA T | AAAATCTG TAGAAAACAT | TATTATTA GACTTAAATG | AAGACTTGG | 480 |
| AGGTTATCAA T | GCCCTCAACA ACTTTATTC | TCAAAATTCC GATAGTAATC | TGGACGTAAA | 540 |
| AAAATTAAA C | CAATTCTT TTAATCGAGA | CGATCAGGTT GCCTGGTAA | TGTTTCTTC | 600 |
| TGGTACAAC | GGTGTGCGA AGGGAGTCAT | GCTAACTCAC AAGAATATTG | TTGCACGATT | 660 |
| TTCTCTGCA A | AAAGATCTA CTTTGGTAA | CGCAATTAAAT CCCACGACAG | CAATTAAAC | 720 |
| GGTAATACCT T | TCACCCATG GTTTGGTAT | GATGACCACA TTAGGATACT | TTACTGTGG | 780 |
| ATTCCGAGTT C | TTCTAATGC ACACGTTGA | AGAAAAACTA TTCTACAAAT | CATTACAAGA | 840 |
| TTATAAAGTG G | AAAGTACTT TACTTGTACC | AACTTAATG GCATTTCTTG | CAAAAGTGC | 900 |
| ATTAGTTGAA A | AGTACGATT TATCGCATT | AAAAGAAATT GCATCTGGTG | GCGCACCTT | 960 |
| ATCAAAAGAA A | TTGGGGAGA TGGTAAAAA | ACGGTTAAA TTAACCTTG | TCAGGCAAGG | 1020 |
| GTATGGATTA A | ACAGAACCA CTTCGGCTGT | TTTAATTACA CCGAAAGGTG | ACGCCAGACC | 1080 |
| GGGATCAACT G | GGTAAAATAG TACCAATTCA | CGCTGTTAAA GTTGTGATC | CTACAAACAGG | 1140 |
| AAAAATTG G | GGGCCAAATG AACCTGGAGA | ATTGTATTT AAAGGCGCCA | TGATAATGAA | 1200 |
| GGGTATTAT A | ATAATGAAG AAGCTACTAA | AGCAATTATT GATAATGACG | GATGGTTGCG | 1260 |
| CTCTGGTGAT A | TTGCTTATT ATGACAATGA | TGGCCATTTC TATATTGTGG | ACAGGCTGAA | 1320 |
| GTCATTAATT A | AAATATAAAG GTTATCAGGT | TGCACCTGCT GAAATTGAGG | GAATACTCTT | 1380 |
| ACAACATCCG T | TATATTGTT ATGCCGGCGT | TACTGGTATA CCGGATGAAG | CCGGGGCGA | 1440 |
| GCTTCCAGCT G | CAGGTGTTG TAGTACAGAC | TGGAAAATAT CTAACGAAC | AAATCGTACA | 1500 |
| AGATTGTTT G | TCCAGTCAGG TTCAACAGC | CAAATGGCTA CGGGTGGGG | TGAAATTGTT | 1560 |
| GGATGAAATT C | CCAAAGGAT CAACTGGAAA | AATTGACAGA AAAGTGTAA | GACAAATGTT | 1620 |
| TGAAAAAACAC A | ACCAATGGG | | | 1639 |

FIG. 32

luc78-0G8 (SEQ ID NO:7)

| | | | | | | |
|------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|------|
| GGATCCAATG | GCAGATAAAA | ATATTTATA | TGGGCCGAA | CCATTTTATC | CCTTGGCTGA | 60 |
| TGGGACGGCT | GGAGAACAGA | TGTTTACGC | ATTATCTCGT | TATGCAGATA | TTTCAGGATG | 120 |
| CATAGCATTG | ACAAATGCTC | ATACAAAAGC | CCCTGTTTA | TATGAAGAGT | TTTTAAAATT | 180 |
| GTCGTGTCGT | TTAGCGGAAA | GTTTTAAAAA | GTATGGATTA | AAACAAAACG | ACACAATAGC | 240 |
| GGTGTGTAGC | AAAAATGGTT | TGCAATTTC | CCTTCCGTAA | ATTGCATCAT | TGTATCTTGG | 300 |
| AATAATTGCA | GCACCTGTTA | GTGATAAATA | CATTGAACGT | GAATTAAATAC | ACAGTCTTGG | 360 |
| TATTGAAAAA | CCACGCATAA | TTTTTGCTC | CAAGAATACT | TTTCAAAAG | TACTGAATGT | 420 |
| AAAATCTAAA | TTAAAAATATG | TAGAAACTAT | TATTATATTA | GACTTAAATG | AAGACCTTAGG | 480 |
| AGGTTATCAA | TGCCTCAACA | ACTTTTATTTC | TCAAAATTCC | GATATTAATC | TTGACGTAAA | 540 |
| AAAATTTAAA | CCATATTCTT | TTAATCGAGA | C3ATCAGGTT | GGCTTGGTAA | TGTTTCTTC | 600 |
| TGGTACAAC | GGTGTTCGGA | AGGGAGTCAT | GCTAACTCAC | AAGAATATTG | TTGCAACGATT | 660 |
| TTCTCTTGC | AAAGATCCTA | CTTTGGTAA | CGCAATTAA | CCRAOGACAG | CAATTAAAC | 720 |
| GGTAATACCT | TTCCACCRTG | GTTTGGTAT | GATGACCACA | TTAGGATACT | TTACTTGTTG | 780 |
| ATTCCGAGTT | TTCTCTAATGC | ACACGTTGA | AGAAAAACTA | TTTCTACAAT | CATTACRAGA | 840 |
| TTATAAAGTG | GAAGTACTT | TACTTGACCC | AACATTAATG | GCATTTCTTG | CAAAAGTGC | 900 |
| ATTAGTTGAA | AAAGTACGATT | TATCGCACTT | AAAAGAAATT | GCATCTGGTG | GCGCACCTTT | 960 |
| ATCAAAAGAA | ATTGGGGAGA | TGGTAAAAAA | ACGGTTAAA | TTAAACTTTG | TCAGGCAAGG | 1020 |
| GTATGGATTA | ACAGAAACCA | CTTGGCTGT | TTTAATTACA | CGAAA...ccc | >XGTCAAGACC | 1080 |
| GGGATCAACT | GGTAAAATAG | TACCAATTCA | CGCTGTAAA | GTGTGCGATC | CTACAAACAGG | 1140 |
| AAAATTTTG | GGGCCAATG | AACCTGGAGA | ATTGTATTT | AAAGGCACCA | TGATAATGAA | 1200 |
| AGGTTATTAT | AATAATGAAG | AAGCTACTAA | AGCAATTATT | QATAAAGACG | GATGGTTGCG | 1260 |
| CTCTGTTGAT | ATTGCTTATT | ATGACAATGA | TGGCCATTTC | TATATGTTG | ACAGGCTGAA | 1320 |
| GTCATTAATT | AAATATAAAG | GTTATCAGGT | TGCACCTGCT | GAATTGAGG | GAATACTCTT | 1380 |
| ACAACATCCG | TATATTGTTG | ATGCOGGCGT | TACTGGTATA | COGGATGAAG | CCGGGGCGGA | 1440 |
| GCTTCCAGCT | GCAGGTGTTG | TAGTACAGAC | TGGAAAATAT | CTAAACGAAC | AAATCGTACA | 1500 |
| AAATTTGTT | TCCAGTCAG | TTTCAACAGC | CAAATGGCTA | CGGGGTGGGG | TGAATTTTT | 1560 |
| GGATGAAATT | CCCAAAGGAT | CAACTGGAAA | AATTGACAGA | AAAGTGTAA | GACAAATGTT | 1620 |
| TGAAAAACAC | ACCAATGGG | | | | | 1639 |

FIG. 33

luc78-1E1 (SEQ ID NO:8)

| | | | | | | |
|------------|--------------------|------------|-------------|------------------------|------------|------|
| GGATCCAATG | G <u>CAGATAAAA</u> | ATATTTATA | TGGGCCGAA | CCATTTATC | CCITGGCTGA | 60 |
| TGGGACGGCT | GGAGAACAGA | TGTTTACGC | ATTATCTCGT | TATGCAGATA | TTTCAGGATG | 120 |
| CATAGCATTG | ACAAATGCTC | ATACAAAAGC | CCCTGTTTA | TATGAAGAGT | TGTAAAATT | 180 |
| GTCGTGTCGT | TTAGCGGAAA | GTTTAAAAAA | GTATGGATTA | AAACAAAACG | ACACAATAGC | 240 |
| GGTGTGTAGC | AAAAATGGT | TGCAATATT | CCTTCCCTGTA | ATTGCATCAT | TGTATCTTGG | 300 |
| AATAATTGCA | GCACCTGTTA | GTGATAAATA | CATTGAACGT | GAATTAATAC | ACAGTCTTGG | 360 |
| TATTGAAAAA | CCACGCATAA | TTTTTGCTC | CAAGAATACT | TTTCAAAAG | TACTGAATGT | 420 |
| AAAATCTAAA | TTAAAATATG | TAGAAACTAT | TATTATATTA | GACTAAATG | AAGACTTAGG | 480 |
| AGGTATCAA | TGCCTCAACA | ACTTATTTTC | TCAAAATCC | GATATTAATC | TTGACGTAAA | 540 |
| AAAATTTAAA | CCATATTCTT | TTAATCGAGA | CGATCAGGTT | GGTTGGTAA | TGTTTCTTC | 600 |
| TGGTACAAC | GGTGTGCGGA | AGGGAGTCAT | GCTAACTCAC | ARGAATATTG | TTGCACGATT | 660 |
| TTCTATTGCA | AAAGATCCTA | CTTTGGTAA | CGCAATTAAAT | CCAACGACAG | CAATTAAAC | 720 |
| GGTAATACCT | TTCCACCATG | GTTTTGGTAT | GATGACCACA | TTAGGATACT | TTACTTGTGG | 780 |
| ATTCCGAGTT | GTTCTAATGC | ACACGTTGAA | AGAAAAACTA | TTTCTACAAAT | CATTACAAGA | 840 |
| TTATAAAGTG | GAAGTACTT | TACTGTACC | AACATTAATG | GCATTTCTTG | CAAAAAGTGC | 900 |
| ATTAGTTGAA | AAAGTACGATT | TATCGCACCT | AAAAGAAATT | GCATCTGGTG | GGGCACCTTT | 960 |
| ATCAAAAGAA | ATTGGGGAGA | TGGTGAAAAA | ACGGTTAAA | TTAAACTTTG | TCAGGCAAGG | 1020 |
| GTATGGATTA | ACAGAAACCA | CTTCGGCTGT | TTTAATTACA | CGAAAD CCCC | CGQCAGACC | 1080 |
| GGGATCAACT | GGTAAAATAG | TACCATTTCA | CGCTGTTAA | GTGTGCGATC | CTACACAGG | 1140 |
| AAAAATTTCG | GGGCCAAATG | AACCTGGAGA | ATTGTATTTT | AAAGGCGCCA | TGATAATGAA | 1200 |
| GGGTTATTAT | ATAATGAAG | AAGCTACTAA | AGCAATTATT | AAACAAAGACG | GATGGTTGCG | 1260 |
| CTCTGGTGT | ATTGCTTATT | ATGACAATGA | TGGCCATTTC | TATATTGTGG | ACAGGCTGAA | 1320 |
| GTCATTAATT | AAATATAAAG | GTTATCAGGT | TGCACCTGCT | GAAATTGAGG | GAATACTCTT | 1380 |
| ACAACATCCG | TATATTGTTG | ATGCCGGCGT | TACTGGTATA | CCGGATGAAG | CCGCGGGCGA | 1440 |
| GCTTCCAGCT | GCAGGGTTG | TAGTACAGAC | TGGAAATAT | CTAAACGAAAC | AAATCGTACA | 1500 |
| AAATTGTTT | TCCAGTCAG | TTTCAACAGC | CAAATGGCTA | CGTGGTGGGG | TGAAATTTT | 1560 |
| GGATGAAATT | CCCAAAGGAT | CAACTGGAAA | AATTGACAGA | AAAGTGTAA | GACAAATGTT | 1620 |
| TGAAAAACAC | ACCAATGGG | | | | | 1639 |

FIG. 34

luc78-2B4 (SEQ ID NO:9)

| | | | | | | |
|------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|------|
| GGATCCAATG | GAGATAAAA | ATATTTATA | TGGGCCGAA | CCATTITATC | CCTTGGCTGA | 60 |
| TGGGACGGCT | GGAGAACAGA | TGTTTGACGC | ATTATCTCGT | TATGCAGATA | TTTCAGGATG | 120 |
| CATAGCATTG | ACAATGCTC | ATACAAAAGC | CCCTGTTTA | TATGAAGAGT | TGTAAAATT | 180 |
| GTCTGTGCGT | TTAGCGGAAA | GTTTAAAAAA | GTATGGATTAA | AAACAAAACG | ACACAAATAGC | 240 |
| GGTGTGTAGC | GAAAATGGTT | TGCAATTTT | CCTTCCTGTA | ATTGCATCAT | TGTATCTTGG | 300 |
| AATAATTGCA | GCACCTGTTA | GTGATAAATA | CGTTGAACGT | GAATTAATAC | ACAGTCTTGG | 360 |
| TATTGAAAAA | CCACGCATAA | TTTTTGCTC | CAAGAATACT | TTTCAAAAG | TACTGAATGT | 420 |
| AAAATCTAAA | TTAAAATATG | TAGAAACTAT | TATTATATA | GAATTAAATG | AAGACTTAGG | 480 |
| AGGTTATCAA | TGCCTCAACA | ACTTTATTC | TCAAAATTCC | GATAGTAATC | TGGACGTAAA | 540 |
| AAAATTAAA | CCAAATTCTT | TTAATCGAGA | CGATCAGGTT | GCCTTGGTAA | TGTTTCTTC | 600 |
| TGGTACAAC | GGTGTTCGA | AGGGAGTCAT | GCTAACTCAC | AAGAATATTG | TTGCACGATT | 660 |
| TTCTCTTCA | AAAGATCTA | CTTTGGTAA | CGCAATTAA | CCAACGACAG | CAATTAAAC | 720 |
| GGTAATACCT | TTCCACCAG | GTGTTGGTAT | GATGACCACA | TTAGGAACT | TTACTGTGG | 780 |
| ATTCCGAGTT | GTTCTAATGC | ACACGTTGA | AGAAAAACTA | TTCTACAAAT | CATTACAAGA | 840 |
| TTATAAAGTG | GAAAGTACIT | TACTTGTACC | AACATTAATG | GCATTTCCTG | CAAAAGTGC | 900 |
| ATTAGTTGAA | AAAGTACGATT | TATGCACTT | AAAAGAAATT | GCATCTGGTG | GCGCACCTTT | 960 |
| ATCAAAAGAA | ATTGGGGAGA | TGGTAAAAAA | ACGGTTAAA | TTAAACTTTG | TCAGGCAAGG | 1020 |
| GTATGGATTA | ACAGAAACCA | CTTGGCTGT | TTAAATACA | CCGAAACccc | xxGGAGACC | 1080 |
| GGGATCAACT | GTTAAAATAG | TACCATTTCA | CGCTGTTAAA | GTGTCGATC | CTACAACAGG | 1140 |
| AAAAAATTG | GGGCCAATG | AACTGGAGA | ATTGTATTT | AAAGGCGQCA | TGATAATGAA | 1200 |
| GGGTATTTAT | AATAATGAAG | AAGTACTAA | AGCAATTATT | QAIAAAAGACG | GATGGTTGCG | 1260 |
| CTCTGGTGAT | ATTGCTTATT | ATGACAATGA | TGGCCATTTC | TATATTGTGG | ACAGGCTGAA | 1320 |
| GTCATTAAIT | AAATATAAAG | GTTATCAGGT | TGCACCTGCT | GAAATTGAGG | GAATACTCTT | 1380 |
| ACAACATCCG | TATATTGTTG | ATGCCGGCGT | TACTGGTATA | CCGGATGAAG | CCGGGGCGA | 1440 |
| GCTTCCAGCT | GCAGGTGTTG | TAGTACAGAC | TGGAAAATAT | CTAACACGAC | AAATCGTACA | 1500 |
| AAATTGTTT | TCCAGTCAG | TTTCAACAGC | CAAATGGCTA | CGTGGTGGGG | TGAAATTTTT | 1560 |
| GGATGAAATT | CCCAAAGGGAT | CAACTGGAAA | AATTGACAGA | AAAGTGTAA | GACAAATGTT | 1620 |
| TGAAAACAC | ACCAATGGG | | | | | 1639 |

FIG. 35

luc78-0B10 (SEQ ID NO:19)

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|
| G | T | M | A | D | K | N | I | L | Y | G | P | E | P | F | Y | P | L | A | D | 20 |
| I | A | L | T | N | A | H | M | F | D | A | S | R | Y | A | E | S | L | G | C | 40 |
| S | C | R | L | A | E | S | F | K | K | N | V | L | K | E | Q | L | K | I | L | 60 |
| V | C | S | E | N | G | L | Q | F | F | Y | L | G | V | I | A | T | H | A | G | 80 |
| I | I | A | A | P | V | S | D | F | C | S | K | E | R | F | Q | L | N | L | G | 100 |
| I | V | K | P | R | I | I | F | E | T | I | S | Q | N | I | N | D | L | H | G | 120 |
| K | S | K | L | R | S | V | E | I | S | K | I | N | T | D | Q | L | N | L | G | 140 |
| G | Y | Q | C | L | N | N | F | T | I | Q | N | S | D | E | L | V | L | V | G | 160 |
| K | F | K | P | Y | S | F | N | R | D | D | Q | V | A | Q | L | N | M | F | K | 180 |
| G | T | T | G | V | P | K | G | V | M | M | L | T | H | A | N | V | A | R | S | 200 |
| S | L | A | K | D | P | T | F | G | N | A | M | T | T | T | Y | P | L | C | F | 220 |
| V | I | P | F | H | H | G | F | G | M | M | T | N | L | F | S | A | T | G | G | 240 |
| F | R | V | V | L | M | H | T | F | E | K | L | M | T | G | Q | P | L | C | D | 260 |
| Y | K | V | E | S | T | L | V | P | T | L | M | F | A | Q | L | G | A | K | S | 280 |
| L | V | E | K | Y | D | L | S | H | L | K | R | F | S | N | G | D | R | P | A | 300 |
| S | K | E | I | G | E | M | V | K | K | R | F | K | P | N | G | A | R | Q | L | 320 |
| Y | G | L | T | E | T | T | S | A | V | L | I | V | T | K | D | A | T | G | P | 340 |
| G | S | T | G | K | I | V | P | F | H | A | Y | F | V | G | M | G | I | M | K | 360 |
| K | I | L | G | P | N | E | E | P | G | E | L | Y | F | K | D | A | T | G | K | 380 |
| Q | Y | Y | N | N | E | E | A | T | K | A | I | I | P | V | G | N | W | L | R | 400 |
| S | G | D | I | A | Y | Y | D | N | D | G | H | H | P | D | A | D | V | R | L | 420 |
| S | L | I | K | Y | K | G | Y | Q | V | A | P | A | E | I | E | V | R | I | A | 440 |
| Q | H | P | Y | I | V | D | A | G | V | T | G | I | P | D | E | E | A | G | E | 460 |
| L | P | A | A | G | V | V | V | Q | T | G | K | Y | L | N | E | E | G | V | Q | 480 |
| D | F | V | S | S | Q | V | S | T | G | K | I | D | R | K | V | G | L | F | M | 500 |
| D | E | I | P | K | G | S | T | G | K | I | D | R | K | V | G | L | F | K | F | 520 |
| E | K | H | T | N | G | | | | | | | | | | | | | | | 540 |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 546 |

FIG. 36

Luc78-0G8 (SEQ ID NO:20)

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|-----|-----|-----|
| M | A | D | K | N | I | L | Y | G | P | E | P | F | Y | P | L | A | D | 20 | | | |
| G | T | A | G | E | Q | M | F | Y | A | L | S | R | Y | A | D | I | S | G | C | 40 | |
| I | A | L | T | N | A | H | T | K | E | N | V | L | Y | E | E | F | L | K | L | 60 | |
| S | C | R | L | A | E | S | F | K | K | Y | G | L | K | Q | N | D | T | I | A | 80 | |
| V | C | S | E | N | G | L | Q | F | F | L | P | V | I | A | S | L | Y | L | G | 100 | |
| I | I | A | A | P | V | S | D | K | Y | I | E | R | E | L | I | H | S | L | G | 120 | |
| I | V | K | P | R | I | I | F | C | S | K | N | T | F | Q | K | V | L | N | V | 140 | |
| K | S | K | L | K | Y | V | E | T | I | I | I | L | D | L | N | E | D | L | G | 160 | |
| G | Y | Q | C | L | N | N | F | I | S | Q | N | S | D | I | N | L | D | V | K | 180 | |
| K | F | K | P | Y | S | F | N | R | D | D | Q | V | A | L | V | M | F | S | S | 200 | |
| G | T | T | G | V | P | K | G | V | M | L | T | H | K | N | I | V | A | R | F | 220 | |
| S | L | A | K | D | P | T | F | G | N | A | I | N | P | T | T | A | I | L | T | 240 | |
| V | I | P | F | H | H | G | F | G | M | T | T | L | G | Y | F | T | C | G | 260 | | |
| F | R | V | Y | L | M | H | T | F | E | E | K | L | F | L | Q | S | L | Q | D | 280 | |
| Y | K | V | E | S | T | L | L | V | P | T | L | M | A | F | L | A | K | S | A | 300 | |
| L | V | E | K | Y | D | L | S | H | L | K | E | I | A | S | G | G | A | P | L | 320 | |
| S | K | E | I | G | E | M | V | K | K | R | F | K | L | N | F | V | R | Q | G | 340 | |
| Y | G | L | T | E | T | T | S | A | V | L | I | T | P | K | X | X | V | R | P | 360 | |
| G | S | T | G | K | I | V | P | F | H | A | V | K | V | V | D | P | T | T | G | 380 | |
| K | I | L | G | P | N | E | P | G | E | L | Y | F | K | G | D | M | I | M | K | 400 | |
| G | Y | Y | N | N | E | E | A | T | K | A | I | I | D | K | D | G | W | L | R | 420 | |
| S | G | D | I | A | Y | Y | D | N | D | G | H | F | Y | I | V | D | R | L | K | 440 | |
| S | L | I | K | Y | K | G | Y | Q | V | A | P | A | E | I | E | G | I | L | L | 460 | |
| Q | H | P | Y | I | V | D | A | G | V | T | G | I | P | D | E | A | A | G | E | 480 | |
| L | P | A | A | G | V | V | V | Q | T | G | K | Y | L | N | E | Q | I | V | Q | 500 | |
| N | F | V | S | S | Q | V | V | S | T | A | K | W | L | R | G | G | V | K | F | L | 520 |
| D | E | I | P | K | G | S | T | G | K | I | D | R | K | V | L | R | Q | M | F | 540 | |
| E | K | H | T | N | G | | | | | | | | | | | | | | | 546 | |

FIG. 37

Luc78-1E1 (SEQ ID NO:21)

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|---|-----|
| M | A | D | K | N | I | L | Y | G | P | E | P | F | Y | P | L | A | D | 20 | | |
| G | T | A | G | E | Q | M | F | D | A | L | S | R | Y | A | D | I | P | G | C | 40 |
| I | A | L | T | N | A | H | T | K | E | N | V | L | Y | E | E | F | L | K | L | 60 |
| S | C | R | L | A | E | S | F | K | K | Y | G | L | K | Q | N | D | T | I | A | 80 |
| V | C | S | E | N | G | L | Q | Y | F | L | P | V | I | A | S | L | Y | L | G | 100 |
| I | I | A | A | P | V | S | D | K | Y | I | E | R | E | L | I | H | S | L | G | 120 |
| I | V | K | P | R | I | I | F | C | S | K | N | T | F | Q | K | V | L | N | V | 140 |
| K | S | K | L | K | Y | V | E | T | I | I | I | L | D | L | N | E | D | L | G | 160 |
| G | Y | Q | C | L | N | N | F | I | S | Q | N | S | D | I | N | L | D | V | K | 180 |
| K | F | K | P | N | S | F | N | R | D | D | Q | V | A | L | V | M | F | S | S | 200 |
| G | T | T | G | V | P | K | G | V | M | L | T | H | K | N | I | V | A | R | F | 220 |
| S | I | A | K | D | P | T | F | G | N | A | I | N | P | T | T | A | I | L | T | 240 |
| V | I | P | F | H | H | G | F | G | M | M | T | T | L | G | Y | F | T | C | G | 260 |
| F | R | V | V | L | M | H | T | F | E | E | K | L | F | L | Q | S | L | Q | D | 280 |
| Y | K | V | E | S | T | L | L | V | P | T | L | M | A | F | L | A | K | S | A | 300 |
| L | V | E | K | Y | D | L | S | H | L | K | E | I | A | S | G | G | A | P | L | 320 |
| S | K | E | I | G | E | M | V | K | K | R | F | K | L | N | F | V | R | Q | G | 340 |
| Y | G | L | T | E | T | T | S | A | V | L | I | T | P | K | X | X | A | R | P | 360 |
| G | S | T | G | K | I | V | P | F | H | A | V | K | V | V | D | P | T | T | G | 380 |
| K | I | L | G | P | N | E | P | G | E | L | Y | F | K | G | A | M | I | M | K | 400 |
| G | Y | Y | N | N | E | E | A | T | K | A | I | I | D | K | D | G | W | L | R | 420 |
| S | G | D | I | A | Y | Y | D | N | D | G | H | F | Y | I | V | D | R | L | K | 440 |
| S | L | I | K | Y | K | G | Y | Q | V | A | P | A | E | I | E | G | I | L | L | 460 |
| Q | H | P | Y | I | V | D | A | G | V | T | G | I | P | D | E | A | A | G | E | 480 |
| L | P | A | A | G | V | V | V | Q | T | G | K | Y | L | N | E | Q | I | V | Q | 500 |
| N | F | V | S | S | Q | V | S | T | A | K | W | L | R | G | G | V | K | F | L | 520 |
| D | E | I | P | K | G | S | T | G | K | I | D | R | K | V | L | R | Q | M | F | 540 |
| E | K | H | T | N | G | | | | | | | | | | | | | | | 546 |

FIG. 38

Luc78-2B4 (SEQ ID NO:22)

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|---|-----|-----|
| M | A | D | K | N | I | L | Y | G | P | E | P | F | Y | P | L | A | D | 20 | | | |
| G | T | A | G | E | Q | M | F | D | A | L | S | R | Y | A | D | I | P | G | C | 40 | |
| I | A | L | T | N | A | H | T | K | E | N | V | L | Y | E | E | F | L | K | L | 60 | |
| S | C | R | L | A | E | S | F | K | K | Y | G | L | K | Q | N | D | T | I | A | 80 | |
| V | C | S | E | N | G | L | Q | F | F | L | P | V | I | A | S | L | Y | L | G | 100 | |
| I | I | A | A | P | V | S | D | K | Y | Y | E | R | E | L | I | H | S | L | G | 120 | |
| I | V | K | P | R | I | I | F | C | S | K | N | T | F | Q | K | V | L | N | V | 140 | |
| K | S | K | L | K | Y | V | E | T | I | I | I | L | D | L | N | E | D | L | G | 160 | |
| G | Y | Q | C | L | N | N | F | I | S | Q | N | S | D | S | N | L | D | V | K | 180 | |
| K | F | K | P | N | S | F | N | R | R | D | D | Q | V | A | L | V | M | F | S | S | 200 |
| G | T | T | G | V | P | K | G | V | M | L | T | H | K | N | I | V | A | R | F | 220 | |
| S | L | A | K | D | P | T | F | G | N | A | I | N | P | T | T | A | I | L | T | 240 | |
| V | I | P | F | H | H | G | F | G | M | M | T | T | L | G | Y | F | T | C | G | 260 | |
| F | R | V | V | L | M | H | T | F | E | E | K | L | F | L | Q | S | L | Q | D | 280 | |
| Y | K | V | E | S | T | L | L | V | P | T | L | M | A | F | L | A | K | S | A | 300 | |
| L | V | E | K | Y | D | L | S | H | L | K | E | I | A | S | G | G | A | P | L | 320 | |
| S | K | E | I | G | E | M | V | K | K | R | F | K | L | N | F | V | R | Q | G | 340 | |
| Y | G | L | T | E | T | T | S | A | V | L | I | T | P | K | X | X | A | R | P | 360 | |
| G | S | T | G | K | I | V | P | F | H | A | V | K | V | V | D | P | T | T | G | 380 | |
| K | I | L | G | P | N | E | T | G | E | L | Y | F | K | G | A | M | I | M | K | 400 | |
| G | Y | Y | N | N | E | E | A | T | K | A | I | I | D | K | D | G | W | L | R | 420 | |
| S | G | D | I | A | Y | Y | D | N | D | G | H | F | Y | I | V | D | R | L | K | 440 | |
| S | L | I | K | Y | K | G | Y | Q | V | A | P | A | E | I | E | G | I | L | L | 460 | |
| Q | H | P | Y | I | V | D | A | G | V | T | G | I | P | D | E | A | A | G | E | 480 | |
| L | P | A | A | G | V | V | V | Q | T | G | K | Y | L | N | E | Q | I | V | Q | 500 | |
| N | F | V | S | S | Q | V | S | T | A | K | W | L | R | G | G | V | K | F | L | 520 | |
| D | E | I | P | K | G | S | T | G | K | I | D | R | K | V | L | R | Q | M | F | 540 | |
| E | K | H | T | N | G | | | | | | | | | | | | | | | 546 | |

FIG. 39

luc85-4F12 (SEQ ID NO:10)

| | | | | | | |
|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|------|
| GGATCCAATG | GCAAGATAAAA | ATATTTATA | TGGGCCGAA | CCATTTTATC | CCTTGCGTGA | 60 |
| TGGGACGGCT | GGAGAACAGA | TGTTCACGC | ATTATCTCGT | TATGCAGATA | TTCCCGGCTG | 120 |
| CATAGCATTG | ACAAATGCTC | ATACAAAAGC | CCCTGTTTA | TATGAAGAGT | TTTTAAAATT | 180 |
| GTCGTGTCGT | TTAGCGGAAA | GTTTTAAAAA | GTATGGATTA | AAACAAAACG | ACACAATAGC | 240 |
| GGTGTGTAGC | AAAAATGGTT | TGCAATTTT | CCTTCCTGTA | ATTGCATCAT | TGTATCTTGG | 300 |
| AATAATTGTC | GCACCTGTTA | ACGATAAAA | CATIGAACGT | GAATTAATAC | ACAGTCTTGG | 360 |
| TATTGAAAAA | CCACGCATAG | TTTTTGCTC | CAAGAATACT | TTTCAAAAG | TACTGAATGT | 420 |
| AAAATCTAAA | TTAAAATCTG | TAGAAACTAT | TATTATATA | GACTTAAATG | AAGACTTACG | 480 |
| AGGTTATCAA | TGCCTCAACA | ACTTTATTC | TCAAAATTCC | GATATTAATC | TTGACGCTAAA | 540 |
| AAAATTAAAA | CCATATTCTT | TTAATCGAGA | CGATCAGGTT | CGGTTGATTA | TGTTTCTTC | 600 |
| TGGTACAAC | GGTCTGCGGA | AGGGAGTCAT | GCTAACTCAC | AAGAATATTG | TTGACGATT | 660 |
| TTCTCTTCA | AAAGATCTTA | CTTTGGTAA | CGCAATTAA | CCGACGACAG | CAATTTAAC | 720 |
| GGTAATACCT | TTCCACCAGT | GTGTTGGTAT | GATGACCAACA | TTAGGATACT | TTACTTGTTG | 780 |
| ATTCCGAGTT | GTTCTAATGC | ACACGTTGA | AGAAAAACTA | TTTCTACAAT | CATTACAAGA | 840 |
| TTATAAAGTG | GAAAGTACTT | TACTTGTACC | AACATTAATG | GCATTTCTG | CAAAAGTGC | 900 |
| ATTAGTTGAA | AAAGTACGATT | TATGCCACTT | AAAAGAAATT | GCATCTGGTG | GGCACCTTT | 960 |
| ATCAAAAGAA | ATTGGGGAGA | TGGTAAAAAA | ACGGTTAAA | TTAAACTTTG | TCAGGCAAGG | 1020 |
| GTATGGATTA | ACAGAAACCA | CTTGGCTGT | TTAATTACA | CCGAAADXXXX | XGGCGAGACC | 1080 |
| GGGATCAACT | GGTAAAATAG | TACCATTTCA | CGCTGTTAA | GTGTCGATC | CTACAAACAGG | 1140 |
| AAAATTTG | GGGCCAATG | AACCTGGAGA | ATTGTATT | AAAGGCCCCA | TGATAATGAA | 1200 |
| GGGTTATTAT | ATAATGAAG | AAGCTACTAA | AGCAATTATT | GATAATGACG | GATGGTTGCG | 1260 |
| CTCTGGTGAT | ATTGCTTATT | ATGACAATGA | TGGCCATT | TATATTGTGG | ACAGGCTGAA | 1320 |
| GTCATTAAATT | AAATATAAAG | GTTATCAGGT | TGCACCTGCT | GAAATTGAGG | GAATACCTT | 1380 |
| ACAACATCG | TATATTGTG | ATGCCGGGT | TACTGGTATT | CCGGATGAG | CGCGGGCGA | 1440 |
| GCTTCCAGCT | GCAGGTGTTG | TAGTACAGAC | TGGAAAATAT | CTAAACGAAC | AAATCGTACA | 1500 |
| AAATTTGTT | TCCAGTCAAG | TTTCAACAGC | CAAATGGCTA | CGTGGTGGGG | TGAAATTTT | 1560 |
| GGATGAAATT | CCCAAAGGAT | CAACTGGAAA | AATTGACAGA | AAAGTGTAA | GACAAATGTT | 1620 |
| TGAAAAACAC | ACCAATGGG | | | | | 1639 |

FIG. 40

Luc85-4F12 (SEQ ID NO:23)

M A D K N I L Y G P E P F Y P L A D 20
G T A G E Q M F D A L S R Y A D I P G C 40
I A L T N A H T K E N V L Y E E F L K L 60
S C R L A E S F K K Y G L K Q N D T I A 80
V C S E N G L Q F F L P V I A S L Y L G 100
I I V A P V N D K Y I E R E L I H S L G 120
I V K P R I I F C S K N T F Q K V L N V 140
K S K L K S V E T I I I L D L N E D L G 160
G Y Q C L N N F I S Q N S D I N L D V K 180
K F K P Y S F N R D D Q V A L I M F S S 200
G T T G L P K G V M L T H K N I V A R F 220
S L A K D P T F G N A I N P T T A I L T 240
V I P F H H G F G M M T T L G Y F T C G 260
F R V V L M H T F E E K L F L Q S L Q D 280
Y K V E S T L L V P T L M A F L A K S A 300
L V E K Y D L S H L K E I A S G G A P L 320
S K E I G E M V K K R F K L N F V R Q G 340
Y G L T E T T S A V L I T P K X X A R P 360
G S T G K I V P F H A V K V V D P T T G 380
K I L G P N E P G E L Y F K G P M I M K 400
G Y Y N N E E A T K A I I D N D G W L R 420
S G D I A Y Y D N D G H F Y I V D R L K 440
S L I K Y K G Y Q V A P A E I E G I L L 460
Q H P Y I V D A G V T G I P D E A A G E 480
L P A A G V V V Q T G K Y L N E Q I V Q 500
D F V S S Q V S T A K W L R G G V K F L 520
D E I P K G S T G K I D R K V L R Q M F 540
E K H T N G 546

FIG. 41

Luc90-1B5 (SEQ ID NO:11)

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| GGATCCAATG G C AGATAAGA ATATTTATA TGGGCCQGAA CCATTTATC CCTTGGAAAGA | 60 |
| TGGGACGGCT GGAGAACAGA TGTTT G ACGC ATTATCTCGT TATGCAGATA TTCCGGG C TG | 120 |
| CATAGCATTG ACA A ATGCTC ATACAAAAGA AAATGTTTA TATGAAGAGT TT G AAACT | 180 |
| GTCGTGTCGT TTAGCGGAAA GTTTAAAAA GTATGGATTA AAACAAAACG ACACAATAGC | 240 |
| GGTGTGTAGC GAAAATGGT G TGCAATT T CCTCCTGTA ATTGCATCAT TGTATCTTGG | 300 |
| AATAATTG T GCACCTGTTA ACGATAAAATA CATTGAACGT GAATTAA T AC ACAGTCTTGG | 360 |
| TATTG T AAA CCACG C ATAG TTTTG G TC CAAGAAT T CT TT C AAAAG TACTGAATGT | 420 |
| AAAATCTAAA T T AAAATG T TA G AAACTAT TATTATTTA GACTTAAATG AAGACTTAGG | 480 |
| AGGTTATCAA TGCC T CAACA ACTTTATTTC TCAAAATTCC GATA G TAATC T G ACG T AAA | 540 |
| AAAATTAAA CCATATTCTT TTAATOGAGA CGATCAG G TT CG T YG T TA TGTTTCTTC | 600 |
| TGGTACA A CT GGTCTGCCGA AGGGAGTCAT GCTA A CTCAC AAGAATATTG TTG C ACGATT | 660 |
| TTCTCTG C AA AAAGATCC T CT T TTGGTAA CGCAATT A AT CCCACGACAG CAATT T TAAC | 720 |
| GGTAATACCT TTCCACCAG G GTTTGGTAT GATGACCAC A TTAGGATACT TTACTTG T GG | 780 |
| ATTCCGAGTT GTCTAA T GC ACACGTT G A AGAAA A CTA TT T CTACAA T CATTACAAGA | 840 |
| TTATAAAGT G GAAAGTACTT TACTTOTACC AACATTAATG GCATT T GT G CAAAAGTGC | 900 |
| ATTAGT G AA AAGTACGATT TATCC C ACTT AAAAGAAATT GCATCTGGTG GCGCACCTT | 960 |
| ATC A AAAGAA ATTGGGGAGA TGGT G AAAAA ACGGTTAAA TTAAACT T TC TCAGGCAAGG | 1020 |
| GTATGGATTA ACAGAAACCA CTTCGGCTGT TT T AATT A CA CCG A AGGTG ACG C AA D ACC | 1080 |
| GGGATCAACT GGTAAAATAG TACCA T CA CGCTGTTAAA GTTGT C GATC CTACACAGG | 1140 |
| AAAATT T TG GGGCC A ATG AA C TGGAGA ATTGTATTTT AAAGG C CGA TGATAATGAA | 1200 |
| GGGTTATTAT AATAATGAAG AAGCTACTAA AGCAATT A IT GATAATG A CG GATGGT T CG | 1260 |
| CTCTGGTGAT ATTGCTTATT ATGACAATGA TGGCCATT T T TATATTGT G ACAGGCTGAA | 1320 |
| GTCACT T ATT AAATATAAAG GTTATCAGGT TGCA C CTGCT GAAATTGAGG GAATACTCTT | 1380 |
| ACAACATCCG TATATTGT G ATGCCGGGT TACTGGTATA CCGGATGAAG CCGCGGGCGA | 1440 |
| GCTTCCAGCT GCAGGTGT G TAGTACAGAC TGGAAAATAT CTAAACGAAC AAATCGTACA | 1500 |
| AGATTATGTT GCCAGTCAAG TTCA C ACAGC CAAATGGCTA CGTGGT G GG TGAAAATTTT | 1560 |
| GGATGA A TT CCCAAGGAT CAACTGGAAA AATTGACAGA AAAGTGT T AA GACAAATGTT | 1620 |
| TGAAAACAC ACCAATG GG | 1639 |

FIG. 42

Luc90-1B5 (SEQ ID NO:24)

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|---|---|-----|-----|----|----|
| | M | A | D | K | N | I | L | Y | G | P | E | F | P | Y | P | Y | P | Y | P | L | E | G | D | 20 |
| G | T | A | G | E | Q | M | F | D | A | L | V | G | S | R | E | Q | A | E | I | P | C | L | 40 | |
| I | A | L | T | N | A | H | T | K | E | N | Y | G | P | L | L | Q | Q | T | F | P | LAG | 60 | | |
| S | C | R | L | A | E | S | F | K | K | P | L | V | R | L | L | R | T | Y | D | G | G | 80 | | |
| V | C | S | E | N | G | L | Q | F | F | G | P | E | Y | Y | Y | E | E | S | I | V | V | 100 | | |
| I | I | V | Y | A | P | V | N | D | K | Y | I | K | E | F | K | I | E | PL | T | Y | G | 120 | | |
| I | K | S | Y | P | R | I | V | F | E | N | I | N | N | D | D | D | D | TY | Y | S | V | 140 | | |
| G | K | K | Q | K | K | S | N | F | F | I | I | I | I | I | I | I | I | PL | Y | L | L | 160 | | |
| G | T | T | P | T | P | S | P | N | F | S | S | S | S | S | S | S | S | TY | S | M | N | 180 | | |
| S | L | A | A | K | K | D | P | D | G | V | V | V | V | V | V | V | V | PL | M | V | V | 200 | | |
| V | I | P | V | F | H | H | H | T | F | G | G | G | G | G | G | G | G | FA | A | F | F | 220 | | |
| F | R | V | V | E | S | T | L | L | F | F | F | F | F | F | F | F | F | PL | T | C | T | 240 | | |
| Y | K | V | E | K | S | D | L | L | E | E | E | E | E | E | E | E | E | AI | I | L | Q | 260 | | |
| L | S | K | E | I | G | H | M | N | M | M | M | M | M | M | M | M | M | ITY | Y | A | S | 280 | | |
| S | Y | G | L | T | G | K | T | T | S | S | S | S | S | S | S | S | S | Q | F | A | G | 300 | | |
| G | K | S | T | G | K | I | N | E | P | P | P | P | P | P | P | P | P | PL | A | T | T | 320 | | |
| K | I | Y | Y | N | N | Y | Y | Y | A | A | A | A | A | A | A | A | A | FA | I | T | M | 340 | | |
| Q | S | G | D | I | K | A | Y | K | G | G | G | G | G | G | G | G | G | PL | A | T | L | 360 | | |
| S | S | L | I | P | Y | I | V | V | D | D | D | D | D | D | D | D | D | AT | I | T | Q | 380 | | |
| Q | H | P | A | A | G | S | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | AR | R | R | R | 400 | | |
| L | P | V | A | A | S | K | S | S | T | T | T | T | T | T | T | T | T | AT | T | T | T | 420 | | |
| D | X | E | I | P | A | P | K | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | W | R | R | R | 440 | | |
| E | K | H | T | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | IA | I | I | I | 460 | | |

FIG. 43

lucPpe2 [T249M] (SEQ ID NO:12)

| | | | | | | |
|-------------|------------|-------------|-------------|------------|------------|------|
| GGATCCAATG | GAAGATAAAA | ATATTTATA | TGGACCTGAA | CCATTTATC | CCTGGCTGA | 60 |
| TGGGACGGCT | GGAGAACAGA | TGTTTACGC | ATTATCTCGT | TATGCAGATA | TTTCAGGATG | 120 |
| CATAGCATTG | ACAAATGCTC | ATACAAAAGA | AAATGTTTA | TATGAAGAGT | TTTTAAAATT | 180 |
| GTCGTGTCGT | TTAGCGGAAA | GTTTAAAAA | GTATGGATT | AAACAAAACG | ACACAATAGC | 240 |
| GGTGTGTAGC | AAAAATGGTT | TGCAATTTT | CCTCCCTTA | ATTGCATCAT | TGTATCTGG | 300 |
| AATAATTGCA | GCACCTGTTA | GTGATAAAATA | CATTGAACGT | GAATTAATAC | ACAGTCTGG | 360 |
| TATTGAAAAA | CCACGCATAA | TTTTTGTTTC | CAAGAACTACT | TTTCAAAAG | TACTGAATGT | 420 |
| AAAATCTAAA | TTAAAATATG | TAGAAACTAT | TATTATTTA | GACTTAAATG | AAGACTTAGG | 480 |
| AGGTTATCAA | TGCCTCAACA | ACTTTATTC | TCAAAATTCC | GATATTAATC | TTGACGTAAA | 540 |
| AAAATTTAAA | CCAAATTCTT | TTAATCGAGA | CGATCAGTT | CGTTGGTAA | TGTTTCTTC | 600 |
| TGGTACAAC | GGTGTTCGA | AGGGAGTCAT | GCTAACTCAC | AAGAATATTG | TTGCACGATT | 660 |
| TTCTCATTCG | AAAGATCTA | CTTTGGTAA | CGCAATTAAT | CCAACGACAG | CAATTTAAC | 720 |
| GGTAATACCT | TTCCACCATG | GTTTGGTAT | GATGACCACA | TTAGGATACT | TTACTGTGG | 780 |
| ATTCCGAGTT | GCTCTAATGC | ACACGTTGA | AGAAAAACTA | TTTCTACAT | CATTACAAGA | 840 |
| TTATAAAAGTG | GAAAGTACTT | TACTTGTACC | AACATTAATG | GCATTTTTG | CAAAAAGTGC | 900 |
| ATTAGTTGAA | AGTACGATT | TATGCCACTT | AAAAGAAATT | GCATCTGGT | GGCACCTTT | 960 |
| ATCAAAAGAA | ATTGGGGAGA | TGGTAAAAA | ACGGTTAAA | TTAAACTTG | TCAGGCAAGG | 1020 |
| GTATGGATT | ACAGAAACCA | CTTCGGCTGT | TTAATTACA | CCGGACACTG | ACGTCAGACC | 1080 |
| GGGATCAACT | GGTAAAATAG | TACCATTTCA | CGCTGTTAA | GTGTCGATC | CTACAACAGG | 1140 |
| AAAAATTTG | GGGCCAAATG | AAACTGGAGA | ATTGTATTT | AAAGGCGACA | TGATAATGAA | 1200 |
| AAGTTATTAT | AATAATGAAG | AAGCTACTAA | AGCAATTATT | AACAAAGACG | GATGGTTGCG | 1260 |
| CTCTGGTGT | ATTGCTTATT | ATGACAATGA | TGGCCATT | TATATTGTGG | ACAGGCTGAA | 1320 |
| GTCATTAATT | AAATATAAAG | GTTATCAGGT | TGCACCTGCT | GAAATTGAGG | GAATACTCTT | 1380 |
| ACAACATCCG | TATATTGTG | ATGCCGGCGT | TACTGGTATA | CCGGATGAAG | CCGGGGCGA | 1440 |
| GCTTCAGCT | GCAGGTGTG | TAGTACAGAC | TGGAAAATAT | CTAACCGAAC | AAATCGTACA | 1500 |
| AAATTTGTT | TCCAGTCAAG | TTTCAACAGC | CAAATGGCTA | CGTGGTGGGG | TGAAATTTT | 1560 |
| GGATGAAATT | CCCAAAGGAT | CAACTGGAAA | AATTGACAGA | AAAGTGTAA | GACAAATGTT | 1620 |
| TGAAAAACAC | AAATCTAAC | TG | | | | 1642 |

FIG. 44

LucPpe2 [T249M] (SEQ ID NO:25)

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|-----|-----|
| M | E | D | K | N | I | L | Y | G | P | E | P | F | Y | P | L | A | D | 20 | | | |
| G | T | A | G | E | Q | M | F | Y | A | L | S | R | Y | A | D | I | S | G | C | 40 | |
| I | A | L | T | N | A | H | T | K | E | N | V | L | Y | E | F | L | K | L | 60 | | |
| S | C | R | L | A | E | S | F | K | K | Y | G | L | K | Q | N | D | T | I | A | 80 | |
| V | C | S | E | N | G | L | Q | F | F | L | P | L | I | A | S | L | Y | L | G | 100 | |
| I | I | A | A | P | V | S | D | K | Y | I | E | R | E | L | I | H | S | L | G | 120 | |
| I | V | K | P | R | I | I | F | C | S | K | N | T | F | Q | K | V | L | N | V | 140 | |
| K | S | K | L | K | Y | V | E | T | I | I | I | L | D | L | N | E | D | L | G | 160 | |
| G | Y | Q | C | L | N | N | F | I | S | Q | N | S | D | I | N | L | D | V | K | 180 | |
| K | F | K | P | N | S | F | N | R | R | D | D | Q | V | A | L | V | M | F | S | S | 200 |
| G | T | T | G | V | S | K | G | V | M | L | T | H | K | N | I | V | A | R | F | 220 | |
| S | H | C | K | D | P | T | F | G | N | A | I | N | P | T | T | A | I | L | T | 240 | |
| V | I | P | F | H | H | G | F | G | M | M | T | T | L | G | Y | F | T | C | G | 260 | |
| F | R | V | A | L | M | H | T | F | E | E | K | L | F | L | Q | S | L | Q | D | 280 | |
| Y | K | V | E | S | T | L | L | V | P | T | L | M | A | F | F | A | K | S | A | 300 | |
| L | V | E | K | Y | D | L | S | H | L | K | E | I | A | S | G | G | A | P | L | 320 | |
| S | K | E | I | G | E | M | V | K | K | R | F | K | L | N | F | V | R | Q | G | 340 | |
| Y | G | L | T | E | T | T | S | A | V | L | I | T | P | D | T | D | V | R | P | 360 | |
| G | S | T | G | K | I | V | P | F | H | A | V | K | V | V | D | P | T | T | G | 380 | |
| K | I | L | G | P | N | E | T | G | E | L | Y | F | K | G | D | M | I | M | K | 400 | |
| G | Y | Y | N | N | E | E | A | T | K | A | I | I | N | K | D | G | W | L | R | 420 | |
| S | G | D | I | A | Y | Y | D | N | D | G | H | F | Y | I | V | D | R | L | K | 440 | |
| S | L | I | K | Y | K | G | Y | Q | V | A | P | A | E | I | E | G | I | L | L | 460 | |
| Q | H | P | Y | I | V | D | A | G | V | T | G | I | P | D | E | A | A | G | E | 480 | |
| L | P | A | A | G | V | V | V | Q | T | G | K | Y | L | N | E | Q | I | V | Q | 500 | |
| N | F | V | S | S | Q | V | S | T | A | K | W | L | R | G | G | V | K | F | L | 520 | |
| D | E | I | P | K | G | S | T | G | K | I | D | R | K | V | L | R | Q | M | F | 540 | |
| E | K | H | K | S | K | L | | | | | | | | | | | | | | 547 | |

FIG. 45

LucPpL 81-6G1 (SEQ ID NO:26)

M M K R E K N V I Y G P E P L H P L E D 20
L T A G E M L F R A L R K H S H L P Q A 40
L V D V V G D E S L S Y K E F F E A T V 60
L L A Q S L H N C G Y K M N D V V S I C 80
A E N N T R F F I P V I A A W Y I G M I 100
V A P V N E S Y I P D E L C K V M G I S 120
K P Q I V F T T K N I L N K V L E V Q S 140
R T N F I K R I I I L D T V E N I H G C 160
E S L P N G I S R Y S D G N I A N F K P 180
L H E D P V E Q V A A I L C S S G T T G 200
L P K G V M Q T H Q N I C V R L I H A L 220
D P R A G T Q L I P G V T V L V Y L P F 240
F H A F G F S I T L G Y F M V G L R V I 260
M E R R F D Q E A F L K A I Q D Y E V R 280
S V I N V P S V I L F L S K S P L V D K 300
Y D L S S L R E L C C G A A P L A K E V 320
A E V A A K R L N L P G I R C G F G L T 340
E S T S A N I H S L R D E F K S G S L G 360
R V T P L M A A K I A D R E T G K A L G 380
P N Q V G E L C I K G P M V S K G Y V N 400
N V E A T K E A I D D D G W L H S G D F 420
G Y Y D E D E H F Y V V D R Y K E L I K 440
Y K G S Q V A P A E L E E I L L K N P C 460
I R D V A V V G I P D L E A G E L P S A 480
F V V K Q P G K E I T A K E V Y D Y L A 500
E R V S H T K Y L R G G V R F V D S I P 520
R N V T G K I T R K E L L K Q L L E K A 540
G G 542

FIG. 46

LucPpl 81-6G1

ATGATGAAGC GAGAGAAAAA TGTTATATAT GGACCCGAAC CCCTACACCC CTTGGAAGAC
 TTAACAGCTG GAGAAATGCT CTTCGGTGCC CTTCGAAAAC ATTCTCATT ACCGCAGGCT
 TTAGTAGATG TGGTTGGQGA CGAACATGCTT TCCTATAAAAG AGTTTTTGA AGCGACAGTC
 CTCCTAGCGC AAAGTCTCCA CAATTGTGGA TACAAGATGA ATGATGTAGT GTCGATCTGC
 GCCGAGAATA ATACAAGATT TTTTATTCCC GTTATTGCAG CTGGTATAT TGGTATGATT
 GTAGCACCTG TTAATGAAAG TTACATCCCA GATGAACCTCT GTAAGGTGAT GGGTATATCG
 AAACCAACAA TAGTTTTAC GACAAAGAAC ATTTAAATA AGGTATTGGA GGTACAGAGC
 AGAACTAATT TCATAAAAAG GATCATCATA CTTGATACTG TAGAAAACAT ACACGTTGT
 GAAAGCTTC CCAATTAT TCTCGTTAT TCGGATGGAA ATATTGCCA CTTCAAACCT
 TTACATTTCG ATCCCTGTTGA GCAAGTGGCA GCTATCTTAT GTGCGTCAGG CACTACTGGA
 TTACCGAAAG GTGTAATGCA AACTCACCAA AATATTGTG TCGACTTAT ACATGCTTA
 GACCCCAGGG CAGGAACGCA ACTTATTCCCT GGTGTGACAG TCTTAGTATA TCTGCCTTT
 TTCCATGCTT TTGGTTCTC TATAACCTTG GGATACTTCA TGGTGGGTCT TCGTGTATC
 ATGTTAGAC GATTGATCA AGAACATT CTAAAAGCTA TTCAGGATTA TGAAGTTGA
 AGTGTAAATT ACGTTCCATC AGTAATATTG TTCTTATGAA AAAGTCCTT GGTGACAAA
 TACGATTAT CAAGTTTAAG GGATTGTTGT TGCGGTGCGG CACCATTAGC AAAAGAAGTT
 GCTGAGGTTG CAGCAAAACG ATTAACCTTG CCAGGAATTTC GCTGTGGATT TGGTTGACA
 GAATCTACTT CAGCTAAATAT ACACAGTCTT AGGGATGAAT TAAATCAGG ATCACTTGG
 AGAGTTACTC CTTAATGGC AGCTAAAATA GCAGATAGGG AACTGGTAA AGCATTGGGA
 CCAAATCAAG TTGGTGAATT ATGCATTAAA GGTCCCATGG TATCGAAAGG TTACGTGAAC
 AATGTAGAAG CTACCAAAAGA AGCTATTGAT GATGATGGTT GGCTTCACTC TGGAGACTTT
 GGATACTATG ATGAGGATGA GCATTCTAT GTGGTGGACC GTTACAAGGA ATTGATTA
 TATAAGGGCT CTCAGGTAGC ACCTGCAGAA CTAGAAGAGA TTTTATTGAA AAATCCATGT
 ATCAGAGATG TTGCTGTGGT TGGTATTCCCT GATCTAGAAG CTGGAGAACT GCCATCTGCG
 TTTGTGGTTA AACAGCCCCG AAAGGAGATT ACAGCTAAAG AAGTGTACGA TTATCTGCC
 GAGAGGGTCT CCCATACAAA GTATTGCGT GGAGGGGTTG GATTGTTGA TAGCATACCA
 AGGAATGTTA CAGGTAAAAT TACAAGAAAG GAACTCTGA AGCAGTTGCT GGAGAAGGGCG
GGAGGT

FIG. 47

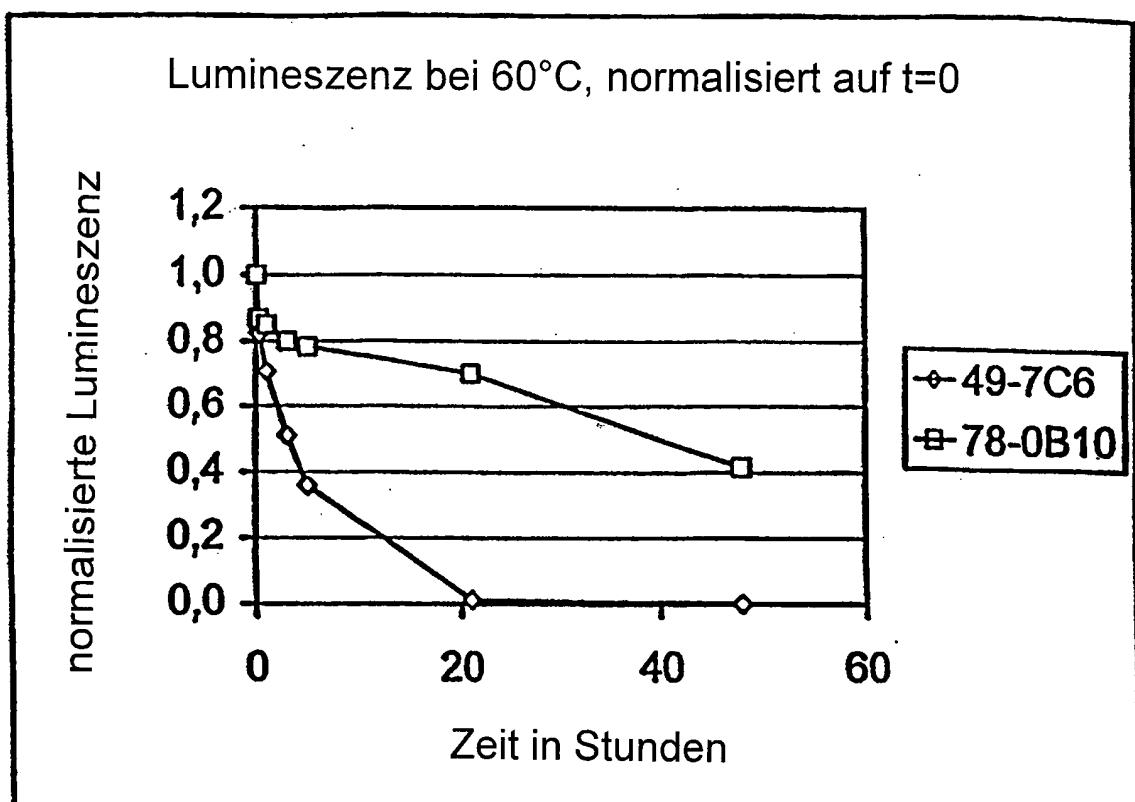


FIG. 48

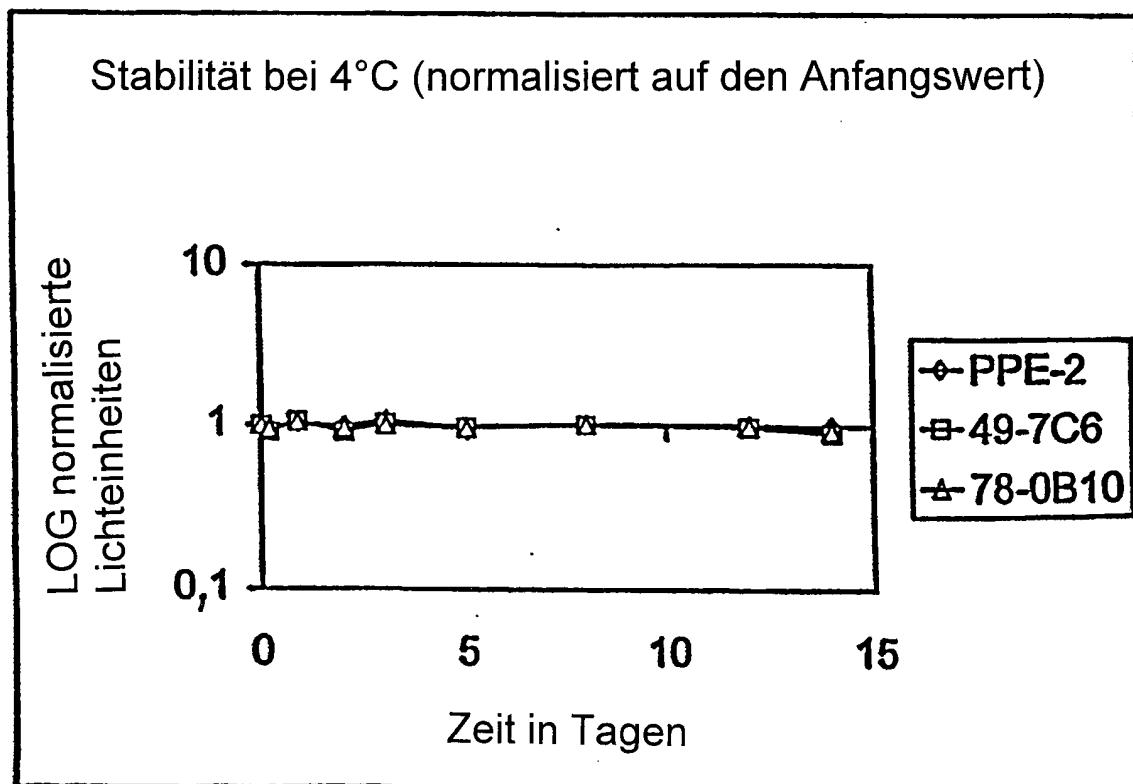


FIG. 49

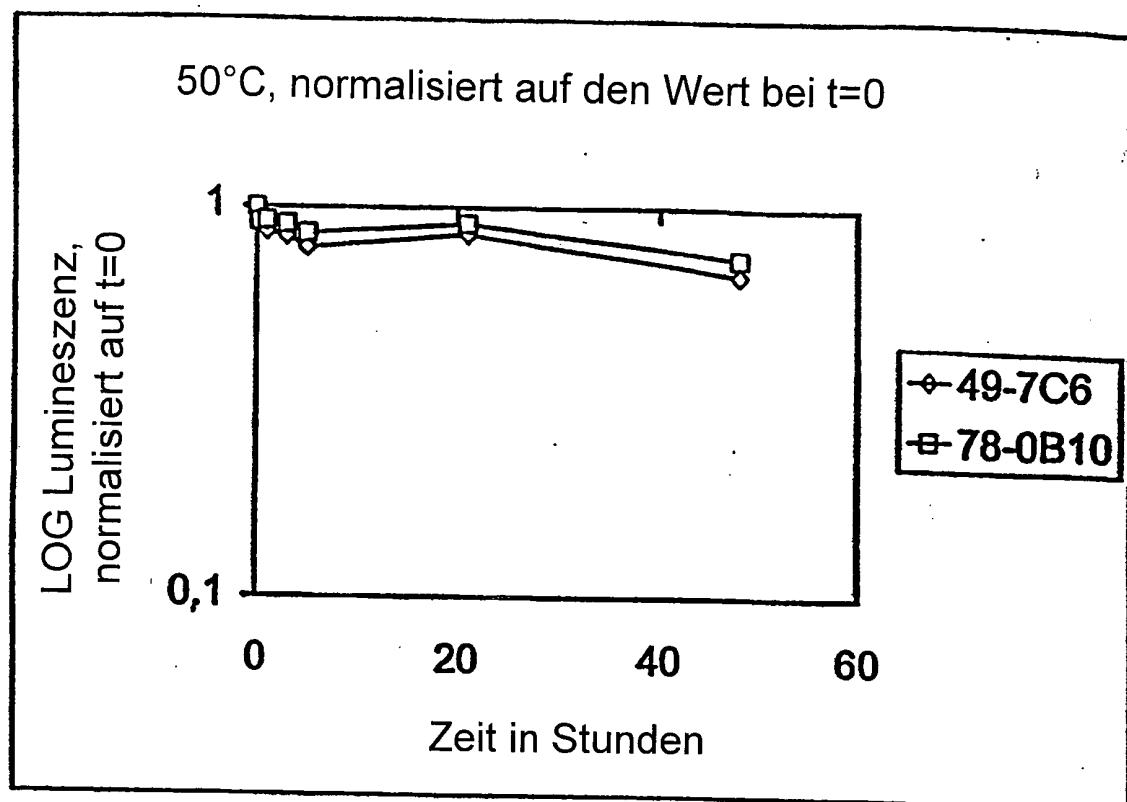


FIG. 50

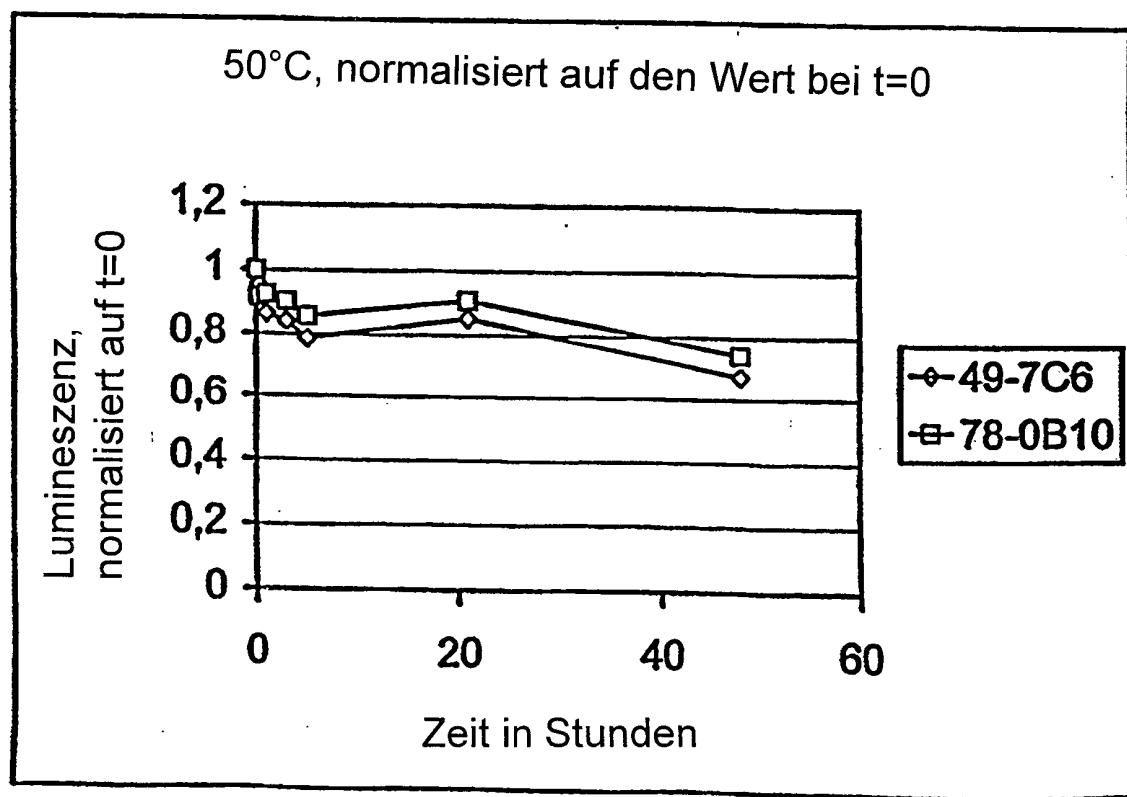


FIG. 51

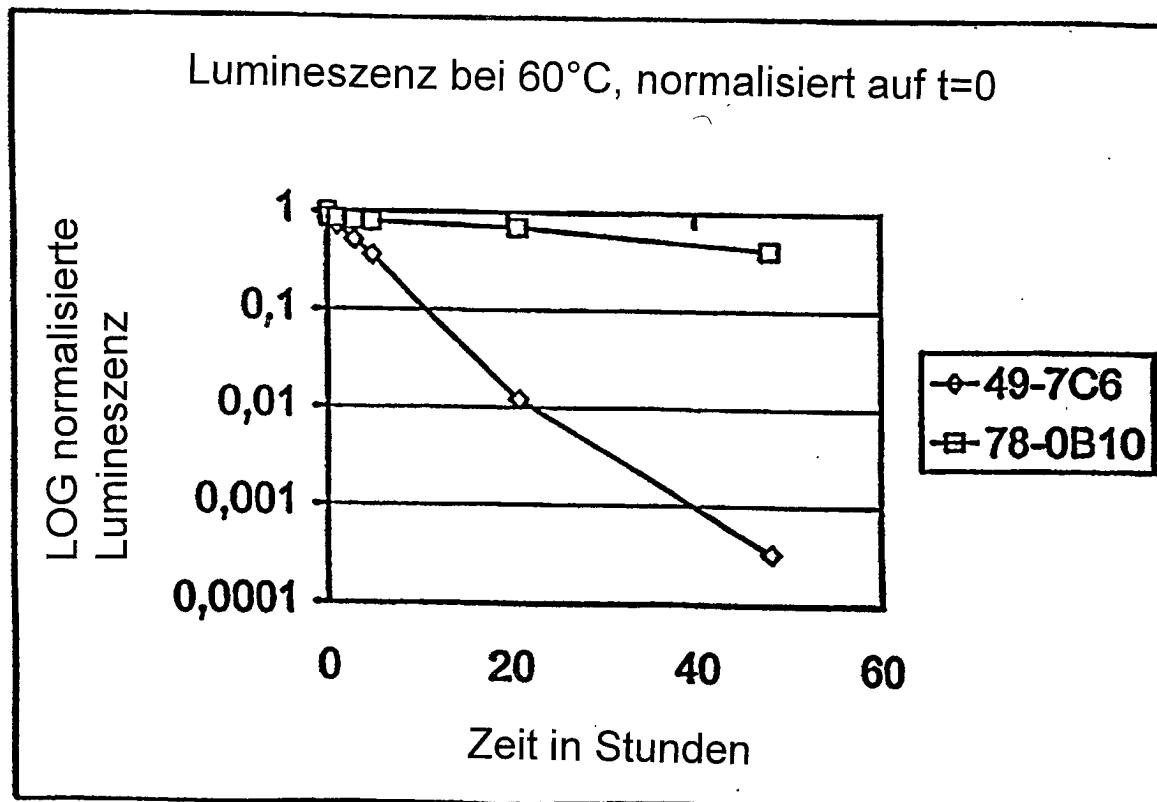


FIG. 52

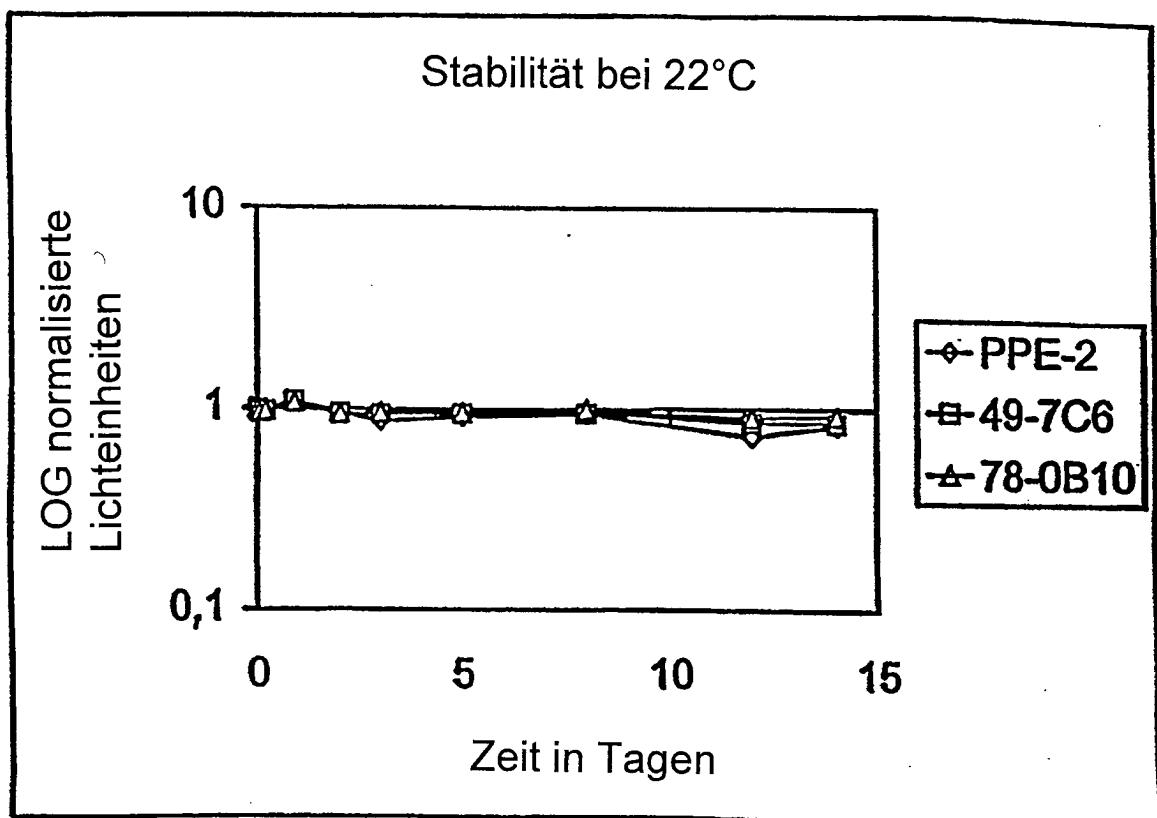


FIG. 53

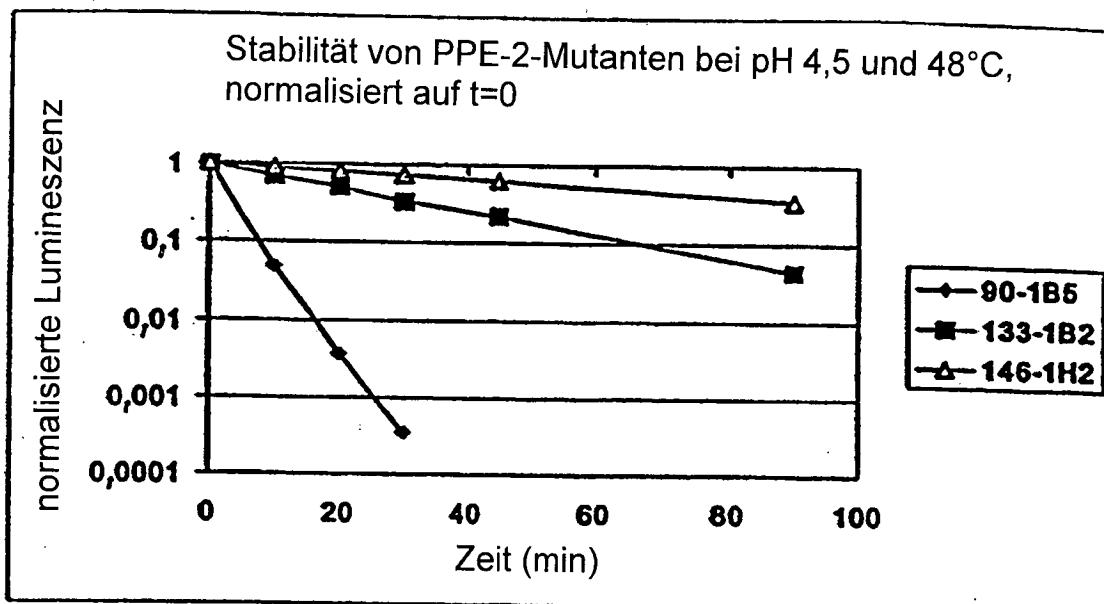


FIG. 54A

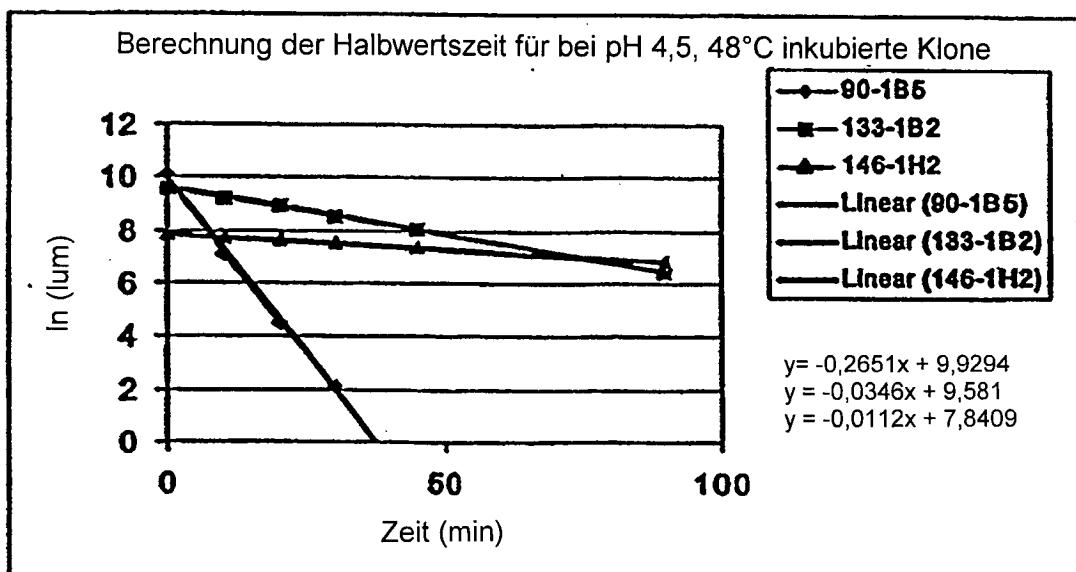


FIG. 54B

Luc133-1B2 (SEQ ID NO:42)

| | | | | | | |
|------------|------------------|------------|-------------|-------------|-------------|------|
| AGATCCAATG | GCAGATAAAGA | ATATTTATA | TGGGCCCGAA | CCATTTATC | CCTTGGAAAGA | 60 |
| TGGGACGGCT | GGAGAACAGA | TGTTTQACGC | ATTATCTGT | TATGCAGATA | TTCCGGGCTG | 120 |
| CATAGCATTG | ACAAATGCTC | ATACAAAAGA | AAATGTTTA | TATGAAGAGT | TTCTGAAACT | 180 |
| GTCGTGTCGT | TTAGCGGAAA | GTTTAAAAA | GTATGGATTA | AAACAAAACG | ACACAAATGC | 240 |
| GGTGTGTAGC | GAAAATAGT | TGCAATTTC | CCITCCTGTA | ATTGCATCAT | TGTATCTTGG | 300 |
| AATAATTGTC | GCACCTGTTA | ACGATAAATA | CATTGAACGT | GAATTAATAC | ACAGTCTTGG | 360 |
| TATTGAAAAA | CCACGCATAG | TTTTTGCTC | CAAGAATACT | TTTCAAAAAG | TACTGAATGT | 420 |
| AAAATCTAAA | TTAAAATCTA | TGAAACTAT | TATTATATA | GACTIONATG | ATGACTTAGG | 480 |
| AGGTTATCAA | TGCCTCAACA | ACTTTATTTC | TCAAAATTCC | GATAGTAATC | TGGACGTTAA | 540 |
| AAAATTTAAA | CCAAATTCTT | TTAATCGAGA | CGATCAGTT | GGTTGATTA | TGTTTCTTC | 600 |
| TGGTACAAC | GGTGTGCGGA | AGGGAGTCAT | GCTAACTCAC | AAAGAATATTG | TTGCAOGATT | 660 |
| TTCTATTGCA | AAAGATCCTA | CTTTGGTAA | CGCAATTAAT | CCGACGTCAG | CAATTTAAC | 720 |
| GGTAATACCT | TTCCACCATG | GTGTTGGTAT | GATGACCACA | TTAGGATACT | TTACTTGTGG | 780 |
| ATTCCGAGTT | GTTCTAATGC | ACACGTTGA | AGAAAAACTA | TTTCTACAAT | CATTACAAGA | 840 |
| TTATAAAGTG | GAAGAGTACTT | TACTTGTACC | AACATTAATG | GCATTTCTTG | CAAAAAGTGC | 900 |
| ATTAGTTGAA | AGTACGATT | TATOGCACTT | AAAAGAAATT | GCATCTGGTG | GCGCACCTT | 960 |
| ATCAAAGAA | ATTGGGGAGA | TGGTAAAAAA | ACGGTTAAA | TTAAACTTTG | TCAGGCAAGG | 1020 |
| GTATGGATTA | ACAGAACCA | CTTCGGCTGT | TTAATTACA | CCGAAAGGTG | ACGGCAACCC | 1080 |
| GGGATCAACT | GGTAAAATAG | TACCATTCA | CGCTGTTAAA | GTGTCGATC | CTACAAACAGG | 1140 |
| AAAAATTTG | GGGCCAATG | AAQCTGGAGA | ATTGTTTT | AAAGGCCCCA | TGATAATGAA | 1200 |
| GGGTTATTAT | AATAATGAAG | AAGCTACTAA | AGCAATTATT | GATAATGACG | GATGGTGCG | 1260 |
| CTCTGGTGAT | ATTGCTTATT | ATGACAATGA | TGGCCATTTC | TATATTGTGG | ACAGGCTGAA | 1320 |
| GTCACTGATT | AAATATAAAG | GTTATCAGGT | TGCACCTGCT | GAATTGAGG | GAATACTCTT | 1380 |
| ACAACATCG | TATATTGTTC | ATGCCGGCGT | TACTGGTATA | CGGGATGAAAG | CGCGGGCGA | 1440 |
| GCTTCCAGCT | GCAGGTGTG | TAGTACAGAC | TGGAAAATAT | CTAAACGAAC | AAATCGTACA | 1500 |
| AGATTATGTT | GCCAGTCAAG | TTTCAACAGC | CAAATGGCTA | CGTGGTGGGG | TGATATTTT | 1560 |
| GGATGAAATT | CCCAAAGGAT | CAACTGGAAA | AAATTGACAGA | AAAGTGTAA | GACAAATGTT | 1620 |
| AGAAAAACAC | <u>ACCAATGGG</u> | | | | | 1639 |

FIG. 55

Luc146-1H2 (SEQ ID NO:43)

| | | | | | | |
|-------------|--------------|-------------|------------|-------------|-------------|------|
| GGATCCAATG | GCAAGATAAAGA | ATATTTTATA | TGGGCCGAA | CCATTITATC | CCTTGGAAAGA | 60 |
| TGGGACGGCT | GGAGAACAGA | TGTTTGTACGC | ATTATCTCGT | TATGCAGCTA | TTCCGGCTG | 120 |
| CATAGCATTG | ACAAATGCTC | ATACAAAAGA | AAATGTTTA | TATGAAGAGT | TTCTGAAACT | 180 |
| GTCGTGTGTT | TTAGCGGAA | GTTTAAAAAA | GTATGGATTA | AAACAAAACG | ACACAATAGC | 240 |
| GGTGTGTAGC | AAAAATAGTC | TGCAATTTTT | CCTTCCTGTA | ATTGCATCAT | TGTATCTTGG | 300 |
| AATAATTGTG | GCACCTGTTA | AGATAAATA | CATTGAACGT | GAATTAATAC | ACAGTCTTGG | 360 |
| TATTGAAAAA | CCACGCATAG | TTTTTGCTC | CAAGAATACT | TTTCAAAAG | TACTGAATGT | 420 |
| AAAATCTAAA | TTAAAATCTA | TGAAACTAT | TATTATATA | GACTTAAATG | AAGACTTAGG | 480 |
| AGGTTATCAA | TGCCTCAACA | ACTTTATTC | TCAAAATTCC | GATAGTAATC | TGGACGTAAA | 540 |
| AAAATTTAAA | CCCTATTCTT | TTAATCGAGA | CGATCAGGTT | GGTCGATTA | TGTTTCTTC | 600 |
| TGGTACAAC | GGTCTGGCGA | AGGGAGTCAT | GCTAACTCAC | AAGAATATG | TTGACAGATT | 660 |
| TTCTATTGCA | AAAGATCCTA | CTTTGGTA | CGCAATTAA | CCGACGTCAG | CAATTTAAC | 720 |
| GGTAATACCT | TTCCACCATG | GTTTGGTAT | GATGACCACA | TTAGGATACT | TTACTTGTGG | 780 |
| ATTCGAGTT | GTTCTAATGC | ACACGTTGA | AGAAAAACTA | TTTCTACAAAT | CATTACAAGA | 840 |
| TTATRAAGTG | GAAAGTACTT | TACTTGTACC | AACATTAATG | GCATTTCCTG | CAAAAAGTGC | 900 |
| ATTAGTTGAA | AAAGTACGATT | TATCGACTT | AAAAGAAATT | GCATCTGGTG | GCGCACCTTT | 960 |
| ATCAAAAGAA | ATTGGGGAGA | TGGTAAAAAA | ACGGTTAAA | TTAAACTTTG | TCAGGCAAGG | 1020 |
| GTATGGATTA | ACAGAAACCA | CTTGGGCTGT | TTAATTACA | CGAAAGGTG | ACGCGADACC | 1080 |
| GGGATCAACT | GGTAAAATAG | TACCATTCGA | CGCTGTTAA | GTGTCGATC | CTACAAACAGG | 1140 |
| AAAATTTTG | GGGCCAATG | AACTGGAGA | ATTGTATT | AAAGGCCCCA | TGATAATGAA | 1200 |
| GGGTATTAT | AATAATGAG | AGCTACTAA | AGCAATTATT | QATAATGACG | GATGTTGCG | 1260 |
| CTCTGGTGAT | ATTGCTTATT | ATGACAATGA | TGGCCATT | TATATTGTGG | ACAGGCTGAA | 1320 |
| GTCACTGATT | AAATATAAAG | GTTATCAGGT | TGCACCTGCT | GAATTGAGG | GAATACCTT | 1380 |
| ACACACATCCG | TATATTGTG | ATGCCGGCGT | TACTGGTATA | CCGGATGAGG | CCGGGGCGA | 1440 |
| GCTTCAGCT | GCAGGTGTTG | TAGTACAGAC | TGGAAAATAT | CTAACGAC | AAATGTCACA | 1500 |
| AGATTATGTT | GCCAGTCAG | TTCAACAGC | CAAATGGCTA | CGTGGTGGGG | TGAAATT | 1560 |
| GGATGAAATT | CCCAAAGGAT | CAACTGGAAA | AATTGACAGA | AAAGTGTAA | GACAATGTT | 1620 |
| AGAAAAACAC | ACCAATGGG | | | | | 1639 |

FIG. 56

Luc133-1B2 (SEQ ID NO:44)

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|
| | M | A | D | K | N | I | L | Y | G | P | E | F | Y | P | L | E | D | 20 |
| G | T | A | G | E | Q | M | F | D | A | L | S | R | P | I | P | G | C | 40 |
| I | A | C | R | L | T | N | A | H | T | K | V | L | Y | D | E | F | L | 60 |
| S | C | S | E | N | S | S | E | S | F | K | K | Y | Q | E | E | T | I | 80 |
| V | C | I | V | K | S | N | V | N | D | F | F | L | V | S | L | Y | L | 100 |
| I | K | S | T | K | P | R | I | V | F | C | K | I | E | A | H | S | L | 120 |
| K | F | T | T | K | L | K | S | I | D | K | Y | I | L | Q | V | N | G | 140 |
| G | S | I | A | P | R | R | V | N | F | I | S | T | F | D | L | D | L | 160 |
| S | V | I | P | F | H | H | S | N | F | R | I | S | Q | E | S | V | S | 180 |
| F | R | K | V | V | L | M | H | M | D | M | D | Q | L | N | F | S | S | 200 |
| Y | K | V | V | E | S | T | L | L | Q | P | Q | L | A | I | R | F | T | 220 |
| L | V | E | K | Y | D | L | S | H | T | G | T | L | T | C | G | D | T | 240 |
| S | K | G | L | T | E | E | M | V | S | F | T | L | F | T | C | G | D | 260 |
| Y | G | S | T | G | E | T | T | K | A | P | K | L | G | Q | R | Q | G | 280 |
| G | K | I | L | G | K | I | N | E | S | P | H | V | F | D | P | R | T | 300 |
| S | S | Y | D | I | K | Y | N | E | E | R | E | A | K | E | P | M | K | 320 |
| S | L | G | I | K | Y | I | A | Y | K | D | T | N | D | V | N | G | K | 340 |
| Q | H | P | A | V | A | G | V | D | A | G | V | G | I | P | D | E | E | 360 |
| L | P | P | A | A | S | Q | V | V | V | Q | T | G | Y | L | N | E | G | 380 |
| D | X | E | V | A | S | Q | S | T | G | T | A | K | Y | R | G | Q | Q | 400 |
| E | K | H | I | P | K | G | G | S | T | G | K | W | L | R | K | I | F | 420 |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | 440 |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | 460 |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | 480 |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | 500 |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | 520 |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | 540 |

FIG. 57

Luc146-1H2 (SEQ ID NO:45)

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|----|
| G | T | M | A | D | K | N | I | L | Y | G | P | F | Y | P | L | E | D | 20 |
| I | A | A | G | E | Q | M | F | D | A | L | S | A | E | F | P | C | 40 | |
| S | C | R | L | T | N | A | H | T | K | E | V | E | Q | L | G | K | 60 | |
| V | C | S | E | N | S | S | F | K | K | Y | G | N | S | T | L | A | 80 | |
| I | I | V | V | A | P | V | V | D | F | P | Y | I | E | F | H | G | 100 | |
| K | S | K | K | P | R | I | S | Q | K | R | T | E | F | D | L | L | 120 | |
| G | Y | Q | C | L | K | I | N | D | C | Y | R | Q | D | L | N | G | 140 | |
| K | F | K | P | X | S | F | F | F | S | T | L | S | S | D | D | V | 160 | |
| G | T | T | G | L | P | K | N | P | T | D | M | N | N | L | L | G | 180 | |
| S | I | A | K | D | P | T | F | R | I | D | L | S | S | F | S | S | 200 | |
| V | I | P | F | H | H | H | F | V | S | V | H | N | I | A | R | F | 220 | |
| F | R | V | V | Y | L | M | T | T | T | M | T | T | E | T | T | G | 240 | |
| Y | K | V | V | E | S | T | L | L | F | V | P | E | Y | G | L | G | 260 | |
| L | V | E | K | Y | D | L | S | S | G | H | L | K | Q | S | A | A | 280 | |
| S | K | E | I | G | E | M | V | S | K | R | M | T | F | P | P | P | 300 | |
| Y | G | L | T | E | T | T | S | A | V | L | A | E | G | G | G | G | 320 | |
| G | S | T | G | K | I | V | P | P | L | H | V | K | D | D | D | D | 340 | |
| K | I | L | G | P | N | E | E | E | G | A | K | F | P | P | P | M | 360 | |
| Q | Y | Y | N | N | N | Y | D | T | H | E | L | I | D | D | D | G | 380 | |
| S | G | D | I | A | Y | Y | D | N | N | D | G | H | F | F | F | G | 400 | |
| S | L | I | K | Y | K | G | Y | Q | V | V | A | A | E | E | E | I | 420 | |
| Q | H | P | Y | I | V | D | A | Q | T | G | T | I | I | I | I | I | 440 | |
| L | P | A | A | G | V | V | V | V | Q | T | G | K | I | I | I | I | 460 | |
| D | E | I | P | S | Q | G | S | T | G | K | I | D | R | R | R | R | 480 | |
| E | K | H | T | N | G | G | G | G | K | K | R | R | R | R | R | R | 500 | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | 520 | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | 540 | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | 546 | |

FIG. 58

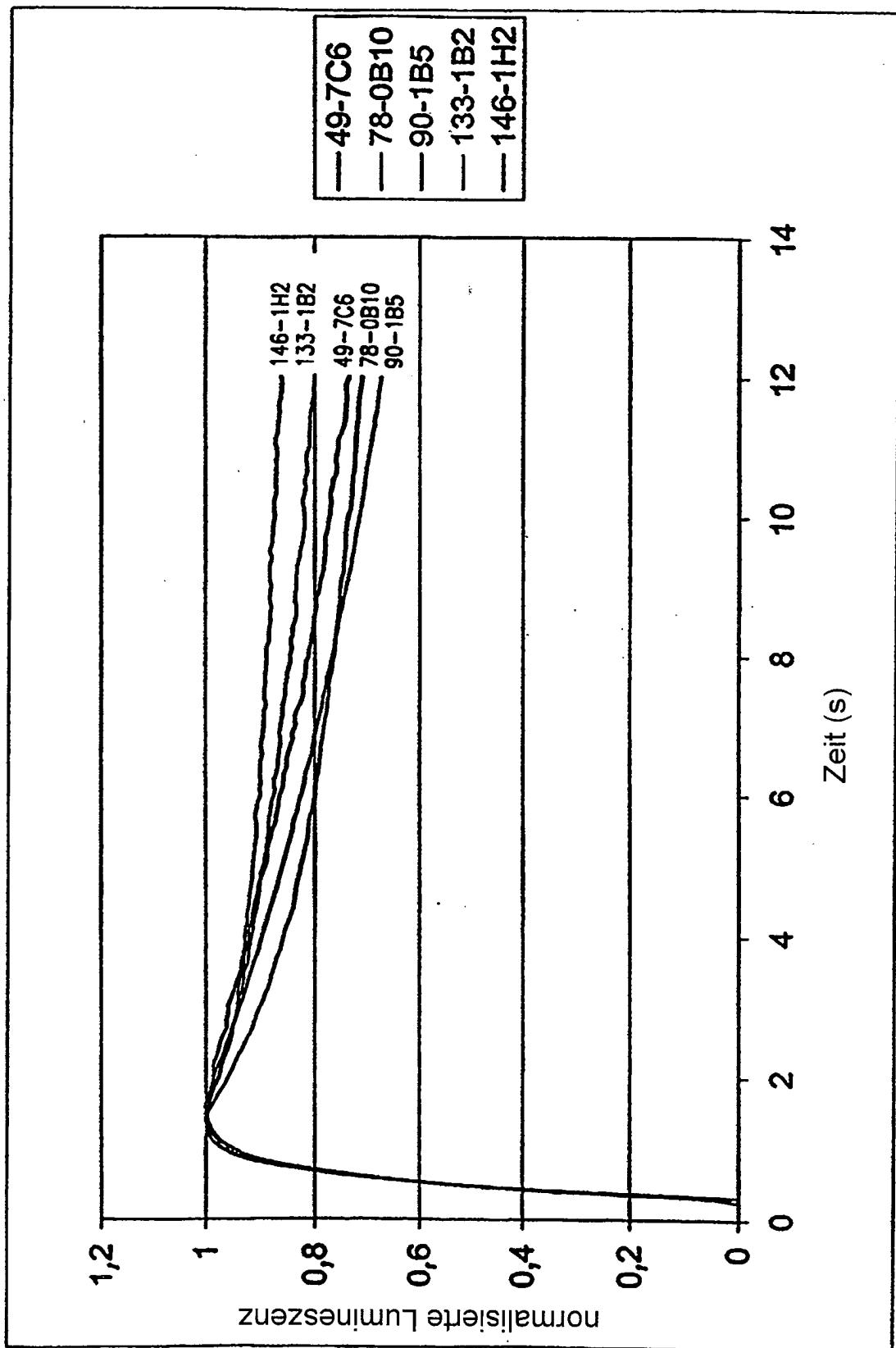


FIG. 59

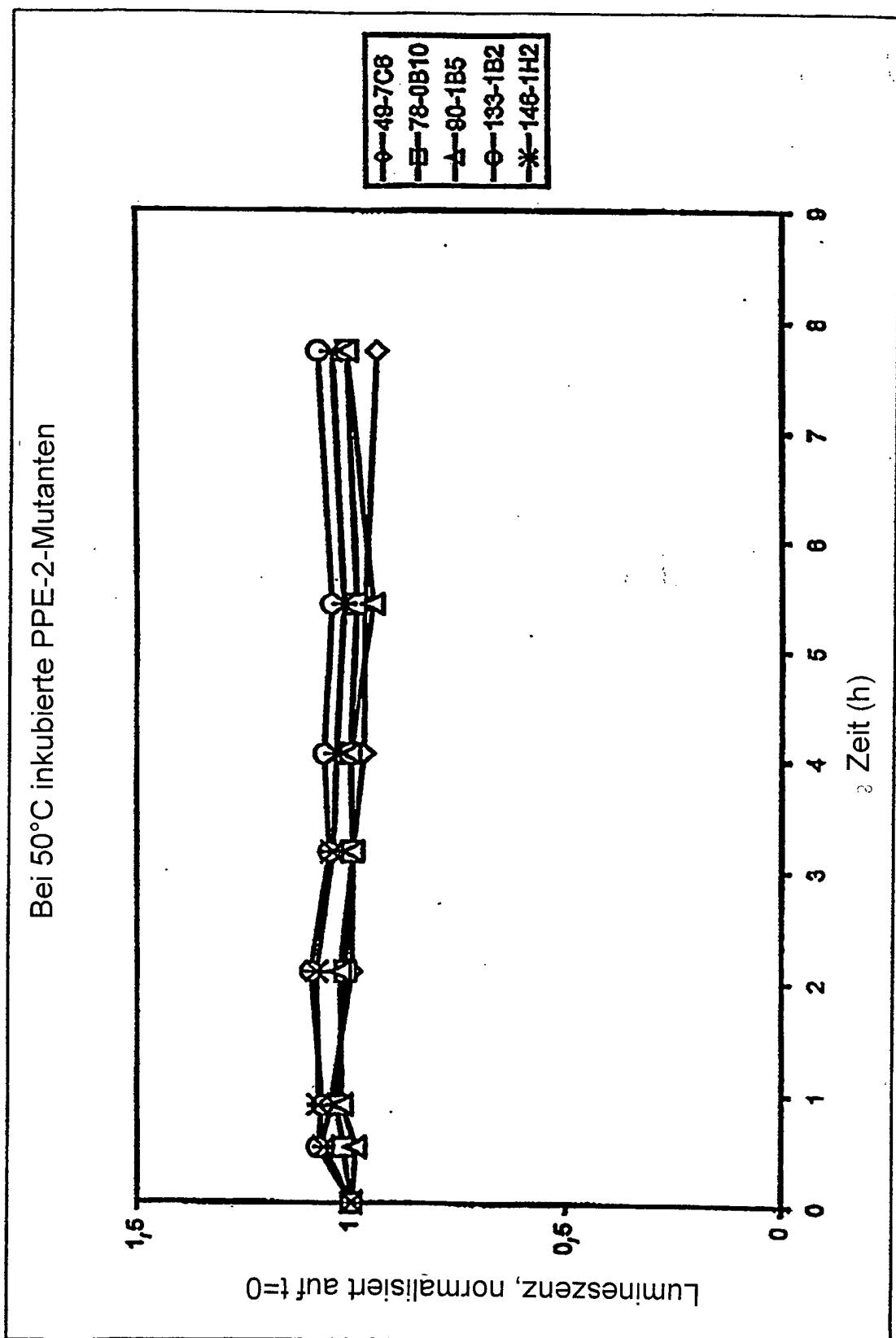


FIG. 60

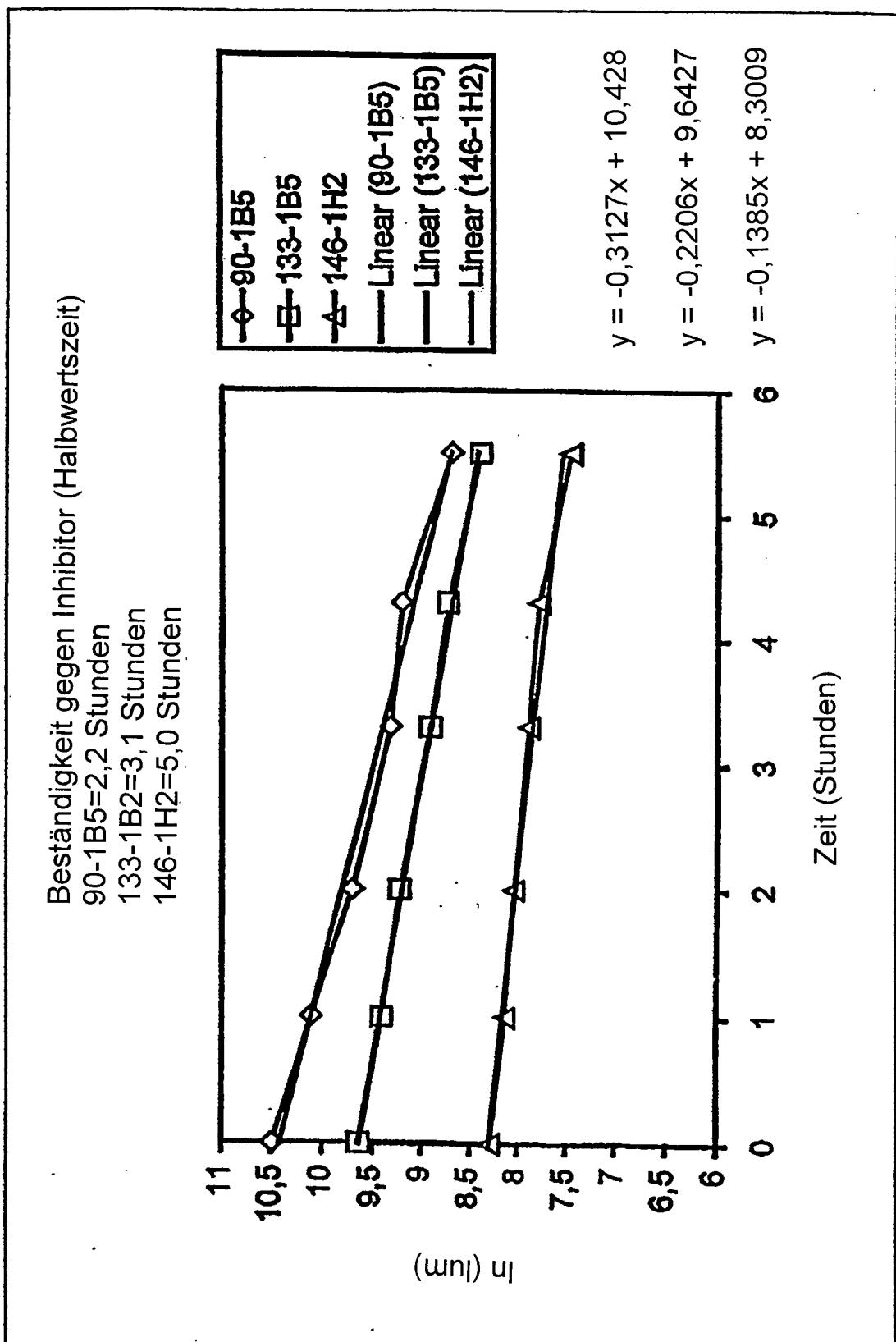


FIG. 61

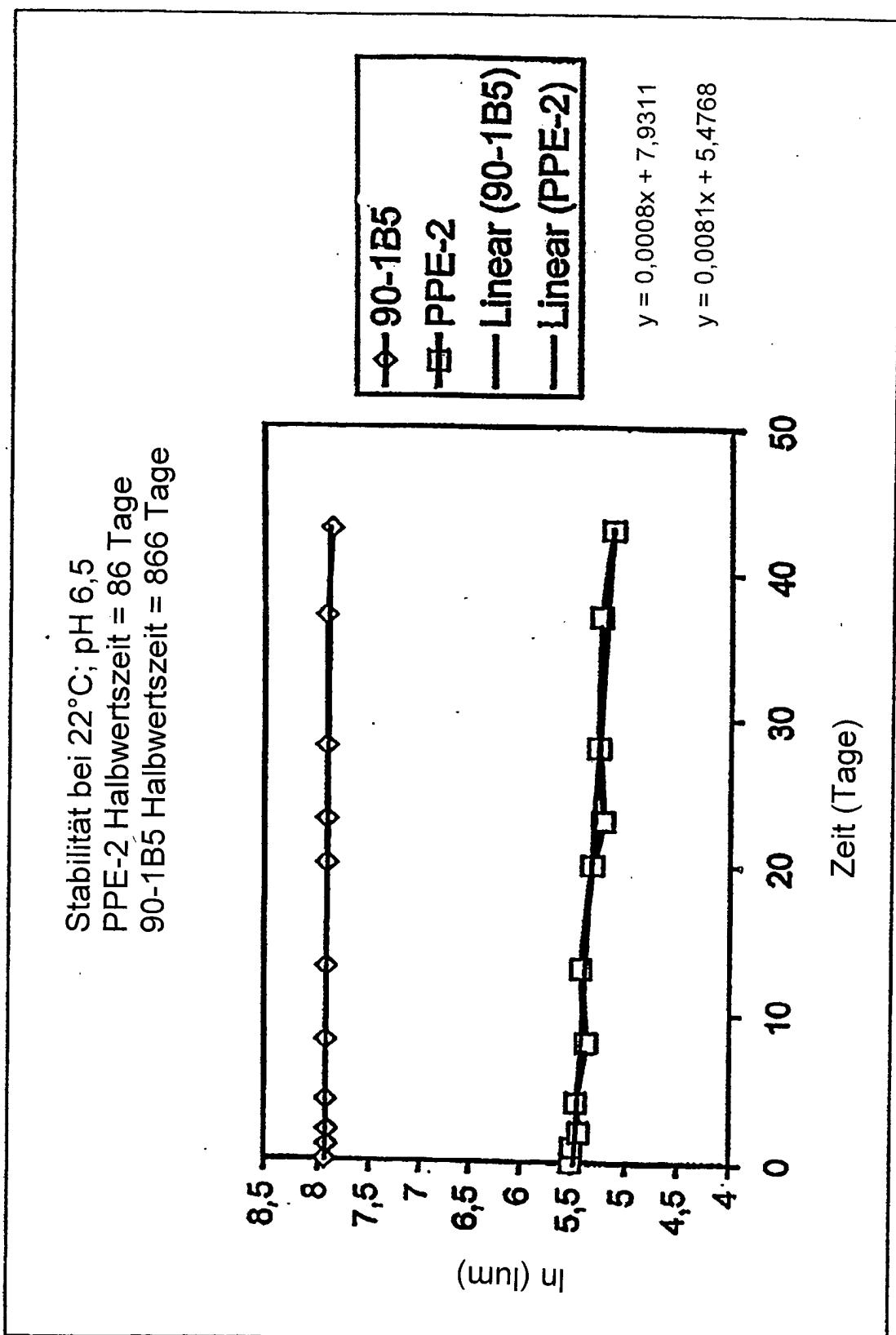


FIG. 62

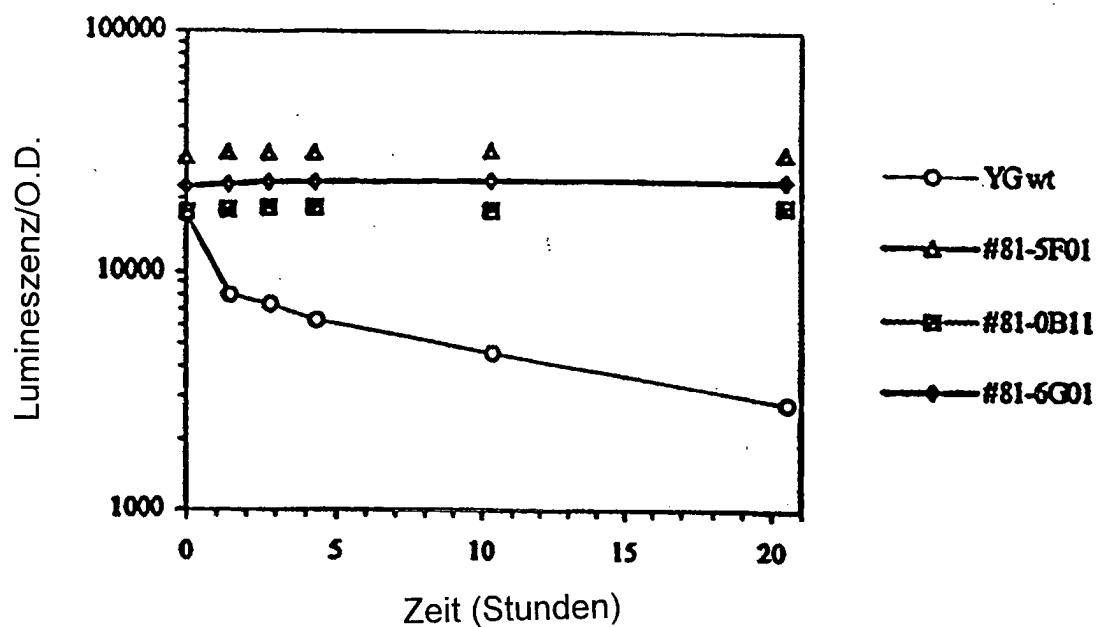


FIG. 63

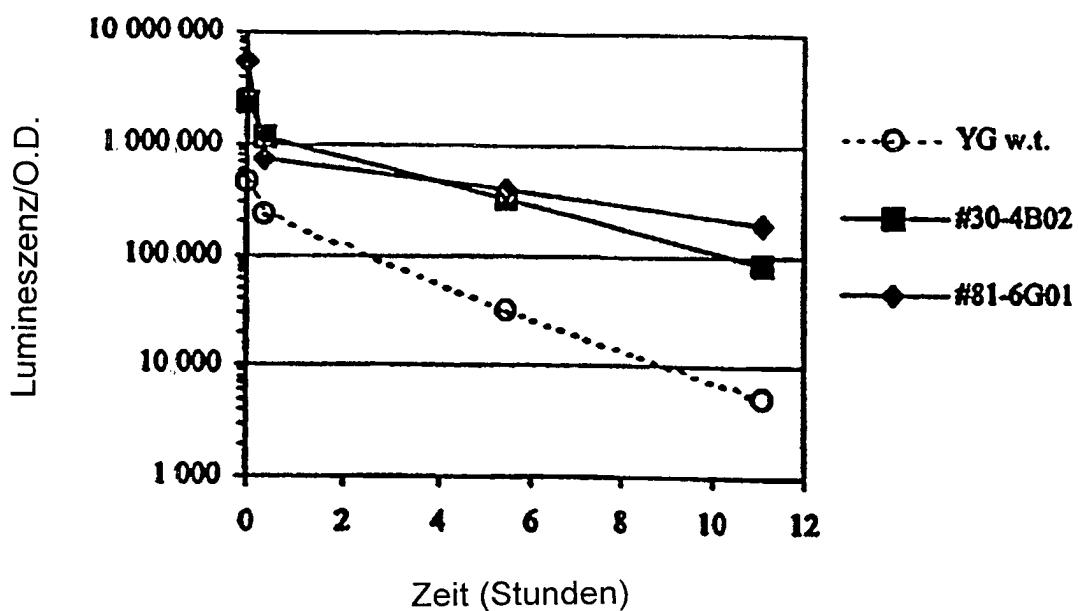


FIG. 64

LucPpl81-0B11

GGATCCCCATG ATGAAGCGAG AGAAAAATGT TATATATGGA CCCGAACCCC TACACCCCTT 60
 GGAAGACTTA ACAGCTGGAG AATGCTCTT CGGTGCCCTT CGAAAACATT CTCATTTACC 120
 GCAGGCTTTA GTAGATGTGG TTGGGGACGA ATGCCTTCC TATAAAAGAGT TTTTGAGC 180
 GACAGTCCCTC CTAGCGCAAA GTCTCCACAA TTGTGGATAC AAGATGAATG ATGTTAGTGT 240
 GATCTGCGCC GAGAATAATA CAAGATTTT TATTCCCGTT ATTGCAGCTT GGTATATTGG 300
 TATGATTGTA GCACCTGTTA ATGAAAGTTA CATCCCAGAT GAACTCTGTA AGGTCATGGG 360
 TATATCGAAA CCACAAATAG TTTTACGAC AAAGAACATT TAAATAAGG TATTGGAGGT 420
 ACAGAGCAGA ACTAATTICA TAAAAAGGAT CATCGTACTT GATACTGTAG AAAACATACA 480
 CGGTTGTGAA AGTCTTCCCA ATTTTATTTC TCGTTATTG GATGGAATAA TTGCCAACTT 540
 CAAACCTTTA CATTTCGATC CTGTAGAGCA AGTGGCAGCT ATCTTATGTT CGTCAGGCAC 600
 TACTGGATTA CGAAAGGTG TAATGCAAAC TCACCAAAT ATTTGTGTCC GACTTATACA 660
 TGCTTTAGAC CCCAGGGCAG GAACGCAACT TATTCCGT GTGACAGTCT TAGTATATCT 720
 GCCTTTTTTC CATGCTTTTG GGTTCTCTAT AACCCTGGGA TACTTCATGG TGGGTCTTCG 780
 TGTTATCATG TCAAGACGAT TTGATCCAGA AGCATTCTA AAAGCTATTG AGGATTATGA 840
 AGTTGAAAGT GTAATTAAACG TTCCATCAGT ATATATTGTC TTATCGAAAA GTCCTTGGT 900
 TGACAAATAC GATTATCAA GTTTAAGGGA ATTGTGTTGC GGTGCGGCAC CATTAGCAAA 960
 AGAAGTTGCT GAGGTTGCAG CAAACGATT AAACCTGCCA GGAATTGCT GTGGATTGG 1020
 TTTGACAGAA TCTACTTCAG CTAATATACA CAGTCITAGG GATGAATTAA AACCAGGATC 1080
 ACTTGGAAAGA GTTACTCCCT TAATGGCAGC TAAAATAGCA GATAGGGAAA CTGGTAAAGC 1140
 ATTGGGACCA AATCAAGTTG GTGAATTATG CATTAAAGGT CCCATGGTAT CGAAAGGTTA 1200
 CGTGAACAAT GTAGAAGCTA CCAAAGAAGC TATTGATGAT GATGGTTGGC TTCACTCTGG 1260
 AGACTTTGGA TACTATGATG AGGATGAGCA TTTCTATGTC GTGGACCGTT ACAAGGAATT 1320
 GATTAATAT AAGGGCTCTC AGGTAGCACC TGCAGAACTA GAAGAGATT TATTGAAAAA 1380
 TCCATGTATC AGAGATGTTG CTGTGGTTGG TATTCCGTAT CTAGAAGCTG GAGAACTGCC 1440
 ATCTGCGTTT GTGGTTAAC AGCCCCGAAA GGAGATTACA GCTAAAGAAG TGTACGATTA 1500
 TCTTGCCGAG AGGGTCTCCC ATACAAAGTA TTTGCGTGGG GGGGTTGAT TCGTTGATAG 1560
 CATAACCACGG AATGTTACAG GTAAAATTAC AAGAAAGGAA CTTCTGAAGC AGTTGCTGGA 1620
GAAGGCGGGGA GGT

FIG. 65

LucPpl 81-OB11

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|-----|-----|
| B | D | M | M | K | R | E | K | N | V | I | Y | G | P | E | P | L | H | P | L | 18 | | |
| Q | A | L | L | T | A | G | E | M | F | R | A | L | R | K | H | S | F | E | P | 38 | | |
| T | I | C | Y | V | D | V | V | G | S | S | L | S | Y | K | E | F | V | B | A | 58 | | |
| I | M | I | S | A | L | A | N | N | T | N | C | G | P | K | D | V | E | V | S | 78 | | |
| Q | S | I | K | V | V | Q | N | F | S | I | I | P | Y | M | N | Y | V | I | G | 98 | | |
| G | C | P | T | A | R | E | R | H | T | K | P | D | Y | A | W | K | V | M | E | 118 | | |
| K | P | G | S | R | T | F | F | F | S | N | Y | I | E | L | N | K | V | L | E | 138 | | |
| T | A | L | F | E | N | R | Y | H | T | I | R | P | D | K | T | G | N | I | S | 158 | | |
| P | F | D | R | S | V | S | T | P | I | N | V | Y | Y | I | W | C | S | R | G | 178 | | |
| V | V | I | R | R | V | H | R | P | V | Q | R | A | Q | D | L | C | V | V | T | T | 198 | |
| V | R | K | S | S | S | E | E | E | P | N | I | Q | P | L | V | L | V | L | Y | 218 | | |
| D | K | T | Y | R | D | H | F | H | V | Q | T | Q | T | F | V | V | V | L | Y | L | 238 | |
| E | V | V | A | M | S | P | P | P | M | Q | L | Q | Q | M | I | Q | D | P | L | Y | 258 | |
| L | T | E | A | E | R | R | R | R | M | T | L | I | I | V | V | V | V | L | Y | E | 278 | |
| L | G | G | S | S | S | S | S | S | S | F | Q | Q | Q | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | 298 | |
| L | G | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | 318 | |
| V | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | 338 | |
| D | F | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | 358 | |
| I | K | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | 378 |
| P | C | I | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | 398 | |
| S | A | F | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | 418 | |
| L | A | E | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | 438 | |
| I | P | R | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | 458 | |
| K | A | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | 478 | |

542

FIG. 66