



(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

(73) Patentinhaber:

Promega Corp., Madison, Wis., US

(74) Vertreter:

Strehl, Schübel-Hopf & Partner, 80538 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

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

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

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

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

Beschreibung

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 Stipendium 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 Wildtyp Luciferase. 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 Wildtyp-luciferase oder eine rekombinante Wildtyp-luciferase 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 Wirte, 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 Polynucleotidsequenz, die eine erste Käferluciferase als Ausgangs(Eltern)-Sequenz kodiert, wobei eine Polynucleotidsequenz 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 Luciferaseamino-säuresequenz 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 Polynucleotidsequenzen, welche Luciferaseenzyme kodieren, die eine beliebige einzelne Mutation oder beliebige Kombinationen von Mutationen eines Typs enthalten, der eine Aminosäure der Referenzkäferluciferase 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 Käferluciferase-sequenzen, die in **Fig. 19** gezeigt sind, einschließlich LucPpe2.

[0015] Die Nucleotidsequenzen, 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 Unterstreichungen 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 Polynucleotidsequenz, die für ein Enzym mit der gewünschten Eigenschaft, beispielsweise einer enzymologischen Eigenschaft, kodiert, aus einer ersten Population von mutierten Polynucleotidsequenzen. Die selektierte isolierte Polynucleotidsequenz wird dann mutiert, wobei eine zweite Population von mutierten Polynucleotidsequenzen erhalten wird. Beispielsweise wird ein Gemisch von selektierten isolierten Polynucleotidsequenzen mutiert, wobei eine zweite Population von mutierten Polynucleotidsequenzen erhalten wird. Dieses Verfahren kann wiederholt werden, bis eine weitere Polynucleotidsequenz erhalten wird, beispielsweise selektiert und/oder isoliert wird, wobei diese Polynucleotidsequenz 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 Nucleinsäuren 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 Luciferaseenzym 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 Luciferaseenzym 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 Luciferaseenzym 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 Nucleotide 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 unterstrichenen Aminosäuren sind Mutationen.
- [0059] [Fig. 37](#) zeigt eine Aminosäuresequenz (SEQ ID NO: 20) des mutierten Luciferaseenzym 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 Luciferaseenzym 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 Luciferaseenzym 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 Position 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; unterstrichene 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 Aminosäure 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 unterstrichenen 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 Unterstreichungen 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 LucPpLYG 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 Polynucleotidsequenz, die für das erfindungsgemäße Enzym kodiert, umfasst Mutationen, die eine Vielzahl von Aminosäuresubstitutionen im Vergleich zu der Polynucleotidsequenz kodieren, welche für das Enzym kodiert, von dem das erfindungsgemäße 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 erfindungsgemäße Ausführungsform isolierte Polynucleotidsequenzen (cDNAs), die für mutierte Luciferasen mit erhöhter Thermostabilität und erhöhter Resistenz gegen Luciferaseinhibitoren kodieren, Vektoren, welche die Polynucleotidsequenzen enthalten, und transformierte Wirte, welche die Polynucleotidsequenzen 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 lucPplYG 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 Roboter-Verfahren, das hinsichtlich der Genauigkeit maximiert war, umfasst die Kontrolle des Mischens, der Wärmeübertragung und der Eindampfung von Proben in dem Roboter-Screening-Verfahren, 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 Korrekturle-sepolymerasen 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 Polynucleotidsequenzen, welche das Enzym kodieren, das aus einer ersten Polynucleotidsequenz abgeleitet ist, die für ein zu mutierendes Enzym kodiert, wurde mindestens eine Polynucleotidsequenz, die für ein Enzym kodiert, das verbesserte enzymologische Aktivität hat, selektiert und isoliert. In einer Ausführungsform wird dann eine durch Oligonucleotide vermittelte Mutagenese durchgeführt, um mindestens ein Codon, das für eine Konsensus-Aminosäure kodiert, in mindestens eine der selektierten isolierten Polynucleotidsequenzen einzuführen, welche für die Enzyme kodieren, wobei eine weitere Polynucleotidsequenz 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 Polynucleotidsequenz nicht vorhanden ist.

Produktion der erfindungsgemäßen Luciferasen

[0107] Das Verfahren zum Herstellen von Luciferasen mit erhöhter Thermostabilität ist die rekursive Mutagenese.

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, beinhaltet 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 kodierender 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 (Li)	Enzym- stabilität (tau)	Substrat- bindung (Km)	Signal- stabilität (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

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

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	6e1-	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	1e1-	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 Nakamo (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% Glycerin). 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 apparente 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 Luciferininhibitoren zu einem schnelleren Enzymumsatz führen können.

[0120] Jede Punktmutation für sich erhöht (mehr oder weniger) die Thermostabilität des mutierten Enzyms in Bezug auf die Wildtyp-luciferase. 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 erfindungsgemäßen thermostabilen Luciferasen

Mutageneseverfahren:

[0121] Eine anschauliche Mutagenese-strategie ist wie folgt: Der "beste" Wildtyp-luciferase-klon, 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 diesem Screeningverfahren wurde eine neue Luciferase-population 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 Rekombinanten 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.

Roboter-Verfahren:

[0125] Die Wärmeübertragung wurde in einem Roboter-Verfahren 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 × 7 × 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 Temperatureinstellung 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 Roboter-Verfahren 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 Roboter-Vorrichtung, 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 Pipettiervorrichtung gesetzt.

[0129] Die Platte auf dem Schüttler wird in die Pipettiervorrichtung 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 Zelllysate 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 Pipettiervorrichtung 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 Pipettiervorrichtung gegeben, und die Abdeckung wird entfernt und auf den benachbarten Lokator gegeben. Zwei Tochterplatten werden

durch das Pipettierverfahren hergestellt (vergleiche "Erzeugung eines Paares 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 Paares 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 K_2HPO_4 ; 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 μ M Luciferin; 175 μ M 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 Paares 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. Mach 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. Mach 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. Mach 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. Mach 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.

```
XooooooooX
oooooooooooo
oooooooooooo
oooXooooXooo
oooooooooooo
oooooooooooo
oooXooooXooo
oooooooooooo
XoooooooooX
```

[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 apparente 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 $S = (1 - \int(L)/L_0 t)^2$. 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 $C = \text{Sum}(\text{Kriterien 2–5, gewichtet mit einem relativen Wert, wobei beispielsweise ein höheres Gewicht auf die Stabilität gelegt wird, weil sie ein Hauptziel ist})$.

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 enthielt. 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_f die mittlere Zeit der letzten Messung ist (beispielsweise 15 Stunden). Die Signalstabilität wird als $S = (1 - \text{int}(L)/L_i t_f)^2$ 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 $S = (1 + K - \text{int}(L)/L_i t_f)^2$ verwendet werden, wobei $1/K = 2$ (relative Änderung des Flüssigkeitsvolumens bei t_f) verwendet wird].

[0171] Berechnung der Referenzwertoberflächen: 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 , $K_{mr}/K_{m:app,total,r}$ 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: $C = 5(\tau/\tau_r) + 2(S_r/S) + 2(K_{mr}/K_{m:app,total}) + (L_i/L_{ir})$.

[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 sind 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_r/S)
- 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_r/S)

- 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 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_r/S)
- 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

[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 Eintragskriterium 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_r/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 Lumineszenzmesswert 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 $\ln(L1X)$ gegen t , wobei die Datenpunkte und der Graph angegeben ist.

[0194] S oder S_r/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 SpeI-Schnittstelle ein, um die Mutante ohne Sequenzieren zu identifizieren. Die Mutanten wurden in vivo gescreent, und 13 Kolonien wurden aufgenommen, wobei 12 davon die SpeI-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 ApaI-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 Rekombinationsmutagenese-protokoll vereint. Die durch Shuffling erhaltenen Mutanten wurden in amp^r 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 Matrice 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 Matrice 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:

- 6215, 6234, 6236, 6248 (ergaben eine erhöhte Thermostabilität)
- 6215, 6217, 6218, 6219, 6220, 6221, 6222, 6231, 6233, 6234, 6236, 6238, 6247, 6248, 6249, 6251, 6253 (ergaben keine Änderung oder eine verringerte Thermostabilität).
- 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 Zufallspunktmutagenese 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 Mutageneseexperimente

[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 Maxam & Gilbert's methodology), die Aminosäuresequenzierung durch ein beliebiges Verfahren (beispielsweise Edman-Abbau) und elektrophoretische Auftrennung von Polynucleotiden 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 Mutagenese Strategie 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 Ablaufen 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 Cysteinocodons 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 geselektiert, 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 $\ln(0,5)/\text{Steigung der Regression}$ berechnet.

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

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 filtersterilisiert und mit sterilem 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'-gtactgagacgacgccagcccaagcttaggcctgagtg-3' (SEQ ID NO: 38);

⁺⁺pRAMtailDN: 5'-ggcatgagcgtgaactgactgaactagcggccgccgag-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)
- 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 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 U/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'-gtactgagacgacgccag-3' (SEQ ID NO: 40)

pRAM19DN – 5'-ggcatgagcgtgaactgac-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) enthält.
- 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 µl steriles nanoreines Wasser.
- 3. Ligation in ein pRAM (+/r)-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 Ethanol ausfällung anstelle von Butanol verwendet wird, ist ein Waschschriff 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 Ligationsreaktion)
 - 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 plattiert 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

[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 sterilem 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 sterilem 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-Übernachtskultur 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 Sephacryl 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 Mutageneseprimer wird so konstruiert, dass er alle möglichen Aminosäurecodons zufällig erzeugt.

Mutagenesereaktion:

Tabelle 11

Komponente	Endkonzentration
Einzelsträngige Matrize	0,05 pmol
Mutageneseoligonucleotid	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-Plattenroboterdurchlauf verfügbar, sodass mindestens 15 LB-amp-Platten für einen vollständigen Roboterlauf 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 Zahnstocher 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 Übernachtsmedium enthält 1% Gelatine

*Das Induktionsmedium enthält 1 mM IPTG und keine Gelatine.

S.O.C.-Medien:

- 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 Luciferinabbauprodukten 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 Matriz 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 $MgSO_4$ 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 $\ln(0,5)/\text{Steigung}$ 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 gemischt 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 MgSO_4) 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. Übernachtskulturen von zu testenden Klonen werden in LB, supplementiert mit 100 $\mu\text{g/ml}$ AMP, hergestellt. Die Kulturen werden 1:10 in M-9-Minimalmedium, supplementiert mit 1 mM IPTG, 100 $\mu\text{g/ml}$ 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 schien, 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 Feuerfliegenluciferase 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 (LucPplRD) 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 Reporterenzym 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 grünen Licht emittierenden Prototypenzym.

Differenzielle physikalische und enzymologische Eigenschaften

[0285] Idealerweise sollten die 2 Luciferasereporter 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 Lumineszenzspektren ähnlich sind. Es könnte sein, dass die Unterschiede, die mit der Entwicklung einer roten Licht emittierenden Luciferase zusammenhängen, auf die gleichzeitigen Störungen der Integrität der Enzymstruktur zurückzuführen sind, da die Thermostabilität eines Prototyps der roten Licht emittierenden Luciferase erhöht wurde, ohne dass das Lumineszenzspektrum 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 Prototypenzym 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 Substratbindungskonstanten, insbesondere für Luciferin, gelegt.

[0290] Die Wahl des ursprünglichen Prototyps für die Optimierung viel auf die gelb-grünes Licht emittierende Wildtypyluciferase, die aus Leuchtkäfern isoliert wurde (LucPpLYG). 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 Cysteinocodons 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 Wildtyp-luciferase 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 Wildtypsequenz 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 Wildtyp-luciferase gefunden wurde (2 in der Mutante Luc30-4B02). 4 der verbleibenden Änderungen näherten die mutierten Sequenzen an die Konsensus-Aminosäure unter den anderen klonierten Käferluciferasen 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 Cysteinocodons 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 Käferluciferasen.

[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	$I_{288} \rightarrow (F, L, I, M, V, S, P, T, A)$ $C_{310} \rightarrow X + C_{311} \rightarrow X$
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	$C_{388} \rightarrow X + V_{389} \rightarrow (N, Y, N)$ $K_{457} \rightarrow X$

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 Lumineszenzeigenschaften dieser 3 mutierten Enzyme wurden miteinander verglichen. Sie wurden auch mit der gelb-grünes Licht emittierenden Wildtyp-luciferase 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 Wildtyp-luciferasen 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 Lumineszenzeigenschaften 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 Wildtyp-luciferase deutlich sank.

[0302] Bei den Lumineszenztests, die nur einige Sekunden dauern, produzierten die gelb-grünes Licht emittierenden Wildtyp-luciferasen 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 Wildtyp-luciferase, 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 Reversionen 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% Sättigungsfraction). 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 grünes 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 (μ M)	K_M für Luciferin (μ M)
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 Wildtyp-luciferase 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> 341.012WO1

<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	gcagataaaa	atatatttata	tgggcccga	ccattttatc	ccttggctga	60
tgggacggct	ggagaacaga	tgttttacgc	attatctcgt	tatgcagata	tttcaggatg	120
catagcattg	acaaatgctc	atacaaaaga	aaatgtttta	tatgaagagt	ttttaaaatt	180
gtcgtgtcgt	ttagcggaaa	gttttaaaaa	gtatggatta	aaacaaaacg	acacaatagc	240
ggtgtgtagc	gaaaatggtt	tgcaattttt	ccttcctata	attgcatcat	tgtatcttgg	300
aataattgca	gcacctgtta	gtgataaata	cattgaacgt	gaattaatac	acagtcttgg	360
tattgtaaaa	ccacgcataa	ttttttgctc	caagaatact	tttcaaaaag	tactgaatgt	420
aaaatctaaa	ttaaaatatg	tagaaaactat	tattatatata	gacttaaatg	aagacttagg	480
aggttatcaa	tgcctcaaca	actttatttc	tcaaaaattcc	gatattaatc	tggacgtaaa	540
aaaatttaaa	ccatattctt	ttaatcgaga	cgatcagggt	gcgttggtta	tgttttcttc	600
tgggtacaact	ggtgtttcga	agggagtcac	gctaactcac	aagaatattg	ttgcacgatt	660
ttctcttgca	aaagatccta	cttttggtta	cgcaattaat	ccaacgacag	caattttaac	720
ggtaataacct	ttccaccatg	gttttggtat	gatgaccaca	ttaggatact	ttacttgttg	780
attccgagtt	gttctaattg	acacgtttga	agaaaaacta	tttctacaat	cattacaaga	840
ttataaagtg	gaaaagtact	tacttgtacc	aacattaatg	gcatttcttg	caaaaagtgc	900
attagttgaa	aagtacgatt	tatcgcaact	aaaagaaaatt	gcactctggtg	gcgcaccttt	960
atcaaaaagaa	attggggaga	tggtgaaaaa	acggttttaa	ttaaaactttg	tcaggcaagg	1020
gtatggatta	acagaaacca	cttcggctgt	tttaattaca	ccgaacaatg	acgtcagacc	1080
gggatcaact	ggtaaaatag	taccatttca	cgctgttaaa	gttgtcgatc	ctacaacagg	1140
aaaaattttg	gggccaaatg	aacctggaga	attgtatttt	aaaggcgaca	tgataatgaa	1200
aggttattat	aataatgaag	aagctactaa	agcaattatt	aacaaagacg	gatggttgcg	1260
ctctgggtgat	attgcttatt	atgacaatga	tggccatttt	tatattgttg	acaggctgaa	1320
gtcattaatt	aaatataaa	gttatcaggt	tgcacctgct	gaaattgagg	gaatactctt	1380
acaacatccg	tatattgttg	atgccggcgt	tactggtata	ccggatgaag	ccgcgggcga	1440
gcttccagct	gcagggtgtg	tagtacagac	tggaaaaatat	ctaaacgaac	aaatcgtaaa	1500
aaattttgtt	tccagtcaag	tttcaacagc	caaatggcta	cgtggtgggg	tgaaaattttt	1560
ggatgaaatt	cccaaaggat	caactggaaa	aattgcacaga	aaagtgttaa	gacaaaatgtt	1620

tgaaaaaacac accaatggg

1639

<210> 2

<211> 1639

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Anmerkung = "mutierte Luciferase"

<400> 2

ggatccaatg	gaagataaaa	atattttata	tggacctgaa	ccattttatc	ccttggctga	60
tgggacggct	ggagaacaga	tgttttacgc	attatctcgt	tatgcagata	tttcaggatg	120
catagcattg	acaaatgctc	atacaaaagc	ccctgtttta	tatgaagagt	tgttaaaatt	180
gtcgtgtcgt	ttagcggaaa	gttttaaaaa	gtatggatta	aaacaaaacg	acacaatagc	240
ggtgtgtagc	gaaaatggtt	tgcaattttt	ccttcctata	attgcatcat	tgtatcttgg	300
aataattgca	gcacctgtta	gtgataaata	cattgaacgt	gaattaatac	acagtcttgg	360
tattgtaaaa	ccacgcataa	ttttttgctc	caagaatact	tttcaaaaag	tactgaatgt	420
aaaatctaaa	ttaaaatatg	tagaaactat	tattatatta	gacttaaatg	aagacttagg	480
aggttatcaa	tgctcaaca	actttatttc	tcaaaattcc	gatattaatc	tggacgtaaa	540
aaaatttaaa	ccatattctt	ttaatcgaga	cgatcagggt	gcgttggtta	tgttttcttc	600
tggtagaact	ggtgtttcga	agggagtcac	gtaactcac	aagaatattg	ttgcacgatt	660
ttctcatgca	aaagatccta	cttttggtta	cgcaattaat	ccaacgcacg	caattttaac	720
ggtataacct	ttccaccatg	gttttggtat	gatgaccaca	ttaggatact	ttacttgtgg	780
attccgagtt	gttctaattg	acacgtttga	agaaaaacta	tttctacaat	cattacaaga	840
ttataaagtg	gaaagtactt	tacttgtacc	aacattaatg	gcattttttg	caaaaagtgc	900
attagttgaa	aagtcagatt	tatcgcaact	aaaagaaaatt	gcactctggtg	gcgcaccttt	960
atcaaaaagaa	attggggaga	tggtgaaaaa	acggttttaa	ttaaactttg	tcaggcaagg	1020
gtatggatta	acagaaacca	cttcggctgt	tttaattaca	ccgaacaatg	acgtcagacc	1080
gggatcaact	ggtaaaatag	taccatttca	cgctgttaaa	gttgctcgatc	ctacaacagg	1140
aaaaattttg	gggccaaaatg	aaactggaga	attgtatttt	aaaggcgaca	tgataatgaa	1200
aggttattat	aataatgaag	aagctactaa	agcaattatt	aacaaagacg	gatggttgcg	1260
ctctggtgat	attgcttatt	atgacaatga	tggccatttt	tatattgtgg	acaggctgaa	1320
gtcattaatt	aaatataaag	gttatcaggt	tgcacctgct	gaaattgagg	gaatactctt	1380
acaacatccg	tatattgttg	atgccggcgt	tactggtata	ccggatgaag	ccgcgggcga	1440
gcttccagct	gcagggtgtg	tagtacagac	tggaaaatat	ctaaacgaac	aaatcgtaca	1500
aaattttgtt	tccagtcaag	tttcaacagc	caaatggcta	cgtggtgggg	tgaaaattttt	1560
ggatgaaatt	cccaaaggat	caactgaaa	aattgacaga	aaagtgttaa	gacaaatggt	1620
tgaaaaaacac	accaatggg					1639

<210> 3

<211> 1639

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Anmerkung = "mutierte Luciferase"

<400> 3

ggatccaatg	gaagataaaa	atattttata	tggacctgaa	ccattttatc	ccttggctga	60
tgggacggct	ggagaacaga	tgttttacgc	attatctcgt	tatgcagata	tttcaggatg	120
catagcattg	acaaatgctc	atacaaaagc	ccctgtttta	tatgaagagt	ttttaaaatt	180
gtcgtgtcgt	ttagcggaaa	gttttaaaaa	gtatggatta	aaacaaaacg	acacaatagc	240
ggtgtgtagc	gaaaatggtt	tgcaattttt	ccttcctata	attgcatcat	tgtatcttgg	300
aataattgca	gcacctgtta	gtgataaata	cattgaacgt	gaattaatac	acagtcttgg	360
tattgtaaaa	ccacgcataa	ttttttgctc	caagaatact	tttcaaaaag	tactgaatgt	420
aaaatctaaa	ttaaaatatg	tagaaactat	tattatatta	gacttaaatg	aagacttagg	480
aggttatcaa	tgctcaaca	actttatttc	tcaaaattcc	gatattaatc	ttgacgtaaa	540
aaaatttaaa	ccatattctt	ttaatcgaga	cgatcagggt	gcgttggtta	tgttttcttc	600
tggtagaact	ggtgtttcga	agggagtcac	gtaactcac	aagaatattg	ttgtacgatt	660

ttcttatgca	aaagatccta	cttttggttaa	cgcaattaat	ccaacgacag	caattttaac	720
ggtaatacct	ttccaccatg	gttttggtat	gatgaccaca	ttaggatact	ttacttgtgg	780
attccgagtt	gttctaatagc	acacgtttga	agaaaaacta	tttctacaat	cattacaaga	840
ttataaaagt	gaaagtactt	tacttgtacc	aacattaatg	gcattttcttg	caaaaagtgc	900
attagttgaa	aagtacgatt	tatcgcactt	aaaagaaatt	gcatctggtg	gcgcaccttt	960
atcaaaagaa	attggggaga	tggtgaaaaa	acggtttaaa	ttaaactttg	tcaggcaagg	1020
gtatggatta	acagaaacca	cttcggctgt	tttaattaca	ccgaacaatg	acgtcagacc	1080
gggatcaact	ggtaaaatag	taccatttca	cgctgttaaa	gttgtcgatc	ctacaacagg	1140
aaaaattttg	gggccaaatg	aaactggaga	attgtatttt	aaaggcgaca	tgataatgaa	1200
aggttattat	aataatgaag	aagctactaa	agcaattatt	aacaaagacg	gatggttgcg	1260
ctctggtgat	attgcttatt	atgacaatga	tggccatttt	tatattgtgg	acaggctgaa	1320
gtcattaatt	aaatataaag	gttatcaggt	tgcacctgct	gaaattgagg	gaatactctt	1380
acaacatccg	tatattgttg	atgccggcgt	tactggtata	ccggatgaag	ccgcgggcga	1440
gcttccagct	gcaggtgttg	tagtacagac	tggaaaaatat	ctaaacgaac	aaatcgtaca	1500
aaattttggt	tccagtcaag	tttcaacagc	caaatggcta	cgtggtgggg	tgaaattttt	1560
ggatgaaatt	cccaaaggat	caactggaaa	aattgacaga	aaagtgttaa	gacaaatggt	1620
tgaaaaacac	accaatggg					1639

<210> 4

<211> 1639

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> /Anmerkung = "mutierte Luciferase"

<400> 4

ggatccaatg	gaagataaaa	atattttata	tggacctgaa	ccattttatc	ccttggtgta	60
tgggacggct	ggagaacaga	tgttttacgc	attatctcgt	tatgcagata	tttcaggatg	120
catagcattg	acaaatgctc	atacaaaagc	ccctgtttta	tatgaagagt	ttttaaaatt	180
gtcgtgtcgt	ttagcggaaa	gttttaaaaa	gtatggatta	aaacaaaaacg	acacaatagc	240
ggtgtgtagc	gaaaaatggt	tgcaattttt	ccttcctata	attgcatcat	tgtatcttgg	300
aataattgca	gcacctgtta	gtgataaata	cattgaacgt	gaattaatac	acagtcttgg	360
tattgtaaaa	ccacgcataa	ttttttgctc	caagaatact	tttcaaaaag	tactgaatgt	420
aaaatctaaa	ttaaaatatg	tagaaactat	tattatatta	gacttaaatg	aagacttagg	480
aggttatcaa	tgccctcaaca	actttatttc	tcaaaattcc	gataattaatc	ttgacgtaaa	540
aaaatttaaa	ccatatttctt	ttaatcgaga	cgatcagggt	gcgttggtaa	tgttttcttc	600
tggatcaact	ggtgtttcga	agggagtcac	gtaactcac	aagaatattg	ttgcacgatt	660
ttctattgca	aaagatccta	cttttggttaa	cgcaattaat	ccaacgacag	caattttaac	720
ggtaatacct	ttccaccatg	gttttggtat	gatgaccaca	ttaggatact	ttacttgtgg	780
attccgagtt	gttctaatagc	acacgtttga	agaaaaacta	tttctacaat	cattacaaga	840
ttataaaagt	gaaagtactt	tacttgtacc	aacattaatg	gcattttttg	caaaaagtgc	900
attagttgaa	aagtacgatt	tatcgcactt	aaaagaaatt	gcatctggtg	gcgcaccttt	960
atcaaaagaa	attggggaga	tggtgaaaaa	acggtttaaa	ttaaactttg	tcaggcaagg	1020
gtatggatta	acagaaacca	cttcggctgt	tttaattaca	ccgaacaatg	acgtcagacc	1080
gggatcaact	ggtaaaatag	taccatttca	cgctgttaaa	gttgtcgatc	ctacaacagg	1140
aaaaattttg	gggccaaatg	aaactggaga	attgtatttt	aaaggcgaca	tgataatgaa	1200
aggttattat	aataatgaag	aagctactaa	agcaattatt	aacaaagacg	gatggttgcg	1260
ctctggtgat	attgcttatt	atgacaatga	tggccatttt	tatattgtgg	acaggctgaa	1320
gtcattaatt	aaatataaag	gttatcaggt	tgcacctgct	gaaattgagg	gaatactctt	1380
acaacatccg	tatattgttg	atgccggcgt	tactggtata	ccggatgaag	ccgcgggcga	1440
gcttccagct	gcaggtgttg	tagtacagac	tggaaaaatat	ctaaacgaac	aaatcgtaca	1500
aaattttggt	tccagtcaag	tttcaacagc	caaatggcta	cgtggtgggg	tgaaattttt	1560
ggatgaaatt	cccaaaggat	caactggaaa	aattgacaga	aaagtgttaa	gacaaatggt	1620
tgaaaaacac	accaatggg					1639

<210> 5

<211> 1639

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> /Anmerkung = "mutierte Luciferase"

<400> 5

ggatccaatg	gaagataaaa	atatatttata	tggacctgaa	ccattttatc	ccttggctga	60
tgggacggct	ggagaacaga	tgtttgacgc	attatctcgt	tatgcagata	tttcaggatg	120
catagcattg	acaaatgctc	atacaaaagc	ccctgtttta	tatgaagagt	tggtaaaatt	180
gtcgtgtcgt	ttagcggaaa	gttttaaaaa	gtatggatta	aaacaaaacg	acacaatagc	240
ggtgtgtagc	gaaaatgggt	tgcaattttt	ccttcctata	attgcatcat	tgtatcttgg	300
aataattgca	gcacctgtta	gtgataaata	cattgaacgt	gaattaatac	acagtcttgg	360
tattgtaaaa	ccacgcataa	ttttttgctc	caagaatact	tttcaaaaag	tactgaatgt	420
aaaatctaaa	ttaaaatatg	tagaaactat	tattatatta	gacttaaatg	aagacttagg	480
aggttatcaa	tgctcaaca	actttatttc	tcaaaattcc	gatattaatc	ttgacgtaaa	540
aaaattttaa	ccatattctt	ttaatcgaga	cgatcagggt	gcgttggtta	tgttttcttc	600
tggtaacaact	ggtgtttcga	agggagtcac	gtaactcac	aagaatattg	ttgcacgatt	660
ttctcatgca	aaagatccta	cttttggtta	cgcaattaat	ccaacgacag	caattttaac	720
ggtaataacct	ttccaccatg	gttttggtat	gatgaccaca	ttaggatact	ttacttgtgg	780
attccgagtt	gttctaatac	acacgtttga	agaaaaacta	tttctacaat	cattacaaga	840
ttataaagtg	gaaagtactt	tacttgtacc	aacattaatg	gcattttttg	caaaaagtgc	900
attagttgaa	aagtacgatt	tatcgcaact	aaaagaaaatt	gcactctggtg	gcgcaccttt	960
atcaaaaaga	attggggaga	tggtgaaaaa	acggttttaa	ttaaactttg	tcaggcaagg	1020
gtatggatta	acagaaacca	cttcggctgt	tttaattaca	ccgaacaatg	acgtcagacc	1080
gggatcaact	ggtaaaaatg	taccatttca	cgctgttaaa	gttgctgatc	ctacaacagg	1140
aaaaattttg	gggccaaaatg	aaactggaga	attgtatttt	aaaggcgaca	tgataatgaa	1200
aggttattat	aataatgaag	aagctaacta	agcaattatt	aacaaagacg	gatggttgcg	1260
ctctggtgat	attgcttatt	atgacaatga	tggccatttt	tataattgtg	acaggctgaa	1320
gtcatttaatt	aaatataaag	gttatcaggt	tgcacctgct	gaaattgagg	gaatactctt	1380
acaacatccg	tataattgtt	atgccggcgt	tactggtata	ccggatgaag	ccgcgggcga	1440
gcttccagct	gcagggtgtt	tagtacagac	tggaaaaatat	ctaaacgaac	aaatcgtaaa	1500
aaattttgtt	tccagtcaag	tttcaacagc	caaatggcta	cgtggtgggg	tgaaattttt	1560
ggatgaaatt	cccaaaggat	caactggaaa	aattgacaga	aaagtgttaa	gacaaaatgtt	1620
tgaaaaaacac	accaatggg					1639

<210> 6

<211> 1639

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> /Anmerkung = "mutierte Luciferase"

<400> 6

ggatccaatg	gcagataaga	atatatttata	tgggcccga	ccattttatc	ccttggctga	60
tgggacggct	ggagaacaga	tgtttgacgc	attatctcgt	tatgcagata	tttcaggatg	120
catagcattg	acaaatgctc	atacaaaaga	aaatgtttta	tatgaagagt	ttttaaaatt	180
gtcgtgtcgt	ttagcggaaa	gttttaaaaa	gtatggatta	aaacaaaacg	acacaatagc	240
ggtgtgtagc	gaaaatgggt	tgcaattttt	ccttcctgta	attgcatcat	tgtatcttgg	300
aataattgca	gcacctgtta	gtgataaata	cattgaacgt	gaattaatac	acagtcttgg	360
tattgtaaaa	ccacgcataa	ttttttgctc	caagaatact	tttcaaaaag	tactgaatgt	420
aaaatctaaa	ttaaaatctg	tagaaactat	tattatatta	gacttaaatg	aagacttagg	480
aggttatcaa	tgctcaaca	actttatttc	tcaaaattcc	gatagtaatc	tggacgtaaa	540
aaaattttaa	ccatattctt	ttaatcgaga	cgatcagggt	gcgttggtta	tgttttcttc	600
tggtaacaact	ggtgttccga	agggagtcac	gtaactcac	aagaatattg	ttgcacgatt	660
ttctcttgca	aaagatccta	cttttggtta	cgcaattaat	cccacgacag	caattttaac	720
ggtaataacct	ttccaccatg	gttttggtat	gatgaccaca	ttaggatact	ttacttgtgg	780
attccgagtt	gttctaatac	acacgtttga	agaaaaacta	tttctacaat	cattacaaga	840
ttataaagtg	gaaagtactt	tacttgtacc	aacattaatg	gcatttcttg	caaaaagtgc	900
attagttgaa	aagtacgatt	tatcgcaact	aaaagaaaatt	gcactctggtg	gcgcaccttt	960
atcaaaaaga	attggggaga	tggtgaaaaa	acggttttaa	ttaaactttg	tcaggcaagg	1020

gtatggatta	acagaaacca	cttcggctgt	tttaattaca	ccgaaagggtg	acgccagacc	1080
gggatcaact	ggtaaaatag	taccattttca	cgctgttaaa	gttgtcgatc	ctacaacagg	1140
aaaaattttg	gggccaaaatg	aacctggaga	attgtatttt	aaaggcgcca	tgataatgaa	1200
gggttattat	aataatgaag	aagctactaa	agcaattatt	gataatgacg	gatggttgcg	1260
ctctggtgat	attgcttatt	atgacaatga	tggccatttt	tatattgtgg	acaggctgaa	1320
gtcattaatt	aaatataaag	gttatcaggt	tgcacctgct	gaaattgagg	gaatactctt	1380
acaacatccg	tatattgttg	atgccggcgt	tactggtata	ccggatgaag	ccgcgggcga	1440
gcttccagct	gcagggtgttg	tagtacagac	tggaaaatat	ctaaacgaac	aaatcgtaca	1500
agattttgtt	tccagtcaag	tttcaacagc	caaatggcta	cgtggtgggg	tgaaattttt	1560
ggatgaaatt	cccaaaggat	caactggaaa	aattgacaga	aaagtgttaa	gacaaatggt	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	gcagataaaa	atattttata	tgggcccga	ccattttatc	ccttggctga	60
tgggacggct	ggagaacaga	tgttttacgc	attatctcgt	tatgcagata	tttcaggatg	120
catagcattg	acaaatgctc	atacaaaagc	ccctgtttta	tatgaagagt	ttttaaaatt	180
gtcgtgtcgt	ttagcggaaa	gttttaaaaa	gtatggatta	aaacaaaacg	acacaatagc	240
ggtgtgtagc	gaaaatgggt	tgcaattttt	ccttcctgta	attgcatcat	tgtatcttgg	300
aataattgca	gcacctgtta	gtgataaata	cattgaacgt	gaattaatac	acagtcttgg	360
tattgtaaaa	ccacgcataa	ttttttgctc	caagaatact	tttcaaaaag	tactgaatgt	420
aaaatctaaa	ttaaaatatg	tagaaactat	tattatatta	gacttaaatg	aagacttagg	480
aggttatcaa	tgcctcaaca	actttatttc	tcaaaattcc	gatattaatc	ttgacgtaaa	540
aaaattttaa	ccatattctt	ttaatcgaga	cgatcaggtt	gcgttggtaa	tgttttcttc	600
tggtagaact	ggtgttccga	agggagtcac	gctaactcac	aagaatattg	ttgcacgatt	660
ttctcttgca	aaagatccta	cttttggtta	cgcaattaat	ccaacgacag	caatttttaac	720
ggtaatacct	ttccaccatg	gttttggtat	gatgaccaca	ttaggatact	ttacttgtgg	780
attccgagtt	gttctaattg	acacgtttga	agaaaaacta	tttctacaat	cattacaaga	840
ttataaaagt	gaaagtactt	tacttgtacc	aacattaatg	gcatttcttg	caaaaagtgc	900
attagttgaa	aagtacgatt	tatcgcaact	aaaagaaaatt	gcatctggtg	gcgcaccttt	960
atcaaaaagaa	attggggaga	tggtgaaaaa	acggttttaa	ttaaaacttg	tcaggcaagg	1020
gtatggatta	acagaaacca	cttcggctgt	tttaattaca	ccgaaannnn	nngtcagacc	1080
gggatcaact	ggtaaaatag	taccattttca	cgctgttaaa	gttgtcgatc	ctacaacagg	1140
aaaaattttg	gggccaaaatg	aacctggaga	attgtatttt	aaaggcgaca	tgataatgaa	1200
aggttattat	aataatgaag	aagctactaa	agcaattatt	gataaagacg	gatggttgcg	1260
ctctggtgat	attgcttatt	atgacaatga	tggccatttt	tatattgtgg	acaggctgaa	1320
gtcattaatt	aaatataaag	gttatcaggt	tgcacctgct	gaaattgagg	gaatactctt	1380
acaacatccg	tatattgttg	atgccggcgt	tactggtata	ccggatgaag	ccgcgggcga	1440
gcttccagct	gcagggtgttg	tagtacagac	tggaaaatat	ctaaacgaac	aaatcgtaca	1500
aaattttgtt	tccagtcaag	tttcaacagc	caaatggcta	cggggtgggg	tgaaattttt	1560
ggatgaaatt	cccaaaggat	caactggaaa	aattgacaga	aaagtgttaa	gacaaatggt	1620
tgaaaaaacac	accaatggg					1639

<210> 8

<211> 1639

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

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

<223> Anmerkung = "Mutierte Luciferase"

<400> 8

ggatccaatg	gcagataaaa	atatatttata	tgggcccga	ccattttatc	ccttggctga	60
tgggacggct	ggagaacaga	tgttttacgc	attatctcgt	tatgcagata	tttcaggatg	120
catagcattg	acaaatgctc	atacaaaagc	ccctgtttta	tatgaagagt	tgttaaaatt	180
gtcgtgtcgt	ttagcggaaa	gttttaaaaa	gtatggatta	aaacaaaacg	acacaatagc	240
ggtgtgtagc	gaaaatggtt	tgcaatatit	ccttcctgta	attgcatcat	tgtatccttg	300
aataattgca	gcacctgtta	gtgataaata	cattgaacgt	gaattaatac	acagtcttgg	360
tattgtaaaa	ccacgcataa	ttttttgctc	caagaatact	tttcaaaaag	tactgaatgt	420
aaaatctaaa	ttaaaatatg	tagaaactat	tattatatta	gacttaaatg	aagacttagg	480
aggttatcaa	tgccctcaaca	actttatttc	tcaaaaattcc	gatattaatc	ttgacgtaaa	540
aaaatttaaa	ccatattctt	ttaatcgaga	cgatcagggt	gcgttggtta	tgttttcttc	600
tgggtacaact	ggtgttccga	agggagtcac	gctaactcac	aagaatattg	ttgcacgatt	660
ttctattgca	aaagatccta	cttttggtta	cgcaattaat	ccaacgcacg	caattttaac	720
ggtaatacct	ttccaccatg	gttttggtat	gatgaccaca	ttaggatact	ttacttgtgg	780
attccgagtt	gttctaattg	acacgtttga	agaaaaacta	tttctacaat	cattacaaga	840
ttataaagtg	gaaagtactt	tacttgtacc	aacattaatg	gcatttcttg	caaaaagtgc	900
attagttgaa	aagtacgatt	tatcgcaact	aaaagaaaatt	gcactctggt	gcgcaccttt	960
atcaaaagaa	attggggaga	tggtgaaaaa	acggttttaa	ttaaactttg	tcaggcaagg	1020
gtatggatta	acagaaacca	cttcggctgt	tttaattaca	ccgaaannnn	nngccagacc	1080
gggatcaact	ggtaaaatag	taccattttca	cgctgttaaa	gttgtcgatc	ctacaacagg	1140
aaaaattttg	gggccaatg	aacctggaga	attgtatttt	aaaggcgcca	tgataatgaa	1200
gggttattat	aataatgaag	aagctactaa	agcaattatt	aacaaaagac	gatggttgcg	1260
ctctggtgat	attgcttatt	atgacaatga	tggccatttt	tatatgtggg	acaggctgaa	1320
gtcattaatt	aaatataaag	gttatcaggt	tgcacctgct	gaaattgagg	gaatactctt	1380
acaacatccg	tatatgtttg	atgccggcgt	tactggtata	ccggatgaag	ccgcgggcga	1440
gcttccagct	gcaggtgttg	tagtacagac	tggaaaaatat	ctaaacgaac	aaatcgtaac	1500
aaattttgtt	tccagtcaag	tttcaacagc	caaatggcta	cgtggtgggg	tgaaattttt	1560
ggatgaaatt	cccaaaggat	caactggaaa	aattgacaga	aaagtgttaa	gacaaatggt	1620
tgaaaaaacac	accaatggg					1639

<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	atatatttata	tgggcccga	ccattttatc	ccttggctga	60
tgggacggct	ggagaacaga	tgttttgacgc	attatctcgt	tatgcagata	tttcaggatg	120
catagcattg	acaaatgctc	atacaaaagc	ccctgtttta	tatgaagagt	tgttaaaatt	180
gtcgtgtcgt	ttagcggaaa	gttttaaaaa	gtatggatta	aaacaaaacg	acacaatagc	240
ggtgtgtagc	gaaaatggtt	tgcaattttt	ccttcctgta	attgcatcat	tgtatccttg	300
aataattgca	gcacctgtta	gtgataaata	cgttgaacgt	gaattaatac	acagtcttgg	360
tattgtaaaa	ccacgcataa	ttttttgctc	caagaatact	tttcaaaaag	tactgaatgt	420
aaaatctaaa	ttaaaatatg	tagaaactat	tattatatta	gacttaaatg	aagacttagg	480
aggttatcaa	tgccctcaaca	actttatttc	tcaaaaattcc	gatagtaatc	ttgacgtaaa	540
aaaatttaaa	ccaaattctt	ttaatcgaga	cgatcagggt	gcgttggtta	tgttttcttc	600
tgggtacaact	ggtgtttcga	agggagtcac	gctaactcac	aagaatattg	ttgcacgatt	660

ttctcttgca	aaagatccta	cttttggttaa	cgcaattaat	ccaacgacag	caattttaac	720
ggtaatacct	ttccaccatg	gttttggtat	gatgaccaca	ttaggatact	ttacttgtgg	780
attccgagtt	gttctaatac	acacgtttga	agaaaaacta	tttctacaat	cattacaaga	840
ttataaagtg	gaaagtactt	tacttgtacc	aacattaatg	gcattttctt	caaaaaagtgc	900
attagttgaa	aagtacgatt	tatcgcactt	aaaagaaaatt	gcatctggtg	gcgcaccttt	960
atcaaaaagaa	attggggaga	tggtgaaaaa	acggtttaaa	ttaaactttg	tcaggcaagg	1020
gtatggatta	acagaaacca	cttcggctgt	tttaattaca	ccgaacnnnn	nngccagacc	1080
gggatcaact	ggtaaaaatag	taccatttca	cgctgttaaa	gttgctcgatc	ctacaacagg	1140
aaaaattttg	gggccaaaatg	aacctggaga	attgtatttt	aaaggcgcca	tgataatgaa	1200
gggttattat	aataatgaag	aagctactaa	agcaattatt	gataaagacg	gatggttgcg	1260
ctctggtgat	attgcttatt	atgacaatga	tggccatttt	tatattgtgg	acaggctgaa	1320
gtcattaatt	aaatataaag	gttatcaggt	tgcacctgct	gaaattgagg	gaatactctt	1380
acaacatccg	tatattgttg	atgccggcgt	tactggtata	ccggatgaag	ccgcgggcga	1440
gcttccagct	gcaggtgttg	tagtacagac	tggaaaatat	ctaaacgaac	aaatcgta	1500
aaattttggt	tccagtcaag	tttcaacagc	caaatggcta	cggtgtgggg	tgaaattttt	1560
ggatgaaatt	cccaaaggat	caactggaaa	aattgacaga	aaagtgttaa	gacaaatggt	1620
tgaaaaacac	accaatggg					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	gcagataaaa	atattttata	tgggcccga	ccattttatc	ccttggctga	60
tgggacggct	ggagaacaga	tgttttacgc	attatctcgt	tatgcagata	ttccgggctg	120
catagcattg	acaaatgctc	atacaaaagc	ccctgtttta	tatgaagagt	ttttaaaatt	180
gtcgtgtcgt	ttagcgga	gttttaaaaa	gtatggatta	aaacaaaacg	acacaatagc	240
ggtgtgtagc	gaaaaatggt	tgcaattttt	ccttcctgta	attgcatcat	tgtatcttgg	300
aataattgtg	gcacctgtta	acgataaata	cattgaacgt	gaattaatac	acagtcttgg	360
tattgtaaaa	ccacgcatag	ttttttgctc	caagaatact	tttcaaaaag	tactgaatgt	420
aaaatctaaa	ttaaaatctg	tagaaaactat	tattatatta	gacttaaatg	aagacttagg	480
aggttatcaa	tgctcaaca	actttatttc	tcaaaaattcc	gatattaatc	ttgacgtaaa	540
aaaatttaaa	ccatattctt	ttaatcgaga	cgatcaggtt	gcgttgatta	tgttttcttc	600
tggtagaact	ggtctgccga	agggagtcac	gctaactcac	aagaatattg	ttgcacgatt	660
ttctcttgca	aaagatccta	cttttggttaa	cgcaattaat	cccacgacag	caattttaac	720
ggtaatacct	ttccaccatg	gttttggtat	gatgaccaca	ttaggatact	ttacttgtgg	780
attccgagtt	gttctaatac	acacgtttga	agaaaaacta	tttctacaat	cattacaaga	840
ttataaagtg	gaaagtactt	tacttgtacc	aacattaatg	gcattttctt	caaaaaagtgc	900
attagttgaa	aagtacgatt	tatcgcactt	aaaagaaaatt	gcatctggtg	gcgcaccttt	960
atcaaaaagaa	attggggaga	tggtgaaaaa	acggtttaaa	ttaaactttg	tcaggcaagg	1020
gtatggatta	acagaaacca	cttcggctgt	tttaattaca	ccgaaannnn	nngccagacc	1080
gggatcaact	ggtaaaaatag	taccatttca	cgctgttaaa	gttgctcgatc	ctacaacagg	1140
aaaaattttg	gggccaaaatg	aacctggaga	attgtatttt	aaaggcccga	tgataatgaa	1200
gggttattat	aataatgaag	aagctactaa	agcaattatt	gataatgacg	gatggttgcg	1260
ctctggtgat	attgcttatt	atgacaatga	tggccatttt	tatattgtgg	acaggctgaa	1320
gtcattaatt	aaatataaag	gttatcaggt	tgcacctgct	gaaattgagg	gaatactctt	1380
acaacatccg	tatattgttg	atgccggcgt	tactggtatt	ccggatgaag	ccgcgggcga	1440
gcttccagct	gcaggtgttg	tagtacagac	tggaaaatat	ctaaacgaac	aaatcgta	1500
aaattttggt	tccagtcaag	tttcaacagc	caaatggcta	cggtgtgggg	tgaaattttt	1560
ggatgaaatt	cccaaaggat	caactggaaa	aattgacaga	aaagtgttaa	gacaaatggt	1620
tgaaaaacac	accaatggg					1639

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

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

<400> 11

ggatccaatg	gcagataaga	atatatttata	tgggcccga	ccattttatc	ccttggaaga	60
tgggacggct	ggagaacaga	tgtttgacgc	attatctcgt	tatgcagata	ttccgggctg	120
catagcattg	acaaatgctc	atacaaaaga	aaatgtttta	tatgaagagt	ttctgaaact	180
gtcgtgtcgt	ttagcggaaa	gttttaaaaa	gtatggatta	aaacaaaacg	acacaatagc	240
ggtgtgtagc	gaaaatggtc	tgcaattttt	ccttcctgta	attgcatcat	tgtatccttg	300
aataattgtg	gcacctgtta	acgataaata	cattgaacgt	gaattaatac	acagtcttgg	360
tattgtaaaa	ccacgcatag	ttttttgctc	caagaatact	tttcaaaaag	tactgaatgt	420
aaaatctaaa	ttaaaatcta	ttgaaactat	tattatatta	gacttaaatg	aagacttagg	480
aggttatcaa	tgccctcaaca	actttatttc	tcaaaattcc	gatagtaatc	tggacgtaaa	540
aaaatttaaa	ccatattctt	ttaatcgaga	cgatcagggt	gcgttgatta	tgttttcttc	600
tggtacaact	ggtctgccga	agggagtcac	gctaactcac	aagaatattg	ttgcacgatt	660
ttctcttgca	aaagatccta	cttttggtta	cgcaattaat	cccacgacag	caattttaac	720
ggtaatacct	ttccaccatg	gttttggtat	gätgaccaca	ttaggatact	ttacttgtgg	780
attccgagtt	gttctaattg	acacgtttga	agaaaaacta	tttctacaat	cattacaaga	840
ttataaagtg	gaaagtactt	tacttgtacc	aacattaatg	gcatttcttg	caaaaagtgc	900
attagttgaa	aagtacgatt	tatcgcactt	aaaagaaatt	gcactctggtg	gcgcaccttt	960
atcaaaagaa	attggggaga	tggtgaaaaa	acggttttaa	ttaaactttg	tcaggcaagg	1020
gtatggatta	acagaaacca	cttcggctgt	tttaattaca	ccgaaagggtg	acgccaaacc	1080
gggatcaact	ggtaaaaatg	taccatttca	cgctgtttaa	gttgctcgatc	ctacaacagg	1140
aaaaattttg	gggccaaaatg	aacctggaga	attgtatttt	aaaggcccga	tgataatgaa	1200
gggttattat	aataatgaag	aagctactaa	agcaattatt	gataatgacg	gatggttgcg	1260
ctctggtgat	attgcttatt	atgacaatga	tggccatttt	tatattgtgg	acaggctgaa	1320
gtcactgatt	aaatataaag	gttatcaggt	tgcacctgct	gaaattgagg	gaatactctt	1380
acaacatccg	tatattgttg	atgccggcgt	tactggtata	ccggatgaag	ccgcgggcga	1440
gcttccagct	gcagggtgtg	tagtacagac	tggaaaatat	ctaaacgaac	aaatcgtaca	1500
agattatggt	gccagtcaag	tttcaacagc	caaatggcta	cgtggtgggg	tgaaattttt	1560
ggatgaaatt	cccaaaggat	caactggaaa	aattgacaga	aaagtgttaa	gacaaatggt	1620
tgaaaaaacac	accaatggg					1639

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

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

<400> 12

ggatccaatg	gaagataaaa	atatatttata	tggacctgaa	ccattttatc	ccttggtctga	60
tgggacggct	ggagaacaga	tgttttacgc	attatctcgt	tatgcagata	tttcaggatg	120
catagcattg	acaaatgctc	atacaaaaga	aaatgtttta	tatgaagagt	ttttaaaatt	180
gtcgtgtcgt	ttagcggaaa	gttttaaaaa	gtatggatta	aaacaaaacg	acacaatagc	240
ggtgtgtagc	gaaaatgggt	tgcaattttt	ccttccttta	attgcatcat	tgtatccttg	300
aataattgca	gcacctgtta	gtgataaata	cattgaacgt	gaattaatac	acagtcttgg	360
tattgtaaaa	ccacgcataa	ttttttgttc	caagaatact	tttcaaaaag	tactgaatgt	420
aaaatctaaa	ttaaaatgat	tagaaactat	tattatatta	gacttaaatg	aagacttagg	480
aggttatcaa	tgccctcaaca	actttatttc	tcaaaattcc	gatattaatc	ttgacgtaaa	540
aaaatttaaa	ccaaattctt	ttaatcgaga	cgatcagggt	gcgttggtta	tgttttcttc	600
tggtacaact	ggtgtttcga	agggagtcac	gctaactcac	aagaatattg	ttgcacgatt	660
ttctcattgc	aaagatccta	cttttggtta	cgcaattaat	ccaacgacag	caattttaac	720

ggtaataacct	ttccaccatg	gttttggat	gatgaccaca	ttaggatact	ttacttgtgg	780
attccgaggt	gctctaata	gcacgtttga	agaaaaacta	tttctacaat	cattacaaga	840
ttataaaagt	gaaagtactt	tacttgtacc	aacattaatg	gcattttttg	caaaaagtgc	900
attagttgaa	aagtacgatt	tatcgcactt	aaaagaaaatt	gcatctgggtg	gcgcaccttt	960
atcaaaagaa	attggggaga	tggtgaaaaa	acggtttaaa	ttaaactttg	tcaggcaagg	1020
gtatggatta	acagaaacca	cttcggctgt	tttaattaca	ccggacactg	acgtcagacc	1080
gggatcaact	ggtaaaaatg	taccattttca	cgctgtttaaa	gttgctcgatc	ctacaacagg	1140
aaaaattttg	gggccaatg	aaactggaga	attgtatttt	aaaggcgaca	tgataatgaa	1200
aagttattat	aataatgaag	aagctactaa	agcaattatt	aacaaagacg	gatggttgcg	1260
ctctgggtgat	attgcttatt	atgacaatga	tggccatttt	tatatgtggg	acaggctgaa	1320
gtcattaatt	aaatataaag	gttatcaggt	tgcacctgct	gaaattgagg	gaatactctt	1380
acaacatccg	tatatgtgtg	atgccggcgt	tactggtata	ccggatgaag	ccgcgggcga	1440
gcttccagct	gcagggtgtg	tagtacagac	tggaaaaatat	ctaaacgaac	aaatcgta	1500
aaattttgtt	tccagtcaag	tttcaacagc	caaatggcta	cggtgtgggg	tgaaattttt	1560
ggatgaaatt	cccaaaggat	caactggaaa	aattgacaga	aaagtgttaa	gacaaatggt	1620
tgaaaaacac	aaatctaagc	tg				1642

<210> 13

<211> 1626

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> /Anmerkung = "mutierte Luciferase"

<400> 13

atgatgaagc	gagagaaaaa	tggtatata	ggacccgaac	ccctacaccc	cttgaagac	60
ttaacagctg	gagaaatgct	cttccgtgcc	cttcgaaaac	attctcattt	accgcaggct	120
ttagtagatg	tggttggcga	cgaatcgctt	tctataaaag	agttttttga	agcgacagtc	180
ctcctagcgc	aaagtctcca	caattgtgga	tacaagatga	atgatgtagt	gtcgatctgc	240
gccgagaata	atacaagatt	ttttattccc	gttattgcag	cttggtatat	tggtatgatt	300
gtagcacctg	ttaatgaaag	ttacatccca	gatgaactct	gtaaggatgat	gggtatatcg	360
aaaccacaaa	tagttttttac	gacaaagaac	atttttaaata	aggtattgga	ggtacagagc	420
agaactaatt	tcataaaaaag	gatcatcata	cttgatactg	tagaaaaacat	acacggttgt	480
gaaagtcctc	ccaatttttat	ttctcgttat	tcggatggaa	atattgccaa	cttcaaacct	540
ttacatttcg	atcctgttga	gcaagtggca	gctatcttat	gttcgtcagg	cactactgga	600
ttaccgaaaag	gtgtaatgca	aactcaccaa	aatatattgtg	tccgacttat	acatgcttta	660
gaccccaggg	caggaacgca	acttattcct	ggtgtgacag	tcttagtata	tctgcctttt	720
ttccatgctt	ttgggttctc	tataaccttg	ggatacttca	tggtgggtct	tcgtgttatc	780
atgttcagac	gatttgatca	agaagcattt	ctaaaaagcta	ttcaggatta	tgaagttcga	840
agtgtaatga	acgttccatc	agtaatatgt	ttcttatcga	aaagtccttt	ggttgacaaa	900
tacgatttat	caagtttaag	ggaattgtgt	tgcggtgcgg	caccattagc	aaaagaagtt	960
gctgagggtg	cagcaaaaacg	attaaaacttg	ccaggaattc	gctgtggatt	tggtttgaca	1020
gaatctactt	cagctaatat	acacagtcctt	agggatgaat	ttaaatcagg	atcacttgga	1080
agagttactc	ctttaatggc	agctaaaata	gcagataggg	aaactggtaa	agcattggga	1140
ccaaatcaag	ttggtgaatt	atgcattaaa	ggtcccattg	tatcgaaaag	ttacgtgaac	1200
aatgtagaag	ctaccaaaaga	agctattgat	gatgatggtt	ggcttcactc	tggagacttt	1260
ggatactatg	atgaggatga	gcatttctat	gtggtggacc	gttacaagga	attgattaaa	1320
tataagggct	ctcaggtagc	acctgcagaa	ctagaagaga	ttttattgaa	aaatccatgt	1380
atcagagatg	ttgctgtggg	tggtattcct	gatctagaag	ctggagaact	gccatctgcg	1440
tttgtgggtt	aacagcccgg	aaaggagatt	acagctaaag	aagtgtacga	ttatcttgcc	1500
gagaggggtc	cccatacaaa	gtatttgcgt	ggaggggttc	gattcgttga	tagcatacca	1560
aggaatgtta	caggtaaaaat	tacaagaaaag	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
	485	490
Val Gln Asn Phe Val Ser Ser	Gln Val Ser Thr Ala Lys	Trp Leu Arg
	500	505
Gly Gly Val Lys Phe Leu Asp	Glu Ile Pro Lys Gly Ser	Thr Gly Lys
	515	520
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 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 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 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 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						
	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														

				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	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

[illegible]

			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	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 Asn	Lys Asp Gly Trp
	405	410
Leu Arg Ser Gly Asp Ile	Ala Tyr Tyr Asp Asn	Asp Gly His Phe Tyr
	420	425
Ile Val Asp Arg Leu Lys	Ser Leu Ile Lys Tyr Lys	Gly Tyr Gln Val
	435	440
Ala Pro Ala Glu Ile Glu	Gly Ile Leu Leu Gln His	Pro Tyr Ile Val
	450	455
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
Val Gln Asn Phe Val Ser	Ser Gln Val Ser Thr Ala	Lys Trp Leu Arg
	500	505
Gly Gly Val Lys Phe Leu	Asp Glu Ile Pro Lys Gly	Ser Thr Gly Lys
	515	520
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
Ala Asp Gly Thr Ala Gly	Glu Gln Met Phe Asp Ala	Leu Ser Arg Tyr
	20	25
Ala Asp Ile Ser Gly Cys	Ile Ala Leu Thr Asn Ala	His Thr Lys Glu
	35	40
Asn Val Leu Tyr Glu Glu	Phe Leu Lys Leu Ser Cys	Arg Leu Ala Glu
	50	55
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
Leu Gly Ile Ile Ala Ala	Pro Val Ser Asp Lys Tyr	Ile Glu Arg Glu
	100	105
Leu Ile His Ser Leu Gly	Ile Val Lys Pro Arg Ile	Ile Phe Cys Ser
	115	120
Lys Asn Thr Phe Gln Lys	Val Leu Asn Val Lys Ser	Lys Leu Lys Ser
	130	135
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
	165	170
Val Lys Lys Phe Lys Pro	Tyr Ser Phe Asn Arg Asp	Asp Gln Val Ala
	180	185
Leu Val Met Phe Ser Ser	Gly Thr Thr Gly Val Pro	Lys Gly Val Met
	195	200
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		240
	245	250
Cys Gly Phe Arg Val Val Leu Met His Thr Phe Glu Glu Lys Leu Phe		255
	260	265
Leu Gln Ser Leu Gln Asp Tyr Lys Val Glu Ser Thr Leu Leu Val Pro		270
	275	280
Thr Leu Met Ala Phe Leu Ala Lys Ser Ala Leu Val Glu Lys Tyr Asp		285
	290	295
Leu Ser His Leu Lys Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro Leu Ser Lys		300
305	310	315
Glu Ile Gly Glu Met Val Lys Lys Arg Phe Lys Leu Asn Phe Val Arg		320
	325	330
Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala Val Leu Ile Thr Pro		335
	340	345
Lys Gly Asp Ala Arg Pro Gly Ser Thr Gly Lys Ile Val Pro Phe His		350
	355	360
Ala Val Lys Val Val Asp Pro Thr Thr Gly Lys Ile Leu Gly Pro Asn		365
	370	375
Glu Pro Gly Glu Leu Tyr Phe Lys Gly Ala Met Ile Met Lys Gly Tyr		380
385	390	395
Tyr Asn Asn Glu Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asp Asn Asp Gly Trp		400
	405	410
Leu Arg Ser Gly Asp Ile Ala Tyr Tyr Asp Asn Asp Gly His Phe Tyr		415
	420	425
Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Gln Val		430
	435	440
Ala Pro Ala Glu Ile Glu Gly Ile Leu Leu Gln His Pro Tyr Ile Val		445
	450	455
Asp Ala Gly Val Thr Gly Ile Pro Asp Glu Ala Ala Gly Glu Leu Pro		460
465	470	475
Ala Ala Gly Val Val Val Gln Thr Gly Lys Tyr Leu Asn Glu Gln Ile		480
	485	490
Val Gln Asp Phe Val Ser Ser Gln Val Ser Thr Ala Lys Trp Leu Arg		495
	500	505
Gly Gly Val Lys Phe Leu Asp Glu Ile Pro Lys Gly Ser Thr Gly Lys		510
	515	520
Ile Asp Arg Lys Val Leu Arg Gln Met Phe Glu Lys His Thr Asn Gly		525
	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 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	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					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	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	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	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> 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					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	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	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	Asn	Ser	Phe	Asn	Arg	Asp	Asp	Gln	Val	Ala
			180						185				190		
Leu	Val	Met	Phe	Ser	Ser	Gly	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					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	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> 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					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	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						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	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	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"

```

<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 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

```

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	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

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 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	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

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 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

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	Ile	Leu	Asp	Thr	Val	Glu	Asn	Ile	His	Gly	Cys
145					150					155				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					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	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					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	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	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> 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

```

      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              480
Glu Leu Pro Gly Ala Val Val Val Leu Glu Ser Gly Lys Asn 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 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              15
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              80
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              160
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              240
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

```

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 mingrelica*

<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 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

				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				

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				

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 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 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 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

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
	405	410
Trp Leu His Ser Gly	Asp Ile Ala Tyr Trp	Asp Glu Asp Glu His Phe
	420	425
Phe Ile Val Asp Arg	Leu Lys Ser Leu Ile	Lys Tyr Lys Gly Tyr Gln
	435	440
Val Ala Pro Ala Glu	Leu Glu Ser Ile Leu	Leu Gln His Pro Asn Ile
	450	455
Phe Asp Ala Gly Val	Ala Gly Leu Pro Asp	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
	485	490
Glu Ile Val Asp Tyr	Val Ala Ser Gln Val	Thr Thr Ala Lys Lys Leu
	500	505
Arg Gly Gly Val Val	Phe Val Asp Glu Val	Pro Lys Gly Leu Thr Gly
	515	520
Lys Leu Asp Ala Arg	Lys Ile Arg Glu Ile	Leu Ile Lys Ala Lys Lys
	530	535
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 15
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

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

			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	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	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.

<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
						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
						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
						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
					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

```

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 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 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

```

```

          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

```

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

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		
225	230	235
Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Thr 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 ccgccgag

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 atatatttata tgggcccga	ccattttatc ccttggaaga	60
tgggacggct ggagaacaga tgtttgacgc attatctcgt	tatgcagata ttccgggctg	120
catagcattg acaaatgctc atacaaaaga aaatgtttta	tatgaagagt ttctgaaact	180
gtcgtgtcgt ttagcggaaa gttttaaaaa gtatggatta	aaacaaaacg acacaatagc	240
ggtgtgtagc gaaaatagtc tgcaattttt ccttcctgta	attgcatcat tgtatcttgg	300
aataattgtg gcacctgtta acgataaata cattgaacgt	gaattaatac acagtcttgg	360
tattgtaaaa ccacgcatag ttttttgctc caagaatact	tttcaaaaag tactgaatgt	420
aaaatctaaa ttaaaatcta ttgaaactat tattatatta	gacttaaag atgacttagg	480
aggttatcaa tgcctcaaca actttatttc tcaaaattcc	gatagtaatc tggacgtaaa	540

```

aaaattttaa ccatattctt ttaatcgaga cgatcagggt gcgttgatta tgttttcttc 600
tggtagaact ggtctgccga agggagtcac gctaactcac aagaatattg ttgcacgatt 660
ttctattgca aaagatccta ctttttgtaa cgcaattaat cccacgtcag caattttaac 720
ggtaatacct ttccaccatg gtttttggtat gatgaccaca ttaggatact ttacttgtgg 780
attccgagtt gttctaattgc acacgtttga agaaaaacta tttctacaat cattacaaga 840
ttataaagtg gaaagtactt tacttgtacc aacattaatg gcatttcttg caaaaagtgc 900
attagttgaa aagtacgatt tatcgactt aaaagaaatt gcatctggtg gcgcaccttt 960
atcaaaagaa attggggaga tggtgaaaaa acggtttaaa ttaactttg tcaggcaagg 1020
gtatggatta acagaaacca cttcggctgt tttaattaca ccgaaagggt acgccaacc 1080
gggatcaact ggtaaaatag taccatttca cgctgtttaa gttgtcgatc ctacaacagg 1140
aaaaattttg gggccaaatg aacctggaga attgtatttt aaaggcccga tgataatgaa 1200
gggttattat aataatgaag aagctactaa agcaattatt gataatgacg gatggttgcg 1260
ctctggtgat attgcttatt atgacaatga tggccatttt tatattgtgg acaggctgaa 1320
gtcactgatt aaatataaag gttatcaggt tgcacctgct gaaattgagg gaatactctt 1380
acaacatccg tatattgttg atgccggcgt tactggtata ccggatgaag ccgcgggcga 1440
gcttccagct gcaggtgttg tagtacagac tggaaaatat ctaaacgaac aaatcgtaca 1500
agattatggt gccagtcaag tttcaacagc caaatggcta cgtggtgggg tgataattttt 1560
ggatgaaatt cccaaaggat caactggaaa aattgacaga aaagtgttaa gacaaatggt 1620
agaaaaacac accaatggg 1639

```

<210> 43

<211> 1639

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> /Anmerkung = "mutierte Luciferase"

<400> 43

```

ggatccaatg gcagataaga atattttata tgggcccga ccatthttat ccttgaaga 60
tgggacggct ggagaacaga tgtttgacgc attatctcgt tatgcagcta ttccgggctg 120
catagcattg acaaatgctc atacaaaaga aaatgtttta tatgaagagt ttctgaaact 180
gtcgtgtcgt ttagcgaaa gttttaaaaa gtatggatta aaacaaaacg acacaatagc 240
ggtgtgtagc gaaaatagtc tgcaattttt ctttctgta attgcatcat tgtatcttgg 300
aataattgtg gcacctgtta acgataaata cattgaacgt gaattaatac acagtcttgg 360
tattgtaaaa ccacgcatag ttttttgctc caagaatact tttcaaaaag tactgaatgt 420
aaaatctaaa ttaaaatcta ttgaaactat tattatatta gacttaaatg aagacttagg 480
aggttatcaa tgcctcaaca actttatttc tcaaaattcc gatagtaatc tggacgtaaa 540
aaaattttaa ccctattctt ttaatcgaga cgatcagggt gcgtcgatta tgttttcttc 600
tggtagaact ggtctgccga agggagtcac gctaactcac aagaatattg ttgcacgatt 660
ttctattgca aaagatccta ctttttgtaa cgcaattaat cccacgtcag caattttaac 720
ggtaatacct ttccaccatg gtttttggtat gatgaccaca ttaggatact ttacttgtgg 780
attccgagtt gttctaattgc acacgtttga agaaaaacta tttctacaat cattacaaga 840
ttataaagtg gaaagtactt tacttgtacc aacattaatg gcatttcttg caaaaagtgc 900
attagttgaa aagtacgatt tatcgactt aaaagaaatt gcatctggtg gcgcaccttt 960
atcaaaagaa attggggaga tggtgaaaaa acggtttaaa ttaactttg tcaggcaagg 1020
gtatggatta acagaaacca cttcggctgt tttaattaca ccgaaagggt acgccaacc 1080
gggatcaact ggtaaaatag taccatttca cgctgtttaa gttgtcgatc ctacaacagg 1140
aaaaattttg gggccaaatg aacctggaga attgtatttt aaaggcccga tgataatgaa 1200
gggttattat aataatgaag aagctactaa agcaattatt gataatgacg gatggttgcg 1260
ctctggtgat attgcttatt atgacaatga tggccatttt tatattgtgg acaggctgaa 1320
gtcactgatt aaatataaag gttatcaggt tgcacctgct gaaattgagg gaatactctt 1380
acaacatccg tatattgttg atgccggcgt tactggtata ccggatgaag ccgcgggcga 1440
gcttccagct gcaggtgttg tagtacagac tggaaaatat ctaaacgaac aaatcgtaca 1500
agattatggt gccagtcaag tttcaacagc caaatggcta cgtggtgggg tgaaattttt 1560
ggatgaaatt cccaaaggat caactggaaa aattgacaga aaagtgttaa gacaaatggt 1620
agaaaaacac accaatggg 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 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

```

			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	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

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
Gln Gly Tyr Gly Leu Thr	Glu Thr Thr Ser Ala	Val Leu Ile Thr Pro
	340	345
Lys Gly Asp Ala Lys Pro	Gly Ser Thr Gly Lys	Ile Val Pro Leu His
	355	360
Ala Val Lys Val Val Asp	Pro Thr Thr Gly Lys	Ile Leu Gly Pro Asn
	370	375
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
Leu Arg Ser Gly Asp Ile	Ala Tyr Tyr Asp Asn	Asp Gly His Phe Tyr
	420	425
Ile Val Asp Arg Leu Lys	Ser Leu Ile Lys Tyr	Lys Gly Tyr Gln Val
	435	440
Ala Pro Ala Glu Ile Glu	Gly Ile Leu Leu Gln	His Pro Tyr Ile Val
	450	455
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
Val Gln Asp Tyr Val Ala	Ser Gln Val Ser Thr	Ala Lys Trp Leu Arg
	500	505
Gly Gly Val Lys Phe Leu	Asp Glu Ile Pro Lys	Gly Ser Thr Gly Lys
	515	520
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

ggatcccatg	atgaagcgag	agaaaaatgt	tatatatgga	cccgaacccc	tacaccctt	60
ggaagactta	acagctggag	aatgctctt	ccgtgccctt	cgaaaacatt	ctcatttacc	120
gcaggcttta	gtagatgtgg	ttggcgacga	atcgctttcc	tataaagagt	tttttgaagc	180
gacagtcctc	ctagcgcaaa	gtctccacaa	ttgtggatac	aagatgaatg	atgtagtgtc	240
gatctgcgcc	gagaataata	caagattttt	tattcccgtt	attgcagctt	ggtatatttg	300
tatgattgta	gcacctgtta	atgaaaagtta	catcccagat	gaactctgta	aggtcatggg	360
tatatcgaaa	ccacaaatag	tttttacgac	aaagaacatt	ttaaataagg	tattggaggt	420
acagagcaga	actaattttca	taaaaaggat	catcgtactt	gatactgtag	aaaacataca	480
cggttgtgaa	agtcttccca	attttatttc	tcgttatctg	gatggaaata	ttgccaaact	540
caaaccttta	catttcgatc	ctgtagagca	agtggcagct	atcttatgtt	cgtcaggcac	600
tactggatta	ccgaaagggt	taatgcaaac	tcaccaaact	atgtgtgtcc	gacttatata	660
tgcttttagac	cccagggcag	gaacgcaact	tattcctggg	gtgacagtct	tagtatatct	720
gccttttttc	catgcttttg	ggttctctat	aaccttggga	tacttcatgg	tgggtcttcg	780
tgttatcatg	tcaagacgat	ttgatccaga	agcatttcta	aaagctattc	aggattatga	840
agttcgaagt	gtaattaacg	ttccatcagt	aatattgttc	ttatcgaaaa	gtcctttggg	900
tgacaaatac	gatttatcaa	gtttaaggga	attgtgttgc	ggtgcggcac	cattagcaaa	960
agaagttgct	gaggttgcag	caaaacgatt	aaacttgcca	ggaattcgct	gtggatttgg	1020

```

tttgacagaa totacttcag ctaatatata cagtcttagg gatgaattta aaccaggatc 1080
acttggaaga gttactcctt taatggcagc taaaatagca gatagggaaa ctggtaaagc 1140
attgggacca aatcaagttg gtgaattatg cattaaaggt cccatggtat cgaaagggtta 1200
cgtgaacaat gtagaagcta ccaaagaagc tattgatgat gatggttggc ttcactctgg 1260
agactttgga tactatgatg aggatgagca tttctatgtg gtggaccgtt acaaggaatt 1320
gattaaatat aagggtcttc aggtagcacc tgcagaacta gaagagattt tattgaaaaa 1380
tccatgtatc agagatgttg ctgtggttgg tattcctgat ctagaagctg gagaactgcc 1440
atctgcgttt gtggttaaac agcccggaaa ggagattaca gctaaagaag tgtacgatta 1500
tcttgccgag aggggtctccc atacaaagta tttgcgtgga ggggttcgat tcgttgatag 1560
cataccacgg aatgttacag gtaaaattac aagaaaggaa cttctgaagc agttgctgga 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

```

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					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	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 gctgtttgac gc

22

<210> 50
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

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

<400> 50
 gttatgcaga tattccgggc tgcatagcac tg 32

 <210> 51
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

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

 <400> 51
 cttggaataa ttgtggcacc tgtaaacgat aaatacattg 40

 <210> 52
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

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

 <400> 52
 aaccacgcat agttttttgc 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
 gttgcgttga 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 tttggtatga cgaccacatt ag

32

<210> 60

<211> 43

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> /Anmerkung = "ein Primer"

<400> 60

ttgttctaataat gcaccgcttt gaagaagaac tatttctaca atc

43

<210> 61

<211> 31

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> /Anmerkung = "ein Primer"

<400> 61
 aagtgcatta gttgataagt acgatttatc g 31
 <210> 62
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> /Anmerkung = "ein Primer"
 <400> 62
 cggttttaa at taccgggtgt caggcaag 28
 <210> 63
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> /Anmerkung = "ein Primer"
 <400> 63
 aagacgcaa 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
 tatttttaaag gcccgatgat aatgaagg 28
 <210> 66
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> /Anmerkung = "ein Primer"
 <400> 66
 ggatggttgc actctggtga tattg 25
 <210> 67

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

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

cagctgcagt tgttgtagta 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
 aatcgtaaa gattatgttg ccagtcaagt 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
 ataaaaatat tctgtatggt cccgaacc 28
 <210> 73
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> /Anmerkung = "ein Primer"
 <400> 73
 atgtttgacg 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
 aagaaaatgt 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
 cgaaaatggt ctgcaatttt tc 22
 <210> 78

<211> 29
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

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

<400> 78
 aattgcatca ctgtatctgg gaataattg 29

<210> 79
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

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

<400> 79
 ttgaacgtga actgatacac agtctgggta 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
 tctttttaatc 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
tggaaaagtac tctgctggta ccaacactga tggcatttc 39

<210> 86
<211> 30
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

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

<400> 86
cgatttatcg cacctgaaag aaattgcatc 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
 aggaataatt 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
 aggaataact gctgcaacat ccg 23

<210> 92
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

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

<400> 92
 cagtcaagtt tcaaccgcca aatggctgctg tggtgggg 38

<210> 93
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

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

<400> 93
 gaaaaattga 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

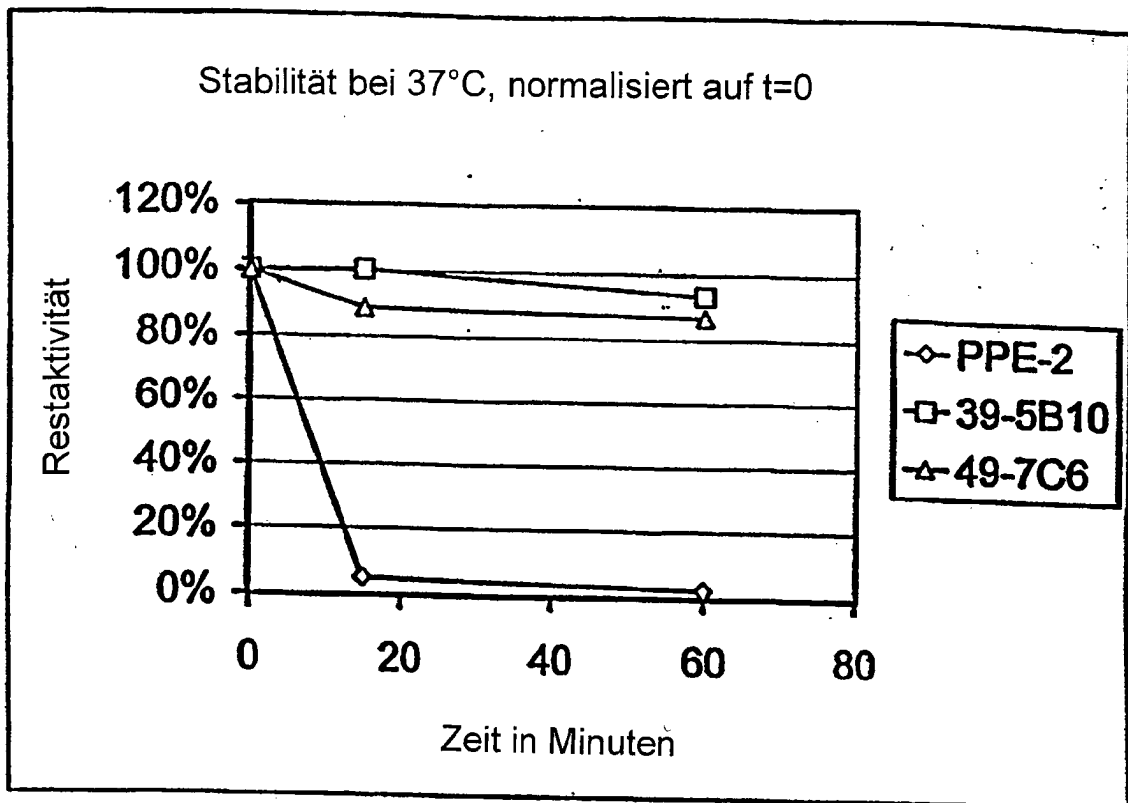


FIG. 1

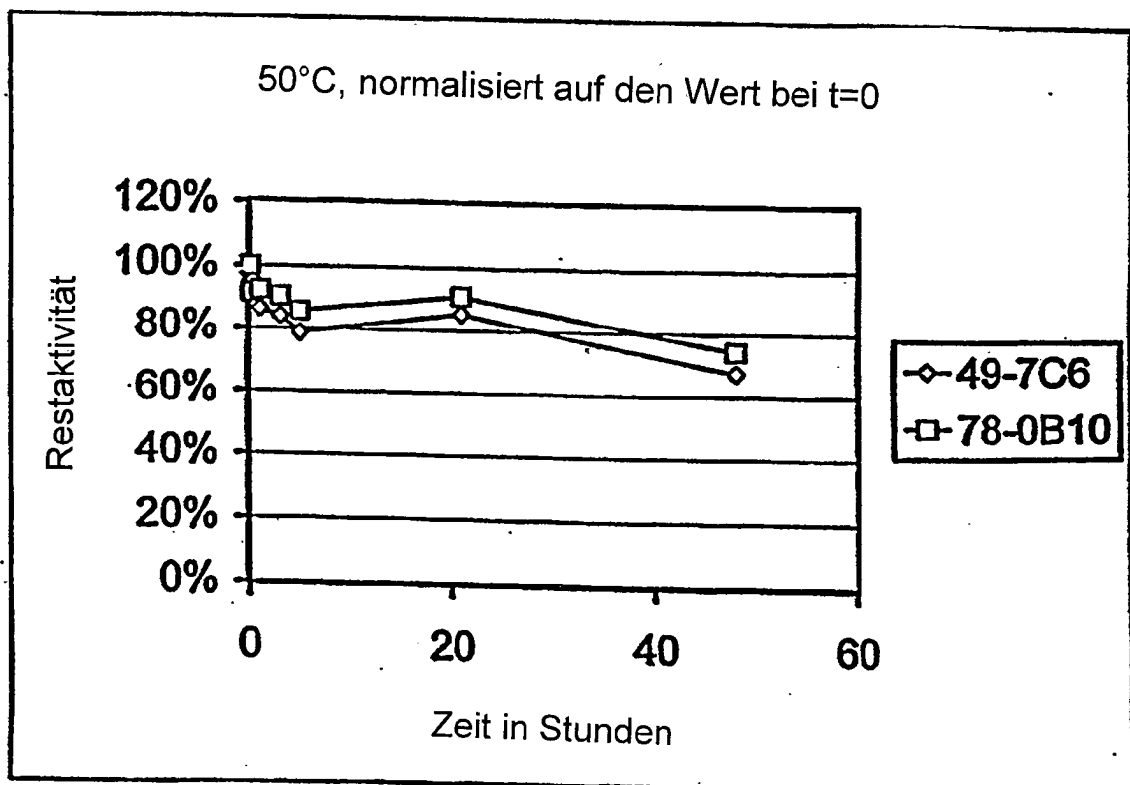


FIG. 2

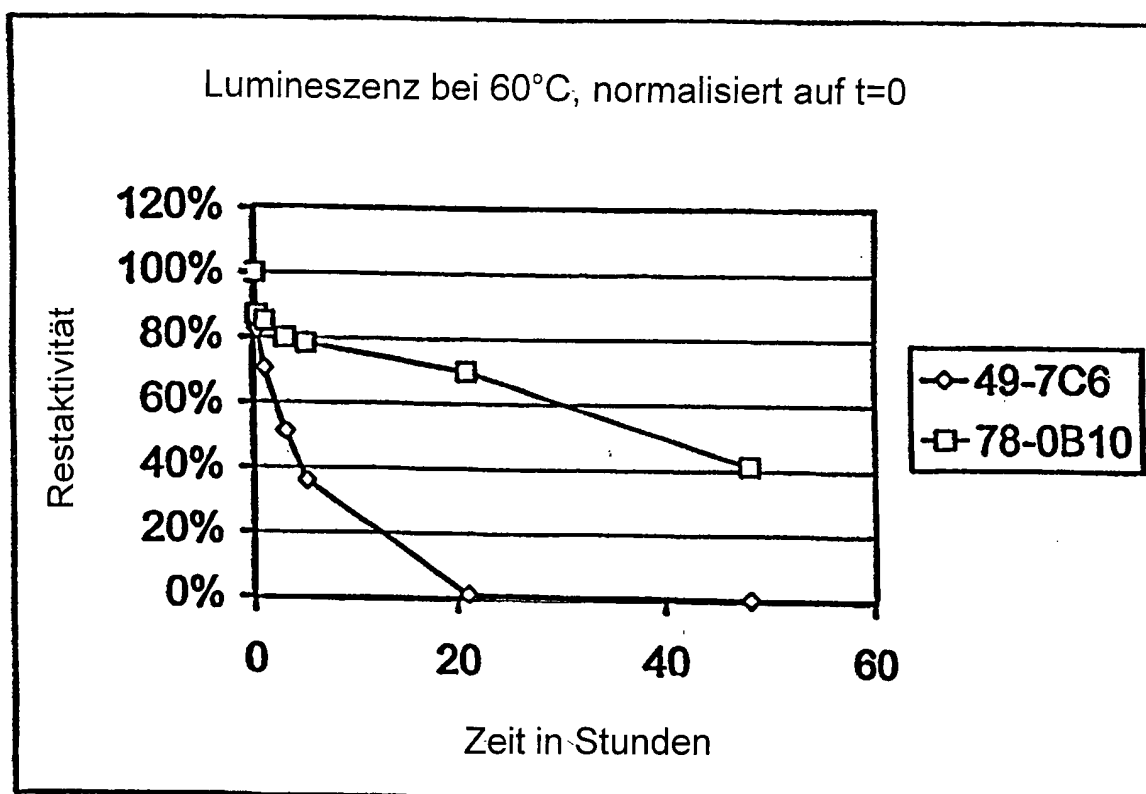


FIG. 3

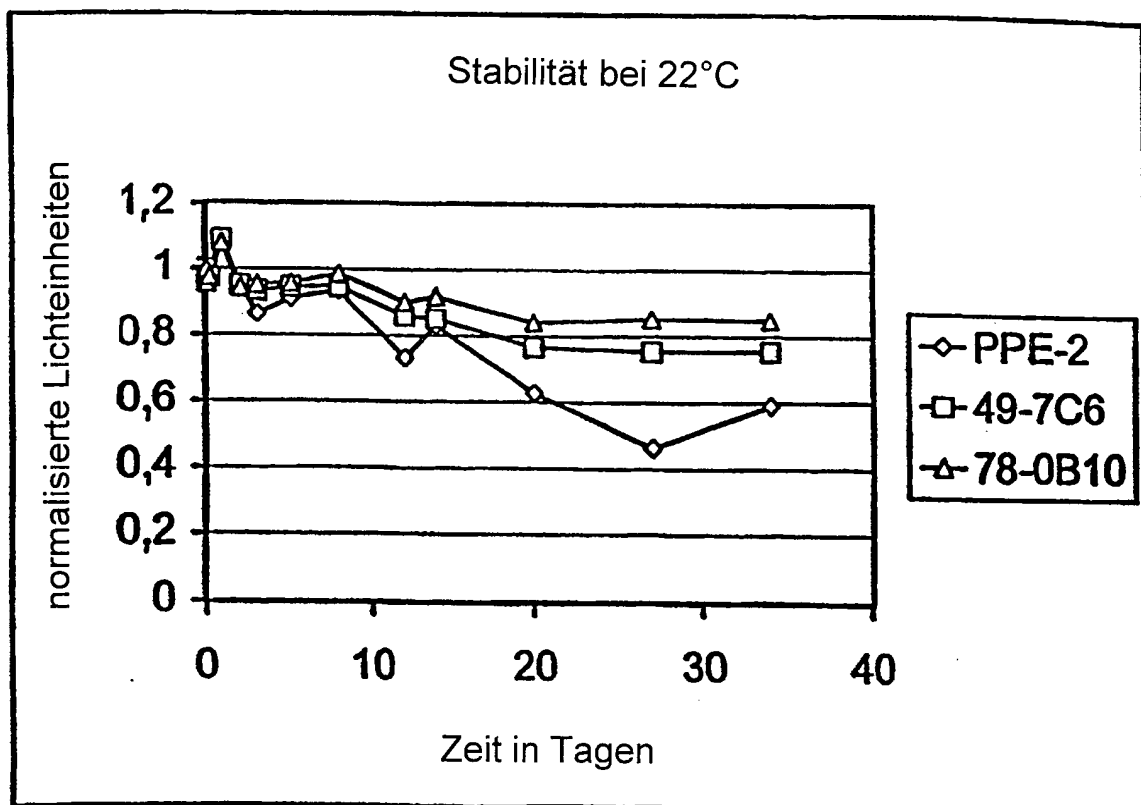


FIG. 4

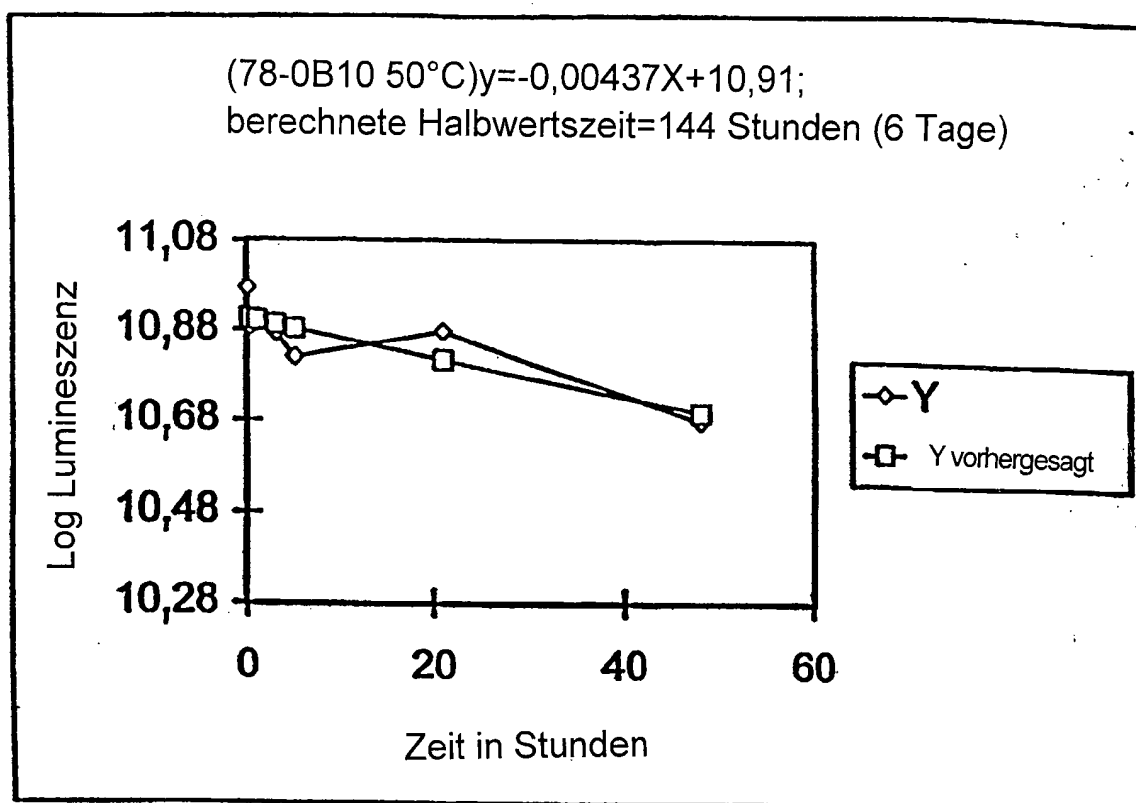


FIG. 5

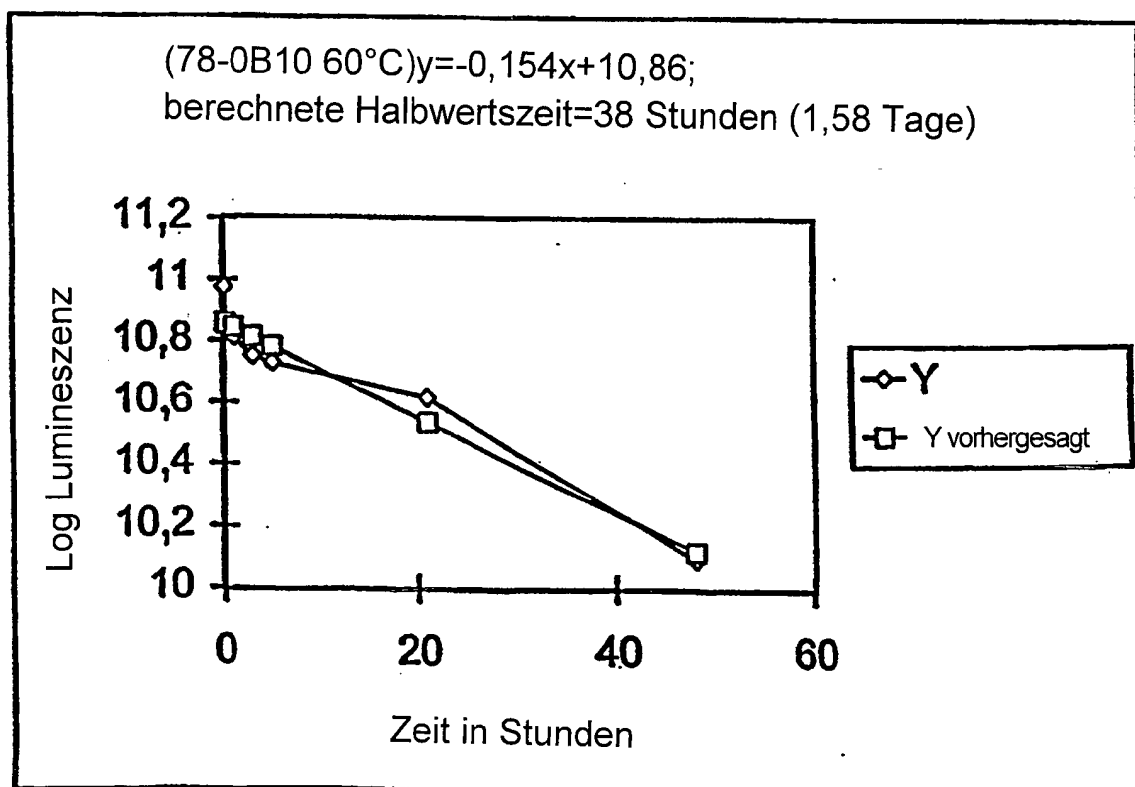


FIG. 6

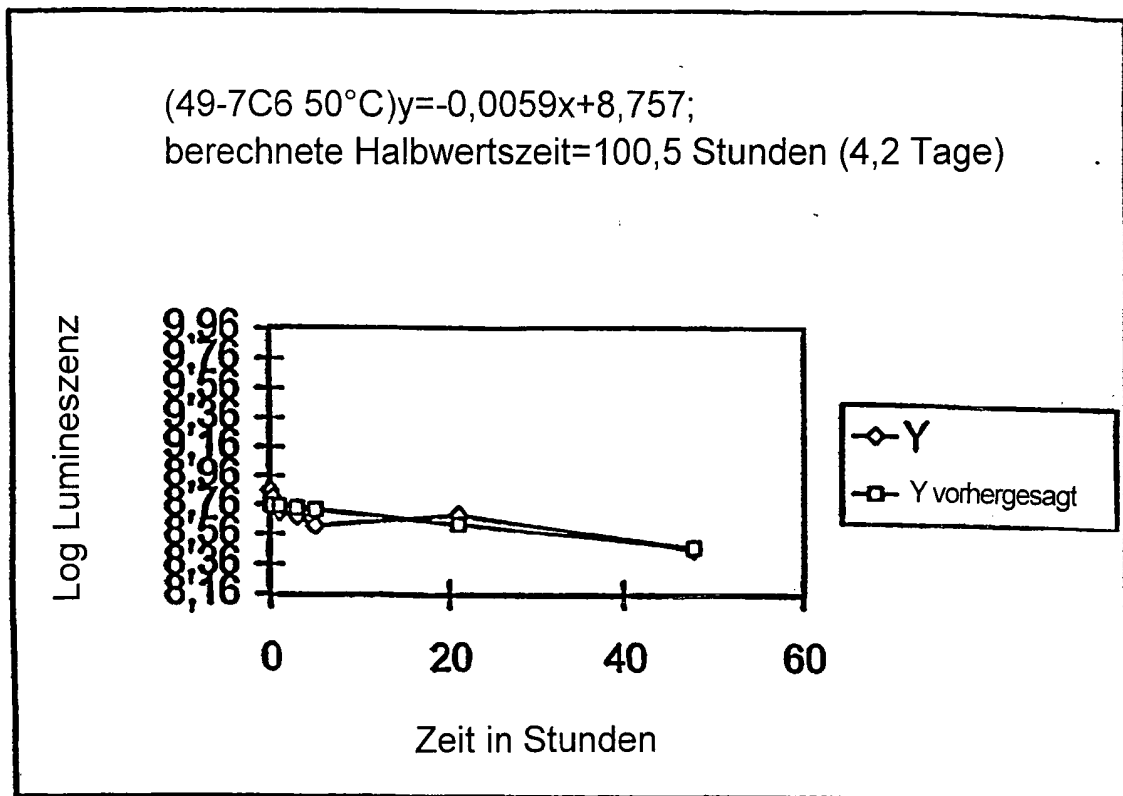


FIG. 7

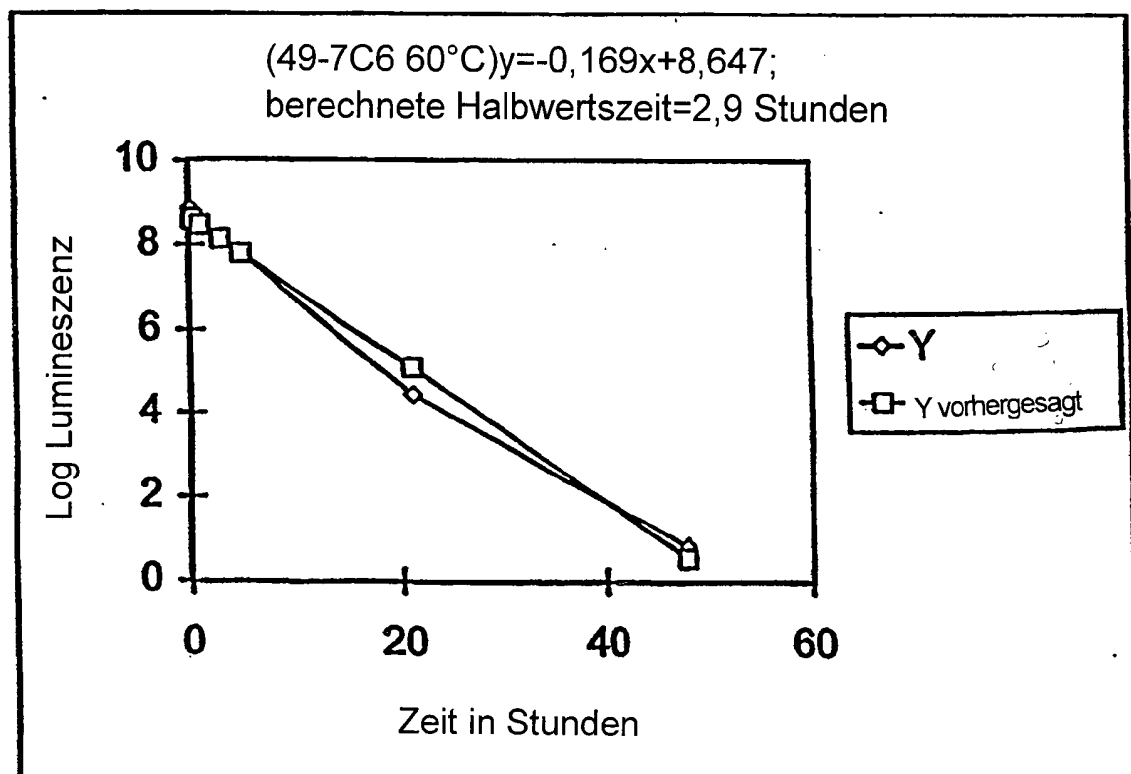


FIG. 8

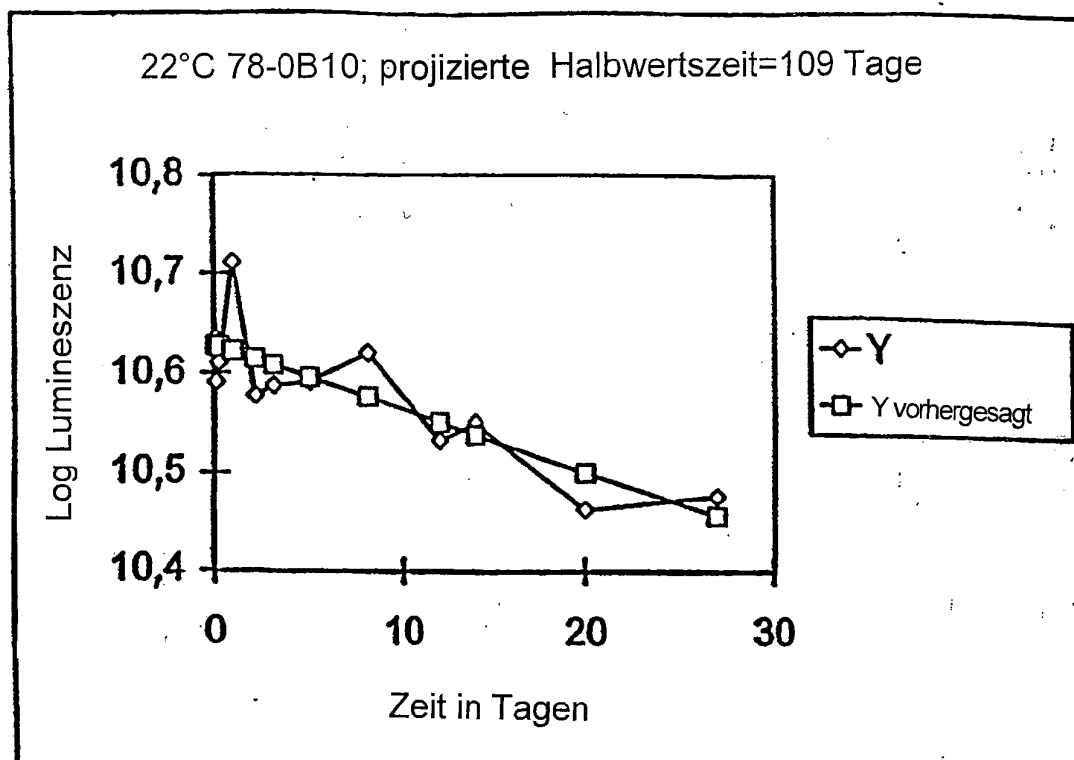


FIG. 9

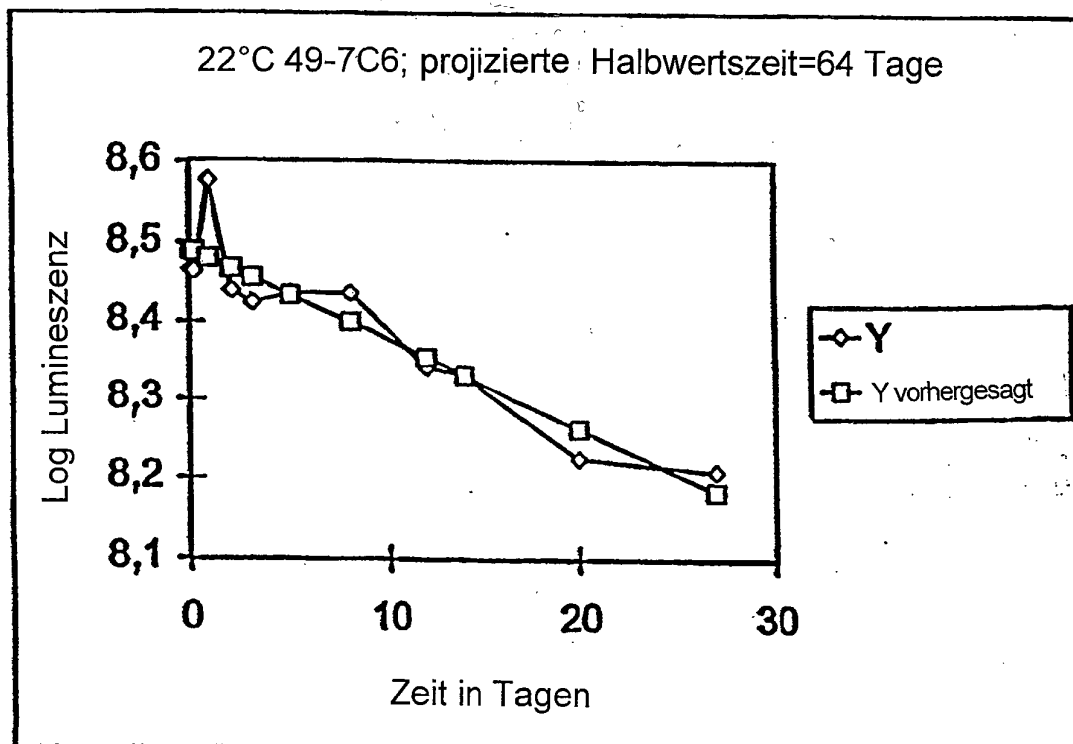


FIG. 10

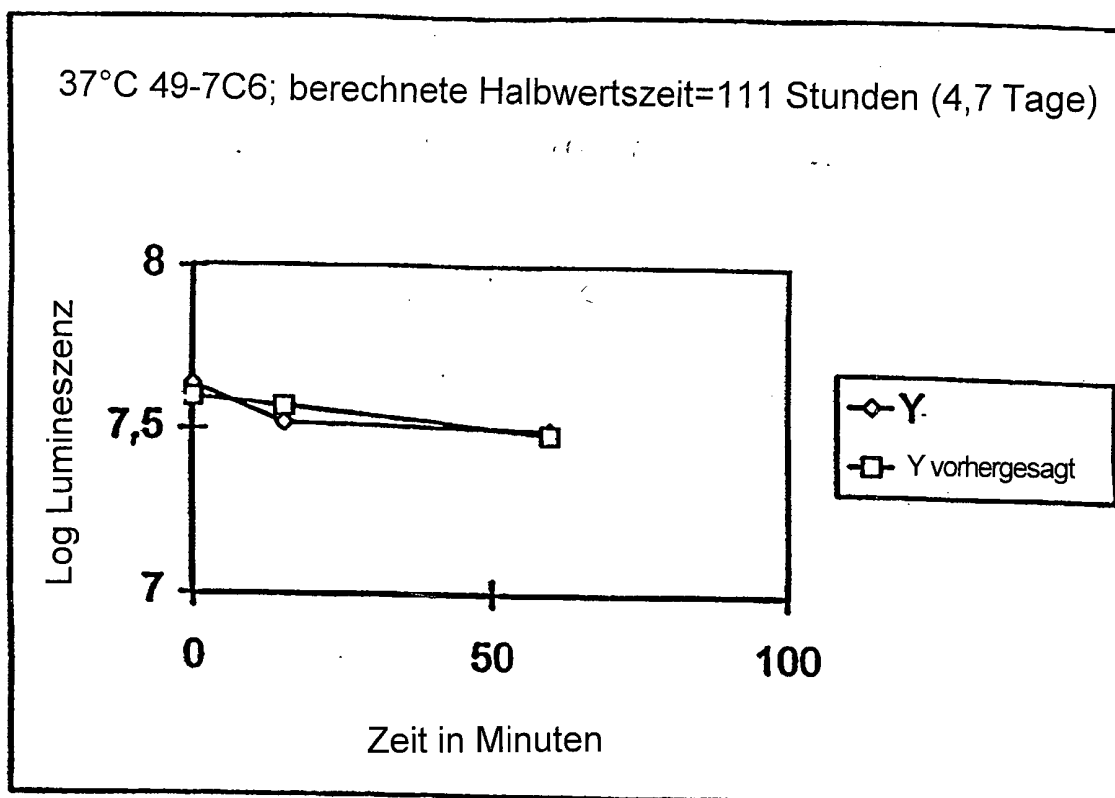


FIG. 11

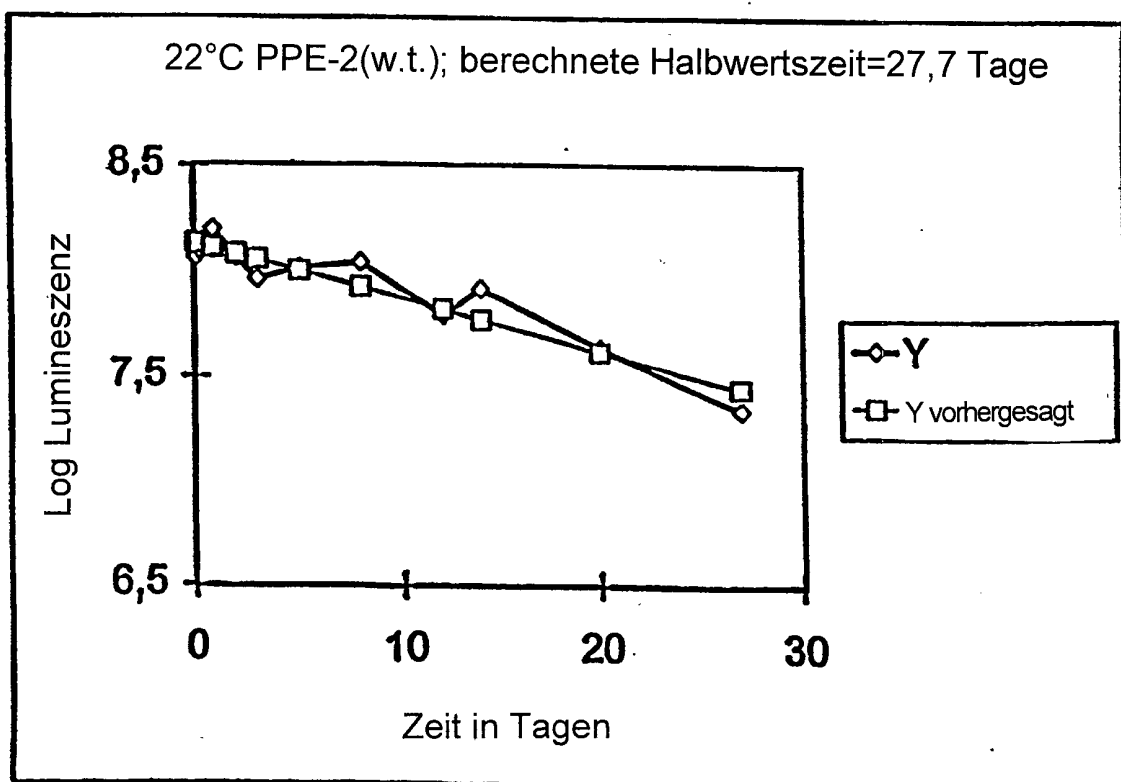


FIG. 12

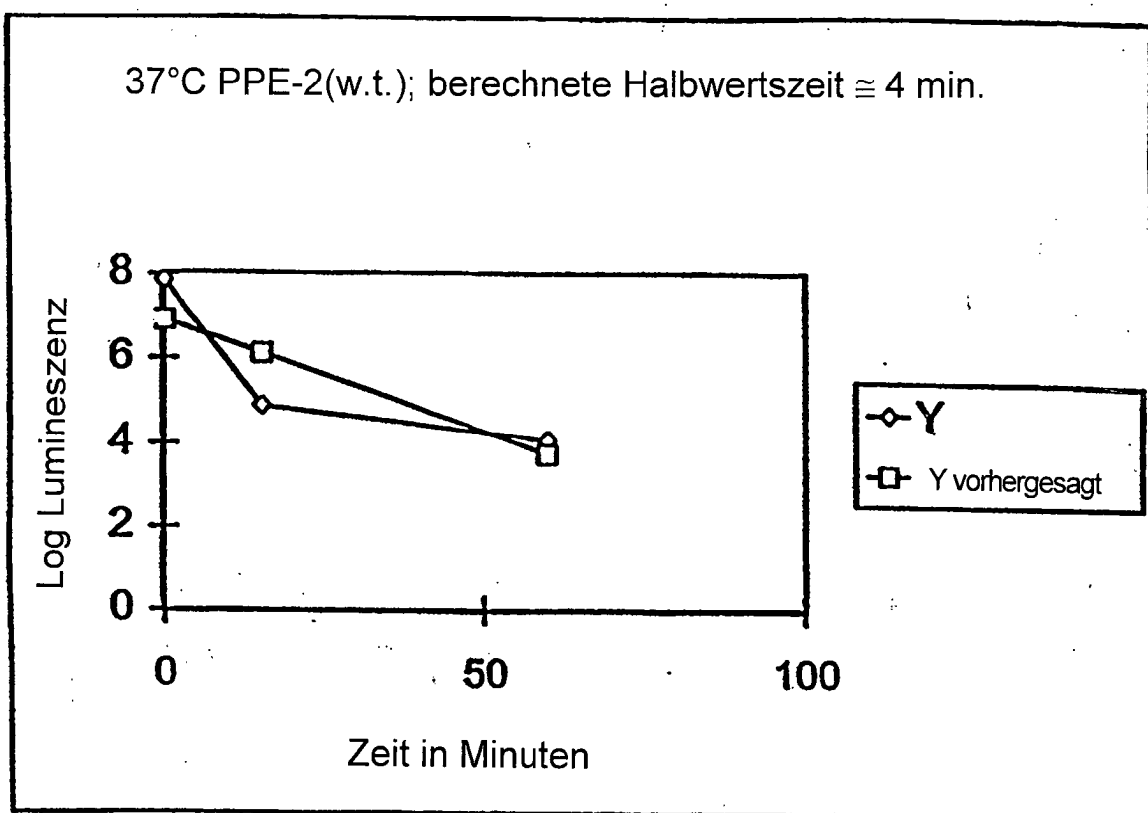


FIG. 13

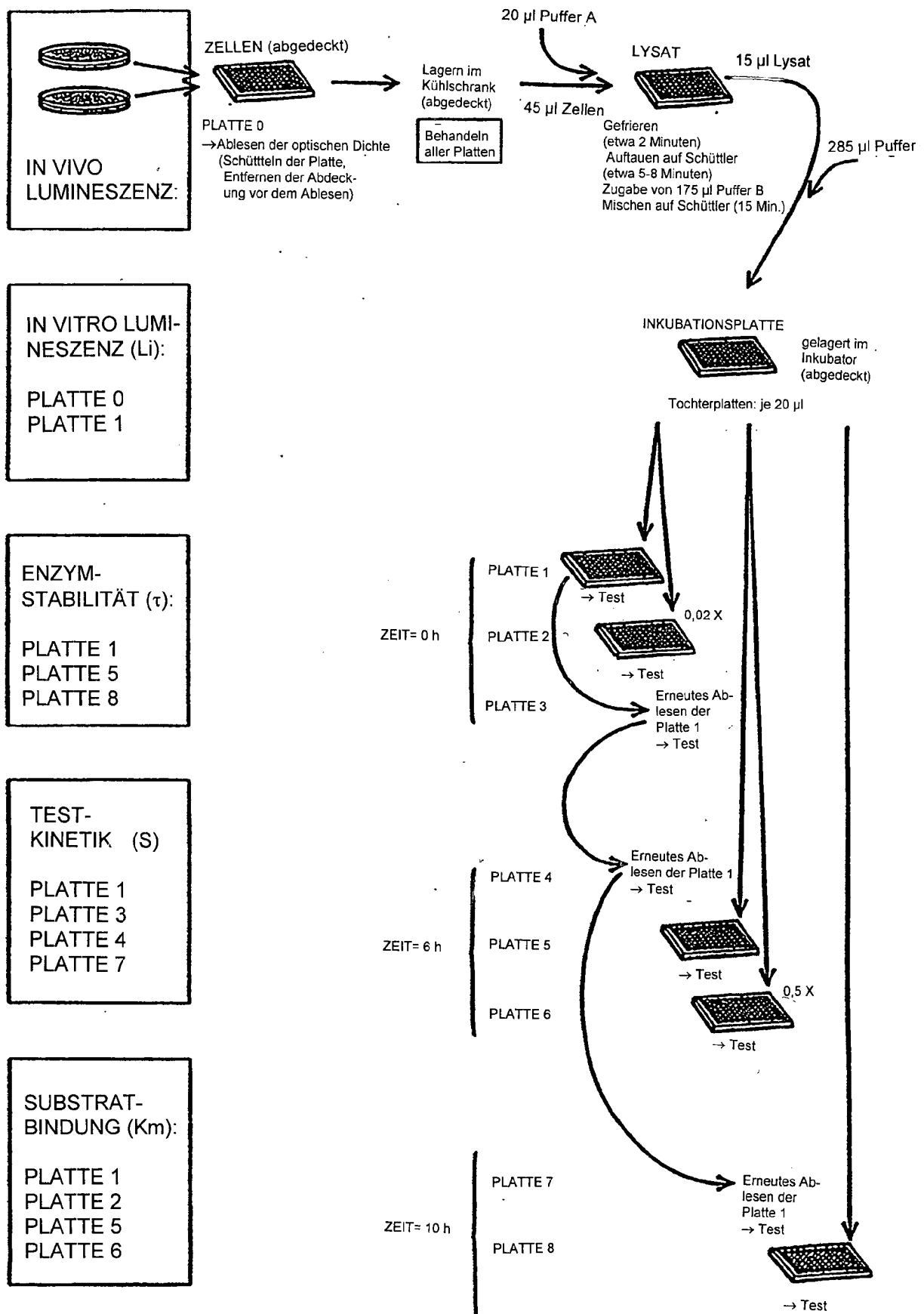
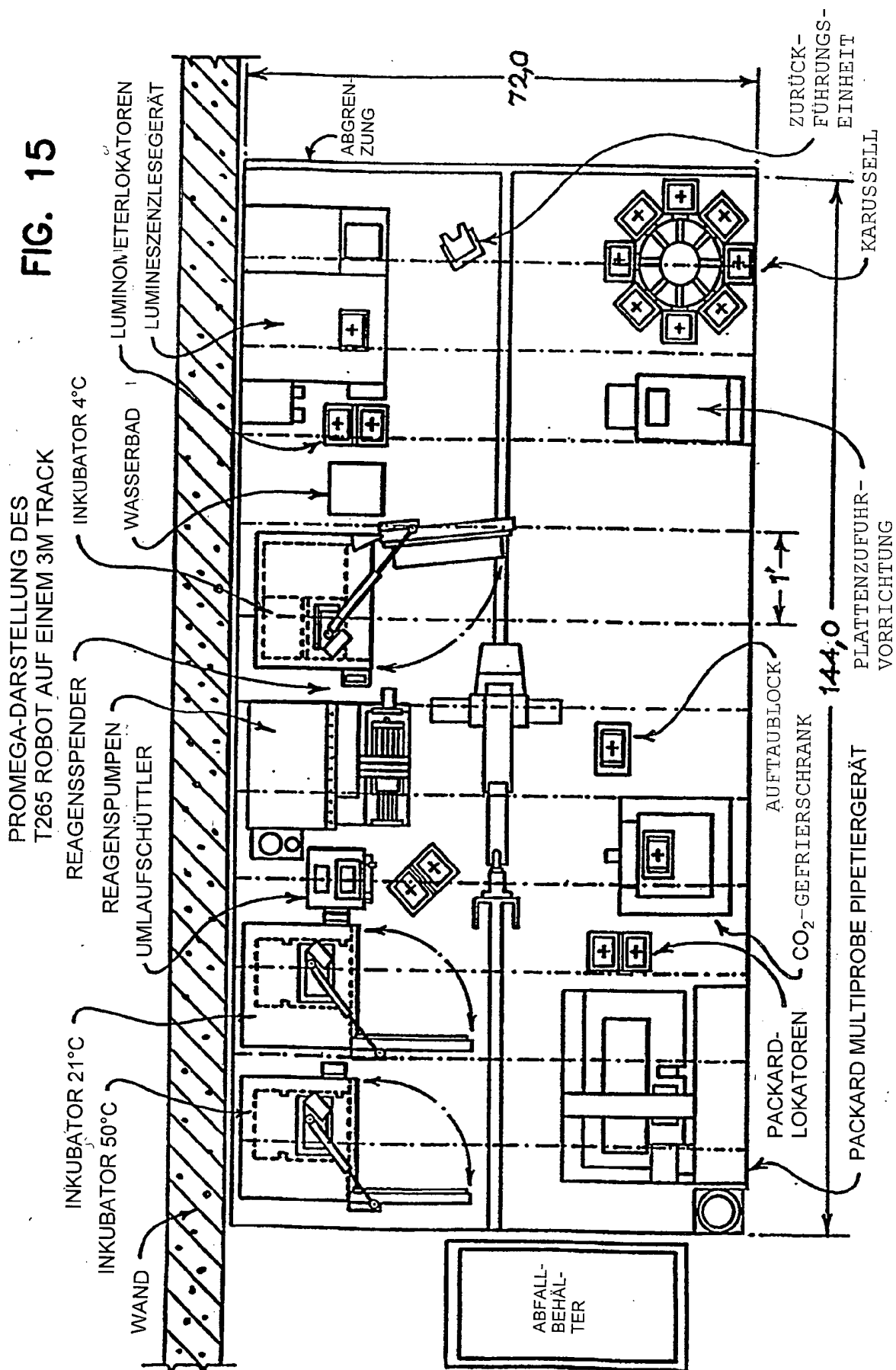


FIG. 14



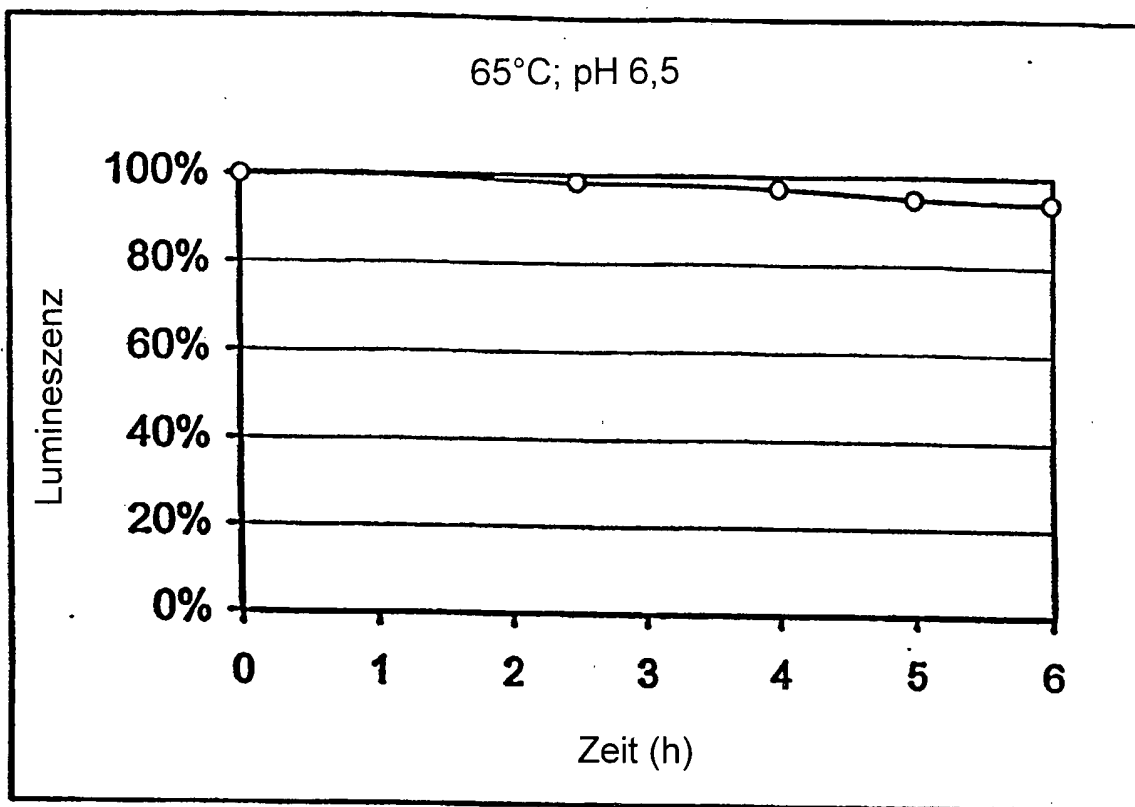


FIG. 16A

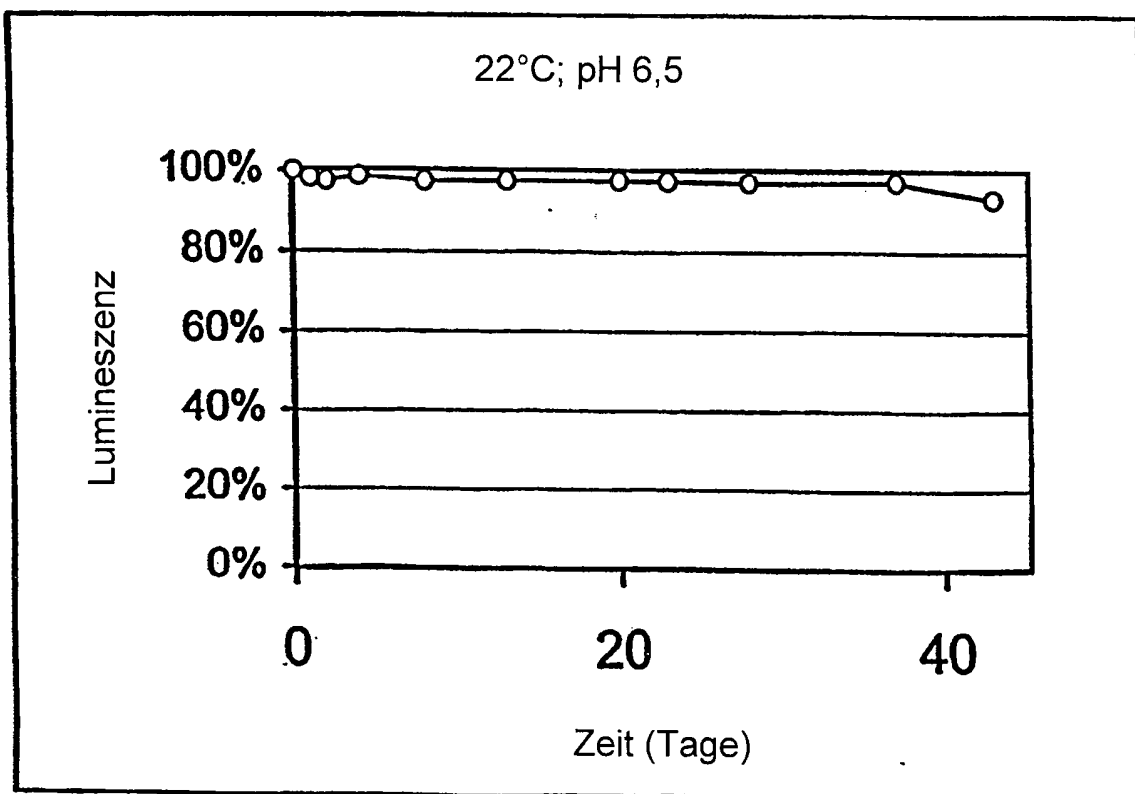


FIG. 16B

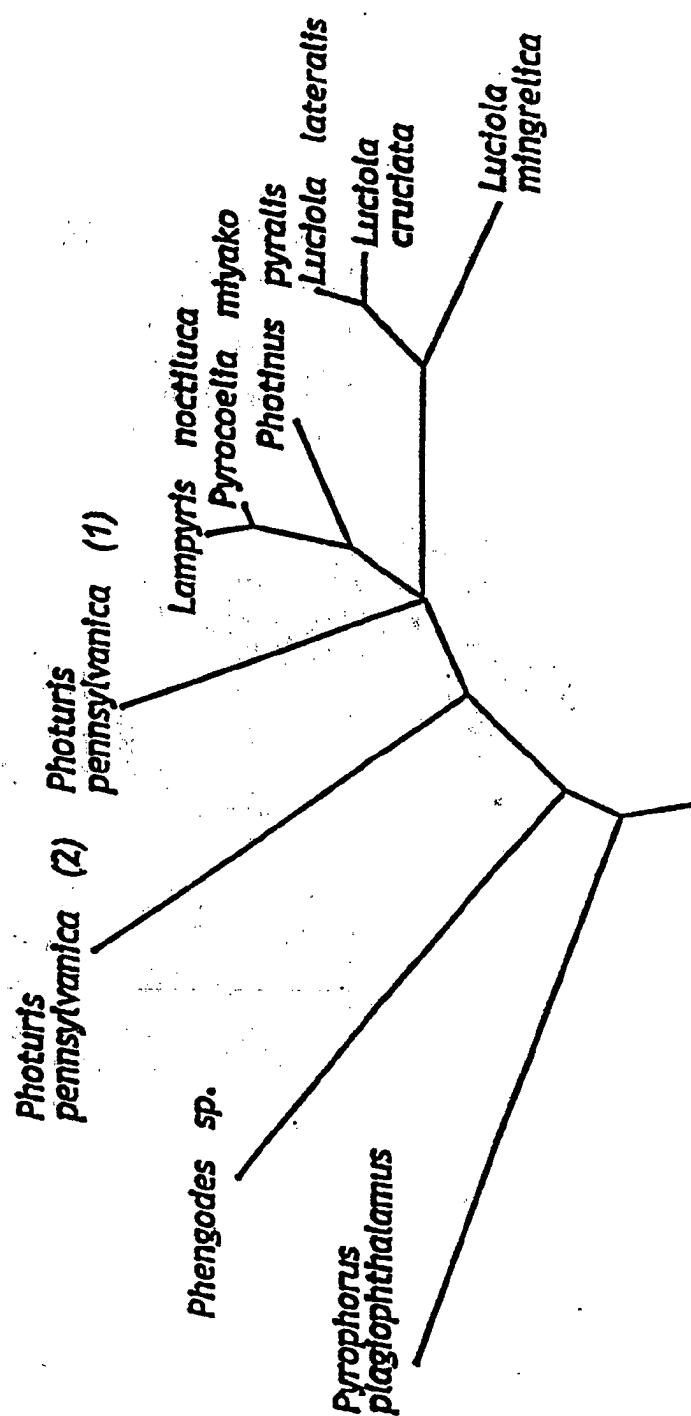
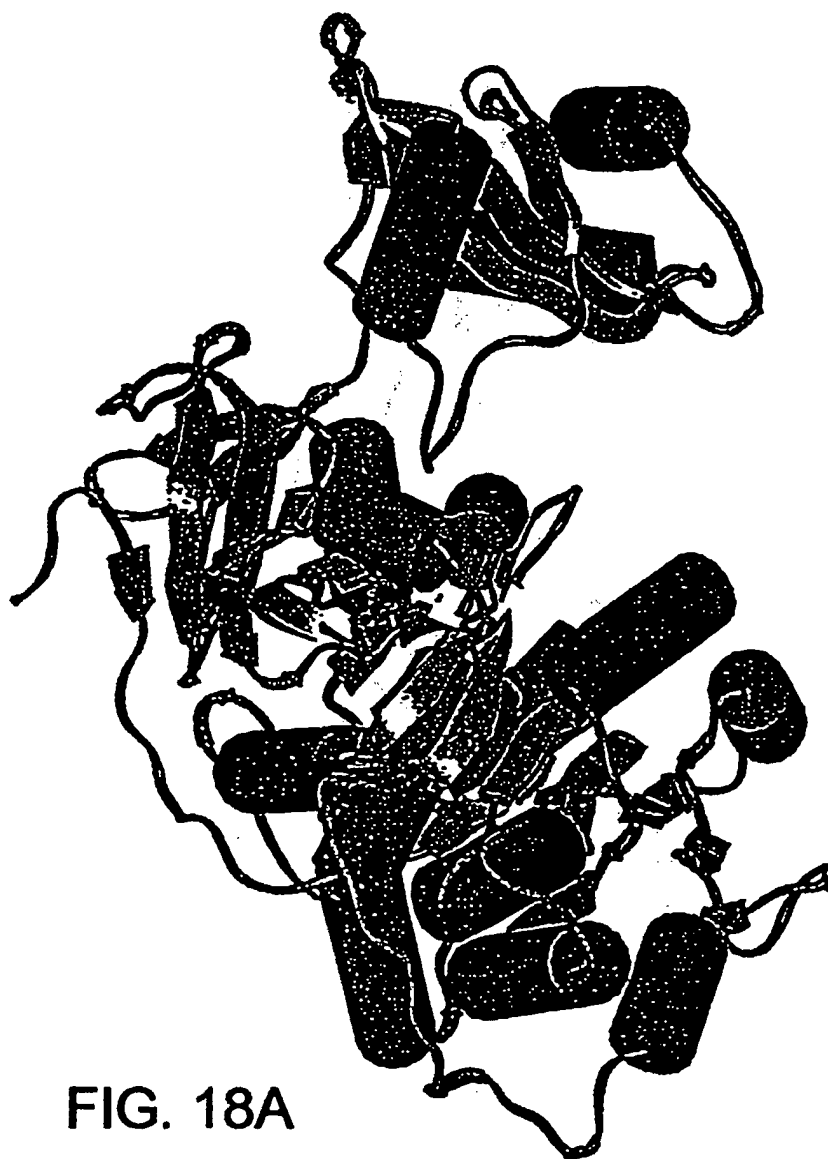


FIG. 17



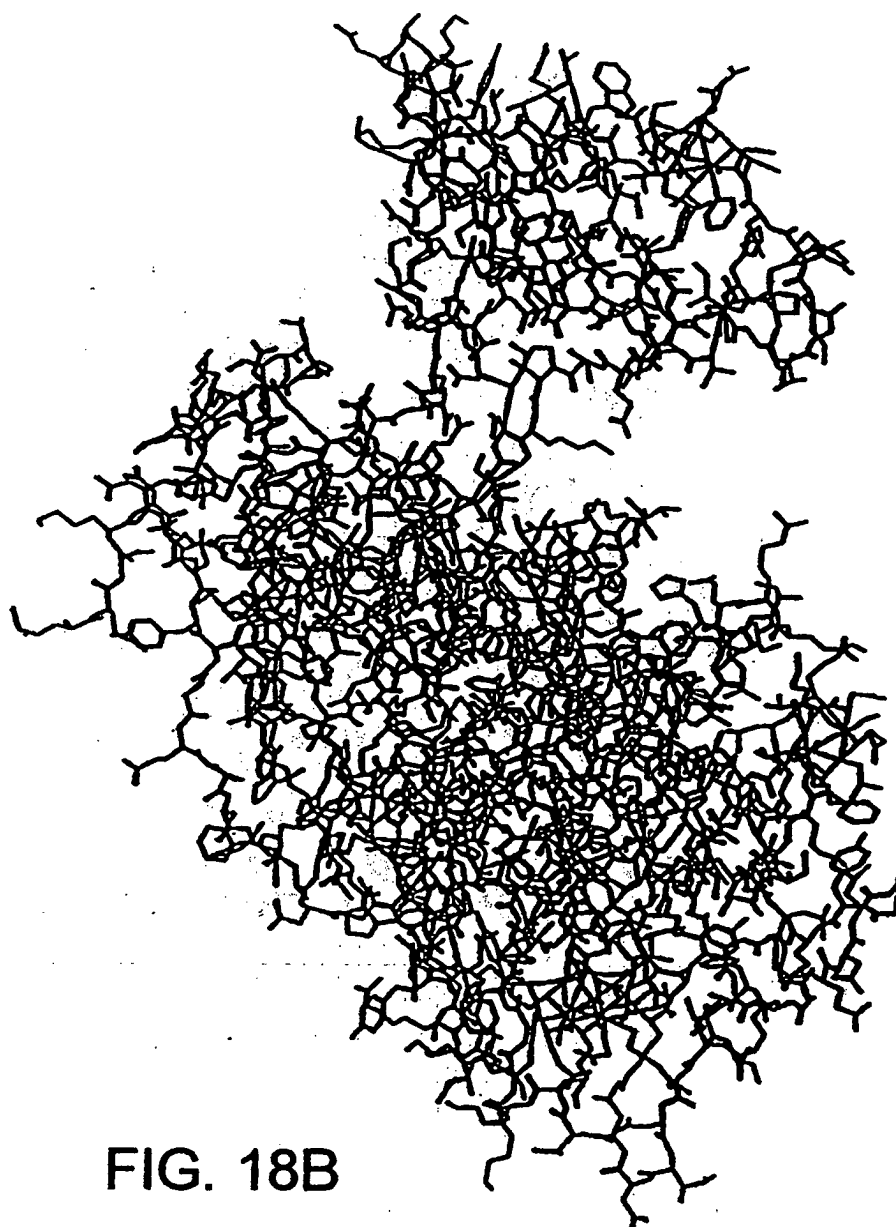


FIG. 18B

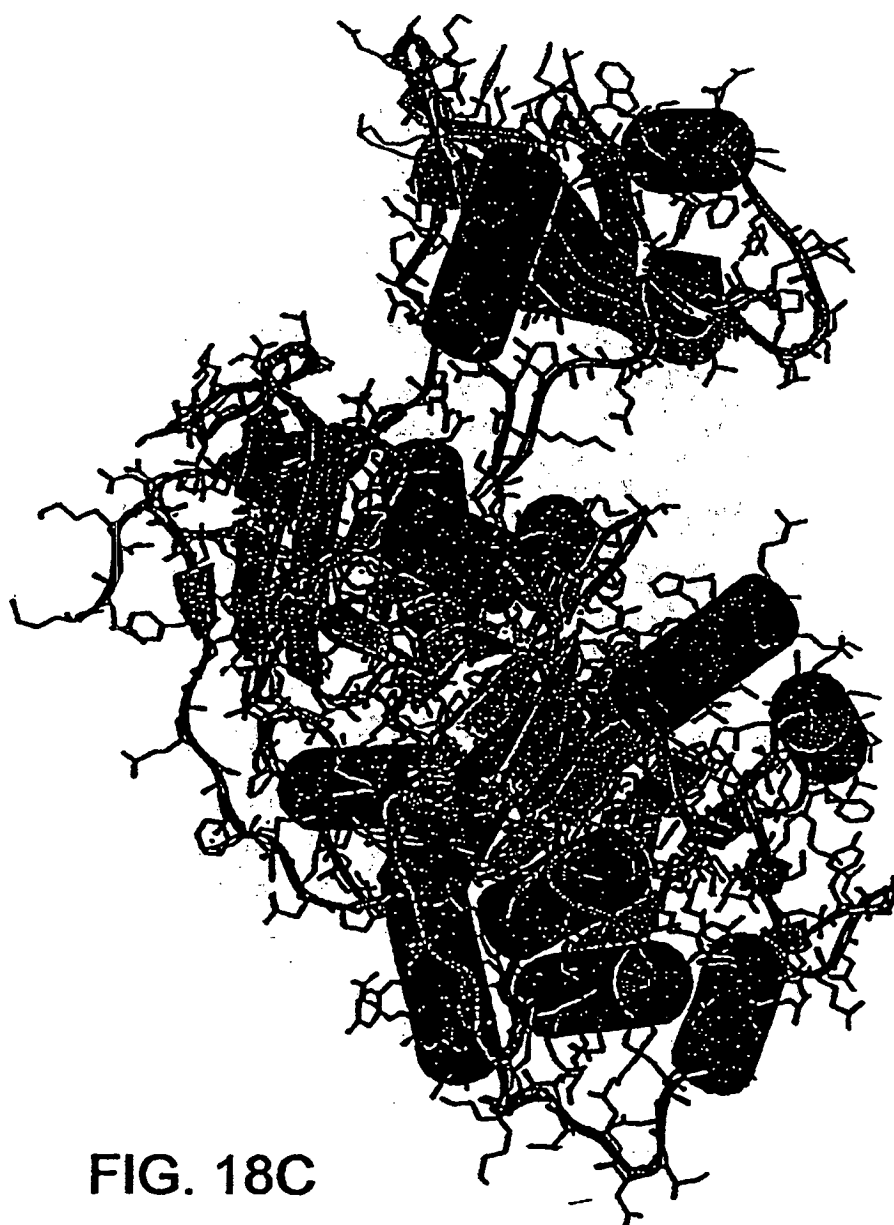


FIG. 18C

	1				50
Lcr	MENMENDE.N	IVVGPKPFYP	IEBGSAGTQL	RKYMERYAKL	.GAIAPTNAV
Lla	MENMENDE.N	IVYGPEPFYP	IEBGSAGAQL	RKYMDRYAKL	.GAIAPTNAI
Lmi	ME.MEKKE.N	VVYGPLPFYP	IEBGSAGIQL	HKYMHQYAKL	.GAIAPSNAL
Pmi	...MEDDSKH	IMHGRHSIL	WEDGTAGEQL	HKAMKRYAQV	PGTIAFTDAH
Ppy	...MED.AKN	IKKGPAPFYP	LEDGTAGEQL	HKAMKRYALV	PGTIAFTDAH
Lno	...MED.AKN	IMHGPAPFYP	LEDGTAGEQL	HKAMKRYAQV	PGTIAFTDAH
Ppe1	...MSI.ENN	ILIGPPPYYP	LEEGTAGEQL	HRAISRYAAV	PGTLAYTDVH
Phg	MIKME..EEH	VMPGAMPRL	LFEGTAGQQL	HRALYKHSYF	PE..AIVDSH
GR	...MMKREKN	VVYGPEPLHP	LEDLTAGEML	FRALRKHSHL	PQ..ALVDVY
YG	...MMKREKN	VVYGPEPLHP	LEDLTAGEML	FRALRKHSHL	PQ..ALVDVF
Ppe2	...MED..KN	ILYGPEPFYP	LADGTAGEQM	FYALSRYADI	SGCIALTNAH
49-7C6	A				
78-0B10	A			D	
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	BFFIPVIAGL
Lla	TGVDYTYAEY	LEKSCCLGEA	LKNYGLVVDG	RIALCSENCE	BFFIPVLAGL
Lmi	TGVDISYQBY	FDITCRLAEA	MKNFGMKPEE	HIALCSENCE	BFFIPVLAGL
Pmi	AEVNITYSEY	FEMSCRLAET	MKRYGLGLQH	HIAVCSETSL	QFFMPVCGAL
Ppy	IEVNITYAEY	FEMSVRLAEA	MKRYGLGLQH	HIAVCSETSL	QFFMPVCGAL
Lno	AEVNITYSEY	FEMACRLAET	MKRYGLGLQH	HIAVCSETSL	QFFMPVCGAL
Ppe1	TELEVITYKEF	LDVTCRLAEA	MKNYGLGLQH	TISVCSENCV	QFFMPVCAAL
Phg	THEIISYAKI	LDMSCRLAVS	FQKYGLTQNN	IIGICSENNL	NFFNPVIAAF
GR	GEEWISYKEF	FETTCLLAQS	LHNCGYKMSD	VVSICAENNK	RFFVPPIAAW
YG	GDESLSYKEF	FEATCLLAQS	LHNCGYKMND	VVSICAENNK	RFFIPPIAAW
Ppe2	TKENVLYEFP	LKLSCRLAES	FKKYGLKQND	TIAVCSENGL	QFFLPLIASL
49-7C6					I
78-0B10					V
90-1B5					V
133-1B2				S	V
146-1H2				S	V
Cons	-----Y---	-----L---	-----G-----	-----C-E---	-FF-P-----
	101				150
Lcr	FIGVGVAPTN	EIYTLRELVE	SLGISKPTIV	FSSKKGLDKV	ITVQKTVTTI
Lla	FIGVGVAPTN	EIYTLRELVE	SLGISKPTIV	FSSKKGLDKV	ITVQKTVATI
Lmi	YIGVAVAPT	EIYTLRELVE	SLGIAQPTIV	FSSRKGLPKV	LEVQKTVTCT
Pmi	FIGVGVAPTN	DIYNERELYN	SLFISQPTIV	FCSKRALQKI	LGVQKKLPVI
Ppy	FIGVAVAPT	DIYNERELYN	SMNISQPTIV	FVSKKGLQKI	LNVQKKLPVI
Lno	FIGVGVAPTN	DIYNERELYN	SLSISQPTIV	SCSKRALQKI	LNVQKKLPVI
Ppe1	YVGVAAPT	DIYNERELYN	SLSISQPTIV	FTRNSLQKI	LGVQSRPLPI
Phg	YLGITVATN	DTYTDRELSE	TLNITKPQML	FCSKQSLPIV	MKTMKIMPVY
GR	YIGMIVAPVN	EGYIPDELCK	VMGISRPQLV	FCTKNILNKV	LEVQSRITDFI
YG	YIGMIVAPVN	ESYIPDELCK	VMGISRPQIV	FCTKNILNKV	LEVQSRITNFI
Ppe2	YLGIIAAPVS	DKYIERELIH	SLGIVKPRII	FCSKNTFQKV	LNVKSKLKIV
49-7C6					
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	KTIVILDSKV	DYRGYQCLDT	FIKRNTPPGF	QASSFKTVEV	.DRKEQVALI
Lla	KTIVILDSKV	DYRGYQ8MDN	FIKRNTPQGF	KG88FKTVEV	.NRKEQVALI
Lmi	KKIVILDSKV	NFGGHDCMET	FIKKEVELGF	QP88FVPIDV	KNRKQHVALI
Pmi	QKIVILDSRE	DYMGKQSMYS	FIESHLPA6F	NEYDYIPDSF	.DRETATALI
Ppy	QKIIIMDSKT	DYQGFQSMYT	FVTSHLPPGF	NEYDFVPESF	.DRDKTIALI
Lno	QKIVILDSRE	DYMGKQSMYS	FIESHLPA6F	NEYDYIPDSF	.DRETATALI
Ppe1	KKIIILDGKK	DYLGYSQMS	FMKEHVPANF	NV8AFKPLSF	.DLDR.VACI
Phg	QKLLIIDSQ	DIGGIECVHS	FVSRYTDEHF	DPLKFVPLDF	.DPREQVALI
GR	KRIIILDAVE	NIHGCESLPN	FISRYSDGNI	A..NFKPLHY	.DPVEQVAAI
YG	KRIIILDTVE	NIHGCESLPN	FISRYSDGNI	A..NFKPLHY	.DPVEQVAAI
Ppe2	ETIIILDLE	DLGGYQCLNN	FISQNSDINL	DVKKFKPNSF	.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	KGVQLTHENT	VTRFSHARDP	IYGNQVSPGT	AVLTVVPFHH
Lla	MNSSGSTGLP	KGVQLTHENA	VTRFSHARDP	IYGNQVSPGT	AILTVVPFHH
Lmi	MNSSGSTGLP	KGVRLTHEGA	VTRFSHAKDP	IYGNQVSPGT	AILTVVPFHH
Pmi	MNSSGSTGLP	KGVDLTHMNV	CVRFSHCRDP	VFGNQIIPDT	AILTVIPFHH
Ppy	MNSSGSTGLP	KGVLPHTA	CVRFSHARDP	IFGNQIIPDT	AILSVVPFHH
Lno	MNSSGSTGLP	KGVLPHTNV	CVRFSHCRDP	VFGNQIIPDT	AILTVIPFHH
Ppe1	MNSSGSTGLP	KGVPIHRNT	IYRFSHCRDP	VFGNQIIPDT	TILCAVPFHH
Phg	MTSSGTTGLP	KGVMLTHRNI	CVRFVHSRDP	LFGTRFIPET	SILSLVPFHH
GR	LCSSGTTGLP	KGVMLTHRNV	CVRLIHALDP	RVGTQLIPGV	TVLVYLPFFH
YG	LCSSGTTGLP	KGVMLTHQNI	CVRLIHALDP	RAGTQLIPGV	TVLVYLPFFH
Ppe2	MFSSGTTGVS	KGVMLTHKNI	VARFSHCKDP	TFGNAINPTT	AILTVIPFHH
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	GFGMFTTLGY	LICGFRVVML	TKFDEETFLK	TLQDYKCTSV	ILVPTLFAIL
Lla	GFGMFTTLGY	LTCGFRIVML	TKFDEETFLK	TLQDYKCSSV	ILVPTLFAIL
Lmi	GFGMFTTLGY	FACGYRVVML	TKFDEELFLR	TLQDYKCTSV	ILVPTLFAIL
Pmi	VFGMFTTLGY	LTCGFRIVLM	YRFEEELFLR	SLQDYKIQSA	LLVPTLFSFF
Ppy	GFGMFTTLGY	LICGFRVVML	YRFEEELFLR	SLQDYKIQSA	LLVPTLFSFF
Lno	GFGMFTTLGY	LTCGFRIVLM	YRFEEELFLR	SLQDYKIQSA	LLVPTLFSFF
Ppe1	AFGTFTNLGY	LICGFHVLM	YRFNEHLFLQ	TLQDYKQSA	LLVPTVLAFI
Phg	AFGMFTTLY	FIVGLKIVMM	KRFDGELFLK	TIQNYKIPTI	VIAPPVMVFL
GR	AFGFSINLGY	FMVGLRVIML	RRFDQEAFLK	AIQDYEVRSV	INVPAILFL
YG	AFGFSINLGY	FMVGLRVIML	RRFDQEAFLK	AIQDYEVRSV	INVPAILFL
Ppe2	GFGMTTTLGY	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				350
Lcr	NKSELNLYD	LSNLVEIASG	GAPLSKEVGE	AVARRFNLPG	VRQGYGLTET
Lla	NRSELIDKYD	LSNLVEIASG	GAPLSKEIGE	AVARRFNLPG	VRQGYGLTET
Lmi	NKSELIDKPD	LSNLVEIASG	GAPLAKEVGE	AVARRFNLPG	VRQGYGLTET
Pmi	AKSTLVDKYD	LSNLHEIASG	GAPLAKEVGE	AVAKRFKLPG	IRQGYGLTET
Ppy	AKSTLIDKYD	LSNLHEIASG	GAPLSKEVGE	AVAKRFKLPG	IRQGYGLTET
Lno	AKSTLVDKYD	LSNLHEIASG	GAPLAKEVGE	AVAKRFKLPG	IRQGYGLTET
Ppe1	AKNPLVDKYD	LSNLHEIASG	GAPLSKEISE	IAAKRFKLPG	IRQGYGLTET
Phg	AKSHLVDKYD	LSSIKEIATG	GAPLGALAN	AVAKRLKLGG	IIQGYGLTET
GR	SKSPLVDKYD	LSSLRELCCG	AAPLAKEVAE	IAVKRLNLPG	IRCGFGLTES
YG	SKSPLVDKYD	LSSLRELCCG	AAPLAKEVAE	VAVKRLNLPG	IRCGFGLTES
Ppe2	AKSALVEKYD	LSHLKEIASG	GAPLSKEIGE	MVKKRFKLNF	VRQGYGLTET
49-7C6					
78-0B10					
90-1B5					
133-1B2					
146-1H2					
Cons	----	L--K-D	LS---E---G	-APL-----	----R--L-- ---G-GLTE-
	351				400
Lcr	TSAILIITPEG	DDKPGASGKV	VPLFKAKVID	LDTKKSLGPN	RRGEVCVKGP
Lla	TSAILIITPEG	DDKPGASGKV	VPLFKAKVID	LDTKKTLGPN	RRGEVCVKGP
Lmi	TSAFIITPEG	DDKPGASGKV	VPLFKVKVID	LDTKKTLGPN	RRGEICVKGP
Pmi	TSAILIITPEG	DDKPGACGKV	VPFFTAKIVD	LDTGKTLGPN	QRGELCVKGP
Ppy	TSAILIITPEG	DDKPGAVGKV	VPFFEAKVVD	LDTGKTLGPN	QRGELCVKGP
Lno	TSAILIITPEG	DDKPGACGKV	VPFFSAKIVD	LDTGKTLGPN	QRGELCVKGP
Ppe1	TCAIVITABG	EFKLGAVGKV	VPFYSKVLVD	LNTGKTLGPN	RRGEICFKGP
Phg	CCAVLITPHN	KIKTGSTGQV	LPYVTAKIVD	TKTGKTLGPN	QTGELCFKSD
GR	TSANIHSIRD	EFKSGSLGRV	TPLMAAKIAD	RETGKALGPN	QVGEICIKGP
YG	TSANIHSIRD	EFKSGSLGRV	TPLMAAKIAD	RETGKALGPN	QVGEICVKGP
Ppe2	TSAVLITPDT	DVRPGSTGKI	VPFHAKVVD	PTTGKTLGPN	ETGELYFKGD
49-7C6	NN				P
78-0B10	KG	A			P
90-1B5	KG	AK			P
133-1B2	KG	AK			P
146-1H2	KG	AK	L		P
Cons	--A-----	-----G--G--	-P-----K--D	--T-K-LG-N	--GE-----
	401				450
Lcr	MLMKGYVNNP	EATKELIDEE	GWLHTGDIGY	YDEEKHFFIV	DRLKSLIKYK
Lla	MLMKGYVDNP	EATREIIDEE	GWLHTGDIGY	YDEEKHFFIV	DRLKSLIKYK
Lmi	SLMLGYSNNP	EATRETIDEE	GWLHTGDIGY	YDEDEHFFIV	DRLKSLIKYK
Pmi	MIMKGYVNNP	EATNALIDKD	GWLHSGDIAY	YDKDGHFFIV	DRLKSLIKYK
Ppy	MIMKGYVNNP	EATNALIDKD	GWLHSGDIAY	WDEDEHFFIV	DRLKSLIKYK
Lno	MIMKGYVNNP	EATNALIDKD	GWLHSGDIAY	YDKDGHFFIV	DRLKSLIKYK
Ppe1	MIMKGYINN	EATRELIDEE	GWLHSGDIGY	YDEDEHFFIV	DRLKSLIKYK
Phg	IIMKGYQNE	EETRLVIDKD	GWLHSGDIGY	YDTGDNFHV	DRLKSLIKYK
GR	MVSKGYVNNV	EATKEAIDDD	GWLHSGDFGY	YDEDEHFFIV	DRYKELIKYK
YG	MVSKGYVNNV	EATKEAIDDD	GWLHSGDFGY	YDEDEHFFIV	DRYKELIKYK
Ppe2	MIMKSYNNNE	EATKAIINKD	GWLHSGDIAY	YDNDGHFFIV	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 GYQVPPAELE SVLLQHPNIF DAGVAGVPDP VAGELPGAVV VLESGKNMTE
 Lla GYQVPPAELE SVLLQHPNIF DAGVAGVPDP IAGELPGAVV VLEKKGKMTTE
 Lmi GYQVPPAELE SVLLQHPNIF DAGVAGVPDP DAGELPGAVV VMEKKGKMTTE
 Pmi GYQVPPAELE SILLQHPFIF DAGVAGIPDP DAGELPAAVV VLEKKGKMTTE
 Ppy GYQVAPAELE SILLQHPNIF DAGVAGLPDD DAGELPAAVV VLEKKGKMTTE
 Lno GYQVPPAELE SILLQHPFIF DAGVAGIPDP DAGELPAAVV VLEKKGKMTTE
 Ppe1 GYQVPPAELE ALLLQHPFIE DAGVAGVPDE VAGDLPGAVV VLEKKGKSITE
 Phg AYQVAPAELE ALLLQHPYIA DAGVTGIPDE EAGELPAACV VLEPGKMTTE
 GR GSQVAPAELE EILLKNPCIR DVAVVGIPDL EAGELPSAFV VIQPGKEITA
 YG GSQVAPAELE EILLKNPCIR DVAVVGIPDL EAGELPSAFV VKQPGKEITA
 Ppe2 GYQVAPAEIE 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 VRFVDEVPKG LTGKIDGRA. IREILKKPV.
 Lla KEVMDYVASQ VSNAKRLRGG VRFVDEVPKG LTGKIDGKA. IREILKKPV.
 Lmi KEIVDYVNSQ VVNHKRLRGG VRFVDEVPKG LTGKIDAKV. IREILKKPQ.
 Pmi QEVM DYVAGQ VTASKRLRGG VKFVDEVPKG LTGKIDSRK. IREILTMGQK
 Ppy KEIVDYVASQ VTTAKKL RGG VVFVDEVPKG LTGKL DAK. IREILIKAKK
 Lno QEVM DYVAGQ VTASKRLRGG VKFVDEVPKG LTGKIDGRK. IREILMMGKK
 Ppe1 KEIQDYVAGQ VTSSKKL RGG VEFVKEVPKG FTGKIDTRK. IREILIKAKK
 Phg KEVMDYIAER VTPTKRLRGG VLFVNNIPKG ATGKLVRTE. LRRLLTQRA.
 GR KEVYDYLAEER VSHTKYL RGG VRFVDSIPRN VTGKITRKEK LKQLEKS..
 YG KEVYDYLAEER VSHTKYL RGG VRFVDSIPRN VTGKITRKEK LKQLEKS..
 Ppe2 QIVQNFVSSQ VSTAKWL RGG VKFLDEIPKG STGKIDRKV. LRQMFEXH..

49-7C6
 78-0B10 D
 90-1B5 DY A
 133-1B2 DY A I L
 146-1H2 DY A L

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

551

LcrAKM
 LlaAKM
 LmiAKM
 PmiSKL
 Ppy G...GKSKL
 LnoSKL
 Ppe1 GKSKSKAKL
 PhgAKL
 GRSKL
 YGSKL
 Ppe2KSKL

49-7C6 TNG*
 78-0B10 TNG*
 90-1B5 TNG*
 133-1B2 TNG*
 146-1H2 TNG*

FIG. 19A (Fortsetzung)

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

FIG. 19A (Fortsetzung)

1		50	
Lcr	MENMENDE.N	IVVGPKPFYP	IEEGSAGTQL RKYMERYAKL .GAIIFTNAV
Lla	MENMENDE.N	IVYGPEPFYP	IEEGSAGAQL RKYMDRYAKL .GAIIFTNAL
Lmi	ME.MEKKE.N	VVYGPLPFYP	IEEGSAGIQL HKYMHQYAKL .GAIAPSNAL
Pmi	...MEDDSKH	IMHGHRSIL	WEDGTAGEQL HKAMKRYAQV PGTIIFTDAH
Ppy	...MED.AKN	IKKGPAPFYP	LEDGTAGEQL HKAMKRYALV PGTIIFTDAH
Lno	...MED.AKN	IMHGPAPFYP	LEDGTAGEQL HKAMKRYAQV PGTIIFTDAH
Ppe1	...MSI.ENN	ILIGPPPYYP	LEEGTAGEQL HRAISRYAAV PGTLAYTDVH
Ppe2	...MED..KN	ILYGPEPFYP	LADGTAGEQM FYALSRYADI SGCIALTNAH
Phg	MIKME..EEH	VMPGAMPRDL	LFEGTAGQQL HRALYKHSYF PE..AIVDSH
GR	...MMKREKN	VVYGPEPLHP	LEDLTAGEML FRALRKHSHL PQ..ALVDVY
YG	...MMKREKN	VIYGPEPLHP	LEDLTAGEML FRALRKHSHL PQ..ALVDVF
30-4B02	...MMKREKN	VIYGPEPLHP	LEDLTAGEML FRALRKHSHL PQ..ALVDVY
81-6G01	...MMKREKN	VIYGPEPLHP	LEDLTAGEML FRALRKHSHL PQ..ALVDVY
Cons	---M-----	---G-----	-----AG-----A-----

51		100	
Lcr	TGVDYSYAEY	LEKSCCLGKA	LQNYGLVVDG RIALCSENCE EFFIPVIAGL
Lla	TGVDYTYAEY	LEKSCCLGEA	LKNYGLVVDG RIALCSENCE EFFIPVLAGL
Lmi	TGVDISYQBY	FDITCRLAEA	MKNFGMKPEE HIALCSENCE EFFIPVLAGL
Pmi	AEVNITYSEY	FEMSCRLAET	MKRYGLGLQH HIAVCSETSL QFFMPVCGAL
Ppy	IEVNITYAEY	FEMSVRLAEA	MKRYGLNTNH RIVVCSENSL QFFMPVCGAL
Lno	AEVNITYSEY	FEMACRLAET	MKRYGLGLQH HIAVCSENSL QFFMPVCGAL
Ppe1	TELEVITYKEF	LDVTCRLAEA	MQNYGLGLQH TISVCSENCV QFFMPICAAL
Ppe2	TKENVLYEEF	LKLSCLRAES	FKKYGLKQND TIAVCSENGL QFFLPLIASL
Phg	THRIISYAKI	LDMSCRLAVS	FQKYGLTONN IIGICSENNL NFFNPVIAAF
GR	GEEWISYKEF	FETTCLLAQS	LHNCGYKMSD VVSICAENNK RFFVPPIAAW
YG	GDESLSYKEF	FEATCLLAQS	LHNCGYKMND VVSICAENNK RFFIPPIAAW
30-4B02	GDESLSYKEF	FEATVLLAQS	LHNCGYKMND VVSICAENNK RFFIPVIAAW
81-6G01	GDESLSYKEF	FEATVLLAQS	LHNCGYKMND VVSICAENNT RFFIPVIAAW
Cons	-----Y---	-----L---	-----G-----C-E---FF-P-----

101		150	
Lcr	FIGVGVAPTN	EIYTLRELVE	SLGISKPTIV FSSKKGLDKV ITVQKTVTI
Lla	FIGVGVAPTN	EIYTLRELVE	SLGISKPTIV FSSKKGLDKV ITVQKTVATI
Lmi	YIGVAVAPT	EIYTLRELNE	SLGIAOPTIV FSSRKGLPKV LEVQKTVTI
Pmi	FIGVGVAPTN	DIYNERELYN	SLFISOPTIV FCSKRALQKI LGVQKKLPVI
Ppy	FIGVAVAPAN	DIYNERELLN	SMNISOPTIV FVSKKGLQKI LNVQKKLPVI
Lno	FIGVGVAPTN	DIYNERELYN	SLSISOPTIV SCSSKRALQKI LGVQKKLPVI
Ppe1	YVGVAAPT	DIYNERELYN	SLSISOPTIV FTSRNSLQKI LGVQSRLPVI
Ppe2	YLGIIAAPVS	DKYIERELIH	SLGIVKPRII FCSKNTFQKV LNVKSKLKVY
Phg	YLGITVATVN	DTYTDRELSE	TLNITKPQML FCSKQSLPIV MKTMKIMPVY
GR	YIGMIVAPVN	EGYIPDELCK	VMGISRPQLV FCTKNILNKV LEVQSRTDFI
YG	YIGMIVAPVN	ESYIPDELCK	VMGISKPOIV FCTKNILNKV LEVQSRTNFI
30-4B02	YIGMIVAPVN	ESYIPDELCK	VMGISKPOIV FTTKNILNKV LEVQSRTNFI
81-6G01	YIGMIVAPVN	ESYIPDELCK	VMGISKPOIV FTTKNILNKV LEVQSRTNFI
Cons	--G---A---	--Y---EL--	---I--P-----

FIG. 19B

151	200
Lcr	KTIVILDSKV DYRGYQCLDT FIKRNTPPGF QASSFKTVEV .DRKEQVALI
Lla	KTIVILDSKV DYRGYQSMON FIKKNTPPGF KGSSFKTVEV .NRKEQVALI
Lmi	KKIVILDSKV NFGGHDCMET FIKKHVRLGF QPSSFPVIDV KNKQHVALL
Pmi	QKIVILDSRE DYMKGQSMYS FIBSHLPAGF NEYDYIPDSF .DRETATALI
Ppy	QKIIIMDSKT DYQGPQSMYT FVTSHLPPGF NEYDFVPESF .DRDKTIALI
Lno	QKIVILDSRE DYMKGQSMYS FIBSHLPAGF NEYDYIPDSF .DRETATALI
Ppe1	KKIIILDGKK DYLGYSQMQS FMKEHVPANF NVSAFKPLSF .DLDR.VACI
Ppe2	ETIIILDLE DLGGYQCLNN FISQNSDINL DVKKFKPNSF .NRDDQVALV
Phg	QKLLIIDSQ DIGGIECVHS FVSRYTDEHF DPLKFPVPLDF .DPREQVALI
GR	KRIIILDAVE NIHGCESLPN FISRYSDGNI A..NFKPLHY .DPVEQVAAI
YG	KRIIILDTVE NIHGCESLPN FISRYSDGNI A..NFKPLHY .DPVEQVAAI
30-4B02	KRIIILDTVE NIHGCESLPN FISRYSDGNI A..NFKPLHY .DPVEQVAAI
81-6G01	KRIIILDTVE NIHGCESLPN FISRYSDGNI A..NFKPLHY .DPVEQVAAI
Cons	----I-D--- --G----- F----- -----A--

201	250
Lcr	MNSSGSTGLP KGVQLTHENT VTRFSHARDP IYGNQVSPGT AVLTVVPFHH
Lla	MNSSGSTGLP KGVQLTHENA VTRFSHARDP IYGNQVSPGT AILTVVPFHH
Lmi	MNSSGSTGLP KGVRLTHEGA VTRFSHAKDP IYGNQVSPGT AILTVVPFHH
Pmi	MNSSGSTGLP KGVDLTHMNV CVRFSHCRDP VFGNQIIPDT AILTVVPFHH
Ppy	MNSSGSTGLP KGVALPHRTA CVRFSHARDP IFGNQIIPDT AILSVVPFHH
Lno	MNSSGSTGLP KGVELTHQNV CVRFSHCRDP VFGNQIIPDT AILTVVPFHH
Ppe1	MNSSGSTGLP KGVPISHRNT IYRFSHCRDP VFGNQIIPDT TILCAVPFHH
Ppe2	MFSSGTTGVS KGVMLTHKNI VARFSHCKDP TFGNAINPTT AILTVVPFHH
Phg	MTSSGTTGLP KGVMLTHRNI CVRFVHSRDP LFGTRFIPET SILSLVPFHH
GR	LCSSGTTGLP KGVMTQTHNV CVRLIHALDP RVGTQLIPGV TVLVYLPFFH
YG	LCSSGTTGLP KGVMTQTHNI CVRLIHALDP RAGTQLIPGV TVLVYLPFFH
30-4B02	LCSSGTTGLP KGVMTQTHNI CVRLIHALDP RAGTQLIPGV TVLVYLPFFH
81-6G01	LCSSGTTGLP KGVMTQTHNI CVRLIHALDP RAGTQLIPGV TVLVYLPFFH
Cons	--SSG-TG-- KGV---H--- --R--H--DP --G---P-- --L---PF-H

251	300
Lcr	GFGMFTTLGY LICGFRVVM LTKFDEETFLK TLQDYKCTSV ILVPTLFAIL
Lla	GFGMFTTLGY LTCGFRIVML TKFDEETFLK TLQDYKCSSV ILVPTLFAIL
Lmi	GFGMFTTLGY PACGYRVVM LTKFDEELFLR TLQDYKCTSV ILVPTLFAIL
Pmi	VFGMFTTLGY LTCGFRIVLM YRFEELFLR SLQDYKIQSA LLVPTLPSFF
Ppy	GFGMFTTLGY LICGFRVVM YRFEELFLR SLQDYKIQSA LLVPTLPSFF
Lno	GFGMFTTLGY LTCGFRIVLM YRFEELFLR SLQDYKIQSA LLVPTLPSFF
Ppe1	AFGTFTNLGY LICGFHVVM YRFNEHLFLQ TLQDYKCQSA LLVPTVLAFL
Ppe2	GFGMTTTLGY FTCGFRVALM HTFEELFLQ SLQDYKVEST LLVPTLMAFF
Phg	AFGMFTTLY FIVGLKIVMM KRFDGELFLK TIQNYKIPTI VIAPPVMVFL
GR	AFGFSINLGY FMVGLRVIML RRFDOEAFLK AIQDYEVRSV INVPAIILFL
YG	AFGFSINLGY FMVGLRVIML RRFDOEAFLK AIQDYEVRSV INVPAIILFL
30-4B02	AFGFSINLGY FMVGLRVIML RRFDOEAFLK AIQDYEVRSV INVPAIILFL
81-6G01	AFGFSITLGY FMVGLRVIML RRFDOEAFLK AIQDYEVRSV INVPAIILFL
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	AVAKRPFKLPG	IRQGYGLTET
Ppy	AKSTLIDKYD	LSNLHEIASG	GAPLSKEVGE	AVAKRFHLPG	IRQGYGLTET
Lno	AKSTLVDKYD	LSNLHEIASG	GAPLAKEVGE	AVAKRPFKLPG	IRQGYGLTET
Ppe1	AKNPLVDKYD	LSNLHEIASG	GAPLSKEISE	IAAKRPFKLPG	IRQGYGLTET
Ppe2	AKSALVEKYD	LSHLKEIASG	GAPLSKEIGE	MVKKRPFKLNF	VRQGYGLTET
Phg	AKSHLVDKYD	LSSIKEIATG	GAPLGPALAN	AVAKRLKLG	IIQGYGLTET
GR	SKSPLVDKYD	LSSLRELCCG	AAPLAKEVAE	IAVKRLNLPG	IRCGFGLTES
YG	SKSPLVDKYD	LSSLRELCCG	AAPLAKEVAE	VAVKRLNLPG	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	TSAILIITPEG	DDKPGASGKV	VPLFKAKVID	LDTKKS LGPN	RRGEVCVKGP
Lla	TSAILIITPEG	DDKPGASGKV	VPLFKAKVID	LDTKKT LGPN	RRGEVCVKGP
Lmi	TSAFIITPEG	DDKPGASGKV	VPLFKVKVID	LDTKKT LGVN	RRGEICVKGP
Pmi	TSAILIITPEG	DDKPGACGKV	VPFPTAKIVD	LDTGKT LGVN	QRGELCVKGP
Ppy	TSAILITPEG	DDKPGAVGKV	VPFPEAKVVD	LDTGKT LGVN	QRGELCVRGP
Lno	TSAILIITPEG	DDKPGACGKV	VPFPSAKIVD	LDTGKT LGVN	QRGELCVKGP
Ppe1	TCAIVITAE	BFKLGA VGKV	VPFYSLKVLD	LNTGKK LGPN	ERGEICFKGP
Ppe2	TSAVLITPDT	DVRPGSTGKI	VPFHAVKVVD	PTTGKILGPN	ETGELYFKGD
Phg	CCAVLITPEN	KIKTGSTGQV	LPYVTAKIVD	TKTGKNLGPN	QTGELCFKSD
GR	TSANIHSIRD	BFKSGSLGRV	TPLMAAKIAD	RETGKALGPN	QVGELCIKGP
YG	TSANIHSIRD	BFKSGSLGRV	TPLMAAKIAD	RETGKALGPN	QVGELCVKGP
30-4B02	TSANIHSIRD	BFKSGSIGRV	TPLMAAKIAD	RETGKALGPN	QVGELCIKGP
81-6G01	TSANIHSIRD	BFKSGSLGRV	TPLMAAKIAD	RETGKALGPN	QVGELCIKGP
Cons	--A-----	----G--G--	-P----K--D	--T-K-LG-N	--GE-----

	401				450
Lcr	MIMKGYVNNP	EATKELIDEE	GWLHTGDIGY	YDEEKHFFIV	DRLKSLIKYK
Lla	MIMKGYVDNP	EATREIIDEE	GWLHTGDIGY	YDEEKHFFIV	DRLKSLIKYK
Lmi	SLMLGYGNP	EATRETIDEE	GWLHTGDIGY	YDEDEHFFIV	DRLKSLIKYK
Pmi	MIMKGYVNNP	EATNALIDKD	GWLHSGDIAY	YDKDGHFFIV	DRLKSLIKYK
Ppy	MIMSGYVNNP	EATNALIDKD	GWLHSGDIAY	WDEDEHFFIV	DRLKSLIKYK
Lno	MIMKGYVNNP	EATSALIDKD	GWLHSGDIAY	YDKDGHFFIV	DRLKSLIKYK
Ppe1	MIMKGYINNP	EATRELIDEE	GWIHSGDIGY	FDKDGHYIV	DRLKSLIKYK
Ppe2	MIMKSYNNNE	EATKAIINKD	GWLRS GDIAY	YDNDGHFYIV	DRLKSLIKYK
Phg	IIMKGYQQNE	EETRLVIDKD	GWLHSGDIGY	YDTDGNFHV	DRLKELIKYK
GR	MVSKGYVNNV	EATKEAIDDD	GWLHSGDFGY	YDEDEHFFV	DRYKELIKYK
YG	MVSKGYVNNV	EATKEAIDDD	GWLHSGDFGY	YDEDEHFFV	DRYKELIKYK
30-4B02	MVSKGYVNNV	EATKEAIDDD	GWLHSGDFGY	YDEDEHFFV	DRYKELIKYK
81-6G01	MVSKGYVNNV	EATKEAIDDD	GWLHSGDFGY	YDEDEHFFV	DRYKELIKYK
Cons	-----Y--N-	E-T---I---	GW---GD--Y	-D-----V	DR-K-LIKYK

FIG. 19B (Fortsetzung)

451				500			
Lcr	GYQVPPAELE	SVLLQHPSIF	DAGVAGVPDP	VAGELPGAVV	VLESGKNMTE		
Lla	GYQVPPAELE	SVLLQHNPIN	DAGVAGVPDP	IAGELPGAVV	VLEKKGSMTE		
Lmi	GYQVPPAELE	SVLLQHNPIN	DAGVAGVPDP	DAGELPGAVV	VMEKKGSMTE		
Pmi	GYQVPPAELE	SILLQHPPFIF	DAGVAGIPDP	DAGELPAAVV	VLEBKGMMTE		
Ppy	GYQVAPAELE	SILLQHNPIN	DAGVAGLPDD	DAGELPAAVV	VLEHGKMTTE		
Lno	GYQVPPAELE	SILLQHPPFIF	DAGVAGIPDP	DAGELPAAVV	VLEBKGMTTE		
Ppe1	GYQVPPAELE	ALLLQHPPFIE	DAGVAGVPDE	VAGDLPGAVV	VLKEGKSITE		
Ppe2	GYQVAPAEIE	GILLQHPIYIV	DAGVTGIPDE	AAGELPAAGV	VVQTGKYLNE		
Phg	AYQVAPAELE	ALLLQHPIYIA	DAGVTGIPDE	EAGELPAACV	VLEPGKMTTE		
GR	GSQVAPAELE	EILLKNPCIR	DVAVVGIPDL	EAGELPSAFV	VIQPGKEITA		
YG	GSQVAPAELE	EILLKNPCIR	DVAVVGIPDL	EAGELPSAFV	VKQPGKEITA		
30-4B02	GSQVAPAELE	EILLTNPCIR	DVAVVGIPDL	EAGELPSAFV	VKQPGKEITA		
81-6G01	GSQVAPAELE	EILLKNPCIR	DVAVVGIPDL	EAGELPSAFV	VKQPGKEITA		
Cons	--QV-PAE-E	--LL--P-I-	D--V-G-PD-	-AG-LP-A-V	V---GK----		

501				550			
Lcr	KEVMDYVASQ	VSNKRLRGG	VRFVDEVPKG	LTGKIDGRA.	IREILKKPV.		
Lla	KEVMDYVASQ	VSNKRLRGG	VRFVDEVPKG	LTGKIDGKA.	IREILKKPV.		
Lmi	KEIVDYVNSQ	VVNHKRLRGG	VRFVDEVPKG	LTGKIDAKV.	IREILKKPQ.		
Pmi	QEVMDYVAGQ	VTASKRLRGG	VKFVDEVPKG	LTGKIDSRK.	IREILTMGQK		
Ppy	KEIVDYVASQ	VTTAKKL RGG	VVFVDEVPKG	LTGKLDARK.	IREILIKAKK		
Lno	QEVMDYVAGQ	VTASKRLRGG	VKFVDEVPKG	LTGKIDGRK.	IREILMMGKK		
Ppe1	KEIQDYVAGQ	VTSSKKLRGG	VEFVKEVPKG	FTGKIDTRK.	IKKILIKAQK		
Ppe2	QIVQNFVSSQ	VSTAKWLRGG	VKFLDEIPKG	STGKIDRKV.	LRQMFEKH..		
Phg	KEVMDYIAER	VTPTKRLRGG	VLFVNNIPKG	ATGKLV RTE.	LRRLLTQRA.		
GR	KEVYDYL AER	VSHTKYL RGG	VRFVDSIPRN	VTGKITR KEL	LKQ LLEKS..		
YG	KEVYDYL AER	VSHTKYL RGG	VRFVDSIPRN	VTGKITR KEL	LKQ LLEKS..		
30-4B02	KEVYDYL AER	VSHTKYL RGG	VRFVDSIPRN	VTGKITR KEL	LKQ LLEK...		
81-6G01	KEVYDYL AER	VSHTKYL RGG	VRFVDSIPRN	VTGKITR KEL	LKQ LLEK...		
Cons	-----	V---K-LRGG	V-F----P--	-TGK-----	-----		

551			
LcrAKM		
LlaAKM		
LmiAKM		
PmiSKL		
Ppy	G...GKSKL		
LnoSKL		
Ppe1	GKSKSKAKL		
Ppe2KSKL		
PhgAKL		
GRSKL		
YGSKL		
30-4B02AGG*		
81-6G01AGG*		
Cons	-----K-		

FIG. 19B (Fortsetzung)

1	50
Lcr	MENMENDE.N IVVGPKPFYP IEKGSAGTQL RKYMERYAKL .GAIAPTNAV
Lla	MENMENDE.N IVYGPEPFYP IEKGSAGAQL RKYMDRYAKL .GAIAPTNAI
Lmi	ME.MEKKE.N VVYGPLPFYP IEKGSAGIQL HKYMHQYAKL .GAIAPSNAL
Pmi	...MEDDSKH IMHGHRHSIL WEDGTAGEQL HKAMKRYAQV PGTIAFTDAH
Ppy	...MED.AKN IKKGPAPFYP LEDGTAGEQL HKAMKRYALV PGTIAFTDAH
Lno	...MED.AKN IMHGPAPFYP LEDGTAGEQL HKAMKRYAQV PGTIAFTDAH
Ppe1	...MSI.ENN ILIGPPPYYP LEEGTAGEQL HRAISRYAAV PGTLAYTDVH
Ppe2	...MED..KN ILYGPEPFYP LADGTAGEQM FYALSRYADI SGCIALTNAH
Phg	MIKME..EEH VMPGAMPRLD LFEGTAGQQL HRALYKHSYF PE..AIVDSH
YG	...MMKREKN VIYGPEPLHP LEDLTAGEML FRALRKHSHL PQ..ALVDVF
---XX00000 X00-000X0 O0X0-0X0 X00X0XX00 0X00-XX0XX	
51	100
Lcr	TGVDYSYAEY LEKSCCLGKA LQNYGLVVDG RIALCSENCE EFFIPVIAGL
Lla	TGVDYTYAEY LEKSCCLGKA LQNYGLVVDG RIALCSENCE EFFIPVLAGL
Lmi	TGVDISYQEY FDITCLARA MENFGMKPEE HIALCSENCE EFFIPVLAGL
Pmi	AEVNITYSEY FEMSCRLAET MKRYGLGLQH HIAVCSETSL QFFMPVOGAL
Ppy	IEVNITYAEY FEMSVRLAEA MKRYGLNTNH RIVVCSENSL QFFMPVLGAL
Lno	AEVNITYSEY FEMACRLAET MKRYGLGLQH HIAVCSENSL QFFMPVOGAL
Ppe1	TELEVITYKEF LDVTCRLAEA MKNYGLGLQH TISVCSENCV QFFMPICAAI
Ppe2	TKENVLYEEF LKLSCLRAES FKKYGLKQND TIAVCSENGL QFFLPLIASL
Phg	THEIISYAKI LDMSCRLAAS FQKYGLTQNN IIGICSENNL NFFNPFVIAAF
YG	GDESLSYKEF FEATCLLAQS LHNCGYKMND VVSICAEENK RFFIPILAAW
X0X0X---X X00X0X0X- XX0X-X0000 0XKO-X-00X X--O-X000X	
101	150
Lcr	FIGVGVAPTN EYTLRELVEH SLGISKPTIV FSSKKGLDKV ITVQKTVTIT
Lla	FIGVGVAPTN EYTLRELVEH SLGISKPTIV FSSKKGLDKV ITVQKTVATI
Lmi	YIGVAVAPTN EYTLRELVEH SLGIAQPTIV FSSRKGLPKV LEVQKTVTCT
Pmi	FIGVGVAPTN DIYNERELYN SLFISQPTIV FCSKRALQKI LGVQKKLPVI
Ppy	FIGVAVAPAN DIYNERELYN SMNISQPTIV FVSKKGLQKI LNVQKKLPVI
Lno	FIGVGVASTN DIYNERELYN SLSISQPTIV SCSKRALQKI LGVQKKLPVI
Ppe1	YVGVAAPTN DIYNERELYN SLSISQPTIV FTSRNSLQKI LGVQSRLPVI
Ppe2	YLGIIAAPVS DKYIERELIH SLGIVKPRII FCSKNTFQKV LNVKSKLKIV
Phg	YLGITVATVN DTYTDRELSE TLNITKQML FCSKQSLPIV MKTMKIMPYV
YG	YIGMIVAPVN ESYIPDELCK VMGISKPQIV FCTKNILNKV LEVQSRTNFI
X0-X00-0X0 XX-0XX--00 XX0-0X-X00 00X0000X00 000-X0XX00	

FIG. 19C

151	200
Lcr	KTIVILDSKV DYRGYQCLDT FIKRNTPPGF QASSFKTVEV .DRKEQVALI
Lla	KTIVILDSKV DYRGYQSDN FIKKNTPOGF KGSSFKTVEV .NRKEQVALI
Lmi	KKIVILDSKV NFGGHDOMET FIKKEVELGF QPSSFVPIDV KNRKQHVALI
Pmi	QKIVILDSRE DYMKGQSMYS FIESHLPAGF NEYDYIPDSF .DRETATALI
Ppy	QKIIIMDSKT DYQGFQSMYT FVTSHLPPGF NEYDFVPESF .DRDKTIALI
Lno	QKIVILDSRE DYMKGQSMYS FIESHLPAGF NEYDYIPDSF .DRETATALI
Ppe1	KKIIILDGKK DYLGYSQMSQ FMKEHVPANF NVSAFKPLSF .DIDR.VACI
Ppe2	ETIIILDLE DLGGYQCLNN FISQNSDINL DVKKFKPNSF .NRDDQVALV
Phg	QKLLIIDSQ DIGGIECVHS FVSRYTDEHF DPLKFVPLDF .DPREQVALI
YG	KRIIILDTVE NIHGCESLPN FISRYSDGNI A. .NFKPLHY .DPVEQVAAT
OXOX-O-XXO XXO-OXOXOO -OOOXOXOXX O--OOOOXX -OXOOO-XO	
201	250
Lcr	MNSSGSTGLP KGVQLTHEHT VTRFSHARDP IYGNQVSPGT AVLTVVPFHH
Lla	MNSSGSTGLP KGVQLTHEHA VTRFSHARDP IYGNQVSPGT AILTVVPFHH
Lmi	MNSSGSTGLP KGVRIHEQA VTRFSHAKDP IYGNQVSPGT AILTVVPFHH
Pmi	MNSSGSTGLP KGVDLTHMV CVRFSECRDP VFGNQIIPDT AILTVIPFHH
Ppy	MNSSGSTGLP KGVALPHTA CVRFSEHARDP IFGNQIIPDT AILSVVPFHH
Lno	MNSSGSTGLP KGVELTHQNV CVRFSECRDP VFGNQIIPDT AILTVIPFHH
Ppe1	MNSSGSTGLP KGVPISEHT IYRFSECRDP VFGNQIIPDT TILCAVPFHH
Ppe2	MFSSGITGVS KGVMLTHKI VARFSECKDP TFGNAINPTT AILTVIPFHH
Phg	MTSSGITGLP KGVMLTHRI CVRFVHSRDP LFGTRFIPET SILSLVPFHH
YG	LCSSGITGLP KGVMTQHNI CVRLIHALDP RAGTQLIPGV TVLVYLPFHH
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 TLQDYKCSSV ILVPTLFAIL
Lmi	GFGMFTTLGY PACGYRVVML TKFDEELFLR TLQDYKCTSV ILVPTLFAIL
Pmi	VFQMFTTLGY LTCGFRIVLM YRFEELFLR SLQDYKIQSA ILVPTLFSFF
Ppy	GFGMFTTLGY LICGFRVVLN YRFEELFLR SLQDYKIQSA ILVPTLFSFF
Lno	GFGMFTTLGY LTCGFRIVLM YRFEELFLR SLQDYKIQSA ILVPTLFSFF
Ppe1	AFGTFTNLGY LICGFHVLM YRFNEHLFLQ TLQDYKQSA ILVPTVLAFL
Ppe2	GFGMTTLGY FTCGFRVALM HTFEELFLQ SLQDYKVEST ILVPTINAF
Phg	AFGMFTTLY FIVGLKIVMM KRFDGELFLK TIQNYKIPTI VIAPFVNL
YG	AFGFSINLGY FMVGLRVIML RRFDOEAFK AIQDYEVRSV INVPAIILFL
X-OXXXX-O- XOX-XOXXX OO-OXOX--O XX-O-XOOO XO-XXXXOO	

FIG. 19C (Fortsetzung)

301	350
Lcr	NKSELINKYD LSNLVEIASG GAPLSKEVGE AVARRFNLPG VRQGYGLTET
Lla	NRSELIDKYD LSNLVEIASG GAPLSKEIGE AVARRFNLPG VRQGYGLTET
Lmi	NKSELIDKFD LSNLVEIASG GAPLAKEVGE AVARRFNLPG VRQGYGLTET
Pmi	AKSTLVDPKYD LSNLHEIASG GAPLAKEVGE AVAKRFKLPG IRQGYGLTET
Ppy	AKSTLIDKYD LSNLHEIASG GAPLSKEVGE AVAKRFHLPG IRQGYGLTET
Lno	AKSTLVDPKYD LSNLHEIASG GAPLAKEVGE AVAKRFKLPG IRQGYGLTET
Ppe1	AKNPLVDPKYD LSNLHEIASG GAPLSKEISE IAAKRFKLPG IRQGYGLTET
Ppe2	AKSALVEKYD LSHLKEIASG GAPLSKEIGE MVKRFKLPG IRQGYGLTET
Phg	AKSHLVDPKYD LSSIKEIATG GAPLGPALAN AVAKRKLGG IIQGYGLTET
YG	SKSPLVDPKYD LSSLRELCCG AAPLAKEVAE VAVKRLNLPG IRCGFGLTES
X000-00-0- --X00-XXX- X---X00X0 XXX0-XX-00 OOX-X-----X	
351	400
Lcr	TSAILIITPEG DDKPGASGKV VPLFKAKVID LDTKKSLOPN RRGEVCVKGP
Lla	TSAILIITPEG DDKPGASGKV VPLFKAKVID LDTKKTLOPN RRGEVCVKGP
Lmi	TEAFIITPEG DDKPGASGKV VPLFKVKVID LDTKKTLOPN RRGEICVKGP
Pmi	TSAILIITPEG DDKPGACGKV VPFFYAKIVD LDTGKTLGVN QRGEICVKGP
Ppy	TSAILIITPEG DDKPGAVGKV VPFFFAKVVD LDTGKTLGVN QRGEICVRGP
Lno	TSAILIITPEG DDKPGACGKV VPFFSAKIVD LDTGKTLGVN QRGEICVKGP
Ppe1	TCAIVITAEG EFKLGAAGKV VPFFYSLKVID LNTGKTLGVN ERGEICVKGP
Ppe2	TSAVLITPDT DVRPGSTGKI VPFFHAVKVD PTTGKTLGVN ETGEICVKGP
Phg	CCAVLITPHN KIKTGSTGQV LPYVTAKIVD TKTGKTLGVN QTGEICVKGP
YG	TSANIHSLOD EFKSGSLGRV TPLMAAKIAD RETGKTLGVN QVGEICVKGP
00-X0XXXXX XXOX-X0-X0 X-XX00-XX- XX-0-X--0- OX--000000	
401	450
Lcr	MIMKGYVNNP EATKELIDEE GWLETGDIGY YDEEKHFFIV DRKSLIKYK
Lla	MIMKGYVDNP EATREIIDEE GWLETGDIGY YDEEKHFFIV DRKSLIKYK
Lmi	SIMLGYSNNP EATRETIDEE GWLETGDIGY YDEDEHFFIV DRKSLIKYK
Pmi	MIMKGYVNNP EATNALIDKD GWLHSGDIAY YDKDGHFFIV DRKSLIKYK
Ppy	MIMKGYVNNP EATNALIDKD GWLHSGDIAY WDEDEHFFIV DRKSLIKYK
Lno	MIMKGYVNNP EATSALIDKD GWLHSGDIAY YDKDGHFFIV DRKSLIKYK
Ppe1	MIMKGYINNP EATRELIDEE GWIHSGDIGY FDEDEHFFIV DRKSLIKYK
Ppe2	MIMKSYNNP EATKALIDKD GWLHSGDIAY YDNDGHFFIV DRKSLIKYK
Phg	IIMKGYQNE EETRLVIDKD GWLHSGDIGY YDIDGNFHIV DRKSLIKYK
YG	MVSKGYVNNV EATKRAIDDD GWLHSGDFGY YDEDEHFFIV DRKSLIKYK
0XX00-00-X -0-00X-0X0 --000--X0- 0-00X00X- --X-X-----	

FIG. 19C (Fortsetzung)

451	500
Lcr	GYQVPPAELE SVLLQHPNIF DAGVAGVPDP VAGELPGAVV VLESQKMTTE
Lla	GYQVPPAELE SVLLQHPNIF DAGVAGVPDP IAGELPGAVV VLEKQKSMTE
Lmi	GYQVPPAELE SVLLQHPNIF DAGVAGVPDP DAGELPGAVV VMEKQKMTTE
Pmi	GYQVPPAELE SILLQHPFIF DAGVAGIPDD DAGELPAAVV VLEEGKMTTE
Ppy	GYQVAPAELE SILLQHPNIF DAGVAGLPDD DAGELPAAVV VLEHGKMTTE
Lno	GYQVPPAELE SILLQHPFIF DAGVAGIPDP DAGELPAAVV VLEEGKMTTE
Ppe1	GYQVPPAELE ALLLQHPFIE DAGVAGVPDE VAGDLPGAVV VLKQKSITE
Ppe2	GYQVAPAEIE GILLQHPYIV DAGVTGIPDE AAGELPAAGV VVQTGKYLNE
Phg	AYQVAPAELE ALLLQHPYIA DAGVTGIPDE EAGELPAACV VLEPGKMTTE
YG	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	QEVMDYVAGQ VTASKRLRGG VKFVDEVPKG LTGKIDSRK. IREILTMGQK
Ppy	KEIVDYVASQ VTTAKKL RGG VVFVDEVPKG LTGKIDARK. IREILIKAKK
Lno	QEVMDYVAGQ VTASKRLRGG VKFVDEVPKG LTGKIDGRK. IREILMMGKK
Ppe1	KEIQDYVAGQ VTSSKKLRGG VEFVKEVPKG FTGKIDTRK. IKEILIKAQK
Ppe2	QIVQNFVSSQ VSTAKWLRGG VKFLDEIPKG STGKIDRKV. LRQMFETH..
Phg	KEVMDYIAER VTPTKRLRGG VLFVNNIPKG ATGKLV RTE. LRRLLTORA.
YG	KEVYDYLAER VSHTKYLRGG VRFVDSIPRN VTGKITR KEL LKQILLEKS..
OOOXOOXOX -OOO-X----- -O-OOXX-XX X---OXOXOO XXXXOOOOOO	

551	
LcrAKM
LlaAKM
LmiAKM
PmiSKL
Ppy	G...GKSKL
LnoSKL
Ppe1	GKSKSKAKL
Ppe2KSKL
PhgAKL
YGSKL
OOOOOOX-O	

FIG. 19C (Fortsetzung)

Erläuterungen zu den Käferluciferasesequenzen:

Lcr	<i>Luciola cruciata</i>
Lla	<i>Luciola lateralis</i>
Lmi	<i>Luciola mingrelica</i>
Pmi	<i>Pyrocoelia miyako</i>
Ppy	<i>Photinus pyralis</i>
Lno	<i>Lampyrus 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

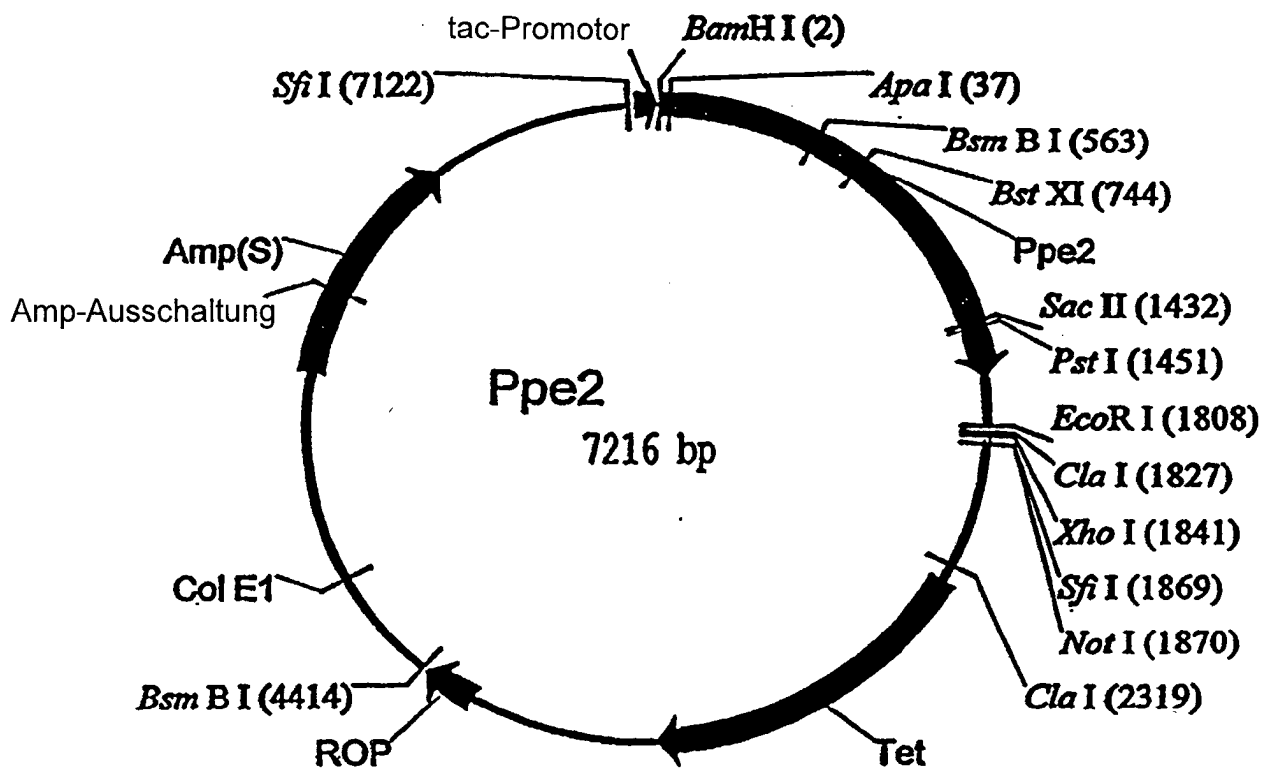


FIG. 20

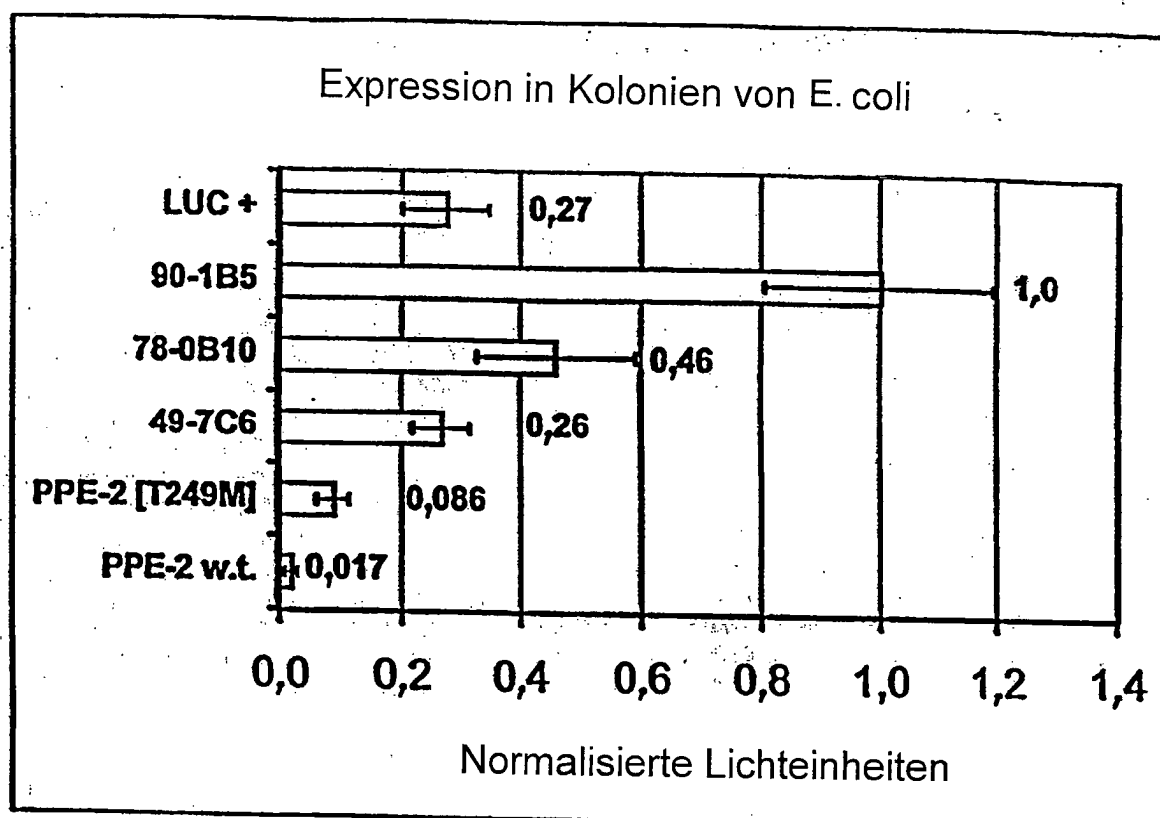


FIG. 21

luc49-7C6 (SEQ ID NO:1)

GGATCCAATG	GCAGATAAAA	ATATTTTATA	TGGGCCCGAA	CCATTTTATC	CCTTGGCTGA	60
TGGGACGGCT	GGAGAACAGA	TGTTTTACGC	ATTATCTCGT	TATGCAGATA	TTTCAGGATG	120
CATAGCATTG	ACAAATGCTC	ATACAAAAGA	AAATGTTTTA	TATGAAGAGT	TTTTAAAATT	180
GTCGTGTCGT	TTAGCGGAAA	GTTTTAAAAA	GTATGGATTA	AAACAAAACG	ACACAATAGC	240
GGTGTGTAGC	GAAAATGGTT	TGCAATTTTT	CCTTCCTATA	ATTGCATCAT	TGTATCTTGG	300
AATAATTGCA	GCACCTGTTA	GTGATAAATA	CATTGAACGT	GAATTAATAC	ACAGTCTTGG	360
TATTGTAAAA	CCACGCATAA	TTTTTTGCTC	CAAGAATACT	TTTCAAAAAG	TACTGAATGT	420
AAAATCTAAA	TTAAAAATAT	TAGAAACTAT	TATTATATTA	GACTTAAATG	AAGACTTAGG	480
AGGTTATCAA	TGCTCAACA	ACTTTATTTT	TCAAAATTCC	GATATTAATC	TGGACGTAAA	540
AAAATTTAAA	CCATATTCTT	TTAATCGAGA	CGATCAGGTT	GCGTTGGTAA	TGTTTTCTTC	600
TGGTACAAC	GGTGTTCGA	AGGGAGTCAT	GCTAACTCAC	AAGAATATTG	TTGCACGATT	660
TTCTCTTGA	AAAGATCCTA	CTTTTGGTAA	CGCAATTAA	CCAACGACAG	CAATTTTAA	720
GGTAATACCT	TTCCACCATG	GTTTTGGTAT	GATGACCACA	TTAGGATACT	TTACTTGTGG	780
ATTCGAGTT	GTCTAATGC	ACACGTTTGA	AGAAAACTA	TTTCTACAAT	CATTACAAGA	840
TTATAAAGTG	GAAAGTACTT	TACTTGTACC	AACATTAAAT	GCATTTCTTG	CAAAAAGTGC	900
ATTAGTTGAA	AAGTACGATT	TATCGCACTT	AAAAGAAATT	GCATCTGGTG	GCGCACCTTT	960
ATCAAAAGAA	ATTGGGGAGA	TGGTGAAAAA	ACGGTTTAAA	TTAAACTTTG	TCAGGCAAGG	1020
GTATGGATTA	ACAGAAACCA	CTTCGGCTGT	TTAATTACA	CCGACAAATG	ACGTCAGACC	1080
GGGATCAACT	GGTAAAATAG	TACCATTTCA	CGCTGTTAAA	GTTGTGATC	CTACAACAGG	1140
AAAAATTTTG	GGGCCAAATG	AACTGAGAGA	ATGTATTTT	AAAGGCGACA	TGATAATGAA	1200
AGGTTATTAT	AATAATGAAG	AAGCTACTAA	AGCAATTATT	AACAAAGACG	GATGGTTGCG	1260
CTCTGGTGAT	ATTGCTTATT	ATGACAATGA	TGGCCATTTT	TATATTGTGG	ACAGGCTGAA	1320
GTCATTAAAT	AAATATAAAG	GTTATCAGGT	TGCACCTGCT	GAAATTGAGG	GAATACTCTT	1380
ACAACATCCG	TATATTGTTG	ATGCCGGCGT	TACTGGTATA	CCGGATGAAG	CCGCGGGCGA	1440
GCTTCCAGCT	GCAGGTGTTG	TAGTACAGAC	TGGAAAATAT	CTAAACGAAC	AAATCGTACA	1500
AAATTTTGTT	TCCAGTCAAG	TTTCAACAGC	CAAATGGCTA	CGTGGTGGGG	TGAAATTTTT	1560
GGATGAAATT	CCCAAAGGAT	CAACTGGAAA	AATTGACAGA	AAAGTGTTAA	GACAAATGTT	1620
TGAAAAACAC	ACCAATGGG					1639

FIG. 22

luc49-6C10 (SEQ ID NO:2)

GGATCCAATG	GAAGATAAAA	ATATTTTATA	TGGACCTGAA	CCATTTTATC	CCTTGGCTGA	60
TGGGACGGCT	GGAGAACAGA	TGTTTTACGC	ATTATCTCGT	TATGCAGATA	TTTCAGGATG	120
CATAGCATTG	ACAAATGCTC	ATACAAAAGC	CCCTGTTTTA	TATGAAGAGT	TGTTAAAATT	180
GTCGTGTCGT	TTAGCGGAAA	GTTTTAAAAA	GTATGGATTA	AAACAAAACG	ACACAATAGC	240
GGTGTGTAGC	GAAAATGGTT	TGCAATTTTT	CCTTCCTATA	ATTGCATCAT	TGTATCTTGG	300
AATAATTGCA	GCACCTGTTA	GTGATAAATA	CATTGAACGT	GAATTAATAC	ACAGTCTTGG	360
TATTGTAAAA	CCACGCATAA	TTTTTTGCTC	CAAGAATACT	TTTCAAAAAG	TACTGAATGT	420
AAAATCTAAA	TTAAATATAG	TAGAAACTAT	TATTATATTA	GACTTAAATG	AAGACTTAGG	480
AGGTTATCAA	TGCCTCAACA	ACTTTATTTT	TCAAAATTCC	GATATTAATC	TGGACGTAAA	540
AAAATTTAAA	CCAATTTCTT	TTAATCGAGA	CGATCAGGTT	GCGTTGGTAA	TGTTTTCTTC	600
TGGTACAAC	GGTGTTCGA	AGGGAGTCAT	GCTAACTCAC	AAGAATATTG	TTGCACGATT	660
TTCTCATGCA	AAAGATCCTA	CTTTTGGTAA	CGCAATTAA	CCAACGACAG	CAATTTTAAC	720
GGTAATACCT	TTCCACCATG	GTTTTGGTAT	GATGACCACA	TTAGGATACT	TTACTTGTGG	780
ATTCGAGATT	GTTCTAATGC	ACACGTTTGA	AGAAAACTA	TTTCTACAAT	CATTACAAGA	840
TTATAAGTG	GAAAGTACTT	TACTTGTAAC	AACATTAAATG	GCATTTTTTG	CAAAAAGTGC	900
ATTAGTTGAA	AAGTACGATT	TATCGCACTT	AAAAGAAATT	GCATCTGGTG	GCGCACCTTT	960
ATCAAAGAA	ATTGGGGAGA	TGGTGAAAAA	ACGGTTTAAA	TTAAACTTTG	TCAGGCAAGG	1020
GTATGGATTA	ACAGAAACCA	CTTCGGCTGT	TTTAATTACA	CCGACAGATG	ACGTCAGACC	1080
GGGATCAACT	GGTAAAATAG	TACCATTTCA	CGCTGTTAAA	GTTGTGATC	CTACAACAGG	1140
AAAAATTTTG	GGGCCAAATG	AAACTGGAGA	ATTGTATTTT	AAAGGCGACA	TGATAATGAA	1200
AGGTTATTAT	AATAATGAAG	AAGCTACTAA	AGCAATTATT	AACAAAGACG	GATGGTTGCG	1260
CTCTGGTGAT	ATTGCTTATT	ATGACAATGA	TGGCCATTTT	TATATTGTGG	ACAGGCTGAA	1320
GTCATTAAAT	AAATATAAAG	GTTATCAGGT	TGCACCTGCT	GAAATTGAGG	GAATACTCTT	1380
ACAACATCCG	TATATTGTTG	ATGCCGGCGT	TACTGGTATA	COGGATGAAG	CCGCGGGCGA	1440
GCTTCCAGCT	GCAGGTGTTG	TAGTACAGAC	TGGAAAATAT	CTAAACGAAC	AAATCGTACA	1500
AAATTTTGTT	TCCAGTCAAG	TTTCAACAGC	CAATGGGCTA	CGTGGTGGGG	TGAAATTTTT	1560
GGATGAAATT	CCCAAAGGAT	CAACTGGAAA	AATTGACAGA	AAAGTGTTAA	GACAAATGTT	1620
TGAAAAACAC	ACCAATGGG					1639

FIG. 23

1uc49-0G12 (SEQ ID NO:3)

GGATCCAATG	GAAGATAAAA	ATATTTTATA	TGGACCTGAA	CCATTTTATC	CCTTGGCTGA	60
TGGGACCGCT	GGAGAACAGA	TGTTTTACGC	ATTATCTCGT	TATGCAGATA	TTTCAGGATG	120
CATAGCATTG	ACAAATGCTC	ATACAAAAGC	CCCTGTTTTA	TATGAAGAGT	TTTTAAAATT	180
GTCGTGTCGT	TTAGCGGAAA	GTTTTAAAAA	GTATGGATTA	AAACAAAACG	ACACAATAGC	240
GGTGTGTAGC	GAAAATGGTT	TGCAATTTTT	CCTTCCTATA	ATTGCATCAT	TGTATCTTGG	300
AATAATTGCA	GCACCTGTTA	GTGATAAATA	CATTGAACGT	GAATTAATAC	ACAGTCTTGG	360
TATTGTAAAA	CCACGCATAA	TTTTTTGCTC	CAAGAATACT	TTTCAAAAAG	TACTGAATGT	420
AAAATCTAAA	TTAAAATATG	TAGAAACTAT	TATTATATTA	GACTTAAATG	AAGACTTAGG	480
AGGTATCAAA	TGCCTCAACA	ACTTTATTTT	TCAAAATTCC	GATATTAATC	TTGACGTAAA	540
AAAATTTAAA	CCAATATTCT	TTAATCGAGA	CGATCAGGTT	GCGTTGGTAA	TGTTTTCTTC	600
TGGTACAACCT	GGTGTTCGGA	AGGGAGTCAT	GCTAACTCAC	AAGAATATTG	TTGTACGATT	660
TTCTTATGCA	AAAGATCCTA	CTTTTGGTAA	CGCAATTAAT	CCAACGACAG	CAATTTTAAC	720
GGTAATACCT	TTCCACCATG	GTTTTGGTAT	GATGACCACA	TTAGGATACT	TTACTTGTGG	780
ATTCCGAGTT	GTTCTAATGC	ACACGTTTGA	AGAAAACTA	TTTCTACAAT	CATTACAAGA	840
TTATAAAGTG	GAAAGTACTT	TACTTGTACC	AACATTAATG	GCATTTCTTG	CAAAAAGTGC	900
ATTAGTTGAA	AAGTACGATT	TATCGCACTT	AAAAGAAATT	GCATCTGGTG	GCGCACCTTT	960
ATCAAAAGAA	ATTGGGGAGA	TGGTGAAAAA	ACGGTTTAAA	TTAAACTTTG	TCAGGCAAGG	1020
GTATGGATTA	ACAGAAACCA	CTTCGGCTGT	TTTAATTACA	CCGACACATG	ACGTCAGACC	1080
GGGATCAACT	GGTAAAATAG	TACCATTTCA	CGCTGTTAAA	GTTGTCGATC	CTACAACAGG	1140
AAAATTTTGG	GGGCCAAATG	AAACTGGAGA	ATTGTATTTT	AAAGGCGACA	TGATAATGAA	1200
AGGTATATAT	AATAATGAAG	AAGCTACTAA	AGCAATTATT	AACAAAGACG	GATGGTTGCG	1260
CTCTGGTGAT	ATTGCTTATT	ATGACAATGA	TGGCCATTTT	TATATTGTGG	ACAGGCTGAA	1320
GTCATTAATT	AAATATAAAG	GTTATCAGGT	TGCACCTGCT	GAAATTGAGG	GAATACTCTT	1380
ACAACATCCG	TATATTGTTG	ATGCOGGCGT	TACTGGTATA	CCGATGAAG	CCGCGGGCGA	1440
GCTTCCAGCT	GCAGGTGTTG	TAGTACAGAC	TGGAAAATAT	CTAAACGAAC	AAATCGTACA	1500
AAATTTTGTG	TCCAGTCAAG	TTTCAACAGC	CAAATGGCTA	CGTGGTGGGG	TGAAATTTTT	1560
GGATGAAATT	CCCAAAGGAT	CAACTGGAAA	AATTGACAGA	AAAGTGTTAA	GACAAATGTT	1620
TGAAAAACAC	ACCAATGGG					1639

FIG. 24

luc49-7A5 (SEQ ID NO:4)

GGATCCAATG	GAAGATAAAA	ATATTTTATA	TGGACCTGAA	CCATTTTATC	CCTTGGCTGA	60
TGGGACGGCT	GGAGAACAGA	TGTTTTACGC	ATTATCTCGT	TATGCAGATA	TTTCAGGATG	120
CATAGCATTG	ACAAATGCTC	ATACAAAAGC	CCCTGTTTTA	TATGAAGAGT	TTTTAAAATT	180
GTCGTGTCGT	TTAGCGGAAA	GTTTTAAAAA	GTATGGATTA	AAACAAAACG	ACACAATAGC	240
GGTGTGTAGC	GAAAATGGTT	TGCAATTTTT	CCTTCCTATA	ATTGCATCAT	TGTATCTTGG	300
AATAATTGCA	GCACCTGTTA	GTGATAAATA	CATTGAACGT	GAATTAATAC	ACAGTCTTGG	360
TATTGTAAAA	CCACGCATAA	TTTTTTGCTC	CAAGAATACT	TTTCAAAAAG	TACTGAATGT	420
AAAAATCTAA	TTAAATATG	TAGAAACTAT	TATTATATTA	GACTTAAATG	AAGACTTAGG	480
AGGTTATCAA	TGCCTCAACA	ACTTTATTTT	TCAAAATTCC	GATATTAATC	TTGACGTAAA	540
AAAAATTTAA	CCATATTCTT	TTAATCGAGA	CGATCAGGTT	GCGTTGGTAA	TGTTTTCTTC	600
TGGTACAAC	GGTGTTCGA	AGGGAGTCAT	GCTAACTCAC	AAGAATATTG	TTGCACGATT	660
TTCTATTGCA	AAAGATCCTA	CTTTTGGTAA	CGCAATTAAT	CCAACGACAG	CAATTTTAAC	720
GGTAATACCT	TTCCACCATG	GTTTTGGTAT	GATGACCACA	TTAGGATACT	TTACTTGTGG	780
ATTCCGAGTT	GTCTAATG	ACACGTTTGA	AGAAAACTA	TTTCTACAAT	CATTACAAGA	840
TTATAAAGTG	GAAAGTACTT	TACTTGTACC	AACATTAATG	GCATTTTTTG	CAAAAAGTGC	900
ATTAGTTGAA	AAGTACGATT	TATCGCACTT	AAAAGAAATT	GCATCTGGTG	GCGCACCTTT	960
ATCAAAAGAA	ATTGGGGAGA	TGGTGAAAAA	ACGGTTTAAA	TTAAACTTTG	TCAGGCAAGG	1020
GTATGGATTA	ACAGAAACCA	CTTCGGCTGT	TTTAATTACA	CCGACAAATG	ACGTCAGACC	1080
GGGATCAACT	GGTAAAATAG	TACCATTTTCA	CGCTGTTAAA	GTTGTCGATC	CTACAACAGG	1140
AAAAATTTTG	GGGCCAAATG	AAACTGGAGA	ATTGTATTTT	AAAGGCGACA	TGATAATGAA	1200
AGGTTATTAT	AATAATGAAG	AAGCTACTAA	AGCAATTATT	AACAAAGACG	GATGGTTGCG	1260
CTCTGGTGAT	ATTGCTTATT	ATGACAATGA	TGGCCATTTT	TATATTGTGG	ACAGGCTGAA	1320
GTCATTAATT	AAATATAAAG	GTTATCAGGT	TGCACCTGCT	GAAATTGAGG	GAATACTCTT	1380
ACAACATCCG	TATATTGTTG	ATGCCGGCGT	TACTGGTATA	CCGGATGAAG	CCGCGGGCGA	1440
GCTTCCAGCT	GCAGGTGTTG	TAGTACAGAC	TGGAAAATAT	CTAAACGAAC	AAATCGTACA	1500
AAATTTTGTT	TCCAGTCAAG	TTTCAACAGC	CAAATGGCTA	CGTGGTGGGG	TGAAATTTTT	1560
GGATGAAATT	CCCAAAGGAT	CAACTGGAAA	AATTGACAGA	AAAGTGTTAA	GACAAATGTT	1620
TGAAAAACAC	ACCAATGGG					1639

FIG. 25

luc49-4G11 (SEQ ID NO:5)

GGATCCAATG	GAAGATAAAA	ATATTTTATA	TGGACCTGAA	CCATTTTATC	CCTTGGCTGA	60
TGGGACGGCT	GGAGAACAGA	TGTTTGACGC	ATTATCTCGT	TATGCAGATA	TTTCAGGATG	120
CATAGCATTG	ACAAATGCTC	ATACAAAAGC	CCCTGTTTTA	TATGAAGAGT	TGTTAAAATT	180
GTCGTGTCGT	TTAGCGGAAA	GTTTTAAAAA	GTATGGATTA	AAACAAAACG	ACACAATAGC	240
GGTGTGTAGC	GAAAATGGTT	TGCAATTTTT	CCTTCCTATA	ATTGCATCAT	TGTATCTTGG	300
AATAATTGCA	GCACCTGTTA	GTGATAAATA	CATTGAACGT	GAATTAATAC	ACAGTCTTGG	360
TATTGTAAAA	CCACGCATAA	TTTTTTGCTC	CAAGAATACT	TTTCAAAAAG	TACTGAATGT	420
AAAATCTAAA	TTAAATATATG	TAGAAACTAT	TATTATATTA	GACTTAAATG	AAGACTTAGG	480
AGGTTATCAA	TGCCTCAACA	ACTTTATTTT	TCAAAATPCC	GATATTAATC	TTGACGTAAA	540
AAAATTTAAA	CCATATTCTT	TTAATCGAGA	CGATCAGGTT	GCGTTGGTAA	TGTTTTCTTC	600
TGGTACAAC	GGTGTTCGA	AGGGAGTCAT	GCTAACTCAC	AAGAATATTG	TTGCACGATT	660
TTCTCATGCA	AAAGATCCTA	CTTTTGGTAA	CGCAATTAAT	CCAACGACAG	CAATTTTAAC	720
GGTAATACCT	TTCCACCATG	GTTTTGGTAT	GATGACCACA	TTAGGATACT	TTACTTGTGG	780
ATTCCGAGTT	GTCTAATGC	ACACGTTTGA	AGAAAACTA	TTTCTACAAT	CATTACAAGA	840
TTATAAAGTG	GAAAGTACTT	TACTTGTACC	AACATTAATG	GCATTTTTTG	CAAAAAGTGC	900
ATTAGTTGAA	AAGTACGATT	TATCGCACTT	AAAAGAAATT	GCATCTGGTG	GCGCACCTTT	960
ATCAAAAGAA	ATTGGGGAGA	TGGTGAAAAA	ACGGTTTAAA	TTAAACTTTG	TCAGGCAAGG	1020
GTATGGATTA	ACAGAAACCA	CTTCGGCTGT	TTTAATTACA	CCGACCAATG	ACGTCAGACC	1080
GGGATCAACT	GGTAAAATAG	TACCATTTC	CGCTGTTAAA	GTTGTCGATC	CTACAACAGG	1140
AAAAATTTTG	GGGCCAAATG	AAACTGGAGA	ATTGTATTTT	AAAGGCGACA	TGATAATGAA	1200
AGGTTATTAT	AATAATGAAG	AAGCTACTAA	AGCAATTATT	AACAAGACG	GATGGTTGCG	1260
CTCTGGTGAT	ATTGCTTATT	ATGACAATGA	TGGCCATTTT	TATATTGTGG	ACAGGCTGAA	1320
GTCAATTAAT	AAATATAAAG	GTTATCAGGT	TGCACCTGCT	GAAATTGAGG	GAATACTCTT	1380
ACAACATCCG	TATATTGTTG	ATGCCGGCGT	TACTGGTATA	COGGATGAAG	COGCGGGCGA	1440
GCTTCCAGCT	GCAGGTGTTG	TAGTACAGAC	TGGAAAATAT	CTAAACGAAC	AAATCGTACA	1500
AAATTTTGTT	TCCAGTCAAG	TTTCAACAGC	CAAATGGCTA	CGTGGTGGGG	TGAAATTTTT	1560
GGATGAAATT	CCCAAAGGAT	CAACTGGAAA	AATTGACAGA	AAAGTGTTAA	GACAAATGTT	1620
TGAAAAACAC	ACCAATGGG					1639

FIG. 26

luc49-7C6 (SRQ ID NO:14)

		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	A	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	E	S	F	K	F	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	I	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	T	P	Y	S	F	N	R	D	D	Q	V	A	L	V	M	F	S	S		200
G	T	K	G	V	S	K	G	V	M	L	T	H	K	N	I	V	A	R	F		220
S	L	A	K	D	P	T	F	G	M	A	T	N	P	T	T	A	I	L	T		240
V	I	P	F	H	H	G	F	G	N	M	T	L	F	L	Y	F	T	C	G		260
F	R	V	V	L	M	H	T	F	P	E	K	L	M	A	Q	S	L	Q	D		280
Y	K	V	E	S	T	L	L	V	P	T	L	I	A	F	L	A	K	S	A		300
L	V	E	K	Y	D	L	S	H	K	R	E	K	L	N	G	V	A	P	L		320
S	K	E	I	G	E	M	V	K	K	R	F	K	L	N	F	V	Q	R	G		340
Y	G	L	T	E	T	T	S	A	V	L	I	T	P	N	N	D	V	T	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	E	A	T	K	A	I	F	N	K	D	M	I	M		400
Q	Y	Y	N	N	E	E	A	T	K	A	I	F	N	K	D	M	I	M	K		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	A	A	S	V	V	A	V	T	G	I	P	D	E	A	I	G	E		480
L	P	A	A	S	S	Q	V	Q	T	A	K	I	Y	L	R	G	V	Q	F		500
N	F	V	S	K	N	G	S	T	G	K	I	D	R	K	V	L	Q	M	F		520
D	E	K	H	T	N	Q															540
E	K	H	T	N	Q																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 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 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 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 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 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 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 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 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 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 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 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 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	GCAGATAAGA	ATATTTTATA	TGGGCCCGAA	CCATTTTATC	CCTTGGCTGA	60
TGGGACGGCT	GGAGAACAGA	TGTTTGACGC	ATTATCTCGT	TATGCAGATA	TTTCGGGATG	120
CATAGCATTG	ACAATGCTC	ATACAAAAGA	AAATGTTTTA	TATGAAGAGT	TTTTAAAATT	180
GTCGTGTCGT	TTAGCGGAAA	GTTTTAAAAA	GTATGGATTA	AAACAAAACG	ACACAATAGC	240
GGTGTGTAGC	GAAAATGGTT	TGCAATTTTT	CCTTCCTGTA	ATTGCATCAT	TGTATCTTGG	300
AATAATTGCA	GCACCTGTTA	GTGATAAATA	CATTGAACGT	GAATTAATAC	ACAGTCTTGG	360
TATTGTAAAA	CCACGCATAA	TTTTTTGCTC	CAAGAATACT	TTTCAAAAAG	TACTGAATGT	420
AAAATCTAAA	TTAAAATCTG	TAGAAACTAT	TATTATATTA	GACTTAAATG	AAGACTTAGG	480
AGGTATCAAA	TGCCTCAACA	ACTTTATTTT	TCAAAATTCC	GATAGTAATC	TGGACGTAAA	540
AAAATTAAAA	CCATATTCTT	TTAATCGAGA	CGATCAGGTT	GCGTTGGTAA	TGTTTTCTTC	600
TGGTACAACT	GGTGTTCGGA	AGGGAGTCAT	GCTAACTCAC	AAGAATATTG	TGCAACGATT	660
TTCTCTTCGA	AAAGATCCTA	CTTTTGGTAA	CGCAATTAAT	CCACACACAG	CAATTTTAAC	720
GGTAATACCT	TTCCACCATG	GTTTTGGTAT	GATGACCACA	TTAGGATACT	TTACTTGTGG	780
ATTCCGAGTT	GTCTAATGC	ACAOGTTTGA	AGAAAACTA	TTTCTACAAT	CATTACAAGA	840
TTATAAAGTG	GAAAGTACTT	TACTTGTACC	AACATTAATG	GCATTTCTTG	CAAAAAGTGC	900
ATTAGTTGAA	AAGTACGATT	TATCGCACTT	AAAAGAAATT	GCATCTGGTG	GCGCACCTTT	960
ATCAAAAGAA	ATTGGGGAGA	TGGTGAAAAA	ACGGTTTAAA	TTAAACTTTG	TCAGGCAAGG	1020
GTATGGATTA	ACAGAAACCA	CTTCGGCTGT	TTTAATTACA	CCGAAAGGTG	ACGCCAGACC	1080
GGGATCAACT	GGTAAAATAG	TACCATTTCA	CGCTGTTAAA	GTTGTGATC	CTACAACAGG	1140
AAAAATTTTG	GGGCCAAATG	AACTTGGAGA	ATTGTATTTT	AAAGGCGCCA	TGATAATGAA	1200
GGGTATTAT	AATAATGAAG	AAGCTACTAA	AGCAATTATT	GATAATGACG	GATGGTTGCG	1260
CTCTGGTGAT	ATTGCTTATT	ATGACAATGA	TGGCCATTTT	TATATTGTGG	ACAGGCTGAA	1320
GTCAATTAAT	AAATATAAAG	GTTATCAGGT	TGCACCTGCT	GAAATTGAGG	GAATACTCTT	1380
ACAACATCCG	TATATTGTTG	ATGCCGGCGT	TACTGGTATA	CCGGATGAAG	CCGCCGGCGA	1440
GCTTCCAGCT	GCAGGTGTTG	TAGTACAGAC	TGGAAAATAT	CTAAACGAAC	AAATCGTACA	1500
AGATTTTGT	TCCAGTCAAG	TTTCAACAGC	CAAATGGCTA	CGTGGTGGGG	TGAAATTTTT	1560
GGATGAAATT	CCCAAAGGAT	CAACTGGAAA	AATTGACAGA	AAAGTGTTAA	GACAAATGTT	1620
TGAAAAACAC	ACCAATGGG					1639

FIG. 32

luc78-0G8 (SEQ ID NO:7)

```

GGATCCAATG GCAGATAAAA ATATTTTATA TGGGCCCGAA CCATTTTATC CCTTGGCTGA 60
TGGGACGGCT GGAGAACAGA TGTTTACGC ATTATCTCGT TATGCAGATA TTTCAGGATG 120
CATAGCATTG ACAAATGCTC ATACAAAAGC CCCTGTTTTA TATGAAGAGT TTTTAAAATT 180
GTCGTGTCGT TTAGCGGAAA GTTTTAAAAA GTATGGATTA AAACAAAACG ACACAATAGC 240
GGTGTGTAGC GAAAATGGTT TGCAATTTTT CCTTCCTGTA ATTGCATCAT TGTATCTTGG 300
AATAATTGCA GCACCTGTTA GTGATAAATA CATTGAACGT GAATTAATAC ACAGTCTTGG 360
TATTGTAAAA CCACGCATAA TTTTTGCTC CAAGAATACT TTTCAAAAAG TACTGAATGT 420
AAAATCTAAA TTAAAATATG TAGAACTAT TATTATATTA GACTTAAATG AAGACTTAGG 480
AGGTTATCAA TGCCCAACA ACTTTATTC TCAAAATTCC GATATTAATC TTGACGTAAA 540
AAAATTTAAA CCATATTCTT TTAATCGAGA CGATCAGGTT GCGTTGGTAA TGTATCTTC 600
TGGTACAAC TGTGTTTCCA AGGGAGTCAT GCTAACTCAC AAGAATATTG TTGCACGATT 660
TTCTCTTCCA AAAGATCCTA CTTTTGGTAA CGCAATTAA TCCACGACAG CAATTTTAA 720
GGTAATACCT TTCCACCATG GTTTTGGTAT GATGACCACA TTAGGATACT TTACTTGTGG 780
ATTCCGAGTT GTTCTAATGC ACACGTTTGA AGAAAACTA TTTCTACAAT CATTACAGA 840
TTATAAAGTG GAAAGTACTT TACTTGTACC AACATTAATG GCATTTCTTG CAAAAGTGC 900
ATTAGTTGAA AAGTACGATT TATCGCATT AAAAGAAATT GCATCTGGTG GCGCACCTTT 960
ATCAAAAGAA ATTGGGGAGA TGGTGA AAAA ACGGTTTAAA TTAACTTTG TCAGGCAAGG 1020
GTATGGATTA ACAGAAACCA CTTCGGCTGT TTTAATTACA CCGAAAxxxx xGTCAGACC 1080
GGGATCAACT GGTAAAATAG TACCATTTC CGCTGTTAAA GTTGTGATC CTACAACAGG 1140
AAAATTTTG GGGCCAAATG AACCTGGAGA ATTGTATTTT AAAGGCGACA TGATAATGAA 1200
AGGTTATTAT AATAATGAAG AAGCTACTAA AGCAATTATT GATAAGACG GATGGTTGCG 1260
CTCTGGTGAT ATTGCTTATT ATGACAATGA TGGCCATTTT TATATTGTGG ACAGGCTGAA 1320
GTCATTAATT AAATATAAAG GTTATCAGGT TGCACCTGCT GAAATTGAGG GAATACTCTT 1380
ACAACATCCG TATATTGTTG ATGCCGGCGT TACTGGTATA CCGGATGAAG CCGCGGCGA 1440
GCTTCCAGCT GCAGGTGTTG TAGTACAGAC TGGAAAATAT CTAAACGAAC AAATCGTACA 1500
AAATTTTGT TCCAGTCAAG TTTCAACAGC CAAATGGCTA CCGGGTGGGG TGAAATTTT 1560
GGATGAAATT CCCAAGGAT CAACTGGAAA AATTGACAGA AAAGTGTAA GACAAATGTT 1620
TGAAAAACAC ACCAATGGG

```

FIG. 33

luc78-1E1 (SEQ ID NO:8)

```

GGATCCAATG GCAGATAAAA ATATTTTATA TGGGCCCGAA CCATTTTATC CCTTGGCTGA 60
TGGGACGGCT GGAGAACAGA TGTTTTACGC ATTATCTCGT TATGCAGATA TTTCAGGATG 120
CATAGCATTG ACAAATGCTC ATACAAAAGC CCCTGTTTTA TATGAAGAGT TGTAAAAATT 180
GTCGTGTCGT TTAGCGGAAA GTTTTAAAAA GTATGGATTA AAACAAAACG ACACAATAGC 240
GGTGTGTAGC GAAAATGGTT TGCAATATTT CCTTCCTGTA ATTGCATCAT TGTATCTTGG 300
AATAATTGCA GCACCTGTTA GTGATAAATA CATTGAACGT GAATTAATAC ACAGTCTTGG 360
TATTGTAAAA CCACGCATAA TTTTTTGCTC CAAGAATACT TTTCAAAAAG TACTGAATGT 420
AAAATCTAAA TTAATAATATG TAGAAACTAT TATTATATTA GACTTAAATG AAGACTTAGG 480
AGGTTATCAA TGCCCTCAACA ACTTTATTTT TCAAAATTCG GATATTAATC TTGACGTAAA 540
AAAATTTAAA CCAATTCTTT TTAATCGAGA CGATCAGGTT GCGTTGGTAA TGTTTTCTTC 600
TGGTACAACCT GGTGTTTCCA AGGGAGTCAT GCTAACTCAC AAGAATATTG TTGCACGATT 660
TTCTATTGCA AAAGATCCTA CTTTGGGTAA CGCAATTAAT CCAACGACAG CAATTTTAAC 720
GGTAATACCT TTCCACCATG GTTTGGGTAT GATGACCACA TTAGGATACT TTAATTGTGG 780
ATTCOGAGTT GTTCTAATGC ACACGTTTGA AGAAAACTA TTTCTACAAT CATTACAAGA 840
TTATAAAGTG GAAAGTACTT TACTTGTAAC AACATTATG GCATTCTTGG CAAAAAGTGC 900
ATTAGTTGAA AAGTACGATT TATCGCACCT AAAAGAAATT GCATCTGGTG GCGCACCTTT 960
ATCAAAAGAA ATTGGGGAGA TGGTGAAAAA ACGGTTTAAA TTAACCTTG TCAGGCAAGG 1020
GTATGGATTA ACAGAAACCA CTTCCGCTGT TTTAATTACA CCGAAACCC CGGCAGACC 1080
GGGATCAACT GGTAATAATG TACCATTTCG CGCTGTTAAA GTTGTGATC CTACAACAGG 1140
AAAAATTTTG GGGCCAAATG AACCTGGAGA ATTGTATTTT AAAGGOGCCA TGATAATGAA 1200
GGGTTATTAT AATAATGAAG AAGCTACTAA AGCAATTATT AACAAAGACG GATGGTTGCG 1260
CTCTGGTGAT ATTGCTTATT ATGACAATGA TGGCCATTTT TATATTGTGG ACAGGCTGAA 1320
GTCATTAATT AAATATAAAG GTTATCAGGT TGCACCTGCT GAAATTGAGG GAATACTCTT 1380
ACAACATCOG TATATTGTTG ATGCCGGCGT TACTGGTATA CCGGATGAAG CCGCGGGCGA 1440
GCTTCCAGCT GCAGGTGTTG TAGTACAGAC TGGAAAATAT CTAAACGAAC AAATCGTACA 1500
AAATTTTGTT TCCAGTCAAG TTTCACAGC CAAATGGCTA CGTGGTGGGG TGAAATTTT 1560
GGATGAATT CCCAAAGGAT CAACTGGAAA AATTGACAGA AAAGTGTTAA GACAAATGTT 1620
TGAAAAACAC ACCAATGGG 1639

```

FIG. 34

1uc78-2B4 (SEQ ID NO:9)

```

GGATCCAATG GCAGATAAAA ATATTTTATA TGGGCCCGAA CCATTTTATC CCTTGGCTGA 60
TGGGACGGCT GGAGAACAGA TGTTCGACGC ATTATCTCGT TATGCAGATA TTTCAGGATG 120
CATAGCATTG ACAAATGCTC ATACAAAAGC CCCTGTTTTA TATGAAGAGT TGTAAAAATT 180
GTCGTGTCGT TTAGCGGAAA GTTTTAAAAA GTATGGATTA AAACAAAACG ACACAATAGC 240
GGTGTGTAGC GAAAATGGTT TGCAATTTTT CCTTCCTGTA ATTGCATCAT TGTATCTTGG 300
AATAATTGCA GCACCTGTTA GTGATAAATA CGTTGAACGT GAATTAATAC ACAGTCTTGG 360
TATTGTAAAA CCACGCATAA TTTTTTGCTC CAAGAATACT TTTCAAAAAG TACTGAATGT 420
AAAATCTAAA TTAATAATATG TAGAAACTAT TATTATATTA GACTTAAATG AAGACTTAGG 480
AGGTTATCAA TGCCTCAACA ACTTTATTTT TCAAAATTCC GATAGTAATC TGGACGTAAA 540
AAAATTTAAA CCAAATTCCT TTAATCGAGA CGATCAGGTT GCGTTGGTAA TGTTTTCTTC 600
TGGTACAACCT GGTGTTTCGA AGGGAGTCAT GCTAACTCAC AAGAATATTG TTGCACGATT 660
TTCTCTTGA AAAGATCCTA CTTTTGGTAA CGCAATTAAT CCAACGACAG CAATTTTAAC 720
GGTAATACCT TTCCACCATG GTTTTGGTAT GATGACCACA TTAGGATACT TTACTTGTGG 780
ATTCOGAGTT GTCTAATGC ACACGTTTGA AGAAAACTA TTTCTACAAT CATTACAAGA 840
TTATAAAGTG GAAAGTACTT TACTTGTACC AACATTAATG GCATTTCTTG CAAAAAGTGC 900
ATTAGTTGAA AAGTACGATT TATCGCACTT AAAAGAAATT GCATCTGGTG GCGCACCTTT 960
ATCAAAAGAA ATTGGGGAGA TGGTGAAAAA ACGGTTTAAA TTAAACTTTG TCAGGCAAGG 1020
GTATGGATTA ACAGAAACCA CTTCGGCTGT TTTAATTACA CCGAACxxx xCGAGACC 1080
GGGATCAACT GGTAAAATAG TACCATTTC ACGTGTTAAA GTTGTCGATC CTACAACAGG 1140
AAAAATTTTG GGGCCAAATG AACTGGAGA ATTGTATTTT AAAGGCGCCA TGATAATGAA 1200
GGGTATTAT AATAATGAAG AAGCTACTAA AGCAATTATT GATAAAGACG GATGGTTGCG 1260
CTCTGGTGAT ATTGCTTATT ATGACAATGA TGGCCATTTT TATATTGTGG ACAGGCTGAA 1320
GTCATTAATT AAATATAAAG GTTATCAGGT TGCACCTGCT GAAATTGAGG GAATACTCTT 1380
ACAACATCCG TATATTGTTG ATGCGGGCGT TACTGGTATA CCGGATGAAG CCGCGGGCGA 1440
GCTTCCAGCT GCAGGTGTTG TAGTACAGAC TGGAAAATAT CTAAACGAAC AAATCGTACA 1500
AAATTTTGT TCCAGTCAAG TTTCAACAGC CAAATGGCTA CGTGGTGGGG TGAAATTTTT 1560
GGATGAAATT CCCAAAGGAT CAACTGGAAA AATTGACAGA AAAGTGTTAA GACAAATGTT 1620
TGAAAAACAC ACCAATGGG
1639

```

FIG. 35

luc78-0B10 (SEQ ID NO:19)

		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	S	G	C		40
I	A	L	T	N	A	H	T	K	E	N	V	L	Y	E	N	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	I	S	E	N	G	L	Q	F	F	L	P	V	I	A	S	L	Y	L	G		100
I	V	K	A	P	R	I	S	D	K	Y	I	E	R	E	L	H	S	L	G		120
K	S	K	L	K	E	V	F	C	S	I	N	T	F	Q	K	V	L	N	V		140
G	Y	Q	C	L	N	N	F	I	S	I	I	L	D	L	N	E	D	L	G		160
K	F	K	P	X	S	F	N	R	D	Q	V	H	A	E	N	L	D	V	K		180
G	T	T	G	V	P	K	G	V	M	L	T	H	K	N	V	M	F	S	S		200
S	L	A	K	D	P	T	F	G	N	A	I	N	P	T	I	A	I	L	T		220
V	I	P	F	H	H	G	F	G	M	M	T	T	L	G	T	A	I	C	G		240
F	R	V	Y	L	M	H	T	F	E	E	K	L	F	L	Q	S	T	Q	D		260
Y	K	V	E	S	T	L	L	V	P	T	L	M	A	F	L	A	K	S	A		280
L	V	E	K	Y	D	L	S	H	L	K	R	I	A	S	G	A	P	L		300	
S	K	E	I	G	E	M	V	K	K	R	F	K	L	N	F	V	R	Q	G		320
Y	G	L	T	E	T	T	S	A	V	L	I	T	P	K	Q	D	A	R	P		340
G	S	T	G	K	I	V	P	F	H	A	V	K	V	V	D	P	T	T	G		360
K	I	L	G	P	N	E	P	G	E	L	Y	I	F	K	A	M	I	M	K		400
Q	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	A	H	F	I	V	D	R	L	K		440
S	L	I	K	Y	K	G	Y	Q	V	A	T	G	I	I	E	G	I	L	L		460
Q	H	P	A	S	V	V	A	G	V	T	G	K	Y	L	N	Q	A	I	V		480
L	P	A	S	S	Q	V	V	Q	T	A	K	W	L	R	G	V	K	F		500	
D	E	F	I	P	K	G	S	T	G	I	D	R	K	V	L	R	Q	M	F		520
E	K	H	T	N	G																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 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 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 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 V 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 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	GCAGATAAAA	ATATTTTATA	TGGGCCCGAA	CCATTTTATC	CCTTGGCTGA	60
TGGGACGGCT	GGAGAACAGA	TGTTTTACGC	ATTATCTCGT	TATGCAGATA	TTCCGGGCTG	120
CATAGCATTG	ACAAATGCTC	ATACAAAAGC	CCCTGTTTAA	TATGAAGAGT	TTTTAAAATT	180
GTCGTGTCGT	TTAGCGGAAA	GTTTTAAAAA	GTATGGATTA	AAACAAAACG	ACACAATAGC	240
GGTGTGTAGC	GAAAATGGTT	TGCAATTTTT	CCTTCCTGTA	ATTGCATCAT	TGTATCTTGG	300
AATAATTGTG	GCACCTGTTA	ACGATAAATA	CATTGAACGT	GAATTAATAC	ACAGTCTTGG	360
TATTGTAAAA	CCACGCATAG	TTTTTTGCTC	CAAGAATACT	TTTCAAAAAG	TACTGAATGT	420
AAAAATCTAAA	TTAAAATCTG	TAGAAACTAT	TATTATATTA	GACTTAAATG	AAGACTTAGG	480
AGGTATCAAA	TGCCTCAACA	ACTTTATTTT	TCAAAATTCC	GATATTAATC	TTGACGTAAA	540
AAAAATTAAAA	CCATATTCTT	TTAATCGAGA	CGATCAGGTT	GCGTTGATTA	TGTTTTCTTC	600
TGGTACAACCT	GCTCTGCCGA	AGGGAGTCAT	GCTAACTCAC	AAGAATATTG	TTGCACGATT	660
TTCTCTTQCA	AAAGATCCTA	CTTTTGGTAA	CGCAATTAAAT	CCGACGACAG	CAATTTTAAC	720
GGTAATACCT	TTCCACCATG	GTTTTGGTAT	GATGACCACA	TTAGGATACT	TTACTTGTGG	780
ATTCCGAGTT	GTTCTAATGC	ACACGTTTTGA	AGAAAAACTA	TTTCTACAAT	CATTACARGA	840
TTATAAAGTG	GAAAGTACTT	TACTTGTACC	AACATTAATG	GCATTTCTTG	CAAAAAGTGC	900
ATTAGTTGAA	AAGTACGATT	TATCGCACTT	AAAAGAAATT	GCATCTGGTG	GCGCACCTTT	960
ATCAAAAGAA	ATTGGGGAGA	TGGTGAAAAA	ACGGTTTAAA	TTAAACTTTG	TCAGGCAAGG	1020
GTATGGATTA	ACAGAAACCA	CTTOGGCTGT	TTTAATTACA	CCGAAA	CCGACGACC	1080
GGGATCAACT	GGTAAAATAG	TACCATTTC	CGCTGTTAAA	GTTGTGATC	CTACAACAGG	1140
AAAAATTTTG	GGGCCAAATG	AACTGGGAGA	ATTGTATTTT	AAAGGCCCGA	TGATAATGAA	1200
GGGTATTAT	AATAATGAAG	AAGCTACTAA	AGCAATTATT	GATAATGACG	GATGGTTGCG	1260
CTCTGGTGAT	ATTGCTTATT	ATGACAATGA	TGGCCATTTT	TATATTGTGG	ACAGGCTGAA	1320
GTCATTAATT	AAATATAAAG	GTTATCAGGT	TGCACCTGCT	GAAATTGAGG	GAATACTCTT	1380
ACAACATCCG	TATATTGTTG	ATGCCGGCGT	TACTGGTATT	CCGGATGAAG	CCGCGGGCGA	1440
GCTTCCAGCT	GCAGGTGTTG	TAGTACAGAC	TGGAATAAT	CTAAACGAAC	AAATCGTACA	1500
AAATTTTGTT	TCCAGTCAAG	TTTCAACAGC	CRAATGGCTA	CGTGGTGGGG	TGAAATTTTT	1560
GGATGAAATT	CCCAAAGGAT	CAACTGGAAA	AATTGACAGA	AAAGTGTTAA	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 Y I A S L Y L G 100
I I Y 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	GCAGATAAGA	ATATTTTATA	TGGGCCCGAA	CCATTTTATC	CCTTGGAAAG	60
TGGGACGGCT	GGAGAACAGA	TGTTTQACGC	ATTATCTCGT	TATGCAGATA	TTCCGGGCTG	120
CATAGCATTG	ACAAATGCTC	ATACAAAAGA	AAATGTTTTA	TATGAAGAGT	TTCTGAAACT	180
GTCGTGTCGT	TTAGCGGAAA	GTTTTAAAAA	GTATGGATTA	AAACAAAACG	ACACAATAGC	240
GGTGTGTAGC	GAAAATGGTC	TGCAATTTTT	CCTTCCTGTA	ATTGCATCAT	TGTATCTTGG	300
AATAATTGTG	GCACCTGTTA	ACGATAAATA	CATTGAACGT	GAATTAATAC	ACAGTCTTGG	360
TATTGTAAAA	CCACGCATAG	TTTTTTGCTC	CAAGAATACT	TTTCAAAAAG	TACTGAATGT	420
AAAATCTAAA	TTAAATCTTA	TGAAACTAT	TATTATATTA	GACTTAAATG	AAGACTTAGG	480
AGGTTATCAA	TGCCTCAACA	ACTTTATTTT	TCAAAATTCC	GATAGTAATC	TGGACGTAAA	540
AAAATTTAAA	CCAATATCTT	TAAATOGAGA	CGATCAGGTT	GCGTGGATTA	TGTTTTCTTC	600
TGGTACAAC	GGTCTGCGGA	AGGGAGTCAT	GCTAACTCAC	AAGAATATTG	TTGCACGATT	660
TTCTCTTGCA	AAAGATCCCT	CTTTGGGTAA	CGCAATTAAT	CCCAACGACG	CAATTTTAAC	720
GGTAATACCT	TTCCACCATG	GTTTGGGTAT	GATGACCACA	TTAGGATACT	TTACTTGTGG	780
ATTCOGAGTT	GTTCTAATGC	ACACGTTTGA	AGAAAACTA	TTTCTACAAT	CATTACAAGA	840
TTATAAAGTG	GAAAGTACTT	TACTTGATACC	AACATTAAATG	GCATTTCTTG	CAAAAAGTGC	900
ATTAGTTGAA	AAGTACGATT	TATCGCACTT	AAAAGAAATT	GCATCTGGTG	GCGCACCTTT	960
ATCAAAAGAA	ATTGGGGAGA	TGGTGAAGAA	ACGGTTTAAA	TTAACTTTTG	TCAGGCAAGG	1020
GTATGGATTA	ACAGAAACCA	CTTCGGCTGT	TTTAATTACA	CCGAAGGGTG	ACGCCAAGCC	1080
GGGATCAACT	GGTAAATAG	TACCATTTC	CGCTGTTAAA	GTTGTGATC	CTACAACAGG	1140
AAAAATTTTG	GGGCCAAATG	AACCTGGAGA	ATTGTATTTT	AAAGGCCCGA	TGATAATGAA	1200
GGGTTATTAT	AATAATGAAG	AAGCTACTAA	AGCAATTATT	GATAATGACG	GATGGTTGCG	1260
CTCTGGTGAT	ATTGCTTATT	ATGACAATGA	TGGCCATTTT	TATATTGTGG	ACAGGCTGAA	1320
GTCACTGATT	AAATATAAAG	GTTATCAGGT	TGCACCTGCT	GAAATTGAGG	GAATACTCTT	1380
ACAACATCCG	TATATTGTTG	ATGCCGGCGT	TACTGGTATA	CCGGATGAAG	CCGCGGGCGA	1440
GCTTCCAGCT	GCAGGTGTTG	TAGTACAGAC	TGGAAAATAT	CTAAACGAAC	AAATCGTACA	1500
AGATTATGTT	GCCAGTCAAG	TTTCAACAGC	CAAAATGGCTA	CGTGGTGGGG	TGAAATTTTT	1560
GGATGAAATT	CCCAAAGGAT	CAACTGGAAA	AATTGACAGA	AAAGTGTTAA	GACAAATGTT	1620
TGAAAAACAC	ACCAATGGG					1639

FIG. 42

Luc90-1B5 (SEQ ID NO:24)

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

FIG. 43

lucPpe2 [T249M] (SEQ ID NO:12)

GGATCCAATG	GAAGATAAAA	ATATTTTATA	TGGACCTGAA	CCATTTTATC	CCTTGGCTGA	60
TGGGACGGCT	GGAGAACAGA	TGTTTTACGC	ATTATCTCGT	TATGCAGATA	TTTCAGGATG	120
CATAGCATTG	ACAAATGCTC	ATACAAAAGA	AAATGTTTTA	TATGAAGAGT	TTTTAAAATT	180
GTCGTGTCGT	TTAGCGGAAA	GTTTTAAAAA	GTATGGATTA	AAACAAAACG	ACACAATAGC	240
GGTGTGTAGC	GAAAATGGTT	TGCAATTTTT	CCTTCCTTTA	ATTGCATCAT	TGTATCTTGG	300
AATAATTGCA	GCACCTGTTA	GTGATAAATA	CATTGAACGT	GAATTAATAC	ACAGTCTTGG	360
TATTGTAAAA	CCACGCATAA	TTTTTTGTTC	CAAGAATACT	TTTCAAAAAG	TACTGAATGT	420
AAAATCTAAA	TTAAAATATG	TAGAAACTAT	TATTATATTA	GACTTAAATG	AAGACTTAGG	480
AGGTTATCAA	TGCCTCAACA	ACTTTATTTT	TCAAAATTCC	GATATTAATC	TTGACGTAAA	540
AAAATTTAAA	CCAAATTCCT	TTAATCGAGA	CGATCAGGTT	GCGTTGGTAA	TGTTTTCTTC	600
TGGTACAAC	GGTGTTCGTA	AGGGAGTCAT	GCTAACTCAC	AAGAATATTG	TTGCACGATT	660
TTCTCATTCG	AAAGATCCTA	CTTTTGGTAA	CGCAATTAAT	CCAACGACAG	CAATTTTAAC	720
GGTAATACCT	TTCCACCATG	GTTTTGGTAT	GATGACCACA	TTAGGATACT	TTACTTGTGG	780
ATTCCGAGTT	GCTCTAATGC	ACACGTTTGA	AGAAAACTA	TTTCTACAAT	CATTACAAGA	840
TTATAAAGTG	GAAAGTACTT	TACTTGTACC	AACATTAATG	GCATTTTTTG	CAAAAAGTGC	900
ATTAGTTGAA	AAGTACGATT	TATCGCACTT	AAAAGAAATT	GCATCTGGTG	GCGCACCTTT	960
ATCAAAAGAA	ATTGGGGAGA	TGGTGAAAAA	ACGGTTTAAA	TTAAACTTTG	TCAGGCAAGG	1020
GTATGGATTA	ACAGAAACCA	CTTCGGCTGT	TTTAATTACA	CCGGACACTG	ACGTCAGACC	1080
GGGATCAACT	GGTAAAAATG	TACCATTTCA	CGCTGTTAAA	GTTGTCGATC	CTACAACAGG	1140
AAAAATTTTG	GGGCCAAATG	AAACTGGAGA	ATTGTATTTT	AAAGGCGACA	TGATAATGAA	1200
AAGTTATTAT	AATAATGAAG	AAGCTACTAA	AGCAATTATT	AACAAAGACG	GATGGTTGCG	1260
CTCTGGTGAT	ATTGCTTATT	ATGACAATGA	TGGCCATTTT	TATATTGTGG	ACAGGCTGAA	1320
GTCATTAAAT	AAATATAAAG	GTTATCAGGT	TGCACCTGCT	GAAATTGAGG	GAATACTCTT	1380
ACAACATCCG	TATATTGTTG	ATGCCGGCGT	TACTGGTATA	CCGGATGAAG	CCGCGGGCGA	1440
GCTTCCAGCT	GCAGGTGTTG	TAGTACAGAC	TGGAAAATAT	CTAAACGAAC	AAATCGTACA	1500
AAATTTTGTT	TCCAGTCAAG	TTTCAACAGC	CAAATGGCTA	CGTGGTGGGG	TGAAATTTTT	1560
GGATGAAATT	CCCAAAGGAT	CAACTGGAAA	AATTGACAGA	AAAGTGTTAA	GACAAATGTT	1620
TGAAAAACAC	AAATCTAAGC	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 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 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 TGGTTGGCGA CGAATCGCTT TCCTATAAAG AGTTTTTTGA AGCGACAGTC
CTCCTAGCGC AAAGTCTCCA CAATTGTGGA TACAAGATGA ATGATGTAGT GTCGATCTGC
GCCGAGAATA ATACAAGATT TTTTATTCCC GTTATTGCAG CFTGGTATAT TGGTATGATT
GTAGCACCTG TTAATGAAAG TTACATCCCA GATGAACTCT GTAAGGTGAT GGGTATATCG
AAACCACAAA TAGTTTTTAC GACAAAGAAC ATTTTAAATA AGGTATTGGA GGTACAGAGC
AGAACTAATT TCATAAAAAG GATCATCATA CTTGATACTG TAGAAAACAT ACACGGTTGT
GAAAGTCTTC CCAATTTTAT TTCTCGTTAT TCGGATGGAA ATATTGCCAA CTTCAAACCT
TTACATTTCG ATCCTGTTGA GCAAGTGGCA GCTATCTTAT GTTCGTCAGG CACTACTGGA
TTACCGAAG GTGTAATGCA AACTCACCAA AATATTGTG TCCGACTTAT ACATGCTTTA
GACCCACGGG CAGGAACGCA ACTTATTCCT GGTGTGACAG TCTTAGTATA TCTGCCTTTT
TTCCATGCTT TTGGGTTCTC TATAACCTTG GGATACTTCA TGGTGGGTCT TCGTGTATC
ATGTTGAGAC GATTTGATCA AGAAGCATT CTAAAAGCTA TTCAGGATTA TGAAGTTGGA
AGTGTAAATTA ACGTTCCATC AGTAATATTG TTCTTATCGA AAAGTCCTTT GGTGACAAA
TACGATTTAT CAAGTTTAAAG GGAATTGTGT TCGGTTGCGG CACCATTAGC AAAAGAAGTT
GCTGAGGTTG CAGCAAAACG ATTAAACTTG CCAGGAATTC GCTGTGGATT TGGTTTGACA
GAATCTACTT CAGCTAATAT ACACAGTCTT AGGGATGAAT TTAAATCAGG ATCACTTGGA
AGAGTTACTC CTTTAATGGC AGCTAAAATA GCAGATAGGG AAAGTGGTAA AGCATTGGGA
CCAATCAAG TTGGTGAATT ATGCATTAAA GGTCCCATGG TATCGAAAGG TTACGTGAAC
AATGTAGAAG CTACCAAGA AGCTATTGAT GATGATGGTT GGCTTCACTC TGGAGACTTT
GGATACTATG ATGAGGATGA GCATTTCTAT GTGGTGGACC GTTACAAGGA ATTGATTAAA
TATAAGGGCT CTCAGGTAGC ACCTGCAGAA CTAGAAGAGA TTTTATTGAA AAATCCATGT
ATCAGAGATG TTGCTGTGGT TGGTATTCCT GATCTAGAA GCTGGAGAACT GCCATCTGCG
TTTGTGGTTA AACAGCCCGG AAAGGAGATT ACAGCTAAAG AAGTGTACGA TTATCTTGCC
GAGAGGGTCT CCCATACAAA GTATTTCGT GGAGGGGTTC GATTCGTTGA TAGCATACCA
AGGAATGTTA CAGGTAAAAT TACAAGAAAG GAACTTCTGA AGCAGTTGCT GGAGAAGCGC
GGAGGT

```

FIG. 47

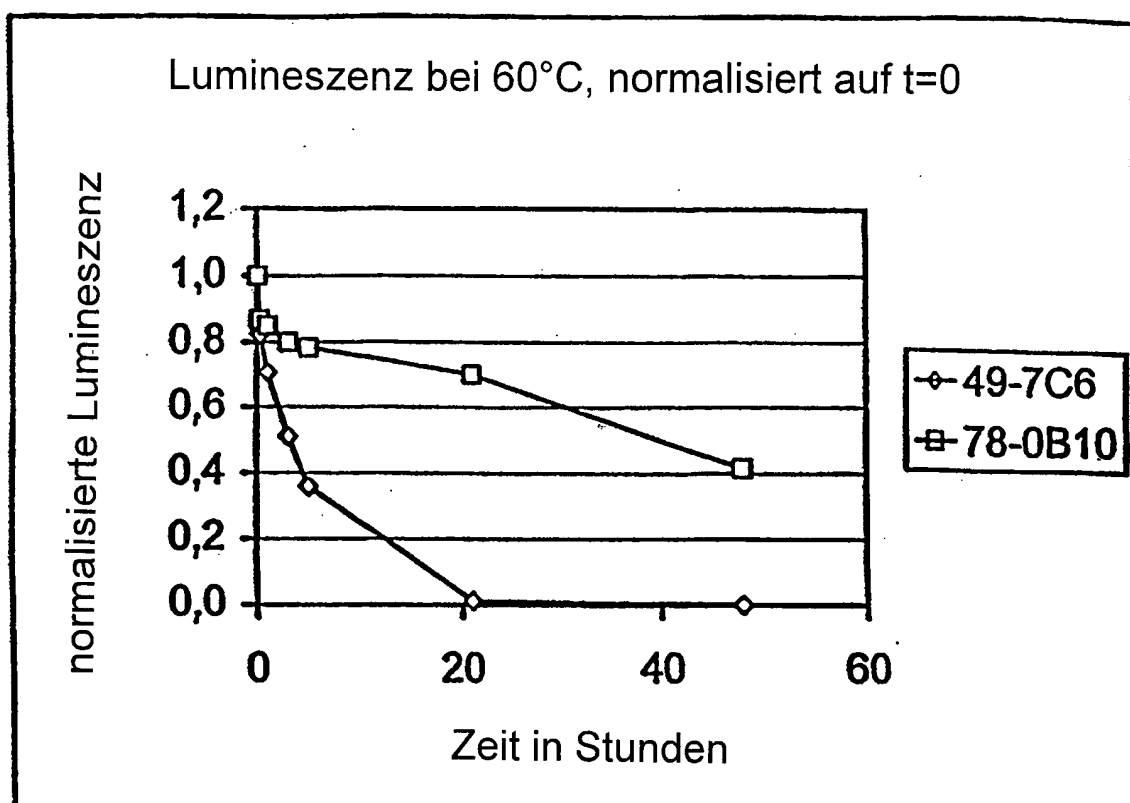


FIG. 48

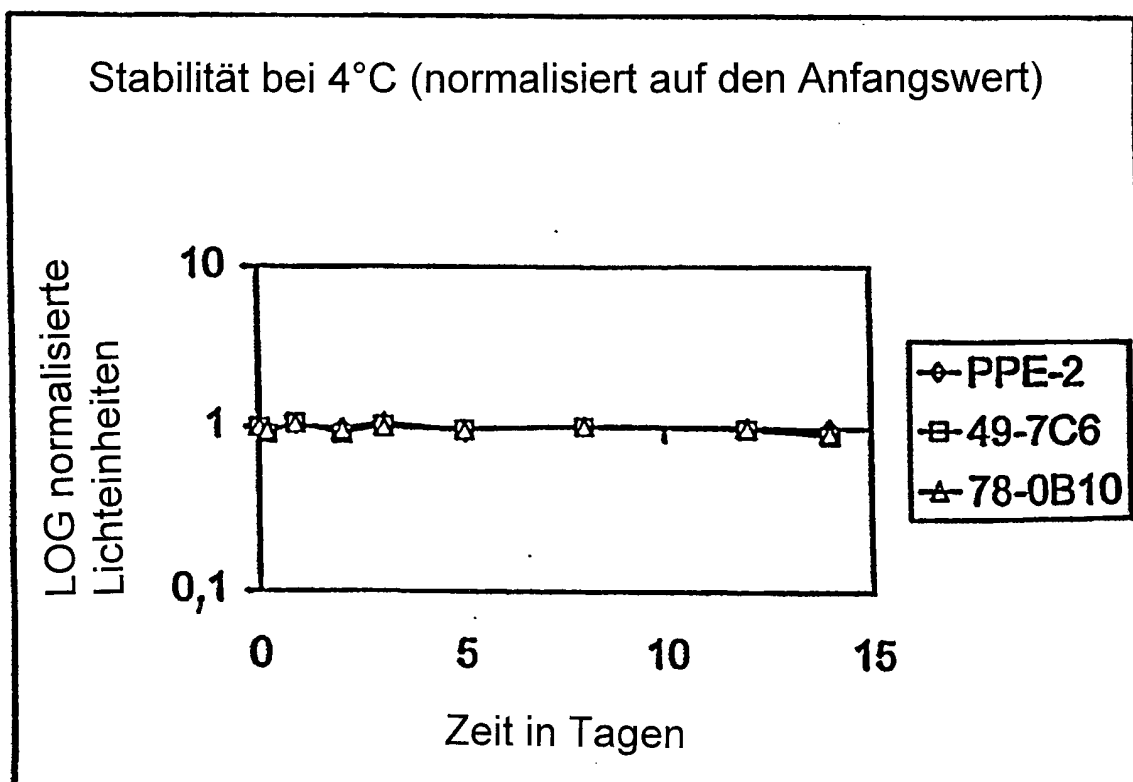


FIG. 49

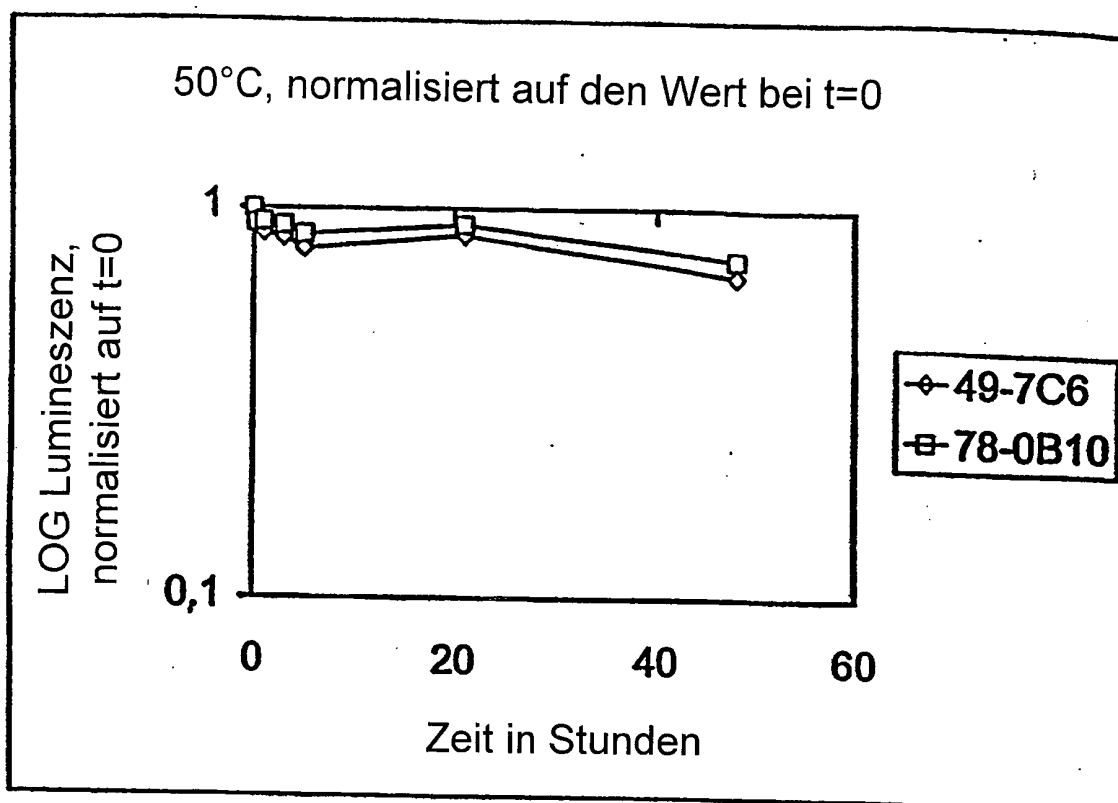


FIG. 50

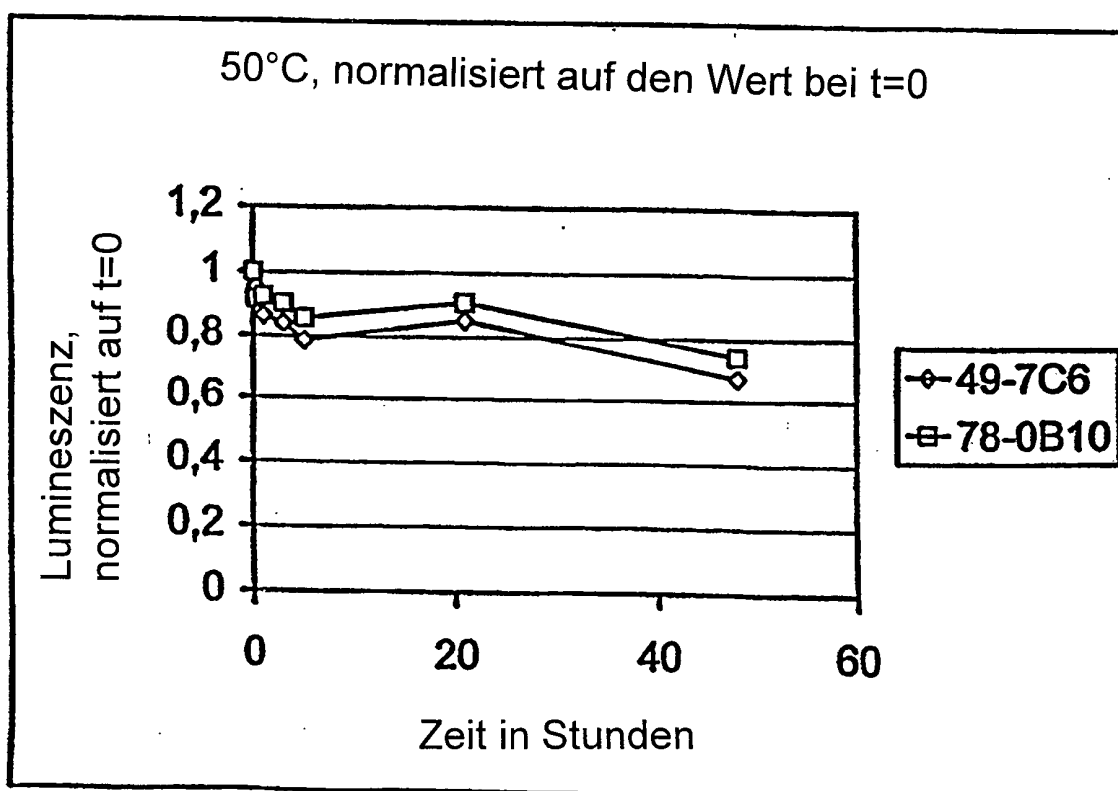


FIG. 51

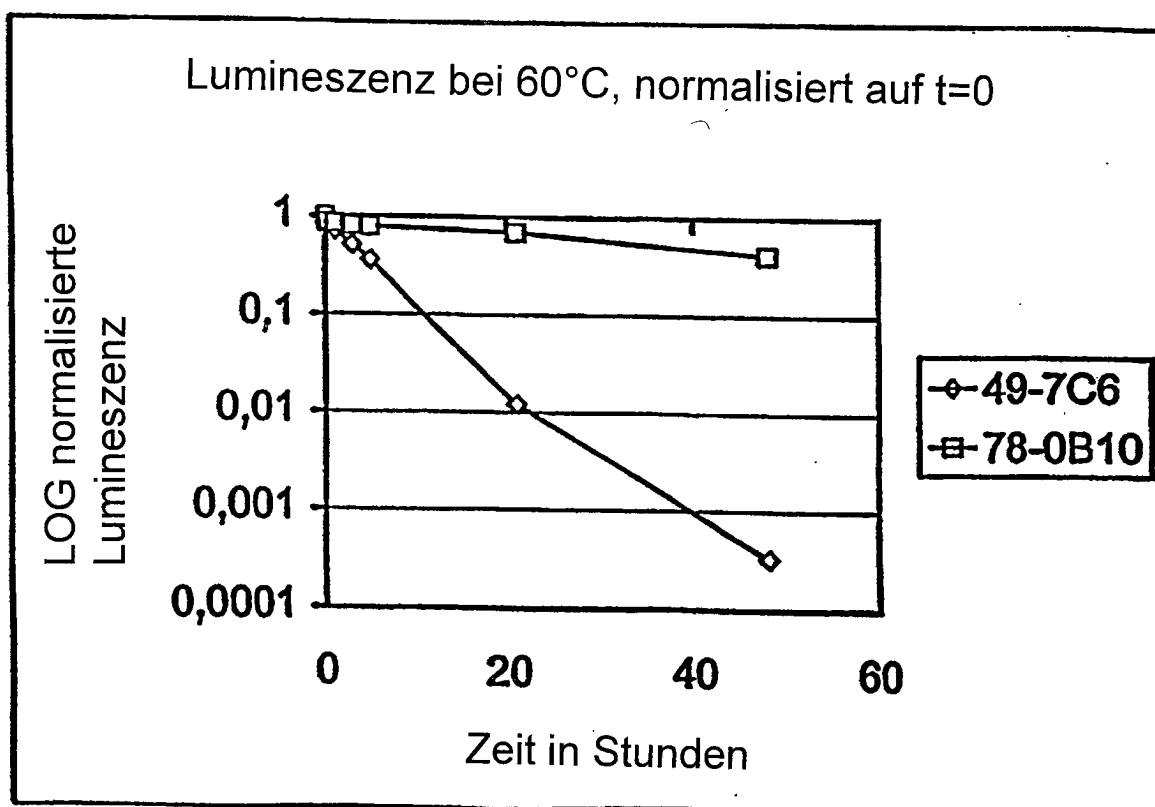


FIG. 52

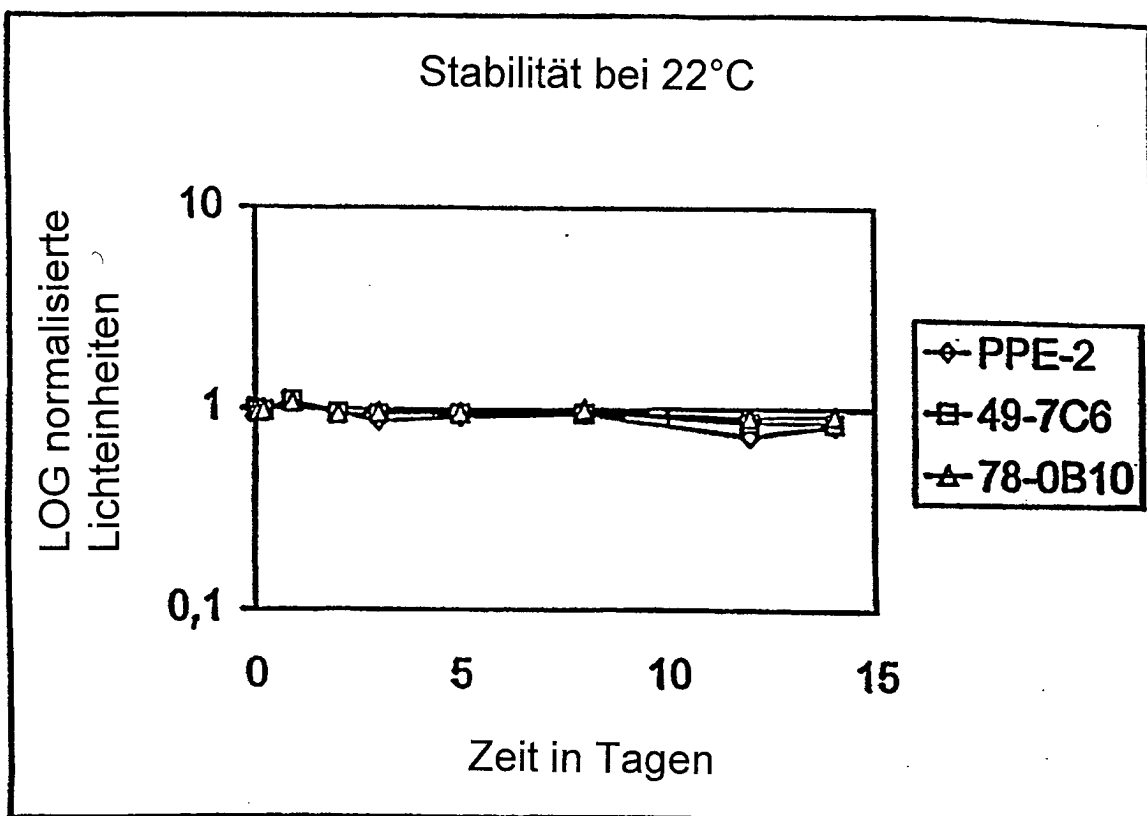


FIG. 53

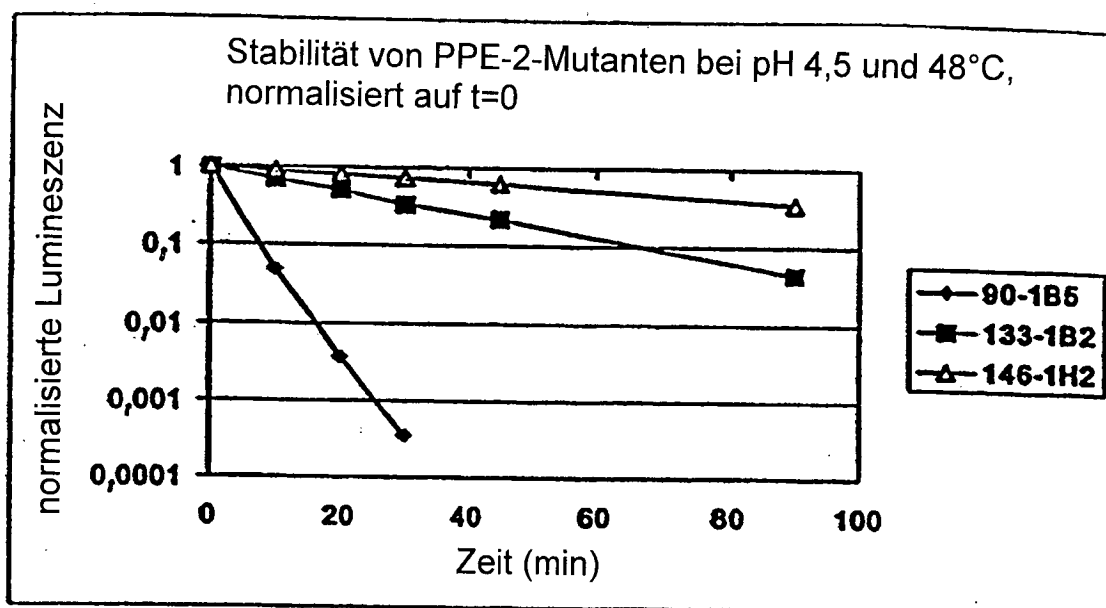


FIG. 54A

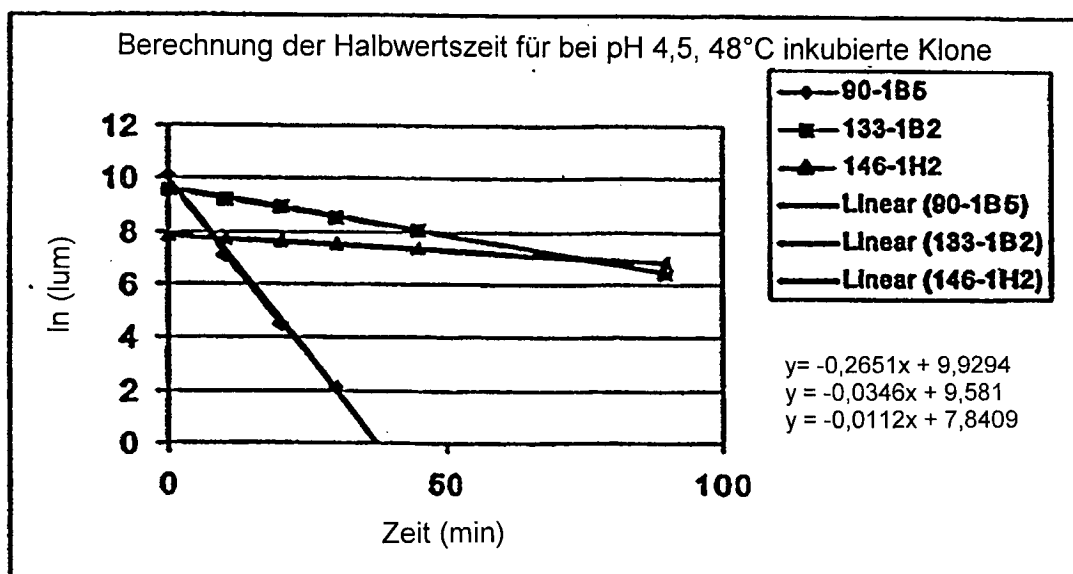


FIG. 54B

Luc133-1B2 (SEQ ID NO:42)

```

AGATCCAATG GCAGATAAGA ATATTTTATA TGGGCGCGAA CCATTTTATC CCTTGGAAAG 60
TGGGACGGCT GGAGAACAGA TGTTTGACGC ATTATCTCGT TATGCAGATA TTCCGGGCTG 120
CATAGCATTG ACAAATGCTC ATACAAAAGA AAATGTTTTA TATGAAGAGT TTCTGAAACT 180
GTCGTGTGCT TTAGCGGAAA GTTTTAAAAA GTATGGATTA AAACAAAACG ACACAATAGC 240
GGTGTGTAGC GAAAATAGTC TGCAATTTT CCTTCCTGTA ATTGCATCAT TGTATCTTGG 300
AATAATTGTG GCACCTGTTA ACGATAAATA CATGGAACGT GAATTAATAC ACAGTCTTGG 360
TATTGTAAAA CCACGCATAG TTTTGTGCTC CAAGAATACT TTTCAAAAAG TACTGAATGT 420
AAAATCTAAA TTAAATCTA TTGAAACTAT TATTATATTA GACTTAAATG ATGACTTAGG 480
AGGTTATCAA TGCCTCAACA ACTTTATTTT TCAAAATTCC GATAGTAATC TGGACGTAAA 540
AAAATTTAAA CCAATTCTTT TTAATCGAGA CGATCAGGTT GCGTTGATTA TGTTTCTTTC 600
TGGTACAACCT GGTCTGCGGA AGGGAGTCAT GCTAACTCAC AAGAATATTG TTGCAOGATT 660
TTCTATTGCA AAAGATCCTA CTTTTGGTAA CGCAATTAAT CCACGTCAG CAATTTTAAC 720
GGTAATACTT TTCCACCATG GTTTTGGTAT GATGACCACA TTAGGATACT TTACTTGTGG 780
ATTCCGAGTT GTTCTAATGC ACACGTTTGA AGAAAACTA TTTCTACAAT CATTACAAGA 840
TTATAAAGTG GAAAGTACTT TACTTGTAAC AACATTAATG GCATTTCTTG CAAAAAGTGC 900
ATTAGTTGAA AAGTACGATT TATCGCACTT AAAAGAAATT GCATCTGGTG GCGCACCTTT 960
ATCAAAAGAA ATTGGGGAGA TGGTGAAAAA ACGGTTTAAA TTAAACTTTG TCAGGCAAGG 1020
GTATGGATTA ACAGAAACCA CTTCGGCTGT TTTAATTACA CCGAAAGGTG ACGCCAGACC 1080
GGGATCAACT GGTAAATAG TACCATTTCA CGCTGTTAAA GTTGTGATC CTACAACAGG 1140
AAAAATTTTG GGGCCAAATG AAQCTGGAGA ATTGTATTTT AAAGGCCCGA TGATAATGAA 1200
GGGTATTAT AATAATGAAG AAGCTACTAA AGCAATTATT GATAATGACG GATGGTTGCG 1260
CTCTGGTGAT ATTGCTTATT ATGACAATGA TGGCCATTTT TATATTGTGG ACAGGCTGAA 1320
GTCACTGATT AAATATAAAG GTTATCAGGT TGCACCTGCT GAAATTGAGG GAATACTCTT 1380
ACAACATCCG TATATTGTTG ATGCGGCGT TACTGGTATA CCGGATGAAG CCGCGGGCGA 1440
GCTTCCAGCT GCAGGTGTTG TAGTACAGAC TGGAAAATAT CTAAACGAAC AAATCGTACA 1500
AGATTATGTT GCGAGTCAAG TTTCAACAGC CAAATGGCTA CGTGGTGGGG TGATATTTTT 1560
GGATGAAATT CCAAAGGAT CAACTGGAAA AATTGACAGA AAAGTGTTAA GACAAATGTT 1620
AGAAAAACAC ACCAATGGG

```

1639

FIG. 55

Luc146-1H2 (SEQ ID NO:43)

```

GGATCCAATG GCAGATAAGA ATATTTTATA TGGGCCCGAA CCATTTTATC CCTTGGGAAGA 60
TGGGACGGCT GGAGAACAGA TGTTTGACGC ATTATCTCGT TATGCAGCTA TTCCGGGCTG 120
CATAGCATTG ACAAATGCTC ATACAAAAGA AAATGTTTTA TATGAAGAGT TTCTGAAACT 180
GTCGTGTCGT TTAGCGGAAA GTTTTAAAAA GTATGGATTA AAACAAAACG ACACAATAGC 240
GGTGTGTAGC GAAAATAGTC TGCAATTTTT CCTTCCTGTA ATTGCATCAT TGTATCTTGG 300
AATAATTGTG GCACCTGTTA ACGATAAATA CATTGAACGT GAATTAATAC ACAGTCTTGG 360
TATTGTAAAA CCACGCATAG TTTTTTGCTC CAAGAATACT TTTCAAAAAG TACTGAATGT 420
AAAATCTAAA TTAAATCTTA TTGAAACTAT TATTATATTA GACTTAAATG AAGACTTAGG 480
AGGTTATCAA TGCCTCAACA ACTTTATTTT TCAAAATTCC GATAGTAATC TGGACGTAAA 540
AAAATTTAAA CCTATTCTT TTAATCGAGA CGATCAGGTT GCGTCCGATTA TGTTTTCTTC 600
TGGTACAAC TGTCTGCCGA AGGGAGTCAT GCTAACTCAC AAGAATATTG TTGCACGATT 660
TTCTATTGCA AAAGATCCTA CTTTTGGTAA CGCAATTAAT CCACGTCAG CAATTTTAAC 720
GGTAATACCT TTCCACCATG GTTTTGGTAT GATGACCACA TTAGGATACT TTACTTGTGG 780
ATTCOGAGTT GTTCTAATGC ACAOGTTTGA AGAAAACTA TTTCTACAAT CATTACAAGA 840
TTATAAAGTG GAAAGTACTT TACTTGTACC AACATTAATG GCATTTCTTG CAAAAAGTGC 900
ATTAGTTGAA AAGTACGATT TATCGCACTT AAAAGAAATT GCATCTGGTG GCGCACCTTT 960
ATCAAAAGAA ATTGGGGAGA TGGTGAAAAA ACGGTTTAAA TTAACTTTG TCAGGCAAGG 1020
GTATGGATTA ACAGAAAACCA CTTCCGGCTGT TTTAATTACA CCGAAGGTG ACGCCABACC 1080
GGGATCAACT GGTAAAATAG TACCATTACA CGCTGTTAAA GTTGTGATC CTACAACAGG 1140
AAAAATTTTG GGGCCAAATG AAGCTGGAGA ATTGTATTTT AAAGGCCCGA TGATAATGAA 1200
GGGTTATTAT AATAATGAAG AAGCTACTAA AGCAATTATT GATAATGACG GATGGTTGCG 1260
CTCTGGTGAT ATTGCTTATT ATGACAATGA TGGCCATTTT TATATTGTGG ACAGGCTGAA 1320
GTCACGTATT AAATATAAAG GTTATCAGGT TGCACCTGCT GAAATTGAGG GAATACTCTT 1380
ACAACATCCG TATATTGTTG ATGCCGGCGT TACTGGTATA COGGATGAAG CCGCGGGCGA 1440
GCTTCCAGCT GCAGGTGTTG TAGTACAGAC TGGAAAATAT CTAAACGAAC AAATCGTACA 1500
AGATTATGTT GCCAGTCAAG TTTCAACAGC CAAATGGCTA CGTGGTGGGG TGAAATTTTT 1560
GGATGAAATT CCCAAGGAT CAACTGGAAA AATTGACAGA AAAGTGTTAA GACAAATGTT 1620
AGAAAAACAC ACCAATGGG

```

FIG. 56

Luc133-1B2 (SEQ ID NO:44)

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

FIG. 57

Luc146-1H2 (SEQ ID NO:45)

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

FIG. 58

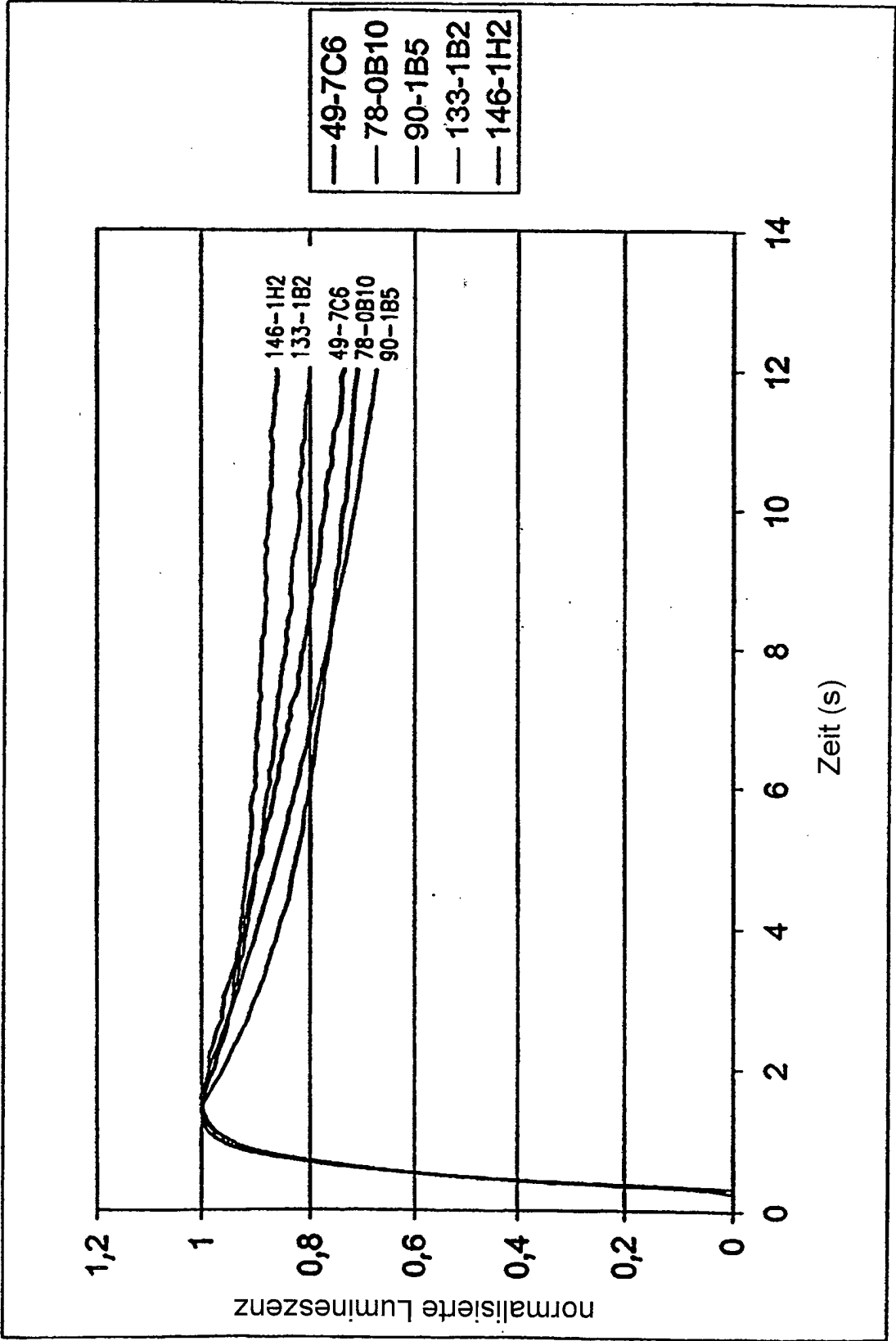


FIG. 59

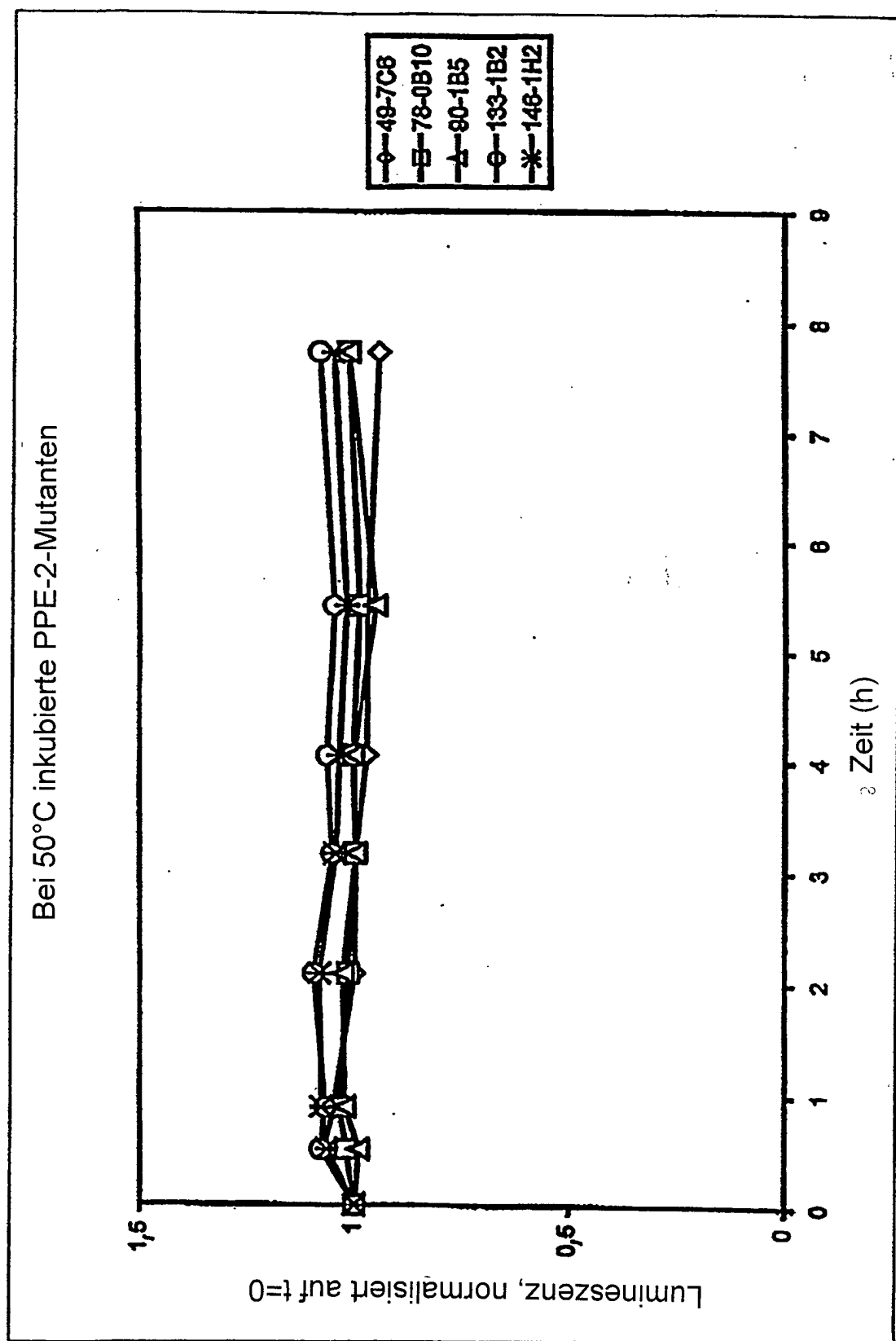


FIG. 60

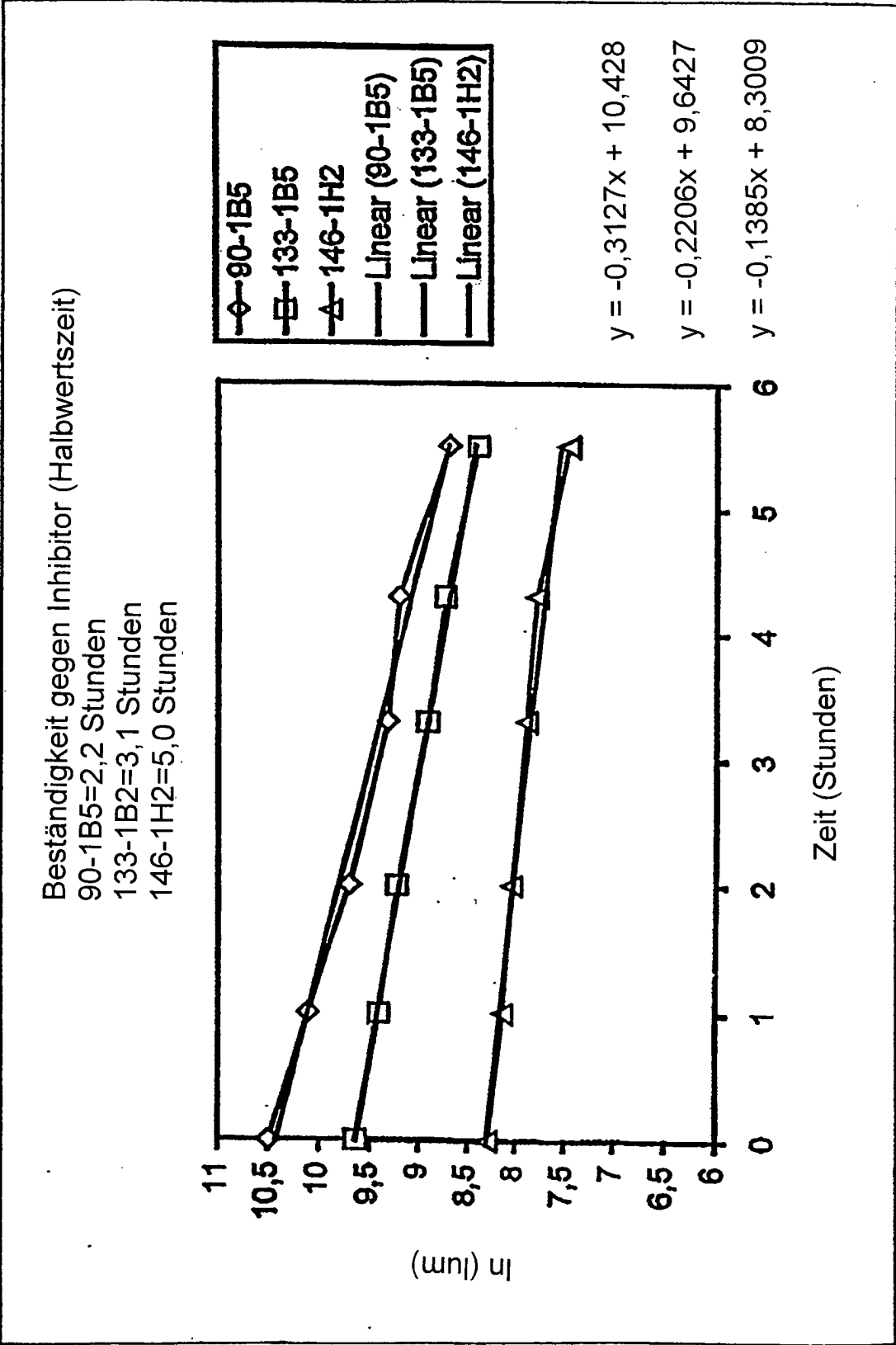


FIG. 61

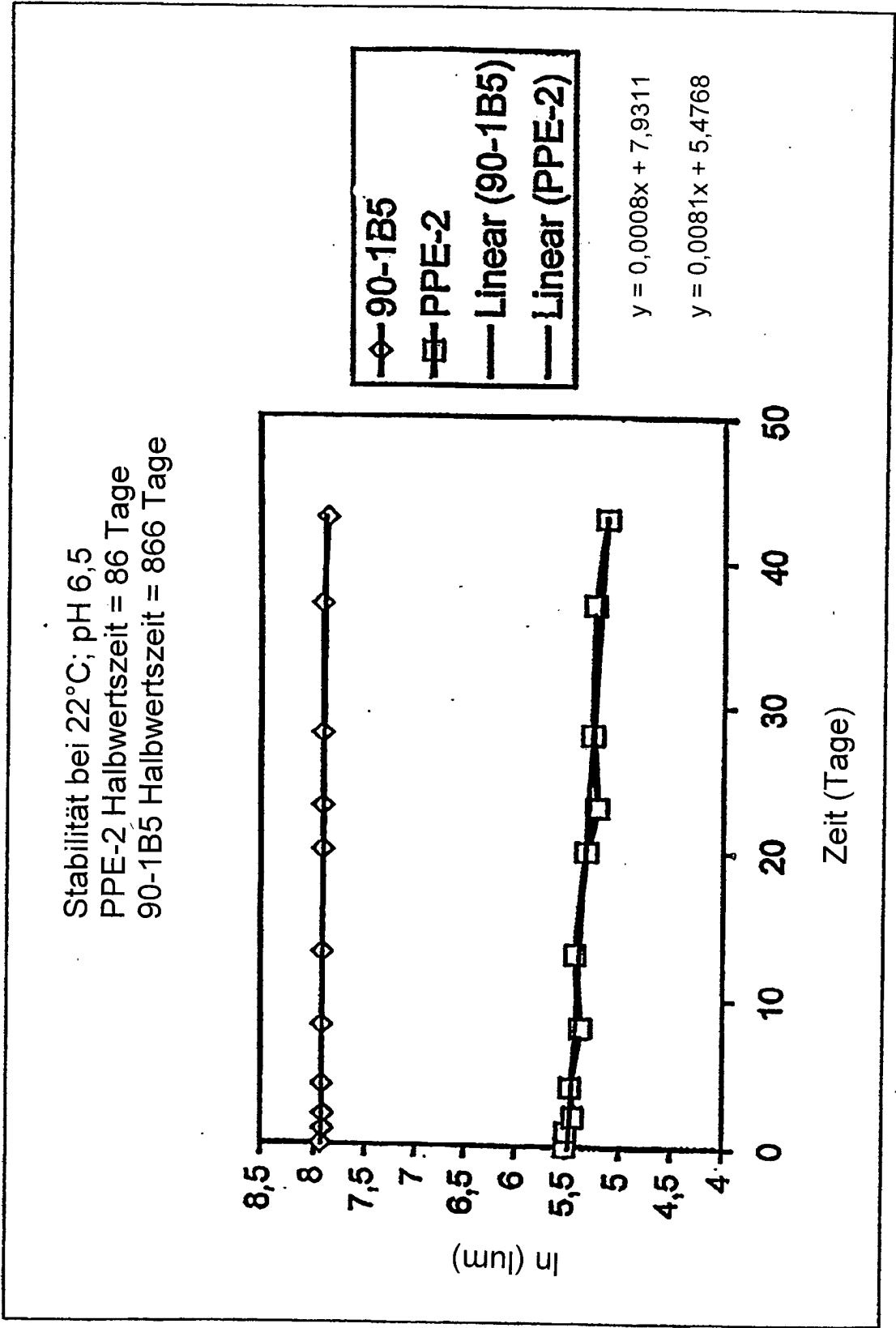


FIG. 62

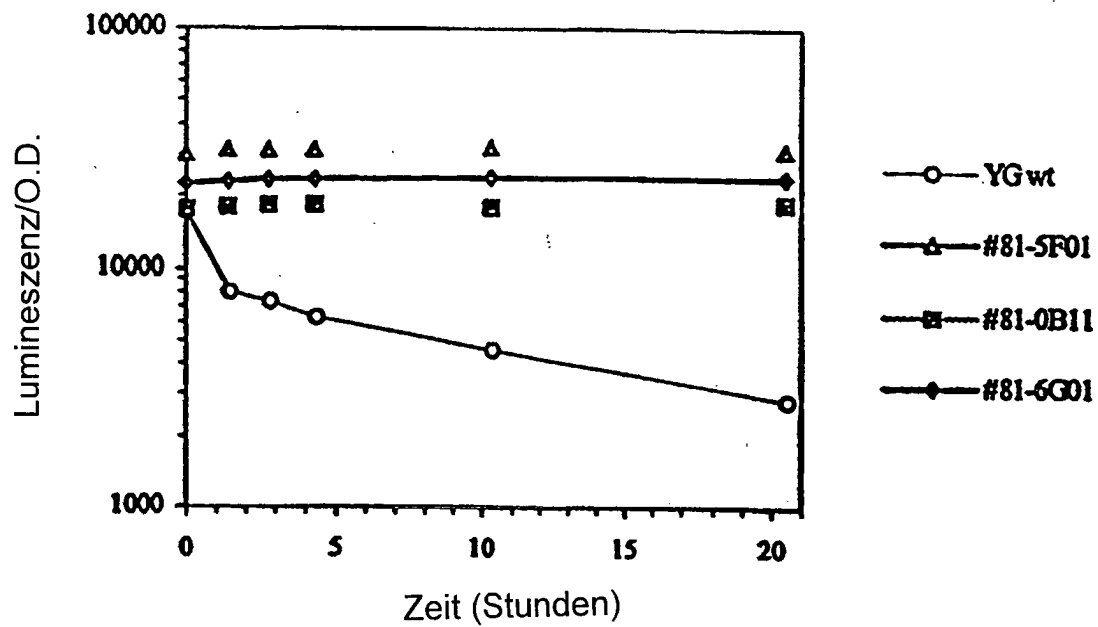


FIG. 63

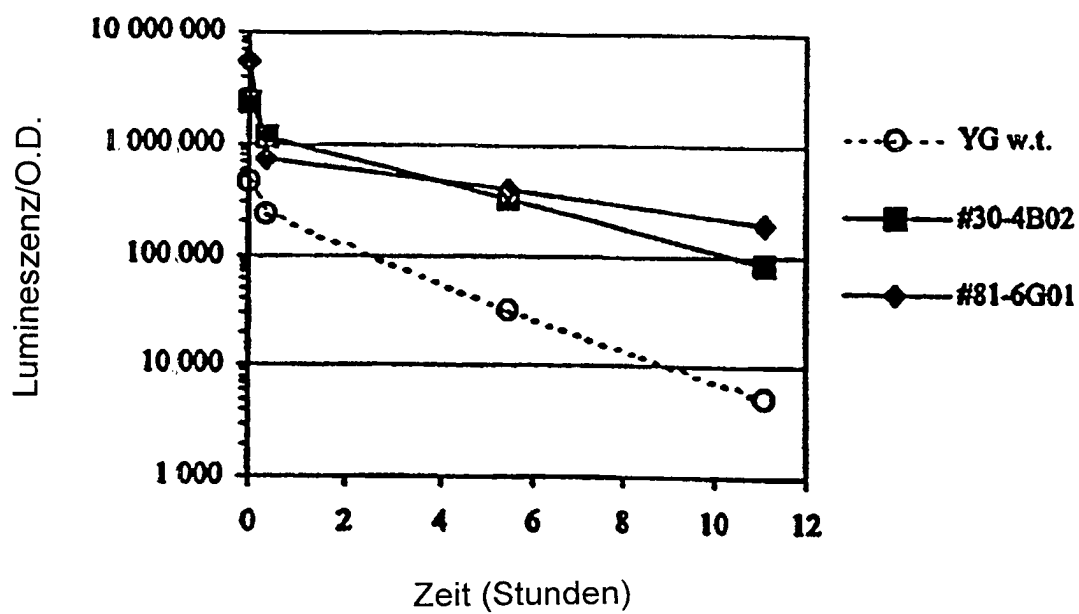


FIG. 64

LucPp181-0B11

```

GGATCCCATG ATGAAGCGAG AGAAAAATGT TATATATGGA CCGAACCCC TACACCCCTT 60
GGAAGACTTA ACAGCTGGAG AAATGCTCTT CCGTCCCTT CGAAACATT CTCATTTACC 120
GCAGGCTTTA GTAGATGTGG TTGGCGACGA ATCGCTTTCC TATAAAGAGT TTTTGAAGC 180
GACAGTCCTC CTAGCGCAAA GTCTCCACAA TTGTGGATAC AAGATGAATG ATGTAGTGTC 240
GATCTGCGCC GAGAATAATA CAAGATTTTT TATCCCGTT ATTGCAGCTT GGTATATTGG 300
TATGATTGTA GCACCTGTTA ATGAAAGTTA CATCCAGAT GAACTCTGTA AGGTCATGGG 360
TATATCGAAA CCACAAATAG TTTTACGAC AAAGAACATT TTAAATAAGG TATTGGAGGT 420
ACAGAGCAGA ACTAATTTCA TAAAAAGGAT CATCGTACTT GATACTGTAG AAAACATACA 480
CGGTTGTGAA AGTCTTCCCA ATTTTATTTT TCGTTATTCTG GATGGAAATA TTGCCAACTT 540
CAACCTTTA CATTTCGATC CTGTAGAGCA AGTGGCAGCT ATCTTATGTT CGTCAGGCAC 600
TACTGGATTA CCGAAAGGTG TAATGCAAAAC TCACCAAAAT ATTTGTGTCC GACTTATACA 660
TGCTTTAGAC CCCAGGGCAG GAACGCAACT TATTCCTGGT GTGACAGTCT TAGTATATCT 720
GCCTTTTTTC CATGCTTTTG GGTCTCTAT AACCTTGGGA TACTTCATGG TGGTCTCTCG 780
TGTTATCATG TCAAGACGAT TTGATCCAGA AGCATTCTTA AAAGCTATTC AGGATTATGA 840
AGTTGGAAGT GTAATTAACG TTCCAACAGT AATATTGTTT TTATCGAAAA GTCCTTTGGT 900
TGACAAATAC GATTTATCAA GTTTAAGGGA ATTGTGTTGC GGTGCGGCAC CATTAGCAAA 960
AGAAGTTGCT GAGGTTGCAG CAAAACGATT AAACCTGCCA GGAATTCGCT GTGGATTGTTG 1020
TTTGACAGAA TCTACTTCAG CTAATATACA CAGTCTTAGG GATGAATTTA AACCAAGGATC 1080
ACTTGAAGA GTTACTCCTT TAATGGCAGC TAAAATAGCA GATAGGAAA CTGGTAAAGC 1140
ATTGGGACCA AATCAAGTTG GTGAATTATG CATTAAAGGT CCCATGGTAT CGAAAGGTTA 1200
CGTGAACAAT GTAGAAGCTA CCAAAGAAGC TATTGATGAT GATGGTTGGC TTCACTCTGG 1260
AGACTTTGGA TACTATGATG AGGATGAGCA TTTCTATGTG GTGGACCGTT ACAAGGAATT 1320
GATTAAATAT AAGGGCTCTC AGGTAGCACC TGCAGAACTA GAAGAGATTT TATTGAAAAA 1380
TCCATGTATC AGAGATGTTG CTGTGGTTGG TATTCCTGAT CTAGAAGCTG GAGAACTGCC 1440
ATCTGCGTTT GTGGTTAAAC AGCCCGGAAA GGAGATTACA GCTAAAGAAG TGTACGATTA 1500
TCTTGCCGAG AGGGTCTCCC ATACAAAGTA TTTGCGTGGA GGGGTTCCGAT TCGTTGATAG 1560
CATACCACGG AATGTTACAG GTAAAATTAC AAGAAAGGAA CTTCTGAAGC AGTTGCTGGA 1620
GAAGGCGGGA GGT

```

FIG. 65

LucPpl 81-0B11

E	D	M	M	K	R	E	K	N	V	I	Y	G	P	E	P	L	H	P	L	18
Q	A	L	T	A	G	B	M	L	F	R	A	L	R	K	H	S	H	L	P	38
T	Y	L	V	D	V	Y	G	D	E	N	S	S	Y	K	E	F	F	E	A	58
I	C	A	E	A	Q	S	L	H	N	F	I	P	I	M	N	D	V	V	S	78
M	I	V	A	P	N	T	R	F	Y	T	K	N	E	A	A	W	Y	I	G	98
I	S	K	P	Q	I	V	E	S	I	K	I	I	L	C	K	V	L	M	G	118
Q	S	R	T	N	F	I	K	R	I	S	R	Y	D	N	V	E	N	I	H	138
G	C	E	S	L	P	N	F	I	S	R	Y	S	D	T	V	I	A	N	F	158
K	P	L	H	E	D	P	V	E	Q	T	H	A	I	G	C	I	S	G	T	178
T	G	L	P	K	G	V	M	Q	T	L	I	Q	I	C	V	R	L	I	H	198
A	F	D	P	R	A	G	T	Q	S	I	T	L	V	F	M	V	L	Y	L	218
P	F	F	H	A	F	R	F	S	P	E	A	F	L	K	A	I	Q	D	E	238
V	I	M	S	V	N	V	D	P	S	Y	I	L	C	S	K	S	P	L	V	258
V	R	S	D	L	S	S	L	R	E	L	N	C	P	A	A	P	L	A	K	278
D	K	Y	E	V	A	A	K	R	L	H	S	L	P	I	R	C	G	F	G	298
E	V	A	E	T	S	A	N	I	A	K	I	L	D	E	F	K	P	Q	S	318
L	T	E	S	T	S	P	M	A	C	A	K	I	A	D	R	E	T	G	K	338
L	G	R	V	Q	V	L	E	L	A	I	K	G	P	M	V	S	K	G	Y	358
V	N	N	V	E	A	T	K	E	B	H	I	D	D	G	W	L	H	S	G	378
D	F	G	Y	Y	D	E	D	E	P	A	E	V	V	D	R	Y	K	E	L	398
I	K	I	R	D	S	Q	V	A	V	G	I	L	E	E	I	L	E	K	N	418
P	C	F	R	V	V	A	V	V	G	K	E	L	E	A	E	G	L	P	438	
S	A	E	R	V	K	Q	P	G	K	Y	L	T	A	K	V	F	L	Y	458	
L	A	R	N	V	T	H	T	K	I	T	R	E	L	L	K	Q	L	D	S	478
I	P	A	Q															E	498	
K	A	Q																B	518	
																			538	
																			542	

FIG. 66