(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 674 043**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)
C12N 9/12 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2013** **PCT/US2013/031694**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014** **WO14142921**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2013** **E 13712657 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.04.2018** **EP 2971070**

(54) Título: **Polimerasas modificadas para una mejor incorporación de análogos de nucleótidos**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.06.2018

(73) Titular/es:

ILLUMINA, INC. (100.0%)
5200 Ilumina Way
San Diego, CA 92122, US

(72) Inventor/es:

CHEN, CHENG-YAO;
HE, MOLLY;
BOMATI, ERIN y
PEISAJOVICH, SERGIO

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 674 043 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Polimerasas modificadas para una mejor incorporación de análogos de nucleótidos

Antecedentes

Las polimerasas sirven de base a todos los organismos para replicarse y mantener sus genomas. Éstas permiten la replicación del ADN con una alta fidelidad mediante la detección entre bases complementarias, así como el reconocimiento de características estructurales adicionales de las bases. Existe una necesidad de polimerasas modificadas para una mejor incorporación análogos de nucleótidos, en particular de nucleótidos que están modificados en el hidroxilo 3' del azúcar.

Lista de secuencias

La presente solicitud se presenta conjuntamente con una lista de secuencias en formato electrónico. El listado de secuencias se proporciona como un archivo titulado IP0660.TXT, creado el 14 de Marzo, 2013, el cual tiene un tamaño de 199 kb. La información del listado de secuencias en formato electrónico se incorpora en la presente memoria en referencia a su totalidad.

Breve compendio

En la presente memoria se presentan enzimas polimerasas para una mejor incorporación de análogos de nucleótidos, en particular de nucleótidos que están modificados en el hidroxilo 3' del azúcar, tal que el sustituyente es de mayor tamaño que el del grupo hidroxilo 3' que aparece de manera natural. Los presentes inventores han identificado sorprendentemente determinadas polimerasas modificadas que muestran una mejor incorporación de los análogos deseados y que tienen una gran cantidad de otras ventajas asociadas.

En la presente memoria se describen también enzimas y métodos asociados para ayudar al entendimiento de la invención, pero éstos no forman parte de la invención reivindicada.

Los ejemplos o realizaciones que se describen en la presente memoria que no entran dentro de la definición de las reivindicaciones, no forman parte de la presente invención.

En la presente memoria se presentan polimerasas modificadas que muestran una mayor renovación cuando se comparan con una polimerasa control durante la incorporación de un nucleótido bloqueado en el OH 3' dentro de un polinucleótido. Las polimerasas modificadas muestran, por ejemplo, un mejor patrón de conmutación cuando se compara con una polimerasa control durante la incorporación de un nucleótido con un OH 3' bloqueado dentro de un polinucleótido. En algunos ejemplos, las polimerasas modificadas muestran una pirofosforolisis reducida cuando se compara con una polimerasa control durante la incorporación de un nucleótido con un OH 3' bloqueado dentro de un polinucleótido.

La polimerasa modificada comprende al menos una mutación de sustitución del aminoácido en una posición en el bolsillo de unión bloqueado 3' de la polimerasa, el cual puede comprender restos que tienen grupos posicionados en la cadena lateral dentro de 6, 7, 8, 9, 10 Å del grupo bloqueante de un nucleótido bloqueado en 3'. En determinados ejemplos, el bolsillo de unión bloqueado 3' comprende restos que tienen grupos posicionados en la cadena lateral dentro de 8 Å del grupo bloqueante de un nucléotido bloqueado en 3'. Por ejemplo, el bolsillo de unión bloqueado 3' comprende restos que tienen grupos posicionados en la cadena lateral dentro de 8 Å de la azida terminal de un nucleótido que tiene funcionalidad O-azido metilo en la posición 3', tal como la azida terminal del nucleótido en la estructura cristalina mostrada en la Figura 2.

Como se divulga en la presente memoria la polimerasa modificada comprende al menos una mutación de sustitución de aminoácido en la posición o posiciones funcionales equivalentes para Gly386, Gly387, Phe405, Ser407, Leu408, Tyr409, Pro410, Ser411, Ile412, Asn491, Asn494, Gly495, Ala510, Ser512, Val513, Thr514, Ala515, Trp516, Gly517, Arg518, Glu519, Tyr520, Ile521, Thr541 y/o Asp542 en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9ºN. La secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9ºN se establece en SEQ ID NO:4. En algunos ejemplos, la polimerasa modificada comprende una combinación de una o más mutaciones de sustitución en la posición o posiciones equivalentes funcionalmente para Gly386, Gly387, Phe405, Ser407, Leu408, Tyr409, Pro410, Ser411, Ile412, Asn491, Asn494, Gly495, Ala510, Ser512, Val513, Thr514, Ala515, Trp516, Gly517, Arg518, Glu519, Tyr520, Ile521, Thr541 y/o Asp542 en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9ºN. En realizaciones de la invención, al menos una mutación de sustitución comprende una mutación en la posición equivalente a Thr514 y/o Ile521.

En determinados ejemplos, la mutación de sustitución comprende una mutación para un resto que tienen una cadena lateral más pequeña. En determinados ejemplos, la mutación de sustitución comprende una mutación para un resto que tiene una cadena lateral hidrofóbica.

Según la presente divulgación, la polimerasa es una polimerasa de ADN. La polimerasa modificada de la presente invención es un tipo de ADN polimerasa de la familia B. La polimerasa puede ser, por ejemplo, una polimerasa de

ADN de arqueas de la familia B, ADN polimerasa-α humana, T4, RB69, y polimerasas de ADN del fago phi29. En determinados ejemplos, la ADN polimerasa de arqueas de la familia B es de un género seleccionado del grupo que consiste en *Thermococcus*, *Pyrococcus*, y *Methanococcus*. Por ejemplo, la polimerasa se puede seleccionar del grupo que consiste en la polimerasa Vent, Deep Vent, 9ºN, y Pfu. En determinados ejemplos, la polimerasa 9ºN es una polimerasa de ADN de arqueas de la familia B.

En algunas realizaciones, además de las mutaciones anteriores, la polimerasa modificada puede comprender además mutaciones de sustitución en posiciones equivalentes funcionalmente para Leu408 y/o Tyr409 y/o Pro410 en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9ºN. Por ejemplo, las mutaciones de sustitución pueden comprender mutaciones de sustitución homólogas para Leu408Ala y/o Tyr409Ala y/o Pro410Ile en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9ºN.

En algunas realizaciones, la polimerasa modificada comprende una actividad reducida de la exonucleasa en comparación con la polimerasa de tipo salvaje. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, la polimerasa modificada comprende mutaciones de sustitución en posiciones equivalentes funcionalmente para Asp141 y/o Glu143 en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9ºN.

En determinadas realizaciones, la polimerasa modificada comprende además mutaciones de sustitución en posiciones equivalentes funcionalmente para Ala485 en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9ºN. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la polimerasa comprende una mutación de sustitución equivalente funcionalmente para Ala485Leu o Ala485Val en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9ºN.

En determinadas realizaciones, la polimerasa modificada comprende además una mutación de sustitución para un aminoácido diferente en la posición equivalente funcionalmente para Cys223 en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9ºN. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, la polimerasa modificada comprende una mutación de sustitución equivalente funcionalmente para Cys223Ser en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9ºN.

Se divulgan también en la presente memoria ejemplos de una polimerasa modificada que comprende una mutación de sustitución adicional para eliminar una metionina interna. Por ejemplo, la polimerasa modificada comprende una mutación de sustitución para un aminoácido diferente en la posición equivalente funcionalmente para Met129 en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9ºN. En determinados ejemplos, la polimerasa modificada comprende una mutación de sustitución equivalente funcionalmente para Met129Ala en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9ºN.

Según la presente invención se proporciona una polimerasa modificada que comprende una mutación de sustitución para el dominio semi-conservado en el bolsillo de unión de bloqueo 3', comprendiendo el dominio semi-conservado la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOS:1-3, en donde la mutación de sustitución comprende una mutación en la posición 3 de cualquier resto distinto a Thr y/o una mutación en posición 10 de cualquier resto diferente a Ile, o una combinación de dos mutaciones de sustitución. En determinadas realizaciones, la polimerasa modificada comprende una mutación para Thr en posición 3. En determinadas realizaciones, la polimerasa modificada comprende una mutación para Ile en posición 10. En determinadas realizaciones, la polimerasa modificada comprende tanto una mutación para Thr en la posición 3 como una mutación para Ile en posición 10. En determinadas realizaciones, la polimerasa modificada comprende tanto una mutación para Thr en posición 3 como una mutación para Ile en posición 10.

Se proporciona también según la presente invención una polimerasa modificada que comprende una mutación de sustitución para el dominio semi-conservado en el bolsillo de unión de bloqueo 3', comprendiendo el dominio semi-conservado la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4, en donde la mutación de sustitución comprende una mutación en posición 6 para cualquier resto distinto a Thr y/o una mutación en la posición 13 para cualquier resto diferente a Ile, o una combinación de dos mutaciones de sustitución. En determinadas realizaciones, la polimerasa modificada comprende una mutación para Thr en posición 6. En determinadas realizaciones, la polimerasa modificada comprende una mutación para Ile en posición 13. En determinadas realizaciones, la polimerasa modificada comprende tanto una mutación para Thr en posición 6 como una mutación para Ile en posición 13.

En algunas realizaciones, además de las mutaciones anteriores, la polimerasa modificada puede comprender además mutaciones de sustitución en posiciones equivalentes funcionalmente para Le408 y/o Tyr409 y/o Pro410 en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9ºN. Por ejemplo, las mutaciones de sustitución pueden comprender mutaciones de sustitución homólogas para Leu408Ala y/o Tyr409Ala y/o Pro410Ile en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9ºN.

En algunas realizaciones, la polimerasa modificada comprende una actividad exonucleasa reducida en comparación con la polimerasa de tipo salvaje. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, la polimerasa modificada comprende mutaciones de sustitución en posiciones equivalentes funcionalmente para Asp141 y/o Glu143 en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9ºN.

En determinadas realizaciones, la polimerasa modificada comprende además mutaciones de sustitución en posiciones equivalentes funcionalmente para Ala485 en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9ºN. Por

ejemplo, en algunas realizaciones, la polimerasa comprende una mutación de sustitución equivalente funcionalmente para Ala485Leu o Ala485Val en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9ºN.

En determinadas realizaciones, la polimerasa modificada comprende además una mutación de sustitución para un aminoácido diferente en la posición equivalente funcionalmente para Cys223 en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9ºN. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, la polimerasa comprende una mutación de sustitución equivalente funcionalmente para Cys223Ser en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9ºN.

Se divulga también una polimerasa modificada que puede comprender una mutación de sustitución adicional para eliminar una metionina interna. Por ejemplo, la polimerasa modificada comprende una mutación de sustitución para un aminoácido diferente en la posición equivalente funcionalmente para Met129 en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9ºN. En determinados ejemplos, la polimerasa modificada comprende una mutación de sustitución equivalente funcionalmente para Met129Ala en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9ºN.

En la presente memoria se divulga también una polimerasa modificada que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOS: 6-8, 10-12, 14-16, 18-20, 22-24, 26-28, y 32-34. En determinadas realizaciones se proporciona una polimerasa modificada que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOS: 6-8, 10-12, 14-16, 18-20, 22-24, 26-34.

Se proporciona también según la presente invención una molécula de ácido nucleico que codifica una polimerasa modificada como se define en cualquiera de las realizaciones anteriores. Se proporciona también según la presente invención un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico descrito anteriormente. Se proporciona también según la presente invención una célula hospedadora que comprende el vector descrito anteriormente.

Se divulga también en la presente memoria un método para incorporar nucleótidos modificados en el ADN permitiendo interaccionar a los siguientes componentes: (i) una polimerasa modificada como se describe en la presente memoria, (ii) un molde de ADN; y (iii) una disolución de nucleótidos. En determinados ejemplos, el molde de ADN comprende una serie de agrupaciones.

Se divulga también en la presente memoria un kit para realizar la reacción de incorporación de nucleótidos que comprende: una polimerasa como se define en la presente memoria y una disolución de nucleótidos. En determinados ejemplos, la disolución de nucleótidos comprende nucleótidos marcados. En determinados ejemplos, los nucleótidos comprenden nucleótidos sintéticos. En determinados ejemplos, los nucleótidos comprenden nucleótidos modificados. En determinados ejemplos, los nucleótidos modificados se han modificado en el hidroxilo 3' del azúcar, tal que el sustituyente es más grande en tamaño que el grupo hidroxilo 3' que aparece de manera natural. En determinados ejemplos, los nucleótidos modificados comprenden una molécula de nucleótido o nucleósido modificado que comprende una base de purina o pirimidina y una fracción de azúcar de ribosa o desoxirribosa que tiene un grupo de bloqueo OH-3' unido covalentemente a ello, tal que el átomo de carbono 3' se ha unido a un grupo de la estructura

$$-O-Z$$

en donde Z es cualquiera de $–C(R')_2-O-R''$, $-C(R')_2-N(R'')_2$, $-C(R')_2-N(H)R''$, $-C(R')_2-S-R''$ y $–C(R')_2-F$,

en donde cada R'' es o es parte de un grupo de protección eliminable;

cada R' es independientemente un átomo de hidrógeno, un alquilo, alquilo sustituido, arilalquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo, heterociclo, acilo, ciano, alcoxilo, ariloxilo, heteroariloxilo o grupo amido, o un marcador detectable unido a través de un grupo de unión; o $(R')_2$ representa un grupo alquilideno de fórmula $=C(R''')_2$ en donde cada R''' puede ser igual o diferente y se selecciona del grupo que comprende átomos de hidrógeno y halógeno y grupos alquilo; y

en donde la molécula puede reaccionar para producir un intermediario en el cual cada R'' se cambia por H o, donde Z es $–C(R')_2-F$, el F se cambia por OH, SH o NH_2, preferiblemente por OH, cuyo intermediario se disocia bajo condiciones acuosas para proporcionar una molécula con un OH 3' libre;

con la condición de que cuando Z es $–C(R')_2-S-R''$, ambos grupos R' no sean H.

En determinados ejemplos, R' del nucleósido o nucleótido modificado es un alquilo o un alquilo sustituido. En determinados ejemplos, -Z del nucleótido o nucleósido modificado tiene la fórmula $–C(R')_2-N_3$. En determinados ejemplos, Z es un grupo azidometilo.

En determinados ejemplos, los nucleósidos modificados se marcan fluorescentemente para permitir su detección. En determinados ejemplos, los nucleótidos modificados comprenden un nucleótido o nucleósido que tienen una base unidas a un marcador detectable a través de un enlazador de separación. En determinados ejemplos, el kit comprende además uno o más moléculas molde de ADN y/o cebadores.

La presente invención se describe ahora en referencia a los dibujos acompañantes y la descripción de a continuación. Otras características, objetivos, y ventajas serán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y a partir de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una imagen de fósforo de un ensayo en gel que mide la pirofosforolisis mediante una ADN polimerasa.

La Figura 2 es un diagrama que muestra el co-cristal de la polimerasa de ADN 9ºN unida a un análogo de citosina bloqueado en 3' y un molde de ADN.

La Figura 3 es un esquema que muestra el alineamiento de secuencias de aminoácidos de polimerasa a partir de *Thermococcus sp. 9ºN-7* (9ºN), polimerasa 9ºN T514S/I521L mutante (Pol957), *Thermococcus gorgonarius* (TGO), *Thermococcus kodakaraensis (*KDOD1), *Pyrococcus furiosus* (Pfu), *Methanococcus maripaludis* (MMS2) y ADN polimerasa del fago RB69. La numeración mostrada representa la numeración de restos de aminoácidos en la polimerasa 9ºN.

La Figura 4 es un esquema que muestra dos porciones destacadas del alineamiento mostrado en la Figura 3.

La Figura 5 es una gráfica que muestra los resultados a partir del análisis de introducción/pre-introducción.

Descripción detallada

En la presente memoria se presentan enzimas polimerasa para una mejor incorporación de análogos de nucleótidos, en particular nucleótidos que se han modificado en el hidroxilo 3' del azúcar tal que el sustituyente tiene un mayor tamaño que el del grupo hidroxilo 3' que aparece de manera natural. Los presentes inventores han identificado sorprendentemente determinadas polimerasas modificadas que muestran una mejor incorporación de los análogos deseados y tienen otras muchas ventajas asociadas.

Un ejemplo de las polimerasas modificadas presentadas en la presente memoria son polimerasas que muestran una renovación aumentada cuando se compara con una polimerasa control durante la incorporación de un nucleótido bloqueado en el OH 3' en un polinucleótido. La tasa de renovación de una polimerasa refleja, en parte, la tasa de disociación enzimática a partir del molde y se puede cuantificar empleando cualquiera de las metodologías conocidas en la técnica. Por ejemplo, la tasa de renovación de una ADN polimerasa se puede medir empleando un ensayo para medir cinéticas de inicio, como se establece generalmente en el Ejemplo 1 de abajo, y como se describe en Joyce (2010) *Biochim. Biophys. Acta*. 1804:1032-1040. Las polimerasas modificadas presentadas en la presente memoria muestran, por ejemplo, un mejor molde de conmutación cuando se compara al de una polimerasa control durante la incorporación de un nucleótido bloqueado en OH 3' de un polinucleótido. En algunos ejemplos, las polimerasas modificadas muestran una pirofosforolisis reducida cuando se compara con una polimerasa control durante la incorporación de un nucleótido bloqueado en OH 3' de un polinucleótido. La pirofosforolisis, que es la reacción inversa de incorporación de nucleótidos, ocurre más frecuentemente cuando una polimerasa tiene una tasa de renovación más lenta después de la incorporación de un nucleótido. La pirofosforolisis se puede cuantificar empleando cualquier método conocido en la técnica. Los ensayos para medir la pirofosforolisis se establecen en la Figura 1 y se describen en Kaushik et al., (1996) *Biochemistry* 35:7256-7266.

Como se describe en mayor detalle a continuación en la presente memoria, los inventores han descubierto sorprendentemente que una o más mutaciones en los restos en el espacio que rodea el grupo bloqueante 3' da como resultado un incremento significativo en la tasa de renovación y en la reducción de pirofosforolisis.

Estas polimerasas modificadas han mejorado el rendimiento de la secuenciación de ADN mediante síntesis (SBS, de sus siglas en inglés) y dan como resultado menores errores en la introducción y/o pre-introducción.

Como se emplea en la siguiente memoria, el término "introducción" se refiere a un fenómeno en la SBS que es causado por la introducción incompleta de un nucleótido en alguna porción de las hebras de ADN dentro de las agrupaciones mediante polimerasas en un ciclo de secuenciación dado. El término "pre-introducción" se refiere a un fenómeno en la SBS que es causado por la incorporación de nucleótidos sin terminadores 3' eficaces, causando que la incorporación del evento vaya un ciclo hacia delante. La introducción y la pre-introducción causan las intensidades obtenidas para un ciclo específico que consiste en la señal del ciclo actual, así como la transferencia a partir de los ciclos precedentes y posteriores. Como aumenta el número de ciclos, aumenta la fracción de secuencias por grupo afectado por la introducción, dificultando la identificación de la base correcta. La introducción se puede causar, por ejemplo, mediante una polimerasa que realiza la reacción inversa de la incorporación del nucleótido, como se sabe que ocurre bajo condiciones conductoras de la pirofosforolisis. Por consiguiente, el descubrimiento de polimerasas modificadas que disminuyen la incidencia de la introducción y/o pre-introducción es sorprendente y proporciona una gran ventaja en aplicaciones de la SBS. Por ejemplo, las polimerasas modificadas proporcionan tiempos del ciclo SBS más rápidos, menores valores de introducción y pre-introducción, y mayor longitud de lectura de secuenciación. La caracterización de polimerasas modificadas como se proporcionan en la presente memoria se establece en la sección de Ejemplos de a continuación.

Las polimerasas modificadas como se proporcionan en la presente memoria pueden comprender al menos una mutación por sustitución de aminoácido en una posición en el bolsillo de unión de bloqueo 3' de la polimerasa. Como se emplea en la presente memoria, el término "bolsillo de unión de bloqueo 3'" se refiere al bolsillo tri-dimensional de una enzima polimerasa que rodea un grupo bloqueante en el hidroxilo 3' del azúcar del nucleótido. Por ejemplo, los inventores han resuelto la estructura co-cristal de una ADN polimerasa unida a la citosina que tiene funcionalidad O-azido metilo en la posición 3', como se establece en la Figura 2.

En un ejemplo, el bolsillo de unión de bloqueo 3' comprende restos que tienen grupos en la cadena lateral posicionados dentro de 6, 7, 8, 9, 10 Å del grupo bloqueante de un nucleótido 3' bloqueado. En determinados ejemplos, el bolsillo de unión bloqueado 3' comprende restos que tienen grupos posicionados en la cadena lateral dentro de 8 Å del grupo bloqueante de un nucléotido 3' bloqueado. Por ejemplo, el bolsillo de unión bloqueado 3' de una ADN polimerasa comprende restos que tienen grupos posicionados en la cadena lateral dentro de 8 Å de la azida terminal de un nucleótido que tiene funcionalidad O-azido metilo en la posición 3'.

La polimerasa modificada puede comprender al menos una mutación de sustitución en la posición o posiciones equivalentes funcionalmente a los de los restos establecidos en la Tabla 1 de abajo. La Tabla 1 establece los restos de polimerasa que tienen cadenas laterales posicionadas con 6 Angstrom y 8 Angstrom de la azida terminal del nucleótido bloqueado O-azido metilo 3' como se determinó mediante cristalografía. La Figura 2 muestra una vista tri-dimensional de una ADN polimerasa co-cristal 9ºN unida a un análogo de citosina bloqueado en el O-azido metilo 3' y a un molde de ADN. En la Tabla 1 de abajo se establecen los restos aminoácidos que tienen una cadena lateral dentro de 6 ó 8 Angstrom de esfera de la azida terminal.

Por tanto, una polimerasa modificada como se presenta en la presente memoria comprende al menos una mutación de sustitución en la posición o posiciones equivalentes funcionalmente para, por ejemplo, Gly386, Gly387, Phe405, Ser407, Leu408, Tyr409, Pro410, Ser411, Ile412, Asn491, Asn494, Gly495, Ala510, Ser512, Val513, Thr514, Ala515, Trp516, Gly517, Arg518, Glu519, Tyr520, Ile521, Thr541 y/o Asp542 en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9ºN. En algunos ejemplos, la polimerasa modificada comprende una combinación de una o más mutaciones de sustitución en la posición o posiciones equivalentes funcionalmente a, por ejemplo, Gly386, Gly387, Phe405, Ser407, Leu408, Tyr409, Pro410, Ser411, Ile412, Asn491, Asn494, Gly495, Ala510, Ser512, Val513, Thr514, Ala515, Trp516, Gly517, Arg518, Glu519, Tyr520, Ile521, Thr541 y/o Asp542 en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9ºN. Según la presente invención, al menos una mutación de sustitución comprende una mutación en la posición equivalente a Thr514 y/o Ile521.

Tabla 1 – Restos en el bolsillo de unión de bloqueo 3' de la ADN polimerasa 9ºN

Restos dentro de 6 Angstrom de la azida terminal	Restos dentro de 8 Angstrom de la azida terminal
Leu 408	Gly 386
Tyr 409	Gly 387
Ile 412	Phe 405
Asn 494	Ser 407
Val 513*	Pro 410
Thr 514*	Ser 411
Ala 515*	Asn 491
Trp 516*	Gly 495
Gly 517*	Ala 510*
Arg 518*	Ser 512*
Thr 541	Glu 519*
Asp 542	Tyr 520*
	Ile 521*

(*) indica restos en el dominio semi-conservado del bolsillo de unión de bloqueo 3'.

En determinados ejemplos, la mutación de sustitución comprende una mutación para un resto que tiene una cadena lateral más pequeña. Los tamaños relativos de las cadenas laterales de aminoácidos son bien conocidos en la técnica y se pueden comparar empleando cualquier métrica conocida, incluyendo los efectos estéricos y/o la densidad electrónica. Por tanto, un ejemplo de aminoácidos establecido para incrementar el tamaño sería G, A, S, C,

V, T, P, I, L, D, N, E, Q, M, K, H, F, Y, R, W. En determinados ejemplos, la mutación de sustitución comprende una mutación para un resto que tiene una cadena lateral hidrofóbica tal como A, I, L, V, F, W, Y.

Según la presente invención se proporciona una polimerasa modificada que comprende una mutación de sustitución para un dominio semi-conservado en el bolsillo de unión de bloqueo 3'. Como se emplea en la presente memoria, el término "dominio semi-conservado" se refiere a una porción de polimerasa que está conservada completamente, o al menos conservada parcialmente entre varias especies. El dominio semi-conservado comprende restos de aminoácido que residen en el bolsillo de unión de bloqueo 3' de la polimerasa. Se ha descubierto sorprendentemente que la mutación de uno o más restos en el dominio semi-conservado afecta a la actividad de la polimerasa en presencia de nucleótidos bloqueados en 3', dando como resultado un incremento significativo en la tasa de renovación y en la reducción de pirofosforolisis. Estas polimerasas modificadas tienen un mejor rendimiento en la secuenciación de ADN mediante síntesis y dan como resultado menores errores de introducción, como se describe en la sección de Ejemplos de a continuación.

En algunas realizaciones, el dominio semi-conservado comprende aminoácidos que tienen la secuencia establecida en cualquiera de SEQ ID NOS:1-4. SEQ ID NOS:1-3 corresponde a los restos 512-521 de la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9ºN, la cual se establece en la presente memoria como SEQ ID NO:5. SEQ ID NO:4 corresponde a los restos 509-521 de la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9ºN. En las Figuras 3 y 4 se establece un alineamiento que muestra la conservación entre varias especies en el dominio semi-conservado. Las secuencias de polimerasa que se muestran en las Figuras 3 y 4 se obtuvieron a partir de la base de datos Genbank números de acceso Q56366 (ADN polimerasa 9ºN), NP_577941 (Pfu), YP_182414 (KOD1), NP_987500 (MMS2), AAP75958 (RB69), P56689 (TGo).

Se han encontrado sorprendentemente mutaciones para uno o más restos en el dominio semi-conservado para incrementar la tasa de renovación y la reducción en la pirofosforolisis, dando como resultado la reducción de errores en la introducción. Por ejemplo, en algunas realizaciones de las polimerasas modificadas presentadas en la presente memoria, la mutación de sustitución comprende una mutación en posición 3 de cualquiera de SEQ ID NOS:1-3 para cualquier resto diferente a Thr y/o una mutación en posición 10 de cualquier SEQ ID NOS:1-3 para cualquier resto diferente a Ile, o una combinación de las dos sustituciones. En determinadas realizaciones, la polimerasa modificada comprende una mutación para Thr en posición 3 de cualquier SEQ ID NOS:1-3. En determinadas realizaciones, la polimerasa modificada comprende una mutación para Ile en posición 10 de cualquier SEQ ID NOS:1-3. En determinadas realizaciones, la polimerasa modificada comprende tanto una mutación para Thr en posición 3 de cualquier SEQ ID NOS:1-3 como una mutación para Ile en posición 10 de cualquier SEQ ID NOS:1-3.

En algunas realizaciones de las polimerasas modificadas presentadas en la presente memoria, la mutación de sustitución comprende una mutación en posición 6 de SEQ ID NO:4 para cualquier resto diferente a Thr y/o una mutación en posición 13 de SEQ ID NO:4 para cualquier resto diferente a Ile, o una combinación de dos mutaciones de sustitución. En determinadas realizaciones, la polimerasa modificada comprende una mutación para Thr en posición 6 de SEQ ID NO:4. En determinadas realizaciones, la polimerasa modificada comprende una mutación para Ile en posición 13 de SEQ ID NO:4. En determinadas realizaciones, la polimerasa modificada presenta tanto una mutación para Thr en posición 6 de SEQ ID NO:4 como una mutación para Ile en posición 13 de SEQ ID NO:4.

Como se describe anteriormente en la presente memoria la polimerasa es una ADN polimerasa. Según la presente invención la ADN polimerasa es un tipo de ADN polimerasa de la familia B. La polimerasa puede ser, por ejemplo, una ADN polimerasa de arqueas de la familia B, una ADN polimerasa-α humana, y polimerasas de fagos. Se puede emplear en la presente memoria cualquier polimerasa de fagos, incluyendo, por ejemplo, polimerasas tales como T4, RB69 y ADN polimerasas del fago phi29.

Las ADN polimerasas de arqueas de la familia B son bien conocidas en la técnica como queda demostrado en la divulgación de la Patente U.S. Nº 8.283.149. En determinados ejemplos la ADN polimerasa es a partir de arqueas termófilas, lo que significa que las polimerasas a menudo son termoestables. Por consiguiente, en otro ejemplo la polimerasa se selecciona a partir de la polimerasa Vent, Deep Vent, 9ºN y Pfu. Vent y Deep Vent son nombres comerciales empleados para las ADN polimerasas de la familia B aisladas a partir de la arquea termófila *Thermococcus litoralis*. La polimerasa 9ºN se identificó también a partir de *Thermococcus sp*. La polimerasa Pfu se aisló a partir de *Pyrococcus furiosus*.

En determinados ejemplos, la ADN polimerasa de arqueas de la familia B es a partir de un género, tal como, por ejemplo, los géneros *Thermococcus*, *Pyrococcus* y *Methanococcus*. Los miembros del género *Thermococcus* son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, *Thermococcus 4557*, *Thermococcus barophilus, Thermococcus gammatolerans, Thermococcus onnurineus, Thermococcus sibiricus, Thermococcus kodakarensis, Thermococcus gorgonarius.* Los miembros del género *Pyrococcus* son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, *Pyrococcus NA2, Pyrococcus abyssi, Pyrococcus furiosus, Pyrococcus horikoshii, Pyrococcus yayanosii, Pyrococcus endeavori, Pyrococcus glycovorans, Pyrococcus woesei.* Los miembros del género *Methanococcus* son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, *M. aeolicus*, *M. maripaludis, M. vannielii, M. voltae, "*M. thermolithotrophicus*"* y "M. jannaschii*"*.

Por ejemplo, la polimerasa se puede seleccionar a partir del grupo que consiste en polimerasa Vent, Deep Vent, 9ºN y Pfu. En determinados ejemplos, el ADN polimerasa de arquea de la familia B es polimerasa 9ºN.

Por “equivalente funcionalmente” significa que la polimerasa control, en el caso de estudios que emplean una polimerasa completamente diferente, contendrá la sustitución de aminoácidos que se considere que aparece en la posición del aminoácido en la otra polimerasa que tiene el mismo papel funcional en la enzima. Como un ejemplo, la mutación en posición 412 de Tirosina a Valina (Y412V) en la ADN polimerasa Vent será equivalente funcionalmente a una sustitución en posición 409 de Tirosina a Valina (Y409V) en la polimerasa 9ºN.

Por lo general las mutaciones de sustitución equivalentes funcionalmente en dos o más polimerasas diferentes aparecen en posiciones de aminoácidos homólogos en las secuencias de aminoácidos de las polimerasas. Por lo tanto, el empleo en la presente memoria del término “equivalente funcionalmente” engloba también a mutaciones que son “posicionalmente equivalentes” u “homólogas” para una mutación dada, independientemente de si se conoce o no la función particular del aminoácido mutado. Es posible identificar restos de aminoácidos posicionalmente equivalentes u homólogos en las secuencias de aminoácidos de dos o más polimerasas diferentes sobre la base del alineamiento secuencial y/o de modelado molecular. En las Figuras 3 y 4 se establece un ejemplo de alineamiento secuencial para identificar restos equivalentes posicionalmente y/o equivalentes funcionalmente. Por tanto, por ejemplo, como se muestra en la Figura 4, los restos en el dominio semi-conservado en el bolsillo de unión de bloqueo 3’ se identifican en las posiciones 512-521 de la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9ºN. Los restos que corresponden a las polimerasas TGO, KOD1, Pfu, MmS2 y RB69 se identifican en la Figura alineados verticalmente y se consideran equivalentes posicionalmente así como equivalentes funcionalmente al resto correspondiente en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9ºN.

Las polimerasas modificadas descritas en la presente memoria anteriormente pueden comprender mutaciones de sustitución adicionales que se conocen por mejorar uno o más aspectos de la actividad de la polimerasa en presencia de nucleótidos bloqueados en 3’ y/o en aplicaciones de secuenciación de ADN. Por ejemplo, en algunas realizaciones de la invención, además de cualquiera de las mutaciones anteriores, la polimerasa modificada puede comprender además mutaciones de sustitución en posiciones equivalentes funcionalmente para Leu408 y/o Tyr409 y/o Pro410 en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9ºN. Se puede realizar una gran variedad de mutaciones de sustitución en una o más posiciones en posiciones equivalentes funcionalmente para 408-410 en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9ºN, que dan como resultado un incremento en la incorporación de los nucleótidos bloqueados, como se conoce en la técnica y queda demostrado por la divulgación US 2006/0240439 y US 2006/0281109. Por ejemplo, las mutaciones de sustitución pueden comprender mutaciones de sustitución homólogas para Leu408Ala y/o Tyr409Ala y/o Pro10Ile en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9ºN. En determinadas realizaciones, además de cualquiera de las mutaciones anteriores, la polimerasa modificada comprende además mutaciones de sustitución en posiciones equivalentes funcionalmente para Ala485 en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9ºN. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la polimerasa comprende una mutación de sustitución equivalente funcionalmente para Ala485Leu o Ala485Val en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9ºN.

En algunas realizaciones, además de cualquiera de las mutaciones anteriores, la polimerasa modificada puede comprender una actividad exonucleasa reducida en comparación con una polimerasa de tipo salvaje. Se conoce que una gran variedad de mutaciones de sustitución en una o más posiciones que dan como resultado una actividad exonucleasa reducida, como se conoce en la técnica y queda demostrado por la documentación incorporada en US 2006/0240439 y US 2006/0281109. Por ejemplo, en algunas realizaciones, además de las mutaciones anteriores, la polimerasa modificada puede comprender además mutaciones de sustitución en posiciones equivalentes funcionalmente para Asp141 y/o o Glu143 en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9ºN.

En determinadas realizaciones, además de cualquiera de las mutaciones anteriores, la polimerasa modificada comprende además una mutación de sustitución para un aminoácido distinto en la posición equivalente funcionalmente para Cys223 en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9ºN como se conoce en la técnica y queda demostrado por la documentación incorporada en US 2006/0281109. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, la polimerasa modificada comprende una mutación de sustitución equivalente funcionalmente para Cys223Ser en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9ºN.

Se divulga también y además de cualquiera de las mutaciones anteriores, que la polimerasa modificada puede comprender una o más mutaciones de sustitución para eliminar una metionina interna. Por ejemplo, la polimerasa modificada comprende una mutación de sustitución para un aminoácido diferente en la posición equivalente funcionalmente para Met129 en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9ºN. En determinados ejemplos, la polimerasa modificada comprende una mutación de sustitución equivalente funcionalmente para Met129Ala en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9ºN.

Mutación de polimerasas

En la presente divulgación se emplean opcionalmente varios tipos de mutagénesis, por ejemplo, para modificar polimerasas para producir variantes, por ejemplo, de cuerdo con modelos de polimerasa y predicciones modelo como se discute anteriormente, o empleando estrategias mutacionales aleatorias o semi-aleatorias. En general, se

puede emplear cualquier procedimiento de mutagénesis disponible para producir mutantes de la polimerasa. Tales procedimientos de mutagénesis incluyen opcionalmente la selección de ácidos nucleicos y polipéptidos mutantes para una o más actividades de interés (por ejemplo, pirofosforolisis reducida, renovación aumentada, por ejemplo, para un análogo de nucleótido dado). Los procedimientos que se pueden emplear incluyen, pero no se limitan a: mutagénesis puntual dirigida al sitio, mutagénesis puntual aleatoria, recombinación homóloga in vitro o in vivo (barajado de ADN y PCR de solapamiento combinatorio), mutagénesis empleando moldes que contienen uracilo, mutagénesis dirigida al oligonucleótido, mutagénesis de ADN modificado con fosforotioato, mutagénesis empleando intervalos de duplos de ADN, reparación de desajustes puntuales, mutagénesis empleando cepas del huésped con reparación deficiente, selección por restricción y purificación por restricción, mutagénesis de deleción, mutagénesis mediante síntesis genética total, PCR degenerado, reparación de la rotura de la doble cadena, y muchos otros procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. La polimerasa de inicio para la mutación puede ser cualquiera de las indicadas en la presente memoria, incluyendo los mutantes de polimerasa tales como las que se identifican en, por ejemplo, US 2006/0240439 y US 2006/0281109.

Opcionalmente, la mutagénesis se puede guiar mediante información conocida a partir de una molécula de polimerasa que aparece de forma natural, o a partir de una polimerasa modificada o mutada (por ejemplo, empleando una polimerasa mutante existente como se indica en las referencias precedentes), por ejemplo, secuencia, comparaciones de secuencias, propiedades físicas, estructura cristalina y/o similares, como se discute anteriormente. Sin embargo, la modificación puede ser esencialmente aleatoria (por ejemplo, como en el barajado de ADN clásico o “familiar”, véase, por ejemplo, Crameri et al. (1998) “DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution” Nature 391:288-291).

Información adicional sobre formatos de mutaciones se encuentran en: Sambrook et al., Molecular Cloning—A Laboratory Manual (3ª Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, 2000 (“Sambrook”); Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. y John Willey e Hijos, Inc., (complementado a través de 2011) (“Ausubel”) y PCR Protocols A Guide to Methods and Applications (Innis et al. eds) Academic Press Inc. San Diego, Calif. (1990) (“Innis”). Las siguientes publicaciones y referencias citadas proporcionan detalles adicionales sobre los formatos de mutaciones: Arnold, Protein engineering for unusual environments, Current Opinion in Biotechnology 4:450-455 (1993); Bass et al., Mutant Trp repressors with new DNA-binding specificities, Science 242:240-245 (1998); Bordo y Argos (1991) Suggestions for “Safe” Residue Substitutions in Site-directed Mutagenesis 217:721-729; Botstein y Shortle, Strategies and applications of in vitro mutagenesis, Science 229:1193-1201 (1985); Carter et al., Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors, Nucl. Acids Res. 13:4431-4443 (1985); Carter, Site-directed mutagenesis, Biochem. J. 237:1-7 (1986); Carter, Improved oligonucleotide-directed mutagenesis using M13 vectors, Methods in Enzymol. 154:382-403 (1987); Dale et al., Olinucleotide-directed random mutagenesis using phosphorothioate method, Methods Mol. Biol. 57:369-374 (1996); Eghtedarzadeh & Henikoff, Use of oligonucleotides to generate large deletions, Nucl. Acids Res. 14:5115 (1986); Fritz et al., Oligonucleotide-directed construction of mutations: a gapped duplex DNA procedure without enzimatic reactions in vitro, Nucl. Acids. Res. 16:6987-6999 (1998); Grundstrom et al., Oligonucleotide-directed mutagenesis by microscale ‘shot-gun’ gene synthesis, Nucl. Acids Res. 13:3305-3316 (1985); Hayes (2002) Combining Computational and Experimental Screening for rapid Optimization of Protein Properties PNAS 99(25) 15926-15931; Kunkel, The efficiency of oligonucleotide directed mutagenesis, in Nucleic Acids & Molecular Biology (Eckstein, F. y Lilley, D. M. J. eds., Springer Verlag, Berlín)) (1987); Kunkel, Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 82:488-492 (1985); Kunkel et al., Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection, Methods in Enzymol. 154, 367-382 (1987); Kramer et al., The gapped duples DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction, Nucl. Acids Res. 12:9441-9456 (1984); Kramer & Fritz Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA, Methods in Enzymol. 154:350-367 (1987); Kramer et al., Point Mismatch Repair, Cell 38:879-887 (1984); Kramer at al., Improved enzymatic in vitro reactions in the gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed construction of mutations, Nucl. Acids Res. 16:7207 (1988); Ling et al., Approaches to DNA mutagenesis: an overwiev, Anal Biochem. 254(2):157-178 (1997); Lorimer and Pastan Nucleic Acids Res. 23, 3067-8 (1995); Mandecki, Oligonucleotide-directed double-strand break repair in plasmids of Escherechia coli: a method for site-specific mutagenesis, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 83:7177-7181 (1986); Nakamaye & Eckstein, Inhibition of restriction endonuclease Nci I cleavage by phosphorotioate groups and its application to oligonulceotide-directed mutagenesis, Nucl. Acids. Res. 14:9679-9698 (1986); Nambiar et al., Total synthesis and cloning of a gene coding for the ribonuclease S protein, Science 223:1299-1301 (1984); Sakamar y Khorana, Total synthesis and expression of a gene for the a-subunit of bovine rod outer segment guanine nucleotide-binding protein (transducin), Nucl. Acids Res. 14:6361-6372 (1988); Sayers et al., Y-T Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis, Nucl. Acids Res. 16:791-802 (1988); Sayers et al., Strand specific cleavage of phosphorothioate-containing DNA by reaction with restriction endonucleases in the presence of ethidium bromide, (1988) Nucl. Acids Res. 16:803-814; Sieber et al., Nature Biotechnology, 19:456-460 (2001); Smith, In vitro mutagenesis, Ann. Rev. Genet. 19:423-462 (1985); Methods in Enzymol. 100:468-500 (1983); Methods in Enzymol. 154:329-350 (1987); Stemmer, Nature 370, 389-91 (1994); Taylor et al., The use of phosphorothioate-modified DNA in restriction enzyme reactions to prepare nicked DNA, Nucl. Acids Res. 13:8749-8764 (1985); Taylor et al., The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high frequency using phosphorothioate-modified DNA, Nucl. Acids Res. 13:8765-8787 (1985); Wells et al., Importance of hydrogen-bound formation in stabilizing the transition state of subtilisin, Phil. Trans. R. Soc. Lond. A 317:415-423 (1986); Wells et al.,

Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites, Gene 34:315-323 (1985); Zoller & Smith, Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any DNA fragment, Nucleic Acids Res. 10:6487-6500 (1982); Zoller & Smith, Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors, Methods in Enzymol. 100:468-500 (1983); Zoller & Smith, Oligonucleotide-directed mutagenesis: a simple method using two oligonucleotide primers and a single-strand DNA template, Methods in Enzymol. 154:329-350 (1987); Clackson et al. (1991) “Making antibody fragments using phage display libraries” Nature 352:624-628; Gibbs et al. (2001) “Degenerate oligonucleotide gene shuffling (DOGS): a method for enhancing the frequency of recombination with family shuffling” Gene 271:13-20; y Higara and Arnold (2003) “General method for sequence-independent site-directed chimeragenesis: J. Mol. Biol. 330:287-296. Se pueden encontrar detalles adicionales de muchos de los métodos anteriores en Methods in Enzymology Volumen 154, que describe también controles útiles para la resolución de problemas con varios métodos de mutagénesis.

Producción y aislamiento de polimerasas recombinantes

Generalmente, los ácidos nucleicos que codifican una polimerasa como se presenta en la presente memoria se puede realizar mediante clonación, recombinación, síntesis in vitro, amplificación in vitro y/o otros métodos disponibles. Se puede emplear una variedad de métodos recombinantes para expresar un vector de expresión que codifica una polimerasa como la que se presenta en la presente memoria. Los métodos para producir ácidos nucleicos recombinantes, para la expresión y aislamiento de los productos expresados, son bien conocidos y se describen en la técnica. En la presente memoria se describe un gran número de ejemplos de mutaciones y combinaciones de mutaciones, así como de estrategias para el diseño de mutaciones deseables. En la presente memoria y en, por ejemplo, WO 2007/076057 y PCT/US2007/022459, se encuentran métodos para realizar y seleccionar mutaciones en el sitio activo de las polimerasas, que incluyen las características estéricas a modificar en o cerca del sitio activo para permitir un mejor acceso de los análogos de nucleótidos.

Referencias útiles adicionales para la mutación, manipulación del ácido nucleico recombinante y in vitro (incluyendo la clonación, expresión, PCR, y similares) incluyen Berger y Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology volumen 152 Academic Press, Inc., San Diego, Calif. (Berger); Kaufman et al., (2003) Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine Segunda Edición Ceske (ed) CRC Press (Kaufman); y The Nucleic Acid Protocols Handbook Ralph Rapley (ed) (2000) Cold Spring Harbor, Humana Press Inc (Rapley); Chen et al. (ed) PCR Cloning Protocols, Segunda Edición (Methods in Molecular Biology, volumen 192) Humana Press; y en Viljoen et al. (2005) Molecular Diagnostic PCR Handbook Springer, ISBN 1402034032.

Además, están disponibles comercialmente un sinfín de kits para la purificación de plásmidos u otros ácidos nucleicos relevantes a partir de células, (véase, por ejemplo, EasyPrep.TM., FlexiPrep.TM, ambos de Pharmacia Biotech; StrataClean.TM., de Stratagene; y QIAprep.TM de Qiagen). Cualquier ácido nucleico aislado y/o purificado se puede manipular además para producir otros ácidos nucleicos, usar para transfectar células, incorporar en vectores relacionados para infectar organismos para la expresión, y/o similares. Los vectores típicos de clonación contienen terminadores de la transcripción y de la traducción, secuencias de iniciación de la transcripción y la traducción, y promotores útiles para la regulación de la expresión de un ácido nucleico diana particular. Los vectores comprenden opcionalmente casetes de expresión genéricos que contienen al menos una secuencia de terminación independiente, secuencias que permiten la replicación del casete en eucariotas, o procariotas, o en ambas (por ejemplo, vectores lanzadera) y marcadores de selección para ambos sistemas eucariotas y procariotas. Los vectores son adecuados para la replicación e incorporación en células procariotas, eucariotas, o ambas.

Otras referencias útiles, por ejemplo, para el aislamiento y el cultivo celular (por ejemplo, para el aislamiento del ácido nucleico posterior) incluyen a Freshney (1994) Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, tercera edición, Wiley-Liss, Nueva York y las referencias citadas en él; Payne et al. (1992) Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems John Wiley e Hijos, Inc. Nueva York, N.Y.; Gamborg y Phillips (eds) (1995) Plant Cell, Tissue and Organ Culture; Fundamental Methods Springer Lab Manual, Springer-Verlag (Berlín Heidelberg Nueva York) y Atlas y Parks (eds) The Handbook of Microbiological Media (1993) CRC Press, Boca Raton, Fla.

En la presente memoria se presentan también ácidos nucleicos que codifican las polimerasas recombinantes de la invención. Un aminoácido particular se puede codificar mediante múltiples codones, y determinados sistemas de traducción (por ejemplo, células procariotas o eucariotas) a menudo muestran un codon parcial, por ejemplo, organismos diferentes a menudo prefieren uno de los varios codones sinónimos que codifican el mismo aminoácido. Como tal, los ácidos nucleicos que se presentan en la presente memoria son opcionalmente “codones optimizados”, lo que significa que los ácidos nucleicos se sintetizan para incluir codones que se prefieren para un sistema de traducción particular que se está empleando para expresar la polimerasa. Por ejemplo, cuando se desea expresar la polimerasa en una célula bacteriana (o incluso una cepa de una bacteria en particular), el ácido nucleico se puede sintetizar para que incluya los codones que se encuentran con más frecuencia en el genoma de esa célula bacteriana, para una expresión eficaz de la polimerasa. Se puede emplear una estrategia similar cuando se desea expresar la polimerasa en una célula eucariota, por ejemplo, el ácido nucleico puede incluir codones preferidos para esa célula eucariota.

Se conoce una gran variedad de métodos para la detección y el aislamiento de proteínas y se pueden emplear para aislar polimerasas, por ejemplo, a partir de cultivos recombinantes de células que expresan las polimerasas recombinantes presentadas en la presente memoria. En la técnica se conoce una gran variedad de métodos para la detección y el aislamiento de proteínas, que incluyen, por ejemplo, los establecidos en R. Scopes, Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y. (1982); Deutscher, Methods in Enzymology Vol. 182: Guide to Protein Purification, Academic Press, Inc. N.Y. (1990); Sandana (1997) Bioseparation of Proteins, Academic Press, Inc.; Bollag et al. (1996) Protein Methods, 2.sup.nd Edición Wiley-Liss, NY; Walker (1996) The Protein Protocols Handbook Humana Press, NJ, Harris y Angal (1990) Protein Purification Applications: A Practical Approach IRL Press en Oxford, Oxford, Inglaterra; Harris and Angal Protein Purification Methods: A Practical Approach IRL Press en Oxford, Oxford, Inglaterra; Scopes (1993) Protein Purification: Principles and Practice 3.sup.rd Edición Springer Verlag, NY; Janson y Ryden (1998) Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications, Segunda Edición Wiley-VCH, NY; y Walker (1998) Protein Protocols en CD-ROM Humana Press, NJ; y las referencias citadas en ellas. Se pueden encontrar detalles adicionales respecto a métodos de purificación y detección de proteínas en Satinder Ahuja ed., Handbook of Bioseparations, Academic Press (2000).

Métodos de uso

Las polimerasas modificadas presentadas en la presente memoria se pueden emplear en un procedimiento de secuenciación, tal como una técnica de secuenciación mediante síntesis (SBS). En resumen, el SBS se puede iniciar mediante la puesta en contacto de los ácidos nucleicos diana con uno o más nucleótidos marcados, ADN polimerasa, etc. Las características donde se extiende un cebador empleando como patrón un ácido nucleico diana incorporarán un nucleótido marcado que se puede detectar. Opcionalmente, los nucleótidos marcados pueden incluir además una propiedad de terminación reversible que termina con una extensión cebadora adicional una vez se ha añadido un nucleótido a un cebador. Por ejemplo, se puede añadir un nucleótido análogo que tiene una fracción de terminación reversible a un cebador, tal que la extensión posterior no aparece hasta que se suministra un agente de desbloqueo para eliminar la fracción. Por tanto, para ejemplos que emplean terminaciones reversibles, se puede suministrar un agente de desbloqueo al flujo celular (antes o después de que aparezca la detección). Se pueden llevar a cabo lavados entre varias etapas de suministro. El ciclo se puede repetir a continuación n veces para extender el cebador mediante n nucleótidos, detectando de esta manera una secuencia de longitud n. Ejemplos de procedimientos de SBS, sistemas fluídicos y plataformas de detección que se pueden adaptar fácilmente para usar con una matriz producida mediante los métodos de la presente divulgación se describen, por ejemplo, en Bentley et al., *Nature* 456:53-59 (2008), WO 04/018497; WO 91/06678; WO 07/123744; Patentes US. N°s 7.057.026; 7.329.492; 7.211.414; 7.315.019 ó 7.405.281, y la Solicitud de Patente US Pub. Nº 2008/0108082 A1.

Se pueden emplear otros procedimientos de secuenciación que usan reacciones cíclicas, tal como la pirosecuenciación. La pirosecuenciación detecta la liberación de pirofosfato inorgánico (PPi) cuando se incorporan nucleótidos determinados en una hebra de ácido nucleico naciente (Ronaghi, et al., *Analytical Biochesmitry* 242(1), 84-9 (1996); Ronaghi, *Genome Res*. 11(1), 3-11 (2001); Ronaghi et al. *Science* 281(5375), 363 (1998); Pat. US N°s 6.210.891; 6.258.568 y 6.274.320). En la pirosecuenciación, la liberación de PPi se puede detectar convirtiéndose en adenosina trifosfato (ATP) mediante la ATP sulfurilasa, y el ATP resultante se puede detectar a través de los fotones producidos por la luciferasa. Por tanto, se puede monitorear la reacción de secuenciación a través de un sistema de detección de luminiscencia. En los procedimientos de pirosecuenciación no son necesarias las fuentes de radiación de excitación empleadas para los sistemas de detección basados en fluorescencia. Sistemas fluídicos, detectores y procedimientos útiles que se pueden emplear para la aplicación de la pirosecuenciación para matrices de la presente divulgación se describen, por ejemplo, en la Solicitud de Patente WIPO Ser. Nº PCT/US11/57111, la Solicitud de la Patente US Pub. Nº 2005/0191698 A1, Pat. US Nº 7.595.883, y la Pat. US Nº 7.244.559.

Algunos ejemplos pueden emplear métodos que implican monitorear la actividad de la ADN polimerasa en tiempo real. Por ejemplo, las incorporaciones de nucleótidos se pueden detectar a través de interacciones de transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET) entre una polimerasa que soporta un fluoróforo y nucleótidos marcados con γ-fosfato, o con una guía de ondas de modo cero. Técnicas y reactivos para la secuenciación basada en FRET se describen, por ejemplo, en Levene et al. *Science* 299, 682-686 (2003); Lundquist et al. *Opt. Lett.* 33, 1026-1028 (2008); Korlach et al. *Proc Natl. Acad. Sci.* EE.UU. 105, 1176-1181 (2008).

Algunos ejemplos de SBS incluyen la detección de un protón liberado en la incorporación de un nucleótido en un producto de extensión. Por ejemplo, la secuenciación basada en la detección de protones liberados se puede usar en detectores eléctricos y técnicas asociadas que están comercialmente disponibles en Ion Torrent (Guilford, CT, a Life Tecnologies subsidiary) o en métodos y sistemas de secuenciación descritos en las solicitudes de Patente US Pub. N°s 2009/0026082 A1; 2009/0127589 A1; 2010/0137143 A1; o 2010/0282617 A1.

Por consiguiente, en la presente memoria se presentan métodos para incorporar análogos de nucleótidos en el ADN permitiendo la interacción de los siguientes componentes: (i) una polimerasa modificada como se describe en la presente memoria, (ii) un molde de ADN; y (iii) una disolución de nucleótidos. En determinados ejemplos, el molde de ADN comprende un conjunto de grupos. En determinados ejemplos, los nucleótidos están modificados en el hidroxilo 3' del azúcar, e incluyen modificaciones en el hidroxilo 3' del azúcar tal que el sustituyente es de mayor tamaño que el que aparece de manera natural en el grupo hidroxilo 3'.

Ácidos nucleicos que codifican polimerasas modificadas

Otras moléculas de ácidos nucleicos que se presentan en la presente memoria codifican las polimerasas modificadas presentadas en la presente memoria. Para cualquier polimerasa modificada dada la cual es una versión mutante de una polimerasa para la que se conoce la secuencia de aminoácidos, y preferiblemente también la secuencia de nucleótidos de tipo salvaje que codifica la polimerasa, es posible obtener una secuencia de nucleótidos que codifica el mutante según los principios básicos de la biología molecular. Por ejemplo, dado que se conoce la secuencia de nucleótidos de tipo salvaje que codifica la polimerasa 9ºN, es posible deducir una secuencia de nucleótidos que codifica cualquier versión mutante dada de la 9ºN que tenga una o más sustituciones de aminoácidos empleando el código genético estándar. De manera similar, las secuencias de nucleótidos pueden derivarse fácilmente para versiones mutantes de otras polimerasas, tal como, por ejemplo, Vent™, Pfu, Tsp JDF-3, Taq, etc. Se pueden construir después moléculas de ácidos nucleicos que tienen secuencias de nucleótidos requeridas empleando técnicas de biología molecular estándar conocidas en la técnica.

De acuerdo con la presente divulgación, ácidos nucleicos determinados incluyen no sólo ácidos nucleicos idénticos sino también cualquier pequeña variación que incluye, en particular, sustituciones en casos en los que resulta en un codon sinónimo (un codon diferente que determina el mismo resto aminoácido) debido al código degenerado en las sustituciones de aminoácidos conservativas. El término “secuencia de ácidos nucleicos” incluye también la secuencia complementaria de cualquier secuencia monocatenaria dada con respecto a las variaciones base.

Las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente memoria pueden incluir también, de manera ventajosa, un vector de expresión adecuado para expresar las proteínas de polimerasa codificadas en él en un huésped adecuado. La incorporación de ADN clonado en un vector de expresión adecuado para la posterior transformación de dicha célula y selección posterior de las células transformadas, es bien conocida por los expertos en la técnica como se proporciona en Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory.

Tal vector de expresión incluye un vector que tiene un ácido nucleico como se presenta en la presente memoria unido de manera operativa a secuencias reguladoras, tal como regiones promotoras, que son capaces de efectuar la expresión de dichos fragmentos de ADN. El término “unido de manera operativa” se refiere a una yuxtaposición en donde los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar de una forma dirigida. Tales vectores se pueden transformar en una célula huésped adecuada para proporcionar la expresión de una proteína según la presente divulgación.

La molécula de ácido nucleico puede codificar una proteína madura o una proteína que tiene una prosecuencia, incluyendo que codifica una secuencia líder sobre la preproteína que se separa después por la célula hospedadora para formar una proteína madura. Los vectores pueden ser, por ejemplo, vectores de plásmidos, virus o fagos provistos con un origen de replicación, y opcionalmente, un promotor para la expresión de dicho nucleótido, y opcionalmente un regulador del promotor. Los vectores pueden contener uno o más marcadores seleccionables, tal como, por ejemplo, un gen de resistencia a antibiótico.

Elementos reguladores requeridos para la expresión incluyen a secuencias promotoras para unir la ARN polimerasa y para dirigir un nivel de inicio de transcripción adecuado, y también secuencias de iniciación de la traducción para la unión al ribosoma. Por ejemplo, un vector de expresión bacteriano puede incluir un promotor tal como el promotor lac, y la secuencia Shine-Dalgarno para la iniciación de la traducción, y el codon de inicio AUG. De manera similar, un vector de expresión eucariota puede incluir un promotor homólogo o heterólogo para la ARN polimerasa II, una señal de poliadenilación hacia abajo, el codon de inicio AUG, y un codón de terminación para la separación del ribosoma. Tales vectores se pueden obtener comercialmente o se pueden ensamblar a partir de las secuencias descritas mediante métodos bien conocidos en la técnica.

La transcripción del ADN que codifica la polimerasa por eucariotas superiores se puede optimizar mediante la inclusión en el vector de una secuencia potenciadora. Los potenciadores son elementos que actúan en posición cis del ADN que actúan en un promotor para incrementar el nivel de transcripción. Los vectores generalmente incluirán también orígenes de replicación además de marcadores seleccionables.

Ejemplos

Ejemplo 1

Métodos y condiciones de ensayo general

Los siguientes párrafos describen las condiciones de ensayo general empleados en los Ejemplos presentados a continuación.

1. Ensayo basado en gel

Esta sección describe un ensayo basado en gel empleado en los ejemplos de a continuación para monitorear la actividad pirofosforolítica de una polimerasa.

En resumen, la actividad pirofosforolítica de un ejemplo de polimerasa modificada se midió mediante el mezclado de enzima 300 nM y duplo de molde de ADN del cebador con diferentes concentraciones (0, 0,125, 0,25, 0,5, 1, 2, y 4 mM) de pirofosfato sódico, respectivamente, en la reacción tampón que contiene: Tris-HCl 50 mM (pH 9,0), NaCl 50 mM, EDTA 1 mM, $MgSO_4$ 6 mM, y Tween-20 0,05% (v/v). Las reacciones se realizaron a 55ºC durante 1 minuto, y se pararon mediante adición de un volumen igual de disolución de enfriado 2X que contiene bromofenol azul 0,025%, EDTA 30 mM y formamida desionizada al 95%.

Los productos de reacción se desnaturalizaron a 95ºC durante 5 minutos y se dispusieron en electroforesis de gel de urea-poliacrilamida 7M 15% (urea-PAGE). Los resultados se visualizaron mediante escaneo del gel con el PhosphorImager 8000 GE Healthcare Typhoon.

El duplo del molde del cebador se formó mediante la re-asociación de los siguientes oligonucleótidos:

Cebador: 5'-GCTTGCACAGGTGCGTTCGT*-3'

Molde: 5'-CGTTAGTCCACGAACGCACCTGTGCAAGC-3'

Este cebador comprende un tinte fluorescente 6-carboxitetrametilrodamina (TAMRA) unido al 5' terminal del oligonucléotido. El último "T*" contiene un resto de bloqueo 3'-O azido metilo en el nucleótido. Las líneas indican degradación del cebador marcado indicando mejora de la pirofosforolisis (reacción inversa de la polimerización de ADN) en comparación con el control.

2. Clonación y expresión de polimerasas

Esta sección describe el planteamiento empleado para la clonación y la expresión de varias de las polimerasas mutantes empleadas en los Ejemplos de a continuación.

Se realizó la mutagénesis en el gen que codifica la estructura de la secuencia génica para la polimerasa empleando metodología estándar de mutagénesis dirigida al sitio. Para cada mutación realizada, se confirmó la secuencia adecuada de los genes mutados mediante secuenciación de la secuencia génica clonada.

Los genes de la polimerasa se subclonaron en un vector pET11a y se transformó en células de expresión BL21 Star (DE3) de Invitrogen. Las células transformadas se cultivaron a 37ºC en 2,8 L de matraces Fernbock hasta que se alcanzó una OD600 de 0,8. La expresión de proteínas se indujo después mediante la adición de IPTG 1 mM, seguido de 3 horas de crecimiento adicional. Los cultivos se centrifugaron a continuación a 7000 rpm durante 20 minutos. Los sedimentos celulares se almacenaron a -20ºC hasta la purificación.

Se realizó la lisis de células bacterianas mediante la resuspensión de los cultivos congelados en tampón de lisis 10x p/v (Tris pH 7,5, NaCl 500 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM). Se añadió EDTA libre del inhibidor proteasa (Roche) al sedimento celular resuspendido. Se realizaron todas las etapas de lisis y purificación a 4ºC. El cultivo resuspendido se hizo pasar a través de un microfluidificador cuatro veces para completar la lisis celular. El lisado se centrifugó después a 20.000 rpm durante 20 minutos para eliminar el resto celular. Se añadió polietilenimina (concentración final de 0,5%) al sobrenadante lentamente con agitación durante 45 minutos para precipitar el ácido nucleico bacteriano. El lisado se centrifugó a 20.000 rpm durante 20 minutos; el sedimento se descartó. El lisado se precipitó después con sulfato de amonio empleando dos volúmenes de (NH4)2SO4 saturado frío en dH2O estéril (agua destilada). La proteína precipitada se centrifugó a 20.000 rpm durante 20 minutos. Los sedimentos de la proteína se resuspendieron en 250 mL de tampón A (Tris 50 mM pH 7,5, KCl 50 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 1 mM). El lisado resuspendido se purificó entonces empleando una columna de Flujo rápido SP de 5 mL (GE) pre-equilibrada en tampón A. La columna se eluyó empleando un gradiente de KCL de 50 mL de 0,1 a 1M. Las fracciones pico se agruparon y se diluyeron con tampón C (Tris pH 7,5, EDTA 0,1 mM, DTT 1 mM) hasta que la conductividad fue igual al del tampón D (Tris pH 7,5, KCl 50 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 1 mM). Las fracciones agrupadas se cargaron luego en 5 mL de una columna de Heparina de Flujo rápido HiTrap. La polimerasa se eluyó después empleando un gradiente 100 mL de KC de 50 mM a 1 M. Las fracciones pico se agruparon, se dializaron en un tampón de almacenamiento (Tris 20 mM pH 7,5, KCl 300 mM, EDTA 0,1 mM, Glicerol 50%) y se congelaron a -80ºC.

3. Análisis de pre-introducción/introducción

Esta sección describe el planteamiento empleado para analizar el rendimiento de las polimerasas mutantes empleadas en los Ejemplos de a continuación en una secuenciación mediante ensayo de síntesis.

Se emplearon experimentos de secuenciación de 12 ciclos cortos para generar los valores de pre-introducción e introducción. Los experimentos se llevaron a cabo en un sistema Analizador del genoma Illumina que se convirtió en un sistema de una sola línea de funcionamiento de química rápida MiSeq (Illumina, Inc., San Diego, CA), según las instrucciones del fabricante. Por ejemplo, para cada polimerasa, se generaron mezclas de incorporación separada (IMX) y se realizaron ciclos de 4 x 12 empleando una posición diferente para cada IMX. Se emplearon formulaciones del reactivo MiSeq estándar, con la polimerasa estándar sustituida con la polimerasa que se está ensayando. La biblioteca de ADN empleada se realizó siguiendo el protocolo HT TruSeq del ADN genómico PhiX (suministrado

como control con reactivos Illumina). El programa informático Illumina RTA se empleó para evaluar los niveles de pre-introducción e introducción.

Ejemplo 2

Identificación y cribado de mutantes de polimerasa 9ºN para la pre-introducción/introducción

Se realizó un cribado de los restos en el bolsillo de bloqueo 3' de la mutagénesis de saturación. Los restos seleccionados para la mutación se identificaron en base a la interacción prevista con el grupo de bloqueo 3' de un nucleótido modificado, como se representa en general en la Figura 2. Se generaron, clonaron, expresaron y purificaron mutaciones para una secuencia estructural de la polimerasa 9ºN modificada (SEQ ID NO:30) como se describe en general en el Ejemplo 1.

Las polimerasas mutantes purificadas se cribaron por sus cinéticas empleando el ensayo basado en gel descrito anteriormente en el Ejemplo 1 y se compararon con la polimerasa control que tiene la secuencia establecida en SEQ ID NO:30. De estos mutantes que se examinaron, se ensayó además un grupo de mutantes, incluyendo los mutantes de a continuación, para la actividad de la pre-introducción/introducción como se describe anteriormente en el Ejemplo 1.

Los resultados del cribado se muestran en la Figura 5 y se resumen en la tabla de abajo. Como se muestra en la tabla, cada uno de los mutantes anteriores mostraron inesperadas y significativas mejoras en una o más de las fases de pre-introducción e introducción cuando se compararon con la polimerasa control, Pol812.

Mutación (nombre)	SEQ ID NO:	¿Reducción de la introducción en comparación con el control?
Control (Pol812)	30	-
T514A (Pol951)	32	Sí
T514S (Pol952)	32	Sí
I521L (Pol953)	33	Sí
T514A/I521L (Pol955)	34	Sí
T514S/I521L (Pol957)	34	Sí

Ejemplo 3

Cribado de mutantes de polimerasa 9ºN WT

Se generaron, clonaron, expresaron y purificaron mutaciones de una secuencia estructural (SEQ ID NO: 5) de polimerasa 9ºN-7 (9ºN) de tipo salvaje (WT) de *Thermococcus sp.* como se describe de manera general en el Ejemplo 1, produciendo enzimas de polimerasa que tienen las secuencias de aminoácidos como se establecen en SEQ ID NOS: 6-8.

Se ensayaron las cinéticas de las polimerasas mutantes purificadas empleando el ensayo basado en gel descrito anteriormente en el Ejemplo 1 y se comparó con la polimerasa control que tiene la secuencia establecida en SEQ ID NO: 5. De estos mutantes que se examinaron, se ensayó además un grupo de mutantes para la actividad de la pre-introducción/introducción como se describe en general anteriormente en el Ejemplo 1. Las polimerasas que tienen las siguientes mutaciones mostraron tener una mejor actividad de pre-introducción y/o introducción en comparación con la polimerasa control: T514A, T514S, I521L, T514A/I521L y T514S/I521L.

Ejemplo 4

Cribado de mutantes de Exo$^-$ polimerasa 9ºN

Se generaron, clonaron, expresaron y purificaron mutaciones de una secuencia estructural de Exo$^-$ polimerasa 9ºN (SEQ ID NO: 9) como se describe de manera general en el Ejemplo 1, produciendo enzimas de polimerasa que tienen las secuencias de aminoácidos como se establecen en SEQ ID NOS: 10-12.

Se ensayaron las cinéticas de las polimerasas mutantes purificadas empleando el ensayo basado en gel descrito anteriormente en el Ejemplo 1 y se comparó con la polimerasa control que tiene la secuencia establecida en SEQ ID NO: 9. De estos mutantes que se examinaron, se ensayó además un grupo de mutantes para la actividad de la pre-introducción/introducción como se describe en general anteriormente en el Ejemplo 1. Las polimerasas que tienen

las siguientes mutaciones mostraron tener una mejor actividad de pre-introducción y/o introducción en comparación con la polimerasa control: T514A, T514S, I521L, T514A/I521L y T514S/I521L.

Ejemplo 5

Cribado de mutantes de la polimerasa 9ºN modificada

Se generaron, clonaron, expresaron y purificaron mutaciones de una secuencia estructural de la polimerasa 9ºN modificada (SEQ ID NO: 13) como se describe de manera general en el Ejemplo 1, produciendo enzimas de polimerasa que tienen las secuencias de aminoácidos como se establecen en SEQ ID NOS: 14-16.

Se ensayaron las cinéticas de las polimerasas mutantes purificadas empleando el ensayo basado en gel descrito anteriormente en el Ejemplo 1 y se comparó con la polimerasa control que tiene la secuencia establecida en SEQ ID NO: 13. De estos mutantes que se examinaron, se ensayó además un grupo de mutantes para la actividad de la pre-introducción/introducción como se describe en general anteriormente en el Ejemplo 1. Las polimerasas que tienen las siguientes mutaciones mostraron tener una mejor actividad de pre-introducción y/o introducción en comparación con la polimerasa control: T514A, T514S, I521L, T514A/I521L y T514S/I521L.

Ejemplo 6

Cribado de mutantes de Exo$^-$ polimerasa Pfu

En base al análisis del alineamiento secuencial de la secuencia estructural de la polimerasa 9ºN (véase la Figura 3), se generaron, clonaron, expresaron y purificaron mutaciones específicas de una secuencia estructural de Exo$^-$ polimerasa para *Pyrococcus furiosus* (Pfu) (SEQ ID NO: 17) como se describe de manera general en el Ejemplo 1, produciendo enzimas de polimerasa que tienen las secuencias de aminoácidos como se establecen en SEQ ID NOS: 18-20.

Se ensayaron las cinéticas de las polimerasas mutantes purificadas empleando el ensayo basado en gel descrito anteriormente en el Ejemplo 1 y se comparó con la polimerasa control que tiene la secuencia establecida en SEQ ID NO: 17. De estos mutantes que se examinaron, se ensayó además un grupo de mutantes para la actividad de la pre-introducción/introducción como se describe en general anteriormente en el Ejemplo 1. Las polimerasas que tienen las siguientes mutaciones mostraron tener una mejor actividad de pre-introducción y/o introducción en comparación con la polimerasa control: T514A, T514S, I521L, T514A/I521L y T514S/I521L.

Ejemplo 7

Cribado de mutantes de Exo$^-$ polimerasa KOD1

En base al análisis del alineamiento secuencial de la secuencia estructural de la polimerasa 9ºN (véase la Figura 3), se generaron, clonaron, expresaron y purificaron mutaciones específicas de una secuencia estructural de Exo$^-$ polimerasa para *Thermococcus kodakaraensis* (KOD1) (SEQ ID NO: 21) como se describe de manera general en el Ejemplo 1, produciendo enzimas de polimerasa que tienen las secuencias de aminoácidos como se establecen en SEQ ID NOS: 22-24.

Se ensayaron las cinéticas de las polimerasas mutantes purificadas empleando el ensayo basado en gel descrito anteriormente en el Ejemplo 1 y se comparó con la polimerasa control que tienen la secuencia establecida en SEQ ID NO: 21. De estos mutantes que se examinaron, se ensayó además un grupo de mutantes para la actividad de la pre-introducción/introducción como se describe en general anteriormente en el Ejemplo 1. Las polimerasas que tienen las siguientes mutaciones mostraron tener una mejor actividad de pre-introducción y/o introducción en comparación con la polimerasa control: T514A, T514S, I521L, T514A/I521L y T514S/I521L.

Ejemplo 8

Cribado de mutantes de Exo$^-$ polimerasa MMS2

En base al análisis del alineamiento secuencial de la secuencia estructural de la polimerasa 9ºN (véase la Figura 3), se identificaron mutaciones específicas de una secuencia estructural de Exo$^-$ polimerasa para *Methanococcus maripaludis* (MMS2) (SEQ ID NO: 25) en base a la homología con un alineamiento con la polimerasa 9ºN (véase la Figura 4). Las mutaciones se generaron, clonaron, expresaron y purificaron como se describe de manera general en el Ejemplo 1, produciendo enzimas de polimerasa que tienen las secuencias de aminoácidos como se establecen en SEQ ID NOS: 26-28.

Se ensayaron las cinéticas de las polimerasas mutantes purificadas empleando el ensayo basado en gel descrito anteriormente en el Ejemplo 1 y se comparó con la polimerasa control que tienen la secuencia establecida en SEQ ID NO: 25. De estos mutantes que se examinaron, se ensayó además un grupo de mutantes para la actividad de la pre-introducción/introducción como se describe en general anteriormente en el Ejemplo 1. Las polimerasas que tienen las siguientes mutaciones mostraron tener una mejor actividad de pre-introducción y/o introducción en comparación con la polimerasa control: T530A, T530S, I537L, T530A/I537L y T530S/I537L.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Illumina, Inc.

<120> POLIMERASAS MODIFICADAS PARA UNA MEJOR INCORPORACIÓN DE ANÁLOGOS DE NUCLEÓTIDOS.

<130> IP-0660-PCT

<160> 34

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 10
<212> PRT
<213> Varias especies

<220>
<221> VARIANTE
<222> (2)..(2)
<223> X= V, I, A

<220>
<221> VARIANTE
<222> (8)..(8)
<223> X= E, D, Q, K, T, Y, S, H, D

<220>
<221> VARIANTE
<222> (9)..(9)
<223> X= Y, F, L

<400> 1
Ser Xaa Thr Ala Trp Gly Arg Xaa Xaa Ile
1 5 10

<210> 2
<211> 10
<212> PRT
<213> Varios incluyendo Thermococcus sp. o Pyrococcus sp.

<220>
<221> VARIANTE
<222> (8)..(8)
<223> X= E, K

<400> 2
Ser Val Thr Ala Trp Gly Arg Xaa Tyr Ile
1 5 10

<210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> Varios incluyendo Thermococcus sp. 9 N-7

<400> 3
Ser Val Thr Ala Trp Gly Arg Glu Tyr Ile
1 5 10

<210> 4
<211> 13
<212> PRT
<213> Varios

<220>
<221> VARIANTE
<222> (4)..(4)
<223> X= cualquier aminoácido

<220>
<221> VARIANTE
<222> (5)..(5)
<223> X= cualquier aminoácido

<220>
<221> VARIANTE
<222> (7)..(7)
<223> X= cualquier aminoácido

<220>
<221> VARIANTE
<222> (8)..(8)
<223> X= cualquier aminoácido

<220>
<221> VARIANTE
<222> (11)..(11)
<223> X= cualquier aminoácido

<400> 4
Cys Ala Glu Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Gly Arg Xaa Tyr Ile
1 5 10

<210> 5
<211> 775
<212> PRT
<213> Thermococcus sp. 9 N-7

<400> 5
Met Ile Leu Asp Thr Asp Tyr Ile Thr Glu Asn Gly Lys Pro Val Ile
1 5 10 15

Arg Val Phe Lys Lys Glu Asn Gly Glu Phe Lys Ile Glu Tyr Asp Arg
20 25 30

Thr Phe Glu Pro Tyr Phe Tyr Ala Leu Leu Lys Asp Asp Ser Ala Ile
35 40 45

Glu Asp Val Lys Lys Val Thr Ala Lys Arg His Gly Thr Val Val Lys
50 55 60

Val Lys Arg Ala Glu Lys Val Gln Lys Lys Phe Leu Gly Arg Pro Ile
65 70 75 80

Glu Val Trp Lys Leu Tyr Phe Asn His Pro Gln Asp Val Pro Ala Ile
85 90 95

Arg Asp Arg Ile Arg Ala His Pro Ala Val Val Asp Ile Tyr Glu Tyr
100 105 110

Asp Ile Pro Phe Ala Lys Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Gly Leu Ile Pro
115 120 125

Met Glu Gly Asp Glu Glu Leu Thr Met Leu Ala Phe Asp Ile Glu Thr
130 135 140

Leu Tyr His Glu Gly Glu Glu Phe Gly Thr Gly Pro Ile Leu Met Ile
145 150 155 160

Ser Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Ala Arg Val Ile Thr Trp Lys Lys Ile
165 170 175

Asp Leu Pro Tyr Val Asp Val Val Ser Thr Glu Lys Glu Met Ile Lys
180 185 190

Arg Phe Leu Arg Val Val Arg Glu Lys Asp Pro Asp Val Leu Ile Thr
195 200 205

Tyr Asn Gly Asp Asn Phe Asp Phe Ala Tyr Leu Lys Lys Arg Cys Glu
210 215 220

Glu Leu Gly Ile Lys Phe Thr Leu Gly Arg Asp Gly Ser Glu Pro Lys
225 230 235 240

Ile Gln Arg Met Gly Asp Arg Phe Ala Val Glu Val Lys Gly Arg Ile
245 250 255

His Phe Asp Leu Tyr Pro Val Ile Arg Arg Thr Ile Asn Leu Pro Thr
260 265 270

Tyr Thr Leu Glu Ala Val Tyr Glu Ala Val Phe Gly Lys Pro Lys Glu
275 280 285

Lys Val Tyr Ala Glu Glu Ile Ala Gln Ala Trp Glu Ser Gly Glu Gly
290 295 300

Leu Glu Arg Val Ala Arg Tyr Ser Met Glu Asp Ala Lys Val Thr Tyr

305 310 315 320

Glu Leu Gly Arg Glu Phe Phe Pro Met Glu Ala Gln Leu Ser Arg Leu
325 330 335

Ile Gly Gln Ser Leu Trp Asp Val Ser Arg Ser Ser Thr Gly Asn Leu
340 345 350

Val Glu Trp Phe Leu Leu Arg Lys Ala Tyr Lys Arg Asn Glu Leu Ala
355 360 365

Pro Asn Lys Pro Asp Glu Arg Glu Leu Ala Arg Arg Arg Gly Gly Tyr
370 375 380

Ala Gly Gly Tyr Val Lys Glu Pro Glu Arg Gly Leu Trp Asp Asn Ile
385 390 395 400

Val Tyr Leu Asp Phe Arg Ser Leu Tyr Pro Ser Ile Ile Ile Thr His
405 410 415

Asn Val Ser Pro Asp Thr Leu Asn Arg Glu Gly Cys Lys Glu Tyr Asp
420 425 430

Val Ala Pro Glu Val Gly His Lys Phe Cys Lys Asp Phe Pro Gly Phe
435 440 445

Ile Pro Ser Leu Leu Gly Asp Leu Leu Glu Glu Arg Gln Lys Ile Lys
450 455 460

Arg Lys Met Lys Ala Thr Val Asp Pro Leu Glu Lys Lys Leu Leu Asp
465 470 475 480

Tyr Arg Gln Arg Ala Ile Lys Ile Leu Ala Asn Ser Phe Tyr Gly Tyr
485 490 495

Tyr Gly Tyr Ala Lys Ala Arg Trp Tyr Cys Lys Glu Cys Ala Glu Ser
500 505 510

Val Thr Ala Trp Gly Arg Glu Tyr Ile Glu Met Val Ile Arg Glu Leu
515 520 525

Glu Glu Lys Phe Gly Phe Lys Val Leu Tyr Ala Asp Thr Asp Gly Leu
530 535 540

His Ala Thr Ile Pro Gly Ala Asp Ala Glu Thr Val Lys Lys Lys Ala
545 550 555 560

Lys Glu Phe Leu Lys Tyr Ile Asn Pro Lys Leu Pro Gly Leu Leu Glu
565 570 575

Leu Glu Tyr Glu Gly Phe Tyr Val Arg Gly Phe Phe Val Thr Lys Lys
580 585 590

Lys Tyr Ala Val Ile Asp Glu Glu Gly Lys Ile Thr Thr Arg Gly Leu
595 600 605

Glu Ile Val Arg Arg Asp Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu Thr Gln Ala
610 615 620

Arg Val Leu Glu Ala Ile Leu Lys His Gly Asp Val Glu Glu Ala Val
625 630 635 640

Arg Ile Val Lys Glu Val Thr Glu Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Val Pro
645 650 655

Pro Glu Lys Leu Val Ile His Glu Gln Ile Thr Arg Asp Leu Arg Asp
660 665 670

Tyr Lys Ala Thr Gly Pro His Val Ala Val Ala Lys Arg Leu Ala Ala
675 680 685

Arg Gly Val Lys Ile Arg Pro Gly Thr Val Ile Ser Tyr Ile Val Leu
690 695 700

Lys Gly Ser Gly Arg Ile Gly Asp Arg Ala Ile Pro Ala Asp Glu Phe
705 710 715 720

Asp Pro Thr Lys His Arg Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln
725 730 735

Val Leu Pro Ala Val Glu Arg Ile Leu Lys Ala Phe Gly Tyr Arg Lys
740 745 750

Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Lys Gln Val Gly Leu Gly Ala Trp
755 760 765

Leu Lys Val Lys Gly Lys Lys
770 775

<210> 6
<211> 775
<212> PRT
<213> Thermococcus sp. 9 N-7

<220>
<221> VARIANTE
<222> (514)..(514)
<223> X= A, S

<400> 6

Met Ile Leu Asp Thr Asp Tyr Ile Thr Glu Asn Gly Lys Pro Val Ile
1 5 10 15

Arg Val Phe Lys Lys Glu Asn Gly Glu Phe Lys Ile Glu Tyr Asp Arg
20 25 30

Thr Phe Glu Pro Tyr Phe Tyr Ala Leu Leu Lys Asp Asp Ser Ala Ile
35 40 45

Glu Asp Val Lys Lys Val Thr Ala Lys Arg His Gly Thr Val Val Lys
50 55 60

Val Lys Arg Ala Glu Lys Val Gln Lys Lys Phe Leu Gly Arg Pro Ile
65 70 75 80

Glu Val Trp Lys Leu Tyr Phe Asn His Pro Gln Asp Val Pro Ala Ile
85 90 95

Arg Asp Arg Ile Arg Ala His Pro Ala Val Val Asp Ile Tyr Glu Tyr
100 105 110

Asp Ile Pro Phe Ala Lys Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Gly Leu Ile Pro
115 120 125

Met Glu Gly Asp Glu Glu Leu Thr Met Leu Ala Phe Asp Ile Glu Thr
130 135 140

Leu Tyr His Glu Gly Glu Glu Phe Gly Thr Gly Pro Ile Leu Met Ile
145 150 155 160

Ser Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Ala Arg Val Ile Thr Trp Lys Lys Ile
165 170 175

Asp Leu Pro Tyr Val Asp Val Val Ser Thr Glu Lys Glu Met Ile Lys
180 185 190

Arg Phe Leu Arg Val Val Arg Glu Lys Asp Pro Asp Val Leu Ile Thr
195 200 205

Tyr Asn Gly Asp Asn Phe Asp Phe Ala Tyr Leu Lys Lys Arg Cys Glu
210 215 220

Glu Leu Gly Ile Lys Phe Thr Leu Gly Arg Asp Gly Ser Glu Pro Lys

225 230 235 240

Ile Gln Arg Met Gly Asp Arg Phe Ala Val Glu Val Lys Gly Arg Ile
245 250 255

His Phe Asp Leu Tyr Pro Val Ile Arg Arg Thr Ile Asn Leu Pro Thr
260 265 270

Tyr Thr Leu Glu Ala Val Tyr Glu Ala Val Phe Gly Lys Pro Lys Glu
275 280 285

Lys Val Tyr Ala Glu Glu Ile Ala Gln Ala Trp Glu Ser Gly Glu Gly
290 295 300

Leu Glu Arg Val Ala Arg Tyr Ser Met Glu Asp Ala Lys Val Thr Tyr
305 310 315 320

Glu Leu Gly Arg Glu Phe Phe Pro Met Glu Ala Gln Leu Ser Arg Leu
325 330 335

Ile Gly Gln Ser Leu Trp Asp Val Ser Arg Ser Ser Thr Gly Asn Leu
340 345 350

Val Glu Trp Phe Leu Leu Arg Lys Ala Tyr Lys Arg Asn Glu Leu Ala
355 360 365

Pro Asn Lys Pro Asp Glu Arg Glu Leu Ala Arg Arg Arg Gly Gly Tyr
370 375 380

Ala Gly Gly Tyr Val Lys Glu Pro Glu Arg Gly Leu Trp Asp Asn Ile
385 390 395 400

Val Tyr Leu Asp Phe Arg Ser Leu Tyr Pro Ser Ile Ile Ile Thr His
405 410 415

Asn Val Ser Pro Asp Thr Leu Asn Arg Glu Gly Cys Lys Glu Tyr Asp
420 425 430

Val Ala Pro Glu Val Gly His Lys Phe Cys Lys Asp Phe Pro Gly Phe
435 440 445

Ile Pro Ser Leu Leu Gly Asp Leu Leu Glu Glu Arg Gln Lys Ile Lys
450 455 460

Arg Lys Met Lys Ala Thr Val Asp Pro Leu Glu Lys Lys Leu Leu Asp
465 470 475 480

Tyr Arg Gln Arg Ala Ile Lys Ile Leu Ala Asn Ser Phe Tyr Gly Tyr
485 490 495

Tyr Gly Tyr Ala Lys Ala Arg Trp Tyr Cys Lys Glu Cys Ala Glu Ser
500 505 510

Val Xaa Ala Trp Gly Arg Glu Tyr Ile Glu Met Val Ile Arg Glu Leu
515 520 525

Glu Glu Lys Phe Gly Phe Lys Val Leu Tyr Ala Asp Thr Asp Gly Leu
530 535 540

His Ala Thr Ile Pro Gly Ala Asp Ala Glu Thr Val Lys Lys Lys Ala
545 550 555 560

Lys Glu Phe Leu Lys Tyr Ile Asn Pro Lys Leu Pro Gly Leu Leu Glu
565 570 575

Leu Glu Tyr Glu Gly Phe Tyr Val Arg Gly Phe Phe Val Thr Lys Lys
580 585 590

Lys Tyr Ala Val Ile Asp Glu Glu Gly Lys Ile Thr Thr Arg Gly Leu
595 600 605

Glu Ile Val Arg Arg Asp Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu Thr Gln Ala
610 615 620

Arg Val Leu Glu Ala Ile Leu Lys His Gly Asp Val Glu Glu Ala Val
625 630 635 640

Arg Ile Val Lys Glu Val Thr Glu Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Val Pro
645 650 655

Pro Glu Lys Leu Val Ile His Glu Gln Ile Thr Arg Asp Leu Arg Asp
660 665 670

Tyr Lys Ala Thr Gly Pro His Val Ala Val Ala Lys Arg Leu Ala Ala
675 680 685

Arg Gly Val Lys Ile Arg Pro Gly Thr Val Ile Ser Tyr Ile Val Leu
690 695 700

Lys Gly Ser Gly Arg Ile Gly Asp Arg Ala Ile Pro Ala Asp Glu Phe
705 710 715 720

Asp Pro Thr Lys His Arg Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln
725 730 735

Val Leu Pro Ala Val Glu Arg Ile Leu Lys Ala Phe Gly Tyr Arg Lys
740 745 750

Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Lys Gln Val Gly Leu Gly Ala Trp
755 760 765

Leu Lys Val Lys Gly Lys Lys
770 775

<210> 7
<211> 775
<212> PRT
<213> Thermococcus sp. 9 N-7

<220>
<221> VARIANTE
<222> (521)..(521)
<223> X=L

<400> 7
Met Ile Leu Asp Thr Asp Tyr Ile Thr Glu Asn Gly Lys Pro Val Ile
1 5 10 15

Arg Val Phe Lys Lys Glu Asn Gly Glu Phe Lys Ile Glu Tyr Asp Arg
20 25 30

Thr Phe Glu Pro Tyr Phe Tyr Ala Leu Leu Lys Asp Asp Ser Ala Ile
35 40 45

Glu Asp Val Lys Lys Val Thr Ala Lys Arg His Gly Thr Val Val Lys
50 55 60

Val Lys Arg Ala Glu Lys Val Gln Lys Lys Phe Leu Gly Arg Pro Ile
65 70 75 80

Glu Val Trp Lys Leu Tyr Phe Asn His Pro Gln Asp Val Pro Ala Ile
85 90 95

Arg Asp Arg Ile Arg Ala His Pro Ala Val Val Asp Ile Tyr Glu Tyr
100 105 110

Asp Ile Pro Phe Ala Lys Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Gly Leu Ile Pro
115 120 125

Met Glu Gly Asp Glu Glu Leu Thr Met Leu Ala Phe Asp Ile Glu Thr
130 135 140

Leu Tyr His Glu Gly Glu Glu Phe Gly Thr Gly Pro Ile Leu Met Ile

145 150 155 160

Ser Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Ala Arg Val Ile Thr Trp Lys Lys Ile
165 170 175

Asp Leu Pro Tyr Val Asp Val Val Ser Thr Glu Lys Glu Met Ile Lys
180 185 190

Arg Phe Leu Arg Val Val Arg Glu Lys Asp Pro Asp Val Leu Ile Thr
195 200 205

Tyr Asn Gly Asp Asn Phe Asp Phe Ala Tyr Leu Lys Lys Arg Cys Glu
210 215 220

Glu Leu Gly Ile Lys Phe Thr Leu Gly Arg Asp Gly Ser Glu Pro Lys
225 230 235 240

Ile Gln Arg Met Gly Asp Arg Phe Ala Val Glu Val Lys Gly Arg Ile
245 250 255

His Phe Asp Leu Tyr Pro Val Ile Arg Arg Thr Ile Asn Leu Pro Thr
260 265 270

Tyr Thr Leu Glu Ala Val Tyr Glu Ala Val Phe Gly Lys Pro Lys Glu
275 280 285

Lys Val Tyr Ala Glu Glu Ile Ala Gln Ala Trp Glu Ser Gly Glu Gly
290 295 300

Leu Glu Arg Val Ala Arg Tyr Ser Met Glu Asp Ala Lys Val Thr Tyr
305 310 315 320

Glu Leu Gly Arg Glu Phe Phe Pro Met Glu Ala Gln Leu Ser Arg Leu
325 330 335

Ile Gly Gln Ser Leu Trp Asp Val Ser Arg Ser Ser Thr Gly Asn Leu
340 345 350

Val Glu Trp Phe Leu Leu Arg Lys Ala Tyr Lys Arg Asn Glu Leu Ala
355 360 365

Pro Asn Lys Pro Asp Glu Arg Glu Leu Ala Arg Arg Arg Gly Gly Tyr
370 375 380

Ala Gly Gly Tyr Val Lys Glu Pro Glu Arg Gly Leu Trp Asp Asn Ile
385 390 395 400

Val Tyr Leu Asp Phe Arg Ser Leu Tyr Pro Ser Ile Ile Ile Thr His
405 410 415

Asn Val Ser Pro Asp Thr Leu Asn Arg Glu Gly Cys Lys Glu Tyr Asp
420 425 430

Val Ala Pro Glu Val Gly His Lys Phe Cys Lys Asp Phe Pro Gly Phe
435 440 445

Ile Pro Ser Leu Leu Gly Asp Leu Leu Glu Glu Arg Gln Lys Ile Lys
450 455 460

Arg Lys Met Lys Ala Thr Val Asp Pro Leu Glu Lys Lys Leu Leu Asp
465 470 475 480

Tyr Arg Gln Arg Ala Ile Lys Ile Leu Ala Asn Ser Phe Tyr Gly Tyr
485 490 495

Tyr Gly Tyr Ala Lys Ala Arg Trp Tyr Cys Lys Glu Cys Ala Glu Ser
500 505 510

Val Thr Ala Trp Gly Arg Glu Tyr Xaa Glu Met Val Ile Arg Glu Leu
515 520 525

Glu Glu Lys Phe Gly Phe Lys Val Leu Tyr Ala Asp Thr Asp Gly Leu
530 535 540

His Ala Thr Ile Pro Gly Ala Asp Ala Glu Thr Val Lys Lys Lys Ala
545 550 555 560

Lys Glu Phe Leu Lys Tyr Ile Asn Pro Lys Leu Pro Gly Leu Leu Glu
565 570 575

Leu Glu Tyr Glu Gly Phe Tyr Val Arg Gly Phe Phe Val Thr Lys Lys
580 585 590

Lys Tyr Ala Val Ile Asp Glu Glu Gly Lys Ile Thr Thr Arg Gly Leu
595 600 605

Glu Ile Val Arg Arg Asp Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu Thr Gln Ala
610 615 620

Arg Val Leu Glu Ala Ile Leu Lys His Gly Asp Val Glu Glu Ala Val
625 630 635 640

Arg Ile Val Lys Glu Val Thr Glu Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Val Pro
645 650 655

Pro Glu Lys Leu Val Ile His Glu Gln Ile Thr Arg Asp Leu Arg Asp
660 665 670

Tyr Lys Ala Thr Gly Pro His Val Ala Val Ala Lys Arg Leu Ala Ala
675 680 685

Arg Gly Val Lys Ile Arg Pro Gly Thr Val Ile Ser Tyr Ile Val Leu
690 695 700

Lys Gly Ser Gly Arg Ile Gly Asp Arg Ala Ile Pro Ala Asp Glu Phe
705 710 715 720

Asp Pro Thr Lys His Arg Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln
725 730 735

Val Leu Pro Ala Val Glu Arg Ile Leu Lys Ala Phe Gly Tyr Arg Lys
740 745 750

Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Lys Gln Val Gly Leu Gly Ala Trp
755 760 765

Leu Lys Val Lys Gly Lys Lys
770 775

<210> 8
<211> 775
<212> PRT
<213> Thermococcus sp. 9 N-7

<220>
<221> VARIANTE
<222> (514)..(514)
<223> X= A, S

<220>
<221> VARIANTE
<222> (521)..(521)
<223> X= L

<400> 8
Met Ile Leu Asp Thr Asp Tyr Ile Thr Glu Asn Gly Lys Pro Val Ile
1 5 10 15

Arg Val Phe Lys Lys Glu Asn Gly Glu Phe Lys Ile Glu Tyr Asp Arg
20 25 30

Thr Phe Glu Pro Tyr Phe Tyr Ala Leu Leu Lys Asp Asp Ser Ala Ile
35 40 45

Glu Asp Val Lys Lys Val Thr Ala Lys Arg His Gly Thr Val Val Lys
50 55 60

Val Lys Arg Ala Glu Lys Val Gln Lys Lys Phe Leu Gly Arg Pro Ile
65 70 75 80

Glu Val Trp Lys Leu Tyr Phe Asn His Pro Gln Asp Val Pro Ala Ile
85 90 95

Arg Asp Arg Ile Arg Ala His Pro Ala Val Val Asp Ile Tyr Glu Tyr
100 105 110

Asp Ile Pro Phe Ala Lys Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Gly Leu Ile Pro
115 120 125

Met Glu Gly Asp Glu Glu Leu Thr Met Leu Ala Phe Asp Ile Glu Thr
130 135 140

Leu Tyr His Glu Gly Glu Glu Phe Gly Thr Gly Pro Ile Leu Met Ile
145 150 155 160

Ser Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Ala Arg Val Ile Thr Trp Lys Lys Ile
165 170 175

Asp Leu Pro Tyr Val Asp Val Val Ser Thr Glu Lys Glu Met Ile Lys
180 185 190

Arg Phe Leu Arg Val Val Arg Glu Lys Asp Pro Asp Val Leu Ile Thr
195 200 205

Tyr Asn Gly Asp Asn Phe Asp Phe Ala Tyr Leu Lys Lys Arg Cys Glu
210 215 220

Glu Leu Gly Ile Lys Phe Thr Leu Gly Arg Asp Gly Ser Glu Pro Lys
225 230 235 240

Ile Gln Arg Met Gly Asp Arg Phe Ala Val Glu Val Lys Gly Arg Ile
245 250 255

His Phe Asp Leu Tyr Pro Val Ile Arg Arg Thr Ile Asn Leu Pro Thr
260 265 270

Tyr Thr Leu Glu Ala Val Tyr Glu Ala Val Phe Gly Lys Pro Lys Glu
275 280 285

Lys Val Tyr Ala Glu Glu Ile Ala Gln Ala Trp Glu Ser Gly Glu Gly
290 295 300

Leu Glu Arg Val Ala Arg Tyr Ser Met Glu Asp Ala Lys Val Thr Tyr
305 310 315 320

Glu Leu Gly Arg Glu Phe Phe Pro Met Glu Ala Gln Leu Ser Arg Leu
325 330 335

Ile Gly Gln Ser Leu Trp Asp Val Ser Arg Ser Ser Thr Gly Asn Leu
340 345 350

Val Glu Trp Phe Leu Leu Arg Lys Ala Tyr Lys Arg Asn Glu Leu Ala
355 360 365

Pro Asn Lys Pro Asp Glu Arg Glu Leu Ala Arg Arg Arg Gly Gly Tyr
370 375 380

Ala Gly Gly Tyr Val Lys Glu Pro Glu Arg Gly Leu Trp Asp Asn Ile
385 390 395 400

Val Tyr Leu Asp Phe Arg Ser Leu Tyr Pro Ser Ile Ile Ile Thr His
405 410 415

Asn Val Ser Pro Asp Thr Leu Asn Arg Glu Gly Cys Lys Glu Tyr Asp
420 425 430

Val Ala Pro Glu Val Gly His Lys Phe Cys Lys Asp Phe Pro Gly Phe
435 440 445

Ile Pro Ser Leu Leu Gly Asp Leu Leu Glu Glu Arg Gln Lys Ile Lys
450 455 460

Arg Lys Met Lys Ala Thr Val Asp Pro Leu Glu Lys Lys Leu Leu Asp
465 470 475 480

Tyr Arg Gln Arg Ala Ile Lys Ile Leu Ala Asn Ser Phe Tyr Gly Tyr
485 490 495

Tyr Gly Tyr Ala Lys Ala Arg Trp Tyr Cys Lys Glu Cys Ala Glu Ser
500 505 510

Val Xaa Ala Trp Gly Arg Glu Tyr Xaa Glu Met Val Ile Arg Glu Leu
515 520 525

Glu Glu Lys Phe Gly Phe Lys Val Leu Tyr Ala Asp Thr Asp Gly Leu
530 535 540

His Ala Thr Ile Pro Gly Ala Asp Ala Glu Thr Val Lys Lys Lys Ala
545 550 555 560

Lys Glu Phe Leu Lys Tyr Ile Asn Pro Lys Leu Pro Gly Leu Leu Glu
565 570 575

Leu Glu Tyr Glu Gly Phe Tyr Val Arg Gly Phe Phe Val Thr Lys Lys
580 585 590

Lys Tyr Ala Val Ile Asp Glu Glu Gly Lys Ile Thr Thr Arg Gly Leu
595 600 605

Glu Ile Val Arg Arg Asp Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu Thr Gln Ala
610 615 620

Arg Val Leu Glu Ala Ile Leu Lys His Gly Asp Val Glu Glu Ala Val
625 630 635 640

Arg Ile Val Lys Glu Val Thr Glu Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Val Pro
645 650 655

Pro Glu Lys Leu Val Ile His Glu Gln Ile Thr Arg Asp Leu Arg Asp
660 665 670

Tyr Lys Ala Thr Gly Pro His Val Ala Val Ala Lys Arg Leu Ala Ala
675 680 685

Arg Gly Val Lys Ile Arg Pro Gly Thr Val Ile Ser Tyr Ile Val Leu
690 695 700

Lys Gly Ser Gly Arg Ile Gly Asp Arg Ala Ile Pro Ala Asp Glu Phe
705 710 715 720

Asp Pro Thr Lys His Arg Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln
725 730 735

Val Leu Pro Ala Val Glu Arg Ile Leu Lys Ala Phe Gly Tyr Arg Lys
740 745 750

Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Lys Gln Val Gly Leu Gly Ala Trp
755 760 765

Leu Lys Val Lys Gly Lys Lys
770 775

<210> 9
<211> 775
<212> PRT
<213> Thermococcus sp. 9 N-7

<400> 9

Met Ile Leu Asp Thr Asp Tyr Ile Thr Glu Asn Gly Lys Pro Val Ile
1 5 10 15

Arg Val Phe Lys Lys Glu Asn Gly Glu Phe Lys Ile Glu Tyr Asp Arg
20 25 30

Thr Phe Glu Pro Tyr Phe Tyr Ala Leu Leu Lys Asp Asp Ser Ala Ile
35 40 45

Glu Asp Val Lys Lys Val Thr Ala Lys Arg His Gly Thr Val Val Lys
50 55 60

Val Lys Arg Ala Glu Lys Val Gln Lys Lys Phe Leu Gly Arg Pro Ile
65 70 75 80

Glu Val Trp Lys Leu Tyr Phe Asn His Pro Gln Asp Val Pro Ala Ile
85 90 95

Arg Asp Arg Ile Arg Ala His Pro Ala Val Val Asp Ile Tyr Glu Tyr
100 105 110

Asp Ile Pro Phe Ala Lys Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Gly Leu Ile Pro
115 120 125

Met Glu Gly Asp Glu Glu Leu Thr Met Leu Ala Phe Ala Ile Ala Thr
130 135 140

Leu Tyr His Glu Gly Glu Glu Phe Gly Thr Gly Pro Ile Leu Met Ile
145 150 155 160

Ser Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Ala Arg Val Ile Thr Trp Lys Lys Ile
165 170 175

Asp Leu Pro Tyr Val Asp Val Val Ser Thr Glu Lys Glu Met Ile Lys
180 185 190

Arg Phe Leu Arg Val Val Arg Glu Lys Asp Pro Asp Val Leu Ile Thr
195 200 205

Tyr Asn Gly Asp Asn Phe Asp Phe Ala Tyr Leu Lys Lys Arg Cys Glu
210 215 220

Glu Leu Gly Ile Lys Phe Thr Leu Gly Arg Asp Gly Ser Glu Pro Lys
225 230 235 240

Ile Gln Arg Met Gly Asp Arg Phe Ala Val Glu Val Lys Gly Arg Ile

245 250 255

His Phe Asp Leu Tyr Pro Val Ile Arg Arg Thr Ile Asn Leu Pro Thr
260 265 270

Tyr Thr Leu Glu Ala Val Tyr Glu Ala Val Phe Gly Lys Pro Lys Glu
275 280 285

Lys Val Tyr Ala Glu Glu Ile Ala Gln Ala Trp Glu Ser Gly Glu Gly
290 295 300

Leu Glu Arg Val Ala Arg Tyr Ser Met Glu Asp Ala Lys Val Thr Tyr
305 310 315 320

Glu Leu Gly Arg Glu Phe Phe Pro Met Glu Ala Gln Leu Ser Arg Leu
325 330 335

Ile Gly Gln Ser Leu Trp Asp Val Ser Arg Ser Ser Thr Gly Asn Leu
340 345 350

Val Glu Trp Phe Leu Leu Arg Lys Ala Tyr Lys Arg Asn Glu Leu Ala
355 360 365

Pro Asn Lys Pro Asp Glu Arg Glu Leu Ala Arg Arg Arg Gly Gly Tyr
370 375 380

Ala Gly Gly Tyr Val Lys Glu Pro Glu Arg Gly Leu Trp Asp Asn Ile
385 390 395 400

Val Tyr Leu Asp Phe Arg Ser Leu Tyr Pro Ser Ile Ile Ile Thr His
405 410 415

Asn Val Ser Pro Asp Thr Leu Asn Arg Glu Gly Cys Lys Glu Tyr Asp
420 425 430

Val Ala Pro Glu Val Gly His Lys Phe Cys Lys Asp Phe Pro Gly Phe
435 440 445

Ile Pro Ser Leu Leu Gly Asp Leu Leu Glu Glu Arg Gln Lys Ile Lys
450 455 460

Arg Lys Met Lys Ala Thr Val Asp Pro Leu Glu Lys Lys Leu Leu Asp
465 470 475 480

Tyr Arg Gln Arg Ala Ile Lys Ile Leu Ala Asn Ser Phe Tyr Gly Tyr
485 490 495

Tyr Gly Tyr Ala Lys Ala Arg Trp Tyr Cys Lys Glu Cys Ala Glu Ser
500 505 510

Val Thr Ala Trp Gly Arg Glu Tyr Ile Glu Met Val Ile Arg Glu Leu
515 520 525

Glu Glu Lys Phe Gly Phe Lys Val Leu Tyr Ala Asp Thr Asp Gly Leu
530 535 540

His Ala Thr Ile Pro Gly Ala Asp Ala Glu Thr Val Lys Lys Lys Ala
545 550 555 560

Lys Glu Phe Leu Lys Tyr Ile Asn Pro Lys Leu Pro Gly Leu Leu Glu
565 570 575

Leu Glu Tyr Glu Gly Phe Tyr Val Arg Gly Phe Phe Val Thr Lys Lys
580 585 590

Lys Tyr Ala Val Ile Asp Glu Glu Gly Lys Ile Thr Thr Arg Gly Leu
595 600 605

Glu Ile Val Arg Arg Asp Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu Thr Gln Ala
610 615 620

Arg Val Leu Glu Ala Ile Leu Lys His Gly Asp Val Glu Glu Ala Val
625 630 635 640

Arg Ile Val Lys Glu Val Thr Glu Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Val Pro
645 650 655

Pro Glu Lys Leu Val Ile His Glu Gln Ile Thr Arg Asp Leu Arg Asp
660 665 670

Tyr Lys Ala Thr Gly Pro His Val Ala Val Ala Lys Arg Leu Ala Ala
675 680 685

Arg Gly Val Lys Ile Arg Pro Gly Thr Val Ile Ser Tyr Ile Val Leu
690 695 700

Lys Gly Ser Gly Arg Ile Gly Asp Arg Ala Ile Pro Ala Asp Glu Phe
705 710 715 720

Asp Pro Thr Lys His Arg Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln
725 730 735

Val Leu Pro Ala Val Glu Arg Ile Leu Lys Ala Phe Gly Tyr Arg Lys
740 745 750

Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Lys Gln Val Gly Leu Gly Ala Trp
755 760 765

Leu Lys Val Lys Gly Lys Lys
770 775

<210> 10
<211> 775
<212> PRT

<213> Thermococcus sp. 9 N-7

<220>
<221> VARIANTE
<222> (514)..(514)
<223> X=A, S

<400> 10
Met Ile Leu Asp Thr Asp Tyr Ile Thr Glu Asn Gly Lys Pro Val Ile
1 5 10 15

Arg Val Phe Lys Lys Glu Asn Gly Glu Phe Lys Ile Glu Tyr Asp Arg
20 25 30

Thr Phe Glu Pro Tyr Phe Tyr Ala Leu Leu Lys Asp Asp Ser Ala Ile
35 40 45

Glu Asp Val Lys Lys Val Thr Ala Lys Arg His Gly Thr Val Val Lys
50 55 60

Val Lys Arg Ala Glu Lys Val Gln Lys Lys Phe Leu Gly Arg Pro Ile
65 70 75 80

Glu Val Trp Lys Leu Tyr Phe Asn His Pro Gln Asp Val Pro Ala Ile
85 90 95

Arg Asp Arg Ile Arg Ala His Pro Ala Val Val Asp Ile Tyr Glu Tyr
100 105 110

Asp Ile Pro Phe Ala Lys Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Gly Leu Ile Pro
115 120 125

Met Glu Gly Asp Glu Glu Leu Thr Met Leu Ala Phe Ala Ile Ala Thr
130 135 140

Leu Tyr His Glu Gly Glu Glu Phe Gly Thr Gly Pro Ile Leu Met Ile
145 150 155 160

Ser Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Ala Arg Val Ile Thr Trp Lys Lys Ile

165 170 175

Asp Leu Pro Tyr Val Asp Val Val Ser Thr Glu Lys Glu Met Ile Lys
180 185 190

Arg Phe Leu Arg Val Val Arg Glu Lys Asp Pro Asp Val Leu Ile Thr
195 200 205

Tyr Asn Gly Asp Asn Phe Asp Phe Ala Tyr Leu Lys Lys Arg Cys Glu
210 215 220

Glu Leu Gly Ile Lys Phe Thr Leu Gly Arg Asp Gly Ser Glu Pro Lys
225 230 235 240

Ile Gln Arg Met Gly Asp Arg Phe Ala Val Glu Val Lys Gly Arg Ile
245 250 255

His Phe Asp Leu Tyr Pro Val Ile Arg Arg Thr Ile Asn Leu Pro Thr
260 265 270

Tyr Thr Leu Glu Ala Val Tyr Glu Ala Val Phe Gly Lys Pro Lys Glu
275 280 285

Lys Val Tyr Ala Glu Glu Ile Ala Gln Ala Trp Glu Ser Gly Glu Gly
290 295 300

Leu Glu Arg Val Ala Arg Tyr Ser Met Glu Asp Ala Lys Val Thr Tyr
305 310 315 320

Glu Leu Gly Arg Glu Phe Phe Pro Met Glu Ala Gln Leu Ser Arg Leu
325 330 335

Ile Gly Gln Ser Leu Trp Asp Val Ser Arg Ser Ser Thr Gly Asn Leu
340 345 350

Val Glu Trp Phe Leu Leu Arg Lys Ala Tyr Lys Arg Asn Glu Leu Ala
355 360 365

Pro Asn Lys Pro Asp Glu Arg Glu Leu Ala Arg Arg Arg Gly Gly Tyr
370 375 380

Ala Gly Gly Tyr Val Lys Glu Pro Glu Arg Gly Leu Trp Asp Asn Ile
385 390 395 400

Val Tyr Leu Asp Phe Arg Ser Leu Tyr Pro Ser Ile Ile Ile Thr His
405 410 415

Asn Val Ser Pro Asp Thr Leu Asn Arg Glu Gly Cys Lys Glu Tyr Asp
420 425 430

Val Ala Pro Glu Val Gly His Lys Phe Cys Lys Asp Phe Pro Gly Phe
435 440 445

Ile Pro Ser Leu Leu Gly Asp Leu Leu Glu Glu Arg Gln Lys Ile Lys
450 455 460

Arg Lys Met Lys Ala Thr Val Asp Pro Leu Glu Lys Lys Leu Leu Asp
465 470 475 480

Tyr Arg Gln Arg Ala Ile Lys Ile Leu Ala Asn Ser Phe Tyr Gly Tyr
485 490 495

Tyr Gly Tyr Ala Lys Ala Arg Trp Tyr Cys Lys Glu Cys Ala Glu Ser
500 505 510

Val Xaa Ala Trp Gly Arg Glu Tyr Ile Glu Met Val Ile Arg Glu Leu
515 520 525

Glu Glu Lys Phe Gly Phe Lys Val Leu Tyr Ala Asp Thr Asp Gly Leu
530 535 540

His Ala Thr Ile Pro Gly Ala Asp Ala Glu Thr Val Lys Lys Lys Ala
545 550 555 560

Lys Glu Phe Leu Lys Tyr Ile Asn Pro Lys Leu Pro Gly Leu Leu Glu
565 570 575

Leu Glu Tyr Glu Gly Phe Tyr Val Arg Gly Phe Phe Val Thr Lys Lys
580 585 590

Lys Tyr Ala Val Ile Asp Glu Glu Gly Lys Ile Thr Thr Arg Gly Leu
595 600 605

Glu Ile Val Arg Arg Asp Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu Thr Gln Ala
610 615 620

Arg Val Leu Glu Ala Ile Leu Lys His Gly Asp Val Glu Glu Ala Val
625 630 635 640

Arg Ile Val Lys Glu Val Thr Glu Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Val Pro
645 650 655

Pro Glu Lys Leu Val Ile His Glu Gln Ile Thr Arg Asp Leu Arg Asp
660 665 670

Tyr Lys Ala Thr Gly Pro His Val Ala Val Ala Lys Arg Leu Ala Ala
675 680 685

Arg Gly Val Lys Ile Arg Pro Gly Thr Val Ile Ser Tyr Ile Val Leu
690 695 700

Lys Gly Ser Gly Arg Ile Gly Asp Arg Ala Ile Pro Ala Asp Glu Phe
705 710 715 720

Asp Pro Thr Lys His Arg Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln
725 730 735

Val Leu Pro Ala Val Glu Arg Ile Leu Lys Ala Phe Gly Tyr Arg Lys
740 745 750

Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Lys Gln Val Gly Leu Gly Ala Trp
755 760 765

Leu Lys Val Lys Gly Lys Lys
770 775

<210> 11
<211> 775
<212> PRT
<213> Thermococcus sp. 9 N-7

<220>
<221> VARIANTE
<222> (521)..(521)
<223> X=L

<400> 11
Met Ile Leu Asp Thr Asp Tyr Ile Thr Glu Asn Gly Lys Pro Val Ile
1 5 10 15

Arg Val Phe Lys Lys Glu Asn Gly Glu Phe Lys Ile Glu Tyr Asp Arg
20 25 30

Thr Phe Glu Pro Tyr Phe Tyr Ala Leu Leu Lys Asp Asp Ser Ala Ile
35 40 45

Glu Asp Val Lys Lys Val Thr Ala Lys Arg His Gly Thr Val Val Lys
50 55 60

Val Lys Arg Ala Glu Lys Val Gln Lys Lys Phe Leu Gly Arg Pro Ile
65 70 75 80

Glu Val Trp Lys Leu Tyr Phe Asn His Pro Gln Asp Val Pro Ala Ile

85 90 95

Arg Asp Arg Ile Arg Ala His Pro Ala Val Val Asp Ile Tyr Glu Tyr
100 105 110

Asp Ile Pro Phe Ala Lys Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Gly Leu Ile Pro
115 120 125

Met Glu Gly Asp Glu Glu Leu Thr Met Leu Ala Phe Ala Ile Ala Thr
130 135 140

Leu Tyr His Glu Gly Glu Glu Phe Gly Thr Gly Pro Ile Leu Met Ile
145 150 155 160

Ser Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Ala Arg Val Ile Thr Trp Lys Lys Ile
165 170 175

Asp Leu Pro Tyr Val Asp Val Val Ser Thr Glu Lys Glu Met Ile Lys
180 185 190

Arg Phe Leu Arg Val Val Arg Glu Lys Asp Pro Asp Val Leu Ile Thr
195 200 205

Tyr Asn Gly Asp Asn Phe Asp Phe Ala Tyr Leu Lys Lys Arg Cys Glu
210 215 220

Glu Leu Gly Ile Lys Phe Thr Leu Gly Arg Asp Gly Ser Glu Pro Lys
225 230 235 240

Ile Gln Arg Met Gly Asp Arg Phe Ala Val Glu Val Lys Gly Arg Ile
245 250 255

His Phe Asp Leu Tyr Pro Val Ile Arg Arg Thr Ile Asn Leu Pro Thr
260 265 270

Tyr Thr Leu Glu Ala Val Tyr Glu Ala Val Phe Gly Lys Pro Lys Glu
275 280 285

Lys Val Tyr Ala Glu Glu Ile Ala Gln Ala Trp Glu Ser Gly Glu Gly
290 295 300

Leu Glu Arg Val Ala Arg Tyr Ser Met Glu Asp Ala Lys Val Thr Tyr
305 310 315 320

Glu Leu Gly Arg Glu Phe Phe Pro Met Glu Ala Gln Leu Ser Arg Leu
325 330 335

Ile Gly Gln Ser Leu Trp Asp Val Ser Arg Ser Ser Thr Gly Asn Leu
340 345 350

Val Glu Trp Phe Leu Leu Arg Lys Ala Tyr Lys Arg Asn Glu Leu Ala
355 360 365

Pro Asn Lys Pro Asp Glu Arg Glu Leu Ala Arg Arg Arg Gly Gly Tyr
370 375 380

Ala Gly Gly Tyr Val Lys Glu Pro Glu Arg Gly Leu Trp Asp Asn Ile
385 390 395 400

Val Tyr Leu Asp Phe Arg Ser Leu Tyr Pro Ser Ile Ile Ile Thr His
405 410 415

Asn Val Ser Pro Asp Thr Leu Asn Arg Glu Gly Cys Lys Glu Tyr Asp
420 425 430

Val Ala Pro Glu Val Gly His Lys Phe Cys Lys Asp Phe Pro Gly Phe
435 440 445

Ile Pro Ser Leu Leu Gly Asp Leu Leu Glu Glu Arg Gln Lys Ile Lys
450 455 460

Arg Lys Met Lys Ala Thr Val Asp Pro Leu Glu Lys Lys Leu Leu Asp
465 470 475 480

Tyr Arg Gln Arg Ala Ile Lys Ile Leu Ala Asn Ser Phe Tyr Gly Tyr
485 490 495

Tyr Gly Tyr Ala Lys Ala Arg Trp Tyr Cys Lys Glu Cys Ala Glu Ser
500 505 510

Val Thr Ala Trp Gly Arg Glu Tyr Xaa Glu Met Val Ile Arg Glu Leu
515 520 525

Glu Glu Lys Phe Gly Phe Lys Val Leu Tyr Ala Asp Thr Asp Gly Leu
530 535 540

His Ala Thr Ile Pro Gly Ala Asp Ala Glu Thr Val Lys Lys Lys Ala
545 550 555 560

Lys Glu Phe Leu Lys Tyr Ile Asn Pro Lys Leu Pro Gly Leu Leu Glu
565 570 575

Leu Glu Tyr Glu Gly Phe Tyr Val Arg Gly Phe Phe Val Thr Lys Lys
580 585 590

Lys Tyr Ala Val Ile Asp Glu Glu Gly Lys Ile Thr Thr Arg Gly Leu
595 600 605

Glu Ile Val Arg Arg Asp Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu Thr Gln Ala
610 615 620

Arg Val Leu Glu Ala Ile Leu Lys His Gly Asp Val Glu Glu Ala Val
625 630 635 640

Arg Ile Val Lys Glu Val Thr Glu Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Val Pro
645 650 655

Pro Glu Lys Leu Val Ile His Glu Gln Ile Thr Arg Asp Leu Arg Asp
660 665 670

Tyr Lys Ala Thr Gly Pro His Val Ala Val Ala Lys Arg Leu Ala Ala
675 680 685

Arg Gly Val Lys Ile Arg Pro Gly Thr Val Ile Ser Tyr Ile Val Leu
690 695 700

Lys Gly Ser Gly Arg Ile Gly Asp Arg Ala Ile Pro Ala Asp Glu Phe
705 710 715 720

Asp Pro Thr Lys His Arg Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln
725 730 735

Val Leu Pro Ala Val Glu Arg Ile Leu Lys Ala Phe Gly Tyr Arg Lys
740 745 750

Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Lys Gln Val Gly Leu Gly Ala Trp
755 760 765

Leu Lys Val Lys Gly Lys Lys
770 775

<210> 12
<211> 775
<212> PRT
<213> Thermococcus sp. 9 N-7

<220>
<221> VARIANTE
<222> (514)..(514)
<223> X=A, S

<220>
<221> VARIANTE
<222> (521)..(521)
<223> X=L

<400> 12

Met Ile Leu Asp Thr Asp Tyr Ile Thr Glu Asn Gly Lys Pro Val Ile
1 5 10 15

Arg Val Phe Lys Lys Glu Asn Gly Glu Phe Lys Ile Glu Tyr Asp Arg
20 25 30

Thr Phe Glu Pro Tyr Phe Tyr Ala Leu Leu Lys Asp Asp Ser Ala Ile
35 40 45

Glu Asp Val Lys Lys Val Thr Ala Lys Arg His Gly Thr Val Val Lys
50 55 60

Val Lys Arg Ala Glu Lys Val Gln Lys Lys Phe Leu Gly Arg Pro Ile
65 70 75 80

Glu Val Trp Lys Leu Tyr Phe Asn His Pro Gln Asp Val Pro Ala Ile
85 90 95

Arg Asp Arg Ile Arg Ala His Pro Ala Val Val Asp Ile Tyr Glu Tyr
100 105 110

Asp Ile Pro Phe Ala Lys Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Gly Leu Ile Pro
115 120 125

Met Glu Gly Asp Glu Glu Leu Thr Met Leu Ala Phe Ala Ile Ala Thr
130 135 140

Leu Tyr His Glu Gly Glu Glu Phe Gly Thr Gly Pro Ile Leu Met Ile
145 150 155 160

Ser Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Ala Arg Val Ile Thr Trp Lys Lys Ile
165 170 175

Asp Leu Pro Tyr Val Asp Val Val Ser Thr Glu Lys Glu Met Ile Lys
180 185 190

Arg Phe Leu Arg Val Val Arg Glu Lys Asp Pro Asp Val Leu Ile Thr
195 200 205

Tyr Asn Gly Asp Asn Phe Asp Phe Ala Tyr Leu Lys Lys Arg Cys Glu
210 215 220

Glu Leu Gly Ile Lys Phe Thr Leu Gly Arg Asp Gly Ser Glu Pro Lys
225 230 235 240

Ile Gln Arg Met Gly Asp Arg Phe Ala Val Glu Val Lys Gly Arg Ile
245 250 255

His Phe Asp Leu Tyr Pro Val Ile Arg Arg Thr Ile Asn Leu Pro Thr
260 265 270

Tyr Thr Leu Glu Ala Val Tyr Glu Ala Val Phe Gly Lys Pro Lys Glu
275 280 285

Lys Val Tyr Ala Glu Glu Ile Ala Gln Ala Trp Glu Ser Gly Glu Gly
290 295 300

Leu Glu Arg Val Ala Arg Tyr Ser Met Glu Asp Ala Lys Val Thr Tyr
305 310 315 320

Glu Leu Gly Arg Glu Phe Phe Pro Met Glu Ala Gln Leu Ser Arg Leu
325 330 335

Ile Gly Gln Ser Leu Trp Asp Val Ser Arg Ser Ser Thr Gly Asn Leu
340 345 350

Val Glu Trp Phe Leu Leu Arg Lys Ala Tyr Lys Arg Asn Glu Leu Ala
355 360 365

Pro Asn Lys Pro Asp Glu Arg Glu Leu Ala Arg Arg Arg Gly Gly Tyr
370 375 380

Ala Gly Gly Tyr Val Lys Glu Pro Glu Arg Gly Leu Trp Asp Asn Ile
385 390 395 400

Val Tyr Leu Asp Phe Arg Ser Leu Tyr Pro Ser Ile Ile Ile Thr His
405 410 415

Asn Val Ser Pro Asp Thr Leu Asn Arg Glu Gly Cys Lys Glu Tyr Asp
420 425 430

Val Ala Pro Glu Val Gly His Lys Phe Cys Lys Asp Phe Pro Gly Phe
435 440 445

Ile Pro Ser Leu Leu Gly Asp Leu Leu Glu Glu Arg Gln Lys Ile Lys
450 455 460

Arg Lys Met Lys Ala Thr Val Asp Pro Leu Glu Lys Lys Leu Leu Asp
465 470 475 480

Tyr Arg Gln Arg Ala Ile Lys Ile Leu Ala Asn Ser Phe Tyr Gly Tyr
485 490 495

Tyr Gly Tyr Ala Lys Ala Arg Trp Tyr Cys Lys Glu Cys Ala Glu Ser
500 505 510

Val Xaa Ala Trp Gly Arg Glu Tyr Xaa Glu Met Val Ile Arg Glu Leu
515 520 525

Glu Glu Lys Phe Gly Phe Lys Val Leu Tyr Ala Asp Thr Asp Gly Leu
530 535 540

His Ala Thr Ile Pro Gly Ala Asp Ala Glu Thr Val Lys Lys Lys Ala
545 550 555 560

Lys Glu Phe Leu Lys Tyr Ile Asn Pro Lys Leu Pro Gly Leu Leu Glu
565 570 575

Leu Glu Tyr Glu Gly Phe Tyr Val Arg Gly Phe Phe Val Thr Lys Lys
580 585 590

Lys Tyr Ala Val Ile Asp Glu Glu Gly Lys Ile Thr Thr Arg Gly Leu
595 600 605

Glu Ile Val Arg Arg Asp Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu Thr Gln Ala
610 615 620

Arg Val Leu Glu Ala Ile Leu Lys His Gly Asp Val Glu Glu Ala Val
625 630 635 640

Arg Ile Val Lys Glu Val Thr Glu Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Val Pro
645 650 655

Pro Glu Lys Leu Val Ile His Glu Gln Ile Thr Arg Asp Leu Arg Asp
660 665 670

Tyr Lys Ala Thr Gly Pro His Val Ala Val Ala Lys Arg Leu Ala Ala
675 680 685

Arg Gly Val Lys Ile Arg Pro Gly Thr Val Ile Ser Tyr Ile Val Leu
690 695 700

Lys Gly Ser Gly Arg Ile Gly Asp Arg Ala Ile Pro Ala Asp Glu Phe
705 710 715 720

Asp Pro Thr Lys His Arg Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln
725 730 735

Val Leu Pro Ala Val Glu Arg Ile Leu Lys Ala Phe Gly Tyr Arg Lys
740 745 750

Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Lys Gln Val Gly Leu Gly Ala Trp
755 760 765

Leu Lys Val Lys Gly Lys Lys
770 775

<210> 13

<211> 775
<212> PRT
<213> Thermococcus sp. 9 N-7

<400> 13
Met Ile Leu Asp Thr Asp Tyr Ile Thr Glu Asn Gly Lys Pro Val Ile
1 5 10 15

Arg Val Phe Lys Lys Glu Asn Gly Glu Phe Lys Ile Glu Tyr Asp Arg
20 25 30

Thr Phe Glu Pro Tyr Phe Tyr Ala Leu Leu Lys Asp Asp Ser Ala Ile
35 40 45

Glu Asp Val Lys Lys Val Thr Ala Lys Arg His Gly Thr Val Val Lys
50 55 60

Val Lys Arg Ala Glu Lys Val Gln Lys Lys Phe Leu Gly Arg Pro Ile
65 70 75 80

Glu Val Trp Lys Leu Tyr Phe Asn His Pro Gln Asp Val Pro Ala Ile
85 90 95

Arg Asp Arg Ile Arg Ala His Pro Ala Val Val Asp Ile Tyr Glu Tyr
100 105 110

Asp Ile Pro Phe Ala Lys Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Gly Leu Ile Pro
115 120 125

Met Glu Gly Asp Glu Glu Leu Thr Met Leu Ala Phe Ala Ile Ala Thr
130 135 140

Leu Tyr His Glu Gly Glu Glu Phe Gly Thr Gly Pro Ile Leu Met Ile
145 150 155 160

Ser Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Ala Arg Val Ile Thr Trp Lys Lys Ile
165 170 175

Asp Leu Pro Tyr Val Asp Val Val Ser Thr Glu Lys Glu Met Ile Lys

180 185 190

Arg Phe Leu Arg Val Val Arg Glu Lys Asp Pro Asp Val Leu Ile Thr
195 200 205

Tyr Asn Gly Asp Asn Phe Asp Phe Ala Tyr Leu Lys Lys Arg Ser Glu
210 215 220

Glu Leu Gly Ile Lys Phe Thr Leu Gly Arg Asp Gly Ser Glu Pro Lys
225 230 235 240

Ile Gln Arg Met Gly Asp Arg Phe Ala Val Glu Val Lys Gly Arg Ile
245 250 255

His Phe Asp Leu Tyr Pro Val Ile Arg Arg Thr Ile Asn Leu Pro Thr
260 265 270

Tyr Thr Leu Glu Ala Val Tyr Glu Ala Val Phe Gly Lys Pro Lys Glu
275 280 285

Lys Val Tyr Ala Glu Glu Ile Ala Gln Ala Trp Glu Ser Gly Glu Gly
290 295 300

Leu Glu Arg Val Ala Arg Tyr Ser Met Glu Asp Ala Lys Val Thr Tyr
305 310 315 320

Glu Leu Gly Arg Glu Phe Phe Pro Met Glu Ala Gln Leu Ser Arg Leu
325 330 335

Ile Gly Gln Ser Leu Trp Asp Val Ser Arg Ser Ser Thr Gly Asn Leu
340 345 350

Val Glu Trp Phe Leu Leu Arg Lys Ala Tyr Lys Arg Asn Glu Leu Ala
355 360 365

Pro Asn Lys Pro Asp Glu Arg Glu Leu Ala Arg Arg Arg Gly Gly Tyr
370 375 380

Ala Gly Gly Tyr Val Lys Glu Pro Glu Arg Gly Leu Trp Asp Asn Ile
385 390 395 400

Val Tyr Leu Asp Phe Arg Ser Ala Ala Ala Ser Ile Ile Ile Thr His
405 410 415

Asn Val Ser Pro Asp Thr Leu Asn Arg Glu Gly Cys Lys Glu Tyr Asp
420 425 430

Val Ala Pro Glu Val Gly His Lys Phe Cys Lys Asp Phe Pro Gly Phe
435 440 445

Ile Pro Ser Leu Leu Gly Asp Leu Leu Glu Glu Arg Gln Lys Ile Lys
450 455 460

Arg Lys Met Lys Ala Thr Val Asp Pro Leu Glu Lys Lys Leu Leu Asp
465 470 475 480

Tyr Arg Gln Arg Leu Ile Lys Ile Leu Ala Asn Ser Phe Tyr Gly Tyr
485 490 495

Tyr Gly Tyr Ala Lys Ala Arg Trp Tyr Cys Lys Glu Cys Ala Glu Ser
500 505 510

Val Thr Ala Trp Gly Arg Glu Tyr Ile Glu Met Val Ile Arg Glu Leu
515 520 525

Glu Glu Lys Phe Gly Phe Lys Val Leu Tyr Ala Asp Thr Asp Gly Leu
530 535 540

His Ala Thr Ile Pro Gly Ala Asp Ala Glu Thr Val Lys Lys Lys Ala
545 550 555 560

Lys Glu Phe Leu Lys Tyr Ile Asn Pro Lys Leu Pro Gly Leu Leu Glu
565 570 575

Leu Glu Tyr Glu Gly Phe Tyr Val Arg Gly Phe Phe Val Thr Lys Lys
580 585 590

Lys Tyr Ala Val Ile Asp Glu Glu Gly Lys Ile Thr Thr Arg Gly Leu
595 600 605

Glu Ile Val Arg Arg Asp Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu Thr Gln Ala
610 615 620

Arg Val Leu Glu Ala Ile Leu Lys His Gly Asp Val Glu Glu Ala Val
625 630 635 640

Arg Ile Val Lys Glu Val Thr Glu Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Val Pro
645 650 655

Pro Glu Lys Leu Val Ile His Glu Gln Ile Thr Arg Asp Leu Arg Asp
660 665 670

Tyr Lys Ala Thr Gly Pro His Val Ala Val Ala Lys Arg Leu Ala Ala
675 680 685

Arg Gly Val Lys Ile Arg Pro Gly Thr Val Ile Ser Tyr Ile Val Leu
690 695 700

Lys Gly Ser Gly Arg Ile Gly Asp Arg Ala Ile Pro Ala Asp Glu Phe
705 710 715 720

Asp Pro Thr Lys His Arg Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln
725 730 735

Val Leu Pro Ala Val Glu Arg Ile Leu Lys Ala Phe Gly Tyr Arg Lys
740 745 750

Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Lys Gln Val Gly Leu Gly Ala Trp
755 760 765

Leu Lys Val Lys Gly Lys Lys
770 775

<210> 14
<211> 775
<212> PRT
<213> Thermococcus sp. 9 N-7

<220>
<221> VARIANTE
<222> (514)..(514)
<223> X=A, S

<400> 14
Met Ile Leu Asp Thr Asp Tyr Ile Thr Glu Asn Gly Lys Pro Val Ile
1 5 10 15

Arg Val Phe Lys Lys Glu Asn Gly Glu Phe Lys Ile Glu Tyr Asp Arg
20 25 30

Thr Phe Glu Pro Tyr Phe Tyr Ala Leu Leu Lys Asp Asp Ser Ala Ile
35 40 45

Glu Asp Val Lys Lys Val Thr Ala Lys Arg His Gly Thr Val Val Lys
50 55 60

Val Lys Arg Ala Glu Lys Val Gln Lys Lys Phe Leu Gly Arg Pro Ile
65 70 75 80

Glu Val Trp Lys Leu Tyr Phe Asn His Pro Gln Asp Val Pro Ala Ile
85 90 95

Arg Asp Arg Ile Arg Ala His Pro Ala Val Val Asp Ile Tyr Glu Tyr

100 105 110

Asp Ile Pro Phe Ala Lys Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Gly Leu Ile Pro
115 120 125

Met Glu Gly Asp Glu Glu Leu Thr Met Leu Ala Phe Ala Ile Ala Thr
130 135 140

Leu Tyr His Glu Gly Glu Glu Phe Gly Thr Gly Pro Ile Leu Met Ile
145 150 155 160

Ser Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Ala Arg Val Ile Thr Trp Lys Lys Ile
165 170 175

Asp Leu Pro Tyr Val Asp Val Val Ser Thr Glu Lys Glu Met Ile Lys
180 185 190

Arg Phe Leu Arg Val Val Arg Glu Lys Asp Pro Asp Val Leu Ile Thr
195 200 205

Tyr Asn Gly Asp Asn Phe Asp Phe Ala Tyr Leu Lys Lys Arg Ser Glu
210 215 220

Glu Leu Gly Ile Lys Phe Thr Leu Gly Arg Asp Gly Ser Glu Pro Lys
225 230 235 240

Ile Gln Arg Met Gly Asp Arg Phe Ala Val Glu Val Lys Gly Arg Ile
245 250 255

His Phe Asp Leu Tyr Pro Val Ile Arg Arg Thr Ile Asn Leu Pro Thr
260 265 270

Tyr Thr Leu Glu Ala Val Tyr Glu Ala Val Phe Gly Lys Pro Lys Glu
275 280 285

Lys Val Tyr Ala Glu Glu Ile Ala Gln Ala Trp Glu Ser Gly Glu Gly
290 295 300

Leu Glu Arg Val Ala Arg Tyr Ser Met Glu Asp Ala Lys Val Thr Tyr
305 310 315 320

Glu Leu Gly Arg Glu Phe Phe Pro Met Glu Ala Gln Leu Ser Arg Leu
325 330 335

Ile Gly Gln Ser Leu Trp Asp Val Ser Arg Ser Ser Thr Gly Asn Leu
340 345 350

Val Glu Trp Phe Leu Leu Arg Lys Ala Tyr Lys Arg Asn Glu Leu Ala
355 360 365

Pro Asn Lys Pro Asp Glu Arg Glu Leu Ala Arg Arg Arg Gly Gly Tyr
370 375 380

Ala Gly Gly Tyr Val Lys Glu Pro Glu Arg Gly Leu Trp Asp Asn Ile
385 390 395 400

Val Tyr Leu Asp Phe Arg Ser Ala Ala Ala Ser Ile Ile Ile Thr His
405 410 415

Asn Val Ser Pro Asp Thr Leu Asn Arg Glu Gly Cys Lys Glu Tyr Asp
420 425 430

Val Ala Pro Glu Val Gly His Lys Phe Cys Lys Asp Phe Pro Gly Phe
435 440 445

Ile Pro Ser Leu Leu Gly Asp Leu Leu Glu Glu Arg Gln Lys Ile Lys
450 455 460

Arg Lys Met Lys Ala Thr Val Asp Pro Leu Glu Lys Lys Leu Leu Asp
465 470 475 480

Tyr Arg Gln Arg Leu Ile Lys Ile Leu Ala Asn Ser Phe Tyr Gly Tyr
485 490 495

Tyr Gly Tyr Ala Lys Ala Arg Trp Tyr Cys Lys Glu Cys Ala Glu Ser
500 505 510

Val Xaa Ala Trp Gly Arg Glu Tyr Ile Glu Met Val Ile Arg Glu Leu
515 520 525

Glu Glu Lys Phe Gly Phe Lys Val Leu Tyr Ala Asp Thr Asp Gly Leu
530 535 540

His Ala Thr Ile Pro Gly Ala Asp Ala Glu Thr Val Lys Lys Lys Ala
545 550 555 560

Lys Glu Phe Leu Lys Tyr Ile Asn Pro Lys Leu Pro Gly Leu Leu Glu
565 570 575

Leu Glu Tyr Glu Gly Phe Tyr Val Arg Gly Phe Phe Val Thr Lys Lys
580 585 590

Lys Tyr Ala Val Ile Asp Glu Glu Gly Lys Ile Thr Thr Arg Gly Leu
595 600 605

Glu Ile Val Arg Arg Asp Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu Thr Gln Ala
610 615 620

Arg Val Leu Glu Ala Ile Leu Lys His Gly Asp Val Glu Glu Ala Val
625 630 635 640

Arg Ile Val Lys Glu Val Thr Glu Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Val Pro
645 650 655

Pro Glu Lys Leu Val Ile His Glu Gln Ile Thr Arg Asp Leu Arg Asp
660 665 670

Tyr Lys Ala Thr Gly Pro His Val Ala Val Ala Lys Arg Leu Ala Ala
675 680 685

Arg Gly Val Lys Ile Arg Pro Gly Thr Val Ile Ser Tyr Ile Val Leu
690 695 700

Lys Gly Ser Gly Arg Ile Gly Asp Arg Ala Ile Pro Ala Asp Glu Phe
705 710 715 720

Asp Pro Thr Lys His Arg Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln
725 730 735

Val Leu Pro Ala Val Glu Arg Ile Leu Lys Ala Phe Gly Tyr Arg Lys
740 745 750

Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Lys Gln Val Gly Leu Gly Ala Trp
755 760 765

Leu Lys Val Lys Gly Lys Lys
770 775

<210> 15
<211> 775
<212> PRT
<213> Thermococcus sp. 9 N-7

<220>
<221> VARIANTE
<222> (521)..(521)
<223> X=L

<400> 15
Met Ile Leu Asp Thr Asp Tyr Ile Thr Glu Asn Gly Lys Pro Val Ile
1 5 10 15

Arg Val Phe Lys Lys Glu Asn Gly Glu Phe Lys Ile Glu Tyr Asp Arg

20 25 30

Thr Phe Glu Pro Tyr Phe Tyr Ala Leu Leu Lys Asp Asp Ser Ala Ile
35 40 45

Glu Asp Val Lys Lys Val Thr Ala Lys Arg His Gly Thr Val Val Lys
50 55 60

Val Lys Arg Ala Glu Lys Val Gln Lys Lys Phe Leu Gly Arg Pro Ile
65 70 75 80

Glu Val Trp Lys Leu Tyr Phe Asn His Pro Gln Asp Val Pro Ala Ile
85 90 95

Arg Asp Arg Ile Arg Ala His Pro Ala Val Val Asp Ile Tyr Glu Tyr
100 105 110

Asp Ile Pro Phe Ala Lys Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Gly Leu Ile Pro
115 120 125

Met Glu Gly Asp Glu Glu Leu Thr Met Leu Ala Phe Ala Ile Ala Thr
130 135 140

Leu Tyr His Glu Gly Glu Glu Phe Gly Thr Gly Pro Ile Leu Met Ile
145 150 155 160

Ser Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Ala Arg Val Ile Thr Trp Lys Lys Ile
165 170 175

Asp Leu Pro Tyr Val Asp Val Val Ser Thr Glu Lys Glu Met Ile Lys
180 185 190

Arg Phe Leu Arg Val Val Arg Glu Lys Asp Pro Asp Val Leu Ile Thr
195 200 205

Tyr Asn Gly Asp Asn Phe Asp Phe Ala Tyr Leu Lys Lys Arg Ser Glu
210 215 220

Glu Leu Gly Ile Lys Phe Thr Leu Gly Arg Asp Gly Ser Glu Pro Lys
225 230 235 240

Ile Gln Arg Met Gly Asp Arg Phe Ala Val Glu Val Lys Gly Arg Ile
245 250 255

His Phe Asp Leu Tyr Pro Val Ile Arg Arg Thr Ile Asn Leu Pro Thr
260 265 270

Tyr Thr Leu Glu Ala Val Tyr Glu Ala Val Phe Gly Lys Pro Lys Glu
275 280 285

Lys Val Tyr Ala Glu Glu Ile Ala Gln Ala Trp Glu Ser Gly Glu Gly
290 295 300

Leu Glu Arg Val Ala Arg Tyr Ser Met Glu Asp Ala Lys Val Thr Tyr
305 310 315 320

Glu Leu Gly Arg Glu Phe Phe Pro Met Glu Ala Gln Leu Ser Arg Leu
325 330 335

Ile Gly Gln Ser Leu Trp Asp Val Ser Arg Ser Ser Thr Gly Asn Leu
340 345 350

Val Glu Trp Phe Leu Leu Arg Lys Ala Tyr Lys Arg Asn Glu Leu Ala
355 360 365

Pro Asn Lys Pro Asp Glu Arg Glu Leu Ala Arg Arg Arg Gly Gly Tyr
370 375 380

Ala Gly Gly Tyr Val Lys Glu Pro Glu Arg Gly Leu Trp Asp Asn Ile
385 390 395 400

Val Tyr Leu Asp Phe Arg Ser Ala Ala Ala Ser Ile Ile Ile Thr His
405 410 415

Asn Val Ser Pro Asp Thr Leu Asn Arg Glu Gly Cys Lys Glu Tyr Asp
420 425 430

Val Ala Pro Glu Val Gly His Lys Phe Cys Lys Asp Phe Pro Gly Phe
435 440 445

Ile Pro Ser Leu Leu Gly Asp Leu Leu Glu Glu Arg Gln Lys Ile Lys
450 455 460

Arg Lys Met Lys Ala Thr Val Asp Pro Leu Glu Lys Lys Leu Leu Asp
465 470 475 480

Tyr Arg Gln Arg Leu Ile Lys Ile Leu Ala Asn Ser Phe Tyr Gly Tyr
485 490 495

Tyr Gly Tyr Ala Lys Ala Arg Trp Tyr Cys Lys Glu Cys Ala Glu Ser
500 505 510

Val Thr Ala Trp Gly Arg Glu Tyr Xaa Glu Met Val Ile Arg Glu Leu
515 520 525

Glu Glu Lys Phe Gly Phe Lys Val Leu Tyr Ala Asp Thr Asp Gly Leu
530 535 540

His Ala Thr Ile Pro Gly Ala Asp Ala Glu Thr Val Lys Lys Lys Ala
545 550 555 560

Lys Glu Phe Leu Lys Tyr Ile Asn Pro Lys Leu Pro Gly Leu Leu Glu
565 570 575

Leu Glu Tyr Glu Gly Phe Tyr Val Arg Gly Phe Phe Val Thr Lys Lys
580 585 590

Lys Tyr Ala Val Ile Asp Glu Glu Gly Lys Ile Thr Thr Arg Gly Leu
595 600 605

Glu Ile Val Arg Arg Asp Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu Thr Gln Ala
610 615 620

Arg Val Leu Glu Ala Ile Leu Lys His Gly Asp Val Glu Glu Ala Val
625 630 635 640

Arg Ile Val Lys Glu Val Thr Glu Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Val Pro
645 650 655

Pro Glu Lys Leu Val Ile His Glu Gln Ile Thr Arg Asp Leu Arg Asp
660 665 670

Tyr Lys Ala Thr Gly Pro His Val Ala Val Ala Lys Arg Leu Ala Ala
675 680 685

Arg Gly Val Lys Ile Arg Pro Gly Thr Val Ile Ser Tyr Ile Val Leu
690 695 700

Lys Gly Ser Gly Arg Ile Gly Asp Arg Ala Ile Pro Ala Asp Glu Phe
705 710 715 720

Asp Pro Thr Lys His Arg Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln
725 730 735

Val Leu Pro Ala Val Glu Arg Ile Leu Lys Ala Phe Gly Tyr Arg Lys
740 745 750

Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Lys Gln Val Gly Leu Gly Ala Trp
755 760 765

Leu Lys Val Lys Gly Lys Lys
770 775

<210> 16
<211> 775
<212> PRT
<213> Thermococcus sp. 9 N-7

<220>
<221> VARIANTE
<222> (514)..(514)
<223> X=A, S

<220>
<221> VARIANTE
<222> (521)..(521)
<223> X=L

<400> 16
Met Ile Leu Asp Thr Asp Tyr Ile Thr Glu Asn Gly Lys Pro Val Ile
1 5 10 15

Arg Val Phe Lys Lys Glu Asn Gly Glu Phe Lys Ile Glu Tyr Asp Arg
20 25 30

Thr Phe Glu Pro Tyr Phe Tyr Ala Leu Leu Lys Asp Asp Ser Ala Ile
35 40 45

Glu Asp Val Lys Lys Val Thr Ala Lys Arg His Gly Thr Val Val Lys
50 55 60

Val Lys Arg Ala Glu Lys Val Gln Lys Lys Phe Leu Gly Arg Pro Ile
65 70 75 80

Glu Val Trp Lys Leu Tyr Phe Asn His Pro Gln Asp Val Pro Ala Ile
85 90 95

Arg Asp Arg Ile Arg Ala His Pro Ala Val Val Asp Ile Tyr Glu Tyr
100 105 110

Asp Ile Pro Phe Ala Lys Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Gly Leu Ile Pro
115 120 125

Met Glu Gly Asp Glu Glu Leu Thr Met Leu Ala Phe Ala Ile Ala Thr
130 135 140

Leu Tyr His Glu Gly Glu Glu Phe Gly Thr Gly Pro Ile Leu Met Ile
145 150 155 160

Ser Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Ala Arg Val Ile Thr Trp Lys Lys Ile
165 170 175

Asp Leu Pro Tyr Val Asp Val Val Ser Thr Glu Lys Glu Met Ile Lys
180 185 190

Arg Phe Leu Arg Val Val Arg Glu Lys Asp Pro Asp Val Leu Ile Thr
195 200 205

Tyr Asn Gly Asp Asn Phe Asp Phe Ala Tyr Leu Lys Lys Arg Ser Glu
210 215 220

Glu Leu Gly Ile Lys Phe Thr Leu Gly Arg Asp Gly Ser Glu Pro Lys
225 230 235 240

Ile Gln Arg Met Gly Asp Arg Phe Ala Val Glu Val Lys Gly Arg Ile
245 250 255

His Phe Asp Leu Tyr Pro Val Ile Arg Arg Thr Ile Asn Leu Pro Thr
260 265 270

Tyr Thr Leu Glu Ala Val Tyr Glu Ala Val Phe Gly Lys Pro Lys Glu
275 280 285

Lys Val Tyr Ala Glu Glu Ile Ala Gln Ala Trp Glu Ser Gly Glu Gly
290 295 300

Leu Glu Arg Val Ala Arg Tyr Ser Met Glu Asp Ala Lys Val Thr Tyr
305 310 315 320

Glu Leu Gly Arg Glu Phe Phe Pro Met Glu Ala Gln Leu Ser Arg Leu
325 330 335

Ile Gly Gln Ser Leu Trp Asp Val Ser Arg Ser Ser Thr Gly Asn Leu
340 345 350

Val Glu Trp Phe Leu Leu Arg Lys Ala Tyr Lys Arg Asn Glu Leu Ala
355 360 365

Pro Asn Lys Pro Asp Glu Arg Glu Leu Ala Arg Arg Arg Gly Gly Tyr
370 375 380

Ala Gly Gly Tyr Val Lys Glu Pro Glu Arg Gly Leu Trp Asp Asn Ile
385 390 395 400

Val Tyr Leu Asp Phe Arg Ser Ala Ala Ala Ser Ile Ile Ile Thr His
405 410 415

Asn Val Ser Pro Asp Thr Leu Asn Arg Glu Gly Cys Lys Glu Tyr Asp
420 425 430

Val Ala Pro Glu Val Gly His Lys Phe Cys Lys Asp Phe Pro Gly Phe
435 440 445

Ile Pro Ser Leu Leu Gly Asp Leu Leu Glu Glu Arg Gln Lys Ile Lys
450 455 460

Arg Lys Met Lys Ala Thr Val Asp Pro Leu Glu Lys Lys Leu Leu Asp
465 470 475 480

Tyr Arg Gln Arg Leu Ile Lys Ile Leu Ala Asn Ser Phe Tyr Gly Tyr
485 490 495

Tyr Gly Tyr Ala Lys Ala Arg Trp Tyr Cys Lys Glu Cys Ala Glu Ser
500 505 510

Val Xaa Ala Trp Gly Arg Glu Tyr Xaa Glu Met Val Ile Arg Glu Leu
515 520 525

Glu Glu Lys Phe Gly Phe Lys Val Leu Tyr Ala Asp Thr Asp Gly Leu
530 535 540

His Ala Thr Ile Pro Gly Ala Asp Ala Glu Thr Val Lys Lys Lys Ala
545 550 555 560

Lys Glu Phe Leu Lys Tyr Ile Asn Pro Lys Leu Pro Gly Leu Leu Glu
565 570 575

Leu Glu Tyr Glu Gly Phe Tyr Val Arg Gly Phe Phe Val Thr Lys Lys
580 585 590

Lys Tyr Ala Val Ile Asp Glu Glu Gly Lys Ile Thr Thr Arg Gly Leu
595 600 605

Glu Ile Val Arg Arg Asp Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu Thr Gln Ala
610 615 620

Arg Val Leu Glu Ala Ile Leu Lys His Gly Asp Val Glu Glu Ala Val
625 630 635 640

Arg Ile Val Lys Glu Val Thr Glu Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Val Pro
645 650 655

Pro Glu Lys Leu Val Ile His Glu Gln Ile Thr Arg Asp Leu Arg Asp
660 665 670

Tyr Lys Ala Thr Gly Pro His Val Ala Val Ala Lys Arg Leu Ala Ala

675 680 685

Arg Gly Val Lys Ile Arg Pro Gly Thr Val Ile Ser Tyr Ile Val Leu
690 695 700

Lys Gly Ser Gly Arg Ile Gly Asp Arg Ala Ile Pro Ala Asp Glu Phe
705 710 715 720

Asp Pro Thr Lys His Arg Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln
725 730 735

Val Leu Pro Ala Val Glu Arg Ile Leu Lys Ala Phe Gly Tyr Arg Lys
740 745 750

Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Lys Gln Val Gly Leu Gly Ala Trp
755 760 765

Leu Lys Val Lys Gly Lys Lys
770 775

<210> 17
<211> 775
<212> PRT
<213> Pyrococcus furiosus

<400> 17
Met Ile Leu Asp Val Asp Tyr Ile Thr Glu Glu Gly Lys Pro Val Ile
1 5 10 15

Arg Leu Phe Lys Lys Glu Asn Gly Lys Phe Lys Ile Glu His Asp Arg
20 25 30

Thr Phe Arg Pro Tyr Ile Tyr Ala Leu Leu Arg Asp Asp Ser Lys Ile
35 40 45

Glu Glu Val Lys Lys Ile Thr Gly Glu Arg His Gly Lys Ile Val Arg
50 55 60

Ile Val Asp Val Glu Lys Val Glu Lys Lys Phe Leu Gly Lys Pro Ile
65 70 75 80

Thr Val Trp Lys Leu Tyr Leu Glu His Pro Gln Asp Val Pro Thr Ile
85 90 95

Arg Glu Lys Val Arg Glu His Pro Ala Val Val Asp Ile Phe Glu Tyr
100 105 110

Asp Ile Pro Phe Ala Lys Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Gly Leu Ile Pro

115 120 125

Met Glu Gly Glu Glu Glu Leu Lys Ile Leu Ala Phe Ala Ile Ala Thr
130 135 140

Leu Tyr His Glu Gly Glu Glu Phe Gly Lys Gly Pro Ile Ile Met Ile
145 150 155 160

Ser Tyr Ala Asp Glu Asn Glu Ala Lys Val Ile Thr Trp Lys Asn Ile
165 170 175

Asp Leu Pro Tyr Val Glu Val Val Ser Ser Glu Arg Glu Met Ile Lys
180 185 190

Arg Phe Leu Arg Ile Ile Arg Glu Lys Asp Pro Asp Ile Ile Val Thr
195 200 205

Tyr Asn Gly Asp Ser Phe Asp Phe Pro Tyr Leu Ala Lys Arg Ala Glu
210 215 220

Lys Leu Gly Ile Lys Leu Thr Ile Gly Arg Asp Gly Ser Glu Pro Lys
225 230 235 240

Met Gln Arg Ile Gly Asp Met Thr Ala Val Glu Val Lys Gly Arg Ile
245 250 255

His Phe Asp Leu Tyr His Val Ile Thr Arg Thr Ile Asn Leu Pro Thr
260 265 270

Tyr Thr Leu Glu Ala Val Tyr Glu Ala Ile Phe Gly Lys Pro Lys Glu
275 280 285

Lys Val Tyr Ala Asp Glu Ile Ala Lys Ala Trp Glu Ser Gly Glu Asn
290 295 300

Leu Glu Arg Val Ala Lys Tyr Ser Met Glu Asp Ala Lys Ala Thr Tyr
305 310 315 320

Glu Leu Gly Lys Glu Phe Leu Pro Met Glu Ile Gln Leu Ser Arg Leu
325 330 335

Val Gly Gln Pro Leu Trp Asp Val Ser Arg Ser Ser Thr Gly Asn Leu
340 345 350

Val Glu Trp Phe Leu Leu Arg Lys Ala Tyr Glu Arg Asn Glu Val Ala
355 360 365

Pro Asn Lys Pro Ser Glu Glu Glu Tyr Gln Arg Arg Leu Arg Glu Ser
370 375 380

Tyr Thr Gly Gly Phe Val Lys Glu Pro Glu Lys Gly Leu Trp Glu Asn
385 390 395 400

Ile Val Tyr Leu Asp Phe Arg Ala Ala Ala Ala Ser Ile Ile Ile Thr
405 410 415

His Asn Val Ser Pro Asp Thr Leu Asn Leu Glu Gly Cys Lys Asn Tyr
420 425 430

Asp Ile Ala Pro Gln Val Gly His Lys Phe Cys Lys Asp Ile Pro Gly
435 440 445

Phe Ile Pro Ser Leu Leu Gly His Leu Leu Glu Glu Arg Gln Lys Ile
450 455 460

Lys Thr Lys Met Lys Glu Thr Gln Asp Pro Ile Glu Lys Ile Leu Leu
465 470 475 480

Asp Tyr Arg Gln Lys Leu Ile Lys Leu Leu Ala Asn Ser Phe Tyr Gly
485 490 495

Tyr Tyr Gly Tyr Ala Lys Ala Arg Trp Tyr Cys Lys Glu Cys Ala Glu
500 505 510

Ser Val Thr Ala Trp Gly Arg Lys Tyr Ile Glu Leu Val Trp Lys Glu
515 520 525

Leu Glu Glu Lys Phe Gly Phe Lys Val Leu Tyr Ile Asp Thr Asp Gly
530 535 540

Leu Tyr Ala Thr Ile Pro Gly Gly Glu Ser Glu Glu Ile Lys Lys Lys
545 550 555 560

Ala Leu Glu Phe Val Lys Tyr Ile Asn Ser Lys Leu Pro Gly Leu Leu
565 570 575

Glu Leu Glu Tyr Glu Gly Phe Tyr Lys Arg Gly Phe Phe Val Thr Lys
580 585 590

Lys Arg Tyr Ala Val Ile Asp Glu Glu Gly Lys Val Ile Thr Arg Gly
595 600 605

Leu Glu Ile Val Arg Arg Asp Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu Thr Gln
610 615 620

Ala Arg Val Leu Glu Thr Ile Leu Lys His Gly Asp Val Glu Glu Ala
625 630 635 640

Val Arg Ile Val Lys Glu Val Ile Gln Lys Leu Ala Asn Tyr Glu Ile
645 650 655

Pro Pro Glu Lys Leu Ala Ile Tyr Glu Gln Ile Thr Arg Pro Leu His
660 665 670

Glu Tyr Lys Ala Ile Gly Pro His Val Ala Val Ala Lys Lys Leu Ala
675 680 685

Ala Lys Gly Val Lys Ile Lys Pro Gly Met Val Ile Gly Tyr Ile Val
690 695 700

Leu Arg Gly Asp Gly Pro Ile Ser Asn Arg Ala Ile Leu Ala Glu Glu
705 710 715 720

Tyr Asp Pro Lys Lys His Lys Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn
725 730 735

Gln Val Leu Pro Ala Val Leu Arg Ile Leu Glu Gly Phe Gly Tyr Arg
740 745 750

Lys Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Arg Gln Val Gly Leu Thr Ser
755 760 765

Trp Leu Asn Ile Lys Lys Ser
770 775

<210> 18
<211> 775
<212> PRT
<213> Pyrococcus furiosus

<220>
<221> VARIANTE
<222> (515)..(515)
<223> X=A,S

<400> 18
Met Ile Leu Asp Val Asp Tyr Ile Thr Glu Glu Gly Lys Pro Val Ile
1 5 10 15

Arg Leu Phe Lys Lys Glu Asn Gly Lys Phe Lys Ile Glu His Asp Arg
20 25 30

Thr Phe Arg Pro Tyr Ile Tyr Ala Leu Leu Arg Asp Asp Ser Lys Ile

35 40 45

Glu Glu Val Lys Lys Ile Thr Gly Glu Arg His Gly Lys Ile Val Arg
50 55 60

Ile Val Asp Val Glu Lys Val Glu Lys Lys Phe Leu Gly Lys Pro Ile
65 70 75 80

Thr Val Trp Lys Leu Tyr Leu Glu His Pro Gln Asp Val Pro Thr Ile
85 90 95

Arg Glu Lys Val Arg Glu His Pro Ala Val Val Asp Ile Phe Glu Tyr
100 105 110

Asp Ile Pro Phe Ala Lys Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Gly Leu Ile Pro
115 120 125

Met Glu Gly Glu Glu Glu Leu Lys Ile Leu Ala Phe Ala Ile Ala Thr
130 135 140

Leu Tyr His Glu Gly Glu Glu Phe Gly Lys Gly Pro Ile Ile Met Ile
145 150 155 160

Ser Tyr Ala Asp Glu Asn Glu Ala Lys Val Ile Thr Trp Lys Asn Ile
165 170 175

Asp Leu Pro Tyr Val Glu Val Val Ser Ser Glu Arg Glu Met Ile Lys
180 185 190

Arg Phe Leu Arg Ile Ile Arg Glu Lys Asp Pro Asp Ile Ile Val Thr
195 200 205

Tyr Asn Gly Asp Ser Phe Asp Phe Pro Tyr Leu Ala Lys Arg Ala Glu
210 215 220

Lys Leu Gly Ile Lys Leu Thr Ile Gly Arg Asp Gly Ser Glu Pro Lys
225 230 235 240

Met Gln Arg Ile Gly Asp Met Thr Ala Val Glu Val Lys Gly Arg Ile
245 250 255

His Phe Asp Leu Tyr His Val Ile Thr Arg Thr Ile Asn Leu Pro Thr
260 265 270

Tyr Thr Leu Glu Ala Val Tyr Glu Ala Ile Phe Gly Lys Pro Lys Glu
275 280 285

Lys Val Tyr Ala Asp Glu Ile Ala Lys Ala Trp Glu Ser Gly Glu Asn
290 295 300

Leu Glu Arg Val Ala Lys Tyr Ser Met Glu Asp Ala Lys Ala Thr Tyr
305 310 315 320

Glu Leu Gly Lys Glu Phe Leu Pro Met Glu Ile Gln Leu Ser Arg Leu
325 330 335

Val Gly Gln Pro Leu Trp Asp Val Ser Arg Ser Ser Thr Gly Asn Leu
340 345 350

Val Glu Trp Phe Leu Leu Arg Lys Ala Tyr Glu Arg Asn Glu Val Ala
355 360 365

Pro Asn Lys Pro Ser Glu Glu Glu Tyr Gln Arg Arg Leu Arg Glu Ser
370 375 380

Tyr Thr Gly Gly Phe Val Lys Glu Pro Glu Lys Gly Leu Trp Glu Asn
385 390 395 400

Ile Val Tyr Leu Asp Phe Arg Ala Ala Ala Ala Ser Ile Ile Ile Thr
405 410 415

His Asn Val Ser Pro Asp Thr Leu Asn Leu Glu Gly Cys Lys Asn Tyr
420 425 430

Asp Ile Ala Pro Gln Val Gly His Lys Phe Cys Lys Asp Ile Pro Gly
435 440 445

Phe Ile Pro Ser Leu Leu Gly His Leu Leu Glu Glu Arg Gln Lys Ile
450 455 460

Lys Thr Lys Met Lys Glu Thr Gln Asp Pro Ile Glu Lys Ile Leu Leu
465 470 475 480

Asp Tyr Arg Gln Lys Leu Ile Lys Leu Leu Ala Asn Ser Phe Tyr Gly
485 490 495

Tyr Tyr Gly Tyr Ala Lys Ala Arg Trp Tyr Cys Lys Glu Cys Ala Glu
500 505 510

Ser Val Xaa Ala Trp Gly Arg Lys Tyr Ile Glu Leu Val Trp Lys Glu
515 520 525

Leu Glu Glu Lys Phe Gly Phe Lys Val Leu Tyr Ile Asp Thr Asp Gly
530 535 540

Leu Tyr Ala Thr Ile Pro Gly Gly Glu Ser Glu Glu Ile Lys Lys Lys
545 550 555 560

Ala Leu Glu Phe Val Lys Tyr Ile Asn Ser Lys Leu Pro Gly Leu Leu
565 570 575

Glu Leu Glu Tyr Glu Gly Phe Tyr Lys Arg Gly Phe Phe Val Thr Lys
580 585 590

Lys Arg Tyr Ala Val Ile Asp Glu Glu Gly Lys Val Ile Thr Arg Gly
595 600 605

Leu Glu Ile Val Arg Arg Asp Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu Thr Gln
610 615 620

Ala Arg Val Leu Glu Thr Ile Leu Lys His Gly Asp Val Glu Glu Ala
625 630 635 640

Val Arg Ile Val Lys Glu Val Ile Gln Lys Leu Ala Asn Tyr Glu Ile
645 650 655

Pro Pro Glu Lys Leu Ala Ile Tyr Glu Gln Ile Thr Arg Pro Leu His
660 665 670

Glu Tyr Lys Ala Ile Gly Pro His Val Ala Val Ala Lys Lys Leu Ala
675 680 685

Ala Lys Gly Val Lys Ile Lys Pro Gly Met Val Ile Gly Tyr Ile Val
690 695 700

Leu Arg Gly Asp Gly Pro Ile Ser Asn Arg Ala Ile Leu Ala Glu Glu
705 710 715 720

Tyr Asp Pro Lys Lys His Lys Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn
725 730 735

Gln Val Leu Pro Ala Val Leu Arg Ile Leu Glu Gly Phe Gly Tyr Arg
740 745 750

Lys Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Arg Gln Val Gly Leu Thr Ser
755 760 765

Trp Leu Asn Ile Lys Lys Ser
770 775

<210> 19
<211> 775
<212> PRT
<213> Pyrococcus furiosus

<220>
<221> VARIANTE
<222> (522)..(522)
<223> X=L

<400> 19

Met Ile Leu Asp Val Asp Tyr Ile Thr Glu Glu Gly Lys Pro Val Ile
1 5 10 15

Arg Leu Phe Lys Lys Glu Asn Gly Lys Phe Lys Ile Glu His Asp Arg
20 25 30

Thr Phe Arg Pro Tyr Ile Tyr Ala Leu Leu Arg Asp Asp Ser Lys Ile
35 40 45

Glu Glu Val Lys Lys Ile Thr Gly Glu Arg His Gly Lys Ile Val Arg
50 55 60

Ile Val Asp Val Glu Lys Val Glu Lys Lys Phe Leu Gly Lys Pro Ile
65 70 75 80

Thr Val Trp Lys Leu Tyr Leu Glu His Pro Gln Asp Val Pro Thr Ile
85 90 95

Arg Glu Lys Val Arg Glu His Pro Ala Val Val Asp Ile Phe Glu Tyr
100 105 110

Asp Ile Pro Phe Ala Lys Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Gly Leu Ile Pro
115 120 125

Met Glu Gly Glu Glu Glu Leu Lys Ile Leu Ala Phe Ala Ile Ala Thr
130 135 140

Leu Tyr His Glu Gly Glu Glu Phe Gly Lys Gly Pro Ile Ile Met Ile
145 150 155 160

Ser Tyr Ala Asp Glu Asn Glu Ala Lys Val Ile Thr Trp Lys Asn Ile
165 170 175

Asp Leu Pro Tyr Val Glu Val Val Ser Ser Glu Arg Glu Met Ile Lys
180 185 190

Arg Phe Leu Arg Ile Ile Arg Glu Lys Asp Pro Asp Ile Ile Val Thr
195 200 205

Tyr Asn Gly Asp Ser Phe Asp Phe Pro Tyr Leu Ala Lys Arg Ala Glu
210 215 220

Lys Leu Gly Ile Lys Leu Thr Ile Gly Arg Asp Gly Ser Glu Pro Lys
225 230 235 240

Met Gln Arg Ile Gly Asp Met Thr Ala Val Glu Val Lys Gly Arg Ile
245 250 255

His Phe Asp Leu Tyr His Val Ile Thr Arg Thr Ile Asn Leu Pro Thr
260 265 270

Tyr Thr Leu Glu Ala Val Tyr Glu Ala Ile Phe Gly Lys Pro Lys Glu
275 280 285

Lys Val Tyr Ala Asp Glu Ile Ala Lys Ala Trp Glu Ser Gly Glu Asn
290 295 300

Leu Glu Arg Val Ala Lys Tyr Ser Met Glu Asp Ala Lys Ala Thr Tyr
305 310 315 320

Glu Leu Gly Lys Glu Phe Leu Pro Met Glu Ile Gln Leu Ser Arg Leu
325 330 335

Val Gly Gln Pro Leu Trp Asp Val Ser Arg Ser Ser Thr Gly Asn Leu
340 345 350

Val Glu Trp Phe Leu Leu Arg Lys Ala Tyr Glu Arg Asn Glu Val Ala
355 360 365

Pro Asn Lys Pro Ser Glu Glu Glu Tyr Gln Arg Arg Leu Arg Glu Ser
370 375 380

Tyr Thr Gly Gly Phe Val Lys Glu Pro Glu Lys Gly Leu Trp Glu Asn
385 390 395 400

Ile Val Tyr Leu Asp Phe Arg Ala Ala Ala Ala Ser Ile Ile Ile Thr
405 410 415

His Asn Val Ser Pro Asp Thr Leu Asn Leu Glu Gly Cys Lys Asn Tyr
420 425 430

Asp Ile Ala Pro Gln Val Gly His Lys Phe Cys Lys Asp Ile Pro Gly
435 440 445

Phe Ile Pro Ser Leu Leu Gly His Leu Leu Glu Glu Arg Gln Lys Ile
450 455 460

Lys Thr Lys Met Lys Glu Thr Gln Asp Pro Ile Glu Lys Ile Leu Leu
465 470 475 480

Asp Tyr Arg Gln Lys Leu Ile Lys Leu Leu Ala Asn Ser Phe Tyr Gly
485 490 495

Tyr Tyr Gly Tyr Ala Lys Ala Arg Trp Tyr Cys Lys Glu Cys Ala Glu
500 505 510

Ser Val Thr Ala Trp Gly Arg Lys Tyr Xaa Glu Leu Val Trp Lys Glu
515 520 525

Leu Glu Glu Lys Phe Gly Phe Lys Val Leu Tyr Ile Asp Thr Asp Gly
530 535 540

Leu Tyr Ala Thr Ile Pro Gly Gly Glu Ser Glu Glu Ile Lys Lys Lys
545 550 555 560

Ala Leu Glu Phe Val Lys Tyr Ile Asn Ser Lys Leu Pro Gly Leu Leu
565 570 575

Glu Leu Glu Tyr Glu Gly Phe Tyr Lys Arg Gly Phe Phe Val Thr Lys
580 585 590

Lys Arg Tyr Ala Val Ile Asp Glu Glu Gly Lys Val Ile Thr Arg Gly
595 600 605

Leu Glu Ile Val Arg Arg Asp Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu Thr Gln
610 615 620

Ala Arg Val Leu Glu Thr Ile Leu Lys His Gly Asp Val Glu Glu Ala
625 630 635 640

Val Arg Ile Val Lys Glu Val Ile Gln Lys Leu Ala Asn Tyr Glu Ile
645 650 655

Pro Pro Glu Lys Leu Ala Ile Tyr Glu Gln Ile Thr Arg Pro Leu His
660 665 670

Glu Tyr Lys Ala Ile Gly Pro His Val Ala Val Ala Lys Lys Leu Ala
675 680 685

Ala Lys Gly Val Lys Ile Lys Pro Gly Met Val Ile Gly Tyr Ile Val
690 695 700

Leu Arg Gly Asp Gly Pro Ile Ser Asn Arg Ala Ile Leu Ala Glu Glu
705 710 715 720

Tyr Asp Pro Lys Lys His Lys Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn
725 730 735

Gln Val Leu Pro Ala Val Leu Arg Ile Leu Glu Gly Phe Gly Tyr Arg
740 745 750

Lys Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Arg Gln Val Gly Leu Thr Ser
755 760 765

Trp Leu Asn Ile Lys Lys Ser
770 775

<210> 20
<211> 775
<212> PRT
<213> Pyrococcus furiosus

<220>
<221> VARIANTE
<222> (515)..(515)
<223> X=A, S

<220>
<221> VARIANTE
<222> (522)..(522)
<223> X=L

<400> 20
Met Ile Leu Asp Val Asp Tyr Ile Thr Glu Glu Gly Lys Pro Val Ile
1 5 10 15

Arg Leu Phe Lys Lys Glu Asn Gly Lys Phe Lys Ile Glu His Asp Arg
20 25 30

Thr Phe Arg Pro Tyr Ile Tyr Ala Leu Leu Arg Asp Asp Ser Lys Ile
35 40 45

Glu Glu Val Lys Lys Ile Thr Gly Glu Arg His Gly Lys Ile Val Arg
50 55 60

Ile Val Asp Val Glu Lys Val Glu Lys Lys Phe Leu Gly Lys Pro Ile
65 70 75 80

Thr Val Trp Lys Leu Tyr Leu Glu His Pro Gln Asp Val Pro Thr Ile
85 90 95

Arg Glu Lys Val Arg Glu His Pro Ala Val Val Asp Ile Phe Glu Tyr
100 105 110

Asp Ile Pro Phe Ala Lys Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Gly Leu Ile Pro
115 120 125

Met Glu Gly Glu Glu Glu Leu Lys Ile Leu Ala Phe Ala Ile Ala Thr
130 135 140

Leu Tyr His Glu Gly Glu Glu Phe Gly Lys Gly Pro Ile Ile Met Ile
145 150 155 160

Ser Tyr Ala Asp Glu Asn Glu Ala Lys Val Ile Thr Trp Lys Asn Ile
165 170 175

Asp Leu Pro Tyr Val Glu Val Val Ser Ser Glu Arg Glu Met Ile Lys
180 185 190

Arg Phe Leu Arg Ile Ile Arg Glu Lys Asp Pro Asp Ile Ile Val Thr
195 200 205

Tyr Asn Gly Asp Ser Phe Asp Phe Pro Tyr Leu Ala Lys Arg Ala Glu
210 215 220

Lys Leu Gly Ile Lys Leu Thr Ile Gly Arg Asp Gly Ser Glu Pro Lys
225 230 235 240

Met Gln Arg Ile Gly Asp Met Thr Ala Val Glu Val Lys Gly Arg Ile
245 250 255

His Phe Asp Leu Tyr His Val Ile Thr Arg Thr Ile Asn Leu Pro Thr
260 265 270

Tyr Thr Leu Glu Ala Val Tyr Glu Ala Ile Phe Gly Lys Pro Lys Glu
275 280 285

Lys Val Tyr Ala Asp Glu Ile Ala Lys Ala Trp Glu Ser Gly Glu Asn
290 295 300

Leu Glu Arg Val Ala Lys Tyr Ser Met Glu Asp Ala Lys Ala Thr Tyr
305 310 315 320

Glu Leu Gly Lys Glu Phe Leu Pro Met Glu Ile Gln Leu Ser Arg Leu
325 330 335

Val Gly Gln Pro Leu Trp Asp Val Ser Arg Ser Ser Thr Gly Asn Leu
340 345 350

Val Glu Trp Phe Leu Leu Arg Lys Ala Tyr Glu Arg Asn Glu Val Ala
355 360 365

Pro Asn Lys Pro Ser Glu Glu Glu Tyr Gln Arg Arg Leu Arg Glu Ser
370 375 380

Tyr Thr Gly Gly Phe Val Lys Glu Pro Glu Lys Gly Leu Trp Glu Asn
385 390 395 400

Ile Val Tyr Leu Asp Phe Arg Ala Ala Ala Ala Ser Ile Ile Ile Thr
405 410 415

His Asn Val Ser Pro Asp Thr Leu Asn Leu Glu Gly Cys Lys Asn Tyr
420 425 430

Asp Ile Ala Pro Gln Val Gly His Lys Phe Cys Lys Asp Ile Pro Gly
435 440 445

Phe Ile Pro Ser Leu Leu Gly His Leu Leu Glu Glu Arg Gln Lys Ile
450 455 460

Lys Thr Lys Met Lys Glu Thr Gln Asp Pro Ile Glu Lys Ile Leu Leu
465 470 475 480

Asp Tyr Arg Gln Lys Leu Ile Lys Leu Leu Ala Asn Ser Phe Tyr Gly
485 490 495

Tyr Tyr Gly Tyr Ala Lys Ala Arg Trp Tyr Cys Lys Glu Cys Ala Glu
500 505 510

Ser Val Xaa Ala Trp Gly Arg Lys Tyr Xaa Glu Leu Val Trp Lys Glu
515 520 525

Leu Glu Glu Lys Phe Gly Phe Lys Val Leu Tyr Ile Asp Thr Asp Gly
530 535 540

Leu Tyr Ala Thr Ile Pro Gly Gly Glu Ser Glu Glu Ile Lys Lys Lys
545 550 555 560

Ala Leu Glu Phe Val Lys Tyr Ile Asn Ser Lys Leu Pro Gly Leu Leu
565 570 575

Glu Leu Glu Tyr Glu Gly Phe Tyr Lys Arg Gly Phe Phe Val Thr Lys
580 585 590

Lys Arg Tyr Ala Val Ile Asp Glu Glu Gly Lys Val Ile Thr Arg Gly
595 600 605

Leu Glu Ile Val Arg Arg Asp Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu Thr Gln

610 615 620

Ala Arg Val Leu Glu Thr Ile Leu Lys His Gly Asp Val Glu Glu Ala
625 630 635 640

Val Arg Ile Val Lys Glu Val Ile Gln Lys Leu Ala Asn Tyr Glu Ile
645 650 655

Pro Pro Glu Lys Leu Ala Ile Tyr Glu Gln Ile Thr Arg Pro Leu His
660 665 670

Glu Tyr Lys Ala Ile Gly Pro His Val Ala Val Ala Lys Lys Leu Ala
675 680 685

Ala Lys Gly Val Lys Ile Lys Pro Gly Met Val Ile Gly Tyr Ile Val
690 695 700

Leu Arg Gly Asp Gly Pro Ile Ser Asn Arg Ala Ile Leu Ala Glu Glu
705 710 715 720

Tyr Asp Pro Lys Lys His Lys Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn
725 730 735

Gln Val Leu Pro Ala Val Leu Arg Ile Leu Glu Gly Phe Gly Tyr Arg
740 745 750

Lys Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Arg Gln Val Gly Leu Thr Ser
755 760 765

Trp Leu Asn Ile Lys Lys Ser
770 775

<210> 21
<211> 774
<212> PRT
<213> Thermococcus kodakaraensis

<400> 21
Met Ile Leu Asp Thr Asp Tyr Ile Thr Glu Asp Gly Lys Pro Val Ile
1 5 10 15

Arg Ile Phe Lys Lys Glu Asn Gly Glu Phe Lys Ile Glu Tyr Asp Arg
20 25 30

Thr Phe Glu Pro Tyr Phe Tyr Ala Leu Leu Lys Asp Asp Ser Ala Ile
35 40 45

Glu Glu Val Lys Lys Ile Thr Ala Glu Arg His Gly Thr Val Val Thr

50 55 60

Val Lys Arg Val Glu Lys Val Gln Lys Lys Phe Leu Gly Arg Pro Val
65 70 75 80

Glu Val Trp Lys Leu Tyr Phe Thr His Pro Gln Asp Val Pro Ala Ile
85 90 95

Arg Asp Lys Ile Arg Glu His Pro Ala Val Ile Asp Ile Tyr Glu Tyr
100 105 110

Asp Ile Pro Phe Ala Lys Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Gly Leu Val Pro
115 120 125

Met Glu Gly Asp Glu Glu Leu Lys Met Leu Ala Phe Ala Ile Ala Thr
130 135 140

Leu Tyr His Glu Gly Glu Glu Phe Ala Glu Gly Pro Ile Leu Met Ile
145 150 155 160

Ser Tyr Ala Asp Glu Glu Gly Ala Arg Val Ile Thr Trp Lys Asn Val
165 170 175

Asp Leu Pro Tyr Val Asp Val Val Ser Thr Glu Arg Glu Met Ile Lys
180 185 190

Arg Phe Leu Arg Val Val Lys Glu Lys Asp Pro Asp Val Leu Ile Thr
195 200 205

Tyr Asn Gly Asp Asn Phe Asp Phe Ala Tyr Leu Lys Lys Arg Cys Glu
210 215 220

Lys Leu Gly Ile Asn Phe Ala Leu Gly Arg Asp Gly Ser Glu Pro Lys
225 230 235 240

Ile Gln Arg Met Gly Asp Arg Phe Ala Val Glu Val Lys Gly Arg Ile
245 250 255

His Phe Asp Leu Tyr Pro Val Ile Arg Arg Thr Ile Asn Leu Pro Thr
260 265 270

Tyr Thr Leu Glu Ala Val Tyr Glu Ala Val Phe Gly Gln Pro Lys Glu
275 280 285

Lys Val Tyr Ala Glu Glu Ile Thr Thr Ala Trp Glu Thr Gly Glu Asn
290 295 300

Leu Glu Arg Val Ala Arg Tyr Ser Met Glu Asp Ala Lys Val Thr Tyr
305 310 315 320

Glu Leu Gly Lys Glu Phe Leu Pro Met Glu Ala Gln Leu Ser Arg Leu
325 330 335

Ile Gly Gln Ser Leu Trp Asp Val Ser Arg Ser Ser Thr Gly Asn Leu
340 345 350

Val Glu Trp Phe Leu Leu Arg Lys Ala Tyr Glu Arg Asn Glu Leu Ala
355 360 365

Pro Asn Lys Pro Asp Glu Lys Glu Leu Ala Arg Arg Arg Gln Ser Tyr
370 375 380

Glu Gly Gly Tyr Val Lys Glu Pro Glu Arg Gly Leu Trp Glu Asn Ile
385 390 395 400

Val Tyr Leu Asp Phe Arg Ser Ala Ala Ala Ser Ile Ile Ile Thr His
405 410 415

Asn Val Ser Pro Asp Thr Leu Asn Arg Glu Gly Cys Lys Glu Tyr Asp
420 425 430

Val Ala Pro Gln Val Gly His Arg Phe Cys Lys Asp Phe Pro Gly Phe
435 440 445

Ile Pro Ser Leu Leu Gly Asp Leu Leu Glu Glu Arg Gln Lys Ile Lys
450 455 460

Lys Lys Met Lys Ala Thr Ile Asp Pro Ile Glu Arg Lys Leu Leu Asp
465 470 475 480

Tyr Arg Gln Arg Leu Ile Lys Ile Leu Ala Asn Ser Tyr Tyr Gly Tyr
485 490 495

Tyr Gly Tyr Ala Arg Ala Arg Trp Tyr Cys Lys Glu Cys Ala Glu Ser
500 505 510

Val Thr Ala Trp Gly Arg Glu Tyr Ile Thr Met Thr Ile Lys Glu Ile
515 520 525

Glu Glu Lys Tyr Gly Phe Lys Val Ile Tyr Ser Asp Thr Asp Gly Phe
530 535 540

Phe Ala Thr Ile Pro Gly Ala Asp Ala Glu Thr Val Lys Lys Lys Ala
545 550 555 560

Met Glu Phe Leu Lys Tyr Ile Asn Ala Lys Leu Pro Gly Ala Leu Glu
565 570 575

Leu Glu Tyr Glu Gly Phe Tyr Lys Arg Gly Phe Phe Val Thr Lys Lys
580 585 590

Lys Tyr Ala Val Ile Asp Glu Glu Gly Lys Ile Thr Thr Arg Gly Leu
595 600 605

Glu Ile Val Arg Arg Asp Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu Thr Gln Ala
610 615 620

Arg Val Leu Glu Ala Leu Leu Lys Asp Gly Asp Val Glu Lys Ala Val
625 630 635 640

Arg Ile Val Lys Glu Val Thr Glu Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Val Pro
645 650 655

Pro Glu Lys Leu Val Ile His Glu Gln Ile Thr Arg Asp Leu Lys Asp
660 665 670

Tyr Lys Ala Thr Gly Pro His Val Ala Val Ala Lys Arg Leu Ala Ala
675 680 685

Arg Gly Val Lys Ile Arg Pro Gly Thr Val Ile Ser Tyr Ile Val Leu
690 695 700

Lys Gly Ser Gly Arg Ile Gly Asp Arg Ala Ile Pro Phe Asp Glu Phe
705 710 715 720

Asp Pro Thr Lys His Lys Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln
725 730 735

Val Leu Pro Ala Val Glu Arg Ile Leu Arg Ala Phe Gly Tyr Arg Lys
740 745 750

Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Arg Gln Val Gly Leu Ser Ala Trp
755 760 765

Leu Lys Pro Lys Gly Thr
770

<210> 22
<211> 774
<212> PRT
<213> Thermococcus kodakaraensis

<220>
<221> VARIANTE
<222> (514)..(514)
<223> X=A, S

<400> 22

Met Ile Leu Asp Thr Asp Tyr Ile Thr Glu Asp Gly Lys Pro Val Ile
1 5 10 15

Arg Ile Phe Lys Lys Glu Asn Gly Glu Phe Lys Ile Glu Tyr Asp Arg
20 25 30

Thr Phe Glu Pro Tyr Phe Tyr Ala Leu Leu Lys Asp Asp Ser Ala Ile
35 40 45

Glu Glu Val Lys Lys Ile Thr Ala Glu Arg His Gly Thr Val Val Thr
50 55 60

Val Lys Arg Val Glu Lys Val Gln Lys Lys Phe Leu Gly Arg Pro Val
65 70 75 80

Glu Val Trp Lys Leu Tyr Phe Thr His Pro Gln Asp Val Pro Ala Ile
85 90 95

Arg Asp Lys Ile Arg Glu His Pro Ala Val Ile Asp Ile Tyr Glu Tyr
100 105 110

Asp Ile Pro Phe Ala Lys Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Gly Leu Val Pro
115 120 125

Met Glu Gly Asp Glu Glu Leu Lys Met Leu Ala Phe Ala Ile Ala Thr
130 135 140

Leu Tyr His Glu Gly Glu Glu Phe Ala Glu Gly Pro Ile Leu Met Ile
145 150 155 160

Ser Tyr Ala Asp Glu Glu Gly Ala Arg Val Ile Thr Trp Lys Asn Val
165 170 175

Asp Leu Pro Tyr Val Asp Val Val Ser Thr Glu Arg Glu Met Ile Lys
180 185 190

Arg Phe Leu Arg Val Val Lys Glu Lys Asp Pro Asp Val Leu Ile Thr
195 200 205

Tyr Asn Gly Asp Asn Phe Asp Phe Ala Tyr Leu Lys Lys Arg Cys Glu
210 215 220

Lys Leu Gly Ile Asn Phe Ala Leu Gly Arg Asp Gly Ser Glu Pro Lys
225 230 235 240

Ile Gln Arg Met Gly Asp Arg Phe Ala Val Glu Val Lys Gly Arg Ile
245 250 255

His Phe Asp Leu Tyr Pro Val Ile Arg Arg Thr Ile Asn Leu Pro Thr
260 265 270

Tyr Thr Leu Glu Ala Val Tyr Glu Ala Val Phe Gly Gln Pro Lys Glu
275 280 285

Lys Val Tyr Ala Glu Glu Ile Thr Thr Ala Trp Glu Thr Gly Glu Asn
290 295 300

Leu Glu Arg Val Ala Arg Tyr Ser Met Glu Asp Ala Lys Val Thr Tyr
305 310 315 320

Glu Leu Gly Lys Glu Phe Leu Pro Met Glu Ala Gln Leu Ser Arg Leu
325 330 335

Ile Gly Gln Ser Leu Trp Asp Val Ser Arg Ser Ser Thr Gly Asn Leu
340 345 350

Val Glu Trp Phe Leu Leu Arg Lys Ala Tyr Glu Arg Asn Glu Leu Ala
355 360 365

Pro Asn Lys Pro Asp Glu Lys Glu Leu Ala Arg Arg Arg Gln Ser Tyr
370 375 380

Glu Gly Gly Tyr Val Lys Glu Pro Glu Arg Gly Leu Trp Glu Asn Ile
385 390 395 400

Val Tyr Leu Asp Phe Arg Ser Ala Ala Ala Ser Ile Ile Ile Thr His
405 410 415

Asn Val Ser Pro Asp Thr Leu Asn Arg Glu Gly Cys Lys Glu Tyr Asp
420 425 430

Val Ala Pro Gln Val Gly His Arg Phe Cys Lys Asp Phe Pro Gly Phe
435 440 445

Ile Pro Ser Leu Leu Gly Asp Leu Leu Glu Glu Arg Gln Lys Ile Lys
450 455 460

Lys Lys Met Lys Ala Thr Ile Asp Pro Ile Glu Arg Lys Leu Leu Asp
465 470 475 480

Tyr Arg Gln Arg Leu Ile Lys Ile Leu Ala Asn Ser Tyr Tyr Gly Tyr
485 490 495

Tyr Gly Tyr Ala Arg Ala Arg Trp Tyr Cys Lys Glu Cys Ala Glu Ser
500 505 510

Val Xaa Ala Trp Gly Arg Glu Tyr Ile Thr Met Thr Ile Lys Glu Ile
515 520 525

Glu Glu Lys Tyr Gly Phe Lys Val Ile Tyr Ser Asp Thr Asp Gly Phe
530 535 540

Phe Ala Thr Ile Pro Gly Ala Asp Ala Glu Thr Val Lys Lys Lys Ala
545 550 555 560

Met Glu Phe Leu Lys Tyr Ile Asn Ala Lys Leu Pro Gly Ala Leu Glu
565 570 575

Leu Glu Tyr Glu Gly Phe Tyr Lys Arg Gly Phe Phe Val Thr Lys Lys
580 585 590

Lys Tyr Ala Val Ile Asp Glu Glu Gly Lys Ile Thr Thr Arg Gly Leu
595 600 605

Glu Ile Val Arg Arg Asp Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu Thr Gln Ala
610 615 620

Arg Val Leu Glu Ala Leu Leu Lys Asp Gly Asp Val Glu Lys Ala Val
625 630 635 640

Arg Ile Val Lys Glu Val Thr Glu Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Val Pro
645 650 655

Pro Glu Lys Leu Val Ile His Glu Gln Ile Thr Arg Asp Leu Lys Asp
660 665 670

Tyr Lys Ala Thr Gly Pro His Val Ala Val Ala Lys Arg Leu Ala Ala
675 680 685

Arg Gly Val Lys Ile Arg Pro Gly Thr Val Ile Ser Tyr Ile Val Leu
690 695 700

Lys Gly Ser Gly Arg Ile Gly Asp Arg Ala Ile Pro Phe Asp Glu Phe
705 710 715 720

Asp Pro Thr Lys His Lys Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln
725 730 735

Val Leu Pro Ala Val Glu Arg Ile Leu Arg Ala Phe Gly Tyr Arg Lys
740 745 750

Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Arg Gln Val Gly Leu Ser Ala Trp
755 760 765

Leu Lys Pro Lys Gly Thr
770

<210> 23
<211> 774
<212> PRT
<213> Thermococcus kodakaraensis

<220>
<221> VARIANTE
<222> (521)..(521)
<223> X=L

<400> 23
Met Ile Leu Asp Thr Asp Tyr Ile Thr Glu Asp Gly Lys Pro Val Ile
1 5 10 15

Arg Ile Phe Lys Lys Glu Asn Gly Glu Phe Lys Ile Glu Tyr Asp Arg
20 25 30

Thr Phe Glu Pro Tyr Phe Tyr Ala Leu Leu Lys Asp Asp Ser Ala Ile
35 40 45

Glu Glu Val Lys Lys Ile Thr Ala Glu Arg His Gly Thr Val Val Thr
50 55 60

Val Lys Arg Val Glu Lys Val Gln Lys Lys Phe Leu Gly Arg Pro Val
65 70 75 80

Glu Val Trp Lys Leu Tyr Phe Thr His Pro Gln Asp Val Pro Ala Ile
85 90 95

Arg Asp Lys Ile Arg Glu His Pro Ala Val Ile Asp Ile Tyr Glu Tyr
100 105 110

Asp Ile Pro Phe Ala Lys Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Gly Leu Val Pro
115 120 125

Met Glu Gly Asp Glu Glu Leu Lys Met Leu Ala Phe Ala Ile Ala Thr
130 135 140

Leu Tyr His Glu Gly Glu Glu Phe Ala Glu Gly Pro Ile Leu Met Ile
145 150 155 160

Ser Tyr Ala Asp Glu Glu Gly Ala Arg Val Ile Thr Trp Lys Asn Val
165 170 175

Asp Leu Pro Tyr Val Asp Val Val Ser Thr Glu Arg Glu Met Ile Lys
180 185 190

Arg Phe Leu Arg Val Val Lys Glu Lys Asp Pro Asp Val Leu Ile Thr
195 200 205

Tyr Asn Gly Asp Asn Phe Asp Phe Ala Tyr Leu Lys Lys Arg Cys Glu
210 215 220

Lys Leu Gly Ile Asn Phe Ala Leu Gly Arg Asp Gly Ser Glu Pro Lys
225 230 235 240

Ile Gln Arg Met Gly Asp Arg Phe Ala Val Glu Val Lys Gly Arg Ile
245 250 255

His Phe Asp Leu Tyr Pro Val Ile Arg Arg Thr Ile Asn Leu Pro Thr
260 265 270

Tyr Thr Leu Glu Ala Val Tyr Glu Ala Val Phe Gly Gln Pro Lys Glu
275 280 285

Lys Val Tyr Ala Glu Glu Ile Thr Thr Ala Trp Glu Thr Gly Glu Asn
290 295 300

Leu Glu Arg Val Ala Arg Tyr Ser Met Glu Asp Ala Lys Val Thr Tyr
305 310 315 320

Glu Leu Gly Lys Glu Phe Leu Pro Met Glu Ala Gln Leu Ser Arg Leu
325 330 335

Ile Gly Gln Ser Leu Trp Asp Val Ser Arg Ser Ser Thr Gly Asn Leu
340 345 350

Val Glu Trp Phe Leu Leu Arg Lys Ala Tyr Glu Arg Asn Glu Leu Ala
355 360 365

Pro Asn Lys Pro Asp Glu Lys Glu Leu Ala Arg Arg Arg Gln Ser Tyr
370 375 380

Glu Gly Gly Tyr Val Lys Glu Pro Glu Arg Gly Leu Trp Glu Asn Ile
385 390 395 400

Val Tyr Leu Asp Phe Arg Ser Ala Ala Ala Ser Ile Ile Ile Thr His
405 410 415

Asn Val Ser Pro Asp Thr Leu Asn Arg Glu Gly Cys Lys Glu Tyr Asp
420 425 430

Val Ala Pro Gln Val Gly His Arg Phe Cys Lys Asp Phe Pro Gly Phe
435 440 445

Ile Pro Ser Leu Leu Gly Asp Leu Leu Glu Glu Arg Gln Lys Ile Lys
450 455 460

Lys Lys Met Lys Ala Thr Ile Asp Pro Ile Glu Arg Lys Leu Leu Asp
465 470 475 480

Tyr Arg Gln Arg Leu Ile Lys Ile Leu Ala Asn Ser Tyr Tyr Gly Tyr
485 490 495

Tyr Gly Tyr Ala Arg Ala Arg Trp Tyr Cys Lys Glu Cys Ala Glu Ser
500 505 510

Val Thr Ala Trp Gly Arg Glu Tyr Xaa Thr Met Thr Ile Lys Glu Ile
515 520 525

Glu Glu Lys Tyr Gly Phe Lys Val Ile Tyr Ser Asp Thr Asp Gly Phe
530 535 540

Phe Ala Thr Ile Pro Gly Ala Asp Ala Glu Thr Val Lys Lys Lys Ala
545 550 555 560

Met Glu Phe Leu Lys Tyr Ile Asn Ala Lys Leu Pro Gly Ala Leu Glu
565 570 575

Leu Glu Tyr Glu Gly Phe Tyr Lys Arg Gly Phe Phe Val Thr Lys Lys
580 585 590

Lys Tyr Ala Val Ile Asp Glu Glu Gly Lys Ile Thr Thr Arg Gly Leu
595 600 605

Glu Ile Val Arg Arg Asp Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu Thr Gln Ala
610 615 620

Arg Val Leu Glu Ala Leu Leu Lys Asp Gly Asp Val Glu Lys Ala Val
625 630 635 640

Arg Ile Val Lys Glu Val Thr Glu Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Val Pro
645 650 655

Pro Glu Lys Leu Val Ile His Glu Gln Ile Thr Arg Asp Leu Lys Asp
660 665 670

Tyr Lys Ala Thr Gly Pro His Val Ala Val Ala Lys Arg Leu Ala Ala
675 680 685

Arg Gly Val Lys Ile Arg Pro Gly Thr Val Ile Ser Tyr Ile Val Leu
690 695 700

Lys Gly Ser Gly Arg Ile Gly Asp Arg Ala Ile Pro Phe Asp Glu Phe
705 710 715 720

Asp Pro Thr Lys His Lys Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln
725 730 735

Val Leu Pro Ala Val Glu Arg Ile Leu Arg Ala Phe Gly Tyr Arg Lys
740 745 750

Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Arg Gln Val Gly Leu Ser Ala Trp
755 760 765

Leu Lys Pro Lys Gly Thr
770

<210> 24
<211> 774
<212> PRT
<213> Thermococcus kodakaraensis

<220>
<221> VARIANTE
<222> (514)..(514)
<223> X=A, S

<220>
<221> VARIANTE
<222> (521)..(521)
<223> X=L

<400> 24
Met Ile Leu Asp Thr Asp Tyr Ile Thr Glu Asp Gly Lys Pro Val Ile
1 5 10 15

Arg Ile Phe Lys Lys Glu Asn Gly Glu Phe Lys Ile Glu Tyr Asp Arg
20 25 30

Thr Phe Glu Pro Tyr Phe Tyr Ala Leu Leu Lys Asp Asp Ser Ala Ile
35 40 45

Glu Glu Val Lys Lys Ile Thr Ala Glu Arg His Gly Thr Val Val Thr
50 55 60

Val Lys Arg Val Glu Lys Val Gln Lys Lys Phe Leu Gly Arg Pro Val
65 70 75 80

Glu Val Trp Lys Leu Tyr Phe Thr His Pro Gln Asp Val Pro Ala Ile
85 90 95

Arg Asp Lys Ile Arg Glu His Pro Ala Val Ile Asp Ile Tyr Glu Tyr
100 105 110

Asp Ile Pro Phe Ala Lys Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Gly Leu Val Pro
115 120 125

Met Glu Gly Asp Glu Glu Leu Lys Met Leu Ala Phe Ala Ile Ala Thr
130 135 140

Leu Tyr His Glu Gly Glu Glu Phe Ala Glu Gly Pro Ile Leu Met Ile
145 150 155 160

Ser Tyr Ala Asp Glu Glu Gly Ala Arg Val Ile Thr Trp Lys Asn Val
165 170 175

Asp Leu Pro Tyr Val Asp Val Val Ser Thr Glu Arg Glu Met Ile Lys
180 185 190

Arg Phe Leu Arg Val Val Lys Glu Lys Asp Pro Asp Val Leu Ile Thr
195 200 205

Tyr Asn Gly Asp Asn Phe Asp Phe Ala Tyr Leu Lys Lys Arg Cys Glu
210 215 220

Lys Leu Gly Ile Asn Phe Ala Leu Gly Arg Asp Gly Ser Glu Pro Lys
225 230 235 240

Ile Gln Arg Met Gly Asp Arg Phe Ala Val Glu Val Lys Gly Arg Ile
245 250 255

His Phe Asp Leu Tyr Pro Val Ile Arg Arg Thr Ile Asn Leu Pro Thr
260 265 270

Tyr Thr Leu Glu Ala Val Tyr Glu Ala Val Phe Gly Gln Pro Lys Glu
275 280 285

Lys Val Tyr Ala Glu Glu Ile Thr Thr Ala Trp Glu Thr Gly Glu Asn
290 295 300

Leu Glu Arg Val Ala Arg Tyr Ser Met Glu Asp Ala Lys Val Thr Tyr
305 310 315 320

Glu Leu Gly Lys Glu Phe Leu Pro Met Glu Ala Gln Leu Ser Arg Leu
325 330 335

Ile Gly Gln Ser Leu Trp Asp Val Ser Arg Ser Ser Thr Gly Asn Leu
340 345 350

Val Glu Trp Phe Leu Leu Arg Lys Ala Tyr Glu Arg Asn Glu Leu Ala
355 360 365

Pro Asn Lys Pro Asp Glu Lys Glu Leu Ala Arg Arg Arg Gln Ser Tyr
370 375 380

Glu Gly Gly Tyr Val Lys Glu Pro Glu Arg Gly Leu Trp Glu Asn Ile
385 390 395 400

Val Tyr Leu Asp Phe Arg Ser Ala Ala Ala Ser Ile Ile Ile Thr His
405 410 415

Asn Val Ser Pro Asp Thr Leu Asn Arg Glu Gly Cys Lys Glu Tyr Asp
420 425 430

Val Ala Pro Gln Val Gly His Arg Phe Cys Lys Asp Phe Pro Gly Phe
435 440 445

Ile Pro Ser Leu Leu Gly Asp Leu Leu Glu Glu Arg Gln Lys Ile Lys
450 455 460

Lys Lys Met Lys Ala Thr Ile Asp Pro Ile Glu Arg Lys Leu Leu Asp
465 470 475 480

Tyr Arg Gln Arg Leu Ile Lys Ile Leu Ala Asn Ser Tyr Tyr Gly Tyr
485 490 495

Tyr Gly Tyr Ala Arg Ala Arg Trp Tyr Cys Lys Glu Cys Ala Glu Ser
500 505 510

Val Xaa Ala Trp Gly Arg Glu Tyr Xaa Thr Met Thr Ile Lys Glu Ile
515 520 525

Glu Glu Lys Tyr Gly Phe Lys Val Ile Tyr Ser Asp Thr Asp Gly Phe
530 535 540

Phe Ala Thr Ile Pro Gly Ala Asp Ala Glu Thr Val Lys Lys Lys Ala

545 550 555 560

Met Glu Phe Leu Lys Tyr Ile Asn Ala Lys Leu Pro Gly Ala Leu Glu
565 570 575

Leu Glu Tyr Glu Gly Phe Tyr Lys Arg Gly Phe Phe Val Thr Lys Lys
580 585 590

Lys Tyr Ala Val Ile Asp Glu Glu Gly Lys Ile Thr Thr Arg Gly Leu
595 600 605

Glu Ile Val Arg Arg Asp Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu Thr Gln Ala
610 615 620

Arg Val Leu Glu Ala Leu Leu Lys Asp Gly Asp Val Glu Lys Ala Val
625 630 635 640

Arg Ile Val Lys Glu Val Thr Glu Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Val Pro
645 650 655

Pro Glu Lys Leu Val Ile His Glu Gln Ile Thr Arg Asp Leu Lys Asp
660 665 670

Tyr Lys Ala Thr Gly Pro His Val Ala Val Ala Lys Arg Leu Ala Ala
675 680 685

Arg Gly Val Lys Ile Arg Pro Gly Thr Val Ile Ser Tyr Ile Val Leu
690 695 700

Lys Gly Ser Gly Arg Ile Gly Asp Arg Ala Ile Pro Phe Asp Glu Phe
705 710 715 720

Asp Pro Thr Lys His Lys Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln
725 730 735

Val Leu Pro Ala Val Glu Arg Ile Leu Arg Ala Phe Gly Tyr Arg Lys
740 745 750

Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Arg Gln Val Gly Leu Ser Ala Trp
755 760 765

Leu Lys Pro Lys Gly Thr
770

<210> 25
<211> 784
<212> PRT
<213> Methanococcus maripaludis

<400> 25

Met Glu Ser Leu Ile Asp Leu Asp Tyr Asn Ser Asp Asp Leu Cys Ile
1 5 10 15

Tyr Leu Tyr Leu Ile Asn Ser Ile Ile Lys Glu Lys Asp Phe Lys Pro
20 25 30

Tyr Phe Tyr Val Asn Ser Thr Asp Lys Glu Gln Ile Leu Glu Phe Leu
35 40 45

Lys Asp Tyr Glu Lys Lys His Lys Leu Asp Ser Glu Ile Ser Lys Met
50 55 60

Ile Glu Asn Ile Glu Thr Val Lys Lys Ile Val Phe Asp Glu Asn Tyr
65 70 75 80

Gln Glu Lys Glu Leu Ser Lys Val Thr Val Lys Tyr Pro Asn Asn Val
85 90 95

Lys Thr Val Arg Glu Ile Leu Met Glu Phe Glu Arg Leu Tyr Glu Tyr
100 105 110

Asp Ile Pro Phe Val Arg Arg Tyr Leu Ile Asp Asn Ser Val Ile Pro
115 120 125

Thr Ser Thr Trp Asp Phe Glu Asn Asn Lys Lys Ile Asp Asn Lys Ile
130 135 140

Pro Asp Phe Lys Thr Val Ser Phe Ala Ile Ala Val Tyr Cys Asn Lys
145 150 155 160

Glu Pro Asn Pro Lys Lys Asp Pro Ile Ile Met Ala Ser Phe Ser Ser
165 170 175

Lys Asp Phe Asn Thr Val Val Ser Thr Lys Lys Phe Asp His Glu Lys
180 185 190

Leu Glu Tyr Val Lys Asp Glu Lys Glu Leu Ile Lys Arg Ile Ile Glu
195 200 205

Ile Leu Lys Glu Tyr Asp Ile Ile Tyr Thr Tyr Asn Gly Asp Asn Phe
210 215 220

Asp Phe Pro Tyr Leu Lys Lys Arg Ala Glu Ser Phe Gly Leu Glu Leu
225 230 235 240

Lys Leu Gly Lys Asn Asp Glu Lys Ile Lys Ile Thr Lys Gly Gly Met
245 250 255

Asn Ser Lys Ser Tyr Ile Pro Gly Arg Val His Ile Asp Leu Tyr Pro
260 265 270

Ile Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu Thr Lys Tyr Arg Leu Glu Asn Val
275 280 285

Thr Glu Ala Leu Phe Asp Val Lys Lys Val Asp Val Gly His Glu Asn
290 295 300

Ile Pro Lys Met Trp Asp Asn Leu Asp Glu Thr Leu Val Glu Tyr Ser
305 310 315 320

His Gln Asp Ala Tyr Tyr Thr Gln Arg Ile Gly Glu Gln Phe Leu Pro
325 330 335

Leu Glu Ile Met Phe Ser Arg Val Val Asn Gln Ser Leu Tyr Asp Ile
340 345 350

Asn Arg Met Ser Ser Ser Gln Met Val Glu Tyr Leu Leu Leu Lys Asn
355 360 365

Ser Tyr Lys Met Gly Val Ile Ala Pro Asn Arg Pro Ser Gly Lys Glu
370 375 380

Tyr Gln Lys Arg Ile Arg Ser Ser Tyr Glu Gly Gly Tyr Val Lys Glu
385 390 395 400

Pro Leu Lys Gly Ile His Glu Asp Ile Val Ser Met Asp Phe Leu Ser
405 410 415

Ala Ala Ala Ser Ile Ile Met Ser His Asn Leu Ser Pro Glu Thr Ile
420 425 430

Asp Cys Thr Cys Cys Ser Asp Glu Glu Asn Gly Glu Asn Glu Glu Ile
435 440 445

Leu Gly His Lys Phe Cys Lys Lys Ser Ile Gly Ile Ile Pro Lys Thr
450 455 460

Leu Met Asp Leu Ile Asn Arg Arg Lys Lys Val Lys Lys Val Leu Arg
465 470 475 480

Glu Lys Ala Glu Lys Gly Glu Phe Asp Glu Glu Tyr Gln Ile Leu Asp
485 490 495

Tyr Glu Gln Arg Leu Ile Lys Val Leu Ala Asn Ser His Tyr Gly Tyr
500 505 510

Leu Ala Phe Pro Met Ala Arg Trp Tyr Ser Arg Asp Cys Ala Glu Ile
515 520 525

Thr Thr His Leu Gly Arg Gln Tyr Ile Gln Lys Thr Ile Glu Glu Ala
530 535 540

Glu Asn Phe Gly Phe Lys Val Ile Tyr Ala Asp Thr Asp Gly Phe Tyr
545 550 555 560

Ser Lys Trp Ala Asp Asp Lys Glu Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Leu Leu
565 570 575

Glu Lys Thr Arg Glu Phe Leu Lys Asn Ile Asn Asn Thr Leu Pro Gly
580 585 590

Glu Met Glu Leu Glu Phe Glu Gly Tyr Phe Lys Arg Gly Ile Phe Val
595 600 605

Thr Lys Lys Lys Tyr Ala Leu Ile Asp Glu Asn Glu Lys Ile Thr Val
610 615 620

Lys Gly Leu Glu Val Val Arg Arg Asp Trp Ser Asn Val Ser Lys Asn
625 630 635 640

Thr Gln Lys Asn Val Leu Asn Ala Leu Leu Lys Glu Gly Ser Val Glu
645 650 655

Asn Ala Lys Lys Val Ile Gln Asp Thr Ile Lys Glu Leu Lys Asp Gly
660 665 670

Lys Val Asn Asn Glu Asp Leu Leu Ile His Thr Gln Leu Thr Lys Arg
675 680 685

Ile Glu Asp Tyr Lys Thr Thr Ala Pro His Val Glu Val Ala Lys Lys
690 695 700

Ile Leu Lys Ser Gly Asn Arg Val Asn Thr Gly Asp Val Ile Ser Tyr
705 710 715 720

Ile Ile Thr Ser Gly Asn Lys Ser Ile Ser Glu Arg Ala Glu Ile Leu
725 730 735

Glu Asn Ala Lys Asn Tyr Asp Thr Asn Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln Ile
740 745 750

Leu Pro Pro Val Ile Arg Leu Met Glu Ala Leu Gly Ile Thr Lys Asp
755 760 765

Glu Leu Lys Asp Ser Lys Lys Gln Tyr Thr Leu His His Phe Leu Lys
770 775 780

<210> 26
<211> 784
<212> PRT

<213> Methanococcus maripaludis

<220>
<221> VARIANTE
<222> (530)..(530)
<223> X= A, S

<400> 26
Met Glu Ser Leu Ile Asp Leu Asp Tyr Asn Ser Asp Asp Leu Cys Ile
1 5 10 15

Tyr Leu Tyr Leu Ile Asn Ser Ile Ile Lys Glu Lys Asp Phe Lys Pro
20 25 30

Tyr Phe Tyr Val Asn Ser Thr Asp Lys Glu Gln Ile Leu Glu Phe Leu
35 40 45

Lys Asp Tyr Glu Lys Lys His Lys Leu Asp Ser Glu Ile Ser Lys Met
50 55 60

Ile Glu Asn Ile Glu Thr Val Lys Lys Ile Val Phe Asp Glu Asn Tyr
65 70 75 80

Gln Glu Lys Glu Leu Ser Lys Val Thr Val Lys Tyr Pro Asn Asn Val
85 90 95

Lys Thr Val Arg Glu Ile Leu Met Glu Phe Glu Arg Leu Tyr Glu Tyr
100 105 110

Asp Ile Pro Phe Val Arg Arg Tyr Leu Ile Asp Asn Ser Val Ile Pro
115 120 125

Thr Ser Thr Trp Asp Phe Glu Asn Asn Lys Lys Ile Asp Asn Lys Ile
130 135 140

Pro Asp Phe Lys Thr Val Ser Phe Ala Ile Ala Val Tyr Cys Asn Lys
145 150 155 160

Glu Pro Asn Pro Lys Lys Asp Pro Ile Ile Met Ala Ser Phe Ser Ser
165 170 175

Lys Asp Phe Asn Thr Val Val Ser Thr Lys Lys Phe Asp His Glu Lys
180 185 190

Leu Glu Tyr Val Lys Asp Glu Lys Glu Leu Ile Lys Arg Ile Ile Glu
195 200 205

Ile Leu Lys Glu Tyr Asp Ile Ile Tyr Thr Tyr Asn Gly Asp Asn Phe
210 215 220

Asp Phe Pro Tyr Leu Lys Lys Arg Ala Glu Ser Phe Gly Leu Glu Leu
225 230 235 240

Lys Leu Gly Lys Asn Asp Glu Lys Ile Lys Ile Thr Lys Gly Gly Met
245 250 255

Asn Ser Lys Ser Tyr Ile Pro Gly Arg Val His Ile Asp Leu Tyr Pro
260 265 270

Ile Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu Thr Lys Tyr Arg Leu Glu Asn Val
275 280 285

Thr Glu Ala Leu Phe Asp Val Lys Lys Val Asp Val Gly His Glu Asn
290 295 300

Ile Pro Lys Met Trp Asp Asn Leu Asp Glu Thr Leu Val Glu Tyr Ser
305 310 315 320

His Gln Asp Ala Tyr Tyr Thr Gln Arg Ile Gly Glu Gln Phe Leu Pro
325 330 335

Leu Glu Ile Met Phe Ser Arg Val Val Asn Gln Ser Leu Tyr Asp Ile
340 345 350

Asn Arg Met Ser Ser Ser Gln Met Val Glu Tyr Leu Leu Leu Lys Asn
355 360 365

Ser Tyr Lys Met Gly Val Ile Ala Pro Asn Arg Pro Ser Gly Lys Glu
370 375 380

Tyr Gln Lys Arg Ile Arg Ser Ser Tyr Glu Gly Gly Tyr Val Lys Glu
385 390 395 400

Pro Leu Lys Gly Ile His Glu Asp Ile Val Ser Met Asp Phe Leu Ser
405 410 415

Ala Ala Ala Ser Ile Ile Met Ser His Asn Leu Ser Pro Glu Thr Ile
420 425 430

Asp Cys Thr Cys Cys Ser Asp Glu Glu Asn Gly Glu Asn Glu Glu Ile
435 440 445

Leu Gly His Lys Phe Cys Lys Lys Ser Ile Gly Ile Ile Pro Lys Thr
450 455 460

Leu Met Asp Leu Ile Asn Arg Arg Lys Lys Val Lys Lys Val Leu Arg
465 470 475 480

Glu Lys Ala Glu Lys Gly Glu Phe Asp Glu Glu Tyr Gln Ile Leu Asp
485 490 495

Tyr Glu Gln Arg Leu Ile Lys Val Leu Ala Asn Ser His Tyr Gly Tyr
500 505 510

Leu Ala Phe Pro Met Ala Arg Trp Tyr Ser Arg Asp Cys Ala Glu Ile
515 520 525

Thr Xaa His Leu Gly Arg Gln Tyr Ile Gln Lys Thr Ile Glu Glu Ala
530 535 540

Glu Asn Phe Gly Phe Lys Val Ile Tyr Ala Asp Thr Asp Gly Phe Tyr
545 550 555 560

Ser Lys Trp Ala Asp Asp Lys Glu Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Leu Leu
565 570 575

Glu Lys Thr Arg Glu Phe Leu Lys Asn Ile Asn Asn Thr Leu Pro Gly
580 585 590

Glu Met Glu Leu Glu Phe Glu Gly Tyr Phe Lys Arg Gly Ile Phe Val
595 600 605

Thr Lys Lys Lys Tyr Ala Leu Ile Asp Glu Asn Glu Lys Ile Thr Val
610 615 620

Lys Gly Leu Glu Val Val Arg Arg Asp Trp Ser Asn Val Ser Lys Asn
625 630 635 640

Thr Gln Lys Asn Val Leu Asn Ala Leu Leu Lys Glu Gly Ser Val Glu
645 650 655

Asn Ala Lys Lys Val Ile Gln Asp Thr Ile Lys Glu Leu Lys Asp Gly
660 665 670

Lys Val Asn Asn Glu Asp Leu Leu Ile His Thr Gln Leu Thr Lys Arg
675 680 685

Ile Glu Asp Tyr Lys Thr Thr Ala Pro His Val Glu Val Ala Lys Lys
690 695 700

Ile Leu Lys Ser Gly Asn Arg Val Asn Thr Gly Asp Val Ile Ser Tyr
705 710 715 720

Ile Ile Thr Ser Gly Asn Lys Ser Ile Ser Glu Arg Ala Glu Ile Leu
725 730 735

Glu Asn Ala Lys Asn Tyr Asp Thr Asn Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln Ile
740 745 750

Leu Pro Pro Val Ile Arg Leu Met Glu Ala Leu Gly Ile Thr Lys Asp
755 760 765

Glu Leu Lys Asp Ser Lys Lys Gln Tyr Thr Leu His His Phe Leu Lys
770 775 780

<210> 27
<211> 784
<212> PRT
<213> Methanococcus maripaludis

<220>
<221> VARIANTE
<222> (537)..(537)
<223> X=L

<400> 27
Met Glu Ser Leu Ile Asp Leu Asp Tyr Asn Ser Asp Asp Leu Cys Ile
1 5 10 15

Tyr Leu Tyr Leu Ile Asn Ser Ile Ile Lys Glu Lys Asp Phe Lys Pro
20 25 30

Tyr Phe Tyr Val Asn Ser Thr Asp Lys Glu Gln Ile Leu Glu Phe Leu
35 40 45

Lys Asp Tyr Glu Lys Lys His Lys Leu Asp Ser Glu Ile Ser Lys Met
50 55 60

Ile Glu Asn Ile Glu Thr Val Lys Lys Ile Val Phe Asp Glu Asn Tyr
65 70 75 80

Gln Glu Lys Glu Leu Ser Lys Val Thr Val Lys Tyr Pro Asn Asn Val
85 90 95

Lys Thr Val Arg Glu Ile Leu Met Glu Phe Glu Arg Leu Tyr Glu Tyr
100 105 110

Asp Ile Pro Phe Val Arg Arg Tyr Leu Ile Asp Asn Ser Val Ile Pro
115 120 125

Thr Ser Thr Trp Asp Phe Glu Asn Asn Lys Lys Ile Asp Asn Lys Ile
130 135 140

Pro Asp Phe Lys Thr Val Ser Phe Ala Ile Ala Val Tyr Cys Asn Lys
145 150 155 160

Glu Pro Asn Pro Lys Lys Asp Pro Ile Ile Met Ala Ser Phe Ser Ser
165 170 175

Lys Asp Phe Asn Thr Val Val Ser Thr Lys Lys Phe Asp His Glu Lys
180 185 190

Leu Glu Tyr Val Lys Asp Glu Lys Glu Leu Ile Lys Arg Ile Ile Glu
195 200 205

Ile Leu Lys Glu Tyr Asp Ile Ile Tyr Thr Tyr Asn Gly Asp Asn Phe
210 215 220

Asp Phe Pro Tyr Leu Lys Lys Arg Ala Glu Ser Phe Gly Leu Glu Leu
225 230 235 240

Lys Leu Gly Lys Asn Asp Glu Lys Ile Lys Ile Thr Lys Gly Gly Met
245 250 255

Asn Ser Lys Ser Tyr Ile Pro Gly Arg Val His Ile Asp Leu Tyr Pro
260 265 270

Ile Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu Thr Lys Tyr Arg Leu Glu Asn Val
275 280 285

Thr Glu Ala Leu Phe Asp Val Lys Lys Val Asp Val Gly His Glu Asn
290 295 300

Ile Pro Lys Met Trp Asp Asn Leu Asp Glu Thr Leu Val Glu Tyr Ser
305 310 315 320

His Gln Asp Ala Tyr Tyr Thr Gln Arg Ile Gly Glu Gln Phe Leu Pro
325 330 335

Leu Glu Ile Met Phe Ser Arg Val Val Asn Gln Ser Leu Tyr Asp Ile
340 345 350

Asn Arg Met Ser Ser Ser Gln Met Val Glu Tyr Leu Leu Leu Lys Asn
355 360 365

Ser Tyr Lys Met Gly Val Ile Ala Pro Asn Arg Pro Ser Gly Lys Glu
370 375 380

Tyr Gln Lys Arg Ile Arg Ser Ser Tyr Glu Gly Gly Tyr Val Lys Glu
385 390 395 400

Pro Leu Lys Gly Ile His Glu Asp Ile Val Ser Met Asp Phe Leu Ser
405 410 415

Ala Ala Ala Ser Ile Ile Met Ser His Asn Leu Ser Pro Glu Thr Ile
420 425 430

Asp Cys Thr Cys Cys Ser Asp Glu Glu Asn Gly Glu Asn Glu Glu Ile
435 440 445

Leu Gly His Lys Phe Cys Lys Lys Ser Ile Gly Ile Ile Pro Lys Thr
450 455 460

Leu Met Asp Leu Ile Asn Arg Arg Lys Lys Val Lys Lys Val Leu Arg
465 470 475 480

Glu Lys Ala Glu Lys Gly Glu Phe Asp Glu Glu Tyr Gln Ile Leu Asp
485 490 495

Tyr Glu Gln Arg Leu Ile Lys Val Leu Ala Asn Ser His Tyr Gly Tyr
500 505 510

Leu Ala Phe Pro Met Ala Arg Trp Tyr Ser Arg Asp Cys Ala Glu Ile
515 520 525

Thr Thr His Leu Gly Arg Gln Tyr Xaa Gln Lys Thr Ile Glu Glu Ala
530 535 540

Glu Asn Phe Gly Phe Lys Val Ile Tyr Ala Asp Thr Asp Gly Phe Tyr
545 550 555 560

Ser Lys Trp Ala Asp Asp Lys Glu Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Leu Leu
565 570 575

Glu Lys Thr Arg Glu Phe Leu Lys Asn Ile Asn Asn Thr Leu Pro Gly
580 585 590

Glu Met Glu Leu Glu Phe Glu Gly Tyr Phe Lys Arg Gly Ile Phe Val
595 600 605

Thr Lys Lys Lys Tyr Ala Leu Ile Asp Glu Asn Glu Lys Ile Thr Val
610 615 620

Lys Gly Leu Glu Val Val Arg Arg Asp Trp Ser Asn Val Ser Lys Asn
625 630 635 640

Thr Gln Lys Asn Val Leu Asn Ala Leu Leu Lys Glu Gly Ser Val Glu
645 650 655

Asn Ala Lys Lys Val Ile Gln Asp Thr Ile Lys Glu Leu Lys Asp Gly
660 665 670

Lys Val Asn Asn Glu Asp Leu Leu Ile His Thr Gln Leu Thr Lys Arg
675 680 685

Ile Glu Asp Tyr Lys Thr Thr Ala Pro His Val Glu Val Ala Lys Lys
690 695 700

Ile Leu Lys Ser Gly Asn Arg Val Asn Thr Gly Asp Val Ile Ser Tyr
705 710 715 720

Ile Ile Thr Ser Gly Asn Lys Ser Ile Ser Glu Arg Ala Glu Ile Leu
725 730 735

Glu Asn Ala Lys Asn Tyr Asp Thr Asn Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln Ile
740 745 750

Leu Pro Pro Val Ile Arg Leu Met Glu Ala Leu Gly Ile Thr Lys Asp
755 760 765

Glu Leu Lys Asp Ser Lys Lys Gln Tyr Thr Leu His His Phe Leu Lys
770 775 780

<210> 28
<211> 784
<212> PRT
<213> Methanococcus maripaludis

<220>
<221> VARIANTE
<222> (530)..(530)
<223> X=A, S

<220>
<221> VARIANTE
<222> (537)..(537)
<223> X=L

<400> 28

Met Glu Ser Leu Ile Asp Leu Asp Tyr Asn Ser Asp Asp Leu Cys Ile
1 5 10 15

Tyr Leu Tyr Leu Ile Asn Ser Ile Ile Lys Glu Lys Asp Phe Lys Pro
20 25 30

Tyr Phe Tyr Val Asn Ser Thr Asp Lys Glu Gln Ile Leu Glu Phe Leu
35 40 45

Lys Asp Tyr Glu Lys Lys His Lys Leu Asp Ser Glu Ile Ser Lys Met
50 55 60

Ile Glu Asn Ile Glu Thr Val Lys Lys Ile Val Phe Asp Glu Asn Tyr
65 70 75 80

Gln Glu Lys Glu Leu Ser Lys Val Thr Val Lys Tyr Pro Asn Asn Val
85 90 95

Lys Thr Val Arg Glu Ile Leu Met Glu Phe Glu Arg Leu Tyr Glu Tyr
100 105 110

Asp Ile Pro Phe Val Arg Arg Tyr Leu Ile Asp Asn Ser Val Ile Pro
115 120 125

Thr Ser Thr Trp Asp Phe Glu Asn Asn Lys Lys Ile Asp Asn Lys Ile
130 135 140

Pro Asp Phe Lys Thr Val Ser Phe Ala Ile Ala Val Tyr Cys Asn Lys
145 150 155 160

Glu Pro Asn Pro Lys Lys Asp Pro Ile Ile Met Ala Ser Phe Ser Ser
165 170 175

Lys Asp Phe Asn Thr Val Val Ser Thr Lys Lys Phe Asp His Glu Lys
180 185 190

Leu Glu Tyr Val Lys Asp Glu Lys Glu Leu Ile Lys Arg Ile Ile Glu
195 200 205

Ile Leu Lys Glu Tyr Asp Ile Ile Tyr Thr Tyr Asn Gly Asp Asn Phe
210 215 220

Asp Phe Pro Tyr Leu Lys Lys Arg Ala Glu Ser Phe Gly Leu Glu Leu
225 230 235 240

Lys Leu Gly Lys Asn Asp Glu Lys Ile Lys Ile Thr Lys Gly Gly Met
245 250 255

Asn Ser Lys Ser Tyr Ile Pro Gly Arg Val His Ile Asp Leu Tyr Pro
260 265 270

Ile Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu Thr Lys Tyr Arg Leu Glu Asn Val
275 280 285

Thr Glu Ala Leu Phe Asp Val Lys Lys Val Asp Val Gly His Glu Asn
290 295 300

Ile Pro Lys Met Trp Asp Asn Leu Asp Glu Thr Leu Val Glu Tyr Ser
305 310 315 320

His Gln Asp Ala Tyr Tyr Thr Gln Arg Ile Gly Glu Gln Phe Leu Pro
325 330 335

Leu Glu Ile Met Phe Ser Arg Val Val Asn Gln Ser Leu Tyr Asp Ile
340 345 350

Asn Arg Met Ser Ser Ser Gln Met Val Glu Tyr Leu Leu Leu Lys Asn
355 360 365

Ser Tyr Lys Met Gly Val Ile Ala Pro Asn Arg Pro Ser Gly Lys Glu
370 375 380

Tyr Gln Lys Arg Ile Arg Ser Ser Tyr Glu Gly Gly Tyr Val Lys Glu
385 390 395 400

Pro Leu Lys Gly Ile His Glu Asp Ile Val Ser Met Asp Phe Leu Ser
405 410 415

Ala Ala Ala Ser Ile Ile Met Ser His Asn Leu Ser Pro Glu Thr Ile
420 425 430

Asp Cys Thr Cys Cys Ser Asp Glu Glu Asn Gly Glu Asn Glu Glu Ile
435 440 445

Leu Gly His Lys Phe Cys Lys Lys Ser Ile Gly Ile Ile Pro Lys Thr
450 455 460

Leu Met Asp Leu Ile Asn Arg Arg Lys Lys Val Lys Lys Val Leu Arg
465 470 475 480

Glu Lys Ala Glu Lys Gly Glu Phe Asp Glu Glu Tyr Gln Ile Leu Asp

485 490 495

Tyr Glu Gln Arg Leu Ile Lys Val Leu Ala Asn Ser His Tyr Gly Tyr
500 505 510

Leu Ala Phe Pro Met Ala Arg Trp Tyr Ser Arg Asp Cys Ala Glu Ile
515 520 525

Thr Xaa His Leu Gly Arg Gln Tyr Xaa Gln Lys Thr Ile Glu Glu Ala
530 535 540

Glu Asn Phe Gly Phe Lys Val Ile Tyr Ala Asp Thr Asp Gly Phe Tyr
545 550 555 560

Ser Lys Trp Ala Asp Asp Lys Glu Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Leu Leu
565 570 575

Glu Lys Thr Arg Glu Phe Leu Lys Asn Ile Asn Asn Thr Leu Pro Gly
580 585 590

Glu Met Glu Leu Glu Phe Glu Gly Tyr Phe Lys Arg Gly Ile Phe Val
595 600 605

Thr Lys Lys Lys Tyr Ala Leu Ile Asp Glu Asn Glu Lys Ile Thr Val
610 615 620

Lys Gly Leu Glu Val Val Arg Arg Asp Trp Ser Asn Val Ser Lys Asn
625 630 635 640

Thr Gln Lys Asn Val Leu Asn Ala Leu Leu Lys Glu Gly Ser Val Glu
645 650 655

Asn Ala Lys Lys Val Ile Gln Asp Thr Ile Lys Glu Leu Lys Asp Gly
660 665 670

Lys Val Asn Asn Glu Asp Leu Leu Ile His Thr Gln Leu Thr Lys Arg
675 680 685

Ile Glu Asp Tyr Lys Thr Thr Ala Pro His Val Glu Val Ala Lys Lys
690 695 700

Ile Leu Lys Ser Gly Asn Arg Val Asn Thr Gly Asp Val Ile Ser Tyr
705 710 715 720

Ile Ile Thr Ser Gly Asn Lys Ser Ile Ser Glu Arg Ala Glu Ile Leu
725 730 735

Glu Asn Ala Lys Asn Tyr Asp Thr Asn Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln Ile
740 745 750

Leu Pro Pro Val Ile Arg Leu Met Glu Ala Leu Gly Ile Thr Lys Asp
755 760 765

Glu Leu Lys Asp Ser Lys Lys Gln Tyr Thr Leu His His Phe Leu Lys
770 775 780

<210> 29
<211> 775
<212> PRT
<213> Thermococcus sp. 9 N-7

<400> 29
Met Ile Leu Asp Thr Asp Tyr Ile Thr Glu Asn Gly Lys Pro Val Ile
1 5 10 15

Arg Val Phe Lys Lys Glu Asn Gly Glu Phe Lys Ile Glu Tyr Asp Arg
20 25 30

Thr Phe Glu Pro Tyr Phe Tyr Ala Leu Leu Lys Asp Asp Ser Ala Ile
35 40 45

Glu Asp Val Lys Lys Val Thr Ala Lys Arg His Gly Thr Val Val Lys
50 55 60

Val Lys Arg Ala Glu Lys Val Gln Lys Lys Phe Leu Gly Arg Pro Ile
65 70 75 80

Glu Val Trp Lys Leu Tyr Phe Asn His Pro Gln Asp Val Pro Ala Ile
85 90 95

Arg Asp Arg Ile Arg Ala His Pro Ala Val Val Asp Ile Tyr Glu Tyr
100 105 110

Asp Ile Pro Phe Ala Lys Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Gly Leu Ile Pro
115 120 125

Met Glu Gly Asp Glu Glu Leu Thr Met Leu Ala Phe Ala Ile Ala Thr
130 135 140

Leu Tyr His Glu Gly Glu Glu Phe Gly Thr Gly Pro Ile Leu Met Ile
145 150 155 160

Ser Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Ala Arg Val Ile Thr Trp Lys Lys Ile
165 170 175

Asp Leu Pro Tyr Val Asp Val Val Ser Thr Glu Lys Glu Met Ile Lys
180 185 190

Arg Phe Leu Arg Val Val Arg Glu Lys Asp Pro Asp Val Leu Ile Thr
195 200 205

Tyr Asn Gly Asp Asn Phe Asp Phe Ala Tyr Leu Lys Lys Arg Ser Glu
210 215 220

Glu Leu Gly Ile Lys Phe Thr Leu Gly Arg Asp Gly Ser Glu Pro Lys
225 230 235 240

Ile Gln Arg Met Gly Asp Arg Phe Ala Val Glu Val Lys Gly Arg Ile
245 250 255

His Phe Asp Leu Tyr Pro Val Ile Arg Arg Thr Ile Asn Leu Pro Thr
260 265 270

Tyr Thr Leu Glu Ala Val Tyr Glu Ala Val Phe Gly Lys Pro Lys Glu
275 280 285

Lys Val Tyr Ala Glu Glu Ile Ala Gln Ala Trp Glu Ser Gly Glu Gly
290 295 300

Leu Glu Arg Val Ala Arg Tyr Ser Met Glu Asp Ala Lys Val Thr Tyr
305 310 315 320

Glu Leu Gly Arg Glu Phe Phe Pro Met Glu Ala Gln Leu Ser Arg Leu
325 330 335

Ile Gly Gln Ser Leu Trp Asp Val Ser Arg Ser Ser Thr Gly Asn Leu
340 345 350

Val Glu Trp Phe Leu Leu Arg Lys Ala Tyr Lys Arg Asn Glu Leu Ala
355 360 365

Pro Asn Lys Pro Asp Glu Arg Glu Leu Ala Arg Arg Arg Gly Gly Tyr
370 375 380

Ala Gly Gly Tyr Val Lys Glu Pro Glu Arg Gly Leu Trp Asp Asn Ile
385 390 395 400

Val Tyr Leu Asp Phe Arg Ser Ala Ala Ile Ser Ile Ile Ile Thr His
405 410 415

Asn Val Ser Pro Asp Thr Leu Asn Arg Glu Gly Cys Lys Glu Tyr Asp
420 425 430

Val Ala Pro Glu Val Gly His Lys Phe Cys Lys Asp Phe Pro Gly Phe
435 440 445

Ile Pro Ser Leu Leu Gly Asp Leu Leu Glu Glu Arg Gln Lys Ile Lys
450 455 460

Arg Lys Met Lys Ala Thr Val Asp Pro Leu Glu Lys Lys Leu Leu Asp
465 470 475 480

Tyr Arg Gln Arg Val Ile Lys Ile Leu Ala Asn Ser Phe Tyr Gly Tyr
485 490 495

Tyr Gly Tyr Ala Lys Ala Arg Trp Tyr Cys Lys Glu Cys Ala Glu Ser
500 505 510

Val Thr Ala Trp Gly Arg Glu Tyr Ile Glu Met Val Ile Arg Glu Leu
515 520 525

Glu Glu Lys Phe Gly Phe Lys Val Leu Tyr Ala Asp Thr Asp Gly Leu
530 535 540

His Ala Thr Ile Pro Gly Ala Asp Ala Glu Thr Val Lys Lys Lys Ala
545 550 555 560

Lys Glu Phe Leu Lys Tyr Ile Asn Pro Lys Leu Pro Gly Leu Leu Glu
565 570 575

Leu Glu Tyr Glu Gly Phe Tyr Val Arg Gly Phe Phe Val Thr Lys Lys
580 585 590

Lys Tyr Ala Val Ile Asp Glu Glu Gly Lys Ile Thr Thr Arg Gly Leu
595 600 605

Glu Ile Val Arg Arg Asp Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu Thr Gln Ala
610 615 620

Arg Val Leu Glu Ala Ile Leu Lys His Gly Asp Val Glu Glu Ala Val
625 630 635 640

Arg Ile Val Lys Glu Val Thr Glu Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Val Pro
645 650 655

Pro Glu Lys Leu Val Ile His Glu Gln Ile Thr Arg Asp Leu Arg Asp
660 665 670

Tyr Lys Ala Thr Gly Pro His Val Ala Val Ala Lys Arg Leu Ala Ala
675 680 685

Arg Gly Val Lys Ile Arg Pro Gly Thr Val Ile Ser Tyr Ile Val Leu
690 695 700

Lys Gly Ser Gly Arg Ile Gly Asp Arg Ala Ile Pro Ala Asp Glu Phe
705 710 715 720

Asp Pro Thr Lys His Arg Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln
725 730 735

Val Leu Pro Ala Val Glu Arg Ile Leu Lys Ala Phe Gly Tyr Arg Lys
740 745 750

Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Lys Gln Val Gly Leu Gly Ala Trp
755 760 765

Leu Lys Val Lys Gly Lys Lys
770 775

<210> 30
<211> 775
<212> PRT
<213> Thermococcus sp. 9 N-7

<400> 30
Met Ile Leu Asp Thr Asp Tyr Ile Thr Glu Asn Gly Lys Pro Val Ile
1 5 10 15

Arg Val Phe Lys Lys Glu Asn Gly Glu Phe Lys Ile Glu Tyr Asp Arg
20 25 30

Thr Phe Glu Pro Tyr Phe Tyr Ala Leu Leu Lys Asp Asp Ser Ala Ile
35 40 45

Glu Asp Val Lys Lys Val Thr Ala Lys Arg His Gly Thr Val Val Lys
50 55 60

Val Lys Arg Ala Glu Lys Val Gln Lys Lys Phe Leu Gly Arg Pro Ile
65 70 75 80

Glu Val Trp Lys Leu Tyr Phe Asn His Pro Gln Asp Val Pro Ala Ile
85 90 95

Arg Asp Arg Ile Arg Ala His Pro Ala Val Val Asp Ile Tyr Glu Tyr
100 105 110

Asp Ile Pro Phe Ala Lys Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Gly Leu Ile Pro
115 120 125

Ala Glu Gly Asp Glu Glu Leu Thr Met Leu Ala Phe Ala Ile Ala Thr
130 135 140

Leu Tyr His Glu Gly Glu Glu Phe Gly Thr Gly Pro Ile Leu Met Ile
145 150 155 160

Ser Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Ala Arg Val Ile Thr Trp Lys Lys Ile
165 170 175

Asp Leu Pro Tyr Val Asp Val Val Ser Thr Glu Lys Glu Met Ile Lys
180 185 190

Arg Phe Leu Arg Val Val Arg Glu Lys Asp Pro Asp Val Leu Ile Thr
195 200 205

Tyr Asn Gly Asp Asn Phe Asp Phe Ala Tyr Leu Lys Lys Arg Ser Glu
210 215 220

Glu Leu Gly Ile Lys Phe Thr Leu Gly Arg Asp Gly Ser Glu Pro Lys
225 230 235 240

Ile Gln Arg Met Gly Asp Arg Phe Ala Val Glu Val Lys Gly Arg Ile
245 250 255

His Phe Asp Leu Tyr Pro Val Ile Arg Arg Thr Ile Asn Leu Pro Thr
260 265 270

Tyr Thr Leu Glu Ala Val Tyr Glu Ala Val Phe Gly Lys Pro Lys Glu
275 280 285

Lys Val Tyr Ala Glu Glu Ile Ala Gln Ala Trp Glu Ser Gly Glu Gly
290 295 300

Leu Glu Arg Val Ala Arg Tyr Ser Met Glu Asp Ala Lys Val Thr Tyr
305 310 315 320

Glu Leu Gly Arg Glu Phe Phe Pro Met Glu Ala Gln Leu Ser Arg Leu
325 330 335

Ile Gly Gln Ser Leu Trp Asp Val Ser Arg Ser Ser Thr Gly Asn Leu
340 345 350

Val Glu Trp Phe Leu Leu Arg Lys Ala Tyr Lys Arg Asn Glu Leu Ala
355 360 365

Pro Asn Lys Pro Asp Glu Arg Glu Leu Ala Arg Arg Arg Gly Gly Tyr

370 375 380

Ala Gly Gly Tyr Val Lys Glu Pro Glu Arg Gly Leu Trp Asp Asn Ile
385 390 395 400

Val Tyr Leu Asp Phe Arg Ser Ala Ala Ile Ser Ile Ile Ile Thr His
405 410 415

Asn Val Ser Pro Asp Thr Leu Asn Arg Glu Gly Cys Lys Glu Tyr Asp
420 425 430

Val Ala Pro Glu Val Gly His Lys Phe Cys Lys Asp Phe Pro Gly Phe
435 440 445

Ile Pro Ser Leu Leu Gly Asp Leu Leu Glu Glu Arg Gln Lys Ile Lys
450 455 460

Arg Lys Met Lys Ala Thr Val Asp Pro Leu Glu Lys Lys Leu Leu Asp
465 470 475 480

Tyr Arg Gln Arg Val Ile Lys Ile Leu Ala Asn Ser Phe Tyr Gly Tyr
485 490 495

Tyr Gly Tyr Ala Lys Ala Arg Trp Tyr Cys Lys Glu Cys Ala Glu Ser
500 505 510

Val Thr Ala Trp Gly Arg Glu Tyr Ile Glu Met Val Ile Arg Glu Leu
515 520 525

Glu Glu Lys Phe Gly Phe Lys Val Leu Tyr Ala Asp Thr Asp Gly Leu
530 535 540

His Ala Thr Ile Pro Gly Ala Asp Ala Glu Thr Val Lys Lys Lys Ala
545 550 555 560

Lys Glu Phe Leu Lys Tyr Ile Asn Pro Lys Leu Pro Gly Leu Leu Glu
565 570 575

Leu Glu Tyr Glu Gly Phe Tyr Val Arg Gly Phe Phe Val Thr Lys Lys
580 585 590

Lys Tyr Ala Val Ile Asp Glu Glu Gly Lys Ile Thr Thr Arg Gly Leu
595 600 605

Glu Ile Val Arg Arg Asp Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu Thr Gln Ala
610 615 620

Arg Val Leu Glu Ala Ile Leu Lys His Gly Asp Val Glu Glu Ala Val
625 630 635 640

Arg Ile Val Lys Glu Val Thr Glu Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Val Pro
645 650 655

Pro Glu Lys Leu Val Ile His Glu Gln Ile Thr Arg Asp Leu Arg Asp
660 665 670

Tyr Lys Ala Thr Gly Pro His Val Ala Val Ala Lys Arg Leu Ala Ala
675 680 685

Arg Gly Val Lys Ile Arg Pro Gly Thr Val Ile Ser Tyr Ile Val Leu
690 695 700

Lys Gly Ser Gly Arg Ile Gly Asp Arg Ala Ile Pro Ala Asp Glu Phe
705 710 715 720

Asp Pro Thr Lys His Arg Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln
725 730 735

Val Leu Pro Ala Val Glu Arg Ile Leu Lys Ala Phe Gly Tyr Arg Lys
740 745 750

Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Lys Gln Val Gly Leu Gly Ala Trp
755 760 765

Leu Lys Val Lys Gly Lys Lys
770 775

<210> 31
<211> 775
<212> PRT
<213> Thermococcus sp. 9 N-7

<220>
<221> VARIANTE
<222> (129)..(129)
<223> X=M, A

<220>
<221> VARIANTE
<222> (410)..(410)
<223> X=V, A, I

<220>
<221> VARIANTE
<222> (485)..(485)
<223> X=L, V

<400> 31

Met Ile Leu Asp Thr Asp Tyr Ile Thr Glu Asn Gly Lys Pro Val Ile
1 5 10 15

Arg Val Phe Lys Lys Glu Asn Gly Glu Phe Lys Ile Glu Tyr Asp Arg
20 25 30

Thr Phe Glu Pro Tyr Phe Tyr Ala Leu Leu Lys Asp Asp Ser Ala Ile
35 40 45

Glu Asp Val Lys Lys Val Thr Ala Lys Arg His Gly Thr Val Val Lys
50 55 60

Val Lys Arg Ala Glu Lys Val Gln Lys Lys Phe Leu Gly Arg Pro Ile
65 70 75 80

Glu Val Trp Lys Leu Tyr Phe Asn His Pro Gln Asp Val Pro Ala Ile
85 90 95

Arg Asp Arg Ile Arg Ala His Pro Ala Val Val Asp Ile Tyr Glu Tyr
100 105 110

Asp Ile Pro Phe Ala Lys Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Gly Leu Ile Pro
115 120 125

Xaa Glu Gly Asp Glu Glu Leu Thr Met Leu Ala Phe Ala Ile Ala Thr
130 135 140

Leu Tyr His Glu Gly Glu Glu Phe Gly Thr Gly Pro Ile Leu Met Ile
145 150 155 160

Ser Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Ala Arg Val Ile Thr Trp Lys Lys Ile
165 170 175

Asp Leu Pro Tyr Val Asp Val Val Ser Thr Glu Lys Glu Met Ile Lys
180 185 190

Arg Phe Leu Arg Val Val Arg Glu Lys Asp Pro Asp Val Leu Ile Thr
195 200 205

Tyr Asn Gly Asp Asn Phe Asp Phe Ala Tyr Leu Lys Lys Arg Ser Glu
210 215 220

Glu Leu Gly Ile Lys Phe Thr Leu Gly Arg Asp Gly Ser Glu Pro Lys
225 230 235 240

Ile Gln Arg Met Gly Asp Arg Phe Ala Val Glu Val Lys Gly Arg Ile
245 250 255

His Phe Asp Leu Tyr Pro Val Ile Arg Arg Thr Ile Asn Leu Pro Thr
260 265 270

Tyr Thr Leu Glu Ala Val Tyr Glu Ala Val Phe Gly Lys Pro Lys Glu
275 280 285

Lys Val Tyr Ala Glu Glu Ile Ala Gln Ala Trp Glu Ser Gly Glu Gly
290 295 300

Leu Glu Arg Val Ala Arg Tyr Ser Met Glu Asp Ala Lys Val Thr Tyr
305 310 315 320

Glu Leu Gly Arg Glu Phe Phe Pro Met Glu Ala Gln Leu Ser Arg Leu
325 330 335

Ile Gly Gln Ser Leu Trp Asp Val Ser Arg Ser Ser Thr Gly Asn Leu
340 345 350

Val Glu Trp Phe Leu Leu Arg Lys Ala Tyr Lys Arg Asn Glu Leu Ala
355 360 365

Pro Asn Lys Pro Asp Glu Arg Glu Leu Ala Arg Arg Arg Gly Gly Tyr
370 375 380

Ala Gly Gly Tyr Val Lys Glu Pro Glu Arg Gly Leu Trp Asp Asn Ile
385 390 395 400

Val Tyr Leu Asp Phe Arg Ser Ala Ala Xaa Ser Ile Ile Ile Thr His
405 410 415

Asn Val Ser Pro Asp Thr Leu Asn Arg Glu Gly Cys Lys Glu Tyr Asp
420 425 430

Val Ala Pro Glu Val Gly His Lys Phe Cys Lys Asp Phe Pro Gly Phe
435 440 445

Ile Pro Ser Leu Leu Gly Asp Leu Leu Glu Glu Arg Gln Lys Ile Lys
450 455 460

Arg Lys Met Lys Ala Thr Val Asp Pro Leu Glu Lys Lys Leu Leu Asp
465 470 475 480

Tyr Arg Gln Arg Xaa Ile Lys Ile Leu Ala Asn Ser Phe Tyr Gly Tyr
485 490 495

Tyr Gly Tyr Ala Lys Ala Arg Trp Tyr Cys Lys Glu Cys Ala Glu Ser
500 505 510

Val Thr Ala Trp Gly Arg Glu Tyr Ile Glu Met Val Ile Arg Glu Leu
515 520 525

Glu Glu Lys Phe Gly Phe Lys Val Leu Tyr Ala Asp Thr Asp Gly Leu
530 535 540

His Ala Thr Ile Pro Gly Ala Asp Ala Glu Thr Val Lys Lys Lys Ala
545 550 555 560

Lys Glu Phe Leu Lys Tyr Ile Asn Pro Lys Leu Pro Gly Leu Leu Glu
565 570 575

Leu Glu Tyr Glu Gly Phe Tyr Val Arg Gly Phe Phe Val Thr Lys Lys
580 585 590

Lys Tyr Ala Val Ile Asp Glu Glu Gly Lys Ile Thr Thr Arg Gly Leu
595 600 605

Glu Ile Val Arg Arg Asp Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu Thr Gln Ala
610 615 620

Arg Val Leu Glu Ala Ile Leu Lys His Gly Asp Val Glu Glu Ala Val
625 630 635 640

Arg Ile Val Lys Glu Val Thr Glu Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Val Pro
645 650 655

Pro Glu Lys Leu Val Ile His Glu Gln Ile Thr Arg Asp Leu Arg Asp
660 665 670

Tyr Lys Ala Thr Gly Pro His Val Ala Val Ala Lys Arg Leu Ala Ala
675 680 685

Arg Gly Val Lys Ile Arg Pro Gly Thr Val Ile Ser Tyr Ile Val Leu
690 695 700

Lys Gly Ser Gly Arg Ile Gly Asp Arg Ala Ile Pro Ala Asp Glu Phe
705 710 715 720

Asp Pro Thr Lys His Arg Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln
725 730 735

Val Leu Pro Ala Val Glu Arg Ile Leu Lys Ala Phe Gly Tyr Arg Lys
740 745 750

Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Lys Gln Val Gly Leu Gly Ala Trp

755 760 765

Leu Lys Val Lys Gly Lys Lys
770 775

<210> 32
<211> 775
<212> PRT
<213> Thermococcus sp. 9 N-7

<220>
<221> VARIANTE
<222> (129)..(129)
<223> X=M, A

<220>
<221> VARIANTE
<222> (410)..(410)
<223> X=V, A, I

<220>
<221> VARIANTE
<222> (485)..(485)
<223> X=L, V

<220>
<221> VARIANTE
<222> (514)..(514)
<223> X=A, S

<400> 32
Met Ile Leu Asp Thr Asp Tyr Ile Thr Glu Asn Gly Lys Pro Val Ile
1 5 10 15

Arg Val Phe Lys Lys Glu Asn Gly Glu Phe Lys Ile Glu Tyr Asp Arg
20 25 30

Thr Phe Glu Pro Tyr Phe Tyr Ala Leu Leu Lys Asp Asp Ser Ala Ile
35 40 45

Glu Asp Val Lys Lys Val Thr Ala Lys Arg His Gly Thr Val Val Lys
50 55 60

Val Lys Arg Ala Glu Lys Val Gln Lys Lys Phe Leu Gly Arg Pro Ile
65 70 75 80

Glu Val Trp Lys Leu Tyr Phe Asn His Pro Gln Asp Val Pro Ala Ile
85 90 95

Arg Asp Arg Ile Arg Ala His Pro Ala Val Val Asp Ile Tyr Glu Tyr
100 105 110

Asp Ile Pro Phe Ala Lys Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Gly Leu Ile Pro
115 120 125

Xaa Glu Gly Asp Glu Glu Leu Thr Met Leu Ala Phe Ala Ile Ala Thr
130 135 140

Leu Tyr His Glu Gly Glu Glu Phe Gly Thr Gly Pro Ile Leu Met Ile
145 150 155 160

Ser Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Ala Arg Val Ile Thr Trp Lys Lys Ile
165 170 175

Asp Leu Pro Tyr Val Asp Val Val Ser Thr Glu Lys Glu Met Ile Lys
180 185 190

Arg Phe Leu Arg Val Val Arg Glu Lys Asp Pro Asp Val Leu Ile Thr
195 200 205

Tyr Asn Gly Asp Asn Phe Asp Phe Ala Tyr Leu Lys Lys Arg Ser Glu
210 215 220

Glu Leu Gly Ile Lys Phe Thr Leu Gly Arg Asp Gly Ser Glu Pro Lys
225 230 235 240

Ile Gln Arg Met Gly Asp Arg Phe Ala Val Glu Val Lys Gly Arg Ile
245 250 255

His Phe Asp Leu Tyr Pro Val Ile Arg Arg Thr Ile Asn Leu Pro Thr
260 265 270

Tyr Thr Leu Glu Ala Val Tyr Glu Ala Val Phe Gly Lys Pro Lys Glu
275 280 285

Lys Val Tyr Ala Glu Glu Ile Ala Gln Ala Trp Glu Ser Gly Glu Gly
290 295 300

Leu Glu Arg Val Ala Arg Tyr Ser Met Glu Asp Ala Lys Val Thr Tyr
305 310 315 320

Glu Leu Gly Arg Glu Phe Phe Pro Met Glu Ala Gln Leu Ser Arg Leu
325 330 335

Ile Gly Gln Ser Leu Trp Asp Val Ser Arg Ser Ser Thr Gly Asn Leu
340 345 350

Val Glu Trp Phe Leu Leu Arg Lys Ala Tyr Lys Arg Asn Glu Leu Ala
355 360 365

Pro Asn Lys Pro Asp Glu Arg Glu Leu Ala Arg Arg Arg Gly Gly Tyr
370 375 380

Ala Gly Gly Tyr Val Lys Glu Pro Glu Arg Gly Leu Trp Asp Asn Ile
385 390 395 400

Val Tyr Leu Asp Phe Arg Ser Ala Ala Xaa Ser Ile Ile Ile Thr His
405 410 415

Asn Val Ser Pro Asp Thr Leu Asn Arg Glu Gly Cys Lys Glu Tyr Asp
420 425 430

Val Ala Pro Glu Val Gly His Lys Phe Cys Lys Asp Phe Pro Gly Phe
435 440 445

Ile Pro Ser Leu Leu Gly Asp Leu Leu Glu Glu Arg Gln Lys Ile Lys
450 455 460

Arg Lys Met Lys Ala Thr Val Asp Pro Leu Glu Lys Lys Leu Leu Asp
465 470 475 480

Tyr Arg Gln Arg Xaa Ile Lys Ile Leu Ala Asn Ser Phe Tyr Gly Tyr
485 490 495

Tyr Gly Tyr Ala Lys Ala Arg Trp Tyr Cys Lys Glu Cys Ala Glu Ser
500 505 510

Val Xaa Ala Trp Gly Arg Glu Tyr Ile Glu Met Val Ile Arg Glu Leu
515 520 525

Glu Glu Lys Phe Gly Phe Lys Val Leu Tyr Ala Asp Thr Asp Gly Leu
530 535 540

His Ala Thr Ile Pro Gly Ala Asp Ala Glu Thr Val Lys Lys Lys Ala
545 550 555 560

Lys Glu Phe Leu Lys Tyr Ile Asn Pro Lys Leu Pro Gly Leu Leu Glu
565 570 575

Leu Glu Tyr Glu Gly Phe Tyr Val Arg Gly Phe Phe Val Thr Lys Lys
580 585 590

Lys Tyr Ala Val Ile Asp Glu Glu Gly Lys Ile Thr Thr Arg Gly Leu
595 600 605

Glu Ile Val Arg Arg Asp Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu Thr Gln Ala
610 615 620

Arg Val Leu Glu Ala Ile Leu Lys His Gly Asp Val Glu Glu Ala Val
625 630 635 640

Arg Ile Val Lys Glu Val Thr Glu Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Val Pro
645 650 655

Pro Glu Lys Leu Val Ile His Glu Gln Ile Thr Arg Asp Leu Arg Asp
660 665 670

Tyr Lys Ala Thr Gly Pro His Val Ala Val Ala Lys Arg Leu Ala Ala
675 680 685

Arg Gly Val Lys Ile Arg Pro Gly Thr Val Ile Ser Tyr Ile Val Leu
690 695 700

Lys Gly Ser Gly Arg Ile Gly Asp Arg Ala Ile Pro Ala Asp Glu Phe
705 710 715 720

Asp Pro Thr Lys His Arg Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln
725 730 735

Val Leu Pro Ala Val Glu Arg Ile Leu Lys Ala Phe Gly Tyr Arg Lys
740 745 750

Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Lys Gln Val Gly Leu Gly Ala Trp
755 760 765

Leu Lys Val Lys Gly Lys Lys
770 775

<210> 33
<211> 775
<212> PRT
<213> Thermococcus sp. 9 N-7

<220>
<221> VARIANTE
<222> (129)..(129)
<223> X=M, A

<220>
<221> VARIANTE
<222> (410)..(410)
<223> X=V, A, I

<220>
<221> VARIANTE
<222> (485)..(485)
<223> X=L, V

<220>
<221> VARIANTE
<222> (521)..(521)
<223> X=L

<400> 33

Met Ile Leu Asp Thr Asp Tyr Ile Thr Glu Asn Gly Lys Pro Val Ile
1 5 10 15

Arg Val Phe Lys Lys Glu Asn Gly Glu Phe Lys Ile Glu Tyr Asp Arg
20 25 30

Thr Phe Glu Pro Tyr Phe Tyr Ala Leu Leu Lys Asp Asp Ser Ala Ile
35 40 45

Glu Asp Val Lys Lys Val Thr Ala Lys Arg His Gly Thr Val Val Lys
50 55 60

Val Lys Arg Ala Glu Lys Val Gln Lys Lys Phe Leu Gly Arg Pro Ile
65 70 75 80

Glu Val Trp Lys Leu Tyr Phe Asn His Pro Gln Asp Val Pro Ala Ile
85 90 95

Arg Asp Arg Ile Arg Ala His Pro Ala Val Val Asp Ile Tyr Glu Tyr
100 105 110

Asp Ile Pro Phe Ala Lys Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Gly Leu Ile Pro
115 120 125

Xaa Glu Gly Asp Glu Glu Leu Thr Met Leu Ala Phe Ala Ile Ala Thr
130 135 140

Leu Tyr His Glu Gly Glu Glu Phe Gly Thr Gly Pro Ile Leu Met Ile
145 150 155 160

Ser Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Ala Arg Val Ile Thr Trp Lys Lys Ile
165 170 175

Asp Leu Pro Tyr Val Asp Val Val Ser Thr Glu Lys Glu Met Ile Lys
180 185 190

Arg Phe Leu Arg Val Val Arg Glu Lys Asp Pro Asp Val Leu Ile Thr
195 200 205

Tyr Asn Gly Asp Asn Phe Asp Phe Ala Tyr Leu Lys Lys Arg Ser Glu
210 215 220

Glu Leu Gly Ile Lys Phe Thr Leu Gly Arg Asp Gly Ser Glu Pro Lys
225 230 235 240

Ile Gln Arg Met Gly Asp Arg Phe Ala Val Glu Val Lys Gly Arg Ile
245 250 255

His Phe Asp Leu Tyr Pro Val Ile Arg Arg Thr Ile Asn Leu Pro Thr
260 265 270

Tyr Thr Leu Glu Ala Val Tyr Glu Ala Val Phe Gly Lys Pro Lys Glu
275 280 285

Lys Val Tyr Ala Glu Glu Ile Ala Gln Ala Trp Glu Ser Gly Glu Gly
290 295 300

Leu Glu Arg Val Ala Arg Tyr Ser Met Glu Asp Ala Lys Val Thr Tyr
305 310 315 320

Glu Leu Gly Arg Glu Phe Phe Pro Met Glu Ala Gln Leu Ser Arg Leu
325 330 335

Ile Gly Gln Ser Leu Trp Asp Val Ser Arg Ser Ser Thr Gly Asn Leu
340 345 350

Val Glu Trp Phe Leu Leu Arg Lys Ala Tyr Lys Arg Asn Glu Leu Ala
355 360 365

Pro Asn Lys Pro Asp Glu Arg Glu Leu Ala Arg Arg Arg Gly Gly Tyr
370 375 380

Ala Gly Gly Tyr Val Lys Glu Pro Glu Arg Gly Leu Trp Asp Asn Ile
385 390 395 400

Val Tyr Leu Asp Phe Arg Ser Ala Ala Xaa Ser Ile Ile Ile Thr His
405 410 415

Asn Val Ser Pro Asp Thr Leu Asn Arg Glu Gly Cys Lys Glu Tyr Asp
420 425 430

Val Ala Pro Glu Val Gly His Lys Phe Cys Lys Asp Phe Pro Gly Phe
435 440 445

Ile Pro Ser Leu Leu Gly Asp Leu Leu Glu Glu Arg Gln Lys Ile Lys
450 455 460

Arg Lys Met Lys Ala Thr Val Asp Pro Leu Glu Lys Lys Leu Leu Asp
465 470 475 480

Tyr Arg Gln Arg Xaa Ile Lys Ile Leu Ala Asn Ser Phe Tyr Gly Tyr
485 490 495

Tyr Gly Tyr Ala Lys Ala Arg Trp Tyr Cys Lys Glu Cys Ala Glu Ser
500 505 510

Val Thr Ala Trp Gly Arg Glu Tyr Xaa Glu Met Val Ile Arg Glu Leu
515 520 525

Glu Glu Lys Phe Gly Phe Lys Val Leu Tyr Ala Asp Thr Asp Gly Leu
530 535 540

His Ala Thr Ile Pro Gly Ala Asp Ala Glu Thr Val Lys Lys Lys Ala
545 550 555 560

Lys Glu Phe Leu Lys Tyr Ile Asn Pro Lys Leu Pro Gly Leu Leu Glu
565 570 575

Leu Glu Tyr Glu Gly Phe Tyr Val Arg Gly Phe Phe Val Thr Lys Lys
580 585 590

Lys Tyr Ala Val Ile Asp Glu Glu Gly Lys Ile Thr Thr Arg Gly Leu
595 600 605

Glu Ile Val Arg Arg Asp Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu Thr Gln Ala
610 615 620

Arg Val Leu Glu Ala Ile Leu Lys His Gly Asp Val Glu Glu Ala Val
625 630 635 640

Arg Ile Val Lys Glu Val Thr Glu Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Val Pro
645 650 655

Pro Glu Lys Leu Val Ile His Glu Gln Ile Thr Arg Asp Leu Arg Asp
660 665 670

Tyr Lys Ala Thr Gly Pro His Val Ala Val Ala Lys Arg Leu Ala Ala
675 680 685

Arg Gly Val Lys Ile Arg Pro Gly Thr Val Ile Ser Tyr Ile Val Leu
690 695 700

Lys Gly Ser Gly Arg Ile Gly Asp Arg Ala Ile Pro Ala Asp Glu Phe
705 710 715 720

Asp Pro Thr Lys His Arg Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln
725 730 735

Val Leu Pro Ala Val Glu Arg Ile Leu Lys Ala Phe Gly Tyr Arg Lys
740 745 750

Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Lys Gln Val Gly Leu Gly Ala Trp
755 760 765

Leu Lys Val Lys Gly Lys Lys
770 775

<210> 34
<211> 775
<212> PRT
<213> Thermococcus sp. 9 N-7

<220>
<221> VARIANTE
<222> (129)..(129)
<223> X=M, A

<220>
<221> VARIANTE
<222> (410)..(410)
<223> X=V, A, I

<220>
<221> VARIANTE
<222> (485)..(485)
<223> X=L, V

<220>
<221> VARIANTE
<222> (514)..(514)
<223> X=A, S

<220>
<221> VARIANTE
<222> (521)..(521)
<223> X=L

<400> 34
Met Ile Leu Asp Thr Asp Tyr Ile Thr Glu Asn Gly Lys Pro Val Ile
1 5 10 15

Arg Val Phe Lys Lys Glu Asn Gly Glu Phe Lys Ile Glu Tyr Asp Arg
20 25 30

Thr Phe Glu Pro Tyr Phe Tyr Ala Leu Leu Lys Asp Asp Ser Ala Ile
35 40 45

Glu Asp Val Lys Lys Val Thr Ala Lys Arg His Gly Thr Val Val Lys
50 55 60

Val Lys Arg Ala Glu Lys Val Gln Lys Lys Phe Leu Gly Arg Pro Ile
65 70 75 80

Glu Val Trp Lys Leu Tyr Phe Asn His Pro Gln Asp Val Pro Ala Ile
85 90 95

Arg Asp Arg Ile Arg Ala His Pro Ala Val Val Asp Ile Tyr Glu Tyr
100 105 110

Asp Ile Pro Phe Ala Lys Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Gly Leu Ile Pro
115 120 125

Xaa Glu Gly Asp Glu Glu Leu Thr Met Leu Ala Phe Ala Ile Ala Thr
130 135 140

Leu Tyr His Glu Gly Glu Glu Phe Gly Thr Gly Pro Ile Leu Met Ile
145 150 155 160

Ser Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Ala Arg Val Ile Thr Trp Lys Lys Ile
165 170 175

Asp Leu Pro Tyr Val Asp Val Val Ser Thr Glu Lys Glu Met Ile Lys
180 185 190

Arg Phe Leu Arg Val Val Arg Glu Lys Asp Pro Asp Val Leu Ile Thr
195 200 205

Tyr Asn Gly Asp Asn Phe Asp Phe Ala Tyr Leu Lys Lys Arg Ser Glu
210 215 220

Glu Leu Gly Ile Lys Phe Thr Leu Gly Arg Asp Gly Ser Glu Pro Lys
225 230 235 240

Ile Gln Arg Met Gly Asp Arg Phe Ala Val Glu Val Lys Gly Arg Ile
245 250 255

His Phe Asp Leu Tyr Pro Val Ile Arg Arg Thr Ile Asn Leu Pro Thr
260 265 270

Tyr Thr Leu Glu Ala Val Tyr Glu Ala Val Phe Gly Lys Pro Lys Glu
275 280 285

Lys Val Tyr Ala Glu Glu Ile Ala Gln Ala Trp Glu Ser Gly Glu Gly
290 295 300

Leu Glu Arg Val Ala Arg Tyr Ser Met Glu Asp Ala Lys Val Thr Tyr
305 310 315 320

Glu Leu Gly Arg Glu Phe Phe Pro Met Glu Ala Gln Leu Ser Arg Leu
325 330 335

Ile Gly Gln Ser Leu Trp Asp Val Ser Arg Ser Ser Thr Gly Asn Leu
340 345 350

Val Glu Trp Phe Leu Leu Arg Lys Ala Tyr Lys Arg Asn Glu Leu Ala
355 360 365

Pro Asn Lys Pro Asp Glu Arg Glu Leu Ala Arg Arg Arg Gly Gly Tyr
370 375 380

Ala Gly Gly Tyr Val Lys Glu Pro Glu Arg Gly Leu Trp Asp Asn Ile
385 390 395 400

Val Tyr Leu Asp Phe Arg Ser Ala Ala Xaa Ser Ile Ile Ile Thr His
405 410 415

Asn Val Ser Pro Asp Thr Leu Asn Arg Glu Gly Cys Lys Glu Tyr Asp
420 425 430

Val Ala Pro Glu Val Gly His Lys Phe Cys Lys Asp Phe Pro Gly Phe
435 440 445

Ile Pro Ser Leu Leu Gly Asp Leu Leu Glu Glu Arg Gln Lys Ile Lys
450 455 460

Arg Lys Met Lys Ala Thr Val Asp Pro Leu Glu Lys Lys Leu Leu Asp
465 470 475 480

Tyr Arg Gln Arg Xaa Ile Lys Ile Leu Ala Asn Ser Phe Tyr Gly Tyr
485 490 495

Tyr Gly Tyr Ala Lys Ala Arg Trp Tyr Cys Lys Glu Cys Ala Glu Ser
500 505 510

Val Xaa Ala Trp Gly Arg Glu Tyr Xaa Glu Met Val Ile Arg Glu Leu
515 520 525

Glu Glu Lys Phe Gly Phe Lys Val Leu Tyr Ala Asp Thr Asp Gly Leu
530 535 540

His Ala Thr Ile Pro Gly Ala Asp Ala Glu Thr Val Lys Lys Lys Ala
545 550 555 560

Lys Glu Phe Leu Lys Tyr Ile Asn Pro Lys Leu Pro Gly Leu Leu Glu
565 570 575

Leu Glu Tyr Glu Gly Phe Tyr Val Arg Gly Phe Phe Val Thr Lys Lys
580 585 590

Lys Tyr Ala Val Ile Asp Glu Glu Gly Lys Ile Thr Thr Arg Gly Leu
595 600 605

Glu Ile Val Arg Arg Asp Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu Thr Gln Ala
610 615 620

Arg Val Leu Glu Ala Ile Leu Lys His Gly Asp Val Glu Glu Ala Val
625 630 635 640

Arg Ile Val Lys Glu Val Thr Glu Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Val Pro
645 650 655

Pro Glu Lys Leu Val Ile His Glu Gln Ile Thr Arg Asp Leu Arg Asp
660 665 670

Tyr Lys Ala Thr Gly Pro His Val Ala Val Ala Lys Arg Leu Ala Ala
675 680 685

Arg Gly Val Lys Ile Arg Pro Gly Thr Val Ile Ser Tyr Ile Val Leu
690 695 700

Lys Gly Ser Gly Arg Ile Gly Asp Arg Ala Ile Pro Ala Asp Glu Phe
705 710 715 720

Asp Pro Thr Lys His Arg Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln
725 730 735

Val Leu Pro Ala Val Glu Arg Ile Leu Lys Ala Phe Gly Tyr Arg Lys
740 745 750

Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Lys Gln Val Gly Leu Gly Ala Trp
755 760 765

Leu Lys Val Lys Gly Lys Lys
770 775

REIVINDICACIONES

1. Una ADN polimerasa tipo de la familia B que comprende aminoácidos que tienen una mutación de sustitución de aminoácidos para la posición equivalente para Thr514 y/o Ile521, dichos aminoácidos se seleccionan de:

   (i) el aminoácido de cualquiera de SEQ ID NOS:6-8, 10-12, 14-16, 18-20, 22-24 y 26-34;

   (ii) un aminoácido que tiene una mutación de sustitución en el dominio semi-conservado en el bolsillo de unión de bloqueo 3', comprendiendo dicho dominio semi-conservado la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOS: 1-3 en donde la mutación de sustitución comprende una mutación seleccionada a partir de una sustitución en posición 3 de cualquier otro resto distinto a Thr o una sustitución en posición 10 para cualquier resto distinto a Ile, o una combinación de las mismas; o

   (iii) un aminoácido que tiene una mutación de sustitución en el dominio semi-conservado en el bolsillo de unión de bloqueo 3', comprendiendo dicho dominio semi-conservado la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 en donde la mutación de sustitución comprende una mutación seleccionada a partir de una sustitución en posición 6 de cualquier otro resto distinto a Thr o una sustitución en posición 13 para cualquier resto distinto a Ile, o una combinación de las mismas.

2. La polimerasa de la reivindicación 1(ii), en donde la mutación comprende:

   a) una sustitución en posición 3, en donde opcionalmente la mutación comprende una sustitución para Ala o Ser; o

   b) una sustitución en posición 10, en donde opcionalmente la mutación comprende una sustitución para Leu.

3. La polimerasa de la reivindicación 1(ii), en donde la mutación comprende tanto una sustitución en posición 3 como una sustitución en posición 10.

4. La polimerasa de la reivindicación 1(iii), en donde la mutación comprende:

   a) una sustitución en posición 6, en donde opcionalmente la mutación comprende una sustitución para Ala o Ser; o

   b) una sustitución en posición 13, en donde opcionalmente la mutación comprende una sustitución para Leu.

5. La polimerasa de la reivindicación 1(iii), en donde la mutación comprende tanto una sustitución en posición 6 como una sustitución en posición 13.

6. La polimerasa de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la polimerasa comprende además mutaciones de sustitución en posiciones equivalentes funcionalmente para Leu408 y/o Tyr409 y/o Pro410 en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9ºN, en donde opcionalmente la polimerasa comprende mutaciones de sustitución homólogas para Leu408Ala y/o Tyr409Ala y/o Pro410Ile en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9ºN.

7. La polimerasa de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la polimerasa comprende una actividad exonucleasa reducida en comparación con la polimerasa de tipo salvaje, en donde opcionalmente la polimerasa comprende mutaciones de sustitución en posiciones equivalentes funcionalmente para Asp141 y/o Glu143 en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9ºN.

8. La polimerasa de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la polimerasa comprende además mutaciones de sustitución en posiciones equivalentes funcionalmente para Ala485 en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9ºN, en donde opcionalmente la polimerasa comprende una mutación de sustitución equivalente funcionalmente para Ala485Leu o Ala485Val en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9ºN.

9. La polimerasa de cualquiera de las reivindicaciones 1-5 que comprende además una mutación de sustitución para un aminoácido diferente en la posición equivalente funcionalmente para Cys223 en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9ºN.

10. La polimerasa de la reivindicación 9, en donde la polimerasa comprende una mutación de sustitución equivalente funcionalmente para Cys223Ser en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9ºN.

11. Una molécula de ácido nucleico que codifica la polimerasa como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-10.

12. Un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 11.

13. Una célula hospedadora que comprende el vector de la reivindicación 12.

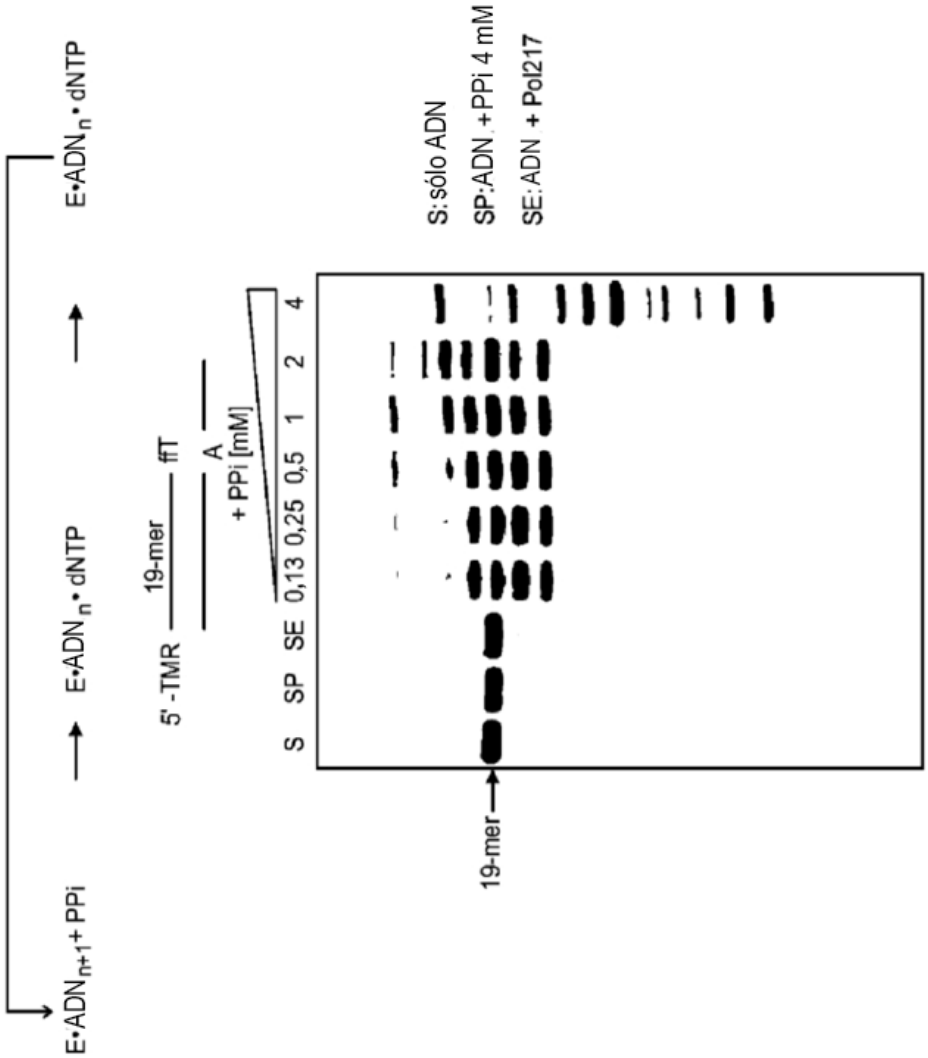
E•ADN$_{n+1}$ + PPi
E•ADN$_n$ • dNTP
E•ADN$_n$ • dNTP
5'-TMR
19-mer
fT
A
+ PPi [mM]
S
SP
SE
0,13
0,25
0,5
1
2
4
19-mer
S: sólo ADN
SP: ADN + PPi 4 mM
SE: ADN + Pol217

Fig. 1

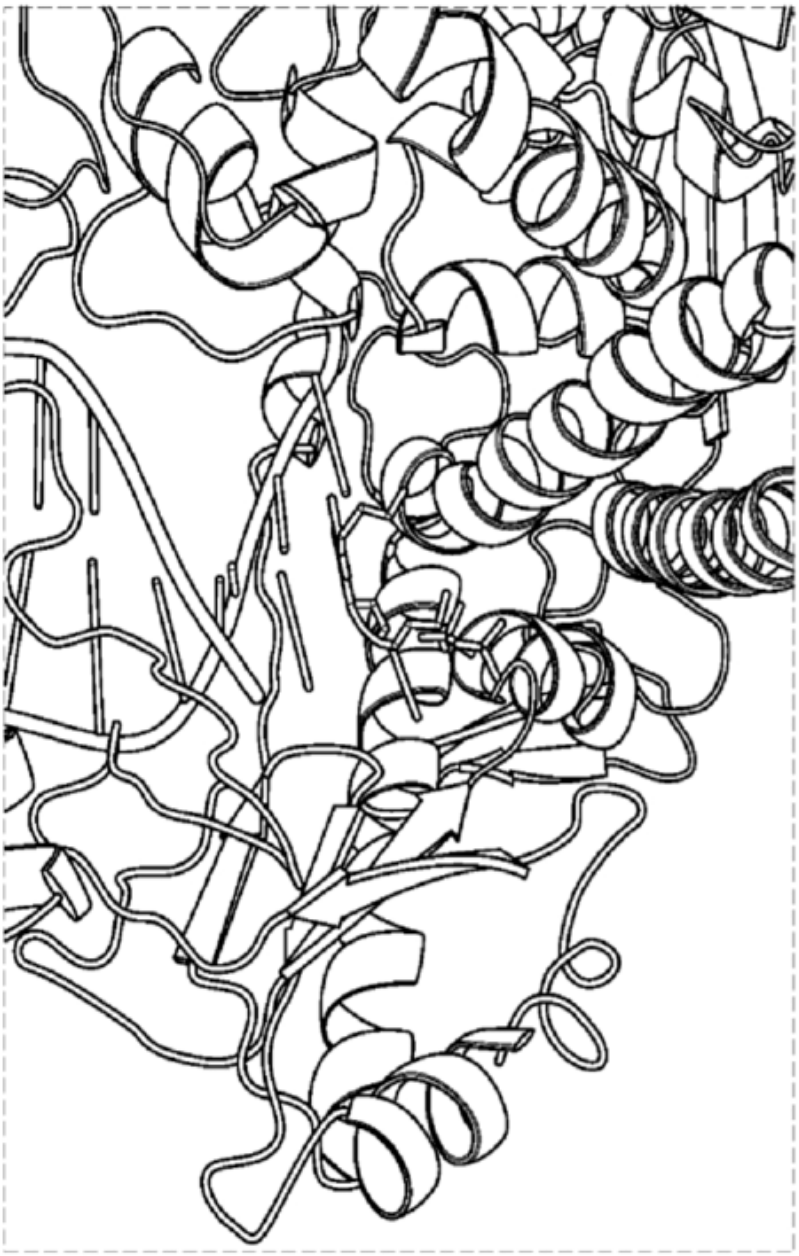

Fig. 2

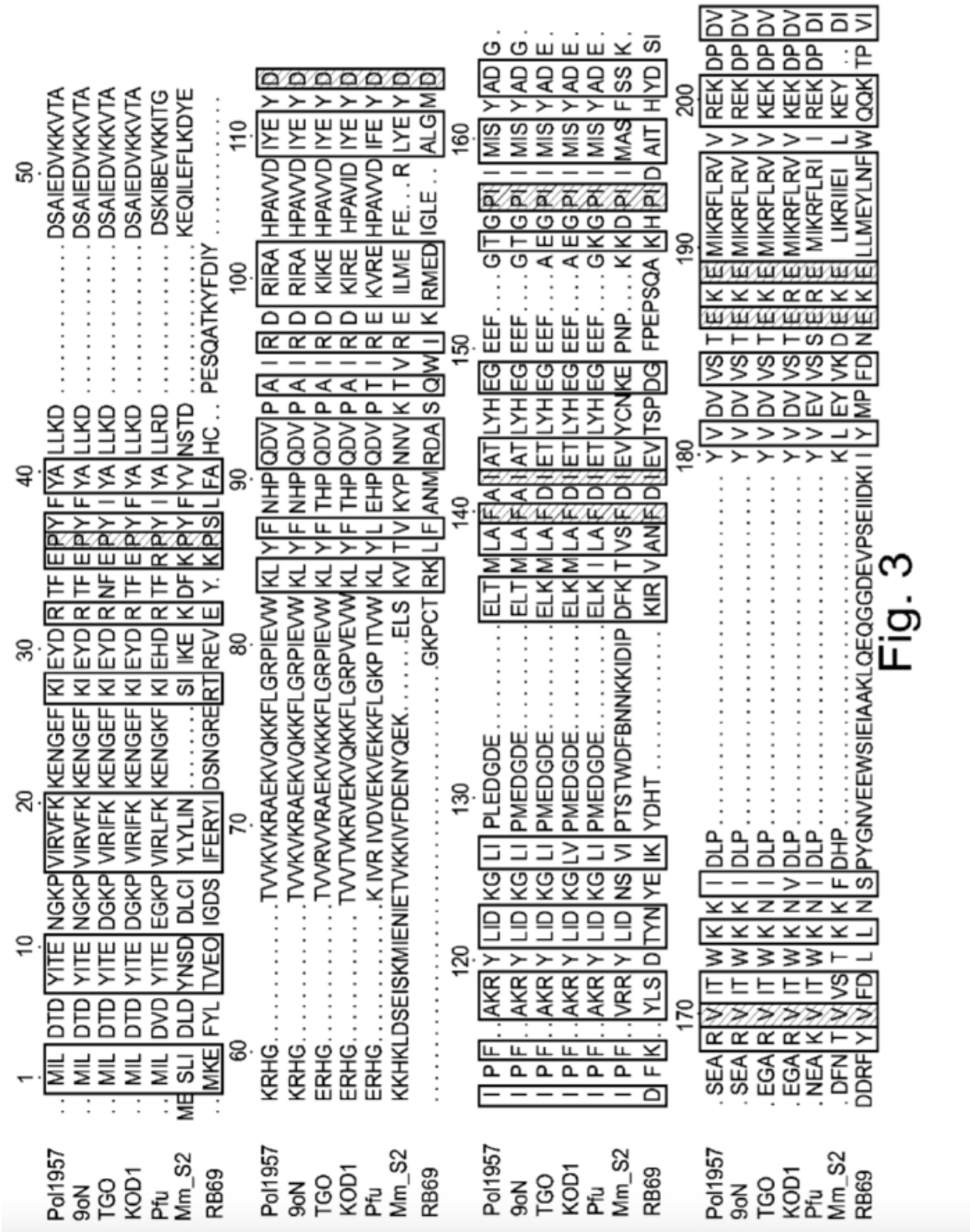

Fig. 3

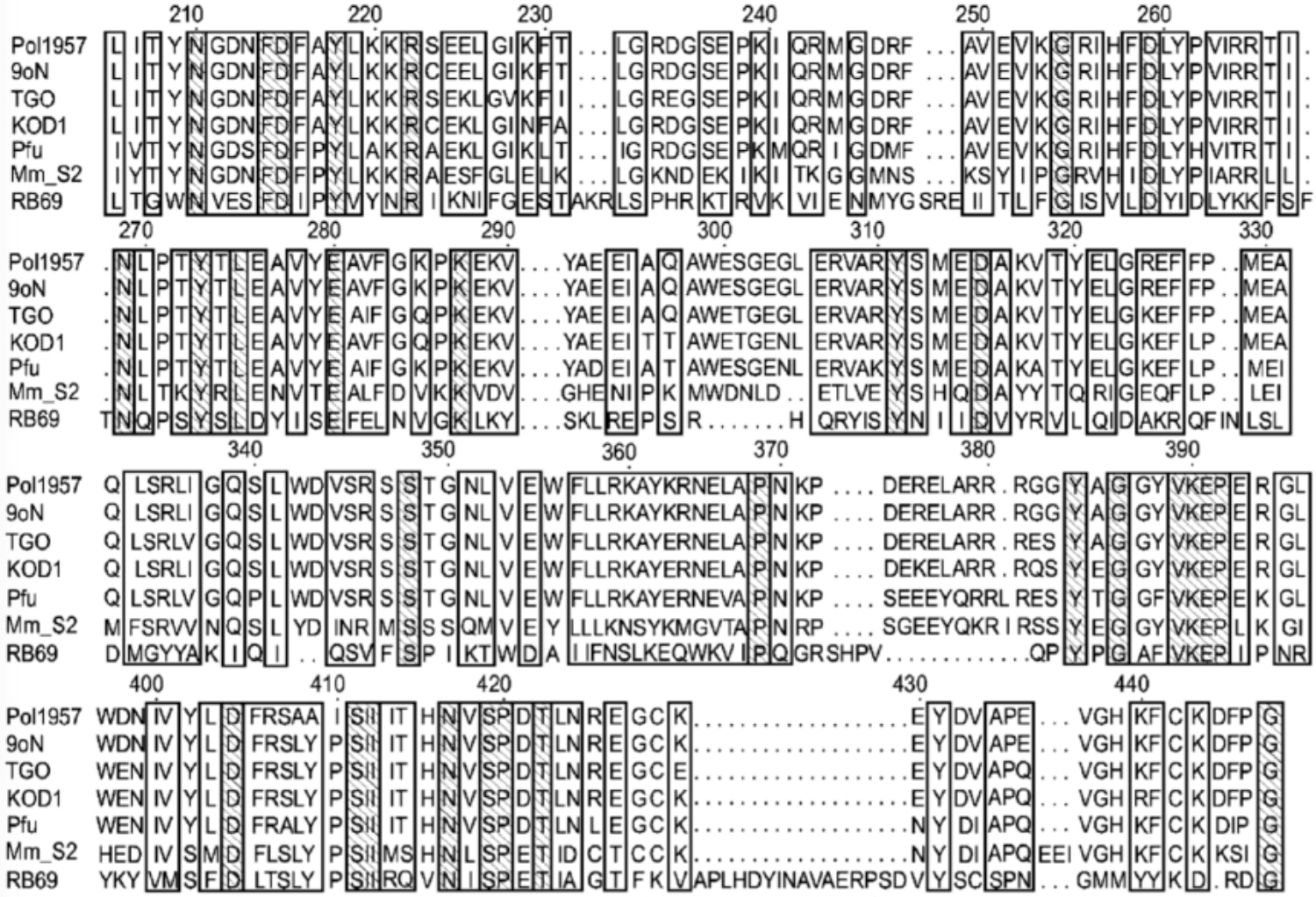

Fig. 3 (continuación)

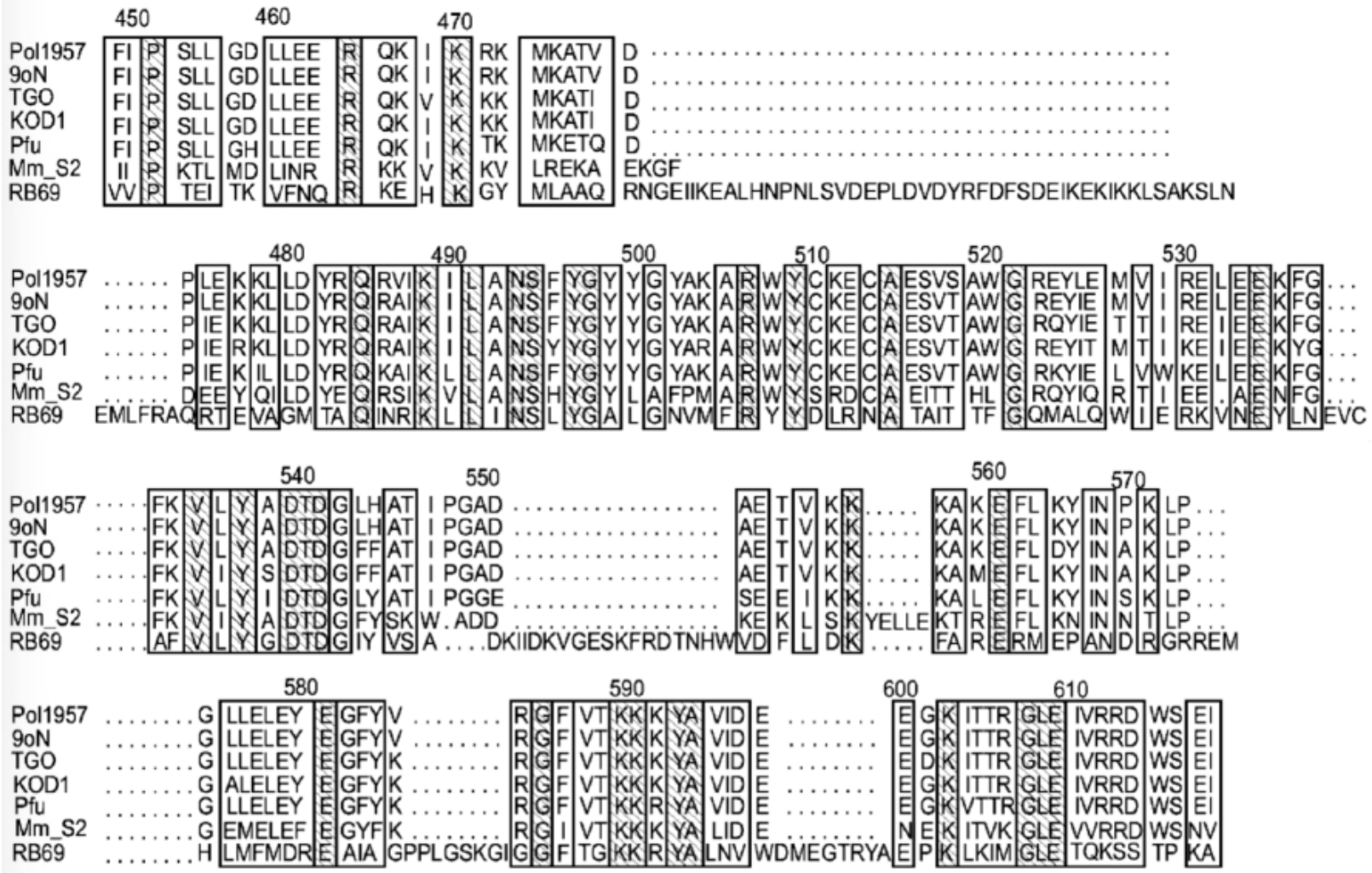

Fig. 3 **(continuación)**

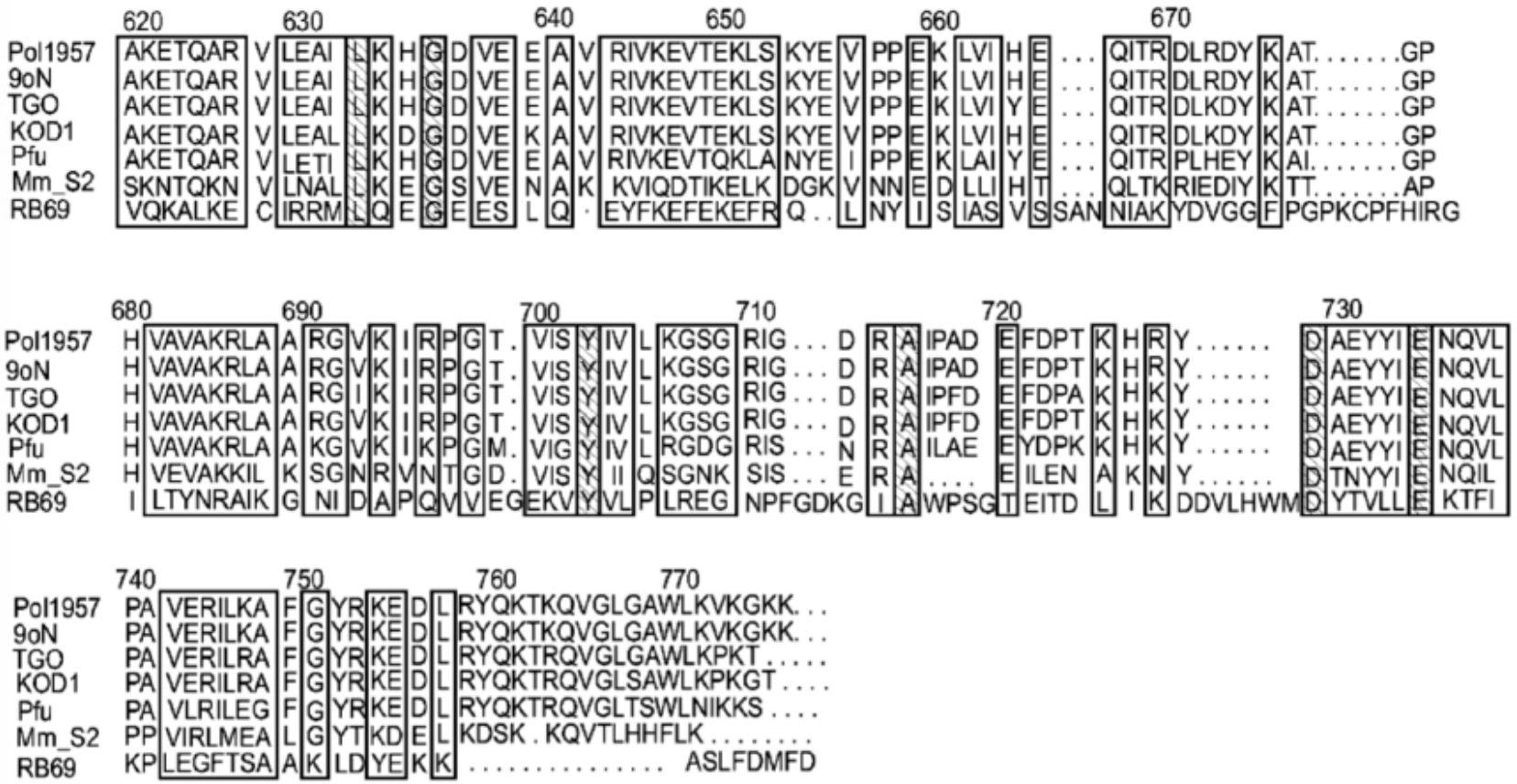

Fig. 3 **(continuación)**

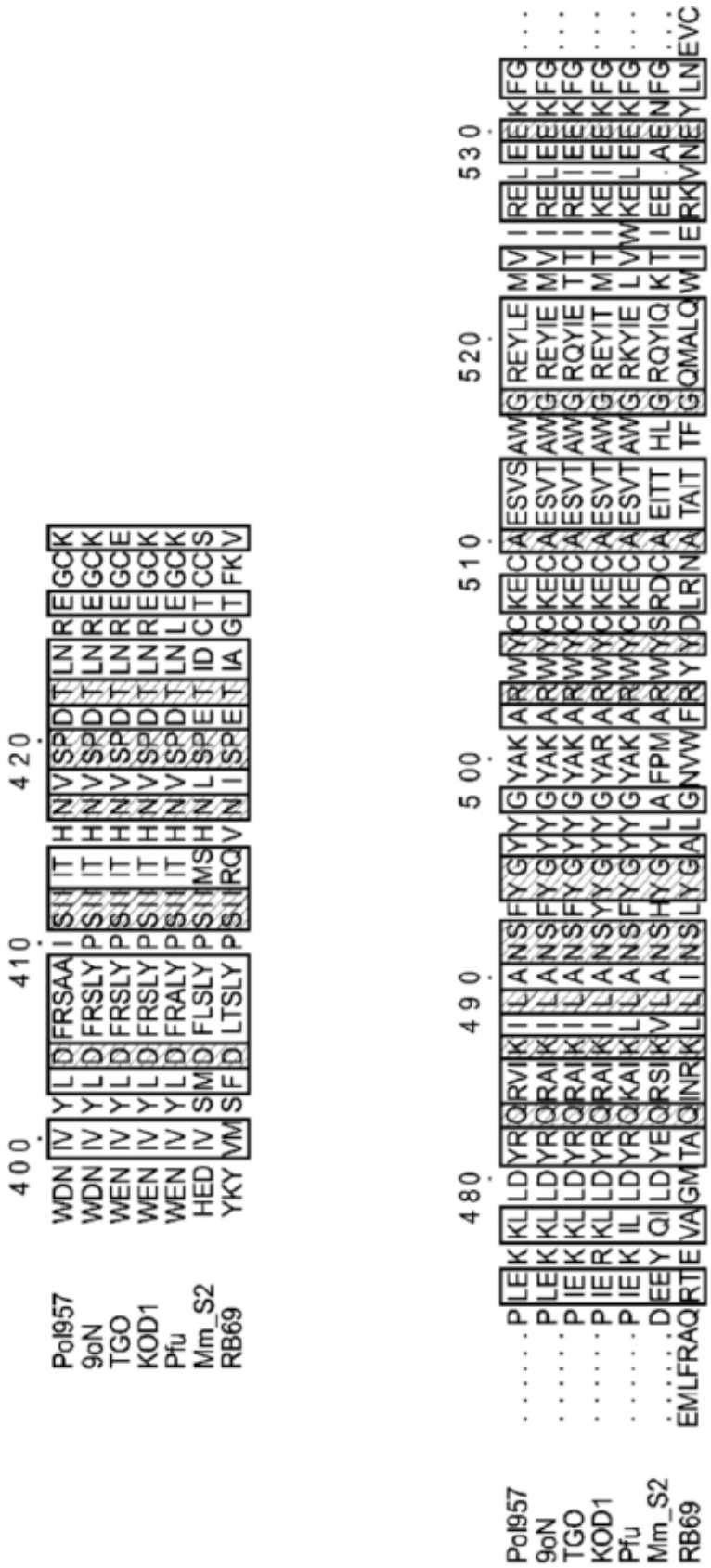
400
410
420
Pol957
9oN
TGO
KOD1
Pfu
Mm_S2
RB69
WDN IV YLDFRSAAISITHNVSPDTLNREGCK
WDN IV YLDFRSLYPSITHNVSPDTLNREGCK
WEN IV YLDFRSLYPSITHNVSPDTLNREGCE
WEN IV YLDFRSLYPSITHNVSPDTLNREGCK
WEN IV YLDFRALYPSITHNVSPDTLNLEGCK
HED IV SMDFLSLYPSMSHNLSPETIDCTCCS
YKY VMSFDLTSLYPSRQVNISPETIAGTFKV
480
490
500
510
520
530
Pol957
9oN
TGO
KOD1
Pfu
Mm_S2
RB69
PLEKKLDYRQRVIKILANSFYGYYGYAKARWYCKECAESVSAWGREYLEMVIRELEEKFG
PLEKKLDYRQRAIKILANSFYGYYGYAKARWYCKECAESVTAWGREYIEMVIRELEEKFG
PIEKKLDYRQRAIKILANSFYGYYGYAKARWYCKECAESVTAWGRQYIETTIREIEEKFG
PIERKLDYRQRAIKILANSYYGYYGYARARWYCKECAESVTAWGREYITMTIKEIEEKFG
PIEKILDYRQKAIKLLANSFYGYYGYAKARWYCKECAESVTAWGRKYIELVWKELEEKFG
DEEYQLDYEQRSIKVLANSHYGYLAFPMARWYSRDCAEITTHLGRQYIQKTIEEAENFG
EMLFRAQRTEVAGMTAQINRKLLINSLYGALGNVWFRYYDLRNATAITTFGQMALQWIERKVNEYLNEVC

Fig. 4

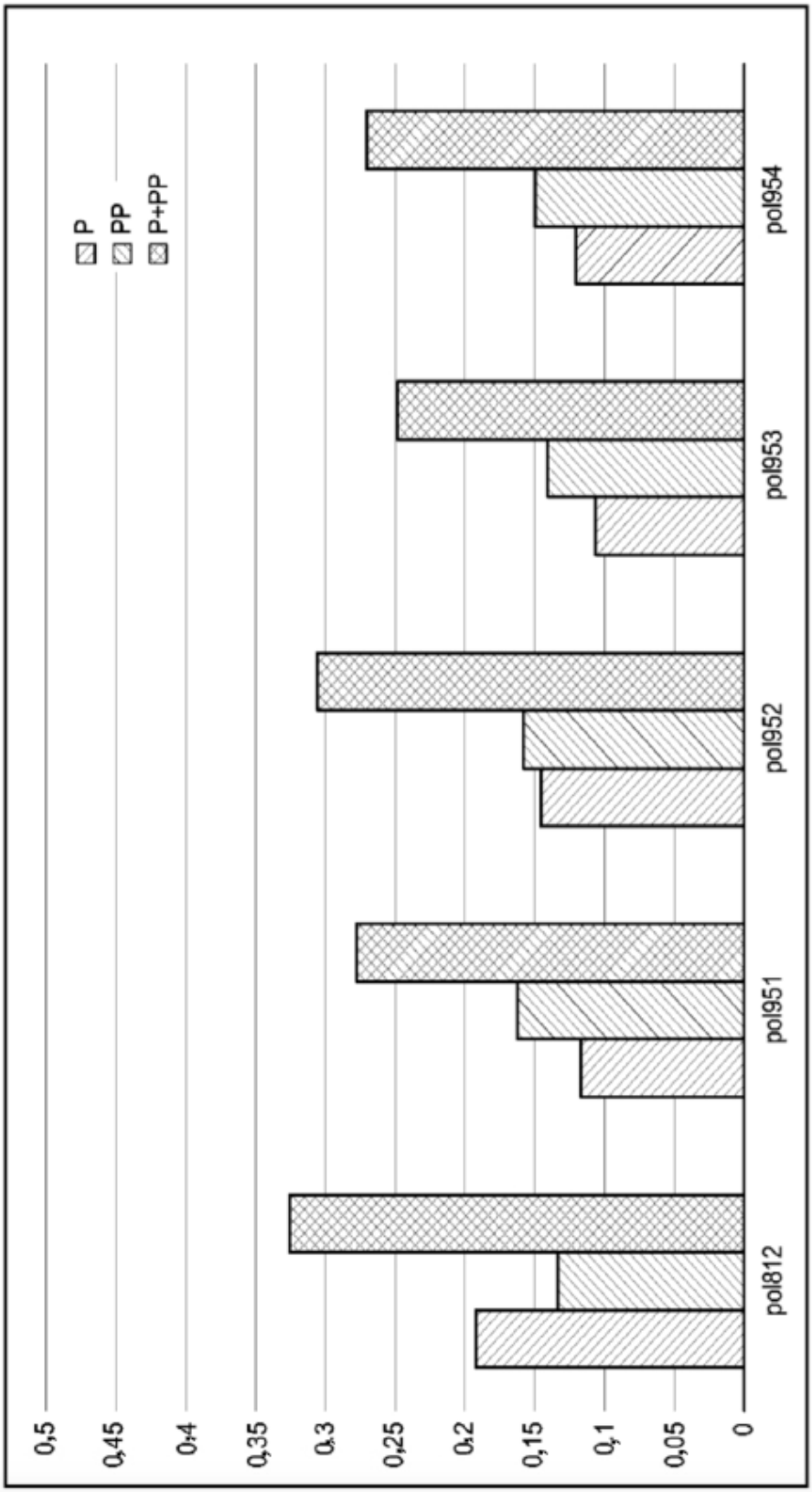
0,5
0,45
0,4
0,35
0,3
0,25
0,2
0,15
0,1
0,05
0
P
PP
P+PP
pol812
pol951
pol952
pol953
pol954

Fig. 5

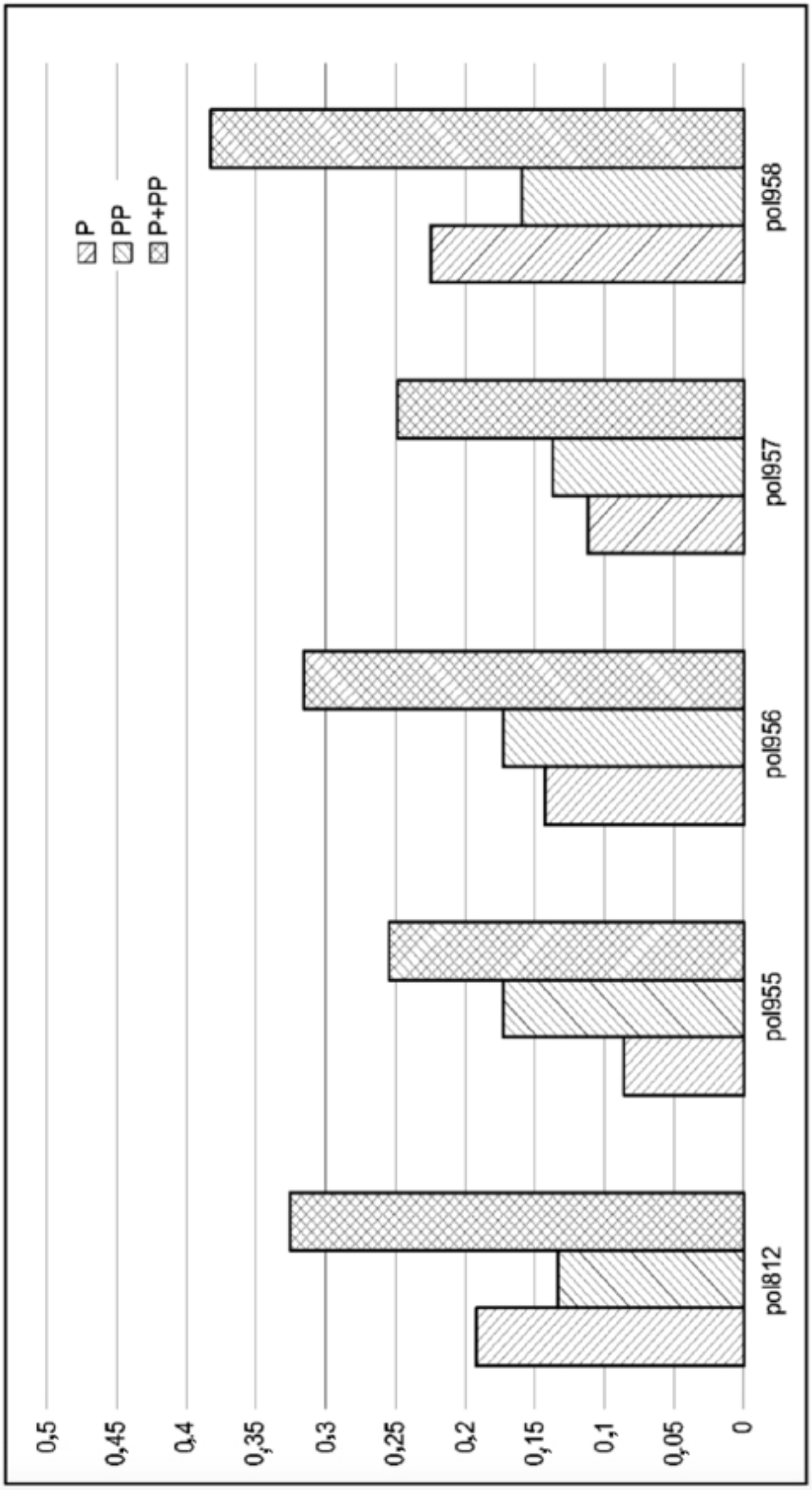

Fig. 5(continuación)