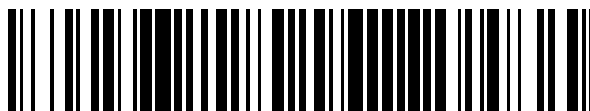


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 747 227**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

C12N 9/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.09.2015 PCT/US2015/053021**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.04.2016 WO16054096**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.09.2015 E 15779120 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2019 EP 3201355**

54 Título: **Polimerasas modificadas para la incorporación mejorada de análogos de nucleótidos**

30 Prioridad:

30.09.2014 US 201462057843 P

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

10.03.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BOMATI, ERIN;
PREVITE, MICHAEL;
KELLINGER, MATTHEW WILLIAM;
CHEN, CHENG-YAO y
HE, MOLLY**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 747 227 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 la incorporación mejorada de análogos de nucleótidos

Antecedentes

Todos los organismos cuentan con ADN polimerasas para replicar y mantener sus genomas. Permiten una replicación de alta fidelidad del ADN mediante la detección de complementariedad entre bases así como el reconocimiento de rasgos estructurales adicionales de la base. Sigue habiendo la necesidad de polimerasas modificadas con incorporación mejorada de análogos de nucleótidos, en particular nucleótidos que estén modificados en el hidroxilo del azúcar 3'.

El documento WO2014/142921 divulga polimerasas modificadas para la incorporación mejorada de análogos de nucleótidos, que reduce los efectos de retraso de fase en aplicaciones de secuenciación por síntesis.

El documento EP0822256 divulga una ADN polimerasa KOD mutante (144TV) con un 90,60 % de identidad con la SEQ ID NO: 10 y que exhibe T144V y G153A.

Hopfner Karl-Peter et al. "Crystal structure of a thermostable type B DNA polymerase from *Thermococcus gorgonarius*", NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 96, n.º 7, 30 de marzo de 1999, páginas 3600-3605 divulga una polimerasa de *Thermococcus gorgonarius* con un 91,80 % de identidad con la SEQ ID NO:10 y que exhibe G153A.

Listado de secuencias

La presente solicitud se presenta junto con un listado de secuencias en formato electrónico. El listado de secuencias de proporciona como un fichero titulado IP1201.TXT, creado el 30 de septiembre de 2014, que es de 216 kB de tamaño.

Breve compendio

Se presentan en la presente memoria enzimas polimerasas para la incorporación mejorada de análogos de nucleótido, en particular nucleótidos que estén modificados en el hidroxilo del azúcar 3' de tal modo que el sustituyente sea de mayor tamaño que el grupo hidroxilo 3' de origen natural. Los presentes inventores han identificado sorprendentemente ciertas polimerasas alteradas que exhiben una incorporación mejorada de los análogos deseados y tienen una serie de otras ventajas asociadas.

En ciertas realizaciones la polimerasa alterada comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 80 %, 90 %, 95 % o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 10, cuya ADN polimerasa recombinante comprende al menos una mutación por sustitución aminoacídica en una o más posiciones equivalentes posicionalmente a Lys476 y Thr590 en la secuencia aminoacídica de la ADN polimerasa 9^oN, en la que la mutación en la posición posicionalmente equivalente a Lys476 comprende una mutación por un aminoácido hidrófobo. Se expone la secuencia aminoacídica de ADN polimerasa 9^oN de tipo silvestre en la SEQ ID NO: 10.

Se divulga también cuando una mutación por sustitución en la posición Thr144 comprende una mutación por un aminoácido no polar, por ejemplo, una mutación homóloga a Thr144Ala, Thr144Gly o Thr144Leu. Se divulga también cuando una mutación por sustitución en la posición Gly153 comprende una mutación por un aminoácido polar, por ejemplo, una mutación homóloga a Gly153Asp. La mutación por sustitución en la posición Lys476 comprende una mutación por un aminoácido hidrófobo, por ejemplo, una mutación homóloga a Lys476Trp. Se divulga también cuando una mutación por sustitución en posición Leu478 comprende una mutación por un aminoácido polar, por ejemplo, una mutación homóloga a Leu478Ser, Leu478Arg o Leu478Thr. En ciertas realizaciones, la mutación por sustitución en posición Thr590 comprende una mutación por un aminoácido no polar, por ejemplo, una mutación homóloga a Thr590Ile. Se divulga también cuando una mutación por sustitución en posición Ala639 comprende, por ejemplo, una mutación homóloga a Ala639Val o Ala639Phe. Se divulga también cuando una mutación por sustitución en posición Asp718 comprende una mutación por un aminoácido no cargado, por ejemplo, una mutación homóloga a Asp718Asn.

En algunas realizaciones, la polimerasa es una ADN polimerasa. Por ejemplo, la ADN polimerasa puede ser una ADN polimerasa de tipo de familia B. La polimerasa puede ser, por ejemplo, una ADN polimerasa arqueal de la familia B, ADN polimerasa α humana y ADN polimerasas de fago T4, RB69 y phi29. En ciertas realizaciones, la ADN polimerasa arqueal de la familia B es de un género seleccionado del grupo consistente en *Thermococcus*, *Pyrococcus* y *Methanococcus*. Por ejemplo, la polimerasa puede seleccionarse del grupo consistente en polimerasas Vent, Deep Vent, 9^oN y Pfu. En ciertas realizaciones, la ADN polimerasa arqueal de la familia B es la polimerasa 9^oN.

En algunas realizaciones, además de las mutaciones anteriores, la polimerasa alterada puede comprender adicionalmente mutaciones por sustitución en posiciones equivalentes posicionalmente a Leu408 y/o Tyr409 y/o Pro410 en la secuencia aminoacídica de la ADN polimerasa 9^oN. Por ejemplo, las mutaciones por sustitución pueden comprender mutaciones por sustitución homólogas de Leu408Ala y/o Tyr409Ala y/o Pro410Ile en la secuencia aminoacídica de ADN polimerasa 9^oN.

En algunas realizaciones, la polimerasa alterada comprende una actividad exonucleasa reducida en comparación con

una polimerasa de tipo silvestre. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la polimerasa alterada comprende mutaciones por sustitución en posiciones equivalentes posicionalmente a Asp141 y/o Glu143 en la secuencia aminoacídica de ADN polimerasa 9°N.

5 En ciertas realizaciones, la polimerasa alterada comprende adicionalmente mutaciones por sustitución en posiciones equivalentes posicionalmente a Ala485 en la secuencia aminoacídica de ADN polimerasa 9°N. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la polimerasa comprende una mutación por sustitución posicionalmente equivalente a Ala485Leu o Ala485 Val en la secuencia aminoacídica de polimerasa 9°N.

10 Se divulga también cuando la polimerasa alterada comprende adicionalmente una mutación por sustitución por un aminoácido diferente en la posición funcionalmente equivalente a Cys223 en la secuencia aminoacídica de ADN polimerasa 9°N. Por ejemplo, la polimerasa alterada comprende una mutación por sustitución funcionalmente equivalente a Cys223Ser en la secuencia aminoacídica de polimerasa 9°N.

15 Se divulga también cuando la al menos una mutación por sustitución comprende una mutación en una posición equivalente a Thr514, Lys477 y/o Ile521. Por ejemplo, la polimerasa alterada comprende una mutación por sustitución funcionalmente equivalente a Thr514Ala, Thr514Ser, Lys477Met y/o Ile521Leu en la secuencia aminoacídica de polimerasa 9°N.

20 Se divulga también cuando la polimerasa alterada puede comprender una mutación por sustitución adicional para retirar una metionina interna. Por ejemplo, la polimerasa alterada comprende una mutación por sustitución por un aminoácido diferente en una posición funcionalmente equivalente a Met129 en la secuencia aminoacídica de ADN polimerasa 9°N. Se divulga también cuando la polimerasa alterada comprende una mutación por sustitución funcionalmente equivalente a Met129Ala en la secuencia aminoacídica de polimerasa 9°N.

Se presenta también en la presente memoria una polimerasa alterada que comprende una mutación por sustitución en el dominio semiconservado que comprende la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 1, en la que la mutación por sustitución comprende una mutación seleccionada de una sustitución en posición 5 por cualquier residuo distinto de Thr o Val. La mutación puede comprender una sustitución en posición 5 por Ala, Gly o Leu.

25 Se presenta también en la presente memoria una polimerasa alterada que comprende una mutación por sustitución en el dominio semiconservado que comprende la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 2, en la que la mutación por sustitución comprende una mutación seleccionada de una sustitución en posición 7 por cualquier residuo distinto de Gly, Ala o Lys. La mutación puede comprender una sustitución en posición 7 por Asp.

30 Se presenta también en la presente memoria una polimerasa alterada que comprende una mutación por sustitución en el dominio semiconservado que comprende la secuencia aminoacídica de cualquiera de las SEQ ID NO: 3-6, en la que la mutación por sustitución comprende una mutación seleccionada de una sustitución en posición 2 por cualquier residuo distinto de Lys, Arg, Tyr o Glu. La mutación puede comprender una sustitución en posición 2 por Trp.

35 Se presenta también en la presente memoria una polimerasa alterada que comprende una mutación por sustitución en el dominio semiconservado que comprende la secuencia aminoacídica de cualquiera de las SEQ ID NO: 3-6, en la que la mutación por sustitución comprende una mutación seleccionada de una sustitución en posición 4 por cualquier residuo distinto de Leu, Ile o Ala. La mutación puede comprender una sustitución en posición 4 por Ser, Arg o Thr.

40 Se presenta también en la presente memoria una polimerasa alterada que comprende una mutación por sustitución en el dominio semiconservado que comprende la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 7, en la que la mutación por sustitución comprende una mutación seleccionada de una sustitución en posición 6 por cualquier residuo distinto de Thr. La mutación puede comprender una sustitución en posición 6 por Ile o Gly.

Se presenta también en la presente memoria una polimerasa alterada que comprende una mutación por sustitución en el dominio semiconservado que comprende la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 8, en la que la mutación por sustitución comprende una mutación seleccionada de una sustitución en posición 6 por cualquier residuo distinto de Ala. La mutación puede comprender una sustitución en posición 6 por Val o Phe.

45 Se presenta también en la presente memoria una polimerasa alterada que comprende una mutación por sustitución en el dominio semiconservado que comprende la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 9, en la que la mutación por sustitución comprende una mutación seleccionada de una sustitución en posición 7 por cualquier residuo distinto de Asp o Glu. La mutación puede comprender una sustitución en posición 7 por Asn.

50 Además de las mutaciones anteriores, la polimerasa alterada puede comprender adicionalmente mutaciones por sustitución en posiciones funcionalmente equivalentes a Leu408 y/o Tyr409 y/o Pro410 en la secuencia aminoacídica de ADN polimerasa 9°N. Por ejemplo, las mutaciones por sustitución pueden comprender mutaciones por sustitución homólogas de Leu408Ala y/o Tyr409Ala y/o Pro410Ile en la secuencia aminoacídica de ADN polimerasa 9°N.

55 La polimerasa alterada puede comprender actividad exonucleasa reducida en comparación con una polimerasa de tipo silvestre. Por ejemplo, la polimerasa alterada comprende mutaciones por sustitución en posiciones funcionalmente equivalentes a Asp141 y/o Glu143 en la secuencia aminoacídica de ADN polimerasa 9°N.

Se divulga también cuando la polimerasa alterada comprende adicionalmente mutaciones por sustitución en posiciones funcionalmente equivalentes a Ala485 en la secuencia aminoacídica de ADN polimerasa 9°N. Por ejemplo, la polimerasa puede comprender una mutación por sustitución funcionalmente equivalente a Ala485Leu o Ala485Val en la secuencia aminoacídica de polimerasa 9°N.

5 Se divulga también cuando la polimerasa alterada comprende adicionalmente una mutación por sustitución por un aminoácido diferente en una posición funcionalmente equivalente a Cys233 en la secuencia aminoacídica de ADN polimerasa 9°N. Por ejemplo, la polimerasa alterada puede comprender una mutación por sustitución funcionalmente equivalente a Cys223Ser en la secuencia aminoacídica de polimerasa 9°N.

10 Se divulga también cuando la al menos una mutación por sustitución comprende una mutación en la posición equivalente a Thr514, Lys477 y/o Ile521. Por ejemplo, la polimerasa alterada puede comprender una mutación por sustitución funcionalmente equivalente a Thr514Ala, Thr514Ser, Lys477Met y/o Ile521Leu en la secuencia aminoacídica de polimerasa 9°N.

15 Se divulga también cuando la polimerasa alterada puede comprender una mutación por sustitución adicional para retirar una metionina interna. Por ejemplo, la polimerasa alterada puede comprender una mutación por sustitución por un aminoácido diferente en una posición funcionalmente equivalente a Met129 en la secuencia aminoacídica de ADN polimerasa 9°N. La polimerasa alterada puede comprender una mutación por sustitución funcionalmente equivalente a Met129Ala en la secuencia aminoacídica de polimerasa 9°N.

Se presenta también en la presente memoria una polimerasa alterada que comprende la secuencia aminoacídica de una cualquiera de las SEQ ID NO: 11-12, 14-15, 17, 19-20, 22-23, 25-26, 28, 30 y 32-40.

20 Se presenta también en la presente memoria una molécula de ácido nucleico que codifica una polimerasa alterada como se define en cualquiera de las realizaciones anteriores. Se presenta también en la presente memoria un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico descrita anteriormente. Se presenta también en la presente memoria una célula hospedadora que comprende el vector descrito anteriormente.

25 Se presenta también en la presente memoria un método para incorporar nucleótidos modificados a ADN que comprende permitir interaccionar los siguientes componentes: (i) una polimerasa alterada según cualquiera de las realizaciones anteriores, (ii) un molde de ADN y (iii) una solución de nucleótidos. El molde de ADN puede comprender una matriz agrupada.

30 Se proporciona también en la presente memoria un kit para efectuar una reacción de incorporación de nucleótidos que comprende: una polimerasa como se define en cualquiera de las realizaciones anteriores y una solución de nucleótidos. La solución de nucleótidos puede comprender nucleótidos marcados. Los nucleótidos pueden comprender nucleótidos sintéticos. Los nucleótidos pueden comprender nucleótidos modificados. Los nucleótidos modificados pueden modificarse en el hidroxilo del azúcar 3' de tal modo que el sustituyente sea de mayor tamaño que el grupo hidroxilo 3' de origen natural. Los nucleótidos modificados pueden comprender una molécula de nucleótido o nucleósido modificado que comprende una base de purina o pirimidina y un resto de azúcar ribosa o desoxirribosa que tiene un grupo de bloqueo de 3'-OH retirable enlazado covalentemente con la misma, de tal modo que el átomo de carbono 3' tenga enlazado un grupo de estructura



en la que 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 los que cada R'' es o es parte de un grupo protector retirable;

40 cada R' es independientemente un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo, alquilo sustituido, arilalquilo, alquenoilo, alquinoilo, arilo, heteroarilo, heterociclo, acilo, ciano, alcoxi, ariloxi, heteroariloxi o amido, o un marcaje detectable enlazado a través de un grupo ligador; o $(R')_2$ representa un grupo alquilideno de fórmula $=C(R'')_2$ en la que cada R'' puede ser igual o diferente y se selecciona del grupo que comprende átomos de hidrógeno y halógeno y grupos alquilo; y

45 en la que la molécula puede hacerse reaccionar procurando un intermedio en que cada R'' se intercambia por H o, cuando Z es $-C(R')_2-F$, el F se intercambia por OH, SH o NH_2 , preferiblemente OH, cuyo intermedio se disocia en condiciones acuosas dando una molécula con un 3'OH libre;

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

50 R' del nucleótido o nucleósido modificado puede ser un alquilo o alquilo sustituido. -Z del nucleótido o nucleósido modificado puede ser de fórmula $-C(R')_2-N_3$. Z puede ser un grupo azidometilo.

Los nucleótidos modificados pueden estar marcados fluorescentemente para permitir su detección. Los nucleótidos modificados pueden comprender un nucleótido o nucleósido que tiene una base enlazada con un marcaje detectable a través de un ligador escindible. El marcaje detectable puede comprender un marcaje fluorescente. El kit puede comprender además una o más moléculas de molde y/o cebadores de ADN.

Se exponen los detalles de una o más de las realizaciones en los dibujos acompañantes y la descripción siguiente. Otros rasgos, objetos y ventajas resultarán evidentes a partir de la descripción y dibujos y a partir de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

5 La Figura 1 es un esquema que muestra el alineamiento de secuencias aminoacídicas de polimerasa de *Thermococcus* sp. 9°N-7 (9°N), mutante T514S/I521L de polimerasa 9°N (Pol957), *Thermococcus gorgonarius* (TGO), *Thermococcus kodakaraensis* (KOD1), *Pyrococcus furiosus* (Pfu), *Methanococcus maripaludis* (MMS2) y ADN polimerasa de fago RB69. La numeración mostrada representa la numeración de los residuos aminoacídicos en la polimerasa 9°N.

10 La Figura 2 es un esquema que muestra dos porciones destacadas del alineamiento mostrado en la Figura 1.

Descripción detallada

Se presentan en la presente memoria enzimas polimerasas para la incorporación mejorada de análogos de nucleótidos, en particular nucleótidos que están modificados en el hidroxilo de azúcar 3' de tal modo que el sustituyente sea de mayor tamaño que el grupo hidroxilo 3' de origen natural. Los presentes inventores han identificado sorprendentemente ciertas polimerasas alteradas que exhiben la incorporación mejorada de los análogos deseados y tienen una serie de otras ventajas asociadas, incluyendo tasa de error reducida, retraso de fase y adelantamiento de fase reducidos y métricas de calidad mejoradas en reacciones de secuenciación por síntesis.

Como se describe con más detalle a continuación en la presente memoria, los inventores han encontrado sorprendentemente que una o más mutaciones en la polimerasa dan como resultado profundos aumentos de la tasa de recambio y la reducción de la pirofosforólisis. Estas polimerasas alteradas tienen un rendimiento mejorado en la secuenciación de ADN por síntesis (SBS) y dan como resultado retraso de fase y/o adelantamiento de fase reducidos, y unas métricas de calidad mejoradas globalmente en reacciones de secuenciación por síntesis.

Retraso de fase y adelantamiento de fase son términos conocidos por los especialistas en la materia y se usan para describir la pérdida de sincronización en la lectura de las copias de secuencia de un agrupamiento. El retraso de fase y adelantamiento de fase causan que las intensidades extraídas de un ciclo específico consistan en la señal del ciclo actual así como ruido de ciclos precedentes y siguientes. Por tanto, como se usa en la presente memoria, el término "retraso de fase" hace referencia a un fenómeno en SBS que está causado por la incorporación incompleta de un nucleótido a alguna porción de hebras de ADN en agrupamientos por la polimerasa en un ciclo de secuenciación dado, y es por tanto una medida de la tasa a la que moléculas individuales en un agrupamiento pierden sincronización entre sí. El retraso de fase puede medirse durante la detección de la señal del agrupamiento en cada ciclo, y puede reseñarse como el porcentaje de señal detectable de un agrupamiento que está fuera de sincronización con la señal en el agrupamiento. Como ejemplo, un agrupamiento se detecta por una señal de fluoróforo "verde" durante el ciclo N. En el ciclo posterior (ciclo N+1), se detecta el 99,9 % de la señal del agrupamiento en el canal "rojo" y permanece un 0,1 % de la señal del ciclo anterior y se detecta en el canal "verde". Este resultado indicaría que aparece retraso de fase, y puede reseñarse como un valor numérico, tal como un valor de retraso de fase de 0,1, indicando que un 0,1 % de las moléculas en un agrupamiento se quedan atrás en cada ciclo.

El término "adelantamiento de fase" como se usa en la presente memoria hace referencia a un fenómeno en SBS que está causado por la incorporación de nucleótidos sin terminadores 3' eficaces, causando que el evento de incorporación vaya 1 ciclo por delante. A medida que aumenta el número de ciclos, aumenta la fracción de secuencias por agrupamiento afectadas por retraso de fase, obstaculizando la identificación de la base correcta. El adelantamiento de fase puede detectarse mediante un instrumento de secuenciación y reseñarse como un valor numérico, tal como un valor de adelantamiento de fase de 0,1, indicando que un 0,1 % de las moléculas en el agrupamiento van por delante en cada ciclo.

La detección de retraso de fase y adelantamiento de fase pueden efectuarse y reseñarse según cualquier metodología adecuada como es conocida en la materia, por ejemplo, como se describe en el documento U.S. 2012/0020537, que se incorpora como referencia en su totalidad. Por ejemplo, como se describe en los ejemplos siguientes, el retraso de fase se detecta y reseña rutinariamente durante tandas de secuenciación de SBS en instrumentos de secuenciación tales como las plataformas de secuenciación HiSeq, Genome Analyzer, NextSeq o MiSeq de Illumina, Inc. (San Diego, CA) o cualquier otro instrumento adecuado conocido en la materia.

El retraso de fase puede causarse, por ejemplo, por una polimerasa que efectúa la reacción inversa de incorporación de nucleótidos, como es conocido que sucede en condiciones tendentes a la pirofosforólisis. Por consiguiente, el descubrimiento de polimerasas alteradas que disminuyen la incidencia de retraso de fase y/o adelantamiento de fase es sorprendente y proporciona una gran ventaja en aplicaciones de SBS. Por ejemplo, las polimerasas alteradas proporcionan un tiempo de ciclo de SBS más rápido, menores valores de retraso de fase y/o adelantamiento de fase y longitudes de lectura de secuenciación más largas. Se expone en la sección de ejemplos siguiente la caracterización del retraso de fase y adelantamiento de fase para polimerasas alteradas como se proporciona en la presente memoria.

La fidelidad con la que una colección secuenciada coincide con la secuencia genómica original puede variar

dependiendo de la frecuencia de la mutación de base que ocurre en cualquier paso desde la extracción del ácido nucleico a su secuenciación en una plataforma de secuenciación. Esta frecuencia pone un límite superior a la probabilidad de que una base secuenciada sea correcta. En algunas realizaciones, la puntuación de calidad se presenta como un valor numérico. Por ejemplo, la puntuación de calidad puede citarse como QXX, donde XX es la puntuación, y significa que esa petición particular tiene una probabilidad de error de $10^{-XX/10}$. Por tanto, como ejemplo, Q30 es igual a una tasa de error de 1 en 1000, o 0,1 % y Q40 es igual a una tasa de error de 1 en 10.000 o 0,01 %. Dicho de otro modo, si ocurre una mutación una de cada mil veces, entonces la confianza (probabilidad) máxima de que cualquier base sea correcta es de 1 cada 10^3 , concretamente un máximo de Q30.

En ciertas realizaciones, la sustitución por mutación comprende una mutación por un residuo que tiene una cadena lateral no polar. Los aminoácidos que tienen cadenas laterales no polares son bien conocidos en la materia e incluyen, por ejemplo: alanina, cisteína, glicina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, triptófano, tirosina y valina.

En ciertas realizaciones, la mutación por sustitución comprende una mutación por un residuo que tiene una cadena lateral polar. Los aminoácidos que tienen cadenas laterales polares son bien conocidos en la materia e incluyen, por ejemplo: arginina, asparagina, ácido aspártico, glutamina, ácido glutámico, histidina, lisina, serina y treonina.

En ciertas realizaciones, la mutación por sustitución comprende una mutación por un residuo que tiene una cadena lateral hidrófoba. Los aminoácidos que tienen cadenas laterales hidrófobas son bien conocidos en la materia e incluyen, por ejemplo: glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina y triptófano.

En ciertas realizaciones, la mutación por sustitución comprende una mutación por un residuo que tiene una cadena lateral no cargada. Los aminoácidos que tienen cadenas laterales no cargadas son bien conocidos en la materia e incluyen, por ejemplo: glicina, serina, cisteína, asparagina, glutamina, tirosina y treonina.

Se presenta también en la presente memoria una polimerasa alterada que comprende una mutación por sustitución en un dominio semiconservado de la polimerasa. Como se usa en la presente memoria, el término "dominio semiconservado" hace referencia a una porción de la polimerasa que está totalmente conservada, o al menos parcialmente conservada, entre diversas especies. Se ha descubierto sorprendentemente que la mutación de uno o más residuos en un dominio semiconservado afecta a la actividad polimerasa en presencia de nucleótidos bloqueados 3', dando como resultado un rendimiento profundamente mejorado de la secuenciación de ADN por síntesis y dando como resultado errores de retraso fase reducidos, como se describe en la sección de Ejemplos siguiente.

Se expone en las Figuras 1 y 2 un alineamiento que muestra la conservación entre diversas polimerasas en los dominios semiconservados. Las secuencias de polimerasa mostradas en las Figuras 1 y 2 se obtuvieron de la base de datos Genbank, números de acceso Q56366 (ADN polimerasa 9°N), NP_577941 (Pfu), YP_182414 (KOD1), NP_987500 (MMS2), AAP75958 (RB69) y P56689 (TGo).

Se divulga también cuando el dominio semiconservado comprende aminoácidos que tienen la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 1. La SEQ ID NO: 1 expone residuos en el dominio semiconservado que están conservados entre diversas polimerasas, y corresponde a los residuos 140-149 de la secuencia aminoacídica de ADN polimerasa 9°N, que se expone en la presente memoria como SEQ ID NO: 10. Por consiguiente, en algunas de las polimerasas alteradas presentadas en la presente memoria que comprenden una mutación por sustitución en un dominio semiconservado de la polimerasa, la mutación por sustitución comprende una mutación en posición 5 de la SEQ ID NO: 1 por cualquier residuo distinto de Thr o Val. La polimerasa alterada puede comprender una mutación por un residuo no polar en posición 5 de la SEQ ID NO: 1. La polimerasa alterada puede comprender una mutación por Ala, Gly o Leu en posición 5 de la SEQ ID NO: 1.

El dominio semiconservado puede comprender aminoácidos que tienen la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2. La SEQ ID NO: 2 expone residuos en el dominio semiconservado que están conservados entre diversas polimerasas, y corresponde a los residuos 147-157 de la secuencia aminoacídica de ADN polimerasa 9°N, que se expone en la presente memoria como SEQ ID NO: 10. Por consiguiente, en algunas de las polimerasas alteradas presentadas en la presente memoria que comprenden una mutación por sustitución en un dominio semiconservado de la polimerasa, la mutación por sustitución comprende una mutación en posición 7 de la SEQ ID NO: 2 por cualquier residuo distinto de Gly, Ala o Lys. La polimerasa alterada puede comprender una mutación por un residuo polar en posición 7 de la SEQ ID NO: 2. La polimerasa alterada puede comprender una mutación por Asp en posición 7 de la SEQ ID NO: 2.

Se divulga también cuando el dominio semiconservado comprende aminoácidos que tienen la secuencia expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 3-6. Las SEQ ID NO: 3-6 exponen residuos en el dominio semiconservado que están conservados entre diversas polimerasas, y corresponde a los residuos 475-492 de la secuencia aminoacídica de ADN polimerasa 9°N, que se expone en la presente memoria como SEQ ID NO: 10. Por consiguiente, en algunas de las polimerasas alteradas presentadas en la presente memoria que comprenden una mutación por sustitución en un dominio semiconservado de la polimerasa, la mutación por sustitución comprende una mutación en posición 2 de cualquiera de las SEQ ID NO: 3-6 por cualquier residuo distinto de Lys, Arg, Tyr o Glu. La polimerasa alterada puede comprender una mutación por un residuo hidrófobo en posición 2 de cualquiera de las SEQ ID NO: 3-6. La polimerasa alterada puede comprender una mutación por Trp en posición 2 de cualquiera de las SEQ ID NO: 3-6.

En algunas de las polimerasas alteradas presentadas en la presente memoria que comprenden una mutación por

sustitución en un dominio semiconservado de la polimerasa, la mutación por sustitución comprende una mutación en posición 4 de cualquiera de las SEQ ID NO: 3-6 por cualquier residuo distinto de Leu, Ile o Ala. La polimerasa alterada puede comprender una mutación por un residuo polar en posición 4 de cualquiera de las SEQ ID NO: 3-6. La polimerasa alterada puede comprender una mutación por Ser, Arg o Thr en posición 4 de cualquiera de las SEQ ID NO: 3-6.

Se divulga también cuando el dominio semiconservado comprende aminoácidos que tienen la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 7. La SEQ ID NO: 7 expone residuos en el dominio semiconservado que están conservados entre diversas polimerasas, y corresponde a los residuos 585-598 de la secuencia aminoacídica de ADN polimerasa 9°N, que se expone en la presente memoria como SEQ ID NO: 10. Por consiguiente, en algunas de las polimerasas alteradas presentadas en la presente memoria que comprenden una mutación por sustitución en un dominio semiconservado de la polimerasa, la mutación por sustitución comprende una mutación en posición 6 de la SEQ ID NO: 7 por cualquier residuo distinto de Thr. La polimerasa alterada puede comprender una mutación por un residuo no polar en posición 6 de la SEQ ID NO: 7. La polimerasa alterada puede comprender una mutación por Ile o Gly en posición 6 de la SEQ ID NO: 7.

Se divulga también cuando el dominio semiconservado comprende aminoácidos que tienen la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 8. La SEQ ID NO: 8 expone residuos en el dominio semiconservado que están conservados entre diversas polimerasas, y corresponde a los residuos 634-646 de la secuencia aminoacídica de ADN polimerasa 9°N, que se expone en la presente memoria como SEQ ID NO: 10. Por consiguiente, en algunas de las polimerasas alteradas presentadas en la presente memoria que comprenden una mutación por sustitución en un dominio semiconservado de la polimerasa, la mutación por sustitución comprende una mutación en posición 6 de la SEQ ID NO: 8 por cualquier residuo distinto de Ala o Gln. La polimerasa alterada puede comprender una mutación por Val o Phe en posición 6 de la SEQ ID NO: 8.

Se divulga también cuando el dominio semiconservado comprende aminoácidos que tienen la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 9. La SEQ ID NO: 9 expone residuos en el dominio semiconservado que están conservados entre diversas polimerasas, y corresponde a los residuos 712-722 de la secuencia aminoacídica de ADN polimerasa 9°N, que se expone en la presente memoria como SEQ ID NO: 10. Por consiguiente, en algunas de las polimerasas alteradas presentadas en la presente memoria que comprenden una mutación por sustitución en un dominio semiconservado de la polimerasa, la mutación por sustitución comprende una mutación en posición 7 de la SEQ ID NO: 9 por cualquier residuo distinto de Asp, Glu o Gly. La polimerasa alterada puede comprender una mutación por un residuo no cargado en posición 7 de la SEQ ID NO: 9. La polimerasa alterada puede comprender una mutación por Asn en posición 7 de la SEQ ID NO: 9.

En algunas realizaciones, la polimerasa es una ADN polimerasa. En ciertas realizaciones, la ADN polimerasa es una ADN polimerasa de tipo de familia B. La polimerasa puede ser, por ejemplo, una ADN polimerasa arqueal de familia B, ADN polimerasa α humana y polimerasas de fago. Puede usarse cualquier polimerasa de fago en las realizaciones presentadas en la presente memoria, incluyendo por ejemplo polimerasas de fago tales como ADN polimerasas de fago T4, RB69 y phi29.

Las ADN polimerasas arqueales de familia B son bien conocidas en la materia como se ejemplifica por la divulgación de la patente de EE. UU. n.º 8.283.149. En ciertas realizaciones, la ADN polimerasa arqueal es de arqueas hipertermófilas, lo que significa que las polimerasas son a menudo termoestables. Por consiguiente, en una realización preferida adicional, la polimerasa se selecciona de polimerasa Vent, Deep Vent, 9°N y Pfu. Vent y Deep Vent son nombres comerciales usados por ADN polimerasas de la familia B aisladas de la arquea hipertermófila *Thermococcus litoralis*. La polimerasa 9°N se identificó también a partir de *Thermococcus sp.* La polimerasa Pfu se aisló de *Pyrococcus furiosus*.

En ciertas realizaciones, la ADN polimerasa arqueal de familia B es de un género tal como, por ejemplo, aquellas del género *Thermococcus*, *Pyrococcus* y *Methanococcus*. Los miembros del género *Thermococcus* son bien conocidos en la materia e incluyen, pero sin limitación, *Thermococcus 4557*, *Thermococcus barophilus*, *Thermococcus gammatolerans*, *Thermococcus onnurineus*, *Thermococcus sibiricus*, *Thermococcus kodakarensis*, *Thermococcus gorgonarius*. Los miembros del género *Pyrococcus* son bien conocidos en la materia e incluyen, pero sin limitación, *Pyrococcus NA2*, *Pyrococcus abyssi*, *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus horikoshii*, *Pyrococcus yamanosii*, *Pyrococcus endeavori*, *Pyrococcus glycovorans* y *Pyrococcus woesei*. Los miembros del género *Methanococcus* son bien conocidos en la materia e incluyen, pero sin limitación, *M. aeolicus*, *M. maripaludis*, *M. vanniellii*, *M. voltae*, "M. thermolithotrophicus" y "M. jannaschii".

Por ejemplo, la polimerasa puede seleccionarse del grupo consistente en polimerasa Vent, Deep Vent, 9°N y Pfu. En ciertas realizaciones, la ADN polimerasa arqueal de familia B es la polimerasa 9°N.

Se entiende por "funcionalmente equivalente" que la polimerasa de control, en el caso de estudios que usan una polimerasa enteramente diferente, contendrá la sustitución aminoacídica que se considera que aparece en la posición aminoacídica en la otra polimerasa que tiene el mismo papel funcional en la enzima. Como ejemplo, la mutación en posición 412 de tirosina a valina (Y412V) en la ADN polimerasa Vent sería funcionalmente equivalente a una sustitución en posición 409 de tirosina a valina (Y409V) en la polimerasa 9°N.

Generalmente, las mutaciones por sustitución funcionalmente equivalentes en dos o más polimerasas diferentes aparecen en posiciones aminoacídicas homólogas en las secuencias aminoacídicas de las polimerasas. Por ello, el uso en la presente memoria de la expresión “funcionalmente equivalente” engloba también mutaciones que son “posicionalmente equivalentes” u “homólogas” a una mutación dada, independientemente de si la función particular del aminoácido mutado es conocida. Los residuos aminoacídicos posicionalmente equivalentes u homólogos en las secuencias aminoacídicas de dos o más polimerasas diferentes se determinan basándose en el alineamiento de secuencias. Se expone en las Figuras 1 y 2 un ejemplo de alineamiento de secuencias para identificar residuos posicionalmente equivalentes y/o funcionalmente equivalentes. Por tanto, por ejemplo, como se muestra en la Figura 2, los residuos en el dominio semiconservado identificados como las posiciones 475-492 de la secuencia aminoacídica de ADN polimerasa 9°N. Los residuos correspondientes en polimerasas TGO, KOD1, Pfu, MmS2 y RB69 se identifican en la Figura como verticalmente alineados y se consideran posicionalmente equivalentes, así como funcionalmente equivalentes, al correspondiente residuo en la secuencia aminoacídica de ADN polimerasa 9°N.

Las polimerasas alteradas descritas anteriormente en la presente memoria pueden comprender mutaciones por sustitución adicionales que son conocidas por potenciar uno o más aspectos de la actividad polimerasa en presencia de nucleótidos bloqueados 3' y/o en aplicaciones de secuenciación de ADN. Por ejemplo, en algunas realizaciones, además de cualquiera de las mutaciones anteriores, la polimerasa alterada puede comprender adicionalmente mutaciones por sustitución en posiciones funcionalmente equivalentes a Leu408 y/o Tyr409 y/o Pro410 en la secuencia aminoacídica de ADN polimerasa 9°N. Puede realizarse cualquiera de una variedad de mutaciones por sustitución en una o más posiciones en posiciones funcionalmente equivalentes a 408-410 en la secuencia aminoacídica de ADN polimerasa 9°N que da como resultado una incorporación aumentada de nucleótidos bloqueados, como es conocido en la materia y ejemplificado por la divulgación de los documentos US 2006/0240439 y US 2006/0281109. Por ejemplo, las mutaciones por sustitución pueden comprender mutaciones por sustitución homólogas de Leu408Ala y/o Tyr409Ala y/o Pro410Ile en la secuencia aminoacídica de ADN polimerasa 9°N. En ciertas realizaciones, además de cualquiera de las mutaciones anteriores, la polimerasa alterada comprende adicionalmente mutaciones por sustitución en posiciones funcionalmente equivalentes a Ala485 en la secuencia aminoacídica de ADN polimerasa 9°N. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la polimerasa comprende una mutación por sustitución funcionalmente equivalente a Ala485Leu o Ala485Val en la secuencia aminoacídica de polimerasa 9°N.

En algunas realizaciones, además de cualquiera de las mutaciones anteriores, la polimerasa alterada puede comprender actividad exonucleasa reducida en comparación con una polimerasa de tipo silvestre. Puede realizarse cualquiera de una variedad de mutaciones por sustitución en una o más posiciones conocidas por dar como resultado una actividad exonucleasa reducida, como es conocido en la materia y ejemplificado por los materiales de los documentos US 2006/0240439 y US 2006/0281109. Por ejemplo, además de las mutaciones anteriores, la polimerasa alterada puede comprender adicionalmente mutaciones por sustitución en posiciones funcionalmente equivalentes a Asp141 y/o Glu143 en la secuencia aminoacídica de ADN polimerasa 9°N.

Además de cualquiera de las mutaciones anteriores, la polimerasa alterada comprende adicionalmente una mutación por sustitución por un aminoácido diferente en una posición funcionalmente equivalente a Cys223 en la secuencia aminoacídica de ADN polimerasa 9°N, como es conocido en la materia y ejemplificado por los materiales incorporados del documento US 2006/0281109. Por ejemplo, la polimerasa alterada comprende una mutación por sustitución funcionalmente equivalente a Cys223Ser en la secuencia aminoacídica de polimerasa 9°N.

Además de cualquiera de las mutaciones anteriores, la polimerasa alterada puede comprender una o más mutaciones en las posiciones equivalentes a Thr514 y/o Ile521 en la secuencia aminoacídica de ADN polimerasa 9°N, como es conocido en la materia y ejemplificado por la divulgación del documento PCT/US2013/031694. Por ejemplo, la polimerasa alterada comprende una mutación por sustitución funcionalmente equivalente a Thr514Ala, Thr514Ser y/o Ile521Leu en la secuencia aminoacídica de polimerasa 9°N.

Además de cualquiera de las mutaciones anteriores, la polimerasa alterada puede comprender una o más mutaciones en las posiciones equivalentes a Arg713 en la secuencia aminoacídica de ADN polimerasa 9°N, como es conocido en la materia y ejemplificado por la divulgación de la patente de EE. UU. n.º 8.623.628. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la polimerasa alterada comprende una mutación por sustitución funcionalmente equivalente a Arg713Gly, Arg713Met o Arg713Ala en la secuencia aminoacídica de polimerasa 9°N.

Además de cualquiera de las mutaciones anteriores, la polimerasa alterada puede comprender una o más mutaciones en las posiciones equivalentes a Arg743 y/o Lys705 en la secuencia aminoacídica de ADN polimerasa 9°N, como es conocido en la materia y ejemplificado por la divulgación de la patente de EE. UU. n.º 8.623.628. Por ejemplo, la polimerasa alterada comprende una mutación por sustitución funcionalmente equivalente a Arg743Ala y/o Lys705Ala en la secuencia aminoacídica de polimerasa 9°N.

Además de cualquiera de las mutaciones anteriores, la polimerasa alterada puede comprender una o más mutaciones en las posiciones equivalentes a Lys477 en la secuencia aminoacídica de ADN polimerasa 9°N, como es conocido en la materia y ejemplificado por la divulgación de la solicitud de EE. UU. n.º 62/018.470, presentada el 27 de junio de 2014 y titulada “POLIMERASAS MODIFICADAS PARA LA INCORPORACIÓN MEJORADA DE ANÁLOGOS DE NUCLEÓTIDOS”. Por ejemplo, la polimerasa alterada comprende una mutación por sustitución funcionalmente equivalente a Lys477Met en la secuencia aminoacídica de polimerasa 9°N.

Además de cualquiera de las mutaciones anteriores, la polimerasa alterada puede comprender una o más mutaciones por sustitución adicionales para retirar una metionina interna. Por ejemplo, la polimerasa alterada comprende una mutación por sustitución por un aminoácido diferente en una posición funcionalmente equivalente a Met129 en la secuencia aminoacídica de ADN polimerasa 9°N. La polimerasa alterada puede comprender una mutación por sustitución funcionalmente equivalente a Met129Ala en la secuencia aminoacídica de polimerasa 9°N.

Mutación de polimerasas

Se usan opcionalmente diversos tipos de mutagénesis en la presente divulgación, p. ej. para modificar las polimerasas para producir variantes, p.ej., de acuerdo con modelos de polimerasa y predicciones modélicas como se discuten anteriormente, o usando enfoques mutacionales aleatorios o semialeatorios. En general, puede usarse cualquier procedimiento de mutagénesis disponible para elaborar mutantes de polimerasa. Tales procedimientos de mutagénesis incluyen opcionalmente la selección de ácidos nucleicos y polipéptidos mutantes para una o más actividades de interés (p. ej., pirofosforólisis reducida, recambio aumentado, p. ej., para un análogo de nucleótido dado). Los procedimientos que pueden usarse incluyen, pero sin limitación: mutagénesis dirigida a sitio, mutagénesis puntual aleatoria, recombinación homóloga in vitro o in vivo (transposición de ADN y PCR de superposición combinatoria), mutagénesis usando moldes que contienen uracilo, mutagénesis dirigida a oligonucleótidos, mutagénesis de ADN modificado con fosforotioato, mutagénesis que usa ADN dúplex con huecos, reparación de desapareamientos puntuales, mutagénesis que usa cepas hospedadoras deficientes en reparación, selección por restricción y purificación por restricción, mutagénesis de delección, mutagénesis por síntesis génica total, PCR degenerada, reparación de rotura bicatenaria y muchas otras conocidas por especialistas en la materia. La polimerasa de partida para mutación puede ser cualquiera de las señaladas en la presente memoria, incluyendo mutantes de polimerasa disponibles tales como los identificados, p. ej., en los documentos US 2006/0240439 y US 2006/0281109.

Opcionalmente, la mutagénesis puede guiarse por la información conocida de una molécula de polimerasa de origen natural, o de una polimerasa conocida alterada o mutada (p. ej., usando una polimerasa mutante existente como se señala en las referencias anteriores), p. ej., secuencia, comparaciones de secuencia, propiedades físicas, estructura cristalina y/o similares como se discute anteriormente. Sin embargo, en otra clase de realizaciones, la modificación puede ser esencialmente aleatoria (p. ej., como en la transposición de ADN clásica o "familiar", véase p. ej. Crameri et al. (1998) "DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution" *Nature* 391: 288-291).

Se encuentra información adicional sobre formatos de mutación en: Sambrook et al., *Molecular Cloning- A Laboratory Manual* (3ª Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 2000 ("Sambrook"); *Current Protocols in Molecular Biology*, F. M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, una empresa conjunta entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., (suplementado en 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 en ellas proporcionan detalles adicionales sobre formatos de mutación: 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 (1988); 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., Oligonucleotide-directed random mutagenesis using the phosphorothioate method, *Methods Mol. Biol.* 57: 369-374 (1996); Eghtedarzadeh y 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 enzymatic reactions in vitro, *Nucl. Acids Res.* 16: 6987-6999 (1988); 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, en *Nucleic Acids & Molecular Biology* (Eckstein, F. y Lilley, D. M. J. eds., Springer Verlag, Berlin) (1987); Kunkel, Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 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 duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction, *Nucl. Acids Res.* 12: 9441-9456 (1984); Kramer y 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 et 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 overview, *Anal Biochem.* 254(2): 157-178 (1997); Lorimer y Pastan *Nucleic Acids Res.* 23, 3067-8 (1995); Mandecki, Oligonucleotide-directed double-strand break repair in plasmids of *Escherichia coli*: a method for site-specific mutagenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 7177-7181 (1986); Nakamaye y Eckstein, Inhibition of restriction endonuclease Nci I cleavage by phosphorothioate groups and its application to oligonucleotide-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 α -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-bond 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 y Smith, Oligonucleotide-directed mutagenesis using M 13-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 y Smith, Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors, Methods in Enzymol. 100: 468-500 (1983); Zoller y Smith, Oligonucleotide-directed mutagenesis: a simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded 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 Hiraga and Arnold (2003) "General method for sequence-independent site-directed chimeragenesis: J. Mol. Biol. 330: 287-296. Pueden encontrarse detalles adicionales de muchos de los métodos anteriores en Methods in Enzymology volumen 154, que describe también controles útiles para resolución de problemas con diversos métodos de mutagénesis.

Elaboración y aislamiento de polimerasas recombinantes

Generalmente, los ácidos nucleicos que codifican una polimerasa como se presenta en la presente memoria pueden elaborarse por clonación, recombinación, síntesis in vitro, amplificación in vitro y/u otros métodos disponibles. Puede usarse una variedad de métodos recombinantes para expresar un vector de expresión que codifica una polimerasa como se presenta en la presente memoria. Los métodos de elaboración de ácidos nucleicos recombinantes, expresión y aislamiento de productos expresados son bien conocidos y se describen en la materia. Se describen en la presente memoria una serie de mutaciones ejemplares y combinaciones de mutaciones, así como estrategias para el diseño de mutaciones deseables. Se encuentran métodos para la elaboración y selección de mutaciones en el sitio activo de polimerasas, incluyendo para modificar los rasgos estéricos en o cerca del sitio activo para permitir un acceso mejorado por análogos de nucleótido anteriormente en la presente memoria y, p. ej., en los documentos WO 2007/076057 y PCT/US2007/022459.

Las referencias adicionales útiles para métodos de mutación, manipulación recombinante y de ácido nucleico in vitro (incluyendo 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 2ª 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, 2ª edición (Methods in Molecular Biology, volumen 192) Humana Press y en Viljoen et al. (2005) Molecular Diagnostic PCR Handbook Springer, ISBN 1402034032.

Además, están comercialmente disponibles una multitud de kits para la purificación de plásmidos u otros ácidos nucleicos relevantes de células (véanse, p. ej., EasyPrep™, FlexiPrep™ ambos de Pharmacia Biotech; StrataClean™ de Stratagene y QIAprep™ de Qiagen). Cualquier ácido nucleico aislado y/o purificado puede manipularse adicionalmente para producir otros ácidos nucleicos, usarse para transfectar células, incorporarse a vectores relacionados para infectar organismos para expresión y/o similares. Los vectores de clonación típicos contienen terminadores de transcripción y traducción, secuencias de iniciación de transcripción y traducción y promotores útiles para la regulación de la expresión del ácido nucleico diana particular. Los vectores comprenden opcionalmente módulos de expresión genéricos que contienen al menos una secuencia terminadora independiente, secuencias que permiten la replicación del módulo en eucariotas o procariotas o ambos (p. ej., vectores lanzadera) y marcadores de selección para sistemas tanto procarióticos como eucarióticos. Los vectores son adecuados para replicación e integración en procariotas, eucariotas o ambos.

Otras referencias útiles, p. ej. para aislamiento y cultivo celular (p. ej., para aislamiento posterior de ácido nucleico) incluyen Freshney (1994) Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, 3ª edición Wiley-Liss, Nueva York y las referencias citadas en el mismo; Payne et al. (1992) Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems John Wiley & Sons, Inc. Nueva York, N.Y.; Gamborg and Phillips (eds) (1995) Plant Cell, Tissue and Organ Culture; Fundamental Methods Springer Lab Manual, Springer-Verlag (Berlín Heidelberg Nueva York) y Atlas and Parks (eds) The Handbook of Microbiological Media (1993) CRC Press, Boca Ratón, Fla.

Los ácidos nucleicos que codifican las polimerasas recombinantes divulgadas en la presente memoria son también un rasgo de realizaciones presentadas en la presente memoria. Un aminoácido particular puede estar codificado por múltiples codones, y ciertos sistemas de traducción (p. ej., células procarióticas o eucarióticas) exhiben a menudo sesgo de codón, p. ej., diferentes organismos prefieren a menudo uno de los varios codones sinónimos que codifican el mismo aminoácido. Como tales, los ácidos nucleicos presentados en la presente memoria están opcionalmente "optimizados de codón", lo que significa que los ácidos nucleicos se sintetizan para incluir codones que son preferidos

por el sistema de traducción particular que se está empleando para expresar la polimerasa. Por ejemplo, cuando es deseable expresar la polimerasa en una célula bacteriana (o incluso una cepa de bacterias particular), el ácido nucleico puede sintetizarse para incluir codones encontrados lo más frecuentemente en el genoma de esa célula bacteriana, para una expresión eficaz de la polimerasa. Puede emplearse una estrategia similar cuando es deseable expresar la polimerasa en una célula eucariótica, p. ej. el ácido nucleico puede incluir codones preferidos por esa célula eucariótica.

Son conocidos una variedad de métodos de aislamiento y detección de proteínas y pueden usarse para aislar polimerasas, p. ej. a partir de cultivos recombinantes de células que expresan las polimerasas recombinantes presentadas en la presente memoria. Son bien conocidos en la materia una variedad de métodos de aislamiento y detección de proteínas incluyendo, p. ej., aquellos expuestos 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*, 2ª 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 at Oxford, Oxford, Inglaterra; Harris y Angal *Protein Purification Methods: A Practical Approach* IRL Press at Oxford, Oxford, Inglaterra; Scopes (1993) *Protein Purification: Principles and Practice* 3ª edición Springer Verlag, NY; Janson y Ryden (1998) *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications*, 2ª edición Wiley-VCH, NY y Walker (1998) *Protein Protocols on CD-ROM* Humana Press, NJ; y las referencias citadas en los mismos. Pueden encontrarse detalles adicionales respecto a los métodos de purificación y detección de proteínas en Satinder Ahuja ed., *Handbook of Bioseparations*, Academic Press (2000).

Métodos de uso

Las polimerasas alteradas presentadas en la presente memoria pueden usarse en un procedimiento de secuenciación tal como una técnica de secuenciación por síntesis (SBS). Brevemente, la SBS puede iniciarse poniendo en contacto los ácidos nucleicos diana con uno o más nucleótidos marcados, ADN polimerasa, etc. Aquellos rasgos en que se extiende un cebador usando el ácido nucleico diana como molde incorporarán un nucleótido marcado que puede detectarse. Opcionalmente, los nucleótidos marcados pueden incluir adicionalmente una propiedad de terminación reversible que termina la extensión de cebador adicional una vez se ha añadido un nucleótido a un cebador. Por ejemplo, puede añadirse un análogo de nucleótido que tiene un resto terminador reversible a un cebador de tal modo que la posterior extensión no pueda ocurrir hasta suministrar un agente desbloqueante para retirar el resto. Por tanto, para realizaciones que usan terminación reversible, puede suministrarse un agente de desbloqueo a la celda de flujo (antes o después de ocurrir la detección). Pueden llevarse a cabo lavados entre las diversas etapas de suministro. El ciclo puede repetirse n veces para extender el cebador en n nucleótidos, detectando así una secuencia de longitud n. Se describen procedimientos de SBS ejemplares, sistemas de fluidos y plataformas de detección que pueden adaptarse fácilmente para uso con una matriz producida por los métodos de la presente divulgación, por ejemplo, en Bentley et al., *Nature* 456: 53-59 (2008), los documentos WO 04/018497; WO 91/06678; WO 07/123744; patentes de EE. UU. n.º 7.057.026, 7.329.492, 7.211.414, 7.315.019 o 7.405.281 y la pub. de sol. de pat. de EE. UU. n.º 2008/0108082 A1.

Pueden usarse otros procedimientos de secuenciación que usan reacciones cíclicas, tales como pirosecuenciación. La pirosecuenciación detecta la liberación de pirofosfato inorgánico (PPi) a medida que se incorporan nucleótidos particulares a una hebra de ácido nucleico naciente (Ronaghi, et al., *Analytical Biochemistry* 242 (1), 84-9 (1996); Ronaghi, *Genome Res.* 11(1), 3-11 (2001); Ronaghi et al. *Science* 281 (5375), 363 (1998); patentes de EE. UU. n.º 6.210.891, 6.258.568 y 6.274.320). En pirosecuenciación, puede detectarse el PPi liberado al convertirse en trifosfato de adenosina (ATP) por ATP sulfurilasa, y el ATP resultante puede detectarse por fotones producidos por luciferasa. Por tanto, la reacción de secuenciación puede monitorizarse mediante un sistema de detección de luminiscencia. Las fuentes de radiación de excitación usadas para sistemas basados en fluorescencia no son necesarias para los procedimientos de pirosecuenciación. Se describen sistemas de fluidos, detectores y procedimientos útiles que pueden usarse para aplicación de pirosecuenciación a matrices de la presente divulgación, por ejemplo, en la sol. de pat. WIPO n.º de serie PCT/US11/57111, pub. de sol. de pat. de EE. UU. n.º 2005/0191698 A1, patente de EE.UU. n.º 7.595.883 y patente de EE. UU. n.º 7.244.559.

Algunas realizaciones pueden utilizar métodos que implican la monitorización instantánea de la actividad ADN polimerasa. Por ejemplo, pueden detectarse incorporaciones de nucleótidos mediante interacciones de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) entre una polimerasa portadora de fluoróforo y nucleótidos marcados con γ -fosfato, o con guías de onda de modo cero. Se describen técnicas y reactivos para secuenciación basada en FRET, por ejemplo, en Levene et al. *Science* 299, 682-686 (2003); Lundquist et al. *Opt. Lett.* 33, 1026-1028 (2008) y Korch et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 1176-1181 (2008).

Algunas realizaciones de SBS incluyen la detección de un protón liberado tras la incorporación de un nucleótido a un producto de extensión. Por ejemplo, la secuenciación basada en la detección de protones liberados puede usar un detector eléctrico y técnicas asociadas que están comercialmente disponibles en Ion Torrent (Guilford, CT, una filial de Life Technologies) o métodos y sistemas de secuenciación descritos en las pub. de sol. de pat. de EE. UU. n.º 2009/0026082 A1, 2009/0127589 A1, 2010/0137143 A1 o 2010/0282617 A1.

Por consiguiente, se presentan en la presente memoria métodos para incorporar análogos de nucleótidos a ADN que comprenden permitir interaccionar los siguientes componentes: (i) una polimerasa alterada según cualquiera de las realizaciones anteriores; (ii) un molde de ADN y (iii) una solución de nucleótidos. En ciertas realizaciones, el molde de ADN comprende una matriz agrupada. En ciertas realizaciones, los nucleótidos se modifican en el hidroxilo de azúcar 3' e incluyen modificaciones en el hidroxilo de azúcar 3' de tal modo que el sustituyente sea de mayor tamaño que el grupo hidroxilo 3' de origen natural.

Comparación, identidad y homología de secuencia

Los términos "idéntico" o "porcentaje de identidad", en el contexto de dos o más secuencias de ácido nucleico o polipéptido, hacen referencia a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de residuos aminoacídicos o nucleótidos que son iguales, cuando se comparan y alinean para correspondencia máxima, medida usando uno de los algoritmos de comparación de secuencia descritos a continuación (u otros algoritmos disponibles para especialistas en la materia) o por inspección visual.

La frase "sustancialmente idéntico", en el contexto de dos ácidos nucleicos o polipéptidos (p. ej., ADN que codifican una polimerasa, o la secuencia aminoacídica de una polimerasa) hace referencia a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen al menos aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 90-95 %, aproximadamente un 98 %, aproximadamente un 99 % o más identidad de residuos nucleotídicos o aminoacídicos, cuando se comparan y alinean para correspondencia máxima, medida usando un algoritmo de comparación de secuencias o por inspección visual. Tales secuencias "sustancialmente idénticas" se considera típicamente que son "homólogas", sin referencia a un ancestro real. Preferiblemente, la "identidad sustancial" existe en una región de la secuencia que es de al menos 50 residuos de longitud, más preferiblemente en una región de al menos aproximadamente 100 residuos, y lo más preferiblemente las secuencias son sustancialmente idénticas en al menos aproximadamente 150 residuos, o en toda la longitud de las dos secuencias para comparar.

Las proteínas y/o secuencias de proteína son "homólogas" cuando derivan, natural o artificialmente, de una proteína o secuencia de proteína ancestral común. De forma similar, los ácidos nucleicos y/o secuencias de ácidos nucleicos son homólogos cuando derivan, natural o artificialmente, de un ácido nucleico o secuencia de ácido nucleico ancestral común. La homología se infiere generalmente de la similitud de secuencia entre dos o más ácidos nucleicos o proteínas (o secuencias de los mismos). El porcentaje preciso de similitud entre secuencias que es útil para establecer homología varía con el ácido nucleico y la proteína en cuestión, pero se usa rutinariamente tan poco como un 25 % de similitud de secuencia en 50, 100, 150 o más residuos para establecer la homología. Pueden usarse también niveles mayores de similitud de secuencia, p. ej. 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 % o más, para establecer la homología. Se describen en la presente memoria métodos para determinar los porcentajes de similitud de secuencia (p. ej., BLASTP y BLASTN usando parámetros por defecto) y están generalmente disponibles.

Para comparación de secuencia y determinación de homología, típicamente una secuencia actúa como secuencia de referencia con la que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencia, se meten las secuencias de prueba y referencia en un ordenador, se diseñan las coordenadas de subsecuencia, si es necesario, y se diseñan los parámetros del programa de algoritmo de secuencia. El algoritmo de comparación de secuencia calcula entonces la identidad de secuencia porcentual para la secuencia o secuencias de prueba respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros de programa diseñados.

Puede realizarse un alineamiento óptimo de secuencias para comparación, p. ej., por el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981), por el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970), por el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988), por implementaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), o por inspección visual (véase en general Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., eds., Current Protocols, una empresa conjunta entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., suplementado en 2004).

Es un ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar la identidad de secuencia porcentual y similitud de secuencia el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990). El software para efectuar análisis BLAST está públicamente disponible en el National Center for Biotechnology Information. Este algoritmo implica identificar en primer lugar los pares de secuencia de alta puntuación (HSP), identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta que coinciden con o satisfacen alguna puntuación T de umbral evaluado positivo cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. Se hace referencia a T como el umbral de puntuación de palabra vecina (Altschul et al., supra). Estos aciertos de palabra vecina iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP más largos que los contengan. Los aciertos de palabra se extienden entonces en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia a condición de que la puntuación de alineamiento acumulado pueda aumentar. Se calculan las puntuaciones acumuladas usando, para secuencias nucleotídicas, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de residuos coincidentes; siempre >0) y N (puntuación de penalización para residuos no coincidentes; siempre <0). Para secuencias aminoacídicas, se usa una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulada. La extensión de los aciertos de palabra en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineamiento acumulada cae una cantidad X desde su valor máximo conseguido; la puntuación acumulada llega a cero o menos, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de

residuos de puntuación negativa, o se alcanza el final de cualquier secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento. El programa BLASTN (para secuencias nucleotídicas) usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, un corte de 100, M= 5, N= -4, y una comparación de ambas hebras. Para secuencias aminoacídicas, el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10 y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915).

Además de calcular la identidad de secuencia porcentual, el algoritmo BLAST efectúa también un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, p. ej., Karlin y Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90: 5873-5787 (1993)). Es una medida de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST la probabilidad de suma mínima (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad de que ocurra por casualidad una coincidencia entre dos secuencias nucleotídicas o aminoacídicas. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma mínima en una comparación del ácido nucleico de prueba con al ácido nucleico de referencia es menor de aproximadamente 0,1, más preferiblemente menor de aproximadamente 0,01 y lo más preferiblemente menor de aproximadamente 0,001.

Ácidos nucleicos que codifican polimerasas alteradas

Se presentan adicionalmente en la presente memoria moléculas de ácido nucleico que codifican las enzimas polimerasas alteradas presentadas en la presente memoria. Para cualquier polimerasa alterada dada que sea una versión mutante de una polimerasa para la que sea conocida la secuencia aminoacídica, y preferiblemente también la secuencia nucleotídica de tipo silvestre que codifica la polimerasa, es posible obtener una secuencia nucleotídica que codifica el mutante según los principios básicos de biología molecular. Por ejemplo, dado que la secuencia nucleotídica de tipo silvestre que codifica la polimerasa 9°N es conocida, es posible deducir una secuencia nucleotídica que codifica cualquier versión mutante dada de 9°N que tenga una o más sustituciones aminoacídicas usando el código genético estándar. De forma similar, las secuencias nucleotídicas pueden derivarse fácilmente de versiones mutantes de otras polimerasas tales como, por ejemplo, Vent™, Pfu, Tsp JDF-3, Taq, etc. Pueden construirse entonces moléculas de ácido nucleico que tienen la secuencia nucleotídica requerida usando técnicas de biología molecular estándares conocidas en la materia.

De acuerdo con las realizaciones presentadas en la presente memoria, un ácido nucleico definido incluye no solo el ácido nucleico idéntico, sino también cualquier variación de bases menor incluyendo, en particular, sustituciones en casos que den como resultado un codón sinónimo (un codón diferente que especifica el mismo residuo aminoacídico) debido al código degenerado en sustituciones aminoacídicas conservativas. La expresión "secuencia de ácido nucleico" incluye también la secuencia complementaria de cualquier secuencia monocatenaria dada respecto a las variaciones de bases.

Las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente memoria pueden incluirse también, ventajosamente, en un vector de expresión adecuado para expresar las proteínas polimerasas codificadas a partir de las mismas en un hospedador adecuado. La incorporación de ADN clonado a un vector de expresión adecuado para transformación posterior de dicha célula y selección posterior de las células transformadas es bien conocida por los especialistas en la materia 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 según las realizaciones presentadas en la presente memoria ligado operativamente con secuencias reguladoras, tales como regiones promotoras, que son capaces de efectuar la expresión de dichos fragmentos de ADN. La expresión "ligado operativamente" hace referencia a una yuxtaposición en la que los componentes descritos están en una relación que los permite funcionar de la manera pretendida. Tales vectores pueden transformarse en una célula hospedadora adecuada para proporcionar la expresión de una proteína según las realizaciones presentadas en la presente memoria.

La molécula de ácido nucleico puede codificar una proteína madura o una proteína que tiene una prosequencia, incluyendo codificar una secuencia líder en la preproteína que se escinde entonces por la célula hospedadora formando una proteína madura. Los vectores, por ejemplo, pueden ser vectores de plásmido, virus o fago proporcionados 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 tales como, por ejemplo, un gen de resistencia a antibióticos.

Los elementos reguladores requeridos para expresión incluyen secuencias promotoras para unirse a ARN polimerasa y dirigir un nivel apropiado de iniciación de la transcripción y también secuencias de iniciación de la traducción para unión a ribosoma. Por ejemplo, un vector de expresión bacteriano puede incluir un promotor tal como el promotor lac y, para iniciación de la traducción, la secuencia de Shine-Dalgarno y el codón de inicio AUG. De forma similar, un vector de expresión eucariótico puede incluir un promotor heterólogo u homólogo para ARN polimerasa II, una señal de poliadenilación en 5', el codón de inicio AUG y un codón de terminación para el desprendimiento del ribosoma. Tales vectores pueden obtenerse comercialmente o ensamblarse a partir de las secuencias descritas mediante métodos bien conocidos en la materia.

La transcripción de ADN que codifica la polimerasa por eucariotas superiores puede optimizarse incluyendo una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son elementos de ADN de acción en cis que actúan sobre un promotor aumentando el nivel de transcripción. Los vectores incluirán también generalmente orígenes de replicación además de los marcadores seleccionables.

5 Ejemplo 1

Métodos y condiciones de ensayo generales

Los siguientes párrafos describen las condiciones de ensayo generales usadas en los ejemplos presentados a continuación.

1. Clonación y expresión de polimerasas

10 Esta sección describe el enfoque usado para la clonación y expresión de los diversos mutantes de polimerasa usados en los Ejemplos siguientes.

Se efectuó la mutagénesis en el gen que codifica la secuencia génica de esqueleto de la polimerasa usando metodología de mutagénesis dirigida a sitio estándar. Para cada mutación realizada, se confirmó la secuencia apropiada de los genes mutados por secuenciación de la secuencia del gen clonado.

15 Se subclonaron los genes de polimerasa en un vector pET11a y se transformaron en células de expresión BL21 Star (DE3) de Invitrogen. Se cultivaron las células transformadas a 37 °C en matraces Fernback de 2,8 l hasta alcanzar una DO600 de 0,8. Se indujo entonces la expresión de proteína mediante la adición de IPTG 1 mM, seguido de 3 horas de crecimiento adicional. Se centrifugaron entonces los cultivos a 7000 rpm durante 20 minutos. Se almacenaron los sedimentos celulares a -20 °C hasta purificación.

20 Se efectuó la lisis de células bacterianas resuspendiendo 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 inhibidor de proteasa libre de EDTA (Roche) al sedimento celular resuspendido. Se efectuaron todas las etapas de lisis y purificación a 4 °C. Se pasó el cultivo resuspendido a través de un microfluidizador 4 veces para completar la lisis celular. Se centrifugó entonces el lisado a 20.000 rpm durante 20 minutos para retirar los desechos celulares. Se añadió polietilenimina (concentración final 0,5 %) al sobrenadante lentamente con agitación durante 45 minutos para precipitar ácido nucleico bacteriano. Se centrifugó el lisado a 20.000 rpm durante 20 minutos y se desechó el sedimento. Se precipitó entonces el lisado con sulfato de amonio usando dos volúmenes de (NH₄)₂SO₄ saturado frío en H₂O de estéril. Se centrifugó la proteína precipitada a 20.000 rpm durante 20 minutos. Se resuspendieron los sedimentos de proteína en 250 ml de tampón A (Tris 50 mM pH 7,5, KCl 50 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 1 mM). Se purificó entonces el lisado resuspendido usando una columna SP FastFlow (GE) de 5 ml preequilibrada en tampón A. Se eluyó la columna usando un gradiente de 50 ml de KCl 0,1 a 1 M. Se combinaron las fracciones de pico y se diluyeron con tampón C (Tris pH 7,5, EDTA 0,1 mM, DTT 1 mM) hasta que la conductividad era igual a la del tampón D (Tris pH 7,5, KCl 50 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 1 mM). Se cargaron entonces las fracciones combinadas en una columna HiTrap Heparin Fastflow de 5 ml. Se eluyó entonces la polimerasa usando un gradiente de 100 ml de KCl 50 mM a 1 M. Se combinaron las fracciones de pico, se dializaron en tampón de almacenamiento (Tris 20 mM pH 7,5, KCl 300 mM, EDTA 0,1 mM, 50 % de glicerol) y se congelaron a -80 °C.

2. Análisis de retraso de fase/adelantamiento de fase

Esta sección describe el enfoque usado para analizar el rendimiento de los mutantes de polimerasa usados en los Ejemplos siguientes en un ensayo de secuenciación por síntesis.

40 Se usan experimentos de secuenciación para generar valores de retraso de fase y adelantamiento de fase. Se llevan a cabo los experimentos en un sistema MiSeq (Illumina, Inc., San Diego, CA), según las instrucciones del fabricante. Por ejemplo, para cada polimerasa, se generó una mezcla de incorporación (IMX) separada y se efectuó una tanda de 150 ciclos usando un carril de celda de flujo diferente para cada IMX. Se usaron formulaciones de reactivo V3 MiSeq estándar, con la polimerasa estándar sustituida por la polimerasa que se está ensayando, a una concentración de 30 µg/ml. El tiempo estándar para incubación de IMX en la celda de flujo se acortó a 6 segundos. Se elaboró la colección de ADN usada siguiendo el protocolo Nextera™ estándar (Illumina, Inc.) usando ADN genómico de *E. coli*. Se usó el software Illumina RTA para evaluar los niveles de retraso de fase y adelantamiento de fase.

Ejemplo 2

Identificación y cribado de mutantes de polimerasa 9°N para retraso de fase/adelantamiento de fase

50 Se efectúa un cribado de mutagénesis por saturación de residuos en el bolsillo bloqueado 3'. Se generan mutaciones en la secuencia de esqueleto de polimerasa 9°N modificada (SEQ ID NO: 31), se clonan, se expresan y se purifican como se describe en general en el Ejemplo 1.

Se criba en las polimerasas mutantes purificadas la actividad de retraso de fase/adelantamiento de fase como se describe anteriormente en el Ejemplo 1. Se compara la actividad de retraso de fase y adelantamiento de fase de los mutantes ensayados con la polimerasa de control que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 31.

Se resumen los resultados del análisis en la tabla siguiente. Como se muestra en la tabla, cada uno de los mutantes anteriores muestra mejoras inesperadas y significativas en uno o más del retraso de fase y adelantamiento de fase cuando se comparan con las polimerasas de control.

Mutante	SEQ ID NO:	¿Reducción de retardo de fase en comparación con control?
Control	31	-
Mutante 1	33	Sí
Mutante 2	34	Sí
Mutante 3	35	Sí
Mutante 4	36	Sí
Mutante 5	37	Sí
Mutante 6	38	Sí
Mutante 7	39	Sí
Mutante 8	40	Sí

Ejemplo 3

5 Cribado de mutantes de polimerasa 9°N WT

Se generan mutaciones de una secuencia de esqueleto de polimerasa 9°N-7 (9°N) de tipo silvestre de *Thermococcus* sp. (SEQ ID NO: 10), se clonan y se expresan y purifican como se describe en general en el Ejemplo 1, produciendo enzimas polimerasas que tienen las secuencias aminoacídicas expuestas como SEQ ID NO: 11-12, como se describe en la tabla siguiente.

10 Se criba en las polimerasas mutantes purificadas la actividad de retraso de fase/adelantamiento de fase como se describe en general en el Ejemplo 1 y se compara con la polimerasa de control que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 10. Se muestra que aquellas polimerasas que tienen las siguientes mutaciones tienen actividad de retardo de fase y/o adelantamiento de fase mejorada en comparación con el control:

Mutante	SEQ ID NO:
T144A	11
T144G	11
T144L	11
G153D	11
K476W	11
L478S	11
L478R	11
L478T	11
T590I	11
T590G	11
A639V	11
A639F	11

D718N	11
T144A G153D K476W L478S T590I A639V D718N	11
T144A G153D T590I A639V D718N	11
K476W L478S T590I	11
K476W T590I	11
T144A L408A Y409A P410I	12
G153D L408A Y409A P410I	12
K476W L408A Y409A P410I	12
L478S L408A Y409A P410I	12
T590I L408A Y409A P410I	12
A639V L408A Y409A P410I	12
D718N L408A Y409A P410I	12
T144A G153D K476W L478S T590I A639V D718N L408A	12

Y409A P410I	
T144A G153D T590I A639V D718N L408A Y409A P410I	12
K476W L478S T590I L408A Y409A P410I	12
K476W T590I L408A Y409A P410I	12
T144A L408A Y409A P410I A485V	12
G153D L408A Y409A P410I A485V	12
K476W L408A Y409A P410I A485V	12
L478S L408A Y409A P410I A485V	12
T590I L408A Y409A P410I A485V	12
A639V L408A Y409A P410I A485V	12
D718N L408A Y409A	12

P410I A485V	
T144A G153D K476W L478S T590I A639V D718N L408A Y409A P410I A485V	12
T144A G153D T590I A639V D718N L408A Y409A P410I A485V	12
K476W L478S T590I L408A Y409A P410I A485V	12
K476W T590I L408A Y409A P410I A485V	12

Ejemplo 4

Cribado de mutantes de expolimerasa 9°N

5 Se generan mutaciones en la secuencia de esqueleto de expolimerasa 9°N (SEQ ID NO: 13), se clonan, se expresan y se purifican como se describe en general en el Ejemplo 1, produciendo enzimas polimerasas que tienen las secuencias aminoacídicas expuestas como SEQ ID NO: 14-15.

10 Se criba en las polimerasas mutantes purificadas la actividad de retraso de fase/adelantamiento de fase como se describe en general anteriormente en el Ejemplo 1 y se compara con la polimerasa de control que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 13. Se muestra que aquellas polimerasas que tienen las siguientes mutaciones tienen actividad de retraso de fase/adelantamiento de fase mejoradas en comparación con el control

Mutante	SEQ ID NO:
T144A	14
G153D	14
K476W	14
L478S	14
T590I	14
A639V	14
D718N	14
T144A G153D K476W L478S T590I A639V D718N	14
T144A G153D T590I A639V D718N	14
K476W L478S T590I	14
K476W T590I	14
T144A L408A Y409A P410I	15
G153D L408A Y409A P410I	15
K476W L408A Y409A P410I	15
L478S L408A Y409A P410I	15
T590I L408A Y409A P410I	15
A639V L408A Y409A P410I	15
D718N	15

L408A Y409A P410I	
T144A G153D K476W L478S T590I A639V D718N L408A Y409A P410I	15
T144A G153D T590I A639V D718N L408A Y409A P410I	15
K476W L478S T590I L408A Y409A P410I	15
K476W T590I L408A Y409A P410I	15
T144A L408A Y409A P410I A485V	15
G153D L408A Y409A P410I A485V	15
K476W L408A Y409A P410I A485V	15
L478S L408A Y409A P410I A485V	15
T590I L408A	15

Y409A P410I A485V	
A639V L408A Y409A P410I A485V	15
D718N L408A Y409A P410I A485V	15
T144A G153D K476W L478S T590I A639V D718N L408A Y409A P410I A485V	15
T144A G153D T590I A639V D718N L408A Y409A P410I A485V	15
K476W L478S T590I L408A Y409A P410I A485V	15
K476W T590I L408A Y409A P410I A485V	15

Ejemplo 5

Cribado de mutantes de polimerasa 9°N alterada

Se generan mutaciones en la secuencia de esqueleto de expolimerasa 9°N alterada (esqueleto seleccionado de las SEQ ID NO: 16, 27, 29 y 31), se clonan, se expresan y se purifican como se describe en general en el Ejemplo 1, produciendo enzimas polimerasas que tienen las secuencias aminoacídicas expuestas como SEQ ID NO: 17, 28, 30 y 32-40.

Se criba en las polimerasas mutantes purificadas la actividad de retraso de fase/adelantamiento de fase como se describe en general anteriormente en el Ejemplo 1 y se compara con la polimerasa de control que tiene la secuencia expuesta en las SEQ ID NO: 16, 27, 29 y 31. Se muestra que aquellas polimerasas que tienen las siguientes mutaciones tienen actividad de retraso de fase/adelantamiento de fase mejorada en comparación con el control:

Mutante	SEQ ID NO:
T144A	17, 28, 30, 32
G153D	17, 28, 30, 32
K476W	17, 28, 30, 32, 35
L478S	17, 28, 30, 32, 36
T590I	17, 28, 30, 32, 39
A639V	17, 28, 30, 32
D718N	17, 28, 30, 32
T144A G153D K476W L478S T590I A639V D718N	17, 28, 30, 32, 33, 34
T144A G153D T590I A639V D718N	17, 28, 30, 32
K476W L478S T590I	17, 28, 30, 32, 37
K476W T590I	17, 28, 30, 32, 38
K476W L478S	17, 28, 30, 32, 40

Ejemplo 6

Cribado de mutantes de exopolimerasa Pfu

Basándose en el análisis del alineamiento de secuencias con la secuencia de esqueleto de polimerasa 9°N (véase la Figura 1), se generan mutaciones específicas en la secuencia de esqueleto de exopolimerasa de *Pyrococcus furiosus* (Pfu) (SEQ ID NO: 18), se clonan, se expresan y se purifican como se describe en general en el Ejemplo 1, produciendo enzimas polimerasas que tienen las secuencias aminoacídicas expuestas como SEQ ID NO: 19-20.

Se criba en las polimerasas mutantes purificadas la actividad de retraso de fase/adelantamiento de fase como se describe en general anteriormente en el Ejemplo 1 y se compara con la polimerasa de control que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 18. Se muestra que aquellas polimerasas que tienen las siguientes mutaciones tienen actividad de retraso de fase/adelantamiento de fase mejoradas en comparación con el control:

Mutante	SEQ ID NO:
T144A	19
G153D	19
K477W	19
L479S	19
T591I	19
A640V	19
D719N	19
T144A G153D K477W L479S T591I A640V D719N	19
T144A G153D T591I A640V D719N	19
K477W L479S T591I	19
K477W T591I	19
T144A L409A Y410A P411I	20
G153D L409A Y410A	20

P411I	
K477W L409A Y410A P411I	20
L479S L409A Y410A P411I	20
T591I L409A Y410A P411I	20
A640V L409A Y410A P411I	20
D719N L409A Y410A P411I	20
T144A G153D K477W L479S T591I A640V D719N L409A Y410A P411I	20
T144A G153D T591I A640V D719N L409A Y410A P411I	20
K477W L479S T591I L409A Y410A P411I	20
K477W T591I L409A Y410A P411I	20

Ejemplo 7

Cribado de mutantes de exopolimerasa KOD1

Basándose en el análisis del alineamiento de secuencias con la secuencia de esqueleto de polimerasa 9°N (véase la Figura 1), se generan mutaciones específicas en la secuencia de esqueleto de exopolimerasa *Thermococcus kodakaraensis* (KOD1) (SEQ ID NO: 21), se clonan, se expresan y se purifican como se describe en general en el Ejemplo 1, produciendo enzimas polimerasa que tienen las secuencias aminoacídicas expuestas como SEQ ID NO: 22-23.

Se criba en las polimerasas mutantes purificadas la actividad de retraso de fase/adelantamiento de fase como se describe en general anteriormente en el Ejemplo 1 y se compara con la polimerasa de control que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 21. Se muestra que aquellas polimerasas que tienen las siguientes mutaciones tienen actividad de retraso de fase/adelantamiento de fase mejoradas en comparación con el control:

Mutante	SEQ ID NO:
T144A	22
G153D	22
K476W	22
L478S	22
T590I	22
A639V	22
D718N	22
T144A G153D K476W L478S T590I A639V D718N	22
T144A G153D T590I A639V D718N	22
K476W L478S T590I	22
K476W T590I	22
T144A L408A Y409A P410I	23
G153D L408A Y409A	23

P410I	
K476W L408A Y409A P410I	23
L478S L408A Y409A P410I	23
T590I L408A Y409A P410I	23
A639V L408A Y409A P410I	23
D718N L408A Y409A P410I	23
T144A G153D K476W L478S T590I A639V D718N L408A Y409A P410I	23
T144A G153D T590I A639V D718N L408A Y409A P410I	23
K476W L478S T590I L408A Y409A P410I	23
K476W T590I L408A Y409A P410I	23

Ejemplo 8

Cribado de mutantes de exopolimerasa MMS2

Basándose en el análisis del alineamiento de secuencias con la secuencia de esqueleto de polimerasa 9°N (véase la Figura 1), se identifican mutaciones específicas en la secuencia de esqueleto de exopolimerasa *Methanococcus maripalidus* (MMS2) (SEQ ID NO: 24) basándose en la homología en un alineamiento con polimerasa 9°N (véase la Figura 2). Se generan los mutantes, se clonan, se expresan y se purifican como se describe en general en el Ejemplo 1, produciendo enzimas polimerasa que tienen las secuencias aminoacídicas expuestas como SEQ ID NO: 25-26.

Se criba en las polimerasas mutantes purificadas la actividad de retraso de fase/adelantamiento de fase como se describe en general anteriormente en el Ejemplo 1 y se compara con la polimerasa de control que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 24. Se muestra que aquellas polimerasas que tienen las siguientes mutaciones tienen actividad de retraso de fase/adelantamiento de fase mejoradas en comparación con el control:

Mutante	SEQ ID NO:
V156A	25
K165D	25
Y492W	25
I494S	25
T609I	25
A658V	25
V156A G153D Y492W I494S T609I A658V	25
V156A G153D T609I A658V	25
Y492W I494S T609I	25
Y492W T609I	25
V156A L417A Y418A P419I	26
G153D	26

L417A Y418A P419I	26
Y492W L417A Y418A P419I	26
I494S L417A Y418A P419I	26
T609I L417A Y418A P419I	26
A658V L417A Y418A P419I	26
V156A G153D Y492W I494S T609I A658V L417A Y418A P419I	26
V156A G153D T609I A658V L417A Y418A P419I	26
Y492W I494S T609I L417A Y418A P419I	26
Y492W T609I L417A Y418A P419I	26

El término comprende pretende ser en la presente memoria de extremos abiertos, incluyendo no solo los elementos indicados, sino englobando adicionalmente cualquier elemento adicional.

Se han descrito una serie de realizaciones. No obstante, se entenderá que pueden realizarse diversas modificaciones. Por consiguiente, otras realizaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

5 **Listado de secuencias**

<110> Illumina, Inc.

<120> POLIMERASAS MODIFICADAS PARA LA INCORPORACIÓN MEJORADA DE ANÁLOGOS DE NUCLEÓTIDOS

<130> IP-1201-PRV

10 <160> 40

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Varios incluyendo Thermococcus sp. o Pyrococcus sp.

<220>

<221> Variante

20 <222> (2)..(2)

<223> X= cualquiera AA

<220>

<221> Variante

<222> (4)..(4)

25 <223> X= cualquiera AA

<220>

<221> Variante

<222> (5)..(5)

<223> X= cualquiera AA

30 <400> 1

Phe Xaa Ile Xaa Xaa Leu Tyr His Glu Gly

1

5

10

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

35 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Varios incluyendo Thermococcus sp. o Pyrococcus sp.

<220>

<221> Variante

40 <222> (7)..(7)

<223> X = cualquiera AA

<220>

<221> Variante

<222> (8)..(8)

45 <223> X = cualquiera AA

<400> 2

His Glu Gly Glu Glu Phe Xaa Xaa Gly Pro Ile

1

5

10

<210> 3

<211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Varios incluyendo Thermococcus sp. o Pyrococcus sp.

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2)..(2)
 <223> X= cualquiera AA

10 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (3)..(3)
 <223> X= cualquiera AA

15 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)..(4)
 <223> X= cualquiera AA

20 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (8)..(8)
 <223> X= cualquiera AA

25 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (10)..(10)
 <223> X= cualquiera AA

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (11)..(11)
 <223> X= cualquiera AA

30 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (12)..(12)
 <223> X= cualquiera AA

35 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (14)..(14)
 <223> X= cualquiera AA

<400> 3
 Glu Xaa Xaa Xaa Leu Asp Tyr Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Lys Xaa Leu Ala
 1 5 10 15

Asn Ser

40 <210> 4
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Varios incluyendo Thermococcus sp. o Pyrococcus sp.

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2)..(2)
 <223> X=K, R, Y

50 <220>
 <221> VARIANTE

<222> (3)..(3)
 <223> X=K, I, Q

 <220>
 <221> VARIANTE
 5 <222> (4)..(4)
 <223> X=L, I, M

 <220>
 <221> VARIANTE
 10 <222> (8)..(8)
 <223> X=R, E

 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (10)..(10)
 <223> X=R, K, I
 15
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (11)..(11)
 <223> X=A, K, L, V, S

 <220>
 20 <221> VARIANTE
 <222> (12)..(12)
 <223> X=I, V, L, N

 <220>
 <221> VARIANTE
 25 <222> (14)..(14)
 <223> X=I, V, L

 <400> 4
 Glu Xaa Xaa Leu Asp Tyr Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Lys Xaa Leu Ala
 1 5 10 15

 Asn Ser
 <210> 5
 30 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Varios incluyendo Thermococcus sp. o Pyrococcus sp.
 35
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2)..(2)
 <223> X=R, K

 <220>
 40 <221> VARIANTE
 <222> (3)..(3)
 <223> X=K, I

 <220>
 <221> VARIANTE
 45 <222> (10)..(10)
 <223> X=R, K

 <220>
 <221> VARIANTE
 50 <222> (14)..(14)
 <223> X=I, L

 <400> 5

Glu Xaa Xaa Leu Leu Asp Tyr Arg Gln Xaa Ala Ile Lys Xaa Leu Ala
1 5 10 15

Asn Ser

<210> 6

<211> 18

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Varios incluyendo Thermococcus sp. o Pyrococcus sp.

<400> 6

Glu Lys Lys Leu Leu Asp Tyr Arg Gln Arg Ala Ile Lys Ile Leu Ala
1 5 10 15

Asn Ser

10 <210> 7

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Varios incluyendo Thermococcus sp. o Pyrococcus sp.

<400> 7

Arg Gly Phe Phe Val Thr Lys Lys Lys Tyr Ala Val Ile Asp
1 5 10

<210> 8

<211> 13

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Varios incluyendo Thermococcus sp. o Pyrococcus sp.

<220>

25 <221> Variante

<222> (5)..(5)

<223> X = cualquiera AA

<400> 8

Gly Asp Val Glu Xaa Ala Val Arg Ile Val Lys Glu Val
1 5 10

30 <210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Varios incluyendo Thermococcus sp. o Pyrococcus sp.

<220>

<221> Variante

<222> (1)..(1)

<223> X = cualquiera AA

40 <220>

<221> Variante

<222> (5)..(5)

<223> X = cualquiera AA

<220>

45 <221> Variante

<222> (6).. (6)
 <223> X = cualquiera AA

 <220>
 <221> Variante
 5 <222> (7)..(7)
 <223> X = cualquiera AA

 <220>
 <221> Variante
 10 <222> (9).. (9)
 <223> X = cualquiera AA

 <400> 9
 Xaa Arg Ala Ile Xaa Xaa Xaa Glu Xaa Asp Pro
 1 5 10

 <210> 10
 <211> 775
 15 <212> PRT
 <213> Thermococcus sp. 9N-7

 <400> 10

ES 2 747 227 T3

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	

ES 2 747 227 T3

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

ES 2 747 227 T3

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

ES 2 747 227 T3

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

5 <213> Thermococcus sp. 9N-7

<220>

<221> Variante

<222> (144)..(144)

<223> X=T, A, G, L

10 <220>

<221> Variante

<222> (153)..(153)

<223> X= G, D

15 <220>

<221> Variante

<222> (476)..(476)

<223> X= K, W

20 <220>

<221> Variante

<222> (478)..(478)

<223> X= L, S, R, T

25 <220>

<221> Variante

<222> (590)..(590)

<223> X= T, I, G

30 <220>

<221> Variante

<222> (639)..(639)

<223> X= A, V, F

35 <220>

<221> Variante

<222> (718)..(718)

<223> X= D, N

<400> 11

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

ES 2 747 227 T3

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 Xaa
 130 135 140
 Leu Tyr His Glu Gly Glu Glu Phe Xaa 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

ES 2 747 227 T3

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 Xaa Lys Xaa 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

ES 2 747 227 T3

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 Xaa 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 Xaa 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 Xaa 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. 9N-7

<220>
<221> Variante
<222> (144)..(144)

	<223> X= T, A
	<220>
	<221> Variante
5	<222> (153)..(153)
	<223> X= G, D
	<220>
	<221> Variante
	<222> (408)..(408)
	<223> X= L, A
10	<220>
	<221> Variante
	<222> (409)..(409)
	<223> X= Y, A
15	<220>
	<221> Variante
	<222> (410)..(410)
	<223> X= P, V, A, I
20	<220>
	<221> Variante
	<222> (476)..(476)
	<223> X= K, W
25	<220>
	<221> Variante
	<222> (478)..(478)
	<223> X= L, S
30	<220>
	<221> Variante
	<222> (590)..(590)
	<223> X= T, I
35	<220>
	<221> Variante
	<222> (639)..(639)
	<223> X= A, V, F
40	<220>
	<221> Variante
	<222> (718)..(718)
	<223> X= D, N
	<400> 12

ES 2 747 227 T3

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	Xaa	130	135	140	
Leu	Tyr	His	Glu	Gly	Glu	Glu	Phe	Xaa	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

ES 2 747 227 T3

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 Xaa Xaa 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 Xaa Lys Xaa 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

ES 2 747 227 T3

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 Xaa 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 Xaa 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 Xaa 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. 9N-7

ES 2 747 227 T3

<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

ES 2 747 227 T3

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

ES 2 747 227 T3

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

ES 2 747 227 T3

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

5 <213> Thermococcus sp. 9N-7

<220>

<221> Variante

<222> (144)..(144)

<223> X= T, A

10 <220>

<221> Variante

<222> (153)..(153)

<223> X= G, D

15 <220>

<221> Variante

<222> (476)..(476)

<223> X= K, W

20 <220>

<221> Variante

<222> (478)..(478)

<223> X= L, S

25 <220>

<221> Variante

<222> (590)..(590)

<223> X= T, I

30 <220>

<221> Variante

<222> (639)..(639)

<223> X= A, V, F

<220>

<221> Variante

<222> (718)..(718)

<223> X= D, N

<400> 14

ES 2 747 227 T3

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	Xaa	130	135	140	
Leu	Tyr	His	Glu	Gly	Glu	Glu	Phe	Xaa	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

ES 2 747 227 T3

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 Xaa Lys Xaa 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

ES 2 747 227 T3

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	Xaa	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	Xaa	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	Xaa	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. 9N-7
5	<220> <221> Variante <222> (144)..(144) <223> X= T, A
10	<220> <221> Variante <222> (153)..(153) <223> X= G, D
15	<220> <221> Variante <222> (408)..(408) <223> X= L, A
20	<220> <221> Variante <222> (409)..(409) <223> X= Y, A
25	<220> <221> Variante <222> (410)..(410) <223> X= P, V, A, I
30	<220> <221> Variante <222> (476)..(476) <223> X= K, W
35	<220> <221> Variante <222> (478)..(478) <223> X= L, S
40	<220> <221> Variante <222> (485)..(485) <223> X= A, L, V
45	<220> <221> Variante <222> (590)..(590) <223> X= T, I
	<220> <221> Variante <222> (639)..(639) <223> X= A, V, F
	<220> <221> Variante <222> (718)..(718) <223> X= D, N
	<400> 15

ES 2 747 227 T3

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	Xaa	130	135	140	
Leu	Tyr	His	Glu	Gly	Glu	Glu	Phe	Xaa	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	

ES 2 747 227 T3

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 Xaa Xaa 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

ES 2 747 227 T3

Arg Lys Met Lys Ala Thr Val Asp Pro Leu Glu Xaa Lys Xaa 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 Xaa 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 Xaa 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 Xaa Glu Phe
 705 710 715 720

ES 2 747 227 T3

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. 9N-7

<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

ES 2 747 227 T3

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

ES 2 747 227 T3

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							

ES 2 747 227 T3

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> Thermococcus sp. 9N-7

<220>
<221> Variante
<222> (144)..(144)
<223> X= T, A

<220>
<221> Variante
<222> (153)..(153)
<223> X= G, D

<220>
<221> Variante
<222> (476)..(476)
<223> X= K, W

<220>
<221> Variante
<222> (478)..(478)
<223> X= L, S

<220>
<221> Variante
<222> (590)..(590)
<223> X= T, I

<220>
<221> Variante
<222> (639)..(639)
<223> X= A, V, F

<220>
<221> Variante
<222> (718)..(718)
<223> X= D, N

ES 2 747 227 T3

<400> 17

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 Xaa
130 135 140

Leu Tyr His Glu Gly Glu Glu Phe Xaa 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

ES 2 747 227 T3

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

ES 2 747 227 T3

Arg Lys Met Lys Ala Thr Val Asp Pro Leu Glu Xaa Lys Xaa 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 Xaa 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 Xaa 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 Xaa Glu Phe

ES 2 747 227 T3

705											710											715											720
Asp	Pro	Thr	Lys	His	Arg	Tyr	Asp	Ala	Glu	Tyr	Tyr	Ile	Glu	Asn	Gln																		
				725											730																		
Val	Leu	Pro	Ala	Val	Glu	Arg	Ile	Leu	Lys	Ala	Phe	Gly	Tyr	Arg	Lys																		
				740											745																		
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> 18																																	
<211> 775																																	
<212> PRT																																	
<213> Pyrococcus furiosus																																	
<400> 18																																	
Met	Ile	Leu	Asp	Val	Asp	Tyr	Ile	Thr	Glu	Glu	Gly	Lys	Pro	Val	Ile																		
1					5											10																	
Arg	Leu	Phe	Lys	Lys	Glu	Asn	Gly	Lys	Phe	Lys	Ile	Glu	His	Asp	Arg																		
				20											25																		
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																		
Ile	Val	Asp	Val	Glu	Lys	Val	Glu	Lys	Lys	Phe	Leu	Gly	Lys	Pro	Ile																		
65					70											75																	
Thr	Val	Trp	Lys	Leu	Tyr	Leu	Glu	His	Pro	Gln	Asp	Val	Pro	Thr	Ile																		
				85											90																		
Arg	Glu	Lys	Val	Arg	Glu	His	Pro	Ala	Val	Val	Asp	Ile	Phe	Glu	Tyr																		
				100											105																		
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																		

ES 2 747 227 T3

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

ES 2 747 227 T3

Ile Val Tyr Leu Asp Phe Arg Ala Leu Tyr Pro 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

ES 2 747 227 T3

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> (144)..(144)
<223> X= T, A

<220>
<221> Variante
<222> (153)..(153)
<223> X= G, D

<220>
<221> Variante
<222> (477)..(477)
<223> X= K, W

<220>
<221> Variante
<222> (479)..(479)
<223> X= L, S

<220>
<221> Variante
<222> (591)..(591)
<223> X= T, I

<220>
<221> Variante
<222> (640)..(640)
<223> X= A, V, F

<220>
<221> Variante
<222> (719)..(719)
<223> X= E, N

ES 2 747 227 T3

<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 Xaa
130 135 140

Leu Tyr His Glu Gly Glu Glu Phe Xaa 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

ES 2 747 227 T3

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 Leu Tyr Pro 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

ES 2 747 227 T3

450		455		460
Lys Thr Lys Met Lys Glu Thr Gln Asp Pro Ile Glu Xaa Ile Xaa Leu				
465		470		475
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
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 Xaa 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 Xaa				
	625		630	635
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

ES 2 747 227 T3

Leu Arg Gly Asp Gly Pro Ile Ser Asn Arg Ala Ile Leu Ala Xaa 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

5 <213> Pyrococcus furiosus

<220>

<221> Variante

<222> (144)..(144)

<223> X= T, A

10

<220>

<221> Variante

<222> (153)..(153)

<223> X= G, D

15

<220>

<221> Variante

<222> (409)..(409)

<223> X= L, A

20

<220>

<221> Variante

<222> (410)..(410)

<223> X= Y, A

25

<220>

<221> Variante

<222> (411)..(411)

<223> X= P, V, A, I

30

<220>

<221> Variante

<222> (477)..(477)

<223> X= K, W

35

<220>

<221> Variante

<222> (591)..(591)

<223> X= T, I

40

<220>

<221> Variante

<222> (640)..(640)

<223> X= A, V, F

ES 2 747 227 T3

<220>
 <221> Variante
 <222> (719)..(719)
 <223> X= E, N

5

<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 Xaa
 130 135 140
 Leu Tyr His Glu Gly Glu Glu Phe Xaa 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

ES 2 747 227 T3

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 Xaa Xaa Xaa 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

ES 2 747 227 T3

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 Xaa Ile Xaa 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 Xaa 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 Xaa
 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

ES 2 747 227 T3

Leu Arg Gly Asp Gly Pro Ile Ser Asn Arg Ala Ile Leu Ala Xaa 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

5 <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

ES 2 747 227 T3

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

ES 2 747 227 T3

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 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		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		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		640

ES 2 747 227 T3

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

5 <213> Thermococcus kodakaraensis

<220>

<221> Variante

<222> (144)..(144)

<223> X= T, A

10

<220>

<221> Variante

<222> (153)..(153)

<223> X= A, D

15

<220>

<221> Variante

<222> (476)..(476)

<223> X= R, W

20

<220>

<221> Variante

<222> (478)..(478)

<223> X= L, S

25

<220>

<221> Variante

<222> (590)..(590)

<223> X= T, I

<220>

<221> Variante

<222> (639)..(639)

<223> X= A, V, F

ES 2 747 227 T3

<220>
 <221> Variante
 <222> (718)..(718)
 <223> X= D, N

5

<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 Xaa
 130 135 140
 Leu Tyr His Glu Gly Glu Glu Phe Xaa 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

ES 2 747 227 T3

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

ES 2 747 227 T3

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 Xaa Lys Xaa 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 Xaa 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 Xaa 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

ES 2 747 227 T3

690

695

700

Lys Gly Ser Gly Arg Ile Gly Asp Arg Ala Ile Pro Phe Xaa 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

5 <213> Thermococcus kodakaraensis

<220>

<221> Variante

<222> (144)..(144)

<223> X= T, A

10

<220>

<221> Variante

<222> (153)..(153)

<223> X= A, D

15

<220>

<221> Variante

<222> (408)..(408)

<223> X= L, A

20

<220>

<221> Variante

<222> (409)..(409)

<223> X= Y, A

25

<220>

<221> Variante

<222> (410)..(410)

<223> X= P, V, A, I

<220>

<221> Variante

<222> (476)..(476)

<223> X= R, W

30

<220>

<221> Variante

<222> (478)..(478)

<223> X= L, S

35

<220>

<221> Variante

<222> (590)..(590)

<223> X= T, I

40

<220>

<221> Variante

<222> (639).. (639)

<223> X= A, V, F

<220>

<221> Variante

<222> (718)..(718)

<223> X= D, N

<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 Xaa
130 135 140

Leu Tyr His Glu Gly Glu Glu Phe Xaa 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

ES 2 747 227 T3

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 Xaa Xaa 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		

ES 2 747 227 T3

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	Xaa	Lys	Xaa	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	Xaa	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	Xaa	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			

ES 2 747 227 T3

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 Xaa 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> 784

<212> PRT

<213> Methanococcus maripaludis

<400> 24

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

ES 2 747 227 T3

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	

ES 2 747 227 T3

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
 Leu Tyr Pro 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

ES 2 747 227 T3

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> 25

<211> 784

<212> PRT

5 <213> Methanococcus maripaludis

<220>

<221> Variante

<222> (156)..(156)

<223> X= V, A

10

<220>

<221> Variante

<222> (165)..(165)

<223> X= K, D

15

<220>

<221> Variante

<222> (492)..(492)

<223> X= Y, W

20

<220>

<221> Variante

<222> (494)..(494)

<223> X= I, S

25

<220>

<221> Variante

<222> (609)..(609)

<223> X= T, I

<220>

<221> Variante

ES 2 747 227 T3

<222> (658)..(658)

<223> X= A, V, F

<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 Xaa Tyr Cys Asn Lys
145 150 155 160

Glu Pro Asn Pro Xaa 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

ES 2 747 227 T3

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	
Leu	Tyr	Pro	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			

ES 2 747 227 T3

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 Xaa Gln Xaa 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
 Xaa 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 Xaa 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

ES 2 747 227 T3

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

5 <213> Methanococcus maripaludis

<220>

<221> Variante

<222> (156)..(156)

<223> X= V, A

10 <220>

<221> Variante

<222> (165)..(165)

<223> X= K, D

15 <220>

<221> Variante

<222> (417)..(417)

<223> X= L, A

20 <220>

<221> Variante

<222> (418)..(418)

<223> X= Y, A

25 <220>

<221> Variante

<222> (419)..(419)

<223> X= P, V, A, I

30 <220>

<221> Variante

<222> (492)..(492)

<223> X= Y, W

35 <220>

<221> Variante

<222> (494)..(494)

<223> X= I, S

40 <220>

<221> Variante

<222> (609)..(609)

<223> X= T, I

40 <220>

<221> Variante

<222> (658)..(658)

<223> X= A, V, F

ES 2 747 227 T3

<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 Xaa Tyr Cys Asn Lys
145          150          155          160

Glu Pro Asn Pro Xaa 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

```

ES 2 747 227 T3

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
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
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
Pro	Leu	Lys	Gly	Ile	His	Glu	Asp	Ile	Val	Ser	Met	Asp	Phe	Leu	Ser	405	410	415
Xaa	Xaa	Xaa	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

ES 2 747 227 T3

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 Xaa Gln Xaa 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
 Xaa 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 Xaa 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

ES 2 747 227 T3

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> 775

<212> PRT

<213> Thermococcus sp. 9N-7

<400> 27

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

ES 2 747 227 T3

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

ES 2 747 227 T3

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	Ser	Ala	Trp	Gly	Arg	Glu	Tyr	Leu	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							

ES 2 747 227 T3

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> 28
<211> 775
<212> PRT
<213> Thermococcus sp. 9N-7

5

<220>
<221> Variante
<222> (144)..(144)
<223> X=T, A

10

<220>
<221> Variante
<222> (153)..(153)
<223> X= G, D

15

<220>
<221> Variante
<222> (476)..(476)
<223> X= K, W

20

<220>
<221> Variante
<222> (478)..(478)
<223> X= L, S

25

<220>
<221> Variante
<222> (590)..(590)
<223> X= T, I

30

<220>
<221> Variante
<222> (639).. (639)
<223> X= A, V, F

<220>
<221> Variante
<222> (718)..(718)
<223> X= D, N

ES 2 747 227 T3

<400> 28

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 Xaa
130 135 140

Leu Tyr His Glu Gly Glu Glu Phe Xaa 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

ES 2 747 227 T3

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

ES 2 747 227 T3

Arg Lys Met Lys Ala Thr Val Asp Pro Leu Glu Xaa Lys Xaa 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 Ser Ala Trp Gly Arg Glu Tyr Leu 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 Xaa 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 Xaa 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 Xaa Glu Phe

ES 2 747 227 T3

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> 29

<211> 775

<212> PRT

<213> Thermococcus sp. 9N-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

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

ES 2 747 227 T3

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

ES 2 747 227 T3

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 Ala Ala Trp Gly Arg Glu Tyr Leu 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

ES 2 747 227 T3

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. 9N-7

<220>
<221> Variante
<222> (144)..(144)
<223> X= T, A

<220>
<221> Variante
<222> (153)..(153)
<223> X= G, D

<220>
<221> Variante
<222> (476)..(476)
<223> X= K, W

<220>
<221> Variante
<222> (478)..(478)
<223> X= L, S

<220>
<221> Variante
<222> (590)..(590)
<223> X= T, I

<220>
<221> Variante
<222> (639)..(639)
<223> X= A, V, F

<220>
<221> Variante
<222> (718)..(718)
<223> X= D, N

ES 2 747 227 T3

<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 Xaa
130 135 140

Leu Tyr His Glu Gly Glu Glu Phe Xaa 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

ES 2 747 227 T3

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

ES 2 747 227 T3

450		455		460
Arg Lys Met Lys Ala Thr Val Asp Pro Leu Glu Xaa Lys Xaa Leu Asp				
465		470		475
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 Ala Ala Trp Gly Arg Glu Tyr Leu 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
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 Xaa 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 Xaa Val				
	625		630	635
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

ES 2 747 227 T3

Lys Gly Ser Gly Arg Ile Gly Asp Arg Ala Ile Pro Ala Xaa 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

5 <213> Thermococcus sp. 9N-7

<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

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

ES 2 747 227 T3

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

ES 2 747 227 T3

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 Met 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 Ser Ala Trp Gly Arg Glu Tyr Leu 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

ES 2 747 227 T3

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. 9N-7

5

<220>
<221> Variante
<222> (144)..(144)
<223> X= T, A

10

<220>
<221> Variante
<222> (153)..(153)
<223> X= G, D

15

<220>
<221> Variante
<222> (476)..(476)
<223> X= K, W

20

<220>
<221> Variante
<222> (478)..(478)
<223> X= L, S

25

<220>
<221> Variante
<222> (590)..(590)
<223> X= T, I

30

<220>
<221> Variante
<222> (639)..(639)
<223> X= A, V, F

<220>
<221> Variante
<222> (718)..(718)
<223> X= D, N

ES 2 747 227 T3

<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

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

Leu Tyr His Glu Gly Glu Glu Phe Xaa 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

ES 2 747 227 T3

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			

ES 2 747 227 T3

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 Xaa Met Xaa 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 Ser Ala Trp Gly Arg Glu Tyr Leu 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 Xaa 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 Xaa 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

ES 2 747 227 T3

Lys Gly Ser Gly Arg Ile Gly Asp Arg Ala Ile Pro Ala Xaa 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

5 <213> Thermococcus sp. 9N-7

<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

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

ES 2 747 227 T3

Leu Tyr His Glu Gly Glu Glu Phe Asp 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

ES 2 747 227 T3

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 Ser Ala Trp Gly Arg Glu Tyr Leu 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 Ile 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 Val Val
625 630 635 640

Arg Ile Val Lys Glu Val Thr Glu Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Val Pro

ES 2 747 227 T3

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 Asn 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
 5 <213> Thermococcus sp. 9N-7
 <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

ES 2 747 227 T3

85								90				95			
Arg	Asp	Arg	Ile 100	Arg	Ala	His	Pro	Ala 105	Val	Val	Asp	Ile	Tyr 110	Glu	Tyr
Asp	Ile	Pro 115	Phe	Ala	Lys	Arg	Tyr 120	Leu	Ile	Asp	Lys	Gly 125	Leu	Ile	Pro
Ala	Glu	Gly 130	Asp	Glu	Glu	Leu 135	Thr	Met	Leu	Ala	Phe 140	Ala	Ile	Ala	Ala
Leu 145	Tyr	His	Glu	Gly	Glu 150	Glu	Phe	Asp	Thr	Gly 155	Pro	Ile	Leu	Met	Ile 160
Ser	Tyr	Ala	Asp	Gly 165	Ser	Glu	Ala	Arg	Val 170	Ile	Thr	Trp	Lys	Lys 175	Ile
Asp	Leu	Pro	Tyr 180	Val	Asp	Val	Val	Ser 185	Thr	Glu	Lys	Glu	Met 190	Ile	Lys
Arg	Phe	Leu 195	Arg	Val	Val	Arg	Glu 200	Lys	Asp	Pro	Asp	Val 205	Leu	Ile	Thr
Tyr	Asn 210	Gly	Asp	Asn	Phe	Asp 215	Phe	Ala	Tyr	Leu	Lys 220	Lys	Arg	Ser	Glu
Glu 225	Leu	Gly	Ile	Lys	Phe 230	Thr	Leu	Gly	Arg	Asp 235	Gly	Ser	Glu	Pro	Lys 240
Ile	Gln	Arg	Met	Gly 245	Asp	Arg	Phe	Ala	Val 250	Glu	Val	Lys	Gly	Arg 255	Ile
His	Phe	Asp	Leu 260	Tyr	Pro	Val	Ile	Arg 265	Arg	Thr	Ile	Asn	Leu 270	Pro	Thr
Tyr	Thr	Leu 275	Glu	Ala	Val	Tyr	Glu 280	Ala	Val	Phe	Gly	Lys 285	Pro	Lys	Glu
Lys	Val 290	Tyr	Ala	Glu	Glu	Ile 295	Ala	Gln	Ala	Trp	Glu 300	Ser	Gly	Glu	Gly
Leu 305	Glu	Arg	Val	Ala	Arg 310	Tyr	Ser	Met	Glu	Asp 315	Ala	Lys	Val	Thr	Tyr 320
Glu	Leu	Gly	Arg	Glu 325	Phe	Phe	Pro	Met	Glu 330	Ala	Gln	Leu	Ser	Arg 335	Leu

ES 2 747 227 T3

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 Met 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 Ser Ala Trp Gly Arg Glu Tyr Leu 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 Ile Lys Lys
 580 585 590

ES 2 747 227 T3

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 Val 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 Asn 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> 35

<211> 775

<212> PRT

5 <213> Thermococcus sp. 9N-7

<400> 35

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

ES 2 747 227 T3

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
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
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
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

ES 2 747 227 T3

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 Trp Met 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 Ser Ala Trp Gly Arg Glu Tyr Leu 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

ES 2 747 227 T3

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> 36
 <211> 775
 <212> PRT
 5 <213> Thermococcus sp. 9N-7
 <400> 36

ES 2 747 227 T3

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	

ES 2 747 227 T3

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 Met Ser Leu Asp
 465 470 475 480

ES 2 747 227 T3

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 Ser Ala Trp Gly Arg Glu Tyr Leu 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

ES 2 747 227 T3

<210> 37
 <211> 775
 <212> PRT
 <213> Thermococcus sp. 9N-7

5

<400> 37
 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

ES 2 747 227 T3

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

ES 2 747 227 T3

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 Trp Met Ser 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 Ser Ala Trp Gly Arg Glu Tyr Leu 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 Ile 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 Phe 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		

ES 2 747 227 T3

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> 38

<211> 775

<212> PRT

<213> Thermococcus sp. 9N-7

5

<400> 38

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

ES 2 747 227 T3

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
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
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
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

ES 2 747 227 T3

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 Trp Met 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 Ser Ala Trp Gly Arg Glu Tyr Leu 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 Ile 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

ES 2 747 227 T3

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> 39

<211> 775

<212> PRT

5 <213> Thermococcus sp. 9N-7

<400> 39

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

ES 2 747 227 T3

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	

ES 2 747 227 T3

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	Met	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	Ser	Ala	Trp	Gly	Arg	Glu	Tyr	Leu	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

ES 2 747 227 T3

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 Ile 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> 40

<211> 775

<212> PRT

<213> Thermococcus sp. 9N-7

<400> 40

ES 2 747 227 T3

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		

ES 2 747 227 T3

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 Trp Met Ser 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

ES 2 747 227 T3

Val Ser Ala Trp Gly Arg Glu Tyr Leu 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

ES 2 747 227 T3

755

760

765

Leu Lys Val Lys Gly Lys Lys
770 775

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una ADN polimerasa recombinante que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 80 % idéntica a la SEQ ID NO: 10, cuya ADN polimerasa recombinante comprende al menos una mutación por sustitución aminoacídica en una o más posiciones posicionalmente equivalentes a Lys476 y Thr590, en la secuencia aminoacídica de ADN polimerasa 9°N, en la que la mutación en la posición posicionalmente equivalente a Lys476 comprende una mutación por un aminoácido hidrófobo.
2. La ADN polimerasa recombinante de la reivindicación 1, en la que dicha mutación por sustitución en la posición posicionalmente equivalente a Lys476 comprende una mutación por Trp.
- 10 3. La ADN polimerasa recombinante de la reivindicación 1, en la que dicha mutación por sustitución en la posición posicionalmente equivalente a Thr590 comprende una mutación por un aminoácido no polar.
4. La ADN polimerasa recombinante de la reivindicación 1, en la que dicha mutación por sustitución en la posición posicionalmente equivalente a Thr590 comprende una mutación por Ile.
- 15 5. La ADN polimerasa recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la polimerasa alterada comprende adicionalmente mutaciones por sustitución en las posiciones posicionalmente equivalentes a Leu408, Tyr409, Pro410 o una combinación de las mismas, en la secuencia aminoacídica de ADN polimerasa 9°N.
6. La ADN polimerasa recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la polimerasa alterada comprende mutaciones por sustitución en posiciones posicionalmente equivalentes a Asp141, Glu143 o una combinación de las mismas en la secuencia aminoacídica de ADN polimerasa 9°N.
- 20 7. La ADN polimerasa recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que la polimerasa alterada comprende adicionalmente mutaciones por sustitución en posiciones posicionalmente equivalentes a Ala485 en la secuencia aminoacídica de ADN polimerasa 9°N.
8. La ADN polimerasa recombinante de la reivindicación 1, en la que dicha mutación por sustitución comprende mutaciones en posiciones posicionalmente equivalentes a Lys 476 y Thr590 respecto a la SEQ ID NO: 10, y en la que la mutación en la posición posicionalmente equivalente a Lys476 comprende una mutación por Trp y la mutación en la posición posicionalmente equivalente a Thr590 comprende una mutación por Ile.
- 25 9. La ADN polimerasa recombinante de la reivindicación 1, en la que la secuencia aminoacídica es al menos un 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 10.
10. La ADN polimerasa recombinante de la reivindicación 1, en la que la secuencia aminoacídica es al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 10.
- 30 11. La ADN polimerasa recombinante de la reivindicación 1, en la que la secuencia aminoacídica es al menos un 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 10.

FIG. 1

Pol1957	210	220	230	240	250	260	
9oN	LITYNGDNEF	FAYLKKRS	EEELGKFT	LGRDGESE	PKIQRMGDRF	...AVVKGR	IHHFDLYPPVIRRTI
TGO	LITYNGDNEF	FAYLKKRS	EEELGKFT	LGRDGESE	PKIQRMGDRF	...AVVKGR	IHHFDLYPPVIRRTI
KOD1	LITYNGDNEF	FAYLKKRS	EKLGKFT	LGRDGESE	PKIQRMGDRF	...AVVKGR	IHHFDLYPPVIRRTI
Pfu	LITYNGDNEF	FAYLKKRS	EKLGKFT	LGRDGESE	PKIQRMGDRF	...AVVKGR	IHHFDLYPPVIRRTI
Mm S2	LITYNGDNEF	FAYLKKRS	EKLGKFT	LGRDGESE	PKIQRMGDRF	...AVVKGR	IHHFDLYPPVIRRTI
RB69	LITGMNVESE	DIPIYVNR	IKNIFGES	TAKRLSPHR	KTRVKNVI	ENMYGSRE	IITLFGISVLDYIDLYKKFSE
Pol1957	270	280	290	300	310	320	330
9oN	NLPPTYTLE	AVYEAVF	CKPKKVV	...YABEIA	QAWESGEG	LERVARYSM	EDAKVTYELCREFFP...MEA
TGO	NLPPTYTLE	AVYEAVF	CKPKKVV	...YABEIA	QAWESGEG	LERVARYSM	EDAKVTYELCREFFP...MEA
KOD1	NLPPTYTLE	AVYEAVF	CKPKKVV	...YABEIA	QAWESGEG	LERVARYSM	EDAKVTYELCREFFP...MEA
Pfu	NLPPTYTLE	AVYEAVF	CKPKKVV	...YABEIA	QAWESGEG	LERVARYSM	EDAKVTYELCREFFP...MEA
Mm S2	NLPPTYTLE	AVYEAVF	CKPKKVV	...YABEIA	QAWESGEG	LERVARYSM	EDAKVTYELCREFFP...MEA
RB69	NLTQPSYSL	DIPIYVNR	IKNIFGES	TAKRLSPHR	KTRVKNVI	ENMYGSRE	IITLFGISVLDYIDLYKKFSE
Pol1957	340	350	360	370	380	390	
9oN	QLSRLIGQS	LWDVSRSS	STGNLVE	...FLLRKAY	KRNELAPN	KP...DERELARR	RGGYAGGYVKEPERGL
TGO	QLSRLIGQS	LWDVSRSS	STGNLVE	...FLLRKAY	KRNELAPN	KP...DERELARR	RGGYAGGYVKEPERGL
KOD1	QLSRLIGQS	LWDVSRSS	STGNLVE	...FLLRKAY	KRNELAPN	KP...DERELARR	RGGYAGGYVKEPERGL
Pfu	QLSRLIGQS	LWDVSRSS	STGNLVE	...FLLRKAY	KRNELAPN	KP...DERELARR	RGGYAGGYVKEPERGL
Mm S2	QLSRLIGQS	LWDVSRSS	STGNLVE	...FLLRKAY	KRNELAPN	KP...DERELARR	RGGYAGGYVKEPERGL
RB69	DMGYAKIQ	I...QSVF	SPIKTWD	AIIFNSLKE	QNKVVPQGR	SHPV...QPY	PGAFVKEPIPNR
Pol1957	400	410	420	430	440		
9oN	WDNIVYLD	FRSAA	ISIIITH	NVSPD	TNREGCK	...EYDV	APE...VGHKFCCKDFPG
TGO	WDNIVYLD	FRSAA	ISIIITH	NVSPD	TNREGCK	...EYDV	APE...VGHKFCCKDFPG
KOD1	WDNIVYLD	FRSAA	ISIIITH	NVSPD	TNREGCK	...EYDV	APE...VGHKFCCKDFPG
Pfu	WDNIVYLD	FRSAA	ISIIITH	NVSPD	TNREGCK	...EYDV	APE...VGHKFCCKDFPG
Mm S2	WDNIVYLD	FRSAA	ISIIITH	NVSPD	TNREGCK	...EYDV	APE...VGHKFCCKDFPG
RB69	YKYVM	SPD	LTS	SLY	PSIIIRQ	VNIS	PETIACTFKVAPLHDYINAVAERP

FIG. 1 (continuación)

FIG. 1 (continuación)

Pol1957	620	630	640	650	660	670	
90N	AKETQARV	LEAILKHG	VEEAVR	IVKEVTEKLS	KYEVPP	EKLVIHE	QITRDLRDYKAT
TGO	AKETQARV	LEAILKHG	VEEAVR	IVKEVTEKLS	KYEVPP	EKLVIHE	QITRDLRDYKAT
KOD1	AKETQARV	LEAILKHG	VEEAVR	IVKEVTEKLS	KYEVPP	EKLVIHE	QITRDLRDYKAT
Pfu	AKETQARV	LEAILKHG	VEEAVR	IVKEVTEKLS	KYEVPP	EKLVIHE	QITRDLRDYKAT
Mm S2	SKNTQKNV	LNALLKEG	VEENAK	KVIOQDTIKELK	DGKVNNE	DLIIHT	QITRDLRDYKAT
RB69	VQKALKE	QIRRMLE	QEGEES	LQ	EYFKEFEKEFR	Q	QITRDLRDYKAT
Pol1957	680	690	700	710	720	730	
90N	HVAVAKRRLA	ARGVKI	RPGT	VISYIV	LKSGCRIG	DRAIPADE	EFDPPTKHRY
TGO	HVAVAKRRLA	ARGVKI	RPGT	VISYIV	LKSGCRIG	DRAIPADE	EFDPPTKHRY
KOD1	HVAVAKRRLA	ARGVKI	RPGT	VISYIV	LKSGCRIG	DRAIPADE	EFDPPTKHRY
Pfu	HVAVAKRRLA	ARGVKI	RPGT	VISYIV	LKSGCRIG	DRAIPADE	EFDPPTKHRY
Mm S2	HVEVAKKIL	KSGNRV	NTGD	VISYII	TSGNKSIS	ERAA	ILLENAKNY
RB69	ILTYNRAIK	GNIDAP	QVVEG	EKVYV	L	REGNPF	GDKCIAWPSGTEITD
Pol1957	740	750	760	770			
90N	PAVERILKA	FGYRKE	DLRYQKT	KQVGLGAWL	KVKGKK		
TGO	PAVERILKA	FGYRKE	DLRYQKT	KQVGLGAWL	KVKGKK		
KOD1	PAVERILKA	FGYRKE	DLRYQKT	KQVGLGAWL	KVKGKK		
Pfu	PAVERILKA	FGYRKE	DLRYQKT	KQVGLGAWL	KVKGKK		
Mm S2	PPVIRLMEA	LLGITK	DELKDSK	KQYTLHHFLK			
RB69	KPLEGFTSA	AKLDYE	KK				

FIG. 1 (continuación)

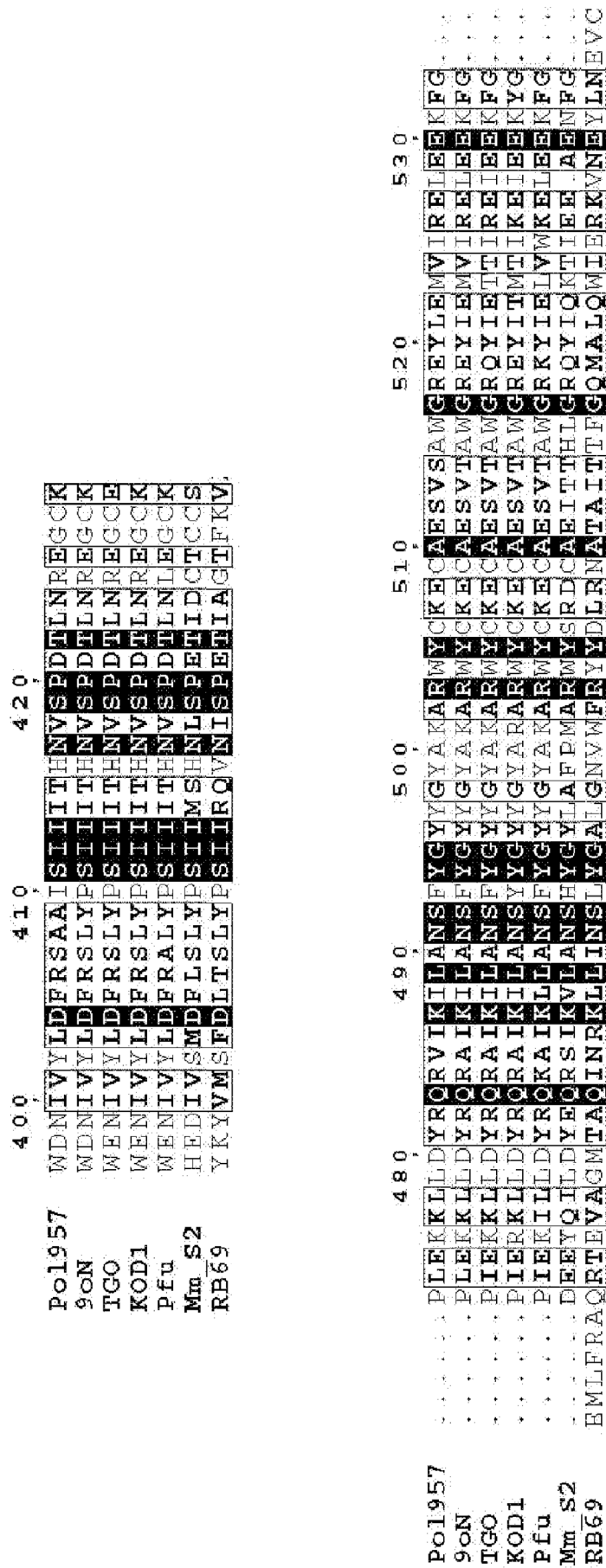


FIG. 2