



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0071724
(43) 공개일자 2020년06월19일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/566 (2006.01) C07K 14/47 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01) G01N 33/542 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
G01N 33/566 (2013.01)
C07K 14/4722 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7006390
(22) 출원일자(국제) 2018년10월15일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2020년03월04일
(86) 국제출원번호 PCT/CA2018/051294
(87) 국제공개번호 WO 2019/075556
국제공개일자 2019년04월25일
(30) 우선권주장
62/573,853 2017년10월18일 미국(US)
- (71) 출원인
유니버시티 드 몬트리얼
캐나다 퀘벡 에이치3티 1제이4, 몬트리얼, 에두아르드-몽뎀 2900
도메인 테라퓨틱스
프랑스 67400 일키르히그라펜슈타텐 블러바르 세바스티앙 브란트 850
- (72) 발명자
르 구일, 크리스티앙
캐나다 제이1이 3피4 퀘벡 몬트리얼 크리스토프 콜롬브 10514
부비에, 미셸
캐나다 에이치3티 1비7 퀘벡 몬트리얼 쉐맹 드 라코트-생-캐서린 2702
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인에이아이피

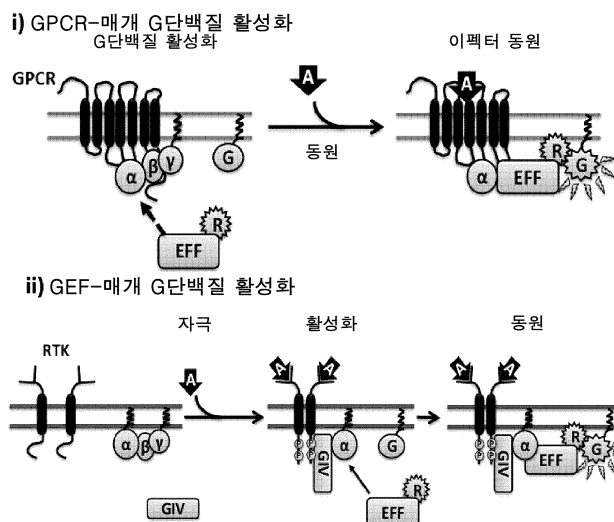
전체 청구항 수 : 총 67 항

(54) 발명의 명칭 G-단백질 활성화의 평가를 위한 시스템 및 방법

(57) 요약

형질 막 및 엔도솜과 같은 다양한 세포 구획에서, 및 Gα 단백질 서브유닛 패밀리-선택적 방식으로 G 단백질 활성화를 모니터링하기 위한 시스템 및 방법이 기재된다. 이들 시스템 및 방법은 또한 G 단백질-결합 수용체(GPCR)-매개 뿐만 아니라 비-수용체 구아닌 뉴클레오타이드 교환 인자(GEF)-매개 G 단백질 활성화의 모니터링을 허용하고, 적합한 에너지(BRET) 공여체 및 수용체로 태그된 G 단백질 및 세포 구획 마커의 특이적 이펙터의 G 단백질-결합 도메인의 사용을 기초로 한다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

C12N 15/85 (2013.01)

G01N 33/542 (2013.01)

G01N 2333/726 (2013.01)

G01N 2500/00 (2013.01)

(72) 발명자

루카시바, 빅토리아

캐나다 에이치4엘 5에이6 퀘벡 생-로랑 에이피티
1006 플레이스 포르티에 745

호그, 미레유

캐나다 에이치7씨 1이5 퀘벡 라발 루 드 라 파브리
II 5195

브레튼, 빌리

캐나다 에이치2지 2지7 퀘벡 몬트리얼 아브뉴
루이-에베르 6684

명세서

청구범위

청구항 1

G α 단백질 서브유닛 패밀리-선택적 방식으로 G 단백질 활성화의 조절(modulation)을 측정하는 시스템으로서, 상기 시스템은

하기 성분을 발현하는 세포를 포함하며:

(i) 생물발광 공여체 분자 또는 형광 수용체 분자로 태그된 G α 서브유닛 상호작용 폴리펩티드(GASIP)를 포함하는 제1 성분으로서,

여기서:

상기 G α 단백질 서브유닛 패밀리가 Gi이면, 상기 GASIP는 Gi에 특이적으로 결합하는 단백질의 도메인을 포함하고;

상기 G α 단백질 서브유닛 패밀리가 Gq이면, 상기 GASIP는 Gq에 특이적으로 결합하는 단백질의 도메인을 포함하고;

상기 G α 단백질 서브유닛 패밀리가 G12/13이면, 상기 GASIP는 G12/13에 특이적으로 결합하는 단백질의 도메인을 포함하는 것인, 제1 성분; 및

(ii) 생물발광 공여체 분자 또는 형광 수용체 분자로 태그된 형질 막(PM)-표적화 모이어티, 엔도솜-표적화 모이어티 또는 골지-표적화 모이어티를 포함하는 제2 성분;

여기서 상기 GASIP가 상기 형광 수용체 분자로 태그되면, 상기 PM-표적화 모이어티, 엔도솜-표적화 모이어티 또는 골지-표적화 모이어티는 상기 생물발광 공여체 분자로 태그되고, 상기 GASIP가 상기 생물발광 공여체 분자로 태그되면, 상기 PM-표적화 모이어티, 엔도솜-표적화 모이어티 또는 골지-표적화 모이어티는 상기 형광 수용체 분자로 태그되는 것인, 시스템.

청구항 2

제1항에 있어서, Gi에 특이적으로 결합하는 단백질의 상기 도메인이 Rap1GAP 또는 G-단백질 신호전달 조절인자(RGS) 단백질의 G-단백질 결합 도메인인, 시스템.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 GASIP가 Rap1GAP의 G 단백질-결합 도메인을 포함하는, 시스템.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 Rap1GAP의 G 단백질-결합 도메인이 위치 437, 439 및 441에서 세린 잔기 중 하나 이상이 돌연변이되거나 또는 부재하는 Rap1GAP의 잔기 1 내지 442(서열번호:8), 또는 그의 변이체를 포함하는, 시스템.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 Rap1GAP의 G 단백질-결합 도메인이 Rap1GAP의 잔기 1 내지 420 또는 1 내지 436을 포함하는, 시스템.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 위치 437, 439 및 441에서 모든 3개의 세린 잔기가 돌연변이되는, 시스템.

청구항 7

제4항 또는 제6항에 있어서, 상기 세린 잔기가 알라닌으로 치환되는, 시스템.

청구항 8

제2항에 있어서, 상기 GASIP가 RGS 단백질의 G 단백질-결합 도메인을 포함하는, 시스템.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 RGS 단백질이 RGS17, RGS19 또는 RGS20인, 시스템.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 G 단백질-결합 도메인이 RGS17의 잔기 64 내지 210(서열번호:17), RGS19의 잔기 70-217(서열번호:18), 또는 RGS20의 잔기 242-388(서열번호:19)을 포함하는, 시스템.

청구항 11

제1항에 있어서, Gq에 특이적으로 결합하는 단백질의 상기 도메인이 P63RhoGEF 또는 GRK2의 G 단백질-결합 도메인인, 시스템.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 GASIP가 P63RhoGEF의 G 단백질-결합 도메인을 포함하는, 시스템.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 P63RhoGEF의 G 단백질-결합 도메인이 P63RhoGEF의 잔기 295 내지 502(서열번호:25)를 포함하는, 시스템.

청구항 14

제11항에 있어서, 상기 GASIP가 GRK2의 G 단백질-결합 도메인을 포함하는, 시스템.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 GRK2의 G 단백질-결합 도메인이 GRK2의 잔기 30 내지 203(서열번호:27)을 포함하는, 시스템.

청구항 16

제1항에 있어서, G12/13에 특이적으로 결합하는 단백질의 상기 도메인이 PDZRhoGEF 또는 P115RhoGEF의 G 단백질-결합 도메인인, 시스템.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 GASIP가 PDZRhoGEF의 G 단백질-결합 도메인을 포함하는, 시스템.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 PDZRhoGEF의 G 단백질-결합 도메인이 PDZRhoGEF의 잔기 281 내지 483(서열번호:21)을 포함하는, 시스템.

청구항 19

제16항에 있어서, 상기 GASIP가 P115RhoGEF의 G 단백질-결합 도메인을 포함하는, 시스템.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 P115RhoGEF의 G 단백질-결합 도메인이 P115RhoGEF의 잔기 1 내지 244(서열번호:23)를 포함하는, 시스템.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 GASIP가 상기 생물발광 공여체 분자로 태그되고, 상기 PM-표

적화 모이어티, 엔도솜-표적화 모이어티 또는 골지-표적화 모이어티가 상기 형광 수용체 분자로 태그되는, 시스템.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PM 표적화 모이어티가 PM에 국부화된 PM 단백질 또는 그의 단편인, 시스템.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 PM 단백질 또는 그의 단편이 (a) 팔미토일화, 미리스토일화, 및/또는 프레닐화 신호 서열 및/또는 (b) 다염기성 서열을 포함하는, 시스템.

청구항 24

제22항 또는 제23항에 있어서, 상기 PM 표적화 모이어티가 아미노산 서열 GCMSCCKVLS(서열번호:60), GCMGLPCVVM(서열번호:61), CVKIKKCIIM(서열번호:62), KKKKKKSKTKCVIM(서열번호:63), 또는 KNGKKKRKSLAKRIRERCCIL(서열번호: 45), CMSCKCCIL(서열번호:4), 또는 SPKKGLLQRLFKRQHQNNSKS(서열번호:5)를 포함하는, 시스템.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 PM 표적화 모이어티가 아미노산 서열 GKKKKKKSKTKCVIM(서열번호:1)을 포함하는, 시스템.

청구항 26

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 엔도솜 표적화 모이어티가 엔도솜에 국부화된 엔도솜 단백질 또는 그의 단편인, 시스템.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 엔도솜 단백질 또는 그의 단편이 FYVE 도메인을 포함하는, 시스템.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 엔도솜 표적화 모이어티가 인간 엔도핀의 FYVE 도메인을 포함하는, 시스템.

청구항 29

제28항에 있어서, 상기 엔도솜 표적화 모이어티가 인간 엔도핀의 잔기 739 내지 806(서열번호:39)을 포함하는, 시스템.

청구항 30

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 골지 표적화 모이어티가 골지에 국부화된 골지 단백질 또는 그의 단편인, 시스템.

청구항 31

제30항에 있어서, 상기 골지 표적화 모이어티가 골지에 국부화된 eNOS1 또는 그의 단편인, 시스템.

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 골지 표적화 모이어티가 인간 eNOS1의 잔기 1 내지 73(서열번호:46)을 포함하는, 시스템.

청구항 33

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 성분이 (i) 상기 GASIP와 (ii) 상기 생물발광 공여체 분자 또는 형광 수용체 분자 사이의 링커를 추가로 포함하는, 시스템.

청구항 34

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 성분이 (i) 상기 PM-표적화 모이어티, 엔도솜-표적화 모이어티 또는 골지-표적화 모이어티와 (ii) 상기 생물발광 공여체 분자 또는 형광 수용체 분자 사이의 링커를 추가로 포함하는, 시스템.

청구항 35

제33항 또는 제34항에 있어서, 상기 링커가 5 내지 25개의 아미노산으로 연결된 펩티드인, 시스템.

청구항 36

제1항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 G 단백질을 통해 신호를 보내는 세포 표면 수용체인 제3 성분을 추가로 포함하는, 시스템.

청구항 37

제36항에 있어서, 상기 세포 표면 수용체가 GPCR, RTK 또는 인테그린 수용체인, 시스템.

청구항 38

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 G 단백질 활성화가 G 단백질-결합 수용체(GPCR)-매개 G 단백질 활성화인, 시스템.

청구항 39

제1항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 재조합 G α 서브유닛 폴리펩티드인 제4 성분을 추가로 포함하는, 시스템.

청구항 40

제39항에 있어서, 상기 G 단백질 활성화가 비-수용체 구아닌 뉴클레오티드 교환 인자(GEF)-매개 G 단백질 활성화이고, 상기 재조합 G α 서브유닛 폴리펩티드가 상기 G α 서브유닛 폴리펩티드의 카르복시(C)-말단 도메인에서 적어도 하나의 돌연변이를 포함하고, 상기 C-말단 도메인이 상기 G α 서브유닛 폴리펩티드의 마지막 7개 잔기에 상응하는, 시스템.

청구항 41

제40항에 있어서, 상기 돌연변이가 적어도 마지막 2개의 C-말단 잔기의 결실 또는 치환인, 시스템.

청구항 42

제41항에 있어서, 상기 돌연변이가 적어도 마지막 5개의 C-말단 잔기의 결실 또는 치환인, 시스템.

청구항 43

제40항에 있어서, 상기 돌연변이가 상기 C-말단 도메인에서 보존된 류신 잔기 중 적어도 1개의 결실 또는 치환인, 시스템.

청구항 44

제43항에 있어서, 상기 돌연변이가 상기 C-말단 도메인에서 마지막 보존된 류신 잔기의 치환인, 시스템.

청구항 45

제44항에 있어서, 상기 치환이 류신을 아스파르트산으로, 류신을 프롤린으로, 또는 류신을 아르기닌으로 치환인, 시스템.

청구항 46

제40항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 GEF가 GIV/Girdin이고, 상기 GASIP가 제1항 내지 제7항 중

어느 한 항에 정의된 바와 같은 Rap1GAP의 G 단백질-결합 도메인을 포함하는, 시스템.

청구항 47

제46항에 있어서, 상기 GEF가 수용체 티로신 키나제(RTK)에 의해 활성화되는, 시스템.

청구항 48

제1항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 생물발광 공여체 분자가 루시페라제, 바람직하게는 레닐라 루시페라제 단백질(rLuc)인, 시스템.

청구항 49

제1항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 형광 수용체 분자가 녹색 형광 단백질(GFP), 바람직하게는 레닐라 GFP(rGFP)인, 시스템.

청구항 50

제1항 내지 제49항 중 어느 한 항의 시스템의 제1 및/또는 제2 성분을 암호화하는, 하나 이상의 핵산.

청구항 51

제50항에 있어서, 제1항 내지 제49항 중 어느 한 항의 시스템의 제1 성분을 암호화하는 제1 핵산 및 제1항 내지 제49항 중 어느 한 항의 시스템의 제2 성분을 암호화하는 제2 핵산을 포함하는, 하나 이상의 핵산.

청구항 52

제50항 또는 제51항의 하나 이상의 핵산을 포함하는, 하나 이상의 벡터.

청구항 53

제1항 내지 제49항 중 어느 한 항에 정의된 시스템의 성분을 발현하는, 숙주 세포.

청구항 54

제제(agent)가 관심 G 단백질의 활성화를 조절하는지 여부를 결정하는 방법으로서, 하기 단계를 포함하는, 방법:

- (a) 제1항 내지 제49항 중 어느 한 항의 시스템을 상기 생물발광 공여체 분자에 대한 기질과 접촉시키는 단계; 및
- (b) 상기 제제의 존재 및 부재 하에 시스템에서 BRET 신호를 측정하는 단계로서, 여기서 상기 제제의 부재에 비해 상기 제제의 존재 하에 상기 BRET 신호의 차이는 상기 제제가 상기 관심 G 단백질의 활성화를 조절함을 나타내는 것인, 단계.

청구항 55

제54항에 있어서, 상기 관심 G 단백질이 Gi 단백질 서브유닛 패밀리의 것이고, 상기 GASIP가 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 Rap1GAP의 G 단백질-결합 도메인을 포함하는, 방법.

청구항 56

제49항에 있어서, 상기 시스템이 Gi 단백질 서브유닛 패밀리의 재조합 Gα 서브유닛 폴리펩티드를 포함하는, 방법.

청구항 57

제56항에 있어서, 상기 방법이 복수의 시스템을 사용하여 수행되고, 상기 시스템 각각이 Gi 단백질 서브유닛 패밀리의 상이한 재조합 Gα 서브유닛 폴리펩티드를 포함하는, 방법.

청구항 58

제54항에 있어서, 상기 관심 G 단백질이 Gq 단백질 서브유닛 패밀리의 것이고, 상기 GASIP가 제1항 및 제11항 내지 제15항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 P63RhoGEF 또는 GRK2의 G 단백질-결합 도메인을 포함하는, 방법.

청구항 59

제58항에 있어서, 상기 시스템이 Gq 단백질 서브유닛 패밀리의 재조합 Gα 서브유닛 폴리펩티드를 포함하는, 방법.

청구항 60

제59항에 있어서, 상기 방법이 복수의 시스템을 사용하여 수행되고, 상기 시스템 각각이 Gq 단백질 서브유닛 패밀리의 상이한 재조합 Gα 서브유닛 폴리펩티드를 포함하는, 방법.

청구항 61

제54항에 있어서, 상기 관심 G 단백질이 G12/13 단백질 서브유닛 패밀리의 것이고, 상기 GASIP가 제1항 및 제16항 내지 제20항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 PDZRhoGEF 또는 P115RhoGEF의 G 단백질-결합 도메인을 포함하는, 방법.

청구항 62

제61항에 있어서, 상기 시스템이 G12/13 단백질 서브유닛 패밀리의 재조합 Gα 서브유닛 폴리펩티드를 포함하는, 방법.

청구항 63

제62항에 있어서, 상기 방법이 복수의 시스템을 사용하여 수행되고, 상기 시스템 각각이 G12/13 단백질 서브유닛 패밀리의 상이한 재조합 Gα 서브유닛 폴리펩티드를 포함하는, 방법.

청구항 64

제제(agent)가 비-수용체 구아닌 뉴클레오티드 교환 인자(GEF)-매개 G 단백질 활성화를 조절하는지 여부를 결정하는 방법으로서, 하기 단계를 포함하는, 방법:

- (a) 제40항 내지 제47항 중 어느 한 항의 시스템을 상기 생물발광 공여체 분자에 대한 기질과 접촉시키는 단계; 및
- (b) 상기 제제의 존재 및 부재 하에 시스템의 BRET 신호를 측정하는 단계로서, 상기 제제의 부재에 비해 상기 제제의 존재 하에 상기 BRET 신호의 차이는 상기 제제가 비-수용체 GEF-매개 G 단백질 활성화를 조절함을 나타내는 것인, 단계.

청구항 65

제54항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 BRET 신호가 플레이트 판독기를 사용하거나 또는 현미경 검사에 의해 측정되는, 방법.

청구항 66

제54항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 기질이 코엘렌테라진 기질인, 방법.

청구항 67

제66항에 있어서, 상기 코엘렌테라진 기질이 메톡시 e-코엘렌테라진인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

관련 출원에 대한 상호 참조

[0001]

[0002] 본 출원은 2017년 10월 18일자로 출원된 미국 가출원 일련 번호 제62/573,853호의 우선권을 주장하며, 그의 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 기술 분야

[0004] 본 발명은 일반적으로 세포에서 G-단백질 활성화의 모니터링에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 이중삼량체 G 단백질은 G 단백질-결합 수용체(GPCR)의 표준적인 신호전달 파트너이며, 또한 다른 유형의 수용체, 특히 수용체 티로신 키나제(RTK)의 G α -상호작용 소포-관련 단백질(GIV; 또한 Girdin으로도 알려짐)을 통한 신호전달에 수반되는 것으로 알려져 있다(Ghosh P, 2016, *Pharmacol Res.* 105:99-107). 수용체 활성화는 G α -결합된 GDP의 GTP로의 교환을 촉발시켜, G α 및 G β/γ 서브유닛의 해리를 촉진하는 이중삼량체 G 단백질의 형태적 재배열을 초래한다. 이어서 GTP-결합된 G α 및 유리 G β/γ 서브유닛은 특이적 이펙터에 개입할 수 있다.

[0006] G 단백질은 G α 서브유닛의 활성화 후 신호전달 결과에 기초한 패밀리로 그룹화된다. Gs 패밀리(G α s, G α o1f)는 아데닐릴 시클라제(AC)의 직접 활성화를 통해 cAMP의 생산을 강화시킨다. 반대로, Gi 패밀리(G α i1, G α i2, G α i3, G α oA, G α oB 및 G α z)는 특이적 AC를 억제함으로써 cAMP 수준을 감소시킨다. Gq 패밀리(G α q, G α 11, G α 14 및 G α 15)는 포스포리파제 C β (PLC β)를 활성화시켜 2차 메신저 디아실글리세롤(DAG) 및 이노시톨 트리포스페이트(IP $_3$)를 생산하며, 이는 이후에 소포체로부터 각각 PKC의 활성화 및 Ca $^{2+}$ 방출을 촉진한다. 마지막으로, G12/13 패밀리(G α 12 및 G α 13)는 LARG, p115 및 TRIO와 같은 Rho-GEF를 제어하고 따라서 세포골격 리모델링과 연관된 과정(예를 들어, 화학주성)에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 상이한 패밀리에 속하는 G 단백질의 활성화 후 신호전달의 명확한 결과를 고려하여, G 단백질 패밀리-선택적 방식으로 G 단백질 활성화의 모니터링을 허용하는 시스템 및 검정은 예를 들어 다양한 리간드에 의해 세포 표면 수용체 활성화를 보다 잘 특징화하고(예를 들어 주어진 리간드에 의해 활성화된 신호전달 경로) G 단백질의 보다 특이적인 조절인자를 확인하는데 필요하다.

[0007] 세포 표면 수용체 활성화가 리간드 결합에 반응하여 형질 막(PM)에서 주로 발생하지만, 세포 표면 수용체(예를 들어, GPCR, RTK)의 신호전달은 엔도솜 및 골지를 포함한 다른 세포 구획에서 발생하는 것으로 제시된 바 있다. 활성화시, 많은 세포 표면 수용체는 엔도솜에 진입하고, 엔도솜 내의 리간드-수용체 복합체의 트래피킹(trafficking)은 수용체의 분해를 통해 신호전달을 종결시키거나(리소좀 및 프로테아좀에서), 또는 수용체의 재순환을 통해 신호전달을 세포 표면으로 다시 지속시키는 메커니즘을 제공한다. 그러나, 수용체 신호전달이 또한 엔도솜에서 개시되고, 지속되고, 종결될 수 있음이 입증된 바 있다(Murphy *et al.*, 2009, *PNAS*, vol. 106 no. 42, 17615-17622; Tsvetanova *et al.*, 2015, *J. Biol. Chem.* 290(11), pp. 6689-6696; Vilardaga *et al.*, 2014, *Nature Chemical Biology* 10, 700-706). 유사하게, 일부 G 단백질은 골지(Lo *et al.*, 2015, *Dev. Cell.* 33: 189-203) 및 소포체(ER)-골지 계면(Bastin *et al.*, *Front Bioeng Biotechnol.* 2015 Sep 1;3: 128)과 회합하고 활성화되는 것으로 밝혀진 바 있다. 상이한 신호는 PM, 및 엔도솜 및 골지와 같은 다른 구획에서 수용체로부터 발생하여 명확한 생리학적 반응을 초래할 수 있고, 상이한 메커니즘은 이들 구획에서 수용체의 신호전달을 조절한다. 신호전달 및 조절에 대한 이러한 명확한 메커니즘은 (PM 보다는) 다른 세포 구획에서 신호전달을 표적화하는 것에 기초한 신규 요법의 가능성을 높이고, 따라서 상이한 세포 구획에서 G 단백질 활성화를 모니터링하기 위한 시스템 및 검정이 필요하다.

[0008] 미국 특허 제9,029,097호 및 W0/2016/058094는 G 단백질 활성화를 모니터링하기 위한 BRET-기반 바이오센서를 개시한다. 그러나, 이들 바이오센서는 G 단백질 서브유닛(G α , G β , 및/또는 G γ) 중 하나 이상, 및/또는 GPCR의 태깅을 필요로 하며, 이는 이들 단백질의 활성화에 영향을 미칠 수 있다. 또한, 이들 바이오센서는 세포에서 전반적인 G 단백질 활성화를 검출하지만, 상이한 세포 구획에서 및 G 단백질 패밀리-선택적 방식으로 G 단백질 활성화의 모니터링을 허용하지는 않는다.

[0009] 본 명세서는 다수의 문서를 지칭하며, 그의 내용은 전문이 본원에 참조로 포함된다.

발명의 내용

[0010] 본 개시내용은 하기 양태(item) 1 내지 67을 제공한다:

[0011] 1. G α 단백질 서브유닛 패밀리-선택적 방식으로 G 단백질 활성화의 조절(modulation)을 측정하는 시스템으로,

상기 시스템은 하기를 성분을 발현하는 세포를 포함하며:

- [0012] (i) 생물발광 공여체 분자 또는 형광 수용체 분자로 태그된 Gα 서브유닛 상호작용 폴리펩티드(GASIP)를 포함하는 제1 성분으로서, 여기서: 상기 Gα 단백질 서브유닛 패밀리가 Gi이면, 상기 GASIP는 Gi에 특이적으로 결합하는 단백질의 도메인을 포함하고; 상기 Gα 단백질 서브유닛 패밀리가 Gq이면, 상기 GASIP는 Gq에 특이적으로 결합하는 단백질의 도메인을 포함하고; 상기 Gα 단백질 서브유닛 패밀리가 G12/13이면, 상기 GASIP는 G12/13에 특이적으로 결합하는 단백질의 도메인을 포함하는 것인, 제1 성분; 및
- [0013] (ii) 생물발광 공여체 분자 또는 형광 수용체 분자로 태그된 형질 막(PM)-표적화 모이어티, 엔도솜-표적화 모이어티 또는 골지-표적화 모이어티를 포함하는 제2 성분;
- [0014] 여기서 상기 GASIP가 상기 형광 수용체 분자로 태그되면, 상기 PM-표적화 모이어티, 엔도솜-표적화 모이어티 또는 골지-표적화 모이어티는 상기 생물발광 공여체 분자로 태그되고, 상기 GASIP가 상기 생물발광 공여체 분자로 태그되면, 상기 PM-표적화 모이어티, 엔도솜-표적화 모이어티 또는 골지-표적화 모이어티는 상기 형광 수용체 분자로 태그되는 것인, 시스템.
- [0015] 2. 양태 1에 있어서, Gi에 특이적으로 결합하는 단백질의 상기 도메인이 Rap1GAP 또는 G-단백질 신호전달 조절인자(RGS) 단백질의 G-단백질 결합 도메인인, 시스템.
- [0016] 3. 양태 2에 있어서, 상기 GASIP가 Rap1GAP의 G 단백질-결합 도메인을 포함하는, 시스템.
- [0017] 4. 양태 3에 있어서, 상기 Rap1GAP의 G 단백질-결합 도메인이 위치 437, 439 및 441에서 세린 잔기 중 하나 이상이 돌연변이되거나 또는 부재하는 Rap1GAP의 잔기 1 내지 442(서열번호(서열식별번호):8), 또는 그의 변이체를 포함하는, 시스템.
- [0018] 5. 양태 4에 있어서, 상기 Rap1GAP의 G 단백질-결합 도메인이 Rap1GAP의 잔기 1 내지 420 또는 1 내지 436을 포함하는, 시스템.
- [0019] 6. 양태 4에 있어서, 상기 위치 437, 439 및 441에서 모든 3개의 세린 잔기가 돌연변이되는, 시스템.
- [0020] 7. 양태 4 또는 6에 있어서, 상기 세린 잔기가 알라닌으로 치환되는, 시스템.
- [0021] 8. 양태 2에 있어서, 상기 GASIP가 RGS 단백질의 G 단백질-결합 도메인을 포함하는, 시스템.
- [0022] 9. 양태 8에 있어서, 상기 RGS 단백질이 RGS17, RGS19 또는 RGS20인, 시스템.
- [0023] 10. 양태 9에 있어서, 상기 G 단백질-결합 도메인이 RGS17의 잔기 64 내지 210(서열번호:17), RGS19의 잔기 70-217(서열번호:18), 또는 RGS20의 잔기 242-388(서열번호:19)을 포함하는, 시스템.
- [0024] 11. 양태 1에 있어서, Gq에 특이적으로 결합하는 단백질의 상기 도메인이 P63RhoGEF 또는 GRK2의 G 단백질-결합 도메인인, 시스템.
- [0025] 12. 양태 11에 있어서, 상기 GASIP가 P63RhoGEF의 G 단백질-결합 도메인을 포함하는, 시스템.
- [0026] 13. 양태 12에 있어서, 상기 P63RhoGEF의 G 단백질-결합 도메인이 P63RhoGEF의 잔기 295 내지 502(서열번호:25)를 포함하는, 시스템.
- [0027] 14. 양태 11에 있어서, 상기 GASIP가 GRK2의 G 단백질-결합 도메인을 포함하는, 시스템.
- [0028] 15. 양태 14에 있어서, 상기 GRK2의 G 단백질-결합 도메인이 GRK2의 잔기 30 내지 203(서열번호:27)을 포함하는, 시스템.
- [0029] 16. 양태 1에 있어서, G12/13에 특이적으로 결합하는 단백질의 상기 도메인이 PDZRhoGEF 또는 P115RhoGEF의 G 단백질-결합 도메인인, 시스템.
- [0030] 17. 양태 16에 있어서, 상기 GASIP가 PDZRhoGEF의 G 단백질-결합 도메인을 포함하는, 시스템.
- [0031] 18. 양태 17에 있어서, 상기 PDZRhoGEF의 G 단백질-결합 도메인이 PDZRhoGEF의 잔기 281 내지 483(서열번호:21)을 포함하는, 시스템.
- [0032] 19. 양태 16에 있어서, 상기 GASIP가 P115RhoGEF의 G 단백질-결합 도메인을 포함하는, 시스템.
- [0033] 20. 양태 19에 있어서, 상기 P115RhoGEF의 G 단백질-결합 도메인이 P115RhoGEF의 잔기 1 내지 244(서열번호:21)을 포함하는, 시스템.

호:23)를 포함하는, 시스템.

- [0034] 21. 양태 1 내지 20 중 어느 한 양태에 있어서, 상기 GASIP가 상기 생물발광 공여체 분자로 태그되고, 상기 PM-표적화 모이어티, 엔도솜-표적화 모이어티 또는 골지-표적화 모이어티가 상기 형광 수용체 분자로 태그되는, 시스템.
- [0035] 22. 양태 1 내지 21 중 어느 한 양태에 있어서, 상기 PM 표적화 모이어티가 PM에 국부화된 PM 단백질 또는 그 단편인, 시스템.
- [0036] 23. 양태 22에 있어서, 상기 PM 단백질 또는 그의 단편이 (a) 팔미토일화, 미리스토일화, 및/또는 프레닐화 신호 서열 및/또는 (b) 다염기성 서열을 포함하는, 시스템.
- [0037] 24. 양태 22 또는 23에 있어서, 상기 PM 표적화 모이어티가 아미노산 서열 GCMSCCKVLS(서열번호:62), GCMGLPCVVM(서열번호:63), CVKIKKCIIM(서열번호:64), KKKKKKSKTKCVIM(서열번호:65), KNGKKKRKSLAKRIRERCCIL(서열번호: 45), CMSCKCCIL(서열번호:46), 또는 SPKKGLLQRLFKRQHQNNSKS(서열번호:47)를 포함하는, 시스템.
- [0038] 25. 양태 24에 있어서, 상기 PM 표적화 모이어티가 아미노산 서열 GKKKKKKSKTKCVIM(서열번호:1)을 포함하는, 시스템.
- [0039] 26. 양태 1 내지 21 중 어느 한 양태에 있어서, 상기 엔도솜 표적화 모이어티가 엔도솜에 국부화된 엔도솜 단백질 또는 그의 단편인, 시스템.
- [0040] 27. 양태 26에 있어서, 상기 엔도솜 단백질 또는 그의 단편이 FYVE 도메인을 포함하는, 시스템.
- [0041] 28. 양태 27에 있어서, 상기 엔도솜 표적화 모이어티가 인간 엔도핀의 FYVE 도메인을 포함하는, 시스템.
- [0042] 29. 양태 28에 있어서, 상기 엔도솜 표적화 모이어티가 인간 엔도핀의 잔기 739 내지 806(서열번호:39)을 포함하는, 시스템.
- [0043] 30. 양태 1 내지 21 중 어느 한 양태에 있어서, 상기 골지 표적화 모이어티가 골지에 국부화된 골지 단백질 또는 그의 단편인, 시스템.
- [0044] 31. 양태 30에 있어서, 상기 골지 표적화 모이어티가 골지에 국부화된 eNOS1 또는 그의 단편인, 시스템.
- [0045] 32. 양태 31에 있어서, 상기 골지 표적화 모이어티가 인간 eNOS1의 잔기 1 내지 73(서열번호:48)을 포함하는, 시스템.
- [0046] 33. 양태 1 내지 32 중 어느 한 양태에 있어서, 상기 제1 성분이 (i) 상기 GASIP와 (ii) 상기 생물발광 공여체 분자 또는 형광 수용체 분자 사이의 링커를 추가로 포함하는, 시스템.
- [0047] 34. 양태 1 내지 33 중 어느 한 양태에 있어서, 상기 제2 성분이 (i) 상기 PM-표적화 모이어티, 엔도솜-표적화 모이어티 또는 골지-표적화 모이어티와 (ii) 상기 생물발광 공여체 분자 또는 형광 수용체 분자 사이의 링커를 추가로 포함하는, 시스템.
- [0048] 35. 양태 33 또는 34에 있어서, 상기 링커가 5 내지 25개의 아미노산으로 연결된 펩티드인, 시스템.
- [0049] 36. 양태 1 내지 35 중 어느 한 양태에 있어서, 상기 G 단백질을 통해 신호를 보내는 세포 표면 수용체인 제3 성분을 추가로 포함하는 시스템.
- [0050] 37. 양태 36에 있어서, 상기 세포 표면 수용체가 GPCR, RTK 또는 인테그린 수용체인, 시스템.
- [0051] 38. 양태 1 내지 37 중 어느 한 양태에 있어서, 상기 G 단백질 활성화가 G 단백질-결합 수용체(GPCR)-매개 G 단백질 활성화인, 시스템.
- [0052] 39. 양태 1 내지 38 중 어느 한 양태에 있어서, 재조합 Gα 서브유닛 폴리펩티드인 제4 성분을 추가로 포함하는 시스템.
- [0053] 40. 양태 39에 있어서, 상기 G 단백질 활성화가 비-수용체 구아닌 뉴클레오티드 교환 인자(GEF)-매개 G 단백질 활성화이고, 상기 재조합 Gα 서브유닛 폴리펩티드가 상기 Gα 서브유닛 폴리펩티드의 카르복시(C)-말단 도메인에서 적어도 하나의 돌연변이를 포함하고, 상기 C-말단 도메인이 상기 Gα 서브유닛 폴리펩티드의 마지막 7개 잔기에 상응하는, 시스템.
- [0054] 41. 양태 40에 있어서, 상기 돌연변이가 적어도 마지막 2개의 C-말단 잔기의 결실 또는 치환인, 시스템.

- [0055] 42. 양태 41에 있어서, 상기 돌연변이가 적어도 마지막 5개의 C-말단 잔기의 결실 또는 치환인, 시스템.
- [0056] 43. 양태 40에 있어서, 상기 돌연변이가 상기 C-말단 도메인에서 보존된 류신 잔기 중 적어도 1개의 결실 또는 치환인, 시스템.
- [0057] 44. 양태 43에 있어서, 상기 돌연변이가 상기 C-말단 도메인에서 마지막 보존된 류신 잔기의 치환인, 시스템.
- [0058] 45. 양태 44에 있어서, 상기 치환이 류신을 아스파르트산으로, 류신을 프롤린으로, 또는 류신을 아르기닌으로 치환인, 시스템.
- [0059] 46. 양태 40 내지 45 중 어느 한 양태에 있어서, 상기 GEF가 GIV/Girdin이고, 상기 GASIP가 양태 1 내지 7 중 어느 한 양태에 정의된 바와 같은 Rap1GAP의 G 단백질-결합 도메인을 포함하는, 시스템.
- [0060] 47. 양태 46에 있어서, 상기 GEF가 수용체 티로신 키나제(RTK)에 의해 활성화되는, 시스템.
- [0061] 48. 양태 1 내지 47 중 어느 한 양태에 있어서, 상기 생물발광 공여체 분자가 루시페라제, 바람직하게는 레닐라(*Renilla*) 루시페라제 단백질(*rLuc*)인, 시스템.
- [0062] 49. 양태 1 내지 48 중 어느 한 양태에 있어서, 상기 형광 수용체 분자가 녹색 형광 단백질(GFP), 바람직하게는 레닐라 GFP(*rGFP*)인, 시스템.
- [0063] 50. 양태 1 내지 49 중 어느 한 양태의 시스템의 제1 및/또는 제2 성분을 암호화하는 하나 이상의 핵산.
- [0064] 51. 양태 50에 있어서, 양태 1 내지 49 중 어느 한 양태의 시스템의 제1 성분을 암호화하는 제1 핵산 및 양태 1 내지 49 중 어느 한 양태의 시스템의 제2 성분을 암호화하는 제2 핵산을 포함하는 하나 이상의 핵산.
- [0065] 52. 양태 50 또는 51의 하나 이상의 핵산을 포함하는 하나 이상의 벡터.
- [0066] 53. 양태 1 내지 49 중 어느 한 양태에 정의된 시스템의 성분을 발현하는 숙주 세포.
- [0067] 54. 제제(agent)가 관심 G 단백질의 활성화를 조절하는지 여부를 결정하는 방법으로, 하기 단계를 포함하는, 방법: (a) 양태 1 내지 49 중 어느 한 양태의 시스템을 상기 생물발광 공여체 분자에 대한 기질과 접촉시키는 단계; 및 (b) 상기 제제의 존재 및 부재 하에 시스템에서 BRET 신호를 측정하며, 여기서 상기 제제의 부재에 비해 상기 제제의 존재 하에 상기 BRET 신호의 차이는 상기 제제가 상기 관심 G 단백질의 활성화를 조절함을 나타내는 것인, 단계.
- [0068] 55. 양태 54에 있어서, 상기 관심 G 단백질이 Gi 단백질 서브유닛 패밀리의 것이고, 상기 GASIP가 양태 1 내지 7 중 어느 한 양태에 정의된 바와 같은 Rap1GAP의 G 단백질-결합 도메인을 포함하는, 방법.
- [0069] 56. 양태 49에 있어서, 상기 시스템이 Gi 단백질 서브유닛 패밀리의 재조합 Gα 서브유닛 폴리펩티드를 포함하는, 방법.
- [0070] 57. 양태 56에 있어서, 상기 방법이 복수의 시스템을 사용하여 수행되고, 상기 시스템 각각이 Gi 단백질 서브유닛 패밀리의 상이한 재조합 Gα 서브유닛 폴리펩티드를 포함하는, 방법.
- [0071] 58. 양태 54에 있어서, 상기 관심 G 단백질이 Gq 단백질 서브유닛 패밀리의 것이고, 상기 GASIP가 양태 1 및 11 내지 15 중 어느 한 양태에 정의된 바와 같은 P63RhoGEF 또는 GRK2의 G 단백질-결합 도메인을 포함하는, 방법.
- [0072] 59. 양태 58에 있어서, 상기 시스템이 Gq 단백질 서브유닛 패밀리의 재조합 Gα 서브유닛 폴리펩티드를 포함하는, 방법.
- [0073] 60. 양태 59에 있어서, 상기 방법이 복수의 시스템을 사용하여 수행되고, 상기 시스템 각각이 Gq 단백질 서브유닛 패밀리의 상이한 재조합 Gα 서브유닛 폴리펩티드를 포함하는, 방법.
- [0074] 61. 양태 54에 있어서, 상기 관심 G 단백질이 G12/13 단백질 서브유닛 패밀리의 것이고, 상기 GASIP가 양태 1 및 16 내지 20 중 어느 한 양태에 정의된 바와 같은 PDZRhoGEF 또는 P115RhoGEF의 G 단백질-결합 도메인을 포함하는, 방법.
- [0075] 62. 양태 61에 있어서, 상기 시스템이 G12/13 단백질 서브유닛 패밀리의 재조합 Gα 서브유닛 폴리펩티드를 포함하는, 방법.
- [0076] 63. 양태 62에 있어서, 상기 방법이 복수의 시스템을 사용하여 수행되고, 상기 시스템 각각이 G12/13 단백질

서브유닛 패밀리 상이한 재조합 Gα 서브유닛 폴리펩티드를 포함하는, 방법.

- [0077] 64. 제제가 비-수용체 구아닌 뉴클레오티드 교환 인자(GEF)-매개 G 단백질 활성화를 조절하는지 여부를 결정하는 방법으로, 하기 단계를 포함하는, 방법: (a) 양태 40 내지 47 중 어느 한 양태의 시스템을 상기 생물발광 공여체 분자에 대한 기질과 접촉시키는 단계; 및 (b) 상기 제제의 존재 및 부재 하에 시스템에서 BRET 신호를 측정하며, 여기서 상기 제제의 부재에 비해 상기 제제의 존재 하에 상기 BRET 신호의 차이는 상기 제제가 비-수용체 GEF-매개 G 단백질 활성화를 조절함을 나타내는 것인, 방법.
- [0078] 65. 양태 54 내지 64 중 어느 한 양태에 있어서, 상기 BRET 신호가 플레이트 판독기를 사용하거나 또는 현미경 검사에 의해 측정되는, 방법.
- [0079] 66. 양태 54 내지 65 중 어느 한 양태에 있어서, 상기 기질이 코엘렌테라진 기질인, 방법.
- [0080] 67. 양태 66에 있어서, 상기 코엘렌테라진 기질이 메톡시 e-코엘렌테라진인, 방법.
- [0081] 본 발명의 다른 목적, 이점 및 특성은 첨부된 도면을 참조하여 단지 예로 주어진 하기 특정 구현예의 비제한적 인 설명을 읽으면 보다 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0082] 첨부된 도면의 설명은 다음과 같다:

도 1a는 GPCR-매개 직접 G 단백질 활성화(상부 패널 **i**) 또는 구아닌-뉴클레오티드 교환 인자(GEF)-매개 G 단백질 활성화(하부 패널 **ii**)를 모니터링하기 위한 이펙터-기반 센서의 원리를 도시한다. 수용체, 적합한 생물발광 공명 에너지 전달(BRET) 공여체 또는 수용체(예를 들어, rGFP)로 태그된 세포 구획(또는 세포하 국부화) 마커, 예컨대 형질 막(PM) 또는 초기 엔도솜(EE) 마커, 적합한 BRET 공여체 또는 수용체(예를 들어, RlucII)로 태그된 특이적 G 단백질 이펙터의 Gα-상호작용 도메인을 발현하는 세포는 작용제에 노출되어 공동발현된 G 단백질을 활성화시킨다. 패널 **i**에서, 작용제-유도 GPCR 자극은 G 단백질을 직접적으로 활성화시키며, 이는 태그된 이펙터를 세포질에서 표지된 막으로 동원한다. 패널 **ii**에서 G 단백질 활성화는 RTK(예를 들어, EGFR) 또는 인테그린 α-β 복합체의 활성화 후 GIV/Girdin과 같은 GEF의 동원에 의해 매개된다.

도 1b-1e는 3개의 상이한 G 단백질 이펙터로 수득된 특이성의 예를 도시한다. Gq, Gi 및 G12/13 패밀리의 구성원에 결합된 수용체를 PM 마커에 융합된 rGFP(rGFP-CAAX, GKKKKKSKTKCVIM, 서열번호: 1) 및 RlucII로 태그된 G 단백질 이펙터와 함께, 이들 G 단백질과 공동-발현시켰다. **도 1b**는 Rap1GAP(SSS-AAA)-RlucII 및 rGFP-CAAX(PM 마커)를 사용하여, 혈소판-활성화 인자(PAF)/PAFR-매개 G 단백질(Gq, G11, G14, G12, GoA, GoB, Gz, Gi1, Gi2, Gi3) 활성화로 수득된 용량 반응 곡선(DRC)을 도시한다. 모의 반응은 내인성으로 발현된 Gi1, i2 및 i3 단백질의 활성화를 나타낸다. **도 1c**는 PDZRG-RlucII 및 rGFP-CAAX를 사용하여, U46619/TPαR-매개 G 단백질(Gq, G11, G14, G15, G12, G13, Gz) 활성화로 수득된 DRC를 도시한다. 모의 반응은 내인성으로 발현된 G12 및 G13 단백질의 활성화를 나타낸다. **도 1d 및 1e**는 P63RG-RlucII 및 rGFP-CAAX를 사용하여, PAF/PAFR-매개 G 단백질(Gq, G11, G14, G12, GoA, GoB, Gz, Gi1, Gi2, Gi3) 활성화(**도 1d**) 및 U46619/TPαR-매개 G 단백질(Gq, G11, G14, G15, G12, G13, Gz) 활성화(**도 1e**)로 수득된 DRC를 도시한다. 모의 반응은 내인성으로 발현된 Gq 및 G11 단백질의 활성화를 나타낸다.

도 2a는 Gi 패밀리의 G 단백질의 활성화를 모니터링하기 위한 Rap1GAP-기반 시스템의 시험된 다양한 작제물을 도시한다. 첫번째 작제물은 C-말단에서 BRET 공여체, Rluc8로 태그된 Rap1GAP의 일부(잔기 1-442)로 이루어진다. 이 작제물로부터, 상이한 링커를 사용하고 Rluc8 대신에 RlucII를 사용하여 두번째 작제물을 유도하였다. 실험 결과는 **도 2b-2z**에 도시되어 있다. 링커A = GSGGGSGGGA(서열번호: 6) 및 링커B = GSAGTGGAIDIKLPAT(서열번호: 7). Rap1GAP 1-442 = 서열번호: 8; Rap1GAP Δcterm(1-420) = 서열번호: 10; Rap1GAP ΔSSS = 서열번호: 9; Rap1GAP SS-AA = 서열번호: 13; Rap1GAP SS-DA = 서열번호: 14; Rap1GAP SS-AD = 서열번호: 15; Rap1GAP SS-DD = 서열번호: 16; Rap1GAP SSS-AAA = 서열번호: 11; Rap1GAP SSS-TTT = 서열번호: 12.

도 2b-2e는 3개의 상이한 Rap1GAP-Rluc 작제물: Rap1GAP(1-442)-Rluc8(원형), Rap1GAP(1-442)-RlucII(삼각형) 및 Rap1GAP(ΔCT)-RlucII(다이아몬드형)을 사용하여 AR-M100390(ARM) 자극시 Gi1(**도 2b**), Gi2(**도 2c**), GoA(**도 2d**) 및 Gz(**도 2e**)의 인간 Mu 오피오이드 수용체(hMOR1)-매개 활성화를 사용한 DRC를 도시한다.

도 2f-2h는 Rap1GAP(1-442)-Rluc8(**도 2f**), Rap1GAP(1-442)-RlucII(**도 2g**) 또는 RAP1GAP(ΔCT)-RlucII(**도 2h**)를 사용하여, 상이한 단백질의 인산화를 초래하는 단백질 키나제 A의 cAMP 생산 증가 및 활성화를 촉진시키는,

포스콜린(삼각형) 또는 비히클(DMSO/타이로드, 원형)의 존재 하에 PM에서 Gz의 hMOR1/ARM-촉진된 활성화를 사용한 DRC를 도시한다.

도 2i-2n은 Rap1GAP(1-442)-RlucII(**도 2i**), 절단된(잔기 1-436) 버전 Rap1GAP(Δ SSS)-RlucII(**도 2j**), Rap1GAP(SS-AD)-RlucII(**도 2k**), Rap1GAP(SS-DA)-RlucII(**도 2l**), Rap1GAP(SS-AA)-RlucII(**도 2m**), 또는 Rap1GAP(SS-DD)-RlucII(**도 2n**)를 사용하여 포스콜린(삼각형) 또는 비히클(원형)의 존재 하에 PM에서 Gi2의 hMOR1/ARM-촉진된 활성화를 사용한 DRC를 도시한다.

도 2o-2q는 Rap1GAP(1-442)-RlucII(**도 2o**), Rap1GAP(SSS-TTT)-RlucII(**도 2p**) 및 Rap1GAP(SSS-AAA)-RlucII(**도 2q**)를 사용하여 포스콜린(삼각형) 또는 비히클(원형)의 존재 하에 PM에서 GoB의 hMOR1/ARM-촉진된 활성화를 사용한 DRC를 도시한다.

도 2r은 Gi1, Gi2, Gi3, GoA 또는 GoB의 공동-발현과 함께, 형질 막으로 Rap1GAP(SSS-AAA)-RlucII 전위를 사용하여 도파민 D4 수용체(D4R)의 도파민-촉진된 자극 후 G 단백질 활성화의 DRC를 도시한다.

도 2s-2w는 리간드 A412,997, 도파민, L741,742 및 Way-100635로 도파민 수용체 D4R(**도 2s**), D1R(**도 2t**), D2R(**도 2u**), D3R(**도 2u**) 또는 D1R(**도 2w**)의 자극 후 Gz 활성화의 DRC를 도시한다.

도 2x-2z는 검정의 견고성을 나타내는 검정에 대한 Z' 인자를 도시하는 그래프이다. HEK293을 WT Gi2(**도 2x**), WT GoA(**도 2y**), 또는 WT Gz(**도 2z**)와 함께, D4R, Rap1GAP(SSS-AAA)-RlucII, rGFP-CAAX로 공동-형질감염시키고, 96-웰 플레이트에 플레이팅하고, 6-8 분 동안 37°C에서 100nM 도파민(삼각형) 또는 비히클(DMSO/타이로드; 사각형)로 자극하였다. PM으로 Rap1GAP(SSS-AAA)-RlucII의 동원을 BRET2에서 평가하였다. BRET 값은 제시된 그래프에 웰당 표시되어 있다.

도 3a는 본원에 기재된 연구에서 사용된 G-단백질 신호전달 조절인자(RGS) 단백질의 구성원의 RGS 도메인에 기초한 Gi 패밀리의 G 단백질의 활성화를 모니터링하기 위한 다른 작제물을 도시한다. RGS17(서열번호: 17의 잔기 64-210), RGS19(서열번호: 18의 잔기 70-217) 및 RGS20(서열번호: 19의 잔기 242-388)의 RGS(Gi-결합) 도메인을 포함하는 단편은 C-말단에서 BRET 공여체 RlucII로 태그되어 있다. 링커B' = GSAGTGGRAIDIKLASAT(서열번호: 20).

도 3b-3d는 GoA, GoB, Gz, Gi1, Gi2 또는 Gi3의 공동-발현과 함께, PM으로 RGS(RGS17)-RlucII(**도 3b**), RGS(RGS19)-RlucII(**도 3c**) 또는 RGS(RGS20)-RlucII(**도 3d**) 전위를 사용하여 D4의 도파민-촉진된 자극 후 G 단백질 활성화의 DRC를 도시한다.

도 4a는 본원에 기재된 연구에서 사용된 G12/13 패밀리의 G 단백질의 활성화를 모니터링하기 위한 PDZRhoGEF(PDZRG)-RlucII 작제물을 도시한다. PDZRhoGEF(서열번호: 21의 잔기 281-483)의 G12/13 결합 도메인을 포함하는 단편은 C-말단에서 BRET 공여체 RlucII로 태그되어 있다. 링커D = GIRLREALKLPAT(서열번호: 22).

도 4b 및 **4c**는 TP α R 작용제 I-BOP(CAS 번호: 128719-90-4)로 자극 후, G α 없음(모의), 5 ng의 G α , 20 ng의 G α 또는 100 ng의 G α 중 어느 하나와 함께 트롬복산 수용체(TP α R), PDZRG-RlucII, rGFP-CAAX로 공동형질감염된 HEK293 세포에서 G12(**도 4b**) 및 G13(**도 4c**) 활성화의 DRC를 도시한다.

도 4d 및 **4e**는 PDZRG-RlucII를 사용하여 PM에서 G12(**도 4d**) 및 G13(**도 4e**) 활성화에 대한 TP α R 리간드의 DRC를 도시한다. 트롬복산 수용체(TP α R), PDZRG-RlucII, rGFP-CAAX로 공동형질감염된 HEK293 세포를 알려진 완전 작용제(U46619, I-BOP, CTA2), 부분 작용제(U51605) 및 길항제 I-SAP 및 SQ 29,558로 자극하였다. 결과를 정규화하고 I-BOP 반응의 %(n=4) +/- SEM으로 제시하였다.

도 4f 및 **4g**는 PDZRG-RlucII 작제물을 사용하여 검정에 대한 Z' 인자를 도시하는 그래프이다. HEK293을 WT G12(**도 4f**) 또는 WT G13(**도 4g**)과 함께 TP α R, PDZRG-RlucII, rGFP-CAAX로 공동-형질감염시키고, 96-웰 플레이트에 플레이팅하고, 6-8 분 동안 37°C에서 100 nM의 TP α R 작용제 U46619(삼각형) 또는 비히클(메틸 아세테이트/타이로드; 사각형)로 자극하였다. PM으로 PDZRG-RlucII의 동원을 BRET2에서 평가하였다. BRET 값은 제시된 그래프에 웰당 표시되어 있다.

도 5a는 본원에 기재된 연구에서 사용된 G12/13 패밀리의 G 단백질의 활성화를 모니터링하기 위한 P115RhoGEF(P115RG)-RlucII 작제물을 도시한다. P115RhoGEF(서열번호: 23의 잔기 1-244)의 G12/13 결합 도메인을 포함하는 단편은 C-말단에서 BRET 공여체 RlucII로 태그되어 있다. 링커C = RLKLPAT(서열번호: 24).

도 5b 및 **5c**는 P115RG-RlucII를 사용하여 PM에서 G12(**도 5b**) 및 G13(**도 5c**) 활성화에 대한 TP α R 리간드의 DRC

를 도시한다. 트롬복산 수용체(TP α R), P115RG-RlucII, rGFP-CAAX로 공동형질감염된 HEK293 세포를 U46619, I-BOP, CTA2, U51605, I-SAP 및 SQ 29,558로 자극하였다. 결과를 정규화하고 I-BOP 반응의 %(n=4) +/- SEM으로 제시하였다.

도 5d 및 5e는 PDZRG-RlucII 작제물을 사용하여 검정에 대한 Z' 인자를 도시하는 그래프이다. HEK293을 WT G12(**도 5d**) 또는 WT G13(**도 5e**)과 함께 TP α R, P115RG-RlucII, rGFP-CAAX로 공동-형질감염시키고, 96-웰 플레이트에 플레이팅하고, 6-8 분 동안 37°C에서 100 nM의 TP α R 작용제 U46619(삼각형) 또는 비히클(메틸 아세테이트/타이로드; 사각형)로 자극하였다. PM으로 P115RG-RlucII의 동원을 BRET2에서 평가하였다. BRET 값은 제시된 그래프에 웰당 표시되어 있다.

도 6a는 본원에 기재된 연구에서 사용된 Gq 패밀리(Gq, G11, G14 & G15)의 G 단백질의 활성화를 모니터링하기 위한 P63RhoGEF(P63RG) 작제물을 도시한다. P63RhoGEF의 Gq 결합 도메인(서열번호: 25의 잔기 295-502)을 포함하는 단편은 C-말단에서 BRET 공여체 RlucII로 태그되어 있다. 링커E = ASGSAGTGGRAIDIKLPAT(서열번호: 26).

도 6b-6e는 TP α R 작용제 U46619로 자극 후, G α 없음(모의, 내인성 G 단백질로부터 수득된 반응) 또는 상이한 품질의 G α 서브유닛 중 어느 하나와 함께 TP α R, P63RG-RlucII, rGFP-CAAX로 공동형질감염된 HEK293 세포의 PM에서 Gq(**도 6b**), G11(**도 6c**), G14(**도 6d**) 및 G15(**도 6e**) 활성화의 DRC를 도시한다.

도 6f-6i는 TP α R 작용제 U46619로 자극 후, G α 없음(모의, 내인성 G 단백질로부터 수득된 반응) 또는 상이한 품질의 G α 서브유닛 중 어느 하나와 함께 TP α R, P63RG-RlucII, rGFP-FYVE로 공동형질감염된 HEK293 세포의 초기 엔도솜(EE)에서 Gq(**도 6f**), G11(**도 6g**), G14(**도 6h**) 및 G15(**도 6i**) 활성화의 DRC를 도시한다.

도 6j-6m은 **도 6b-6e**에서 결정된 최적 조건 하에 P63RG-RlucII를 사용하여 PM에서 Gq(**도 6j**), G11(**도 6k**), G14(**도 6l**) 및 G15(**도 6m**) 활성화에 대한 TP α R 리간드의 DRC를 도시한다. 트롬복산 수용체(TP α R), P63RG-RlucII, rGFP-CAAX로 공동형질감염된 HEK293 세포를 U46619, I-BOP, CTA2, U51605, I-SAP 및 SQ 29,558로 자극하였다. 결과를 정규화하고 I-BOP 반응의 %(n=3 내지 n=5) +/- SEM으로 제시하였다.

도 6n-6q는 **도 6f-6i**에서 결정된 최적 조건 하에 P63RG-RlucII를 사용하여 EE에서 Gq(**도 6n**), G11(**도 6o**), G14(**도 6p**) 및 G15(**도 6q**) 활성화에 대한 TP α R 리간드의 DRC를 도시한다. 트롬복산 수용체(TP α R), P63RG-RlucII, rGFP-FYVE로 공동형질감염된 HEK293 세포를 U46619, I-BOP, CTA2, U51605, I-SAP 및 SQ 29,558로 자극하였다. 결과를 정규화하고 I-BOP 반응의 %(n=3 내지 n=5) +/- SEM으로 제시하였다.

도 6r 및 6s는 P63RG-RlucII 작제물을 사용하여 검정에 대한 Z' 인자를 도시하는 그래프이다. HEK293을 WT Gq(**도 6r**) 또는 WT G11(**도 6s**)과 함께 TP α R, P63RG-RlucII, rGFP-CAAX로 공동-형질감염시키고, 96-웰 플레이트에 플레이팅하고, 6-8 분 동안 37°C에서 100 nM의 TP α R 작용제 U46619(삼각형) 또는 비히클(메틸 아세테이트/타이로드; 사각형)로 자극하였다. PM으로 P63RG-RlucII의 동원을 BRET2에서 평가하였다. BRET 값은 제시된 그래프에 웰당 표시되어 있다.

도 7a는 본원에 기재된 연구에서 사용된 Gq 패밀리(Gq, G11, G14 & G15)의 G 단백질의 활성화를 모니터링하기 위한 2개의 RGS(GRK2) 작제물을 도시한다. GRK2의 Gq 결합 도메인(RGS 도메인)(서열번호: 27의 잔기 30-203)을 포함하는 단편은 N-말단 RlucII-RGS(GRK2) 또는 C-말단(RGS(GRK2)-RlucII)에서 BRET 공여체 RlucII로 태그되어 있다. 링커B' = GSAGTGGRAIDIKLASAT(서열번호: 20).

도 7b 및 7c는 RlucII-RGS(GRK2)를 사용하여, 2개의 리간드/수용체 시스템, 즉 At1AR/ANGII(**도 7b**) 및 TP α R/U46619(**도 7c**)의 PM에서 Gq, G11, G14 및 G15의 활성화의 DRC를 도시한다.

도 7d 및 7e는 RGS(GRK2)-RlucII를 사용하여, 2개의 리간드/수용체 시스템, 즉 At1AR/ANGII(**도 7d**) 및 TP α R/U46619(**도 7e**)의 PM에서 Gq, G11, G14 및 G15의 활성화의 DRC를 도시한다.

도 7f는 RlucII-RGS(GRK2) 작제물을 사용하여 검정에 대한 Z' 인자를 도시하는 그래프이다. HEK293을 WT Gq와 함께 TP α R, RlucII-RGS(GRK2), rGFP-CAAX로 공동-형질감염시키고, 96-웰 플레이트에 플레이팅하고, 6-8 분 동안 37°C에서 100 nM의 TP α R 작용제 U46619(삼각형) 또는 비히클(메틸 아세테이트/타이로드; 사각형)로 자극하였다. PM으로 RlucII-RGS(GRK2)의 동원을 BRET2에서 평가하였다. BRET 값은 제시된 그래프에 웰당 표시되어 있다.

도 8a는 G 단백질의 GEF-매개 활성화, 즉 GPCR에 의해 매개되지 않은 G 단백질 활성화를 모니터링하는 그의 능력에 대해 본원에 기재된 연구에서 시험된 돌연변이된 Gi2 및 GoB 단백질을 도시한다. G α i2 Δ 5 = 서열번호:

28; G a i 2 Δ 2 = 서열번호: 29; G a i 2 L-2G = 서열번호: 31; G a i 2 L-2P = 서열번호: 33; G a i 2 L-2R = 서열번호: 34; G a i 2 L-2D = 서열번호: 32; G a i 2 L-7G = 서열번호: 30; G a o B Δ 5 = 서열번호: 36; G a o B L-2G = 서열번호: 35.

도 8b-8g는 Gi2 및 GoB의 결실 돌연변이체, 즉 Gi2 Δ2(도 8b 및 8c), Gi2 Δ5(도 8d 및 8e) 및 GoB Δ5(도 8f 및 8g)의 활성화의 DRC를 도시한다. HEK293을 EGF 수용체(EGFR, 도 8b, 8d, 8f) 또는 브래디키닌 수용체(BKB2R, 도 8c, 8e, 8g) 중 어느 하나, Rap1GAP(SSS-AAA)-RlucII, rGFP-CAAX, 및 WT 또는 돌연변이된 Gi2/GoB 서브유닛을 암호화하는 구출물로 공동-형질감염시켰다.

도 8h-8m은 Gi2 및 GoB의 Leu을 Gly으로 돌연변이체, 즉 Gi2 L-7G(도 8h 및 8i), Gi2 L-2G(도 8j 및 8k) 및 GoB L-2G(도 8l 및 8m)의 활성화의 DRC를 도시한다. HEK293을 EGFR(도 8h, 8j, 8l) 또는 BKB2R(도 8i, 8k, 8m) 중 어느 하나, Rap1GAP(SSS-AAA)-RlucII, rGFP-CAAX, 및 WT 또는 돌연변이된 Gi2/GoB 서브유닛을 암호화하는 작제물로 공동-형질감염시켰다.

도 8n-8s는 Gi2의 위치 -2 돌연변이체, 즉 Gi2 L-2D(도 8n 및 8o), Gi2 L-2P(도 8p 및 8q) 및 Gi2 L-2R(도 8r 및 8s)의 활성화의 DRC를 도시한다. HEK293을 EGFR(도 8n, 8p, 8r) 또는 BKB2R(도 8o, 8q, 8s) 중 어느 하나, Rap1GAP(SSS-AAA)-RlucII, rGFP-CAAX, 및 WT 또는 돌연변이된 Gi2 서브유닛을 암호화하는 작제물로 공동-형질감염시켰다.

도 8t-8u는 Rap1GAP(SSS-AAA)-RlucII 작제물을 사용하여 G 단백질의 GEF-매개 활성화를 모니터링하는 검정에 대한 Z' 인자를 도시하는 그래프이다. HEK293을 WT Gi2(도 8t) 또는 돌연변이체 Gi2 L-2P(도 8u)와 함께 EGFR, Rap1GAP(SSS-AAA)-RlucII, rGFP-CAAX로 공동-형질감염시키고, 96-웰 플레이트에 플레이팅하고, 2 분 동안 RT에서 10 ng/ml의 EGF(삼각형) 또는 비히클(타이로드; 사각형)로 자극하였다. PM으로 Rap1GAP(SSS-AAA)-RlucII의 동원을 BRET2에서 평가하였다. BRET 값은 제시된 그래프에 웰당 표시되어 있다.

도 8v-8x는 Rap1GAP(SSS-AAA)-RlucII 작제물(원형) 및 RGS(RGS17)-RlucII(삼각형)를 사용하여 모니터링된, 2개의 GPCR, 도 8v에서 델타-오피오이드 수용체(DOR), 및 도 8w에서 D2R, 및 RTK(EGFR; 도 8x)에 의한 Gi2 활성화의 DRC를 도시한다. HEK293을 수용체(DOR, D2R 또는 EGFR), Rap1GAP(SSS-AAA)-RlucII 또는 RGS(RGS17)-RlucII, rGFP-CAAX 및 WT Gi2를 암호화하는 작제물로 공동-형질감염시키고, 96-웰 플레이트에 플레이팅하고, GPCR 작용제(도 8v, 8w)로 8 분 동안 또는 EGF(도 8x)로 7 분 동안, RT에서 지시된 용량으로 자극하였다. PM으로 Rap1GAP(SSS-AAA)-RlucII 및 RGS(RGS17)-RlucII의 동원을 BRET2에서 평가하였다. 제시된 DRC는 대표적인 3개의 독립 실험이다.

도 9a-9d는 본원에 기재된 연구에서 사용된 폴리펩티드의 아미노산 서열을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0083] 본원에 사용된 유전학, 분자 생물학, 생화학 및 핵산의 용어 및 기호는 당업계의 표준 논문 및 텍스트, 예를 들어 Kornberg and Baker, *DNA Replication*, Second Edition (W University Science Books, 2005); Lehninger, *Biochemistry*, 6th Edition (W H Freeman & Co (Sd), New York, 2012); Strachan and Read, *Human Molecular Genetics*, Second Edition (Wiley-Liss, New York, 1999); Eckstein, editor, *Oligonucleotides and Analogs: A Practical Approach* (Oxford University Press, New York, 1991); Gait, editor, *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach* (IRL Press, Oxford, 1984) 등의 것들을 따른다. 모든 용어는 관련 업계에서 확립된 그들의 전형적인 의미로 이해되어야 한다.
- [0084] 단수형은 본원에서 문법적 대상의 하나 또는 하나 초과(즉 적어도 하나)를 지칭하기 위해 사용된다. 예로서, "요소"는 하나의 요소 또는 하나 초과(즉 적어도 하나)의 요소를 의미한다. 본 명세서 전반에 걸쳐, 달리 문맥상 요구되지 않는 한, "포함하다", "포함한다" 및 "포함하는"이라는 단어는 언급된 단계 또는 요소 또는 단계 또는 요소의 그룹을 포함하지만 임의의 다른 단계 또는 요소 또는 단계 또는 요소의 그룹을 배제하지 않음을 의미하는 것으로 이해될 것이다.
- [0085] 본 명세서에서 언급된 Genbank, RefSeq, UniProt, NCBI 및/또는 Ensembl 수탁 번호(또는 임의의 다른 데이터베이스)에 상응하는 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열을 포함한 정보는 본원에 참조로 포함된다.
- [0086] 본원에 기재된 모든 방법은 달리 본원에 지시되지 않거나 또는 문맥상 명백하게 모순되지 않는 한 임의의 적합한 순서로 수행될 수 있다.

- [0087] 본원에 제공된 임의의 및 모든 예, 또는 예시적인 언어("예를 들어", "예컨대")의 사용은 단지 본 발명을 보다 잘 설명하기 위한 것이며 달리 청구되지 않는 한 본 발명의 범위에 대한 제한을 두지 않는다.
- [0088] 본원에서, "약"이라는 용어는 일반적인 의미를 갖는다. "약"이라는 용어는 값이 값을 결정하기 위해 이용되는 장치 또는 방법에 대한 고유의 오차 변동을 포함하거나, 또는 언급된 값에 가까운 값, 예를 들어 언급된 값(또는 값의 범위)의 10% 또는 5% 이내를 포함함을 나타내기 위해 사용된다.
- [0089] 본원에 개시된 구현에 및 특성의 임의의 및 모든 조합 및 하위조합은 본 발명에 의해 포함된다. 예를 들어, 본원에 확인된 유전자들 중 2, 3, 4, 5개 또는 그 이상의 임의의 조합의 표현은 본원에 기재된 방법에서 사용될 수 있다.
- [0090] 본 개시내용은 G 단백질 패밀리-선택적 방식으로, 및 상이한 세포 구획에서 G 단백질 활성화의 모니터링을 허용하는 시스템 및 검정에 관한 것이다. 이들 시스템 및 검정은 적합한 에너지(즉 BRET) 공여체 및 수용체로 태그된 G 단백질 및 세포 구획 마커의 특이적 이펙터의 사용에 기초한다. 이들 시스템 및 검정은 유리하게는 특이적 G 단백질 이펙터의 전위를 평가하여, 이에 따라 G 단백질의 기능/활성이 변경될 위험을 최소화함으로써 특정 세포 구획에서 G 단백질 활성화가 G 단백질 패밀리-선택적 방식으로 간접적으로 검출됨에 따라 임의의 G 단백질 서브유닛($G\alpha$, $G\beta$ 또는 $G\gamma$)의 변형(예를 들어, BRET 공여체 또는 수용체 또는 다른 검출가능한 표지로 태그/융합)을 필요로 하지 않는다. 본원에 기재된 시스템으로 수득된 동적 차은 G 단백질 활성화를 평가하기 위해 다른 시스템으로 수득된 것보다 더 높으며(예를 들어, 미국 특허 번호 제9,029,097호 및 WO/2016/058094), 이는 고처리량 스크리닝(HTS) 적용(부분 작용제의 확인 포함)에 중요할 수 있고, 또한 내인성 G 단백질에 의해 매개된 신호의 검출을 (G 단백질 패밀리 수준에서) 허용한다. 특이성은 관심 G 단백질 서브유닛(들)에 특이적인 G 단백질 이펙터의 G 단백질-결합 도메인, 예컨대 G_i 패밀리(G_{i1} , G_{i2} , G_{i3} , G_{oA} , G_{oB} , G_z)에 대한 Rap1GAP의 G 단백질-결합 도메인, G_q 패밀리(G_q , G_{11} , G_{14} & G_{15})에 대한 P63RhoGEF(P63RG)의 G 단백질-결합 도메인 및 $G_{12/13}$ 패밀리에 대한 PDZRhoGEF 또는 P115RhoGEF의 G 단백질-결합 도메인을 사용함으로써 달성된다. 필요한 경우, G 단백질 서브유닛 수준에서의 특이성은 관심 G 단백질 서브유닛(들)을 연구된 수용체와 공동-발현함으로써 달성될 수 있다.
- [0091] 따라서, 한 양태에서, 본 개시내용은 $G\alpha$ 단백질 서브유닛 패밀리-선택적 방식으로 G 단백질 활성화의 조절을 측정하기 위한 시스템을 제공하며, 상기 시스템은 하기 성분을 발현하는 세포를 포함하며:
- [0092] (i) 생물발광 공여체 분자 또는 형광 수용체 분자로 태그된 $G\alpha$ 서브유닛 상호작용 폴리펩티드(GASIP)를 포함하는 제1 성분으로서;
- [0093] 여기서:
- [0094] 상기 $G\alpha$ 단백질 서브유닛 패밀리가 G_i 이면, 상기 GASIP는 G_i 에 결합하는 단백질의 도메인을 포함하고;
- [0095] 상기 $G\alpha$ 단백질 서브유닛 패밀리가 G_q 이면, 상기 GASIP는 G_q 에 결합하는 단백질의 도메인을 포함하고;
- [0096] 상기 $G\alpha$ 단백질 서브유닛 패밀리가 $G_{12/13}$ 이면, 상기 GASIP는 $G_{12/13}$ 에 결합하는 단백질의 도메인을 포함하고;
- [0097] 상기 $G\alpha$ 단백질 서브유닛 패밀리가 G_s 이면, 상기 GASIP는 G_s 에 결합하는 단백질의 도메인을 포함하는 것인, 제1 성분; 및
- [0098] (ii) 생물발광 공여체 분자 또는 형광 수용체 분자로 태그된 형질 막(PM)-표적화 모이어티, 엔도솜-표적화 모이어티 또는 골지-표적화 모이어티를 포함하는 제2 성분;
- [0099] 여기서 상기 GASIP가 상기 형광 수용체 분자로 태그되면, 상기 PM-표적화 모이어티, 엔도솜-표적화 모이어티 또는 골지-표적화 모이어티는 상기 생물발광 공여체 분자로 태그되고, 상기 GASIP가 상기 생물발광 공여체 분자로 태그되면, 상기 PM-표적화 모이어티, 엔도솜-표적화 모이어티 또는 골지-표적화 모이어티는 상기 형광 수용체 분자로 태그된다.
- [0100] 다른 양태에서, 본 개시내용은 $G\alpha$ 단백질 서브유닛 패밀리-선택적 방식으로 G 단백질 활성화의 조절을 측정하기 위한 시스템을 제공하며, 상기 시스템은 하기 성분을 발현하는 세포를 포함하며:
- [0101] (i) 생물발광 공여체 분자 또는 형광 수용체 분자로 태그된 $G\alpha$ 서브유닛 상호작용 폴리펩티드(GASIP)를 포함하는 제1 성분으로서;
- [0102] 여기서:

- [0103] 상기 G α 단백질 서브유닛 패밀리가 Gi이면, 상기 GASIP는 Rap1GAP, G-단백질 신호전달 조절인자(RGS) 단백질 또는 TNFAIP8의 G 단백질-결합 도메인, 바람직하게는 Rap1GAP 또는 RGS 단백질의 G 단백질-결합 도메인을 포함하고;
- [0104] 상기 G α 단백질 서브유닛 패밀리가 Gq이면, 상기 GASIP는 RhoGEF 단백질(예를 들어, P63RhoGEF 또는 TRIO), GRK2, GRK3, TPR1(테트라트리카펫트 반복 도메인 1) 또는 RGS 단백질(예를 들어, RGS2)의 G 단백질-결합 도메인, 바람직하게는 P63RhoGEF 또는 GRK2/GRK3의 G 단백질-결합 도메인을 포함하고;
- [0105] 상기 G α 단백질 서브유닛 패밀리가 G12/13이면, 상기 GASIP는 RhoGEF 단백질(PDZRhoGEF, P115RhoGEF 또는 LARG), JNK-상호작용 류신 지퍼 단백질(JLP), 카데린, Axin1, PP2A, SNAP-알파, 폴리스티넨1, RGS16, AKAP110 또는 HAX1(HS1-관련 단백질 X1)의 G 단백질-결합 도메인, 바람직하게는 PDZRhoGEF 또는 P115RhoGEF의 G 단백질-결합 도메인을 포함하고;
- [0106] 상기 G α 단백질 서브유닛 패밀리가 Gs(G α_s , XLG α_s , G α_{olf})이면, 상기 GASIP는 SNX13(RGS-PX1), AXIN1 또는 TPR1(테트라트리카펫트 반복 도메인 1)의 G 단백질-결합 도메인을 포함하는 것인, 제1 성분;
- [0107] (ii) 생물발광 공여체 분자 또는 형광 수용체 분자로 태그된 형질 막(PM)-표적화 모이어티, 엔도솜-표적화 모이어티 또는 골지-표적화 모이어티를 포함하는 제2 성분;
- [0108] 여기서 상기 GASIP가 상기 형광 수용체 분자로 태그되면, 상기 PM-표적화 모이어티, 엔도솜-표적화 모이어티 또는 골지-표적화 모이어티는 상기 생물발광 공여체 분자로 태그되고, 상기 GASIP가 상기 생물발광 공여체 분자로 태그되면, 상기 세포 M-표적화 모이어티, 엔도솜-표적화 모이어티 또는 골지-표적화 모이어티는 상기 형광 수용체 분자로 태그된다.
- [0109] 생물발광 공여체 분자(또는 BRET 공여체) 및 형광 수용체 분자(또는 BRET 수용체)는 생물발광 공여체 분자의 방출 스펙트럼이 형광 수용체 분자의 흡광 스펙트럼과 중첩되도록 선택된다. 이러한 조건 하에, 생물발광 공여체 분자에 의해 전달된 광 에너지는 형광 수용체 분자를 여기할 수 있는 파장, 즉 생물발광 공명 에너지 전달(BRET)에 있다. 공명 에너지 전달(약칭 RET)은 중첩 방출/흡수 스펙트럼을 갖는 2개의 발색단 사이의 에너지 전달을 설명하는 메커니즘이다. 2개의 발색단("공여체" 및 "수용체")이 서로 짧은 거리(예를 들어, 10-100 앙스트롬) 내에 있고 그들의 전이 쌍극자가 적당하게 배향되면, 공여체 발색단은 그의 여기된-상태 에너지를 비-방사성 쌍극자-쌍극자 커플링을 통해 수용체 발색단에 전달할 수 있다. 생물발광 공명 에너지 전달(BRET)은 공여체 생물발광 분자(레닐라 루시페라제와 같은 생물발광 효소)와 수용체 형광 분자(예를 들어, 레닐라 GFP) 사이에 에너지의 비-방사성 전달에 기초한다.
- [0110] 본원에 사용된 바와 같이, 생물발광 공여체 분자라는 용어는 적합한 기질에 대한 작용, 또는 외부 공급원에 의한 자체 여기 후 발광을 생성할 수 있는 임의의 분자를 지칭한다. 본 개시내용에 이용될 수 있는 복수의 상이한 생물발광 공여체 분자가 있다. 발광 시스템은 박테리아, 원생동물, 강장동물, 연체동물, 어류, 배각류, 날벌레, 진균, 벌레, 갑각류, 및 초서류, 특히 피로포루스(*Pyrophorus*) 속의 방아벌레 및 포토누스(*Photinus*), 포토리스(*Photuris*), 및 루시올라(*Luciola*) 속의 반딧불이를 포함한 많은 발광성 유기체로부터 단리되고 알려져 있다. 생물발광을 나타내는 추가 유기체는 PCT 공보 번호 WO 00/024878 및 WO 99/049019에 열거되어 있다. 한 구현예에서, 생물발광 공여체 분자는 루시페라제이다. 루시페라제 활성을 갖는 생물발광 단백질의 예는 미국 특허 번호 제5,229,285호, 제5,219,737호, 제5,843,746호, 제5,196,524호, 및 제5,670,356호에 개시되어 있다. 가장 널리 사용되는 루시페라제 중 2종은 (i) 레닐라 루시페라제 및 (ii) 파이어플라이(*Firefly*) 루시페라제이다.
- [0111] 한 구현예에서, 생물발광 공여체 분자는 레닐라 루시페라제(rLuc)이다. 본원에 사용된 바와 같은 레닐라 루시페라제라는 용어는 생물발광에 사용된 산화 효소를 지칭하며 레닐라 속의 유기체, 예컨대 레닐라 레니포르미스(*Renilla reniformis*) 또는 레닐라 몰레리(*Renilla mulleri*)로부터 유래된다. 이는 레닐라 유기체, 또는 그의 변이체로부터의 고유 루시페라제, 예를 들어 레닐라 레니포르미스 루시페라제(Rluc) 또는 그의 변이체의 고유 형태(아미노산 서열 면에서) 예컨대 RlucII, Rluc3, 녹색 레닐라 루시페라제 또는 Rluc8을 포함한다. "RlucI"라는 용어는 고유 레닐라 루시페라제에 비해 하기 아미노산 치환: A55T, C124A 및 M185V를 포함하는 레닐라 레니포르미스 루시페라제의 돌연변이체 형태를 지칭한다. 한 구현예에서, RlucII는 도 9c에 도시된 서열을 포함한다. "Rluc8"이라는 용어는 고유 레닐라 레니포르미스 루시페라제에 비해 하기 아미노산 치환: A55T, C124A, S130A, K136R, A143M, M185V, M253L, 및 S287L을 포함하는 레닐라 레니포르미스 루시페라제의 돌연변이체 형태를 지칭한다. 고유 레닐라 몰레리 루시페라제의 아미노산 서열은 GenBank 수탁 번호 AAG54094.1에 개시

되어 있다.

[0112] 이들 효소에 대한 천연 및 합성 발광성 기질은 당업계에 널리 알려져 있고 상업적으로 입수가능하다. 루시페라제 기질의 예는 루시페린(예를 들어, D-루시페린 및 그의 염, 라티아 루시페린, 박테리아 루시페린, 디노플라젤레이트 루시페린 등), 코엘렌테라진, 코엘렌테라진 h, 코엘렌테라진 e, 코엘렌테라진 f, 코엘렌테라진 fcp, 코엘렌테라진 cp, 코엘렌테라진 hcp, 코엘렌테라진 i, 코엘렌테라진 ip, 코엘렌테라진 n, 코엘렌테라진 400a(Deepblue™), 메톡시 e-코엘렌테라진(NanoLight Technology®로부터의 Prolume® Purple I), 메톡시-코엘렌테라진-메톡시(NanoLight Technology®로부터의 Prolume® Purple II), 메톡시-코엘렌테라진-F(NanoLight Technology®로부터의 Prolume® Purple III), 메톡시-코엘렌테라진-요오딘(NanoLight Technology®로부터의 Prolume® Purple), 메톡시-v-코엘렌테라진- 메톡시(NanoLight Technology®로부터의 Prolume® Purple V), ViviRen™(Promega®로부터 입수)을 포함한다. 생물발광 공여체 분자의 적합한 기질은 생물발광 단백질에 의해 방출된 광의 원하는 파장 및/또는 강도에 기초하여 당업자에 의해 선택될 수 있다. 한 구현예에서, 루시페라제 기질은 코엘렌테라진-h, 메톡시 e-코엘렌테라진 또는 코엘렌테라진 400A이다.

[0113] 본원에 사용된 바와 같이, 형광 수용체 분자라는 용어는 생물발광 공여체 분자의 활성의 결과로서 방출된 에너지를 수용하고, 이를 광 에너지로서 재방출할 수 있는 임의의 화합물을 지칭한다. 대표적인 형광 수용체 단백질은 녹색 형광 단백질(GFP), 녹색 형광 단백질의 변이체(예컨대 GFP10), 청색 형광 단백질(BFP), 시안 형광 단백질(CFP), 황색 형광 단백질(YFP), 강화된 GFP(EGFP), 강화된 CFP(ECFP), 강화된 YFP(EYFP), GFPS65T, mAmetrine, LSS-mOrange, LSS-mKate, 에메랄드, 토파즈, GFPuv, 불안정화된 EGFP(dEGFP), 불안정화된 ECFP(dECFP), 불안정화된 EYFP(dEYFP), HcRed, t-HcRed, DsRed, DsRed2, mRFP1, 포실로포린, 레닐라 GFP(rGFP), 몬스터 GFP, paGFP, 카에테 단백질 또는 피코빌리단백질, 또는 이들 중 임의의 하나의 생물학적으로 활성인 변이체 또는 단편을 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 가장 빈번하게 사용되는 생물발광 또는 형광단은 해파리 에쿼리아 빅토리아(*Aequorea victoria*)로부터의 GFP 및 예를 들어 돌연변이유발 및 키메라 단백질 기술로 수득된 수많은 다른 변이체(GFP)이다. GFP는 그들의 발색단의 독특한 성분에 기초하여 분류되며, 각각의 부류는 명확한 여기 및 방출 파장을 갖는다: 부류 1, 중성 페놀 및 음이온성 페놀레이트의 야생형 혼합물: 부류 2, 페놀레이트 음이온: 부류 3, 중성 페놀: 부류 4, 적층된 s-전자 시스템을 갖는 페놀레이트 음이온: 부류 5, 인돌: 부류 6, 이미다졸: 및 부류 7, 페닐.

[0114] 비-단백성 형광 수용체 분자의 예는 Alexa™(Molecular Probes), 플루오르 염료, Bodipy dye™(Life technologies), Cy dye™(Life technologies), 플루오레세인, 단실, 엠벨리페론(7-히드록시쿠마린), 형광 미소구체, 발광성 나노결정, Marina blue™(Life technologies), Cascade blue™(Life technologies), Cascade yellow™(Life technologies), Pacific Blue™(Life technologies), Oregon green™(Life technologies), 테트라메틸로다민, 로다민, Texas red™(Life technologies), 희토류 원소 킬레이트, 또는 그의 임의의 조합 또는 유도체이다.

[0115] 다른 대표적인 형광 수용체 분자는 하기를 포함할 있으나 이에 제한되지는 않는다: sgGFP, sgBFP, BFP 청색-이동 GFP(Y66H), 시안 GFP, DsRed, 단량체 RFP, EBFP, ECFP, GFP(S65T), GFP 적색-이동(rsGFP), 비-UV 여기(wtGFP), UV 여기(wtGFP), GFPuv, HcRed, rsGFP, 사파이어 GFP, sgBFP™, sgBFP™(수퍼 글로 BFP), sgGFP™, sgGFP™(수퍼 글로 GFP), 옐로 GFP, 반도체 나노입자(예를 들어, 라만 나노입자), 1,5 IAEDANS; 1,8-ANS; 4-메틸엠벨리페론; 5-카르복시-2,7-디클로로플루오레세인; 5-카르복시플루오레세인(5-FAM); 5-카르복시나프토폴루오레세인; 5-카르복시 테트라메틸로다민(5-TAMRA); 5-FAM(5-카르복시플루오레세인); 5-HAT(히드록시 트립타민); 5-히드록시 트립타민(HAT); 5-ROX(카르복시-X-로다민); 5-TAMRA(5-카르복시테트라메틸로다민); 6-카르복시로다민 6G; 6-CR 6G; 6-JOE; 7-아미노-4-메틸쿠마린; 7-아미노악티노마이신 D(7-AAD); 7-히드록시-4-메틸쿠마린; 9-아미노-6-클로로-2-메톡시아크리딘; ABQ; 산성 폭신; ACMA(9-아미노-6-클로로-2-메톡시아크리딘); 아크리딘 오렌지; 아크리딘 레드; 아크리딘 옐로; 아크리플라빈; 아크리플라빈 포일겐 SITS A; 에쿼린(발광단백질); AFP(자동형광 단백질; Quantum Biotechnologies); Alexa Fluor 350™; Alexa Fluor 430™; Alexa Fluor 488™; Alexa Fluor 532™; Alexa Fluor 546™; Alexa Fluor 568™; Alexa Fluor 594™; Alexa Fluor 633™; Alexa Fluor 647™; Alexa Fluor 660™; Alexa Fluor 680™; 알리자린 콤플렉손; 알리자린 레드; 알로피코시아닌(APC); AMC, AMCA-S; AMCA(아미노메틸쿠마린); AMCA-X; 아미노악티노마이신 D; 아미노쿠마린; 아미노메틸쿠마린(AMCA); 아닐린 블루; 안트로실 스테아레이트; APC(알로피코시아닌); APC-Cy7; APTRA-BTC; APTS; 아스트라존 브릴리언트 레드 4G; 아스트라존 오렌지 R; 아스트라존 레드 6B; 아스트라존 옐로 7 GLL; 아타브린; ATTO-TAG™ CBQCA; ATTO-TAG™ FQ; 아우라민; 아우로포스핀 G; 아우로포스핀; BAO 9(비스아미노페닐옥사디아졸); BCECF(높은 pH); BCECF(낮은 pH); 베르베린 술페이트; 베타 락타마제; 비메인; 비스벤즈아미드; 비스벤즈아미드(회호스

트); 비스-BTC; 블란코포르 FFG; 블란코포르SV; BOBOTM-1 ; BOBOTM-3; 보디피 492/515; 보디피 493/503; 보디피 500/510; 보디피 505/515; 보디피 530/550; 보디피 542/563; 보디피 558/568; 보디피 564/570; 보디피 576/589; 보디피 581/591; 보디피 630/650-X; 보디피 650/665-X; 보디피 665/676; 보디피 F1; 보디피 FL ATP; 보디피 F1-세라마이드; 보디피 R6G SE; 보디피 TMR; 보디피 TMR-X 접합체; 보디피 TMR-X, SE; 보디피 TR; 보디피 TR ATP; 보디피 TR-X SE; BO-PROTM-1 ; BO-PROTM-3; 브릴리언트 술폴플라빈 FF; BTC; BTC-5N; 칼세인; 칼세인 블루; Calcium CrimsonTM; 칼슘 그린; 칼슘 그린-1 Ca²⁺ 염료; 칼슘 그린-2 Ca²⁺; 칼슘 그린-5N Ca²⁺; 칼슘 그린-C18 Ca²⁺; 칼슘 오렌지; 칼코플루오르 화이트; 카르복시-X-로다민(5-ROX); Cascade BlueTM; 캐스캐이드 옐로; 카테콜아민; CCF2(진블레이저); CFDA; 클로로필; 크로모마이신 A; 크로모마이신 A; CL-NERF; CMFDA; 쿠마린 팔로이딘; C-피코시아닌; CPM 메틸쿠마린; CTC; CTC 포르마잔; Cy2TM; Cy3.18; Cy3.5TM; Cy3TM; Cy5.18; Cy5.5TM; Cy5TM; Cy7TM; 사이클릭 AMP 플루오로센서(FiCRhR); 답실; 단실; 단실 아민; 단실 카다베린; 단실 클로라이드; 단실 DHPE; 단실 플루오라이드; DAPI; 다폭실; 다폭실 2; 다폭실 3'DCFDA; DCFH(디클로로디히드로플루오레세인 디아세테이트); DDAO; DHR(디히도로다민 123); Di-4-ANEPPS; Di-8-ANEPPS(비-비율); DiA(4-디-16-ASP); 디클로로디히드로플루오레세인 디아세테이트(DCFH); DiD-친유성 트레이서; DiD(DiIC18(5)); DIDS; 디히드로로다민 123(DHR); DiI(DiIC18(3)); 디니트로페놀; DiO(DiOC18(3)); DiR; DiR(DiIC18(7)); DM-NERF(높은 pH); DNP; 도파민; DTAF; DY-630-NHS; DY-635-NHS; ELF 97; 에오신; 에리트로신; 에리트로신 ITC; 에티뎀 브로마이드; 에티뎀 호모다이어-1(EthD-1); 유크리신; 유코라이트; 유로폼(III) 클로라이드; EYFP; 패스트 블루; FDA; 포일젠(파라로사닐린); FIF(포름알데히드 유도된 형광); FITC; 플라조 오렌지; 플루오-3; 플루오-4; 플루오레세인(FITC); 플루오레세인 디아세테이트; 플루오로-에메랄드; 플루오로-골드(히드록시스티발바미딘); 플루오르-루비; 플루오르 X; FM 1-43TM; FM 4-46; Fura RedTM(높은 pH); Fura RedTM/플루오-3; 푸라-2; 푸라-2/BCECF; 게나크릴 브릴리언트 레드 B; 게나크릴 브릴리언트 옐로 10GF; 게나크릴 핑크 3G; 게나크릴 옐로 5GF; 진블레이저(CCF2); 글록살산; 그레놀 블루; 해마토포르피린; 회흐스트 33258; 회흐스트 33342; 회흐스트 34580; HPTS; 히드록시쿠마린; 히드록시스티발바미딘(플루오로골드); 히드록시트리판틴; 인도-1, 고 칼슘; 인도-1, 저 칼슘; 인도디카르보시아닌(DiD); 인도트리카르보시아닌(DiR); 인트라화이트 Cf; JC-1; JO-JO-1; JO-PRO-1; 레이저프로; 라우로단; LDS 751(DNA); LDS 751(RNA); 류코포르 PAF; 류코포르 SF; 류코포르 WS; 리사민 로다민; 리사민 로다민 B; 칼세인/에티뎀 호모다이어; LOLO-1; LO-PRO-1; 루시퍼 옐로; 리소 트랙커 블루; 리소 트랙커 블루-화이트; 리소 트랙커 그린; 리소 트랙커 레드; 리소 트랙커 옐로; 리소센서 블루; 리소센서 그린; 리소센서 옐로/블루; 매그 그린; 매그달라 레드(플록신 B); 매그-푸라 레드; 매그-푸라-2; 매그-푸라-5; 매그-인도-1; 마그네슘 그린; 마그네슘 오렌지; 말라키트 그린; 마리나 블루; 맥실론 브릴리언트 플라빈 10 GFF; 맥실론 브릴리언트 플라빈 8 GFF; 메로시아닌; 메톡시쿠마린; 미토틱렉터 그린 FM; 미토틱렉터 오렌지; 미토틱렉터 레드; 미트라마이신; 모노브로모비메인; 모노브로모비메인(mBBR-GSH); 모노클로로비메인; MPS(메틸 그린 피로닌 스틸벤); NBD; NBD 아민; 닐 레드; 니트로벤즈옥사디올; 노르아테날린; 뉴클레어 패스트 레드; 뉴클레어 옐로; 닐로산 브릴리언트 라빈 E8G; 오레곤 그린; 오레곤 그린 488-X; Oregon GreenTM; Oregon GreenTM 488; Oregon GreenTM 500; Oregon GreenTM 514; 퍼시픽 블루; 파라로사닐린(포일젠); PBF1; PE-Cy5; PE-Cy7; PerCP; PerCP-Cy5.5; PE-텍사스레드[레드 613]; 플록신 B(매그달라 레드); 포르위트 AR; 포르위트 BKL; 포르위트 Rev; 포르위트 RPA; 포스핀 3R; 포토레지스트; 피코에리트린 B[PE]; 피코에리트린 R[PE]; PKH26(Sigma); PKH67; PMIA; 폰토크롬 블루 블랙; POPO-1; POPO-3; PO-PRO-1 ; PO-PRO-3; 프리물린; 프로시온 옐로; 프로피뎀 요오다이드(PI); PyMPO; 피렌; 피로닌; 피로닌 B; 피로잘 브릴리언트 플라빈 7GF; QSY 7; 퀴나크린 머스타드; 레드 613[PE-텍사스레드]; 레소루핀; RH 414; Rhod-2; 로다민; 로다민 110; 로다민 123; 로다민 5 GLD; 로다민 6G; 로다민 B; 로다민 B 200; 로다민 B 엑스트라; 로다민 BB; 로다민 BG; 로다민 그린; 로다민 팔리시딘; 로다민 팔로이딘; 로다민 레드; 로다민 WT; 로즈 뱅갈; R-피코시아닌; R-피코에리트린(PE); S65A; S65C; S65L; S65T; SBF1; 세로토닌; 세브론 브릴리언트 레드 2B; 세브론 브릴리언트 레드 4G; 세브론 브릴리언트 레드 B; 세브론 오렌지; 세브론 옐로 L; SITS; SITS(프리물린); SITS(스티벤 이소티오술포산); SNAFL 칼세인; SNAFL-1; SNAFL-2; SNARF 칼세인; SNARF1; 나트륨 그린; 스펙트럼아쿠아; 스펙트럼그린; 스펙트럼오렌지; 스펙트럼 레드; SPQ(6-메톡시-N-(3-술폴프로필)퀴놀리늄); 스틸벤; 술폴로다민 B can C; 술폴로다민 엑스트라; SYTO 11 ; SYTO 12; SYTO 13; SYTO 14; SYTO 15; SYTO 16; SYTO 17; SYTO 18; SYTO 20; SYTO 21; SYTO 22; SYTO 23; SYTO 24; SYTO 25; SYTO 40; SYTO 41 ; SYTO 42; SYTO 43; SYTO 44; SYTO 45; SYTO 59; SYTO 60; SYTO 61 ; SYTO 62; SYTO 63; SYTO 64; SYTO 80; SYTO 81; SYTO 82; SYTO 83; SYTO 84; SYTO 85; SYTOX 블루; SYTOX 그린; SYTOX 오렌지; 테트라사이클린; 테트라메틸로다민(TRITC); Texas RedTM; Texas Red-XTM 접합체; 티아디카르보시아닌(DISC3); 티아진 레드 R; 티아졸 오렌지; 티오플라빈 5; 티오플라빈 S; 티오플라빈 TCN; 티올라이트; 티오졸 오렌지; 티노폴 CBS(칼코플루오르 화이트); TMR; TO-PRO-1; TO-PRO-3; TO-PRO-5; TOTO-1; TOTO-3; 트리컬러(PE-

Cy5); TRITC 테트라메틸로다민이소티오시아네이트; 트루 블루; 트루레드; 울트라라이트; 우라닌 B; 우비텍스 SFC; WW 781; X-로다민; XRITC; 자일렌 오렌지; Y66F; Y66H; Y66W; YO-PRO-1 ; YO-PRO-3; YOYO-1; YOYO-3, SYBR 그린, 및 티아졸 오렌지(삼입 염료).

[0116] 한 구현예에서, 형광 수용체 분자는 레닐라 GFP(rGFP)이다. "레닐라 GFP"라는 용어는 레닐라 속, 예컨대 레닐라 레니포르미스 또는 레닐라 물레리의 유기체로부터 유래된 녹색 형광 단백질을 지칭한다. 이는 레닐라 유기체, 또는 그의 변이체로부터의 고유 GFP를 포함한다. 한 구현예에서, 레닐라 GFP는 레닐라 레니포르미스 GFP, 추가 구현예에서, 레닐라 레니포르미스 GFP의 고유 형태(아미노산 서열 면에서)이다. 한 구현예에서, rGFP는 도 9d에 도시된 서열을 포함한다. 고유 레닐라 물레리 GFP의 아미노산 서열은 GenBank 수탁 번호 AAG54098.1에 개시되어 있다. 레닐라 루시페라제 및/또는 레닐라 GFP의 핵산 서열은 인간 세포에서 발현을 위해 코돈-최적화될 수 있다(즉 "인간화", 예를 들어, 레닐라 물레리 GFP의 인간화 버전에 대해 WO 2002/057451 참조).

[0117] BRET에 적합한 생물발광 공여체 및 형광 수용체 분자의 대표적인 조합(BRET 쌍으로 지칭됨)은 루시페라제(Luc)/GFP, Luc/비너스, Luc/토파즈, Luc/GFP-10, Luc/GFP-2, Luc/YFP, Luc/rGFP 등을 포함한다. 다른 구현예에서, 하기 BRET 구성 중 하나가 본원에 기재된 바이오센서 및 방법에 사용된다: RlucII/coel-400a/강화된 청색(EB) FP2, RlucII/coel-400a/슈퍼 시안 형광 단백질(SCFP3A), RlucII/coel-400a/mAmetrine, RlucII/coel-400a/rGFP, RlucII/coel-400a/mAmetrine.

[0118] 한 구현예에서, 생물발광 공여체 분자는 레닐라 루시페라제이고 형광 수용체 분자는 레닐라 GFP이다.

[0119] 한 구현예에서, 제2 성분은 PM-표적화 모이어티를 포함한다. 본원에 사용된 바와 같은 "형질 막(PM) 표적화 모이어티"라는 용어는 생물발광 공여체 또는 형광 수용체 분자(예를 들어, 레닐라 GFP 또는 레닐라 Luc)를 PM에 동원 또는 격리할 수 있는 임의의 모이어티를 지칭한다. 따라서 생물발광 공여체 또는 형광 수용체 분자는 형질 막에서 발견된 임의의 단백질(예를 들어, PM에서 발견된 수용체 또는 임의의 다른 단백질), 또는 그의 단편에 융합될 수 있다. 이러한 단백질의 예는 많은 세포 유형에서 발견된 포낭(형질 막의 작은(50-100 nm) 함입에 상응하는 지질 뿔뿔 유형)의 주요 성분인 카베올린-1이다. CAV1 유전자의 대안적인 스플라이싱에 의해 생성된 카베올린-1의 2개의 이소형이 확인되었다: 카베올린-1 α (잔기 2-178 포함) 및 카베올린-1 β (32-178 서열에 상응). 이러한 모이어티의 다른 예는 단백질 지질화/지방산 아실화, 예컨대 미리스토일화, 팔미토일화 및 프레닐화, 뿐만 아니라 다염기성 도메인에 대한 신호 서열을 포함하는 펩티드/폴리펩티드를 포함한다. 여러 단백질은 미리스토일화, 팔미토일화 및/또는 프레닐화되는 것으로 알려져 있고(예를 들어, 단백질 키나제 및 포스포타제 예컨대 Yes, Fyn, Lyn, Lck, Hck, Fgr, G α 단백질, 산화 질소 신타제, ADP-리보실화 인자(ARF), 칼슘 결합 단백질 및 막 또는 세포골격-관련 구조 단백질 예컨대 MARCKS(예를 들어, Wright et al., *J Chem Biol.* Mar 2010; 3(1): 19-35; Alcart-Ramos et al., *Biochimica et Biophysica Acta(BBA) - Biomembranes*, Volume 1808, Issue 12, December 2011, Pages 2981-2994 참조), 따라서 이들 단백질 중 임의의 것으로부터의 미리스토일화, 팔미토일화 및 프레닐화(예를 들어, 게라닐게라닐화) 신호 서열은 바이오센서에서 사용될 수 있다. 한 구현예에서, 미리스토일화 및/또는 팔미토일화 서열은 Lyn 키나제로부터의 것이다.

[0120] 한 구현예에서, PM 막 표적화 모이어티는 CAAX 모티프(C는 시스테인 잔기이고, AA는 2개의 지방족 잔기이고, X는 임의의 아미노산을 나타냄)를 포함한다. CAAX 모티프는 번역후 변형을 지시하는 C-말단에서 특이적 아미노산 서열을 갖는 단백질의 그룹으로 정의된 "CAAX 단백질"에서 발견된다. CAAX 단백질은 핵 라민(중간 필라멘트) 예컨대 프리라민 A, 라민 B1 및 라민 B2, Ras 및 복수의 GTP-결합 단백질(G 단백질) 예컨대 Ras, Rho, Rac, 및 Cdc42, 여러 단백질 키나제 및 포스포타제 등을 포함하는 매우 다양한 분자를 포함한다(예를 들어, Gao et al., *Am J Transl Res.* 2009; 1(3): 312-325 참조). C-말단의 단부에서 CAAX 모티프 또는 박스를 갖는 단백질은 전형적으로 단백질이 형질 막 또는 핵 막으로 이동하여 상이한 기능을 발휘하기 전에 프레닐화 과정을 필요로 한다. 한 구현예에서, CAAX 박스는 인간 RAS 패밀리의 단백질, 예를 들어 HRAS, NRAS, Ral-A, KRAS4A 또는 KRAS4b로부터 유래한다. RAS, NRAS, KRAS4A 또는 KRAS4b의 마지막 C-말단 잔기(조가변 영역 또는 HVR로 지칭됨)는 하기 도시되며, 추정된 최소 형질 막 표적화 영역은 이탤릭체로 및 CAAX 박스는 밑줄로 표시되어 있다(예를 들어, Ahearn et al., *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13: 39-51, January 2012 참조): HRAS: KLNPPDESGPGCMSCCKVLS(서열번호: 41); NRAS: KLNSSDDGTQGCMGLPCVIM(서열번호: 42); KRAS4A: KISKEEKTPGCVKIKKCIIM(서열번호: 43); KRAS4B: KMSKDGAKKKKKSKTKCVIM(서열번호: 44); Ral-A/Ral1: KNGKKKRKSLAKRIRERCCIL(서열번호: 45). 한 구현예에서, PM 표적화 모이어티는 아미노산 서열 GCMSCCKVLS(서열번호: 60), GCMGLPCVIM(서열번호: 61), CVKIKKCIIM(서열번호: 62), KKKKKSKTKCVIM(서열번호: 63), 또는 KNGKKKRKSLAKRIRERCCIL(서열번호: 45)을 포함하고, 바람직하게는 PM 표적화 모이어티는 KRAS4B로부터의 서열

GKKKKKSKTKCVIM(서열번호:1)을 포함한다. 다른 구현예에서, PM 표적화 모이어티는 HRAS로부터의 형질 막 표적화 팔미토일화 서열 및 Ral-A/Ral1로부터의 프레닐화 신호 서열(서열: CMSCKCCIL, 서열번호: 4)을 포함한다.

[0121] 여러 단백질은 또한 PM을 표적으로 하는 비-지질, 다염기성 도메인 예컨대 Ras 소형 GTPases, 포스포타제 PTEN, 비수용체 티로신 키나제 Src, 액틴 조절인자 WASP 및 MARCKS, 및 G 단백질-결합 수용체 키나제(GRK) 예컨대 GRK5를 함유한다. 한 구현예에서, 다염기성 도메인은 GRK5로부터의 것이며, 서열 SPKKGLLQRLFKRQHQNNSKS(서열번호: 5)를 포함한다.

[0122] 한 구현예에서, 제2 성분은 엔도솜 표적화 모이어티를 포함한다. 본원에 사용된 바와 같은 "엔도솜 표적화 모이어티"라는 용어는 생물발광 공여체 또는 형광 수용체 분자를 엔도솜, 예를 들어, 초기 엔도솜에 동원 또는 격리할 수 있는 임의의 모이어티를 지칭한다. 여러 엔도솜 표적화 모이어티/마커가 당업계에 알려져 있으며 단백질의 Rab 패밀리(RAB4, RAB5, RAB7, RAB9 및 RAB11), 만노스 6-포스페이트 수용체(M6PR), 카베올린-1 및 -2, 트랜스페린 및 그의 수용체, 클라트린, 뿐만 아니라 FYVE 도메인 예컨대 초기 엔도솜 자가항원 1(EEA1), 라베노신-5, 수용체 활성화를 위한 Smad 앵커(SARA), Vps27p 및 엔도핀을 포함하는 단백질을 포함한다. 일부 마커는 초기 엔도솜에 보다 특이적이고(예를 들어, RAB4, 트랜스페린 및 그의 수용체, 및 FYVE 도메인을 포함하는 단백질), 다른 마커는 후기 엔도솜에 보다 특이적이며(예를 들어, RAB7, RAB9, 및 M6PR), 다른 마커는 재순환 엔도솜에 보다 특이적이다(예를 들어, RAB11, RAB4). 따라서, 이들 단백질 또는 적합한 그의 단편은 생물발광 공여체 분자(예를 들어, 레닐라 Luc) 또는 형광 수용체 분자(예를 들어, 레닐라 GFP)에 융합되어 그들을 엔도솜 국부화에 연결/표적할 수 있다.

[0123] 한 구현예에서, 엔도솜 표적화 모이어티는 FYVE 도메인을 포함한다. FYVE 도메인은 3개의 보존된 요소에 의해 정의된다: N-말단 WxxD, 중앙 RR/KHHCR, 및 C-말단 RVC 모티프. FYVE 도메인을 함유하는 인간 단백질의 예는 ANKFY1, EEA1 FGD1, FGD2, FGD3, FGD4, FGD5, FGD6, FYCO1, HGS MTMR3, MTMR4, PIKFYVE, PLEKHF1, PLEKHF2, RUFY1, RUFY2, WDF3, WDFY1, WDFY2, WDFY3, ZFYVE1, ZFYVE16, ZFYVE19, ZFYVE20, ZFYVE21, ZFYVE26, ZFYVE27, ZFYVE28 및 ZFYVE9(EMBL-EBI, 패밀리 FYVE(PF01363))를 포함한다. 한 구현예에서, 엔도솜 표적화 모이어티는 인간 ZFYVE16/엔도핀의 FYVE 도메인(UniProtKB - Q7Z3T8, 서열번호: 39), 예를 들어 약 잔기 747 내지 805 또는 약 잔기 739 내지 806 인간 엔도핀을 포함한다.

[0124] 한 구현예에서, 제2 성분은 골지 표적화 모이어티를 포함한다. 본원에 사용된 바와 같은 "골지 표적화 모이어티"라는 용어는 생물발광 공여체 또는 형광 수용체 분자를 골지 기관에 동원 또는 격리할 수 있는 임의의 모이어티를 지칭한다. 여러 골지 표적화 모이어티/마커가 당업계에 알려져 있으며 eNOS(예를 들어, 그의 N-말단 부분, J. Liu *et al.*, Biochemistry, 35(1996), pp. 13277-13281), GM130, 골지n-97, 58K 단백질, 트랜스-골지 네트워크 막 단백질 2(TGOLN2), TGN46, TGN38, 만노시다제 2, 신타신 6, GM130(GOLGA2), Golgin-160, 멤브린(GS27), GS28, 코토머 단백질, Rbet1 및 RCAS1을 포함한다. 따라서, 이들 단백질 또는 적합한 그의 단편은 레닐라 Luc 또는 레닐라 GFP에 융합되어 그들을 골지 기관 국부화에 연결/표적할 수 있다. 한 구현예에서, 골지 표적화 모이어티는 인간 eNOS 단백질의 N-말단 부분(서열번호:46), 예를 들어 인간 eNOS1의 잔기 1 내지 73.

[0125] 한 구현예에서, (i) PM-표적화 모이어티, 엔도솜-표적화 모이어티 또는 골지-표적화 모이어티와 (ii) GASIP 사이에 직접 단백질-단백질 상호작용은 없다.

[0126] 생물발광 공여체 또는 형광 수용체 분자는 표적화 모이어티에 대해 N-말단, 내부 또는 C-말단에 융합될 수 있다. 한 구현예에서, PM 표적화 모이어티는 상기 생물발광 공여체 또는 형광 수용체 분자의 C-말단 단부에 융합된다. 한 구현예에서, PM 표적화 모이어티는 형광 수용체 분자, 바람직하게는 형광 수용체 분자의 C-말단 단부에 융합된다. 한 구현예에서, 엔도솜 표적화 모이어티는 상기 생물발광 공여체 또는 형광 수용체 분자의 C-말단 단부에, 추가 구현예에서 상기 형광 수용체 분자의 C-말단 단부에 융합된다.

[0127] 생물발광 공여체 또는 형광 수용체 분자는 GASIP에 대해 N-말단, 내부, 또는 C-말단에 융합될 수 있다. 한 구현예에서, 생물발광 공여체 또는 형광 수용체 분자는 GASIP의 N-말단 단부에 융합된다. 다른 구현예에서, 생물발광 공여체 또는 형광 수용체 분자는 GASIP의 C-말단 단부에 융합된다. 추가 구현예에서, 생물발광 공여체 분자는 GASIP에, 바람직하게는 GASIP의 C-말단 단부에 융합된다.

[0128] "Rap1GAP의 G 단백질-결합 도메인"이라는 용어는 Gi 패밀리의 Gα 서브유닛 단백질(들)에 결합하는 능력을 갖는, Rap1 GTPase-활성화 단백질 1(Rap1GAP) 단백질의 도메인(UniProt 수탁 번호 P47736, 서열번호:47), 또는 그의 변이체를 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다. Rap1GAP의 G 단백질-결합 도메인은 Rap1GAP의 N-말단 부분에 위치하며, 예를 들어 고유 Rap1GAP로부터 적어도 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 또는 400개 잔기를 포함한다.

다. Rap1GAP의 G 단백질-결합 도메인은 Gα 서브유닛 단백질에 대한 결합을 방해하지 않는 하나 이상의 돌연변이를 포함할 수 있다. 한 구현예에서, Rap1GAP의 G 단백질-결합 도메인은 Gi 패밀리의 Gα 서브유닛 단백질(들)에 결합하는 능력을 보유하는 고유 Rap1GAP의 잔기 1 내지 420 또는 1 내지 436, 또는 그의 변이체를 포함한다. 다른 구현예에서, Rap1GAP의 G 단백질-결합 도메인은 Gi 패밀리의 Gα 서브유닛 단백질(들)에 결합하는 능력을 보유하는 잔기 1 내지 442, 또는 그의 변이체를 포함한다. 한 구현예에서, Rap1GAP의 G 단백질-결합 도메인은 생물발광 공여체 분자의 N-말단 단부에 융합된다.

[0129] 다른 구현예에서, Rap1GAP의 G 단백질-결합 도메인은 키나제 활성화(예를 들어, 단백질 키나제 A)와 같은 다운스트림 신호전달 사건에 대한 그의 민감도를 감소시키는 돌연변이를 포함한다. 키나제 활성화와 같은 다운스트림 신호전달 사건에 대한 민감도의 이러한 감소는 추정되는 인산화 부위 중 하나 이상의 돌연변이(들)(예를 들어, 결실, 치환)의 도입, 예를 들어 고유 Rap1GAP의 위치 431, 437, 439 및/또는 441에서 세린 잔기에 의해 달성될 수 있다. 추가 구현예에서, 위치 437, 439 및/또는 441에서 세린 잔기 중 하나 이상은 Rap1GAP의 G 단백질-결합 도메인에서 돌연변이되며, 바람직하게는 위치 437, 439 및/또는 441에서 세린 잔기 중 적어도 2개는 Rap1GAP의 G 단백질-결합 도메인에서 돌연변이되고, 보다 바람직하게는 위치 437, 439 및 441에서 모든 3개의 세린 잔기가 돌연변이된다. 추가 구현예에서, 돌연변이는 예를 들어 인산화될 수 없는 아미노산, 예를 들어 알라닌 잔기에 의한 치환이다. 한 구현예에서, 위치 437, 439 및 441에서 모든 3개의 세린 잔기는 Rap1GAP의 G 단백질-결합 도메인에서 알라닌으로 치환된다. 한 구현예에서, Rap1GAP의 G 단백질-결합 도메인은 도 9a 및 도 9b에 도시된 서열 중 하나를 포함한다.

[0130] 본원에 사용된 바와 같은 "G-단백질 신호전달 조절인자(RGS) 단백질의 G 단백질-결합 도메인"이라는 용어는 Gi 패밀리의 Gα 서브유닛 단백질(들)에 결합하는 능력을 갖는 RGS 단백질의 도메인, 또는 그의 변이체를 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다. RGS 단백질은 RGS-박스 또는 RGS 도메인을 포함하는 22개 단백질(RGS1-RGS22)의 패밀리(PROSITE 엔트리 PS50132)이다. RGS 단백질의 G 단백질-결합 도메인은 Gi 패밀리의 Gα 서브유닛 단백질(들)에 결합하는 능력을 보유하는 RGS 단백질로부터의 적어도 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 또는 400개 잔기, 또는 그의 변이체를 포함할 수 있다. 한 구현예에서, GASIP는 Gi 패밀리의 Gα 서브유닛 단백질(들)에 결합하는 능력을 갖는 RZ/A 하위패밀리의 RGS 단백질, 바람직하게는 RGS17(RGSZ2, UniProt 수탁 번호 Q9UGC6, 서열번호:17), RGS19(GAIP, UniProt 수탁 번호 P49795, 서열번호:18) 또는 RGS20(RGSZ1, UniProt 수탁 번호 O76081, 서열번호:19)의 G 단백질-결합 도메인, 또는 그의 변이체를 포함한다. 한 구현예에서, RGS17의 G 단백질-결합 도메인은 Gi 패밀리의 Gα 서브유닛 단백질(들)에 결합하는 능력을 갖는 고유 RGS17의 잔기 84-200 또는 그의 변이체를 포함한다. 한 구현예에서, RGS17의 G 단백질-결합 도메인은 Gi 패밀리의 Gα 서브유닛 단백질(들)에 결합하는 능력을 갖는 고유 RGS17의 잔기 64-210 또는 그의 변이체를 포함한다. 한 구현예에서, RGS19의 G 단백질-결합 도메인은 Gi 패밀리의 Gα 서브유닛 단백질(들)에 결합하는 능력을 갖는 고유 RGS19의 잔기 90-206 또는 그의 변이체를 포함한다. 한 구현예에서, RGS19의 G 단백질-결합 도메인은 Gi 패밀리의 Gα 서브유닛 단백질(들)에 결합하는 능력을 갖는 고유 RGS19의 잔기 70-217 또는 그의 변이체를 포함한다. 한 구현예에서, RGS20의 G 단백질-결합 도메인은 Gi 패밀리의 Gα 서브유닛 단백질(들)에 결합하는 능력을 갖는 고유 RGS20의 잔기 242-388 또는 그의 변이체를 포함한다. 한 구현예에서, RGS 단백질의 G 단백질-결합 도메인은 생물발광 공여체 분자의 N-말단 단부에 융합된다.

[0131] 본원에 기재된 시스템/방법에 사용될 수 있는 Gi 패밀리의 Gα 서브유닛 단백질(들)에 결합하는 도메인을 포함하는 다른 단백질은 종양 괴사 인자-알파(TNFα)-유도 단백질 8(TNFAIP8, UniProtKB 수탁 번호 O95379, 서열번호: 48)이다.

[0132] "P63RhoGEF의 G 단백질-결합 도메인"이라는 용어는 Gq 패밀리의 Gα 서브유닛 단백질(들)에 결합하는 능력을 갖는 P63RhoGEF(Rho 구아닌 뉴클레오티드 교환 인자 25) 단백질의 도메인(UniProt 수탁 번호 Q86VW2, 서열번호:25), 또는 그의 변이체를 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다. P63RhoGEF의 G 단백질-결합 도메인은 P63RhoGEF의 C-말단 부분에 위치하며, 예를 들어 Gq 패밀리의 Gα 서브유닛 단백질(들)에 결합하는 능력을 보유하는 고유 P63RhoGEF로부터의 적어도 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 또는 400개 잔기, 또는 그의 변이체를 포함한다. P63RhoGEF의 G 단백질-결합 도메인은 Gα 서브유닛 단백질에 대한 결합을 방해하지 않는 하나 이상의 돌연변이를 포함할 수 있다. 한 구현예에서, P63RhoGEF의 G 단백질-결합 도메인은 Gq 패밀리의 Gα 서브유닛 단백질(들)에 결합하는 능력을 보유하는 고유 P63RhoGEF의 잔기 348 내지 466, 또는 그의 변이체를 포함한다. 다른 구현예에서, P63RhoGEF의 G 단백질-결합 도메인은 Gq 패밀리의 Gα 서브유닛 단백질(들)에 결합하는 능력을 보유하는 고유 P63RhoGEF의 잔기 295 내지 502, 또는 그의 변이체를 포함한다. 한 구현예에서, P63RhoGEF의

G 단백질-결합 도메인은 생물발광 공여체 분자의 N-말단 단부에 융합된다.

- [0133] "GRK2의 G 단백질-결합 도메인"이라는 용어는 Gq 패밀리의 G α 서브유닛 단백질(들)에 결합하는 능력을 갖는 GRK2(베타-아드레날린 수용체 키나제 1) 단백질의 도메인(UniProt 수탁 번호 P25098, 서열번호: 27), 또는 그의 변이체를 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다. GRK2의 G 단백질-결합 도메인은 GRK2의 N-말단 부분에 위치하며, 예를 들어 Gq 패밀리의 G α 서브유닛 단백질(들)에 결합하는 능력을 보유하는 고유 GRK2로부터의 적어도 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 또는 400개 잔기, 또는 그의 변이체를 포함한다. GRK2의 G 단백질-결합 도메인은 G α 서브유닛 단백질에 대한 결합을 방해하지 않는 하나 이상의 돌연변이를 포함할 수 있다. 한 구현예에서, GRK2의 G 단백질-결합 도메인은 Gq 패밀리의 G α 서브유닛 단백질(들)에 결합하는 능력을 보유하는 고유 GRK2의 잔기 54 내지 175, 또는 그의 변이체를 포함한다. 다른 구현예에서, GRK2의 G 단백질-결합 도메인은 Gq 패밀리의 G α 서브유닛 단백질(들)에 결합하는 능력을 보유하는 고유 GRK2의 잔기 30 내지 203, 또는 그의 변이체를 포함한다. 한 구현예에서, GRK2의 G 단백질-결합 도메인은 생물발광 공여체 분자의 C-말단 단부에 융합된다.
- [0134] 본원에 기재된 시스템/방법에 사용될 수 있는 Gq 패밀리의 G α 서브유닛 단백질(들)에 결합하는 도메인을 포함하는 다른 단백질은 GRK3(예를 들어, 잔기 ~54-175), PLC β 단백질, RGS 단백질(예를 들어, RGS2, 잔기 ~83-199), TRP1 및 다른 RhoGEF 단백질(예를 들어, 삼중 기능성 도메인 단백질, TRIO)을 포함한다. 상기 정의된 바와 같은 Gq 패밀리의 G α 서브유닛 단백질(들)에 결합하는 능력을 보유하는 이들 도메인 또는 그의 변이체를 포함하는 폴리펩티드가 본원에 기재된 시스템/방법에 사용될 수 있다.
- [0135] "PDZRhoGEF의 G 단백질-결합 도메인"이라는 용어는 G12/13 패밀리의 G α 서브유닛 단백질(들)에 결합하는 능력을 갖는 PDZRhoGEF(Rho 구아닌 뉴클레오티드 교환 인자 11) 단백질의 도메인(UniProt 수탁 번호 015085, 서열번호:21), 또는 그의 변이체를 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다. PDZRhoGEF의 G 단백질-결합 도메인은 PDZRhoGEF의 중앙 부분에 위치하며, 예를 들어 G12/13 패밀리의 G α 서브유닛 단백질(들)에 결합하는 능력을 보유하는 고유 PDZRhoGEF로부터의 적어도 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 또는 400개 잔기, 또는 그의 변이체를 포함한다. PDZRhoGEF의 G 단백질-결합 도메인은 G α 서브유닛 단백질에 대한 결합을 방해하지 않는 하나 이상의 돌연변이를 포함할 수 있다. 한 구현예에서, PDZRhoGEF의 G 단백질-결합 도메인은 G12/13 패밀리의 G α 서브유닛 단백질(들)에 결합하는 능력을 보유하는 고유 PDZRhoGEF의 잔기 306 내지 486, 또는 그의 변이체를 포함한다. 다른 구현예에서, PDZRhoGEF의 G 단백질-결합 도메인은 G12/13 패밀리의 G α 서브유닛 단백질(들)에 결합하는 능력을 보유하는 고유 PDZRhoGEF의 잔기 281 내지 483, 또는 그의 변이체를 포함한다. 한 구현예에서, PDZRhoGEF의 G 단백질-결합 도메인은 생물발광 공여체 분자의 N-말단 단부에 융합된다.
- [0136] "P115RhoGEF의 G 단백질-결합 도메인"이라는 용어는 G12/13 패밀리의 G α 서브유닛 단백질(들)에 결합하는 능력을 갖는 P115RhoGEF(Rho 구아닌 뉴클레오티드 교환 인자 1) 단백질의 도메인(UniProt 수탁 번호 Q92888, 서열번호:23), 또는 그의 변이체를 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다. P115RhoGEF의 G 단백질-결합 도메인은 P115RhoGEF의 N-말단 부분에 위치하며, 예를 들어 G12/13 패밀리의 G α 서브유닛 단백질(들)에 결합하는 능력을 보유하는 고유 P115RhoGEF로부터의 적어도 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 또는 400개 잔기, 또는 그의 변이체를 포함한다. P115RhoGEF의 G 단백질-결합 도메인은 G α 서브유닛 단백질에 대한 결합을 방해하지 않는 하나 이상의 돌연변이를 포함할 수 있다. 한 구현예에서, P115RhoGEF의 G 단백질-결합 도메인은 G12/13 패밀리의 G α 서브유닛 단백질(들)에 결합하는 능력을 보유하는 고유 P115RhoGEF의 잔기 41 내지 232, 또는 그의 변이체를 포함한다. 다른 구현예에서, P115RhoGEF의 G 단백질-결합 도메인은 G12/13 패밀리의 G α 서브유닛 단백질(들)에 결합하는 능력을 보유하는 고유 P115RhoGEF의 잔기 1 내지 244, 또는 그의 변이체를 포함한다. 한 구현예에서, P115RhoGEF의 G 단백질-결합 도메인은 생물발광 공여체 분자의 N-말단 단부에 융합된다.
- [0137] 본원에 기재된 시스템/방법에 사용될 수 있는 G12/13 패밀리의 G α 서브유닛 단백질(들)에 결합하는 도메인을 포함하는 다른 단백질은 RhoGEF 예컨대 Rho 구아닌 뉴클레오티드 교환 인자 12(LARG, UniProtKB 수탁 번호 Q9NZN5, 서열번호:49)(예를 들어, 잔기 ~367-558), JNK-상호작용 류신 지퍼 단백질(JLP, C-말단 부분) 카데린 단백질, AXIN1(UniProtKB 수탁 번호 015169, 서열번호: 50, 잔기 ~88-212, G12에 대해 보다 선택적), PP2A(G12에 대해 보다 선택적), 알파-가용성 NSF 부착 단백질(알파SNAP, UniProtKB 수탁 번호 P54920, 서열번호: 51, N-말단 부분, G12에 대해 보다 선택적), 폴리시스틴-1(UniProtKB 수탁 번호 P98161, 서열번호: 52, G12에 대해 보다 선택적), RGS16(UniProtKB 수탁 번호 015492, 서열번호: 53, N-말단 부분, G13에 대해 보다 선택적), AKAP110(UniProtKB 수탁 번호 075969, 서열번호: 54, C-말단 부분, G13에 대해 보다 선택적), HS1-관련 단백질 X1(HAX1, UniProtKB 수탁 번호 000165, 서열번호: 55, 잔기 ~176-247, G13에 대해 보다 선택적)을 포함한다. 상기 정의된 바와 같은 G12/13 패밀리의 G α 서브유닛 단백질(들)에 결합하는 능력을 보유하는 이들 도메인 또

는 그의 변이체를 포함하는 폴리펩티드는 본원에 기재된 시스템/방법에 사용될 수 있다. 서브유닛 중 하나(G12 또는 G13)에 대해 보다 선택적인 도메인을 사용하는 것은 내인성 G12 또는 G13 단백질의 선택적 활성화를 평가하는데 유용할 수 있다.

- [0138] Gs 패밀리의 G α 서브유닛 단백질(들)에 결합하는 도메인은 SNX13(RGS-PX1, UniProtKB 수탁 번호 Q9Y5W8, 서열 번호: 56, 잔기 ~373-496), AXIN1(UniProtKB 수탁 번호 O15169, 서열번호: 50, 잔기 ~88-211) 또는 TPR1(테트라트리카코펩티드 반복 도메인 1, UniProtKB 수탁 번호 Q99614, 서열번호: 57, C-말단 부분)을 포함한다. 한 구현예에서, Gs 패밀리의 G α 서브유닛 단백질은 막-고정 XL(알파) 서브유닛이다.
- [0139] 한 구현예에서, GASIP의 길이는 약 50, 75 또는 100개 아미노산 내지 약 500, 600, 700 또는 800개 아미노산, 예를 들어 약 100 또는 150개 아미노산 내지 약 200, 250, 300, 350, 400 또는 500개 아미노산이다.
- [0140] 한 구현예에서, GASIP는 Rap1GAP, RGS 단백질(예를 들어, RGS17, 19 또는 20), P63RhoGEF, GRK2, PDZRhoGEF 또는 P115RhoGEF의 전장 서열을 포함하지 않으며, 즉, 전장 단백질에 대한 하나 이상의 돌연변이(치환, 결실 등)를 포함한다. 한 구현예에서, GASIP는 PM으로 동원 또는 고정에 수반되는 잔기 또는 도메인, 예를 들어, 미리스토일화, 팔미토일화 및/또는 프레닐화 신호 서열이 결합되어 있다. 이들 단백질의 절단된 및/또는 돌연변이된 버전을 사용하는 것은 유리하게는 다운스트림 신호전달 사건(예를 들어, 키나제 활성화)의 효과를 최소화하고/하거나 G 단백질 활성화시 GASIP의 상이한 구획으로의 적절한 국부화(시토졸) 및 전위를 보장할 수 있게 하며, 이는 검정의 신뢰도 및/또는 민감도를 개선시킨다.
- [0141] 한 구현예에서, 본원에 기재된 시스템은 재조합 G α 단백질 서브유닛을 추가로 포함한다. 본원에 정의된 바와 같은 G α 단백질 서브유닛은 17개의 상이한 알려진 이소형, 그들의 스플라이스 변이체, 및 임의의 돌연변이된 G α 단백질, 예를 들어 비-선택적/무차별 G α 를 초래하는 것들을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일 비제한적 구현예에서, 본원에 기재된 G α 단백질은 임의의 천연 포유류 G α 단백질 중에서 선택되며, 이는 Gq, Gs, Gi1, Gi2, Gi3, Gt-콘(cone), Gt-로드(rod), Gt-거스트(gust), Gz, GoA, GoB, Golf, G11, G12, G13, G14, 및 G15/G16(또한 GNA15로도 지정됨), 이들 이소형의 스플라이스 버전, 뿐만 아니라 그의 기능성 변이체를 포함한다. 한 구현예에서, 재조합 G α 단백질 서브유닛은 Gi 패밀리를, 예를 들어, Gi1, Gi2, Gi3, GoA, GoB, Gt-콘, Gt-로드, Ggus, 및/또는 Gz의 것이다. 한 구현예에서, G α 단백질 서브유닛은 G α 패밀리를, 예를 들어, Gq, G11, G14 및/또는 G15/16)의 것이다. 한 구현예에서, G α 단백질 서브유닛은 G12/13 패밀리의 것이다.
- [0142] 한 구현예에서, 재조합 G α 서브유닛 폴리펩티드는 GPCR에 의한 활성화를 감소시키거나 또는 방해하는 적어도 하나의 돌연변이를 포함한다. 이러한 돌연변이된 G α 서브유닛 폴리펩티드는 비-수용체 구아닌 뉴클레오티드 교환 인자(GEF)-매개 G 단백질 활성화를 평가하는데 유용할 수 있으며, 즉 G 단백질 활성화는 GPCR 개입을 통해 유도되지 않는다. 한 구현예에서, 돌연변이는 카복시(C)-말단 도메인에 있으며, 바람직하게는 상기 G α 서브유닛 폴리펩티드의 C-말단에서 적어도 7개 잔기 중 하나 이상에서 돌연변이가 있다. 한 구현예에서, 돌연변이는 C-말단에서 마지막 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7개 잔기의 절단이다. 다른 구현예에서, 돌연변이는 C-말단에서 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6개 또는 모든 잔기의 치환이다. 한 구현예에서, 돌연변이는 상기 C-말단 도메인에서 보존된 류신 잔기 중 적어도 1개의 결실 또는 치환, 바람직하게는 상기 C-말단 도메인에서 마지막 보존된 류신 잔기(고유 단백질의 끝에서 두번째 잔기)의 결실 또는 치환이다. 추가 구현예에서, 돌연변이는 마지막 보존된 류신 잔기의 치환, 바람직하게는 아스파르트산(D), 프롤린(P) 또는 아르기닌(R) 잔기의 치환이다. 한 구현예에서, 돌연변이된 재조합 G α 서브유닛 폴리펩티드는 Gi 패밀리를, 예를 들어 Gi2 또는 GoB의 것이다. 추가 구현예에서, 돌연변이된 재조합 G α 서브유닛 폴리펩티드는 **도 9b** 및 **9c**에 도시된 서열 중 하나, 예를 들어, Gai2 Δ 5(서열번호: 28); Gai2 Δ 2(서열번호: 29); Gai2 L-2G(서열번호: 31); Gai2 L-2P(서열번호: 33); Gai2 L-2R(서열번호: 34); Gai2 L-2D(서열번호: 32); Gai2 L-7G(서열번호: 30); GaoB Δ 5(서열번호: 36); 또는 GaoB L-2G(서열번호: 35)를 포함한다.
- [0143] 본원에 사용된 바와 같은 "재조합"이라는 용어는 재조합 핵산 분자로부터 발현되는 단백질 분자, 즉 분자 생물학/유전 공학 기술의 도움으로 제조된 핵산, 예를 들어 단백질을 암호화하는 핵산(예를 들어, 벡터에 존재)으로 세포(또는 그의 자손)의 형질감염/형질전환 후 발현되는 단백질(세포에 의해 천연적으로 발현되는 단백질과 대조적)을 지칭한다.
- [0144] 한 구현예에서, 본원에 기재된 시스템은 세포 표면 수용체를 추가로 포함한다. 바이오센서의 세포는 세포 표면 수용체를 천연적으로 발현할 수 있거나, 또는 세포 표면 수용체가 재조합 세포 표면 수용체일 수 있다(예를 들어, 세포는 세포 표면 수용체를 암호화하는 핵산으로 형질감염 또는 형질전환된 바 있음). 본원에 사용된 바와 같은 "세포 표면 수용체"라는 용어는 형질 막에 부착되거나 또는 내장되고 리간드의 결합시 G 단백질 활성화를

유도하는 단백질을 지칭한다. G 단백질 활성화를 유도하는 세포 표면 수용체의 예는 G 단백질-결합 수용체(GPCR), 수용체 티로신 키나제(RTK), 인테그린을 포함한다. G 단백질 활성화는 전형적으로 리간드에 의한 GPCR 개입을 통해 발생하지만, G 단백질 활성화는 또한 비-수용체 구아닌 뉴클레오티드 교환 인자(GEF) 예컨대 GIV(α -상호작용 소포-관련 단백질, 또한 Girdin으로도 알려짐), NUCB1(뉴클레오빈딘1, 또한 calnuc로도 알려짐), NUCB2 및 DAPLE(홀어진-회합 단백질)를 통해 달성될 수 있다. 예를 들어, GIV 활성화는 RTK(예를 들어, EGFR) 및 Gi 활성화의 인테그린 α - β 복합체 조절과 관련되어 있다. 한 구현예에서, GASIP는 Rap1GAP의 G 단백질-결합 도메인을 포함하고, 세포 표면 수용체는 GPCR 또는 RTK이다. 다른 구현예에서, GASIP는 RGS 단백질, 바람직하게는 RGS17의 G 단백질-결합 도메인을 포함하고, 세포 표면 수용체는 GPCR이다.

[0145] "GPCR"은 전장 고유 GPCR 분자 뿐만 아니라 돌연변이체 GPCR 분자를 지칭한다. GPCR의 목록은 Foord *et al.* (2005) Pharmacol Rev. 57, 279-288에 제시되어 있으며, 이는 본원에 참조로 포함되고, GPCR의 업데이트된 목록은 IUPHAR-DB 데이터베이스(Harman AJ, *et al.* (2009) IUPHAR-DB: the IUPHAR database of G protein-coupled receptors and ion channels. *Nucl. Acids Res.* 37 (Database issue): D680-D685; Sharman JL, *et al.*, (2013) IUPHAR-DB: updated database content and new features. *Nucl. Acids Res.* 41 (Database Issue): D1083-8)에서 이용가능하다.

[0146] "RTK"는 전장 고유 RTK 단백질 뿐만 아니라 돌연변이체 RTK 단백질을 지칭한다. RTK(IUBMB 효소 명명법에 따라 EC 2.7.10.1)는 많은 폴리펩티드 성장 인자, 시토키인, 및 호르몬에 대한 세포 표면 수용체이며, 이들 수용체의 키나제 활성을 담당하는 촉매 도메인을 포함하는 세포내 영역을 특징으로 하며, 이는 수용체 자가인산화 및 RTK 기질의 티로신 인산화를 촉매한다. 인간에서 58개의 알려진 RTK가 있으며, 20개의 하위패밀리로 분포되어 있다 (Robinson *et al.*, *Oncogene* 2000, 19(49):5548-57).

[0147] "인테그린"은 전장 고유 인테그린 단백질 뿐만 아니라 돌연변이체 인테그린 단백질을 지칭한다. 인테그린은 α 및 β 로 불리는 2개의 비공유적으로 회합된 막관통 당단백질 서브유닛으로 구성된다. 다양한 인간 인테그린 이종이량체는 9개 유형의 β 서브유닛 및 24개 유형의 α 서브유닛으로부터 형성된다. 척추동물에서 발견되는 대표적인 인테그린은 $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_7\beta_1$, $\alpha_L\beta_2$, $\alpha_M\beta_2$, $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_V\beta_1$, $\alpha_V\beta_3$, $\alpha_V\beta_5$, $\alpha_V\beta_6$, $\alpha_V\beta_8$, 및 $\alpha_6\beta_4$ 를 포함한다.

[0148] 본원에 사용된 바와 같은 "변이체"(또는 "돌연변이체")라는 용어는 참조(예를 들어, 고유) 서열과 적어도 60%의 서열 동일성을 갖고 그의 원하는 활성, 예를 들어 $G\alpha$ 서브유닛에 결합하거나 또는 BRET 공여체 또는 수용체로서 작용하는 능력을 보유하는 단백질/폴리펩티드를 지칭한다. 추가 구현예에서, 변이체는 참조(예를 들어, 고유) 서열과 적어도 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99%의 유사성 또는 동일성을 갖고 그의 원하는 활성을 보유한다. "유사성" 및 "동일성"은 2개의 폴리펩티드 분자 사이의 서열 유사성/동일성을 지칭한다. 유사성 또는 동일성은 정렬된 서열에서 각각의 위치를 비교함으로써 결정될 수 있다. 아미노산 서열 사이의 유사성 또는 동일성 정도는 서열에 의해 공유되는 위치에서 일치하거나 또는 동일한 아미노산 수의 함수이다. 유사성 또는 동일성의 비교를 위한 서열의 최적 정렬은 다양한 알고리즘, 예컨대 Smith and Waterman, 1981, Adv. Appl. Math 2: 482의 국부 상동성 알고리즘, Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443의 상동성 정렬 알고리즘, Pearson and Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444의 유사성 방법에 대한 탐구 및 이들 알고리즘의 컴퓨터화된 구현(예컨대 미국 위스콘신주 매디슨 소재 Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group의 GAP, BESTFIT, FASTA 및 TFASTA)을 사용하여 수행될 수 있다. 서열 유사성 또는 동일성은 또한 Altschul *et al.*, 1990, J. Mol. Biol. 215: 403-10(공개된 디폴트 설정 사용)에 기재된 BLAST 알고리즘을 사용하여 결정될 수 있다. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 국립 생물공학 정보 센터(National Center for Biotechnology Information) 웹 사이트를 통해 이용가능할 수 있다.

[0149] 구현예에서, 본원에 기재된 성분(융합 분자)의 도메인은 적합한 링커 모이어티, 예를 들어, 하나 이상의 아미노산의 링커 또는 다른 유형의 화학적 링커(예를 들어, 탄수화물 링커, 지질 링커, 지방산 링커, 폴리에테르 링커, PEG 등)를 통해 직접적으로(예를 들어 펩티드 결합을 통해) 또는 "간접적으로" 공유적으로 연결될 수 있다. 한 구현예에서, 하나 이상의 추가 도메인(들)은 상기 정의된 도메인 앞에(N-말단), 사이에 또는 뒤에(C-말단) 삽입될 수 있다. 한 구현예에서, 융합 분자의 도메인은 펩티드 결합을 통해 공유적으로 연결된다. 다른 구현예에서, 융합 분자의 성분 중 하나 이상은 펩티드 링커를 통해 연결된다. 일 구현예에서, 링커는 전형적으로 2 내지 30개 아미노산 길이, 예를 들어 약 5 내지 약 20-25개 아미노산 또는 약 10 내지 약 15-20개 아미노산 범위의 펩티드 링커이다. 링커 각각의 조성 및 길이는 원하는 다양한 특성 예컨대 유연성 및 수용해도에 따

라 선택될 수 있다. 예를 들어, 펩티드 링커는 글리신을 포함하나 이에 제한되지는 않는 비교적 작은 아미노산 잔기를 포함할 수 있으며; 작은 아미노산 잔기는 입체 벌크를 감소시키고 펩티드 링커의 유연성을 증가시킬 수 있다. 펩티드 링커는 또한 세린을 포함하나 이에 제한되지는 않는 극성 아미노산을 포함할 수 있다. 극성 아미노산 잔기는 펩티드 링커의 수용해도를 증가시킬 수 있다. 또한, Globplot 2.3(Linding *et al.*, GlobPlot: exploring protein sequences for globularity and disorder, *Nucleic Acid Res* 2003 - Vol. 31, No.13, 3701-8)과 같은 프로그램을 사용하여 무질서 및 구형성 정도, 따라서 또한 그의 유연성 정도를 결정하는 것을 도울 수 있다. 한 구현예에서, 펩티드 링커는 하기 실시예 및/또는 도면에 개시된 아미노산 서열 중 하나 이상을 포함한다(서열번호:6, 7, 20, 22, 24 및 26).

[0150] 한 구현예에서, 시스템은 본원에 정의된 다양한 성분, 즉 제1 및 제2 성분을 발현하는 세포, 및 임의적으로 재조합 Ga 단백질 서브유닛 및/또는 세포 표면 수용체를 추가로 포함한다.

[0151] 다른 양태에서, 본 개시내용은 본원에 정의된 상기 정의된 제1 및/또는 제2 성분(들)을 암호화하는 핵산 또는 복수의 핵산을 제공한다. 한 구현예에서, 핵산(들)은 벡터/플라스미드(또는 복수의 벡터/플라스미드), 추가 구현예에서 발현 벡터(들)/플라스미드(들)에 존재한다. 이러한 벡터는 하나 이상의 전사 조절 서열(들), 예컨대 프로모터, 인핸서 및/또는 다른 조절 서열에 작동가능하게 연결된 상기 정의된 제1 및/또는 제2 성분(들)을 암호화하는 핵산(들)을 포함한다. 한 구현예에서, 핵산은 제1 및 제2 성분(폴리시스트론성 작제물)을 암호화한다.

[0152] "벡터"라는 용어는 연결된 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 바람직한 벡터의 한 유형은 에피솜, 즉, 염색체의 복제할 수 있는 핵산이다. 바람직한 벡터는 이들이 연결된 핵산의 자율적 복제 및/또는 발현을 할 수 있는 것들이다. 이들이 작동가능하게 연결된 유전자의 발현을 지시할 있는 벡터는 본원에서 "발현 벡터"로서 지칭된다. 본 발명의 재조합 발현 벡터는 당업자에게 알려져 있고, 예를 들어, Sambrook 등의 상기 문헌에서 발견된 표준 기술에 의해 구축될 수 있다. DNA의 단편을 결합하기 위한 다양한 전략이 이용가능하며, DNA 단편의 말단의 성질에 따라 선택되고 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 본 발명의 벡터는 또한 박테리아 및 숙주 세포에서 벡터 전파 및 선택을 용이하게 하기 위해 다른 서열 요소를 함유할 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터는 하나 이상의 제한 엔도뉴클레아제 부위에 대한 뉴클레오티드의 서열을 포함할 수 있다. 예컨대 선택가능한 마커 및 리포터 유전자에 대한 코딩 서열은 당업자에게 널리 알려져 있다.

[0153] 본원에 정의된 핵산 중 하나 이상을 포함하는 재조합 발현 벡터는 세포(숙주 세포)로 도입될 수 있으며, 이는 정의된 재조합 발현 벡터로부터 단백질 코딩 영역을 발현할 수 있는 살아있는 세포를 포함할 수 있다. 살아있는 세포는 배양된 세포 및 살아있는 유기체 내의 세포 둘 다를 포함할 수 있다. 따라서, 본 발명은 또한 본 발명의 재조합 발현 벡터를 함유하는 숙주 세포를 제공한다. "세포", "숙주 세포" 및 "재조합 숙주 세포"라는 용어는 본원에서 상호교환가능하게 사용된다. 이러한 용어는 특정한 대상체 세포 뿐만 아니라 이러한 세포의 자손 또는 잠재적인 자손을 지칭한다. 돌연변이 또는 환경 영향으로 인해 후속 세대에서 특정 변형이 발생할 수 있기 때문에, 이러한 자손은 실제로 모 세포와 동일하지 않을 수 있지만, 여전히 본원에 사용된 바와 같은 용어의 범위 내에 포함된다.

[0154] 벡터 DNA는 통상적인 형질전환 또는 형질감염 기술을 통해 세포로 도입될 수 있다. "형질전환" 및 "형질감염"이라는 용어는 인산칼슘 또는 염화칼슘 공동-침전, DEAE-텍스트란-매개 형질감염, 리포펙션, 전기천공, 미세주입 및 바이러스-매개 형질감염을 포함하여, 외부 핵산을 숙주 세포로 도입하기 위한 기술을 지칭한다. 숙주 세포를 형질전환 또는 형질감염시키기에 적합한 방법은 예를 들어 Sambrook *et al.*(*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press(1989)), 및 다른 실험실 매뉴얼에서 찾을 수 있다. "전사 조절 서열/요소"는 단백질 코딩 서열의 전사를 이들이 작동가능하게 연결된 것으로 유도 또는 제어하는 개시 및 종결 신호, 인핸서, 및 프로모터, 스프라이싱 신호, 폴리아데닐화 신호와 같은 DNA 서열을 지칭하는 일반적인 용어이다. 제1 핵산 서열이 제2 핵산 서열과 기능적 관계로 배치되는 경우 제1 핵산 서열은 제2 핵산 서열과 "작동가능하게 연결"된다. 예를 들어, 프로모터가 코딩 서열의 전사 또는 발현에 영향을 미치는 경우 프로모터는 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로, 작동가능하게 연결된 DNA 서열은 인접하며, 필요한 경우 리딩 프레임에서 2개의 단백질 코딩 영역이 연결된다. 그러나, 예를 들어, 인핸서는 일반적으로 여러 킬로베이스에 의해 프로모터로부터 분리될 때 기능하고 인트론 서열은 가변 길이일 수 있으므로, 일부 폴리뉴클레오티드 요소는 작동가능하게 연결될 수 있지만 인접하지 않다.

[0155] 다른 양태에서, 본 개시내용은 제1 성분을 암호화하는 제1 핵산 및 제2 성분을 암호화하는 제2 핵산, 또는 제1 및 제2 성분을 암호화하는 핵산을 포함하는 키트를 제공한다. 한 구현예에서, 키트는 Ga 단백질 서브유닛을

암호화하는 핵산을 추가로 포함한다. 다른 구현예에서, 키트는 세포 표면 수용체를 암호화하는 핵산을 추가로 포함한다.

[0156] 다른 양태에서, 본 개시내용은 상기 정의된 제1 및/또는 제2 성분(들)을 포함하거나 또는 발현하는 세포를 제공한다. 한 구현예에서, 세포는 상기 정의된 제1 및/또는 제2 성분(들)을 암호화하는 핵산으로 형질감염 또는 형질전환된 바 있다. 한 구현예에서, 세포는 재조합 Gα 단백질 서브유닛을 추가로 포함하거나 또는 발현한다. 한 구현예에서, 세포는 재조합 세포 표면 수용체, 예를 들어, GPCR, RTK 또는 인테그린을 추가로 포함하거나 또는 발현한다.

[0157] 본 개시내용은 예를 들어 당업계에 널리 알려진 배양 배지 및 시약을 사용하여, 본 발명의 제1 및/또는 제2 성분(들)의 발현을 위한, 상기 기재된 것들과 같은 재조합 발현 시스템, 벡터 및 세포를 추가로 제공한다. 세포는 상기 정의된 제1 및 제2 성분(들)을 발현할 수 있는 임의의 세포일 수 있다. 단백질의 발현에 적합한 숙주 세포 및 방법은 당업계에 널리 알려져 있다. 상기 정의된 성분(들)을 발현할 수 있는 임의의 세포가 사용될 수 있다. 예를 들어, 포유류 세포와 같은 진핵생물 숙주 세포가 사용될 수 있다(예를 들어, 마우스 래트 및 햄스터 세포주와 같은 설치류 세포, 인간 세포/세포주). 다른 구현예에서, 상기 언급된 세포는 인간 세포주, 예를 들어 배아 신장 세포주(예를 들어, HEK293 또는 HEK293T 세포)이다.

[0158] 다른 양태에서, 본 개시내용은 제제가 관심 G 단백질의 활성화를 조절하는지 여부를 결정하기 위한 방법을 제공하며, 상기 방법은 하기 단계를 포함하며:

[0159] 본원에 정의된 시스템을 생물발광 공여체 분자에 대한 기질과 접촉시키는 단계;

[0160] 상기 제제의 존재 및 부재 하에 시스템에서 BRET 신호를 측정하는 단계;

[0161] 여기서 상기 제제의 부재에 비해 상기 제제의 존재 하에 상기 BRET 신호의 차이는 상기 제제가 상기 관심 G 단백질의 활성화를 조절함을 나타낸다.

[0162] 한 구현예에서, 제제는 작용제이고 상기 BRET 신호의 차이는 증가이다.

[0163] 한 구현예에서, 관심 G 단백질은 Gi 단백질 서브유닛 패밀리인 것이며, 여기서 GASIP는 본원에 정의된 바와 같은 Rap1GAP 또는 RGS 단백질의 G 단백질-결합 도메인을 포함한다. 한 구현예에서, 상기 언급된 방법에 사용된 시스템은 Gi 단백질 서브유닛 패밀리의 재조합 Gα 서브유닛 폴리펩티드, 즉 재조합 Gi1, Gi2, Gi3, GoA, GoB, 또는 Gz 서브유닛 폴리펩티드를 포함한다. 주어진 시험 제제의 프로파일 또는 특징을 확인하기 위해(즉 시험 제제에 의해 활성화된 특이적 Gi 단백질 서브유닛(들)을 확인하기 위해), 상기 언급된 방법은 복수의(즉 2개 이상의) 시스템을 사용하여 수행될 수 있으며, 각각의 시스템은 상이한 Gi 단백질 서브유닛을 포함하는데, 예를 들어, 제1 시스템은 재조합 Gi1을 포함하고, 제2 시스템은 재조합 Gi2를 포함하고, 제3 시스템은 재조합 Gi3을 포함한다.

[0164] 다른 구현예에서, 관심 G 단백질은 Gq 단백질 서브유닛 패밀리인 것이며, 여기서 GASIP는 본원에 정의된 바와 같은 P63RhoGEF 또는 GRK2의 G 단백질-결합 도메인을 포함한다. 한 구현예에서, 상기 언급된 방법에 사용된 시스템은 Gq 단백질 서브유닛 패밀리의 재조합 Gα 서브유닛 폴리펩티드, 즉 재조합 Gq, G11, G14 또는 G15 서브유닛 폴리펩티드를 포함한다. 주어진 시험 제제의 프로파일 또는 특징을 확인하기 위해(즉 시험 제제에 의해 활성화된 특이적 Gq 단백질 서브유닛(들)을 확인하기 위해), 상기 언급된 방법은 복수의(즉 2개 이상의) 시스템을 사용하여 수행될 수 있으며, 각각의 시스템은 상이한 Gq 단백질 서브유닛을 포함하는데, 예를 들어, 제1 시스템은 재조합 Gq를 포함하고, 제2 시스템은 재조합 G11을 포함하고, 제3 시스템은 재조합 G14를 포함한다.

[0165] 다른 구현예에서, 관심 G 단백질은 G12/13 단백질 서브유닛 패밀리인 것이며, 여기서 GASIP는 본원에 정의된 바와 같은 PDZRhoGEF 또는 P115RhoGEF의 G 단백질-결합 도메인을 포함한다. 한 구현예에서, 상기 언급된 방법에 사용된 시스템은 G12/13 단백질 서브유닛 패밀리의 재조합 Gα 서브유닛 폴리펩티드, 즉 재조합 Gq, G12 또는 G13 서브유닛 폴리펩티드를 포함한다. 주어진 시험 제제의 프로파일 또는 특징을 확인하기 위해(즉 시험 제제에 의해 활성화된 특이적 G12/13 단백질 서브유닛(들)을 확인하기 위해), 상기 언급된 방법은 복수의(즉 2개 이상의) 시스템을 사용하여 수행될 수 있으며, 각각의 시스템은 상이한 G12/13 단백질 서브유닛을 포함하는데, 예를 들어, 제1 시스템은 재조합 G12를 포함하고 제2 시스템은 재조합 G13을 포함한다.

[0166] 다른 양태에서, 본 개시내용은 제제가 비-수용체 구아닌 뉴클레오티드 교환 인자(GEF)-매개 G 단백질 활성화를 조절하는지 여부를 결정하기 위한 방법을 제공하며, 상기 방법은 하기 단계를 포함하며:

- [0167] 본원에 정의된 시스템을 생물발광 공여체 분자에 대한 기질과 접촉시키는 단계;
- [0168] 상기 제제의 존재 및 부재 하에 시스템의 BRET 신호를 측정하는 단계로서, 여기서 상기 시스템은 GPCR에 의한 활성화를 감소 또는 방해하는 적어도 하나의 돌연변이를 포함하는 재조합 G α 서브유닛 폴리펩티드를 포함하는 것인, 단계;
- [0169] 여기서 제제의 부재에 비해 상기 제제의 존재 하에 상기 BRET 신호의 차이는 상기 제제가 비-수용체 GEF-매개 G 단백질 활성화를 조절함을 나타낸다.
- [0170] 한 구현예에서, 제제는 작용제이고 상기 BRET 신호의 차이는 증가(또는 더 높은 BRET 신호)이다.
- [0171] 다른 구현예에서, 제제는 길항제이고 상기 BRET 신호의 차이는 감소(또는 더 낮은 BRET 신호)이다. 한 구현예에서, 제제가 길항제인지 여부를 확인하기 위해, 시스템을 알려진 작용제와 접촉시키고, 제제의 존재 하에 알려진 작용제에 의해 유도된 BRET 신호의 감소는 제제가 길항제임을 나타낸다.
- [0172] 다른 양태에서, 본 개시내용은 제제가 GPCR-매개 G단백질 활성화 또는 RTK/GEF-매개 G단백질 활성화를 유도하는지 여부를 결정하기 위한 방법을 제공하며, 상기 방법은 하기 단계를 포함하며:
- [0173] GASIP가 Rap1GAP의 G 단백질-결합 도메인, 바람직하게는 다운스트림 신호전달 사건(예를 들어, 키나제 활성화)에 대한 그의 민감도를 감소시키는 돌연변이를 포함하며, 보다 바람직하게는 상기 정의된 바와 같은 위치 437, 439 및/또는 441에서 세린 잔기 중 하나 이상의 돌연변이(예를 들어, Rap1GAP(SSS-AAA))를 포함하는 Rap1GAP의 G 단백질-결합 도메인을 포함하는 제1 바이오센서를 사용하여 제제의 존재 하에 BRET 신호를 측정하는 단계;
- [0174] GASIP가 상기 정의된 바와 같은 RGS 단백질, 바람직하게는 RGS17의 G 단백질-결합 도메인을 포함하는 제2 바이오센서를 사용하여 제제의 존재 하에 BRET 신호를 측정하는 단계;
- [0175] 여기서 제2 바이오센서에서 제제의 존재 하에 BRET 신호의 증가없이 제1 바이오센서에서 제제의 존재 하에 BRET 신호의 증가(예를 들어, 용량-의존적 증가)는 제제가 RTK/GEF-매개 G단백질 활성화를 유도함을 나타내고; 여기서 제1 및 제2 바이오센서에서 제제의 존재 하에 BRET 신호의 증가(예를 들어, 용량-의존적 증가)는 제제가 GPCR-매개 G단백질 활성화를 유도함을 나타낸다.
- [0176] "화합물", "제제(agent)", "시험 화합물" 또는 "시험 제제"라는 용어는 합성 또는 천연 화합물의 라이브러리를 포함한 임의의 수의 공급원으로부터 취득될 수 있는 본원에 기재된 시스템/검정에 의해 스크리닝될 수 있는 임의의 분자(예를 들어, 약물 후보물질)를 지칭한다. 예를 들어, 무작위화 올리고뉴클레오타이드의 발현을 포함한 많은 수단이 매우 다양한 유기 화합물 생체분자의 무작위 및 직접 합성에 이용가능하다. 대안적으로, 박테리아, 진균, 식물 및 동물 추출물 형태의 천연 화합물의 라이브러리가 이용가능하거나 용이하게 생산된다. 추가적으로, 천연 또는 합성적으로 생산된 라이브러리 및 화합물이 통상적인 화학적, 물리적 및 생화학적 수단을 통해 용이하게 변형된다.
- [0177] 한 구현예에서, 본원에 사용된 바와 같은 "증가된 신호" 또는 "더 높은 신호"는 시험 제제의 부재 하에 측정된 참조 신호에 비해 적어도 10, 20, 30, 40, 45 또는 50% 더 높은 신호를 지칭한다. 다른 구현예에서, "더 높은 신호"는 시험 제제의 부재에 비해 존재 하에 측정된 신호에서 통계적으로 유의한 차이(적당한 통계 분석을 사용하여 결정됨)를 나타냄으로써, 예를 들어 복수의 샘플에서 취득된 결과를 조합함으로써 결정된다. 상이한 데이터 세트 사이의 유의한 차이를 결정하기 위한 통계 분석(ANOVA, 스튜던트 t -검정, 카이 제곱 등)은 당업계에 알려져 있으며, 이러한 분석은 적합한 컴퓨터 프로그램을 사용하여 수행될 수 있다.
- [0178] 양성 대조군 및 음성 대조군이 본원에 기재된 방법/검정에 사용될 수 있다. 대조군 및 시험 샘플은 통계적으로 유의한 결과를 획득하기 위해 다수회 수행될 수 있다.
- [0179] 한 구현예에서, 상기 언급된 방법은 고처리량 방법(고처리량 스크리닝, HTS)이다. 본원에 사용된 바와 같은 "고처리량 스크리닝"(HTS)이라는 용어는 표적 분자에 대한 결합 활성 또는 생물학적 활성에 대해 다수의 화합물(수백개, 수천개)을 신속하게 및 동시에 스크리닝하도록 하는 방법을 지칭한다. 이러한 HTS 방법은 전형적으로 여러 웰, 예를 들어 384, 1536, 또는 3456 웰을 갖는 마이크로타이터 플레이트에서 수행된다. HTS의 경우, 판독 신호가 높은 민감도, 정확도 및 재현성으로 검출되는 것이 중요하다. 방법이 HTS에 적합한지 또는 양립할 수 있는지 여부를 결정하기 위한 한 가지 방식은 하기 실시예에 기재된 바와 같이, Z-인자를 측정하는 것이다. 이상적으로, Z-인자는 적어도 0.5(즉 0.5 내지 1), 및 바람직하게는 적어도 0.55, 0.6, 0.65, 0.7, 0.75 또는 0.8이어야 한다.

- [0180] BRET 신호를 측정하는 방법 및 장치는 당업계에 널리 알려져 있다. BRET 신호는, 예를 들어, BRET 수용체 신호의 강도(광 강도)를 결정함으로써, 및/또는 BRET 공여체에 의해 방출된 신호 또는 광 강도에 비해 BRET 수용체에 의해 방출된 신호 또는 광 강도의 비(BRET 비)를 계산함으로써 측정될 수 있다. BRET 신호는 BRET 공여체 및/또는 BRET 수용체 광 방출을 검출하기 위해 적합한 필터 세트를 갖는 마이크로플레이트 판독기 또는 현미경을 사용하여 측정될 수 있다.
- [0181] 본원에 기재된 시스템 및 방법은 G 단백질 활성화 조절하는데 있어서 활성이고(GPCR 또는 G 단백질을 통한 다른 수용체 신호전달을 통해) 따라서 잠재적인 약물 후보물질인 화합물을 확인하기 위해 또는 G 단백질 신호전달이 수반되는, 예를 들어, G 단백질 억제 또는 자극이 유익할 수 있는 질환을 치료하는데 사용하기 위해 HTS에 사용될 수 있다. 본원에 기재된 시스템 및 방법은 또한 리간드 프로파일링을 수행하기 위해, 예를 들어, GPCR 또는 G 단백질을 통한 다른 수용체 신호전달의 리간드에 의해 조절된 경로를 결정하기 위해 사용될 수 있다.
- [0182] 본원에 기재된 시스템 및 방법은 약물 개발을 위한 잠재적인 후보물질을 확인하기 위해 화합물 라이브러리의 스크리닝에 사용될 수 있다. 본원에 기재된 시스템이 화합물과 접촉될 때 BRET 신호 비의 변화는 약물 또는 약제학적으로 활성인 화합물을 확인할 수 있고 세포 경로에 대한 그들의 효과를 확인할 수 있다. 또한, 본원에 기재된 시스템 및 방법은 또한 약물 후보물질의 투여량 의존성을 결정하는데 사용될 수 있다.
- [0183] 전자기계식 플레이트 판독기는 신호 비 변화를 검출하는데 사용될 수 있다. 이러한 플레이트 판독기는 본 발명의 시스템을 사용하여 HTS, 약물 후보물질 스크리닝, 및 약물 투여량 의존성 연구에 이용될 수 있다. 본 발명을 실시하는데 사용될 수 있는 플레이트 판독기의 예는 PerkinElmer Fusion™ Universal Microplate Analyzer 장치를 포함하여 PerkinElmer(마이에미주 보스턴 소재)에 의해 제공되는 Fusion™ 패밀리 플레이트 판독기를 포함한다. PerkinElmer EnVision™ HTS 모델이 또한 본원에 기재된 방법을 실시하는데 이용될 수 있다.
- [0184] **본 발명을 수행하기 위한 방식(들)**
- [0185] 본 발명은 하기 비제한적인 실시예에 의해 보다 상세하게 예시된다.
- [0186] **실시예 1: 물질 및 방법**
- [0187] **물질.** 안지오텐신 II(AngII; [Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe], 서열번호: 58), 포르콜린, 도파민 및 폴리-오르니틴은 Sigma-Aldrich으로부터 입수하였다. u46619, I-BOP, CTA2, U51605, I-SAP, SQ 29558은 Cayman Chemical®(미시간주 앤아버)로부터 입수하였다. 인간 EGF는 Cedarlane 실험실로부터 입수하였다. 칼리딘([Lys0]-브래디키닌)은 Eurogentec으로부터 입수하였다. WAY-100635, A 412997, L 741742, SNC-80 및 ARM100390은 Tocris Bioscience(Bio-Techne)로부터 입수하였다. 혈소판 활성화 인자(PAF-C16)는 Enzo Life Sciences, Inc.로부터 입수하였다. 연어 정자 DNA, 돌베코의 변형된 이글 배지(DMEM), 소 태아 혈청, 송아지 혈청, OPTI-MEM®, 및 다른 세포 배양 시약은 Life technologies(Thermo Fisher Scientific) 및 Wisent Inc.로부터 구입하였다. 폴리에틸렌이민(PEI) 25 kDa 선형은 Polysciences Inc.로부터 입수하였다. Prolume Purple I은 Nanolight® Technology로부터 구입하였다. 퓨전 DNA 폴리머라제는 Thermo Fisher Scientific으로부터 입수하였다. 제한 효소, T4 DNA 리가제 및 Gibson 어셈블리 믹스는 New England Biolabs Ltd.로부터 입수하였다. 백색 96-웰 폴리스티렌 세포 배양 마이크로플레이트, 고품 바닥(CellStar 655 083)은 Greiner로부터 입수하였다.
- [0188] **플라스미드 및 구축(constructions) 형질 막 마커 rGFP-CAAX 및 초기 엔도솜 마커 rGFP-FYVE** 작제물(construct)은 이미 기재되었다(Namkung Y. *et al.* 2016; Nat Commun. **7**:12178). TP α 수용체 작제물을 암호화하는 플라스미드, 모든 G α 서브유닛, G β 1 서브유닛 및 G γ 1 서브유닛은 cdna.org로부터 입수한다. 신호 펩티드: MDSKGSSQKGSRLLLLVVSNLLLCQGVVS(서열번호: 59)를 갖는 인간 수용체 D4R, At1AR 및 Mu 오피오이드 수용체(hMOR1)의 코딩 서열(cds)을 서열-최적화하고, GeneART(Thermo Fisher Scientific)에서 합성하고, Invitrogen(Thermo Fisher Scientific)으로부터의 pCDNA3.1(+)에서 Gibson 어셈블리로 서브클로닝하였으며; hMOR1을 pLVX IRES puro(Clontech, 캘리포니아주 소재)에 서브클로닝하였다. 인간 EGFR을 암호화하는 작제물은 Yosef Yarden 박사(Tzahar E. *et al.* 1996; Molecular and Cellular Biology **16**(10): 5276-5287)에 의해 제공되었다. 브래디키닌 B2 수용체(BKB2R) cds 및 RAPGAP(1-442)-Rluc8 작제물(도 9a 및 9b 참조)을 서열-최적화하고, 합성하고, Topgenetech에서 pCDNA3.1(+)에서 서브클로닝하였으며; 펩티드 링커 GSGGGSGGGA(서열번호: 6)는 RapGAP(1-442)와 Rluc8 사이에 존재한다(도 2a 참조). RapGAP(1-442), Rap1GAP Δ CT(1-420), Rap1GAP Δ SSS(1-436), Rap1GAP SSS-AAA(1-442;S437A/S439A/S441A), Rap1GAP SSS-TTT(1-442;S437T/S439T/S441T), Rap1GAP SS-AA(1-442;S437A/S441A), Rap1GAP SS-DA(1-442;S437A/S441A), Rap1GAP SS-AD(1-442;S437A/S441D),

Rap1GAP SS-DD(1-442;S437A/S441A)의 RlucII 태그된 버전을 암호화하는 작제물을 pCDNA3.1(+) RapGAP(1-442)-Rluc8로부터 PCR 증폭으로 생성하고, pCDNA3.1 Hygro(+) GFP10-RlucII에서 Gibson 어셈블리로 서브클로닝하여, GFP10을 Rap1GAP의 상이한 변이체의 코딩 서열로 대체하였다(도 2a, 9a 및 9b 참조). 펩티드 링커: GSAGTGGRAIDIKLPAT(서열번호: 7)는 RAPGAP와 RlucII 사이에 존재한다(도 2a 참조). RlucII로 태그된 인간 RGS17의 RGS 결합 도메인(잔기: 64-210)을 암호화하는 작제물을 pCDNA 3.1 HA-RGS17(cDNA.org로부터 입수)로부터 PCR 증폭으로 생성하고, pCDNA3.1 Hygro(+) GFP10-RlucII에서 Gibson 어셈블리로 서브클로닝하여, GFP10을 RGS의 cds(RGS17 64-210)로 대체하였다(도 3a 및 9d 참조). RlucII로 태그된 인간 RGS19의 RGS 결합 도메인(잔기: 70-217)을 암호화하는 작제물을 pCDNA 3.1 HA-RGS19(cDNA.org로부터 입수)로부터 PCR 증폭으로 생성하고, pCDNA3.1 Hygro(+) GFP10-RlucII에서 Gibson 어셈블리로 서브클로닝하여, GFP10을 RGS19의 코딩 서열(70-217)로 대체하였다(도 3a 및 9d 참조). RlucII로 태그된 인간 RGS20 var1의 RGS 결합 도메인(잔기: 242-388)을 암호화하는 작제물을 pCDNA 3.1 HA-RGS20 var1(cDNA.org로부터 입수)로부터 PCR 증폭으로 생성하고, pCDNA3.1 Hygro(+) GFP10-RlucII에서 Gibson 어셈블리로 서브클로닝하여, GFP10을 RGS의 코딩 서열(RGS20 242-388)로 대체하였다(도 3a 및 9d 참조). 펩티드 링커: GSAGTGGRAIDIKLASAT(서열번호: 20)는 Rap1GAP와 RlucII 사이에 존재한다(도 3a 참조). RlucII로 태그된 인간 PDZRhoGEF(잔기: 281-483) 및 P115RhoGEF(잔기: 1-244)의 G12/13 결합 도메인을 암호화하는 작제물을 IMAGE 클론(OpenBiosystems)으로부터 PCR 증폭으로 생성하고, pCDNA3.1 Hygro(+) GFP10-RlucII에서 Gibson 어셈블리로 서브클로닝하여, GFP10을 대체하였다(도 4a, 5a 및 9d 참조). 펩티드 링커: GILREALKLPAT(서열번호: 22) 및 RLKLPAT(서열번호: 24)는 각각 PDZRhoGEF 및 P115RhoGEF의 RlucII와 G12/13 결합 도메인 사이에 존재한다(도 4a 및 5a 참조). RlucII로 태그된 인간 P63RhoGEF의 Gq 결합 도메인(잔기: 295-502)을 암호화하는 작제물을 IMAGE 클론(OpenBiosystems)으로부터 생성하고, pCDNA3.1 Hygro(+) GFP10-RlucII에서 Gibson 어셈블리로 서브클로닝하여, GFP10을 대체하였다(도 6a 및 9b 참조). 펩티드 링커: ASGSAGTGGRAIDIKLPAT(서열번호: 26)는 Gq 결합 도메인과 RlucII 사이에 존재한다(도 6a 참조). RlucII로 태그된 인간 GRK2의 RGS 도메인(잔기: 30-203)을 암호화하는 작제물을 pCDNA3.1Z-GRK2-GFP10으로부터 PCR 증폭으로 생성하고, pCDNA3.1 Hygro(+) GFP10-RlucII 및 pCDNA3.1(+) RlucII-GFP10st2에서 Gibson 어셈블리로 서브클로닝하여, GFP10을 대체하고 각각 RGS(GRK2)-RlucII 및 RlucII-RGS(GRK2)를 생성하였다(도 7a 및 9b 참조). 펩티드 링커: GSAGTGGRAIDIKLASAT(서열번호: 20)는 2개의 작제물에서 RGS(GRK2) 도메인과 RlucII 사이에 존재한다(도 7a 참조). Gai2 및 GaoB 돌연변이체를 암호화하는 작제물: Gai2 Δ5(=1-350), Gai2 Δ2(=1-353), Gai2 L-7G(=L354G), Gai2 L-2G(=L354G), Gai2 L-2D(=L354D), Gai2 L-2P(=L354P), Gai2 L-2R(=L354R), GaoB L-2G(=L353G), GaoB Δ5(=1-349)을 pCDNA3.1(+) GNAi2 및 pCDNA3.1(+) GNAoB(cdna.org로부터 입수)로부터 PCR-증폭으로 생성하고, pCDNA3.1 Zeo(+)에서 Gibson 어셈블리로 서브클로닝하였다.

[0189] 세포 배양 및 일시적 형질감염. 인간 배아 신장 293(HEK293) 세포를 5% CO₂가 있는 가슴 대기에서 37°C에서 10% 소 태아 혈청, 100 유닛/ml 페니실린/스트렙토마이신으로 보충된 돌베코의 변형된 이글 배지(DMEM)에서 유지하였다. HEK293SL 세포를 5% 소 태아 혈청 및 20 μg/ml 젠타마이신으로 보충된 DMEM에서 배양하였다. 세포를 5% CO₂ 및 90% 습도에서 37°C에서 성장시켰다.

[0190] 폴리(에틸렌이민)(PEI)을 사용한 형질감염: 실험 2일 전에, HEK293 세포를 칼슘 또는 마그네슘 무함유 PBS로 세척하고, 형질감염제로서 PEI를 사용하여 지시된 플라스미드로 형질감염시켰다(3 대 1의 비, PEI/DNA). 이어서 세포를 웰당 35 000개 세포의 밀도로 폴리-L-오르니틴 히드로브로마이드로 전처리되거나 또는 전처리되지 않은 96-웰 플레이트에 직접적으로 시딩하였다. Spark 10M 판독기에서 판독한 모든 실험을 처리되지 않은 플레이트를 사용하여 수행하였다.

[0191] BRET 측정. 형질감염 48-시간 후, 세포를 예열된 타이로드 완충액(140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 12 mM NaHCO₃, 5.6 mM D-글루코스, 0.5 mM MgCl₂, 0.37 mM NaH₂PO₄, 25 mM HEPES, pH 7.4)으로 2회 세척한 후 지시된 바와 같이 실온(RT) 또는 37°C에서 다양한 농도의 리간드로 자극하였다. 세포-투과성 기질, 코엘렌테라진 Purple I을 적어도 6 분(37°C에서) 내지 10분(RT에서) 동안 타이로드 완충액에서 1 μM의 최종 농도로 첨가한 후 BRET 측정하였다. 측정은 Spark 10M 판독기(Tecan Life Sciences; 공여체: 360nm/380nm & 수용체: 505nm/570nm), LB 941 멀티모드 플레이트 판독기(Berthold Technologies; 공여체: 400/470-nm 및 수용체: 515/520-nm 필터) 또는 Synergy Neo(Biotek: (공여체: 400/480 nm, 수용체: 515/530 nm)에서 수행하였다. RlucII(공여체)에 의해 방출된 광 강도에 비해 rGFP(수용체)에 의해 방출된 광 강도의 비를 계산함으로써 BRET 신호를 결정하였다. 모든 BRET 측정을 Tristar 판독기에서 37°C에서(도 1-2m & 도 2r-7f), Spark 10M 판독기

에서 RT에서(도 2n-2q & 도 8b-8s) 또는 Synergy Neo에서 RT에서(도 8t-8x) 수행하였다.

[0192] Z'-인자 결정. Z'-인자 값은 Zhang 등(*J Biomol Screen*. 1999;4(2):67-73)에 의해 기재된 바와 같이 계산하였다. 0.4 초과인 Z'-인자는 강력한 검정으로 고려된다.

[0193] 데이터 분석. GraphPad® Prism 곡선 맞춤 프로그램을 사용하여 EC₅₀ 값의 추정치를 계산하였다. 최적 맞춤을 나타내는 곡선이 이 연구 전반에 걸쳐 제시되며, 또한 이 GraphPad® Prism 그래프를 사용하여 생성하였다.

[0194] 실시예 2: G 단백질 패밀리-선택적 방식으로 G 단백질 활성화를 모니터링하기 위한 시스템 및 검정의 생성 및 특이성(generation and specificity)

[0195] 도 1a 내지 1e는 G 단백질 이펙터로부터 Gα 서브유닛 상호작용 폴리펩티드(GASIP)의 전위에 기초하여, G 단백질 패밀리-선택적 방식으로, 및 상이한 세포 구획에서 G 단백질 활성화를 모니터링하기 위한 시스템 및 검정의 생성 및 특이성을 도시한다. 도 1a는 i) GPCR-매개 직접 G 단백질 활성화, 및 ii) 구아닌-뉴클레오티드 교환 인자(GEF)-매개 G단백질 활성화를 모니터링하기 위한 이펙터-기반 센서의 원리를 도시한다. 수용체, rGFP로 태그된 세포막 국부화 도메인(예를 들어 형질 막(PM) 또는 초기 엔도솜(EE)의 경우), BRET 공여체(예를 들어, RlucII)로 태그된 특이적 이펙터의 Gα-상호작용 도메인을 발현하는 세포를 작용제에 노출시켜 공동-발현된 G 단백질을 활성화시킨다. i)에서, 작용제-유도 GPCR 자극은 G 단백질을 직접적으로 활성화시켜, 세포질에서 rGFP-표지된 막으로 태그된-이펙터를 동원한다. ii)에서, G 단백질 활성화는 RTK(예를 들어, EGFR) 또는 인테그린 α-β 복합체의 활성화 후 GEF 예컨대 GIV/Girdin의 동원으로부터 매개된다. G 단백질 서브유닛은 그들의 활성화를 모니터링하기 위해 변형될 필요가 없으며, 특이성은 Gα 단백질 서브유닛을 연구된 수용체와 공동 발현하고 G 단백질의 각각의 패밀리에 특이적인 GASIP 예컨대 Gi 패밀리의 구성원만이 모의 조건보다 더 큰 반응을 나타내었고(내인성으로 발현된 Gi1, i2 & i3 단백질의 활성화)(도 1b), PDZRG를 사용한 경우 G12/G13 패밀리의 구성원만이 모의 조건보다 더 큰 반응을 나타내었고(내인성으로 발현된 G12 및 G13 단백질의 활성화)(도 1c), P63RG를 사용한 경우 Gq 패밀리의 구성원만이 모의 조건보다 더 큰 반응을 나타내었으며(내인성으로 발현된 Gq 및 G11 단백질의 활성화)(도 1d 및 1e), 따라서 검정의 특이성을 확인하였다.

[0196] 실시예 3: Gi 패밀리의 G 단백질의 활성화를 모니터링하기 위한 시스템 및 검정

[0197] 도 2a 내지 2z는 Gi 패밀리의(Gi1, i2, i3, oA, oB, z)의 G 단백질의 활성화를 모니터링하기 위한 Rap1GAP-기반 BRET 센서의 최적화 및 사용을 도시한다. 시험된 다양한 작제물은 도 2a에 도시되어 있다. 도 2b 내지 2e에 제시된 결과는 검출가능한 BRET 신호가 시험된 2개의 BRET 공여체(Rluc8 및 RlucII)를 사용하여 획득되었으며, RlucII가 전형적으로 Rluc8에 비해 보다 우수한 동적 창을 제공함을 나타낸다. 도 2f 및 2g에 제시된 결과는 세포가 포스콜린(이는 cAMP 생산 증가 및 단백질 키나제 A의 활성화를 촉진시켜 상이한 단백질의 인산화를 초래함)으로 전처리된 경우 측정된 더 낮은 반응에 의해 입증되는 바와 같이 Rap1GAP(1-442) 작제물이 인산화에 민감하여, 검정에 영향을 미칠 수 있음을 입증한다. C-말단 절단된 변이체(1-420 및 1-436), 및 Ser을 Ala으로 및 Ser을 Asp으로 치환의 조합을 포함하는 상이한 돌연변이체를 제조하고 추정되는 인산화 부위(간지 Ser 437, 439 및 441)에서 생성 및 시험하였다. RAP1GAP의 C-말단 절단된 변이체(ΔCT)는 포스콜린의 영향에 민감하지 않았지만, 이 더 짧은 단편(Rap1GAP 1-420)의 창은 Rap1GAP(1-442)의 것보다 유의하게 더 낮다(도 2h). 시험된 다른 돌연변이체 중에서, 포스콜린에 의해 여전히 영향을 받은 유일한 돌연변이체는 Rap1GAP(SS-AD), Rap1GAP(SSS-TTT) 및 Rap1GAP(SS-AA)였으며, 후자는 Rap1GAP(1-442)-RlucII와 필적할만한 동적 창을 나타냈다(도 2j-2q). Rap1GAP(SSS-AAA)를 하기 기재된 다른 실험을 위해 사용하였다.

[0198] 도파민-촉진된 자극시 도파민 D4 수용체(D4R)의 G 단백질 프로파일을 형질 막으로 Rap1GAP(SSS-AAA)-RlucII 전위로 획득하였으며, 각각의 G 단백질(Gi1, Gi2, Gi3, GoA & GoB)은 명확한 약제학적 특징을 갖는 용량-반응 곡선을 나타내었다(도 2r). Gz 활성화를 사용하여 5개 도파민 수용체에 대한 여러 도파민 수용체 리간드(A412 997, 도파민, L741 742 및 WAY-100635)를 프로파일링하였고, 그 결과는 도 2s 내지 2w에 도시되어 있다. 도파민은 모든 수용체를 활성화시키는 것으로 나타났으며(EC₅₀: D1R = 380 nM, D2R = 2.6 nM, D3R = 0.50 nM, D4R = 0.11 nM, D5R = 51 nM), 알려진 D4R 길항제 L741,742는 임의의 도파민 수용체에 대해 작용제 또는 역 특성을 나타내지 않았다. WAY-100635는 단지 D4R(EC₅₀ = 0.83)에 대한 작용제 특성을 나타낸 반면, A412,997은 D3R(EC₅₀ = 281 nM) 및 D4R(EC₅₀ = 0.04 nM) 둘 다를 활성화시켰지만, D1R, D2R 또는 D5R는 활성화시키지

않았다. 도 2x-2z에 도시된 결과는 검정이 강력하고 고처리량 스크리닝(HTS)과 양립할 수 있으며, Z' 인자가 각각 Gi2, GoA 및 Gz 활성화에 대해 0.812, 0.703 및 0.607로 평가되었음을 나타낸다.

[0199] 도 3a-3d는 RGS17, 19 및 20과 같은 G-단백질 신호전달 조절인자(RGS) 단백질의 구성원의 RGS 도메인이 G 단백질 활성화를 모니터링하기 위해 Rap1GAP에 대한 대안으로 사용될 수 있음을 나타낸다. RGS17(잔기 64-210), RGS19(잔기 70-217) 및 RGS20(잔기 242-388) 단백질의 RGS 도메인에 기초한 RlucII-태그된 작제물은 도 3a에 제시되어 있다. 이들 단백질의 Gα-결합 RGS 도메인만을 사용하는 것은 유리하게는 G 단백질 활성화시 상이한 구획으로 시토졸 국부화 및 전위를 허용하며, 전장 단백질에 존재하는 다른 도메인 또는 이들 단백질의 N-말단 부분에 존재하는 팔미토일화 부위에는 영향을 미치지 않는다. RGS(RGS17)-RlucII(도 3b), RGS(RGS19)-RlucII(도 3c) 및 RGS(RGS20)-RlucII(도 3d)로 수득된 용량-반응 곡선은 PM에서 Gi1, Gi2, Gi3, GoA, GoB 및 Gz 활성화의 D4R/도파민-매개 활성화에 대해 제시된다. 3개의 RGS 작제물에 대해 유사한 결과(커플링 및 EC₅₀)를 수득하였으며, 이들 RGS-기반 작제물이 Gi 및 Go 활성화를 모니터링하는데 사용될 수 있음을 확인하였다. 결과는, Gz의 공동발현이 모의 조건과 구별가능한 신호를 초래하지 않았고, Gi3에 대한 동적 창이 Rap1GAP-기반 작제물에 비해 RGS-기반 작제물을 사용하여 더 작았다는 것을 제외하고는, Rap1GAP-기반 작제물을 사용하여 수득된 것들과 유사하였다.

[0200] 실시예 4: G12/13 패밀리의 G 단백질의 활성화를 모니터링하기 위한 시스템 및 검정.

[0201] G12/13 패밀리의 G 단백질의 활성화를 모니터링하기 위한 PDZRhoGEF-기반 BRET 시스템의 최적화 및 사용은 도 4a-g에 기재되어 있다. G12/13 결합 도메인(잔기 281-483, PDZRG)을 포함하는 PDZRhoGEF의 단편을 C-말단에서 BRET 공여체 RlucII로 태그하였다(도 4a). G12 및 13의 활성화를 측정하기 위한 동적 창은 Gα 서브유닛의 발현 수준에 직접적으로 따르는 것으로 나타났지만, 발현 수준은 상이한 양의 G12 및 13으로 수득된 필적할만한 LogEC₅₀에 의해 입증된 바와 같이 G12 및 13의 I-BOP/TPαR-매개 활성화에 대한 효능에 영향을 미치지 않았다(도 4b 및 4c). PDZRG-RlucII를 사용하여 PM에서 G12 및 G13 활성화에 대한 TPαR 리간드를 프로파일링하였다. 세포를 하나의 부분 작용제(U51605) 및 길항제 I-SAP 및 SQ 29,558과 함께 알려진 완전 작용제(U46619, I-BOP, CTA2)로 자극하였다. 도 4d 및 4e에 도시된 결과는 SQ 29,558이 TPαR 작용제로서 작용하지 않음을 나타낸다. 그들의 알려진 활성/특성과 일치하게, U46619, I-BOP 및 CTA2는 G12 및 13 활성화에 대한 완전 작용제이며, 이는 G12/13 활성화를 모니터링하기 위한 검정의 타당성을 검증한다. 흥미롭게도, U51605 및 I-SAP는 편향된 리간드로서 작용하는 것으로 제시되었다. U51605는 G12(Max의 40%) 활성화에 대한 부분 작용제, 및 G13(Max의 93%)에 대한 거의 완전 작용제인 것으로 입증되었다. 대조적으로, I-SAP 자극은 검정에서 유의한 G12 활성화를 유도하지 못하지만(도 4d), 부분 작용제 활성(Max의 53%)은 G13에서 검출되었다(도 4e). 최종적으로, G12 활성화에 대해 0.645 및 G13 활성화에 대해 0.812로 평가된 Z' 인자를 수득하였으며(도 4f 및 4g), 이는 검정이 강력하고 G12/G13 조절에 기초한 고처리량 스크리닝 적용과 양립할 수 있음을 다시 나타낸다.

[0202] G12/13 패밀리의 G 단백질의 활성화를 모니터링하기 위한 P115RhoGEF-기반 BRET 시스템의 최적화 및 사용은 도 5a-e에 기재되어 있다. G12/13 결합 도메인(잔기 1-244, P115RG)을 포함하는 P115RhoGEF의 단편을 C-말단에서 BRET 공여체 RlucII로 태그하였다(도 5a). P115RG-RlucII를 사용하여 PM에서 G12 및 G13 활성화에 대한 TPαR 리간드를 프로파일링하였다. 세포를 U46619, I-BOP, CTA2, U51605, I-SAP 및 SQ 29,558로 자극하였다. 도 5b 및 5c에 도시된 결과는 PDZRG-RlucII로 수득된 것들과 일치하며, SQ 29,558이 TPαR 작용제로서 작용하지 않으며, U46619, I-BOP 및 CTA2가 G12 및 13 활성화에 대한 완전 작용제이며, U51605 및 I-SAP가 편향된 리간드로서 작용하는 것으로 제시되었음을 나타낸다. U51605는 G12(Max의 14%) 및 G13(Max의 60%) 활성화에 대한 부분 작용제인 것으로 입증된 반면, I-SAP 자극은 G13(Max의 19%)에 대해 부분 작용제이고 G12 활성화에 대해 중성이었다. 최종적으로, G12 활성화에 대해 0.703 및 G13 활성화에 대해 0.743으로 평가된 Z' 인자를 수득하였으며(도 5d 및 5e), 이는 검정이 강력하고 G12/G13 조절에 기초한 고처리량 스크리닝 적용과 양립할 수 있음을 다시 나타낸다.

[0203] 실시예 5: Gq 패밀리의 G 단백질의 활성화를 모니터링하기 위한 시스템 및 검정.

[0204] Gq 패밀리(Gq, G11, G14 및 G15)의 G 단백질의 활성화를 모니터링하기 위한 P63RhoGEF-기반 BRET 시스템의 최적화 및 사용은 도 6a-s에 기재되어 있다. Gq 결합 도메인(잔기 295-502, P63RG)을 포함하는 P63RhoGEF의 단편을 C-말단에서 BRET 공여체 RlucII로 태그하였다(도 6a). 전장 P63RhoGEF 단백질은 그의 N-말단에 의해 PM과 회합된다. PDZRG-RlucII 및 P115RG-RlucII와 같이, P63RhoGEF의 G 단백질 결합 도메인만을 포함하는 단편을 사용하는 것은 유리하게는 G 단백질 활성화시 상이한 구획으로 시토졸 국부화 및 전위를 허용한다. 상이한 막 마커(PM의 경우 rGFP-CAAX 및 EE의 경우 rGFP-FYVE)를 사용하여 PM 및 초기 엔도솜(EE)에서 G 단백질 활성을

모니터링하기 위한 최적화는 도 6b-6e(PM의 경우) 및 도 6f-i(EE의 경우)에 제시되어 있다. 모의는 재조합 Gα로 형질감염되지 않은 세포에서 내인성 G 단백질로부터 수득된 반응을 나타낸다. Gq 패밀리의 구성원의 활성화를 측정하기 위한 동적 창은 Gα 서브유닛의 발현 수준에 따르는 것으로 제시되었다. Gq에 대해 도 6b 및 G14에 대해 도 6d에 제시된 바와 같이, 동적 창은 더 많은 Gα가 공동형질감염될수록 증가한다. G15의 경우(도 6e), 효과는 Gα15를 암호화하는 공동-형질감염된 작제를 5ng에서 이미 최대이며, 형질감염은 보다 유의한 효과를 갖지 않았다. G11의 경우(도 6c에서), 5 ng 초과형질감염된 DNA 수준을 증가시키는 것은 동적 창을 감소시키는 것으로 제시되었다. EE에서 G 단백질 활성의 모니터링에 대해 유사한 결과를 수득하였다(도 6f-i).

[0205] 최적화된 조건을 사용하여 PM(도 6j-6m) 및 EE(도 6n-6q)에서 TPαR 리간드 U46619, I-BOP, CTA2, U51605, I-SAP 및 SQ 29,558을 프로파일링하였다. 도 6j-6m에 제시된 바와 같이, U46619, I-BOP 및 CTA2는 Gq(도 6j), G14(도 6k), G11(도 6l) 및 G15(도 6m)에 대한 완전 작용제이며; U51605는 부분 작용제이며(Gq의 경우 I-BOP 최대 반응의 32%, G14의 경우 25%, G11의 경우 24% 및 G15의 경우 10%); I-SAP(Gq에 대해 단지 7%) 및 SQ 29,558은 PM에서 모든 4개의 G 단백질의 유의한 활성화를 유도하지 못한다. EE에서 G 단백질 활성을 모니터링하는 경우 유사한 결과(효능 및 효과)를 수득하였다(도 6n-6q). U51605의 경우, Gq(I-BOP 최대 반응의 71%), G11(61%) 및 G14(75%)에 대해 EE에서 더 높은 효과를 관찰하였지만, G15에 대한 반응은 없었다. 최종적으로, PM에서 각각 Gq 및 G11 활성화에 대해 0.840 및 0.879로 평가된 Z' 인자를 수득하였으며(도 6r 및 6s), 이는 검정이 강력하고 Gq 조절에 기초한 고처리량 스크리닝 적용과 양립할 수 있음을 다시 나타낸다.

[0206] Gq 패밀리의 Gq, G11, G14 및 G15의 G 단백질의 활성화를 모니터링하기 위한 GRK2-기반 BRET 시스템의 최적화 및 사용은 도 7a-7f에 기재되어 있다. 2개의 RGS(GRK2) 작제물이 제시되어 있다. Gq 결합 도메인(RGS 도메인)(잔기 30-203, RGS(GRK2))을 포함하는 GRK2의 단편을 N-말단(RlucII-RGS(GRK2)) 또는 C-말단(RGS(GRK2)-RlucII)에서 BRET 공여체, RlucII로 태그하였다. 전장 GRK2 단백질은 플렉스트린(PH) 도메인 및 PM으로 자체 동원을 조절하는 Gβγ-상호작용 도메인을 갖는다. GRK2의 Gq-결합 RGS 도메인만을 사용하는 것은 유리하게는 Gq 단백질 활성화시 상이한 구획으로 시토졸 국부화 및 전위를 허용하며, 예를 들어 다른 비-Gq G 단백질의 활성화를 통해 조절될 수 있는 PIP₂ 또는 유리 Gβγ 서브유닛 수준에 영향을 미치지 않는다. 도 7b 및 7c에서, RlucII-RGS(GRK2)로 수득된 용량-반응 곡선은 2개의 Gq-결합된 수용체, 안지오텐신II로 자극된 AT1AR(도 7b) 및 U46619로 자극된 TPαR(도 7c)에 의해 PM에서 Gq, G11, G14 및 G15 활성화에 대해 제시된다. 도 7d 및 7e에 도시된 바와 같이, RGS(GRK2)-RlucII로 유사한 결과(커플링 및 EC₅₀)를 수득하였지만, 동적 창은 일반적으로 RlucII-RGS(GRK2)에 비해 더 낮았다. 100 nM U46619로 TPαR의 활성화 후 PM으로 RlucII-RGS(GRK2)의 동원을 평가하는 경우 0.785로 평가된 Z' 인자를 수득하였으며, 이는 검정이 강력하고 Gq 조절에 기초한 고처리량 스크리닝 적용과 양립할 수 있음을 입증한다.

[0207] 실시예 6: 비-수용체 구아닌 뉴클레오티드 교환 인자(GEF)에 의한 G 단백질 활성화를 모니터링하기 위한 시스템 및 검정.

[0208] G 단백질 활성화는 비-수용체 구아닌 뉴클레오티드 교환 인자(GEF) 예컨대 GIV(Gα-상호작용 소포-관련 단백질, 또한 Girdin으로도 알려짐), NUCB1(뉴클레오티딘1, 또한 calnuc로도 알려짐), NUCB2 및 DAPLE(홀어진-회합 단백질)를 통해 달성될 수 있다. GIV/Girdin 활성은 RTK(예를 들어, EGFR) 및 Gi 활성의 인테그린 조절과 관련된다. DAPLE는 wnt/Frizzille 수용체(GPCR)를 통한 rac 및 Gi-활성화와 관련된다. WT Gi 단백질의 GEF-매개 활성화는 본원에 기재된 Gi 패밀리의 G 단백질의 활성화를 모니터링하기 위한 시스템/검정, 예컨대 Rap1Gap(SSS-AAA)-RlucII를 사용한 시스템/검정을 사용하여 모니터링할 수 있다. 그러나, GPCR이 EGFR 및 IGFR과 같은 RTK를 전사활성화시키는 것으로 제시된 바 있으므로, HTS 적용 및 리간드 프로파일링 연구를 위해, G 단백질의 GPCR과 GEF-매개 활성화 사이를 구별할 수 있는 것이 유용할 수 있다. 이 목적을 달성하기 위해, C-말단 돌연변이를 갖는 돌연변이체 Gai2 단백질의 그룹(도 8a)을 설계 및 시험하였다. WT 및 돌연변이체 Gi2의 EGFR-매개 활성화를 용량 반응 곡선으로 GPCR(BKB2R) 반응과 비교하였다. Gai2의 마지막 2개 잔기(도 8b, 8c) 또는 Gai2(도 8d, 8e) 및 GaoB(도 8f, 8g)의 마지막 5개 잔기의 결실은 Gi2 및 GoB의 EGFR-매개 활성화를 유지하면서 GPCR-매개 G 단백질 활성화를 방지하기에 충분하였다. Gi2의 경우, 두 결실은 EGFR을 공동-발현하는 세포에 대해 WT G 단백질과 비교하여 기저 활성을 변화시켰다. 2개의 보존된 류신 잔기(위치 -7 및 -2)에서 치환을 수행하여 EGFR과 유사한 기저 활성을 초래할 수 있지만 GPCR 활성화시 여전히 불활성인 돌연변이체를 갖는 잔기를 확인하였다. 그러므로 L-7G 돌연변이체는 EGFR을 갖는 WT와 상이한 기저 활성을 나타내었다(도 8h, 8i). Gai2의 L-2G 돌연변이체에 대한 결과는 EGFR을 갖는 WT와는 유사하지만 BKB2R을 갖는 것과는 상이한 기저 활성을 나타내었다(도 8j, 8k). GaoB L-2G 돌연변이체의 경우, 기저 활성은 두 수용체에 대해 WT 단백질과 유사

하였다(도 8l, 8m). 추가의 L-2 돌연변이체 $G\alpha i2$ 단백질을 시험하였다(L-2D, L-2P 및 L-2R). 그들의 동적 반응은, PM으로 Rap1GAP(SSS-AAA)-RlucII의 작용제-유도 전위의 측정시, WT 단백질을 사용한 것보다 더 작지만, 기저 활성에서의 차이는 $G\alpha i2$ 단백질의 결실 또는 L-2G 돌연변이체에 비해 훨씬 더 근접하였다(도 8n-8s). WT $G\alpha i2$ 를 사용하여 0.70(도 8t) 및 L-2P $G\alpha i2$ 돌연변이체를 사용하여 0.73(도 8u)으로 평가된 Z' 인자를 수득하였으며, 이는 돌연변이체 및 WT G 단백질 둘 다를 사용하여 비-GPCR-매개 G 단백질 활성화를 모니터링하는 강력한 검정을 나타낸다. 도 8v-8x는 Rap1GAP(SSS-AAA)-RlucII가 GPCR(SNC80-매개 DOR 활성화에 대해 도 8v 및 도 8w에서, D2R의 퀵폴-매개 활성화) 뿐만 아니라 GEF-매개 G단백질 활성화(EGFR 자극을 통해; 도 8x)를 모니터링하는데 사용될 수 있는 반면, 작용제 EGF의 상승 농도의 존재 하에 BRET 신호에서 유의한 증가가 없기 때문에, RGS(RGS17)-RlucII-기반 센서는 단지 GPCR-매개 활성화를 모니터링함을 나타낸다. GPCR 활성화는 RTK 전사활성화를 초래할 수 있기 때문에, 이들 결과는 WT $G\alpha$ /RGS(RGS17)-RlucII 및 돌연변이체 $G\alpha$ /Rap1GAP(SSS-AAA)-RlucII가 RTK/GEF-매개 G단백질 활성화로부터 GPCR-매개된 것을 구별하는데 사용될 수 있다는 증거를 제공한다.

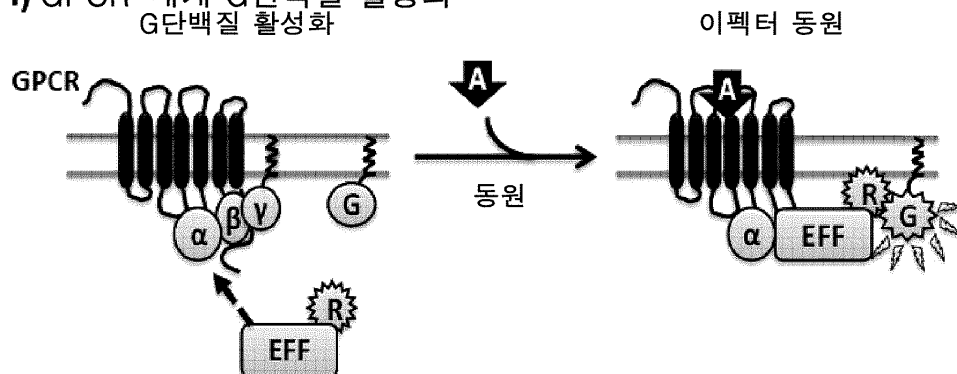
[0209]

본 발명이 특정 구현예의 방식으로 상기 본원에 기재되었지만, 첨부된 청구범위에 정의된 바와 같이 대상 발명의 취지 및 본질을 벗어나지 않으면서 변형될 수 있다. 청구범위에서, "포함하는"이라는 단어는 "포함하나 이에 제한되지는 않는"이라는 어구와 실질적으로 동등한 개방형 용어로서 사용된다. 단수형은 달리 문맥상 명백하게 나타내지 않는 한 상응하는 복수형을 포함한다.

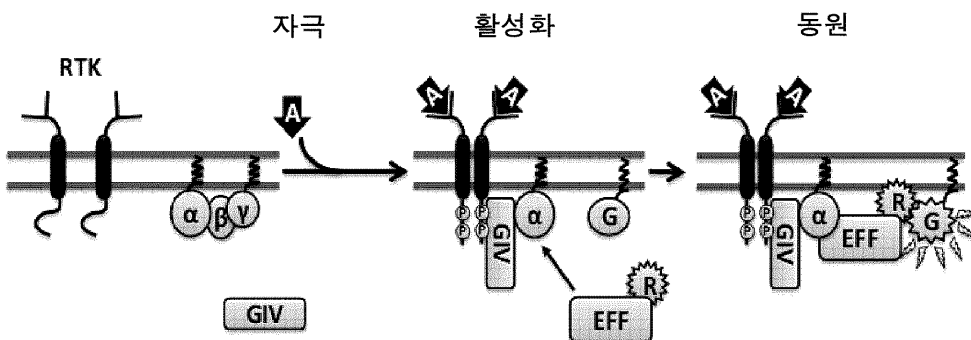
도면

도면1a

i) GPCR-매개 G단백질 활성화

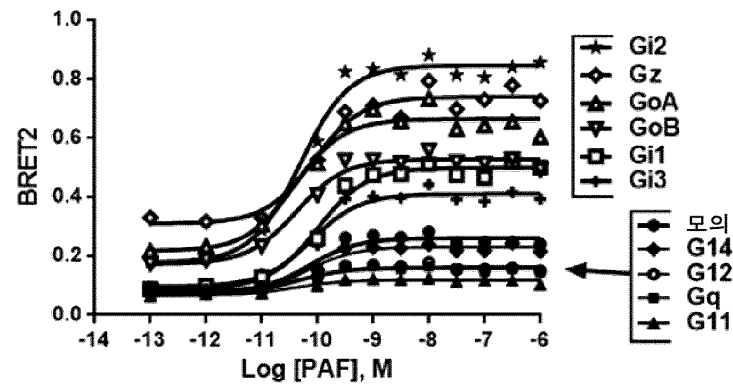


ii) GEF-mediated G protein activation



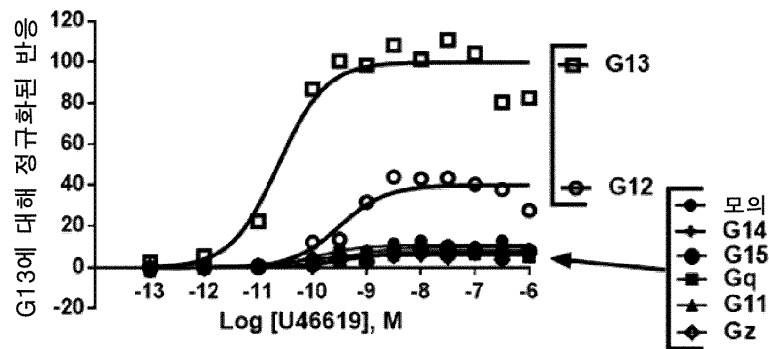
도면1b

DRC:PAF/PAFR, RAP1GAP(SSS-AAA) 센서



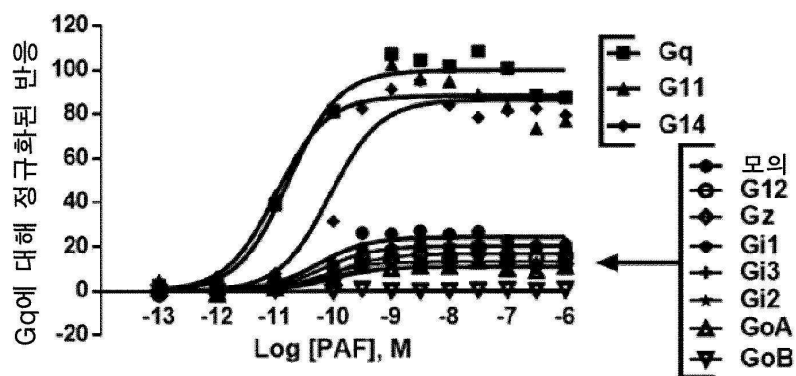
도면1c

DRC:U46619/TP α R, PDZRG 센서

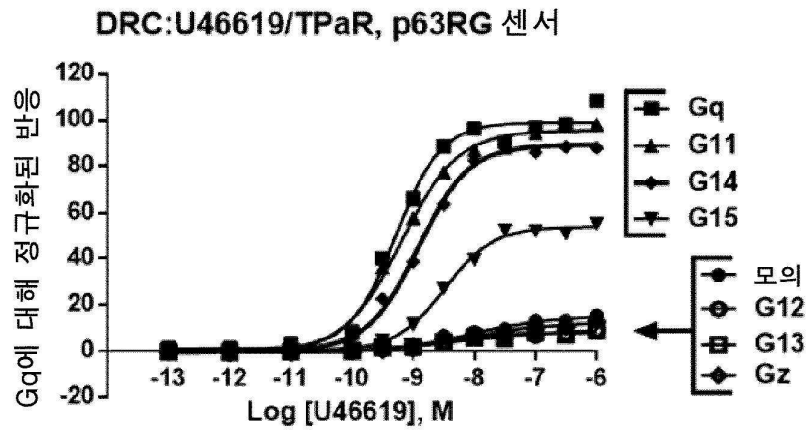


도면1d

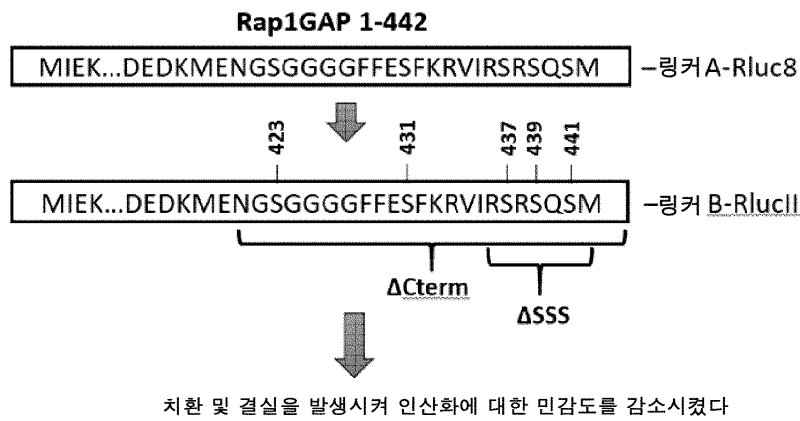
DRC: PAF/PAFR, p63RG 센서



도면1e



도면2a



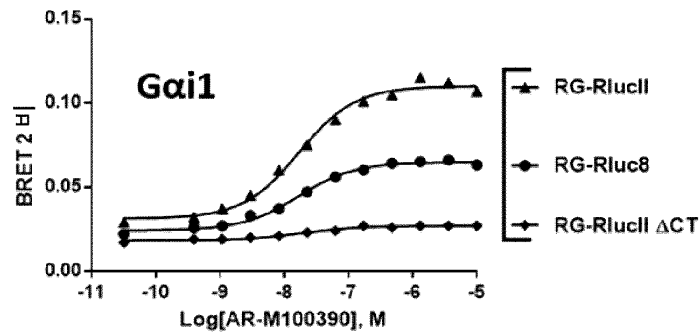
- 변형이체
- Rap1GAP $\Delta Cterm$ (=1-420)
 - Rap1GAP ΔSSS (=1-436)
 - Rap1GAP SS-AA (=S437A/S441A)
 - Rap1GAP SS-DA (=S437D/S441A)
 - Rap1GAP SS-AD(=S437A/S441D)
 - Rap1GAP SS-DD (=S437D/S441D)
 - Rap1GAP SSS-AAA (=S437A/S439A/S441A)
 - Rap1GAP SSS-TTT (=S437T/S439T/S441T)

링커A=GSGGGSGGGA

링커B=GSAGTGGRAIDIKLPAT

도면2b

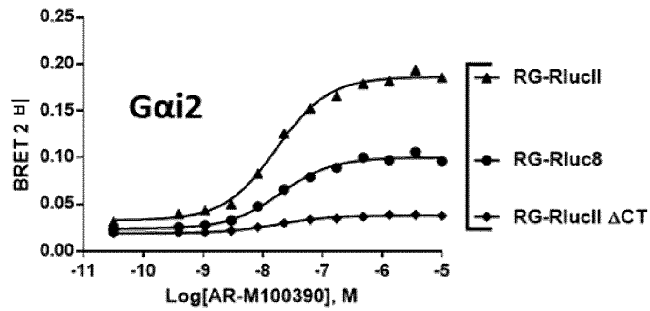
DRC hMOR1/ARM: Rap1GAP-Rluc +G α i1/rGFP-CAAX



	Rluc8	RlucII	RlucII Δ CT
EC50	1.671e-008	1.696e-008	1.846e-008

도면2c

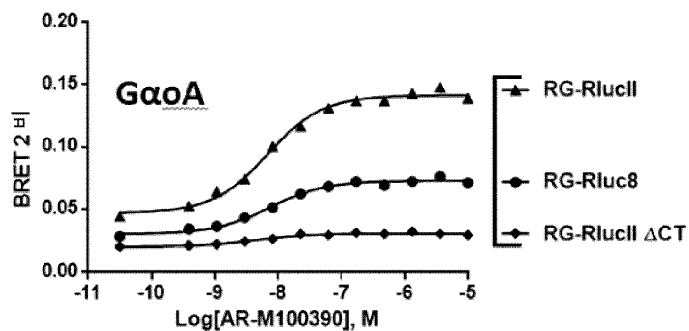
DRC hMOR1/ARM: Rap1GAP-Rluc +G α i2/rGFP-CAAX



	Rluc8	RlucII	RlucII Δ CT
EC50	1.981e-008	1.693e-008	1.739e-008

도면2d

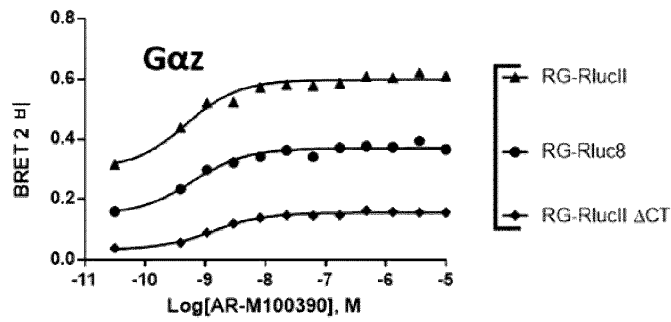
DRC hMOR1/ARM: Rap1GAP-Rluc +G α oA/rGFP-CAAX



	Rluc8	RlucII	RlucII Δ CT
EC50	7.442e-009	6.936e-009	4.671e-009

도면2e

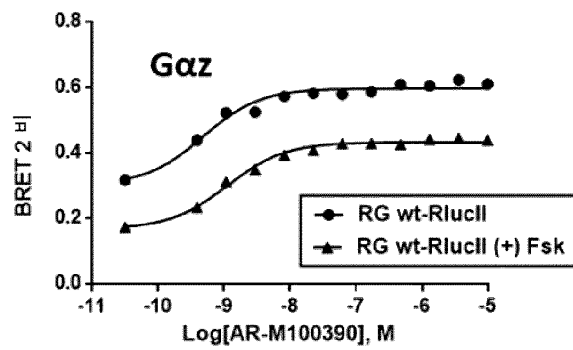
DRC hMOR1/ARM: Rap1GAP-Rluc +Gαz/rGFP-CAAX



	Rluc8	RlucII	RlucII ΔCT
EC50	6.273e-010	4.825e-010	1.328e-009

도면2f

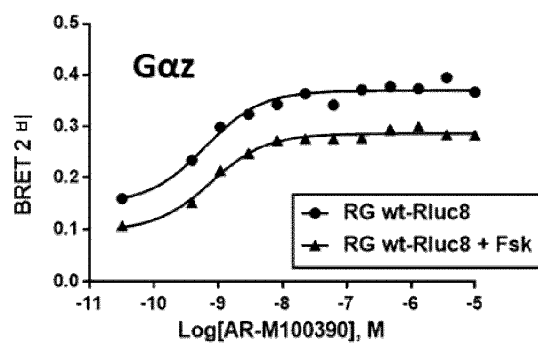
DRC hMOR1/ARM: Rap1GAP-RlucII +Gαz/rGFP-CAAX



	RlucII (-) Fsk	RlucII (+) Fsk
EC50	4.825e-010	1.123e-009

도면2g

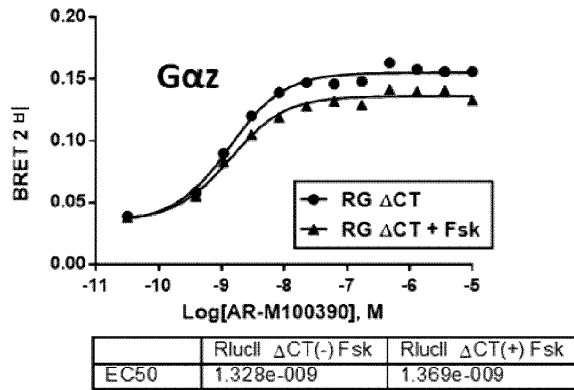
DRC hMOR1/ARM: Rap1GAP-Rluc8 +Gαz/rGFP-CAAX



	Rluc8 (-) Fsk	Rluc8 (+) Fsk
EC50	6.273e-010	7.811e-010

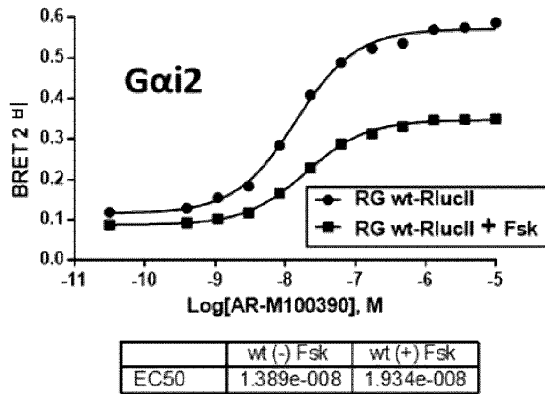
도면2h

DRC hMOR1/ARM: Rap1GAP mut-RlucII +Gz/rGFP-CAAX



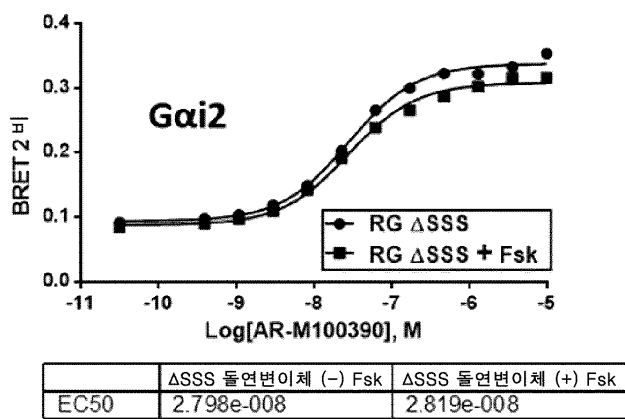
도면2i

DRC hMOR1/ARM: Rap1GAP-RlucII +Gαi2/rGFP-CAAX



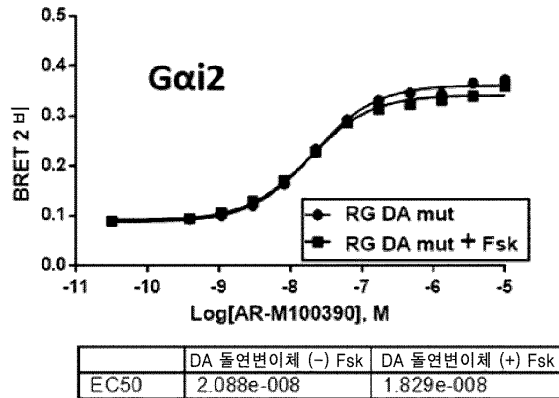
도면2j

DRC hMOR1/ARM: Rap1GAP mut-RlucII +Gαi2/rGFP-CAAX



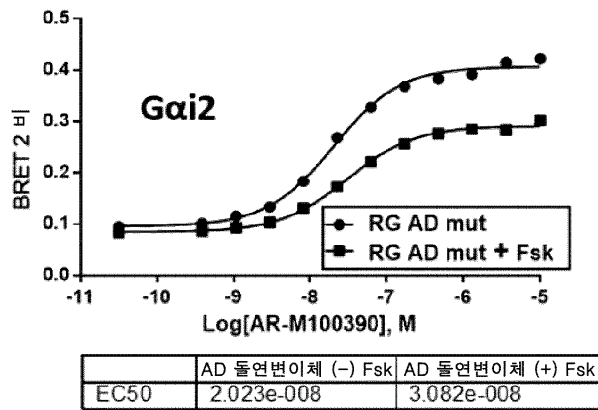
도면2k

DRC hMOR1/ARM: Rap1GAP mut-RlucII +Gαi2/rGFP-CAAX



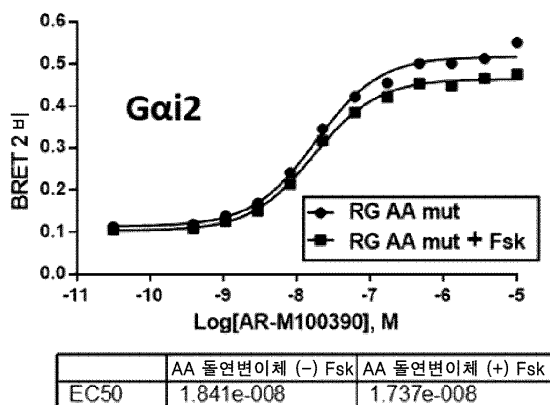
도면2l

DRC hMOR1/ARM: Rap1GAP mut-RlucII +Gαi2/rGFP-CAAX



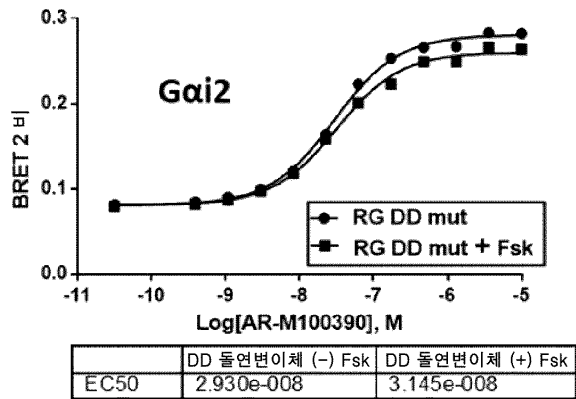
도면2m

DRC hMOR1/ARM: Rap1GAP mut-RlucII +Gαi2/rGFP-CAAX



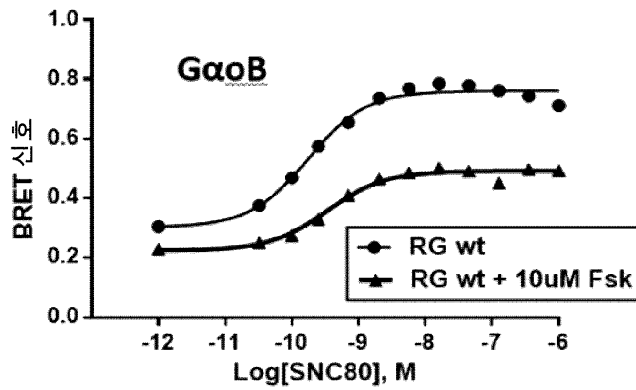
도면2n

DRC hMOR1/ARM: Rap1GAP mut-RlucII +Gαi2/rGFP-CAAX



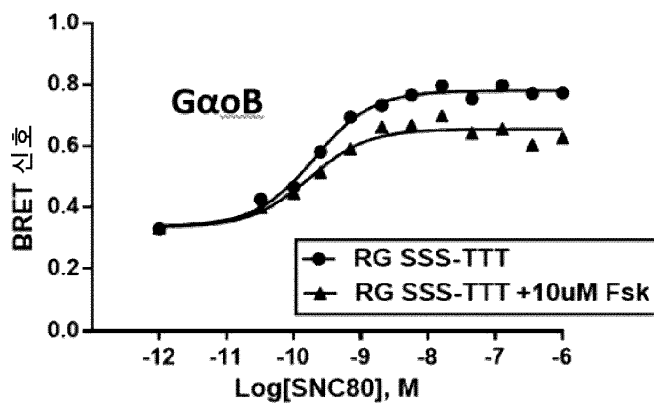
도면2o

DRC hDOR/SNC80: Rap1GAP-RlucII vs GαoB/rGFP-CAAX



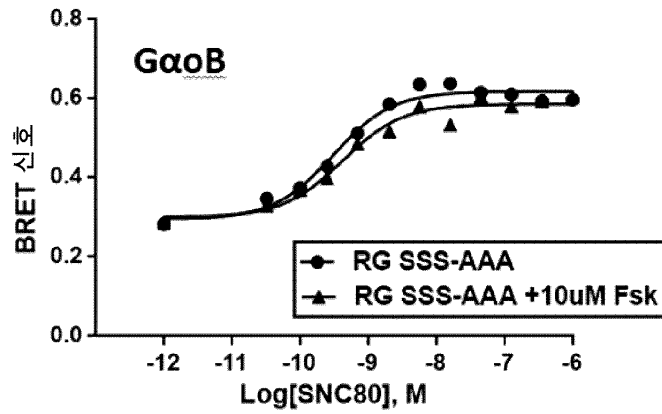
도면2p

DRC hDOR/SNC80: Rap1GAP-RlucII vs GαoB/rGFP-CAAX



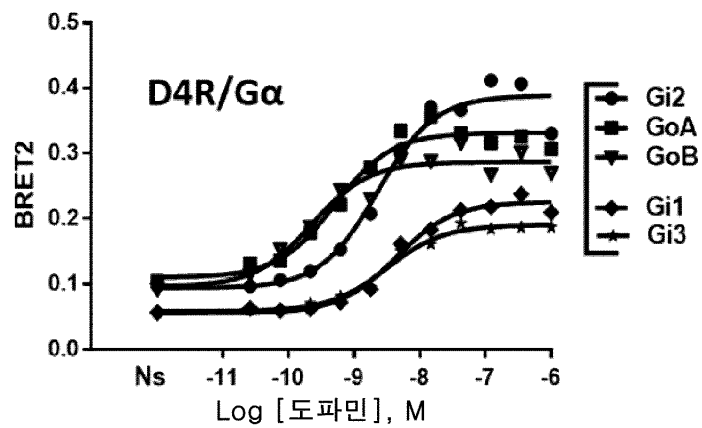
도면2q

DRC hDOR/SNC80: Rap1GAP-RlucII vs $G\alpha B$ /rGFP-CAAX



도면2r

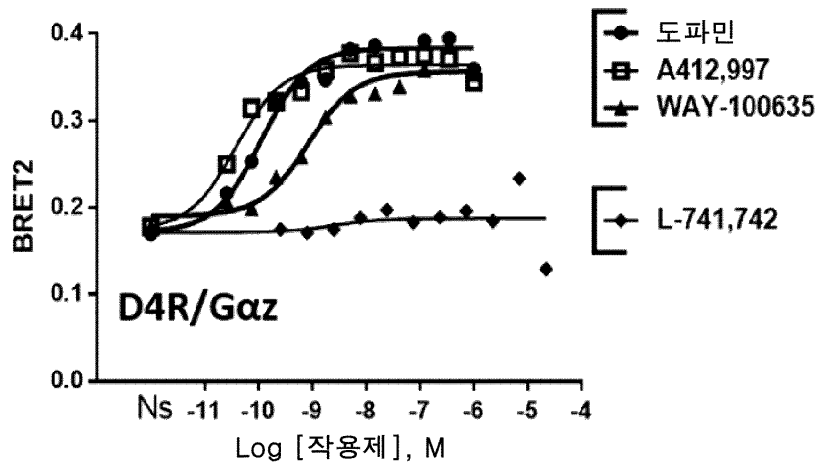
DRC D4R, RAPGAP (SSS-AAA)-RlucII vs $G\alpha$ /rGFP-CAAX



	GoA	GoB	Gi1	Gi2	Gi3
LogEC50	-9.300	-9.651	-8.365	-8.647	-8.505

도면2s

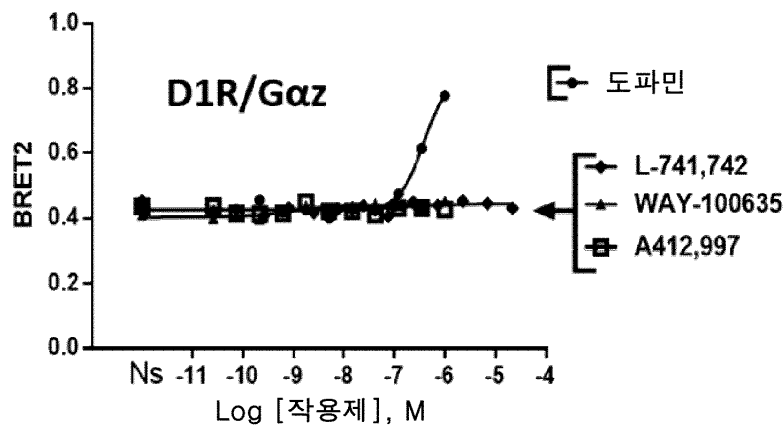
DRC D4R, RAPGAP (SSS-AAA)-RlucII vs Gαz/rGFP-CAAX



	A412,997	도파민	L-741,742	WAY-100635
LogEC50	-10.42	-9.945	-8.583	-9.079

도면2t

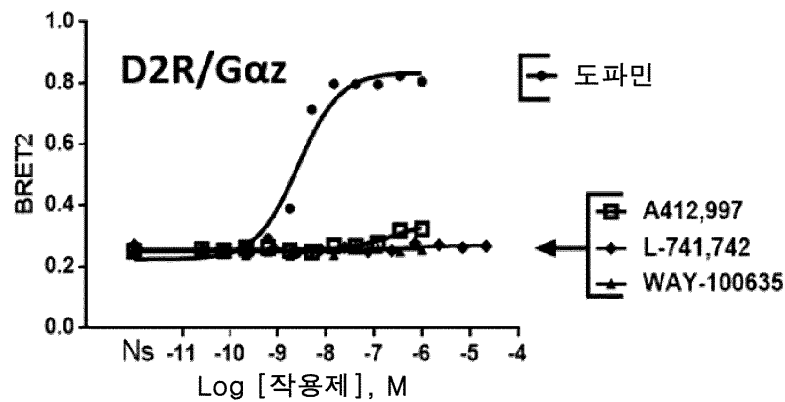
DRC D1R, RAPGAP (SSS-AAA)-RlucII vs Gαz/rGFP-CAAX



	A412,997	도파민	L-741,742	WAY-100635
LogEC50		-5.883	-6.661	-9.022

도면2u

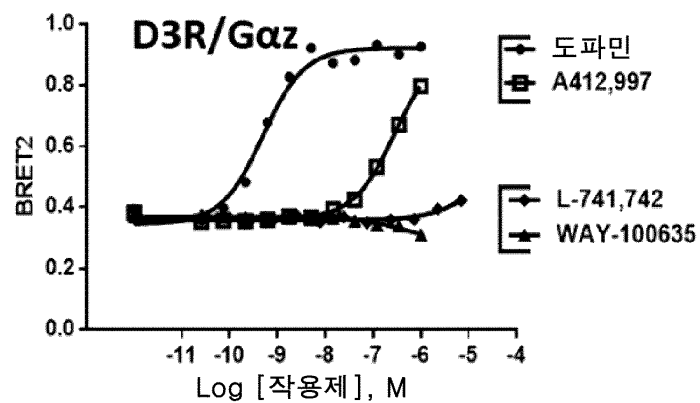
DRC D2R, RAPGAP (SSS-AAA)-RlucII vs $G\alpha z$ /rGFP-CAAX



	A412,997	도파민	L-741,742	WAY-100635
LogEC50	-6.626	-8.577	-6.387	-7.487

도면2v

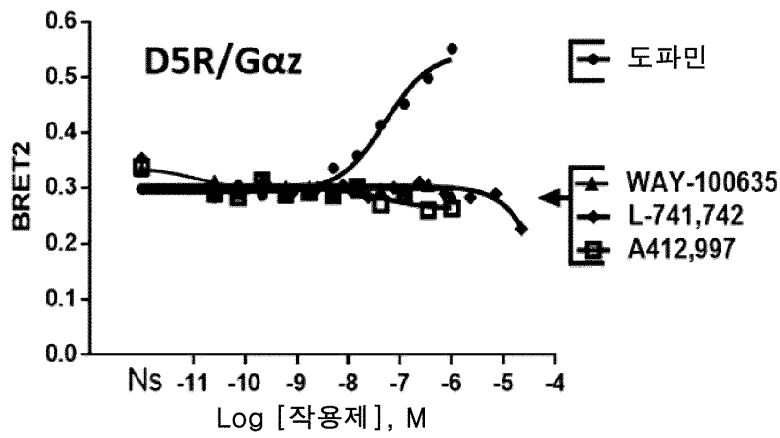
DRC D3R, RAPGAP (SSS-AAA)-RlucII vs $G\alpha z$ /rGFP-CAAX



	A412,997	도파민	L-741,742	WAY-100635
LogEC50	-6.551	-9.309	-5.006	-6.476

도면2w

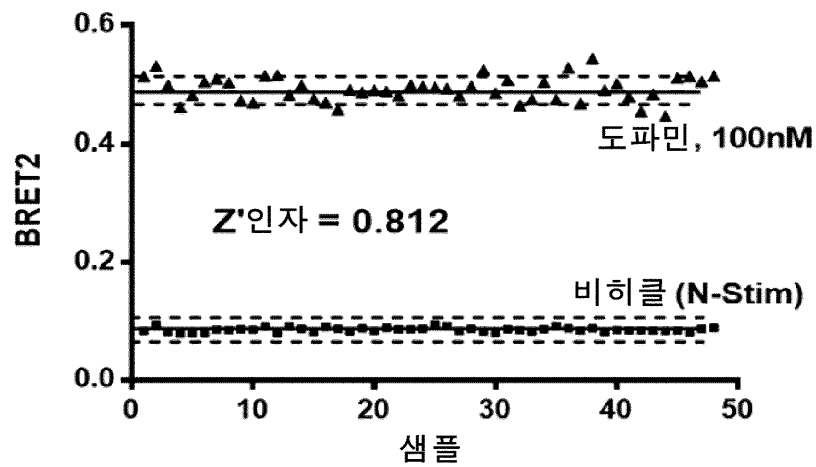
DRC D5R, RAPGAP (SSS-AAA)-RlucII vs Gαz/rGFP-CAAX



	A412,997	도파민	L-741,742	WAY-100635
LogEC50	-7.326	-7.290	~ -2.166	-10.90

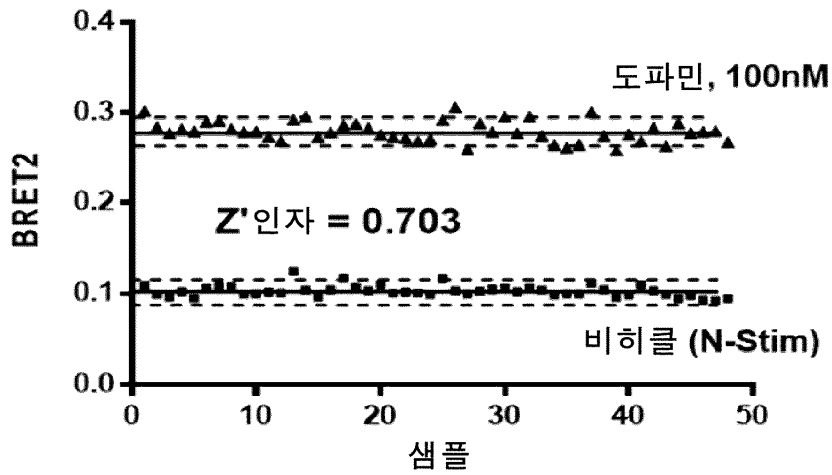
도면2x

Z' 인자: D4R, Rap1GAP (SSS-AAA)/Gi2 센서



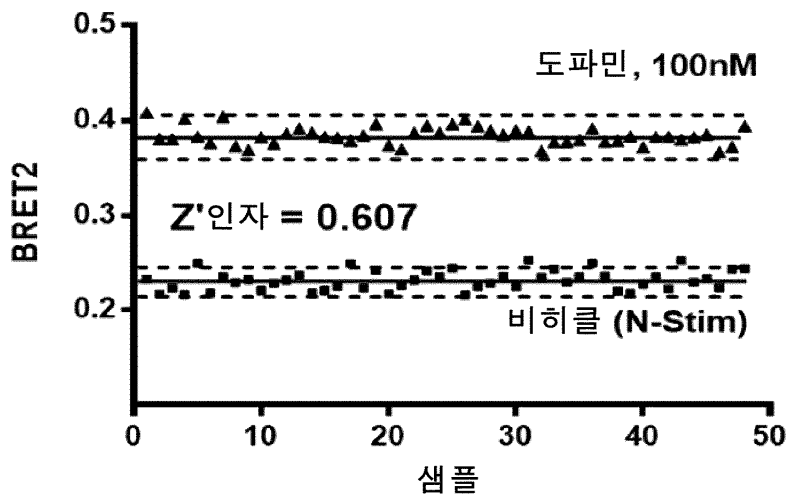
도면2y

Z' 인자: D4R, Rap1GAP (SSS-AAA)/GoA 센서

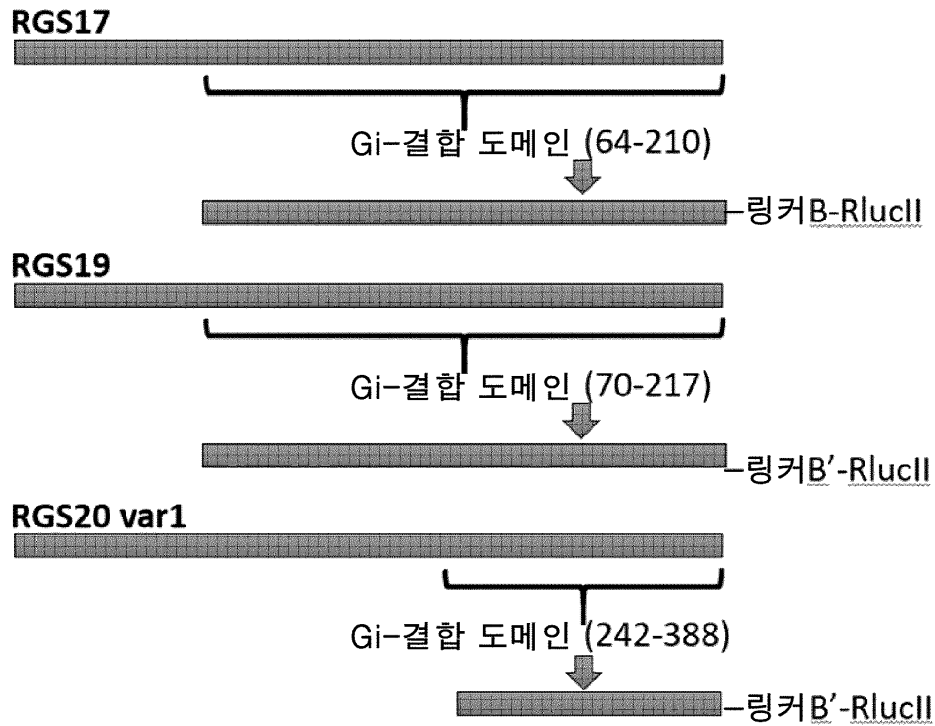


도면2z

Z' 인자: D4R, Rap1GAP (SSS-AAA)/Gz 센서



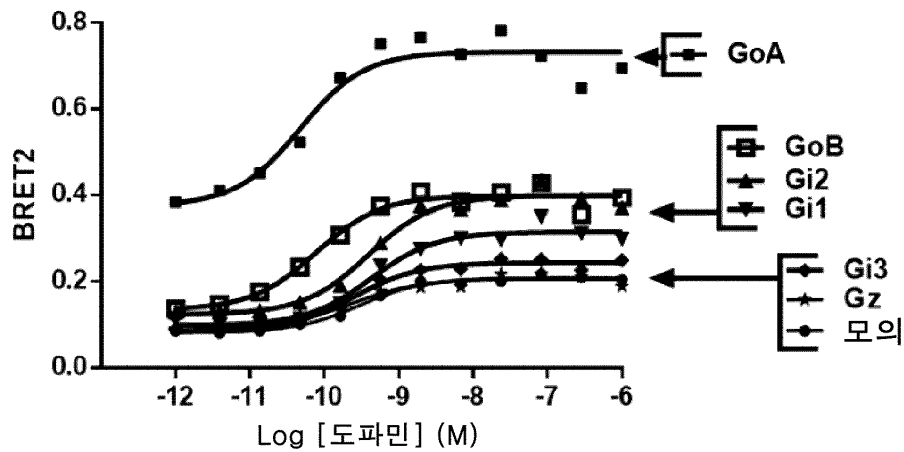
도면3a



LinkerB'=GSAGTGGRAIDIKLASAT

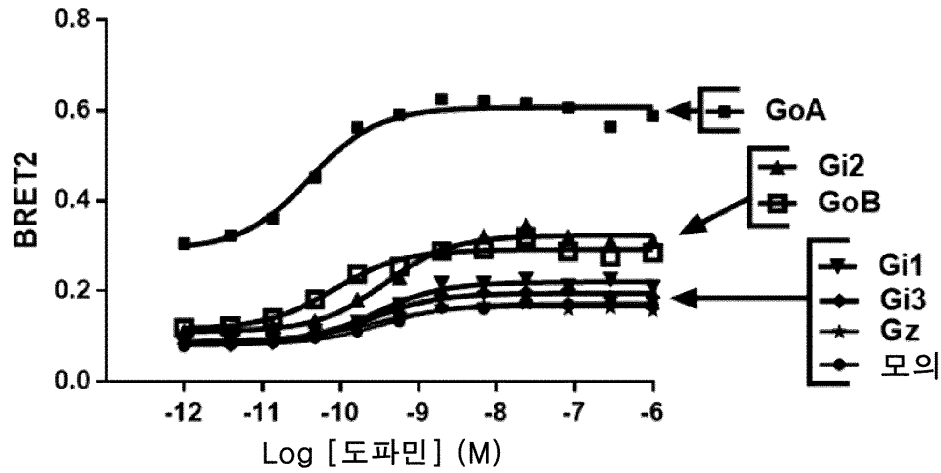
도면3b

DRC: 도파민/D4R, RGS17-기반 센서



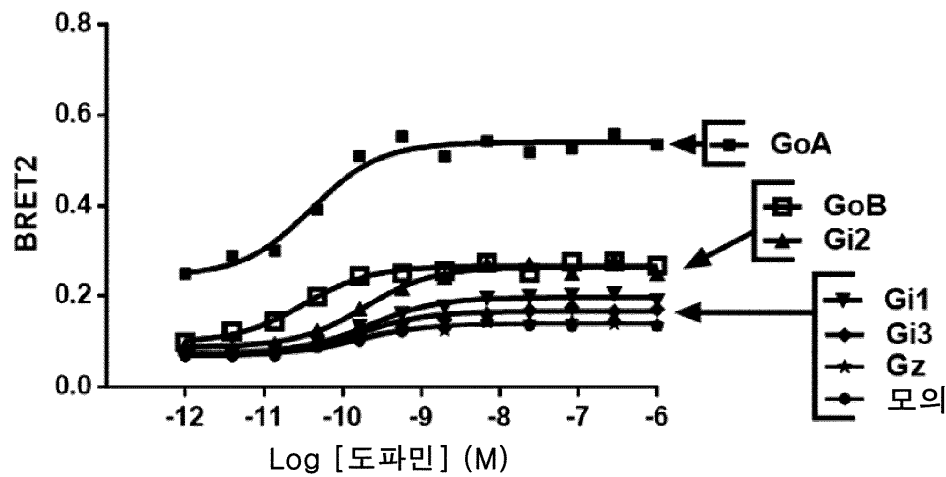
도면3c

DRC: 도파민/D4R, RGS19-기반 센서

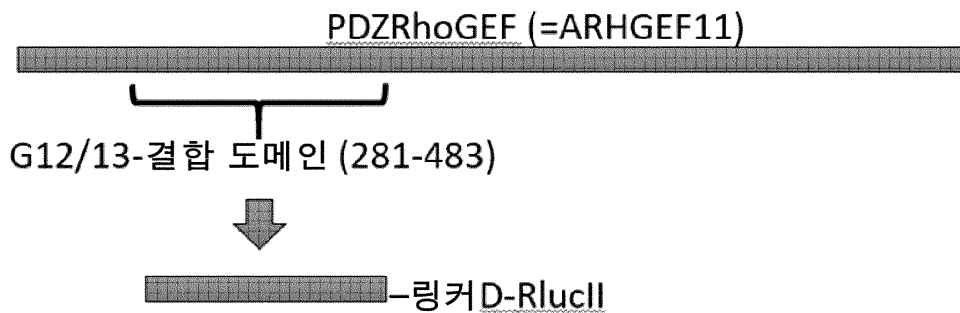


도면3d

DRC: 도파민/D4R, RGS20-기반 센서



도면4a

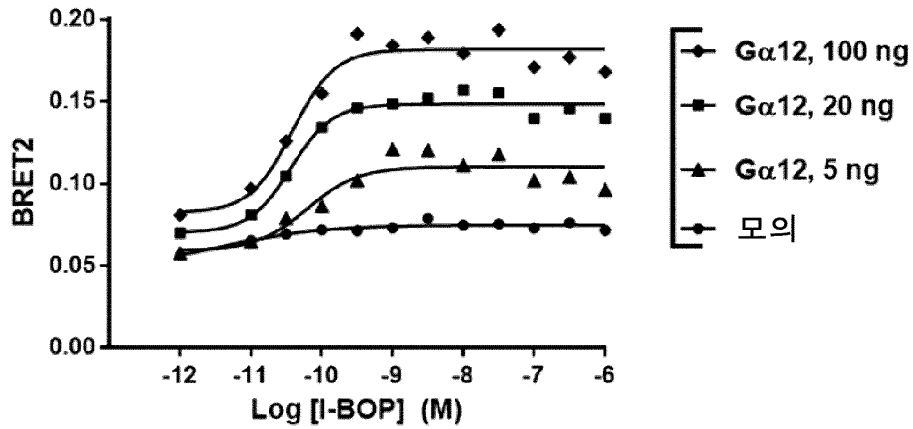


PDZ Rho GEF의 RlucII-태그된 시토졸 G12/13 상호작용 도메인

링커D= GIRLREALKLPAT

도면4b

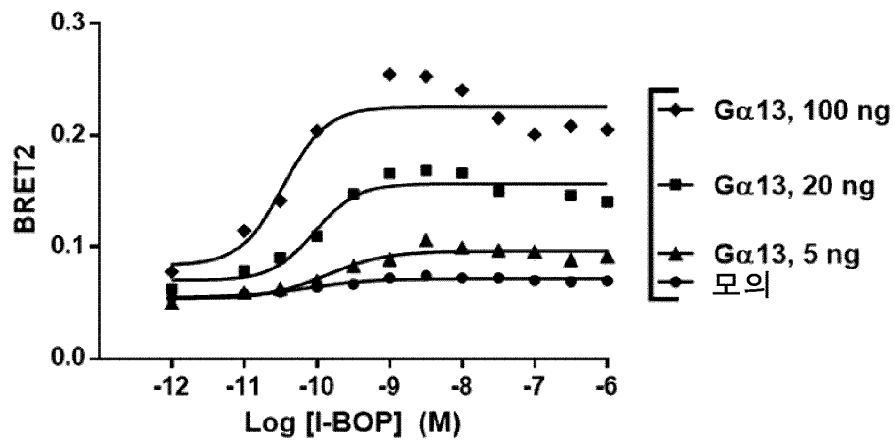
DRC TP α R/I-BOP, PDZRG-RlucII vs G12/rGFP-CAAX



	모의	G α 12, 5 ng	G α 12, 20 ng	G α 12, 100 ng
LogEC50	-11.37	-10.21	-10.44	-10.41

도면4c

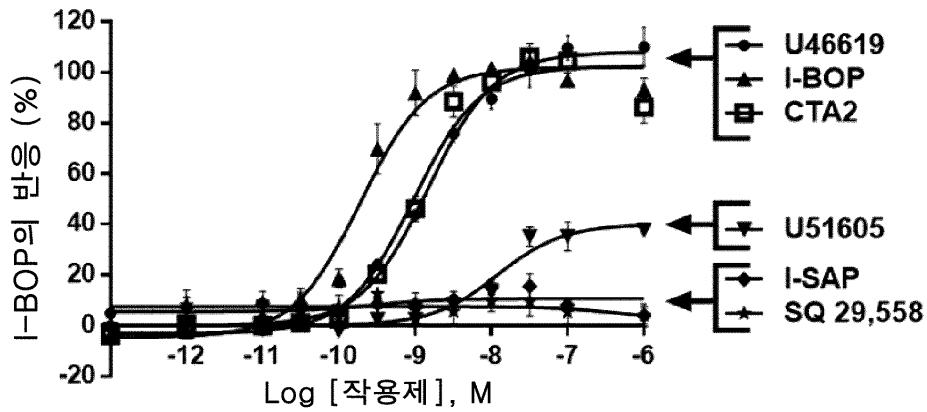
DRC TP α R/I-BOP, PDZRG-RlucII vs G13/rGFP-CAAX



	모의	G α 13, 5 ng	G α 13, 20 ng	G α 13, 100 ng
LogEC50	-10.13	-9.875	-10.04	-10.46

도면4d

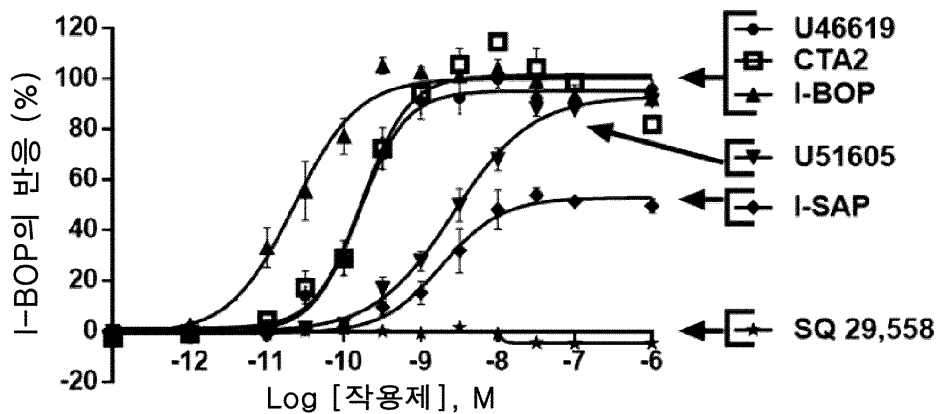
DRC TP α R, PDZRG-RlucII vs G12/rGFP-CAAX



	U46619	I-BOP	CTA2	U51605	I-SAP	SQ 29,558
LogEC50	-8.835	-9.720	-9.027	-7.920	-9.582	-6.396

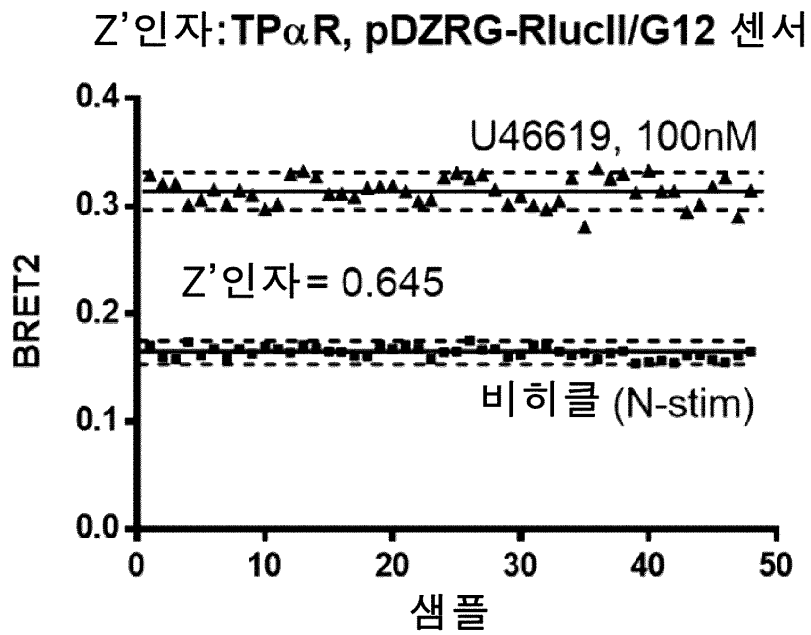
도면4e

DRC TP α R, PDZRG-RlucII vs G13/rGFP-CAAX

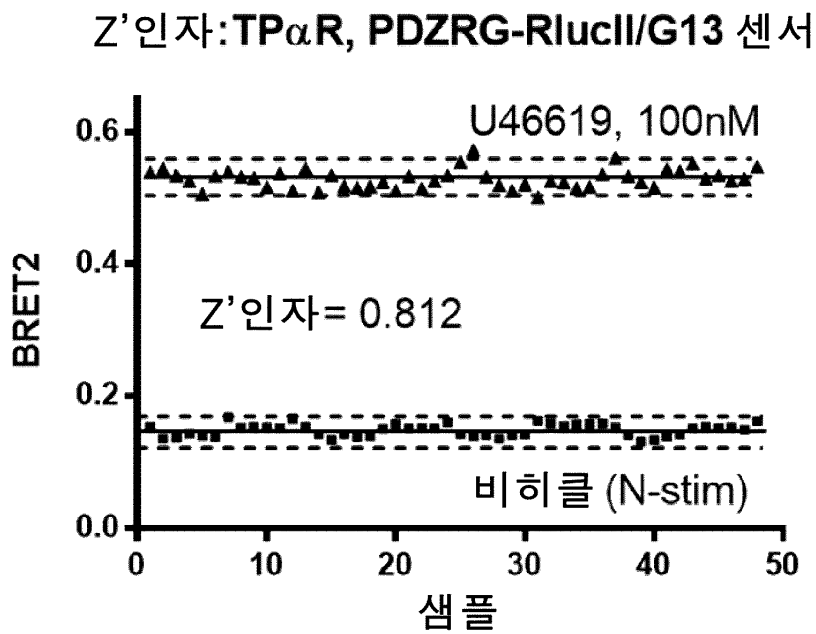


	U46619	I-BOP	CTA2	U51605	I-SAP	SQ 29,558
LogEC50	-9.796	-10.65	-9.765	-8.583	-8.727	~ -7.959

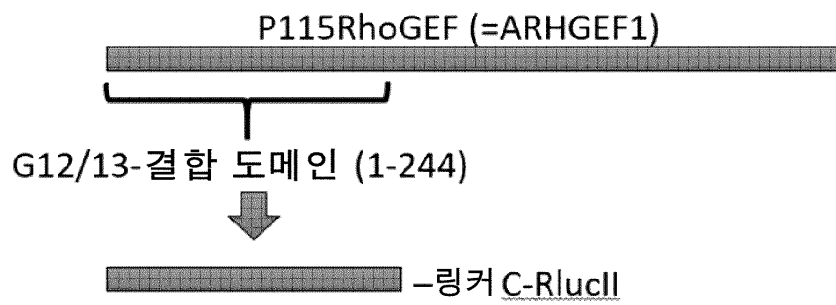
도면4f



도면4g



도면5a

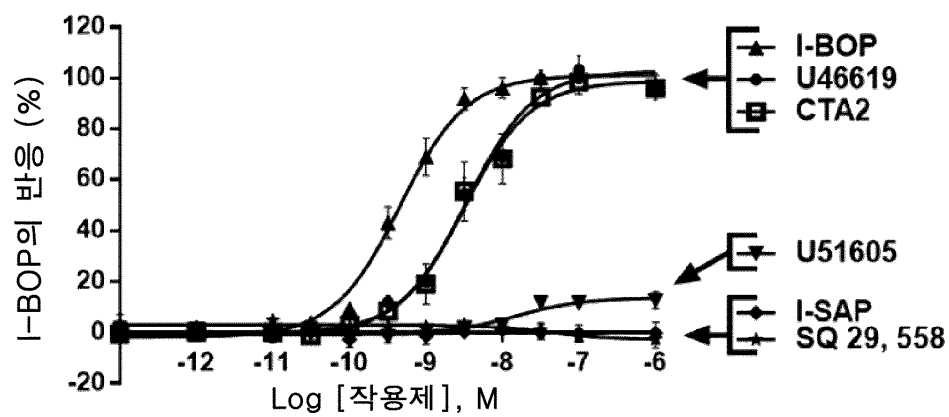


P115 Rho GEF의 RlucII-태그된 시토졸 G12/13 상호작용 도메인

링커C= RLKLPAT

도면5b

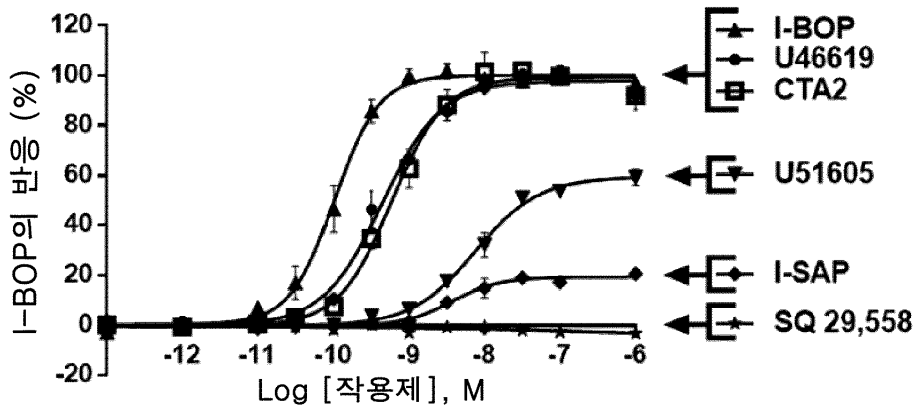
DRC TP α R, P115RG-RlucII vs G12/rGFP-CAAX



	U46619	I-BOP	CTA2	U51605	I-SAP	SQ 29, 558
LogEC50	-8.470	-9.341	-8.499	-7.804	-8.620	-7.373

도면5c

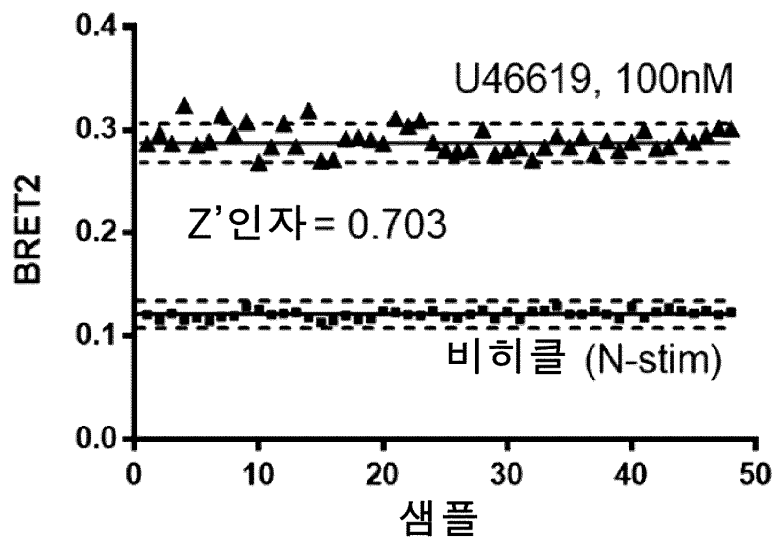
DRC TP α R, P115RG-RlucII vs G13/rGFP-CAAX



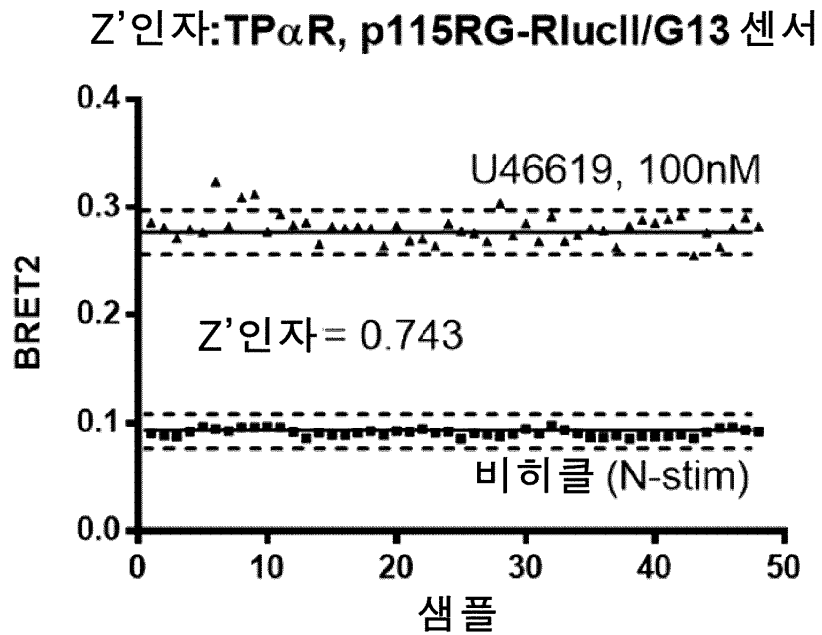
	U46619	I-BOP	CTA2	U51605	I-SAP	SQ 29,558
LogEC ₅₀	-9.356	-9.986	-9.232	-8.119	-8.444	17.94

도면5d

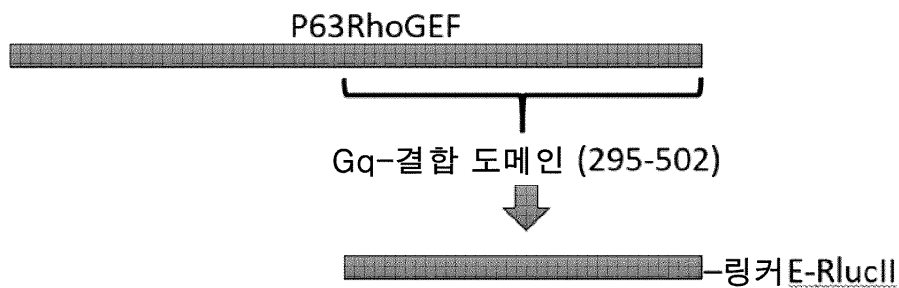
Z'인자 : TP α R, p115RG-RlucII/G12 센서



도면5e



도면6a

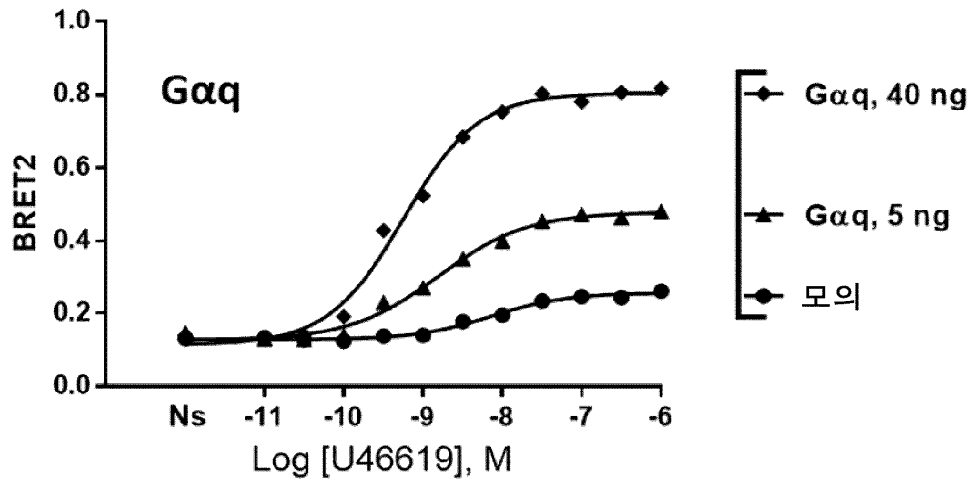


Gq 결합 도메인만을 함유하는 p63(단백질의 막 테더링 부분 결여)의 RlucII-태그된 시토졸 단편

링커E=ASGSAGTGGRAIDIKLPAT

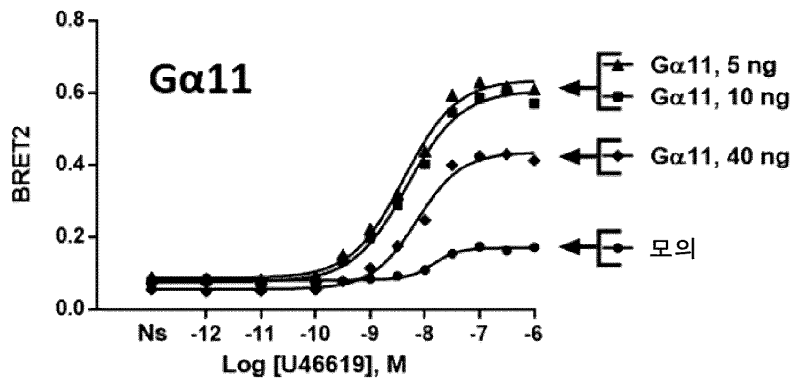
도면6b

DRC TP α R/U46619, p63RG-RlucII/Gq vs PM



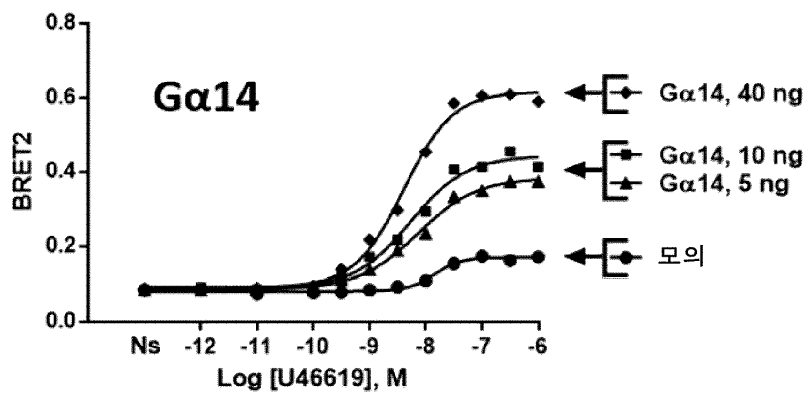
도면6c

DRC:TP α R/U46619, p63RG-RlucII/G11 vs PM



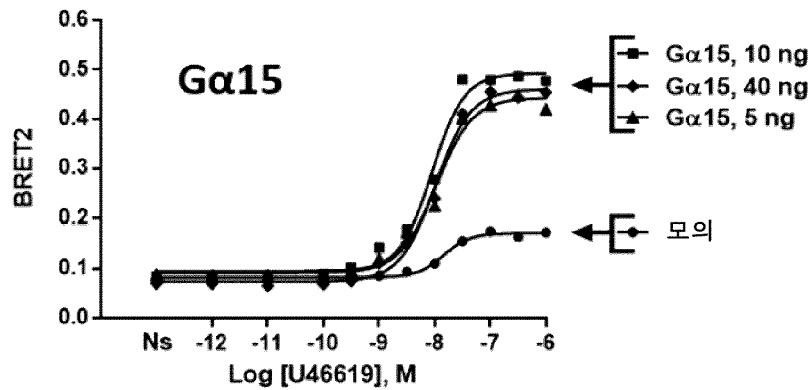
도면6d

DRC:TP α R/U46619, p63RG-RlucII/G14 vs PM



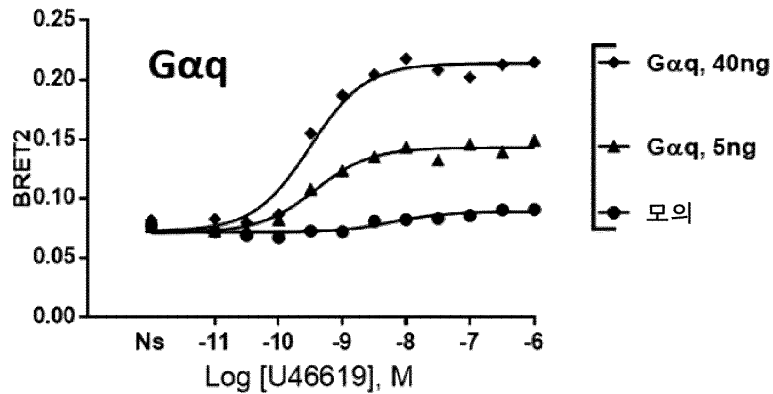
도면6e

DRC: TP α R/U46619, p63RG-RlucII/G15 vs PM



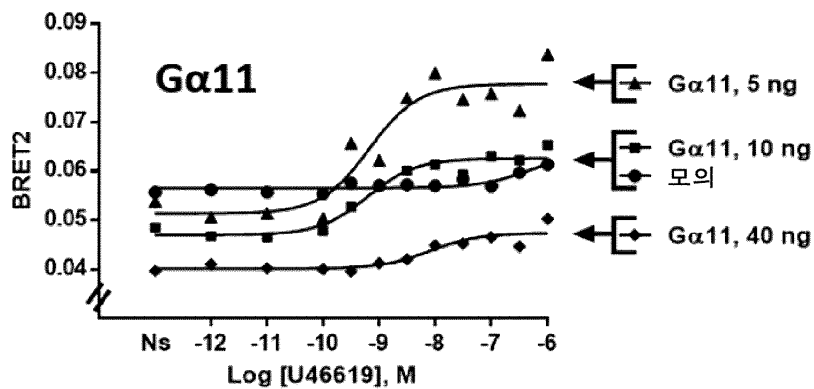
도면6f

DRC: TP α R/U46619, p63RG-RlucII/Gq vs EE



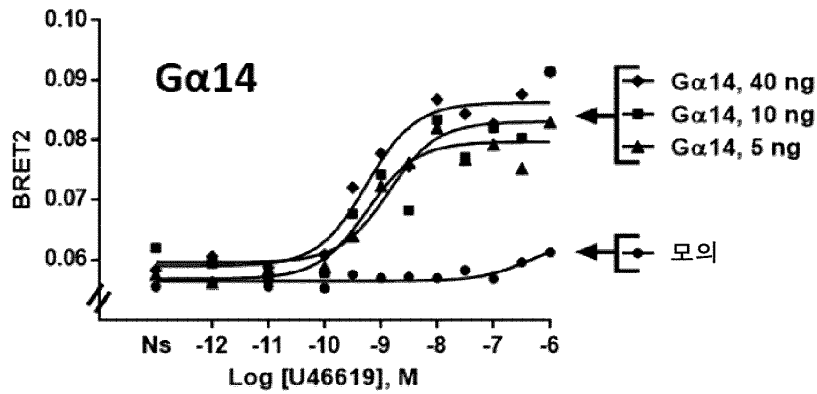
도면6g

DRC: TP α R/U46619, p63RG-RlucII/G11 vs EE



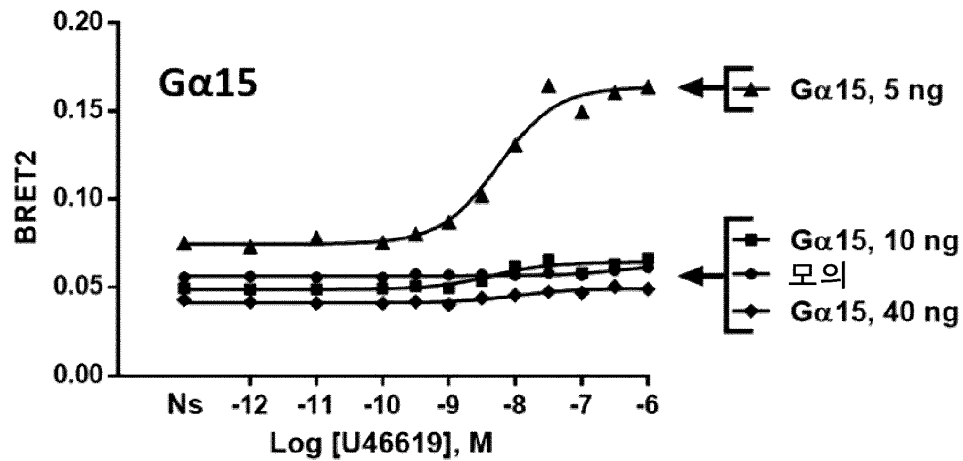
도면6h

DRC:TP α R/U46619, p63RG-RlucII/G14 vs EE



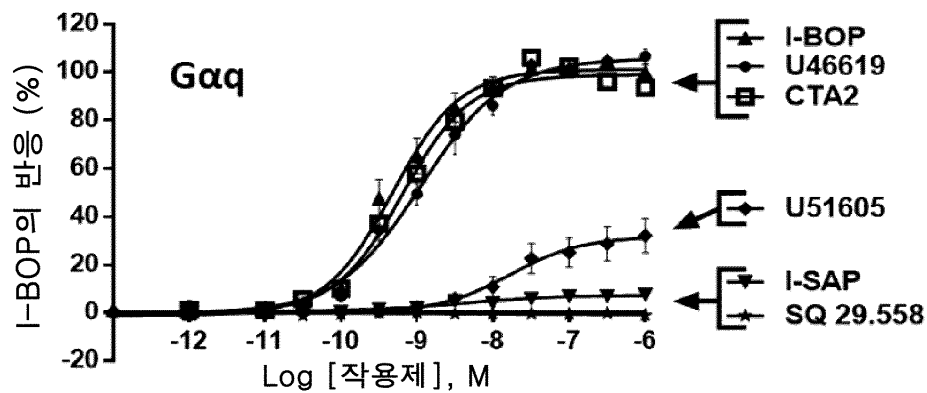
도면6i

DRC:TP α R/U46619, p63RG-RlucII/G15 vs EE



도면6j

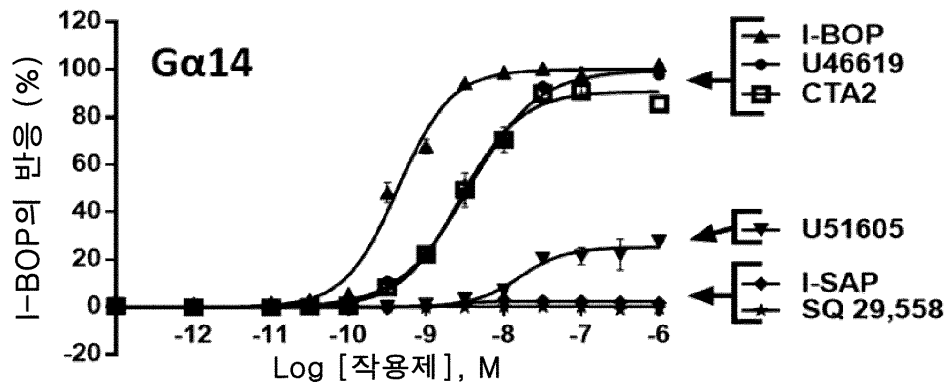
DRC TP α R, p63-RlucII vs Gαq/rGFP-CAAX



	U46619	I-BOP	I-SAP	CTA2	U51605	SQ 29.558
LogEC50	-8.955	-9.324	-8.404	-9.192	-7.787	-94.50

도면6k

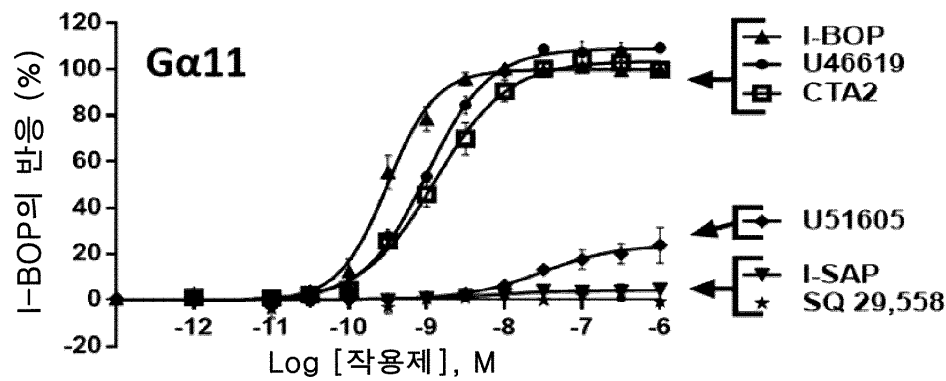
DRC TP α R, p63-RlucII vs G α 14/rGFP-CAAX



	U46619	I-BOP	CTA2	U51605	I-SAP	SQ 29,558
LogEC ₅₀	-8.457	-9.362	-8.563	-7.798	-8.579	

도면6l

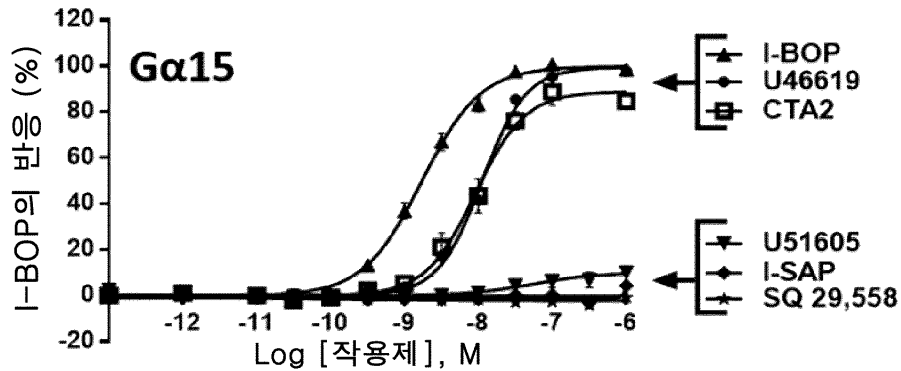
DRC TP α R, p63-RlucII vs G α 11/rGFP-CAAX



	U46619	I-BOP	I-SAP	CTA2	U51605	SQ 29,558
LogEC ₅₀	-9.001	-9.506	-8.220	-8.894	-7.513	

도면6m

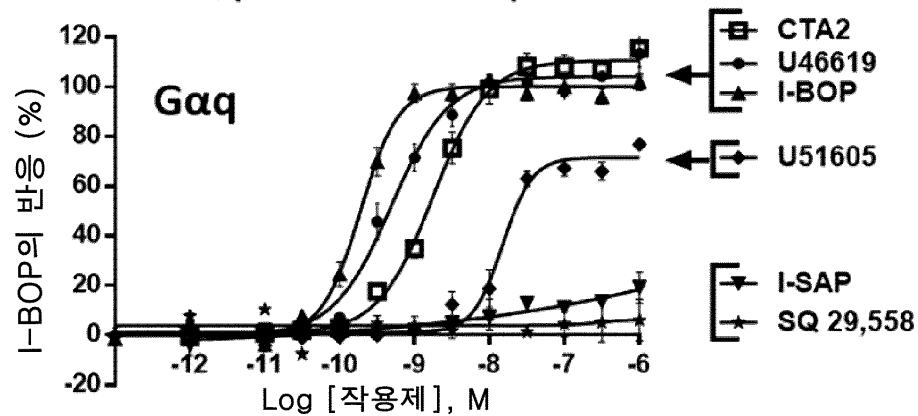
DRC TP α R, p63-RlucII vs G α 15/rGFP-CAAX



	U46619	I-BOP	CTA2	U51605	I-SAP	SQ 29,558
LogEC50	-7.952	-8.766	-8.041	-7.257	~ -5.983	-10.89

도면6n

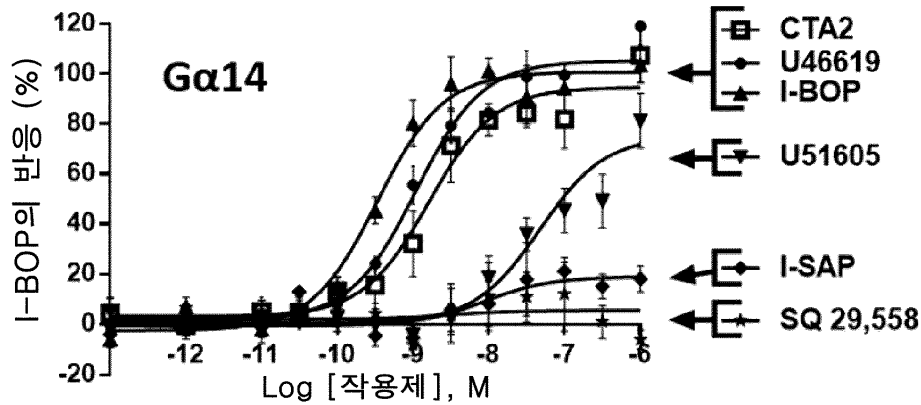
DRC TP α R, p63-RlucII vs G α q/rGFP-FYVE



	U46619	I-BOP	I-SAP	CTA2	U51605	SQ 29,558
LogEC50	-9.313	-9.723	~ 3.747	-8.759	-7.827	-6.554

도면6o

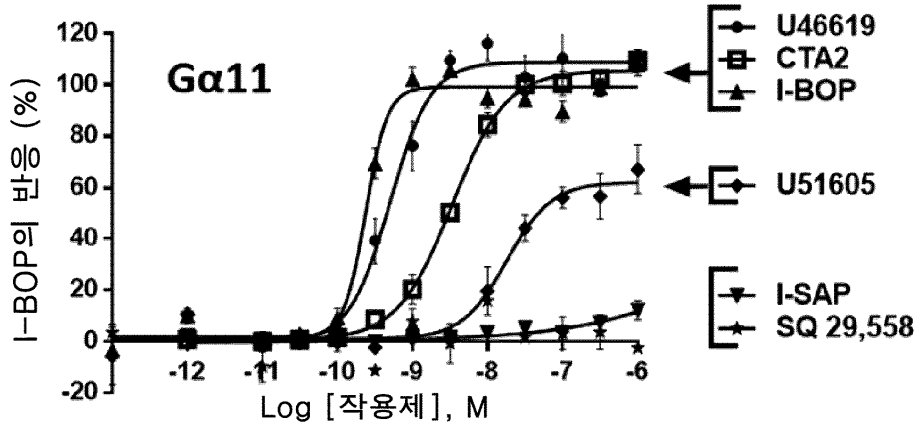
DRC TP α R, p63-RlucII vs G α 14/rGFP-FYVE



	U46619	I-BOP	CTA2	U51605	I-SAP	SQ 29,558
LogEC50	-8.956	-9.468	-8.787	-7.322	-8.053	-8.496

도면6p

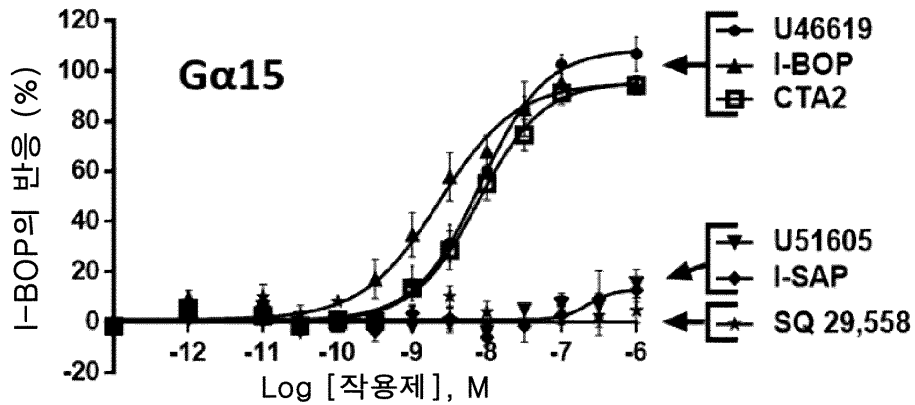
DRC TP α R, p63-RlucII vs G α 11/rGFP-FYVE



	U46619	I-BOP	I-SAP	CTA2	U51605	SQ 29,558
LogEC50	-9.299	-9.624	~ 0.05693	-8.478	-7.742	

도면6q

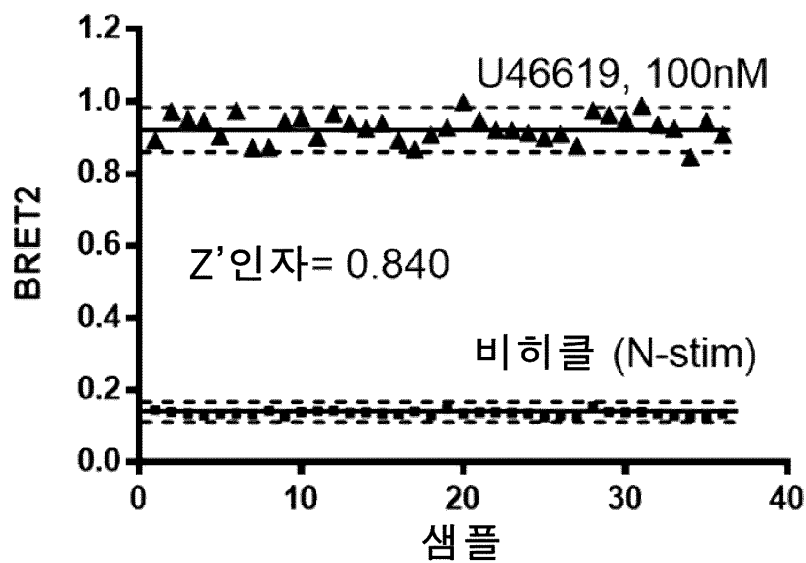
DRC TP α R, p63-RlucII vs G α 15/rGFP-FYVE



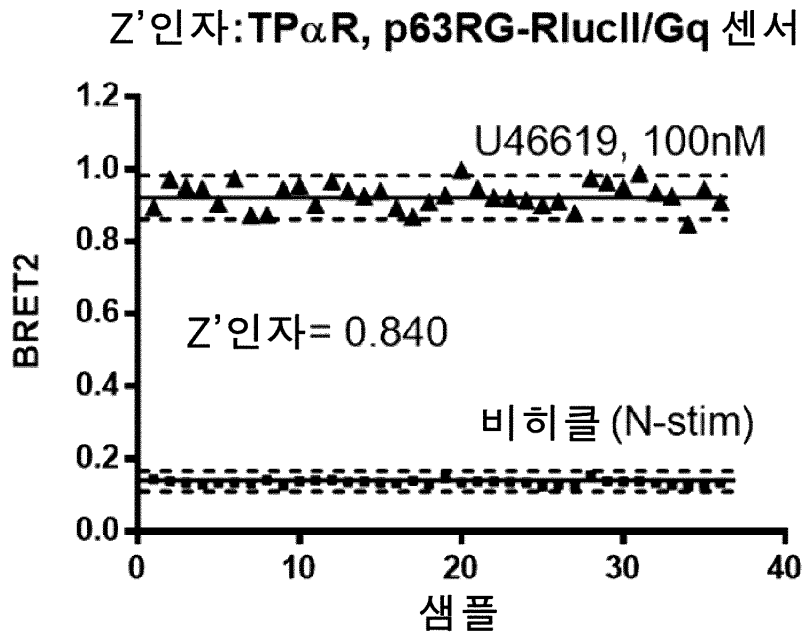
	U46619	I-BOP	CTA2	U51605	I-SAP	SQ 29,558
LogEC50	-8.089	-8.633	-8.115		-6.644	

도면6r

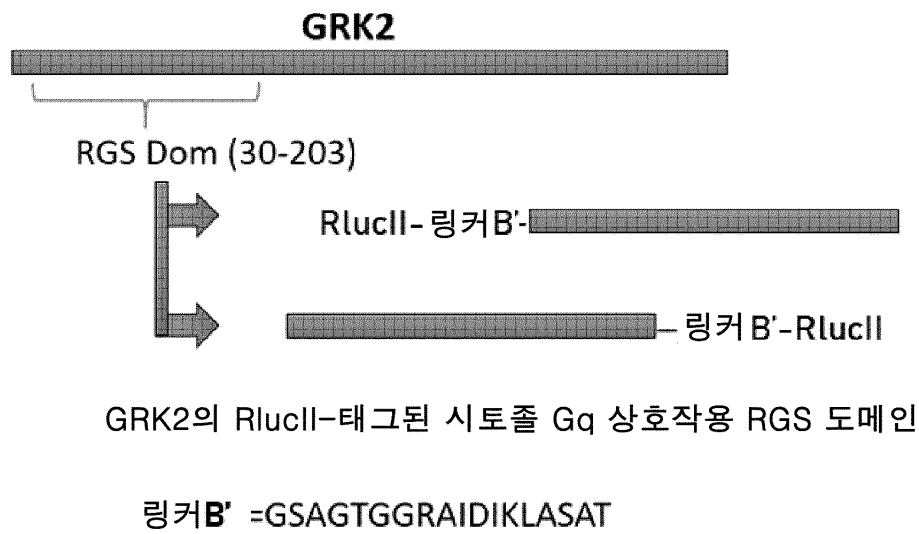
Z'인자: TP α R, p63RG-RlucII/Gq 센서



도면6s

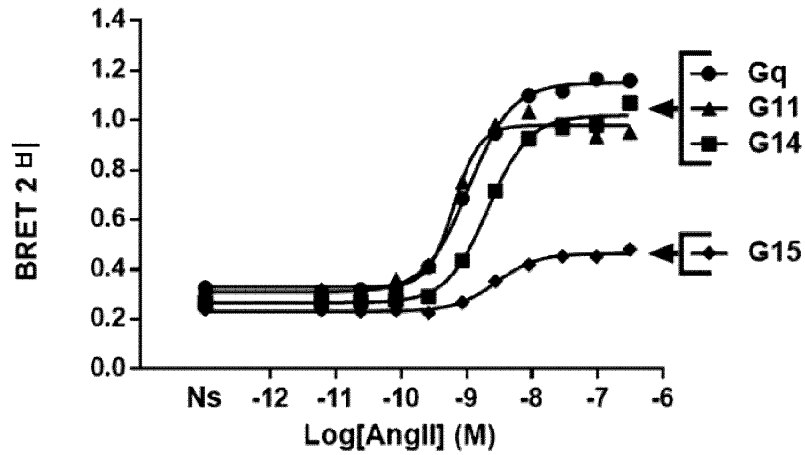


도면7a



도면7b

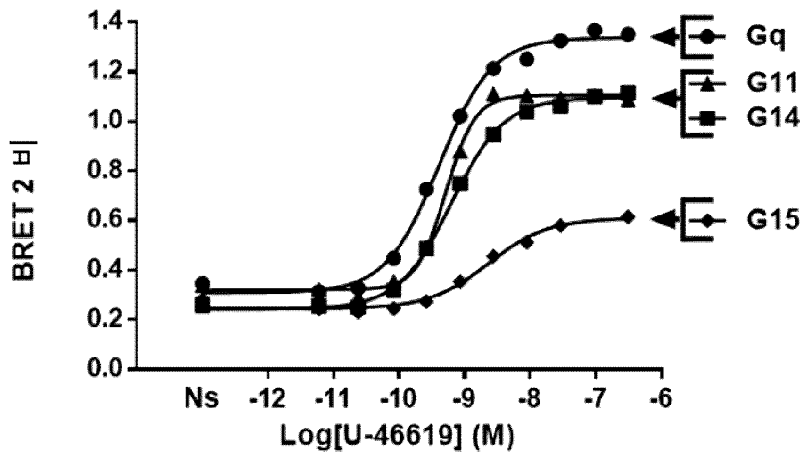
DRC AT1aR/AngII: RIucII-RGS(GRK2) vs $G\alpha$ /rGFP-CAAX



	Gq	G11	G14	G15
LogEC50	-8.965	-9.196	-8.674	-8.546

도면7c

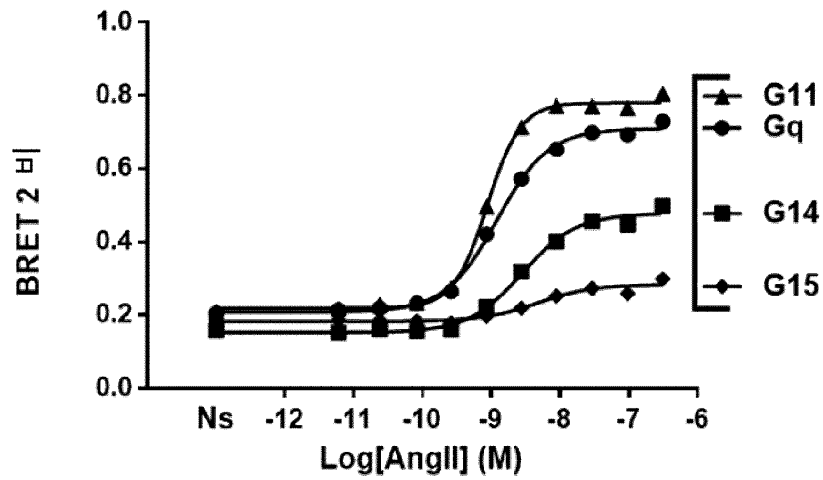
DRC TP α R/U46619: RIucII-RGS(GRK2) vs $G\alpha$ /rGFP-CAAX



	Gq	G11	G14	G15
LogEC50	-9.387	-9.284	-9.198	-8.631

도면7d

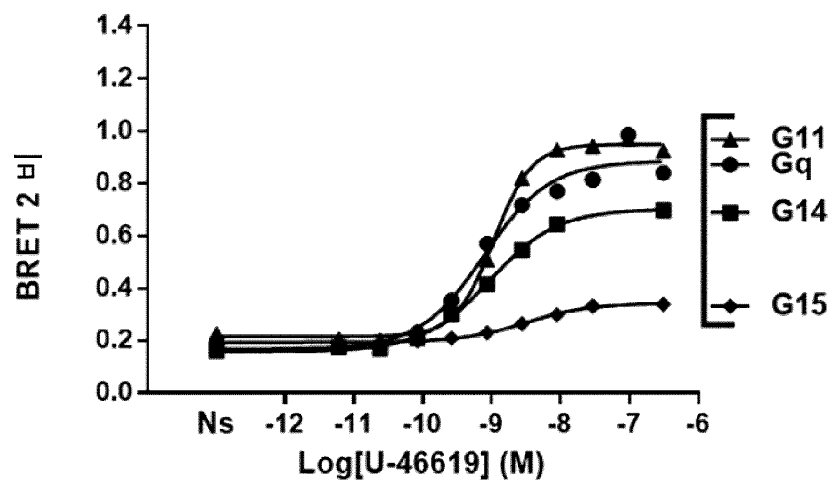
DRC AT1aR/AngII: RGS(GRK2)-RlucII vs G α /rGFP-CAAX



	Gq	G11	G14	G15
LogEC50	-8.914	-9.055	-8.543	-8.324

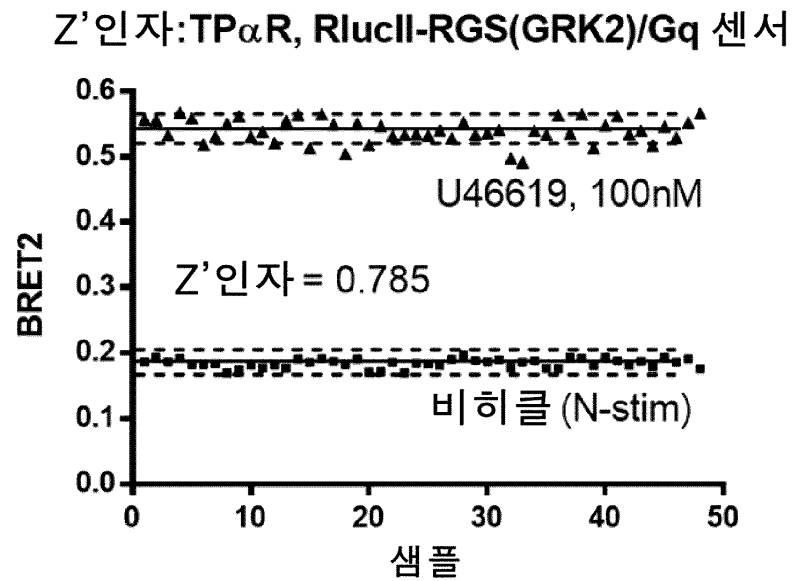
도면7e

DRC TP α R/U46619: RGS(GRK2)-RlucII vs G α /rGFP-CAAX

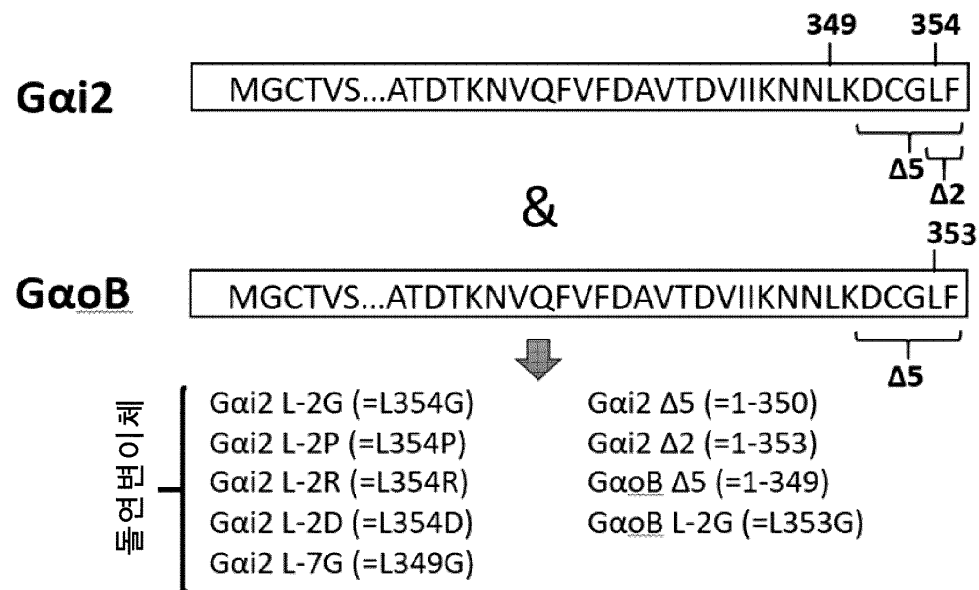


	Gq	G11	G14	G15
LogEC50	-9.107	-8.969	-9.024	-8.514

도면7f

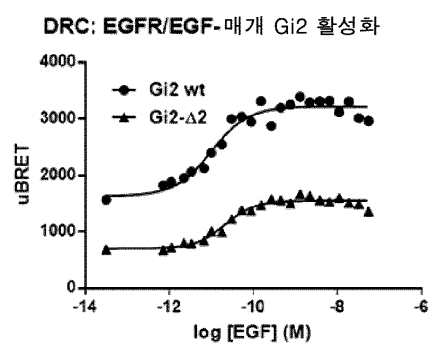


도면8a



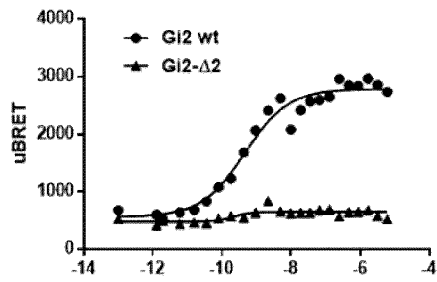
GIV/Gridin-매개 G단백질 활성화를 유지하면서
GPCR-매개 G단백질 활성화를 방지하는 돌연변이

도면8b



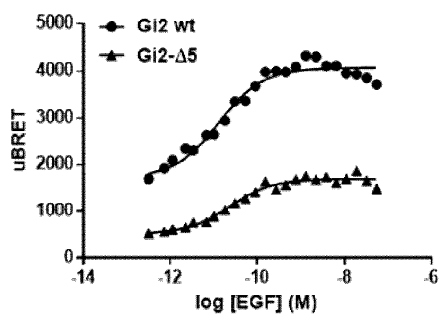
도면8c

DRC: BKB2R/칼리딘-매개 Gi2 활성화



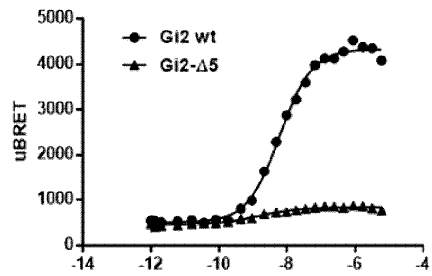
도면8d

DRC: EGFR/EGF-매개 Gi2 활성화



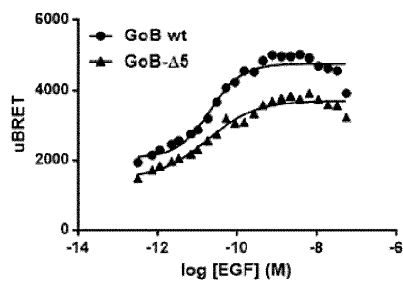
도면8e

DRC: BKB2R/칼리딘-매개 Gi2 활성화



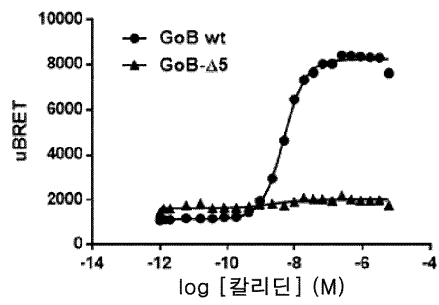
도면8f

DRC: EGFR/EGF-매개 GoB 활성화



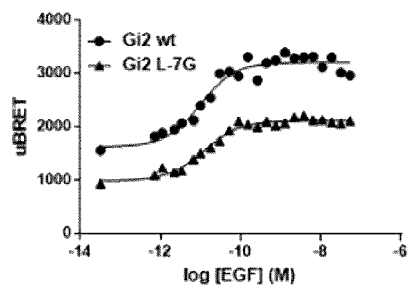
도면8g

DRC: BKB2R/칼리딘-매개 GoB 활성화



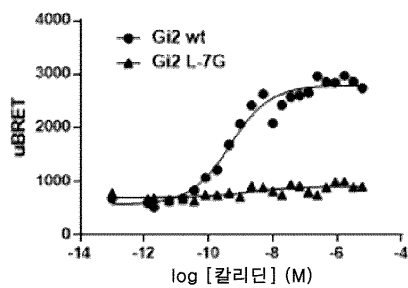
도면8h

DRC: EGFR/EGF-매개 Gi2 활성화



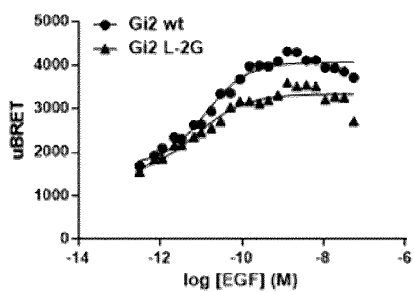
도면8i

DRC: BKB2R/칼리딘-매개 Gi2 활성화



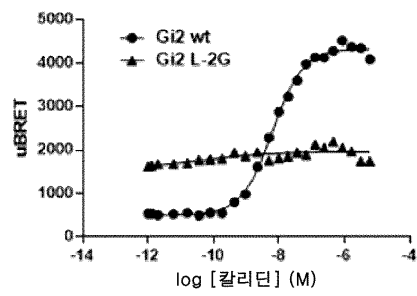
도면8j

DRC: EGFR/EGF-매개 Gi2 활성화



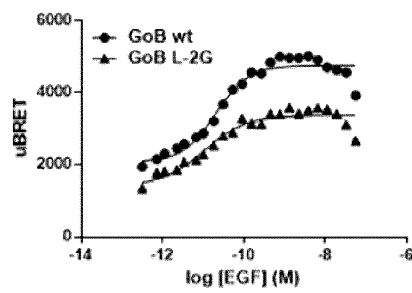
도면8k

DRC: BKB2R/칼리딘-매개 Gi2 활성화



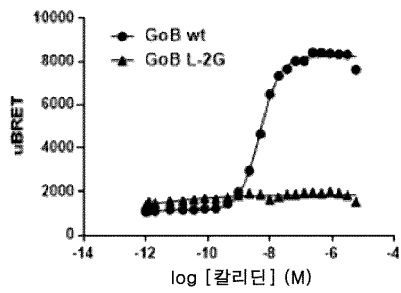
도면8l

DRC: EGFR/EGF-매개 GoB 활성화



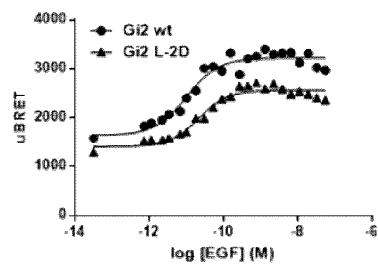
도면8m

DRC: BKB2R/칼리딘-매개 GoB 활성화



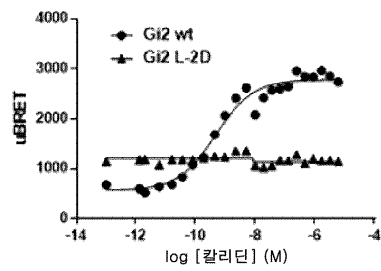
도면8n

DRC: EGFR/EGF-매개 Gi2 활성화



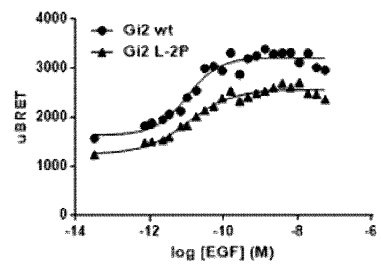
도면8o

DRC: BKB2R/칼리딘-매개 Gi2 활성화



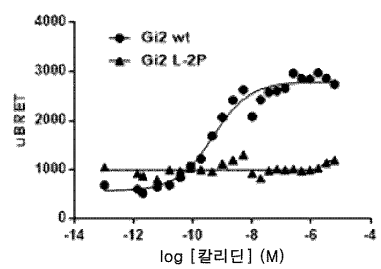
도면8p

DRC: EGFR/EGF-매개 Gi2 활성화



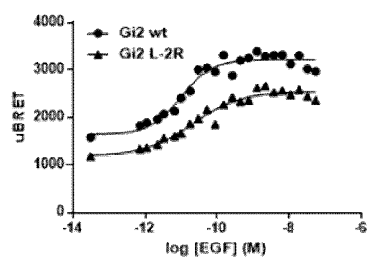
도면8q

DRC: BKB2R/칼리딘-매개 Gi2 활성화



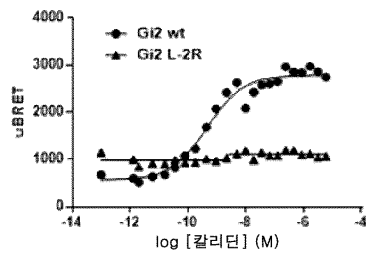
도면8r

DRC: EGFR/EGF-매개 Gi2 활성화



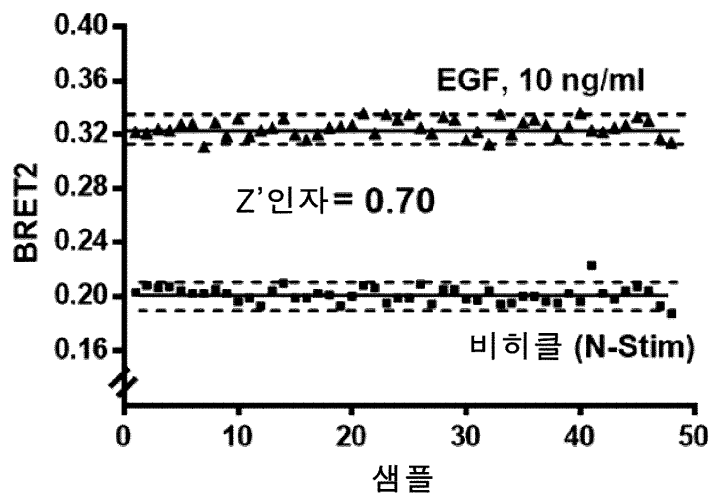
도면8s

DRC: BKB2R/칼리딘-매개 Gi2 활성화



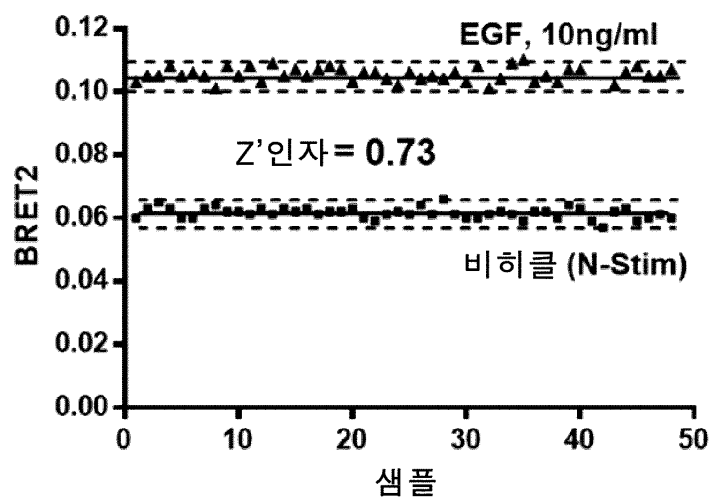
도면8t

Z'인자: EGFR, Rap1GAP (SSS-AAA)/Gi2-WT

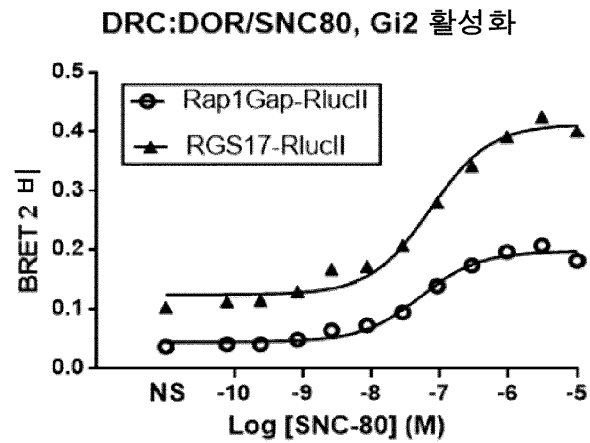


도면8u

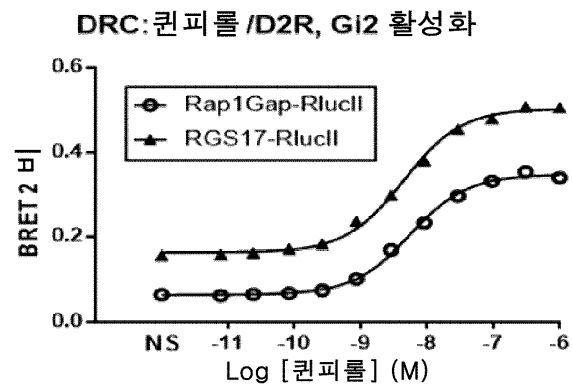
Z'인자: EGFR, Rap1GAP (SSS-AAA)/Gi2_L-2P



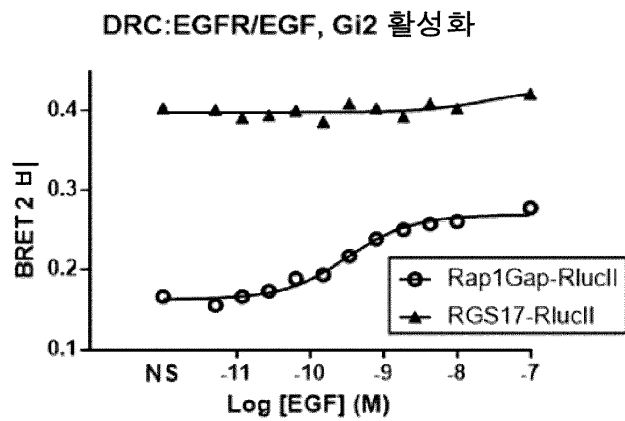
도면8v



도면8w



도면8x



도면9a

>Rap1GAP (1-442) (서열번호: 8)

MIEKMQGSRMDEQRCSEFPPLKTEEDYIPYPSVHEVLGREGFPFLILLPQFGGYWIEGTNHEITSIPETEPLQSPTTKVK
LECNPTARIYRKHFLGKEHFNYYSLDAALGHLVFSKYDVIQDQEHRLRLRLTKCRTYHDVIPISCLTEFPNVVQMAKL
CEDVNVDRFYPVLYPKASRLIVTFDEHVISNNFKFVGIYQKLGQTSEELFSTNEESPAFVEFLEFLGQKVKLQDFKGR
GGLDVTHGQTGTESVYCNFRNKEIMFHVSTKLPYTEGDAQQLQKRKHIGAAIVAVVFQDENTPFVPMIASNFLHAYVVV
QAEGGGPDGPLYKVSVTARDDVPFFGPPPLPDPAVFRKGPEFQEFLLTKLINAEYACYKAEKFAKLEERTRAALETLYEE
LHHSQSMMLGGDEDKMENGSGGGGFESFKRVIIRSRQSM

>Rap1GAP ΔSSS (1-436) (서열번호: 9)

MIEKMQGSRMDEQRCSEFPPLKTEEDYIPYPSVHEVLGREGFPFLILLPQFGGYWIEGTNHEITSIPETEPLQSPTTKVK
LECNPTARIYRKHFLGKEHFNYYSLDAALGHLVFSKYDVIQDQEHRLRLRLTKCRTYHDVIPISCLTEFPNVVQMAKL
CEDVNVDRFYPVLYPKASRLIVTFDEHVISNNFKFVGIYQKLGQTSEELFSTNEESPAFVEFLEFLGQKVKLQDFKGR
GGLDVTHGQTGTESVYCNFRNKEIMFHVSTKLPYTEGDAQQLQKRKHIGAAIVAVVFQDENTPFVPMIASNFLHAYVVV
QAEGGGPDGPLYKVSVTARDDVPFFGPPPLPDPAVFRKGPEFQEFLLTKLINAEYACYKAEKFAKLEERTRAALETLYEE
LHHSQSMMLGGDEDKMENGSGGGGFESFKRVIIR

>Rap1GAP (1-420) (서열번호: 10)

MIEKMQGSRMDEQRCSEFPPLKTEEDYIPYPSVHEVLGREGFPFLILLPQFGGYWIEGTNHEITSIPETEPLQSPTTKVK
LECNPTARIYRKHFLGKEHFNYYSLDAALGHLVFSKYDVIQDQEHRLRLRLTKCRTYHDVIPISCLTEFPNVVQMAKL
CEDVNVDRFYPVLYPKASRLIVTFDEHVISNNFKFVGIYQKLGQTSEELFSTNEESPAFVEFLEFLGQKVKLQDFKGR
GGLDVTHGQTGTESVYCNFRNKEIMFHVSTKLPYTEGDAQQLQKRKHIGAAIVAVVFQDENTPFVPMIASNFLHAYVVV
QAEGGGPDGPLYKVSVTARDDVPFFGPPPLPDPAVFRKGPEFQEFLLTKLINAEYACYKAEKFAKLEERTRAALETLYEE
LHHSQSMMLGGDEDKMEN

>Rap1GAP SSS-AAA (1-442; S437A/S439A/S441A) (서열번호: 11)

MIEKMQGSRMDEQRCSEFPPLKTEEDYIPYPSVHEVLGREGFPFLILLPQFGGYWIEGTNHEITSIPETEPLQSPTTKVK
LECNPTARIYRKHFLGKEHFNYYSLDAALGHLVFSKYDVIQDQEHRLRLRLTKCRTYHDVIPISCLTEFPNVVQMAKL
CEDVNVDRFYPVLYPKASRLIVTFDEHVISNNFKFVGIYQKLGQTSEELFSTNEESPAFVEFLEFLGQKVKLQDFKGR
GGLDVTHGQTGTESVYCNFRNKEIMFHVSTKLPYTEGDAQQLQKRKHIGAAIVAVVFQDENTPFVPMIASNFLHAYVVV
QAEGGGPDGPLYKVSVTARDDVPFFGPPPLPDPAVFRKGPEFQEFLLTKLINAEYACYKAEKFAKLEERTRAALETLYEE
LHHSQSMMLGGDEDKMENGSGGGGFESFKRVIIRARAQAM

>Rap1GAP SSS-TTT (1-442; S437T/S439T/S441T) (서열번호: 12)

MIEKMQGSRMDEQRCSEFPPLKTEEDYIPYPSVHEVLGREGFPFLILLPQFGGYWIEGTNHEITSIPETEPLQSPTTKVK
LECNPTARIYRKHFLGKEHFNYYSLDAALGHLVFSKYDVIQDQEHRLRLRLTKCRTYHDVIPISCLTEFPNVVQMAKL
CEDVNVDRFYPVLYPKASRLIVTFDEHVISNNFKFVGIYQKLGQTSEELFSTNEESPAFVEFLEFLGQKVKLQDFKGR
GGLDVTHGQTGTESVYCNFRNKEIMFHVSTKLPYTEGDAQQLQKRKHIGAAIVAVVFQDENTPFVPMIASNFLHAYVVV
QAEGGGPDGPLYKVSVTARDDVPFFGPPPLPDPAVFRKGPEFQEFLLTKLINAEYACYKAEKFAKLEERTRAALETLYEE
LHHSQSMMLGGDEDKMENGSGGGGFESFKRVIIRTRTQTM

>Rap1GAP SS-AA (1-442; S437A/S441A) (서열번호: 13)

MIEKMQGSRMDEQRCSEFPPLKTEEDYIPYPSVHEVLGREGFPFLILLPQFGGYWIEGTNHEITSIPETEPLQSPTTKVK
LECNPTARIYRKHFLGKEHFNYYSLDAALGHLVFSKYDVIQDQEHRLRLRLTKCRTYHDVIPISCLTEFPNVVQMAKL
CEDVNVDRFYPVLYPKASRLIVTFDEHVISNNFKFVGIYQKLGQTSEELFSTNEESPAFVEFLEFLGQKVKLQDFKGR
GGLDVTHGQTGTESVYCNFRNKEIMFHVSTKLPYTEGDAQQLQKRKHIGAAIVAVVFQDENTPFVPMIASNFLHAYVVV
QAEGGGPDGPLYKVSVTARDDVPFFGPPPLPDPAVFRKGPEFQEFLLTKLINAEYACYKAEKFAKLEERTRAALETLYEE
LHHSQSMMLGGDEDKMENGSGGGGFESFKRVIIRARSQAM

>Rap1GAP SS-DA (1-442; S437A/S441A) (서열번호: 14)

MIEKMQGSRMDEQRCSEFPPLKTEEDYIPYPSVHEVLGREGFPFLILLPQFGGYWIEGTNHEITSIPETEPLQSPTTKVK
LECNPTARIYRKHFLGKEHFNYYSLDAALGHLVFSKYDVIQDQEHRLRLRLTKCRTYHDVIPISCLTEFPNVVQMAKL
CEDVNVDRFYPVLYPKASRLIVTFDEHVISNNFKFVGIYQKLGQTSEELFSTNEESPAFVEFLEFLGQKVKLQDFKGR
GGLDVTHGQTGTESVYCNFRNKEIMFHVSTKLPYTEGDAQQLQKRKHIGAAIVAVVFQDENTPFVPMIASNFLHAYVVV
QAEGGGPDGPLYKVSVTARDDVPFFGPPPLPDPAVFRKGPEFQEFLLTKLINAEYACYKAEKFAKLEERTRAALETLYEE
LHHSQSMMLGGDEDKMENGSGGGGFESFKRVIIRDRSQAM

도면9b

>Rap1GAP SS-AD (1-442; S437A/S441D) (서열번호: 15)
 MIEKMQGSRMDEQRCSFPPPLKTEEDYIPYPSVHEVLGREGFFPLILLPQFGGYWIEGTNHEITSIPETEPLQSPTTKVK
 LECNPTARIYRKHFLGKEHFNYYSLDAALGHLVFSKYDVIQDQEHRLRLLRKCRTYHDVIPISCLTEFPNVVQMAKL
 CEDVNVDRFPYPLYPKASRLIVTFDEHVISNNFKFGVIYQKLGQTSEEBLFSTNEESPAFVEFLEBFLGQKVKLQDFKGF
 GGLDVTHGQTGTESVYCNFRNKEIMFHVSTKLPYTEGDAQQLQKRKHIGAAIVAVVFQDENTPFVPMIASNFLHAYVVV
 QAEGGGPDGPLYKVSVTARDDVPFFGPPLPDPAVFRKGPEFQEFLLTKLINAEYACYKAEKFAKLEERTRAALLETLYEE
 LHIHQSMGMLGGDEDKMENSGGGGFFESFKRVI RARSQDM

>Rap1GAP SS-DD (1-442; S437A/S441A) (서열번호: 16)
 MIEKMQGSRMDEQRCSFPPPLKTEEDYIPYPSVHEVLGREGFFPLILLPQFGGYWIEGTNHEITSIPETEPLQSPTTKVK
 LECNPTARIYRKHFLGKEHFNYYSLDAALGHLVFSKYDVIQDQEHRLRLLRKCRTYHDVIPISCLTEFPNVVQMAKL
 CEDVNVDRFPYPLYPKASRLIVTFDEHVISNNFKFGVIYQKLGQTSEEBLFSTNEESPAFVEFLEBFLGQKVKLQDFKGF
 GGLDVTHGQTGTESVYCNFRNKEIMFHVSTKLPYTEGDAQQLQKRKHIGAAIVAVVFQDENTPFVPMIASNFLHAYVVV
 QAEGGGPDGPLYKVSVTARDDVPFFGPPLPDPAVFRKGPEFQEFLLTKLINAEYACYKAEKFAKLEERTRAALLETLYEE
 LHIHQSMGMLGGDEDKMENSGGGGFFESFKRVI RDRSQDM

>P63 RGS (서열번호: 25의 잔기 295 - 502)
 MIMKYQLLLKDFLYYNRAGMDTADLEQAVEVMCFVPKRCNDMMTLGRLRGFEGKLTAGKLLGQDTFWWTEPEAGGLLS
 SRGRERRVPLFEQIIIFSEALGGVGRGTQPGYVYKNSIKVSCLEGNLQGDPCRFAITSRGPEGGIQRYVLQAADPAI
 SQAWIKHVAQILESQRDFLNALQSPIEYQRRESQTNLSGRPRGPGVGS

>PDZRG (=ARHGEF11) (서열번호: 21의 잔기 281 - 483)
 QGVDQSPKPLIIGFEEDYDPGYFNNESDIIFQDLEKLKSRPAHLGVFLRYIFSQADPSPLLFYLCAEVYQQAAPKDSRSL
 GKDIWNI FLEKNAFLRYKIPEMLQABIDSRLRNSEDARGVLCEAQEAAMPEIQEQIHDYRTKRTLGLGSLYGENDLDDL
 GDPLRERQVAEKQLAALGDILSKYBEDRSAPMDFALNTYMSHA

>P115RG (=ARHGEF1, 이소형 var2) (서열번호: 23의 잔기 1 - 244)
 MEDFARGAASPGPSRPLVPSIIGAEDDFENELETNSEEQNSQFQSLQEVKRRPAHLMALLQHVALQFEPGPLLCCCLH
 ADMLGSLGPKEAKKAFDFYHSFLEKTAVLRVPVPPNVA FELDRTRADLISEDVQRRFVQEVVQSQQVAVGRQLEDFRSK
 RLMGMTPEWEQELAQLEAWVGRDRASYEARERHVAERLLMHLEEMQHTISTDEEKSAAVVNAIGLYMRHLGVRTKSGDKKS
 GRNF

>GRK2 RGS dom (서열번호: 27의 잔기 30 - 203)
 KILLPEPSIRSMQKYLEDRGEVTFEKIFSQKLGYLFRDFCLNHLEEARPLVEFYEEIKKYEKLETEEERVARSRIFD
 SYIMKELLACSHPFKSKATEHVQGHGKQVPPDLFPYIEEIQCNLRGDFVQFKIESDKFTRFCQWKNVELNIHLTMND
 FSVHRIIGRGGFG

>Gαi2 Δ5 (=1-350) (서열번호: 28)
 MGCTVSAEDKAAAEKSKMIDKNLREDGEKAAAEVKLLLLGAGESGKSTIVKQMKI IHEDGYSEEBRCQYRAVVYSNTIQS
 IMAIVKAMGNLQIDFADPSRADDAQLFALSCTAEEQGVLPDDL SGVIRRLWADHGVQACFGRSREYQLNDSAAYYLNDL
 ERIAQSDYIPTQQDVLTRVKTGTGIVETHFTFKDLHFKMFDVGGQRSEKRWIHC FEGVTAIIFCVALSAYDLVLAEDDEE
 MNRMHESMKLFDSICNNKWFTDTSIILFLNKKDLFEEKITHSPLTICFPEYTGANKYDEAASYIQSKFEDLNKRKDTKEI
 YTHFTCATDTKNVQFVFDVAVTDV I IKNNLK

>Gαi2 Δ2 (=1-353) (서열번호: 29)
 MGCTVSAEDKAAAEKSKMIDKNLREDGEKAAAEVKLLLLGAGESGKSTIVKQMKI IHEDGYSEEBRCQYRAVVYSNTIQS
 IMAIVKAMGNLQIDFADPSRADDAQLFALSCTAEEQGVLPDDL SGVIRRLWADHGVQACFGRSREYQLNDSAAYYLNDL
 ERIAQSDYIPTQQDVLTRVKTGTGIVETHFTFKDLHFKMFDVGGQRSEKRWIHC FEGVTAIIFCVALSAYDLVLAEDDEE
 MNRMHESMKLFDSICNNKWFTDTSIILFLNKKDLFEEKITHSPLTICFPEYTGANKYDEAASYIQSKFEDLNKRKDTKEI
 YTHFTCATDTKNVQFVFDVAVTDV I IKNNLKDCG

>Gαi2 L-7G (=L349G) (서열번호: 30)
 MGCTVSAEDKAAAEKSKMIDKNLREDGEKAAAEVKLLLLGAGESGKSTIVKQMKI IHEDGYSEEBRCQYRAVVYSNTIQS
 IMAIVKAMGNLQIDFADPSRADDAQLFALSCTAEEQGVLPDDL SGVIRRLWADHGVQACFGRSREYQLNDSAAYYLNDL
 ERIAQSDYIPTQQDVLTRVKTGTGIVETHFTFKDLHFKMFDVGGQRSEKRWIHC FEGVTAIIFCVALSAYDLVLAEDDEE
 MNRMHESMKLFDSICNNKWFTDTSIILFLNKKDLFEEKITHSPLTICFPEYTGANKYDEAASYIQSKFEDLNKRKDTKEI
 YTHFTCATDTKNVQFVFDVAVTDV I IKNNLKDCGLF

도면9c

>Gxi2 L-2G(=L354G) (서열번호: 31)
 MGCTVSAEDKAAAERSKMIDKNLREDGEKAAREVKLLLLGAGESGKSTIVKQMKI IHEDGYSEEECRQYRAVVYSNTIQS
 IMAIVKAMGNLQIDFADPSRADDARQLFALSCTAEEQGVLPDDLSGVIRRLWADHGVQACFGRSREYQLNDSAAAYLNDL
 ERIAQSDYIPTQQDVLRLTRVKTGTGIVETHFTFKDLHFHMFVGGQSRERKKWIHC FEGVTAIIFCVALSAYDLVLAEDDEE
 MNRMHESMKLFDSICNNKWFDTDSIILFLNKKDLFEEKITHSPLTICFPEYTGANKYDEAASYIQSKFEDLNKRKDTKEI
 YTHFTCATDTKNVQFVFDVAVTDV I I KNNLKDCGDF

>Gxi2 L-2D(=L354D) (서열번호: 32)
 MGCTVSAEDKAAAERSKMIDKNLREDGEKAAREVKLLLLGAGESGKSTIVKQMKI IHEDGYSEEECRQYRAVVYSNTIQS
 IMAIVKAMGNLQIDFADPSRADDARQLFALSCTAEEQGVLPDDLSGVIRRLWADHGVQACFGRSREYQLNDSAAAYLNDL
 ERIAQSDYIPTQQDVLRLTRVKTGTGIVETHFTFKDLHFHMFVGGQSRERKKWIHC FEGVTAIIFCVALSAYDLVLAEDDEE
 MNRMHESMKLFDSICNNKWFDTDSIILFLNKKDLFEEKITHSPLTICFPEYTGANKYDEAASYIQSKFEDLNKRKDTKEI
 YTHFTCATDTKNVQFVFDVAVTDV I I KNNLKDCGDF

>Gxi2 L-2P(=L354P) (서열번호: 33)
 MGCTVSAEDKAAAERSKMIDKNLREDGEKAAREVKLLLLGAGESGKSTIVKQMKI IHEDGYSEEECRQYRAVVYSNTIQS
 IMAIVKAMGNLQIDFADPSRADDARQLFALSCTAEEQGVLPDDLSGVIRRLWADHGVQACFGRSREYQLNDSAAAYLNDL
 ERIAQSDYIPTQQDVLRLTRVKTGTGIVETHFTFKDLHFHMFVGGQSRERKKWIHC FEGVTAIIFCVALSAYDLVLAEDDEE
 MNRMHESMKLFDSICNNKWFDTDSIILFLNKKDLFEEKITHSPLTICFPEYTGANKYDEAASYIQSKFEDLNKRKDTKEI
 YTHFTCATDTKNVQFVFDVAVTDV I I KNNLKDCGDF

>Gxi2 L-2R(=L354R) (서열번호: 34)
 MGCTVSAEDKAAAERSKMIDKNLREDGEKAAREVKLLLLGAGESGKSTIVKQMKI IHEDGYSEEECRQYRAVVYSNTIQS
 IMAIVKAMGNLQIDFADPSRADDARQLFALSCTAEEQGVLPDDLSGVIRRLWADHGVQACFGRSREYQLNDSAAAYLNDL
 ERIAQSDYIPTQQDVLRLTRVKTGTGIVETHFTFKDLHFHMFVGGQSRERKKWIHC FEGVTAIIFCVALSAYDLVLAEDDEE
 MNRMHESMKLFDSICNNKWFDTDSIILFLNKKDLFEEKITHSPLTICFPEYTGANKYDEAASYIQSKFEDLNKRKDTKEI
 YTHFTCATDTKNVQFVFDVAVTDV I I KNNLKDCGRF

>GxiB L-2G(=L353G) (서열번호: 35)
 MGCTLSAEDKAAAERSKMAIEKNLREDGISAADVKLLLLGAGESGKSTIVKQMKI IHEDGFSGEDVKYKPVVYSNTIQS
 LAIVRAMDTLGI EYDGERKADAKMVCVDSRMEDETEPFSAEALLSMMRLWGDGSGIQECFNRSREYQLNDSAKYYLDSL
 DRIGAADYQPTQDILRLTRVKTGTGIVETHFTFKDLHFHMFVGGQSRERKKWIHC FEGVTAIIFCVALSGYDQVLHEDET
 TNRMHESLKLFDSCNNKWFDTDSIILFLNKKDIFEEKIKKSPLTICFPEYTGPSAFTEAVAYIQAQYESKNKSAHKEIY
 THVTCATDTNNIQFVFDVAVTDV I I AKNLRGCGY

>GxiB Δ5(=1-349) (서열번호: 36)
 MGCTLSAEDKAAAERSKMAIEKNLREDGISAADVKLLLLGAGESGKSTIVKQMKI IHEDGFSGEDVKYKPVVYSNTIQS
 LAIVRAMDTLGI EYDGERKADAKMVCVDSRMEDETEPFSAEALLSMMRLWGDGSGIQECFNRSREYQLNDSAKYYLDSL
 DRIGAADYQPTQDILRLTRVKTGTGIVETHFTFKDLHFHMFVGGQSRERKKWIHC FEGVTAIIFCVALSGYDQVLHEDET
 TNRMHESLKLFDSCNNKWFDTDSIILFLNKKDIFEEKIKKSPLTICFPEYTGPSAFTEAVAYIQAQYESKNKSAHKEIY
 THVTCATDTNNIQFVFDVAVTDV I I AKNLR

>RLucII (서열번호: 37)
 MTSKVYDPEQRKRMITGPQWWARCKQMNVLDSFINYYDSEKHAENAVIFLHGNATSSYLWRHVPHIEPVARCIIPDLIG
 MGKSGKSGNGSYRLLDHYKYLTAWFELNLNPKKIIFVGHDWGAALAFHYSYEHQDKIKAIVHAESVVDVIESWDEWPDIE
 EDIALIKSEEGEKMLNENFFVETVLP SKIMRKLEPEEFAAYLEPFKEKGEVRRPTLSWPREIPLVKGKPDVQVIVRNY
 NAYLRASDDLPMKFIESDPGFFSNAIVEGAKKFPNTEFVKVKGHLHFSQEDAPDEMGIYIKSFVERVLKNEQ

>rGFP: (서열번호: 38)
 MDLAKLGLKEVMPKINLEGLVGDHAFSMEGVGEKNILEGTQEVKISVTKGAPLPFAFDIVSVAFSYGNRAYTGYPPEEIS
 DYFLQSPFEGFTYERNIRYQDGGTAIVKSDISLEDGKFIIVNDFKAKDLRRMGVPVQQDIVGMQPSYESMYTNVTSVIGE
 CIIAPKLQTKGHFTYHMRVYKSKKPVETMPLYHFIQHRLVKTNVDTASGYVVQHETAIAAHSTIKKIEGSLP

>엔도핀의 FYVE 도메인 (서열번호: 39)
 QKQPTWVPDSEAPNCMNQVKFTFTKRRHHCRA CGKVFCGVCCNRKCKLQYLEKEARVCVVCYETISK

>CAAX 서열; KRAS로부터의 형질-막 표적화 도메인 (서열번호: 1)
 GKKKKKKSKTKCVM

도면9d

>RGS (RGS17; 서열번호: 17의 잔기 64 - 210)
 IQVLEECQNPTAEVLWSQNFQDKMMKAPAGRNLFREFLRTEYSEENLFWLACEDLKKEQNKKVIEEKARMIYEDYIS I
 LSPKEVSLDSRVREV INRNLLDPNPHMYEDAQLQIYTLMHRDSFPRFLNSQIYKSFVESTAGSSSES

>RGS (RGS19; 서열번호: 18의 잔기 70 - 217)
 LPSCEVCATPSPPEEVQSWAQSFQKLMHSPAGRSVFRAFLRTEYSEENLFWLACEELKAEANQHVVDEKARLIYEDYVSI
 LSPKEVSLDSRVREG INKMKQEPSAHTFDDAQLQIYTLMHRDSYPRFLSSPTYRALLLQGSPSSSEA

>RGS (RGS20; 서열번호: 19의 잔기 242 - 388)
 LPTWEESPAPTL EEVNAWQSFQKLMVTPAGRNAFREFLRTEFSEENLFWMACCELKKEANKNIIEEKARIYEDYIS I
 LSPKEVSLDSRVREV INRNMVPEPSQHI FDDAQLQIYTLMHRDSYPRFMNSAVYKDLLQSLSEKSTIEA

서열목록

<110> UNIVERSITE DE MONTREAL

DOMAIN THERAPEUTICS

<120> SYSTEMS AND METHODS FOR THE ASSESSMENT OF G-PROTEIN ACTIVATION

<130> G15691.00141

<150> US 62/573,853

<151> 2017-10-18

<160> 63

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Gly Lys Lys Lys Lys Lys Lys Ser Lys Thr Lys Cys Val Ile Met

1 5 10 15

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Gly Cys Ile Lys Ser Lys Gly Lys Asp Ser

1 5 10

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Cys Met Ser Cys Lys Cys Val Leu Ser

1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Cys Met Ser Cys Lys Cys Cys Ile Leu

1 5

<210> 5
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 5
 Ser Pro Lys Lys Gly Leu Leu Gln Arg Leu Phe Lys Arg Gln His Gln

1 5 10 15
 Asn Asn Ser Lys Ser
 20

<210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic peptide linker
 <400> 6
 Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ala

1 5 10
 <210> 7
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic peptide linker
 <400> 7
 Gly Ser Ala Gly Thr Gly Gly Arg Ala Ile Asp Ile Lys Leu Pro Ala

1 5 10 15
 Thr

<210> 8
 <211> 442
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 8
 Met Ile Glu Lys Met Gln Gly Ser Arg Met Asp Glu Gln Arg Cys Ser

1 5 10 15
 Phe Pro Pro Pro Leu Lys Thr Glu Glu Asp Tyr Ile Pro Tyr Pro Ser
 20 25 30
 Val His Glu Val Leu Gly Arg Glu Gly Pro Phe Pro Leu Ile Leu Leu
 35 40 45
 Pro Gln Phe Gly Gly Tyr Trp Ile Glu Gly Thr Asn His Glu Ile Thr

 50 55 60
 Ser Ile Pro Glu Thr Glu Pro Leu Gln Ser Pro Thr Thr Lys Val Lys
 65 70 75 80
 Leu Glu Cys Asn Pro Thr Ala Arg Ile Tyr Arg Lys His Phe Leu Gly
 85 90 95
 Lys Glu His Phe Asn Tyr Tyr Ser Leu Asp Ala Ala Leu Gly His Leu
 100 105 110
 Val Phe Ser Leu Lys Tyr Asp Val Ile Gly Asp Gln Glu His Leu Arg
 115 120 125

 Leu Leu Leu Arg Thr Lys Cys Arg Thr Tyr His Asp Val Ile Pro Ile
 130 135 140
 Ser Cys Leu Thr Glu Phe Pro Asn Val Val Gln Met Ala Lys Leu Val
 145 150 155 160
 Cys Glu Asp Val Asn Val Asp Arg Phe Tyr Pro Val Leu Tyr Pro Lys
 165 170 175
 Ala Ser Arg Leu Ile Val Thr Phe Asp Glu His Val Ile Ser Asn Asn
 180 185 190
 Phe Lys Phe Gly Val Ile Tyr Gln Lys Leu Gly Gln Thr Ser Glu Glu

 195 200 205
 Glu Leu Phe Ser Thr Asn Glu Glu Ser Pro Ala Phe Val Glu Phe Leu
 210 215 220
 Glu Phe Leu Gly Gln Lys Val Lys Leu Gln Asp Phe Lys Gly Phe Arg
 225 230 235 240
 Gly Gly Leu Asp Val Thr His Gly Gln Thr Gly Thr Glu Ser Val Tyr
 245 250 255
 Cys Asn Phe Arg Asn Lys Glu Ile Met Phe His Val Ser Thr Lys Leu

				260						265						270			
Pro	Tyr	Thr	Glu	Gly	Asp	Ala	Gln	Gln	Leu	Gln	Arg	Lys	Arg	His	Ile				
			275				280				285								
Gly	Ala	Ala	Ile	Val	Ala	Val	Val	Phe	Gln	Asp	Glu	Asn	Thr	Pro	Phe				
	290					295					300								
Val	Pro	Asp	Met	Ile	Ala	Ser	Asn	Phe	Leu	His	Ala	Tyr	Val	Val	Val				
305					310					315					320				
Gln	Ala	Glu	Gly	Gly	Gly	Pro	Asp	Gly	Pro	Leu	Tyr	Lys	Val	Ser	Val				
				325					330					335					
Thr	Ala	Arg	Asp	Asp	Val	Pro	Phe	Phe	Gly	Pro	Pro	Leu	Pro	Asp	Pro				
				340				345					350						
Ala	Val	Phe	Arg	Lys	Gly	Pro	Glu	Phe	Gln	Glu	Phe	Leu	Leu	Thr	Lys				
	355					360					365								
Leu	Ile	Asn	Ala	Glu	Tyr	Ala	Cys	Tyr	Lys	Ala	Glu	Lys	Phe	Ala	Lys				
	370					375					380								
Leu	Glu	Glu	Arg	Thr	Arg	Ala	Ala	Leu	Leu	Glu	Thr	Leu	Tyr	Glu	Glu				
385					390					395					400				
Leu	His	Ile	His	Ser	Gln	Ser	Met	Met	Gly	Leu	Gly	Gly	Asp	Glu	Asp				
				405					410				415						
Lys	Met	Glu	Asn	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Phe	Phe	Glu	Ser	Phe	Lys				
			420					425					430						
Arg	Val	Ile	Arg	Ser	Arg	Ser	Gln	Ser	Met										
		435					440												
<210>	9																		
<211>	436																		
<212>	PRT																		
<213>	Homo sapiens																		
<400>	9																		
Met	Ile	Glu	Lys	Met	Gln	Gly	Ser	Arg	Met	Asp	Glu	Gln	Arg	Cys	Ser				
1			5					10					15						
Phe	Pro	Pro	Pro	Leu	Lys	Thr	Glu	Glu	Asp	Tyr	Ile	Pro	Tyr	Pro	Ser				

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

Pro Tyr Thr Glu Gly Asp Ala Gln Gln Leu Gln Arg Lys Arg His Ile
275 280 285

Gly Ala Ala Ile Val Ala Val Val Phe Gln Asp Glu Asn Thr Pro Phe
290 295 300

Val Pro Asp Met Ile Ala Ser Asn Phe Leu His Ala Tyr Val Val Val
305 310 315 320

Gln Ala Glu Gly Gly Gly Pro Asp Gly Pro Leu Tyr Lys Val Ser Val
325 330 335

Thr Ala Arg Asp Asp Val Pro Phe Phe Gly Pro Pro Leu Pro Asp Pro
340 345 350

Ala Val Phe Arg Lys Gly Pro Glu Phe Gln Glu Phe Leu Leu Thr Lys
355 360 365

Leu Ile Asn Ala Glu Tyr Ala Cys Tyr Lys Ala Glu Lys Phe Ala Lys
370 375 380

Leu Glu Glu Arg Thr Arg Ala Ala Leu Leu Glu Thr Leu Tyr Glu Glu
385 390 395 400

Leu His Ile His Ser Gln Ser Met Met Gly Leu Gly Gly Asp Glu Asp
405 410 415

Lys Met Glu Asn Gly Ser Gly Gly Gly Gly Phe Phe Glu Ser Phe Lys
420 425 430

Arg Val Ile Arg
435

<210> 10
<211> 420
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 10

Met Ile Glu Lys Met Gln Gly Ser Arg Met Asp Glu Gln Arg Cys Ser
1 5 10 15

Phe Pro Pro Pro Leu Lys Thr Glu Glu Asp Tyr Ile Pro Tyr Pro Ser
20 25 30

Val His Glu Val Leu Gly Arg Glu Gly Pro Phe Pro Leu Ile Leu Leu

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

290 295 300

Val Pro Asp Met Ile Ala Ser Asn Phe Leu His Ala Tyr Val Val Val

305 310 315 320

Gln Ala Glu Gly Gly Gly Pro Asp Gly Pro Leu Tyr Lys Val Ser Val

325 330 335

Thr Ala Arg Asp Asp Val Pro Phe Phe Gly Pro Pro Leu Pro Asp Pro

340 345 350

Ala Val Phe Arg Lys Gly Pro Glu Phe Gln Glu Phe Leu Leu Thr Lys

355 360 365

Leu Ile Asn Ala Glu Tyr Ala Cys Tyr Lys Ala Glu Lys Phe Ala Lys

370 375 380

Leu Glu Glu Arg Thr Arg Ala Ala Leu Leu Glu Thr Leu Tyr Glu Glu

385 390 395 400

Leu His Ile His Ser Gln Ser Met Met Gly Leu Gly Gly Asp Glu Asp

405 410 415

Lys Met Glu Asn

420

<210> 11

<211> 442

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Met Ile Glu Lys Met Gln Gly Ser Arg Met Asp Glu Gln Arg Cys Ser

1 5 10 15

Phe Pro Pro Pro Leu Lys Thr Glu Glu Asp Tyr Ile Pro Tyr Pro Ser

20 25 30

Val His Glu Val Leu Gly Arg Glu Gly Pro Phe Pro Leu Ile Leu Leu

35 40 45

Pro Gln Phe Gly Gly Tyr Trp Ile Glu Gly Thr Asn His Glu Ile Thr

50 55 60

Ser Ile Pro Glu Thr Glu Pro Leu Gln Ser Pro Thr Thr Lys Val Lys

65 70 75 80

Leu Glu Cys Asn Pro Thr Ala Arg Ile Tyr Arg Lys His Phe Leu Gly

85 90 95

Lys Glu His Phe Asn Tyr Tyr Ser Leu Asp Ala Ala Leu Gly His Leu

100 105 110

Val Phe Ser Leu Lys Tyr Asp Val Ile Gly Asp Gln Glu His Leu Arg

115 120 125

Leu Leu Leu Arg Thr Lys Cys Arg Thr Tyr His Asp Val Ile Pro Ile

130 135 140

Ser Cys Leu Thr Glu Phe Pro Asn Val Val Gln Met Ala Lys Leu Val

145 150 155 160

Cys Glu Asp Val Asn Val Asp Arg Phe Tyr Pro Val Leu Tyr Pro Lys

165 170 175

Ala Ser Arg Leu Ile Val Thr Phe Asp Glu His Val Ile Ser Asn Asn

180 185 190

Phe Lys Phe Gly Val Ile Tyr Gln Lys Leu Gly Gln Thr Ser Glu Glu

195 200 205

Glu Leu Phe Ser Thr Asn Glu Glu Ser Pro Ala Phe Val Glu Phe Leu

210 215 220

Glu Phe Leu Gly Gln Lys Val Lys Leu Gln Asp Phe Lys Gly Phe Arg

225 230 235 240

Gly Gly Leu Asp Val Thr His Gly Gln Thr Gly Thr Glu Ser Val Tyr

245 250 255

Cys Asn Phe Arg Asn Lys Glu Ile Met Phe His Val Ser Thr Lys Leu

260 265 270

Pro Tyr Thr Glu Gly Asp Ala Gln Gln Leu Gln Arg Lys Arg His Ile

275 280 285

Gly Ala Ala Ile Val Ala Val Val Phe Gln Asp Glu Asn Thr Pro Phe

290 295 300

Val Pro Asp Met Ile Ala Ser Asn Phe Leu His Ala Tyr Val Val Val

305 310 315 320

Gln Ala Glu Gly Gly Gly Pro Asp Gly Pro Leu Tyr Lys Val Ser Val

325 330 335
 Thr Ala Arg Asp Asp Val Pro Phe Phe Gly Pro Pro Leu Pro Asp Pro
 340 345 350
 Ala Val Phe Arg Lys Gly Pro Glu Phe Gln Glu Phe Leu Leu Thr Lys
 355 360 365
 Leu Ile Asn Ala Glu Tyr Ala Cys Tyr Lys Ala Glu Lys Phe Ala Lys

 370 375 380
 Leu Glu Glu Arg Thr Arg Ala Ala Leu Leu Glu Thr Leu Tyr Glu Glu
 385 390 395 400
 Leu His Ile His Ser Gln Ser Met Met Gly Leu Gly Gly Asp Glu Asp
 405 410 415
 Lys Met Glu Asn Gly Ser Gly Gly Gly Gly Phe Phe Glu Ser Phe Lys
 420 425 430
 Arg Val Ile Arg Ala Arg Ala Gln Ala Met
 435 440

 <210> 12
 <211> 442
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 12
 Met Ile Glu Lys Met Gln Gly Ser Arg Met Asp Glu Gln Arg Cys Ser
 1 5 10 15
 Phe Pro Pro Pro Leu Lys Thr Glu Glu Asp Tyr Ile Pro Tyr Pro Ser
 20 25 30
 Val His Glu Val Leu Gly Arg Glu Gly Pro Phe Pro Leu Ile Leu Leu
 35 40 45
 Pro Gln Phe Gly Gly Tyr Trp Ile Glu Gly Thr Asn His Glu Ile Thr

 50 55 60
 Ser Ile Pro Glu Thr Glu Pro Leu Gln Ser Pro Thr Thr Lys Val Lys
 65 70 75 80
 Leu Glu Cys Asn Pro Thr Ala Arg Ile Tyr Arg Lys His Phe Leu Gly
 85 90 95

Lys Glu His Phe Asn Tyr Tyr Ser Leu Asp Ala Ala Leu Gly His Leu
 100 105 110
 Val Phe Ser Leu Lys Tyr Asp Val Ile Gly Asp Gln Glu His Leu Arg
 115 120 125

 Leu Leu Leu Arg Thr Lys Cys Arg Thr Tyr His Asp Val Ile Pro Ile
 130 135 140
 Ser Cys Leu Thr Glu Phe Pro Asn Val Val Gln Met Ala Lys Leu Val
 145 150 155 160
 Cys Glu Asp Val Asn Val Asp Arg Phe Tyr Pro Val Leu Tyr Pro Lys
 165 170 175
 Ala Ser Arg Leu Ile Val Thr Phe Asp Glu His Val Ile Ser Asn Asn
 180 185 190
 Phe Lys Phe Gly Val Ile Tyr Gln Lys Leu Gly Gln Thr Ser Glu Glu

 195 200 205
 Glu Leu Phe Ser Thr Asn Glu Glu Ser Pro Ala Phe Val Glu Phe Leu
 210 215 220
 Glu Phe Leu Gly Gln Lys Val Lys Leu Gln Asp Phe Lys Gly Phe Arg
 225 230 235 240
 Gly Gly Leu Asp Val Thr His Gly Gln Thr Gly Thr Glu Ser Val Tyr
 245 250 255
 Cys Asn Phe Arg Asn Lys Glu Ile Met Phe His Val Ser Thr Lys Leu
 260 265 270

 Pro Tyr Thr Glu Gly Asp Ala Gln Gln Leu Gln Arg Lys Arg His Ile
 275 280 285
 Gly Ala Ala Ile Val Ala Val Val Phe Gln Asp Glu Asn Thr Pro Phe
 290 295 300
 Val Pro Asp Met Ile Ala Ser Asn Phe Leu His Ala Tyr Val Val Val
 305 310 315 320
 Gln Ala Glu Gly Gly Gly Pro Asp Gly Pro Leu Tyr Lys Val Ser Val
 325 330 335
 Thr Ala Arg Asp Asp Val Pro Phe Phe Gly Pro Pro Leu Pro Asp Pro

340 345 350
 Ala Val Phe Arg Lys Gly Pro Glu Phe Gln Glu Phe Leu Leu Thr Lys
 355 360 365
 Leu Ile Asn Ala Glu Tyr Ala Cys Tyr Lys Ala Glu Lys Phe Ala Lys
 370 375 380
 Leu Glu Glu Arg Thr Arg Ala Ala Leu Leu Glu Thr Leu Tyr Glu Glu
 385 390 395 400
 Leu His Ile His Ser Gln Ser Met Met Gly Leu Gly Gly Asp Glu Asp
 405 410 415

 Lys Met Glu Asn Gly Ser Gly Gly Gly Gly Phe Phe Glu Ser Phe Lys
 420 425 430
 Arg Val Ile Arg Thr Arg Thr Gln Thr Met
 435 440
 <210> 13
 <211> 442
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 13
 Met Ile Glu Lys Met Gln Gly Ser Arg Met Asp Glu Gln Arg Cys Ser
 1 5 10 15
 Phe Pro Pro Pro Leu Lys Thr Glu Glu Asp Tyr Ile Pro Tyr Pro Ser
 20 25 30

 Val His Glu Val Leu Gly Arg Glu Gly Pro Phe Pro Leu Ile Leu Leu
 35 40 45
 Pro Gln Phe Gly Gly Tyr Trp Ile Glu Gly Thr Asn His Glu Ile Thr
 50 55 60
 Ser Ile Pro Glu Thr Glu Pro Leu Gln Ser Pro Thr Thr Lys Val Lys
 65 70 75 80
 Leu Glu Cys Asn Pro Thr Ala Arg Ile Tyr Arg Lys His Phe Leu Gly
 85 90 95
 Lys Glu His Phe Asn Tyr Tyr Ser Leu Asp Ala Ala Leu Gly His Leu
 100 105 110

Val Phe Ser Leu Lys Tyr Asp Val Ile Gly Asp Gln Glu His Leu Arg
115 120 125

Leu Leu Leu Arg Thr Lys Cys Arg Thr Tyr His Asp Val Ile Pro Ile
130 135 140

Ser Cys Leu Thr Glu Phe Pro Asn Val Val Gln Met Ala Lys Leu Val
145 150 155 160

Cys Glu Asp Val Asn Val Asp Arg Phe Tyr Pro Val Leu Tyr Pro Lys
165 170 175

Ala Ser Arg Leu Ile Val Thr Phe Asp Glu His Val Ile Ser Asn Asn
180 185 190

Phe Lys Phe Gly Val Ile Tyr Gln Lys Leu Gly Gln Thr Ser Glu Glu
195 200 205

Glu Leu Phe Ser Thr Asn Glu Glu Ser Pro Ala Phe Val Glu Phe Leu
210 215 220

Glu Phe Leu Gly Gln Lys Val Lys Leu Gln Asp Phe Lys Gly Phe Arg
225 230 235 240

Gly Gly Leu Asp Val Thr His Gly Gln Thr Gly Thr Glu Ser Val Tyr
245 250 255

Cys Asn Phe Arg Asn Lys Glu Ile Met Phe His Val Ser Thr Lys Leu
260 265 270

Pro Tyr Thr Glu Gly Asp Ala Gln Gln Leu Gln Arg Lys Arg His Ile
275 280 285

Gly Ala Ala Ile Val Ala Val Val Phe Gln Asp Glu Asn Thr Pro Phe
290 295 300

Val Pro Asp Met Ile Ala Ser Asn Phe Leu His Ala Tyr Val Val Val
305 310 315 320

Gln Ala Glu Gly Gly Gly Pro Asp Gly Pro Leu Tyr Lys Val Ser Val
325 330 335

Thr Ala Arg Asp Asp Val Pro Phe Phe Gly Pro Pro Leu Pro Asp Pro
340 345 350

Ala Val Phe Arg Lys Gly Pro Glu Phe Gln Glu Phe Leu Leu Thr Lys
355 360 365

Leu Ile Asn Ala Glu Tyr Ala Cys Tyr Lys Ala Glu Lys Phe Ala Lys
 370 375 380
 Leu Glu Glu Arg Thr Arg Ala Ala Leu Leu Glu Thr Leu Tyr Glu Glu

 385 390 395 400
 Leu His Ile His Ser Gln Ser Met Met Gly Leu Gly Gly Asp Glu Asp
 405 410 415
 Lys Met Glu Asn Gly Ser Gly Gly Gly Gly Phe Phe Glu Ser Phe Lys
 420 425 430
 Arg Val Ile Arg Ala Arg Ser Gln Ala Met
 435 440
 <210> 14
 <211> 442
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 14
 Met Ile Glu Lys Met Gln Gly Ser Arg Met Asp Glu Gln Arg Cys Ser

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

 Leu Glu Cys Asn Pro Thr Ala Arg Ile Tyr Arg Lys His Phe Leu Gly
 85 90 95
 Lys Glu His Phe Asn Tyr Tyr Ser Leu Asp Ala Ala Leu Gly His Leu
 100 105 110
 Val Phe Ser Leu Lys Tyr Asp Val Ile Gly Asp Gln Glu His Leu Arg
 115 120 125
 Leu Leu Leu Arg Thr Lys Cys Arg Thr Tyr His Asp Val Ile Pro Ile

130 135 140
Ser Cys Leu Thr Glu Phe Pro Asn Val Val Gln Met Ala Lys Leu Val

145 150 155 160
Cys Glu Asp Val Asn Val Asp Arg Phe Tyr Pro Val Leu Tyr Pro Lys

165 170 175
Ala Ser Arg Leu Ile Val Thr Phe Asp Glu His Val Ile Ser Asn Asn

180 185 190
Phe Lys Phe Gly Val Ile Tyr Gln Lys Leu Gly Gln Thr Ser Glu Glu

195 200 205
Glu Leu Phe Ser Thr Asn Glu Glu Ser Pro Ala Phe Val Glu Phe Leu

210 215 220

Glu Phe Leu Gly Gln Lys Val Lys Leu Gln Asp Phe Lys Gly Phe Arg
225 230 235 240

Gly Gly Leu Asp Val Thr His Gly Gln Thr Gly Thr Glu Ser Val Tyr
245 250 255

Cys Asn Phe Arg Asn Lys Glu Ile Met Phe His Val Ser Thr Lys Leu
260 265 270

Pro Tyr Thr Glu Gly Asp Ala Gln Gln Leu Gln Arg Lys Arg His Ile
275 280 285

Gly Ala Ala Ile Val Ala Val Val Phe Gln Asp Glu Asn Thr Pro Phe

290 295 300
Val Pro Asp Met Ile Ala Ser Asn Phe Leu His Ala Tyr Val Val Val

305 310 315 320
Gln Ala Glu Gly Gly Gly Pro Asp Gly Pro Leu Tyr Lys Val Ser Val

325 330 335
Thr Ala Arg Asp Asp Val Pro Phe Phe Gly Pro Pro Leu Pro Asp Pro

340 345 350
Ala Val Phe Arg Lys Gly Pro Glu Phe Gln Glu Phe Leu Leu Thr Lys

355 360 365

Leu Ile Asn Ala Glu Tyr Ala Cys Tyr Lys Ala Glu Lys Phe Ala Lys
370 375 380

Leu Glu Glu Arg Thr Arg Ala Ala Leu Leu Glu Thr Leu Tyr Glu Glu
 385 390 395 400
 Leu His Ile His Ser Gln Ser Met Met Gly Leu Gly Gly Asp Glu Asp
 405 410 415
 Lys Met Glu Asn Gly Ser Gly Gly Gly Gly Phe Phe Glu Ser Phe Lys
 420 425 430
 Arg Val Ile Arg Asp Arg Ser Gln Ala Met

435 440

<210> 15
 <211> 442
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 15

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

50 55 60
 Ser Ile Pro Glu Thr Glu Pro Leu Gln Ser Pro Thr Thr Lys Val Lys
 65 70 75 80
 Leu Glu Cys Asn Pro Thr Ala Arg Ile Tyr Arg Lys His Phe Leu Gly
 85 90 95
 Lys Glu His Phe Asn Tyr Tyr Ser Leu Asp Ala Ala Leu Gly His Leu
 100 105 110
 Val Phe Ser Leu Lys Tyr Asp Val Ile Gly Asp Gln Glu His Leu Arg
 115 120 125

Leu Leu Leu Arg Thr Lys Cys Arg Thr Tyr His Asp Val Ile Pro Ile
 130 135 140
 Ser Cys Leu Thr Glu Phe Pro Asn Val Val Gln Met Ala Lys Leu Val

145 150 155 160
 Cys Glu Asp Val Asn Val Asp Arg Phe Tyr Pro Val Leu Tyr Pro Lys
 165 170 175
 Ala Ser Arg Leu Ile Val Thr Phe Asp Glu His Val Ile Ser Asn Asn
 180 185 190
 Phe Lys Phe Gly Val Ile Tyr Gln Lys Leu Gly Gln Thr Ser Glu Glu

 195 200 205
 Glu Leu Phe Ser Thr Asn Glu Glu Ser Pro Ala Phe Val Glu Phe Leu
 210 215 220
 Glu Phe Leu Gly Gln Lys Val Lys Leu Gln Asp Phe Lys Gly Phe Arg
 225 230 235 240
 Gly Gly Leu Asp Val Thr His Gly Gln Thr Gly Thr Glu Ser Val Tyr
 245 250 255
 Cys Asn Phe Arg Asn Lys Glu Ile Met Phe His Val Ser Thr Lys Leu
 260 265 270

 Pro Tyr Thr Glu Gly Asp Ala Gln Gln Leu Gln Arg Lys Arg His Ile
 275 280 285
 Gly Ala Ala Ile Val Ala Val Val Phe Gln Asp Glu Asn Thr Pro Phe
 290 295 300
 Val Pro Asp Met Ile Ala Ser Asn Phe Leu His Ala Tyr Val Val Val
 305 310 315 320
 Gln Ala Glu Gly Gly Gly Pro Asp Gly Pro Leu Tyr Lys Val Ser Val
 325 330 335
 Thr Ala Arg Asp Asp Val Pro Phe Phe Gly Pro Pro Leu Pro Asp Pro

 340 345 350
 Ala Val Phe Arg Lys Gly Pro Glu Phe Gln Glu Phe Leu Leu Thr Lys
 355 360 365
 Leu Ile Asn Ala Glu Tyr Ala Cys Tyr Lys Ala Glu Lys Phe Ala Lys
 370 375 380
 Leu Glu Glu Arg Thr Arg Ala Ala Leu Leu Glu Thr Leu Tyr Glu Glu
 385 390 395 400
 Leu His Ile His Ser Gln Ser Met Met Gly Leu Gly Gly Asp Glu Asp

405 410 415
 Lys Met Glu Asn Gly Ser Gly Gly Gly Gly Phe Phe Glu Ser Phe Lys
 420 425 430
 Arg Val Ile Arg Ala Arg Ser Gln Asp Met
 435 440
 <210> 16
 <211> 442
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 16
 Met Ile Glu Lys Met Gln Gly Ser Arg Met Asp Glu Gln Arg Cys Ser
 1 5 10 15
 Phe Pro Pro Pro Leu Lys Thr Glu Glu Asp Tyr Ile Pro Tyr Pro Ser
 20 25 30

 Val His Glu Val Leu Gly Arg Glu Gly Pro Phe Pro Leu Ile Leu Leu
 35 40 45
 Pro Gln Phe Gly Gly Tyr Trp Ile Glu Gly Thr Asn His Glu Ile Thr
 50 55 60
 Ser Ile Pro Glu Thr Glu Pro Leu Gln Ser Pro Thr Thr Lys Val Lys
 65 70 75 80
 Leu Glu Cys Asn Pro Thr Ala Arg Ile Tyr Arg Lys His Phe Leu Gly
 85 90 95
 Lys Glu His Phe Asn Tyr Tyr Ser Leu Asp Ala Ala Leu Gly His Leu

 100 105 110
 Val Phe Ser Leu Lys Tyr Asp Val Ile Gly Asp Gln Glu His Leu Arg
 115 120 125
 Leu Leu Leu Arg Thr Lys Cys Arg Thr Tyr His Asp Val Ile Pro Ile
 130 135 140
 Ser Cys Leu Thr Glu Phe Pro Asn Val Val Gln Met Ala Lys Leu Val
 145 150 155 160
 Cys Glu Asp Val Asn Val Asp Arg Phe Tyr Pro Val Leu Tyr Pro Lys

165 170 175
 Ala Ser Arg Leu Ile Val Thr Phe Asp Glu His Val Ile Ser Asn Asn
 180 185 190
 Phe Lys Phe Gly Val Ile Tyr Gln Lys Leu Gly Gln Thr Ser Glu Glu
 195 200 205
 Glu Leu Phe Ser Thr Asn Glu Glu Ser Pro Ala Phe Val Glu Phe Leu
 210 215 220
 Glu Phe Leu Gly Gln Lys Val Lys Leu Gln Asp Phe Lys Gly Phe Arg
 225 230 235 240
 Gly Gly Leu Asp Val Thr His Gly Gln Thr Gly Thr Glu Ser Val Tyr
 245 250 255
 Cys Asn Phe Arg Asn Lys Glu Ile Met Phe His Val Ser Thr Lys Leu
 260 265 270
 Pro Tyr Thr Glu Gly Asp Ala Gln Gln Leu Gln Arg Lys Arg His Ile
 275 280 285
 Gly Ala Ala Ile Val Ala Val Val Phe Gln Asp Glu Asn Thr Pro Phe
 290 295 300
 Val Pro Asp Met Ile Ala Ser Asn Phe Leu His Ala Tyr Val Val Val
 305 310 315 320
 Gln Ala Glu Gly Gly Gly Pro Asp Gly Pro Leu Tyr Lys Val Ser Val
 325 330 335
 Thr Ala Arg Asp Asp Val Pro Phe Phe Gly Pro Pro Leu Pro Asp Pro
 340 345 350
 Ala Val Phe Arg Lys Gly Pro Glu Phe Gln Glu Phe Leu Leu Thr Lys
 355 360 365
 Leu Ile Asn Ala Glu Tyr Ala Cys Tyr Lys Ala Glu Lys Phe Ala Lys
 370 375 380
 Leu Glu Glu Arg Thr Arg Ala Ala Leu Leu Glu Thr Leu Tyr Glu Glu
 385 390 395 400
 Leu His Ile His Ser Gln Ser Met Met Gly Leu Gly Gly Asp Glu Asp
 405 410 415

Lys Met Glu Asn Gly Ser Gly Gly Gly Gly Phe Phe Glu Ser Phe Lys
 420 425 430
 Arg Val Ile Arg Asp Arg Ser Gln Asp Met
 435 440
 <210> 17
 <211> 210
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 17
 Met Arg Lys Arg Gln Gln Ser Gln Asn Glu Gly Thr Pro Ala Val Ser
 1 5 10 15
 Gln Ala Pro Gly Asn Gln Arg Pro Asn Asn Thr Cys Cys Phe Cys Trp
 20 25 30
 Cys Cys Cys Cys Ser Cys Ser Cys Leu Thr Val Arg Asn Glu Glu Arg
 35 40 45
 Gly Glu Asn Ala Gly Arg Pro Thr His Thr Thr Lys Met Glu Ser Ile
 50 55 60
 Gln Val Leu Glu Glu Cys Gln Asn Pro Thr Ala Glu Glu Val Leu Ser
 65 70 75 80
 Trp Ser Gln Asn Phe Asp Lys Met Met Lys Ala Pro Ala Gly Arg Asn
 85 90 95
 Leu Phe Arg Glu Phe Leu Arg Thr Glu Tyr Ser Glu Glu Asn Leu Leu
 100 105 110
 Phe Trp Leu Ala Cys Glu Asp Leu Lys Lys Glu Gln Asn Lys Lys Val
 115 120 125
 Ile Glu Glu Lys Ala Arg Met Ile Tyr Glu Asp Tyr Ile Ser Ile Leu
 130 135 140
 Ser Pro Lys Glu Val Ser Leu Asp Ser Arg Val Arg Glu Val Ile Asn
 145 150 155 160
 Arg Asn Leu Leu Asp Pro Asn Pro His Met Tyr Glu Asp Ala Gln Leu
 165 170 175
 Gln Ile Tyr Thr Leu Met His Arg Asp Ser Phe Pro Arg Phe Leu Asn

180 185 190
 Ser Gln Ile Tyr Lys Ser Phe Val Glu Ser Thr Ala Gly Ser Ser Ser
 195 200 205
 Glu Ser
 210
 <210> 18
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 18
 Met Pro Thr Pro His Glu Ala Glu Lys Gln Ile Thr Gly Pro Glu Glu
 1 5 10 15
 Ala Asp Arg Pro Pro Ser Met Ser Ser His Asp Thr Ala Ser Pro Ala
 20 25 30
 Ala Pro Ser Arg Asn Pro Cys Cys Leu Cys Trp Cys Cys Cys Cys Ser
 35 40 45
 Cys Ser Trp Asn Gln Glu Arg Arg Arg Ala Trp Gln Ala Ser Arg Glu
 50 55 60
 Ser Lys Leu Gln Pro Leu Pro Ser Cys Glu Val Cys Ala Thr Pro Ser

 65 70 75 80
 Pro Glu Glu Val Gln Ser Trp Ala Gln Ser Phe Asp Lys Leu Met His
 85 90 95
 Ser Pro Ala Gly Arg Ser Val Phe Arg Ala Phe Leu Arg Thr Glu Tyr
 100 105 110
 Ser Glu Glu Asn Met Leu Phe Trp Leu Ala Cys Glu Glu Leu Lys Ala
 115 120 125
 Glu Ala Asn Gln His Val Val Asp Glu Lys Ala Arg Leu Ile Tyr Glu
 130 135 140

 Asp Tyr Val Ser Ile Leu Ser Pro Lys Glu Val Ser Leu Asp Ser Arg
 145 150 155 160
 Val Arg Glu Gly Ile Asn Lys Lys Met Gln Glu Pro Ser Ala His Thr
 165 170 175

Phe Asp Asp Ala Gln Leu Gln Ile Tyr Thr Leu Met His Arg Asp Ser
 180 185 190
 Tyr Pro Arg Phe Leu Ser Ser Pro Thr Tyr Arg Ala Leu Leu Leu Gln
 195 200 205
 Gly Pro Ser Gln Ser Ser Ser Glu Ala

210 215

<210> 19
 <211> 388
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 19

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

50 55 60
 Ser Pro Ala Ala Pro Lys Leu Phe Gly Leu Leu Ser Ser Pro Leu Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Ala Arg Phe Phe Ser His Leu Leu Arg Arg Pro Pro Pro Glu
 85 90 95
 Ala Pro Arg Arg Arg Leu Asp Phe Ser Pro Leu Leu Pro Ala Leu Pro
 100 105 110
 Ala Ala Arg Leu Ser Arg Gly His Glu Glu Leu Pro Gly Arg Leu Ser
 115 120 125

Leu Leu Leu Gly Ala Ala Leu Ala Leu Pro Gly Arg Pro Ser Gly Gly
 130 135 140
 Arg Pro Leu Arg Pro Pro His Pro Val Ala Lys Pro Arg Glu Glu Asp
 145 150 155 160
 Ala Thr Ala Gly Gln Ser Ser Pro Met Pro Gln Met Gly Ser Glu Arg

165 170 175
Met Glu Met Arg Lys Arg Gln Met Pro Ala Ala Gln Asp Thr Pro Gly
180 185 190
Ala Ala Pro Gly Gln Pro Gly Ala Gly Ser Arg Gly Ser Asn Ala Cys

195 200 205
Cys Phe Cys Trp Cys Cys Cys Cys Ser Cys Ser Cys Leu Thr Val Arg
210 215 220
Asn Gln Glu Asp Gln Arg Pro Thr Ile Ala Ser His Glu Leu Arg Ala
225 230 235 240
Asp Leu Pro Thr Trp Glu Glu Ser Pro Ala Pro Thr Leu Glu Glu Val
245 250 255
Asn Ala Trp Ala Gln Ser Phe Asp Lys Leu Met Val Thr Pro Ala Gly
260 265 270

Arg Asn Ala Phe Arg Glu Phe Leu Arg Thr Glu Phe Ser Glu Glu Asn
275 280 285
Met Leu Phe Trp Met Ala Cys Glu Glu Leu Lys Lys Glu Ala Asn Lys
290 295 300
Asn Ile Ile Glu Glu Lys Ala Arg Ile Ile Tyr Glu Asp Tyr Ile Ser
305 310 315 320
Ile Leu Ser Pro Lys Glu Val Ser Leu Asp Ser Arg Val Arg Glu Val
325 330 335
Ile Asn Arg Asn Met Val Glu Pro Ser Gln His Ile Phe Asp Asp Ala

340 345 350
Gln Leu Gln Ile Tyr Thr Leu Met His Arg Asp Ser Tyr Pro Arg Phe
355 360 365
Met Asn Ser Ala Val Tyr Lys Asp Leu Leu Gln Ser Leu Ser Glu Lys
370 375 380
Ser Ile Glu Ala

385

<210> 20

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide linker

<400> 20

Gly Ser Ala Gly Thr Gly Gly Arg Ala Ile Asp Ile Lys Leu Ala Ser

1 5 10 15
Ala Thr

<210> 21

<211> 1522

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Met Ser Val Arg Leu Pro Gln Ser Ile Asp Arg Leu Ser Ser Leu Ser

1 5 10 15
Ser Leu Gly Asp Ser Ala Pro Glu Arg Lys Ser Pro Ser His His Arg

20 25 30
Gln Pro Ser Asp Ala Ser Glu Thr Thr Gly Leu Val Gln Arg Cys Val
35 40 45

Ile Ile Gln Lys Asp Gln His Gly Phe Gly Phe Thr Val Ser Gly Asp
50 55 60

Arg Ile Val Leu Val Gln Ser Val Arg Pro Gly Gly Ala Ala Met Lys
65 70 75 80

Ala Gly Val Lys Glu Gly Asp Arg Ile Ile Lys Val Asn Gly Thr Met
85 90 95

Val Thr Asn Ser Ser His Leu Glu Val Val Lys Leu Ile Lys Ser Gly
100 105 110

Ala Tyr Val Ala Leu Thr Leu Leu Gly Ser Ser Pro Ser Ser Met Gly

115 120 125
Ile Ser Gly Leu Gln Gln Asp Pro Ser Pro Ala Gly Ala Pro Arg Ile

130 135 140
Thr Ser Val Ile Pro Ser Pro Pro Pro Pro Pro Leu Pro Pro Pro

145 150 155 160

Gln Arg Ile Thr Gly Pro Lys Pro Leu Gln Asp Pro Glu Val Gln Lys
165 170 175

His Ala Thr Gln Ile Leu Arg Asn Met Leu Arg Gln Glu Glu Lys Glu
180 185 190

Leu Gln Asp Ile Leu Pro Leu Tyr Gly Asp Thr Ser Gln Arg Pro Ser
195 200 205

Glu Gly Arg Leu Ser Leu Asp Ser Gln Glu Gly Asp Ser Gly Leu Asp
210 215 220

Ser Gly Thr Glu Arg Phe Pro Ser Leu Ser Glu Ser Leu Met Asn Arg
225 230 235 240

Asn Ser Val Leu Ser Asp Pro Gly Leu Asp Ser Pro Arg Thr Ser Pro
245 250 255

Val Ile Met Ala Arg Val Ala Gln His His Arg Arg Gln Gly Ser Asp
260 265 270

Ala Ala Val Pro Ser Thr Gly Asp Gln Gly Val Asp Gln Ser Pro Lys
275 280 285

Pro Leu Ile Ile Gly Pro Glu Glu Asp Tyr Asp Pro Gly Tyr Phe Asn
290 295 300

Asn Glu Ser Asp Ile Ile Phe Gln Asp Leu Glu Lys Leu Lys Ser Arg
305 310 315 320

Pro Ala His Leu Gly Val Phe Leu Arg Tyr Ile Phe Ser Gln Ala Asp
325 330 335

Pro Ser Pro Leu Leu Phe Tyr Leu Cys Ala Glu Val Tyr Gln Gln Ala
340 345 350

Ser Pro Lys Asp Ser Arg Ser Leu Gly Lys Asp Ile Trp Asn Ile Phe
355 360 365

Leu Glu Lys Asn Ala Pro Leu Arg Val Lys Ile Pro Glu Met Leu Gln
370 375 380

Ala Glu Ile Asp Ser Arg Leu Arg Asn Ser Glu Asp Ala Arg Gly Val
385 390 395 400

Leu Cys Glu Ala Gln Glu Ala Ala Met Pro Glu Ile Gln Glu Gln Ile

405 410 415
 His Asp Tyr Arg Thr Lys Arg Thr Leu Gly Leu Gly Ser Leu Tyr Gly
 420 425 430
 Glu Asn Asp Leu Leu Asp Leu Asp Gly Asp Pro Leu Arg Glu Arg Gln
 435 440 445
 Val Ala Glu Lys Gln Leu Ala Ala Leu Gly Asp Ile Leu Ser Lys Tyr
 450 455 460
 Glu Glu Asp Arg Ser Ala Pro Met Asp Phe Ala Leu Asn Thr Tyr Met
 465 470 475 480

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

 545 550 555 560
 Lys Pro Gly Asn Val Arg Asn Ile Ile Gln His Phe Glu Asn Asn Gln
 565 570 575
 Gln Tyr Asp Ala Pro Glu Pro Gly Thr Gln Arg Leu Ser Thr Gly Ser
 580 585 590
 Phe Pro Glu Asp Leu Leu Glu Ser Asp Ser Ser Arg Ser Glu Ile Arg
 595 600 605
 Leu Gly Arg Ser Glu Ser Leu Lys Gly Arg Glu Glu Met Lys Arg Ser
 610 615 620

 Arg Lys Ala Glu Asn Val Pro Arg Ser Arg Ser Asp Val Asp Met Asp
 625 630 635 640
 Ala Ala Ala Glu Ala Thr Arg Leu His Gln Ser Ala Ser Ser Ser Thr
 645 650 655
 Ser Ser Leu Ser Thr Arg Ser Leu Glu Asn Pro Thr Pro Pro Phe Thr

660 665 670
 Pro Lys Met Gly Arg Arg Ser Ile Glu Ser Pro Ser Leu Gly Phe Cys
 675 680 685
 Thr Asp Thr Leu Leu Pro His Leu Leu Glu Asp Asp Leu Gly Gln Leu

 690 695 700
 Ser Asp Leu Glu Pro Glu Pro Asp Ala Gln Asn Trp Gln His Thr Val
 705 710 715 720
 Gly Lys Asp Val Val Ala Gly Leu Thr Gln Arg Glu Ile Asp Arg Gln
 725 730 735
 Glu Val Ile Asn Glu Leu Phe Val Thr Glu Ala Ser His Leu Arg Thr
 740 745 750
 Leu Arg Val Leu Asp Leu Ile Phe Tyr Gln Arg Met Lys Lys Glu Asn
 755 760 765

 Leu Met Pro Arg Glu Glu Leu Ala Arg Leu Phe Pro Asn Leu Pro Glu
 770 775 780
 Leu Ile Glu Ile His Asn Ser Trp Cys Glu Ala Met Lys Lys Leu Arg
 785 790 795 800
 Glu Glu Gly Pro Ile Ile Lys Glu Ile Ser Asp Leu Met Leu Ala Arg
 805 810 815
 Phe Asp Gly Pro Ala Arg Glu Glu Leu Gln Gln Val Ala Ala Gln Phe
 820 825 830
 Cys Ser Tyr Gln Ser Ile Ala Leu Glu Leu Ile Lys Thr Lys Gln Arg

 835 840 845
 Lys Glu Ser Arg Phe Gln Leu Phe Met Gln Glu Ala Glu Ser His Pro
 850 855 860
 Gln Cys Arg Arg Leu Gln Leu Arg Asp Leu Ile Ile Ser Glu Met Gln
 865 870 875 880
 Arg Leu Thr Lys Tyr Pro Leu Leu Leu Glu Ser Ile Ile Lys His Thr
 885 890 895
 Glu Gly Gly Thr Ser Glu His Glu Lys Leu Cys Arg Ala Arg Asp Gln
 900 905 910

Cys Arg Glu Ile Leu Lys Tyr Val Asn Glu Ala Val Lys Gln Thr Glu
 915 920 925
 Asn Arg His Arg Leu Glu Gly Tyr Gln Lys Arg Leu Asp Ala Thr Ala
 930 935 940
 Leu Glu Arg Ala Ser Asn Pro Leu Ala Ala Glu Phe Lys Ser Leu Asp
 945 950 955 960
 Leu Thr Thr Arg Lys Met Ile His Glu Gly Pro Leu Thr Trp Arg Ile
 965 970 975
 Ser Lys Asp Lys Thr Leu Asp Leu His Val Leu Leu Leu Glu Asp Leu
 980 985 990
 Leu Val Leu Leu Gln Lys Gln Asp Glu Lys Leu Leu Leu Lys Cys His
 995 1000 1005
 Ser Lys Thr Ala Val Gly Ser Ser Asp Ser Lys Gln Thr Phe Ser Pro
 1010 1015 1020
 Val Leu Lys Leu Asn Ala Val Leu Ile Arg Ser Val Ala Thr Asp Lys
 1025 1030 1035 1040
 Arg Ala Phe Phe Ile Ile Cys Thr Ser Lys Leu Gly Pro Pro Gln Ile
 1045 1050 1055
 Tyr Glu Leu Val Ala Leu Thr Ser Ser Asp Lys Asn Thr Trp Met Glu
 1060 1065 1070
 Leu Leu Glu Glu Ala Val Arg Asn Ala Thr Arg His Pro Gly Ala Ala
 1075 1080 1085
 Pro Met Pro Val His Pro Pro Pro Gly Pro Arg Glu Pro Ala Gln
 1090 1095 1100
 Gln Gly Pro Thr Pro Ser Arg Val Glu Leu Asp Asp Ser Asp Val Phe
 1105 1110 1115 1120
 His Gly Glu Pro Glu Pro Glu Glu Leu Pro Gly Gly Thr Gly Ser Gln
 1125 1130 1135
 Gln Arg Val Gln Gly Lys His Gln Val Leu Leu Glu Asp Pro Glu Gln
 1140 1145 1150
 Glu Gly Ser Ala Glu Glu Glu Glu Leu Gly Val Leu Pro Cys Pro Ser
 1155 1160 1165

Thr Ser Leu Asp Gly Glu Asn Arg Gly Ile Arg Thr Arg Asn Pro Ile
1170 1175 1180

His Leu Ala Phe Pro Gly Pro Leu Phe Met Glu Gly Leu Ala Asp Ser
1185 1190 1195 1200

Ala Leu Glu Asp Val Glu Asn Leu Arg His Leu Ile Leu Trp Ser Leu
1205 1210 1215

Leu Pro Gly His Thr Met Glu Thr Gln Ala Ala Gln Glu Pro Glu Asp
1220 1225 1230

Asp Leu Thr Pro Thr Pro Ser Val Ile Ser Val Thr Ser His Pro Trp
1235 1240 1245

Asp Pro Gly Ser Pro Gly Gln Ala Pro Pro Gly Gly Glu Gly Asp Asn
1250 1255 1260

Thr Gln Leu Ala Gly Leu Glu Gly Glu Arg Pro Glu Gln Glu Asp Met
1265 1270 1275 1280

Gly Leu Cys Ser Leu Glu His Leu Pro Pro Arg Thr Arg Asn Ser Gly
1285 1290 1295

Ile Trp Glu Ser Pro Glu Leu Asp Arg Asn Leu Ala Glu Asp Ala Ser
1300 1305 1310

Ser Thr Glu Ala Ala Gly Gly Tyr Lys Val Val Arg Lys Ala Glu Val
1315 1320 1325

Ala Gly Ser Lys Val Val Pro Ala Leu Pro Glu Ser Gly Gln Ser Glu
1330 1335 1340

Pro Gly Pro Pro Glu Val Glu Gly Gly Thr Lys Ala Thr Gly Asn Cys
1345 1350 1355 1360

Phe Tyr Val Ser Met Pro Ser Gly Pro Pro Asp Ser Ser Thr Asp His
1365 1370 1375

Ser Glu Ala Pro Met Ser Pro Pro Gln Pro Asp Ser Leu Pro Ala Gly
1380 1385 1390

Gln Thr Glu Pro Gln Pro Gln Leu Gln Gly Gly Asn Asp Asp Pro Arg
1395 1400 1405

Arg Pro Ser Arg Ser Pro Pro Ser Leu Ala Leu Arg Asp Val Gly Met

1410 1415 1420
 Ile Phe His Thr Ile Glu Gln Leu Thr Leu Lys Leu Asn Arg Leu Lys
 1425 1430 1435 1440
 Asp Met Glu Leu Ala His Arg Glu Leu Leu Lys Ser Leu Gly Gly Glu
 1445 1450 1455
 Ser Ser Gly Gly Thr Thr Pro Val Gly Ser Phe His Thr Glu Ala Ala
 1460 1465 1470
 Arg Trp Thr Asp Gly Ser Leu Ser Pro Pro Ala Lys Glu Pro Leu Ala
 1475 1480 1485

Ser Asp Ser Arg Asn Ser His Glu Leu Gly Pro Cys Pro Glu Asp Gly
 1490 1495 1500
 Ser Asp Ala Pro Leu Glu Asp Ser Thr Ala Asp Ala Ala Ala Ser Pro
 1505 1510 1515 1520
 Gly Pro

<210> 22
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic peptide linker
 <400> 22

Gly Ile Arg Leu Arg Glu Ala Leu Lys Leu Pro Ala Thr
 1 5 10

<210> 23

<211> 912
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 23

Met Glu Asp Phe Ala Arg Gly Ala Ala Ser Pro Gly Pro Ser Arg Pro
 1 5 10 15
 Gly Leu Val Pro Val Ser Ile Ile Gly Ala Glu Asp Glu Asp Phe Glu
 20 25 30
 Asn Glu Leu Glu Thr Asn Ser Glu Glu Gln Asn Ser Gln Phe Gln Ser

35 40 45
 Leu Glu Gln Val Lys Arg Arg Pro Ala His Leu Met Ala Leu Leu Gln
 50 55 60

 His Val Ala Leu Gln Phe Glu Pro Gly Pro Leu Leu Cys Cys Leu His
 65 70 75 80
 Ala Asp Met Leu Gly Ser Leu Gly Pro Lys Glu Ala Lys Lys Ala Phe
 85 90 95
 Leu Asp Phe Tyr His Ser Phe Leu Glu Lys Thr Ala Val Leu Arg Val
 100 105 110
 Pro Val Pro Pro Asn Val Ala Phe Glu Leu Asp Arg Thr Arg Ala Asp
 115 120 125
 Leu Ile Ser Glu Asp Val Gln Arg Arg Phe Val Gln Glu Val Val Gln

 130 135 140
 Ser Gln Gln Val Ala Val Gly Arg Gln Leu Glu Asp Phe Arg Ser Lys
 145 150 155 160
 Arg Leu Met Gly Met Thr Pro Trp Glu Gln Glu Leu Ala Gln Leu Glu
 165 170 175
 Ala Trp Val Gly Arg Asp Arg Ala Ser Tyr Glu Ala Arg Glu Arg His
 180 185 190
 Val Ala Glu Arg Leu Leu Met His Leu Glu Glu Met Gln His Thr Ile
 195 200 205

 Ser Thr Asp Glu Glu Lys Ser Ala Ala Val Val Asn Ala Ile Gly Leu
 210 215 220
 Tyr Met Arg His Leu Gly Val Arg Thr Lys Ser Gly Asp Lys Lys Ser
 225 230 235 240
 Gly Arg Asn Phe Phe Arg Lys Lys Val Met Gly Asn Arg Arg Ser Asp
 245 250 255
 Glu Pro Ala Lys Thr Lys Lys Gly Leu Ser Ser Ile Leu Asp Ala Ala
 260 265 270
 Arg Trp Asn Arg Gly Glu Pro Gln Val Pro Asp Phe Arg His Leu Lys

 275 280 285

Ala Glu Val Asp Ala Glu Lys Pro Gly Ala Thr Asp Arg Lys Gly Gly
290 295 300

Val Gly Met Pro Ser Arg Asp Arg Asn Ile Gly Ala Pro Gly Gln Asp
305 310 315 320

Thr Pro Gly Val Ser Leu His Pro Leu Ser Leu Asp Ser Pro Asp Arg
325 330 335

Glu Pro Gly Ala Asp Ala Pro Leu Glu Leu Gly Asp Ser Ser Pro Gln
340 345 350

Gly Pro Met Ser Leu Glu Ser Leu Ala Pro Pro Glu Ser Thr Asp Glu
355 360 365

Gly Ala Glu Thr Glu Ser Pro Glu Pro Gly Asp Glu Gly Glu Pro Gly
370 375 380

Arg Ser Gly Leu Glu Leu Glu Pro Glu Glu Pro Pro Gly Trp Arg Glu
385 390 395 400

Leu Val Pro Pro Asp Thr Leu His Ser Leu Pro Lys Ser Gln Val Lys
405 410 415

Arg Gln Glu Val Ile Ser Glu Leu Leu Val Thr Glu Ala Ala His Val
420 425 430

Arg Met Leu Arg Val Leu His Asp Leu Phe Phe Gln Pro Met Ala Glu
435 440 445

Cys Leu Phe Phe Pro Leu Glu Glu Leu Gln Asn Ile Phe Pro Ser Leu
450 455 460

Asp Glu Leu Ile Glu Val His Ser Leu Phe Leu Asp Arg Leu Met Lys
465 470 475 480

Arg Arg Gln Glu Ser Gly Tyr Leu Ile Glu Glu Ile Gly Asp Val Leu
485 490 495

Leu Ala Arg Phe Asp Gly Ala Glu Gly Ser Trp Phe Gln Lys Ile Ser
500 505 510

Ser Arg Phe Cys Ser Arg Gln Ser Phe Ala Leu Glu Gln Leu Lys Ala
515 520 525

Lys Gln Arg Lys Asp Pro Arg Phe Cys Ala Phe Val Gln Glu Ala Glu
530 535 540

Ser Arg Pro Arg Cys Arg Arg Leu Gln Leu Lys Asp Met Ile Pro Thr
 545 550 555 560
 Glu Met Gln Arg Leu Thr Lys Tyr Pro Leu Leu Leu Gln Ser Ile Gly

565 570 575
 Gln Asn Thr Glu Glu Pro Thr Glu Arg Glu Lys Val Glu Leu Ala Ala
 580 585 590

Glu Cys Cys Arg Glu Ile Leu His His Val Asn Gln Ala Val Arg Asp
 595 600 605

Met Glu Asp Leu Leu Arg Leu Lys Asp Tyr Gln Arg Arg Leu Asp Leu
 610 615 620

Ser His Leu Arg Gln Ser Ser Asp Pro Met Leu Ser Glu Phe Lys Asn
 625 630 635 640

Leu Asp Ile Thr Lys Lys Lys Leu Val His Glu Gly Pro Leu Thr Trp
 645 650 655

Arg Val Thr Lys Asp Lys Ala Val Glu Val His Val Leu Leu Leu Asp
 660 665 670

Asp Leu Leu Leu Leu Leu Gln Arg Gln Asp Glu Arg Leu Leu Leu Lys
 675 680 685

Ser His Ser Arg Thr Leu Thr Pro Thr Pro Asp Gly Lys Thr Met Leu
 690 695 700

Arg Pro Val Leu Arg Leu Thr Ser Ala Met Thr Arg Glu Val Ala Thr

705 710 715 720
 Asp His Lys Ala Phe Tyr Val Leu Phe Thr Trp Asp Gln Glu Ala Gln
 725 730 735

Ile Tyr Glu Leu Val Ala Gln Thr Val Ser Glu Arg Lys Asn Trp Cys
 740 745 750

Ala Leu Ile Thr Glu Thr Ala Gly Ser Leu Lys Val Pro Ala Pro Ala
 755 760 765

Ser Arg Pro Lys Pro Arg Pro Ser Pro Ser Ser Thr Arg Glu Pro Leu
 770 775 780

Leu Ser Ser Ser Glu Asn Gly Asn Gly Gly Arg Glu Thr Ser Pro Ala

785					790					795					800	
Asp	Ala	Arg	Thr	Glu	Arg	Ile	Leu	Ser	Asp	Leu	Leu	Pro	Phe	Cys	Arg	
					805					810					815	
Pro	Gly	Pro	Glu	Gly	Gln	Leu	Ala	Ala	Thr	Ala	Leu	Arg	Lys	Val	Leu	
					820					825					830	
Ser	Leu	Lys	Gln	Leu	Leu	Phe	Pro	Ala	Glu	Glu	Asp	Asn	Gly	Ala	Gly	
					835					840					845	
Pro	Pro	Arg	Asp	Gly	Asp	Gly	Val	Pro	Gly	Gly	Gly	Pro	Leu	Ser	Pro	

850				855				860							
Ala	Arg	Thr	Gln	Glu	Ile	Gln	Glu	Asn	Leu	Leu	Ser	Leu	Glu	Glu	Thr
865				870				875				880			
Met	Lys	Gln	Leu	Glu	Glu	Leu	Glu	Glu	Glu	Phe	Cys	Arg	Leu	Arg	Pro
885				890				895							
Leu	Leu	Ser	Gln	Leu	Gly	Gly	Asn	Ser	Val	Pro	Gln	Pro	Gly	Cys	Thr
900				905				910							

<210> 24

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

 $\langle 220 \rangle$

223> Synthetic peptide linker

<400> 24

Arg Leu Lys Leu Pro Ala Thr

1 5

<210> 25

<211> 580

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Met Arg Gly Gly His Lys Gly Gly Arg Cys Ala Cys Pro Arg Val Ile

1 5 10 15

Arg Lys Val Leu Ala Lys Cys Gly Cys Cys Phe Ala Arg Gly Gly Arg

20 25 30

Glu Ser Tyr Ser Ile Ala Gly Ser Glu Gly Ser Ile Ser Ala Ser Ala

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

Ile Lys Pro Val Gln Arg Ile Met Lys Tyr Gln Leu Leu Leu Lys Asp
290 295 300

Phe Leu Lys Tyr Tyr Asn Arg Ala Gly Met Asp Thr Ala Asp Leu Glu
305 310 315 320

Gln Ala Val Glu Val Met Cys Phe Val Pro Lys Arg Cys Asn Asp Met
325 330 335

Met Thr Leu Gly Arg Leu Arg Gly Phe Glu Gly Lys Leu Thr Ala Gln
340 345 350

Gly Lys Leu Leu Gly Gln Asp Thr Phe Trp Val Thr Glu Pro Glu Ala
355 360 365

Gly Gly Leu Leu Ser Ser Arg Gly Arg Glu Arg Arg Val Phe Leu Phe
370 375 380

Glu Gln Ile Ile Ile Phe Ser Glu Ala Leu Gly Gly Gly Val Arg Gly
385 390 395 400

Gly Thr Gln Pro Gly Tyr Val Tyr Lys Asn Ser Ile Lys Val Ser Cys
405 410 415

Leu Gly Leu Glu Gly Asn Leu Gln Gly Asp Pro Cys Arg Phe Ala Leu
420 425 430

Thr Ser Arg Gly Pro Glu Gly Gly Ile Gln Arg Tyr Val Leu Gln Ala
435 440 445

Ala Asp Pro Ala Ile Ser Gln Ala Trp Ile Lys His Val Ala Gln Ile
450 455 460

Leu Glu Ser Gln Arg Asp Phe Leu Asn Ala Leu Gln Ser Pro Ile Glu
465 470 475 480

Tyr Gln Arg Arg Glu Ser Gln Thr Asn Ser Leu Gly Arg Pro Arg Gly
485 490 495

Pro Gly Val Gly Ser Pro Gly Arg Ile Gln Leu Gly Asp Gln Ala Gln
500 505 510

Gly Ser Thr His Thr Pro Ile Asn Gly Ser Leu Pro Ser Leu Leu Leu
515 520 525

Ser Pro Lys Gly Glu Val Ala Arg Ala Leu Leu Pro Leu Asp Lys Gln
530 535 540

Ala Leu Gly Asp Ile Pro Gln Ala Pro His Asp Ser Pro Pro Val Ser

545 550 555 560

Pro Thr Pro Lys Thr Pro Pro Cys Gln Ala Arg Leu Ala Lys Leu Asp

565 570 575

Glu Asp Glu Leu

580

<210> 26

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Syntehtic peptide linker

<400> 26

Ala Ser Gly Ser Ala Gly Thr Gly Gly Arg Ala Ile Asp Ile Lys Leu

1 5 10 15

Pro Ala Thr

<210> 27

<211> 689

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Met Ala Asp Leu Glu Ala Val Leu Ala Asp Val Ser Tyr Leu Met Ala

1 5 10 15

Met Glu Lys Ser Lys Ala Thr Pro Ala Ala Arg Ala Ser Lys Lys Ile

20 25 30

Leu Leu Pro Glu Pro Ser Ile Arg Ser Val Met Gln Lys Tyr Leu Glu

35 40 45

Asp Arg Gly Glu Val Thr Phe Glu Lys Ile Phe Ser Gln Lys Leu Gly

50 55 60

Tyr Leu Leu Phe Arg Asp Phe Cys Leu Asn His Leu Glu Glu Ala Arg

65 70 75 80

Pro Leu Val Glu Phe Tyr Glu Glu Ile Lys Lys Tyr Glu Lys Leu Glu

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

Gly Leu Ala Cys Asp Phe Ser Lys Lys Lys Pro His Ala Ser Val Gly

340 345 350
Thr His Gly Tyr Met Ala Pro Glu Val Leu Gln Lys Gly Val Ala Tyr

355 360 365
Asp Ser Ser Ala Asp Trp Phe Ser Leu Gly Cys Met Leu Phe Lys Leu

370 375 380
Leu Arg Gly His Ser Pro Phe Arg Gln His Lys Thr Lys Asp Lys His

385 390 395 400
Glu Ile Asp Arg Met Thr Leu Thr Met Ala Val Glu Leu Pro Asp Ser

405 410 415

Phe Ser Pro Glu Leu Arg Ser Leu Leu Glu Gly Leu Leu Gln Arg Asp

420 425 430
Val Asn Arg Arg Leu Gly Cys Leu Gly Arg Gly Ala Gln Glu Val Lys

435 440 445
Glu Ser Pro Phe Phe Arg Ser Leu Asp Trp Gln Met Val Phe Leu Gln

450 455 460
Lys Tyr Pro Pro Pro Leu Ile Pro Pro Arg Gly Glu Val Asn Ala Ala

465 470 475 480
Asp Ala Phe Asp Ile Gly Ser Phe Asp Glu Glu Asp Thr Lys Gly Ile

485 490 495
Lys Leu Leu Asp Ser Asp Gln Glu Leu Tyr Arg Asn Phe Pro Leu Thr

500 505 510
Ile Ser Glu Arg Trp Gln Gln Glu Val Ala Glu Thr Val Phe Asp Thr

515 520 525
Ile Asn Ala Glu Thr Asp Arg Leu Glu Ala Arg Lys Lys Ala Lys Asn

530 535 540
Lys Gln Leu Gly His Glu Glu Asp Tyr Ala Leu Gly Lys Asp Cys Ile

545 550 555 560

Met His Gly Tyr Met Ser Lys Met Gly Asn Pro Phe Leu Thr Gln Trp

565 570 575
Gln Arg Arg Tyr Phe Tyr Leu Phe Pro Asn Arg Leu Glu Trp Arg Gly

580 585 590
 Glu Gly Glu Ala Pro Gln Ser Leu Leu Thr Met Glu Glu Ile Gln Ser
 595 600 605
 Val Glu Glu Thr Gln Ile Lys Glu Arg Lys Cys Leu Leu Leu Lys Ile
 610 615 620
 Arg Gly Gly Lys Gln Phe Ile Leu Gln Cys Asp Ser Asp Pro Glu Leu

 625 630 635 640
 Val Gln Trp Lys Lys Glu Leu Arg Asp Ala Tyr Arg Glu Ala Gln Gln
 645 650 655
 Leu Val Gln Arg Val Pro Lys Met Lys Asn Lys Pro Arg Ser Pro Val
 660 665 670
 Val Glu Leu Ser Lys Val Pro Leu Val Gln Arg Gly Ser Ala Asn Gly
 675 680 685
 Leu

<210> 28
 <211> 350
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 28
 Met Gly Cys Thr Val Ser Ala Glu Asp Lys Ala Ala Ala Glu Arg Ser
 1 5 10 15
 Lys Met Ile Asp Lys Asn Leu Arg Glu Asp Gly Glu Lys Ala Ala Arg
 20 25 30
 Glu Val Lys Leu Leu Leu Leu Gly Ala Gly Glu Ser Gly Lys Ser Thr
 35 40 45
 Ile Val Lys Gln Met Lys Ile Ile His Glu Asp Gly Tyr Ser Glu Glu
 50 55 60
 Glu Cys Arg Gln Tyr Arg Ala Val Val Tyr Ser Asn Thr Ile Gln Ser

 65 70 75 80
 Ile Met Ala Ile Val Lys Ala Met Gly Asn Leu Gln Ile Asp Phe Ala
 85 90 95

Asp Pro Ser Arg Ala Asp Asp Ala Arg Gln Leu Phe Ala Leu Ser Cys
 100 105 110
 Thr Ala Glu Glu Gln Gly Val Leu Pro Asp Asp Leu Ser Gly Val Ile
 115 120 125
 Arg Arg Leu Trp Ala Asp His Gly Val Gln Ala Cys Phe Gly Arg Ser
 130 135 140

 Arg Glu Tyr Gln Leu Asn Asp Ser Ala Ala Tyr Tyr Leu Asn Asp Leu
 145 150 155 160
 Glu Arg Ile Ala Gln Ser Asp Tyr Ile Pro Thr Gln Gln Asp Val Leu
 165 170 175
 Arg Thr Arg Val Lys Thr Thr Gly Ile Val Glu Thr His Phe Thr Phe
 180 185 190
 Lys Asp Leu His Phe Lys Met Phe Asp Val Gly Gly Gln Arg Ser Glu
 195 200 205
 Arg Lys Lys Trp Ile His Cys Phe Glu Gly Val Thr Ala Ile Ile Phe

 210 215 220
 Cys Val Ala Leu Ser Ala Tyr Asp Leu Val Leu Ala Glu Asp Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Asn Arg Met His Glu Ser Met Lys Leu Phe Asp Ser Ile Cys Asn
 245 250 255
 Asn Lys Trp Phe Thr Asp Thr Ser Ile Ile Leu Phe Leu Asn Lys Lys
 260 265 270
 Asp Leu Phe Glu Glu Lys Ile Thr His Ser Pro Leu Thr Ile Cys Phe
 275 280 285

 Pro Glu Tyr Thr Gly Ala Asn Lys Tyr Asp Glu Ala Ala Ser Tyr Ile
 290 295 300
 Gln Ser Lys Phe Glu Asp Leu Asn Lys Arg Lys Asp Thr Lys Glu Ile
 305 310 315 320
 Tyr Thr His Phe Thr Cys Ala Thr Asp Thr Lys Asn Val Gln Phe Val
 325 330 335
 Phe Asp Ala Val Thr Asp Val Ile Ile Lys Asn Asn Leu Lys
 340 345 350

<210> 29

<211> 353

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Met Gly Cys Thr Val Ser Ala Glu Asp Lys Ala Ala Ala Glu Arg Ser

1 5 10 15

Lys Met Ile Asp Lys Asn Leu Arg Glu Asp Gly Glu Lys Ala Ala Arg

20 25 30

Glu Val Lys Leu Leu Leu Leu Gly Ala Gly Glu Ser Gly Lys Ser Thr

35 40 45

Ile Val Lys Gln Met Lys Ile Ile His Glu Asp Gly Tyr Ser Glu Glu

50 55 60

Glu Cys Arg Gln Tyr Arg Ala Val Val Tyr Ser Asn Thr Ile Gln Ser

65 70 75 80

Ile Met Ala Ile Val Lys Ala Met Gly Asn Leu Gln Ile Asp Phe Ala

85 90 95

Asp Pro Ser Arg Ala Asp Asp Ala Arg Gln Leu Phe Ala Leu Ser Cys

100 105 110

Thr Ala Glu Glu Gln Gly Val Leu Pro Asp Asp Leu Ser Gly Val Ile

115 120 125

Arg Arg Leu Trp Ala Asp His Gly Val Gln Ala Cys Phe Gly Arg Ser

130 135 140

Arg Glu Tyr Gln Leu Asn Asp Ser Ala Ala Tyr Tyr Leu Asn Asp Leu

145 150 155 160

Glu Arg Ile Ala Gln Ser Asp Tyr Ile Pro Thr Gln Gln Asp Val Leu

165 170 175

Arg Thr Arg Val Lys Thr Thr Gly Ile Val Glu Thr His Phe Thr Phe

180 185 190

Lys Asp Leu His Phe Lys Met Phe Asp Val Gly Gly Gln Arg Ser Glu

195 200 205

Arg Lys Lys Trp Ile His Cys Phe Glu Gly Val Thr Ala Ile Ile Phe
 210 215 220
 Cys Val Ala Leu Ser Ala Tyr Asp Leu Val Leu Ala Glu Asp Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Asn Arg Met His Glu Ser Met Lys Leu Phe Asp Ser Ile Cys Asn
 245 250 255
 Asn Lys Trp Phe Thr Asp Thr Ser Ile Ile Leu Phe Leu Asn Lys Lys
 260 265 270
 Asp Leu Phe Glu Glu Lys Ile Thr His Ser Pro Leu Thr Ile Cys Phe
 275 280 285
 Pro Glu Tyr Thr Gly Ala Asn Lys Tyr Asp Glu Ala Ala Ser Tyr Ile
 290 295 300
 Gln Ser Lys Phe Glu Asp Leu Asn Lys Arg Lys Asp Thr Lys Glu Ile
 305 310 315 320
 Tyr Thr His Phe Thr Cys Ala Thr Asp Thr Lys Asn Val Gln Phe Val
 325 330 335
 Phe Asp Ala Val Thr Asp Val Ile Ile Lys Asn Asn Leu Lys Asp Cys
 340 345 350

Gly

<210> 30
 <211> 355
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 30

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

50 55 60
 Glu Cys Arg Gln Tyr Arg Ala Val Val Tyr Ser Asn Thr Ile Gln Ser
 65 70 75 80
 Ile Met Ala Ile Val Lys Ala Met Gly Asn Leu Gln Ile Asp Phe Ala
 85 90 95
 Asp Pro Ser Arg Ala Asp Asp Ala Arg Gln Leu Phe Ala Leu Ser Cys
 100 105 110
 Thr Ala Glu Glu Gln Gly Val Leu Pro Asp Asp Leu Ser Gly Val Ile
 115 120 125

 Arg Arg Leu Trp Ala Asp His Gly Val Gln Ala Cys Phe Gly Arg Ser
 130 135 140
 Arg Glu Tyr Gln Leu Asn Asp Ser Ala Ala Tyr Tyr Leu Asn Asp Leu
 145 150 155 160
 Glu Arg Ile Ala Gln Ser Asp Tyr Ile Pro Thr Gln Gln Asp Val Leu
 165 170 175
 Arg Thr Arg Val Lys Thr Thr Gly Ile Val Glu Thr His Phe Thr Phe
 180 185 190
 Lys Asp Leu His Phe Lys Met Phe Asp Val Gly Gly Gln Arg Ser Glu

 195 200 205
 Arg Lys Lys Trp Ile His Cys Phe Glu Gly Val Thr Ala Ile Ile Phe
 210 215 220
 Cys Val Ala Leu Ser Ala Tyr Asp Leu Val Leu Ala Glu Asp Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Asn Arg Met His Glu Ser Met Lys Leu Phe Asp Ser Ile Cys Asn
 245 250 255
 Asn Lys Trp Phe Thr Asp Thr Ser Ile Ile Leu Phe Leu Asn Lys Lys
 260 265 270

 Asp Leu Phe Glu Glu Lys Ile Thr His Ser Pro Leu Thr Ile Cys Phe
 275 280 285
 Pro Glu Tyr Thr Gly Ala Asn Lys Tyr Asp Glu Ala Ala Ser Tyr Ile
 290 295 300
 Gln Ser Lys Phe Glu Asp Leu Asn Lys Arg Lys Asp Thr Lys Glu Ile

305 310 315 320
 Tyr Thr His Phe Thr Cys Ala Thr Asp Thr Lys Asn Val Gln Phe Val
 325 330 335
 Phe Asp Ala Val Thr Asp Val Ile Ile Lys Asn Asn Gly Lys Asp Cys

 340 345 350
 Gly Leu Phe
 355
 <210> 31
 <211> 355
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 31
 Met Gly Cys Thr Val Ser Ala Glu Asp Lys Ala Ala Ala Glu Arg Ser
 1 5 10 15
 Lys Met Ile Asp Lys Asn Leu Arg Glu Asp Gly Glu Lys Ala Ala Arg
 20 25 30
 Glu Val Lys Leu Leu Leu Leu Gly Ala Gly Glu Ser Gly Lys Ser Thr
 35 40 45

 Ile Val Lys Gln Met Lys Ile Ile His Glu Asp Gly Tyr Ser Glu Glu
 50 55 60
 Glu Cys Arg Gln Tyr Arg Ala Val Val Tyr Ser Asn Thr Ile Gln Ser
 65 70 75 80
 Ile Met Ala Ile Val Lys Ala Met Gly Asn Leu Gln Ile Asp Phe Ala
 85 90 95
 Asp Pro Ser Arg Ala Asp Asp Ala Arg Gln Leu Phe Ala Leu Ser Cys
 100 105 110
 Thr Ala Glu Glu Gln Gly Val Leu Pro Asp Asp Leu Ser Gly Val Ile

 115 120 125
 Arg Arg Leu Trp Ala Asp His Gly Val Gln Ala Cys Phe Gly Arg Ser
 130 135 140
 Arg Glu Tyr Gln Leu Asn Asp Ser Ala Ala Tyr Tyr Leu Asn Asp Leu
 145 150 155 160

Glu Arg Ile Ala Gln Ser Asp Tyr Ile Pro Thr Gln Gln Asp Val Leu
165 170 175

Arg Thr Arg Val Lys Thr Thr Gly Ile Val Glu Thr His Phe Thr Phe
180 185 190

Lys Asp Leu His Phe Lys Met Phe Asp Val Gly Gly Gln Arg Ser Glu
195 200 205

Arg Lys Lys Trp Ile His Cys Phe Glu Gly Val Thr Ala Ile Ile Phe
210 215 220

Cys Val Ala Leu Ser Ala Tyr Asp Leu Val Leu Ala Glu Asp Glu Glu
225 230 235 240

Met Asn Arg Met His Glu Ser Met Lys Leu Phe Asp Ser Ile Cys Asn
245 250 255

Asn Lys Trp Phe Thr Asp Thr Ser Ile Ile Leu Phe Leu Asn Lys Lys
260 265 270

Asp Leu Phe Glu Glu Lys Ile Thr His Ser Pro Leu Thr Ile Cys Phe
275 280 285

Pro Glu Tyr Thr Gly Ala Asn Lys Tyr Asp Glu Ala Ala Ser Tyr Ile
290 295 300

Gln Ser Lys Phe Glu Asp Leu Asn Lys Arg Lys Asp Thr Lys Glu Ile
305 310 315 320

Tyr Thr His Phe Thr Cys Ala Thr Asp Thr Lys Asn Val Gln Phe Val
325 330 335

Phe Asp Ala Val Thr Asp Val Ile Ile Lys Asn Asn Leu Lys Asp Cys
340 345 350

Gly Gly Phe
355

<210> 32

<211> 355

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

Met Gly Cys Thr Val Ser Ala Glu Asp Lys Ala Ala Ala Glu Arg Ser

1 5 10 15
 Lys Met Ile Asp Lys Asn Leu Arg Glu Asp Gly Glu Lys Ala Ala Arg
 20 25 30
 Glu Val Lys Leu Leu Leu Leu Gly Ala Gly Glu Ser Gly Lys Ser Thr
 35 40 45
 Ile Val Lys Gln Met Lys Ile Ile His Glu Asp Gly Tyr Ser Glu Glu
 50 55 60
 Glu Cys Arg Gln Tyr Arg Ala Val Val Tyr Ser Asn Thr Ile Gln Ser
 65 70 75 80
 Ile Met Ala Ile Val Lys Ala Met Gly Asn Leu Gln Ile Asp Phe Ala
 85 90 95
 Asp Pro Ser Arg Ala Asp Asp Ala Arg Gln Leu Phe Ala Leu Ser Cys
 100 105 110

 Thr Ala Glu Glu Gln Gly Val Leu Pro Asp Asp Leu Ser Gly Val Ile
 115 120 125
 Arg Arg Leu Trp Ala Asp His Gly Val Gln Ala Cys Phe Gly Arg Ser
 130 135 140
 Arg Glu Tyr Gln Leu Asn Asp Ser Ala Ala Tyr Tyr Leu Asn Asp Leu
 145 150 155 160
 Glu Arg Ile Ala Gln Ser Asp Tyr Ile Pro Thr Gln Gln Asp Val Leu
 165 170 175
 Arg Thr Arg Val Lys Thr Thr Gly Ile Val Glu Thr His Phe Thr Phe

 180 185 190
 Lys Asp Leu His Phe Lys Met Phe Asp Val Gly Gly Gln Arg Ser Glu
 195 200 205
 Arg Lys Lys Trp Ile His Cys Phe Glu Gly Val Thr Ala Ile Ile Phe
 210 215 220
 Cys Val Ala Leu Ser Ala Tyr Asp Leu Val Leu Ala Glu Asp Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Asn Arg Met His Glu Ser Met Lys Leu Phe Asp Ser Ile Cys Asn
 245 250 255

Asn Lys Trp Phe Thr Asp Thr Ser Ile Ile Leu Phe Leu Asn Lys Lys
 260 265 270
 Asp Leu Phe Glu Glu Lys Ile Thr His Ser Pro Leu Thr Ile Cys Phe
 275 280 285
 Pro Glu Tyr Thr Gly Ala Asn Lys Tyr Asp Glu Ala Ala Ser Tyr Ile
 290 295 300
 Gln Ser Lys Phe Glu Asp Leu Asn Lys Arg Lys Asp Thr Lys Glu Ile
 305 310 315 320
 Tyr Thr His Phe Thr Cys Ala Thr Asp Thr Lys Asn Val Gln Phe Val
 325 330 335
 Phe Asp Ala Val Thr Asp Val Ile Ile Lys Asn Asn Leu Lys Asp Cys
 340 345 350
 Gly Asp Phe
 355
 <210> 33
 <211> 355
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 33
 Met Gly Cys Thr Val Ser Ala Glu Asp Lys Ala Ala Ala Glu Arg Ser
 1 5 10 15
 Lys Met Ile Asp Lys Asn Leu Arg Glu Asp Gly Glu Lys Ala Ala Arg
 20 25 30
 Glu Val Lys Leu Leu Leu Leu Gly Ala Gly Glu Ser Gly Lys Ser Thr
 35 40 45
 Ile Val Lys Gln Met Lys Ile Ile His Glu Asp Gly Tyr Ser Glu Glu
 50 55 60
 Glu Cys Arg Gln Tyr Arg Ala Val Val Tyr Ser Asn Thr Ile Gln Ser
 65 70 75 80
 Ile Met Ala Ile Val Lys Ala Met Gly Asn Leu Gln Ile Asp Phe Ala
 85 90 95
 Asp Pro Ser Arg Ala Asp Asp Ala Arg Gln Leu Phe Ala Leu Ser Cys

100	105	110	
Thr Ala Glu Glu Gln Gly Val Leu Pro Asp Asp Leu Ser Gly Val Ile			
115	120	125	
Arg Arg Leu Trp Ala Asp His Gly Val Gln Ala Cys Phe Gly Arg Ser			
130	135	140	
Arg Glu Tyr Gln Leu Asn Asp Ser Ala Ala Tyr Tyr Leu Asn Asp Leu			
145	150	155	160
Glu Arg Ile Ala Gln Ser Asp Tyr Ile Pro Thr Gln Gln Asp Val Leu			
165	170	175	
Arg Thr Arg Val Lys Thr Thr Gly Ile Val Glu Thr His Phe Thr Phe			
180	185	190	
Lys Asp Leu His Phe Lys Met Phe Asp Val Gly Gly Gln Arg Ser Glu			
195	200	205	
Arg Lys Lys Trp Ile His Cys Phe Glu Gly Val Thr Ala Ile Ile Phe			
210	215	220	
Cys Val Ala Leu Ser Ala Tyr Asp Leu Val Leu Ala Glu Asp Glu Glu			
225	230	235	240
Met Asn Arg Met His Glu Ser Met Lys Leu Phe Asp Ser Ile Cys Asn			
245	250	255	
Asn Lys Trp Phe Thr Asp Thr Ser Ile Ile Leu Phe Leu Asn Lys Lys			
260	265	270	
Asp Leu Phe Glu Glu Lys Ile Thr His Ser Pro Leu Thr Ile Cys Phe			
275	280	285	
Pro Glu Tyr Thr Gly Ala Asn Lys Tyr Asp Glu Ala Ala Ser Tyr Ile			
290	295	300	
Gln Ser Lys Phe Glu Asp Leu Asn Lys Arg Lys Asp Thr Lys Glu Ile			
305	310	315	320
Tyr Thr His Phe Thr Cys Ala Thr Asp Thr Lys Asn Val Gln Phe Val			
325	330	335	
Phe Asp Ala Val Thr Asp Val Ile Ile Lys Asn Asn Leu Lys Asp Cys			
340	345	350	
Gly Pro Phe			

355

<210> 34

<211> 355

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Met Gly Cys Thr Val Ser Ala Glu Asp Lys Ala Ala Ala Glu Arg Ser

1 5 10 15

Lys Met Ile Asp Lys Asn Leu Arg Glu Asp Gly Glu Lys Ala Ala Arg

20 25 30

Glu Val Lys Leu Leu Leu Gly Ala Gly Glu Ser Gly Lys Ser Thr

35 40 45

Ile Val Lys Gln Met Lys Ile Ile His Glu Asp Gly Tyr Ser Glu Glu

50 55 60

Glu Cys Arg Gln Tyr Arg Ala Val Val Tyr Ser Asn Thr Ile Gln Ser

65 70 75 80

Ile Met Ala Ile Val Lys Ala Met Gly Asn Leu Gln Ile Asp Phe Ala

85 90 95

Asp Pro Ser Arg Ala Asp Asp Ala Arg Gln Leu Phe Ala Leu Ser Cys

100 105 110

Thr Ala Glu Glu Gln Gly Val Leu Pro Asp Asp Leu Ser Gly Val Ile

115 120 125

Arg Arg Leu Trp Ala Asp His Gly Val Gln Ala Cys Phe Gly Arg Ser

130 135 140

Arg Glu Tyr Gln Leu Asn Asp Ser Ala Ala Tyr Tyr Leu Asn Asp Leu

145 150 155 160

Glu Arg Ile Ala Gln Ser Asp Tyr Ile Pro Thr Gln Gln Asp Val Leu

165 170 175

Arg Thr Arg Val Lys Thr Thr Gly Ile Val Glu Thr His Phe Thr Phe

180 185 190

Lys Asp Leu His Phe Lys Met Phe Asp Val Gly Gly Gln Arg Ser Glu

195 200 205

Arg Lys Lys Trp Ile His Cys Phe Glu Gly Val Thr Ala Ile Ile Phe
 210 215 220
 Cys Val Ala Leu Ser Ala Tyr Asp Leu Val Leu Ala Glu Asp Glu Glu
 225 230 235 240

Met Asn Arg Met His Glu Ser Met Lys Leu Phe Asp Ser Ile Cys Asn
 245 250 255
 Asn Lys Trp Phe Thr Asp Thr Ser Ile Ile Leu Phe Leu Asn Lys Lys
 260 265 270
 Asp Leu Phe Glu Glu Lys Ile Thr His Ser Pro Leu Thr Ile Cys Phe
 275 280 285
 Pro Glu Tyr Thr Gly Ala Asn Lys Tyr Asp Glu Ala Ala Ser Tyr Ile
 290 295 300
 Gln Ser Lys Phe Glu Asp Leu Asn Lys Arg Lys Asp Thr Lys Glu Ile

305 310 315 320
 Tyr Thr His Phe Thr Cys Ala Thr Asp Thr Lys Asn Val Gln Phe Val
 325 330 335
 Phe Asp Ala Val Thr Asp Val Ile Ile Lys Asn Asn Leu Lys Asp Cys
 340 345 350

Gly Arg Phe

355

<210> 35

<211> 354

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Met Gly Cys Thr Leu Ser Ala Glu Glu Arg Ala Ala Leu Glu Arg Ser
 1 5 10 15

Lys Ala Ile Glu Lys Asn Leu Lys Glu Asp Gly Ile Ser Ala Ala Lys
 20 25 30
 Asp Val Lys Leu Leu Leu Leu Gly Ala Gly Glu Ser Gly Lys Ser Thr
 35 40 45

Ile Val Lys Gln Met Lys Ile Ile His Glu Asp Gly Phe Ser Gly Glu

50 55 60
 Asp Val Lys Gln Tyr Lys Pro Val Val Tyr Ser Asn Thr Ile Gln Ser
 65 70 75 80
 Leu Ala Ala Ile Val Arg Ala Met Asp Thr Leu Gly Ile Glu Tyr Gly

 85 90 95
 Asp Lys Glu Arg Lys Ala Asp Ala Lys Met Val Cys Asp Val Val Ser
 100 105 110
 Arg Met Glu Asp Thr Glu Pro Phe Ser Ala Glu Leu Leu Ser Ala Met
 115 120 125
 Met Arg Leu Trp Gly Asp Ser Gly Ile Gln Glu Cys Phe Asn Arg Ser
 130 135 140
 Arg Glu Tyr Gln Leu Asn Asp Ser Ala Lys Tyr Tyr Leu Asp Ser Leu
 145 150 155 160

 Asp Arg Ile Gly Ala Ala Asp Tyr Gln Pro Thr Glu Gln Asp Ile Leu
 165 170 175
 Arg Thr Arg Val Lys Thr Thr Gly Ile Val Glu Thr His Phe Thr Phe
 180 185 190
 Lys Asn Leu His Phe Arg Leu Phe Asp Val Gly Gly Gln Arg Ser Glu
 195 200 205
 Arg Lys Lys Trp Ile His Cys Phe Glu Asp Val Thr Ala Ile Ile Phe
 210 215 220
 Cys Val Ala Leu Ser Gly Tyr Asp Gln Val Leu His Glu Asp Glu Thr

 225 230 235 240
 Thr Asn Arg Met His Glu Ser Leu Lys Leu Phe Asp Ser Ile Cys Asn
 245 250 255
 Asn Lys Trp Phe Thr Asp Thr Ser Ile Ile Leu Phe Leu Asn Lys Lys
 260 265 270
 Asp Ile Phe Glu Glu Lys Ile Lys Lys Ser Pro Leu Thr Ile Cys Phe
 275 280 285
 Pro Glu Tyr Thr Gly Pro Ser Ala Phe Thr Glu Ala Val Ala Tyr Ile
 290 295 300

Gln Ala Gln Tyr Glu Ser Lys Asn Lys Ser Ala His Lys Glu Ile Tyr
 305 310 315 320
 Thr His Val Thr Cys Ala Thr Asp Thr Asn Asn Ile Gln Phe Val Phe
 325 330 335
 Asp Ala Val Thr Asp Val Ile Ile Ala Lys Asn Leu Arg Gly Cys Gly
 340 345 350
 Gly Tyr

<210> 36
 <211> 349
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 36

Met Gly Cys Thr Leu Ser Ala Glu Glu Arg Ala Ala Leu Glu Arg Ser

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

Leu Ala Ala Ile Val Arg Ala Met Asp Thr Leu Gly Ile Glu Tyr Gly
 85 90 95
 Asp Lys Glu Arg Lys Ala Asp Ala Lys Met Val Cys Asp Val Val Ser
 100 105 110
 Arg Met Glu Asp Thr Glu Pro Phe Ser Ala Glu Leu Leu Ser Ala Met
 115 120 125
 Met Arg Leu Trp Gly Asp Ser Gly Ile Gln Glu Cys Phe Asn Arg Ser
 130 135 140
 Arg Glu Tyr Gln Leu Asn Asp Ser Ala Lys Tyr Tyr Leu Asp Ser Leu

145 150 155 160
 Asp Arg Ile Gly Ala Ala Asp Tyr Gln Pro Thr Glu Gln Asp Ile Leu
 165 170 175
 Arg Thr Arg Val Lys Thr Thr Gly Ile Val Glu Thr His Phe Thr Phe
 180 185 190
 Lys Asn Leu His Phe Arg Leu Phe Asp Val Gly Gly Gln Arg Ser Glu
 195 200 205
 Arg Lys Lys Trp Ile His Cys Phe Glu Asp Val Thr Ala Ile Ile Phe
 210 215 220

 Cys Val Ala Leu Ser Gly Tyr Asp Gln Val Leu His Glu Asp Glu Thr
 225 230 235 240
 Thr Asn Arg Met His Glu Ser Leu Lys Leu Phe Asp Ser Ile Cys Asn
 245 250 255
 Asn Lys Trp Phe Thr Asp Thr Ser Ile Ile Leu Phe Leu Asn Lys Lys
 260 265 270
 Asp Ile Phe Glu Glu Lys Ile Lys Lys Ser Pro Leu Thr Ile Cys Phe
 275 280 285
 Pro Glu Tyr Thr Gly Pro Ser Ala Phe Thr Glu Ala Val Ala Tyr Ile

 290 295 300
 Gln Ala Gln Tyr Glu Ser Lys Asn Lys Ser Ala His Lys Glu Ile Tyr
 305 310 315 320
 Thr His Val Thr Cys Ala Thr Asp Thr Asn Asn Ile Gln Phe Val Phe
 325 330 335
 Asp Ala Val Thr Asp Val Ile Ile Ala Lys Asn Leu Arg
 340 345

 <210> 37
 <211> 311
 <212> PRT
 <213> Renilla reniformis
 <400> 37
 Met Thr Ser Lys Val Tyr Asp Pro Glu Gln Arg Lys Arg Met Ile Thr

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

 Met Gly Lys Ser Gly Lys Ser Gly Asn Gly Ser Tyr Arg Leu Leu Asp
 85 90 95
 His Tyr Lys Tyr Leu Thr Ala Trp Phe Glu Leu Leu Asn Leu Pro Lys
 100 105 110
 Lys Ile Ile Phe Val Gly His Asp Trp Gly Ala Ala Leu Ala Phe His
 115 120 125
 Tyr Ser Tyr Glu His Gln Asp Lys Ile Lys Ala Ile Val His Ala Glu
 130 135 140
 Ser Val Val Asp Val Ile Glu Ser Trp Asp Glu Trp Pro Asp Ile Glu

 145 150 155 160
 Glu Asp Ile Ala Leu Ile Lys Ser Glu Glu Gly Glu Lys Met Val Leu
 165 170 175
 Glu Asn Asn Phe Phe Val Glu Thr Val Leu Pro Ser Lys Ile Met Arg
 180 185 190
 Lys Leu Glu Pro Glu Glu Phe Ala Ala Tyr Leu Glu Pro Phe Lys Glu
 195 200 205
 Lys Gly Glu Val Arg Arg Pro Thr Leu Ser Trp Pro Arg Glu Ile Pro
 210 215 220

 Leu Val Lys Gly Gly Lys Pro Asp Val Val Gln Ile Val Arg Asn Tyr
 225 230 235 240
 Asn Ala Tyr Leu Arg Ala Ser Asp Asp Leu Pro Lys Met Phe Ile Glu
 245 250 255
 Ser Asp Pro Gly Phe Phe Ser Asn Ala Ile Val Glu Gly Ala Lys Lys
 260 265 270

Phe Pro Asn Thr Glu Phe Val Lys Val Lys Gly Leu His Phe Ser Gln
 275 280 285
 Glu Asp Ala Pro Asp Glu Met Gly Lys Tyr Ile Lys Ser Phe Val Glu
 290 295 300
 Arg Val Leu Lys Asn Glu Gln
 305 310
 <210> 38
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Renilla reniformis
 <400> 38
 Met Asp Leu Ala Lys Leu Gly Leu Lys Glu Val Met Pro Thr Lys Ile
 1 5 10 15
 Asn Leu Glu Gly Leu Val Gly Asp His Ala Phe Ser Met Glu Gly Val
 20 25 30
 Gly Glu Gly Asn Ile Leu Glu Gly Thr Gln Glu Val Lys Ile Ser Val
 35 40 45
 Thr Lys Gly Ala Pro Leu Pro Phe Ala Phe Asp Ile Val Ser Val Ala
 50 55 60
 Phe Ser Tyr Gly Asn Arg Ala Tyr Thr Gly Tyr Pro Glu Glu Ile Ser
 65 70 75 80
 Asp Tyr Phe Leu Gln Ser Phe Pro Glu Gly Phe Thr Tyr Glu Arg Asn
 85 90 95
 Ile Arg Tyr Gln Asp Gly Gly Thr Ala Ile Val Lys Ser Asp Ile Ser
 100 105 110
 Leu Glu Asp Gly Lys Phe Ile Val Asn Val Asp Phe Lys Ala Lys Asp
 115 120 125
 Leu Arg Arg Met Gly Pro Val Met Gln Gln Asp Ile Val Gly Met Gln
 130 135 140
 Pro Ser Tyr Glu Ser Met Tyr Thr Asn Val Thr Ser Val Ile Gly Glu
 145 150 155 160
 Cys Ile Ile Ala Phe Lys Leu Gln Thr Gly Lys His Phe Thr Tyr His

165 170 175
Met Arg Thr Val Tyr Lys Ser Lys Lys Pro Val Glu Thr Met Pro Leu

180 185 190
Tyr His Phe Ile Gln His Arg Leu Val Lys Thr Asn Val Asp Thr Ala

195 200 205
Ser Gly Tyr Val Val Gln His Glu Thr Ala Ile Ala Ala His Ser Thr

210 215 220
Ile Lys Lys Ile Glu Gly Ser Leu Pro

225 230

<210> 39

<211> 1539

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

Met Asp Ser Tyr Phe Lys Ala Ala Val Ser Asp Leu Asp Lys Leu Leu

1 5 10 15
Asp Asp Phe Glu Gln Asn Pro Asp Glu Gln Asp Tyr Leu Gln Asp Val

20 25 30
Gln Asn Ala Tyr Asp Ser Asn His Cys Ser Val Ser Ser Glu Leu Ala

35 40 45
Ser Ser Gln Arg Thr Ser Leu Leu Pro Lys Asp Gln Glu Cys Val Asn

50 55 60
Ser Cys Ala Ser Ser Glu Thr Ser Tyr Gly Thr Asn Glu Ser Ser Leu

65 70 75 80

Asn Glu Lys Thr Leu Lys Gly Leu Thr Ser Ile Gln Asn Glu Lys Asn

85 90 95
Val Thr Gly Leu Asp Leu Leu Ser Ser Val Asp Gly Gly Thr Ser Asp

100 105 110
Glu Ile Gln Pro Leu Tyr Met Gly Arg Cys Ser Lys Pro Ile Cys Asp

115 120 125
Leu Ile Ser Asp Met Gly Asn Leu Val His Ala Thr Asn Ser Glu Glu

130 135 140

Asp Ile Lys Lys Leu Leu Pro Asp Asp Phe Lys Ser Asn Ala Asp Ser

145 150 155 160

Leu Ile Gly Leu Asp Leu Ser Ser Val Ser Asp Thr Pro Cys Val Ser

165 170 175

Ser Thr Asp His Asp Ser Asp Thr Val Arg Glu Gln Gln Asn Asp Ile

180 185 190

Ser Ser Glu Leu Gln Asn Arg Glu Ile Gly Gly Ile Lys Glu Leu Gly

195 200 205

Ile Lys Val Asp Thr Thr Leu Ser Asp Ser Tyr Asn Tyr Ser Gly Thr

210 215 220

Glu Asn Leu Lys Asp Lys Lys Ile Phe Asn Gln Leu Glu Ser Ile Val

225 230 235 240

Asp Phe Asn Met Ser Ser Ala Leu Thr Arg Gln Ser Ser Lys Met Phe

245 250 255

His Ala Lys Asp Lys Leu Gln His Lys Ser Gln Pro Cys Gly Leu Leu

260 265 270

Lys Asp Val Gly Leu Val Lys Glu Glu Val Asp Val Ala Val Ile Thr

275 280 285

Ala Ala Glu Cys Leu Lys Glu Glu Gly Lys Thr Ser Ala Leu Thr Cys

290 295 300

Ser Leu Pro Lys Asn Glu Asp Leu Cys Leu Asn Asp Ser Asn Ser Arg

305 310 315 320

Asp Glu Asn Phe Lys Leu Pro Asp Phe Ser Phe Gln Glu Asp Lys Thr

325 330 335

Val Ile Lys Gln Ser Ala Gln Glu Asp Ser Lys Ser Leu Asp Leu Lys

340 345 350

Asp Asn Asp Val Ile Gln Asp Ser Ser Ser Ala Leu His Val Ser Ser

355 360 365

Lys Asp Val Pro Ser Ser Leu Ser Cys Leu Pro Ala Ser Gly Ser Met

370 375 380

Cys Gly Ser Leu Ile Glu Ser Lys Ala Arg Gly Asp Phe Leu Pro Gln

385 390 395 400
 His Glu His Lys Asp Asn Ile Gln Asp Ala Val Thr Ile His Glu Glu
 405 410 415
 Ile Gln Asn Ser Val Val Leu Gly Gly Glu Pro Phe Lys Glu Asn Asp
 420 425 430
 Leu Leu Lys Gln Glu Lys Cys Lys Ser Ile Leu Leu Gln Ser Leu Ile

 435 440 445
 Glu Gly Met Glu Asp Arg Lys Ile Asp Pro Asp Gln Thr Val Ile Arg
 450 455 460
 Ala Glu Ser Leu Asp Gly Gly Asp Thr Ser Ser Thr Val Val Glu Ser
 465 470 475 480
 Gln Glu Gly Leu Ser Gly Thr His Val Pro Glu Ser Ser Asp Cys Cys
 485 490 495
 Glu Gly Phe Ile Asn Thr Phe Ser Ser Asn Asp Met Asp Gly Gln Asp
 500 505 510

 Leu Asp Tyr Phe Asn Ile Asp Glu Gly Ala Lys Ser Gly Pro Leu Ile
 515 520 525
 Ser Asp Ala Glu Leu Asp Ala Phe Leu Thr Glu Gln Tyr Leu Gln Thr
 530 535 540
 Thr Asn Ile Lys Ser Phe Glu Glu Asn Val Asn Asp Ser Lys Ser Gln
 545 550 555 560
 Met Asn Gln Ile Asp Met Lys Gly Leu Asp Asp Gly Asn Ile Asn Asn
 565 570 575
 Ile Tyr Phe Asn Ala Glu Ala Gly Ala Ile Gly Glu Ser His Gly Ile

 580 585 590
 Asn Ile Ile Cys Glu Ile Val Asp Lys Gln Asn Thr Ile Glu Asn Gly
 595 600 605
 Leu Ser Leu Gly Glu Lys Ser Thr Ile Pro Val Gln Gln Gly Leu Pro
 610 615 620
 Thr Ser Lys Ser Glu Ile Thr Asn Gln Leu Ser Val Ser Asp Ile Asn
 625 630 635 640
 Ser Gln Ser Val Gly Gly Ala Arg Pro Lys Gln Leu Phe Ser Leu Pro

				645								650								655			
Ser	Arg	Thr	Arg	Ser	Ser	Lys	Asp	Leu	Asn	Lys	Pro	Asp	Val	Pro	Asp								
				660				665				670											
Thr	Ile	Glu	Ser	Glu	Pro	Ser	Thr	Ala	Asp	Thr	Val	Val	Pro	Ile	Thr								
				675				680				685											
Cys	Ala	Ile	Asp	Ser	Thr	Ala	Asp	Pro	Gln	Val	Ser	Phe	Asn	Ser	Asn								
				690				695				700											
Tyr	Ile	Asp	Ile	Glu	Ser	Asn	Ser	Glu	Gly	Gly	Ser	Ser	Phe	Val	Thr								
705				710				715				720											
Ala	Asn	Glu	Asp	Ser	Val	Pro	Glu	Asn	Thr	Cys	Lys	Glu	Gly	Leu	Val								
				725				730				735											
Leu	Gly	Gln	Lys	Gln	Pro	Thr	Trp	Val	Pro	Asp	Ser	Glu	Ala	Pro	Asn								
				740				745				750											
Cys	Met	Asn	Cys	Gln	Val	Lys	Phe	Thr	Phe	Thr	Lys	Arg	Arg	His	His								
				755				760				765											
Cys	Arg	Ala	Cys	Gly	Lys	Val	Phe	Cys	Gly	Val	Cys	Cys	Asn	Arg	Lys								
770				775				780															
Cys	Lys	Leu	Gln	Tyr	Leu	Glu	Lys	Glu	Ala	Arg	Val	Cys	Val	Val	Cys								
785				790				795				800											
Tyr	Glu	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Gln	Ala	Phe	Glu	Arg	Met	Met	Ser	Pro								
				805				810				815											
Thr	Gly	Ser	Asn	Leu	Lys	Ser	Asn	His	Ser	Asp	Glu	Cys	Thr	Thr	Val								
				820				825				830											
Gln	Pro	Pro	Gln	Glu	Asn	Gln	Thr	Ser	Ser	Ile	Pro	Ser	Pro	Ala	Thr								
				835				840				845											
Leu	Pro	Val	Ser	Ala	Leu	Lys	Gln	Pro	Gly	Val	Glu	Gly	Leu	Cys	Ser								
850				855				860															
Lys	Glu	Gln	Lys	Arg	Val	Trp	Phe	Ala	Asp	Gly	Ile	Leu	Pro	Asn	Gly								
865				870				875				880											
Glu	Val	Ala	Asp	Thr	Thr	Lys	Leu	Ser	Ser	Gly	Ser	Lys	Arg	Cys	Ser								
				885				890				895											

Glu Asp Phe Ser Pro Leu Ser Pro Asp Val Pro Met Thr Val Asn Thr
 900 905 910
 Val Asp His Ser His Ser Thr Thr Val Glu Lys Pro Asn Asn Glu Thr
 915 920 925
 Gly Asp Ile Thr Arg Asn Glu Ile Ile Gln Ser Pro Ile Ser Gln Val
 930 935 940

 Pro Ser Val Glu Lys Leu Ser Met Asn Thr Gly Asn Glu Gly Leu Pro
 945 950 955 960
 Thr Ser Gly Ser Phe Thr Leu Asp Asp Asp Val Phe Ala Glu Thr Glu
 965 970 975
 Glu Pro Ser Ser Pro Thr Gly Val Leu Val Asn Ser Asn Leu Pro Ile
 980 985 990
 Ala Ser Ile Ser Asp Tyr Arg Leu Leu Cys Asp Ile Asn Lys Tyr Val
 995 1000 1005
 Cys Asn Lys Ile Ser Leu Leu Pro Asn Asp Glu Asp Ser Leu Pro Pro

 1010 1015 1020
 Leu Leu Val Ala Ser Gly Glu Lys Gly Ser Val Pro Val Val Glu Glu
 1025 1030 1035 1040
 His Pro Ser His Glu Gln Ile Ile Leu Leu Leu Glu Gly Glu Ser Phe
 1045 1050 1055
 His Pro Val Thr Phe Val Leu Asn Ala Asn Leu Leu Val Asn Val Lys
 1060 1065 1070
 Phe Ile Phe Tyr Ser Ser Asp Lys Tyr Trp Tyr Phe Ser Thr Asn Gly
 1075 1080 1085

 Leu His Gly Leu Gly Gln Ala Glu Ile Ile Ile Leu Leu Leu Cys Leu
 1090 1095 1100
 Pro Asn Glu Asp Thr Ile Pro Lys Asp Ile Phe Arg Leu Phe Ile Thr
 1105 1110 1115 1120
 Ile Tyr Lys Asp Ala Leu Lys Gly Lys Tyr Ile Glu Asn Leu Asp Asn
 1125 1130 1135
 Ile Thr Phe Thr Glu Ser Phe Leu Ser Ser Lys Asp His Gly Gly Phe
 1140 1145 1150

Leu Phe Ile Thr Pro Thr Phe Gln Lys Leu Asp Asp Leu Ser Leu Pro

1155 1160 1165
Ser Asn Pro Phe Leu Cys Gly Ile Leu Ile Gln Lys Leu Glu Ile Pro

1170 1175 1180
Trp Ala Lys Val Phe Pro Met Arg Leu Met Leu Arg Leu Gly Ala Glu

1185 1190 1195 1200
Tyr Lys Ala Tyr Pro Ala Pro Leu Thr Ser Ile Arg Gly Arg Lys Pro

1205 1210 1215
Leu Phe Gly Glu Ile Gly His Thr Ile Met Asn Leu Leu Val Asp Leu

1220 1225 1230

Arg Asn Tyr Gln Tyr Thr Leu His Asn Ile Asp Gln Leu Leu Ile His

1235 1240 1245
Met Glu Met Gly Lys Ser Cys Ile Lys Ile Pro Arg Lys Lys Tyr Ser

1250 1255 1260
Asp Val Met Lys Val Leu Asn Ser Ser Asn Glu His Val Ile Ser Ile

1265 1270 1275 1280
Gly Ala Ser Phe Ser Thr Glu Ala Asp Ser His Leu Val Cys Ile Gln

1285 1290 1295

Asn Asp Gly Ile Tyr Glu Thr Gln Ala Asn Ser Ala Thr Gly His Pro

1300 1305 1310
Arg Lys Val Thr Gly Ala Ser Phe Val Val Phe Asn Gly Ala Leu Lys

1315 1320 1325
Thr Ser Ser Gly Phe Leu Ala Lys Ser Ser Ile Val Glu Asp Gly Leu

1330 1335 1340
Met Val Gln Ile Thr Pro Glu Thr Met Asn Gly Leu Arg Leu Ala Leu

1345 1350 1355 1360
Arg Glu Gln Lys Asp Phe Lys Ile Thr Cys Gly Lys Val Asp Ala Val

1365 1370 1375

Asp Leu Arg Glu Tyr Val Asp Ile Cys Trp Val Asp Ala Glu Glu Lys

1380 1385 1390
Gly Asn Lys Gly Val Ile Ser Ser Val Asp Gly Ile Ser Leu Gln Gly

1395 1400 1405
Phe Pro Ser Glu Lys Ile Lys Leu Glu Ala Asp Phe Glu Thr Asp Glu
1410 1415 1420
Lys Ile Val Lys Cys Thr Glu Val Phe Tyr Phe Leu Lys Asp Gln Asp
1425 1430 1435 1440
Leu Ser Ile Leu Ser Thr Ser Tyr Gln Phe Ala Lys Glu Ile Ala Met

1445 1450 1455
Ala Cys Ser Ala Ala Leu Cys Pro His Leu Lys Thr Leu Lys Ser Asn
1460 1465 1470
Gly Met Asn Lys Ile Gly Leu Arg Val Ser Ile Asp Thr Asp Met Val
1475 1480 1485
Glu Phe Gln Ala Gly Ser Glu Gly Gln Leu Leu Pro Gln His Tyr Leu
1490 1495 1500
Asn Asp Leu Asp Ser Ala Leu Ile Pro Val Ile His Gly Gly Thr Ser
1505 1510 1515 1520

Asn Ser Ser Leu Pro Leu Glu Ile Glu Leu Val Phe Phe Ile Ile Glu
1525 1530 1535
His Leu Phe

<210> 40
<211> 343
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 40

Met Trp Pro Asn Gly Ser Ser Leu Gly Pro Cys Phe Arg Pro Thr Asn
1 5 10 15
Ile Thr Leu Glu Glu Arg Arg Leu Ile Ala Ser Pro Trp Phe Ala Ala
20 25 30
Ser Phe Cys Val Val Gly Leu Ala Ser Asn Leu Leu Ala Leu Ser Val

35 40 45
Leu Ala Gly Ala Arg Gln Gly Gly Ser His Thr Arg Ser Ser Phe Leu
50 55 60

Thr Phe Leu Cys Gly Leu Val Leu Thr Asp Phe Leu Gly Leu Leu Val
 65 70 75 80
 Thr Gly Thr Ile Val Val Ser Gln His Ala Ala Leu Phe Glu Trp His
 85 90 95
 Ala Val Asp Pro Gly Cys Arg Leu Cys Arg Phe Met Gly Val Val Met
 100 105 110

 Ile Phe Phe Gly Leu Ser Pro Leu Leu Gly Ala Ala Met Ala Ser
 115 120 125
 Glu Arg Tyr Leu Gly Ile Thr Arg Pro Phe Ser Arg Pro Ala Val Ala
 130 135 140
 Ser Gln Arg Arg Ala Trp Ala Thr Val Gly Leu Val Trp Ala Ala Ala
 145 150 155 160
 Leu Ala Leu Gly Leu Leu Pro Leu Leu Gly Val Gly Arg Tyr Thr Val
 165 170 175
 Gln Tyr Pro Gly Ser Trp Cys Phe Leu Thr Leu Gly Ala Glu Ser Gly

 180 185 190
 Asp Val Ala Phe Gly Leu Leu Phe Ser Met Leu Gly Gly Leu Ser Val
 195 200 205
 Gly Leu Ser Phe Leu Leu Asn Thr Val Ser Val Ala Thr Leu Cys His
 210 215 220
 Val Tyr His Gly Gln Glu Ala Ala Gln Gln Arg Pro Arg Asp Ser Glu
 225 230 235 240
 Val Glu Met Met Ala Gln Leu Leu Gly Ile Met Val Val Ala Ser Val
 245 250 255

 Cys Trp Leu Pro Leu Leu Val Phe Ile Ala Gln Thr Val Leu Arg Asn
 260 265 270
 Pro Pro Ala Met Ser Pro Ala Gly Gln Leu Ser Arg Thr Thr Glu Lys
 275 280 285
 Glu Leu Leu Ile Tyr Leu Arg Val Ala Thr Trp Asn Gln Ile Leu Asp
 290 295 300
 Pro Trp Val Tyr Ile Leu Phe Arg Arg Ala Val Leu Arg Arg Leu Gln
 305 310 315 320

Pro Arg Leu Ser Thr Arg Pro Arg Ser Leu Ser Leu Gln Pro Gln Leu

325

330

335

Thr Gln Arg Ser Gly Leu Gln

340

<210> 41

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Lys Leu Asn Pro Pro Asp Glu Ser Gly Pro Gly Cys Met Ser Cys Lys

1

5

10

15

Cys Val Leu Ser

20

<210> 42

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

Lys Leu Asn Ser Ser Asp Asp Gly Thr Gln Gly Cys Met Gly Leu Pro

1

5

10

15

Cys Val Val Met

20

<210> 43

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

Lys Ile Ser Lys Glu Glu Lys Thr Pro Gly Cys Val Lys Ile Lys Lys

1

5

10

15

Cys Ile Ile Met

20

<210> 44

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

Lys Met Ser Lys Asp Gly Lys Lys Lys Lys Lys Lys Ser Lys Thr Lys

1 5 10 15

Cys Val Ile Met

20

<210> 45

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

Lys Asn Gly Lys Lys Lys Arg Lys Ser Leu Ala Lys Arg Ile Arg Glu

1 5 10 15

Arg Cys Cys Ile Leu

20

<210> 46

<211> 1203

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

Met Gly Asn Leu Lys Ser Val Ala Gln Glu Pro Gly Pro Pro Cys Gly

1 5 10 15

Leu Gly Leu Gly Leu Gly Leu Gly Leu Cys Gly Lys Gln Gly Pro Ala

20

25

30

Thr Pro Ala Pro Glu Pro Ser Arg Ala Pro Ala Ser Leu Leu Pro Pro

35 40 45

Ala Pro Glu His Ser Pro Pro Ser Ser Pro Leu Thr Gln Pro Pro Glu

50 55 60

Gly Pro Lys Phe Pro Arg Val Lys Asn Trp Glu Val Gly Ser Ile Thr

65 70 75 80

Tyr Asp Thr Leu Ser Ala Gln Ala Gln Gln Asp Gly Pro Cys Thr Pro

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

Ser Asn Met Leu Leu Glu Ile Gly Gly Leu Glu Phe Pro Ala Ala Pro
340 345 350

Phe Ser Gly Trp Tyr Met Ser Thr Glu Ile Gly Thr Arg Asn Leu Cys
355 360 365

Asp Pro His Arg Tyr Asn Ile Leu Glu Asp Val Ala Val Cys Met Asp
370 375 380

Leu Asp Thr Arg Thr Thr Ser Ser Leu Trp Lys Asp Lys Ala Ala Val
385 390 395 400

Glu Ile Asn Val Ala Val Leu His Ser Tyr Gln Leu Ala Lys Val Thr
405 410 415

Ile Val Asp His His Ala Ala Thr Ala Ser Phe Met Lys His Leu Glu
420 425 430

Asn Glu Gln Lys Ala Arg Gly Gly Cys Pro Ala Asp Trp Ala Trp Ile
435 440 445

Val Pro Pro Ile Ser Gly Ser Leu Thr Pro Val Phe His Gln Glu Met
450 455 460

Val Asn Tyr Phe Leu Ser Pro Ala Phe Arg Tyr Gln Pro Asp Pro Trp
465 470 475 480

Lys Gly Ser Ala Ala Lys Gly Thr Gly Ile Thr Arg Lys Lys Thr Phe
485 490 495

Lys Glu Val Ala Asn Ala Val Lys Ile Ser Ala Ser Leu Met Gly Thr
500 505 510

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

Gly Arg Ala Gln Ser Tyr Ala Gln Gln Leu Gly Arg Leu Phe Arg Lys
530 535 540

Ala Phe Asp Pro Arg Val Leu Cys Met Asp Glu Tyr Asp Val Val Ser
545 550 555 560

Leu Glu His Glu Thr Leu Val Leu Val Val Thr Ser Thr Phe Gly Asn
565 570 575

Gly Asp Pro Pro Glu Asn Gly Glu Ser Phe Ala Ala Ala Leu Met Glu
580 585 590

Met Ser Gly Pro Tyr Asn Ser Ser Pro Arg Pro Glu Gln His Lys Ser

595 600 605

Tyr Lys Ile Arg Phe Asn Ser Ile Ser Cys Ser Asp Pro Leu Val Ser

610 615 620

Ser Trp Arg Arg Lys Arg Lys Glu Ser Ser Asn Thr Asp Ser Ala Gly

625 630 635 640

Ala Leu Gly Thr Leu Arg Phe Cys Val Phe Gly Leu Gly Ser Arg Ala

645 650 655

Tyr Pro His Phe Cys Ala Phe Ala Arg Ala Val Asp Thr Arg Leu Glu

660 665 670

Glu Leu Gly Gly Glu Arg Leu Leu Gln Leu Gly Gln Gly Asp Glu Leu

675 680 685

Cys Gly Gln Glu Glu Ala Phe Arg Gly Trp Ala Gln Ala Ala Phe Gln

690 695 700

Ala Ala Cys Glu Thr Phe Cys Val Gly Glu Asp Ala Lys Ala Ala Ala

705 710 715 720

Arg Asp Ile Phe Ser Pro Lys Arg Ser Trp Lys Arg Gln Arg Tyr Arg

725 730 735

Leu Ser Ala Gln Ala Glu Gly Leu Gln Leu Leu Pro Gly Leu Ile His

740 745 750

Val His Arg Arg Lys Met Phe Gln Ala Thr Ile Arg Ser Val Glu Asn

755 760 765

Leu Gln Ser Ser Lys Ser Thr Arg Ala Thr Ile Leu Val Arg Leu Asp

770 775 780

Thr Gly Gly Gln Glu Gly Leu Gln Tyr Gln Pro Gly Asp His Ile Gly

785 790 795 800

Val Cys Pro Pro Asn Arg Pro Gly Leu Val Glu Ala Leu Leu Ser Arg

805 810 815

Val Glu Asp Pro Pro Ala Pro Thr Glu Pro Val Ala Val Glu Gln Leu

820 825 830

Glu Lys Gly Ser Pro Gly Gly Pro Pro Pro Gly Trp Val Arg Asp Pro

835 840 845
 Arg Leu Pro Pro Cys Thr Leu Arg Gln Ala Leu Thr Phe Phe Leu Asp
 850 855 860
 Ile Thr Ser Pro Pro Ser Pro Gln Leu Leu Arg Leu Leu Ser Thr Leu
 865 870 875 880
 Ala Glu Glu Pro Arg Glu Gln Gln Glu Leu Glu Ala Leu Ser Gln Asp

 885 890 895
 Pro Arg Arg Tyr Glu Glu Trp Lys Trp Phe Arg Cys Pro Thr Leu Leu
 900 905 910
 Glu Val Leu Glu Gln Phe Pro Ser Val Ala Leu Pro Ala Pro Leu Leu
 915 920 925
 Leu Thr Gln Leu Pro Leu Leu Gln Pro Arg Tyr Tyr Ser Val Ser Ser
 930 935 940
 Ala Pro Ser Thr His Pro Gly Glu Ile His Leu Thr Val Ala Val Leu
 945 950 955 960

 Ala Tyr Arg Thr Gln Asp Gly Leu Gly Pro Leu His Tyr Gly Val Cys
 965 970 975
 Ser Thr Trp Leu Ser Gln Leu Lys Pro Gly Asp Pro Val Pro Cys Phe
 980 985 990
 Ile Arg Gly Ala Pro Ser Phe Arg Leu Pro Pro Asp Pro Ser Leu Pro
 995 1000 1005
 Cys Ile Leu Val Gly Pro Gly Thr Gly Ile Ala Pro Phe Arg Gly Phe
 1010 1015 1020
 Trp Gln Glu Arg Leu His Asp Ile Glu Ser Lys Gly Leu Gln Pro Thr

 1025 1030 1035 1040
 Pro Met Thr Leu Val Phe Gly Cys Arg Cys Ser Gln Leu Asp His Leu
 1045 1050 1055
 Tyr Arg Asp Glu Val Gln Asn Ala Gln Gln Arg Gly Val Phe Gly Arg
 1060 1065 1070
 Val Leu Thr Ala Phe Ser Arg Glu Pro Asp Asn Pro Lys Thr Tyr Val
 1075 1080 1085
 Gln Asp Ile Leu Arg Thr Glu Leu Ala Ala Glu Val His Arg Val Leu

1090 1095 1100

Cys Leu Glu Arg Gly His Met Phe Val Cys Gly Asp Val Thr Met Ala

1105 1110 1115 1120

Thr Asn Val Leu Gln Thr Val Gln Arg Ile Leu Ala Thr Glu Gly Asp

 1125 1130 1135

Met Glu Leu Asp Glu Ala Gly Asp Val Ile Gly Val Leu Arg Asp Gln

 1140 1145 1150

Gln Arg Tyr His Glu Asp Ile Phe Gly Leu Thr Leu Arg Thr Gln Glu

 1155 1160 1165

Val Thr Ser Arg Ile Arg Thr Gln Ser Phe Ser Leu Gln Glu Arg Gln

1170 1175 1180

Leu Arg Gly Ala Val Pro Trp Ala Phe Asp Pro Pro Gly Ser Asp Thr

1185 1190 1195 1200

Asn Ser Pro

<210> 47

<211> 663

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Met Ile Glu Lys Met Gln Gly Ser Arg Met Asp Glu Gln Arg Cys Ser

1 5 10 15

Phe Pro Pro Pro Leu Lys Thr Glu Glu Asp Tyr Ile Pro Tyr Pro Ser

 20 25 30

Val His Glu Val Leu Gly Arg Glu Gly Pro Phe Pro Leu Ile Leu Leu

 35 40 45

Pro Gln Phe Gly Gly Tyr Trp Ile Glu Gly Thr Asn His Glu Ile Thr

 50 55 60

Ser Ile Pro Glu Thr Glu Pro Leu Gln Ser Pro Thr Thr Lys Val Lys

65 70 75 80

Leu Glu Cys Asn Pro Thr Ala Arg Ile Tyr Arg Lys His Phe Leu Gly

 85 90 95

Lys Glu His Phe Asn Tyr Tyr Ser Leu Asp Ala Ala Leu Gly His Leu

100 105 110

Val Phe Ser Leu Lys Tyr Asp Val Ile Gly Asp Gln Glu His Leu Arg

115 120 125

Leu Leu Leu Arg Thr Lys Cys Arg Thr Tyr His Asp Val Ile Pro Ile

130 135 140

Ser Cys Leu Thr Glu Phe Pro Asn Val Val Gln Met Ala Lys Leu Val

145 150 155 160

Cys Glu Asp Val Asn Val Asp Arg Phe Tyr Pro Val Leu Tyr Pro Lys

165 170 175

Ala Ser Arg Leu Ile Val Thr Phe Asp Glu His Val Ile Ser Asn Asn

180 185 190

Phe Lys Phe Gly Val Ile Tyr Gln Lys Leu Gly Gln Thr Ser Glu Glu

195 200 205

Glu Leu Phe Ser Thr Asn Glu Glu Ser Pro Ala Phe Val Glu Phe Leu

210 215 220

Glu Phe Leu Gly Gln Lys Val Lys Leu Gln Asp Phe Lys Gly Phe Arg

225 230 235 240

Gly Gly Leu Asp Val Thr His Gly Gln Thr Gly Thr Glu Ser Val Tyr

245 250 255

Cys Asn Phe Arg Asn Lys Glu Ile Met Phe His Val Ser Thr Lys Leu

260 265 270

Pro Tyr Thr Glu Gly Asp Ala Gln Gln Leu Gln Arg Lys Arg His Ile

275 280 285

Gly Asn Asp Ile Val Ala Val Val Phe Gln Asp Glu Asn Thr Pro Phe

290 295 300

Val Pro Asp Met Ile Ala Ser Asn Phe Leu His Ala Tyr Val Val Val

305 310 315 320

Gln Ala Glu Gly Gly Gly Pro Asp Gly Pro Leu Tyr Lys Val Ser Val

325 330 335

Thr Ala Arg Asp Asp Val Pro Phe Phe Gly Pro Pro Leu Pro Asp Pro

340 345 350
 Ala Val Phe Arg Lys Gly Pro Glu Phe Gln Glu Phe Leu Leu Thr Lys
 355 360 365
 Leu Ile Asn Ala Glu Tyr Ala Cys Tyr Lys Ala Glu Lys Phe Ala Lys
 370 375 380
 Leu Glu Glu Arg Thr Arg Ala Ala Leu Leu Glu Thr Leu Tyr Glu Glu

 385 390 395 400
 Leu His Ile His Ser Gln Ser Met Met Gly Leu Gly Gly Asp Glu Asp
 405 410 415
 Lys Met Glu Asn Gly Ser Gly Gly Gly Gly Phe Phe Glu Ser Phe Lys
 420 425 430
 Arg Val Ile Arg Ser Arg Ser Gln Ser Met Asp Ala Met Gly Leu Ser
 435 440 445
 Asn Lys Lys Pro Asn Thr Val Ser Thr Ser His Ser Gly Ser Phe Ala
 450 455 460

 Pro Asn Asn Pro Asp Leu Ala Lys Ala Ala Gly Ile Ser Leu Ile Val
 465 470 475 480
 Pro Gly Lys Ser Pro Thr Arg Lys Lys Ser Gly Pro Phe Gly Ser Arg
 485 490 495
 Arg Ser Ser Ala Ile Gly Ile Glu Asn Ile Gln Glu Val Gln Glu Lys
 500 505 510
 Arg Glu Ser Pro Pro Ala Gly Gln Lys Thr Pro Asp Ser Gly His Val
 515 520 525
 Ser Gln Glu Pro Lys Ser Glu Asn Ser Ser Thr Gln Ser Ser Pro Glu

 530 535 540
 Met Pro Thr Thr Lys Asn Arg Ala Glu Thr Ala Ala Gln Arg Ala Glu
 545 550 555 560
 Ala Leu Lys Asp Phe Ser Arg Ser Ser Ser Ser Ala Ser Ser Phe Ala
 565 570 575
 Ser Val Val Glu Glu Thr Glu Gly Val Asp Gly Glu Asp Thr Gly Leu
 580 585 590
 Glu Ser Val Ser Ser Ser Gly Thr Pro His Lys Arg Asp Ser Phe Ile

595					600					605						
Tyr	Ser	Thr	Trp	Leu	Glu	Asp	Ser	Val	Ser	Thr	Thr	Ser	Gly	Gly	Ser	
610					615					620						
Ser	Pro	Gly	Pro	Ser	Arg	Ser	Pro	His	Pro	Asp	Ala	Gly	Lys	Leu	Gly	
625					630					635					640	
Asp	Pro	Ala	Cys	Pro	Glu	Ile	Lys	Ile	Gln	Leu	Glu	Ala	Ser	Glu	Gln	
645					650					655						
His	Met	Pro	Gln	Leu	Gly	Cys										
660																
<210>	48															
<211>	198															
<212>	PRT															
<213>	Homo sapiens															
<400>	48															
Met	His	Ser	Glu	Ala	Glu	Glu	Ser	Lys	Glu	Val	Ala	Thr	Asp	Val	Phe	
1		5				10				15						
Asn	Ser	Lys	Asn	Leu	Ala	Val	Gln	Ala	Gln	Lys	Lys	Ile	Leu	Gly	Lys	
20					25					30						
Met	Val	Ser	Lys	Ser	Ile	Ala	Thr	Thr	Leu	Ile	Asp	Asp	Thr	Ser	Ser	
35				40				45								
Glu	Val	Leu	Asp	Glu	Leu	Tyr	Arg	Val	Thr	Arg	Glu	Tyr	Thr	Gln	Asn	
50			55				60									
Lys	Lys	Glu	Ala	Glu	Lys	Ile	Ile	Lys	Asn	Leu	Ile	Lys	Thr	Val	Ile	
65		70				75				80						
Lys	Leu	Ala	Ile	Leu	Tyr	Arg	Asn	Asn	Gln	Phe	Asn	Gln	Asp	Glu	Leu	
85					90					95						
Ala	Leu	Met	Glu	Lys	Phe	Lys	Lys	Lys	Val	His	Gln	Leu	Ala	Met	Thr	
100				105				110								
Val	Val	Ser	Phe	His	Gln	Val	Asp	Tyr	Thr	Phe	Asp	Arg	Asn	Val	Leu	
115			120				125									
Ser	Arg	Leu	Leu	Asn	Glu	Cys	Arg	Glu	Met	Leu	His	Gln	Ile	Ile	Gln	

130 135 140

Arg His Leu Thr Ala Lys Ser His Gly Arg Val Asn Asn Val Phe Asp

145 150 155 160

His Phe Ser Asp Cys Glu Phe Leu Ala Ala Leu Tyr Asn Pro Phe Gly

165 170 175

Asn Phe Lys Pro His Leu Gln Lys Leu Cys Asp Gly Ile Asn Lys Met

180 185 190

Leu Asp Glu Glu Asn Ile

195

<210> 49

<211> 1544

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Met Ser Gly Thr Gln Ser Thr Ile Thr Asp Arg Phe Pro Leu Lys Lys

1 5 10 15

Pro Ile Arg His Gly Ser Ile Leu Asn Arg Glu Ser Pro Thr Asp Lys

20 25 30

Lys Gln Lys Val Glu Arg Ile Ala Ser His Asp Phe Asp Pro Thr Asp

35 40 45

Ser Ser Ser Lys Lys Thr Lys Ser Ser Ser Glu Glu Ser Arg Ser Glu

50 55 60

Ile Tyr Gly Leu Val Gln Arg Cys Val Ile Ile Gln Lys Asp Asp Asn

65 70 75 80

Gly Phe Gly Leu Thr Val Ser Gly Asp Asn Pro Val Phe Val Gln Ser

85 90 95

Val Lys Glu Asp Gly Ala Ala Met Arg Ala Gly Val Gln Thr Gly Asp

100 105 110

Arg Ile Ile Lys Val Asn Gly Thr Leu Val Thr His Ser Asn His Leu

115 120 125

Glu Val Val Lys Leu Ile Lys Ser Gly Ser Tyr Val Ala Leu Thr Val

130 135 140
 Gln Gly Arg Pro Pro Gly Ser Pro Gln Ile Pro Leu Ala Asp Ser Glu
 145 150 155 160
 Val Glu Pro Ser Val Ile Gly His Met Ser Pro Ile Met Thr Ser Pro
 165 170 175
 His Ser Pro Gly Ala Ser Gly Asn Met Glu Arg Ile Thr Ser Pro Val
 180 185 190
 Leu Met Gly Glu Glu Asn Asn Val Val His Asn Gln Lys Val Glu Ile
 195 200 205
 Leu Arg Lys Met Leu Gln Lys Glu Gln Glu Arg Leu Gln Leu Leu Gln

 210 215 220
 Glu Asp Tyr Asn Arg Thr Pro Ala Gln Arg Leu Leu Lys Glu Ile Gln
 225 230 235 240
 Glu Ala Lys Lys His Ile Pro Gln Leu Gln Glu Gln Leu Ser Lys Ala
 245 250 255
 Thr Gly Ser Ala Gln Asp Gly Ala Val Val Thr Pro Ser Arg Pro Leu
 260 265 270
 Gly Asp Thr Leu Thr Val Ser Glu Ala Glu Thr Asp Pro Gly Asp Val
 275 280 285

 Leu Gly Arg Thr Asp Cys Ser Ser Gly Asp Ala Ser Arg Pro Ser Ser
 290 295 300
 Asp Asn Ala Asp Ser Pro Lys Ser Gly Pro Lys Glu Arg Ile Tyr Leu
 305 310 315 320
 Glu Glu Asn Pro Glu Lys Ser Glu Thr Ile Gln Asp Thr Asp Thr Gln
 325 330 335
 Ser Leu Val Gly Ser Pro Ser Thr Arg Ile Ala Pro His Ile Ile Gly
 340 345 350
 Ala Glu Asp Asp Asp Phe Gly Thr Glu His Glu Gln Ile Asn Gly Gln

 355 360 365
 Cys Ser Cys Phe Gln Ser Ile Glu Leu Leu Lys Ser Arg Pro Ala His
 370 375 380

Leu Ala Val Phe Leu His His Val Val Ser Gln Phe Asp Pro Ala Thr
 385 390 395 400
 Leu Leu Cys Tyr Leu Tyr Ser Asp Leu Tyr Lys His Thr Asn Ser Lys
 405 410 415
 Glu Thr Arg Arg Ile Phe Leu Glu Phe His Gln Phe Phe Leu Asp Arg
 420 425 430

 Ser Ala His Leu Lys Val Ser Val Pro Asp Glu Met Ser Ala Asp Leu
 435 440 445
 Glu Lys Arg Arg Pro Glu Leu Ile Pro Glu Asp Leu His Arg His Tyr
 450 455 460
 Ile Gln Thr Met Gln Glu Arg Val His Pro Glu Val Gln Arg His Leu
 465 470 475 480
 Glu Asp Phe Arg Gln Lys Arg Ser Met Gly Leu Thr Leu Ala Glu Ser
 485 490 495
 Glu Leu Thr Lys Leu Asp Ala Glu Arg Asp Lys Asp Arg Leu Thr Leu

 500 505 510
 Glu Lys Glu Arg Thr Cys Ala Glu Gln Ile Val Ala Lys Ile Glu Glu
 515 520 525
 Val Leu Met Thr Ala Gln Ala Val Glu Glu Asp Lys Ser Ser Thr Met
 530 535 540
 Gln Tyr Val Ile Leu Met Tyr Met Lys His Leu Gly Val Lys Val Lys
 545 550 555 560
 Glu Pro Arg Asn Leu Glu His Lys Arg Gly Arg Ile Gly Phe Leu Pro
 565 570 575

 Lys Ile Lys Gln Ser Met Lys Lys Asp Lys Glu Gly Glu Glu Lys Gly
 580 585 590
 Lys Arg Arg Gly Phe Pro Ser Ile Leu Gly Pro Pro Arg Arg Pro Ser
 595 600 605
 Arg His Asp Asn Ser Ala Ile Gly Arg Ala Met Glu Leu Gln Lys Ala
 610 615 620
 Arg His Pro Lys His Leu Ser Thr Pro Ser Ser Val Ser Pro Glu Pro
 625 630 635 640

Gln Asp Ser Ala Lys Leu Arg Gln Ser Gly Leu Ala Asn Glu Gly Thr

645 650 655

Asp Ala Gly Tyr Leu Pro Ala Asn Ser Met Ser Ser Val Ala Ser Gly

660 665 670

Ala Ser Phe Ser Gln Glu Gly Gly Lys Glu Asn Asp Thr Gly Ser Lys

675 680 685

Gln Val Gly Glu Thr Ser Ala Pro Gly Asp Thr Leu Asp Gly Thr Pro

690 695 700

Arg Thr Leu Asn Thr Val Phe Asp Phe Pro Pro Pro Pro Leu Asp Gln

705 710 715 720

Val Gln Glu Glu Glu Cys Glu Val Glu Arg Val Thr Glu His Gly Thr

725 730 735

Pro Lys Pro Phe Arg Lys Phe Asp Ser Val Ala Phe Gly Glu Ser Gln

740 745 750

Ser Glu Asp Glu Gln Phe Glu Asn Asp Leu Glu Thr Asp Pro Pro Asn

755 760 765

Trp Gln Gln Leu Val Ser Arg Glu Val Leu Leu Gly Leu Lys Pro Cys

770 775 780

Glu Ile Lys Arg Gln Glu Val Ile Asn Glu Leu Phe Tyr Thr Glu Arg

785 790 795 800

Ala His Val Arg Thr Leu Lys Val Leu Asp Gln Val Phe Tyr Gln Arg

805 810 815

Val Ser Arg Glu Gly Ile Leu Ser Pro Ser Glu Leu Arg Lys Ile Phe

820 825 830

Ser Asn Leu Glu Asp Ile Leu Gln Leu His Ile Gly Leu Asn Glu Gln

835 840 845

Met Lys Ala Val Arg Lys Arg Asn Glu Thr Ser Val Ile Asp Gln Ile

850 855 860

Gly Glu Asp Leu Leu Thr Trp Phe Ser Gly Pro Gly Glu Glu Lys Leu

865 870 875 880

Lys His Ala Ala Ala Thr Phe Cys Ser Asn Gln Pro Phe Ala Leu Glu

885 890 895
 Met Ile Lys Ser Arg Gln Lys Lys Asp Ser Arg Phe Gln Thr Phe Val
 900 905 910
 Gln Asp Ala Glu Ser Asn Pro Leu Cys Arg Arg Leu Gln Leu Lys Asp
 915 920 925
 Ile Ile Pro Thr Gln Met Gln Arg Leu Thr Lys Tyr Pro Leu Leu Leu

 930 935 940
 Asp Asn Ile Ala Lys Tyr Thr Glu Trp Pro Thr Glu Arg Glu Lys Val
 945 950 955 960
 Lys Lys Ala Ala Asp His Cys Arg Gln Ile Leu Asn Tyr Val Asn Gln
 965 970 975
 Ala Val Lys Glu Ala Glu Asn Lys Gln Arg Leu Glu Asp Tyr Gln Arg
 980 985 990
 Arg Leu Asp Thr Ser Ser Leu Lys Leu Ser Glu Tyr Pro Asn Val Glu
 995 1000 1005

 Glu Leu Arg Asn Leu Asp Leu Thr Lys Arg Lys Met Ile His Glu Gly
 1010 1015 1020
 Pro Leu Val Trp Lys Val Asn Arg Asp Lys Thr Ile Asp Leu Tyr Thr
 1025 1030 1035 1040
 Leu Leu Leu Glu Asp Ile Leu Val Leu Leu Gln Lys Gln Asp Asp Arg
 1045 1050 1055
 Leu Val Leu Arg Cys His Ser Lys Ile Leu Ala Ser Thr Ala Asp Ser
 1060 1065 1070
 Lys His Thr Phe Ser Pro Val Ile Lys Leu Ser Thr Val Leu Val Arg

 1075 1080 1085
 Gln Val Ala Thr Asp Asn Lys Ala Leu Phe Val Ile Ser Met Ser Asp
 1090 1095 1100
 Asn Gly Ala Gln Ile Tyr Glu Leu Val Ala Gln Thr Val Ser Glu Lys
 1105 1110 1115 1120
 Thr Val Trp Gln Asp Leu Ile Cys Arg Met Ala Ala Ser Val Lys Glu
 1125 1130 1135
 Gln Ser Thr Lys Pro Ile Pro Leu Pro Gln Ser Thr Pro Gly Glu Gly

1140	1145	1150	
Asp Asn Asp Glu Glu Asp Pro Ser Lys Leu Lys Glu Glu Gln His Gly			
1155	1160	1165	
Ile Ser Val Thr Gly Leu Gln Ser Pro Asp Arg Asp Leu Gly Leu Glu			
1170	1175	1180	
Ser Thr Leu Ile Ser Ser Lys Pro Gln Ser His Ser Leu Ser Thr Ser			
1185	1190	1195	1200
Gly Lys Ser Glu Val Arg Asp Leu Phe Val Ala Glu Arg Gln Phe Ala			
1205	1210	1215	
Lys Glu Gln His Thr Asp Gly Thr Leu Lys Glu Val Gly Glu Asp Tyr			
1220	1225	1230	
Gln Ile Ala Ile Pro Asp Ser His Leu Pro Val Ser Glu Glu Arg Trp			
1235	1240	1245	
Ala Leu Asp Ala Leu Arg Asn Leu Gly Leu Leu Lys Gln Leu Leu Val			
1250	1255	1260	
Gln Gln Leu Gly Leu Thr Glu Lys Ser Val Gln Glu Asp Trp Gln His			
1265	1270	1275	1280
Phe Pro Arg Tyr Arg Thr Ala Ser Gln Gly Pro Gln Thr Asp Ser Val			
1285	1290	1295	
Ile Gln Asn Ser Glu Asn Ile Lys Ala Tyr His Ser Gly Glu Gly His			
1300	1305	1310	
Met Pro Phe Arg Thr Gly Thr Gly Asp Ile Ala Thr Cys Tyr Ser Pro			
1315	1320	1325	
Arg Thr Ser Thr Glu Ser Phe Ala Pro Arg Asp Ser Val Gly Leu Ala			
1330	1335	1340	
Pro Gln Asp Ser Gln Ala Ser Asn Ile Leu Val Met Asp His Met Ile			
1345	1350	1355	1360
Met Thr Pro Glu Met Pro Thr Met Glu Pro Glu Gly Gly Leu Asp Asp			
1365	1370	1375	
Ser Gly Glu His Phe Phe Asp Ala Arg Glu Ala His Ser Asp Glu Asn			
1380	1385	1390	

Pro Ser Glu Gly Asp Gly Ala Val Asn Lys Glu Glu Lys Asp Val Asn
1395 1400 1405

Leu Arg Ile Ser Gly Asn Tyr Leu Ile Leu Asp Gly Tyr Asp Pro Val
1410 1415 1420

Gln Glu Ser Ser Thr Asp Glu Glu Val Ala Ser Ser Leu Thr Leu Gln
1425 1430 1435 1440

Pro Met Thr Gly Ile Pro Ala Val Glu Ser Thr His Gln Gln Gln His
1445 1450 1455

Ser Pro Gln Asn Thr His Ser Asp Gly Ala Ile Ser Pro Phe Thr Pro
1460 1465 1470

Glu Phe Leu Val Gln Gln Arg Trp Gly Ala Met Glu Tyr Ser Cys Phe
1475 1480 1485

Glu Ile Gln Ser Pro Ser Ser Cys Ala Asp Ser Gln Ser Gln Ile Met
1490 1495 1500

Glu Tyr Ile His Lys Ile Glu Ala Asp Leu Glu His Leu Lys Lys Val
1505 1510 1515 1520

Glu Glu Ser Tyr Thr Ile Leu Cys Gln Arg Leu Ala Gly Ser Ala Leu
1525 1530 1535

Thr Asp Lys His Ser Asp Lys Ser
1540

<210> 50
<211> 862
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 50

Met Asn Ile Gln Glu Gln Gly Phe Pro Leu Asp Leu Gly Ala Ser Phe
1 5 10 15

Thr Glu Asp Ala Pro Arg Pro Pro Val Pro Gly Glu Glu Gly Glu Leu
20 25 30

Val Ser Thr Asp Pro Arg Pro Ala Ser Tyr Ser Phe Cys Ser Gly Lys
35 40 45

Gly Val Gly Ile Lys Gly Glu Thr Ser Thr Ala Thr Pro Arg Arg Ser

50 55 60
 Asp Leu Asp Leu Gly Tyr Glu Pro Glu Gly Ser Ala Ser Pro Thr Pro
 65 70 75 80
 Pro Tyr Leu Lys Trp Ala Glu Ser Leu His Ser Leu Leu Asp Asp Gln
 85 90 95

 Asp Gly Ile Ser Leu Phe Arg Thr Phe Leu Lys Gln Glu Gly Cys Ala
 100 105 110
 Asp Leu Leu Asp Phe Trp Phe Ala Cys Thr Gly Phe Arg Lys Leu Glu
 115 120 125
 Pro Cys Asp Ser Asn Glu Glu Lys Arg Leu Lys Leu Ala Arg Ala Ile
 130 135 140
 Tyr Arg Lys Tyr Ile Leu Asp Asn Asn Gly Ile Val Ser Arg Gln Thr
 145 150 155 160
 Lys Pro Ala Thr Lys Ser Phe Ile Lys Gly Cys Ile Met Lys Gln Leu

 165 170 175
 Ile Asp Pro Ala Met Phe Asp Gln Ala Gln Thr Glu Ile Gln Ala Thr
 180 185 190
 Met Glu Glu Asn Thr Tyr Pro Ser Phe Leu Lys Ser Asp Ile Tyr Leu
 195 200 205
 Glu Tyr Thr Arg Thr Gly Ser Glu Ser Pro Lys Val Cys Ser Asp Gln
 210 215 220
 Ser Ser Gly Ser Gly Thr Gly Lys Gly Ile Ser Gly Tyr Leu Pro Thr
 225 230 235 240

 Leu Asn Glu Asp Glu Glu Trp Lys Cys Asp Gln Asp Met Asp Glu Asp
 245 250 255
 Asp Gly Arg Asp Ala Ala Pro Pro Gly Arg Leu Pro Gln Lys Leu Leu
 260 265 270
 Leu Glu Thr Ala Ala Pro Arg Val Ser Ser Ser Arg Arg Tyr Ser Glu
 275 280 285
 Gly Arg Glu Phe Arg Tyr Gly Ser Trp Arg Glu Pro Val Asn Pro Tyr
 290 295 300

Tyr Val Asn Ala Gly Tyr Ala Leu Ala Pro Ala Thr Ser Ala Asn Asp

305 310 315 320

Ser Glu Gln Gln Ser Leu Ser Ser Asp Ala Asp Thr Leu Ser Leu Thr

325 330 335

Asp Ser Ser Val Asp Gly Ile Pro Pro Tyr Arg Ile Arg Lys Gln His

340 345 350

Arg Arg Glu Met Gln Glu Ser Val Gln Val Asn Gly Arg Val Pro Leu

355 360 365

Pro His Ile Pro Arg Thr Tyr Arg Val Pro Lys Glu Val Arg Val Glu

370 375 380

Pro Gln Lys Phe Ala Glu Glu Leu Ile His Arg Leu Glu Ala Val Gln

385 390 395 400

Arg Thr Arg Glu Ala Glu Glu Lys Leu Glu Glu Arg Leu Lys Arg Val

405 410 415

Arg Met Glu Glu Glu Gly Glu Asp Gly Asp Pro Ser Ser Gly Pro Pro

420 425 430

Gly Pro Cys His Lys Leu Pro Pro Ala Pro Ala Trp His His Phe Pro

435 440 445

Pro Arg Cys Val Asp Met Gly Cys Ala Gly Leu Arg Asp Ala His Glu

450 455 460

Glu Asn Pro Glu Ser Ile Leu Asp Glu His Val Gln Arg Val Leu Arg

465 470 475 480

Thr Pro Gly Arg Gln Ser Pro Gly Pro Gly His Arg Ser Pro Asp Ser

485 490 495

Gly His Val Ala Lys Met Pro Val Ala Leu Gly Gly Ala Ala Ser Gly

500 505 510

His Gly Lys His Val Pro Lys Ser Gly Ala Lys Leu Asp Ala Ala Gly

515 520 525

Leu His His His Arg His Val His His His Val His His Ser Thr Ala

530 535 540

Arg Pro Lys Glu Gln Val Glu Ala Glu Ala Thr Arg Arg Ala Gln Ser

545 550 555 560
 Ser Phe Ala Trp Gly Leu Glu Pro His Ser His Gly Ala Arg Ser Arg
 565 570 575
 Gly Tyr Ser Glu Ser Val Gly Ala Ala Pro Asn Ala Ser Asp Gly Leu
 580 585 590
 Ala His Ser Gly Lys Val Gly Val Ala Cys Lys Arg Asn Ala Lys Lys

 595 600 605
 Ala Glu Ser Gly Lys Ser Ala Ser Thr Glu Val Pro Gly Ala Ser Glu
 610 615 620
 Asp Ala Glu Lys Asn Gln Lys Ile Met Gln Trp Ile Ile Glu Gly Glu
 625 630 635 640
 Lys Glu Ile Ser Arg His Arg Arg Thr Gly His Gly Ser Ser Gly Thr
 645 650 655
 Arg Lys Pro Gln Pro His Glu Asn Ser Arg Pro Leu Ser Leu Glu His
 660 665 670

 Pro Trp Ala Gly Pro Gln Leu Arg Thr Ser Val Gln Pro Ser His Leu
 675 680 685
 Phe Ile Gln Asp Pro Thr Met Pro Pro His Pro Ala Pro Asn Pro Leu
 690 695 700
 Thr Gln Leu Glu Glu Ala Arg Arg Arg Leu Glu Glu Glu Glu Lys Arg
 705 710 715 720
 Ala Ser Arg Ala Pro Ser Lys Gln Arg Tyr Val Gln Glu Val Met Arg
 725 730 735
 Arg Gly Arg Ala Cys Val Arg Pro Ala Cys Ala Pro Val Leu His Val

 740 745 750
 Val Pro Ala Val Ser Asp Met Glu Leu Ser Glu Thr Glu Thr Arg Ser
 755 760 765
 Gln Arg Lys Val Gly Gly Gly Ser Ala Gln Pro Cys Asp Ser Ile Val
 770 775 780
 Val Ala Tyr Tyr Phe Cys Gly Glu Pro Ile Pro Tyr Arg Thr Leu Val
 785 790 795 800
 Arg Gly Arg Ala Val Thr Leu Gly Gln Phe Lys Glu Leu Leu Thr Lys

805 810 815
 Lys Gly Ser Tyr Arg Tyr Tyr Phe Lys Lys Val Ser Asp Glu Phe Asp
 820 825 830
 Cys Gly Val Val Phe Glu Glu Val Arg Glu Asp Glu Ala Val Leu Pro
 835 840 845
 Val Phe Glu Glu Lys Ile Ile Gly Lys Val Glu Lys Val Asp
 850 855 860
 <210> 51
 <211> 295
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 51
 Met Asp Asn Ser Gly Lys Glu Ala Glu Ala Met Ala Leu Leu Ala Glu
 1 5 10 15

 Ala Glu Arg Lys Val Lys Asn Ser Gln Ser Phe Phe Ser Gly Leu Phe
 20 25 30
 Gly Gly Ser Ser Lys Ile Glu Glu Ala Cys Glu Ile Tyr Ala Arg Ala
 35 40 45
 Ala Asn Met Phe Lys Met Ala Lys Asn Trp Ser Ala Ala Gly Asn Ala
 50 55 60
 Phe Cys Gln Ala Ala Gln Leu His Leu Gln Leu Gln Ser Lys His Asp
 65 70 75 80
 Ala Ala Thr Cys Phe Val Asp Ala Gly Asn Ala Phe Lys Lys Ala Asp

 85 90 95
 Pro Gln Glu Ala Ile Asn Cys Leu Met Arg Ala Ile Glu Ile Tyr Thr
 100 105 110
 Asp Met Gly Arg Phe Thr Ile Ala Ala Lys His His Ile Ser Ile Ala
 115 120 125
 Glu Ile Tyr Glu Thr Glu Leu Val Asp Ile Glu Lys Ala Ile Ala His
 130 135 140
 Tyr Glu Gln Ser Ala Asp Tyr Tyr Lys Gly Glu Glu Ser Asn Ser Ser

145 150 155 160

Ala Asn Lys Cys Leu Leu Lys Val Ala Gly Tyr Ala Ala Leu Leu Glu

 165 170 175

Gln Tyr Gln Lys Ala Ile Asp Ile Tyr Glu Gln Val Gly Thr Asn Ala

 180 185 190

Met Asp Ser Pro Leu Leu Lys Tyr Ser Ala Lys Asp Tyr Phe Phe Lys

 195 200 205

Ala Ala Leu Cys His Phe Cys Ile Asp Met Leu Asn Ala Lys Leu Ala

 210 215 220

Val Gln Lys Tyr Glu Glu Leu Phe Pro Ala Phe Ser Asp Ser Arg Glu

225 230 235 240

Cys Lys Leu Met Lys Lys Leu Leu Glu Ala His Glu Glu Gln Asn Val

 245 250 255

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

 260 265 270

Asp Gln Trp Leu Thr Thr Met Leu Leu Arg Ile Lys Lys Thr Ile Gln

 275 280 285

Gly Asp Glu Glu Asp Leu Arg

 290 295

<210> 52

<

211> 4303

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Met Pro Pro Ala Ala Pro Ala Arg Leu Ala Leu Ala Leu Gly Leu Gly

 1 5 10 15

Leu Trp Leu Gly Ala Leu Ala Gly Gly Pro Gly Arg Gly Cys Gly Pro

 20 25 30

Cys Glu Pro Pro Cys Leu Cys Gly Pro Ala Pro Gly Ala Ala Cys Arg

 35 40 45

Val Asn Cys Ser Gly Arg Gly Leu Arg Thr Leu Gly Pro Ala Leu Arg

50 55 60
 Ile Pro Ala Asp Ala Thr Ala Leu Asp Val Ser His Asn Leu Leu Arg
 65 70 75 80
 Ala Leu Asp Val Gly Leu Leu Ala Asn Leu Ser Ala Leu Ala Glu Leu
 85 90 95
 Asp Ile Ser Asn Asn Lys Ile Ser Thr Leu Glu Glu Gly Ile Phe Ala
 100 105 110
 Asn Leu Phe Asn Leu Ser Glu Ile Asn Leu Ser Gly Asn Pro Phe Glu
 115 120 125
 Cys Asp Cys Gly Leu Ala Trp Leu Pro Arg Trp Ala Glu Glu Gln Gln

 130 135 140
 Val Arg Val Val Gln Pro Glu Ala Ala Thr Cys Ala Gly Pro Gly Ser
 145 150 155 160
 Leu Ala Gly Gln Pro Leu Leu Gly Ile Pro Leu Leu Asp Ser Gly Cys
 165 170 175
 Gly Glu Glu Tyr Val Ala Cys Leu Pro Asp Asn Ser Ser Gly Thr Val
 180 185 190
 Ala Ala Val Ser Phe Ser Ala Ala His Glu Gly Leu Leu Gln Pro Glu
 195 200 205

 Ala Cys Ser Ala Phe Cys Phe Ser Thr Gly Gln Gly Leu Ala Ala Leu
 210 215 220
 Ser Glu Gln Gly Trp Cys Leu Cys Gly Ala Ala Gln Pro Ser Ser Ala
 225 230 235 240
 Ser Phe Ala Cys Leu Ser Leu Cys Ser Gly Pro Pro Pro Pro Pro Ala
 245 250 255
 Pro Thr Cys Arg Gly Pro Thr Leu Leu Gln His Val Phe Pro Ala Ser
 260 265 270
 Pro Gly Ala Thr Leu Val Gly Pro His Gly Pro Leu Ala Ser Gly Gln

 275 280 285
 Leu Ala Ala Phe His Ile Ala Ala Pro Leu Pro Val Thr Ala Thr Arg
 290 295 300

Trp Asp Phe Gly Asp Gly Ser Ala Glu Val Asp Ala Ala Gly Pro Ala
305 310 315 320
Ala Ser His Arg Tyr Val Leu Pro Gly Arg Tyr His Val Thr Ala Val
325 330 335
Leu Ala Leu Gly Ala Gly Ser Ala Leu Leu Gly Thr Asp Val Gln Val
340 345 350

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

Pro Gly Glu Pro His Pro Ala Thr Ala Glu His Cys Val Arg Leu Gly
500 505 510
Pro Thr Gly Trp Cys Asn Thr Asp Leu Cys Ser Ala Pro His Ser Tyr
515 520 525
Val Cys Glu Leu Gln Pro Gly Gly Pro Val Gln Asp Ala Glu Asn Leu
530 535 540
Leu Val Gly Ala Pro Ser Gly Asp Leu Gln Gly Pro Leu Thr Pro Leu
545 550 555 560

Ala Gln Gln Asp Gly Leu Ser Ala Pro His Glu Pro Val Glu Val Met

565 570 575

Val Phe Pro Gly Leu Arg Leu Ser Arg Glu Ala Phe Leu Thr Thr Ala

580 585 590

Glu Phe Gly Thr Gln Glu Leu Arg Arg Pro Ala Gln Leu Arg Leu Gln

595 600 605

Val Tyr Arg Leu Leu Ser Thr Ala Gly Thr Pro Glu Asn Gly Ser Glu

610 615 620

Pro Glu Ser Arg Ser Pro Asp Asn Arg Thr Gln Leu Ala Pro Ala Cys

625 630 635 640

Met Pro Gly Gly Arg Trp Cys Pro Gly Ala Asn Ile Cys Leu Pro Leu

645 650 655

Asp Ala Ser Cys His Pro Gln Ala Cys Ala Asn Gly Cys Thr Ser Gly

660 665 670

Pro Gly Leu Pro Gly Ala Pro Tyr Ala Leu Trp Arg Glu Phe Leu Phe

675 680 685

Ser Val Pro Ala Gly Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Val Thr Leu His Gly

690 695 700

Gln Asp Val Leu Met Leu Pro Gly Asp Leu Val Gly Leu Gln His Asp

705 710 715 720

Ala Gly Pro Gly Ala Leu Leu His Cys Ser Pro Ala Pro Gly His Pro

725 730 735

Gly Pro Arg Ala Pro Tyr Leu Ser Ala Asn Ala Ser Ser Trp Leu Pro

740 745 750

His Leu Pro Ala Gln Leu Glu Gly Thr Trp Ala Cys Pro Ala Cys Ala

755 760 765

Leu Arg Leu Leu Ala Ala Thr Glu Gln Leu Thr Val Leu Leu Gly Leu

770 775 780

Arg Pro Asn Pro Gly Leu Arg Leu Pro Gly Arg Tyr Glu Val Arg Ala

785 790 795 800

Glu Val Gly Asn Gly Val Ser Arg His Asn Leu Ser Cys Ser Phe Asp

805 810 815
 Val Val Ser Pro Val Ala Gly Leu Arg Val Ile Tyr Pro Ala Pro Arg
 820 825 830
 Asp Gly Arg Leu Tyr Val Pro Thr Asn Gly Ser Ala Leu Val Leu Gln
 835 840 845
 Val Asp Ser Gly Ala Asn Ala Thr Ala Thr Ala Arg Trp Pro Gly Gly

 850 855 860
 Ser Val Ser Ala Arg Phe Glu Asn Val Cys Pro Ala Leu Val Ala Thr
 865 870 875 880
 Phe Val Pro Gly Cys Pro Trp Glu Thr Asn Asp Thr Leu Phe Ser Val
 885 890 895
 Val Ala Leu Pro Trp Leu Ser Glu Gly Glu His Val Val Asp Val Val
 900 905 910
 Val Glu Asn Ser Ala Ser Arg Ala Asn Leu Ser Leu Arg Val Thr Ala
 915 920 925

 Glu Glu Pro Ile Cys Gly Leu Arg Ala Thr Pro Ser Pro Glu Ala Arg
 930 935 940
 Val Leu Gln Gly Val Leu Val Arg Tyr Ser Pro Val Val Glu Ala Gly
 945 950 955 960
 Ser Asp Met Val Phe Arg Trp Thr Ile Asn Asp Lys Gln Ser Leu Thr
 965 970 975
 Phe Gln Asn Val Val Phe Asn Val Ile Tyr Gln Ser Ala Ala Val Phe
 980 985 990
 Lys Leu Ser Leu Thr Ala Ser Asn His Val Ser Asn Val Thr Val Asn

 995 1000 1005
 Tyr Asn Val Thr Val Glu Arg Met Asn Arg Met Gln Gly Leu Gln Val
 1010 1015 1020
 Ser Thr Val Pro Ala Val Leu Ser Pro Asn Ala Thr Leu Ala Leu Thr
 1025 1030 1035 1040
 Ala Gly Val Leu Val Asp Ser Ala Val Glu Val Ala Phe Leu Trp Thr
 1045 1050 1055
 Phe Gly Asp Gly Glu Gln Ala Leu His Gln Phe Gln Pro Pro Tyr Asn

1060	1065	1070	
Glu Ser Phe Pro Val Pro Asp Pro Ser Val Ala Gln Val Leu Val Glu			
1075	1080	1085	
His Asn Val Met His Thr Tyr Ala Ala Pro Gly Glu Tyr Leu Leu Thr			
1090	1095	1100	
Val Leu Ala Ser Asn Ala Phe Glu Asn Leu Thr Gln Gln Val Pro Val			
1105	1110	1115	1120
Ser Val Arg Ala Ser Leu Pro Ser Val Ala Val Gly Val Ser Asp Gly			
1125	1130	1135	
Val Leu Val Ala Gly Arg Pro Val Thr Phe Tyr Pro His Pro Leu Pro			
1140	1145	1150	
Ser Pro Gly Gly Val Leu Tyr Thr Trp Asp Phe Gly Asp Gly Ser Pro			
1155	1160	1165	
Val Leu Thr Gln Ser Gln Pro Ala Ala Asn His Thr Tyr Ala Ser Arg			
1170	1175	1180	
Gly Thr Tyr His Val Arg Leu Glu Val Asn Asn Thr Val Ser Gly Ala			
1185	1190	1195	1200
Ala Ala Gln Ala Asp Val Arg Val Phe Glu Glu Leu Arg Gly Leu Ser			
1205	1210	1215	
Val Asp Met Ser Leu Ala Val Glu Gln Gly Ala Pro Val Val Val Ser			
1220	1225	1230	
Ala Ala Val Gln Thr Gly Asp Asn Ile Thr Trp Thr Phe Asp Met Gly			
1235	1240	1245	
Asp Gly Thr Val Leu Ser Gly Pro Glu Ala Thr Val Glu His Val Tyr			
1250	1255	1260	
Leu Arg Ala Gln Asn Cys Thr Val Thr Val Gly Ala Ala Ser Pro Ala			
1265	1270	1275	1280
Gly His Leu Ala Arg Ser Leu His Val Leu Val Phe Val Leu Glu Val			
1285	1290	1295	
Leu Arg Val Glu Pro Ala Ala Cys Ile Pro Thr Gln Pro Asp Ala Arg			
1300	1305	1310	

Leu Thr Ala Tyr Val Thr Gly Asn Pro Ala His Tyr Leu Phe Asp Trp
 1315 1320 1325
 Thr Phe Gly Asp Gly Ser Ser Asn Thr Thr Val Arg Gly Cys Pro Thr
 1330 1335 1340
 Val Thr His Asn Phe Thr Arg Ser Gly Thr Phe Pro Leu Ala Leu Val
 1345 1350 1355 1360

 Leu Ser Ser Arg Val Asn Arg Ala His Tyr Phe Thr Ser Ile Cys Val
 1365 1370 1375
 Glu Pro Glu Val Gly Asn Val Thr Leu Gln Pro Glu Arg Gln Phe Val
 1380 1385 1390
 Gln Leu Gly Asp Glu Ala Trp Leu Val Ala Cys Ala Trp Pro Pro Phe
 1395 1400 1405
 Pro Tyr Arg Tyr Thr Trp Asp Phe Gly Thr Glu Glu Ala Ala Pro Thr
 1410 1415 1420
 Arg Ala Arg Gly Pro Glu Val Thr Phe Ile Tyr Arg Asp Pro Gly Ser

 1425 1430 1435 1440
 Tyr Leu Val Thr Val Thr Ala Ser Asn Asn Ile Ser Ala Ala Asn Asp
 1445 1450 1455
 Ser Ala Leu Val Glu Val Gln Glu Pro Val Leu Val Thr Ser Ile Lys
 1460 1465 1470
 Val Asn Gly Ser Leu Gly Leu Glu Leu Gln Gln Pro Tyr Leu Phe Ser
 1475 1480 1485
 Ala Val Gly Arg Gly Arg Pro Ala Ser Tyr Leu Trp Asp Leu Gly Asp
 1490 1495 1500

 Gly Gly Trp Leu Glu Gly Pro Glu Val Thr His Ala Tyr Asn Ser Thr
 1505 1510 1515 1520
 Gly Asp Phe Thr Val Arg Val Ala Gly Trp Asn Glu Val Ser Arg Ser
 1525 1530 1535
 Glu Ala Trp Leu Asn Val Thr Val Lys Arg Arg Val Arg Gly Leu Val
 1540 1545 1550
 Val Asn Ala Ser Arg Thr Val Val Pro Leu Asn Gly Ser Val Ser Phe
 1555 1560 1565

Ser Thr Ser Leu Glu Ala Gly Ser Asp Val Arg Tyr Ser Trp Val Leu

1570 1575 1580

Cys Asp Arg Cys Thr Pro Ile Pro Gly Gly Pro Thr Ile Ser Tyr Thr

1585 1590 1595 1600

Phe Arg Ser Val Gly Thr Phe Asn Ile Ile Val Thr Ala Glu Asn Glu

1605 1610 1615

Val Gly Ser Ala Gln Asp Ser Ile Phe Val Tyr Val Leu Gln Leu Ile

1620 1625 1630

Glu Gly Leu Gln Val Val Gly Gly Gly Arg Tyr Phe Pro Thr Asn His

1635 1640 1645

Thr Val Gln Leu Gln Ala Val Val Arg Asp Gly Thr Asn Val Ser Tyr

1650 1655 1660

Ser Trp Thr Ala Trp Arg Asp Arg Gly Pro Ala Leu Ala Gly Ser Gly

1665 1670 1675 1680

Lys Gly Phe Ser Leu Thr Val Leu Glu Ala Gly Thr Tyr His Val Gln

1685 1690 1695

Leu Arg Ala Thr Asn Met Leu Gly Ser Ala Trp Ala Asp Cys Thr Met

1700 1705 1710

Asp Phe Val Glu Pro Val Gly Trp Leu Met Val Ala Ala Ser Pro Asn

1715 1720 1725

Pro Ala Ala Val Asn Thr Ser Val Thr Leu Ser Ala Glu Leu Ala Gly

1730 1735 1740

Gly Ser Gly Val Val Tyr Thr Trp Ser Leu Glu Glu Gly Leu Ser Trp

1745 1750 1755 1760

Glu Thr Ser Glu Pro Phe Thr Thr His Ser Phe Pro Thr Pro Gly Leu

1765 1770 1775

His Leu Val Thr Met Thr Ala Gly Asn Pro Leu Gly Ser Ala Asn Ala

1780 1785 1790

Thr Val Glu Val Asp Val Gln Val Pro Val Ser Gly Leu Ser Ile Arg

1795 1800 1805

Ala Ser Glu Pro Gly Gly Ser Phe Val Ala Ala Gly Ser Ser Val Pro

1810 1815 1820
 Phe Trp Gly Gln Leu Ala Thr Gly Thr Asn Val Ser Trp Cys Trp Ala
 1825 1830 1835 1840
 Val Pro Gly Gly Ser Ser Lys Arg Gly Pro His Val Thr Met Val Phe
 1845 1850 1855
 Pro Asp Ala Gly Thr Phe Ser Ile Arg Leu Asn Ala Ser Asn Ala Val

 1860 1865 1870
 Ser Trp Val Ser Ala Thr Tyr Asn Leu Thr Ala Glu Glu Pro Ile Val
 1875 1880 1885
 Gly Leu Val Leu Trp Ala Ser Ser Lys Val Val Ala Pro Gly Gln Leu
 1890 1895 1900
 Val His Phe Gln Ile Leu Leu Ala Ala Gly Ser Ala Val Thr Phe Arg
 1905 1910 1915 1920
 Leu Gln Val Gly Gly Ala Asn Pro Glu Val Leu Pro Gly Pro Arg Phe
 1925 1930 1935

 Ser His Ser Phe Pro Arg Val Gly Asp His Val Val Ser Val Arg Gly
 1940 1945 1950
 Lys Asn His Val Ser Trp Ala Gln Ala Gln Val Arg Ile Val Val Leu
 1955 1960 1965
 Glu Ala Val Ser Gly Leu Gln Val Pro Asn Cys Cys Glu Pro Gly Ile
 1970 1975 1980
 Ala Thr Gly Thr Glu Arg Asn Phe Thr Ala Arg Val Gln Arg Gly Ser
 1985 1990 1995 2000
 Arg Val Ala Tyr Ala Trp Tyr Phe Ser Leu Gln Lys Val Gln Gly Asp

 2005 2010 2015
 Ser Leu Val Ile Leu Ser Gly Arg Asp Val Thr Tyr Thr Pro Val Ala
 2020 2025 2030
 Ala Gly Leu Leu Glu Ile Gln Val Arg Ala Phe Asn Ala Leu Gly Ser
 2035 2040 2045
 Glu Asn Arg Thr Leu Val Leu Glu Val Gln Asp Ala Val Gln Tyr Val
 2050 2055 2060
 Ala Leu Gln Ser Gly Pro Cys Phe Thr Asn Arg Ser Ala Gln Phe Glu

2065 2070 2075 2080

Ala Ala Thr Ser Pro Ser Pro Arg Arg Val Ala Tyr His Trp Asp Phe

 2085 2090 2095

Gly Asp Gly Ser Pro Gly Gln Asp Thr Asp Glu Pro Arg Ala Glu His

 2100 2105 2110

Ser Tyr Leu Arg Pro Gly Asp Tyr Arg Val Gln Val Asn Ala Ser Asn

 2115 2120 2125

Leu Val Ser Phe Phe Val Ala Gln Ala Thr Val Thr Val Gln Val Leu

 2130 2135 2140

Ala Cys Arg Glu Pro Glu Val Asp Val Val Leu Pro Leu Gln Val Leu

2145 2150 2155 2160

Met Arg Arg Ser Gln Arg Asn Tyr Leu Glu Ala His Val Asp Leu Arg

 2165 2170 2175

Asp Cys Val Thr Tyr Gln Thr Glu Tyr Arg Trp Glu Val Tyr Arg Thr

 2180 2185 2190

Ala Ser Cys Gln Arg Pro Gly Arg Pro Ala Arg Val Ala Leu Pro Gly

 2195 2200 2205

Val Asp Val Ser Arg Pro Arg Leu Val Leu Pro Arg Leu Ala Leu Pro

 2210 2215 2220

Val Gly His Tyr Cys Phe Val Phe Val Val Ser Phe Gly Asp Thr Pro

2225 2230 2235 2240

Leu Thr Gln Ser Ile Gln Ala Asn Val Thr Val Ala Pro Glu Arg Leu

 2245 2250 2255

Val Pro Ile Ile Glu Gly Gly Ser Tyr Arg Val Trp Ser Asp Thr Arg

 2260 2265 2270

Asp Leu Val Leu Asp Gly Ser Glu Ser Tyr Asp Pro Asn Leu Glu Asp

 2275 2280 2285

Gly Asp Gln Thr Pro Leu Ser Phe His Trp Ala Cys Val Ala Ser Thr

2290 2295 2300

Gln Arg Glu Ala Gly Gly Cys Ala Leu Asn Phe Gly Pro Arg Gly Ser

2305 2310 2315 2320

Ser Thr Val Thr Ile Pro Arg Glu Arg Leu Ala Ala Gly Val Glu Tyr
2325 2330 2335

Thr Phe Ser Leu Thr Val Trp Lys Ala Gly Arg Lys Glu Glu Ala Thr
2340 2345 2350

Asn Gln Thr Val Leu Ile Arg Ser Gly Arg Val Pro Ile Val Ser Leu
2355 2360 2365

Glu Cys Val Ser Cys Lys Ala Gln Ala Val Tyr Glu Val Ser Arg Ser
2370 2375 2380

Ser Tyr Val Tyr Leu Glu Gly Arg Cys Leu Asn Cys Ser Ser Gly Ser
2385 2390 2395 2400

Lys Arg Gly Arg Trp Ala Ala Arg Thr Phe Ser Asn Lys Thr Leu Val
2405 2410 2415

Leu Asp Glu Thr Thr Thr Ser Thr Gly Ser Ala Gly Met Arg Leu Val
2420 2425 2430

Leu Arg Arg Gly Val Leu Arg Asp Gly Glu Gly Tyr Thr Phe Thr Leu
2435 2440 2445

Thr Val Leu Gly Arg Ser Gly Glu Glu Glu Gly Cys Ala Ser Ile Arg
2450 2455 2460

Leu Ser Pro Asn Arg Pro Pro Leu Gly Gly Ser Cys Arg Leu Phe Pro
2465 2470 2475 2480

Leu Gly Ala Val His Ala Leu Thr Thr Lys Val His Phe Glu Cys Thr
2485 2490 2495

Gly Trp His Asp Ala Glu Asp Ala Gly Ala Pro Leu Val Tyr Ala Leu
2500 2505 2510

Leu Leu Arg Arg Cys Arg Gln Gly His Cys Glu Glu Phe Cys Val Tyr
2515 2520 2525

Lys Gly Ser Leu Ser Ser Tyr Gly Ala Val Leu Pro Pro Gly Phe Arg
2530 2535 2540

Pro His Phe Glu Val Gly Leu Ala Val Val Val Gln Asp Gln Leu Gly
2545 2550 2555 2560

Ala Ala Val Val Ala Leu Asn Arg Ser Leu Ala Ile Thr Leu Pro Glu
2565 2570 2575

Pro Asn Gly Ser Ala Thr Gly Leu Thr Val Trp Leu His Gly Leu Thr

2580 2585 2590

Ala Ser Val Leu Pro Gly Leu Leu Arg Gln Ala Asp Pro Gln His Val

2595 2600 2605

Ile Glu Tyr Ser Leu Ala Leu Val Thr Val Leu Asn Glu Tyr Glu Arg

2610 2615 2620

Ala Leu Asp Val Ala Ala Glu Pro Lys His Glu Arg Gln His Arg Ala

2625 2630 2635 2640

Gln Ile Arg Lys Asn Ile Thr Glu Thr Leu Val Ser Leu Arg Val His

2645 2650 2655

Thr Val Asp Asp Ile Gln Gln Ile Ala Ala Ala Leu Ala Gln Cys Met

2660 2665 2670

Gly Pro Ser Arg Glu Leu Val Cys Arg Ser Cys Leu Lys Gln Thr Leu

2675 2680 2685

His Lys Leu Glu Ala Met Met Leu Ile Leu Gln Ala Glu Thr Thr Ala

2690 2695 2700

Gly Thr Val Thr Pro Thr Ala Ile Gly Asp Ser Ile Leu Asn Ile Thr

2705 2710 2715 2720

Gly Asp Leu Ile His Leu Ala Ser Ser Asp Val Arg Ala Pro Gln Pro

2725 2730 2735

Ser Glu Leu Gly Ala Glu Ser Pro Ser Arg Met Val Ala Ser Gln Ala

2740 2745 2750

Tyr Asn Leu Thr Ser Ala Leu Met Arg Ile Leu Met Arg Ser Arg Val

2755 2760 2765

Leu Asn Glu Glu Pro Leu Thr Leu Ala Gly Glu Glu Ile Val Ala Gln

2770 2775 2780

Gly Lys Arg Ser Asp Pro Arg Ser Leu Leu Cys Tyr Gly Gly Ala Pro

2785 2790 2795 2800

Gly Pro Gly Cys His Phe Ser Ile Pro Glu Ala Phe Ser Gly Ala Leu

2805 2810 2815

Ala Asn Leu Ser Asp Val Val Gln Leu Ile Phe Leu Val Asp Ser Asn

2820 2825 2830
 Pro Phe Pro Phe Gly Tyr Ile Ser Asn Tyr Thr Val Ser Thr Lys Val
 2835 2840 2845
 Ala Ser Met Ala Phe Gln Thr Gln Ala Gly Ala Gln Ile Pro Ile Glu
 2850 2855 2860
 Arg Leu Ala Ser Glu Arg Ala Ile Thr Val Lys Val Pro Asn Asn Ser

 2865 2870 2875 2880
 Asp Trp Ala Ala Arg Gly His Arg Ser Ser Ala Asn Ser Ala Asn Ser
 2885 2890 2895
 Val Val Val Gln Pro Gln Ala Ser Val Gly Ala Val Val Thr Leu Asp
 2900 2905 2910
 Ser Ser Asn Pro Ala Ala Gly Leu His Leu Gln Leu Asn Tyr Thr Leu
 2915 2920 2925
 Leu Asp Gly His Tyr Leu Ser Glu Glu Pro Glu Pro Tyr Leu Ala Val
 2930 2935 2940

 Tyr Leu His Ser Glu Pro Arg Pro Asn Glu His Asn Cys Ser Ala Ser
 2945 2950 2955 2960
 Arg Arg Ile Arg Pro Glu Ser Leu Gln Gly Ala Asp His Arg Pro Tyr
 2965 2970 2975
 Thr Phe Phe Ile Ser Pro Gly Ser Arg Asp Pro Ala Gly Ser Tyr His
 2980 2985 2990
 Leu Asn Leu Ser Ser His Phe Arg Trp Ser Ala Leu Gln Val Ser Val
 2995 3000 3005
 Gly Leu Tyr Thr Ser Leu Cys Gln Tyr Phe Ser Glu Glu Asp Met Val

 3010 3015 3020
 Trp Arg Thr Glu Gly Leu Leu Pro Leu Glu Glu Thr Ser Pro Arg Gln
 3025 3030 3035 3040
 Ala Val Cys Leu Thr Arg His Leu Thr Ala Phe Gly Ala Ser Leu Phe
 3045 3050 3055
 Val Pro Pro Ser His Val Arg Phe Val Phe Pro Glu Pro Thr Ala Asp
 3060 3065 3070
 Val Asn Tyr Ile Val Met Leu Thr Cys Ala Val Cys Leu Val Thr Tyr

3075 3080 3085
 Met Val Met Ala Ala Ile Leu His Lys Leu Asp Gln Leu Asp Ala Ser
 3090 3095 3100
 Arg Gly Arg Ala Ile Pro Phe Cys Gly Gln Arg Gly Arg Phe Lys Tyr
 3105 3110 3115 3120
 Glu Ile Leu Val Lys Thr Gly Trp Gly Arg Gly Ser Gly Thr Thr Ala
 3125 3130 3135
 His Val Gly Ile Met Leu Tyr Gly Val Asp Ser Arg Ser Gly His Arg
 3140 3145 3150
 His Leu Asp Gly Asp Arg Ala Phe His Arg Asn Ser Leu Asp Ile Phe

 3155 3160 3165
 Arg Ile Ala Thr Pro His Ser Leu Gly Ser Val Trp Lys Ile Arg Val
 3170 3175 3180
 Trp His Asp Asn Lys Gly Leu Ser Pro Ala Trp Phe Leu Gln His Val
 3185 3190 3195 3200
 Ile Val Arg Asp Leu Gln Thr Ala Arg Ser Ala Phe Phe Leu Val Asn
 3205 3210 3215
 Asp Trp Leu Ser Val Glu Thr Glu Ala Asn Gly Gly Leu Val Glu Lys
 3220 3225 3230

 Glu Val Leu Ala Ala Ser Asp Ala Ala Leu Leu Arg Phe Arg Arg Leu
 3235 3240 3245
 Leu Val Ala Glu Leu Gln Arg Gly Phe Phe Asp Lys His Ile Trp Leu
 3250 3255 3260
 Ser Ile Trp Asp Arg Pro Pro Arg Ser Arg Phe Thr Arg Ile Gln Arg
 3265 3270 3275 3280
 Ala Thr Cys Cys Val Leu Leu Ile Cys Leu Phe Leu Gly Ala Asn Ala
 3285 3290 3295
 Val Trp Tyr Gly Ala Val Gly Asp Ser Ala Tyr Ser Thr Gly His Val

 3300 3305 3310
 Ser Arg Leu Ser Pro Leu Ser Val Asp Thr Val Ala Val Gly Leu Val
 3315 3320 3325

Ser Ser Val Val Val Tyr Pro Val Tyr Leu Ala Ile Leu Phe Leu Phe
3330 3335 3340

Arg Met Ser Arg Ser Lys Val Ala Gly Ser Pro Ser Pro Thr Pro Ala
3345 3350 3355 3360

Gly Gln Gln Val Leu Asp Ile Asp Ser Cys Leu Asp Ser Ser Val Leu
3365 3370 3375

Asp Ser Ser Phe Leu Thr Phe Ser Gly Leu His Ala Glu Gln Ala Phe
3380 3385 3390

Val Gly Gln Met Lys Ser Asp Leu Phe Leu Asp Asp Ser Lys Ser Leu
3395 3400 3405

Val Cys Trp Pro Ser Gly Glu Gly Thr Leu Ser Trp Pro Asp Leu Leu
3410 3415 3420

Ser Asp Pro Ser Ile Val Gly Ser Asn Leu Arg Gln Leu Ala Arg Gly
3425 3430 3435 3440

Gln Ala Gly His Gly Leu Gly Pro Glu Glu Asp Gly Phe Ser Leu Ala
3445 3450 3455

Ser Pro Tyr Ser Pro Ala Lys Ser Phe Ser Ala Ser Asp Glu Asp Leu
3460 3465 3470

Ile Gln Gln Val Leu Ala Glu Gly Val Ser Ser Pro Ala Pro Thr Gln
3475 3480 3485

Asp Thr His Met Glu Thr Asp Leu Leu Ser Ser Leu Ser Ser Thr Pro
3490 3495 3500

Gly Glu Lys Thr Glu Thr Leu Ala Leu Gln Arg Leu Gly Glu Leu Gly
3505 3510 3515 3520

Pro Pro Ser Pro Gly Leu Asn Trp Glu Gln Pro Gln Ala Ala Arg Leu
3525 3530 3535

Ser Arg Thr Gly Leu Val Glu Gly Leu Arg Lys Arg Leu Leu Pro Ala
3540 3545 3550

Trp Cys Ala Ser Leu Ala His Gly Leu Ser Leu Leu Leu Val Ala Val
3555 3560 3565

Ala Val Ala Val Ser Gly Trp Val Gly Ala Ser Phe Pro Pro Gly Val
3570 3575 3580

Ser Val Ala Trp Leu Leu Ser Ser Ser Ala Ser Phe Leu Ala Ser Phe

3585 3590 3595 3600

Leu Gly Trp Glu Pro Leu Lys Val Leu Leu Glu Ala Leu Tyr Phe Ser

3605 3610 3615

Leu Val Ala Lys Arg Leu His Pro Asp Glu Asp Asp Thr Leu Val Glu

3620 3625 3630

Ser Pro Ala Val Thr Pro Val Ser Ala Arg Val Pro Arg Val Arg Pro

3635 3640 3645

Pro His Gly Phe Ala Leu Phe Leu Ala Lys Glu Glu Ala Arg Lys Val

3650 3655 3660

Lys Arg Leu His Gly Met Leu Arg Ser Leu Leu Val Tyr Met Leu Phe

3665 3670 3675 3680

Leu Leu Val Thr Leu Leu Ala Ser Tyr Gly Asp Ala Ser Cys His Gly

3685 3690 3695

His Ala Tyr Arg Leu Gln Ser Ala Ile Lys Gln Glu Leu His Ser Arg

3700 3705 3710

Ala Phe Leu Ala Ile Thr Arg Ser Glu Glu Leu Trp Pro Trp Met Ala

3715 3720 3725

His Val Leu Leu Pro Tyr Val His Gly Asn Gln Ser Ser Pro Glu Leu

3730 3735 3740

Gly Pro Pro Arg Leu Arg Gln Val Arg Leu Gln Glu Ala Leu Tyr Pro

3745 3750 3755 3760

Asp Pro Pro Gly Pro Arg Val His Thr Cys Ser Ala Ala Gly Gly Phe

3765 3770 3775

Ser Thr Ser Asp Tyr Asp Val Gly Trp Glu Ser Pro His Asn Gly Ser

3780 3785 3790

Gly Thr Trp Ala Tyr Ser Ala Pro Asp Leu Leu Gly Ala Trp Ser Trp

3795 3800 3805

Gly Ser Cys Ala Val Tyr Asp Ser Gly Gly Tyr Val Gln Glu Leu Gly

3810 3815 3820

Leu Ser Leu Glu Glu Ser Arg Asp Arg Leu Arg Phe Leu Gln Leu His

3825 3830 3835 3840
 Asn Trp Leu Asp Asn Arg Ser Arg Ala Val Phe Leu Glu Leu Thr Arg
 3845 3850 3855
 Tyr Ser Pro Ala Val Gly Leu His Ala Ala Val Thr Leu Arg Leu Glu
 3860 3865 3870
 Phe Pro Ala Ala Gly Arg Ala Leu Ala Ala Leu Ser Val Arg Pro Phe

 3875 3880 3885
 Ala Leu Arg Arg Leu Ser Ala Gly Leu Ser Leu Pro Leu Leu Thr Ser
 3890 3895 3900
 Val Cys Leu Leu Leu Phe Ala Val His Phe Ala Val Ala Glu Ala Arg
 3905 3910 3915 3920
 Thr Trp His Arg Glu Gly Arg Trp Arg Val Leu Arg Leu Gly Ala Trp
 3925 3930 3935
 Ala Arg Trp Leu Leu Val Ala Leu Thr Ala Ala Thr Ala Leu Val Arg
 3940 3945 3950

 Leu Ala Gln Leu Gly Ala Ala Asp Arg Gln Trp Thr Arg Phe Val Arg
 3955 3960 3965
 Gly Arg Pro Arg Arg Phe Thr Ser Phe Asp Gln Val Ala Gln Leu Ser
 3970 3975 3980
 Ser Ala Ala Arg Gly Leu Ala Ala Ser Leu Leu Phe Leu Leu Leu Val
 3985 3990 3995 4000
 Lys Ala Ala Gln Gln Leu Arg Phe Val Arg Gln Trp Ser Val Phe Gly
 4005 4010 4015
 Lys Thr Leu Cys Arg Ala Leu Pro Glu Leu Leu Gly Val Thr Leu Gly

 4020 4025 4030
 Leu Val Val Leu Gly Val Ala Tyr Ala Gln Leu Ala Ile Leu Leu Val
 4035 4040 4045
 Ser Ser Cys Val Asp Ser Leu Trp Ser Val Ala Gln Ala Leu Leu Val
 4050 4055 4060
 Leu Cys Pro Gly Thr Gly Leu Ser Thr Leu Cys Pro Ala Glu Ser Trp
 4065 4070 4075 4080
 His Leu Ser Pro Leu Leu Cys Val Gly Leu Trp Ala Leu Arg Leu Trp

4085	4090	4095	
Gly Ala Leu Arg Leu Gly Ala Val Ile Leu Arg Trp Arg Tyr His Ala			
4100	4105	4110	
Leu Arg Gly Glu Leu Tyr Arg Pro Ala Trp Glu Pro Gln Asp Tyr Glu			
4115	4120	4125	
Met Val Glu Leu Phe Leu Arg Arg Leu Arg Leu Trp Met Gly Leu Ser			
4130	4135	4140	
Lys Val Lys Glu Phe Arg His Lys Val Arg Phe Glu Gly Met Glu Pro			
4145	4150	4155	4160
Leu Pro Ser Arg Ser Ser Arg Gly Ser Lys Val Ser Pro Asp Val Pro			
4165	4170	4175	
Pro Pro Ser Ala Gly Ser Asp Ala Ser His Pro Ser Thr Ser Ser Ser			
4180	4185	4190	
Gln Leu Asp Gly Leu Ser Val Ser Leu Gly Arg Leu Gly Thr Arg Cys			
4195	4200	4205	
Glu Pro Glu Pro Ser Arg Leu Gln Ala Val Phe Glu Ala Leu Leu Thr			
4210	4215	4220	
Gln Phe Asp Arg Leu Asn Gln Ala Thr Glu Asp Val Tyr Gln Leu Glu			
4225	4230	4235	4240
Gln Gln Leu His Ser Leu Gln Gly Arg Arg Ser Ser Arg Ala Pro Ala			
4245	4250	4255	
Gly Ser Ser Arg Gly Pro Ser Pro Gly Leu Arg Pro Ala Leu Pro Ser			
4260	4265	4270	
Arg Leu Ala Arg Ala Ser Arg Gly Val Asp Leu Ala Thr Gly Pro Ser			
4275	4280	4285	
Arg Thr Pro Leu Arg Ala Lys Asn Lys Val His Pro Ser Ser Thr			
4290	4295	4300	
<210> 53			
<211> 202			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			

<400> 53

Met Cys Arg Thr Leu Ala Ala Phe Pro Thr Thr Cys Leu Glu Arg Ala

1 5 10 15

Lys Glu Phe Lys Thr Arg Leu Gly Ile Phe Leu His Lys Ser Glu Leu

20 25 30

Gly Cys Asp Thr Gly Ser Thr Gly Lys Phe Glu Trp Gly Ser Lys His

35 40 45

Ser Lys Glu Asn Arg Asn Phe Ser Glu Asp Val Leu Gly Trp Arg Glu

50 55 60

Ser Phe Asp Leu Leu Leu Ser Ser Lys Asn Gly Val Ala Ala Phe His

65 70 75 80

Ala Phe Leu Lys Thr Glu Phe Ser Glu Glu Asn Leu Glu Phe Trp Leu

85 90 95

Ala Cys Glu Glu Phe Lys Lys Ile Arg Ser Ala Thr Lys Leu Ala Ser

100 105 110

Arg Ala His Gln Ile Phe Glu Glu Phe Ile Cys Ser Glu Ala Pro Lys

115 120 125

Glu Val Asn Ile Asp His Glu Thr His Glu Leu Thr Arg Met Asn Leu

130 135 140

Gln Thr Ala Thr Ala Thr Cys Phe Asp Ala Ala Gln Gly Lys Thr Arg

145 150 155 160

Thr Leu Met Glu Lys Asp Ser Tyr Pro Arg Phe Leu Lys Ser Pro Ala

165 170 175

Tyr Arg Asp Leu Ala Ala Gln Ala Ser Ala Ala Ser Ala Thr Leu Ser

180 185 190

Ser Cys Ser Leu Asp Glu Pro Ser His Thr

195 200

<210> 54

<211> 853

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

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

Gly Gly Arg Phe Phe Pro Arg Glu Arg Lys Arg Phe Arg Gly Gln Glu
260 265 270

Arg Pro Asp Asp Phe Thr Ala Ser Val Ser Glu Gly Ile Met Thr Tyr
275 280 285

Ala Asn Ser Val Val Ser Asp Met Met Val Ser Ile Met Lys Thr Leu
290 295 300

Lys Ile Gln Val Lys Asp Thr Thr Ile Ala Thr Ile Leu Leu Lys Lys
305 310 315 320

Val Leu Leu Lys His Ala Lys Glu Val Val Ser Asp Leu Ile Asp Ser
325 330 335

Phe Leu Arg Asn Leu His Ser Val Thr Gly Thr Leu Met Thr Asp Thr
340 345 350

Gln Phe Val Ser Ala Val Lys Arg Thr Val Phe Ser His Gly Ser Gln
355 360 365

Lys Ala Thr Asp Ile Met Asp Ala Met Leu Arg Lys Leu Tyr Asn Val
370 375 380

Met Phe Ala Lys Lys Val Pro Glu His Val Arg Lys Ala Gln Asp Lys
385 390 395 400

Ala Glu Ser Tyr Ser Leu Ile Ser Met Lys Gly Met Gly Asp Pro Lys
405 410 415

Asn Arg Asn Val Asn Phe Ala Met Lys Ser Glu Thr Lys Leu Arg Glu
420 425 430

Lys Met Tyr Ser Glu Pro Lys Ser Glu Glu Glu Thr Cys Ala Lys Thr
435 440 445

Leu Gly Glu His Ile Ile Lys Glu Gly Leu Thr Leu Trp His Lys Thr
450 455 460

Gln Gln Lys Glu Cys Lys Ser Leu Gly Phe Gln His Ala Ala Phe Glu
465 470 475 480

Ala Pro Asn Thr Gln Arg Lys Pro Ala Ser Asp Ile Ser Phe Glu Tyr
485 490 495

Pro Glu Asp Ile Gly Asn Leu Ser Leu Pro Pro Tyr Pro Pro Glu Lys

500 505 510
 Pro Glu Asn Phe Met Tyr Asp Ser Asp Ser Trp Ala Glu Asp Leu Ile
 515 520 525
 Val Ser Ala Leu Leu Leu Ile Gln Tyr His Leu Ala Gln Gly Gly Arg
 530 535 540
 Arg Asp Ala Arg Ser Phe Val Glu Ala Ala Gly Thr Thr Asn Phe Pro
 545 550 555 560

 Ala Asn Glu Pro Pro Val Ala Pro Asp Glu Ser Cys Leu Lys Ser Ala
 565 570 575
 Pro Ile Val Gly Asp Gln Glu Gln Ala Glu Lys Lys Asp Leu Arg Ser
 580 585 590
 Val Phe Phe Asn Phe Ile Arg Asn Leu Leu Ser Glu Thr Ile Phe Lys
 595 600 605
 Arg Asp Gln Ser Pro Glu Pro Lys Val Pro Glu Gln Pro Val Lys Glu
 610 615 620
 Asp Arg Lys Leu Cys Glu Arg Pro Leu Ala Ser Ser Pro Pro Arg Leu

 625 630 635 640
 Tyr Glu Asp Asp Glu Thr Pro Gly Ala Leu Ser Gly Leu Thr Lys Met
 645 650 655
 Ala Val Ser Gln Ile Asp Gly His Met Ser Gly Gln Met Val Glu His
 660 665 670
 Leu Met Asn Ser Val Met Lys Leu Cys Val Ile Ile Ala Lys Ser Cys
 675 680 685
 Asp Ala Ser Leu Ala Glu Leu Gly Asp Asp Lys Ser Gly Asp Ala Ser
 690 695 700

 Arg Leu Thr Ser Ala Phe Pro Asp Ser Leu Tyr Glu Cys Leu Pro Ala
 705 710 715 720
 Lys Gly Thr Gly Ser Ala Glu Ala Val Leu Gln Asn Ala Tyr Gln Ala
 725 730 735
 Ile His Asn Glu Met Arg Gly Thr Ser Gly Gln Pro Pro Glu Gly Cys
 740 745 750
 Ala Ala Pro Thr Val Ile Val Ser Asn His Asn Leu Thr Asp Thr Val

755 760 765
Gln Asn Lys Gln Leu Gln Ala Val Leu Gln Trp Val Ala Ala Ser Glu

770 775 780
Leu Asn Val Pro Ile Leu Tyr Phe Ala Gly Asp Asp Glu Gly Ile Gln
785 790 795 800
Glu Lys Leu Leu Gln Leu Ser Ala Ala Ala Val Asp Lys Gly Cys Ser
805 810 815
Val Gly Glu Val Leu Gln Ser Val Leu Arg Tyr Glu Lys Glu Arg Gln
820 825 830
Leu Asn Glu Ala Val Gly Asn Val Thr Pro Leu Gln Leu Leu Asp Trp
835 840 845

Leu Met Val Asn Leu

850
<210> 55
<211> 279
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 55

Met Ser Leu Phe Asp Leu Phe Arg Gly Phe Phe Gly Phe Pro Gly Pro
1 5 10 15
Arg Ser His Arg Asp Pro Phe Phe Gly Gly Met Thr Arg Asp Glu Asp
20 25 30
Asp Asp Glu Glu Glu Glu Glu Gly Gly Ser Trp Gly Arg Gly Asn
35 40 45
Pro Arg Phe His Ser Pro Gln His Pro Pro Glu Glu Phe Gly Phe Gly

50 55 60
Phe Ser Phe Ser Pro Gly Gly Gly Ile Arg Phe His Asp Asn Phe Gly
65 70 75 80
Phe Asp Asp Leu Val Arg Asp Phe Asn Ser Ile Phe Ser Asp Met Gly
85 90 95
Ala Trp Thr Leu Pro Ser His Pro Pro Glu Leu Pro Gly Pro Glu Ser
100 105 110

Glu Thr Pro Gly Glu Arg Leu Arg Glu Gly Gln Thr Leu Arg Asp Ser
115 120 125

Met Leu Lys Tyr Pro Asp Ser His Gln Pro Arg Ile Phe Gly Gly Val
130 135 140

Leu Glu Ser Asp Ala Arg Ser Glu Ser Pro Gln Pro Ala Pro Asp Trp
145 150 155 160

Gly Ser Gln Arg Pro Phe His Arg Phe Asp Asp Val Trp Pro Met Asp
165 170 175

Pro His Pro Arg Thr Arg Glu Asp Asn Asp Leu Asp Ser Gln Val Ser
180 185 190

Gln Glu Gly Leu Gly Pro Val Leu Gln Pro Gln Pro Lys Ser Tyr Phe

195 200 205
Lys Ser Ile Ser Val Thr Lys Ile Thr Lys Pro Asp Gly Ile Val Glu
210 215 220

Glu Arg Arg Thr Val Val Asp Ser Glu Gly Arg Thr Glu Thr Thr Val
225 230 235 240

Thr Arg His Glu Ala Asp Ser Ser Pro Arg Gly Asp Pro Glu Ser Pro
245 250 255

Arg Pro Pro Ala Leu Asp Asp Ala Phe Ser Ile Leu Asp Leu Phe Leu
260 265 270

Gly Arg Trp Phe Arg Ser Arg
275

<210> 56

<211> 968

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

Met Leu Thr Glu Ala Ser Leu Ser Ile Trp Gly Trp Gly Ser Leu Gly
1 5 10 15

Ile Val Leu Phe Leu Ile Thr Phe Gly Pro Phe Val Ile Phe Tyr Leu
20 25 30

Thr Phe Tyr Ile Leu Cys Phe Val Gly Gly Gly Leu Val Val Thr Leu

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

Ala Phe Met Asn Ile Ile Lys Leu Ser Asp Asn Ile Gly Glu Leu Glu
290 295 300

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

Asp Thr Ala Gly Asp Asp Ile Asn Thr Ile Lys Asn Gln Ile Asn Ser
325 330 335

Leu Leu Phe Val Lys Lys Val Cys Asp Ser Arg Ile Gln Arg Leu Gln
340 345 350

Ser Gly Lys Glu Ile Asn Thr Val Lys Leu Ala Ala Asn Phe Gly Lys
355 360 365

Leu Cys Thr Val Pro Leu Asp Ser Ile Leu Val Asp Asn Val Ala Leu
370 375 380

Gln Phe Phe Met Asp Tyr Met Gln Gln Thr Gly Gly Gln Ala His Leu
385 390 395 400

Phe Phe Trp Met Thr Val Glu Gly Tyr Arg Val Thr Ala Gln Gln Gln
405 410 415

Leu Glu Val Leu Leu Ser Arg Gln Arg Asp Gly Lys His Gln Thr Asn
420 425 430

Gln Thr Lys Gly Leu Leu Arg Ala Ala Ala Val Gly Ile Tyr Glu Gln
435 440 445

Tyr Leu Ser Glu Lys Ala Ser Pro Arg Val Thr Val Asp Asp Tyr Leu
450 455 460

Val Ala Lys Leu Ala Asp Thr Leu Asn His Glu Asp Pro Thr Pro Glu
465 470 475 480

Ile Phe Asp Asp Ile Gln Arg Lys Val Tyr Glu Leu Met Leu Arg Asp
485 490 495

Glu Arg Phe Tyr Pro Ser Phe Arg Gln Asn Ala Leu Tyr Val Arg Met
500 505 510

Leu Ala Glu Leu Asp Met Leu Lys Asp Pro Ser Phe Arg Gly Ser Asp
515 520 525

Asp Gly Asp Gly Glu Ser Phe Asn Gly Ser Pro Thr Gly Ser Ile Asn
530 535 540

Leu Ser Leu Asp Asp Leu Ser Asn Val Ser Ser Asp Asp Ser Val Gln

545 550 555 560

Leu His Ala Tyr Ile Ser Asp Thr Val Tyr Ala Asp Tyr Asp Pro Tyr

565 570 575

Ala Val Ala Gly Val Cys Asn Asp His Gly Lys Thr Tyr Ala Leu Tyr

580 585 590

Ala Ile Thr Val His Arg Arg Asn Leu Asn Ser Glu Glu Met Trp Lys

595 600 605

Thr Tyr Arg Arg Tyr Ser Asp Phe His Asp Phe His Met Arg Ile Thr

610 615 620

Glu Gln Phe Glu Ser Leu Ser Ser Ile Leu Lys Leu Pro Gly Lys Lys

625 630 635 640

Thr Phe Asn Asn Met Asp Arg Asp Phe Leu Glu Lys Arg Lys Lys Asp

645 650 655

Leu Asn Ala Tyr Leu Gln Leu Leu Leu Ala Pro Glu Met Met Lys Ala

660 665 670

Ser Pro Ala Leu Ala His Tyr Val Tyr Asp Phe Leu Glu Asn Lys Ala

675 680 685

Tyr Ser Lys Gly Lys Gly Asp Phe Ala Arg Lys Met Asp Thr Phe Val

690 695 700

Asn Pro Leu Arg Asn Ser Met Arg Asn Val Ser Asn Ala Val Lys Ser

705 710 715 720

Leu Pro Asp Ser Leu Ala Glu Gly Met Thr Lys Met Ser Asp Asn Met

725 730 735

Gly Lys Met Ser Glu Arg Leu Gly Gln Asp Ile Lys Gln Ser Phe Phe

740 745 750

Lys Val Pro Pro Leu Ile Pro Lys Thr Asp Ser Asp Pro Glu His Arg

755 760 765

Arg Val Ser Ala Gln Leu Asp Asp Asn Val Asp Asp Asn Ile Pro Leu

770 775 780

Arg Val Met Leu Leu Leu Met Asp Glu Val Phe Asp Leu Lys Glu Arg

785 790 795 800
 Asn Gln Trp Leu Arg Arg Asn Ile Lys Asn Leu Leu Gln Gln Leu Ile
 805 810 815
 Arg Ala Thr Tyr Gly Asp Thr Ile Asn Arg Lys Ile Val Asp His Val
 820 825 830
 Asp Trp Met Thr Ser Pro Glu Gln Val Ala Asp Ser Val Lys Arg Phe

 835 840 845
 Arg Asp Ala Phe Trp Pro Asn Gly Ile Leu Ala Glu Ala Val Pro Cys
 850 855 860
 Arg Asp Lys Ser Ile Arg Met Arg Thr Arg Val Ala Gly Lys Thr Lys
 865 870 875 880
 Leu Leu Ala Ile Met Pro Asp Glu Leu Lys His Ile Ile Gly Ala Glu
 885 890 895
 Thr Thr Arg Lys Gly Ile Leu Arg Val Phe Glu Met Phe Gln His Asn
 900 905 910

 Gln Leu Asn Arg Arg Met Val Tyr Val Phe Leu Glu Gly Phe Leu Glu
 915 920 925
 Thr Leu Phe Pro Gln Tyr Lys Phe Arg Glu Leu Phe Asn Lys Leu His
 930 935 940
 Ser Arg Ser Lys Gln Met Gln Lys Tyr Lys Gln Lys Leu Gln Thr Thr
 945 950 955 960
 Gln Ala Pro Ser Leu Gln Lys Arg
 965

 <210> 57
 <211> 292
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 57

 Met Gly Glu Lys Ser Glu Asn Cys Gly Val Pro Glu Asp Leu Leu Asn
 1 5 10 15
 Gly Leu Lys Val Thr Asp Thr Gln Glu Ala Glu Cys Ala Gly Pro Pro
 20 25 30

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

275 280 285

Asn Asn Asn Arg

290

<210> 58

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

Asp Arg Val Tyr Ile His Pro Phe

1 5

<210> 59

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

Met Asp Ser Lys Gly Ser Ser Gln Lys Gly Ser Arg Leu Leu Leu Leu

1 5 10 15

Leu Val Val Ser Asn Leu Leu Leu Cys Gln Gly Val Val Ser

20 25 30

<210>

> 60

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

Gly Cys Met Ser Cys Lys Cys Val Leu Ser

1 5 10

<210> 61

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

Gly Cys Met Gly Leu Pro Cys Val Val Met

1 5 10

<210> 62
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 62
 Cys Val Lys Ile Lys Lys Cys Ile Ile Met
 1 5 10

<210> 63
 <211> 14

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 63
 Lys Lys Lys Lys Lys Lys Ser Lys Thr Lys Cys Val Ile Met
 1 5 10