



(19) 대한민국특허청(KR)
 (12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년03월05일
 (11) 등록번호 10-1834574
 (24) 등록일자 2018년02월26일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/542 (2006.01) *C12N 15/81* (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2011-7020119
- (22) 출원일자(국제) 2010년01월28일
 심사청구일자 2015년01월27일
- (85) 번역문제출일자 2011년08월29일
- (65) 공개번호 10-2011-0125228
- (43) 공개일자 2011년11월18일
- (86) 국제출원번호 PCT/AU2010/000080
- (87) 국제공개번호 WO 2010/085844
 국제공개일자 2010년08월05일
- (30) 우선권주장
 61/148,271 2009년01월29일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
 WO2004057333 A1*
 Journal of Endocrinology, (2008), 196, pp
 435-453.*
 WO2006086883 A1

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
 커먼웰쓰 사이언티픽 앤드 인더스트리얼 리서치
 오가니제이션
 오스트레일리아 오스트레일리안 캐피탈 테리토리
 2601 액턴 클러리즈 로스 스트리트
- (72) 발명자
 트로웰 스테펜 찰스
 오스트레일리아 2903 오스트레일리안 캐피탈 테리
 토리 옥슬리 패렐리 클로즈 3
 혼 아이렌 매리
 오스트레일리아 2582 뉴 사우쓰 웨일스 앤스 로시
 스트리트 81
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
 김태홍

전체 청구항 수 : 총 11 항

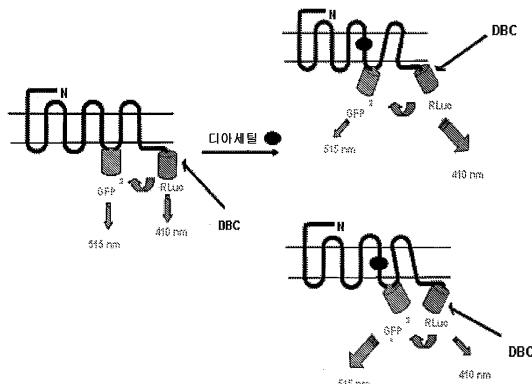
심사관 : 양경식

(54) 발명의 명칭 G 단백질 커플링 수용체 활성화 측정

(57) 요약

본 발명은 샘플에서 화합물을 검출하기 위한 방법 및 폴리펩ти드에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 세포에서 발현시 G 단백질 커플링 수용체, 또는 이의 서브유닛의 N 말단은 세포 외부에 존재하고 C 말단은 세포 내부에 존재하며, 화합물에 결합할 수 있는, 지질 이중층에 내포된 1 이상의 G 단백질 커플링 수용체를 포함하는 세포 무함유 조성물의 용도에 관한 것이다. 경우에 따라, 조성물은 또한 G 단백질 커플링 수용체의 세포내 루프 및/또는 C 말단에 직접 또는 간접 결합하는 1 이상의 보조 분자를 포함한다. G 단백질 커플링 수용체, 및/또는 존재시 보조 분자는, 조합하여 생물발광성 단백질 및 억셉터 분자를 포함하고, 생물발광성 공명 에너지 전달(BRET)을 사용하여 수용체에 결합한 화합물을 검출할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

다크레스 헬렌

오스트레일리아 2606 오스트레일리안 캐피탈 테리
토리 라이온스 타랄레아 크레센트 10

레잇치 버지니아

오스트레일리아 2617 오스트레일리아 캐피탈 테리
토리 벨코넨 몰든 코트 5

명세서

청구범위

청구항 1

화합물을 검출하는 방법으로서,

i) 지질 이중층에 내포되어 있고, 화합물에 결합할 수 있는 1 이상의 G 단백질 커플링 수용체를 포함하는 세포 무함유 조성물과 샘플을 접촉시키는 단계로서, 상기 G 단백질 커플링 수용체는 동일하거나 또는 상이한 1 이상의 서브유닛을 포함하고, G 단백질 커플링 수용체의 1 이상의 서브유닛은 생물발광성 단백질 및 억셉터 분자를 포함하는 것인 단계,

ii) 단계 i)과 동시에 또는 순차적으로, 생물발광성 단백질의 기질을 제공하여, 생물발광성 단백질이 기질을 변형시키도록 하는 단계,

iii) 단계 ii)에서 생물발광성 단백질과 억셉터 분자간 생물발광 공명 에너지 전달(BRET)이 조정되는지 여부를 결정하는 단계로서, 화합물이 G 단백질 커플링 수용체에 결합할 경우 억셉터 분자에 대하여 생물발광성 단백질의 공간적 위치 및/또는 쌍극자 배향이 변경되고, 세포에서 발현시 G 단백질 커플링 수용체, 또는 이의 서브유닛의 N 말단은 세포 외부에 존재하고 C 말단은 세포 내부에 존재하고, BRET 비율의 변화 진폭은 샘플 내 화합물의 상대량을 나타내는 것인 단계를 포함하고,

a) 생물발광성 단백질은 서브유닛의 제5 비경막 루프의 일부를 형성하고, 억셉터 분자는 C 말단의 일부를 형성하거나, 또는

b) 억셉터 분자는 서브유닛의 제5 비경막 루프의 일부를 형성하고, 생물발광성 단백질은 C 말단의 일부를 형성하고,

이 방법은 비생물발광성 단백질이 도너 분자로 사용되고 형광발광 공명 에너지 전달(FRET)의 조정이 결정된 경우보다 적어도 2배 더 민감한 것인 검출 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 미세유체법을 이용해 수행되는 것인 검출 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 생물발광성 단백질 및 억셉터 분자의 포스터(Forster) 길이는 6.8 nm 내지 7.6 nm인 검출 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 생물발광성 단백질 및 억셉터 분자의 포스터 길이는 7.5 nm인 검출 방법.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, i) 서브유닛은 제1 G 단백질 커플링 수용체 서브유닛의 N 말단 및 제1 경막 도메인의 적어도 대부분, 제2 G 단백질 커플링 수용체 서브유닛의 제1 비경막 루프의 적어도 대부분 내지 제5 경막 도메인의 적어도 대부분, 및 제1 G 단백질 커플링 수용체 서브유닛의 제5 비경막 루프의 적어도 대부분 내지 C 말단을 포함하거나, 또는

ii) 서브유닛은 제1 G 단백질 커플링 수용체 서브유닛의 N 말단 내지 제5 경막 도메인의 적어도 대부분, 및 제2 G 단백질 커플링 수용체 서브유닛의 제5 비경막 루프의 적어도 대부분 내지 C 말단을 포함하는 것인 검출 방법.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, i) 생물발광성 단백질은 루시페라제이고/이거나, ii) 기질은 루시페린, 코엘렌테라진, 또는 코엘렌테라진의 유도체이고/이거나, iii) 단백질인 억셉터 분자는 녹색 형광발광 단백질(GFP) 또는 이

의 어느 하나의 생물학적 활성 변이체 또는 단편인 검출 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 루시페라제는 레닐라(*Renilla*) 루시페라제이고, 억셉터 분자는 GFP이고, 기질은 코엘렌테라진 400a인 검출 방법.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, i) 세포 무함유 조성물은 재조합 세포에서 G 단백질 커플링 수용체를 생성시키고 세포막을 파괴하여 얻어지거나, 또는 ii) G 단백질 커플링 수용체는 리포솜의 지질 이중층에 내포되는 것인 검출 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 재조합 세포는 효모 세포인 검출 방법.

청구항 10

제1항 또는 제2항에 있어서, i) G 단백질 커플링 수용체는 후각 수용체이거나, 또는 ii) 서브유닛은 2 이상의 상이한 G 단백질 커플링 수용체 서브유닛 일부분의 키메라인 검출 방법.

청구항 11

G 단백질 커플링 수용체에 결합하는 화합물을 스크리닝하기 위한 방법으로서,

i) 지질 이중층에 내포되어 있고, 화합물에 결합할 수 있는 1 이상의 G 단백질 커플링 수용체를 포함하는 세포 무함유 조성물과 후보 화합물을 접촉시키는 단계로서, G 단백질 커플링 수용체는 동일하거나 또는 상이한 1 이상의 서브유닛을 포함하고, G 단백질 커플링 수용체의 1 이상의 서브유닛은 생물발광성 단백질 및 억셉터 분자를 포함하는 것인 단계,

ii) 단계 i)과 동시에 또는 순차적으로, 생물발광성 단백질의 기질을 제공하여, 생물발광성 단백질이 기질을 변형시키도록 하는 단계,

iii) 단계 ii)에서 생물발광성 단백질과 억셉터 분자간 생물발광성 공명 에너지 전달(BRET)이 조정되는지 여부를 결정하는 단계로서, BRET의 조정은 화합물이 G 단백질 커플링 수용체에 결합하는 것을 나타내며, 세포에서 발현시 G 단백질 커플링 수용체, 또는 이의 서브유닛의 N 말단은 세포 외부에 존재하고 C 말단은 세포 내부에 존재하고, BRET 비율의 변화 진폭은 샘플 내 화합물의 상대량을 나타내는 것인 단계를 포함하고,

a) 생물발광성 단백질은 서브유닛의 제5 비경막 루프의 일부를 형성하고, 억셉터 분자는 C 말단의 일부를 형성하거나, 또는

b) 억셉터 분자는 서브유닛의 제5 비경막 루프의 일부를 형성하고, 생물발광성 단백질은 C 말단의 일부를 형성하고,

이 방법은 비생물발광성 단백질이 도너 분자로 사용되고 형광발광 공명 에너지 전달(FRET)의 조정이 결정된 경우보다 적어도 2배 더 민감한 것인 스크리닝 방법.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 샘플에서 화합물을 검출하기 위한 방법 및 폴리펩티드에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 세포에서 발현시 G 단백질 커플링 수용체, 또는 이의 서브유닛의 N 말단은 세포 외부에 존재하고 C 말단은 세포 내부에 존재하며, 화합물에 결합할 수 있는, 지질 이중층에 내포된 1 이상의 G 단백질 커플링 수용체를 포함하는 세포 무함유 조성물의 용도에 관한 것이다. 경우에 따라, 조성물은 또한 G 단백질 커플링 수용체의 세포내 루프 및/또는 C 말단에 직접 또는 간접 결합하는 1 이상의 보조 분자를 포함한다. G 단백질 커플링 수용체, 및/또는 존재시 보조 분자는, 조합하여 생물발광성 단백질 및 억셉터 분자를 포함하고, 상기 수용체에 결합하는 화합물을 검출하는데 있어 생물발광 공명 에너지 전달(BRET)을 이용할 수 있게 한다.

배경 기술

[0002]

G 단백질 커플링 수용체(GPCR)는 세포 외부의 분자를 감지하여 내부 신호 전달 경로, 및 궁극적으로 세포 반응을 활성화시키는 경막 수용체 패밀리이다. GPCR은 효모와 동물을 포함하여 진핵생물에서만 발견된다. GPCR에 결

합하여 활성화시키는 리간드는 감광성 화합물, 냄새, 폐로몬, 호르몬 및 신경전달물질이 포함되며, 그 크기는 소형 분자에서 웹티드 내지 거대 단백질까지 다양하다. G 단백질 커플링 수용체는 수많은 질환에 관여하며, 또한 치료 약물의 표적이다.

[0003] 척추동물 및 예쁜 꼬마 선충(*C. elegans*) 후각 수용체(OR)는 G 단백질 커플링 수용체(GPCR) 패밀리의 구성원이다(Buck et al., 1991; Troemel et al., 1995). GPCR은 막의 세포외부 쪽에 존재하는 것으로 추정되는 리간드 결합 도메인과 세포내 쪽에 존재하는 G 단백질 결합 도메인을 갖는 그들의 7개 경막 스패닝 도메인으로 특징지워진다. 수용체가 리간드에 결합하면, 입체구조 변화가 수용체에 일어나 그에 의해 이종삼량체 G 단백질이 활성화된다(Kobilka et al., 2007). 다음으로, 활성화된 G 단백질이 신호 전달 경로 예컨대 구아닐 시클라제 또는 포스포리파제 C 경로를 활성화시켜서, 신호가 고등 프로세싱 중심부로 전달될 수 있게 된다(Gaillard et al., 2004).

[0004] 포스터 공명 에너지 전달, 또는 간단히 공명 에너지 전달(RET)은 여기 상태 도너 분자로부터 바닥 상태 억셉터 분자에게로 에너지의 비방사성 전달이다(Ghanouni et al., 2001). 에너지 전달 효율은 도너와 억셉터간 거리, 스펙트럼 중첩 정도 및 억셉터와 도너 쌍극자의 상대적 배향에 의존적이다. 분자내 RET를 이용하여 GPCR 활성화를 모니터링했던 이전 경우들은 형광발광 공명 에너지 전달법(FRET)이라고 불리는 방법으로, 형광발광성 도너와 억셉터를 이용하였다. 대부분의 경우에서, 형광발광 도너와 억셉터 둘 모두는 애쿠오리아 빅토리아(*Aequoria victoria*) 유래의 녹색 형광발광 단백질(GFP)의 유전자조작 변이체이다(Tsien, 1998). 가장 광범위하게 사용되는 FRET 쌍은 도너로서 시안 형광발광 단백질(CFP)과 억셉터로서 황색 형광발광 단백질(YFP)(Piston and Kremers, 2007)이고, 이러한 FRET 시스템은 이전에 다수의 GPCR에 의한 직접 리간드 결합을 정량하는데 사용되었다(Lohse et al., 2003 and 2007; Vilardaga et al., 2003; Rochais et al., 2007; Lisenbee et al., 2007).

[0005] 수용체 활성화를 모니터링하는 방법 중 하나는 각각 제3 세포내 루프 및 C 말단 내 삽입부에서 CFP 및 YFP로 단일 GPCR을 이중 표지화하는 것을 포함한다. 436 nm의 광으로 CFP 여기는 480 nm에서 CFP 발광과, 535 nm에서 발광하는 YFP에 대한 FRET를 일으킨다. FRET의 효율은 도너와 억셉터간 거리의 6승에 따라 다양하며, GPCR의 입체구조 변화에 대해 매우 민감한 지표를 제공한다. 이는 온전한 세포에서 α 2AR, 부갑상선 호르몬 수용체(PTHR), β 1-AR 및 세크리틴 수용체를 이용해 검증되었다. 작용제 노르아드레날린과 α 2AR의 상호작용(Lohse et al., 2003), 부갑상선 호르몬과 PTHR의 상호작용(Vilardaga et al., 2003), 노르에피네프린과 β 1-AR의 상호작용(Rochais et al., 2007) 및 세크리틴과 세크리틴 수용체의 상호작용(Lisenbee et al., 2007)은 CFP와 YFP간 거리를 변화시켜 FRET 신호가 변화되었다.

[0006] FRET 시스템에서, F1AsH(Fluorescein arsenical hairpin binder)로 YFP 억셉터의 교체(Hoffman et al., 2005; Nakanishi et al., 2006)는 α 2-아드레날린작용성 수용체 활성화를 모니터링에 사용시 CFP/YFP 시스템과 비교하여 작용제 유도 FRET 신호를 5배 더 높게 증가시켰다(Nakanishi et al., 2006). 그러나, F1AsH는 광범위한 연구 집단에서는 그 사용이 제한되는 보다 어려운 표지화 및 세척 절차를 포함한다. CFP/YFP 시스템은 분자내 입체구조 변화를 모니터링하기 위해 가장 빈번하게 보고된 FRET 시스템이다. FRET와 관련된 주요 단점은 도너 형광단을 활성화시키기 위한 광원이 필요하다는 점이다(Piston and Kremers, 2007). 이로 인해 도너 여기 과장에서 원치않는 억셉터의 직접 여기가 초래된다(이러한 문제를 "상호간섭(cross-talk)"이라함).

[0007] 생물발광 공명 에너지 전달(BRET)에서는, FRET의 도너 형광단이 루시페라제로 교체되고 억셉터는 임의의 적절한 형광단일 수 있다. 루시페라제의 사용은 기질의 부가로 생물발광 방출 그리고 그에 따라, RET가 개시되므로 조명이 필요없다. BRET의 2가지 공통 수단은 GFP 돌연변이체, YFP(BRET¹; $\lambda_{em} = \sim 530$ nm) 또는 GFP²(BRET²; $\lambda_{em} = \sim 510$ nm)에 커플링된 도너 시스템으로서 코엘렌테라진 H (BRET¹; $\lambda_{em} = \sim 475$ nm) 또는 코엘렌테라진 400a(Clz400a) 기질(BRET²; $\lambda_{em} = \sim 395$ nm)과 레닐라(*Renilla*a) 루시페라제(RLuc)를 포함한다. BRET² 시스템은 양자 수율의 손실로 BRET¹ 시스템에 대해 ~ 55 nm와 비교하여 ~ 115 nm의 우수한 도너 및 억셉터 발광 피크간 스펙트럼 분리성을 제공한다(Pfleger and Eidne et al., 2006).

[0008] 후각 수용체를 이용한 FRET는 이전에 오직 클래스 A(α_2 -아드레날린작용성 및 부갑상선 호르몬,(Vilardaga et al., 2003)) 및 클래스 B(세크리틴,(Lisenbee et al., 2007)) GPCR에 대해서만 검증되었다. GPCR 클래스 A에 속하는, 포유동물 OR과 달리, 선충 OR(Robertson, 1998 and 2001)은 이를 클래스 어디에도 속하지 않고, 진화적으로 구조적으로 별개이다. 또한, GPCR 수퍼패밀리 클래스 A에 속하는 포유동물 OR을 포함하여 모든 OR은 그들

발현 면에서 비정형적이다. 대체로, 이들 단백질은 화학감각 계통에서 유래된 뉴런 외에서는 기능적으로 발현될 수 없다. 그 존재가 포유동물 및 선충 OR의 올바른 발현을 위해 요구되는 다수의 보조 단백질이 동정되었다.

[0009] 따라서, 예를 들어, 바이오센서에서 사용하기 위한 G 단백질 커플링 수용체에 결합하는 화합물을 검출할 수 있는 적절하게 민감한 방법 및 문자가 요구된다.

발명의 내용

[0010] 본 발명자들은 놀랍게도, 표적 화합물을 검출하기 위해, 키메라 G 단백질 커플링 수용체(GPCR), 예컨대 후각 수용체(OR)를 이용하는 세포 무함유 생물발광 공명 에너지 전달(BRET)이 전체 세포를 이용하는 BRET 또는 FRET 등의 다른 검출 방법보다 더욱 민감하다는 것을 확인하였다.

[0011] 따라서, 본 발명의 제1 측면에서는, 화합물을 검출하는 방법을 제공하고, 이 방법은

[0012] i) a) 지질 이중층에 내포되어 있고, 화합물에 결합할 수 있는 1 이상의 G 단백질 커플링 수용체, 및

[0013] b) 경우에 따라, G 단백질 커플링 수용체의 세포내 루프 및/또는 C 말단에 직접 또는 간접 결합하는 1 이상의 보조 문자

[0014] 를 포함하는 세포 무함유 조성물과 샘플을 접촉시키는 단계로서, G 단백질 커플링 수용체는 동일하거나 또는 상이한 1 이상의 서브유닛을 포함하고, G 단백질 커플링 수용체 및/또는 존재할 경우 보조 문자는, 조합하여 생물발광성 단백질 및 억셉터 문자를 포함하는 것인 단계,

[0015] ii) 단계 i)과 동시에 또는 순차적으로, 생물발광성 단백질의 기질을 제공하여, 생물발광성 단백질이 기질을 변형시키도록 하는 단계,

[0016] iii) 단계 ii)에서 생물발광성 단백질과 억셉터 문자간 생물발광 공명 에너지 전달(BRET)이 조정되는지 여부를 결정하는 단계로서,

[0017] 화합물이 G 단백질 커플링 수용체에 결합시 억셉터 문자에 대하여 생물발광성 단백질의 공간적 위치 및/또는 쌍극자 배향이 변경되고, 세포에서 발현시 G 단백질 커플링 수용체, 또는 이의 서브유닛의 N 말단은 세포 외부에 존재하고, C 말단은 세포 내부에 존재하는 것인 단계

[0018] 를 포함한다.

[0019] 일 구체예에서, 화합물에 결합할 수 있는 G 단백질 커플링 수용체의 서브유닛은

[0020] i) 생물발광성 단백질, 및

[0021] ii) 억셉터 문자

[0022] 를 포함하고, 화합물이 서브유닛에 결합시 억셉터 문자에 대한 생물발광성 단백질의 공간적 위치 및/또는 쌍극자 배향이 변경된다. 예를 들어, 서브유닛은

[0023] i) 서열번호 13, 15, 52 또는 54로 제공된 아미노산 서열, 또는

[0024] ii) 서열번호 13, 15, 52 또는 54 중 어느 1 이상과 40% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0025] 다른 구체예에서, G 단백질 커플링 수용체는

[0026] i) a) 생물발광성 단백질, 및

[0027] b) 억셉터 문자

[0028] 를 포함하는 제1 서브유닛, 및

[0029] ii) 화합물에 결합할 수 있는 제2 서브유닛

[0030] 을 포함하고, 화합물이 제2 서브유닛에 결합시 억셉터 문자에 대한 생물발광성 단백질의 공간적 위치 및/또는 쌍극자 배향이 변경된다.

[0031] 추가 구체예에서,

[0032] i) 생물발광성 단백질은 서브유닛의 제3 비경막 루프의 일부를 형성하고, 억셉터 문자은 제5 비경막 루프의 일부를 형성하거나, 또는

- [0033] ii) 억셉터 분자는 서브유닛의 제3 비경막 루프의 일부를 형성하고, 생물발광성 단백질은 제5 비경막 루프의 일부를 형성하거나, 또는
- [0034] iii) 생물발광성 단백질은 서브유닛의 제1 비경막 루프의 일부를 형성하고, 억셉터 분자는 제3 비경막 루프의 일부를 형성하거나, 또는
- [0035] iv) 억셉터 분자는 서브유닛의 제1 비경막 루프의 일부를 형성하고, 생물발광성 단백질은 제3 비경막 루프의 일부를 형성하거나, 또는
- [0036] v) 생물발광성 단백질은 서브유닛의 제5 비경막 루프의 일부를 형성하고, 억셉터 분자는 C 말단의 일부를 형성하거나, 또는
- [0037] vi) 억셉터 분자는 서브유닛의 제5 비경막 루프의 일부를 형성하고, 생물발광성 단백질은 C 말단의 일부를 형성한다.
- [0038] 또 다른 구체예에서, G 단백질 커플링 수용체는
- [0039] i) 생물발광성 단백질을 포함하는 제1 서브유닛, 및
- [0040] ii) 억셉터 분자를 포함하는 제2 서브유닛
- [0041] 을 포함한다. 예를 들어, 제1 또는 제2 서브유닛은
- [0042] i) 서열번호 17 또는 19로 제공된 아미노산 서열, 또는
- [0043] ii) 서열번호 17 및/또는 19와 40% 이상 동일한 아미노산 서열
- [0044] 을 포함할 수 있다.
- [0045] 일 구체예에서,
- [0046] i) 생물발광성 단백질은 제1 서브유닛의 제3 비경막 루프의 일부를 형성하고, 억셉터 분자는 제2 서브유닛의 제5 비경막 루프의 일부를 형성하거나, 또는
- [0047] ii) 억셉터 분자는 제1 서브유닛의 제3 비경막 루프의 일부를 형성하고, 생물발광성 단백질은 제2 서브유닛의 제5 비경막 루프의 일부를 형성하거나, 또는
- [0048] iii) 생물발광성 단백질은 제1 서브유닛의 제1 비경막 루프의 일부를 형성하고, 억셉터 분자는 제2 서브유닛의 제3 비경막 루프의 일부를 형성하거나, 또는
- [0049] iv) 억셉터 분자는 제1 서브유닛의 제1 비경막 루프의 일부를 형성하고, 생물발광성 단백질은 제2 서브유닛의 제3 비경막 루프의 일부를 형성하거나, 또는
- [0050] v) 생물발광성 단백질은 제1 서브유닛의 제5 비경막 루프의 일부를 형성하고, 억셉터 분자는 제2 서브유닛의 C 말단의 일부를 형성하거나, 또는
- [0051] vi) 억셉터 분자는 제1 서브유닛의 제5 비경막 루프의 일부를 형성하고, 생물발광성 단백질은 제2 서브유닛의 C 말단의 일부를 형성한다.
- [0052] 또 다른 구체예에서,
- [0053] i) G 단백질 커플링 수용체는 생물발광성 단백질을 포함하는 서브유닛을 포함하고, 보조 분자가 억셉터 분자를 포함하거나, 또는
- [0054] ii) G 단백질 커플링 수용체는 억셉터 분자를 포함하는 서브유닛을 포함하고, 보조 분자가 생물발광성 단백질을 포함한다.
- [0055] 다른 구체예에서, 보조 분자는
- [0056] i) 생물발광성 단백질, 및
- [0057] ii) 억셉터 분자
- [0058] 를 포함한다.
- [0059] 추가의 다른 구체예에서, 조성물은 2 이상의 보조 분자를 포함하고, 이때 제1 보조 분자가 생물발광성 단백질을

포함하며, 제2 보조 문자가 억셉터 문자를 포함한다.

[0060] 본 발명자들은 특히 본 발명이 FRET 세포무함유 및 BRET-전체 세포 검출 시스템과 비교하여 얼마나 우수한지 확인하였다. 따라서, 바람직한 구체예에서, 본 발명의 방법은 비생물발광성 단백질을 도너 분자로 사용하고 형광 발광 공명 에너지 전달(FRET)의 조정을 측정하는 경우보다 적어도 2배, 3배 또는 5배 더 민감하다. 추가의 바람직한 구체예에서, 본 발명의 방법은 세포 무함유 조성을 대신 온전한 세포에 존재하는 동일 G 단백질 커플링 수용체를 사용하는 방법의 경우보다 적어도 10배, 20배, 30배 또는 40배 더 강한 BRET 신호를 제공한다.

[0061] 클래스 A GPCR, 대체로 OR, 구체적으로는 선충 OR의 비정형적인 성질을 고려하면, 클래스 A GPCR과 BRET 도너 및 억셉터 태그를 포함하는 키메라가 a) 구조적 무결성을 보유하고, b) 후각자극제에 의한 수용체 활성화를 광학 신호로 변환시킬 수 있다는 것이 놀랍다. 따라서, 바람직한 구체예에서, G 단백질 커플링 수용체는 클래스 A GPCR이다. 추가의 바람직한 구체예에서, 클래스 A GPCR은 후각 수용체이다. 후각 수용체는 세포에서 발현시 수용체의 N 말단이 세포 외부에 존재하고 C 말단은 세포 내부에 존재하는 한 임의의 공급원에서 유래된 것일 수 있다. 예로는, 이에 제한되는 것은 아니고, 척색동물 수용체, 선충 수용체, 또는 이의 어느 하나의 생물학적 활성 변이체 또는 단편을 포함한다. 척색동물 수용체의 예로는 이에 제한되는 것은 아니고, 포유동물 수용체, 조류 수용체 및 어류 수용체를 포함한다. 바람직한 구체예에서, 후각 수용체는 선충 수용체 또는 이의 생물학적 활성 변이체 또는 단편이다. 구체예에서, 선충 수용체는 예쁜 꼬마 선충(*Caenorhabditis elegans*) 수용체, 또는 이의 생물학적 활성 변이체 또는 단편이다.

[0062] 구체예에서, 후각 수용체는

i) 서열번호 1 내지 6 중 어느 하나에 제공된 바와 같은 아미노산 서열, 및

ii) 서열번호 1 내지 6 중 어느 1 이상과 40% 이상 동일한 아미노산 서열

[0065] 을 포함한다.

[0066] 다른 구체예에서, 서브유닛은 2 이상의 상이한 G 단백질 커플링 수용체 서브유닛의 일부분의 키메라이다.

[0067] 보조 문자는 G 단백질 커플링 수용체와 직접으로 또는 간접적으로 회합하는 임의의 문자일 수 있다. 예로는, 제한없이, G 단백질 및 어레스틴을 포함한다.

[0068] BRET의 변화폭에 대한 화합물 농도 변화의 효과는 반응이 용량 의존적이라는 첫번째 증거를 제공해 주었다. 따라서, 바람직한 구체예에서, BRET의 수준은 샘플내 화합물의 상대량에 대한 지표이다.

[0069] 생물발광성 단백질의 예로는, 제한없이, 루시페라제, β -갈락토시다제, 락타마제, 홀스래디쉬 퍼옥시다제, 알칼리 포스파타제, β -글루쿠로니다제 또는 β -글루코시다제를 포함한다.

[0070] 루시페라제의 예로는 이에 제한되지 않고, 레닐라(*Renilla*) 루시페라제, 반딧불이 루시페라제, 강장동물 루시페라제, 북미 글로웜(North American glow worm) 루시페라제, 방아벌레 루시페라제, 철도 벌레(railroad worm) 루시페라제, 박테리아 루시페라제, 가우시아 루시페라제, 애쿠오린, 아라크노캄파(*Arachnocampa*) 루시페라제, 또는 이의 어느 하나의 생물학적 활성 변이체 또는 단편, 또는 이의 2 이상의 키메라가 포함된다.

[0071] 기질의 예로는, 이에 제한되지 않고, 딱정벌레 루시페린, 다른 루시페린, 코엘렌테라진, 또는 코엘렌테라진의 유도체가 포함된다. 또한, 일부 발광성 단백질 예컨대 애쿠오린 등의 경우, 기질은 칼슘 이온 등의 보조인자일 수 있다.

[0072] 일 구체예에서, 억셉터 문자는 단백질이고, 이의 예로는, 제한없이, 녹색 형광발광 단백질(GFP), GFP의 청색 형광발광 변이체(BFP), GFP의 시안 형광발광 변이체(CFP), GFP의 황색 형광발광 변이체(YFP), 강화 GFP(EGFP), 강화CFP(ECFP), 강화 YFP(EYFP), GFPS65T, 애메랄드, 토파즈, GFPuv, 탈안정화 EGFP(dEGFP), 탈안정화 ECFP(dECFP), 탈안정화 EYFP(dEYFP), HcRed, t-HcRed, DsRed, DsRed2, t-dimer2, t-dimer2(12), mRFP1, 포실로포린, 레닐라 GFP, 몬스터 GFP, paGFP, Kaede 단백질 또는 파이코빌리단백질, 또는 이의 어느 하나의 생물학적 활성 변이체 또는 단편이 포함된다.

[0073] 다른 구체예에서, 억셉터 문자는 비단백질이고, 이의 예로는, 제한없이, 알렉사 플루오르 염료, 보디파이 염료, Cy 염료, 플루오레세인, 단질, 염밸리페론, 형광발광성 미세구, 발광성 미세구, 형광발광성 나노결정, 마리나 블루, 캐스캐이드 블루, 캐스캐이드 엘로우, 페시픽 블루, 오레곤 그린, 테트라메틸로다민, 로다민, 텍사스 레드, 희토류 원소 칼레이트, 또는 이의 임의 조합 또는 유도체가 포함된다.

- [0074] 다른 구체예에서, 상기 방법은 단계 i) 또는 단계 ii)와 동시에 또는 순차적으로, 생물발광성 단백질의 보조인자를 제공하는 단계를 더 포함한다. 예로는, 제한없이 ATP, 마그네슘, 산소, FIvINiH₂, 칼슘, 또는 이의 어느 2 이상의 조합이 포함된다.
- [0075] 구체예에서, 세포 무함유 조성물은 재조합 세포에서 G 단백질 커플링 수용체를 생성시키고 이 세포의 막을 파괴하는 것에 의해 획득하였다.
- [0076] 구체예에서, 재조합 세포는 G 단백질 커플링 수용체와 회합된 임의의 비내생성 단백질을 생성하지 않는다.
- [0077] 세포 무함유 조성물을 획득할 수 있는 세포는 G 단백질 커플링 수용체를 발현하여 이 수용체를 자신의 세포막으로 도입시킬 수 있는 임의의 세포 유형이다. 특히 바람직한 구체예에서, 재조합 세포는 효모 세포이다.
- [0078] 다른 구체예에서, G 단백질 커플링 수용체는 리포솜의 지질 이중층에 내포된다.
- [0079] 추가 구체예에서, 상기 방법은 미세유체학을 이용해 수행된다.
- [0080] 다른 측면에서, 본 발명은 화합물을 검출하기 위한 정제 및/또는 재조합 폴리펩티드를 제공하며, 이 폴리펩티드는
- i) G 단백질 커플링 수용체의 서브유닛, 및
- [0082] ii) 생물발광성 단백질 및/또는 억셉터 분자
- [0083] 를 포함하고, 세포에서 발현시, 서브유닛의 N 말단은 세포 외부에 존재하고 C 말단은 세포 내부에 존재한다.
- [0084] 일 구체예에서, 폴리펩티드는 1 이상의 상이한 G 단백질 커플링 수용체 서브유닛을 포함하는 G 단백질 커플링 수용체, 및 경우에 따라 1 이상의 상이한 보조 분자인 단백질 복합체의 일부를 형성한다.
- [0085] 구체예에서,
- i) 생물발광성 단백질은 서브유닛의 제3 비경막 루프의 일부를 형성하고, 억셉터 분자는 제5 비경막 루프의 일부를 형성하거나, 또는
- [0087] ii) 억셉터 분자는 서브유닛의 제3 비경막 루프의 일부를 형성하고, 생물발광성 단백질은 제5 비경막 루프의 일부를 형성하거나, 또는
- iii) 생물발광성 단백질은 서브유닛의 제1 비경막 루프의 일부를 형성하고, 억셉터 분자는 제3 비경막 루프의 일부를 형성하거나, 또는
- [0089] iv) 억셉터 분자는 서브유닛의 제1 비경막 루프의 일부를 형성하고, 생물발광성 단백질은 제3 비경막 루프의 일부를 형성하거나, 또는
- v) 생물발광성 단백질은 서브유닛의 제5 비경막 루프의 일부를 형성하고, 억셉터 분자는 C 말단의 일부를 형성하거나, 또는
- [0091] vi) 억셉터 분자는 서브유닛의 제5 비경막 루프의 일부를 형성하고, 생물발광성 단백질은 C 말단의 일부를 형성하거나, 또는
- vii) 생물발광성 단백질 또는 억셉터 분자는 서브유닛의 제1 비경막 루프의 일부를 형성하거나, 또는
- [0093] viii) 생물발광성 단백질 또는 억셉터 분자는 서브유닛의 제3 비경막 루프의 일부를 형성하거나, 또는
- ix) 생물발광성 단백질 또는 억셉터 분자는 서브유닛의 제5 비경막 루프의 일부를 형성하거나, 또는
- [0095] x) 생물발광성 단백질 또는 억셉터 분자는 서브유닛의 C 말단의 일부를 형성한다.
- [0096] 추가 구체예에서, 폴리펩티드는 생물발광성 단백질 및 억셉터 분자를 포함하고, 화합물이 상기 폴리펩티드에 결합시 억셉터 분자에 대한 생물발광성 단백질의 공간적 위치 및/또는 쌍극자 배향이 변경된다.
- [0097] 다른 구체예에서, 폴리펩티드는 서브유닛 및 생물발광성 단백질을 포함하고, 이 폴리펩티드는 억셉터 분자를 포함하는 제2 폴리펩티드에 직접 또는 간접 결합하며, 화합물이 이 폴리펩티드 및/또는 제2 폴리펩티드에 결합시 억셉터 분자에 대한 생물발광성 단백질의 공간적 위치 및/또는 쌍극자 배향이 변경된다.
- [0098] 추가의 다른 구체예에서, 폴리펩티드는 서브유닛 및 억셉터 분자를 포함하고, 이 폴리펩티드는 생물발광성 단백

질을 포함하는 제2 폴리펩티드에 직접 또는 간접 결합하며, 화합물이 이 폴리펩티드 및/또는 제2 폴리펩티드에 결합시 억셉터 분자에 대한 생물발광성 단백질의 공간적 위치 및/또는 쌍극자 배향이 변경된다.

[0099] 상기 2개 구체예에서, 제2 폴리펩티드는 G 단백질 커플링 수용체 서브유닛을 포함하거나(본원에 정의된 바와 같은 동종이량체 또는 이종이량체 또는 고급 다량체 형성을 위함) 또는 보조 분자를 포함한다.

[0100] 추가 측면에서, 본 발명은 화합물을 검출하기 위한 정제 및/또는 재조합 폴리펩티드를 제공하고, 이 폴리펩티드는

i) G 단백질 커플링 수용체의 세포내 루프 및/또는 C 말단에 직접 또는 간접 결합하는 보조 분자, 및

ii) 생물발광성 단백질 및/또는 억셉터 분자

를 포함하고, 세포에서 발현시 G 단백질 커플링 수용체, 또는 이의 서브유닛의 N 말단은 세포 외부에 존재하고 C 말단은 세포 내부에 존재한다.

[0104] 숙련가가 이해하게 되는 바와 같이, 검출 방법에 관한 상기 많은 구체예들은 또한 본 발명의 폴리펩티드 측면에 적용된다.

[0105] 또한, 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 단리 및/또는 외생성 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0106] 구체예에서, 폴리뉴클레오티드는

i) 서열번호 7 내지 12, 14, 16, 18, 20, 51 또는 53 중 어느 하나에 제공된 바와 같은 뉴클레오티드 서열, 또는

ii) 서열번호 7 내지 12, 14, 16, 18, 20, 51 또는 53 중 어느 1 이상과 40% 이상 동일한 뉴클레오티드 서열

[0109] 을 포함한다.

[0110] 다른 측면에서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다. 바람직한 구체예에서, 폴리뉴클레오티드는 프로모터에 작동적으로 연결된다.

[0111] 추가 측면에서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드 및/또는 본 발명의 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다.

[0112] 바람직하게, 숙주 세포는 본 발명의 폴리펩티드를 생성하고, 따라서 이를 포함한다.

[0113] 숙주 세포는 임의의 세포 유형일 수 있다.

[0114] 본 발명은 또한 효모 막에서, 포유동물 후각 수용체와 진화적으로 상이한, 선충 후각 수용체의 기능적 발현을 처음으로 보여주었다. 따라서, 바람직한 구체예에서, 숙주 세포는 효모 세포이다.

[0115] 추가 측면에서, 본 발명은 본 발명의 폴리펩티드, 본 발명의 폴리뉴클레오티드, 본 발명의 벡터, 및/또는 본 발명의 숙주 세포를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0116] 바람직하게, 폴리펩티드는 지질 이중층에 내포된다.

[0117] 또한, 세포 무함유 조성물을 제공하고, 이 조성물은

i) G 단백질 커플링 수용체 서브유닛을 포함하고, 지질 이중층에 내포되어 있는 본 발명의 폴리펩티드, 및/또는

ii) G 단백질 커플링 수용체의 세포내 루프 및/또는 C 말단에 직접 또는 간접 결합하는 보조 분자를 포함하는 본 발명의 폴리펩티드로서, G 단백질 커플링 수용체는 지질 이중층에 내포되어 있고, 세포에서 발현시 G 단백질 커플링 수용체, 또는 이의 서브유닛의 N 말단은 세포 외부에 존재하고, C 말단은 세포 내부에 존재하는 것인 폴리펩티드

[0120] 를 포함한다.

[0121] 바람직하게, 지질 이중층은 효모 지질 이중층이다.

[0122] 구체예에서, 세포 무함유 조성물은 생물발광성 단백질의 기질 및/또는 생물발광성 단백질의 보조 인자를 더 포함한다.

[0123] 당분야의 숙련가가 이해하는 바와 같이, 검출 방법에 대한 상기 많은 구체예들은 본 발명의 세포 무함유 측면에도 적용된다.

- [0124] 추가 측면에서, 본 발명은 본 발명의 세포 무함유 조성물을 제조하는 방법을 제공하고, 이 방법은 본 발명의 세포를 획득하여 세포의 막을 파괴하는 것을 포함한다.
- [0125] 구체예에서, 세포는 투과되거나 또는 용균된다.
- [0126] 구체예에서, 세포는 프랜치 프레스에서 용균된다.
- [0127] 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 폴리펩티드, 본 발명의 숙주 세포, 본 발명의 조성물 및/또는 본 발명의 세포 무함유 조성물을 포함하는 바이오센서를 제공한다.
- [0128] 추가 측면에서, 본 발명은 G 단백질 커플링 수용체에 결합하는 화합물을 스크리닝하기 위한 방법을 제공하고, 이 방법은
- i) a) 지질 이중층에 내포되어 있고, 화합물에 결합할 수 있는 1 이상의 G 단백질 커플링 수용체, 및
 - b) 경우에 따라 G 단백질 커플링 수용체의 세포내 루프 및/또는 C 말단에 직접 또는 간접 결합하는 1 이상의 보조 분자
- [0131] 를 포함하는 세포 무함유 조성물과 후보 화합물을 접촉시키는 단계로서, G 단백질 커플링 수용체는 동일하거나 또는 상이한 1 이상의 서브유닛을 포함하고, G 단백질 커플링 수용체, 및/또는 존재시 보조 분자는, 조합하여 생물발광성 단백질 및 억셉터 분자를 포함하는 것인 단계,
- [0132] i) 단계 i)과 동시에 또는 순차적으로, 생물발광성 단백질의 기질을 제공하여, 생물발광성 단백질이 기질을 변형시키도록 하는 단계,
- [0133] iii) 단계 ii)에서 생물발광성 단백질과 억셉터 분자간 생물발광 공명 에너지 전달(BRET)가 조정되는지 여부를 결정하는 단계로서,
- [0134] BRET의 조정은 화합물이 G 단백질 커플링 수용체에 결합함을 의미하며, 세포에서 발현시 G 단백질 커플링 수용체, 또는 이의 서브유닛의 N 말단은 세포 외부에 존재하고, C 말단은 세포 내부에 존재하는 것인 단계
- [0135] 를 포함한다.
- [0136] 숙련가가 이해하게 되는 바와 같이, 검출 방법에 대한 상기 많은 구체예는 본 발명의 스크리닝 방법 측면에도 적용된다.
- [0137] 추가 측면에서, 본 발명은 본 발명의 폴리펩티드, 본 발명의 폴리뉴클레오티드 본 발명의 벡터, 본 발명의 숙주 세포, 본 발명의 조성물, 본 발명의 세포 무함유 조성물, 및/또는 본 발명의 바이오센서를 포함하는 키트를 제공한다.
- [0138] 명확하게, 본 발명의 일 측면의 바람직한 특징 및 특성은 본 발명의 다른 많은 측면에도 적용할 수 있다.
- [0139] 명세서 전반에서, 용어 "포함하다", 또는 "포함하는" 또는 "포함하여" 등의 이의 별형은 언급한 성분, 정수 또는 단계, 성분, 정수 또는 단계의 그룹이 포함되는 것을 의미하지만, 임의의 다른 성분, 정수 또는 단계, 또는 성분, 정수 또는 단계의 그룹을 배제하려는 의미가 아니다.
- [0140] 본 발명을 이하의 비제한적인 실시예와 첨부된 도면을 참조하여 설명한다.

도면의 간단한 설명

- [0141] 도 1은 GFP² 및 RLuc에 융합된 ODR-10 수용체에서의 공명 에너지 전달 원리를 도시한 도면이다. GFP²는 GPCR의 제3 세포내 루프에 삽입되고 RLuc는 C 말단에 삽입된다. 디아세틸 결합 결과 입체구조 변화가 일어나서 RLuc와 GFP 간 거리가 감소(상층 우), 또는 증가(하층 우)되거나 또는 그들의 발색단 쌍극자의 상태 배향이 변화되어, 용량 의존적 방식으로 BRET² 신호가 변경된다.
- 도 2는 물 또는 리간드의(A) μM (평균 ± SEM, n=2) 및(B) nM (평균 ± SEM, n=6) 농도에 대한 OGOR의 반응을 도시한 도면이다(*는 물과 비교한 유의적인 편차($P \leq 0.05$)를 나타냄).
- 도 3은 물 단독과 비교하여 리간드의(A) μM (평균 ± SEM, n=2) 및(B) nM (평균 ± SEM, n=6) 농도에 대한 OGOR의 BRET² 비율(%) 변화를 도시한 도면이다.

도 4는 OGOR BRET² 반응의 디아세틸 농도 의존성(평균 ± SEM, n=12)을 도시한 도면이다.

도 5는 물 또는 수중 1 μM 디아세틸에 대한 OGOR(평균 ± SEM, n=3) 및 OGOR 돌연변이체(평균 ± SEM, n=6)의 반응을 비교한 도면이다.

도 6은 물 또는 수중 1 μM의 디아세틸에 대한 OCOY(평균 ± SEM, n=5) 및 OGOR(평균 ± SEM, n=3)의 반응을 비교한 도면이다.

도 7은 상이한 농도의 디아세틸 부가시 OCOY의 스펙트럼 주사 결과를 도시한 도면이다. 상부: 미가공 데이터. 하부: 정규화(500 nm) 데이터.

도 8은 FRET(평균 ± SEM, n=5) 및 BRET²(평균 ± SEM, n=12) 둘 모두로 태깅된 ODR-10에 대한 정규화된 용량 반응 그래프를 나타내는 도면이다.

도 9는 LB 단독과 비교하여 LB 중 OP50 박테리아 배양물 또는 OP50 박테리아 상등액(LB)의 10 μl에 대한 TGTR의 반응을 보여주는 도면이다(평균 ± SD, n=3)(*는 LB와 비교한 유의 편차(P ≤ 0.05)를 의미함).

도 10은 물 또는 리간드의 μM(평균 ± SD, n=3) 농도에 대한 TGTR의 반응을 보여주는 도면이다((*는 물과 비교한 유의 편차(P ≤ 0.05)를 의미함).

도 11은 ODR-10 형질도입 카세트를 도시한 도면이다. 어두운 부분 - ODR-10 서열, 밝은 부분 - 가변성 수용체 리간드 결합 도메인. A) N-말단 가변 OR 서열. R루시페라제는 410 nm에서 발광으로 표시하고, GFP²는 515 nm에서 발광으로 표시한다.

도 12는 공초점 현미경(Ex488 nm, Leica SP2 공초점 레이저 주사 현미경)에 의한 odr-10 수용체 국재화 및 태깅된 odr-10 발현 수준을 보여주는 공동 발현된 odr-10-Rluc 및 odr-10-GFP2 효모 세포를 도시한 도면이다.

도 13은 생존 Invsc1 효모 세포에서의 선충 odr-10의 항상성 BRET²를 보여주는 도면이다. 모든 검사한 효모 균주는 15°C에서 24시간 동안 태깅된 odr-10 단백질을 발현하도록 유도시켰다. 에너지 전달 측정은 방법에 기술된 바와 같이 10 μM 코엘렌테라진 h(DeepBlueC)를 부가하고 Rluc 및 GFP2 필터 세팅된 이중 과장 미세평판 판독기에서 발광을 측정하는 것을 통해 생존 세포에서 수행하였다. 데이터는 2회의 독립 실험의 평균 ± StD로 나타냈다. Invsc1/odr-10-RLuc - 음성 대조군. Invsc1/odr-10-RLuc + Invsc1/odr-10-GFP2 - 개별 세포에서 OR 및 OG. 평판 판독을 위해 세포를 함께 혼합하였다 - 2개의 구성체가 개별 세포에서 발현되었기 때문에 BRET는 기대하지 않았다.

Invsc1/odr-10-RLuc; odr-10-GFP2 - 2개 구성체를 동일 세포에서 발현시켰다. BRET가 존재하였고, 따라서 이량 체화가 일어났다.

도 14는 면역침강법에 의한 Odr-10 올리고머의 검출 결과를 도시한 도면이다. 표시한 수용체를 공동발현하는 Invsc1 효모 세포로부터의 미정제 막을 가용화시키고 동량의 루시페라제 활성에 대해 조정하였다. 다음으로, 수용체를 항-GFP 항체를 이용해 면역침강시키고 침강물에서 루시페라제 활성을 측정하였다. 값은 최대량의 침강 루시페라제 활성의 %로서 나타냈다. 데이터는 2회의 생물학적 반복값의 평균이다.

도 15는 초원심분리 후 세포 무함유 막 조제물 100 μl 중 전체 세포 어세이 샘플 100 μl에 5 μM의 코엘렌테라진 400a를 부가시 BRET² 채널에서 측정한 광 출력값을 나타내는 도면이다.

도 16은 전체 세포 및 세포 무함유 어세이 시스템을 이용하여 모니터링된 1 μM의 디아세틸(평균 ± S.D., n=3)과 항온반응(45분)시 BRET² 신호를 나타내는 도면이다.

서열목록 설명:

서열번호 1 - 예쁜 꼬마 선충 Odr10 수용체.

서열번호 2 - 예쁜 꼬마 선충 Str1 12 수용체.

서열번호 3 - 예쁜 꼬마 선충 Str1 13 수용체.

서열번호 4 - 예쁜 꼬마 선충 Str1 14 수용체.

서열번호 5 - 예쁜 꼬마 선충 Str1 15 수용체.

서열번호 6 - 예쁜 꼬마 선충 Str1 16 수용체.

서열번호 7 - 예쁜 꼬마 선충 Odr10 수용체를 코딩하는 ORF.

서열번호 8 - 예쁜 꼬마 선충 Str1 12 수용체를 코딩하는 ORF.

서열번호 9 - 예쁜 꼬마 선충 Str1 13 수용체를 코딩하는 ORF.

서열번호 10 - 예쁜 꼬마 선충 Str1 14 수용체를 코딩하는 ORF.

서열번호 11 - 예쁜 꼬마 선충 Str1 15 수용체를 코딩하는 ORF.

서열번호 12 - 예쁜 꼬마 선충 Str1 16 수용체를 코딩하는 ORF.

서열번호 13 - 예쁜 꼬마 선충 Odr10 수용체, 제3 세포내 루프(제5 비경막 루프)에 삽입된 RLuc 및 C 말단에 삽입된 GFP를 포함하는 본 발명의 폴리펩티드.

서열번호 14 - 예쁜 꼬마 선충 Odr10 수용체, 제3 세포내 루프(제5 비경막 루프)에 삽입된 RLuc 및 C 말단에 삽입된 GFP를 포함하는 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 오픈 리딩 프레임.

서열번호 15 - 예쁜 꼬마 선충 Odr10 수용체, 제3 세포내 루프(제5 비경막 루프)에 삽입된 GFP 및 C 말단에 삽입된 RLuc를 포함하는 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 오픈 리딩 프레임.

서열번호 16 - 예쁜 꼬마 선충 Odr10 수용체, 제3 세포내 루프(제5 경막외 루프)에 삽입된 GFP 및 C 말단에 삽입된 RLuc를 포함하는 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 오픈 리딩 프레임.

서열번호 17 - 예쁜 꼬마 선충 Odr10 수용체 및 C 말단에 삽입된 RLuc를 포함하는 본 발명의 폴리펩티드.

서열번호 18 - C 말단에 삽입된 예쁜 꼬마 선충 Odr10 수용체 RLuc를 포함하는 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 오픈 리딩 프레임.

서열번호 21 내지 44 - 올리고뉴클레오티드 프라이머.

서열번호 45 - mCitrine 유도체.

서열번호 46 - mCFP 유도체.

서열번호 47 - mCitrine 유도체를 코딩하는 오픈 리딩 프레임.

서열번호 48 - mCFP 유도체를 코딩하는 오픈 리딩 프레임.

서열번호 49 - Odr10 FRET 이중 표지화 융합 단백질을 코딩하는 오픈 리딩 프레임.

서열번호 50 - Odr10 FRET 이중 표지화 융합 단백질.

서열번호 51 - Str1 12 BRET 이중 표지화 융합 단백질을 코딩하는 오픈 리딩 프레임.

서열번호 52 - Str1 12 BRET 이중 표지화 융합 단백질.

서열번호 53 - 마우스 α_{2A} 아드레날린작동성 수용체 BRET 이중 표지화 융합 단백질을 코딩하는 오픈 리딩 프레임.

서열번호 54 - 마우스 α_{2A} 아드레날린작동성 수용체 BRET 이중 표지화 융합 단백질.

서열번호 55 - 마우스 α_{2A} 아드레날린작동성 수용체를 코딩하는 오픈 리딩 프레임.

서열번호 56 - 마우스 α_{2A} 아드레날린작동성 수용체.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0142] 일반 기술 및 정의

[0143] 달리 구체적으로 정의하지 않으면, 본원에 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 당분야(예를 들어, 세포 배양, 분자 유전학, 바이오센서, G-커플링 단백질 수용체 생물학, 면역학, 면역조직화학법, 단백질 화학 및 생화학 등)의 숙련가가 통상 이해하는 바와 동일한 의미로 사용된다.

[0144] 달리 지적하지 않으면, 본 발명에서 이용되는 재조합 단백질, 세포 배양, 및 면역학적 기술은 당분야의 숙련가에게 공지된 표준 과정이다. 이러한 기술은 예컨대 하기 문헌들과 같은 문헌 출처 전반에 기술되고 설명되어 있다: J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons(1984), J. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press(1989), T.A. Brown(editor), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Volumes 1 and 2, IRL Press(1991), D.M. Glover and B.D. Hames(editors), DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes 1-4, IRL Press(1995 and 1996), and F. M. Ausubel et al.(editors), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley- Interscience(1988, including all updates until present), Ed Harlow and David Lane(editors) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory,(1988), and J. E. Coligan et al.(editors) Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons(지금까지의 모든 개정 포함).

[0145] 달리 특정하지 않으면, 본원에서 사용되는 용어 "G 단백질 커플링 수용체"는 G 단백질을 통해 신호를 전달하는 7 경막 수용체를 의미한다. 이 수용체는 단일 서브유닛이거나, 또는 2 이상의 수용체 서브유닛일 수 있다. 2 이상의 수용체 서브유닛이 존재할 경우, 이들은 동일하거나, 상이하거나, 또는 이의 조합(예를 들어, 한 서브유닛의 2 및 다른 서브유닛의 단독)일 수 있다. 또한, 달리 특정하거나 정의하지 않으면, 용어 "G 단백질 커플링 수용체" 및 "G 단백질 커플링 수용체의 서브유닛", 또는 이의 변이체는 상호교환적으로 사용된다.

[0146] 본원에서 사용되는 용어 "후각(odorant, olfactory) 수용체", "OR" 또는 이의 별형은, 유기체의 세포에 존재시, 화학감각 지각에 관여하는 폴리펩티드를 의미한다. 구체예에서, 세포는 뉴런이다. 또한, 용어 "후각 수용체"는 후각 리간드에 결합하거나, 또는 후각 리간드에 결합하는 단백질 복합체의 일부를 형성하여, 생리적 반응을 일으키는 폴리펩티드를 의미한다.

[0147] 본원에서 사용하는 용어 "생물발광성 단백질"은 발광을 일으키도록 적절한 기질에 대해 작용할 수 있는 임의의 단백질을 의미한다.

[0148] 본원에서 사용하는 용어 "기질"은 발광을 일으키거나 또는 흡수하도록 생물발광성 단백질과 함께 사용될 수 있는 임의의 분자를 의미한다.

[0149] 본원에서 사용되는 어구 "생물발광성 단백질이 기질을 변형시키도록 하는"은 에너지를 생산하는 기질에 대한 생물발광성 단백질의 임의의 효소 활성을 의미한다.

[0150] 본원에서 사용하는 용어 "엑세プ터 분자"는 생물발광성 단백질의 활성으로 인해 방출되는 에너지를 수용하고, 이를 광에너지로서 재발광할 수 있는 임의의 화합물을 의미한다.

[0151] 본원에서 사용되는 생물발광 공명 에너지 전달(BRET)은 생물발광성 단백질 도너와 억 셉터 분자간 에너지의 비 방사성 전달을 기반으로 하는 근접 어세이이다.

[0152] 본원에서 사용되는 용어 "조정하다" 또는 "조정" 또는 이의 별형은 생물발광성 단백질 및/또는 억 셉터 분자의 발광 스펙트럼 및/또는 강도에서의 변경을 의미한다.

[0153] 본원에서 사용하는 용어 "공간적 위치"는 G 단백질 커플링 수용체를 포함하는 본원에서 정의된 폴리펩티드에 화합물이 결합한 결과로서 변화되는 억 셉터 분자에 대한 생물발광성 단백질의 3차원적 위치선정을 의미한다.

[0154] 본원에서 사용되는 용어 "쌍극자 배향"은 3차원 공간에서의 그 배향에 대한 생물발광성 단백질 및/또는 억 셉터 분자와 관련된 쌍극자 모멘트의 3차원 공간에서의 방향을 의미한다. 쌍극자 모멘트는 분자 상에서의 전하의 변동 결과이다.

[0155] 본원에서 사용되는 용어 "보다 민감한"은 다른 리포터 시스템(예를 들어, FRET)에 대하여 한 리포터 시스템(예를 들어, BRET)의 리간드 결합형과 리간드 미결합형간 공명 에너지 전달 비율이 더 크게 변화하는 것을 의미한다. 본원에 기술된 바와 같이, G 단백질 커플링 수용체 서브유닛을 포함하는 본 발명의 단리 및/또는 재조합 폴리펩티드를 함유하는. 바람직하게, 세포 무함유 조성물은, 본 발명의 폴리펩티드를 포함하건 또는 포함하지 않건, 생존 세포를 포함하지 않는다.

- [0156] 본원에서 사용되는 용어 "접촉하는"은 화합물이 G 단백질 커플링 수용체에 결합할 수 있는 방식으로 검출하려는 화합물을 포함하거나, 또는 포함할 수 있는 샘플을 부가하는 것을 의미한다.
- [0157] 본원에서 사용되는 용어 "지질 이중층"은 통상의 소수성 이중층 내부와 2개의 친수성 표면을 가지며 서로 대향하여 배열된, 대체로 양쪽성인 문자 어레이의 2개 층을 의미한다. 지질 이중층은 천연 발생적이거나 또는 인공적일 수 있다. 가장 바람직하게, 지질 이중층은 G 단백질 커플링 수용체를 포함하는 본원에 정의된 폴리펩티드가 삽입된 세포 또는 생물 막, 예를 들어, 포유동물, 곤충, 식물 또는 효모 세포 막, 가장 바람직하게는 효모 세포 막이다.
- [0158] 본원에서 사용하는 용어 "효모 지질 이중층"은 G 단백질 커플링 수용체를 포함하는 본원에 정의된 폴리펩티드를 발현하는 효모 세포로부터 유래된 지질 이중층을 의미한다. 당분야의 숙련가는 막에 내포되어 있는 효모에서 천연 발생되는 단백질, 예컨대 이에 제한되는 것은 아니고, Fuslp 단백질(Trueheart and Fink, 1989), Ssol/2p, Sncip 및 Sec9p 단백질을 포함하는 SNRE 복합체(Strop et al., 2007), 페로몬 수용체 Ste2p(Celic et al., 2003), 및/또는 Alrl(Graschopf et al., 2001) 등을 검출하는 것을 통해 지질 이중층이 효모로부터 유래된 것인지 여부를 쉽게 결정할 수 있다.
- [0159] 본원에서 사용되는 용어 "동시에 또는 순차적으로"는 본원에 정의된 바와 같은 폴리펩티드와 샘플을 접촉시키기 전, 그 동안 또는 그 이후에 기질이 제공될 수 있음을 의미한다. 바람직하게, 기질은 샘플과 동시에 또는 그 이후에 제공된다.
- [0160] "샘플"은 검출하려는 화합물을 포함하는 것으로 의심되는 임의의 물질 또는 조성물일 수 있다. 샘플의 예로는 공기, 액체, 생물학적 물질 및 토양이 포함된다. 샘플은 자연환경 또는 공급원으로부터 직접 얻거나, 또는 본 발명의 방법을 실시하기 전에 적저로한 절차에 의해 적어도 부분적으로 정제될 수 있다.
- [0161] 본원에서 사용하는 용어 "G 단백질 커플링 수용체, 및/또는 존재시 보조 분자는, 조합하여 생물발광성 단백질 및 억셉터 분자를 포함하다"는 생물발광성 단백질이 G 단백질 커플링 수용체의 서브유닛 또는 보조 분자와 회합, 바람직하게는 공유 결합, 보다 바람직하게는 융합 단백질로서 생성되고, 억셉터 분자가 G 단백질 커플링 수용체의 서브유닛 또는 보조 분자와 회합, 바람직하게 공유 결합, 보다 바람직하게 융합 단백질로서 생성된다는 것을 의미한다. 생물발광성 단백질 및 보조 분자는 G 단백질 커플링 수용체의 동일하거나 또는 상이한 서브유닛 또는 동일하거나 상이한 보조 분자와 회합, 바람직하게 공유 결합, 보다 바람직하게는 융합 단백질로서 생성될 수 있다. 또한, 생물발광성 단백질 및 보조 분자 중 하나는 G 단백질 커플링 수용체의 서브유닛과 회합, 바람직하게 공유 결합, 보다 바람직하게는 융합 단백질로서 생성되고, 생물발광성 단백질 및 보조 분자 중 나머지는 보조 분자와 회합될 수 있다. 또한, 복수의 생물발광성 단백질 및 보조 분자 쌍이 상이한 리간드를 검출하거나, 또는 동일 리간드에 대한 검출 민감도를 증가시키도록 다중화를 위해 조합하여 존재할 수 있다.
- [0162] 본원에서 사용되는 용어 "~의 일부를 형성하다"는 G 단백질 커플링 수용체, 또는 이의 서브유닛의 특정 영역에 생물발광성 단백질 또는 억셉터 분자가 위치함을 의미한다. 이 용어는 또한 생물발광성 단백질 및/또는 수용체 분자가 G 단백질 커플링 수용체에 부착 또는 결합하지만 연속되는 아미노산 사슬을 형성하지 않을 가능성을 포함한다. 일 구체예에서, 생물발광성 단백질 또는 억셉터 분자는 G 단백질 커플링 수용체의 특정 영역을 완전하게 교체한다. 다른 구체예에서, G 단백질 커플링 수용체의 특정 영역의 전부가 아닌, 일부가 교체된다. 또 다른 구체예에서, G 단백질 커플링 수용체의 어떠한 특정 영역도 교체되지 않는다. 당분야의 숙련자가 인식하게 되는 바와 같이, 생물발광성 단백질 또는 억셉터 분자는 억셉터 분자에 대한 생물발광성 단백질의 위치 및/또는 쌍극자 배향의 공간적 변화가 일어나기 위해 본 발명의 폴리펩티드의 G 단백질 커플링 수용체 부분이 표적 화합물에 결합할 수 없게 만들어지도록 삽입되지 않는다.
- [0163] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 G 단백질 커플링 수용체의 특정 부분(도메인)의 "적어도 대부분"은 특정 영역의 51% 이상, 보다 바람직하게는 75% 이상, 보다 더 바람직하게는 90% 이상을 의미한다.
- [0164] "실질적으로 정제된" 또는 "정제된"은 그 천연 상태에서 회합되어 있는 1 이상의 지질, 핵산, 다른 폴리펩티드, 또는 다른 오염 분자와 분리된 폴리펩티드를 의미한다. 실질적으로 정제된 폴리펩티드는 천연적으로 회합된 다른 성분이 60% 이상, 보다 바람직하게는 75% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상 없는 것이 바람직하다. 그러나, 현재 본 발명의 폴리펩티드가 자연계에 존재한다는 증거는 없다.
- [0165] 폴리펩티드와 관련된 용어 "재조합"은 그 천연 상태와 비교하여 변경된 양 또는 변경된 비율로, 세포, 또는 세포 무함유 발현 시스템에 의해 생성되는 경우의 폴리펩티드를 의미한다. 일 구체예에서, 세포는 이 폴리펩티드를 천연적으로 생성하지 않는 세포이다. 그러나, 세포는 생성되는 폴리펩티드의 양을 변경, 바람직하게는 증가

시키는 비내생성 유전자를 포함하는 세포일 수 있다. 본 발명의 재조합 폴리펩티드는 이것이 생성되는, 형질전환(재조합) 세포, 또는 세포 무함유 발현 시스템의 다른 성분과 분리되지 않은 폴리펩티드, 및 적어도 일부 다른 성분으로부터 실질적으로 정제된 이러한 세포 또는 세포 무함유 시스템에서 생성된 폴리펩티드를 포함한다.

[0166] 용어 "폴리펩티드" 및 "단백질"은 대체로 상호교환적으로 사용되며 비아미노산 기의 부가에 의해 변형되거나 또는 변형되지 않을 수 있는 단일 폴리펩티드 사슬을 의미한다. 이러한 폴리펩티드 사슬은 다른 폴리펩티드 또는 단백질 또는 다른 분자 예컨대 보조 인자와 회합될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 본원에서 사용되는 용어 "단백질" 및 "폴리펩티드"는 또한 본원에 기술한 폴리펩티드의 변이체, 돌연변이체, 생물학적 활성 단편, 변형물, 유사체 및/또는 유도체를 포함한다.

[0167] 폴리펩티드의 동일성 %는 캡 생성 패널티 = 5, 및 캡 확장 패널티 = 0.3인 GAP(Needleman and Wunsch, 1970) 분석법(GCG 프로그램)에 의해 결정된다. 문의 서열은 길이가 25 아미노산 이상이고, GAP 분석은 25 아미노산 이상의 영역에 대해 2 서열을 정렬시킨다. 보다 바람직하게, 문의 서열이 길이가 50 아미노산 이상이고, GAP 분석은 50 아미노산 이상의 영역에 대해 2 서열을 정렬시킨다. 보다 바람직하게, 문의 서열은 길이가 100 아미노산 이상이고, GAP 분석은 100 아미노산 이상의 영역에 대해 2 서열을 정렬시킨다. 보다 더 바람직하게 문의 서열은 길이가 250 아미노산 이상이고, GAP 분석은 250 아미노산 이상의 영역에 대해 2 서열을 정렬시킨다. 보다 더 바람직하게, GAP 분석은 그들 전체 길이에 대해 2 서열을 정렬시킨다.

[0168] 본원에서 사용되는 "생물학적 활성 단편"은 전체 길이 폴리펩티드의 지정된 활성을 유지하는 본원에 기술된 바와 같은 폴리펩티드의 일부분이다. 예를 들어, G 단백질 커플링 수용체의 생물학적 활성 단편은 표적 화합물에 결합하여 입체구조 변화를 일으킬 수 있어야 한다. 생물학적 활성 단편은 이들이 지정된 활성을 유지하는 한 임의 크기일 수 있다. 바람직하게, 생물학적 활성 단편은 길이가 150 아미노산 이상, 보다 바람직하게 250 아미노산 이상이다.

[0169] 본원에서 사용하는, "생물학적 활성 변이체"는 상기 생물학적 활성 단편에서 정의한 바와 같이, 지정된 활성을 유지하지만, 1 이상의 아미노산이 천연 발생 또는 지정된 분자와 상이한 분자이다. 생물학적 활성 변이체는 천연 발생 및/또는 지정된 분자와 대체로 50% 이상, 보다 바람직하게는 80% 이상, 더 바람직하게는 90% 이상, 더욱 바람직하게는 95% 이상, 더 바람직하게는 97%, 그리고 보다 더욱 바람직하게는 99% 이상 동일하다.

[0170] 지정된 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드와 관련하여, 상기 제공된 것보다 높은 동일성 % 수치가 바람직한 구체예로 포함된다는 것을 이해할 것이다. 따라서, 적용 가능한 경우, 최소 동일성 % 수치를 고려하여, 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드는 관련하여 지정된 서열번호와 50% 이상, 더 바람직하게는 60% 이상, 더욱 바람직하게는 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 바람직하게는 85% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상, 더욱 바람직하게는 91% 이상, 더 바람직하게는 92% 이상, 더욱 바람직하게는 93% 이상, 더욱 바람직하게는 94% 이상, 더욱 바람직하게는 95% 이상, 더욱 바람직하게는 96% 이상, 더욱 바람직하게는 97% 이상, 더욱 바람직하게는 98% 이상, 더 바람직하게는 99% 이상, 더욱 바람직하게는 99.1% 이상, 더욱 바람직하게는 99.2% 이상, 보다 바람직하게는 99.3% 이상, 더 바람직하게는 99.4% 이상, 더 바람직하게는 99.5% 이상, 더 바람직하게는 99.6% 이상, 더욱 바람직하게는 99.7% 이상, 더욱 바람직하게는 99.8% 이상, 보다 더욱 바람직하게는 99.9% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것이 바람직하다.

[0171] 센스 또는 안티센스 배향 또는 이 둘의 조합으로, 단일 또는 이중 가닥인, DNA, RNA, 또는 이들의 조합을 포함하여, "단리된 폴리뉴클레오티드"는 그 천연 상태에서 회합 또는 결합된 폴리뉴클레오티드 서열과 적어도 부분적으로 분리된 폴리뉴클레오티드를 의미한다. 바람직하게, 단리된 폴리뉴클레오티드는 이들이 천연적으로 회합된 다른 성분이 60% 이상, 바람직하게는 75% 이상, 가장 바람직하게는 90% 이상 없다.

[0172] 폴리뉴클레오티드와 관련된 용어 "외생성"은 세포 또는 세포 무함유 발현 시스템에 존재시, 천연 상태와 비교하여 양이 변경된, 폴리뉴클레오티드를 의미한다. 일 구체예에서, 세포는 이 폴리뉴클레오티드를 천연적으로 포함하지 않는 세포이다. 그러나, 세포는 코딩된 폴리펩티드의 생성 양을 변경, 바람직하게는 증가시키는 비내생성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 세포일 수 있다. 본 발명의 외생성 폴리뉴클레오티드는 이것이 존재하는 형질전환(재조합) 세포, 또는 세포 무함유 발현 시스템의 다른 성분과 분리되지 않은 폴리뉴클레오티드, 및 적어도 일부 다른 성분으로부터 후속 정제된 이러한 세포 또는 세포 무함유 시스템에서 생성된 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0173] 또한, 용어 "폴리뉴클레오티드"는 본원에서 용어 "핵산"과 상호교환적으로 사용된다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드는, 여기 제공되는 분자와 비교하여, 변형 잔기, 또는 뉴클레오티드 잔기의 결실, 삽입 또는 치환인 1 이상의

돌연변이를 보유할 수 있다. 돌연변이체는 천연 발생(즉, 천연 공급원으로부터 단리됨)되거나 또는 합성(예를 들어, 핵산 상에 부위 지정 돌연변이유발법을 실시하는 것에 의함)될 수 있다. 일반적으로, 폴리뉴클레오티드의 단량체는 포스포디에스테르 결합 또는 이의 유사체에 의해 연결된다. 포스포디에스테르 결합의 유사체는 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포셀레노에이트, 포스포디셀레노에이트, 포스포로아닐로티오에이트, 포스포르아닐리데이트 및 포스포르아미데이트를 포함한다.

[0174] 본 발명의 조성물은 "허용되는 담체"를 포함할 수 있다. 이러한 허용되는 담체의 예로는 물, 염수, 링거액, 액스트로스액, 헹크액 및 다른 수성의 생리적으로 균형있는 염 용액이 포함된다. 비수성 비히클, 예컨대 고정유, 참깨유, 에틸올레이트, 또는 트리글리세리드도 사용될 수 있다. "허용되는 담체"의 정확한 성질은 조성물의 용도에 따라 좌우된다. 본원에 기술된 용도, 및 조성물 내 본 발명의 성분의 성질을 고려하여, 숙련가가 용이하여 특정 용도에 적합한 "허용되는 담체(들)"을 결정할 수 있다.

생물발광성 단백질

[0175] 생물발광성 단백질은 릴랙스 되면 에너지를 방출하는 활성화 산물로 기질을 전환시키는 효소로서 당분야에서 이해되고 있다. 활성화 산물(기질에 대한 생물발광성 단백질의 활성에 의해 생성됨)은 억셉터 문자로 전달되는 생물발광성 단백질-생성된 발광의 공급원이다.

[0176] 본 발명에 사용할 수 있는 수많은 상이한 생물발광성 단백질이 존재한다(예를 들어, 표 1 참조). 생물발광성 단백질의 크기를 고려하면, 본 발명에 유용한 기능성 폴리펩티드가 생성될 수 있다는 것은 놀라웠다. 발광 시스템이 알려져 있으며 박테리아, 원생동물, 강장동물, 연체동물, 어류, 밀리페드, 파리, 진균류, 벌레, 갑각류, 및 딱정벌레, 구체적으로 피로포러스(*Pyrophorus*) 속의 방아벌레, 및 포티너스(*Photinus*), 포터리스(*Photuris*) 및 루시올라(*Luciola*) 속의 반딧불이 등을 포함하는 수많은 발광 유기체로부터 단리되었다. 생물발광성을 보이는 부가적인 유기체는 WO 00/024878, WO 99/049019 및 Viviani(2002)에 열거되어 있다.

[0177] 매우 잘 알려진 일례는 루시페라제라고 알려진 단백질 부류로서, 특이적 생화학 기질, 루시페린(천연 발생 형광단)이 루시페라제 활성을 가진 효소에 의해 산화되는 에너지-발생 화학 반응을 촉매한다(Hastings, 1996). 박테리아, 조류, 진균류, 곤충, 어류 및 다른 해양체 등의 종을 포함하여, 원핵생물 및 진핵생물 둘 모두의, 매우 광범위한 유기체가 이러한 방식으로 빛 에너지를 발광할 수 있고 각각은 다른 유기체와 화학적으로 구별되는 특이적 루시페라제 활성 및 루시페린을 갖는다. 루시페린/루시페라제 시스템은 그 형태, 화학성 및 기능이 매우 다양하다. 따라서, 루시페라제 활성을 갖는 생물발광성 단백질은 다양한 공급원으로부터 또는 다양한 수단에 의해 이용될 수 있다. 루시페라제 활성을 갖는 생물발광성 단백질의 예는 US 5,229,285, 5,219,737, 5,843,746, 5,196,524, 및 5,670,356에서 확인할 수 있다. 가장 광범위하게 사용되는 2종의 루시페라제는 (i) 35 kDa 단백질이고, 기질로서 코엘렌테라진을 이용하여 480 nm에서 발광하는 레닐라 루시페라제(*R. reniformis*) 유래(Lorenz et al., 1991); 및 (ii) 기질로서 루시페린을 이용하고 560 nm에서 발광하는, 61 kDa 단백질인 반딧불이 루시페라제(포티너스 *Photinus pyralis* 유래)(de Wet et al., 1987)가 있다.

표 1

예시적인 생물발광성 단백질					
종	명칭	유기체	MW kDa x 10 ⁻³	발광(nm)	기질
곤충	FFluc	포티너스 피랄리스 (북미 반딧불이)	~61	560	D-(<i>-</i>)-2-(6'-히드록시벤조티아졸릴)- ² <i>-</i> 티아졸린-4-카르복실산, HTBTTCA(C ₁₁ H ₈ N ₂ O ₃ S ₂) (루시페린)
곤충	FF'luc	루시올라 크루시아타 (일본 반딧불이)		560-590 (많은 변이체)	루시페린
곤충		펜고디드 딱정벌레 (철도 벌레)			
곤충		아라크노캡파 종			루시페린
곤충		올페리아 펠토니 (북미 클로워)			

곤충	C1luc	파로포러스 플라지오 프탈라마스 (방아벌레)		546, 560, 578 및 593	루시페린
해파리	애쿠오린	애쿠오레아	44.9	460-470	코엘렌테라진
바다 팬지	Rluc	레닐라 레니포르미스	36	480	코엘렌테라진
바다 팬지 (변성)	Rluc8	레닐라 레니포르미스 (변성)	36	487 (피크)	코엘렌테라진 /딥 블루 C
바다 팬지	Rmluc	레닐라 멀레이	36.1	~480	코엘렌테라진
바다 팬지		레닐라 콜리커리			
갑각류 (새우)	Vluc	바르굴라 힐젠토르피	~62	~460	코엘렌테라진 *
갑각류		시프리디나 (바다 반딧불이)	75	460	코엘렌테라진 **
디노파겔레이트 (해양 조류)		고니아울락스 폴리에 드라	130	~475	테트라피롤
연체동물		라티아 (민물 립펫)	170	500	에늘 포르메이트, 터 웬, 알데히드
히드로충		오벨리아 비스커스피 다타	~20	~470	코엘렌테라진
새우		오플로포러스 그라실 로로스트리스	31	462	코엘렌테라진
기타	Ptluc	프틸로사르커스		~490	코엘렌테라진
	Gluc	가우시아	~20	~475	코엘렌테라진
	P1luc	플래우로맘마	22.6	~475	코엘렌테라진

[0180] 가우시아 루시페라제(가우시아 프린셉스(*Gaussia princeps*) 유래)가 생화학적 어세이에 사용되어 왔다 (Verhaegen et al., 2002). 가우시아 루시페라제는 20 kDa 단백질로서 신속한 반응으로 코엘렌테라진을 산화시켜 470 nm에서 밝은 빛을 발광한다.

[0181] 본 발명에 유용한 루시페라제는 또한 아나크노캄파 종(*Anachnocampa sp.*) (WO 2007/019634)으로부터 특징규명되었다. 이들 효소는 크기가 약 59 kDa이고 발광 스펙트럼이 스펙트럼의 파란 부분에 존재하는 발광 반응을 촉매하는 ATP-의존적 루시페라제이다.

[0182] 다르게, 본 발명에서 사용할 수 있는 루시페라제 이외의, 생물발광성 단백질은 발광 신호를 생성하는데 적합한 기질에 대해 작용할 수 있는 임의의 효소이다. 이러한 효소의 특정 예로는 β -갈락토시다제, 락타마제, 홀스래디쉬 페옥시다제, 알칼리 포스파타제, β -글루코나이다제 및 β -글루코시다제 등이 있다. 이들 효소에 대한 합성 발광 기질이 당분야에 알려져 있으며 예컨대 Tropix Inc.(Bedford, MA, USA) 등의 제조사에서 시판된다.

[0183] 본 발명에 유용한 페옥시다제의 예는 [Hushpulian et al.(2007)]에 기재되어 있다.

[0184] 바람직한 구체예에서, 문자량이 작은 생물발광성 단백질이 입체 방해로 인한 상호작용의 억제를 방지하기 위해 사용된다. 생물발광성 단백질은 바람직하게 단일 폴리펩티드 사슬로 구성된다. 또한, 생물발광성 단백질은 바람직하게 올리고며 또는 응집체를 형성하지 않는다. 생물발광성 단백질 레닐라 루시페라제, 가우시아 루시페라제 및 반딧불이 루시페라제는 이들 기준 모두 또는 대부분을 만족시킨다.

기질

[0186] 기질의 선택은 생물발광성 단백질에 의해 생성되는 빛의 강도 및 파장에 영향을 줄 수 있다.

[0187] 광범위하게 알려진 기질은 자포동물, 요각류, 모악동물, 빗해파리, 십각 새우류, 보리 새우, 방산충 및 일부 어류 분류군에서 존재하는 코엘렌테라진이다(Greer and Szalay, 2002). 레닐라 루시페라제의 경우, 예를 들어 418 내지 512 nm에서 빛을 방출하게 되는 코엘렌테라진 유사체/유도체가 이용가능하다(Inouye et al., 1997). 코엘렌테라진 유사체/유도체(400A, DeepBlueC)는 레닐라 루시페라제에 의해 400 nm에서 발광하는 것으로 기술되었다 (WO 01/46691). 코엘렌테라진 유사체/유도체의 다른 예들은 EnduRen 및 ViviRen이다.

[0188] 본원에서 사용되는 용어 "루시페린"은 효소 루시페라제 존재 하에 산화되어 빛 형태의 에너지 및 옥시루시페린을 생성하는, 생물발광할 수 있는 유기체에 존재하는 발광성 생물학적 색소 부류를 의미한다. 루시페린, 또는 2-(6-히드록시벤조티아졸-2-일)-2-티아졸린-4-카르복실산은 반딧불이 포티너스 피랄리스(*Photinus pyralis*)에서

처음 단리되었다. 그 이후로, 다양한 형태의 루시페린이 발견되었고 주로 바다, 예를 들어 어류 및 오징어 등에서 유래하는, 매우 다양한 유기체에서 연구되었지만, 많은 것들이 육지 서식 유기체, 예를 들어, 벌레, 딱정벌레 및 다른 다양한 곤충류에서 동정되었다(Day et al., 2004; Viviani, 2002).

[0189] 각각 화학적으로 상이하고, 광범위한 다른 보조인자들을 이용하는 화학적 및 구조적으로 상이한 루시페라제에 의해 촉매되는, 5개 이상의 일반적인 루시페린 유형이 존재한다. 첫번째로, 반딧불이 루시페린으로서, 촉매반응에 ATP를 필요로 하는 반딧불이 루시페라제가 있다(EC 1.13.12.7). 두번째로, 역시 일부 오징어 및 어류에 존재하고, 장쇄 알데히드 및 환원된 리보플라빈 포스페이트로 구성된 박테리아 루시페린이다. 박테리아 루시페라제는 FMNH₂-의존적이다. 세번째, 디노플라제레이트(dinoflagellate) 루시페린으로서, 디노플라제레이트(해양 플라크톤)에 존재하는 테트라페롤 클로로필 유도체이며, 이 유기체는 밤시간 해양 인광성을 담당한다. 디노플라제레이트 루시페라제는 디노플라제레이트 루시페린의 산화를 촉매하고 3개의 동일한 촉매적 활성 도메인으로 구성된다. 네번째는 이미다졸로피라진 바르글린으로, 이는 일정 오스트라코드(ostracod) 및 심해 어류, 예를 들어 포리크티(Porichthys)에 존재한다. 마지막으로, 코엘란테라진(이미다졸로피라진)이 있으며, 방산충, 벗해파리, 자포동물, 오징어, 요각류, 모약동물, 어류 및 새우류에 존재하는 단백질 애쿠오린의 발광체이다.

엑셉터 분자

[0191] 본 발명에 사용할 수 있는 다수의 다양한 엑셉터 분자가 존재한다. 엑셉터 분자는 단백질이거나 또는 단백질성이 아닐 수 있다. 단백질인 엑셉터 분자의 예로는, 이에 제한되는 것은 아니고, 녹색 형광발광 단백질(GFP), GFP의 청색 형광발광 변이체(BFP), GFP의 시안 형광발광 변이체(CFP), GFP의 황색 형광발광 변이체(YFP), 강화 GFP(EGFP), 강화 CFP(ECFP), 강화 YFP(EYFP), GFPS65T, 에메랄드, 토퍼스, GFPuv, 탈안정화 EGFP(dEGFP), 탈안정화 ECFP(dECFP), 탈안정화 EYFP(dEYFP), HcRed, t-HcRed, DsRed, DsRed2, t-dimer2, t-dimer2(12), mRFP1, 포실로포린, 레닐라 GFP, 몬스터 GFP, paGFP, Kaede 단백질 또는 파이코빌리단백질, 또는 이의 어느 하나의 생물학적 활성 변이체 또는 단편이 포함된다. 단백질이 아닌 엑셉터 분자의 예로는 이에 제한되는 것은 아니고, 알렉사 플루오르(Alexa Fluor) 염료, 보디파이(Bodipy) 염료, Cy 염료, 플루오레세인, 단실, 염밸리페론, 형광발광성 미세구, 발광성 미세구, 형광발광성 나노결정, 마리나 블루, 캐스캐이드 블루, 캐스캐이드 엘로우, 퍼시픽 블루, 오레곤 그린, 테트라메틸로다민, 로다민, 텍사스 레드, 희토류 원소 퀄레이트, 또는 이의 임의 조합 또는 유도체가 포함된다.

[0192] 잘 알려진 일례로는 해파리 애쿠오레아 빅토리아(*Aequorea victoria*) 유래의 녹색 형광발광 단백질 및 분자 생물학, 예를 들어 돌연변이유발법 및 키메라 단백질 기술을 도입하여 생성된 수많은 다른 변이체들(GFP)을 포함하는 형광단 그룹이 있다(Tsien, 1998). GFP는 그들 발색단의 구별되는 성분을 기초로 분류되며 각 클래스는 별개의 여기 및 발광 파장을 갖는다: 클래스 1, 중성 페놀과 음이온성 페놀레이트의 야생형 혼합물: 클래스 2, 페놀레이트 음이온: 클래스 3, 중성 페놀: 클래스 4, s-전자계가 스태킹된 페놀레이트 음이온: 클래스 5, 인돌: 클래스 6, 이미다졸: 및 클래스 7, 페닐.

[0193] 돌연변이된 천연 발생 엑셉터 분자(변이체)가 또한 본 발명에 유용할 수 있다. BRET에 적합한 조작된 시스템의 일례로는 매개 단백질(들)(이 경우, G 단백질 커필링된 수용체) 부재시 단독으로는 서로 유의한 정도로 직접 상호작용하지 않는 레닐라 루시페라제 및 GFP의 강화된 황색 돌연변이체(EYFP) 쌍이 있다(Xu et al., 1999).

[0194] 다른 구체예에서, 엑셉터 분자는 형광발광성 나노결정이다. 나노결정, 또는 "양자점"은 형광발광성 표지로서 유기 분자에 비해 몇몇 장점을 갖는데, 광분해에 대한 내성, 향상된 휘도, 비독성, 및 동시에 몇몇 프로세스를 모니터링 할 수 있는 크기 의존적인, 협소한 발광 스펙트럼 등이 포함된다. 부가적으로, 나노결정의 흡광 스펙트럼은 제1 피크 상에서 연속적이어서, 모든 크기 및 그에 따라 모든 색상이 단일 여기 파장으로 여기될 수 있다.

[0195] 형광발광성 나노결정은 다양한 방식으로 단백질에 부착, 또는 "생접합"될 수 있다. 예를 들어, "양자점"의 표면 캡은 디히드로리포산(DHLA) 또는 양쪽성 중합체로부터의 카르복실레이트 기에 의해 음으로 하전될 수 있다. 단백질은 재조합 단백질에 융합된 양으로 하전된 루신 지페 웨티드로 구성된 브릿지를 통해 또는 직접, 정전기적으로 DHLA-나노결정에 접합될 수 있다. 후자는 목적하는 표적에 대한 특이성을 갖는 1차 항체에 결합한다. 다르게, 항체, 스트렙타비딘 또는 다른 단백질은 통상의 카르보디이미드 화학법으로 나노결정의 폴리아크릴레이트 캡에 공유 결합된다.

[0196] 카드뮴 셀레니드, 카드뮴 설피드, 인듐 아르세니드, 및 인듐 포스피드를 포함하는, 나노결정을 제조하는 콜로이드 방법이 있다. 이를 양자점은 직경이 10 내지 50 원자인, 양자점 용적내에 단지 100 내지 100,000 원자를 함유할 수 있다. 일부 양자점은 보다 큰 밴드캡을 갖는 다른 물질에 묻혀있는 한 물질의 소영역이다. 이들은 예를

들어 코어에 CdSe가 존재하고 쉘에 ZnS가 존재하는 이른바 코어-쉘 구조이거나 또는 오르모실이라고 하는 실리카의 특정형으로부터 유래할 수 있다. 양자점이 클수록, 이의 형광발광 스펙트럼은 더 블루(저에너지). 반대로, 보다 작은 양자점은 더 파란색(고에너지)의 빛을 발광한다. 색상은 양자점의 에너지 준위와 직접적으로 관련있다. 양적으로 말하면, 형광발광된 빛의 에너지(그에 따른 색상)을 결정하는 밴드갭 에너지는 양자점 크기 제곱에 반비례한다. 큰 양자점은 보다 밀접하게 공간화된 높은 에너지 준위를 갖는다. 이는 양자점이 에너지를 덜 함유하는 광자를 흡광할 수 있게 하며, 다시 말해 스펙트럼의 적색 말단에 더 가까워진다.

[0197] 다른 구체예에서, 억셉터 분자는 형광발광성 미세구이다. 이들은 대체로 중합체로부터 제조되며, 다양한 시약에 접합될 수 있는, 중합체 매트릭스에 도입된 형광발광 분자(예를 들어, 플루오레세인 GFP 또는 YFP)를 포함한다. 형광발광성 미세구는 내부적으로 또는 표면에 표지될 수 있다. 내부 표지화는 전형적으로 협소한 형광발광 방출 스펙트럼을 갖는 매우 밝고 안정한 입자를 생성한다. 내부 표지화시, 표면 기는 비드의 표면에 리간드(예를 들어, 단백질)를 접합하기 위해 이용할 수 있게 남아 있다. 내부적으로 표지된 비드는 광표백에 높은 내성을 나타내기 때문에, 영상화 적용분야에서 광범위하게 사용된다.

[0198] 카르복실레이트-변성 형광발광 미세구는 수용성 카르보디이미드 시약 예컨대 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카르보디이미드 헤드로클로라이드(EDAC)를 이용하는 단백질의 공유 결합에 적합하다. 설페이트 형광발광 미세구는 비교적 소수성이고 수동적으로 그리고 거의 비가역적으로 대부분의 임의의 단백질을 흡착한다. 알데히드-설페이트 형광발광 미세구는 표면 알데히드 기를 부가하고, 단백질과 반응하도록 변성시킨 설페이트 미세구이다.

[0199] 다른 구체예에서, 억셉터 분자는 발광성 미세구이다. 이들은 대체로, 다양한 시약에 접합될 수 있는, 중합체 매트릭스에 도입된 발광성 분자(예를 들어, 유로퓸 또는 플래티늄의 착체)를 함유하는, 중합체로부터 제조된다.

생물발광성 단백질과 억셉터 분자의 쌍

[0201] BRET에 적합한 쌍을 결정하는데 고려되어야 하는 기준은 생물발광성 단백질과 비교된 억셉터 분자의 상대적인 발광/형광발광 스펙트럼이다. 생물발광성 단백질의 발광 스펙트럼은 억셉터 분자의 흡광 스펙트럼과 중첩되어야 하고 그에 따라 생물발광성 단백질 유래의 광 에너지는 억셉터 분자를 여기할 수 있는 과장에서 발광되어 2 분자가 서로에 대해 적절한 근접성 및 배향성으로 존재할 때 억셉터 분자 형광발광을 촉진한다. 예를 들어, 레닐라 루시페라제/EGFP 쌍은 관찰 가능한 발광 스펙트럼 피크를 기준으로는 레닐라 루시페라제/EYEF 쌍만큼 우수하지 않다(Xu, 1999; Wang, et al.(1997) in Bioluminescence and Chemiluminescence : Molecular Reporting with Photons, eds. Hastings et al.(Wiley, New York), pp. 419-422). 가능한 쌍을 연구하기 위해, 선별된 생물발광성 단백질 및 억셉터 분자를 함유하는 단백질 융합체를 준비하여 적절한 기질 존재 하에 테스트하였다.

[0202] 또한 생물발광성 단백질 및 억셉터 분자가 부적절하게 서로 회합되지 않는다는 것이 확인되어야 한다. 이는 동일 세포에서 생물발광성 단백질 및 억셉터 분자의 개별적인 공통발현 후 BRET가 일어났는지 여부를 확인하기 위해 발광 스펙트럼을 모니터링함으로써 수행될 수 있다. 예를 들어, [Xu et al.(1999)]의 방법을 이용해 수행될 수 있다. 선별된 생물발광성 단백질 및 억셉터 분자는 BRET가 거의 또는 전혀 관찰되지 않으면 적절한 BRET 쌍을 형성한다.

[0203] 생물발광성 단백질 발광은 기질에 대한 변형에 의해 조작될 수 있다. 루시페라제의 경우, 기질은 코엘렌테라진이다. 생물발광성 단백질 발광을 변경하는 이유는 도너 발광과 억셉터 발광 간 해상도를 개선시키는 것이다. 원래 BRET 시스템은 도너로서 레닐라 루시페라제, 억셉터로서 EYFP(또는 토파즈) 그리고 기질로서 코엘렌테라진 h 유도체를 사용한다. BRET 어세이에서 조합시 이들 성분은 생물발광성 단백질에 대해 475-480 nm 범위에서, 억셉터 분자에 대해 525-530 nm 범위에서 빛을 생성하여, 스펙트럼 해상도가 45-55 nm이다.

[0204] 불행하게도, 레닐라 루시페라제는 실질적으로 GFP 발광과 중첩되는 광범위한 발광 피크를 생성하고, 이어 시스템의 노이즈로 신호를 감소시키는 원인이 된다. 레닐라 루시페라제 기질로서 coel1400a를 이용하는, 본 발명의 BRET 시스템은 도너와 억셉터 발광 과장 사이의 광범위한 스펙트럼 해상도를 제공한다(-105 nm). 레닐라 루시페라제와 coel1400a는 390-400 nm 사이의 빛을 생성하고 이 범위의 빛을 흡광하여 505-508 nm에서 빛을 재발광하는 GFP가 제조되었다. 레닐라 루시페라제와 GFP 간 스펙트럼 해상도에 있어 이러한 증가 때문에, 이 BRET 시스템은 본 발명의 폴리펩ти드의 입체구조에서의 작은 변화를 모니터링하기 위한 우수한 생물학적 도구를 제공한다. 이는 도너와 억셉터간 과장차가 대략 51 nm인, EYFP 및 코엘렌테라진 h 유도체를 이용하는 이전에 기술된 시스템에 비해 상당한 개선이다.

[0205] 다양한 코엘렌테라진 유도체가 당분야에 알려져 있는데, 레닐라 루시페라제 활성에 의해 다양한 과장에서 빛(야생형 코엘렌테라진에 의해 생성되는 것과는 구별됨)을 생성하는 coel1400a가 포함된다. 당분야의 숙련가는 도너

의 빛 방출 피크가 변하기 때문에, 이 과장에서 빛을 흡광하여 효율적인 에너지 전달을 허용되는 억셉터 분자를 선택할 필요가 있다는 것을 이해할 것이다. 예를 들어, 클래스 3 또는 1 GFP가 되도록 G 클래스 4를 변경함으로써 실시할 수 있다. 무엇보다도, 도너의 빛 발광 및 억셉터의 빛 흡광 피크간 스펙트럼 중첩은 효율적인 에너지 전달을 위한 조건 중 하나이다. 클래스 3 및 1 GFP은 400 nm에서 흡광하여 505-511 nm에서 재발광하는 것으로 알려져 있다. 이 결과 도너와 억셉터 방출간 과장차가 대략 111 nm가 된다.

[0206] 추가의 생물발광성 단백질 및 억셉터 분자 쌍의 예를 표 2에 제공한다.

표 2

예시적인 BRET 생물발광성 단백질 및 억셉터 분자 쌍				
BDP	기질	기질 과장(피크)	형광발광 억셉터 분자(FAM)	억셉터의 과장(Ex/Em)
Rluc	코엘렌테라진 야생형	470 nm	플루오레세인	490/525 nm
Rluc	코엘렌테라진 야생형	470 nm	아크리딘 옐로우	470/550 nm
Rluc	코엘렌테라진 야생형	470 nm	나일 레드	485/525 nm
Rluc	코엘렌테라진 cp	442 nm	루시퍼 옐로우	428/540 nm
Rluc	코엘렌테라진 400	400 nm	쿠인-2	365/490 nm
Rluc	코엘렌테라진 400	400 nm	단시클로라이드	380/475 nm
반딧불이 루시페라제	루시페린	560 nm	시아닌 Cy3	575/605 nm
반딧불이 루시페라제	루시페린	560 nm	텍사스 레드	590/615 nm

G 단백질 커플링 수용체

G 단백질-커플링 수용체(GPCR)는 또한 7개 경막 수용체, 7TM 수용체, 7나선 수용체, 및 G 단백질 결합 수용체(GPLR)로서 알려져 있다. GPCR는 세포 외부의 분자를 감지하고 내부 신호전달 경로를 활성화시켜, 최종적으로 세포 반응을 활성화시키는 경막 수용체의 거대 단백질 패밀리이다. 이를 수용체에 결합하여 활성화시키는 리간드는 감광성 화합물, 냄새, 폐로몬, 호르몬 및 신경전달물질을 포함하고, 소형 분자부터 탭티드 내지 거대 단백질로 그 크기가 다양하다. GPCR은 수많은 질환에 관여하며, 또한 모든 현대 의약물 중 대략 절반의 표적이다. GPCR은 서열 상동성 및 기능 유사성을 기초로 5 이상의 클래스로 분류된다:

[0210] 클래스 A 로돕신-유사,

[0211] 클래스 B 시크리틴-유사,

[0212] 클래스 C 대사성/폐로몬,

[0213] 클래스 D 진균성 폐로몬, 및

[0214] 클래스 E cAMP 수용체.

[0215] 클래스 A 로돕신 유사 수용체는 아민 수용체: 아세틸콜린, 알파 아드레날린수용체, 베타 아드레날린수용체, 도파민, 히스타민, 세로토닌, 옥토파민 및 미량 아민; 탭티드 수용체: 안지오텐신, 봄베신, 브라디키닌, C5a 아나필라톡신, Fmet-leu-phe, APJ 유사, 인터루킨-8, 케모카인 수용체(C-C 케모카인, C-X-C 케모카인, BONZO 수용체(CXC6R), C-X3-C 케모카인 및 XC 케모카인), CCK 수용체, 엔도텔린 수용체, 멜라노코르틴 수용체, 뉴로탭티드 Y 수용체, 뉴로텐신 수용체, 오피오이드 수용체, 소마토스타틴 수용체, 타키키닌(Tachykinin) 수용체(기질 P(NK1), 기질 K(NK2), 뉴로메딘 K(NK3), 타키키닌 유사 1, 및 타키키닌 유사 T), 바소프레신-유사 수용체(바소프레신, 옥시토신, 및 코노프레신), 갈라닌 유사 수용체(갈라닌, 알라토스타틴, 및 GPCR 54), 프로테나제-활성화 유사 수용체(예를 들어, 트롬빈), 오렉신&뉴로탭티드 FF, 우로텐신 II 수용체, 아드레노메들린(GIOD) 수용체, GPR37/엔도텔린 B-유사 수용체, 케모카인 수용체-유사 수용체, 및 뉴로메딘 U 수용체; 호르몬 단백질

수용체: 여포 자극 호르몬, 루트로핀-코리오고난드로핀 호르몬, 타이로트로핀, 및 고나도트로핀; (로드)옵신 수용체; 후각 수용체; 프로스타노이드 수용체: 프로스타글란дин, 프로스타시클린, 및 트롬복산; 뉴클레오티드-유사 수용체: 아데노신 및 퓨린수용체; 대마초 수용체; 혈소판 활성화 인자 수용체; 고나도트로핀-방출 호르몬 수용체; 타이로트로핀-방출 호르몬 & 분비자극성 수용체: 타이로트로핀-방출 호르몬, 성장 호르몬 분비자극성, 및 성장호르몬 분비자극성 유사; 멜라토닌; 멜라토닌 수용체; 바이러스 수용체; 리소스핑고리피드 & LPA(EDG) 수용체; 류코트리엔 B4 수용체: 류코트리엔 B4 수용체 BLT1 및 류코트리엔 B4 수용체 BLT2; 및 클래스 A 올пан/다른 수용체: 혈소판 ADP & KIOI 수용체, SREB, Mas 원발암유전자, RDC1, ORPH, LGR 유사(호르몬 수용체), GPR, GPR45 유사, 시스테이닐 류코트리엔, Mas-관련 수용체(MRG), 및 GP40 유사 수용체를 포함한다.

[0216] GPCR의 클래스 B(시크리틴-수용체 패밀리)는 폴리펩티드 호르몬(칼시토닌, 코르티코트로핀 방출 인자, 위 억제 성 웨პ티드, 글루카곤, 글루카곤-유사 웨პ티드-1,-2, 성장 호르몬-방출 호르몬, 부갑상선 호르몬, PACAP, 시크리틴, 혈관작용성 장 폴리펩티드, 이뇨 호르몬, EMR1, 라트로필린), 원형질막에서 세포간 상호작용을 매개하는 것으로 여겨지는 분자(뇌 특이적 혈관생성 억제제(BAI)) 및 스트레스 반응 및 수명을 조절하는 초파리 (*Drosophila*) 단백질 그룹(메투셀라-유사 단백질)에 대한 수용체를 포함한다.

[0217] 클래스 C 대사성 글루타메이트/페로몬 수용체는 대사성 글루타메이트, 대사성 글루타메이트 그룹 I, 대사성 글루타메이트 그룹 II, 대사성 글루타메이트 그룹 III, 대사성 글루타메이트 다른, 세포외 칼슘 감지, 추정 페로몬 수용체, GABA-B, GABA-B 아형 1, GABA-B 아형 2, 및 올펜 GPRC5 수용체를 포함한다.

[0218] GPCR은 시각, 후각, 행동 및 감정 조절, 면역계와 염증의 활성 조절, 자율 신경계 전달, 세포 밀도 감지 등을 포함하는, 다양한 생리적 프로세스에 관여한다. 불활성 G 단백질은 불활성 상태인 수용체에 결합하는 것으로 알려져 있다. 리간드가 인지되면, 수용체 또는 이의 서브유닛은 입체형태를 바꾸어서 물리적으로 G 단백질을 활성화시키고, 이는 수용체로부터 떨어진다. 수용체는 이제 다른 G 단백질을 활성화시키거나, 또는 그 불활성 상태로 다시 돌아간다. 수용체 분자는 활성 및 불활성 생물리 상태간에 입체형태 균형상태로 존재하는 것으로 여겨진다. 수용체에 리간드의 결합은 활성화 수용체 상태로 균형을 이동시킬 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드는 세포에서 발현시 수용체의 N 말단은 세포 외부에 존재하고 C 말단은 세포 내부에 존재하는 G 단백질 커플링 수용체를 포함한다. 당분야의 숙련가는 경막 단백질의 배향을 검출하기에 적합한 방법을 알고 있으며, 이러한 방법은 이에 제한되는 것은 아니고, 결정학, NMR-연구, 모델링 연구와 현미경법, 예컨대 광학 또는 전자 현미경 시료를 위한 세척제 투과성 대조군과 조합된 면역표지법, 2 폴리펩티드의 단편 상보성 태깅 등을 포함한다.

[0219] 바람직한 구체예에서, G 단백질 커플링 수용체는 클래스 A GPCR이다. 추가의 바람직한 구체예에서, 클래스 A(로돕신-유사) GPCR은 후각 수용체 또는 아드레날린작용성 수용체, 보다 바람직하게는 후각 수용체이다. 후각 수용체는 세포에서 발현시 수용체의 N 말단은 세포 외부에 존재하고 C 말단은 세포 내부에 존재하는 한 임의의 공급원으로부터 유래된 것일 수 있다. 그 예로는, 이에 제한되는 것은 아니고 척색동물 수용체, 선충 수용체, 또는 이의 어느 하나의 생물학적 활성 변이체 또는 단편을 포함한다. 척색동물 수용체의 예로는, 이에 제한되는 것은 아니고 포유동물 수용체, 조류 수용체 및 어류 수용체가 포함된다. 바람직한 구체예에서, 후각 수용체는 선충 수용체 또는 이의 생물학적 활성 변이체 또는 단편을 포함한다. 구체예에서, 선충 수용체는 예쁜 꼬마 선충 수용체, 또는 이의 생물학적 활성 변이체 또는 단편이다. 본 발명의 폴리펩티드를 생성하는데 사용할 수 있고/있거나 본 발명의 방법에서 사용할 수 있는 후각 수용체의 예는 [Buck and Axe.(1991), Robertson (1998 and 2001), Aloni et al.(2006), Feldmesser(2006), Olender et al.(2004a and b), Glusma et al. 2000a, 2000b and 2001), Fuchs et al.(2001), Pilpel and Lancet(1999), Sharon et al.(19^8), Zozulya et al.(2001), Niimura and Nci(2003), Lander et al.(2001), Zhang and Firestein(2002), Young et al.(2002)]에 기술되어 있다. 또한, 후각 수용체의 종합적인 리스트는 SenseLab 웹사이트(<http://senselab.med.yale.edu>)에서 입수가능하다.

[0220] 다른 구체예에서, GPCR은 클래스 B 또는 클래스 C 수용체이고, 클래스 C가 이들 2 구체예 중에서 더 바람직하다.

[0221] 특히 바람직한 구체예에서, G 단백질 커플링 수용체는 7개 경막 도메인을 포함한다.

[0222] 생물발광성 단백질은 G 단백질 커플링 수용체(또는 본 발명의 폴리펩티드)의 제1, 제3, 제5 비경막 루프(도메인) 또는 C 말단의 일부분을 형성할 수 있다. 억셉터 분자는 또한 G 단백질 커플링 수용체(또는 본 발명의 폴리펩티드)의 제1, 제3, 제5 비경막 루프(도메인) 또는 C 말단의 일부분을 형성할 수 있다. 각각의 이들 영역은 G 단백질 커플링 수용체가 세포에서 발현하여 존재시 세포내에 있다.

- [0223] 억셉터 분자는 동일 분자(즉, 동일한 단일 폴리펩티드 사슬)의 일부일 때 생물발광성 단백질과 동일 영역에 존재할 수 없지만, 억셉터 분자는 G 단백질 커플링 수용체가 이랑체 또는 고급 다량체로서 존재할 때는 생물발광성 단백질과 동등한 영역에 존재할 수 있다. 예를 들어, 생물발광성 단백질은 수용체의 한 서브유닛의 C 말단 일부분을 형성하고, 억셉터 분자는 수용체의 다른 서브유닛의 C 말단 일부분을 형성할 수 있다. 이러한 예에서, 표지가 회합되는 서브유닛은 동일하거나 또는 상이할 수 있는데, 예를 들어 2 서브유닛은 하나가 생물발광성 단백질로 표지되고 다른 하나가 억셉터 분자로 표지되는 것 외에는 동일할 수 있다. 일 구체예에서, 생물발광성 단백질은 GPCR 서브유닛의 제3 비경막 루프의 일부분을 형성하고, 억셉터 분자는 제5 비경막 루프의 일부분을 형성한다. 다른 구체예에서, 억셉터 분자는 GPCR 서브유닛의 제3 비경막 루프의 일부분을 형성하고, 생물발광성 단백질은 제5 비경막 루프의 일부분을 형성한다.
- [0224] 다른 구체예에서, 생물발광성 단백질은 GPCR 서브유닛의 제1 비경막 루프의 일부분을 형성하고, 억셉터 분자는 제3 비경막 루프의 일부분을 형성한다. 다른 구체예에서, 억셉터 분자는 GPCR 서브유닛의 제1 비경막 루프의 일부분을 형성하고, 생물발광성 단백질은 제3 비경막 루프의 일부분을 형성한다.
- [0225] 바람직한 구체예에서, 생물발광성 단백질은 GPCR 서브유닛의 제5 비경막 루프의 일부분을 형성하고, 억셉터 분자는 C 말단의 일부분을 형성한다. 다른 구체예에서, 억셉터 분자는 GPCR 서브유닛의 제5 비경막 루프의 일부분을 형성하고, 생물발광성 단백질은 C 말단의 일부분을 형성한다.
- [0226] 다른 구체예에서, G 단백질 커플링 수용체는 2 이상의 서브유닛을 포함하고, 여기서 생물발광성 단백질은 제1 서브유닛의 제3 비경막 루프의 일부분을 형성하고, 억셉터 분자는 제2 서브유닛의 제5 비경막 루프의 일부분을 형성한다. 다른 구체예에서, 억셉터 분자는 제1 서브유닛의 제3 비경막 루프의 일부분을 형성하고, 생물발광성 단백질은 제2 서브유닛의 제5 비경막 루프의 일부분을 형성한다.
- [0227] 다른 구체예에서, G 단백질 커플링 수용체는 2 이상의 서브유닛을 포함하고, 여기서 생물발광성 단백질은 제1 서브유닛의 제1 비경막 루프의 일부분을 형성하고, 억셉터 분자는 제2 서브유닛의 제3 비경막 루프의 일부분을 형성한다. 다른 구체예에서, 억셉터 분자는 제1 서브유닛의 제1 비경막 루프의 일부분을 형성하고, 생물발광성 단백질은 제2 서브유닛의 제3 비경막 루프의 일부분을 형성한다.
- [0228] 다른 구체예에서, G 단백질 커플링 수용체는 2 이상의 서브유닛을 포함하고, 여기서 생물발광성 단백질은 제1 서브유닛의 제5 비경막 루프의 일부분을 형성하고, 억셉터 분자는 제2 서브유닛의 C 말단 일부분을 형성한다. 다른 구체예에서, 억셉터 분자는 제1 서브유닛의 제5 비경막 루프의 일부분을 형성하고, 생물발광성 단백질은 제2 서브유닛의 C 말단의 일부분을 형성한다.
- [0229] 다른 구체예에서, G 단백질 커플링 수용체는 2 이상의 서브유닛을 포함하고, 도너와 억셉터 분자는 각각 제1 및 제2 서브유닛의 동일 부위에 존재한다.
- [0230] 구체예에서, 생물발광성 단백질 또는 억셉터 분자는 제5 경막 도메인의 제2 아미노산 뒤에 그리고 제6 경막 도메인 시작전 제2 아미노산 앞에 위치한다. 다른 구체예에서, 생물발광성 단백질 또는 억셉터 분자는 제5 경막 도메인 뒤 약 아미노산 8 이후 또는 제5 경막 도메인 뒤 약 아미노산 22 이후에 위치한다. 추가 구체예에서, 생물발광성 단백질 또는 억셉터 분자는 제6 경막 도메인 전 약 10 또는 12 아미노산에 삽입된다. 가장 바람직하게, 생물발광성 단백질 또는 억셉터 분자는 제3 비경막 루프(도메인)의 중간에 위치한다.
- [0231] C 말단과 관련하여, 천연 C 말단의 약 5 내지 25 아미노산이 제7 경막 도메인의 말단에 잔존하는 것이 바람직하다. 바람직하게, 생물발광성 단백질 또는 억셉터 분자는 제7 경막 뒤 약 16 또는 20 아미노산 이후에 삽입된다.
- [0232] 제1 비경막 루프(도메인)에서의 생물발광성 단백질 또는 억셉터 분자의 위치로 돌아와서, 상기 표지는 제1 경막 도메인의 말단 뒤 약 2 아미노산 및 제2 경막 도메인의 시작 전 약 2 아미노산에 삽입되는 것이 바람직하다. 가장 바람직하게, 생물발광성 단백질 또는 억셉터 분자는 제1 비경막 루프(도메인)의 중간에 위치한다.
- [0233] 추가 구체예에서, 생물발광성 단백질은 G 단백질 커플링 수용체(또는 본 발명의 폴리펩티드)의 N 말단, 제2, 제4, 또는 제6 비경막 루프(도메인)의 일부분을 형성할 수 있다. 억셉터 분자는 또한 G 단백질 커플링 수용체(또는 본 발명의 폴리펩티드)의 N 말단 제2, 제4, 또는 제6 비경막 루프(도메인)의 일부분을 형성할 수 있다. 그러나, 동일 분자의 일부분일때 생물발광성 단백질과 동일한 영역에 존재할 수 없다. 각각의 이들 영역은 G 단백질 커플링 수용체가 발현되어 세포에 존재시 세포내에 존재한다.
- [0234] GPCR은 2 이상의 상이한 GPCR의 비천연적으로 발생하는 키메라일 수 있다. 구체적으로, 이는 키메라에 한 수용체의 일부분은 항상 존재하고, 겹출하려는 화합물에 따라 다양한 GPCR의 다른 부분이 삽입되는, 형질도입 카세

트를 생성할 수 있게 한다.

- [0235] 일 구체예에서, 서브유닛은 제1 G 단백질 커플링 수용체 서브유닛의 제1 경막 도메인의 N 말단 및 적어도 대부분, 제2 G 단백질 커플링 수용체 서브유닛의 제1 비경막 루프의 적어도 대부분 내지 제5 경막 도메인의 적어도 대부분, 및 제1 G 단백질 커플링 수용체 서브유닛의 제5 비경막 루프의 적어도 대부분 내지 C 말단을 포함한다.
- [0236] 다른 구체예에서, 서브유닛은 제1 G 단백질 커플링 수용체 서브유닛의 N 말단 내지 제5 경막 도메인의 적어도 대부분, 및 제2 G 단백질 커플링 수용체 서브유닛의 제5 비경막 루프의 적어도 대부분 내지 C 말단을 포함한다.
- [0237] 당분야의 숙련가들은 G 단백질 커플링 수용체 서브유닛의 N 말단, 경막 도메인, 비경막 루프(도메인) 및 C 말단을 쉽게 결정할 수 있다.
- [0238] 예를 들어, 다양한 생물정보학적 접근법을 이용하여 G 단백질 커플링 수용체의 알려진 경막 도메인과 그 아미노산 서열 및 유사도를 기초로, 단백질에서 경막 도메인의 위치 및 위상 기하학을 결정할 수 있다. 정렬 및 아미노산 서열 비교는 예를 들어, BLAST 프로그램 또는 CLCSTAL W 프로그램을 이용해, 당분야에서 통상적으로 실시된다. 공지의 경막 도메인 함유 단백질과의 정렬결과를 기초로, 당분야의 숙련가는 경막 도메인의 위치를 예상하는 것이 가능하다. 또한, 일부 막-스페닝 단백질의 3차원 구조가 알려져 있는데, 예를 들어 7 경막 G-단백질 커플링 로돕신 광수용체 구조가 X선 결정학에 의해 알려져 있다. 이러한 3D 구조를 이용한 분석 및 비교 결과를 기초로, 다른 막 단백질에서 경막 도메인의 위치 및 위상 기하학을 예상하는 것이 가능할 수 있다. 또한 단백질에서 경막 도메인의 위치 및 위상 기하학을 예상하는데 이용할 수 있는 많은 프로그램이 존재한다. 예를 들어, 그 중 하나로는 막 스페닝 단백질 분절을 예측하는 TMpred(HTotmann and Stoffel, 1993); 막 단백질의 위상 기하학을 예측하는 TopPred(von Heijnc et al, 1990); 단일 및 다수 서열로부터 2차 구조를 예상하는, PRFDATOR(Frishrn and Argos, 1997); 증대된 정렬 서열로부터 단백질의 경막 영역을 예측하는, TMAP(Persson and Argos, 1994); 및 단일 서열로부터 경막 영역을 예측하는 ALOM2(KJien et al, 1984) 중 하나 또는 조합을 이용할 수 있다.
- [0239] 표준 명명법에 따라, 경막 도메인과 비경막 루프(도메인)의 넘버링은 폴리펩티드의 N 말단에 대해 이루어진다.
- [0240] 천연 발생 G 단백질 커플링 수용체의 아미노산 서열 돌연변이체/변이체는 코딩되는 폴리뉴클레오티드에 적절한 뉴클레오티드 변화를 도입하거나, 또는 원하는 폴리펩티드의 시험관 내 합성에 의해 제조될 수 있다. 이러한 돌연변이체는, 예를 들어 아미노산 서열 내에 잔기의 결실, 삽입 또는 치환을 포함한다. 최종 폴리펩티드 생성물이 원하는 특징을 갖는 조건으로, 최종 구성체에 결실, 삽입 및 치환을 조합하여 포함시킨다.
- [0241] 돌연변이체(변이체) 폴리펩티드는 임의의 당분야에 알려진 기술을 이용해 제조될 수 있다. 예를 들어, 본원에 기술된 폴리뉴클레오티드에 대해 시험관 내 돌연변이유발법을 실시한다. 이러한 시험관내 돌연변이 유발법은 폴리뉴클레오티드를 적절한 벡터로 서브클로닝하고, 이 벡터를 예컨대 이.콜라이(*E. coli*) XL-1 red(Stratagene) 등과 같은 "뮤테이터(mutator)" 균주로 형질전환시키고 적절한 수의 세대 동안 이 형질전환 박테리아를 증식시키는 것을 포함할 수 있다. 다른 예에서, G 단백질 커플링 수용체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 대해 [Harayama(1998)]가 대략적으로 기술한 바와 같은 DNA 서플링 방법을 실시한다. 돌연변이된/변이체 DNA 유래의 생성물을 본원에 기술된 방법을 이용해 용이하게 스크리닝하여 이들이 본 발명의 방법에 유용한가 여부를 결정할 수 있다.
- [0242] 아미노산 서열 돌연변이체를 설계할 때, 돌연변이 부위의 위치 및 돌연변이의 성질은 변형시키려는 특징(들)에 따라 좌우된다. 돌연변이 부위는 개별적으로 또는 연속적으로, 예를 들어 (1) 처음에 보존성 아미노산 선택물로 치환한 후 얻어진 결과에 따라 보다 급진적인 선택물로 치환하거나, (2) 표적 잔기를 결실시키거나, 또는 (3) 위치한 부위에 인접하여 다른 잔기를 삽입하여 변형시킬 수 있다.
- [0243] 아미노산 서열 결실은 대체로 약 1 내지 15 잔기 범위, 보다 바람직하게는 약 1 내지 10 잔기, 대체로는 약 1 내지 5의 연속 잔기 범위이다.
- [0244] 치환 돌연변이체는 G 단백질 커플링 수용체에 1 이상의 아미노산 잔기가 제거되고 그 위치에 상이한 잔기가 삽입된다. 치환 돌연변이유발을 위한 최고의 관심 부위는 기능에 중요한 것으로 동정된 부위를 포함한다. 다른 관심 부위는 다양한 균주 또는 종으로부터 얻은 특정 잔기들이 동일한 부위이다. 이들 위치는 생물학적 활성에 중요할 수 있다. 이들 부위, 특히 3 이상의 다른 동일한 보존 부위의 서열 내에 속하는 부위들은 바람직하게 비교적 보존적인 방식으로 치환된다. 이러한 보존성 치환을 표 3에 나타내었다.
- [0245] 또한, 원한다면, 비천연 아미노산 또는 화학적 아미노산 유사체를 본원에 기술된 폴리펩티드에 부가 또는 치환

하여 도입시킬 수 있다. 이러한 아미노산은, 이에 제한되는 것은 아니고, 통상의 아미노산의 D-이성질체, 2,4-디아미노부티르산, α-아미노 이소부티르산, 4-아미노부티르산, 2-아미노부티르산, 6-아미노 헥산산, 2-아미노이소부티르산, 3-아미노 프로피온산, 오르니틴, 노르루신, 노르발린, 히드록시프롤린, 사르코신, 시트룰린, 호모시트룰린, 시스트산, t-부틸글리신, t-부틸알라닌, 페닐글리신, 시클로헥실알라닌, β-알라닌, 플루오로-아미노산, 디자이너 아미노산 예컨대 β-메틸 아미노산, Cα-메틸 아미노산, Nα-메틸 아미노산, 및 일반적인 아미노산 유사체 등을 포함한다.

[0246] 또한 본 발명의 범주에는, 예를 들어 비오틴화, 벤질화, 글리코실화, 아세틸화, 인산화, 아미드화, 공지의 보호/차단기에 의한 유도체화, 단백질가수분해 절단, 항체 분자 또는 다른 세포 리간드에 대한 결합 등에 의하여 합성 동안이나 그 이후에 차등적으로 변형된 폴리펩티드가 포함된다. 이러한 변형에 의해 폴리펩티드의 안정성 및/또는 생활성이 증가될 수 있다.

표 3

예시적인 치환

원래 잔기	예시적인 치환
Ala (A)	val; leu; ile; gly
Arg (R)	lys
Asn (N)	gln; his
Asp (D)	glu
Cys (C)	ser
Gln (Q)	asn; his
Glu (E)	asp
Gly (G)	pro, ala
His (H)	asn; gln
Ile (I)	leu; val; ala
Leu (L)	ile; val; met; ala; phe
Lys (K)	arg
Met (M)	leu; phe
Phe (F)	leu; val; ala
Pro (P)	gly
Ser (S)	thr
Thr (T)	ser
Trp (W)	tyr
Tyr (Y)	trp; phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala

[0247]

[0248] 본원에 기술된 폴리펩티드는 재조합 폴리펩티드의 생성 및 회수, 및 폴리펩티드의 화학 합성을 포함하여, 다양한 방식으로 제조될 수 있다. 일 구체예에서, 본 발명의 단리 폴리펩티드는 폴리펩티드를 생성하는데 효율적인 조건 하에서 폴리펩티드를 발현할 수 있는 세포를 배양하고, 그 폴리펩티드를 회수하는 것에 의해 제조된다. 배양에 바람직한 세포는 본 발명의 재조합 세포이다. 효율적인 배양 조건은, 이에 제한되는 것은 아니고, 폴리펩티드 생성을 허용하는 효율적인 배지, 생물반응기, 온도, pH 및 산소 조건을 포함한다. 효율적인 배지는 본 발명의 폴리펩티드가 생성되도록 세포가 배양되는 임의의 배지를 의미한다. 이러한 배지는 동화 가능한 탄소, 질소 및 인산염 공급원, 적절한 염, 미네랄, 금속 및 다른 영양소, 예컨대 비타민을 갖는 수성 배지를 포함한다. 본 발명의 세포는 통상의 발효 생물반응기, 진탕 플라스크, 시험관, 마이크로타이터 디쉬, 및 페트리 플레이트에서 배양될 수 있다. 배양은 재조합 세포에 적절한 온도, pH 및 산소 함량에서 수행될 수 있다. 이러한 배양 조건은 당분야의 숙련가의 전문지식에 속한다.

보조 분자

[0250] 보조 분자는 G 커플링 단백질 수용체 신호전달에 관여하는 단백질이다. 그 예로는 G 단백질과 어레스틴이 포함된다. 직접적으로 또는 간접적으로 G 단백질 커플링 수용체(및/또는 본원에 정의된 폴리펩티드)와 회합하고, G 단백질 커플링 수용체에 화합물이 결합한 후 2 표지의 상대 위치에서 공간적 변경이 존재하여 BRET 검출이 가능하게 되는 한 임의의 그러한 표지화 보조 분자를 본 발명의 방법에서 사용할 수 있다.

[0251] 당분야의 숙련가는 당분야의 표준 기술을 이용해 특이적 G 단백질 커플링 수용체와 회합하는 보조 분자를 쉽게 동정할 수 있다.

[0252] G 단백질 커플링 수용체에 대해 상기 기술된 상세한 돌연변이체(변이체)를 또한 보조 분자에 적용한다.

[0253] 생물발광성 단백질 또는 억셉터 분자는 보조 분자가 여전히 직접 또는 간접적으로 수용체에 결합하여, 목적하는 화합물이 결합후 BRET의 변화를 검출할 수 있는 한 보조 분자의 임의 위치에 존재할 수 있다. 구체예에서, 생물 발광성 단백질 또는 억셉터 분자는 보조 분자의 C 말단 또는 N 말단에 위치한다. 보조 분자는 이것이 GPCR과 복합체를 형성하기 위해 1 이상의 다른 보조 분자를 필요로한다면 수용체에 간접적으로 결합하는데, 예를 들어 제1 보조 분자가 수용체에 결합하고 제2 보조 분자가 제1 보조 분자에 직접 결합함으로써 수용체에 간접 결합한다.

G 단백질

[0255] G-단백질은 세포내 신호전달을 위한 2차 메신저 캐스캐이드에 관여하는 단백질 패밀리이다. G 단백질은 불활성 구아노신 디포스페이트(GDP) 결합 상태와 활성 구아노신 트리포스페이트(GTP) 결합 상태 사이를 교대하는, "분자 스위치"로서 기능한다. 궁극적으로, G 단백질은 신호 전달 네트워크의 캐스캐이드를 개시시킴으로써 하류 세포 프로세스를 조절한다(Hofmann et al., 2009; Oldham and Hamm, 2008).

[0256] 2개의 상이한 G 단백질 패밀리가 존재하는데, G 단백질 커플링 수용체에 의해 활성화되고 알파(α), 베타(β) 및 감마(γ) 서브유닛으로 구성된, 흔히 "거대" G 단백질이라 불리는 이종삼량체 G 단백질과; 소형 GTPase의 Ras 수퍼패밀리에 속하는 "소형" G 단백질(20-25kDa)이다. 이들 단백질은 이종 삼량체 G 단백질에 존재하는 알파(α) 서브유닛과 상동성이고, 또한 GTP와 GDP에 결합하고 신호 전달에 관여한다. 원형질막과 회합되기 위해, 많은 G 단백질들은 지질에 의해 공유적으로 변형되는데, 예를 들어 이종삼량체 G 단백질 서브유닛은 미리스톨화, 팔미토일화, 또는 프레닐화될 수 있는 한편, 소형 G 단백질은 프레닐화될 수 있다.

[0257] 당분야의 숙련가는 수많은 공지의 G 단백질이 존재한다는 것을 이해할 것이다. 다수의 이종삼량체 G 단백질이 선충에서 동정되었는데, 예를 들어 예쁜 꼬마 선충은 21 $\text{G}\alpha$, 2 $\text{G}\beta$ 및 2 $\text{G}\gamma$ 유전자를 갖는다(Jansen et al., 1999; Cuppen et al., 2003). 서열 유사도를 기초로, 포유동물 $\text{G}\alpha$ 서브유닛은 다음의 4가지 패밀리로 분류된다: Gs , Gi/o , Gq 및 G12 (Neves et al., 2002). 예쁜 꼬마 선충은 각각의 포유동물 패밀리 중 하나의 이종상동체를 발현한다: $\text{GSA-1}(\text{Gs})$, $\text{GOA-1}(\text{Gi/o})$, $\text{EGL-30}(\text{Gq})$ 및 $\text{GPA-12}(\text{G12})$. 나머지 예쁜 꼬마 선충 α 서브유닛(GPA-1-11, GPA-13-17 및 ODR-3)은 충분한 상동성을 공유하지 않아 분류할 수 없다. GPA-12를 제외하고, 보존성 $\text{G}\alpha$ 서브유닛은 광범위하게 발현되지만 새로운 $\text{G}\alpha$ 유전자 중 14는 화학감지 뉴런의 서브셋에서 발현된다.

[0258] $\text{G}\beta$ 서브유닛, GPB-1과, $\text{G}\gamma$ 서브유닛, GPC-2는 전형적인 G 단백질 이종삼량체의 α 서브유닛과 함께 기능하는 것으로 보인다. 나머지 $\text{G}\beta$ 서브유닛, GPB-2는 일정 RGS 단백질의 기능을 조절하는 것으로 여겨지는 한편, 나머지 $\text{G}\gamma$ 서브유닛, GPC-1은 화학감지에서 제한적인 역할을 한다. 따라서, 예쁜 꼬마 선충에서 대부분의 G 단백질 경로에 대한 기능적 차이는 α 서브유닛에 존재한다.

어레스틴

[0260] 어레스틴은 G 단백질 신호전달의 종결을 위한 핵심 단백질 중 하나다. 활성화된 GPCR은 G 단백질 커플링 수용체 키나제(GRK)에 의해 특이적으로 인산화된 후 어레스틴에 결합하여 수용체/G 단백질 상호작용을 불가능하게 하여, 결과적으로 이후 신호 전달이 중단된다. 어레스틴은 작용제-활성화된 것을 포함하여, GPCR에 결합하고 그렇지 않은 것보다 GRK에 의해 인산화된 것에 더욱 단단하게 결합한다.

[0261] 세포에서 어레스틴 트래킹의 2가지 상이한 패턴에 따라 다음과 같이 GPCR이 분류된다: 어레스틴이 세포 표면의 수용체와 상호반응하지만 소포체로 세포내이입되지 않아, 수용체와 일시적인 상호작용을 보이는 클래스 A, 및 R-어레스틴 및 수용체가 함께 세포막으로부터 세포내이입 소포체로 운반되는 클래스 B. 이들 2종의 수용체 클래스는 또한 상이한 어레스틴 이소폼에 대한 그들의 친화성 면에서 다르다. 또한, 클래스 A 수용체는 R-어레스틴 2에 우선적으로 결합하지만 클래스 B 수용체는 β -어레스틴1 및 H-어레스틴2에 동등한 친화성으로 결합한다.

[0262] R-어레스틴 결합은 그 동족 G 단백질로부터 수용체의 언커플링을 일으켜, 하류 2차 메신저 분자를 통한 GPCR 신호전달의 약화 또는 탈감작화가 초래된다.

[0263] G 단백질 신호 종료 동안, 어레스틴 결합은 GPCR로부터의 새로운 신호전달을 개시할 수 있다. 예를 들어, R-어레스틴은 어댑터로서 기능하여, 비수용체 티로신 키나제, 예컨대 Src가 내재화 수용체와 신호전달 복합체를 형성하게 한다. H-어레스틴은 MAPK 모듈 예컨대 ASK-MKK4-JNK3 및 RAF-MEK-ERK 1/2에 대한 GPCR-조절 스캐폴드로서 기능한다. 또한, 어레스틴은 세포내이입 부속물의 단백질, 예컨대 클라트린 AP2 복합물의 β -어댑틴 서브유닛2, 및 Arf-6과 상호작용하여, 클라트린 코팅된 소포체를 통하여 수용체의 내재화를 촉진한다.

[0264] 선충 어레스틴의 예로는 가용성 및 휘발성 냄새를 검출하는데 관여하는, 다양한 화학감지 뉴런 및 HSN 뉴런을 포함하여, 신경계에서 주로 발현되는, 예쁜 꼬마 선충 유래의 ARR-1이다. 20종 이상의 추정 어레스틴이 현재 선충 예쁜꼬마 선충에서 동정되었다. 이러한 어레스틴은 신경계 전반에서 발현되고 척추동물의 비시각 어레스틴과 유사하게, 수용체 내재화를 지원하지만, 시각/감각 아형과 유사하게 후각 및 시력에 관여한다.

재조합 벡터

[0265] 본 발명의 일 구체예는 숙주 세포에 폴리뉴클레오티드 분자를 전달할 수 있는 임의의 벡터에 삽입된, 본원에 기술한 바와 같은 폴리펩티드를 코딩하는 1 이상의 단리/외생성 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 재조합 벡터를 포함한다. 이러한 벡터는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 분자에 인접하여 천연적으로 존재하지 않으며, 바람직하게는 이 폴리뉴클레오티드 분자(들)이 유래하는 종 이외의 종에서 유래되는 폴리뉴클레오티드 서열인, 이종성 폴리뉴클레오티드 서열을 함유한다. 벡터는 원핵생물 또는 진핵생물, RNA 또는 DNA일 수 있고, 대체로 트랜스포준(예컨대, US 5,792,294에 기재된 것), 바이러스 또는 플라스미드이다.

[0267] 한 유형의 재조합 벡터는 발현 벡터에 작동적으로 연결된 폴리뉴클레오티드(들)을 포함한다. 어구 작동적으로 연결된 폴리뉴클레오티드 분자가 숙주 세포로 형질전환시 발현될 수 있는 방식으로 발현 벡터에 삽입됨을 의미한다. 본원에서 사용되는, 발현 벡터는 숙주 세포를 형질전환시킬 수 있고 특정 폴리뉴클레오티드 분자를 발현시킬 수 있는 DNA 또는 RNA 벡터이다. 바람직하게, 발현 벡터는 또한 숙주 세포 내에서 복제될 수 있다. 발현 벡터는 원핵생물 또는 진핵생물의 것일 수 있고, 대체로 바이러스 또는 플라스미드이다. 발현 벡터는 박테리아, 진균, 내부기생체, 절지동물, 동물, 및 식물 세포를 포함하여, 재조합 세포에서 기능(즉, 직접 유전자 발현)하는 임의의 벡터를 포함한다. 본 발명의 벡터는 또한 세포 무함유 발현 시스템에서 폴리펩티드를 생성하는데 사용될 수 있고, 이러한 시스템은 당분야에 잘 알려져 있다.

[0268] 본원에서 사용되는 "작동적으로 연결된"은 2 이상의 핵산(예를 들어, DNA) 절편 간 기능적 관련성을 의미한다. 대체로, 이는 전사되는 서열에 대한 전사 조절 성분의 기능적 관련성을 의미한다. 예를 들어, 프로모터가 적절한 숙주 세포 및/또는 세포 무함유 발현 시스템에서 코딩 서열의 전사를 자극 또는 조정한다면, 이 프로모터는 코딩 서열, 예컨대 본원에 정의된 폴리뉴클레오티드에 작동적으로 연결된 것이다. 대체로, 전사되는 서열에 작동적으로 연결된 프로모터 전사 조절 성분은 전사되는 서열에 물리적으로 인접하며, 다시 말해, 이들은 시스-작용성이다. 그러나, 일부 전사 조절 성분 예컨대 인핸서는 이들이 전사를 강화하는 코딩 서열에 물리적으로 인접하거나 가깝게 위치할 필요가 없다.

[0269] 구체적으로, 본 발명의 발현 벡터는 조절 서열 예컨대 전사 제어 서열, 번역 제어 서열, 복제 원점, 및 재조합 세포에 적합하고 본 발명의 폴리뉴클레오티드 분자의 발현을 제어하는 다른 조절 서열을 함유한다. 구체적으로, 본 발명의 재조합 분자는 전사 제어 서열을 포함한다. 전사 제어 서열은 전사의 개시, 연장 및 종결을 제어하는 서열이다. 특히 중요한 전사 제어 서열은 전사 개시를 제어하는 것, 예컨대 프로모터, 인핸서, 오퍼레이터 및 리프레서 서열이다. 적절한 전사 제어 서열은 본 발명의 재조합 세포 중 1 이상에서 기능할 수 있는 임의의 전사 제어 서열을 포함한다. 다양한 이러한 전사 제어 서열이 당분야에서 알려져 있다. 바람직한 전사 제어 서열은 박테리아, 효모, 절지동물, 선충, 식물 또는 동물 세포에서 기능하는 것들, 예컨대 이에 제한되는 것은 아니고, tac, lac, trp, trc, oxy-pro, omp/lpp, rrnB, 박테리오파지 랍다, 박테리오파지 T7, T71ac, 박테리오파지 T3, 박테리오파지 SP6, 박테리오파지 SP01, 메탈로티오네인, 알파-교배 인자, 피키아 알콜 옥시다제, 알파바이러스 서브게놈 프로모터(예컨대 신드비스 바이러스 서브게놈 프로모터), 항생제 내성 유전자, 배클로바이러스, 헬리오티스 제아(*Heliothis zea*) 곤충 바이러스, 백시니아 바이러스, 헤르페스바이러스, 라쿤 폭스바이러스, 다른 폭스바이러스, 아데노바이러스, 사이토메갈로바이러스(예컨대 최초기 프로모터), 유인원바이러스(SV) 40, 레트로바이러스, 액틴, 레트로바이러스 장기말단 반복부, 루이스 육종 바이러스, 열쇼크, 인산염 및 질산염 전사 제어 서열과, 원핵생물 또는 진핵생물 세포에서 유전자 발현을 제어할 수 있는 다른 서열들을 포함한다.

숙주 세포

[0270] 본 발명의 다른 구체예는 본원에 기술된 1 이상의 재조합 분자로 형질전환되는 숙주 세포 또는 이의 자손 세포를 포함한다. 세포로 폴리뉴클레오티드 분자의 형질전환은 폴리뉴클레오티드 분자를 세포에 삽입시킬 수 있는 임의의 방법에 의해 실시될 수 있다. 형질전환 방법은 이에 제한되는 것은 아니고, 형질감염, 전기천공, 미세주사법, 리포액션, 흡착법 및 프로토플라스트 융합법을 포함한다. 재조합 세포는 단일세포로 남거나 또는 조직, 장기 또는 다세포 유기체로 성장할 수 있다. 본 발명의 형질전환된 폴리뉴클레오티드 분자는 과잉염색체로 남거나 또는 발현되는 그 능력이 보유되는 방식으로 형질전환(즉, 재조합) 세포의 염색체 내 1 이상의 부위에 통합

될 수 있다.

[0272] 형질전환에 적절한 숙주 세포는 본 발명의 폴리뉴클레오티드로 형질전환될 수 있는 임의의 세포를 포함한다. 본 발명의 숙주 세포는 본원에 기술된 폴리펩티드를 내생적으로(즉, 천연적으로) 생성시킬 수 있거나 또는 본원에 기술된 바와 같은 1 이상의 폴리뉴클레오티드 분자로 형질전환된 후 이러한 폴리펩티드를 생성할 수 있다. 본 발명의 숙주 세포는 본원에 기술된 1 이상의 단백질을 생성할 수 있는 임의의 세포일 수 있고, 박테리아, 진균(효모 포함), 기생체, 선충, 절지동물, 동물 및 식물 세포를 포함한다. 숙주 세포의 예로는 살모넬라 (*Salmonella*), 에스케리치아(*Escherichia*), 바실러스(*Bacillus*), 리스테리아(*Listeria*), 사카로마이세스 (*Saccharomyces*), 스포돕테라(*Spodoptera*), 마이코박테리아(*Mycobacteria*), 트리코플러시아(*Trichoplusia*), BHK(어린 햄스터 신장) 세포, MDCK 세포, CRFK 세포, CV-1 세포, COS(예를 들어, COS-7) 세포 및 Vero 세포가 포함된다. 숙주 세포의 추가 예로 이.콜라이 K-12 유도체를 포함하는, 이.콜라이; 살모넬라 타이피(*Salmonella typhi*); 약독화 균주를 포함하는, 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*); 스포돕테라 플루지페르다 (*Spodoptera frugiperda*); 트리코플러시아 니(*Trichoplusia ni*); 및 비종양원성 마우스 근아세포 G8 세포(예를 들어, ATCC CRL 1246). 특히 바람직한 숙주 세포는 효모 세포 예컨대 이에 제한되는 것은 아니고, 사카로마이세스 종, 구체적으로, 사카로마이세스 세레비지아, 캔디다 종, 한세눌라 종 또는 피키아 종 등이다.

[0273] 재조합 DNA 기술을 사용하여 예를 들어, 숙주 세포 내에서 폴리뉴클레오티드 분자의 카피수, 폴리뉴클레오티드 분자가 전사되는 효율, 얻어진 전사체가 번역되는 효율, 및 번역후 변형 효율 등을 조작함으로써 형질전환된 폴리뉴클레오티드 분자의 발현을 향상시킬 수 있다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드 분자의 발현을 증가시키는데 유용한 재조합 기술은 이에 제한되는 것은 아니고, 고카피수 플라스미드에 폴리뉴클레오티드 분자를 작동적으로 연결, 1 이상의 숙주 염색체로 폴리뉴클레오티드 분자 통합, 플라스미드에 벡터 안정화 서열 부가, 전사 제어 신호(예를 들어, 프로모터, 오퍼레이터, 인핸서)의 치환 또는 변형, 번역 제어 신호(예를 들어, 리보솜 결합 부위, 샤인-달가르노 서열)의 치환 또는 변형, 숙주 세포의 코돈 용법에 상응하도록 본 발명의 폴리뉴클레오티드 분자 변형, 및 전사를 탈안정화하는 서열의 결실 등을 포함한다.

세포 무함유 조성물

[0274] 세포로부터 세포 무함유 조성물을 제조하는 방법은 당분야에 잘알려져 있고 동결과 해동의 반복 주기, 분쇄, 초음파 장치에서 초음파로 세포 처리, 균질화, 프렌치 프레스의 사용, 세척제 및/또는 효소 부가, 유리 비드 용균, 차등적 원심분리, 다양한 농도구배 배지를 이용하는 몇몇 밀도 구배 과정이 포함된다. 이들 기술은 당분야의 숙련가에게 친숙하며 예를 들어 ["Current Protocols in Protein Science"; John E. Caligan; Ben M. Dunn; Hidde L. Ploegh; David W. Speicher; Paul T. Wingfield; Wiley and Sons]에 상세하게 기술되어 있다.

[0275] 세포막 추출물을 단리 또는 제조하기 위해, 일반적으로 이를 방법을 조합하여 적용한다(Rieder and Hmr, 2001). 대체로, 예를 들어 US 7,393,934에 요약된 바와 같이, 세포는 기계적 방식을 통해, 또는 세척제를 이용하여 용균되고, 막분획은 차등적 원심분리를 통해 단리된다. [Moore (1994)]에 요약된 방법이 통용된다. 이러한 방법의 예는 US 7,320,875에서 확인할 수 있다. 다른 방법이 또한 막 분획의 제조에 이용할 수 있는데, 예를 들어, 수성 2층 친화성 분류법 등이 있다(Persson and Jergii, 1994).

[0276] 세포막 분획을 정제하기 위해 이용가능한 수많은 상업적 키트가 존재하는데, 예를 들어, Qiagen의 큐프로테옴 원형질막 단백질 키트가 그것이다. 세포를 저장성 완충액에서 항온반응시켜 팽창시킨다. 온화한 세척제를 부가하여 얻어진 세포 혼탁물을 기계적 파쇄를 통해 균질화시킨다. 온전한 세포, 세포 찌꺼기, 핵 및 주요 세포소기관을 원심분리에 의해 제거한다. 얻어진 상등액은 세포줄 단백질과 마이크로솜, 골지체, 및 원형질막을 함유한다. 세포막 상의 분자에 특이적인 리간드를 상등액에 부가한다. 리간드가 세포막 소포체에 결합하고 리간드-소포체 복합체는 리간드에 결합하는 자성 비드를 이용해 침전시킨다. 세척후, 원형질막 소포체는 천연 조건 하에서 용리하며 리간드는 비드에 결합된 상태로 존재한다.

[0277] 효모 세포의 경우, 세포막을 제조하는데 통용되는 방법은 세포를 스페로플라스트하는 것이다. 이는 고수율을 제공하고, 원형질막의 대규모 단리에 이상적으로 적합하다. 이러한 방법은 대체로 세포의 임의의 다른 막성 세포 소기관보다 막을 더 조밀하게 만드는, 조밀한 양이온 실리카 비드를 이용하여 스페로플라스트의 음으로 하전된 표면을 코팅하는 것을 포함한다. 세척 과정으로 과도한 양이온 비드를 제거한 후, 폴리아크릴산을 부가하여 비드 상의 자유 양이온 기를 차단한다. 코팅된 스페로플라스트를 이어서 막 성분의 응집을 방지하기 위해 EGTA-함유 용균 완충액 중에서 수동 균질화에 의해 용균시킨다. 스페로플라스트 용균물의 원심분리로 무거운 원형질막-마이크로비드 화합물이 펠렛화되고, 상등액에 세포내 막성 세포소기관이 남게된다.

- [0279] 본 발명에 사용할 수 있는 G 단백질 커플링 수용체-관련 폴리펩티드를 포함하는 세포 무함유 조성물을 생성하는 추가 예는 [Kaiser et al.(2008)]에 기술되어 있다.
- [0280] 일정 구체예에서, GPCR을 포함하는 본 발명의 폴리펩티드는 리포솜 조제물의 지질 이중층에 내포된다. 본원에서 사용하는 용어 "리포솜"은 예를 들어 포스파티딜 에타놀아민 및 콜레스테롤 등, 양쪽성 인지질의 이중층을 포함하는 닫힌 소포체를 의미한다. 리포솜은 혼합된 지질 사슬과의 천연 유래 인지질(예컨대 포스파티딜에탄올아민), 또는 순수한 계면활성제 성분 예컨대 DOPE(디올레오일포스파티딜에탄올아민)으로 구성될 수 있다.
- [0281] 본원에 기술된 폴리펩티드를 함유하는 리포솜은 예를 들어, 초음파처리에 의해, 수중에서 단백질을 발현하는 세포의 인지질막을 파괴하여 생성할 수 있다. 인지질은 수성 용액의 코어를 함유하는 리포솜 구로 재조립된다. 저전단율은 많은 충을 갖는 다층 리포솜을 생성시킨다. 연속적인 고전단 초음파 처리는 소형의 단층 리포솜을 형성시키며, 이것이 본 발명에 적용하는데 더 적합하다. 최적의 배향 및 접근성을 갖는 최적의 리포솜 크기를 생성하기 위한 실험은 당분야의 숙련가의 통상적인 역량에 포함된다.
- [0282] 본원에 기술된 폴리펩티드는 또한 제조되어, 세척제에서 해리 후, 지질 존재하에 재구성 및 세척제의 제거를 포함하는 막 재구성법에 의해 리포솜으로 유입될 수 있다. 리포솜 조성은 결합 파트너(화합물)과 함께 리포솜에 함유되는 폴리펩티드의 최적 배향 및 접근성을 보장하도록 조정된다. 최적 리포솜 조성을 얻기 위한 이러한 조정은 당분야에서 통상적이다.
- [0283] BRET에 대한 어세이
- [0284] 바람직한 구체예에서, 생물발광성 단백질과 억셉터 문자간에 일어나는 에너지 전달은 특정 파장을 선택하는 광학 필터(하나는 억셉터 문자 발광용이고 다른 것은 생물발광성 단백질 발광용)를 이용하여 측정된 발광성으로부터 계산된 비율로서 나타낸다(식 1 참조).
- [0285] 식 (1) : $Ea/Ed = BRET$ 비율
- [0286] 상기 식에서, Ea는 억셉터 문자 발광 강도(방출광은 억셉터의 발광에 맞춰진 특정 필터를 이용해 선택함)로 정의되고 Ed는 생물발광성 단백질 발광 강도(방출광은 생물발광성 단백질의 발광에 맞춰진 특정 필터를 이용해 선택함)로서 정의된다.
- [0287] 광학 필터는 BRET에 적합한 파장 식별이 허용되는 임의 유형의 필터일 수 있다는 것을 당분야의 숙련가라면 쉽게 이해할 것이다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용되는 광학 필터는 간접 필터, 장파 통과 필터, 단파 통과 필터 등일 수 있다. 필터를 통해 통과하는 파장의 강도(일반적으로 초 당 계수(CPS) 또는 상대적 발광 단위(RLU))는 광증폭관(PMT) 또는 CCD 카메라를 이용해 정량화할 수 있다. 이어서 정량된 신호를 이용해 BRET 비율을 계산하고 에너지 전달 효율로 나타낸다. BRET 비율은 억셉터 발광 강도 증가에 따라 증가한다.
- [0288] 대체로, 도너 발광 강도에 대한 억셉터 발광 강도의 비율(식 1 참조)을 결정하며, 이는 에너지 전달 효율을 반영하는 임의 단위로 표현되는 수이다. 이 비율은 에너지 전달 효율 증가에 따라 증가한다(Xu et al., 1999 참조).
- [0289] 에너지 전달 효율은 억셉터 발광 강도에 대한 도너 발광 강도의 역비율을 이용하여 나타낼 수 있다(식 2 참조). 이 경우, 비율은 에너지 전달 효율 증가에 따라 감소한다. 이러한 계산을 수행하기 전에 발광 강도를 기질의 자체발광성 및 배경광 존재에 대해 보정한다. 이러한 보정은 대체로 이 기질을 함유하지만 생물발광성 단백질, 억셉터 문자 또는 본 발명의 폴리펩티드는 함유하지 않는 대조군 샘플로부터의, 적절한 파장에서 측정된 발광 강도를 빼서 실시한다.
- [0290] 식 (2) : $Ed/Ea = BRET$ 비율
- [0291] 상기 식에서 Ea 및 Ed는 상기 정의된 바와 같다.
- [0292] 생물발광성 단백질 및 억셉터 문자 발광의 빛 강도는 또한 단색화 기반 장치 예컨대 분광형광계, CCD(charged coupled device) 카메라 또는 다이오드 어레이 검출기를 이용해 정량할 수 있다. 분광형광계를 이용시, 발광 스캔은 생물발광성 단백질과 억셉터 문자 발광 피크 둘 모두가 기질 부가시 검출되게 수행된다. 피크하 면적은 상대적인 빛강도를 나타내고 상기 요약한 바와 같이, 비율을 계산하는데 사용된다. 동일 샘플로부터의 생물발광성 단백질 및 억셉터 문자에 대한 빛을 측정할 수 있는 임의의 장치를 본 발명의 BRET 시스템을 모니터링하는데 사용할 수 있다.
- [0293] 다른 구체예에서, 억셉터 문자 발광 단독이 BRET의 효율적인 검출 및/또는 정량화를 위해 적합하다. 이 경우,

에너지 전달 효율은 오직 억셉터 발광 강도를 이용해 나타낸다. 에너지 전달을 측정하기 위해, 임의의 비율 계산없이 억셉터 발광 강도를 이용할 수 있다는 것을 당분야 숙련가는 쉽게 알 수 있다. 이는 이상적으로 억셉터 분자가 생물발광성 단백질로부터 전달되는 빛을 흡수하는 경우에만 빛을 방출하게 된다는 사실에 기인한다. 이 경우 오직 하나의 광 필터만 필요하다.

[0294] 관련 구체예에서, 생물발광성 단백질 발광 단독만이 BRET의 효율적인 검출 및/또는 정량화에 적합하다. 이 경우, 에너지 전달 효율은 오직 생물발광성 단백질 발광 강도만을 이용해 계산된다. 에너지 전달을 측정하기 위해, 임의의 비율 계산없이 도너 발광 강도를 이용할 수 있다는 것을 당분야의 숙련가는 쉽게 이해할 수 있다. 이는 억셉터 분자가 생물발광성 단백질로부터 전달되는 빛을 흡광하기 때문에 생물발광성 단백질로부터 검출가능한 발광이 상응하게 감소한다는 사실에 기인한다.

[0295] 다른 구체예에서, 에너지 전달 효율은 측정을 위해 오직 하나의 광학 필터만 필요한 비율계량 측정법을 이용해 나타낸다. 이 경우, 도너 또는 억셉터에 대한 빛 강도는 적절한 광학 필터를 이용해 결정하고 다른 샘플 측정법이 임의의 필터 사용없이 실시된다(개방 스펙트럼의 강도). 후자의 측정법에서, 전체 빛 산출량(모든 파장에 대함)이 정량된다. 비율 계산은 이어 식 3 또는 4를 이용해 실시된다. 식 3의 경우, 단지 억셉터용 광학 필터만 필요하다. 식 4의 경우는, 도너용 광학 필터만 필요하다.

[0296] 식 (3) : $Ea/Eo-Ea = BRET$ 비율 또는 $= Eo-Ea/Ea$

[0297] 식 (4) : $Eo-Ed/Ed = BRET$ 비율 또는 $= Ed/Eo-Ed$

[0298] 상기 식에서 Ea 및 Ed는 상기 정의된 바와 같고 Eo는 조합된 모든 파장(개방 스펙트럼)에 대한 발광 강도로서 정의된다.

[0299] 추가의 식들이 상기 식 1 내지 4에서 유도될 수 있다는 것은 당분야의 숙련가에게 쉽게 이해된다. 예를 들어, 그러한 유도식 하나는 생물발광성 단백질 및/또는 억셉터 분자에 대한 발광 파장에서 존재하는 배경광에 대한 보정을 포함한다.

[0300] BRET 어세이 수행에서, 빛 방출은 BRETCount를 이용해 각 웨일로부터 측정할 수 있다. BRETCount 장치는 변형된 TopCount이며, 여기서 TopCount는 Packard Instrument(Meriden, CT)에서 판매하는 마이크로타이터플레이트 섬광 및 발광 카운터이다. 배경 노이즈를 제거하기 위해 동시에 2종의 광증폭관(PMT)을 활용하는 고정적인 계측법과 달리, TopCount는 표준 불투명 마이크로타이터플레이트에서 계측이 가능하도록 노이즈 감소를 위해 단일-PMT 기술 및 시간-분석형 필스 계측을 적용한다. 불투명 마이크로타이터플레이트의 이용은 광학 크로스토크를 무시 할 수준으로 낮출 수 있다. TopCount 각각 1, 2, 6 또는 12 샘플의 동시 판독을 가능하게 하는 1, 2, 6 및 12 검출기(PMT)를 포함하는, 다양한 포맷이다. BRETCount 이외에도, 다른 시판되는 장치가 BRET를 수행할 수 있다: Victor 2(Wallac, Finland(Perkin Elmer Life Sciences)) 및 Fusion(Packard Instrument, Meriden). BRET는 적어도 억셉터 분자 발광 및 바람직하게 2 파장(억셉터 분자용 및 생물발광성 단백질용) 또는 그 이상을 검출할 수 있는 판독기를 이용하여 수행될 수 있다.

[0301] 본 발명의 구체예에서, BRET는 미세유체공학적 장치를 이용하여 검출된다. 미세유체공학적 장치는 편리하게, 미세유체공학 장치의 샘플 저장부에 전달되는 샘플 분취액, 대체로 약 50 μl 미만의 분취액만을 필요로 한다. 이는 수동적으로 또는 시린지, 모세관 등을 통한 공압 주입을 통해 수행된다.

[0302] 미세유체공학을 이용하는 자동화 발광 바이오칩 장치를 사용하여 모든 필요한 BRET 반응 단계를 수행할 수 있다. 미세유체공학 바이오칩 플래폼에서 자동화 BRET 반응은 이것이 복수의 수동 조작 단계를 없애고 실험을 실시하는 인간의 시간과 노력을 줄여주기 때문에 바람직하다. 미세유체공학 장치는 복수의 샘플, 시약 및 기질을 보관하기 위한 보관 수단을 구비한 패터닝된 미세채널 및 구획을 갖는 자가-함유 일회용 바이오칩을 포함할 수 있다. 순차적으로 샘플 중 1 이상, 또는 시약, 그리고 이어서 발광 기질을 구획으로부터 미세채널을 통해 반응부로 전달하는 단계들이 자동화될 수 있다. 발광 기질을 이어 도너 분자와 반응시켜서 발광을 일으키고 광학 검출기로 검출한다. 발광 검출용 미세유체공학 장치의 일례는 US 6,949,377에 기술되어 있다.

용도

[0304] 본 발명을 사용하여 광범위하게 다양한 화합물, 특히 후각자극제를 검출할 수 있다. 대체로, 후각자극제는 1 이상의 유기체의 화학감지 후각 수용체에 의해 검출될 수 있는 휘발성 유기 또는 무기 화합물 또는 무기 가스일 수 있다. 이들은 아민 함유 및/또는 설피딜 함유 화합물, 카르복실산, 알콜, 알데하이드, 알칸, 알켄, 방향족 화합물, 에스테르, 터펜 또는 터펜 유도체, 에테르, CO_2 등을 비롯하여, 이들 특징의 조합을 보유하는 화합물을

포함할 수 있다.

[0305] 후각자극제는 인간에 흥미롭거나 또는 가치있는 일부 생물학적 또는 화학적 상태에 대한 지표일 수 있다. 이러한 지표는 다음을 포함할 수 있다:

[0306] . 음식물 및 음료수, 의약 또는 관련 재료의 감각적 매력, 품질 또는 안전성.

[0307] . 인간 또는 동물의 건강, 영양소 또는 운동 상태.

[0308] . 병원체를 포함한, 유해 물질의 존재 또는 부재.

[0309] . 산업적 프로세스의 진척 또는 상태.

[0310] . 환경 오염 또는 상태.

[0311] . 향수, 방향화장품 또는 다른 화장품의 감각적 매력, 품질 또는 안정성.

[0312] 특히 바람직한 구체예에서, 화합물은 오직 본원에 기술된 폴리펩티드의 수용체 일부분에 결합한다.

[0313] 특히 바람직한 구체예에서, 후각 수용체를 포함하는 본원에 정의된 폴리펩티드는 목적하는 화합물(들)을 검출하기 위한 바이오센서에서 사용된다. 바이오센서는 물리화학적 검출제 성분과 생물학적 성분을 조합한 분석물의 검출을 위한 장치이다. 대체로, 3부분으로 구성되는데, 첫번째는 G 단백질 커플링 수용체를 포함하는 본원에 정의된 1 이상의 폴리펩티드이다. 두번째는 화합물과 폴리펩티드의 상호작용에 의해 발생된 신호를 보다 쉽게 측정되고 정량될 수 있는 다른 신호로 변환하는(즉, 변환기) 물리화학적 방식(예를 들어, 광학, 전자화학)으로 작용하는, 변환기 또는 검출기 성분이 필요하다. 세번째로, 사용자에게 친숙한 방식으로 상호작용 결과를 나타내는 조합된 전자 또는 신호 프로세서가 필요하다. BRET를 포함한 바이오센서의 일례는 [Charest et al.(2005)]에 기술되어 있다.

[0314] 다른 구체예에서, 스크리닝 방법이 약물 발견 및/또는 개발을 위해 사용된다. 보다 구체적으로, 수용체는 잠재적인 치료제의 표적이다. 따라서, 이러한 구체예에서, 수용체는 임상적으로 중요한 문자 예컨대 이에 제한되는 것은 아니고, 아드레날린작용성 수용체, 세로티닌 수용체, 도파민 수용체, 대사성/글루타메이트 수용체, GABA 수용체, 서비(vomeronasal) 수용체, 미각 수용체, 또는 세크리틴 유사 수용체인 것이 바람직하다.

[0315] 본 발명의 범주에는 96웰, 384웰, 1536웰(및 기타)의 시판 플레이트를 이용하여 수행되는 당분야에 공지된 이른바 고수율 스크리닝 방법 및 유사 접근법(Spencer, 1998; Oldenburg, 1998; Milligan, 1999)을 포함하는, G 단백질 커플링 수용체와 상호작용할 수 있는 문자를 동정, 특징규명 및 스크리닝하기 위한 방법도 역시 포함된다. 본 발명에 따라 적용되는 추가 방법에는 이에 제한되는 것은 아니고, 고수율 스크리닝으로의 균일한 형광발광 판독법이 포함된다(특히, Pope, 1999에 기술된 것).

[0316] 당분야의 숙련가는 본 발명이 또한 다중적일 수 있음을 이해할 것이다. 이 시스템에서는, 상이한 화합물에 결합하는 상이한 G 단백질 커플링 수용체를 포함하는 2 이상의 폴리펩티드가 제공된다. 각각의 상이한 G 단백질 커플링 수용체는 상이한 생물발광성 단백질 및/또는 억셉터 문자로 표지되어서 이들이 상이한 과정에서 발광하여 상이한 표적 화합물을 검출 및 정량화할 수 있다.

실시예

실시예 1 - 이중 표지화된 BRET ODR-IO(OGPR) 구성체

재료 및 방법

이중 표지화된 BRET OR 구성체의 설계 및 제작

[0321] BRET² 수용체 구성체는 BRET² 성분을 제3 세포내 루프(IC3) 및 C 말단에 삽입하여 생성시켰다. 2개의 BRET 구성체를 다음과 같이 만들었다; (1) IC3 중간에 GFP² 및 C 말단에 RLuc(h); (2) IC3 중간에 RLuc(h) 및 C 말단에 GFP²가 있는 OR. 제3 세포내 루프(IC3)의 위치는 경막 분절의 예측을 위한 웹기반 수단인 The Biology Workbench 상의 TMAP를 이용해 결정하였다(<http://seqtool.sdsc.edu>). ODR-10의 경우, IC3의 중간은 아미노산 240-241이다. OGOR이라고하는 이 구성체에 대한 아미노산 서열은 서열번호 15로서 제공하였다(서열번호 16에 제공된 뉴클레오티드 서열을 코딩).

[0322] ODR-10은 superscript II(Invitrogen)를 이용한 표준 기술로 제조된, 예쁜 꼬마 선충 cDNA로부터 증폭시켰다.

PCR 조건은 다음과 같다: 94°C 2분, 30 사이클의 94°C 15초, 59°C 30초, 68°C 70초, 및 최종 연장 단계 68°C 5분. 표준Pfx50 PCR 성분을 하기 프라이머와 함께 사용하였다; ODR-10XbaI F 5'-AGTCTAGAATGTCGGGAGAATTGTGGATTA-3' (서열번호 21) 및 ODR-10-attbl-R 5'-GGGGACAAGTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATCACGTCGAACTTGAG-3' (서열번호 22). 증폭된 cDNA를 pGEM-T(Invitrogen)에 클로닝하고 서열분석하였다.

[0323] BRET 성분, GFP² 및 레닐라 루시페라제, RLuc(h)는 시판되는 플라스미드pGFP²-MCS-RLuc(h)(PerkinElmer; Lot #6310051-6D1)로부터 얻었다.

[0324] BRET 구성체는 구성체의 개별 단편을 PCR로 증폭시켜 제작하였다(프라이머 및 어닐링 온도는 표 4 참조). PCR은 Pfx50 표준 성분(Invitrogen)을 이용하여 수행하였고, 그 조건은 다음과 같다: 94°C 2분, 30 사이클의 94°C 15초, 59°C 30초, 68°C 70초, 및 최종 연장 단계 68°C 5분. 구성체의 개별 성분을 중첩 프라이머를 이용해 증폭하였다.

표 4

이중 태깅된 ODR-10 수용체 구성체용 프라이머

구성체	단편	cDNA 단편 크기(bp)	프라이머	서열	온리고 어닐링 온도(°C)	
ODR-10::GFP ² @AA240-241::RLuc(h) (Cterm) (OGOR)	(5')ODR-10::GFP ²	1452	F: attB1 ODR-10 포워드 R: ODR-10-Mid(C3GFP ²)Jt2R	AACCATGTCGGGAGAATTGTG (서열번호 23) TGTAGCGCTCGCTTGTACAGCTCGTCAT (서열번호 24)	57.7	
	(3')ODR-10	321	F: ODR-10-Mid(C3GFP ²)Jt2F R: ODR-10-CtermRLuc(h)JtR	GAGCTGTACAAGCGAGCGCTACAGAAACAA (서열번호 25) CTTGTGGTCATCGTGGAACTTGAGACAA (서열번호 26)	57.3	
	RLuc(h) (Cterm)	949	F: ODR-10-CtermRLuc(h)JtF R: attB2 RLuc(h)리버스	CAAGTTCCGACGATGACCAGCAAGGTGTA (서열번호 27) GTTACTGCTCGTCTTCA (서열번호 28)	56.5	
	(3')ODR-10::RLuc(h) (Cterm)	1246	F: ODR-10-Mid(C3GFP ²)Jt2F R: attB2 RLuc(h)리버스	GAGCTGTACAAGCGAGCGCTACAGAAACAA (서열번호 29) GTTACTGCTCGTCTTCA (서열번호 30)	55.3	
	ODR-10::GFP ² @AA240-241::RLuc(h) (Cterm)	2675	F: attB1 ODR-10 포워드 R: attB2 RLuc(h)리버스	AACCATGTCGGGAGAATTGTG (서열번호 31) GTTACTGCTCGTCTTCA (서열번호 32)	53.7	
	ODR-10::RLuc(h)@AA240-241::GFP (Cterm) (OROG)	(5')ODR-10::RLuc(h)	1669	F: attB1 ODR-10 포워드 R: attB2 RLuc(h)리버스	AACCATGTCGGGAGAATTGTG (서열번호 33)	58

[0325]

		R: ODR-10-Mid(C3RLuc(h))Jt2R	CTGTAGCGCTCGCTGCTCGTCTTCAG (서열번호 34)		
(3')ODR-10	321	F: ODR-10-Mid(C3RLuc(h))Jt2F R: ODR-10-CtermGFP JtR	AAGAACGAGCAGCGAGCGCTACAGAAACAA (서열번호 35) CTTGTCTACCATCGTGGAACTTGAGACAA (서열번호 36)	57.9	
	GFP ² (Cterm)	723	F: ODR-10-CtermGFP ² JtF R: attB2 GFP ² 리버스	CAAGTTCCGACGATGGTAGAGCAAGGGCGA (서열번호 37) GTTACTTGTACAGCTCGTC (서열번호 38)	56.3
	(3')Odr10::GFP ² (Cterm)	1030	F: ODR-10-Mid(C3RLuc(h))Jt2F R: attB2 GFP ² 리버스	AAGAACGAGCAGCGAGCGCTACAGAAACAA (서열번호 39) GTTACTTGTACAGCTCGTC (서열번호 40)	54.7
	Odr10::RLuc(h)@AA240-241::GFP (Cterm)	2675	F: attB1 ODR-10 포워드 R: attB2 GFP ² 리버스	AACCATGTCGGGAGAATTGTG (서열번호 41)	53.0

[0326]

[0327] 다음으로 성분들을 정제하고 쌍 반응시켜 94°C에서 변성시키고, 52°C에서 어닐링하며(중첩 프라이머 부위에서) 필요한 쌍을 위해 68°C에서 5분간 연장하였다. 다음으로 쌍의 대부분의 5' 및 3' 프라이머를 이용해 PCR 주형으로 사용하였다. 전체 길이 구성체가 만들어 질 때까지 이를 반복하였다. 이어서 pGEM-T에 클로닝하여 서열분석하였다. 오류없는 클론을 ApaLI를 이용해 pDONR201(Invitrogen)로 서브클로닝하였다. 이후 이것을 에스.세레비지아에서의 후속 발현을 위해 Gateway® 기술(attB 부위가 원래 5' 및 3' 프라이머에 포함되어 있음)을 이용하

여 pYES-DEST52(Invitrogen)에 서브클로닝하였다.

[0328] OGOR 돌연변이체(H110Y)의 제작

부위 지정 돌연변이 유발법을 이중 가닥 주형으로서 pDONR201 벡터(상기 참조) 중 OGOR을 사용하여 수행하였다. 하기 프라이머를 이용하여 표준 프로토콜에 따라 Stratagene Quickchange 부위 지정 돌연변이 유발 키트를 사용해 히스티딘 110에서 타이로신(H110Y) 돌연변이를 수행하였다; 5'- CACCAGTTTGTCTCAGGAGTTATTTGTTATCGATATTTGCAACTT-3' (WT)(서열번호 43) 및 5'- AAGTTGAAATATCGATAAACAAATAACTCCTGAGACAAACAAACTG GTG-3' (H110Y 안티센스)(서열번호 44).

PCR은 Pfx50™ 표준 성분(Invitrogen)을 이용해 수행하였고 조건은 다음과 같다: 94°C 2분, 16 주기의 94°C 30초, 55°C 1분, 68°C 6.8분. 서열분석 이후, 이어서 OGOR 돌연변이체는 에스.세레비지아에서의 후속 발현을 위해 Gateway® 기술(5' 및 3' attB 부위가 원래 OGOR 서열에 포함되었음)을 이용해 pYES-DEST52(Invitrogen)에 서브클로닝하였다.

[0331] 용액 준비

20 %(w/v) 글루코스: 20 g의 글루코스를 100 mL 탈이온수에 부가하고, 용해될 때까지 핫플레이트(50°C)에서 가열한 후 용액을 여과 정제한다(0.2 μm 필터).

20 %(w/v) 라피노스: 20 g의 글루코스를 100 mL 탈이온수에 부가하고 용해될 때까지 핫플레이트(50°C)에서 가열하고 용액을 여과 정제한다(0.2 μm 필터).

20 %(w/v) 갈락토스: 20 g의 갈락토스를 100 mL 탈이온수에 부가하고 용해될 때까지 핫플레이트(50°C)에서 가열하고 용액을 여과 정제한다(0.2 μm 필터).

YPD 배지: 20 g의 세균학적 웨튼, 10 g의 효모 추출물을 1 L의 탈이온수에 부가한다. 15분간 오토클레이브한다.

YPD 플레이트: 20 g의 세균학적 웨튼, 10 g의 효모 추출물 및 20 g의 한천을 1 L의 탈이온수가 부가한다. 15분간 오토클레이브한다. 오토클레이브 이후 20 mL의 20 % 글루코스를 부가하고 한천 플레이트에 붓는다.

우라실 배지가 없는 효모 합성 드롭-아웃 배지(SCMM-U): 아미노산이 없는 6.7 g의 효모 질소 베이스(제품 번호 Y 0626, Sigma) 및 1.92 g의 우라실이 없는 효모 합성 드롭-아웃 배지 보충물(제품 번호 Y 1501)을 1 L의 탈이온수에 부가한다. 15분간 오토클레이브한다.

SCMM-U 플레이트: 1.34 g의 아미노산이 없는 효모 질소 베이스(제품 번호 Y 0626, Sigma), 0.384 g의 우라실이 없는 효모 합성 드롭-아웃 배지 보충물(제품 번호 Y 1501, Sigma) 및 4 g의 한천을 180 mL의 탈이온수에 부가한다. 15분간 오토클레이브한다. 오토클레이브 이후, 20 mL의 20% 글루코스를 부가하고 한천 플레이트에 부가한다.

1×인산나트륨 완충액(1 x PBS, pH 7.4): 10 × 스톡 용액을 탈이온수 중에 82.33 g의 인산나트륨 2염기(0.58 M), 23.45g의 인산나트륨 1염기(0.17 M) 및 40 g 염화나트륨(NaCl)을 용해시켜 준비하였다. 스톡 용액을 탈이온수 중 1 × PBS 용액에 회석하였다.

코엘렌테라진 400a: 코엘렌테라진 400a(Clz400a, Biosynth)을 10.20 mL의 순수 에탄올에 용해시켜 250 μM 스톡 용액을 제조한다. 코엘렌테라진 400a의 40 또는 400 μl 분취액을 미세원심분리 튜브에 파이펫팅한 후 SpeedVac® Plus SC110A(Savant)를 이용해 건조시킨다. 분취액을 -80°C에 보관한다. 무수 에탄올 100 또는 1000 μl(각각 40 또는 400 μl 분취액) 중에 샘플을 재구성하여 50 μM 농도로 만든다.

후각자극제 제조: 후각자극제 디아세틸, 벤즈알데히드 및 옥타날의 1% 스톡 용액은 각각 용매 물, 에탄올 및 DMSO로 구성되었다. 후각자극제를 물에 연속 회석하여 원하는 최종 농도를 얻었다. 후각자극제를 부가하지 않은 동일 용매 회석물도 준비하였다.

[0342] 플라스미드 형질전환 프로토콜

효모 형질전환은 효모 형질전환 키트(YEAST-1, Sigma)를 이용해 수행하였다. YPD 플레이트를 INVSC1(Invitrogen) 에스.세레비지아 균주로 스트리킹하고 2-3일 동안 28°C에서 항온반응시켰다. YPD 플레이트로부터 VSC1 세포 루프를 긁어서 튜브에 넣었다. 세포를 0.5 mL의 형질전환 완충액(제품 코드 T 0809)에 재현탁시키고 5초간 원심분리하였다. 상등액을 제거하고 튜브 내 50-100 μl의 완충액에 놓았다. 10 μl의 10 mg/mL 연어 정자 DNA(제품 코드 D 9156)를 튜브에 부가하였다. 실험하려는 1 μg의 pYES-DEST52 - OR 플라스미드 DNA를

부가하고 10초간 와류시켰다. 600 μl 의 PLATE 완충액(제품 코드 8966)을 부가하고 와류시켰다. 4시간 동안 실온에서 항온반응시킨다. 샘플을 15분간 42°C 가열 블록에서 열 충격을 주었다. 미세원심분리에서 3초간 원심분리하고 상등액을 제거하였다. 500 μl 의 멸균수에 세포를 재현탁시켰다. 100 μl 를 SCMM-U 플레이트 상에 도말한다. 콜로니가 보일 때까지 2-3일 동안 28°C에서 항온반응시켰다.

[0344] 발현 프로토콜

pYES-DEST52 - OR 구성체를 함유하는 단일 콜로니를 2% 글루코스를 포함하는 15 mL의 SCMM-U 배지에서 항온반응시켰다. 진탕(200 rpm)하면서 28°C에서 밤새 성장시킨다.

[0346] 밤샘 배양물의 OD₆₀₀을 측정하였다. 유도 배지(SCMM-U, 2% 갈락토스, 2% 라피노스) 30 mL 중에 OD₆₀₀이 0.4로 얻어지는데 필요한 밤샘 배양물의 양을 제거하고 세포를 5분간 1500 x g에서 펠렛화하였다. 세포를 1 mL의 유도 배지에 재현탁하고 29 mL의 유도 배지에 접종하였다. 72시간 동안 진탕(200 rpm)하면서 15°C에서 성장시켰다. 배양물을 플라스크로부터 제거하고 4°C에서 5분간 1500 x g에서 원심분리하였다. 상등액을 버리고 세포를 1 mL의 멸균수에 재현탁하였다. 세포를 멸균된 미세원심분리 튜브로 옮기고 샘플을 1분간 10,000 x g에서 원심분리하였다. 상등액을 버리고 막 단리를 수행하였다.

[0347] 막 준비

[0348] 세포를 5분간 1500 x g(4°C)에서 원심분리하여 회수하고, 물로 세척한 후 1000 mg/L 글루코스, 36 mg/L 피루브산나트륨, 칼슘 및 마그네슘을 함유하는, 1xPBS Ehsms 둘베코 인산염 완충 염수(D-PBS)(Invitrogen) 4 mL에 재현탁하였다. 세포를 프렌치 프레스(~18000 psi)로 용균시키고 가용성 단백질 분획을 15분간 9300 x g(4°C)에서 원심분리하여 단리하였다. 이후 가용성 단백질 분획을 13.15 mL 폴리카르보네이트 두꺼운벽 원심분리 튜브로 옮기고 1시간 동안 4°C에 40,000 rpm에서 초원심분리하였다(Beckman Coulter L-80 ultra-centrifuge). 상등액을 버리고 막 펠렛을 1 mL의 D-PBD 또는 1 x PBS에 재현탁한 후, 가용화되도록 밤새 4°C에 방치하였다.

[0349] 스펙트럼 측정

[0350] 모든 스펙트럼 스캔은 플레이트 판독 SpectraMax M2 분광형 광분석기(Molecular Devices)를 이용해 기록하였다. 막 준비 샘플 중 100 μl 분취액을 96-웰 플레이트(Perkin-Elmer)를 이용해 스캔하였다. 형광발광 스펙트럼 스캔 결과는 455 nm 발광 컷 오프 필터를 이용하고 420 nm의 여기 파장을 이용해 450 내지 600 nm에서 기록하였다.

[0351] 동시 이중 발광 검출

[0352] 동시 이중 발광 RET 측정은 POLARstar OPTIMA 마이크로플레이트 판독기(BMG LabTech)를 이용해 수행하였다. 동시 발광 측정은 각 채널에 대해 세트 개별 계인(3300/4095)으로 BRET² 필터 세트(410-80/515-30)를 사용하였다.

[0353] RET 분석 프로토콜

[0354] 샘플 농도의 정규화

[0355] BRET² 태깅된 수용체 샘플의 상대 농도를 평가하기 위해 샘플의 형광발광 강도를 스펙트럼 스캔으로부터 결정하고 샘플 양은 OGOR 형광발광 강도를 통해 정규화하였다. GFP² 강도를 농도로 변환하기 위해 정제된 GFP² 단백질을 상이한 농도에서 분석하여 형광발광 강도에 대한 농도에 관한 보정 그래프를 얻었다. GFP² 단백질은 제조사의 설명서(BD Talon(BD Biosciences, Clontech))에 따라서 코발트 친화성 크로마토그래피를 이용해 정제하였다. 최고 적합 식($y = 271x + 233.31$)의 라인을 재배열한 결과 형광발광 강도가 농도로 변환되었다. 5 또는 10 nM의 추정 농도를 최종 부피 100 μl 로 어세이에 사용하였다.

[0356] 선택성

[0357] RET 분석을 96-웰 플레이트(Perkin-Elmer)에서 수행하였고 각각의 특정 후각자극제 1 μM 과 함께 45분간 특정 이중 태깅된 수용체 단백질(OGOR)을 항온반응시키는 것을 포함하였다. 최종 부피는 100 μl 이었고, 10 μl 의 후각자극제, 수용체 단백질 샘플('샘플 농도의 정규화' 섹션 참조), D-PBS(또는 1 x PBS) 및 5 μl 의 C1z400a(5 μM)을 포함하였다. 배경 신호는 D-PBS(또는 1 x PBS) 샘플을 분석하여 기록하였다. 항온반응 시간 동안 96-웰 플레이트 웰은 각 샘플 면을 개별적으로 밀봉하여 Topseal™-A(Packard)로 밀봉하였다. 비후각자극제 샘플(물, 피루베이트, 시트르산, 락트산)을 준비하고 먼저 분석하였다. 이후, 후각자극제 용액을 품 후드에서 준비하고 다음의 순서로 분석하였다: 2-부타논, 2,3-펜탄디온, 2,3-부탄디올 및 디아세틸.

- [0358] BRET² 측정을 위해, 45분 항온반응시간 후에 Clz400a 기질(5 μM)을 부가하고, 5초간 0.50s 통합 시간을 이용해 신호를 기록하였다. Clz400a을 부가한 후, 웰을 재밀봉하는 한편 신호를 기록하여 샘플의 교차오염을 줄였다. 어세이는 순차적으로 샘플을 웰에 부가하는 순서로 수행하였다.
- [0359] BRET² 비율은 다음과 같이 측정된 발광 비율로서 계산한다((수용체 샘플에 대한 515 nm에서 발광값)-(D-PBD(또는 1 x PBS)에 대한 515 nm에서 발광값))/(수용체 샘플에 대한 410 nm에서 발광값)-(D-PBD(또는 1 x PBS)에 대한 410 nm에서 발광값)).
- [0360] 용량 반응 곡선
- [0361] OGOR 농도를 GFP² 농도를 통해 10 nM로 정규화하였다. 용량 반응 곡선은 텍스트에 표시한 바와 같이 농도 범위에 대해 후각자극제 농도를 다양화하여 제작하였다. 최저 농도는 항성 먼저 분석하고 최고 농도는 마지막에 분석하였다.
- [0362] 윈도우 XP용 GraphPad Prism 을 이용한 비선형 회귀 분석법을 통해서, S자형 용량 곡선을 적합화하고, EC₅₀을 계산하였다.
- [0363] 결과
- [0364] 리간드 반응 및 선택성
- [0365] 제조한 구성체는 BRET 도너 및 억셉터가 후각 수용체의 제3 세포내 루프 및 C 말단 내에 삽입된 것이다(도 1). ODR-10에 의한 디아세틸 결합은 도너와 억셉터 성분이 멀리 이동하면 BRET² 비율을 증가시키고, 성분들이 서로 가깝게 이동하면 신호를 증가시킨다.
- [0366] BRET² 신호는 OGOR을 10 nM 또는 1 μM의 하기 리간드와 항온반응시킨 후 기록하였다: 물, 피루베이트, 시트르산, 락트산, 2-부타논, 2,3-펜탄디온, 2,3-부탄디올 및 디아세틸(도 2a 및 b). BRET² 신호의 최고 변화는 OGOR 을 μM 농도의 디아세틸과 항온반응시 일어났고, 용매(물) 반응과 비교하여 신호차가 37.5% 였다(도 3a). 이는 세포 무함유 어세이 포맷으로 이중 표지화 BRET² 태깅된 수용체를 이용하여 리간드 결합을 모니터링한 첫 예이다.
- [0367] OGOR에 nM과 μM의 디아세틸을 부가시 BRET² 비율의 변화는 대조군 반응(물)에 대해 유의하게 상이하였다($P > 0.05$)(도 3a 및 b). 디아세틸 자극에 대한 OGOR의 반응은 nM과 μM 농도로 테스트한 모든 다른 리간드와 비교하여 대조군 반응에 대해 유의하게 상이한 유일한 반응이었다. 이들 결과는 ODR-10이 선택적으로 디아세틸에 결합함을 확증시켜 준다. 이전에 디아세틸은 ODR-10 발현 HEK 293 세포에서 Ca²⁺ 상승 반응을 일으키는 유일한 휘발성 화합물인 것으로 확인되었었다(Zhang et al., 1997).
- [0368] 리간드 결합에 대한 BRET² 반응의 최대 변화율 37.5%는 α_{2A} 수용체에 의한 10 μM 노르에피네프린의 결합(Lohse et al., 2003) 시 FRET 신호에서 관찰된 변화(~5%) 및 PTHR에 의한 1 μM PTH의 결합 시 관찰된 변화(~20%)(Villardaga et al., 2003) 보다 실질적으로 더 크다. 디아세틸의 부가시 BRET² 신호 감소는 BRET² 성분들이 후각자극제 결합시 멀어진다는 것을 시사한다. 이는 BRET² 변환 시스템이 분자내 변화를 모니터링하기 위해 FRET 변환 시스템과 비교하여 우수한 민감도를 나타냄을 처음 증명한 것이다.
- [0369] 용량 반응
- [0370] OGOR의 BRET² 신호에서의 변화율 증폭에 대한 후각자극제 농도 변화 효과(도 4)는 용량 의존적 반응에 대한 첫 증명을 제공한다. EC₅₀ 값은 3.55 fM 디아세틸로 계산되었고, 이는 0.31 ppq(parts per quadrillion)와 동등하다. 인간 세포에서 발현시키고 칼슘 영상화 기술에 의해 모니터링한 경우 디아세틸에 대한 ODR-10의 명백한 친화성은 2.3 μM(~0.2 ppm(part per million))으로 계산되었고, EC₅₀ 값은 화학주성 결과와 일관되었다(Zhang et al., 1997).
- [0371] 여기서 제시하는 세포 무함유 분석법은 전체 세포 분석법 및 현존하는 화학 검출 시스템 예컨대 형광발광 검출

법(Li et al., 2009) 및 불꽃 이온화 검출과 결합된 가스 크로마토그래피법(GC-FID)(Macciola et al., 2008)과 비교하여 디아세틸 정량에 대해 9자릿수 이상으로 더 민감하다.

[0372] 음성 대조군 - OGOR 돌연변이(H110Y)

[0373] 디아세틸에 대한 OGOR 반응의 이상적인 음성 대조군은 BRET² 성분들을 OGOR 수용체에서와 동일한 거리 만큼 떨어져 위치시키지만 수용체가 디아세틸 자체에 비반응성이다. ODR-10의 제3 막 스패닝 잔기의 위치 110에서 히스티딘을 타이로신으로 교체한 결과 디아세틸에 대해 강력하게 결합있는 화학주성 반응이 일어났다(Troemel et al., 1995; Sengupta et al., 1996).

[0374] 히스티딘 110에서 타이로신(H110Y) 돌연변이를 OGOR 구성체에 도입하여 디아세틸의 μM 농도에 대한 반응이 OGOR에 대해 32.4%에서 4.1%로 감소되었다(도 5). 디아세틸에 대해 감소한 반응은 용매(물) 반응과 유의하게 상이하지 않았고($P < 0.05$) 이러한 결과는 돌연변이가 기능 상실을 초래했음을 의미한다. 이는 디아세틸에 대한 OGOR의 반응이 디아세틸과 ODR-10 수용체의 상호작용에 의한 것이고 BRET² 성분들 자체와의 비특이적인 상호작용에 의한 것이 아님을 의미한다.

[0375] 실시예 2 - 이중 표지화 BRET2 ODR-10(OGOR)과 이중 표지화 FRET ODR-10(OCOY)의 비교

[0376] GPCR 활성화의 모니터링을 위한 FRET 시스템에 대한 BRET² 시스템의 민감성을 비교하기 위해, ODR-10 수용체(OGOR)를 태깅하기 위해 사용한 BRET² 성분들을 FRET 성분들로 교체하여 CFP가 제3 세포내 루프에 삽입되고 YFP가 C 말단에 삽입되었다(OCOY). CFP(mCFP)(서열번호 45) 및 YFP(mCitrine)(서열번호 46) 유도체는 둘 모두 단량체이고 효모 발현을 위해 각각 코돈 최적화되었다(EUROSCARF)(각각 서열번호 47 및 48).

[0377] 재료 및 방법

[0378] *KpnI* 및 *XhoI* 제한효소 부위가 측접한 OCOY 서열을 Genscript로 합성하였다. OCOY 서열을 pENTR11 벡터의 *KpnI* 및 *XhoI* 부위에 삽입하였다. 이를 에스.세레비지아에서의 후속 발현을 위해 Gateway® 기술을 이용해 pYES-DEST52(Invitrogen)에 재조합시켰다. OCOY 코딩 서열은 서열번호 49로 제공하였고, 반면 아미노산 서열은 서열 번호 50으로 제공하였다.

[0379] OCOY 발현

[0380] OGOR 발현에 대한 것과 동일한 발현 프로토콜을 InVSC1에서의 OCOY 발현을 위해 사용하였다.

[0381] 농도 정규화

[0382] 이중 태깅된 수용체 샘플의 상태 농도를 평가하기 위해, 샘플의 형광발광 강도를 스펙트럼 스캔으로부터 결정하였고 샘플 양은 OCOY 형광발광 강도에 의해 정규화하였다. YFP 강도(530 nm)는 OCOY에 대해 721.32 a.u.로 정규화하였다. 50 μl 의 OCOY를 적절한 웰에 파이펫팅하여 넣었고 부피는 1 \times PBS를 이용해 최대 100 μl 로 만들었다.

[0383] 결과

[0384] 리간드 반응

[0385] OGOR에 대한 32.4% 감소와 비교하여 μM 농도의 디아세틸에 반응하는 OCOY의 FRET 비율(520 nm에서의 강도/480 nm에서의 강도)은 7.6% 감소하였다(도 6). OCOY 반응은 용매(물) 반응과 유의하게 상이한 것으로 나타났다($P < 0.05$). OGOR은 OCOY 보다 디아세틸 결합 모니터링에 대해 4배 이상 더 민감한 것으로 나타났다.

[0386] BRET² 시스템에 대한, 포스터 거리(R_0), 최대 RET 효율의 50%에 상응하는 RET 프로브 분리는 최근에 7.5 nm로 측정되었고, 최대 R_0 값은 임의의 유전자적으로 코딩되는 RET 쌍에 대해 측정되었다(Dacres et al., 2009). FRET 시스템에 대한 R_0 값은 이전에 4.8 nm(Evers et al., 2006)로 측정되었는데 이는 BRET² 시스템이 FRET 시스템(2.4~7.2 nm) 보다 더 큰 거리 범위(3.8~11.3 nm)를 프로빙할 수 있음을 의미한다. OGOR에 대해 측정된 전달 효율은 디아세틸(1 μM) 부가시 64.3%에서 47%로 변화하여 길이 변화가 6.8 nm에서 7.6 nm로인 것을 의미한다. 포스터 길이가 4.8 nm인 시스템, 예컨대 FRET 시스템은 이 거리 변화에 대해 디아세틸 부가시 11.3%에서 6.0%로의 전달 효율 변화만을 보였다. 이는 BRET² 시스템이 이 거리 범위에서 거리 변화의 측정을 위해, 검출

민감도 면에서, 보다 적합하다는 것을 보여준다.

[0387] OCOY 반응 곡선

디아세틸에 대한 OCOY 반응이 용매(물) 반응과 유의하게 다름을 확인한 후, 용량 반응을 그래프화하였다. 이러한 데이터를 얻기 위해, 스펙트럼 스캔을 상이한 농도의 디아세틸을 부가하여 기록하였다(도 7). 디아세틸의 농도가 1×10^{-21} M에서 1×10^{-10} M로 증가하기 때문에, YFP 발광 강도가 감소하고 CFP 발광 강도 증가가 수반되었다(도 7). 정규화된 OGOR 반응 곡선에 대한 OCOY 반응의 크기조정(도 8)은 BRET² 검출이 ODR-10에 의한 디아세틸 결합을 모니터링하기 위해 FRET 검출보다 더 민감함을 보여주었다. FRET 검출 시스템에 대해 계산된 $\log EC_{50}$ 값은 -16.43 ± 0.9741 M(평균 ± SEM, n=5)이고 이는 BRET2 시스템에 대해 계산된 $\log EC_{50}$ 값 -14.43 ± 0.5468 (평균 ± SEM, n=12)과 유의하게 다르지 않았다($P < 0.05$). 이는 디아세틸에 대한 ODR-10 친화성이 양 검출 시스템에 대해 통계적으로 유사하다는 것을 보여주는 것이고 디아세틸이 ODR-10 수용체와 특이적으로 결합하고 RET 성분들 자체와는 그려하지 않다는 것을 유추할 수 있다.

[0389] 실시예 3 - 이중 태깅된 Str112(TGTR)

[0390] 재료 및 방법

[0391] *NcoI* 및 *NotI* 제한효소 부위가 층첩된 TGTR 서열을 Genscript에 의해 합성하였다. TGTR 서열을 pENTR11 벡터의 *NcoI* 및 *NotI* 부위에 삽입시켰다. 이들을 이어 에스.세레비자야에서의 후속 발현을 위해 Gateway® 기술을 이용해 pYES-DEST52(Invitrogen)에 재조합시켰다.

[0392] TGTR 발현

[0393] OGOR 발현에서와 동일한 발현 프로토콜을 InVSC1에서 TGTR을 발현시키기 위해 사용하였다. TGTR 코딩 서열은 서열번호 51로 제공하였고 그 아미노산 서열은 서열번호 52로 제공하였다.

[0394] RET 분석 프로토콜

[0395] OGOR 선택성 실험에서 기술한 바와 동일한 RET 분석 프로토콜을 사용하였다. 1 μM 의 리간드 피루브산, 시트르산, 에틸아세테이트, 아세토인 및 디아세틸을 10 nM의 TGTR와 함께 분석하였다.

[0396] 박테리아 추출물 어세이의 준비

[0397] 박테리아 균주 OP50을 진탕(200 rpm)하면서 LB에서 밤새 37°C에서 성장시켰다. 이.콜라이 균주 OP50은 일반적으로 실험실에서 선충 성장시 먹이 공급원으로서 사용된다(Brenner, 1974). OP50 박테리아 배양물을 이용하여 2 어세이를 수행하였다. 제1 어세이는 10 μl 의 박테리아 배양물 또는 10 μl 의 LB를 10 nM TGTR에 부가하였다. 제2 어세이는 1 mL의 박테리아 배양물을 미세원심분리 투브에 넣고 1분간 10000 x g에서 원심분리시키는 것을 필요로 하였다. 10 μl 의 상등액을, 새로운 미세원심분리 투브에 붓거나, 또는 10 μl 의 LB를 10 nM TGTR에 부가하였다. 박테리아 샘플 부가 다음에 OGOR RET 분석과 동일한 프로토콜을 후속하였다.

[0398] 결과

[0399] 10 μl 의 OP50 박테리아 상등액 또는 LB 중 박테리아 배양물 부가에 대한 TGTR의 반응은 LB 단독에 대한 것과 유의하게 상이하였다($P \leq 0.05$)(도 9). 성장 동안 OP50에서 방출되는 복합 후각자극제 혼합물로 Str112 수용체 자극은 BRET² 비율을 증가시켰고 이는 BRET² 성분들이 후각자극제 결합 시 서로에 대해 이동한다는 것을 의미한다.

[0400] 다수의 리간드를 개별적으로 테스트하였고(도 10), 피루브산과 아세토인이 물에 대한 TGTR 반응과 비교하여 상당히 높은 BRET² 신호($P \leq 0.05$)를 일으켰다. 이는 리간드 결합시 BRET² 성분이 서로에 대해 이동한다는 것을 의미한다. 아세토인에 반응하는 BRET² 신호에서 20.8%의 증가는 노르에피네프린에 대한 FRET 태깅된 α_{2A} 아드레날린작용성 수용체의 반응 보다 4배 만큼 높다(Lohse et al., 2003). 이는 Str112 선충 수용체에 의한 후각자극제 결합을 처음 증명한 것이고 또한 BRET² 태깅된 Str112에 의한 후각자극제 결합을 모니터링한 첫 예이다.

[0401] 실시예 4 - 수용체 키메라

[0402] ODR-10 형질도입 카세트를 조작하여 ODR-10이 N-말단(aa1-32) 그리고 IC3이 C 말단(aa225-aa339)에 위치하며

BRET 태그는 복수 클로닝 부위가 측정하게 하였다(도 11). 카메라 수용체를 효모에서 발현시킨다. OR의 리간드 결합 영역을 이 카세트에 "인-프레임"으로 셀룰링하고 이를 카메라 수용체를 사용하여 BRET에 의한 리간드 결합을 평가할 수 있다.

[0403] 실시예 5 - 후각 수용체의 올리고머화

C 말단에 Rluc가 표지된 Odr10(서열번호 17) 및 C 말단에 GFP2가 표지된 Odr10(서열번호 19)을 효모에서 공동발현시켜 수용체 올리고머화 및 BRET 조정을 확인하였다.

[0405] 재료 및 방법

[0406] 형질전환체 배양 및 태깅된 유전자 유도 조건

형질전환된 효모 세포의 콜로니를 플라스미드 함유 세포를 선별하기 위해 적절한 영양소(예컨대 우라실(U), 트립토판(T))가 결핍되고 2% 글루코스를 포함하는 효모 합성 드롭 아웃 배지(SCMM, Sigma)에서 밤새 28°C에서 190 rpm으로 진탕하면서 성장시켰다; Invsc1 공동발현 pYesDest52-Odr10-Rluc 및 pDestpESC-Odr10-GFP2(Invsc1/OR/OG)를 위해 SCMM-U-T, 각각 pVV214-Odr10-Rluc(Invsc1/OR) 단독 및 pYesDest52 Odr10-GFP2(Invsc1/OG) 단독 발현을 위한 Invsc1에 대해 SCMM-U.

밤샘 배양 후, OD₆₀₀을 측정하고 세포를 유도 배지(배양 배지로서 글루코스 대신 2% 갈락토스 및 1% 라피노스 포함)에 혼탁하여 최종 OD₆₀₀가 0.4가 되게 하였다. 이 유도 배양물을 24시간 동안 진탕하면서 15°C에서 항온반응시켜 융합 수용체 발현이 유도되게 하였다. 이후 배양물을 펠렛화하고 2회 냉 인산염 완충 염수(PBS)로 세척하였다. 세포 펠렛은 -80°C에서 보관하였고 BRET² 어세이 직전에 PBS 완충액에 혼탁하였다.

[0409] BRET² 어세이를 위한 효모 세포의 정량

우선 Invsc1/OR/OG는 SpectraMax M2 분광형광분석계(Molecular Devices)를 이용하여 백색 96웰 마이크로프렐트(Perkin Elmer) 중에 Ex420 nm에서 GFP의 직접 여기에 의한 GFP 강도(웰당 100 μl 중 약 3000 RLU)를 통해서 정량하였다. 정량된 Invsc1/OR/OG 세포의 레닐라 루시페라제 활성은 96웰 백색 마이크로플레이트 중 총 부피 100 μl 세포에 천연 루시페린 코엘렌테라진(최종 농도 5 μM)을 부가하고 즉시 발광 신호를 측정하여 결정하였다(Polarstar Optima, BMGLABTECH).

Invsc1/OG는 Invsc1/OR/OG와 유사한 GFP 강도를 갖도록 정규화되었다. 음성 대조군(숙주 균주) Invsc1은 Invsc1/OR/OG와 동일한 세포 밀도를 갖도록 정량하였다.

[0412] 마이크로플레이트 BRET² 세포 기반 어세이

[Issad and Jockers(2006)]의 어세이 과정을 변형시키고 96웰 백색 마이크로플레이트에서 총 부피 100 μl로, 각 샘플에 대해 2회 반복하여 실시하였다. 3회의 생물학적 독립 어세이를 실시하고 데이터를 수집하였다. 코엘렌테라진 h DeepBlueC 기질(Biosynth AG)을 최종 농도 10 μM로 부가하고, 이중 과장/발광/형광발광계측 마이크로플레이트 판독기(BMGLabtech)를 이용해 판독을 실시하였다. 이하의 최적화 필터 세트를 이용하여 Rluc 빛 발광(410±80 nm) 및 GFP² 빛 발광(515±30 nm)을 측정하였다. BRET 비율은 공동발현된 Rluc 및 GFP2 융합 단백질의 515 nm/410 nm에서의 발광과 Rluc 융합 단백질 단독의 515 nm/410 nm에서의 발광간 차이로서 정의하였다. 결과는 밀리BRET 유닛으로 나타내었고, 1 밀리BRET는 1000을 곱한 BRET 비율 값에 상응한다(Ayoub, 2002). 동일한 세팅에서 Rluc 또는 GFP 융합물을 발현하지 않는 대조군 세포(숙주 세포 Invsc1)의 빛은 세포 자가형광발광의 검출 결과이다. BRET 비율 값을 계산하기 전에 모든 테스트한 샘플에서 자가형광발광값을 감하였다.

[0414] 미정제 막 조제물, 가용화 및 면역침강

적절하게 유도된 효모 세포(GFP² 수준이 숙주 균주 Invsc1 세포의 배경값에 대해 2배를 넘지 않음)를 3회 빙냉 완충액 A(75 mM tris-HCl, pH7.4, 12 mM MgCl₂ 및 2 mM EDTA)으로 세척하고 최종 펠렛을 완충액 B(완충액 A + 프로테아제 억제제 카테일, 완전 Mini EDTA-무함유(Roche Applied Science))에 혼탁시켰다. 다음으로, 효모 세포를 프렌치 프레스를 이용해 파쇄하고 15분간 10,000 x g로 4°C에서 원심분리하였다. 상동액을 1시간 동안 130000 x g에서 초원심분리하고 펠렛을 차가운 완충액 B에 혼탁하였다.

막 단백질 가용화 및 면역침강 방법은 [Ayoub et al.(2002)]에 기술된 방법을 변형하여 실시하였다. 미정제 막

을 0.5% 디지토닌(Sigma)으로 가용화하고 혼합물을 3시간 동안 4°C에서 교반하였다. 비가용화된 막 단백질은 18,000 x g에서 30분간 4°C에서 원심분리하여 제거하였다. 디지토닌 농도는 차가운 완충액 B를 이용해 0.2%로 조정하였고 다클론 항-GFP 항체(Sapphire Bioscience, Cat No 120-29000)를 최종 희석 1:1000로 부가하였다. 부드럽게 교반하면서 12시간 동안 4°C에서 면역 복합체 형성이 진행되도록 하였고 단백질 A-아가로스 혼탁물(Sigma)을 최종 부피 1:10(아가로스 혼탁물:샘플)으로 부가하고 추가 6시간 동안 부드럽게 교반하면서 4°C에서 항온반응시켰다. 1분간 5000 x g에서 원심분리 후, 상등액을 버리고 아가로스 비드를 5회 0.5 mL의 차가운 완충액 C(완충액 B + 0.2% 디지토닌)으로 세척하였다. 기질로서 코엘렌테라진(Biosynth AG, Switzerland)을 이용하고 발광분석계(BMGLabtech)에서 루시페라제 활성을 측정하여 침전물을 분석하였다.

[0417]

결과

[0418]

효모 세포에서 선충 선충 odr-10의 가시화-공초점 현미경

[0419]

24시간 유도 후 odr-10-Rluc 및 odr-10-GFP²를 공동발현하는 효모 균주 Invscl의 공초점 영상은 GFP2 융합 단백질이 대부분 세포 막에서만 발현되고 태깅된 odr-10의 과발현은 관찰되지 않음을 보여주었다. 약 32%의 세포가 태깅된 odr-10 단백질을 발현하였다. 유도 시간을 최대 48시간으로 증가시킨, 공초점 영상 결과는 세포에서 GFP²가 과발현되었음을 보여주었고 세포의 세포출에서 응집된 GFP2 입자가 관찰되었다(도 12).

[0420]

BRET²에 의한 생존 효모 세포에서 항상성 odr-10 올리고머의 검출

[0421]

BRET² 실험 결과는 유의한 에너지 전달이 odr-10-Rluc 및 odr-10-GFP²를 공동발현하는 효모 세포에서 관찰되었음을 보여주었고(도 13), odr-10이 동종올리고머를 형성함을 의미하였다. 절반의 효모 세포가 odr-10-Rluc를 발현하고 나머지 절반 세포가 odr-10-GFP²를 발현하는 샘플에서는 유의한 에너지 전달이 얻어지지 않았다.

[0422]

면역침강에 의한 생존 효모 세포에서 항상성 Odr-10 올리고머의 검출

[0423]

생존 효모 세포에서 Odr-10의 올리고머화는 수용체-Rluc 및 수용체-GFP² 융합물의 쌍별(pairwise) 발현과, 이후 항-녹색 형광발광 단백질 항체를 이용한 침전 및 공동면역침전된 루시페라제 활성을 통해 확인하였다. 결과는 도 14에 도시하였으며, Odr-10가 세포에서 올리고머를 형성함을 보여주었다. 공동 면역침강이 GFP²와 Rluc 간 수용체-비의존적, 상호작용에 의한 것일 수 있는 가능성을 확인하기 위해, (1) odr-10-Rluc/GFP2, (2) 수용체-GFP² 또는 수용체-Rluc를 발현하는 가용화 막의 혼합물을 이용하여 공동 면역침강을 또한 수행하였다. 동일 세포에서 odr-10-GFP² 및 odr-10-Rluc의 공동발현과 비교하여 루시페라제 활성이 20% 미만으로 회수된 샘플에서의 결과는 공동발현되는 odr-10-GFP² 및 odr-10-Rluc 융합 단백질 간 상호작용이 특이적이라는 것을 시사한다.

[0424]

실시예 6 - BRET² 태깅된 마우스 α_{2A} 아드레날린작용성 수용체

[0425]

마우스 α_{2A} 아드레날린작용성 수용체(서열번호 56)를 조작하여 GFP²를 제3 세포내 루프에, 그 N 말단은 Ala250에 후속되고 C 말단은 Arg372에 인접하게 삽입시켰다. RLuc는 수용체의 C 말단에서 Val1461에 융합시켰다(아미노산 서열을 서열번호 54로 제공하였고 코딩되는 오픈 리딩 프레임은 서열번호 53임).

[0426]

이중 태깅된 아드레날린작용성 수용체를 효모에서 발현시킨다. 이를 수용체는 BRET² 비율 변화를 통하여 마우스 α_{2A} 아드레날린작용성 수용체에 의한 리간드 결합을 모니터링하는데 사용될 수 있다.

[0427]

실시예 7 - 전체 세포 대 세포 무함유 BRET 어세이

[0428]

본 발명의 세포 무함유 어세이 시스템을 전체 세포 어세이 시스템과 비교한 결과 BRET² 신호의 강도는, 전체 세포 어세이에 대해 세포 무함유 어세이를 비교하여, RLuc 채널에서 측정시 광 출력값 면에서, 40배가 넘게 높은 것으로 확인되었다(도 15). 1 μM의 디아세틸을 분석한 결과 전체 세포 어세이를 이용한 BRET² 신호에서는 유의한 변화가 없었는데 반해(P ≤ 0.05), 세포 무함유 어세이 시스템을 이용하여 52%의 유의한 감소(P ≤ 0.05)가 관찰되었다(도 16).

[0429]

광범위하게 기술된 본 발명의 범주 또는 정신을 벗어나지 않고 특정 구체예에 나타낸 바와 같이 다양한 변형 및

/또는 변화를 본 발명에 가할 수 있다는 것은 당분야의 숙련가는 인식할 수 있다. 본 발명의 구체예는, 따라서, 모든 면에서 예시적인 것으로 간주되며 한정하려는 것이 아니다.

[0430] 본 출원은 2009년 1월 29일 출원된 미국 가출원 US 61/148,271을 우선권으로 주장하고, 이를 전체로 참조하여 본원에 포함시킨다.

[0431] 본원에 인용 및/또는 기술된 모든 출판물을 전체로 본원에 포함시킨다.

[0432] 본 명세서에 포함시킨 임의의 문현, 행위, 재료, 장치, 물품 등에 대한 설명은 오직 본 발명에 대한 설명을 제공하려는 목적이다. 임의의 또는 모든 이러한 것들이 본 출원의 각 청구항의 우선일 전에 존재하였기 때문에 본 발명이 관련된 분야에서 공통의 일반적인 지식이었거나 또는 종래 기술 기반의 일부를 형성하는 것임을 인정하는 것이 아니다.

[0433] 참조문헌

- Aloni et al. (2006) Genome Biol. 7:R88.
- Ayoub et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:21522-28.
- Brenner (1974) Genetics 77:71-94.
- Buck and Axel Cell (1991) 65: 175-187.
- Celic et al. (2003) Biochemistry 42: 3004-3017.
- Charest et al. (2005) EMBO Reports 6: 334-340.
- Cuppen et al. (2003) Comp Funct Genomics 4:479-491.
- Dacres et al. (2009) Anal. Biochem. 385:194-202.
- Day et al. (2004) Luminescence 19:8-20.
- de Wet et al. (1987) Mol. Cell. Biol. 2987:725-737.
- Evers et al. (2006) Biochemistry 45: 13183–13192.
- Feldmesser et al. (2006) BMC Genomics.7:121.
- Frishman and Argos (1997) Proteins 27:329-335.
- Fuchs et al. (2001) Human Genetics 108:1-13.
- Gaillard et al. (2004) Cellular and Molecular Life Sciences 61: 456-469.
- Ghanouni et al. (2001) proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:5997-96002.
- Glusman et al (2001) Genome Res. 11:685-702.
- Glusman et al. (2000a) Mammalian Genome 11: 1016-1023
- Glusman et al. (2000b) Genomics 63: 227-245.
- Graschopf et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:16216-16222.
- Greer and Szalay (2002) Luminescence 17:43-74.
- Harayama (1998) Trends Biotechnol. 16:76-82.
- Hastings (1996) Gene 173:5-11.
- Hoffman et al. (2005) Nature Methods 2:171-176.
- Hofmann et al. (2009) Trends Biochem Sci 34:540-552.
- Hofmann and Stoffel (1993) Biol. Chem. 374:166.
- Hushpulian et al. (2007) Biotransformation 25:2-4.
- Inouye et al. (1997) Biochem. J. 233:349-353.
- Issad and Jockers (2008) Methods Mol. Biol. 332:195-209.
- Jansen et al. (1999) Nat. Genet. 21:414-419.
- Kaiser et al. (2008) Proc Natl Acad Sci U S A 105:15726-31.
- Klein et al. (1984) Biochim. Biophys. Acta 787:221-226
- Kobilka et al. (2007) Biochimica et Biophysica Acta1768: 794-807.
- Lander et al. (2001) Nature 409:860-921.

[0434]

- Li et al. (2009) Journal of Fluorescence 19:601-606.
- Lisenbee et al. (2007) Molecular Endocrinology May15: 17505057.
- Lohse et al. (2003) Life Sciences. 74: 397-404.
- Lohse et al. (2007) Current Opinion in Pharmacology 7: 547-553.
- Lorenz et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4438-4442.
- Macciola et al (2008) Food Control 19:873-878.
- Milligan (1999) Trends Pharmacol. Sci. 20:118- 124.
- Moore et al. (1994) Methods Enzymol. 228:448-450 9.
- Nakanishi et al. (2006) Biochemical and Biophysical Research Communications 343:1191-1196.
- Needleman and Wunsch (1970) J. Mol Biol. 45:443-453.
- Neves et al. (2002) Science 296:1636-1639.
- Niimura and Nei (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100:12235-12240.
- Oldenburg (1998) Annu. Rep. Med. Chem. 33:301-311.
- Oldham abd Hamm (2008) Nature 9:60-71.
- Olender et al.(2004a) Genet Mol Res. 3:545-53.
- Olender et al.(2004b) Genomics. 83:361-72.
- Persson and Argos (1994) J. Mol. Biol. 237:182-192.
- Persson and Jergil (1994) Analytical Biochemistry 204: 131-136.
- Pfleger and Eidne (2006) Nature Methods 3:165-174.
- Pilpel and Lancet (1999) Protein Science 8: 969-77.
- Piston et al. (2007) TRENDS in Biochemical Sciences 32: 407-414.
- Pope (1999) Drug Discovery Today 4:350-362.
- Rieder and Emr (2001) Curr. Protocol. Cell. Biol. Ch. 3; Unit 3.8.
- Robertson (1998) Genome Research 8:449-463.
- Robertson (2001) Chem Senses 26:151-159.
- Rochais et al. (2007) The Journal of Clinical Investigation 117: 229-235.
- Sengupta et al. (1996) Cell 84:899-909.
- Sharon et al.(1998) Ann N Y Acad Sci. 30;855:182-93
- Spencer (1998) Biotechnol. Bioeng. 61:61-67.
- Strop et al. (2007) J. Biol. Chem. 283:1113-1119.
- Troemel et al. (1995) Cell 83: 207-218.
- Trueheart and Fink (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86:9916-9920.
- Tsien (1998) Ann. Rev. Biochem. 63:509-544.
- Verhaegen et al. (2002) Anal. Chem. 74: 4378-4385
- Vilardaga (2003) Nature Biotechnology 21: 807-812.

[0435] Viviani (2002) Cell. Mol. Life Sci. 59:1833-1850.

von Heijne (1992) J.Mol.Biol. 225:487-494.

Wang et al (1997) In Bioluminescence and chemiluminescence: molecular reporting with photons, Wiley, NY, pp 419-422.

Xu et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96:151-156.

Young et al. (2002) J. Human Mol. Genet. 11:535-4.

Zhang and Firestein (2002) Nat. Neurosci. 5:81.

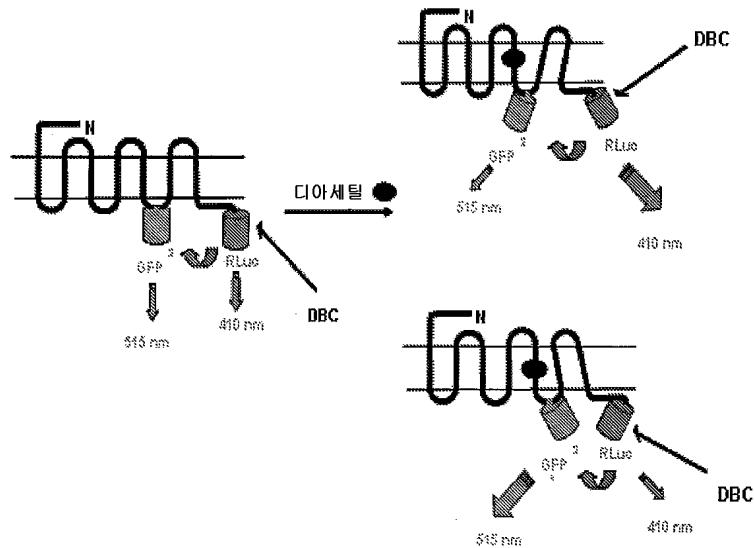
Zhang et al. (1997) PNAS 94: 12162-12167.

Zozulya et al. (2001) Genome Biol. 2:0018.1-0018.12.

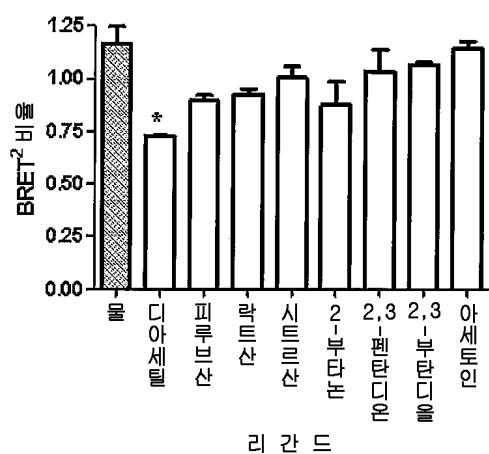
[0436]

도면

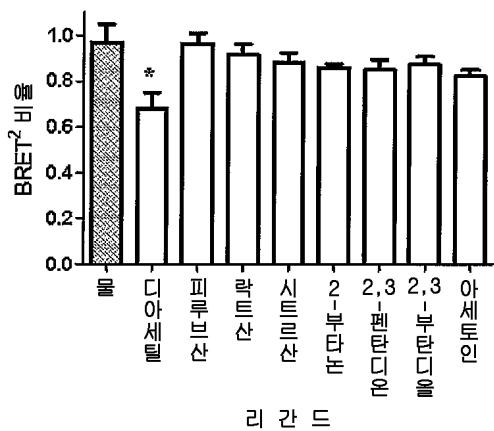
도면1



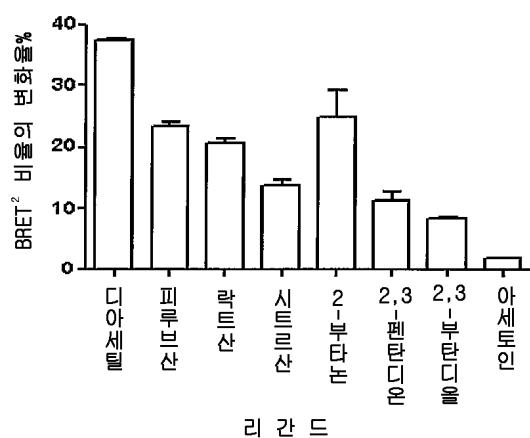
도면2a



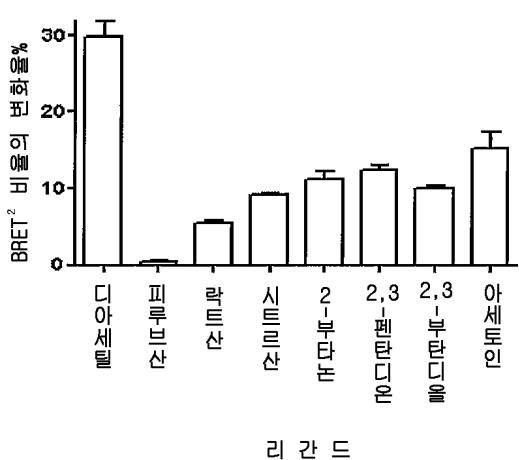
도면2b



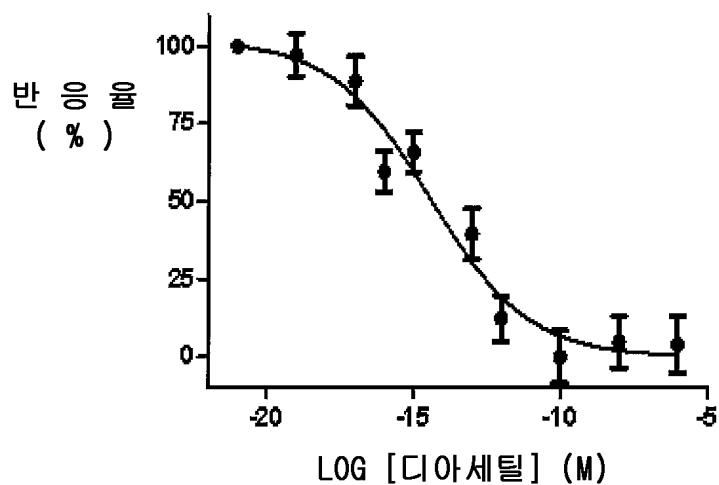
도면3a



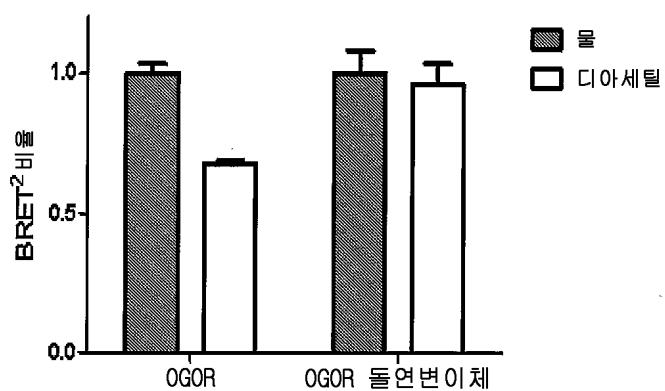
도면3b



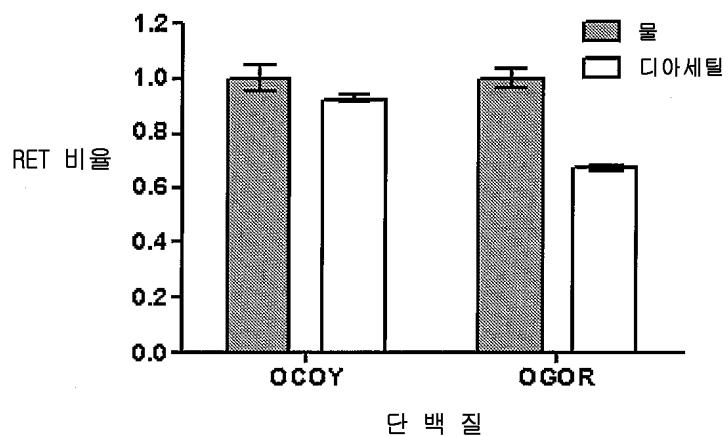
도면4



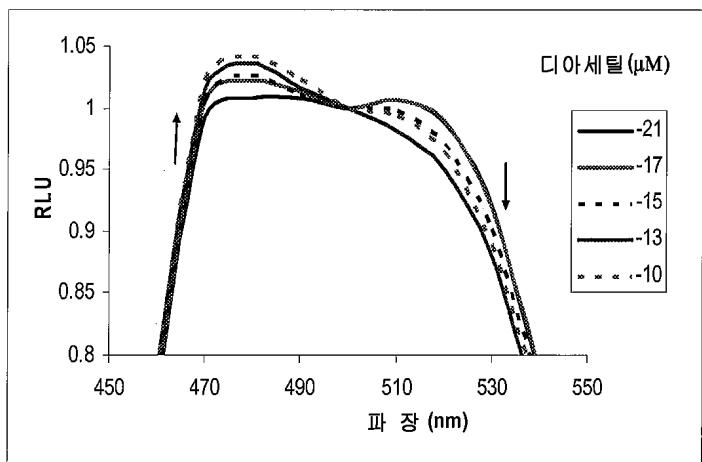
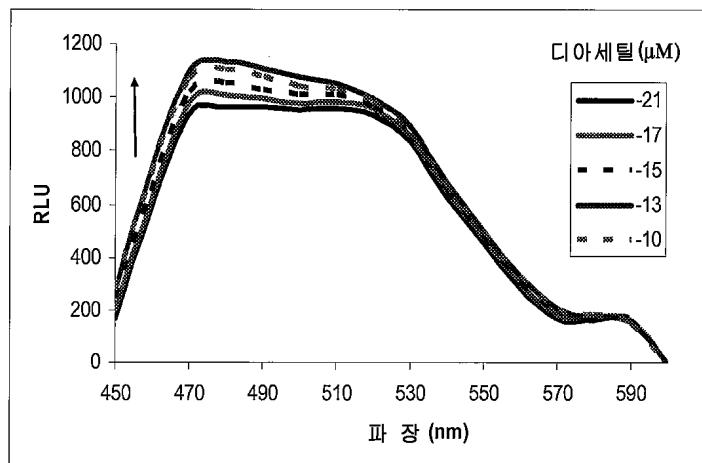
도면5



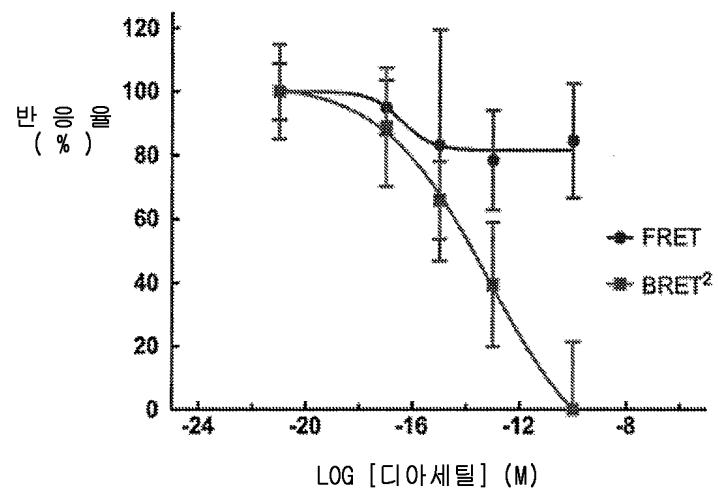
도면6



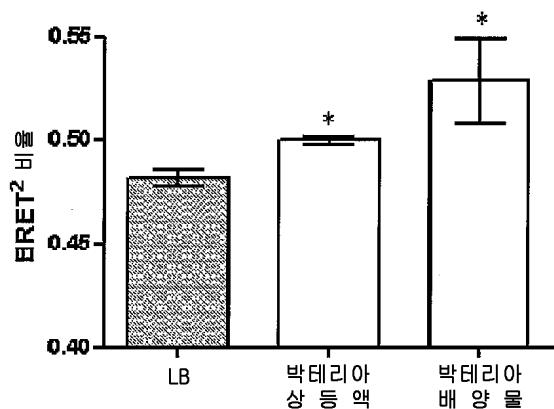
도면7



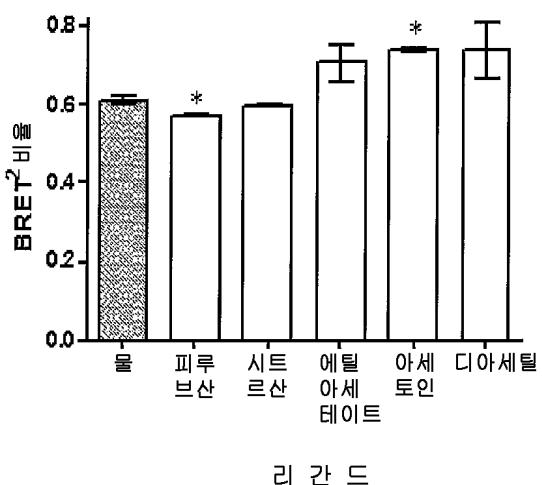
도면8



도면9

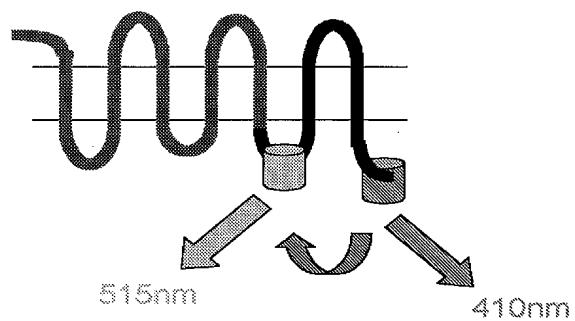
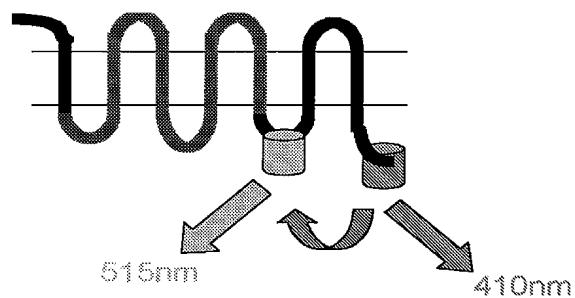


도면10

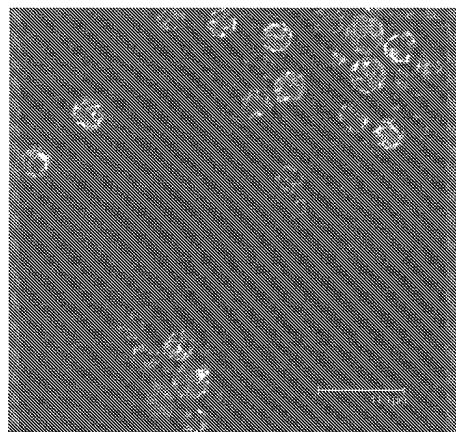


리간드

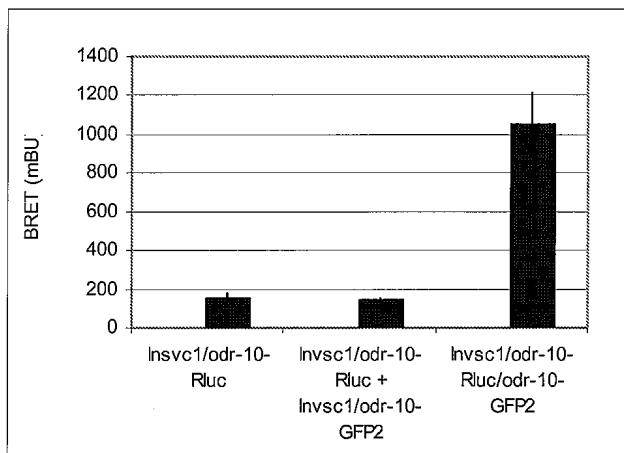
도면11



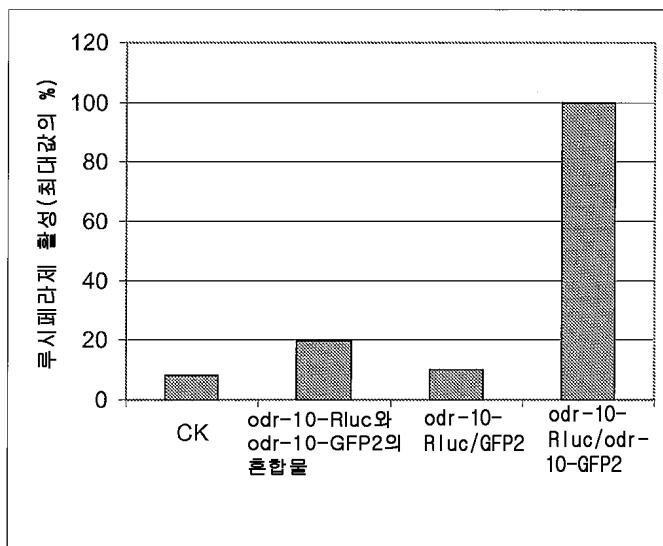
도면12



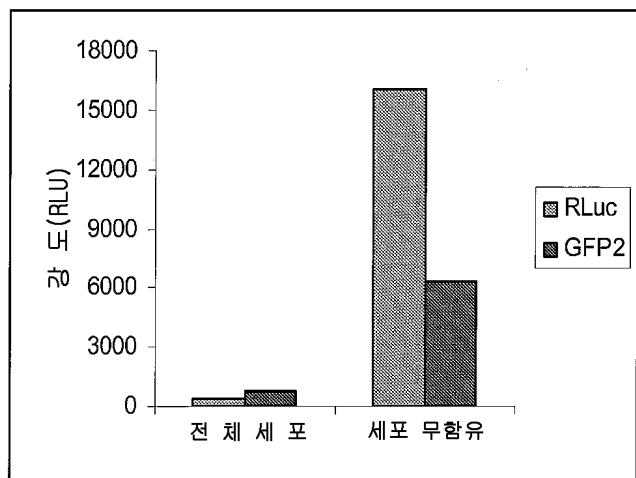
도면13



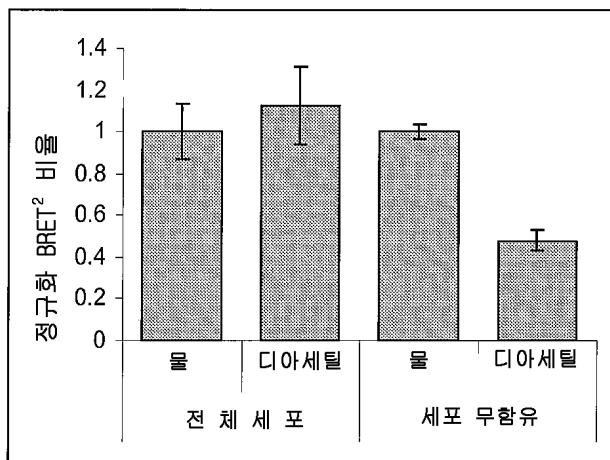
도면14



도면15



도면16



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation

<120> Measuring G protein coupled receptor activation

<130> 508883

<150> 61/148,271

<151> 2009-01-29

<160> 56

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 339

<212> PRT

<213> *Caenorhabditis elegans*

<400> 1

Met Ser Gly Glu Leu Trp Ile Thr Leu Val Asp Thr Ala Asp Ile Val

1

5

10

15

Gly Val Thr Leu Thr Phe Cys Val Asn Ile Val Leu Leu Gly Leu Leu

20

25

30

Lys Thr Arg Gly Lys Asn Leu Gly Thr Tyr Lys Tyr Leu Met Ala Phe

35

40

45

Phe Ser Val Phe Ser Ile Phe Tyr Ala Ile Ile Glu Phe Ile Leu Arg

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

Ile Arg Asp Phe Arg Arg Thr Ile Phe Asn Phe Leu Cys Gly Lys Lys
 305 310 315 320
 Asn Ser Val Asp Glu Ser Arg Ser Thr Thr Arg Ala Asn Leu Ser Gln
 325 330 335
 Val Pro Thr

<210> 2

<211> 346

<212> PRT

<213> Caenorhabditis elegans

<400> 2

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

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

115 120 125
 Leu Pro His Leu Leu Trp Pro Leu Met Cys Ser Ile Pro Val Thr
 130 135 140
 Ala Trp Ala Ser Val Ser Tyr Phe Leu Tyr Pro Asp Thr Glu Tyr Thr
 145 150 155 160
 Glu Ala Ala Val Thr Tyr Val Leu Lys Thr His Tyr Glu Val Ile Lys

165	170	175
Lys Glu Asn Val Ser Tyr Ile Ala Tyr Val Tyr Tyr Gln Tyr Glu Asn		
180	185	190
Gly Glu Arg His Ile Tyr Ile Lys Asn Leu Leu Gly Cys Phe Val His		
195	200	205
Tyr Phe Val Met Ser Met Thr Phe Val Val Val Phe Tyr Cys Gly Phe		
210	215	220
Ser Thr Trp Trp Thr Ile Arg Glu His Arg Gly Ala Ser Asp Arg Thr		
225	230	235
Arg His Leu His Arg Gln Leu Phe Lys Ala Leu Val Phe Gln Thr Leu		
245	250	255
Val Pro Ser Ile Phe Met Tyr Ile Pro Thr Gly Val Met Phe Ile Ala		
260	265	270
Pro Phe Phe Asp Ile Asn Leu Asn Ala Asn Ala Asn Phe Ile Val Phe		
275	280	285
Cys Ser Phe Leu Tyr Pro Gly Leu Asp Pro Leu Ile Leu Ile Phe Ile		
290	295	300
Ile Arg Glu Phe Arg Val Thr Ile Leu Asn Ile Ile Arg Gly Asn Glu		
305	310	315
Arg Gly Asn Ala Val Gly Glu Ala Tyr Ser Thr Ser Arg Ile Lys Ser		
325	330	335
Ser Gln Pro Ala Ala Val Asn Leu Ser Gly		
340	345	
<210> 3		
<211> 341		
<212> PRT		
<213> Caenorhabditis elegans		
<400> 3		
Met Ser Asp Arg His Trp Leu Asp Ile Thr Thr Tyr Ser Asp His Ile		
1	5	10
Gly Phe Thr Ile Ser Thr Ile Ala Asn Phe Val Leu Ile Leu Leu Leu		

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

Pro Phe Val Gly Leu Asn Ile Gly Cys Tyr Gly Asn Ile Thr Thr Ala

275

280

285

Thr Val His Leu Tyr Pro Gly Ile Asp Pro Val Val Leu Ile Phe Ile

290

295

300

Ile Arg Asp Phe Arg Gln Thr Ile Leu Arg Pro Phe Arg Cys Phe Tyr

305 310 315 320

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

325

330

335

Ser Ser Ser Lys Gly

340

<210

> 4

<211> 348

<212> PRT

<213> Caenorhabditis elegans

<400> 4

Met Ser Asp Ile Tyr Trp Ile Gln Ile Thr Glu Val Cys Ser Phe Val

1 5 10 15

Gly Phe Met Leu Ser Val Leu Gly Asn Ser Thr Leu Leu Val Leu Leu

20

25

30

Ser Gly Lys Ser Ile Asp Gly Ile Gly Thr Tyr Arg Tyr Leu Met Ile

35

40

45

Thr Phe Cys Val Phe Ser Leu Leu Phe Thr Ile Leu Glu Asp Phe Ile

50

55

60

Arg Pro Leu Met His His Tyr Asn Asn Thr Ile Ile Val Leu Gln Arg

65 70 75 80

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

85

90

95

Tyr Cys Gly Cys Phe Ala Met Cys Phe Val Met Phe Ala Val His Phe

100

105

110

Ile Tyr Arg Tyr Leu Val Ala Cys His Pro Thr Lys Leu His Tyr Phe

115

120

125

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

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

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

 305 310 315 320
 Lys Thr Lys Lys Ala Ser Val Ser Ser Val Val Arg Gly Ile Glu Ala
 325 330 335
 Gln Ser Lys Lys Gln Ser Phe Ser Arg Val Asp Ile
 340 345
 <210> 5
 <211> 334
 <212> PRT
 <213> Caenorhabditis elegans

<400> 5

Met Thr Asp Gln His Trp Val Ile Ile Thr Asp Ile Ala Gly Pro Ile

1 5 10 15

Gly Phe Ser Met Ser Ile Phe Ser Asn Ser Ile Leu Leu Phe Leu Ile

20 25 30

Phe Ser His Ser Ser Pro Ile Lys Gly Pro Tyr Lys Arg Met Leu Ile

35 40 45

Val Phe Cys Ile Phe Thr Val Phe Tyr Ser Phe Val Val Glu Val Met Leu

50 55 60

Gln Pro Leu Ile His Ile Tyr Asp Asp Thr Leu Phe Leu Ile His Arg

65 70 75 80

Lys Arg Ile Asp Leu Pro Lys Trp Leu Thr Arg Leu Val Pro Thr Thr

85 90 95

Tyr Cys Trp Cys Tyr Ala Met Ser Phe Ser Leu Phe Ala Leu Gln Phe

100 105 110

Leu Tyr Arg Tyr Val Ala Val Cys Lys Pro Gln Tyr Val Asp Leu Phe

115 120 125

Val Gly Cys His Phe Tyr Ala Trp Val Val Leu Ile Leu Ser Leu Ala

130 135 140

Thr Ser Trp Gly Leu Thr Ala Ala Phe Met Phe Pro Gln Thr Asp Arg

145 150 155 160

Thr Thr Glu Ile Phe Leu His Ile Ile Tyr Ser Ser Tyr Asp Leu Glu

165 170 175

Pro Tyr Trp Thr Asp Tyr Val Ala Tyr Lys Tyr Phe Asp Thr Asp Glu

180 185 190

Asn Asn Val Arg Trp Val Asn Val Leu Ser Phe Phe Gly Val Leu Gln

195 200 205

His Gly Ile Val Ile Thr Leu Ser Phe Gly Thr Leu Tyr Tyr Cys Gly

210 215 220

Ile Asn Thr Tyr Leu Lys Ile Lys Lys His Thr Gly Thr Ser Asn Arg

225 230 235 240

Thr Arg Cys Ile Gln Leu Gln Leu Phe Arg Ala Leu Val Ala Gln Thr
 245 250 255
 Ile Leu Pro Met Phe Met Met Tyr Ile Pro Val Gly Phe Met Phe Ala
 260 265 270

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

<210> 6

<211> 350

<212> PRT

<213> Caenorhabditis elegans

<400> 6

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

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

Leu Tyr Arg Tyr Val Ala Val Cys Lys Pro His Leu Val Val Phe Phe

115 120 125

Thr Gly Cys Tyr Phe Tyr Tyr Trp Leu Ala Leu Ile Leu Ser Leu Ala

130 135 140

Thr Ser Trp Gly Leu Thr Ala Ala Phe Met Phe Pro Gln Thr Asn Arg

145 150 155 160

Thr Thr Glu Ser Phe Asn Tyr Val Ile Lys Thr Ser Tyr Asp Leu Asp

165 170 175

Pro Tyr Trp Thr Asp Tyr Val Ala Tyr Lys Tyr Phe Asp Thr Asp Glu

180 185 190

Asn His Val Arg Trp Val Asn Val Leu Ser Leu Phe Gly Val Leu Gln

195 200 205

His Gly Leu Val Ile Thr Leu Ser Phe Gly Thr Leu Phe Tyr Cys Gly

210 215 220

Ile Lys Thr Tyr Leu Ser Ile Thr Glu His Val Gly Met Ser Ser Lys

225 230 235 240

Thr Arg Ser Leu Gln Leu Gln Leu Phe Arg Ala Leu Val Ala Gln Thr

245 250 255

Cys Leu Pro Met Leu Met Met Tyr Met Pro Ile Gly Phe Met Phe Ser

260 265 270

Cys Pro Tyr Phe Asp Leu Gln Leu Gly Ala Val Thr Asn Tyr Gln Thr

275 280 285

Val Met Ala Gln Leu Tyr Pro Gly Ile Asp Pro Phe Met Leu Leu Phe

290 295 300

Leu Ile Asn Ala Tyr Arg Lys Thr Val Leu Ser Leu Ile Cys Pro Asn

305 310 315 320

Phe Ile Gln Lys Lys Tyr Val Gln Thr Ala Thr Thr Arg Asp Gly Thr

325 330 335

Asp Ala Ser Ala Thr Met Asn Ser Val Lys Ser Thr Gln Leu

340 345 350

<211> 1020

<212> DNA

<213> *Caenorhabditis elegans*

<400> 7

atgtcgggag aattgtggat taccctagtt gacacagcgg acattgtcgg cgtcacccgc
accttctgtg tcaacattgt tcttctcgga ctctgaaaa cacgtggaaa aaacttggc 120

acttataaat atctcaiggc gttttctca gtattctcgta tttttacgc catcatcgag 180
ttcatattac gacctataat gcatatttag aacaccactt tcttttgcat ctcaaggaaa 240
agattcaact actccaccaa acttgaaaa atcaactctg cgtttactg tgcttgttt 300
gccaccagg ttgttgtctc aggagttcac tttgttgcat gatatttgc aacttgcaaa 360
ccgaatctac ttctgttgc caacttgcca actttctac ttggccact tggtgcagt 420
gtaccctgtga caatgtggc tagtgtctca tatttttgcat atccagatac cgagtacacg 480
gaagcggctg tcaccaatgt actaaataac cactataact ggatcaaaaa ggagaatgta 540

tcgtacatgt catacgctta ttaccaatac gaaaacggag taaggcatat ctaccta 600
aacttgcttg gatgtttgt tcattacttt gtcgtcgat tgacgtttgt tgtgtatgtc 660
tactgcggat atgccacgtg gaaaactatg aatgaacaca aggtatgtatc tgatagaact 720
cgagcgctac agaaacaact tttcaagct ttagttctc agacactcat cccaaactatc 780
ttcatgtacg ccccaactgg agtcaatgttca atgcacccgt ttttgacgt gaatttgaat 840
gcaaacgcca atttcattgt gtttgctca tttctgtacc cgggactcgat tccactcatt 900
ctgattttga tcattctgtga tttccgaaga acaatattca atttcttgtg tggaaagaaa 960

aacagtgttg atgaatcccg ctgcacaaca agagccaatt tgtctcaagt tccgacgtga 1020
<210> 8

<211> 1040

<212> DNA

<213> *Caenorhabditis elegans*

<400> 8

atgtctggc aattatggtt ggccctcgat gatgtcgccg atatggtagg attcaacttc 60
acgatctcca tcaacatcat tctactgggg ctgatttagaa cacgtggaaa aacgttggaa 120
acgtacaat acttgaatgg cttctctcg tttctctca tctttatgc aatcgatgaa 180
tctatatttga gaccaataat gcataatcgaa aacacgacgt tcttctgtat ttctcgaaaa 240
cgcttcgatt actcaactcg ctttggtaaa atcaactctg ctttctactg tgcttgttt 300

gccacgagtt ttgcctgtc tgccgtacac ttgtgtatc ggtactttgc cgcttgcaaa 360
 ccgaatctgc tacgcttgtt taaccttccg catctttac tgtggcctt gatgtgttcg 420
 attccctgtga ctgcgtggc aagtgttct tacttttgt acccagacac cgagtagact 480
 gaagcagcag ttacatatgt tctgaaaaca cactacgagg tcatcaaaaa agaaaatgt 540
 tcttatatcg catacgata ctatcaatat gaaaatgggg agcgtcacat ctacataaaa 600
 aattgtttg gctgcttgtt acactacttgc ttatgtcaa tgacattgt agttgtttt 660
 tactgcggat ttctacatg gtggacgatt cgtgagcatc gtggagcatc tgataggaca 720

cgtcacctgc atagacaatt gtttaaggca cttgtatttc aaacccttgt tccatcaata 780
 tttatgtaca tcccaactgg tgtcatgttc atcgctccct tttcgacat caaccgtaat 840
 gccaatgcaa acttcatcg ttttgcgtca ttctctatc caggtcttga cccactaatt 900
 ctcatttta tcattcgca attcgggtca ctatggaa tatcatcaga ggaaatgagc 960
 ggggaaatgc tggggcgaa gcatactcaa cttctgaat aaaatcatca caacctgcag 1020
 ctgttaatct ttctggataa 1040

<210> 9

<211> 1026

<212> DNA

<213> Caenorhabditis elegans

<400> 9

atgtctgacc gtcattggct cgacatcacc acctactcag accacattgg gtttacgatt 60
 tccaccatcg ccaatttcgt tctgatcctt ctgttagtct tccgaccgac caaatcatac 120
 ggttcataca agtacctgat gatcacattc tgcgtttca gcctttta cacccatt 180
 gaaactttt tgagacctt catccatatac tacgacaata cgatctcgat gattcagcgc 240
 aagagattcc agtactccga gggtaaccgtt agagccattt catcgaccta ctgcggctgc 300
 tacccatga gtttaccctt gttcgccgtc cactttgtt accgttacta tgcggcttgc 360
 aaacccgaca acctccgtta cttccaagga tgctactttg tgcgtgggtt attcggagca 420

atggcggtgg cggcgagctg ggggttcgca gcgttatttc tgaccggaa gaccgagagg 480
 accaggacgg cgttgataca cgtcatacaa acatcctatg agctggatcc cgagtgggtg 540
 ggaaatgttc catatagcta ttggcgaca gaaaacggag tgaaataacctt gaatcctcgc 600
 aacgtcatcg ggtatccatca acacggcgatc atcatgatcc ttccttcgg aacagtcttc 660
 tactgcggat tcaacactta taagactttg aacggaagtc tgggggtgtc tgaaaaaaca 720
 aaagaaatgc acaccaattt gttcaaggcc ttgggtctac agactatcat ccctactaca 780

ctaatgtaca tccgacaac catgctttt gtcacccat tcgttgact caacatcgcc	840
tgttacggca acatcaactac tgccaccgtc catttgtatc ctggaattga cccagtcgtt	900
ttgatctta taatccgaga cttccggaa acgatttaa gaccatttag atgcttctac	960
cgttcaaata gtgtcgaaaa cactgccacc ataaggcaat accagcagag cagctccaaa	1020
ggataa	1026
<210> 10	
<211> 1047	
<212> DNA	
<213> Caenorhabditis elegans	
<400> 10	
atgtccgata tatactggat acaaattact gaagtttgct cttcgctgg atttatgtc	60
tcagttctag ggaacagtac acttttagta ctgctcgtg gaaaatccat agatggaatt	120
ggcacctatc ggtacttgat gatcaacttc tgcgtttca gtttatttt tacgatatta	180
gaggatttttca tcagaccgt gatgcatac tataacaata ccataattgt tttacaacgc	240
aagcggttca agtttctga ttcaacggct agaatcttga cagtcttta ctgcggctgt	300
ttcgcgtatgt gttcgtatgt gttcgccgtt catttcatct atcgatatct agttgttgt	360
cacccgacaa aattgcacta tttcgaccc aaaaatttca tttctggct gtccggcatg	420
ttattcatag caggaagctg gggttgcattt gcataatgtt ttttcaaga agacctagaa	480
accaggacgg atttggattt tattttgtca acttgttata atttaacgcc agatgatgtc	540
ggacatgtac cgatgtttt ttacaaaact caagggaaata cacgagtaat tcgatggat	600
aacatgattt ggttattca tcatatgata gttatgacaa tctctataag tgccgtttc	660
tactttggca ttaaaaccta cactcgaata atgagttca agggaaaatc ccagaaaacc	720
aaggatctcc agaatcaatt ttctactgtt ctatgttgc aaaccgtatg ccctctgatt	780
ttcatgttttca tccaaatat ggtgctact acggcagccc ttatagatgg cacatttggc	840
tcatggccca atattactgtt agttatgtt cattttgtatc cggctgccga tccattcggtt	900
atactgttca ttataggg gttccggat agtattagaa atgttatata tcgctgcaca	960
aaaacgaaaa aagcatcggt tagctcgtg gtccgtggta ttgaggctca aagcaagaaaa	1020
caatctttt ctgcgttta tattttaa	1047
<210> 11	
<211> 1005	
<212> DNA	

<213> Caenorhabditis elegans

<400> 11

atgactgatc aacactgggt tattatcaca gatattgctg gtccaatcg	60
tccatTTTT caaacTctat tcTTTGTtT ttgatTTT cacattcatc tccaataaaa	120
ggTccatACA aacgaatgct catagtATTt tgcatATTtA ccgtATTcta ctcatTTGc	180
gaagtcatgc ttcaGCCACT aatccatATT tacgacgaca cttatTTTt gattcatcgA	240

aagagaatAG actTGccAAA atggtaaca cgTTGGTc ctactaccta ttgttggTgt	300
taCgcaatga gTTTTCCTT gTTGcatta caATTTAT atagatATgt ggcagtatgc	360
aaACCGcaat atgttgatct ttttgcgGA tGtcactTTt atGcttgggt agTTTigAtc	420
ttatcactag ccacgagctg gggactcact gcagcTTca tGTTcccaca aaccgaccga	480
acaactgaaa ttTTTtgcA cataATTtAt agttcatatg acttggagcc ttattggaca	540
gattatgttG ctTATAAATA ctTtgataCT gatgagaata atgtgagatg ggtcaatgtt	600
cttagTTTT tcggTgtcCT tcagcacGGG attgtAAAta ctctaaGTTt tggcacCCtt	660

tattattgtg gcatcaacac gtaTCTcaaA ataaaaAAAC acactggAAC atcaaAcAGA	720
actcgatgtA ttcaactaca acTTTcaga gctctggTg cacagacaat tttaccaatg	780
ttcatgatgt atattccgt tggttcatg tttgcatgtc catatttga ctTGcaAtta	840
ggTgcataca ccaattatca aacagtcatg gcacaactt atccggaaAt cgaccCatt	900
gtgatgctgt ttTtgataga ttcttataga ataacaatAt ttggatggtt atgtccaaga	960
tttgttatg taaAGCCGAt gcattccaca tacaccctaa ctgtA	1005

<210> 12

<211> 1053

<212> DNA

<213> Caenorhabditis elegans

<400> 12

atgaccgatc gtcgctgggt cgcttattacg gacattgcg gaccgattgg gttcacaatg	60
tcaatTTTTT cgaactcggt gctgttatcg ttgatTTtct caagcagctc tccaattAAA	120
ggagcttaca AAAATATGTT gatagtgttG tGtataTTCA ctatgttcta ctctTTTtt	180
gaaataatgc ttcaaccGtt gattcatatt tatgatgaca cgctgttctt gatccaccgg	240
aaaagatttG acctgtctaa aggaattaca cgTTTgatac ctacaacata ttgttggigt	300
tatgcaatga gtttctcatt attcgccctc cagTTTTGT acagatATgt ggcagTTGc	360
aaacctcaCT tagttgtttt ttTactgga tgctatttct attattggtt ggcactcatc	420

ggagcagtca caaactatca aaccgtcatg gcacagttat acccaggaat cgaccattt 900
atgttgctat ttcttattaa cgctacaga aagacagtgt taagctttagt ctgtcttaat 960
tttatccaga aaaaatatgt tcaaacggca actactcggt atggcacaga tgcctcgcca 1020
acaatgaatt ctgttaaatc tacacagtta taa 1053

<210> 13

<211> 889

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> BRET construct

<400> 13

Met Ser Gly Glu Leu Trp Ile Thr Leu Val Asp Thr Ala Asp Ile Val

1 5 10 15

Gly Val Thr Leu Thr Phe Cys Val Asn Ile Val Leu Leu Gly Leu Leu

20 25 30

Lys Thr Arg Gly Lys Asn Leu Gly Thr Tyr Lys Tyr Leu Met Ala Phe

35 40 45

Phe Ser Val Phe Ser Ile Phe Tyr Ala Ile Ile Glu Phe Ile Leu Arg

50 55 60

Pro Ile Met His Ile Glu Asn Thr Thr Phe Phe Leu Ile Ser Arg Lys

65 70 75 80

Arg Phe Asn Tyr Ser Thr Lys Leu Gly Lys Ile Asn Ser Ala Phe Tyr

85 90 95

Cys Ala Cys Phe Ala Thr Ser Phe Val Val Ser Gly Val His Phe Val

100 105 110

Tyr Arg Tyr Phe Ala Thr Cys Lys Pro Asn Leu Leu Arg Leu Phe Asn

115

120

125

Leu Pro Thr Leu Leu Leu Trp Pro Leu Gly Cys Ser Val Pro Val Thr

130

135

140

Met Trp Ala Ser Val Ser Tyr Phe Leu Tyr Pro Asp Thr Glu Tyr Thr

145 150 155 160

Glu Ala Ala Val Thr Asn Val Leu Asn Asn His Tyr Asn Trp Ile Lys

165

170

175

Lys Glu Asn Val Ser Tyr Ile Ala Tyr Val Tyr Tyr Gln Tyr Glu Asn

180

185

190

Gly Val Arg His Ile Tyr Leu Lys Asn Leu Leu Gly Cys Phe Val His

195

200

205

Tyr Phe Val Met Ser Met Thr Phe Val Val Met Phe Tyr Cys Gly Tyr

210

215

220

Ala Thr Trp Lys Thr Met Asn Glu His Lys Asp Val Ser Asp Arg Thr

225 230 235 240

Met Thr Ser Lys Val Tyr Asp Pro Glu Gln Arg Lys Arg Met Ile Thr

245

250

255

Gly Pro Gln Trp Trp Ala Arg Cys Lys Gln Met Asn Val Leu Asp Ser

260

265

270

Phe Ile Asn Tyr Tyr Asp Ser Glu Lys His Ala Glu Asn Ala Val Ile

275

280

285

Phe Leu His Gly Asn Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Trp Arg His Val Val

290

295

300

Pro His Ile Glu Pro Val Ala Arg Cys Ile Ile Pro Asp Leu Ile Gly

305 310 315 320

Met Gly Lys Ser Gly Lys Ser Gly Asn Gly Ser Tyr Arg Leu Leu Asp

325

330

335

His Tyr Lys Tyr Leu Thr Ala Trp Phe Glu Leu Leu Asn Leu Pro Lys

340

345

350

Lys Ile Ile Phe Val Gly His Asp Trp Gly Ala Cys Leu Ala Phe His

355

360

365

Tyr Ser Tyr Glu His Gln Asp Lys Ile Lys Ala Ile Val His Ala Glu
 370 375 380
 Ser Val Val Asp Val Ile Glu Ser Trp Asp Glu Trp Pro Asp Ile Glu
 385 390 395 400

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

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

Glu Asp Ala Pro Asp Glu Met Gly Lys Tyr Ile Lys Ser Phe Val Glu
 530 535 540
 Arg Val Leu Lys Asn Glu Gln Arg Ala Leu Gln Lys Gln Leu Phe Lys
 545 550 555 560
 Ala Leu Val Leu Gln Thr Leu Ile Pro Thr Ile Phe Met Tyr Ala Pro
 565 570 575
 Thr Gly Val Met Phe Ile Ala Pro Phe Phe Asp Val Asn Leu Asn Ala
 580 585 590

Asn Ala Asn Phe Ile Val Phe Cys Ser Phe Leu Tyr Pro Gly Leu Asp
 595 600 605
 Pro Leu Ile Leu Ile Leu Ile Ile Arg Asp Phe Arg Arg Thr Ile Phe

610	615	620
Asn Phe Leu Cys Gly Lys Asn Ser Val Asp Glu Ser Arg Ser Thr		
625	630	635
Thr Arg Ala Asn Leu Ser Gln Val Pro Thr Met Val Ser Lys Gly Glu		640
645	650	655
Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp		
660	665	670
Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala		
675	680	685
Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu		
690	695	700
Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Ser Tyr Gly Val Gln		
705	710	715
720		
Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys		
725	730	735
Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys		
740	745	750
Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp		
755	760	765
Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp		
770	775	780
Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn		
785	790	795
Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe		800
805	810	815
Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His		
820	825	830
Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp		
835	840	845
Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu		
850	855	860

Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile

865 870 875 880

Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys

885

<210> 14

<211> 2670

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ORF encoding BRET construct of SEQ ID NO:13

<400> 14

atgtcgggag aatttgttgc tacccttagtt gacacagcgaa acattgtcgcc cgtcacccctc	60
---	----

accttctgtg tcaacattgt tcttcgttga ctcttgaaaa cacgtggaaa aaacttgggc	120
---	-----

acttataaat atctcatggc gttttctca gtattctcgat tttttacgc catcatcgag	180
--	-----

ttcatattac gacctataat gcatatttgcg aacaccactt tcttttgcat ctcaaggaaa	240
--	-----

agattcaact actccaccaa acttggaaaa atcaactctg cgtttactg tgctgtttt	300
---	-----

gccaccagtt ttgttgttgc aggagttcac tttgtttatc gatattttgc aacttgcaaa	360
---	-----

ccgaatctac ttcgtttgtt caacttgcac actcttctac tttggccact tggttgcagt	420
---	-----

gtacccgtga caatgtggc tagtgttca tatttttgc atccagatac cgagtagacacg	480
--	-----

gaagcggctg tcaccaatgt actaaataac cactataact ggatcaaaaa ggagaatgt	540
--	-----

tctgtacattt catacgatcta ttaccaatac gaaaacggag taaggcatat ctacccaa	600
---	-----

aacttgcttgc gatgtttgtt tcattactt gtcgttgcg tgacgtttgt tgcgtatgttc	660
---	-----

tactgcggat atgccacgtg gaaaactatg aatgaacaca aggtgtatc tgatagaact	720
--	-----

atgaccagca aggtgtacga ccccgagcag aggaagagga tgcgttgcg cccccactgg	780
--	-----

tggccaggt gcaaggat gaacgttgcg gacagttca tcaactacta cgacagcgag	840
---	-----

aagcacgccc agaacgcccgt gatcttccgt cacggcaacg ccgcttagcag ctaccgtgg	900
--	-----

aggcacgtgg tggccacat cgagccgtg gccagggtca tcatccccga tctgtatggc	960
---	-----

atggcaaga gggcaagag cggcaacggc agctacaggc tgctggacca ctacaagtac	1020
---	------

ctgaccgcct gttcgagct cctgaacctg cccaaagaaga tcatcttcgt gggccacgac	1080
---	------

tggggccct gcctggccctt ccactacaggc tacggacacc aggacaagat caaggccatc	1140
--	------

gtgcacgccc agagcgtggt ggacgttgcg gagagctggg acgagttggcc agacatcgag	1200
--	------

gaggacatcg ccctgtatcaa gagcgaggag ggcgagaaga tggtgctggaa gaacaacttc	1260
---	------

ttcgtggaga ccatgctgcc cagcaagatc atgagaaagc tggagcccga ggagttcgcc 1320

gcctacctgg agcccttcaa ggagaaggc gaggtgagaa gacccacctg gagctggccc 1380
 agagagatcc ccctgtgaa gggcggcaag cccgacgtgg tgcagatgtt gagaaactac 1440
 aacgcctacc tgagagccag cgacgacctg cccaagatgt tcatcgagag cgacccggc 1500
 ttcttcagca acgccatcggt ggagggcgcc aagaagtcc ccaacaccga gttcgtaag 1560
 gtgaagggcc tgcacttcag ccaggaggac gccccgacg agatggcaa gtacatcaag 1620
 agcttcgtgg agagagtgtt gaagaacgag cagcggcgc tacagaaaca actttcaaa 1680
 gcttagttc tttagtccatgtt acgccccaaac tggagtcgt 1740

ttcatcgcac cgaaaaatgg cgtgaatttgc aatgcaacg ccaatttcatttgttttgc 1800
 tcatttcgtt accccggact cgcatttcattt tgcatttcatttgcatttcgtt 1860
 agaacaatat tcaatttcattt gtgtggaaag aaaaacatgtt ttgtgaatcccgatcgaca 1920
 acaagagcca atttgcattca agttccgacg atggtgagca agggcgagga gcttttacc 1980
 ggggtgtgc ccatcctggc cgagctggac ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtt 2040
 tccggcgagg gcgagggcga tgccacccatc ggcaagctga ccctgaagttt catctgcacc 2100
 accggcaagc tgcccggtgcc ctggccacc ctcgtgacca ccctgagcta cggcgtgcag 2160

tgcttcagcc gctaccccgaa ccacatgaag cagcacgact tttcaagtc cgccatgccc 2220
 gaaggctacg tccaggagcg caccatccatc ttcaaggacg acggcaacta caagacccgc 2280
 gccgagggtga agttcgaggg cgacaccctg gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac 2340
 ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac aagctggagt acaactacaa cagccacac 2400
 gtctatataca tggccgacaa gcagaagaac ggcattcaagg tgaacttcaa gatccgcac 2460
 aacatcgagg acggcagcgtt gcagctggcc gaccactacc agcagaacac ccccatcgcc 2520
 gacggccccc tgctgctgccc cgacaaccac tacctgagca cccagttccgc cctgagcaaa 2580

gaccccaacg agaagcgcga tcacatggtc ctgctggagt tcgtgaccgc cgccggatc 2640
 actctggca tggacgagct gtacaagttaa 2670

<210> 15

<211> 889

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> BRET construct

<400> 15

Met Ser Gly Glu Leu Trp Ile Thr Leu Val Asp Thr Ala Asp Ile Val

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

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly

260 265 270

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile

275 280 285

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr

290 295 300

Leu Ser Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys

305 310 315 320

Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu

325 330 335

Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu

340 345 350

Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly

355 360 365

Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr

370 375 380

Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn

385 390 395 400

Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser

405 410 415

Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly

420 425 430

Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu

435 440 445

Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe

450 455 460

Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Arg

465 470 475 480

Ala Leu Gln Lys Gln Leu Phe Lys Ala Leu Val Leu Gln Thr Leu Ile

485 490 495

Pro Thr Ile Phe Met Tyr Ala Pro Thr Gly Val Met Phe Ile Ala Pro

500	505	510
Phe Phe Asp Val Asn Leu Asn Ala Asn Ala Asn Phe Ile Val Phe Cys		
515	520	525
Ser Phe Leu Tyr Pro Gly Leu Asp Pro Leu Ile Leu Ile Leu Ile Ile		
530	535	540
Arg Asp Phe Arg Arg Thr Ile Phe Asn Phe Leu Cys Gly Lys Lys Asn		
545	550	555
Ser Val Asp Glu Ser Arg Ser Thr Thr Arg Ala Asn Leu Ser Gln Val		
565	570	575
Pro Thr Met Thr Ser Lys Val Tyr Asp Pro Glu Gln Arg Lys Arg Met		
580	585	590
Ile Thr Gly Pro Gln Trp Trp Ala Arg Cys Lys Gln Met Asn Val Leu		
595	600	605
Asp Ser Phe Ile Asn Tyr Tyr Asp Ser Glu Lys His Ala Glu Asn Ala		
610	615	620
Val Ile Phe Leu His Gly Asn Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Trp Arg His		
625	630	635
Val Val Pro His Ile Glu Pro Val Ala Arg Cys Ile Ile Pro Asp Leu		
645	650	655
Ile Gly Met Gly Lys Ser Gly Lys Ser Gly Asn Gly Ser Tyr Arg Leu		
660	665	670
Leu Asp His Tyr Lys Tyr Leu Thr Ala Trp Phe Glu Leu Leu Asn Leu		
675	680	685
Pro Lys Lys Ile Ile Phe Val Gly His Asp Trp Gly Ala Cys Leu Ala		
690	695	700
Phe His Tyr Ser Tyr Glu His Gln Asp Lys Ile Lys Ala Ile Val His		
705	710	715
Ala Glu Ser Val Val Asp Val Ile Glu Ser Trp Asp Glu Trp Pro Asp		
725	730	735
Ile Glu Glu Asp Ile Ala Leu Ile Lys Ser Glu Glu Gly Glu Lys Met		
740	745	750

Val Leu Glu Asn Asn Phe Phe Val Glu Thr Met Leu Pro Ser Lys Ile
 755 760 765

Met Arg Lys Leu Glu Pro Glu Glu Phe Ala Ala Tyr Leu Glu Pro Phe
 770 775 780

Lys Glu Lys Gly Glu Val Arg Arg Pro Thr Leu Ser Trp Pro Arg Glu
 785 790 795 800

Ile Pro Leu Val Lys Gly Gly Lys Pro Asp Val Val Gln Ile Val Arg
 805 810 815

Asn Tyr Asn Ala Tyr Leu Arg Ala Ser Asp Asp Leu Pro Lys Met Phe
 820 825 830

Ile Glu Ser Asp Pro Gly Phe Phe Ser Asn Ala Ile Val Glu Gly Ala
 835 840 845

Lys Lys Phe Pro Asn Thr Glu Phe Val Lys Val Lys Gly Leu His Phe
 850 855 860

Ser Gln Glu Asp Ala Pro Asp Glu Met Gly Lys Tyr Ile Lys Ser Phe
 865 870 875 880

Val Glu Arg Val Leu Lys Asn Glu Gln

885

<210> 16

<211> 2670

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ORF encoding BRET construct of SEQ ID NO:15

<400> 16

atgtcggag aattgtggat taccctagtt gacacagccg acattgtcg cgtcacctc	60
acttctgtc tcaacattgt ttttctcgaa cttctgaaaa cacgtgaaaa aaacttgggc	120
acttataaat atctcatggc gttttctca gtattctcgat tttttacgc catcatcgag	180

ttcatattac gacctataat gcatatttag aacaccactt tcttttgat ctcaaggaaa	240
agattcaact actccaccaa acttggaaaa atcaactctg cgtttactg tgctgttt	300
gccaccagtt ttgttgtctc aggagttcac tttgttatac gatatttgc aacttgaaaa	360
ccgaatctac ttcgtttgtt caacttgcca actcttctac tttggccact tggtgcagt	420
gtacccgtga caatgtggc tagtgtctca tatttttgtt atccagatac cgagtagacg	480

gaagcggctg tcaccaatgt actaaataac cactataact ggatcaaaaa ggagaatgt	540
tcgtacattg catacgctta ttaccaatac gaaaacggag taaggcatat ctacctaaa	600
aacttgctt gatgtttgt tcattacttt gtcatgtcga tgacgttgt tgtgtatgttc	660
tactgcggat atgccacgtg gaaaactatg aatgaacaca aggatgtatc ttagatagaact	720
atggtgagca agggcggagga gctgttcacc ggggtggtgc ccattcttgt cgagctggac	780
ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacccat	840
ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggccacc	900
ctcgtgacca ccctgagcta cggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccgaa ccacatgaag	960
cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatttc	1020
ttcaaggacg acggcaacta caagacccgc gccgagggtga agttcgaggg cgacaccctg	1080
gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac	1140
aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac	1200
ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctgcc	1260
gaccactacc agcagaacac cccatcggtg gacggcccg tgctgtgcc cgacaaccac	1320
tacctgagca cccagtccgc cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcga tcacatggtc	1380
ctgctggagt tctgtgaccgc cgccgggatc actctcggtca tggacgagct gtacaagcga	1440
gcgcctacaga aacaactttt caaagcttta gttttcaga cactcatccc aactatttc	1500
atgtacgccc caactggagt catgttcattt gcaccgttt ttgacgtgaa ttgttatgca	1560
aacgccaatt tcattgtttt ttgcttcattt ctgtacccgg gactcgatcc actcattctg	1620
attttgcattt ttcgtgattt ccgaagaaca atattcaatt tcttgtgtgg aaagaaaaac	1680
agtgttgatg aatcccgctc gacaacaaga gccaattttt ctcaagttcc gacgatgacc	1740
agcaagggtt acgaccccgaa gcagaggaag aggtatgtca cggccccca gtggtggcc	1800
aggtgcaagc agatgaacgt gctggacagc ttcatcaact actacgacag cgagaagcac	1860
ggcgagaacg ccgtgatctt cctgcacggc aacgcccgtt gcaagctacgt gtggaggcac	1920
gtgggtcccccc acatcgagcc cgtggccagg tgcatcatcc ccgtatgtatc cgccatggcc	1980
aagagcggca agagcggcaa cggcagctac aggctgtgg accactacaa gtacactgacc	2040
gcctgggtcg agctcctgaa cctgcccag aagatcatct tctgtggccca cgactggggc	2100
gcctgcctgg cttccacta cagctacgag caccaggaca agatcaaggc catcgac	2160
gccgagagcg tgggtggacgt gatcgagacg tggacgagct ggccagacat cgaggaggac	2220

atcgccctga tcaagagcga ggagggcag aagatggtc tgagaacaa ctttcgtg 2280

gagaccatgc tgcccagcaa gatcatgaga aagctggagc ccgaggagtt cgccgcctac 2340
 ctggagccct tcaaggagaa gggcgaggta agaagaccca ccctgagctg gccagagag 2400
 atccccctgg tgaagggcgg caagccgac gtggtgacca tcgtgagaaa ctacaacgcc 2460
 tacctgagag ccagcgacga cctgccaag atgttcatcg agagcgaccc cggttcttc 2520
 agcaacgcca tcgtggaggg cgccaagaag ttcccaaca ccgagtttgt gaaggtgaag 2580
 ggcctgcact tcagccagga ggacgcccc gacgagatgg gcaagtacat caagagcttc 2640
 gtggagagag tgctgaagaa cgagcagtaa 2670

<210> 17

<211> 650

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> BRET construct

<400> 17

Met Ser Gly Glu Leu Trp Ile Thr Leu Val Asp Thr Ala Asp Ile Val

1 5 10 15

Gly Val Thr Leu Thr Phe Cys Val Asn Ile Val Leu Leu Gly Leu Leu

20 25 30

Lys Thr Arg Gly Lys Asn Leu Gly Thr Tyr Lys Tyr Leu Met Ala Phe

35 40 45

Phe Ser Val Phe Ser Ile Phe Tyr Ala Ile Ile Glu Phe Ile Leu Arg

50 55 60

Pro Ile Met His Ile Glu Asn Thr Thr Phe Phe Leu Ile Ser Arg Lys

65 70 75 80

Arg Phe Asn Tyr Ser Thr Lys Leu Gly Lys Ile Asn Ser Ala Phe Tyr

85 90 95

Cys Ala Cys Phe Ala Thr Ser Phe Val Val Ser Gly Val His Phe Val

100 105 110

Tyr Arg Tyr Phe Ala Thr Cys Lys Pro Asn Leu Leu Arg Leu Phe Asn

115 120 125

Leu Pro Thr Leu Leu Leu Trp Pro Leu Gly Cys Ser Val Pro Val Thr

130	135	140
Met Trp Ala Ser Val Ser Tyr Phe Leu Tyr Pro Asp Thr Glu Tyr Thr		
145	150	155
Glu Ala Ala Val Thr Asn Val Leu Asn Asn His Tyr Asn Trp Ile Lys		
165	170	175
Lys Glu Asn Val Ser Tyr Ile Ala Tyr Val Tyr Tyr Gln Tyr Glu Asn		
180	185	190
Gly Val Arg His Ile Tyr Leu Lys Asn Leu Leu Gly Cys Phe Val His		
195	200	205
Tyr Phe Val Met Ser Met Thr Phe Val Val Met Phe Tyr Cys Gly Tyr		
210	215	220
Ala Thr Trp Lys Thr Met Asn Glu His Lys Asp Val Ser Asp Arg Thr		
225	230	235
Arg Ala Leu Gln Lys Gln Leu Phe Lys Ala Leu Val Leu Gln Thr Leu		
245	250	255
Ile Pro Thr Ile Phe Met Tyr Ala Pro Thr Gly Val Met Phe Ile Ala		
260	265	270
Pro Phe Phe Asp Val Asn Leu Asn Ala Asn Ala Asn Phe Ile Val Phe		
275	280	285
Cys Ser Phe Leu Tyr Pro Gly Leu Asp Pro Leu Ile Leu Ile Leu Ile		
290	295	300
Ile Arg Asp Phe Arg Arg Thr Ile Phe Asn Phe Leu Cys Gly Lys Lys		
305	310	315
Asn Ser Val Asp Glu Ser Arg Ser Thr Thr Arg Ala Asn Leu Ser Gln		
325	330	335
Val Pro Thr Met Thr Ser Lys Val Tyr Asp Pro Glu Gln Arg Lys Arg		
340	345	350
Met Ile Thr Gly Pro Gln Trp Trp Ala Arg Cys Lys Gln Met Asn Val		
355	360	365
Leu Asp Ser Phe Ile Asn Tyr Tyr Asp Ser Glu Lys His Ala Glu Asn		
370	375	380

Ala Val Ile Phe Leu His Gly Asn Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Trp Arg
 385 390 395 400
 His Val Val Pro His Ile Glu Pro Val Ala Arg Cys Ile Ile Pro Asp
 405 410 415
 Leu Ile Gly Met Gly Lys Ser Gly Lys Ser Gly Asn Gly Ser Tyr Arg
 420 425 430
 Leu Leu Asp His Tyr Lys Tyr Leu Thr Ala Trp Phe Glu Leu Leu Asn
 435 440 445
 Leu Pro Lys Lys Ile Ile Phe Val Gly His Asp Trp Gly Ala Cys Leu
 450 455 460
 Ala Phe His Tyr Ser Tyr Glu His Gln Asp Lys Ile Lys Ala Ile Val
 465 470 475 480
 His Ala Glu Ser Val Val Asp Val Ile Glu Ser Trp Asp Glu Trp Pro
 485 490 495
 Asp Ile Glu Glu Asp Ile Ala Leu Ile Lys Ser Glu Glu Gly Glu Lys
 500 505 510
 Met Val Leu Glu Asn Asn Phe Phe Val Glu Thr Met Leu Pro Ser Lys
 515 520 525
 Ile Met Arg Lys Leu Glu Pro Glu Glu Phe Ala Ala Tyr Leu Glu Pro
 530 535 540
 Phe Lys Glu Lys Gly Glu Val Arg Arg Pro Thr Leu Ser Trp Pro Arg
 545 550 555 560
 Glu Ile Pro Leu Val Lys Gly Gly Lys Pro Asp Val Val Gln Ile Val
 565 570 575
 Arg Asn Tyr Asn Ala Tyr Leu Arg Ala Ser Asp Asp Leu Pro Lys Met
 580 585 590
 Phe Ile Glu Ser Asp Pro Gly Phe Phe Ser Asn Ala Ile Val Glu Gly
 595 600 605
 Ala Lys Lys Phe Pro Asn Thr Glu Phe Val Lys Val Lys Gly Leu His
 610 615 620
 Phe Ser Gln Glu Asp Ala Pro Asp Glu Met Gly Lys Tyr Ile Lys Ser

625	630	635	640
Phe Val Glu Arg Val Leu Lys Asn Glu Gln			
645	650		
<210> 18			
<211> 1953			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> ORF encoding BRET construct of SEQ ID NO:17			
<400> 18			
atgtcgggag aattgtggat taccctagtt gacacagccg acattgtcg cgtcaccctc	60		
accttctgtc tcaacattgt tcttctcgga cttctgaaaa cacgtggaaa aaacttgggc	120		
acttataaat atctcatggc gttttctca gtattctga tttttacgc catcatcgag	180		
ttcatattac gacctataat gcatatttag aacaccactt tcttttgat ctcaaggaaa	240		
agattcaact actccaccaa acttggaaaa atcaactctg cgtttactg tgcttgttt	300		
gccaccagt ttgttgtctc aggagttcac ttgttttac gatatttgc aacttgcaaa	360		
ccgaatctac ttctttgtt caacttgcca actcttctac ttggccact tggttgcagt	420		
gtacccgtga caatgtggc tagtgtctca tatttttgt atccagatac cgagtacacg	480		
gaagcggctg tcaccaatgt actaaataac cactataact ggatcaaaaa ggagaatgta	540		
tcgtacattg catacgctca ttaccaatac gaaaacggag taaggcatat ctacctaaa	600		
aacttgcttg gatgtttgt tcattactt gtcgtcgat tgacgtttgt tgtgtatgttc	660		
tactgcggat atgccacgtg gaaaactatg aatgaacaca aggtgtatc tgatagaact	720		
cgagcgctac agaaacaact ttcaaaagct ttagttctc agacactcat cccaaactatc	780		
ttcatgtacg cccaaactgg agtcatgttc atgcaccgt ttttgacgt gaatttgaat	840		
gcaaacgcca attcattgt gtttgctca ttctgtacc cggactcgatccactcatt	900		
ctgatttga tcattcgtga ttccgaaga acaatattca atttctgtg tggaaagaaa	960		
aacagtgttg atgaatcccg ctgcacaaca agagccaatt tgtctcaagt tccgacgtat	1020		
accagcaagg tgtacgaccc cgagcagagg aagaggatga tcaccggccc ccagtgggtgg	1080		
gccaggtgca agcagatgaa cgtgctggac agcttcatca actactacga cagcgagaag	1140		
cacggcgaga acgcccgtat ctccctgcac ggcaacgccc ctagcagcta cctgtggagg	1200		
cacgtggtgc cccacatcgat gcccgtggcc aggtgcata tccccgatct gatggcatg	1260		
ggcaagagcg gcaagagcgg caacggcagc tacaggctgc tggaccacta caagtacctg	1320		
accgcctggat tcgagctctt gaaacctgccc aagaagatca tcttcgtggg ccacgactgg	1380		

ggccctgcc tggcattcca ctacagctac gagcaccagg acaagatcaa ggccatcg 1440

cacggcggaga gcgtggtgga cgtgatcgag agctgggacg agtggccaga catcgaggag 1500
 gacatcgccc tgcatacgag cgaggaggc gagaagatgg tgctggagaa caacttcttc 1560
 gtggagacca tgctgcccag caagatcatg agaaagctgg agcccgagga gttcgccg 1620
 tacctggagc cttcaagga gaagggcgag gtgagaagac ccaccctgag ctggcccaga 1680
 gagatcccc tggtaaggg cggcaagccc gacgtggtgc agatcgtgag aaactacaac 1740
 gcctaccta gagccagcga cgacctgccc aagatgttca tcgagagcga ccccggttc 1800
 tttagcaacg ccatcggtt gggcgccaag aagtccccca acaccgagtt cgtgaagg 1860

aaggcctgc acttcagcca ggaggacgcc cccgacgaga tggcaagta catcaagac 1920
 ttctggaga gagtgctgaa gaacgagcag taa 1953

<210> 19

<211> 578

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> BRET construct

<400> 19

Met Ser Gly Glu Leu Trp Ile Thr Leu Val Asp Thr Ala Asp Ile Val

1	5	10	15
---	---	----	----

Gly Val Thr Leu Thr Phe Cys Val Asn Ile Val Leu Leu Gly Leu Leu

20	25	30
----	----	----

Lys Thr Arg Gly Lys Asn Leu Gly Thr Tyr Lys Tyr Leu Met Ala Phe

35	40	45
----	----	----

Phe Ser Val Phe Ser Ile Phe Tyr Ala Ile Ile Glu Phe Ile Leu Arg

50	55	60
----	----	----

Pro Ile Met His Ile Glu Asn Thr Thr Phe Phe Leu Ile Ser Arg Lys

65	70	75	80
----	----	----	----

Arg Phe Asn Tyr Ser Thr Lys Leu Gly Ile Asn Ser Ala Phe Tyr

85	90	95
----	----	----

Cys Ala Cys Phe Ala Thr Ser Phe Val Val Ser Gly Val His Phe Val

100	105	110
-----	-----	-----

Tyr Arg Tyr Phe Ala Thr Cys Lys Pro Asn Leu Leu Arg Leu Phe Asn

115 120 125

Leu Pro Thr Leu Leu Leu Trp Pro Leu Gly Cys Ser Val Pro Val Thr

130 135 140

Met Trp Ala Ser Val Ser Tyr Phe Leu Tyr Pro Asp Thr Glu Tyr Thr

145 150 155 160

Glu Ala Ala Val Thr Asn Val Leu Asn Asn His Tyr Asn Trp Ile Lys

165 170 175

Lys Glu Asn Val Ser Tyr Ile Ala Tyr Val Tyr Tyr Gln Tyr Glu Asn

180 185 190

Gly Val Arg His Ile Tyr Leu Lys Asn Leu Leu Gly Cys Phe Val His

195 200 205

Tyr Phe Val Met Ser Met Thr Phe Val Val Met Phe Tyr Cys Gly Tyr

210 215 220

Ala Thr Trp Lys Thr Met Asn Glu His Lys Asp Val Ser Asp Arg Thr

225 230 235 240

Arg Ala Leu Gln Lys Gln Leu Phe Lys Ala Leu Val Leu Gln Thr Leu

245 250 255

Ile Pro Thr Ile Phe Met Tyr Ala Pro Thr Gly Val Met Phe Ile Ala

260 265 270

Pro Phe Phe Asp Val Asn Leu Asn Ala Asn Phe Ile Val Phe

275 280 285

Cys Ser Phe Leu Tyr Pro Gly Leu Asp Pro Leu Ile Leu Ile Leu Ile

290 295 300

Ile Arg Asp Phe Arg Arg Thr Ile Phe Asn Phe Leu Cys Gly Lys Lys

305 310 315 320

Asn Ser Val Asp Glu Ser Arg Ser Thr Thr Arg Ala Asn Leu Ser Gln

325 330 335

Val Pro Thr Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val

340 345 350

Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser

355 360 365

Val Ser Gly Glu Gly Glu Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu
 370 375 380

Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu
 385 390 395 400

Val Thr Thr Leu Ser Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp
 405 410 415

His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr
 420 425 430

Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr
 435 440 445

Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu
 450 455 460

Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys
 465 470 475 480

Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys
 485 490 495

Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu
 500 505 510

Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile
 515 520 525

Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln
 530 535 540

Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu
 545 550 555 560

Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu
 565 570 575

Tyr Lys

<210> 20

<211> 1737

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ORF encoding BRET construct of SEQ ID NO:19

<400> 20

atgtcggag aattgtggat taccctagtt gacacagcg	60
acacctctgt tcaacattgt tcttctcgaa cttctgaaaa	120

acttataat atctcatggc gttttctca gtattctga tttttacgc	180
ttcatattac gacctataat gcatatttag aacaccactt tcttttgat	240
agattcaact actccaccaa acttggaaaa atcaactctg cgtttactg	300
gccaccagtt ttgttgtctc aggagttcac ttgttatac gatatttgc	360
ccgaatctac ttctttgtt caacttgcca actcttctac ttggccact	420
gtacccgtga caatgtggc tagtgtctca tatttttgt atccagatac	480
gaagcggctg tcaccaatgt actaaataac cactataact ggatcaaaaa	540

tcgtacattg catacgctta ttaccaatac gaaaacggag taaggcatat	600
aatctgcttgcatgtttgt tcattacttt gtcatgtcgatgatgttc	660
tactgcggat atgccacgtg gaaaactatg aatgaacaca aggtatgtatc	720
cgagcgtac agaaacaact ttcaaaagct ttagttctc agacactcat	780
ttcatgtacg ccccaactgg agtcatgttc atgcacccgt ttttgacgt	840
gcaaacgcca attcattgt gtttgctca ttctgtacc cgggactcgatccactcatt	900
ctgattttga tcattcgtga ttccgaaga acaatattca attctgttg	960

aacagtgttg atgaatcccg ctgcacaaca agagccaatt tgtctcaagt	1020
gtgagcaagg gcgaggagct gttcacccgggtgggtccccatgcgtggacggc	1080
gacgtaaacgcgcacaagtt cagcgtgtcc ggcgaggcgaggcgatgc	1140
aagctgaccc tgaagttcat ctgcaccaccggcaagctgc ccgtccctgc	1200
gtgaccaccc tgactacgg cgtcgtgc ttccgcgtt accccgacca	1260
cacgacttctcaactccgc catggccgaa ggctacgtcc agggcgac	1320
aaggacgacg gcaactacaa gaccgcgcgagggtgaagt tcgagggcga	1380

aaccgcacatcg agctgaaggg catcgacttc aaggaggacg gcaacatctt	1440
ctggaggataca actacaacag ccacaacgtc tatatcatgg ccgacaagca	1500
atcaagggtga acttcaagat ccggcacaac atcgaggacg gcagcgtgc	1560
cactaccaggc agaacaccccc catggcgac ggcccccgtgc tgctgcccga	1620
ctgagcaccc agtccgcct gagcaaagac cccaaacgaga agcgcgtca	1680
ctggagttcg tgaccgcgcg cggatcaacttcgcatgg acgagctgtca	1737

<210> 21
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide primer

<400> 21
agtctagaat gtcgggagaa ttgtggatta 30

<210> 22
<211> 49
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide primer

<400> 22
ggggacaagt ttgtacaaaa aaggcaggctt catcacgtcg gaacttgag 49

<210> 23
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide primer

<400> 23
aaccatgtcg ggagaattgt g 21

<210>
> 24
<211> 29
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide primer

<400> 24
tgttagcgctc gcttgtacag ctgtccat 29

<210> 25
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide primer

<400> 25	
gagctgtaca agcgagcgct acagaaacaa	30
<210> 26	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide primer	
<400> 26	
cttgctggtc atcgtcgaa cttgagaca	29
<210> 27	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide primer	
<400> 27	
caaggccgatcgaccagg caaggtgtta	29
<210> 28	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide primer	
<400> 28	
gttactgctc gtttttca	18
<210> 29	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide primer	
<400> 29	
gagctgtaca agcgagcgct acagaaacaa	30
<210> 30	
<211> 18	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide primer	
<400> 30	
gttacigctc gttttca	18
<210> 31	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide primer	
<400> 31	
aaccatgtcg ggagaattgt g	21
<210> 32	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide primer	
<400> 32	
gttactgctc gttttca	18
<210> 33	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide primer	
<400> 33	
aaccatgtcg ggagaattgt g	21
<210> 34	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide primer	
<400> 34	
ctgttagcgct cgctgctcgt tcttcag	27
<210> 35	
<211> 29	

<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide primer	
<400> 35	
aagaacgagc agcgagcgct acagaaaca	29
<210> 36	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide primer	
<400> 36	
c ttgctacc atcgctggaa cttgagaca	29
<210> 37	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide primer	
<400> 37	
caagg tccga cgatggtgag caagggcga	29
<210> 38	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide primer	
<400> 38	
gttacttgta cagtcgtc	19
<210> 39	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide primer	
<400> 39	
aagaacgagc agcgagcgct acagaaaca	29

<210> 40	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide primer	
<400> 40	
gttacttgta cagctcgta	19
<210> 41	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide primer	
<400> 41	
aaccatgtcg ggagaattgt g	21
<210> 42	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide primer	
<400> 42	
gttacttgta cagctcgta	19
<210> 43	
<211> 53	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide primer	
<400> 43	
caccagttt gttgtctcag gagtttattt tgtttatcga tattttgcaa ctt	53
<210> 44	
<211> 53	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide primer	
<400> 44	

aagtgc当地 atatcgataa acaaaataaa ctcctgagac aacaaaactg gtg 53

<210> 45

<211> 238

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> mCitrine derivative

<400> 45

Met Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val

1 5 10 15

Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu

20 25 30

Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys

35 40 45

Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu

50 55 60

Gly Tyr Gly Leu Met Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln

65 70 75 80

His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg

85 90 95

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

100 105 110

Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile

115 120 125

Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn

130 135 140

Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly

145 150 155 160

Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val

165 170 175

Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro

180 185 190

Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Arg Leu Ser
 195 200 205

Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val
 210 215 220

Thr Ala Ala Gly Ile Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
 225 230 235

<210> 46

<211> 238

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> mCFP derivative

<400> 46

Met Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val
 1 5 10 15

Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu
 20 25 30

Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys
 35 40 45

Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu
 50 55 60

Thr Trp Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln
 65 70 75 80

His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg
 85 90 95

Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val
 100 105 110

Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile
 115 120 125

Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Ile
 130 135 140

Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly
 145 150 155 160

Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val
 165 170 175
 Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro
 180 185 190
 Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Arg Leu Ser
 195 200 205
 Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val
 210 215 220
 Thr Ala Ala Gly Ile Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
 225 230 235
 <210> 47
 <211> 717
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Codon optimized ORF encoding SEQ ID NO:45
 <400> 47

atgtctaaag gtgaagaatt attcactgg tttgtccaa tttgggtga attagatggt	60
gatgttaatg gtaccaaatt ttctgtctcc ggtgaagggtg aagggtatgc tacttacggt	120
aaattgacct taaaatttat ttgtactact ggtaaattgc cagttccatg gccaacctta	180
gtcaactactt taggttatgg tttgatgtgt tttgctagat acccagatca tatgaaacaa	240
catgactttt tcaagtctgc catgccagaa ggttatgttc aagaaagaac tattttttc	300
aaagatgacg gtaactacaa gaccagagct gaagtcaagt ttgaagggtga taccttagtt	360
aatagaatcg aattaaaagg tattgattt aaagaagatg gtaacattt aggtcacaaa	420
ttggaataca actataactc tcacaatgtt tacatcatgg ctgacaaaca aaagaatggt	480
atcaaagtta acttcaaaat tagacacaac attgaagatg gttctgttca attagctgac	540
cattatcaac aaaatactcc aattggtgat ggtccagttc ttttaccaga caaccattac	600
ttatcctatc aatctagatt atccaaagat ccaaacgaaa agagagacca catggcttg	660
ttagaatttg ttactgctgc tggttattacc catggatgg atgaattgtt caaataa	717
<210> 48	
<211> 717	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Codon optimized ORF encoding SEQ ID NO:46

<400>

48

atgtctaaag gtgaagaatt attcaactggt gttgtccaa tttgggtga attagatggt	60
gatgttaatg gtcacaaatt ttctgtctcc ggtgaagggtg aaggtgatgc tacttacggt	120
aaattgacct taaaatttat ttgtactact ggtaaaattgc cagttccatg gccaaccta	180
gtcactactt taacttgggg tggtaatgt ttttctagat acccagatca tatgaaacaa	240
catgactttt tcaagtctgc catgccagaa ggttatgttc aagaaagaac tattttttc	300
aaagatgacg gtaactacaa gaccagagct gaagtcaagt ttgaagggtga taccttagtt	360
aatagaatcg aattaaaagg tattgattt aaagaagatg gtaacatttt aggtcacaaa	420

ttgaaataca ttataactc tcacaatgt tacatcactg ctgacaaaca aaagaatggt	480
atcaaagcta acttcaaaat tagacacaac attgaagatg gttctgttca attagctgac	540
cattatcaac aaaatactcc aattgggtat ggtccagttt tgtaaccaga caaccattac	600
ttatccactc aatctagatt atccaaagat ccaaacgaaa agagagacca catggcttg	660
tttagaatttg ttactgctgc tggtaattacc catggatgg atgaattgtt caaataa	717

<210> 49

<211> 2448

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ORF encoding FRET construct

<400> 49

atgtcgggag aattgtggat taccctagtt gacacagcgg acattgtcgg cgtcaccctc	60
accttctgtg tcaacattgt tttctcgga cttctgaaaa cacgtggaaa aaacttgggc	120
acttataat atctcatggc gttttctca gtattctga tttttacgc catcatcgag	180
ttcatattac gacctataat gcatatttag aacaccactt tctttttagt ctcaaggaaa	240
agattcaact actccaccaa acttggaaaa atcaactctg cgtttactg tgctgtttt	300
gccaccagtt ttgttgtctc aggagttcac ttgtttatc gatattttgc aacttgc当地	360
ccgaatctac ttctttgtt caacttgcca actcttctac ttggccact tggtgc当地	420
gtacccgtga caatgtggc tagtgtctca tatttttgc atccagatac cgagtagacg	480

gaagcggctg tcaccaatgt actaaataac cactataact ggatcaaaaa ggagaatgt	540
tctgtacattt catacgatctt taccataac gaaaacggag taaggcatat ctaccaaa	600
aacttgc当地 gatgtttgtt tcattacttt gtcattgtcgat tgacgtttgtt tgtgtatgtt	660

<211> 815

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FRETConstruct

<400> 50

Met Ser Gly Glu Leu Trp Ile Thr Leu Val Asp Thr Ala Asp Ile Val

1 5 10 15

Gly Val Thr Leu Thr Phe Cys Val Asn Ile Val Leu Leu Gly Leu Leu

20 25 30

Lys Thr Arg Gly Lys Asn Leu Gly Thr Tyr Lys Tyr Leu Met Ala Phe

35 40 45

Phe Ser Val Phe Ser Ile Phe Tyr Ala Ile Ile Glu Phe Ile Leu Arg

50 55 60

Pro Ile Met His Ile Glu Asn Thr Thr Phe Phe Leu Ile Ser Arg Lys

65 70 75 80

Arg Phe Asn Tyr Ser Thr Lys Leu Gly Lys Ile Asn Ser Ala Phe Tyr

85 90 95

Cys Ala Cys Phe Ala Thr Ser Phe Val Val Ser Gly Val His Phe Val

100 105 110

Tyr Arg Tyr Phe Ala Thr Cys Lys Pro Asn Leu Leu Arg Leu Phe Asn

115 120 125

Leu Pro Thr Leu Leu Trp Pro Leu Gly Cys Ser Val Pro Val Thr

130 135 140

Met Trp Ala Ser Val Ser Tyr Phe Leu Tyr Pro Asp Thr Glu Tyr Thr

145 150 155 160

Glu Ala Ala Val Thr Asn Val Leu Asn Asn His Tyr Asn Trp Ile Lys

165 170 175

Lys Glu Asn Val Ser Tyr Ile Ala Tyr Val Tyr Tyr Gln Tyr Glu Asn

180 185 190

Gly Val Arg His Ile Tyr Leu Lys Asn Leu Leu Gly Cys Phe Val His

195 200 205

Tyr Phe Val Met Ser Met Thr Phe Val Val Met Phe Tyr Cys Gly Tyr
 210 215 220
 Ala Thr Trp Lys Thr Met Asn Glu His Lys Asp Val Ser Asp Arg Thr
 225 230 235 240
 Met Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val
 245 250 255
 Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu
 260 265 270
 Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys
 275 280 285
 Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu
 290 295 300
 Thr Trp Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln
 305 310 315 320
 His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg
 325 330 335
 Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val
 340 345 350
 Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile
 355 360 365
 Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Ile
 370 375 380
 Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly
 385 390 395 400
 Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val
 405 410 415
 Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro
 420 425 430
 Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Arg Leu Ser
 435 440 445
 Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val

450	455	460
Thr Ala Ala Gly Ile Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Arg Ala		
465	470	475
Leu Gln Lys Gln Leu Phe Lys Ala Leu Val Leu Gln Thr Leu Ile Pro		
485	490	495
Thr Ile Phe Met Tyr Ala Pro Thr Gly Val Met Phe Ile Ala Pro Phe		
500	505	510
Phe Asp Val Asn Leu Asn Ala Asn Phe Ile Val Phe Cys Ser		
515	520	525
Phe Leu Tyr Pro Gly Leu Asp Pro Leu Ile Leu Ile Leu Ile Ile Arg		
530	535	540
Asp Phe Arg Arg Thr Ile Phe Asn Phe Leu Cys Gly Lys Lys Asn Ser		
545	550	555
Val Asp Glu Ser Arg Ser Thr Thr Arg Ala Asn Leu Ser Gln Val Pro		
565	570	575
Thr Met Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu		
580	585	590
Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly		
595	600	605
Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile		
610	615	620
Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr		
625	630	635
Leu Gly Tyr Gly Leu Met Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys		
645	650	655
Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu		
660	665	670
Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu		
675	680	685
Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly		
690	695	700

Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr

705 710 715 720

Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn

725 730 735

Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser

740 745 750

Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly

755 760 765

Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Arg Leu

770 775 780

Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe

785 790 795 800

Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys

805 810 815

<210> 51

<211> 2694

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ORF encoding BRET construct

<400> 51

atgggttctg gtcaattatg gttggctta gttgatgctg cagatatggc tggtttact	60
---	----

ttgacaatct caattaatat cattttgtta ggtttgatata gaactagagg taaaaccccttg	120
--	-----

ggtaacctaca agtacttgat gtctttcttt tcctttcttt ctatttctta tgcaatcggtt	180
---	-----

gaatctatct tgagaccaat catgcataatc gaaaacacta cattttctt aatctccaga	240
---	-----

aagagattcg attacagtac tagattgggt aaaattaatt cagcttctta ctgtgcttgt	300
---	-----

ttcgcaacat cttcggtttt gagtgcagtt catttcgttt acagatactt cgctgcttgt	360
---	-----

aaggcttaatt tggtagatt gtttaactta cctcatttgtt tattgtggcc attgatgtgt	420
--	-----

tcaattccctg ttactgcttg ggcattctgtt tcatactttt tgtacccaga tacagaatat	480
---	-----

accgaagctg cagttaccta tggtttgaag actcattacg aagtttattaa aaaggaaaaac	540
---	-----

gtttcttaca ttgtttacgt ttactaccaa tacgaaaacg gtgaaagaca tatctatatt	600
---	-----

aaaaacttat tgggttggttt cgttcattac ttgcgttatgt ctatgacatt cggttggttt	660
---	-----

atcgaatctg atcctggttt cttttctaat gctattgttg aaggtgctaa gaaattccct 2580

aacacagaat tcgttaaggt taagggttg catttcttc aagaagatgc tccagatgaa 2640

atggtaaat acatcaagtc atttgttcaa agagtttga aaaatgaaca ataa 2694

<210> 52

<211> 897

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> BRET Construct

<400> 52

Met Gly Ser Gly Gln Leu Trp Leu Ala Leu Val Asp Ala Ala Asp Met

1	5	10	15
---	---	----	----

Val Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ile Asn Ile Ile Leu Leu Gly Leu

20	25	30
----	----	----

Ile Arg Thr Arg Gly Lys Thr Leu Gly Thr Tyr Lys Tyr Leu Met Ser

35	40	45
----	----	----

Phe Phe Ser Phe Phe Ser Ile Phe Tyr Ala Ile Val Glu Ser Ile Leu

50	55	60
----	----	----

Arg Pro Ile Met His Ile Glu Asn Thr Thr Phe Phe Leu Ile Ser Arg

65	70	75	80
----	----	----	----

Lys Arg Phe Asp Tyr Ser Thr Arg Leu Gly Lys Ile Asn Ser Ala Phe

85	90	95
----	----	----

Tyr Cys Ala Cys Phe Ala Thr Ser Phe Val Leu Ser Ala Val His Phe

100	105	110
-----	-----	-----

Val Tyr Arg Tyr Phe Ala Ala Cys Lys Pro Asn Leu Leu Arg Leu Phe

115	120	125
-----	-----	-----

Asn Leu Pro His Leu Leu Trp Pro Leu Met Cys Ser Ile Pro Val

130	135	140
-----	-----	-----

Thr Ala Trp Ala Ser Val Ser Tyr Phe Leu Tyr Pro Asp Thr Glu Tyr

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Thr Glu Ala Ala Val Thr Tyr Val Leu Lys Thr His Tyr Glu Val Ile

165	170	175
-----	-----	-----

Lys Lys Glu Asn Val Ser Tyr Ile Ala Tyr Val Tyr Tyr Gln Tyr Glu
 180 185 190
 Asn Gly Glu Arg His Ile Tyr Ile Lys Asn Leu Leu Gly Cys Phe Val
 195 200 205
 His Tyr Phe Val Met Ser Met Thr Phe Val Val Val Phe Tyr Cys Gly
 210 215 220

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

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

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

Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp

420	425	430
Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala		
435	440	445
Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu		
450	455	460
Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys		
465	470	475
Arg His Leu His Arg Gln Leu Phe Lys Ala Leu Val Phe Gln Thr Leu		
485	490	495
Val Pro Ser Ile Phe Met Tyr Ile Pro Thr Gly Val Met Phe Ile Ala		
500	505	510
Pro Phe Phe Asp Ile Asn Leu Asn Ala Asn Ala Asn Phe Ile Val Phe		
515	520	525
Cys Ser Phe Leu Tyr Pro Gly Leu Asp Pro Leu Ile Leu Ile Phe Ile		
530	535	540
Ile Arg Glu Phe Arg Val Thr Ile Leu Asn Ile Ile Arg Gly Asn Glu		
545	550	555
Arg Gly Asn Ala Val Gly Glu Ala Tyr Ser Thr Ser Arg Ile Lys Ser		
565	570	575
Ser Gln Pro Ala Ala Val Asn Leu Ser Gly Met Thr Ser Lys Val Tyr		
580	585	590
Asp Pro Glu Gln Arg Lys Arg Met Ile Thr Gly Pro Gln Trp Trp Ala		
595	600	605
Arg Cys Lys Gln Met Asn Val Leu Asp Ser Phe Ile Asn Tyr Tyr Asp		
610	615	620
Ser Glu Lys His Ala Glu Asn Ala Val Ile Phe Leu His Gly Asn Ala		
625	630	635
Ala Ser Ser Tyr Leu Trp Arg His Val Val Pro His Ile Glu Pro Val		
645	650	655
Ala Arg Cys Ile Ile Pro Asp Leu Ile Gly Met Gly Lys Ser Gly Lys		
660	665	670

Ser Gly Asn Gly Ser Tyr Arg Leu Leu Asp His Tyr Lys Tyr Leu Thr
 675 680 685
 Ala Trp Phe Glu Leu Leu Asn Leu Pro Lys Lys Ile Ile Phe Val Gly
 690 695 700
 His Asp Trp Gly Ala Cys Leu Ala Phe His Tyr Ser Tyr Glu His Gln
 705 710 715 720
 Asp Lys Ile Lys Ala Ile Val His Ala Glu Ser Val Val Asp Val Ile
 725 730 735

 Glu Ser Trp Asp Glu Trp Pro Asp Ile Glu Glu Asp Ile Ala Leu Ile
 740 745 750
 Lys Ser Glu Glu Gly Glu Lys Met Val Leu Glu Asn Asn Phe Phe Val
 755 760 765
 Glu Thr Met Leu Pro Ser Lys Ile Met Arg Lys Leu Glu Pro Glu Glu
 770 775 780
 Phe Ala Ala Tyr Leu Glu Pro Phe Lys Glu Lys Gly Glu Val Arg Arg
 785 790 795 800

 Pro Thr Leu Ser Trp Pro Arg Glu Ile Pro Leu Val Lys Gly Gly Lys
 805 810 815
 Pro Asp Val Val Gln Ile Val Arg Asn Tyr Asn Ala Tyr Leu Arg Ala
 820 825 830
 Ser Asp Asp Leu Pro Lys Met Phe Ile Glu Ser Asp Pro Gly Phe Phe
 835 840 845
 Ser Asn Ala Ile Val Glu Gly Ala Lys Lys Phe Pro Asn Thr Glu Phe
 850 855 860

 Val Lys Val Lys Gly Leu His Phe Ser Gln Glu Asp Ala Pro Asp Glu
 865 870 875 880
 Met Gly Lys Tyr Ile Lys Ser Phe Val Glu Arg Val Leu Lys Asn Glu
 885 890 895
 Gln

<210> 53

<211> 2673

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ORF encoding 2A adrenergic receptor-BRET construct

<400> 53

atgggttac	cttacatgt	tccagattat	gctcaatgg	gttccttaca	accagatgt	60
ggtaattttt	catggAACGG	tacagaagct	ccagggttgt	gtaccagagc	aactccatac	120
tcattgc	aaatgttgc	tttagttgt	ttggcttgtt	tgttgatgtt	gtttactgtt	180
ttcgtaac	gttttgttat	tatcgacgtt	tttacatcta	gagcttggaa	ggcaccacaa	240
aattgttct	tagttgttt	ggcttcigca	gatacttgg	ttgctacatt	agttattcct	300
ttttcttgg	caaacgaagt	tatgggttat	ttgtacttcg	gtaaagttt	gtgtgaaata	360
tatttggctt	tggatgtttt	gttttgtact	tccagtatcg	ttcatttgtt	tgctatctct	420
ttggatagat	actggtaat	cacacaagca	atcgaataca	atttgaagag	aacccaaga	480
agaattaaag	ctatcatcgt	tactgtttgg	gttattccg	cagttattag	ttttccacct	540
ttgatttcca	ttgaaaagaa	aggtgcttgtt	ggtgtcaac	aacctgcaga	accaagtgt	600
aagattaatg	atcaaaaagt	gtatgttatt	tcttcatcca	ttgggttctt	ctttgctcca	660
tgttgatca	tgtatgttgtt	ttacgttaga	atctatcaa	tcgctaagag	aagaactaga	720
gttccacctt	ctagaagagg	tccagatgca	atggttcaa	aaggtaaga	attgtttact	780
ggtgttgttc	ctattttgtt	tgaatttagat	ggtgacgta	atggtcataa	gtttagtgtt	840
tctggtaag	gtgaagggt	cgctacatac	ggtaaattga	cttgaagtt	tatttgtact	900
actggtaat	tgccgatccc	ttggccaaacc	ttggttacca	cttaactta	tggtgttcaa	960
tgttttcca	gataccaga	tcatatgaag	caacatgatt	tcttaagag	tgctatgcct	1020
gaagggttac	ttcaagaaag	aactatttc	tttaaggatg	atggtaacta	caagacaaga	1080
gcagaggta	agtttgaagg	tgacacccgt	gttaacagaa	tcgaattgaa	gggtatcgat	1140
ttcaaggaag	atggtaacat	cttgggtcat	aagttgaaat	acaattacaa	ctccataaac	1200
gtttacatca	tggctgataa	gcaaaagaat	ggtttaaaag	ttaactcaa	gatcagacat	1260
aacatcgaag	atggttcagt	tcaattggca	gatcattacc	aacaaaacac	accaattgg	1320
gacggtcctg	ttttgttacc	agataaccat	tacttgtcaa	cccaatccgc	tttaagtaaa	1380
gatcctaac	aaaagagaga	tcatatggtt	ttgttggaaat	tcgttactgc	tgccaggatc	1440
acattggta	tggatgaatt	gtacaagaga	tggagggta	gacaaaacag	agaaaaagaga	1500
ttcacttcg	ttttggctgt	tgttatttgtt	gtttcgttg	tttgggtt	cccattttc	1560
tttacttaca	cattgatcgc	agttgggtgt	cctgtccat	ctcaattgtt	caacttcttt	1620

ttctggttcg gttactgtaa cagttcttg aacccagtta tatatactat tttcaatcat	1680
gattcagaa gagctttaa aaagatttg tgttaggtg acagaagag aatcgttatg	1740
acctctaagg ttacgatcc agaacaaga aagagaatga ttactggtcc tcaatggtgg	1800

gcacgttgta agcaaatgaa cgaaaaatggat tcttttatta actactacga ttcagaaaag	1860
catgctgaaa acgcgatcat tttcttgcattt ggtaacgcgtc catcatccta tttgtggaga	1920
catgttgttc ctcatattga accagttgtt agatgtatca tcccgatattt gatcggtatg	1980
gttaaatctg gttaaatctgg taacggttct tacagattgt tggatcatta caagtacttg	2040
acagcatggt tcgaattgtt gaatttgc aagaaaat tttcggttgc tcatgattgg	2100
gtgtcttgtt tggcattcca ttactcatac gaacatcaag ataaaattaa ggctatcggtt	2160
catgcagaat ccgttgttga tggttattgaa agttggatg aatggccaga tatcgaagaa	2220

gatatcgctt taattaagtc tgaagaaggt gaaaagatgg tttggaaaa caacttttc	2280
gttggaaacca tttgccttc aaagatcatg agaaagttgg aaccagaaga attcgctca	2340
tatttggAAC ctttaaaga aaagggtgaa gtttagagac caactttgtc atggcctaga	2400
gaaattccat tagttaaagg tggtaaacct gatgttgttc aaatcggttag aaactacaac	2460
gtttacttga gagcatctga tgatttgcct aagatgttca tcgaatccga tccaggttcc	2520
ttttctaatg ctattgttga aggtgctaaag aaattccaa acactgaatt cgtaagggtt	2580
aagggttgc atttctctca agaagatgtt cctgtatgaaa tggtaaata catcaagtca	2640

ttcggttggaaa gagtttggaa aatgaacaa taa	2673
---------------------------------------	------

<210> 54

<211> 890

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2A adrenergic receptor-BRET construct

<400> 54

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

1	5	10	15
---	---	----	----

Gln Pro Asp Ala Gly Asn Ser Ser Trp Asn Gly Thr Glu Ala Pro Gly

20	25	30
----	----	----

Gly Gly Thr Arg Ala Thr Pro Tyr Ser Leu Gln Val Thr Leu Thr Leu

35	40	45
----	----	----

Val Cys Leu Ala Gly Leu Leu Met Leu Phe Thr Val Phe Gly Asn Val

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

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

545	550	555	560
Asp Phe Arg Arg Ala Phe Lys Lys Ile Leu Cys Arg Gly Asp Arg Lys			
565	570	575	
Arg Ile Val Met Thr Ser Lys Val Tyr Asp Pro Glu Gln Arg Lys Arg			
580	585	590	
Met Ile Thr Gly Pro Gln Trp Trp Ala Arg Cys Lys Gln Met Asn Val			
595	600	605	
Leu Asp Ser Phe Ile Asn Tyr Tyr Asp Ser Glu Lys His Ala Glu Asn			
610	615	620	
Ala Val Ile Phe Leu His Gly Asn Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Trp Arg			
625	630	635	640
His Val Val Pro His Ile Glu Pro Val Ala Arg Cys Ile Ile Pro Asp			
645	650	655	
Leu Ile Gly Met Gly Lys Ser Gly Lys Ser Gly Asn Gly Ser Tyr Arg			
660	665	670	
Leu Leu Asp His Tyr Lys Tyr Leu Thr Ala Trp Phe Glu Leu Leu Asn			
675	680	685	
Leu Pro Lys Lys Ile Ile Phe Val Gly His Asp Trp Gly Ala Cys Leu			
690	695	700	
Ala Phe His Tyr Ser Tyr Glu His Gln Asp Lys Ile Lys Ala Ile Val			
705	710	715	720
His Ala Glu Ser Val Val Asp Val Ile Glu Ser Trp Asp Glu Trp Pro			
725	730	735	
Asp Ile Glu Glu Asp Ile Ala Leu Ile Lys Ser Glu Glu Gly Glu Lys			
740	745	750	
Met Val Leu Glu Asn Asn Phe Phe Val Glu Thr Met Leu Pro Ser Lys			
755	760	765	
Ile Met Arg Lys Leu Glu Pro Glu Glu Phe Ala Ala Tyr Leu Glu Pro			
770	775	780	
Phe Lys Glu Lys Gly Glu Val Arg Arg Pro Thr Leu Ser Trp Pro Arg			
785	790	795	800

Glu Ile Pro Leu Val Lys Gly Gly Lys Pro Asp Val Val Gln Ile Val

805 810 815

Arg Asn Tyr Asn Ala Tyr Leu Arg Ala Ser Asp Asp Leu Pro Lys Met

820 825 830

Phe Ile Glu Ser Asp Pro Gly Phe Phe Ser Asn Ala Ile Val Glu Gly

835 840 845

Ala Lys Lys Phe Pro Asn Thr Glu Phe Val Lys Val Lys Gly Leu His

850 855 860

Phe Ser Gln Glu Asp Ala Pro Asp Glu Met Gly Lys Tyr Ile Lys Ser

865 870 875 880

Phe Val Glu Arg Val Leu Lys Asn Glu Gln

885 890

<210> 55

<211> 1389

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 55

atgggctacc catacgacgt cccagactac gccagcatgg gctcaactgca	60
ggcaacagca gctggAACGG gaccgaagecg cccggaggcg gcacccgagc	120
tccctgcagg tgacactgac gctggTTTgc ctggctggcc tgctcatgct	180
tttggcaacg tgctggTTtat tatcgCGGTG ttcaccagtc gcgcgctcaa	240

aacctttcc tgggtgtccct ggcctcagcg gacatcctgg tggccacgct	300
ttttctttgg ccaacgaggt tatgggttac tggtaCTTtg gtaagggtgtg	360
tattggctc tcgacgtgct ctTTTgcacg tcgtccatag tgcacctgtg	420
cTTgaccgct actggTccat cacgcaggcc atcgagtaca acctgaagcg	480
cgcataagg ccatcattgt caccgtgtgg gtcataCTCgg ctgtcatctc	540
ctcatctcca tagagaagaa gggcgctggc ggcccggcagc agccggccga	600
aagatcaacg accagaagtg gtatgtcatc tcctcgTCCA tcggTTccTt	660

tgcctcatca tgatcctggc tTACGTGCGT atttaccaga tcggcaagcg	720
tgcctccag ccggccgggt ccggacgcT cgTTCCGCGc cgccgggggg	780
aggcccaacg ggctgggccc ggagcgCGGC gCGGGTCCCA cggcgctga	840

ctgcccaccc agcttaacgg tgccccgggg gagccgcgc ccgccgggcc ccgcgtggg	900
gatgcgctgg accttagagga gagttcgctg tccgagcacg ccgagcggcc cccggggccc	960
cgcagacccg accgcggccc ccgagccaag ggcaagaccc gggcgagtca ggtgaagccg	1020
ggggacagtc tgcccgccg cggcccccggg gccgcgggc cggggcttc ggggtccgg	1080

cacggagagg agcgcggcgg gggcgccaaa gcgtcgctt ggcgcggag gcaaaaccgg	1140
gagaaaacgct tcacggtcggt gctggcggtg gtgtcggtg tgggtggttt	1200
ccgttctttt tcacctacac gtcatacg gtcggctgcc cggtgcccag ccagctttc	1260
aacttcttct tctgggtcggt ctactgcaac agctcgctga accctgttat ctacaccatc	1320
ttcaaccacg acttccgacg cgcctcaag aagatcctct gccgtggga cagaaaaacgc	1380
atcggtgtga	1389

<210> 56

<211> 462

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 56

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

1 5 10 15

Gln Pro Asp Ala Gly Asn Ser Ser Trp Asn Gly Thr Glu Ala Pro Gly

20 25 30

Gly Gly Thr Arg Ala Thr Pro Tyr Ser Leu Gln Val Thr Leu Thr Leu

35 40 45

Val Cys Leu Ala Gly Leu Leu Met Leu Phe Thr Val Phe Gly Asn Val

50 55 60

Leu Val Ile Ile Ala Val Phe Thr Ser Arg Ala Leu Lys Ala Pro Gln

65 70 75 80

Asn Leu Phe Leu Val Ser Leu Ala Ser Ala Asp Ile Leu Val Ala Thr

85 90 95

Leu Val Ile Pro Phe Ser Leu Ala Asn Glu Val Met Gly Tyr Trp Tyr

100 105 110

Phe Gly Lys Val Trp Cys Glu Ile Tyr Leu Ala Leu Asp Val Leu Phe

115 120 125

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

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

 Gly Ala Asp Arg Arg Pro Asn Gly Leu Gly Pro Glu Arg Gly Ala Gly
 260 265 270
 Pro Thr Gly Ala Glu Ala Glu Pro Leu Pro Thr Gln Leu Asn Gly Ala
 275 280 285
 Pro Gly Glu Pro Ala Pro Ala Gly Pro Arg Asp Gly Asp Ala Leu Asp
 290 295 300
 Leu Glu Glu Ser Ser Ser Glu His Ala Glu Arg Pro Pro Gly Pro
 305 310 315 320

 Arg Arg Pro Asp Arg Gly Pro Arg Ala Lys Gly Lys Thr Arg Ala Ser
 325 330 335
 Gln Val Lys Pro Gly Asp Ser Leu Pro Arg Arg Gly Pro Gly Ala Ala
 340 345 350
 Gly Pro Gly Ala Ser Gly Ser Gly His Gly Glu Glu Arg Gly Gly
 355 360 365
 Ala Lys Ala Ser Arg Trp Arg Gly Arg Gln Asn Arg Glu Lys Arg Phe

370 375 380
Thr Phe Val Leu Ala Val Val Ile Gly Val Phe Val Val Cys Trp Phe
385 390 395 400
Pro Phe Phe Phe Thr Tyr Thr Leu Ile Ala Val Gly Cys Pro Val Pro
405 410 415
Ser Gln Leu Phe Asn Phe Phe Trp Phe Gly Tyr Cys Asn Ser Ser
420 425 430
Leu Asn Pro Val Ile Tyr Thr Ile Phe Asn His Asp Phe Arg Arg Ala
435 440 445

Phe Lys Lys Ile Leu Cys Arg Gly Asp Arg Lys Arg Ile Val
450 455 460