



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0170379
(43) 공개일자 2023년12월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/63 (2006.01) C07K 14/415 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01) C07K 14/705 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01) C12N 9/12 (2006.01)
C12Q 1/6897 (2018.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/63 (2013.01)
C07K 14/415 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0070788

(22) 출원일자 2022년06월10일

심사청구일자 2022년06월10일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

이동민

서울특별시 성북구 오패산로16가길 40, 108동 801호(하월곡동, 꿈의숲 푸르지오)

이승환

경상북도 경주시 능남길 27 (서악동)

(74) 대리인

위병갑

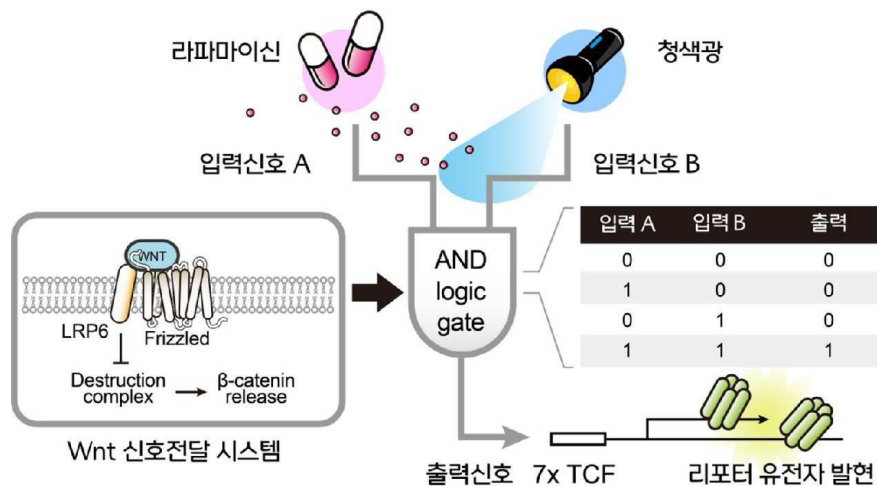
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 광화학유전학적 WNT 신호전달 조절 시스템

(57) 요약

본 발명은광유전학적 및 화학유전학적으로 단백질의 활성을 조절하여 신호전달을 활성화시키는 시스템에 관한 것으로, 화합물 및 광조사 두 개의 매개체가 동시에 존재하는 경우에만 융합단백질의 펩타이드들이 재구성되어 특정 펩타이드가 군집체를 이루거나 특정 펩타이드들이 결합함으로써 단백질의 활성을 조절할 수 있으므로, 노이즈를 배제할 수 있는 스위치 시스템이며, 단백질 간 결합에 의해 활성화가 조절되는 다양한 세포 내 신호전달을 인위적으로 조절할 수 있고, 특히, 생명체의 발달과정에서 중요한 분자 스위치 역할을 수행하는 WNT 신호전달계를 다양한 세포 및 조직에서 활성화시킬 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C07K 14/47 (2013.01)
C07K 14/4702 (2013.01)
C07K 14/705 (2013.01)
C12N 15/62 (2013.01)
C12N 9/12 (2013.01)
C12Q 1/6897 (2018.05)
C07K 2319/00 (2013.01)
C12Q 2523/313 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711157419
과제번호	2018M3C7A1024597
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	뇌과학원천기술개발
연구과제명	광유전학 기반 활성 신경세포 추적 및 제어 기술 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2022.01.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

(1) 제 1 펩타이드와 제 2 펩타이드를 포함하는 제 1 융합단백질; 및

(2) 제 3 펩타이드, 제 4 펩타이드 및 제 5 펩타이드를 포함하는 제 2 융합단백질로 이루어진, 화합물 및 광조사에 의해 광유전학적 및 화학유전학적으로 단백질의 활성을 조절하는 시스템으로서,

화합물이 제 2 펩타이드 및 제 3 펩타이드와 바인딩하여 제 1 융합단백질 및 제 2 융합단백질이 이중 또는 동종 이합체를 형성하고,

광조사에 의하여 제 1 펩타이드가 군집체를 형성하며, 제 4 펩타이드가 제 5 펩타이드를 동일 방향으로 정렬하는, 시스템.

청구항 2

제 1항에 있어서, 제 5 펩타이드가 같은 방향으로 정렬되어 군집체를 형성하는, 시스템.

청구항 3

제 1항에 있어서, 광조사는 청색광 조사인, 시스템.

청구항 4

제 1항에 있어서, 화합물은 라파마이신 또는 라파로그린, 시스템.

청구항 5

제 1항에 있어서, 제 1 펩타이드는 CRY2olig(chryptochrome 2 oligomer)인, 시스템.

청구항 6

제 1항에 있어서, 제 2 펩타이드는 FRB(FKBP-rapamycin binding)인, 시스템.

청구항 7

제 1항에 있어서, 제 3 펩타이드는 FKBP(FK506 binding protein)인, 시스템.

청구항 8

제 1항에 있어서, 제 4 펩타이드는 iLID(improved light-induced dimer)인, 시스템.

청구항 9

제 1항에 있어서, 제 5 펩타이드는 LRP6(Low-density lipoprotein receptor-related protein 6) 또는 이의 단편인, 시스템.

청구항 10

제 9항에 있어서, LRP6이 군집을 이루어 WNT 신호전달이 활성화되는, 시스템.

청구항 11

제 9항에 있어서, LRP6의 단편은 LRP6에서 N-말단의 64개의 아미노산이 결실된 LRP6c(Δ 1-64)인, 시스템.

청구항 12

CRY2olig 및 FRB를 포함하는 제 1 융합단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 및 FKBP, iLID 및 LRP6를 포함하는

제 2 융합단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는, WNT 신호전달 활성화 조성물.

청구항 13

제 12항에 있어서, 청색광 및 라파마이신에 의해 WNT 신호전달을 활성화시키는 WNT 신호전달 활성화 조성물.

청구항 14

제 1 펩타이드와 제 2 펩타이드를 포함하는 제 1 융합단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 및 제 3 펩타이드, 제 4 펩타이드 및 제 5 펩타이드를 포함하는 제 2 융합단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 화합물 및 광조사에 의해 광유전학적 및 화학유전학적으로 단백질의 활성을 조절하기 위한 키트.

청구항 15

제 14항에 있어서, 화합물이 제 2 펩타이드 및 제 3 펩타이드와 바인딩하여 제 1 융합단백질 및 제 2 융합단백질이 이중 또는 동종이합체를 형성하여 화학유전학적으로 단백질의 활성을 조절하고, 및

광조사에 의하여 제 1 펩타이드가 군집체를 형성하며, 제 4 펩타이드가 제 5 펩타이드를 동일 방향으로 정렬하여 광유전학적으로 단백질의 활성을 조절하는, 키트.

청구항 16

제 14항에 있어서, 제 1 펩타이드는 CRY2olig, 제 2 펩타이드는 FRB, 제 3 펩타이드는 FKBP, 제 4 펩타이드는 iLID인, 또는 제 5 펩타이드는 LRP6 또는 이의 단편인, 키트.

청구항 17

제 16항에 있어서, WNT 신호전달 활성화용 키트인, 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 광화학유전학적 WNT 신호전달 조절 시스템에 관한 것으로, 광화학유전학적 방법으로 LRP6 C-말단 단백질의 군집을 조절하여 WNT 신호전달을 활성화시키는 시스템에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 생명체는 다양한 신호 전달계를 활용하며 생존하며, 특히 세포가 발생하고 분화하는 과정에서 다양한 신호 전달계의 조절을 받는다. 이러한 조절 과정들은 단백질 간의 상호 결합에 의해 발생하며, 신호 전달계를 임의로 조절하기 위해서는 정밀한 시공간적 조절이 필수적이다. 세포의 분화 및 발달과정을 인위적으로 조절할 수 있어 다양한 형태의 세포로 분화가 가능하며, 이와 같은 목적을 달성하기 위해서는 고도의 세포 분화 제어 기술이 필요하다. 세포 신호 전달 네트워크는 다양한 외부 자극에 대하여 복잡한 반응을 나타낼 수 있다. 이러한 점에서 빛은 시공간적 해상도가 뛰어나며 반응속도가 빠르고, 비침습적으로 세포에 적용할 수 있다는 장점이 있어 세포 분화 제어 기술에 매우 적합한 매질이다. 광유전학은 광학과 유전학을 결합하여 만든 용어로 빛과 유전공학을 이용하여 세포들을 조절할 수 있는 생물학적 기술이며, 최근 광유전학의 발전으로 신호 경로의 구성 요소를 시공간적으로 조작할 수 있게 되어, 신호 전달이 어떻게 동적으로 조절되고 있는지 확인할 수 있게 되었다. 초기 광유전학은 특정 파장의 빛에 반응하는 이온 채널을 이용하여 개별 신경 세포들의 전기적 특성을 제어함으로써 신경과학 분야에 널리 사용되고 있다. 최근에는 이러한 빛에 반응하는 다양한 생체분자들이 발굴되어 많이 사용되고 있다. 신호 전달 경로의 각 구성은 자극의 다양한 모드로 다르게 반응하는 것으로 알려져 있다. 신호 전달 네트워크의 광유전학적 연구를 통해 신호 전달 경로의 시공간 조절 뿐 아니라, 세포 및 기관 수준의 결과 외에도 많은 질환에서 볼 수 있는 신호 전달 기능 장애를 입증할 수 있다 (L. J. Bugaj et al., Cancer mutations and targeted drugs can disrupt dynamic signal encoding by the Ras-Erk pathway. Science 361, eaao3048 (2018)).

[0003] 한편, WNT 신호전달은 세포의 분화, 증식, 운명 결정, 기관의 발달 등과 같이 발달과정을 조절하는 것으로 알려져 있다. 그 가운데 세포가 특정 운명으로 분화하는 과정에서 WNT 신호전달이 중요하게 작용하고 있으며, 특히

나 배아 줄기세포가 신경세포로 성숙하거나 조혈모세포가 증식하는 과정에서 WNT 신호전달이 중요한 역할로 작용되고 있다. WNT 신호전달 과정에 작용하는 수용체 가운데 LRP6는 WNT 리간드가 왔을 때 Frizzled 라고 부르는 수용체와 같이 작용을 한다. 활성화된 수용체는 Dishevelled라고 불리는 단백질을 수용체 C-말단에 결합시킨다. 고정된 Dishevelled 단백질은 Axin 및 GSK3-베타 단백질이 LRP6 수용체에 결합하도록 한다. LRP6 수용체에 결합된 단백질들은 베타 카테닌을 인산화시키지 못하므로 베타 카테닌의 분해를 막게 된다. 인산화되지 않은 베타 카테닌은 세포의 핵 속으로 들어가 WNT 신호전달 경로를 활성화한다. 반면에 Axin 및 GSK3-베타 단백질에 의해서 인산화된 베타 카테닌은 유비퀴틴화 및 프로테아좀에 의해서 분해된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0004] 본 발명의 목적은 광유전학적 및 화학유전학적으로 단백질의 활성을 조절하는 시스템을 제공하는 것이다.
- [0005] 또한, 본 발명의 목적은 WNT 신호전달 활성화 조성물을 제공하는 것이다.
- [0006] 아울러, 본 발명의 목적은 광유전학적 및 화학유전학적으로 단백질의 활성을 조절하는 키트를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0007] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 화합물 및 광조사에 의해 광유전학적 및 화학유전학적으로 단백질의 활성을 조절하는 시스템을 제공한다.
- [0008] 또한, 본 발명은 WNT 신호전달 활성화 조성물을 제공한다.
- [0009] 아울러, 본 발명은 화합물 및 광조사에 의해 광유전학적 및 화학유전학적으로 단백질의 활성을 조절하는 키트를 제공한다.

발명의 효과

- [0010] 본 발명의 화합물 및 광조사에 의해 광유전학적 및 화학유전학적으로 단백질의 활성을 조절하는 시스템은 화합물 및 광조사 두 개의 매개체가 동시에 존재하는 경우에만 융합단백질의 펩타이드들이 재구성되어 특정 펩타이드가 군집체를 이루거나 특정 펩타이드들이 결합함으로써 단백질의 활성을 조절할 수 있으므로, 노이즈를 배제할 수 있는 스위치 시스템이며, 단백질 간 결합에 의해 활성화가 조절되는 다양한 세포 내 신호전달을 인위적으로 조절할 수 있고, 특히, 생명체의 발달과정에서 중요한 분자 스위치 역할을 수행하는 WNT 신호전달계를 다양한 세포 및 조직에서 활성화시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0011] 도 1은 본 발명의 빛 및 소분자약물의 조절을 받는 AND gate 논리 형태의 시스템을 나타낸 모식도이다.
- 도 2는 본 발명의 제 1 융합단백질 및 제 2 융합단백질을 발현하는 플라스미드를 나타낸 도이다:
- A: Cry2olig 및 FRB이 융합된 제 1 융합단백질을 발현하는 플라스미드 TM-Cry2olig-FRB-P2A-GFP(1-10); 및
- B: LRP6의 C-말단, iLID 및 FKBP이 융합된 제 2 융합단백질을 발현하는 플라스미드 GFP11x7-P2A-NES-FKBP-iLID-LRP6c(Δ 1-64).
- 도 3은 Wnt 신호전달 활성화 실험 스케줄을 나타낸 도이다.
- 도 4는 빛으로 발현이 유도되는 종래의 Cry2olig-mCherry-LRP6c 융합단백질을 나타낸 도이다.
- 도 5는 청색광 및/또는 라파마이신 처리에 의한 융합단백질의 발현에 따른 Wnt 신호전달 활성화를 정량한 도이다:
- optoWnt: 종래의 Cry2olig-mCherry-LRP6c 융합단백질의 발현에 의한 Wnt 신호전달 활성화; 및
- optochemoWnt: Cry2olig-FRB (제 1 융합단백질) 및 FKBP-iLID-LRP6c(Δ 1-64) (제 2 융합단백질)의 발현에 의한 Wnt 신호전달 활성화.
- 도 6은 제 1 융합단백질에서 Cry2olig 또는 Cry2olig(D387A)에 따른 Wnt 신호전달 활성화 정도를 비교한 도이다.

도 7은 제 2 융합단백질에서 LRP6의 부위에 따른 WNT 신호전달 활성화 정도를 비교한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0012] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.
- [0013] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [0014] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 통합된다.
- [0015] 본 명세서 전반을 통하여, 천연적으로 존재하는 아미노산에 대한 통상의 1문자 및 3문자 코드가 사용될 뿐만 아니라 Aib(α -아미노이소부티르산), Sar(N-methylglycine) 등과 같은 다른 아미노산에 대해 일반적으로 허용되는 3문자 코드가 사용된다. 또한 본 발명에서 약어로 언급된 아미노산은 하기와 같이 IUPAC-IUB 명명법에 따라 기재되었다:
- [0016] 알라닌: A, 아르기닌: R, 아스파라긴: N, 아스파르트산: D, 시스테인: C, 글루탐산: E, 글루타민: Q, 글리신: G, 히스티딘: H, 이소류신: I, 류신: L, 리신: K, 메티오닌: M, 페닐알라닌: F, 프롤린: P, 세린: S, 트레오닌: T, 트립토판: W, 티로신: Y 및 발린: V.
- [0018] 일 측면에서, 본 발명은 (1) 제 1 펩타이드와 제 2 펩타이드를 포함하는 제 1 융합단백질; 및 (2) 제 3 펩타이드, 제 4 펩타이드 및 제 5 펩타이드를 포함하는 제 2 융합단백질로 이루어진, 화합물 및 광조사에 의해 광유전학적 및 화학유전학적으로 단백질의 활성을 조절하는 시스템으로서,
- [0019] 화합물이 제 2 펩타이드 및 제 3 펩타이드와 바인딩하여 제 1 융합단백질 및 제 2 융합단백질이 이중 또는 동종이합체를 형성하고,
- [0020] 광조사에 의하여 제 1 펩타이드가 군집체를 형성하며, 제 4 펩타이드가 제 5 펩타이드를 동일 방향으로 정렬하는, 시스템에 관한 것이다.
- [0021] 일 구현예에서, 제 5 펩타이드가 같은 방향으로 정렬되고 군집체를 형성하여 활성화될 수 있다.
- [0022] 일 구현예에서, 상기 시스템은 융합단백질을 활성화할 수 있으며, 군집화를 통해 제 5 펩타이드를 활성화하는 것이 더욱 바람직하다.
- [0023] 일 구현예에서, 화합물에 의해 제 2 펩타이드 및 제 3 펩타이드를 결합시켜 제 1 펩타이드에 제 5 펩타이드를 결합시킬 수 있으며, 광조사에 의해 제 1 펩타이드는 군집체를 이루고, 제 4 펩타이드는 동일 방향으로 정렬될 수 있으므로, 화합물 및 광조사에 의해서만 제 5 펩타이드가 동일 방향으로 정렬된 상태로 군집된 제 1 펩타이드에 결합될 수 있다.
- [0024] 일 구현예에서, 광조사는 청색광 조사일 수 있다.
- [0025] 일 구현예에서, 화합물은 라파마이신 또는 라파로그(라파마이신의 유도체)일 수 있다.
- [0026] 일 구현예에서, 제 1 펩타이드는 CRY2olig(chryptochrome 2 oligomer)이고, 제 2 펩타이드는 FRB(FKBP-rapamycin binding)이며, 제 3 펩타이드는 FKBP(FK506 binding protein)이고, 제 4 펩타이드는 iLID(improved light-induced dimer)이며, 제 5 펩타이드는 LRP6(Low-density lipoprotein receptor-related protein 6) 또

는 이의 단편일 수 있다.

- [0027] 일 구현예에서, CRY2olig는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1의 염기서열을 포함할 수 있으며; FRB는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 10의 염기서열을 포함할 수 있으며; FKBP는 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 11의 염기서열을 포함할 수 있으며; iLID는 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 12의 염기서열을 포함할 수 있으며; 및 LRP6은 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 13의 염기서열을 포함할 수 있다.
- [0028] 일 구현예에서, LRP6이 군집을 이루어 WNT 신호전달이 활성화될 수 있다.
- [0029] 일 구현예에서, LRP6의 단편은 LRP6에서 N-말단의 64개의 아미노산이 결실된 LRP6c(Δ 1-64)일 수 있으며, 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 14의 염기서열을 포함할 수 있다.
- [0030] 일 구현예에서, 제 1 융합단백질은 CRY2olig 및 FRB를 포함할 수 있으며, 제 2 융합단백질은 FKBP, iLID 및 LRP6를 포함할 수 있다.
- [0031] 일 구현예에서, 상기 융합단백질은 형광 단백질을 추가로 포함할 수 있으며, 형광 단백질은 녹색형광단백질(green fluorescent protein, GFP), 향상 녹색형광단백질(Enhanced Green Fluorescent Protein, EGFP), 황색형광단백질(yellow fluorescent protein, YFP), 적색형광단백질(red fluorescent protein, RFP), 주황형광단백질(orange fluorescent protein, OFP), 청록색형광단백질(cyan fluorescent protein, CFP), 청색형광단백질(blue fluorescent protein, BFP), 원적색형광단백질(far-red fluorescent protein) 또는 테트라시스테인 모티프(tetracysteine motif)일 수 있다.
- [0032] 일 측면에서, 본 발명은 상기 제 1 융합단백질 및 제 2 융합단백질; 또는 상기 제 1 융합단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 상기 제 2 융합단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 광유전학 및 화학유전학 매개 Wnt 신호전달 활성화 시스템에 관한 것이다.
- [0033] 일 구현예에서, 제 1 융합단백질 (청색광에 의해 세포막 관통 도메인에 군집을 형성하는 CRY2olig 도메인 및 라파마이신에 의해 FKBP와 결합하는 FRB이 융합된 융합단백질)은 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 15의 염기서열을 포함할 수 있다.
- [0034] 일 구현예에서, 제 2 융합단백질 (WNT 신호전달계의 공동수용체인 LRP6의 C-말단(LRP6에서 N-말단의 64개의 아미노산이 결실된 LRP6c(Δ 1-64)), 청색광에 의해 LRP6의 C말단을 같은 방향으로 정렬시키는 iLID 및 라파마이신에 의해 FRB와 결합하는 FKBP이 융합된 융합단백질)은 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 16의 염기서열을 포함할 수 있다.
- [0035] 일 구현예에서, 상기 시스템은 화합물로서 라파마이신을 이용하여 화학유전학적으로 단백질 이형중합체를 형성하고 청색광 조사에 의해 광유전학적으로 단백질 군집체를 형성하여 WNT 신호전달을 활성화할 수 있다.
- [0036] 일 구현예에서, 청색광 조사에 의해 CRY2olig가 군집체를 이루고, 청색광 조사에 의해 iLID가 정렬되어 같은 방향으로 LRP6를 정렬시키며, 라파마이신에 의해 FRB 및 FKBP가 결합함으로써 군집체를 이룬 Cry2olig에 동일 방향으로 정렬된 LRP6가 결합되어 WNT 신호전달 활성화 효과를 나타낼 수 있다.
- [0037] 일 구현예에서, 본 발명의 시스템을 이용한 WNT 신호전달 활성화를 통해 배아줄기세포의 분화를 유도할 수 있다.
- [0038] 일 측면에서, 본 발명은 CRY2olig 및 FRB를 포함하는 제 1 융합단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 및 FKBP, iLID 및 LRP6를 포함하는 제 2 융합단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는, WNT 신호전달 활성화 조성물에 관한 것이다.
- [0039] 일 구현예에서, 청색광 및 라파마이신에 의해 WNT 신호전달을 활성화시킬 수 있으며, 상기 조성물을 처리하여 제 1 융합단백질 및 제 2 융합단백질이 발현되면 청색광 조사에 의해 CRY2olig가 군집체를 이루고, 청색광 조사에 의해 iLID가 정렬되어 같은 방향으로 LRP6를 정렬시키며, 라파마이신 또는 이의 유도체에 의해 FRB 및 FKBP가 결합함으로써 군집체를 이룬 Cry2olig에 동일 방향으로 정렬된 LRP6가 결합되어 WNT 신호전달 활성화 효과를 나타낼 수 있다.

- [0040] 일 측면에서, 본 발명은 제 1 펩타이드와 제 2 펩타이드를 포함하는 제 1 융합단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 및 제 3 펩타이드, 제 4 펩타이드 및 제 5 펩타이드를 포함하는 제 2 융합단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 화합물 및 광조사에 의해 광유전학적 및 화학유전학적으로 단백질의 활성을 조절하기 위한 키트에 관한 것이다.
- [0041] 일 구현예에서, 화합물이 제 2 펩타이드 및 제 3 펩타이드와 바인딩하여 제 1 융합단백질 및 제 2 융합단백질이 이중 또는 동종이합체를 형성하여 광유전학적으로 단백질의 활성을 조절하고, 및 광조사에 의하여 제 1 펩타이드가 군집체를 형성하며, 제 4 펩타이드가 제 5 펩타이드를 동일 방향으로 정렬하여 광유전학적으로 단백질의 활성을 조절할 수 있다.
- [0042] 일 구현예에서, 제 5 펩타이드가 같은 방향으로 정렬되고 군집체를 형성하여 활성화될 수 있다.
- [0043] 일 구현예에서, 상기 시스템은 융합단백질을 활성화할 수 있으며, 군집화를 통해 제 5 펩타이드를 활성화하는 것이 더욱 바람직하다.
- [0044] 일 구현예에서, 광조사는 청색광 조사일 수 있다.
- [0045] 일 구현예에서, 화합물은 라파마이신 또는 라파로그일 수 있다.
- [0046] 일 구현예에서, 제 1 펩타이드는 CRY2olig(chryptochrome 2 oligomer)이고, 제 2 펩타이드는 FRB(FKBP-rapamycin binding)이며, 제 3 펩타이드는 FKBP(FK506 binding protein)이고, 제 4 펩타이드는 iLID(improved light-induced dimer)이며, 제 5 펩타이드는 LRP6(Low-density lipoprotein receptor-related protein 6) 또는 이의 단편일 수 있다.
- [0047] 일 구현예에서, LRP6이 군집을 이루면 WNT 신호전달이 활성화될 수 있다.
- [0048] 일 구현예에서, LRP6의 단편은 LRP6에서 N-말단의 64개의 아미노산이 결실된 LRP6c(Δ 1-64)일 수 있다.
- [0049] 일 구현예에서, 제 1 융합단백질은 CRY2olig 및 FRB를 포함할 수 있으며, 제 2 융합단백질은 FKBP, iLID 및 LRP6를 포함할 수 있다.
- [0050] 일 구현예에서, 상기 키트는 WNT 신호전달 활성화용 키트일 수 있다.
- [0051] 일 측면에서, 본 발명은 상기 융합단백질을 코딩하는 뉴클레오티드를 포함하는 벡터 및 상기 벡터를 포함하는 숙주세포에 관한 것이다.
- [0052] 일 구현예에서, 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파지 벡터 및 바이러스 벡터 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 적합한 벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 같은 발현 조절 엘리먼트 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 상기 시그널 서열에는 숙주가 에스케리치아 속(*Escherichia* sp.) 박테리아인 경우에는 PhoA 시그널 서열, OmpA 시그널 서열 등이, 숙주가 바실러스속(*Bacillus* sp.) 박테리아인 경우에는 α -아밀라아제 시그널 서열, 서브틸리신 시그널 서열 등이, 숙주가 효모(yeast)인 경우에는 MF α 시그널 서열, SUC2 시그널 서열 등이, 숙주가 동물세포인 경우에는 인슐린 시그널 서열, α -인터페론 시그널 서열, 항체 분자 시그널 서열 등을 이용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한 벡터는 벡터를 함유하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택 마커를 포함할 수 있고, 복제 가능한 벡터인 경우 복제 기원을 포함한다. 예를 들어, 상기 벡터는 "플라스미드"이며, 환형의 이중 가닥 DNA 루프를 지칭하는 것으로서, 여기에 예컨대, 표준 분자 클로닝 기법에 의해 추가적인 DNA 세그먼트가 삽입될 수 있다.
- [0053] 상기 벡터는 각각 전기천공법 (electroporation), 리포펙션, 바이러스 벡터, 나노파티클 (nanoparticles) 뿐만 아니라, PTD (Protein translocation domain) 융합 단백질 방법 등을 통해 생체 내 또는 세포 내로 전달될 수 있다.
- [0054] 본 발명에서 용어, "벡터"는 핵산 서열을 복제할 수 있는 세포로의 도입을 위해서 핵산 서열을 삽입할 수 있는 전달체를 의미한다. 핵산 서열은 외생 (exogenous) 또는 이중 (heterologous)일 수 있다. 벡터로서는 플라스미드, 코즈미드 및 바이러스(예를 들면 박테리오파지)를 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 당업자는 표준적인 재조합 기술에 의해 벡터를 구축할 수 있다(Maniatis, et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988; 및 Ausubel et al., In: Current Protocols in Molecular Biology, John, Wiley & Sons, Inc, NY, 1994 등).

- [0055] 일 구현예에서, 상기 벡터의 제작 시, 상기 융합 폴리펩타이드를 생산하고자 하는 숙주세포의 종류에 따라 프로모터(promoter), 종결자(terminator), 인핸서(enhancer) 등과 같은 발현조절 서열, 막 표적화 또는 분비를 위한 서열 등을 적절히 선택하고 목적에 따라 다양하게 조합할 수 있다.
- [0056] 일 구현예에서, 숙주세포는 에스케리치아 속(*Esche richia* sp.), 살모넬라 속(*Salmonellae* sp.), 예르시니아 속(*Yersinia* sp.), 쉬겔라 속(*Shigella* sp.), 엔테로박터 속(*Enterobacter* sp.), 슈도모나스 속(*Pseudomonas* sp.), 프로테우스 속(*Proteus* sp.) 또는 클레브시엘라 속(*Klebsiella* sp.)의 박테리아일 수 있으며, 에스케리치아 속의 *Escherichia coli*인 것이 융합 폴리펩타이드의 대량 생산에 더욱 바람직하다.
- [0057] 세포 내 다양한 신호전달에서 단백질 간의 결합이 일어나므로, 단백질 간 결합을 조절하기 위한 광유전학 단백질로 Cry2olig 및 iLID를 사용하였다. 애기 장대에서 유래한 Cry2 단백질에서 490번 글루타메이트를 글리신으로 치환하여 군집체 형성능력이 향상된 Cry2olig 단백질을 제 5 펩타이드인 LRP6를 군집시키기 위해 사용하였다. Cry2olig 단백질은 식물유래 단백질이지만 동물 세포와 같은 보조인자를 사용하며, 사용되는 보조인자는 플라빈 아데닌 다이뉴클레오타이드 (FAD)로 생화학에서 산화환원반응의 조효소이고, 단백질의 보결분자단으로 물질대사에 있어서 중요한 효소 반응에 관여하므로, 동물 세포 내에서도 Cry2olig는 활성을 가진다. 청색광이 Cry2olig에 조사되면 Cry2olig에 보조인자인 FAD가 결합하고 Cry2olig가 4량체를 형성한다. 또한, iLID는 커리에서 유래한 단백질로 보조인자는 플라빈 모노뉴클레오타이드 (FMN)를 사용하며, 동물세포에도 존재하는 조효소를 사용하고 있다. iLID의 C-말단 쪽 J-a 나선구조가 암조건에서는 본체에 결합되어있다가 청색광 조사시 FMN이 본체에 결합하여 J-a 나선구조가 본체로부터 떨어져나와 나선구조가 풀리면서 유연한 구조가 됨으로써 iLID에 연결된 제 5 펩타이드 (LRP6)가 같은 방향으로 정렬되도록 기능한다. 단백질 간 결합을 조절하기 위한 화학유전학 단백질로 소분자 화합물인 라파마이신에 의해 이형중합체를 형성하는 FRB 및 FKBP를 사용하였다. 상기 FRB 및 FKBP 단백질은 라파마이신 또는 라파로그를 매개체로 해서 가운데 소분자 화합물 (라파마이신 또는 라파로그)을 두고 양옆으로 각각 결합하는 형태를 나타내므로, FRB 및 FKBP 이형중합체를 이용하여 광조사에 의해 군집체를 형성하고 있는 Cry2olig와 정렬된 iLID에 연결된 LRP6를 서로 결합시켰다.
- [0058] 본 발명에서는 WNT 신호전달 활성의 정량적인 데이터를 획득하기 위해 유전자발현 시스템을 이용하였으며, 리포터 플라스미드로 7xTCF-SEAP (Secreted form of embryonic alkaline phosphatase)를 사용하였다. TCF(T-cell factor)는 DNA에 결합하는 전사인자를 인코딩하는 유전자 그룹이며 베타 카테닌이 핵 안에서 결합할 수 있는 DNA 서열로, WNT 신호전달이 활성화되면 인산화되지 않은 베타 카테닌이 핵 안으로 들어가 TCF 서열에 결합하게 되고, 전사인자들이 모여들어 단백질의 전사를 시작하게 된다. 만들어진 SEAP 효소는 특성을 가지고 있는데 세포 바깥으로 분비가 되며 세포를 배양하고 있는 배지에서 쉽게 검출할 수 있다. SEAP의 기능은 파라-니트로페닐 인산염 (pNitrophenyl phosphate)을 가수분해를 촉매시키며, 가수분해된 파라-니트로페닐인산염은 노란색을 띠게 되므로 405-415nm 의 빛 파장에서 분광광도계를 이용하여 측정하였다.
- [0060] 하기의 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.
- [0062] **실시예 1. WNT 신호전달 활성화 융합단백질 발현 플라스미드 제작**
- [0063] 종래의 빛(광)을 이용한 광유전학 매개 WNT 신호전달 도구의 단점을 극복하기 위해, 광유전학 및 화학유전학적 자극을 통해 조절되는 AND gate 논리 형태의 시스템 (도 1)을 구축하였다. 구체적으로, 청색광 및 소분자약물 (라파마이신)을 통해 WNT 신호전달을 활성화 시키기 위한 도구로써, 청색광에 의해 세포막 관통 도메인에 군집을 형성하는 CRY2olig 도메인 및 라파마이신에 의해 FKBP와 결합하는 FRB(FKBP-rapamycin binding)이 융합된 융합단백질 (제 1 융합단백질)을 발현하는 플라스미드 (TM-Cry2olig-FRB-P2A-GFP(1-10)) (서열번호 15)와, WNT 신호전달계의 공동수용체인 LRP6(Low-density lipoprotein receptor-related protein 6)의 C-말단, 청색광에 의해 LRP6의 C말단을 같은 방향으로 정렬시키는 iLID 및 라파마이신에 의해 FRB와 결합하는 FKBP(FK506 binding protein)이 융합된 융합단백질 (제 2 융합단백질)을 발현하는 플라스미드 (GFP11x7-P2A-NES-FKBP-iLID-LRP6c(Δ 1-64)) (서열번호 16)를 제작하였다 (도 2). 상기 플라스미드에서 GFP(1-10) 및 GFP11x7은 형질주입 형광마커로 사용되었으며, 하나의 세포안에 상기 두 가지 플라스미드 DNA가 모두 주입되었을 때 녹색의 형광이 나타난다. 또한, 플라스미드 DNA의 P2A 서열은 단백질로 DNA가 합성이 완료된 후 리보솜에 의해서 잘려지는 서열이므로, GFP의 형광은 단백질로 만들어진 뒤 각각의 단백질과 분리되어 존재하게 된다.

[0065] 실시예 2. 융합단백질 발현 플라스미드의 Wnt 신호전달 활성화 확인

[0066] 상기 실시예 1에서 제작한 플라스미드 2종 TM-Cry2olig-FRB-P2A-GFP(1-10) 0.125 μ g 및 GFP11x7-P2A-NES-FKBP-iLID-LRP6c(Δ 1-64) 0.125 μ g과 리포터 플라스미드로서 7xTCF-SEAP 0.1 μ g을 각각 jetOptimus buffer (Polyplus사)에 첨가한 후 jetOptimus reagent를 0.25 μ l 첨가하여 10분 동안 상온에 두었다가, 24웰 플레이트에 1×10^5 cell/well로 분주하고 이산화탄소의 농도 5% 및 37°C의 인큐베이터에서 24시간 동안 배양한 HEK293T 세포(ATCC)에 50 μ l 씩 분주하여 트랜스펙션하였다. 이 때, 종래의 Cry2olig-mCherry-LRP6c(도 4)를 대조군(optoWnt)으로 사용하였다. 트랜스펙션 후 24시간 동안 인큐베이션하고 암막 커튼을 클린벤치에 치고 680nm로 붉은색을 띠는 LED 헤드램프 하에서 라파마이신(100nM)(TOCRIS사)을 각 웰에 처리한 후 청색광 LED(470nm)가 설치된 인큐베이터에서 배양하였다(암조건 군, 형광등 10분 노출군, 형광등 10분 노출 후 50분 배양X4회 군, 청색광 노출 군). 이 때, 청색광 빛 자극은 분당 2초 동안 자극을 주고 58초 동안 어둠을 유지하는 사이클로 16시간 동안 지속시켰다(도 3). Wnt 신호전달을 정량하기 위해, 세포밖으로 배출된 SEAP를 포함하는 각 군의 세포배양액을 회수한 후(1.5mL 튜브에 400 μ l씩), 고속 원심분리기를 이용하여 13,000rpm 5분 동안 세포 찌꺼기들을 제거하고, 세포의 내인성 알칼라인 포스파테이스를 억제하기 위해 65°C에서 1시간 동안 유지하였다. 그 후, 각 군의 샘플을 96웰 플레이트로 40 μ l씩 분주한 뒤, 반응 시약(5.1M 다이에탄올아민 40 μ l, 0.5M 엘호모아르기닌 4 μ l, 10mM 염화마그네슘 10 μ l 및 증류수 46 μ l)을 100 μ l씩 분주한 뒤 37°C 인큐베이터에 10분간 유지하였다. 이 후, 파라-니트로페닐인산염(pNPP) 시약을 60 μ l씩 분주한 뒤, 분광광도계(TECAN회사의 infinite F50)를 이용하여 405nm 필터로 SEAP에 의한 pNPP의 가수분해 정도인 기울기를 30초당 1번씩 1시간 동안 측정하였다.

[0067] 그 결과, 종래의 플라스미드를 발현시킨 군(optoWnt)의 경우 형광등 노출에도 WNT 신호전달의 활성이 증가되는 반면, 본 발명의 플라스미드를 발현시킨 군(optochemoWnt)의 경우 오직 청색광과 라파마이신이 동시에 존재하는 경우에만 Wnt 신호전달을 활성화하는 것으로 나타났다(도 5).

[0069] 실시예 3. 군집체 형성 기능에 따른 융합단백질의 Wnt 신호전달 활성화

[0070] 상기 실시예 1의 Cry2olig 도메인 및 FRB가 융합된 융합단백질(제 1 융합단백질)에서 Cry2olig의 군집체 기능이 WNT 신호전달에 어떤 영향을 미치는지 확인하기 위해, Cry2olig의 보결조효소가 결합하여 단백질의 활성을 가지게 하는 부위인 387 아스파테이트(Asp)를 알라닌(Ala)으로 치환하여 군집체 형성 기능을 억제한 Cry2olig(D387A)을 이용하여 제작한 융합단백질 TM-Cry2olig(D387A)-FRB를 제작하고, 상기 실시예 2에서와 같이 TM-Cry2olig-FRB와 TM-Cry2olig(D387A)-FRB를 각각 NES-FKBP-iLID-LRP6c(Δ 1-64) 및 7xTCF-SEAP와 함께 세포에 발현시켜 Wnt 신호전달 활성화 정도를 비교하였다.

[0071] 그 결과, 청색광과 라파마이신이 모두 존재하는 상황아래 WNT 신호전달의 활성이 증가한 TM-Cry2olig-FRB 군과 달리, Cry2olig의 보결조효소 결합부위가 변형된 군에서는 라파마이신과 청색광이 있는 상황에서도 WNT 신호전달 활성이 억제되어있는 것으로 나타났다(도 6).

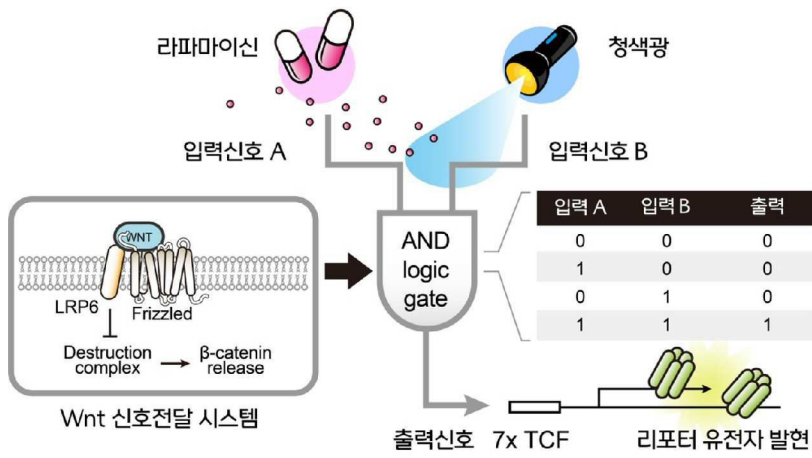
[0073] 실시예 4. LRP6 부위에 따른 Wnt 신호전달 활성화

[0074] WNT 신호전달계의 공동수용체인 LRP6의 부위에 따른 WNT 신호전달 활성화를 확인하기 위해, LRP6c WT, LRP6c(Δ 1-64), LRP6c(Δ 1-98), LRP6c(Δ 208-218) 및 LRP6c(Δ 193-218)를 제작한 뒤, 각각 FKBP와 융합하여 융합단백질을 제작하고 상기 실시예 2에서와 같이 Wnt 신호전달 활성화 정도를 비교하였다.

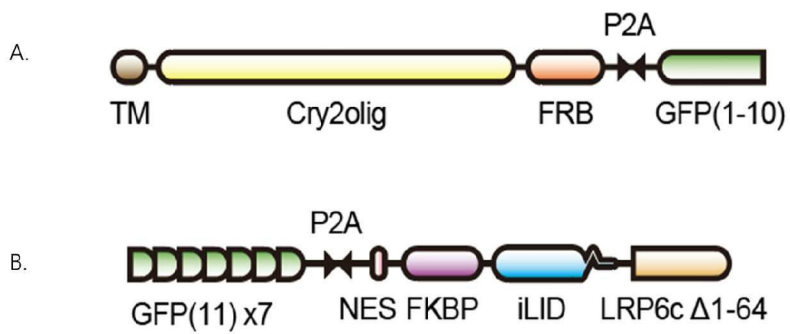
[0075] 그 결과, 전장의 LRP6 및 LRP6c(Δ 1-64)의 Wnt 신호전달 활성화가 가장 우수한 것으로 나타났다(도 7). 이에, 광유전학적 효율을 높이기 위해 LRP6c의 5개의 인산화 위치는 보존하고, 단백질의 크기를 줄여 의도하지 않은 인산화를 방지하는 것으로 N-말단의 64개의 아미노산이 제거된 LRP6c(Δ 1-64)를 이용하는 것이 유리할 것으로 판단하였다.

도면

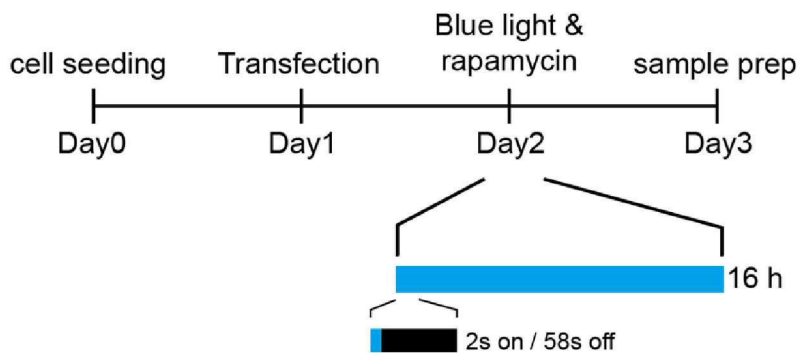
도면1



도면2



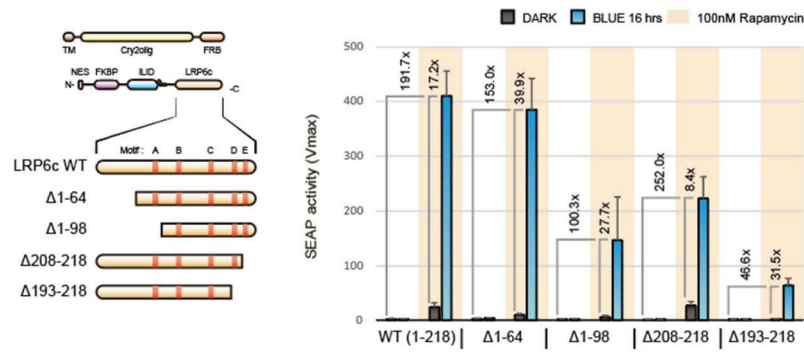
도면3



도면4



도면7



서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> OPTOCHEMOGENETIC REGULATION SYSTEM OF WNT SIGNALING PATHWAY
- <130> DP-2022-0288
- <160> 16
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 498
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Cry2olig
- <400> 1

Met Lys Met Asp Lys Lys Thr Ile Val Trp Phe Arg Arg Asp Leu Arg

1 5 10 15

Ile Glu Asp Asn Pro Ala Leu Ala Ala Ala Ala His Glu Gly Ser Val

20 25 30

Phe Pro Val Phe Ile Trp Cys Pro Glu Glu Glu Gly Gln Phe Tyr Pro

35 40 45

Gly Arg Ala Ser Arg Trp Trp Met Lys Gln Ser Leu Ala His Leu Ser

50 55 60

Gln Ser Leu Lys Ala Leu Gly Ser Asp Leu Thr Leu Ile Lys Thr His

65 70 75 80

Asn Thr Ile Ser Ala Ile Leu Asp Cys Ile Arg Val Thr Gly Ala Thr

85 90 95

Lys Val Val Phe Asn His Leu Tyr Asp Pro Val Ser Leu Val Arg Asp

100 105 110

His Thr Val Lys Glu Lys Leu Val Glu Arg Gly Ile Ser Val Gln Ser

115 120 125

Tyr Asn Gly Asp Leu Leu Tyr Glu Pro Trp Glu Ile Tyr Cys Glu Lys

130 135 140

Gly Lys Pro Phe Thr Ser Phe Asn Ser Tyr Trp Lys Lys Cys Leu Asp

145 150 155 160

Met Ser Ile Glu Ser Val Met Leu Pro Pro Pro Trp Arg Leu Met Pro

165 170 175

Ile Thr Ala Ala Ala Glu Ala Ile Trp Ala Cys Ser Ile Glu Glu Leu

180 185 190

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

195 200 205

Ala Trp Ser Pro Gly Trp Ser Asn Ala Asp Lys Leu Leu Asn Glu Phe

210 215 220

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

225 230 235 240

Gly Asn Ser Thr Ser Leu Leu Ser Pro Tyr Leu His Phe Gly Glu Ile

245 250 255

Ser Val Arg His Val Phe Gln Cys Ala Arg Met Lys Gln Ile Ile Trp

260 265 270

Ala Arg Asp Lys Asn Ser Glu Gly Glu Glu Ser Ala Asp Leu Phe Leu

275 280 285

Arg Gly Ile Gly Leu Arg Glu Tyr Ser Arg Tyr Ile Cys Phe Asn Phe

290 295 300

Pro Phe Thr His Glu Gln Ser Leu Leu Ser His Leu Arg Phe Phe Pro

305 310 315 320

Trp Asp Ala Asp Val Asp Lys Phe Lys Ala Trp Arg Gln Gly Arg Thr

325 330 335

Gly Tyr Pro Leu Val Asp Ala Gly Met Arg Glu Leu Trp Ala Thr Gly

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

 385 390 395 400
 Ser Gly Ser Ile Pro Asp Gly His Glu Leu Asp Arg Leu Asp Asn Pro
 405 410 415
 Ala Leu Gln Gly Ala Lys Tyr Asp Pro Glu Gly Glu Tyr Ile Arg Gln
 420 425 430
 Trp Leu Pro Glu Leu Ala Arg Leu Pro Thr Glu Trp Ile His His Pro
 435 440 445
 Trp Asp Ala Pro Leu Thr Val Leu Lys Ala Ser Gly Val Glu Leu Gly
 450 455 460

 Thr Asn Tyr Ala Lys Pro Ile Val Asp Ile Asp Thr Ala Arg Glu Leu
 465 470 475 480
 Leu Ala Lys Ala Ile Ser Arg Thr Arg Gly Ala Gln Ile Met Ile Gly
 485 490 495
 Ala Ala

<210> 2

<211> 99

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FRB

<400> 2

Met Ala Ser Arg Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu Glu
 1 5 10 15

Glu Ala Ser Arg Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met Phe
 20 25 30

Glu Val Leu Glu Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln Thr

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

85 90 95
 Lys Thr Ser

<210> 3
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> FKBP
 <400> 3

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

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

<210> 4
 <211> 149
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> iLID

<400> 4

Met Glu Phe Leu Ala Thr Thr Leu Glu Arg Ile Glu Lys Asn Phe Val

1 5 10 15

Ile Thr Asp Pro Arg Leu Pro Asp Asn Pro Ile Ile Phe Ala Ser Asp

20 25 30

Ser Phe Leu Gln Leu Thr Glu Tyr Ser Arg Glu Glu Ile Leu Gly Arg

35 40 45

Asn Cys Arg Phe Leu Gln Gly Pro Glu Thr Asp Arg Ala Thr Val Arg

50 55 60

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

65 70 75 80

Ile Asn Tyr Thr Lys Ser Gly Lys Lys Phe Trp Asn Val Phe His Leu

85 90 95

Gln Pro Met Arg Asp Tyr Lys Gly Asp Val Gln Tyr Phe Ile Gly Val

100 105 110

Gln Leu Asp Gly Thr Glu Arg Leu His Gly Ala Ala Glu Arg Glu Ala

115 120 125

Val Cys Leu Ile Lys Lys Thr Ala Phe Gln Ile Ala Glu Ala Ala Asn

130 135 140

Asp Glu Asn Tyr Phe

145

<210> 5

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LRP6c

<400> 5

Arg Met Leu Cys Pro Arg Met Lys Gly Asp Gly Glu Thr Met Thr Asn

1 5 10 15

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

[illegible]

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Thr Glu Arg Ser His Tyr Thr Met Glu Phe Gly Tyr Ser Ser Asn

35 40 45

Ser Pro Ser Thr His Arg Ser Tyr Ser Tyr Arg Pro Tyr Ser Tyr Arg

50 55 60

His Phe Ala Pro Pro Thr Thr Pro Cys Ser Thr Asp Val Cys Asp Ser

65 70 75 80

Asp Tyr Ala Pro Ser Arg Arg Met Thr Ser Val Ala Thr Ala Lys Gly

85 90 95

Tyr Thr Ser Asp Leu Asn Tyr Asp Ser Glu Pro Val Pro Pro Pro Pro

100 105 110

Thr Pro Arg Ser Gln Tyr Leu Ser Ala Glu Glu Asn Tyr Glu Ser Cys

115 120 125

Pro Pro Ser Pro Tyr Thr Glu Arg Ser Tyr Ser His His Leu Tyr Pro

130 135 140

Pro Pro Pro Ser Pro Cys Thr Asp Ser Ser

145 150

<210> 7

<211> 945

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TM-Cry2olig-FRB-P2A-GFP(1-10)

<400> 7

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Pro Phe Lys Val Val Val Ile Ser Ala Ile Leu Ala Leu Val Val Leu

50

55

60

Thr Ile Ile Ser Leu Ile Ile Leu Ile Met Leu Trp Gln Lys Lys Pro

65

70

75

80

Arg Gly Gly Ser Gly Gly Leu Glu Ala Thr Met Lys Met Asp Lys Lys

85

90

95

Thr Ile Val Trp Phe Arg Arg Asp Leu Arg Ile Glu Asp Asn Pro Ala

100

105

110

Leu Ala Ala Ala Ala His Glu Gly Ser Val Phe Pro Val Phe Ile Trp

115

120

125

Cys Pro Glu Glu Glu Gly Gln Phe Tyr Pro Gly Arg Ala Ser Arg Trp

130

135

140

Trp Met Lys Gln Ser Leu Ala His Leu Ser Gln Ser Leu Lys Ala Leu

145

150

155

160

Gly Ser Asp Leu Thr Leu Ile Lys Thr His Asn Thr Ile Ser Ala Ile

165

170

175

Leu Asp Cys Ile Arg Val Thr Gly Ala Thr Lys Val Val Phe Asn His

180

185

190

Leu Tyr Asp Pro Val Ser Leu Val Arg Asp His Thr Val Lys Glu Lys

195

200

205

Leu Val Glu Arg Gly Ile Ser Val Gln Ser Tyr Asn Gly Asp Leu Leu

210

215

220

Tyr Glu Pro Trp Glu Ile Tyr Cys Glu Lys Gly Lys Pro Phe Thr Ser

225

230

235

240

Phe Asn Ser Tyr Trp Lys Lys Cys Leu Asp Met Ser Ile Glu Ser Val

245

250

255

Met Leu Pro Pro Pro Trp Arg Leu Met Pro Ile Thr Ala Ala Ala Glu

260

265

270

Ala Ile Trp Ala Cys Ser Ile Glu Glu Leu Gly Leu Glu Asn Glu Ala

275

280

285

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

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

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

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

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

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

 625 630 635 640
 Arg Gly Pro Gln Thr Leu Lys Glu Thr Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly
 645 650 655
 Arg Asp Leu Met Glu Ala Gln Glu Trp Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser
 660 665 670
 Gly Asn Val Lys Asp Leu Leu Gln Ala Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val
 675 680 685
 Phe Arg Arg Ile Ser Lys Thr Ser Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser
 690 695 700

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

 770 775 780
 Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp
 785 790 795 800

His Met Lys Arg His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr
805 810 815

Val Gln Glu Arg Thr Ile Ser Phe Lys Asp Asp Gly Lys Tyr Lys Thr
820 825 830

Arg Ala Val Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu
835 840 845

Leu Lys Gly Thr Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys
850 855 860

Leu Glu Tyr Asn Phe Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys
865 870 875 880

Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala Asn Phe Thr Val Arg His Asn Val Glu
885 890 895

Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile
900 905 910

Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln
915 920 925

Thr Val Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Gly Thr Gly Gly Gly Gly
930 935 940

Ser
945

<210> 8

<211> 592

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GFP11x7-P2A-NES-FKBP-iLID-LRP6c(del1-64)

<400> 8

Met Arg Asp His Met Val Leu His Glu Tyr Val Asn Ala Ala Gly Ile
1 5 10 15

Thr Gly Gly Ser Gly Gly Arg Asp His Met Val Leu His Glu Tyr Val
20 25 30

Asn Ala Ala Gly Ile Thr Gly Gly Ser Gly Gly Arg Asp His Met Val
35 40 45

Leu His Glu Tyr Val Asn Ala Ala Gly Ile Thr Gly Gly Ser Gly Gly
 50 55 60
 Arg Asp His Met Val Leu His Glu Tyr Val Asn Ala Ala Gly Ile Thr
 65 70 75 80
 Gly Gly Ser Gly Gly Arg Asp His Met Val Leu His Glu Tyr Val Asn
 85 90 95

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

 165 170 175
 Met Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly Arg Thr Phe
 180 185 190
 Pro Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly Met Leu Glu
 195 200 205
 Asp Gly Lys Lys Phe Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys Pro Phe Lys
 210 215 220
 Phe Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu Glu Gly Val
 225 230 235 240

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

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

305 310 315 320

Asp Ser Phe Leu Gln Leu Thr Glu Tyr Ser Arg Glu Glu Ile Leu Gly

325 330 335

Arg Asn Cys Arg Phe Leu Gln Gly Pro Glu Thr Asp Arg Ala Thr Val

340 345 350

Arg Lys Ile Arg Asp Ala Ile Asp Asn Gln Thr Glu Val Thr Val Gln

355 360 365

Leu Ile Asn Tyr Thr Lys Ser Gly Lys Lys Phe Trp Asn Val Phe His

370 375 380

Leu Gln Pro Met Arg Asp Tyr Lys Gly Asp Val Gln Tyr Phe Ile Gly

385 390 395 400

Val Gln Leu Asp Gly Thr Glu Arg Leu His Gly Ala Ala Glu Arg Glu

405 410 415

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

420 425 430

Asn Asp Glu Asn Tyr Phe Tyr Asp Arg Ala His Val Thr Gly Ala Ser

435 440 445

Ser Ser Ser Ser Ser Ser Thr Lys Gly Thr Tyr Phe Pro Ala Ile Leu

450 455 460

Asn Pro Pro Pro Ser Pro Ala Thr Glu Arg Ser His Tyr Thr Met Glu

465 470 475 480

Phe Gly Tyr Ser Ser Asn Ser Pro Ser Thr His Arg Ser Tyr Ser Tyr

485 490 495

Arg Pro Tyr Ser Tyr Arg His Phe Ala Pro Pro Thr Thr Pro Cys Ser

500 505 510

Thr Asp Val Cys Asp Ser Asp Tyr Ala Pro Ser Arg Arg Met Thr Ser

515 520 525

Val Ala Thr Ala Lys Gly Tyr Thr Ser Asp Leu Asn Tyr Asp Ser Glu

530 535 540

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

545 550 555 560
 Glu Asn Tyr Glu Ser Cys Pro Pro Ser Pro Tyr Thr Glu Arg Ser Tyr
 565 570 575
 Ser His His Leu Tyr Pro Pro Pro Pro Ser Pro Cys Thr Asp Ser Ser
 580 585 590

<210> 9

<211> 1494

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cry2olig

<400> 9

atgaagatgg acaaaaagac tatagtttgg tttagaagag acctaaggat tgaggataat	60
cctgcattag cagcagctgc tcacgaagga tctgtttttc ctgtcttcat ttggtgtcct	120
gaagaagaag gacagtttta tcttgaaga gcttcaagat ggtggatgaa acaatcactt	180
gtcacttat ctcaatcctt gaaggctctt ggatctgacc tcactttaat caaaaccac	240
aacacgattt cagcgatctt ggattgtatc cgcgttaccg gtgctacaaa agtcgtcttt	300
aaccacctct atgatcctgt ttcgtttagt cgggaccata ccgtaaagga gaagctggtg	360
gaacgtggga tctctgtgca aagctacaat ggagatctat tgtatgaacc gtgggagata	420
tactgcgaaa agggcaaacc ttttacgagt ttcaattctt actggaagaa atgcttagat	480
atgtcgattg aatccgttat gcttctcct ccttggcggg tgatgccaat aactgcagcg	540
gctgaagcga ttgggcgtg ttcgattgaa gaactagggc tggagaatga ggccgagaaa	600
ccgagcaatg cgttggtaac tagagcttgg tctccaggat ggagcaatgc tgataagtta	660
ctaaatgagt tcatcgagaa gcagttgata gattatgcaa agaacagcaa gaaagttgtt	720
gggaatagta cttcactact ttctccgtat ctccatttcg gggaaataag cgtcagacac	780
gttttccagt gtccccgat gaaacaaatt atatgggcaa gagataagaa cagtgaagga	840
gaagaaagtg cagatctttt tcttagggga atcggtttaa gagagtattc tcggtatata	900
tgtttcaact tcccgtttac tcacagcaaa tcgttgttga gtcattctcg gtttttcct	960
tgggatgctg atgttgataa gttcaaggcc tggagacaag gcaggaccgg ttatccgttg	1020
gtggatgccg gaatgagaga gctttgggct accggatgga tgcataacag aataagagtg	1080
attgtttcaa gctttgctgt gaagtttctt ctcttccat ggaaatgggg aatgaagtat	1140
ttctgggata cacttttga tgctgatttg gaatgtgaca tccttggctg gcagtatatc	1200

tctgggagta tccccgatgg ccacgagctt gatcgcttgg acaatcccg gttacaaggc 1260
gccaatatg acccagaagg tgagtacata aggcaatggc ttcccagct tgcgagattg 1320
ccaactgaat ggattcatca tccatgggac gctcctttaa ccgtactcaa agcttctggt 1380
gtggaactcg gaacaaacta tgcgaaaccc attgtagaca tcgacacagc tcgtgagcta 1440
ctagctaaag ctatttcaag aaccgtgga gcacagatca tgatcggagc agca 1494

<210> 10

<211> 297

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FRB

<400> 10

atggcttctc gaatcctctg gcatgagatg tggcatgaag gcctggaaga ggcattctgt 60

ttgtactttg gggaaaggaa cgtgaaaggc atgtttgagg tgctggagcc cttgcatgct 120

atgatggaac ggggccccca gactctgaag gaaacatcct ttaatcagc ctatggtcga 180

gatttaatgg aggcccaaga gtggtgcagg aagtacatga aatcaggga tgtcaaggac 240

ctctccaag cctgggacct ctattatcat gtgttccgac gaatctcaa gactagt 297

<210> 11

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FKBP

<400> 11

atgggagtgc aggtggaac catctccca ggagacgggc gcaccttccc caagcgcggc 60

cagacctgcg tgggtgacta caccgggatg ctgaagatg gaaagaaatt tgattcctcc 120

cgggacagaa acaagccctt taagtttatg ctaggcaagc aggaggtgat ccgaggttg 180

gaagaagggg ttgccagat gagtgtgggt cagagagcca aactgactat atctccagat 240

tatgcctatg gtgccactgg gcaccaggc atcatccac cacatgccac tctcgtcttc 300

gatgtggagc ttctaaaact ggaa 324

<210> 12

<211> 447

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> iLID

<400>	12	
atggagtttc tggcaaccac actggaacgg atcgagaaaa atttcgtgat tactgatccg	60	
agactgcctg acaacccaat ctttttgcg agcgattcct tctgcaact gacagaatat	120	
tctcgggaag agatcctggg gcgcaattgc cgttttctgc aaggacccga gacagaccgt	180	
gccactgttc ggaaatcag agatgctatt gacaaccaga ctgaagtgc cgttcagctg	240	
atcaattata ccaagagcgg caagaagttc tggaacgtgt tccacctgca accgatgcgc	300	
gattataagg gcgacgtcca gtacttcatt ggcgtgcagc tggatggcac cgaacgtctt	360	
catggcgccg ctgagcgtga ggcggtctgc ctgatcaaaa agacagcctt tcagattgct	420	
gaggcagcga acgacgaaaa ttacttt	447	
<210>	13	
<211>	654	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	LRP6c	
<400>	13	
aggatgttgt gtccacgtat gaaggagat ggggaaacta tgactaatga ctatgtagtt	60	
catggaccag cttctgtgcc tcttggttat gtccacacc caagttcttt gtcaggatct	120	
cttcaggaa tgagcagagg taaatcaatg atcagctccc tcaglatcat ggggggaagc	180	
agtggacccc cctatgaccg agcccatgtt acaggagcat catcaagtag ttcttcaagc	240	
accaaaggca cttacttccc tgcaattttg aacctccac catccccagc cacagagcga	300	
tcacattaca ctatggaatt tggatattct tcaaacagtc cttccactca taggtcatac	360	
agctacaggc catatagcta ccggcacttt gcacccccca ccacaccctg tagcacagat	420	
gtttgtgaca gtgactatgc tctagtcgg agaatgacct cagtggcaac agccaagggc	480	
tataccagtg acttgaacta tgattcagaa cctgtgcccc cacctccac accccgaagc	540	
caatacttgt cagcagagga gaactatgaa agctgcccac cttctccata cacagagagg	600	
agctattctc atcacctcta cccaccgcca cctctccct gtacagactc ctcc	654	
<210>	14	
<211>	462	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	LRP6c(del1-64)	

<400> 14

tatgaccgag cccatgttac aggagcatca tcaagtagtt cttcaagcac caaaggcact	60
tacttccttg caatittgaa ccctccacca tccccagcca cagagcgatc acattacact	120
atggaatttg gatattcttc aaacagtcct tccactcata ggtcatacag ctacaggcca	180
tatagctacc ggcactttgc accccccacc acaccctgca gcacagatgt ttgtgacagt	240
gactatgctc ctagtggag aatgacctca gtggcaacag ccaagggcta taccagtgc	300
ttgaactatg attcagaacc tgtgccccca cctccacac cccgaagcca atacttgtca	360
gcagaggaga actatgaaag ctgcccacct tctccataca cagagaggag ctattctcat	420

cacctctacc caccgccacc ctctccctgt acagactcct cc	462
--	-----

<210> 15

<211> 2838

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TM-Cry2olig-FRB-P2A-GFP(1-10)

<400> 15

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt	60
gacgaacaaa aactcatctc agaagaggat ctgaatgctg tgggccagga cacgcaggag	120
gtcatcgtgg tgccacactc cttgcccttt aagggtggtg tgatctcagc catcctggcc	180
ctggtggtgc tcaccatcat ctcccttacc atcctcatca tgctttggca gaagaagcca	240

cgtggtggct ctggaggctc cgaggccacc atgaagatgg aaaaaagac tatagtttgg	300
tttagaagag acctaaggat tgaggataat cctgcattag cagcagctgc tcacgaagga	360
tctgtttttc ctgtcttcat ttggtgtcct gaagaagaag gacagtttta tcttgaaga	420
gcttcaagat ggtggatgaa acaatcactt gctcacttat ctcaatcctt gaaggctctt	480
ggatctgacc tcactttaat caaaaccac aacacgattt cagcgatctt ggattgtatc	540
cgcgttaccg gtgctacaaa agtcgtcttt aaccacctct atgacctgt ttcgttagtt	600
cgggaccata ccgtaaagga gaagctggtg gaacgtggga tctctgtgca aagctacaat	660

ggagatctat tgatgaacc gtgggagata tactgcgaaa agggcaaacc ttttacgagt	720
ttcaattctt aciggaagaa atgcttagat atgtcgattg aatccgttat gcttcctcct	780
ccttgccggt tgatgccaat aactgcagcg gctgaagcga tttgggcgtg ttcgattgaa	840
gaactagggc tggagaatga ggccgagaaa ccgagcaatg cgttgttaac tagagcttgg	900
tctccaggat ggagcaatgc tgataagtta ctaaatgagt tcacgagaa gcagttgata	960

gattatgcaa agaacagcaa gaaagtgtt gggaatagta cttcactact ttctccgtat	1020
ctccatttcg gggaaataag cgtcagacac gttttccagt gtgcccggat gaaacaaatt	1080
atatgggcaa gagataagaa cagtgaagga gaagaaagtg cagatctttt tcttagggga	1140
atcggtttta gagagtattc tcggtatata tgtttcaact tcccgtttac tcacgagcaa	1200
tcgttgttga gtcatcttcg gtttttccct tgggatgctg atgttgataa gttcaaggcc	1260
tggagacaag gcaggaccgg ttatccgttg gtggatgccg gaatgagaga gctttgggct	1320
accggatgga tgcataacag aataagagtg attgtttcaa gctttgctgt gaagtttctt	1380
ctccttccat ggaaatgggg aatgaagtat ttctgggata cacttttgga tgctgatttg	1440
gaatgtgaca tccttggtcg gcagtataat tctgggagta tccccgatgg ccacgagctt	1500
gatcgcttgg acaatccgcg gttacaaggc gccaaatatg acccagaagg tgagtacata	1560
aggcaatggc ttcccagctt tgcgagattg ccaactgaat ggattcatca tccatgggac	1620
gctcctttta ccgtactcaa agcttcttgg gtggaactcg gaacaaacta tgcgaaaccc	1680
attgtagaca tcgacacagc tcgtgagcta ctagttaaag ctatttcaag aacccgtgga	1740
gcacagatca tgatcggagc agcactgcag gagctcggtg gaggcggccg catggcttct	1800
cgaatcctct ggcatgagat gtggcatgaa ggcttgggaag aggcatctcg tttgtacttt	1860
ggggaaagga acgtgaaagg catgtttgag gtgctggagc ccttgcattc tatgatggaa	1920
cggggccccc agactctgaa ggaaacatcc tttaatcagg cctatggtcg agatttaatg	1980
gaggcccaag agtgggtcag gaagtacatg aaatcaggga atgtcaagga cctcctcaa	2040
gcctgggacc tctattatca tgtgttccga cgaatctcaa agactagtgg atccggcgct	2100
actaacttca gcctgctgaa gcaggctgga gacgtggagg agaaccctgg acctgaattc	2160
gttaacagat ctatgtccaa aggagaagaa ctgtttaccg gtgttgtgcc aattttggtt	2220
gaactcgatg gtgatgtcaa cggacataag ttctcagtga gaggcgaagg agaaggtgac	2280
gccaccattg gaaaattgac tcttaaattc atctgtacta ctggtaaact tcctgtacca	2340
tggccgactc tcgtaacaac gcttacgtac ggagttcagt gcttttcgag ataccagac	2400
catatgaaaa gacatgactt ttttaagtcg gctatgcctg aaggttacgt gcaagaaaga	2460
acaatttcgt tcaaagatga tggaaaatat aaaactagag cagtgtgtaa atttgaagga	2520
gatactttgg ttaaccgcat tgaactgaaa ggaacagatt ttaaagaaga tggtaatatt	2580
cttggacaca aactcgaata caattttaat agtcataacg tatacatcac tgctgataag	2640
caaaagaacg gaattaaagc gaatttcaca gtacgccata atgtagaaga tggcagtggt	2700

caacttgccg accattacca acaaaacacc cctattggag acggtccggt acttcttcct 2760

gataatcact acctctcaac acaaacagtc ctgagcaaag atccaaatga aaaaggaaca 2820

ggtggcggcg gaagttag 2838

<210> 16

<211> 1779

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GFP11x7-P2A-NES-FKBP-iLID-LRP6c(del1-64)

<400> 16

atgctgacc acatggtcct tcatgagtat gtaaagtctg ctgggattac aggtggctct 60

ggaggtagag atcatatggt tctccacgaa tacgttaacg ccgcaggcat cactggcgg 120

agtggaggac gcgaccatat ggtactacat gaatatgtca atgcagccgg aataaccgga 180

gggtccggag gccgggatca catggtgctg catgagtatg tgaacgcggc ggtataact 240

ggtgggtcgg gcggacgaga ccatatggtg cttcacgaat acgtaaacgc agctggcatt 300

actggcggat caggtggcag ggatcacatg gtactccatg agtacgtgaa cgctgctgga 360

atcacaggcg gtagcggcgg tcgggacat atggtcctgc acgaatatgt caatgctgcc 420

ggtatcaccg gaagcggagc tactaacttc agcctgctga agcaggctgg agacgtggag 480

gagaaccctg gacctcttca acttctcct cttgaacgtc ttactctcat gggagtgcag 540

gtggaacca tctccccagg agacgggcgc accttcccca agcgcggcca gacctgcgtg 600

gtgcactaca ccgggatgct tgaagatgga aagaaatttg attcctcccg ggacagaaac 660

aagcccttta agtttatgct aggcaagcag gaggtgatcc gaggttgga agaaggggtt 720

gccagatga gtgtgggtca gagagccaaa ctgactatat ctcagatta tgcctatggt 780

gccactgggc acccaggcat catccacca catgccactc tcgtcttcga tgtggagctt 840

ctaaaactgg aaggcagcgg cgagctcatg gagtttctgg caaccacact ggaacggatc 900

gagaaaaatt tcgtgattac tgatccgaga ctgcctgaca acccaatcat ttttgcgagc 960

gattccttcc tgcaactgac agaattattct cgggaagaga tcctggggcg caattgccgt 1020

tttctgcaag gaccgagac agaccgtgcc actgttcgga aatcagaga tgctattgac 1080

aaccagactg aagtgaccgt tcagctgac aattatacca agagcggcaa gaagtcttg 1140

aacgtgttcc acctgcaacc gatgcgcgat tataaggcg acgtccagta cttcattggc 1200

gtgcagctgg atggcacga acgtcttcat ggcccgctg agcgtgaggc ggtctgcctg 1260

atcaaaaaga cagccttca gattgctgag gcagcgaacg acgaaaatta cttttatgac 1320

cgagcccatg ttacaggagc atcatcaagt agttcttcaa gcaccaaagg cacttacttc	1380
cctgcaattt tgaaccctcc accatcccca gccacagagc gatcacatta cactatggaa	1440
tttggatatt cticaaacag tccttccact cataggcat acagctacag gccatatagc	1500
taccggcact ttgcaccccc caccacacc tgcagcacag atgtttgtga cagtgactat	1560
gctcctagtc ggagaatgac ctcagtggca acagccaagg gctataccag tgacttgaac	1620
tatgattcag aacctgtgcc cccacctccc acaccccgaa gccaatactt gtcagcagag	1680
gagaactatg aaagctgccc accttctcca tacacagaga ggagctattc tcacacctc	1740
taccaccgc caccctctcc ctgtacagac tcctcctag	1779