

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

Zveřejněná podle §31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2015-654

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **23.09.2015**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **31.05.2017**
(Věstník č. 22/2017)

C12N 15/62 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
C12N 15/54 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
C12Q 1/48 (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
C07K 14/465 (2006.01)
C07K 14/82 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)

- (71) Přihlašovatel:
Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká
fakulta, Praha 1, CZ
- (72) Původce:
doc. RNDr. Daniel Rósel, Ph.D., Praha 11, CZ
doc. RNDr. Jan Brábek, Ph.D., Praha 4, CZ
- (74) Zástupce:
KOREJZOVÁ & SPOL., v.o.s., JUDr. Petra
KOREJZOVÁ, Korunní 810/104E, 101 00 Praha 10
- Vinohrady

(54) Název přihlášky vynálezu:
**Rekombinantní proteinový biosenzor kinázy Src,
nukleová kyselina, buněčná linie a
použití**

(57) Anotace:
Rekombinantní proteinový biosenzor kinázy Src,
nukleová kyselina, buněčná linie a použití biosenzoru
kinázy Src pro testování účinku chemických látek
ovlivňujících aktivitu protoonkoproteinu Src a pro
analýzy lokalizace a aktivity Src v živých buňkách.
Biosenzor je tvořen samotnou kinázou Src, do které jsou
vložené fluorofory, které umožní monitorování její
aktivity Src pomocí měření metodikou FRET.

CZ 2015 - 654 A3

Rekombinantní proteinový biosenzor kinázy Src, nukleová kyselina, buněčná linie a použití

Oblast techniky

Vynález poskytuje biosenzor kinázy Src, který je tvořen samotnou kinázou Src, do které jsou na specifických místech vloženy fluorofory, které umožní monitorování její aktivity pomocí měření metodikou FRET. Vynález dále poskytuje použití nového biosenzoru kinázy Src při způsobu testování účinku chemických látek ovlivňujících aktivitu protoonkoproteinu Src a způsob analýzy lokalizace a aktivity kináz rodiny Src v živých buňkách.

Dosavadní stav techniky

Kináza Src je významný protoonkoprotein, který se účastní regulace řady buněčných dějů, jako jsou například migrace buněk, proliferace, diferenciacíe a adheze. Aktivita kinázy Src je zvýšená u řady typů rakovin a je často spojována s větší schopností nádorových buněk invadovat do zdravých tkání a vytvářet tam metastáze. Proces aktivace kinázy Src je spojen se strukturálními změnami. Neaktivovaná kináza Src zaujímá velmi kompaktní konformaci danou intramolekulárními interakcemi. Oslabením těchto vazeb je struktura Src značně rozvolněna a vede k aktivaci Src.

Pro vizualizaci aktivity kináz rodiny Src v buňce byly navrženy dva typy biosenzorů využívající FRET. První typ využívá specifickou peptidovou sekvenci, která představuje fosforylační substrát pro Src kinázu a fosfovazebnou doménu (Ting,A.Y., Kain,K.H., Klemke,R.L., and Tsien,R.Y. (2001). Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 98, 15003-15008.; Wang,Y., Botvinick,E.L., Zhao,Y., Berns,M.W., Usami,S., Tsien,R.Y., and Chien,S. (2005). Nature 434, 1040-1045.). Fosforylace příslušné sekvence kinázou z rodiny Src (SFK) vede k intramolekulární vazbě s fosfovazebnou doménou. Tato vazba je sledována jako zvýšení FRET mezi fluorofory připojenými k fosforylačnímu substrátu a fosfovazebné doméně.

Nevýhodou nutně spojenou s biosenzory založenými na fosforylaci substrátu je nespecifický signál pocházející z fosforylace příslušného substrátu i jinými kinázami přítomnými ve vzorku. Nemohou být ani použity k analýze strukturních změn spojených s aktivací Src ani

k získání informací o dynamice a lokalizaci Src, protože jejich aktivita a vnitrobuněčná lokalizace není přímo závislá na struktuře nebo lokalizaci Src.

Druhý známý typ biosenzorů kináz rodiny Src využívá konformační změny během jejich aktivace. Paster a kol. publikovali biosenzor kinázy Lck, která patří do rodiny SFK a využívá právě konformačních změn doprovázejících aktivaci SFK (Paster, W., Paar, C., Eckerstorfer, P., Jakober, A., Drbal, K., Schutz, G.J., Sonnleitner, A., and Stockinger, H. (2009). *J. Immunol.* 182, 2160-2167.). Autoři vložili do molekuly kinázy Src fluorofory CFP a YFP na C-konec a do smyčky spojující SH3 a SH2 doménu a s pomocí tohoto biosenzoru byli schopni vizualizovat dynamiku aktivace kinázy Lck po stimulaci T-receptoru (Stirnweiss, A., Hartig, R., Gieseler, S., Lindquist, J.A., Reichardt, P., Philipsen, L., Simeoni, L., Poltorak, M., Merten, C., Zuschratter, W., Prokazov, Y., Paster, W., Stockinger, H., Harder, T., Gunzer, M., and Schraven, B. (2013). *Sci. Signal.* 6, ra13.).

U biosenzoru Lck je jeden z fluoroforů umístěn na C-konci molekuly. Druhý fluorofor je v případě Lck biosenzoru umístěn mezi domény SH2 a SH3. Toto umístění druhého fluoroforu by v případě kinázy Src nebylo funkční, protože tato oblast je u kinázy Src, na rozdíl od kinázy Lck, důležitá pro komunikaci mezi SH2 a SH3 doménou a narušení struktury této oblasti vede k nefyziologické aktivaci Src (Young, M.A., Gonfloni, S., Superti-Furga, G., Roux, B., and Kuriyan, J. (2001). *Cell* 105, 115-126.). Biosenzor kinázy Lck lze z podstaty jeho konstrukce použít pouze pro analýzu aktivace Lck a design tohoto biosenzoru z důvodu umístění fluoroforu do oblasti mezi SH3 a SH2 doménu navíc nelze použít pro vytvoření funkčního biosenzoru Src.

V současnosti tedy není k dispozici funkční biosenzor kinázy Src umožňující snadné monitorování její aktivity a dostatečně specifický pro testování účinku například chemických látek ovlivňujících aktivitu protoonkoproteinu Src. Je proto nutné nalézt takové vhodné fluorofory a jejich specifické umístění v sekvenci kinázy Src, které by svým prostorovým umístěním v neaktivní a aktivní molekule neovlivňovaly specifitu a průběh aktivace a umožnily snadnou detekci rozvolnění struktury kinázy Src při její aktivaci.

Podstata vynálezu

Předkládaný nový biosenzor kinázy Src využívá strukturních změn během aktivace Src. Základem biosenzoru je molekula Src, do jejíž sekvence jsou vloženy modrozelená a žlutá

varianta zeleného fluorescenčního proteinu (GFP) tak, aby neovlivnily strukturu Src. Měření vzdálenosti obou fluoroforů pomocí Försterova rezonančního přenosu (FRET) pak umožňuje sledovat míru kompaktace struktury biosenzoru Src a tím i jeho míru aktivace.

Předkládaný biosenzor kinázy Src využívá konformačních změn doprovázejících aktivaci SFK podobně jako biosenzor Lck. S Lck biosenzorem sdílí umístění jednoho z fluoroforů na C-konec molekuly. Hlavním rozdílem je umístění druhého fluoroforu, který je v případě Lck biosenzoru umístěn mezi SH2 a SH3 doménu.

Na rozdíl od výše uvedených biosenzorů prvního typu založených na fosforylaci substrátu není předkládaný biosenzor kinázy Src náchylný k tvorbě nespecifického signálu pocházejícího z fosforylace jinými kinázami. Navíc může být použit k analýze strukturálních změn spojených s aktivací Src a poskytne zároveň i informaci o dynamice a lokalizaci Src.

Základem předmětného biosenzoru kinázy Src je cDNA sekvence kódující kinázu Src kura domácího (*Gallus gallus*, NCBI Reference Sequence: NP_990788.2). Unikátnost biosenzoru je především dána sekvencí linker peptidů strukturálně oddělující fluorofory od samotné molekuly kinázy Src, specifickým umístěním fluoroforů do sekvence kinázy Src a použitím monomerních forem modrozelené a žluté varianty GFP jako fluoroforu (nukleotidová sekvence biosenzoru SEQ ID NO. 1, odpovídající proteinová sekvence biosenzoru SEQ ID NO. 2).

Fluorofor mCFP (Zacharias DA, Violin JD, Newton AC, Tsien RY. Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science*. 2002 May 3;296(5569):913-6.) je pomocí dvou linker peptidů č. 1 (SEQ ID NO. 3) a č. 2 (SEQ ID NO. 4) vložen mezi aminokyseliny na pozici 208 (Asp) a 209 (Ser). Fluorofor mCit (Griesbeck O, Baird GS, Campbell RE, Zacharias DA, Tsien RY. Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein. Mechanism and applications. *J Biol Chem*. 2001 Aug 3;276(31):29188-94) je vložen za poslední aminokyselinu sekvence Src (Leu, 533) pomocí linker peptidu č. 3 (SEQ ID NO. 5).

Předkládaný biosenzor kinázy Src předchází výše popsaným problémům s umístěním fluoroforu do oblasti mezi SH3 a SH2 doménou u biosenzoru Lck vložením fluoroforu do smyčky ve struktuře SH2 domény, která směřuje ven z kompaktní struktury Src (viz Obr. 1 a 2). Pro vložení fluoroforu do SH2 domény jsou použity 8 a 11 aminokyselin dlouhé linkery s opakující se repeticí Gly-Gly-Ser, které oddělují fluorofor od struktury SH2 domény. V rámci přípravy biosenzoru byly testovány dvě série linkerů o různé délce a délka 8 a 11

aminokyselin se ukázala jako nejvhodnější. Při použití kratší (3 aminokyseliny) délky linkerů dochází k deregulaci kinázy. Jako fluorofory byly použity deriváty GFP; a to modrozelený mCFP a žlutý mCit. K zabránění případné dimerizace GFP variant, která by mohla zkreslit výsledky, byly použity monomerické varianty těchto proteinů.

Kompaktní, inaktivní konformace biosenzoru Src vede k vysokému FRET mezi mCFP a mCit. Po aktivaci se struktura kinázy Src rozvolní a dojde k poklesu FRET (viz. Obr. 2).

Podstatou předkládaného vynálezu je tedy rekombinantní proteinový biosenzor kinázy Src, který má sekvenci SEQ ID NO: 2 nebo alespoň 90% identitu sekvence s proteinem se SEQ ID NO: 2.

Dalším předmětem vynálezu je nukleová kyselina kódující výše uvedený rekombinantní proteinový biosenzor kinázy Src, nebo k ní komplementární sekvence, nebo její varianta kódující v důsledku degenerace genetického kódu stejnou aminokyselinovou sekvenci. Ve specifickém provedení má tato nukleová kyselina sekvenci SEQ ID NO: 1.

Další předmět vynálezu je buněčná linie založená na linii SYF (ATCC: CRL-2459™) stabilně exprimující biosenzor kinázy Src.

Vynález se také týká použití nového biosenzoru kinázy Src pro testování účinku chemických látek na aktivitu kinázy Src.

Ve výhodném provedení jde o použití biosenzoru kinázy Src při způsobu stanovení aktivity chemické látky vůči kináze Src ex vivo, při kterém se buňky exprimující uvedený biosenzor kinázy Src inkubují s chemickou látkou a metodou Försterova rezonančního přenosu neboli FRET se stanoví změna stavu aktivace biosenzoru způsobená touto chemickou látkou.

Vynález se dále týká použití nového biosenzoru kinázy Src pro analýzu vlivu chemických látek na lokalizaci a aktivitu Src, prováděnou na živých buňkách a detekovanou v reálném čase.

Ve výhodném provedení jde o použití biosenzoru kinázy Src při způsobu stanovení lokalizace a aktivity kinázy Src v živé buňce, při kterém se analyzovaná buněčná linie nejprve transfekuje expresním vektorem obsahujícím sekvenci kódující biosenzor a následně se sleduje lokalizace a aktivace biosenzoru kinázy Src metodou FRET, například metodou senzitivované emise akceptoru nebo metodou měření doby života fluorescence neboli FLIM.

Podle vynálezu je také možné použití biosenzoru kinázy Src při způsobu stanovení přítomnosti chemických látek s aktivitou vůči kináze Src schopných pronikat do buněk v

biologickém vzoru *ex vivo*, při kterém se buňka exprimující rekombinantní biosenzor kinázy Src ponechá reagovat se vzorkem a metodou FRET se stanoví změna stavu aktivace biosenzoru způsobená vzorkem.

Chemickou látkou se zde rozumí jakákoli látka, která by mohla mít inhibiční, popř. aktivační účinek na kinázu Src. Výhodně se z hlediska možného terapeutického použití jedná o inhibitory, nejvýhodněji nízkomolekulární (≤ 10 kDa) inhibitory kinázy Src. Příkladem mohou být přírodní i syntetické organické sloučeniny s protirakovinným účinkem, popř. i nízkomolekulární peptidy.

Způsob analýzy aktivity chemických látek *ex vivo* se obecně může provádět tak, že na buňky produkující biosenzor Src podle vynálezu se po určitou dobu působí látkou, jejíž aktivita se testuje. Následně se stanoví metodou FRET, zda biosenzor Src je v aktivovaném (rozvolněném, snížený FRET) nebo neaktivovaném (kompaktním, zvýšený FRET) stavu.

Měření se nejvýhodněji, ale bez omezení provádí metodou Försterova rezonančního přenosu, FRET. V příkladech je používána metoda měření FRET s pomocí fluorimetru založená na měření senzitivované emise akceptoru. Dalším typem měření je měření pomocí časově rozlišené fluorescence, kdy se počítá doba života fluorescence a z ní se následně dá dopočítat efektivita FRET.

Vynález dále popisuje způsob analýzy aktivity proteinů *ex vivo*, specificky způsob testování účinku chemických látek ovlivňujících aktivitu protoonkoproteinu Src a způsob analýzy lokalizace a aktivity kináz rodiny Src v živých buňkách.

Objasnění výkresů

Obr. 1 zachycuje strukturu kinázy Src v inaktivním stavu s vyznačením důležitých oblastí proteinu. Modely byly vytvořeny podle struktury Src (PDB databáze: 1FMK)

Obr. 2 zachycuje mechanismus měření aktivity kinázy Src pomocí biosenzoru. V inaktivním stavu zaujímá kináza Src kompaktní konformaci (vlevo) a biosenzor dává silný FRET signál, v aktivním stavu je kináza Src v otevřené konformaci (vpravo) a biosenzor dává slabý FRET signál. Linkery mezi fluorofory a kinázou nejsou ukázány. Modely byly vytvořeny podle struktur z PDB databáze (1FMK, 1Y57, 2H5P, 1F0B).

Obr. 3 je graf znázorňující reprezentativní emisní spektra Src biosenzoru měřená v buněčném lyzátu při excitační vlnové délce 430 nm (excitační maximum mCFP). UT – buňky neindukované, EGF – buňky indukované EGF, LPA – buňky indukované LPA.

Obr. 4 Relativní FRET vztažený na hodnotu FRET neindukovaných buněk a počítaný jako poměr emise při 530 nm (emisní maximum mCit) a 480 nm (emisní maximum mCFP). Graf udává průměr ze 3 nezávislých experimentů analyzovaných v triplikátech. Chybové úsečky představují směrodatnou odchylku. Hodnota “p” udává statistickou významnost vypočítanou pomocí Studentova t-testu. UT – buňky neindukované, EGF – buňky indukované EGF, LPA – buňky indukované LPA.

Obr. 5 znázorňuje reprezentativní emisní spektra Src biosenzoru měřená při excitační vlnové délce 430 nm. UT – buňky kontrolní, Das – buňky, na které bylo působeno 100 nM Dasatinibem.

Obr. 6 Relativní FRET vztažený na hodnotu FRET kontrolních buněk a počítaný jako poměr emise při 530 nm a 480 nm. Graf udává průměr ze 3 nezávislých experimentů analyzovaných v triplikátech. Chybové úsečky představují směrodatnou odchylku. Hodnota “p” udává statistickou významnost vypočítanou pomocí Studentova t-testu. UT – buňky kontrolní, Das – buňky, na které bylo působeno 100 nM Dasatinibem.

Obr. 7 ukazuje lokalizaci Src biosenzoru (fluorescence mCFP; zelená barva) v SYF buňkách.

Obr. 8 ukazuje míru aktivace Src biosenzoru v živých buňkách linie SYF. Aktivita biosenzoru je sledována měřením FRET pomocí metody využívající měření doby života fluorescence mCFP (frequency domain FLIM). Zvýšená aktivita biosenzoru daná nižším FRET odpovídá zvýšení doby života fluorescence mCFP (barevná škála vlevo; [ns]). Zvýšená aktivita Src je viditelná jako světlé body odpovídající době života fluorescence ca 2.8 ns na krajích buněk v tzv. fokálních adhezích, tj. buněčných strukturách zodpovědných za adhezi buněk k podkladu.

Příklady uskutečnění vynálezu

Příklad 1 Příprava buněčné linie SYF stabilně exprimující biosenzor kinázy Src.

a. Produkce virionů v pakovacích Phoenix E buňkách:

5×10^8 Phoenix E (ATCC: CRL-3214™) buněk bylo pomocí polyethyleniminu transfekováno 12 μg plasmidové DNA (vektor pMSCVpuro se zaklonovaným biosenzorem kinázy Src). Třetí den po transfekci byly po 12 hod inkubace buněk v čerstvém mediu sklizeny vyprodukované viriony.

b. Vlastní příprava buněčné linie SYF stabilně exprimující biosenzor kinázy Src:

K adherovaným buňkám linie SYF (konfluence 80%) bylo přidáno přečištěné (centrifugace 15 min, 400 x g) médium s viriony produkovanými ve Phoenix E buňkách (viz. bod 1 výše). Infikované SYF buňky byly následně selektovány v mediu s puromycinem (0,7 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Po 14 dnech selekce byly buňky sortovány pomocí buněčného sorteru FACS na pozitivitu na mCít fluorescenční signál. Takto připravené buňky vykazovaly stabilní expresi biosenzoru kinázy Src.

Příklad 2. Analýza aktivace kinázy Src

Buňky linie SYF (mají inaktivované geny pro SFK kinázy Src, Yes a Fyn; ATCC: CRL-2459™) stabilně transfekované Src biosenzorem byly aktivovány Epidermálním růstovým faktorem (EGF, 100 ng/ml) po dobu 24 hod nebo kyselinou lyzofosfatidovou (LPA, 10 μM) po dobu 10 min. Následně byly lyzovány a v lyzátu byla stanovena míra FRET Src biosenzoru. Snížení FRET odpovídá rozvolnění struktury biosenzoru a tedy jeho aktivaci. Znázorněno na obr. 3 a 4.

Příklad 3. Analýza inhibice kinázy Src in vitro

Buňky linie SYF stabilně transfekované Src biosenzorem byly inkubovány po dobu 30 min v přítomnosti 100nM Dasatinibu (Bristol-Myers Squibb) a následně byla v jejich buněčném lyzátu stanovena míra FRET Src biosenzoru. Zvýšení FRET odpovídá kompaktaci struktury biosenzoru a tedy jeho inhibici. Analýza inhibice kinázy Src in vitro je znázorněna na obr. 5 a 6.

Příklad 4. Analýza lokalizace a aktivace inhibice Src v živých buňkách

Analýza lokalizace je znázorněna na obr. 7. Míra aktivace Src biosenzoru v živých buňkách linie SYF je znázorněna na obr. 8. Aktivita biosenzoru je sledována měřením FRET pomocí metody využívající měření doby života fluorescence mCFP (frequency domain FLIM). Zvýšená aktivita biosenzoru daná nižším FRET odpovídá zvýšení doby života fluorescence mCFP. Zvýšená aktivita Src je viditelná na krajích buněk v tzv. fokálních adhezích, tj. buněčných strukturách zodpovědných za adhezi buněk k podkladu.

Průmyslová využitelnost

Biosenzor kinázy Src podle vynálezu je využitelný především pro testování vlivu chemických látek, zejména nízkomolekulárních organických sloučenin, popř. peptidů, na aktivitu kinázy Src. To je zásadní informace pro oblast lékařství, protože inhibitory kinázy Src jsou schopné inhibovat motilitu a invazivitu nádorových buněk a v konečném důsledku tak bránit jejich metastazování. Biosenzor kinázy Src je rovněž použitelný pro sledování lokalizace aktivity kinázy Src v buňkách, včetně dynamiky této lokalizace. Použitím biosenzoru lze tedy získat nové poznatky o kinázou Src zprostředkované signalizaci, která má zásadní význam pro většinu základních buněčných dějů a za patologických podmínek i pro nádorovou progresi.

Sequence Listing

SEQ ID NO. 1 (DNA sekvence biosenzoru)

Pozice jednotlivých funkčních úseků:

625-648 sekvence kódující linker peptid č. 1

649-1344 sekvence kódující mCFP

1345-1377 sekvence kódující linker peptid č. 2

2353-2373 sekvence kódující linker peptid č. 3

2374-3090 sekvence kódující mCit

atgggtagta	gcaagagcaa	gcctaaggac	cccagccagc	gccggcgag	cctggagcca	60
cccgcacagca	cccaccacgg	gggattccca	gcctcgcaga	cccccaaca	gacagcagcc	120
cccgacacgc	accgcacccc	cagccgctcc	tttgggaccg	tggccaccga	gccaagctc	180
ttcgggggct	tcaacacttc	tgacaccgctc	acgtcgcgc	agcgtgccc	ggcactggct	240
ggcggcgctca	ccactttcgt	ggctctctac	gactacgagt	cccggactga	aacggacttg	300
tccttcaaga	aaggagaacg	cctgcagatt	gtcaacaaca	cgggaaggtga	ctggtggtg	360
gctcattccc	tactacagg	acagacgggc	tacatcccca	gtaactatgt	cgcgcctca	420
gactccatcc	aggctgaaga	gtggtacttt	gggaagatca	ctcgtcggga	gtccgagcgg	480
ctgctgctca	accccgaaaa	cccccgggga	accttcttgg	tccgggagag	cgagacgaca	540
aaaggtgcct	attgcctctc	cgtttctgac	tttgacaacg	ccaaggggct	caatgtgaag	600
cactacaaga	tcgcgaagct	ggacgtcggg	agcggaggta	gtggtggaat	ggtgagcaag	660
ggcgaggagc	tgttcaccgg	ggtggtgcc	atcctggctc	agctggacgg	cgacgtaaac	720
ggccacaggt	tcagcgtgtc	cggcaggggc	gagggcgatg	ccacctacgg	caagctgacc	780
ctgaagttca	tctgcaccac	cggcaagctg	cccgtgccct	ggccccacct	cgtgaccacc	840
ctgacctggg	gcgtgcagtg	cttcagccgc	taccocgacc	acatgaagca	gcacgacttc	900
ttcaagtccg	ccatgcccga	aggctacgtc	caggagcgtg	ccatcttctt	caaggacgac	960
ggcaactaca	agaccgcgc	cgaggtgaag	ttcgaggggc	acaccctggt	gaaccgcatc	1020
gactctgaag	gcactgactt	caaggaggac	ggcaacatcc	tggggcaca	gctggagtac	1080
aactacaatca	gccacaacgt	ctatatcacc	gccgacaagc	agaagaacgg	catcaaggcc	1140
cacttcaaga	tcgcccaaca	catcgaggac	ggcagcgtgc	agctcgcgga	ccactaccag	1200
cagaacaccc	ccatcggcga	cggccccgtg	ctgctgccc	acaaccacta	cctgagcacc	1260
cagtccaagc	tgagcaaaga	ccccaacgag	aagcgcgac	acatggtcct	gctggagttc	1320
gtgaccgccc	ccgggatcac	tctcggcggg	agtggtagcg	gcagtggagg	tgacgtcagc	1380
ggcggcttct	acatcacctc	acgcacacag	ttcagcagcc	tgacgagct	ggtggcctac	1440
tactccaaac	atgetgatgg	cttgtgccac	cgcctgacca	acgtctgccc	cacgtccaag	1500
ccccagaccc	agggactcgc	caaggacgcg	tgggaaatcc	cccgggagtc	gctgcccgtg	1560
gaggtgaagc	tggggcaggg	ctgctttgga	gaggtctgga	tggggacctg	gaaccggcacc	1620
accagagtgg	ccataaagac	tctgaagccc	ggcaccatgt	ccccggaggc	cttccctcag	1680
gaagcccga	tgatgaagaa	gctccggcat	gagaagctgg	ttcagctgta	cgcagtgggtg	1740
tcggaagagc	ccatctacat	cgtcactgag	tacatgagca	aggggagcct	cctggatttc	1800
ctgaaggagg	agatgggcaa	gtacctgccc	ctgccacagc	tcgtcgatat	ggctgctcag	1860
attgcatccg	gcatggccta	tgtggagagg	atgaactacg	tgaccgaga	cctgcccggcg	1920
gccaacatcc	tgttggggga	gaacctggtg	tgcaaggtgg	ctgactttgg	gctggcacgc	1980
ctcatcgagg	acaacgagta	cacagcacgg	caaggtgcca	agttccccat	caagtgagca	2040
gcccccgagg	cagccctcta	tggccggttc	accatcaagt	cggatgtctg	gtccttcggc	2100
atcctgctga	ctgagctgac	caccaagggc	cgggtgccat	acccagggat	ggtcaacagg	2160
gaggtgctgg	accaggtgga	gaggggctac	cgcctgccc	gcccggccga	gtgcccggag	2220
tcgctgcatg	acctcatgtg	ccagtgtggt	cgggaaggacc	ctgaggagcg	gcccactttt	2280
gagtagctag	aggccttctc	ggaggactac	ttcacctcga	cagagcccca	gtaccagcct	2340
ggagagaacc	tagaattcgg	tggcagtgga	gggatggtga	gcaagggcga	ggagctgttc	2400
accgggggtg	tgcccatcct	ggtcgagctg	gacggcgacg	taaacggcca	caagttcagc	2460
gtgtccggcg	agggcgaggg	cgatgccacc	tacggcaagc	tgacctgaa	gttcatctgc	2520
accaccggca	agctgcccgt	gccctggccc	accctcgtga	ccaccttcgg	ctaccggcctg	2580
atgtgcttcg	cccgtacc	cgaccacatg	aagcagcacg	acttcttcaa	gtccgcatg	2640
ccggaaggct	acgtccagga	gcgaccatc	ttcttcaagg	acgacggcaa	ctacaagacc	2700
cgcgcccagg	tgaagttcga	gggcgacacc	ctggtgaacc	gcactgagct	gaagggcatc	2760

```

gacttcaagg aggacggcaa catcctgggg cacaagctgg agtacaacta caacagccac 2820
aacgtctata tcatggccga caagcagaag aacggcatca aggtgaactt caagatccgc 2880
cacaacatcg aggacggcag cgtgcagctc gccgaccact accagcagaa caccccatc 2940
ggcgacggcc ccgtgctgaa gcccgacaac cactacctga gctaccagtc cgccctgagc 3000
aaagaccca acgagaagcg cgatcacatg gtccctgaagg agttcgtgac cgccgccggg 3060
atcactctcg gcatggacga gctgtacaag tag 3094

```

SEQ ID NO. 2 (proteinová sekvence biosenzoru)

Pozice jednotlivých funkčních úseků:

209-216 linker peptid č. 1 (Val-Gly-Ser-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly)

217-448 mCFP

449-459 linker peptid č. 2 (Gly-Gly-Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-Gly-Gly-Asp-Val)

786-791 linker peptid č. 3 (Glu-Phe-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly)

792-1030 mCit

```

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

```

Val Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu
 210 215 220
 Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn
 225 230 235 240
 Gly His Arg Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr
 245 250 255
 Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val
 260 265 270
 Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Trp Gly Val Gln Cys Phe
 275 280 285
 Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala
 290 295 300
 Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp
 305 310 315 320
 Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu
 325 330 335
 Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn
 340 345 350
 Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Ile Ser His Asn Val Tyr
 355 360 365
 Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala His Phe Lys Ile
 370 375 380
 Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln
 385 390 395 400
 Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His
 405 410 415
 Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Lys Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg
 420 425 430
 Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu
 435 440 445
 Gly Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gly Asp Val Ser Gly Gly Phe Tyr
 450 455 460
 Ile Thr Ser Arg Thr Gln Phe Ser Ser Leu Gln Gln Leu Val Ala Tyr
 465 470 475 480
 Tyr Ser Lys His Ala Asp Gly Leu Cys His Arg Leu Thr Asn Val Cys
 485 490 495
 Pro Thr Ser Lys Pro Gln Thr Gln Gly Leu Ala Lys Asp Ala Trp Glu
 500 505 510

Ile Pro Arg Glu Ser Leu Arg Leu Glu Val Lys Leu Gly Gln Gly Cys
 515 520 525

Phe Gly Glu Val Trp Met Gly Thr Trp Asn Gly Thr Thr Arg Val Ala
 530 535 540

Ile Lys Thr Leu Lys Pro Gly Thr Met Ser Pro Glu Ala Phe Leu Gln
 545 550 555 560

Glu Ala Gln Val Met Lys Lys Leu Arg His Glu Lys Leu Val Gln Leu
 565 570 575

Tyr Ala Val Val Ser Glu Glu Pro Ile Tyr Ile Val Thr Glu Tyr Met
 580 585 590

Ser Lys Gly Ser Leu Leu Asp Phe Leu Lys Gly Glu Met Gly Lys Tyr
 595 600 605

Leu Arg Leu Pro Gln Leu Val Asp Met Ala Ala Gln Ile Ala Ser Gly
 610 615 620

Met Ala Tyr Val Glu Arg Met Asn Tyr Val His Arg Asp Leu Arg Ala
 625 630 635 640

Ala Asn Ile Leu Val Gly Glu Asn Leu Val Cys Lys Val Ala Asp Phe
 645 650 655

Gly Leu Ala Arg Leu Ile Glu Asp Asn Glu Tyr Thr Ala Arg Gln Gly
 660 665 670

Ala Lys Phe Pro Ile Lys Trp Thr Ala Pro Glu Ala Ala Leu Tyr Gly
 675 680 685

Arg Phe Thr Ile Lys Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Ile Leu Leu Thr
 690 695 700

Glu Leu Thr Thr Lys Gly Arg Val Pro Tyr Pro Gly Met Val Asn Arg
 705 710 715 720

Glu Val Leu Asp Gln Val Glu Arg Gly Tyr Arg Met Pro Cys Pro Pro
 725 730 735

Glu Cys Pro Glu Ser Leu His Asp Leu Met Cys Gln Cys Trp Arg Lys
 740 745 750

Asp Pro Glu Glu Arg Pro Thr Phe Glu Tyr Leu Gln Ala Phe Leu Glu
 755 760 765

Asp Tyr Phe Thr Ser Thr Glu Pro Gln Tyr Gln Pro Gly Glu Asn Leu
 770 775 780

Glu Phe Gly Gly Ser Gly Gly Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe
 785 790 795 800

Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly
 805 810 815

His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Rekombinantní proteinový biosenzor kinázy Src, který má sekvenci SEQ ID NO: 2 nebo alespoň 90% identitu sekvence s proteinem se SEQ ID NO: 2.
2. Nukleová kyselina kódující rekombinantní proteinový biosenzor kinázy Src podle nároku 1, nebo k ní komplementární sekvence, nebo její varianta kódující v důsledku degenerace genetického kódu stejnou aminokyselinovou sekvenci.
3. Nukleová kyselina podle nároku 2, která má sekvenci SEQ ID NO: 1.
4. Buněčná linie založená na linii SYF (ATCC: CRL-2459™) stabilně exprimující biosenzor kinázy Src.
5. Použití biosenzoru kinázy Src podle nároku 1 pro testování účinku chemických látek na aktivitu kinázy Src.
6. Použití podle nároku 5 při způsobu stanovení aktivity chemické látky vůči kináze Src ex vivo, při kterém se buňky exprimující biosenzor kinázy Src podle nároku 1 inkubují s chemickou látkou, a metodou Försterova rezonančního přenosu, FRET, se stanoví změna stavu aktivace biosenzoru způsobená touto chemickou látkou.
7. Použití biosenzoru kinázy Src podle nároku 1 pro analýzu vlivu chemických látek na lokalizaci a aktivitu Src, prováděnou na živých buňkách a detekovanou v reálném čase.
8. Použití podle nároku 7 při způsobu stanovení lokalizace a aktivity kinázy Src v živé buňce, při kterém se analyzovaná buněčná linie nejprve transfekuje expresním vektorem s biosenzorem a následně se sleduje lokalizace a aktivace biosenzoru kinázy Src podle nároku 1 metodou

FRET, zejména metodou senzitivované emise akceptoru nebo metodou měření doby života fluorescence, FLIM.

9. Použití biosenzoru kinázy Src podle nároku 1 při způsobu stanovení přítomnosti chemických látek s aktivitou vůči kináze Src schopných pronikat do buněk v biologickém vzoru ex vivo, při kterém se buňka exprimující rekombinantní peptidový biosenzor kinázy Src podle nároku 1 ponechá reagovat se vzorkem a metodou FRET se stanoví změna stavu aktivace biosenzoru způsobená vzorkem.
10. Použití podle nároku 5, 6 nebo 9, kde chemickou látkou je inhibitor, zejména, inhibitor kinázy Src s molekulární hmotností ≤ 10 kDa.

PT11894CZ Sekvence

Přehled sekvencí

<110> Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
 <120> Biosenzor kinázy Src pro testování inhibitorů a analýzu aktivity Src ex vivo
 <160> 5

<210> 1
 <211> 3094
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> DNA sekvence Src kura domácího (Gallus gallus) s vloženými sekvencemi mCFP a mCit oddělených od sekvence Src pomocí tří linker peptidů

<400> 1

atgggtagta	gcaagagcaa	gcctaaggac	cccagccagc	gccggcgag	cctggagcca	60
cccagacagca	cccaccacgg	gggattccca	gcctcgcaga	cccccaacaa	gacagcagcc	120
cccagacagc	accgcacccc	cagccgctcc	tttgggaccg	tggccaccga	gccaagctc	180
ttcgggggct	tcaacacttc	tgacaccgtc	acgtcggcgc	agcgtgccgg	ggcactggct	240
ggcggcgta	ccactttcgt	ggctctctac	gactacgagt	cccggactga	aacggacttg	300
tccttcaaga	aaggagaacg	cctgcagatt	gtcaacaaca	cggaaagtga	ctgggtggctg	360
gctcattccc	tactacagg	acagacgggc	tacatcccca	gtaactatgt	cgcgccctca	420
gactccatcc	aggctgaaga	gtggtacttt	gggaagatca	ctcgtcggga	gtccgagcgg	480
ctgctgctca	accccgaaaa	cccccgggga	accttcttgg	tccgggagag	cgagacgaca	540
aaaggtgcct	attgcctctc	cgtttctgac	tttgacaacg	ccaaggggct	caatgtgaag	600
cactacaaga	tccgcaagct	ggacgtcggg	agcggaggta	gtggtggaat	ggtgagcaag	660
ggcgaggagc	tgttcaccgg	ggtggtgcc	atcctggctg	agctggacgg	cgacgtaaac	720
ggccacaggt	tcagcgtgtc	cggcgagggc	gagggcgatg	ccacctacgg	caagctgacc	780
ctgaagttca	tctgcaccac	cggcaagctg	cccgtgccct	ggcccaccct	cgtagaccacc	840
ctgacctggg	gcgtgcagtg	cttcagccgc	taccccgacc	acatgaagca	gcacgacttc	900
ttcaagtccg	ccatgcccga	aggctacgtc	caggagcgta	ccatcttctt	caaggacgac	960
ggcaactaca	agacccgcgc	cgaggtgaag	ttcgagggcg	acaccctggt	gaaccgcatc	1020
gagctgaagc	gcatcgactt	caaggaggac	ggcaacatcc	tggggcacia	gctggagtag	1080
aactacaatca	gccacaacgt	ctatatcacc	gccgacaagc	agaagaacgg	catcaaggcc	1140
cacttcaaga	tccgccacaa	catcgaggac	ggcagcgtgc	agctcgccga	ccactaccag	1200
cagaacaccc	ccatcggcga	cggccccgtg	ctgctgcccc	acaaccacta	cctgagcacc	1260
cagtccaagc	tgagcaaaga	ccccaacgag	aagcgcgatc	acatggtcct	gctggagttc	1320
gtgaccgccc	ccgggatcac	tctcggcgga	agtggtagcg	gcagtggagg	tgacgtcagc	1380
ggcggcttct	acatcacctc	acgcacacag	ttcagcagcc	tgacgagct	ggtggcctac	1440
tacttcaaac	atgctgatgg	cttgtgccac	cgctgacca	acgtctgccc	cacgtccaag	1500
ccccagaccc	agggactcgc	caaggacgcg	tgggaaatcc	cccgggagtc	gctgcggtcg	1560
gaggtgaagc	tggggcaggg	ctgctttgga	gaggtctgga	tggggacctg	gaacggcacc	1620
accagagtgg	ccataaagac	tctgaagccc	ggcaccatgt	ccccggaggc	cttctgagc	1680
gaagcccaag	tgatgaagaa	gctccggcat	gagaagctgg	ttcagctgta	cgcagtgggtg	1740
tcggaagagc	ccatctacat	cgtaactgag	tacatgagca	aggggagcct	cctggatttc	1800
ctgaagggag	agatgggcaa	gtacctgcgg	ctgccacagc	tgtctgatata	ggctctcag	1860
attgcatccg	gcatggccta	tgaggagagg	atgaaactag	tgaccggaga	cctgcgggcg	1920
gccaacatcc	tggtggggga	gaacctggtg	tgcaaggtgg	ctgactttgg	gctggcacgc	1980
ctcatcgagg	acaacgagta	cacagcacgg	caagtgcca	agttccccat	caagtggaca	2040
gccccgagg	cagccctcta	tggccggttc	accatcaagt	cggatgtctg	gtccttcggc	2100
atcctgctga	ctgagctgac	caccaagggc	cgggtgccat	accagggat	ggtcaacagg	2160
gaggtgctgg	accaggtgga	gaggggctac	cgatgccct	gcccggcga	gtgccccgag	2220
tcgtgcatg	acctcatgtg	ccagtgtgg	cggaaaggacc	ctgaggagcg	gcccactttt	2280
gagtacctgc	aggccttctt	ggaggactac	ttcacctcga	cagagcccca	gtaccagcct	2340
ggagagaacc	tagaattcgg	tggcagtgga	gggatgggtg	gcaagggcga	ggagctgttc	2400
accggggtgg	tgcccatcct	ggtcagctg	gacggcgacg	taaacggcca	caagttcagc	2460
gtgtccggcg	agggcgaggg	cgatgccacc	tacggcaagc	tgaccctgaa	gttcatctgc	2520
accaccggca	agctgcccgt	gccctggccc	accctctgta	ccaccttcgg	ctacggcctg	2580
atgtgcttcg	cccgtatccc	cgaccacatg	aagcagcagc	acttcttcaa	gtccggcatg	2640
cccgaaggct	acgtccagga	gcgcaccatc	ttcttcaagg	acgacggcaa	ctacaagacc	2700
cgcgccgagg	tgaagttcga	ggcgacacc	ctggtgaacc	gcatcgagct	gaagggcatc	2760
gacttcaagg	aggacggcaa	catcctgggg	cacaagctgg	agtacaacta	caacagccac	2820
aacgtctata	tcatggccga	caagcagaag	aacggcatca	aggtgaactt	caagatccgc	2880
cacaacatcg	aggacggcag	cgtgcagctc	gccgaccact	accagcagaa	cacccccatc	2940
ggcgacggcc	ccgtgctgaa	gccccacaac	cactacctga	gctaccagtc	cgccctgagc	3000
aaagacccca	acgagaagcg	cgatcacatg	gtcctgaagg	agttcgtgac	cgccgcccgg	3060
atcactctcg	gcatggacga	gctgtacaag	tag			3094

PT11894CZ Sekvence

<210> 2
 <211> 1030
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Proteinová src kura domácího(Gallus gallus) s vloženými sekvencemi mCFP a mCit pomocí tří linker peptidů

<400> 2
 Met Gly Ser Ser Lys Ser Lys Pro Lys Asp Pro Ser Gln Arg Arg Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Glu Pro Pro Asp Ser Thr His His Gly Gly Phe Pro Ala Ser
 20 25 30
 Gln Thr Pro Asn Lys Thr Ala Ala Pro Asp Thr His Arg Thr Pro Ser
 35 40 45
 Arg Ser Phe Gly Thr Val Ala Thr Glu Pro Lys Leu Phe Gly Gly Phe
 50 55 60
 Asn Thr Ser Asp Thr Val Thr Ser Pro Gln Arg Ala Gly Ala Leu Ala
 65 70 75 80
 Gly Gly Val Thr Thr Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ser Arg Thr
 85 90 95
 Glu Thr Asp Leu Ser Phe Lys Lys Gly Glu Arg Leu Gln Ile Val Asn
 100 105 110
 Asn Thr Glu Gly Asp Trp Trp Leu Ala His Ser Leu Thr Thr Gly Gln
 115 120 125
 Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Ser Asp Ser Ile Gln
 130 135 140
 Ala Glu Glu Trp Tyr Phe Gly Lys Ile Thr Arg Arg Glu Ser Glu Arg
 145 150 155 160
 Leu Leu Leu Asn Pro Glu Asn Pro Arg Gly Thr Phe Leu Val Arg Glu
 165 170 175
 Ser Glu Thr Thr Lys Gly Ala Tyr Cys Leu Ser Val Ser Asp Phe Asp
 180 185 190
 Asn Ala Lys Gly Leu Asn Val Lys His Tyr Lys Ile Arg Lys Leu Asp
 195 200 205
 Val Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu
 210 215 220
 Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn
 225 230 235 240
 Gly His Arg Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr
 245 250 255
 Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val
 260 265 270
 Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Trp Gly Val Gln Cys Phe
 275 280 285
 Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala
 290 295 300

PT11894CZ Sekvence

Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp
 305 310 315 320

Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu
 325 330 335

Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn
 340 345 350

Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Ile Ser His Asn Val Tyr
 355 360 365

Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala His Phe Lys Ile
 370 375 380

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

Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His
 405 410 415

Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Lys Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg
 420 425 430

Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu
 435 440 445

Gly Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gly Asp Val Ser Gly Gly Phe Tyr
 450 455 460

Ile Thr Ser Arg Thr Gln Phe Ser Ser Leu Gln Gln Leu Val Ala Tyr
 465 470 475 480

Tyr Ser Lys His Ala Asp Gly Leu Cys His Arg Leu Thr Asn Val Cys
 485 490 495

Pro Thr Ser Lys Pro Gln Thr Gln Gly Leu Ala Lys Asp Ala Trp Glu
 500 505 510

Ile Pro Arg Glu Ser Leu Arg Leu Glu Val Lys Leu Gly Gln Gly Cys
 515 520 525

Phe Gly Glu Val Trp Met Gly Thr Trp Asn Gly Thr Thr Arg Val Ala
 530 535 540

Ile Lys Thr Leu Lys Pro Gly Thr Met Ser Pro Glu Ala Phe Leu Gln
 545 550 555 560

Glu Ala Gln Val Met Lys Lys Leu Arg His Glu Lys Leu Val Gln Leu
 565 570 575

Tyr Ala Val Val Ser Glu Glu Pro Ile Tyr Ile Val Thr Glu Tyr Met
 580 585 590

Ser Lys Gly Ser Leu Leu Asp Phe Leu Lys Gly Glu Met Gly Lys Tyr
 595 600 605

Leu Arg Leu Pro Gln Leu Val Asp Met Ala Ala Gln Ile Ala Ser Gly
 610 615 620

Met Ala Tyr Val Glu Arg Met Asn Tyr Val His Arg Asp Leu Arg Ala
 625 630 635 640

Ala Asn Ile Leu Val Gly Glu Asn Leu Val Cys Lys Val Ala Asp Phe
 645 650 655

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

PT11894CZ Sekvence

Met Asp Glu Leu Tyr Lys
1025 1030

<210> 3
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> linker peptid oddělující sekvenci mCFP na jeho N-konci od sekvence Src

<400> 3
Val Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
1 5

<210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> linker peptid oddělující sekvenci mCFP na jeho C-konci od sekvence Src

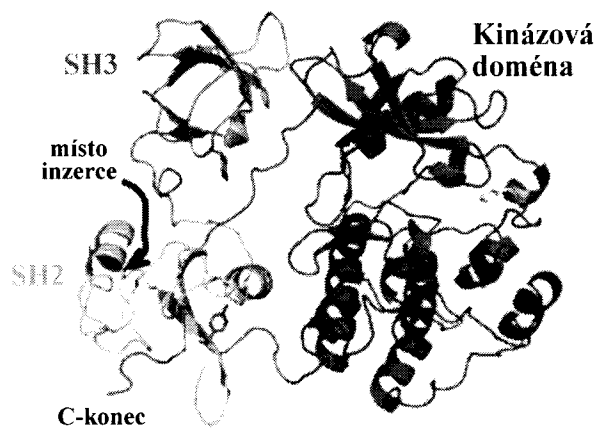
<400> 4
Gly Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gly Asp Val
1 5 10

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

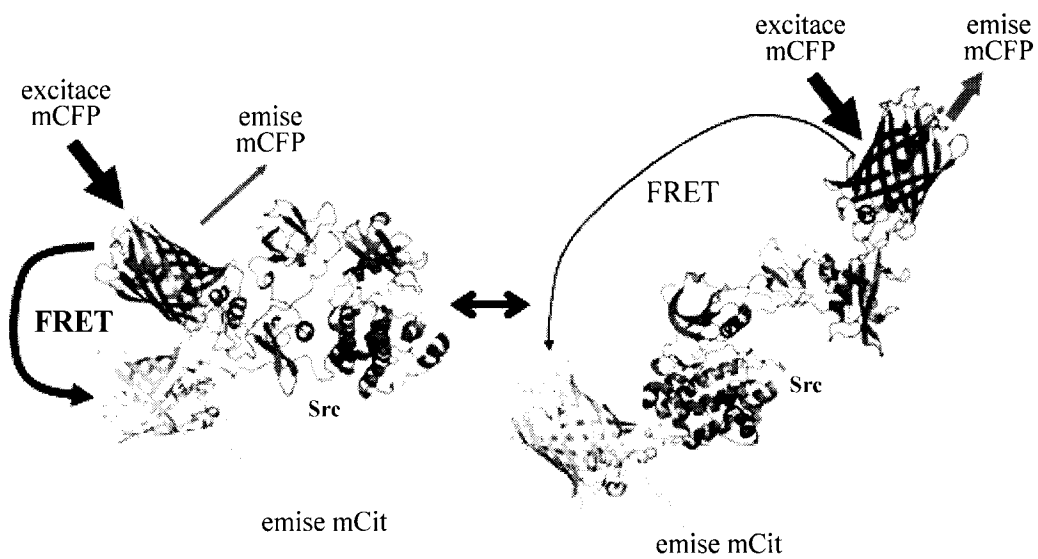
<220>
<223> linker peptid oddělující sekvenci mCit na jeho N-konci od sekvence Src

<400> 5
Glu Phe Gly Gly Ser Gly Gly
1 5

Výkresy

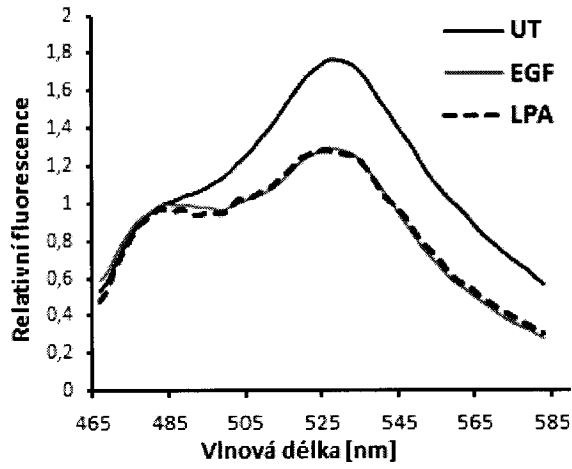


Obr. 1

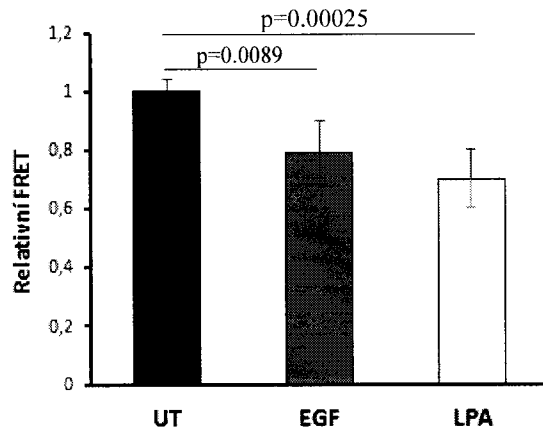


Obr. 2

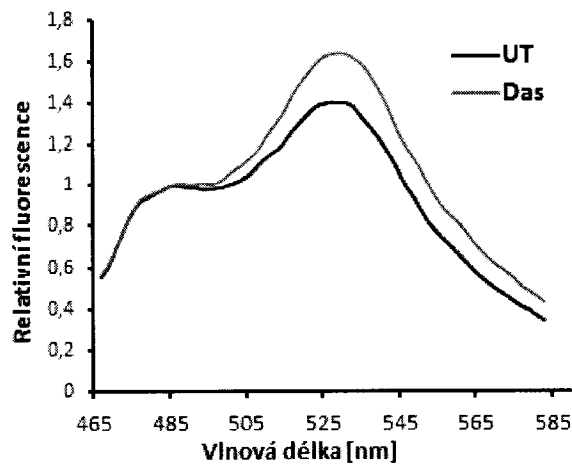
2



Obr. 3

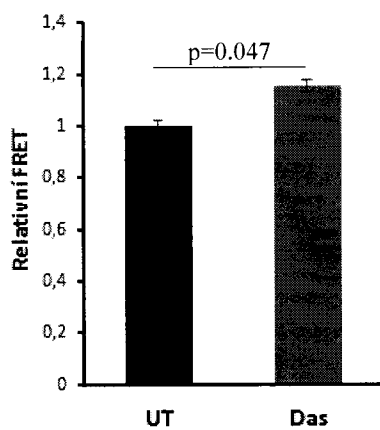


Obr. 4

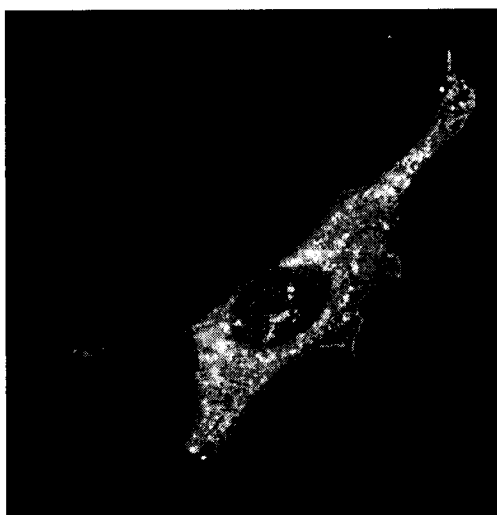


Obr. 5

3



Obr. 6



Obr. 7



Obr. 8