

# PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

## 308 368

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

*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)  
*C12Q 1/6876* (2018.01)

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2015-654**  
(22) Přihlášeno: **23.09.2015**  
(40) Zveřejněno: **31.05.2017**  
**(Věstník č. 22/2017)**  
(47) Uděleno: **21.05.2020**  
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **01.07.2020**  
**(Věstník č. 27/2020)**

(56) Relevantní dokumenty:

Pavlik et al: Design and construction of FRET-based Src biosensor 2012 12th international meeting on advanced light microscopy, Poster abstract, <https://gbiomed.kuleuven.be/apps/cme/files/final-booklet.pdf>; NCBI Reference Sequence: NP\_990788.2, proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src [Gallus gallus], 2011; Wolfgang Paster, et al: Genetically Encoded Förster Resonance Energy Transfer Sensors for the Conformation of the Src Family Kinase Lck 2009 The Journal of Immunology 2160-2167; Kevin Truong and Mitsuhiko Ikura\*: The use of FRET imaging microscopy to detect protein-protein interactions and protein conformational changes in vivo 2001, 573-578, [http://individual.utoronto.ca/ktuong/papers/fret\\_review.pdf](http://individual.utoronto.ca/ktuong/papers/fret_review.pdf).

(73) Majitel patentu:

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká  
fakulta, Praha 1, CZ

(72) Původce:

doc. RNDr. Daniel Rösler, Ph.D., Praha 11, CZ  
doc. RNDr. Jan Brábek, Ph.D., Praha 4, CZ

(74) Zástupce:

KOREJZOVA LEGAL v.o.s., JUDr. Petra Sauvage  
de Brantes, advokátka, Korunní 810/104, 101 00  
Praha 10, Vinohrady

(54) Název 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 kinázou Src, do které jsou vloženy  
fluorofory, které umožní monitorování její aktivity Src  
pomocí měření metodikou FRET.

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

### Oblast techniky

5

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 kinázy Src v živých buňkách.

10

### Dosavadní stav techniky

Kináza Src je významný protoonkoprotein, který se účastní regulace řady buněčných dějů, jako jsou například migrace buněk, proliferace, diferenciací 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 metastázy. 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.

15

20

Pro vizualizaci aktivity kináz rodiny Src v buňce byly navrženy dva typy biosenzoru využívající FRET. První typ využívá specifickou peptidovou sekvenci, která představuje fosforylační substrát pro Src kinázu a fosfovazebnou doménu (Ting, A.Y., Kain, K.H., Kiemke, 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 (Src family kinase. SFK) vede k intramolekulární vazbě s fosfovazebnou doménou. Tato vazba je sledována jako zvýšení FRET mezi fluorofory připojenými k fosforylačnímu substrátu a fosfovazebné doméně.

25

30

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 strukturálních 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.

35

Druhý známý typ biosenzoru 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.).

40

45

U biosenzoru Lck je jeden z fluoroforu 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

50

použít pouze pro analýzu aktivace Lck a design tohoto biosenzoru z důvodu umístění fluoroforu do oblasti mezi SH3 a SH2 domény navíc nelze použít pro vytvoření funkčního biosenzoru Src.

5 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.

10

### Podstata vynálezu

15 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 fluoroforu pomocí Försterova rezonančního přenosu (FRET) pak umožňuje sledovat míru kompaktace struktury biosenzoru Src a tím i jeho míru aktivace.

20 Předkládaný biosenzor kinázy Src využívá konformačních změn doprovázejících aktivaci SFK podobně jako biosenzor Lck. S Lck biosenzorem sdílí umístění jednoho z fluoroforu na C–konec molekuly. Hlavním rozdílem je umístění druhého fluoroforu, který je v případě Lck biosenzoru umístěn mezi STT2 a SH3 domény.

25 Na rozdíl od výše uvedených biosenzoru 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 strukturních změn spojených s aktivací Src a poskytne zároveň i informaci o dynamice a lokalizaci Src.

30 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 strukturně oddělující fluorofory od samotné molekuly kinázy Src. specifickým umístěním fluoroforu 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).

40 Fluorofor mCFP (Zacharias DA, Violin JD, Newton AC, Tsien RY. Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membráně 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 peptidů č. 3 (SEQ ID NO. 5).

45

Předkládaný biosenzor kinázy Src předchází výše popsaným problémům s umístěním fluoroforu do oblastí 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 linkeru o různé délce a délka 8 a 11 aminokyselin se ukázala jako nejvhodnější. Při použití kratší (3 aminokyseliny) délky linkeru 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 monomerní varianty těchto proteinů.

55

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).

- 5 Podstatou předkládaného vynálezu je tedy rekombinantní proteinový biosenzor kinázy Src, který má sekvenci SEQ ID NO: 2.

10 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.

15 Další předmět vynálezu je buněčná linie založená na linii SYF (linie myších fibroblastů, které mají inaktivované geny pro SFK kinázy Src, Yes a Fyn; Klinghoffer, R.A., Sachsenmaier, C., Cooper, J.A., and Soriano, P. (1999). EMBO J. 18, 2459-2471; ATCC: CRL-2459™) stabilně exprimující biosenzor kinázy Src.

20 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.

25 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.

30 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.

35 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.

40 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 ( $\leq 10$  kDa) inhibitory kinázy Src. Příkladem mohou být přírodní i syntetické organické sloučeniny s protirakovinným účinkem, popř. i nízkomolekulární peptidy.

45 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.

50 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.

55

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

5

#### Objasnění výkresů

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

10

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).

15

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 (kyselinou lyzofosfatidovou).

20

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 triplicátech. 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.

25

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.

30

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 triplicátech. 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.

35

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

40

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.

45

#### Příklady uskutečnění vynálezu

50

Příklad 1 Příprava buněčné linie SYF stabilně exprimující biosenzor kinázy Src

a. Produkce virionů v pakovacích Phoenix E buňkách:

5x10<sup>8</sup> Phoenix E (Kinsella TM, Nolan GP. (1996). Hum Gene Ther. 7(12): 1405–13, 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.

5

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 médiu s puromycinem (0,7 µg/ml). Po 14 dnech selekce byly buňky sortovány pomocí buněčného sorteru FACS na pozitivitu na mCIT fluorescenční signál. Takto připravené buňky vykazovaly stabilní expresi biosenzoru kinázy Src.

10

#### Příklad 2 Analýza aktivace kinázy Src

15

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.

20

#### Příklad 3 Analýza inhibice kinázy Src in vitro

Buňky linie SYF stabilně transfekované Src biosenzorem byly inkubovány po dobu 30 min v přítomnosti 100 nM 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.

25

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

30

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.

35

#### Průmyslová využitelnost

40

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.

45

Seznam sekvencí

SEQ ID NO. 1 (DNA sekvence biosenzoru)

- 5 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
- 10 2374–3090 sekvence kódující mCit

atgggtagta	gcaagagcaa	gcctaaggac	cccagccagc	gccggcgcag	ctgggagcca	60
cccgcacagca	cccaccacgg	gggattccca	gcctcgcaga	cccccaaca	gacagcagcc	120
cccgcacacgc	accgcacccc	cagccgctcc	tttgggaccg	tggccaccga	gcccagctc	180
ttcgggggct	tcaacacttc	tgacaccgtc	acgtcgcggc	agcgtgccgg	ggcactggct	240
ggcggcgctca	ccactttcgt	ggctctctac	gactacgagt	cccggactga	aacggacttg	300
tccttcaaga	aaggagaacg	cctgcagatt	gtcaacaaca	cggaagtgga	ctgggtggctg	360
gctcattccc	tcactacagg	acagacgggc	tacatcccca	gtaactatgt	cgcgccctca	420
gactccatcc	aggctgaaga	gtggctacttt	gggaagatca	ctcgtcggga	gtccgagcgg	480
ctgctgctca	acccccgaaa	ccccgggga	accttcttgg	tccgggagag	cgagacgaca	540
aaaggtgcct	attgcctctc	cgtttctgac	tttgacaacg	ccaaggggct	caatgtgaag	600
cactacaaga	tccgcaagct	ggacgtcgga	agcggaggta	gtggtggaat	ggtgagcaag	660
ggcgaggagc	tgttcaccgg	ggtggtgccc	atcctggtcg	agctggacgg	cgacgtaaac	720
ggccacaggt	tcagcgtgtc	cggcgagggc	gagggcgatg	ccacctacgg	caagctgacc	780
ctgaagtcca	tctgcaccac	cggcaagctg	cccgctccct	ggcccacct	cgtgccacc	840
ctgacctggg	gcgtgcaagt	cttcagccgc	taccocgacc	acatgaagca	gcacgacttc	900
ttcaagtccg	ccatgcccga	aggctacgtc	caggagcgtg	ccatcttctt	caaggacgac	960
ggcaactaca	agacccgcgc	cgaggtgaag	ttcgagggcg	acacctggt	gaaccgcatc	1020
gagctgaagg	gcatcgactt	caaggaggac	ggcaacatcc	tggggcaca	gctggagtac	1080
aactacatca	gccacaacgt	ctatatcacc	gccgacaagc	agaagaacgg	catcaaggcc	1140
cacttcaaga	tccgccacaa	catcgaggac	ggcagcgtgc	agctcgcga	ccactaccag	1200
cagaacaccc	ccatcggcga	cggccccgtg	ctgctgcccg	acaaccacta	cctgagcacc	1260
cagtccaagc	tgatgaaaga	ccccaacgag	aagcgcgatc	acatggtcct	gctggagttc	1320
gtgaccgcgc	ccgggatcac	tctcggcgga	agtggtagcg	gcagtggagg	tgacgtcagc	1380
ggcggcttct	acatcacctc	acgcacacag	ttcagcagcc	tgacgagct	ggtggcctac	1440
tactccaaac	atgctgatgg	cttgtgccac	cgctgacca	acgtctgccc	cacgtccaag	1500
ccccagaccc	agggactcgc	caaggacgcg	tgggaaatcc	cccgggagtc	gctgcggctg	1560
gaggtgaagc	tggggcaggg	ctgctttgga	gaggtctgga	tggggacctg	gaacggcacc	1620
accagagtgg	ccataaagac	tctgaagccc	ggcaccatgt	ccccggaggc	cttctgcaag	1680
gaggtgctgg	gagcccaag	gctcggcat	gagaagctgg	ttcagctgta	cgcagtggtc	1740
tcggaagagc	ccatctacat	cgctcactgag	tacatgagca	aggggagcct	cctggatttc	1800
ctgaagggag	agatgggcaa	gtacctgcgg	ctgccacagc	tcgtcgatat	ggctgctcag	1860
attgcatccg	gcatggccta	tgtggagagg	atgaactacg	tgaccgaga	cctgcggggcg	1920
gccaacatcc	tggtggggga	gaacctggtg	tgaaggtgg	ctgactttgg	gctggcacgc	1980
ctcatcgagg	acaacgagta	cacagcacgg	caaggtgcca	agttccccat	caagtggaca	2040
gcccccgagg	cagccctcta	tggccggttc	accatcaagt	cggatgtctg	gtccttcggc	2100
atcctgctga	ctgagctgac	caccaagggc	cgggtgccat	accaggggat	ggtcaacagg	2160
gaggtgctgg	accaggtgga	gaggggctac	cgcattgcct	gcccggccga	gtgccccgag	2220
tcgctgcatg	acctcatgtg	ccagtgtgtg	cggaaaggacc	ctgaggagcg	gccccacttt	2280
gagtacctgc	aggccttctc	ggaggactac	ttcacctoga	cagagcccca	gtaccagcct	2340
ggagagaacc	tagaattcgg	tggcagtgga	gggatggtga	gcaagggcga	ggagctgttc	2400
accgggggtg	tgcccatacct	ggtcagagctg	gacggcgacg	taaacggcca	caagttcagc	2460
gtgtccggcg	agggcgaggg	cgatgccacc	tacggcaagc	tgacctgaa	gttcatctgc	2520
accaccggca	agctgcccgt	gccctggccc	accctcgtga	ccacctcgg	ctacggcctg	2580
atgtgcttcg	cccgtacccc	cgaccacatg	aagcagcacg	acttcttcaa	gtccgccaatg	2640
cccgaaggct	acgtccagga	gcgcaccatc	ttcttcaagg	acgacggcaa	ctacaagacc	2700
cgcgccgagg	tgaagttcga	ggcgacacc	ctggtgaacc	gcatcgagct	gaagggcatc	2760
gacttcaag	aggacggcaa	catcctgggg	cacaagctgg	agtacaacta	caacagccac	2820
aacgtctata	tcattggccga	caagcagaag	aacggcatca	aggtgaactt	caagatccgc	2880
cacaacatcg	aggacggcag	cgtgcagctc	gccgaccact	accagcagaa	cacccccatc	2940
ggcgacggcc	ccgtgctgaa	gcccgacaac	cactacctga	gctaccagtc	cgcctgagc	3000
aaagacccca	acgagaagcg	cgatcacatg	gtcctgaagg	agttcgtgac	cgcgcgccggg	3060
atcactctcg	gcatggacga	gctgtacaag	tag			3094



SEQ ID NO. 2 (DNA sekvence biosenzoru)

Pozice jednotlivých funkčních úseků:

- 5 209–216 linker peptid č. 1 (Val–Gly–Ser–Gly–Gly–Ser–Gly–Gly)  
 217–447 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

10

```

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

	820		825		830														
Lys	Leu	Thr	Leu	Lys	Phe	Ile	Cys	Thr	Thr	Gly	Lys	Leu	Pro	Val	Pro				
	835						840					845							
Trp	Pro	Thr	Leu	Val	Thr	Thr	Phe	Gly	Tyr	Gly	Leu	Met	Cys	Phe	Ala				
	850						855				860								
Arg	Tyr	Pro	Asp	His	Met	Lys	Gln	His	Asp	Phe	Phe	Lys	Ser	Ala	Met				
	865				870					875					880				
Pro	Glu	Gly	Tyr	Val	Gln	Glu	Arg	Thr	Ile	Phe	Phe	Lys	Asp	Asp	Gly				
				885					890					895					
Asn	Tyr	Lys	Thr	Arg	Ala	Glu	Val	Lys	Phe	Glu	Gly	Asp	Thr	Leu	Val				
			900					905					910						
Asn	Arg	Ile	Glu	Leu	Lys	Gly	Ile	Asp	Phe	Lys	Glu	Asp	Gly	Asn	Ile				
		915					920					925							
Leu	Gly	His	Lys	Leu	Glu	Tyr	Asn	Tyr	Asn	Ser	His	Asn	Val	Tyr	Ile				
	930					935					940								
Met	Ala	Asp	Lys	Gln	Lys	Asn	Gly	Ile	Lys	Val	Asn	Phe	Lys	Ile	Arg				
	945				950					955					960				
His	Asn	Ile	Glu	Asp	Gly	Ser	Val	Gln	Leu	Ala	Asp	His	Tyr	Gln	Gln				
				965					970					975					
Asn	Thr	Pro	Ile	Gly	Asp	Gly	Pro	Val	Leu	Lys	Pro	Asp	Asn	His	Tyr				
			980					985					990						
Leu	Ser	Tyr	Gln	Ser	Ala	Leu	Ser	Lys	Asp	Pro	Asn	Glu	Lys	Arg	Asp				
		995					1000					1005							
His	Met	Val	Leu	Lys	Glu	Phe	Val	Thr	Ala	Ala	Gly	Ile	Thr	Leu	Gly				
	1010					1015					1020								
Met	Asp	Glu	Leu	Tyr	Lys														
	1025				1030														

SEQ ID NO. 3 (proteinová sekvence linkeru č. 1)

Val Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly  
1 5

5

SEQ ID NO. 4 (proteinová sekvence linkeru č. 2)

Gly Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gly Asp Val  
1 5

SEQ ID NO. 5 (proteinová sekvence linkeru č. 3)

Glu Phe Gly Gly Ser Gly Gly  
1 5

10

Přehled sekvencí

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

<210> 1  
 <211> 3094  
 <212> DNA  
 10 <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

15 <400> 1

```

atgggtagta gcaagagcaa gcctaaggac cccagccagc gccggcgcag cctggagcca      60
cccgacagca cccaccacgg gggattcccc gcctcgcaga cccccacaa gacagcagcc      120
cccgacaacg accgcacccc cagccgctcc tttgggaccg tggccaccca gcccaagctc      180
ttcgggggct tcaaaccttc tgacaccgtc acgtcgcgcg agcgtgccgg ggcactggct      240
ggcggcgctc caactttcgt ggctctctac gactacagat cccggactga aacggacttg      300
tccttcaaga aaggagaacg cctgcagatt gtcaacaaca cgggaaggtg ctggtggctg      360
gctcattccc tcactacagg acagacgggc tacatcccc gtaactatgt cgcgccctca      420
gactccatcc aggetgaaga gtggtacttt gggaaatca ctcgtcggga gtccgagcgg      480
ctgctgctca accccgaaaa cccccgggga acctctctgg tccgggagag cgagacgaca      540
aaaggtgctt attgctcttc cgtttctgac tttgacaaag ccaaggggct caatgtgaag      600
cactacaaga tccgcaagct ggaegtccga agcggaggta gtggtggaat ggtgagcaag      660
ggcgaggagc tgttcaacgg ggtgggtccc atcctggctg agctggacgg cgacgtaaac      720
ggccacaggt tcagcgtgtc cggcgaaggg gagggcgatg ccacctacgg caagctgacc      780
ctgaagtcca tctgcaccac cggcaagctg cccgtgcccc ggcaccaacct cgtgaccacc      840
ctgacctggg cgtgtcagtg ctteagccgc taacctgacc acatgaagca gcacgacttc      900
ttcaagtccg ccattgccca aggetacgtc caggagcgtc ccattctctt caaggacgac      960
ggcaactaca agaccgcgcg cgaggtgaaq ttcgagggcg accacctggt gaaccgcacc      1020
gagctgaagg gcactgactt caaggaggac ggcaacatcc tggggcaca gctggagtac      1080
aactacatca gccacaacgt ctatatcacc gccgacaagc agaagaacgg catcaaggcc      1140
cacttcaaga tccgccacaa catcgaggac ggcagcgtgc agctcgcga ccactaccag      1200
cagaacaccc ccactggcga cggccccgtg ctgctgcccc acaaccacta cctgagcacc      1260
cagtccaaagc tgagcaaaqa ccccaacgag aagcgcgatc acatggctct gctggagttc      1320
gtgaccgccc cggggatcac tctggcggga agtggtagcg gcagtggagg tgacgtcagc      1380
ggcggcttct acatcacctc acgcacacag ttcagcagcc tgcagcagct ggtggcctac      1440
tactccaaac atgctgatgg cttgtgccc cgcctgacca acgtctgccc cactgccaag      1500
ccccagaccc agggactcgc caaggacgcg tgggaaatcc cccgggagtc gctcgggctg      1560
gaggtgaagc tggggcaggg ctgctttgga gaggtctgga tggggacctg gaacggcacc      1620
accagagtgg ccataaagac tctgaagccc ggcacctatg ccccgagggc ctctctgcag      1680
gaagcccaag tgatgaagaa gctccggcat gagaagctgg ttcagctgta cgcagtgggtg      1740
tcggaagagc ccactctcat cgtcactgag tacatgagca aggggagcct cctggatttc      1800
ctgaaggagc agatgggcaa gtaacctgccc gtcaccagc tegtogatat ggtgctcag      1860
attgcatccc gcattggccta tgtggagagg atgaaactac tgcaaccgaga cctcggggcg      1920
gccaacatcc tgggtggggga gaacctgggt tgcaagggtg ctgactttgg gctggcagcc      1980
ctcatcgagg acaacgagta cacagcaacg caaggtgcca agttccccat caagtggaca      2040
gcccccgagg cagccctcta tggccgggtc accatcaagt cggatgtctg gtccttcggc      2100
atcctgctga ctgagctgac caccaagggc cgggtgccc atccccggat ggtcaacagg      2160
gaggtgctgg accaggtgga gaggggctac cgcctgccc gcccgccccg gtgccccgag      2220
tcgctgcatg acctcatgtg ccagtgtctg cggaaaggacc ctgaggagcg gcccaacttt      2280
gagtacctgc aggccttccc ggaggactac tteacctega cagagcccc gtaaccagct      2340
ggagagaacc tagaattcgg tggcagtgga gggatggtga gcaagggcga ggagctgttc      2400
accgggggtg tgccccatcc ggtcgagctg gacggcgcag taaacggcca caagtccagc      2460
gtgtccggcg agggcgaggg cgatgccacc tacggcaagc tgacctgaa gttcatctgc      2520
accaaccgca agctgccccg gccctggccc ccaactctga ccacctctg ctaccggcctg      2580
atgtgcttcg cccgctaccc cgaccacatg aagcagcaac acttcttcaa gtccgccatg      2640
cccgaaagct acgtccagga gcgcaccatc ttcttcaagg acgacggcaa ctacaagacc      2700
cgcgccaggg tgaagttcga gggcgacacc ctgggtgaacc gcacgcagct gaagggcacc      2760
gacttcaagg aggaagcaca cactctgggg cacaaactgg agtaacaact caacagccac      2820
aacgtctata tcatggccga caagcagaag aacggcatca aggtgaaact caagatccgc      2880
cacaacatcg aggaagccag cgtgcagctc gccgaccaact accagcagaa ccccccatc      2940
ggcgacggcc ccgtgctgaa gcccgacaac cactacctga gctaccagtc cgcctgagc      3000
aaagaaccca acgagaagcg cgatcacatg gtcctgaagg agttcgtgac cgcgcgccgg      3060
atcactctcg gcattggaca gctgtacaag tag                                     3094
    
```

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

5

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

10

&lt;400&gt; 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

```

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  
 820 825 830  
 Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro  
 835 840 845  
 Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe Gly Tyr Gly Leu Met Cys Phe Ala  
 850 855 860  
 Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met  
 865 870 875 880  
 Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly  
 885 890 895  
 Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val  
 900 905 910  
 Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile  
 915 920 925  
 Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile  
 930 935 940  
 Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg  
 945 950 955 960  
 His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln  
 965 970 975  
 Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Lys Pro Asp Asn His Tyr  
 980 985 990  
 Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp  
 995 1000 1005  
 His Met Val Leu Lys Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly  
 1010 1015 1020  
 Met Asp Glu Leu Tyr Lys  
 1025 1030



<210> 3  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 5  
 <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  
 10  
  
 <210> 4  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 15 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> linker peptid oddělující sekvenci mCFP na jeho C–konci od sekvence Src  
  
 20 <400> 4  
 Gly Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gly Asp Val  
 1 5 10  
  
 <210> 5  
 <211> 7  
 25 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> linker peptid oddělující sekvenci mCit na jeho N–konci od sekvence Src  
 30  
 <400> 5  
 Glu Phe Gly Gly Ser Gly Gly  
 1 5

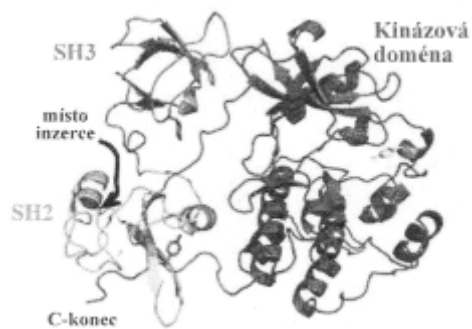
35

### PATENTOVÉ NÁROKY

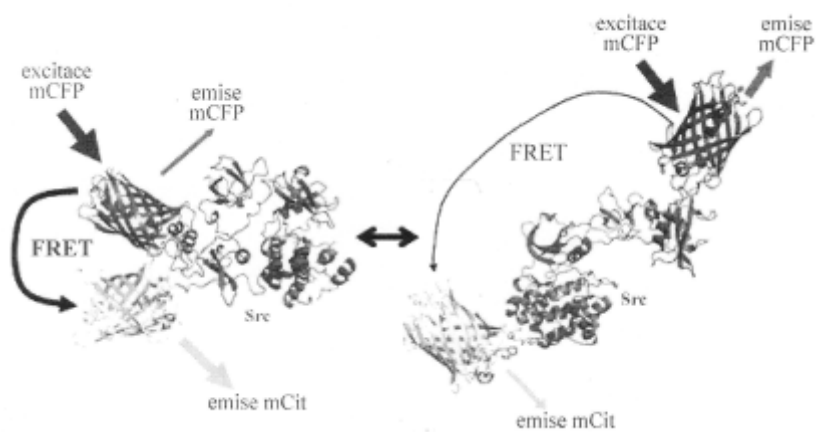
1. Rekombinantní proteinový biosenzor kinázy Src, který má sekvenci SEQ ID NO: 2.  
 40  
 2. Nukleová kyselina kódující rekombinantní proteinový biosenzor kinázy Src podle nároku 1, nebo k ní komplementární sekvence, nebo její varianta kódující v důsledku degenerace genetického kódu stejnou aminokyselinovou sekvenci.  
 45  
 3. Nukleová kyselina podle nároku 2. která má sekvenci SEQ ID NO: 1.  
  
 4. Buněčná linie založená na linii SYF. mající inaktivované geny Src, Yes a Fyn, uložené v Americké sbírce typových kultur ATCC pod přístupovým číslem CRL–2459, stabilně exprimující biosenzor kinázy Src podle nároku 1.  
 50  
 5. Použití biosenzoru kinázy Src podle nároku 1 pro *ex vivo* testování účinku inhibitorů a aktivátorů kinázy Src, na aktivitu kinázy Src.

6. Použití podle nároku 5 pro stanovení aktivity inhibitorů a aktivátorů kinázy Src vůči kináze Src ex vivo, při kterém se buňky exprimující biosenzor kinázy Src podle nároku 1 inkubují s těmito inhibitory či aktivátory, a metodou Försterova rezonančního přenosu, FRET, se stanoví změna stavu aktivace biosenzoru způsobená touto chemickou látkou.  
5
7. Použití biosenzoru kinázy Src podle nároku 1 pro stanovení lokalizace a aktivity kinázy Src v živé buňce ex vivo, 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.  
10
8. Použití biosenzoru kinázy Src podle nároku 1 pro stanovení přítomnosti inhibitorů a aktivátoru kinázy Src schopných pronikat do buněk v biologickém vzorku 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.  
15
9. Použití podle nároků 5, 6 nebo 8, kde inhibitorem je inhibitor kinázy Src s molekulární hmotností  $\leq 10$  kDa.  
20

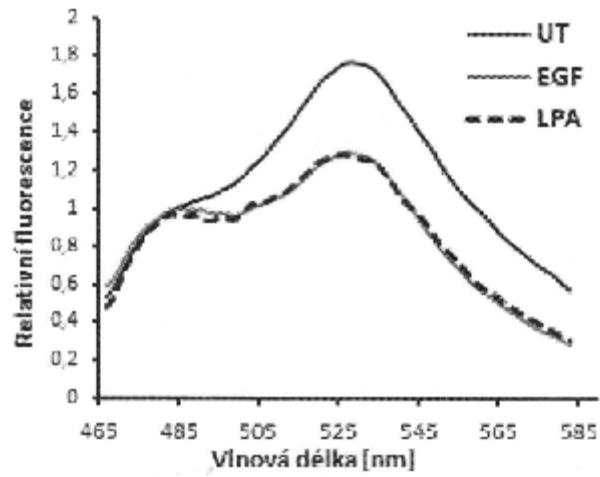
3 výkresy



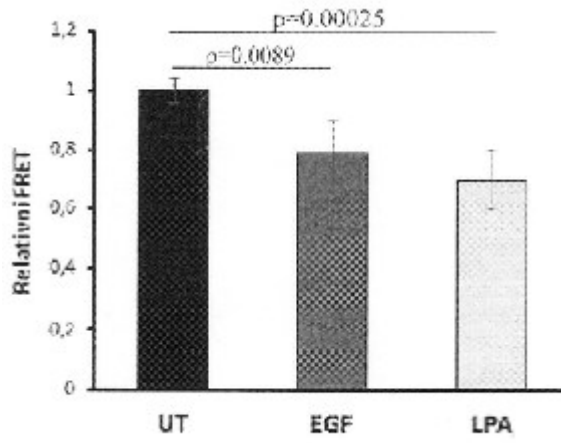
Obr. 1



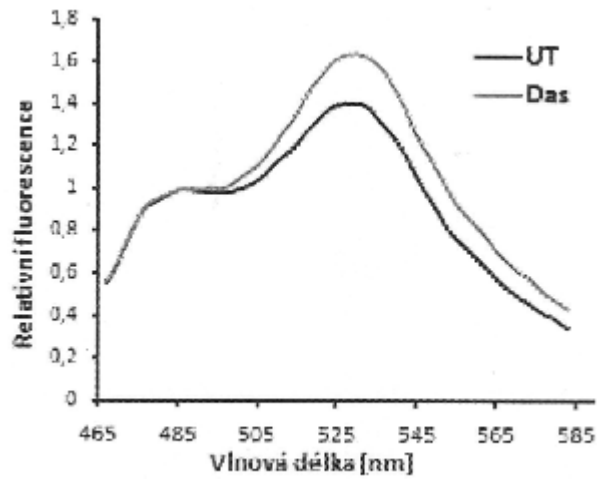
Obr. 2



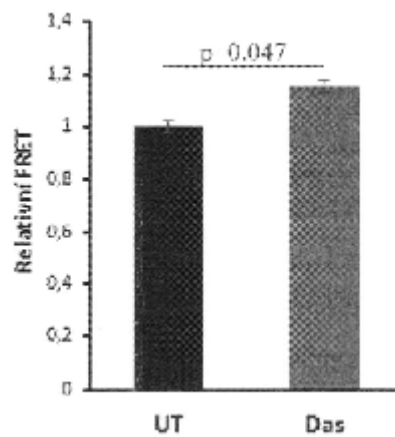
Obr. 3



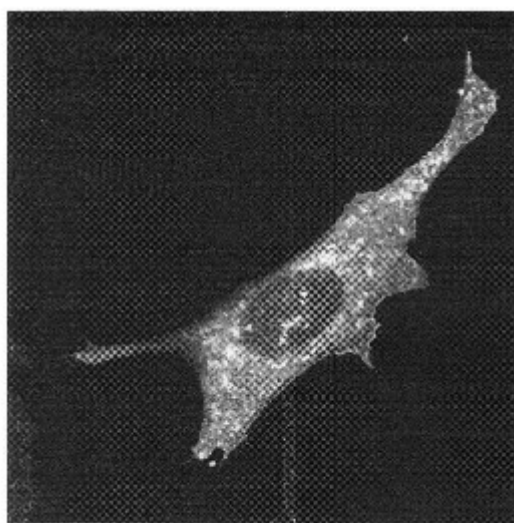
Obr. 4



Obr. 5



Obr. 6



Obr. 7



Obr. 8