

# **STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST**

**Obor: Molekulární biologie (5)**

**Racionální inženýrství spektrálních vlastností zeleného fluorescenčního proteinu z renily fialové**

**Rational engineering of spectral properties of *Renilla reniformis* green fluorescent protein**

**Autor:** Monika Dlouhá

**Škola:** Gymnázium Matyáše Lercha, Žižkova 55, 616 00 Brno

**Kraj:** Jihomoravský kraj

**Konzultant:** Mgr. Daniel Pluskal

**Rok:** 2026

# Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracovala samostatně a použila jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Beru na vědomí, že nejpozději odevzdáním slovesné vědecké práce do veřejné soutěže Středoškolská odborná činnost, stejně jako odevzdáním jejích příloh a dalších připojených děl, např. audiovizuálních, fotografických, výtvarných, architektonických apod. (dále jen „soutěžní dílo“), dochází ke zveřejnění díla podle § 4 odst. 1 zákona č. 121/2000 Sb., autorského zákona, ve znění pozdějších předpisů (dále jen „autorský zákon“). Totéž platí pro pozdější odevzdání doplněného, změněného, upraveného nebo opraveného díla.

Beru na vědomí, že zveřejněním díla, jehož součástí je vynález, se tento vynález stává součástí stavu techniky podle § 5 odst. 1, 2 zákona č. 527/1990 Sb., o vynálezech, průmyslových vzorech a zlepšovacích návrzích, ve znění pozdějších předpisů (dále jen „patentový zákon“), což zakládá překážku pro udělení patentu podle § 3 odst. 1 patentového zákona.

Beru na vědomí, že vyhlášovatel soutěže je podle § 61 odst. 1 autorského zákona per analogiam oprávněn užít soutěžní dílo pro účely zajištění průběhu soutěže, zejména k zajištění transparentnosti soutěže a veřejnosti obhajob soutěžních prací. V odůvodněném rozsahu je tedy vyhlášovatel po dobu účasti autora v soutěži oprávněn zejména:

- zhotovovat rozmnoženiny díla, je-li to nezbytné k seznámení účastníků soutěže, porotců nebo veřejnosti se soutěžní prací;
- zapůjčit originál nebo rozmnoženinu díla účastníkům soutěže, porotcům nebo veřejnosti. Přitom dbá na bezpečné nakládání s dílem;
- vystavovat originál nebo rozmnoženinu díla v průběhu soutěžních přehlídek a doprovodných akcí;
- sdělovat dílo veřejnosti v nehmotné podobě, a to především počítačovou nebo obdobnou sítí.

Dále prohlašuji, že při tvorbě této práce jsem nepoužila nástroje AI.



V Ostopovicích dne 5.2. 2026 .....

Monika Dlouhá

# Poděkování

Na prvním místě bych chtěla poděkovat všem institucím, které se na vzniku mé práce podílely a umožnily její realizaci. Mezi ně patří Loschmidtovy laboratoře, které jsou součástí výzkumného centra RECETOX Masarykovy univerzity v Brně, a Gymnázium Matyáše Lercha. Chtěla bych tímto poděkovat prof. Mgr. Jiřímu Damborskému, Dr. a Ing. RNDr. Martinu Markovi, Ph.D., MBA, kteří mi umožnili vypracovat tuto práci v Loschmidtových laboratořích.

Jmenovitě bych ráda poděkovala všem členům těchto institucí, kteří mi byli vždy nápomocni, poskytli cenné rady a ochotně odpovídali na mé dotazy: Ireně Halíkové, Davidu Damborskému, Bc. Magdaléně Votápkové a Mgr. Karolíně Sedláčkové.

Velké poděkování patří Ing. Marii Šulové a Mgr. Zuzaně Prášilové, které se mnou v laboratoři strávily velké množství času a díky nim jsem získala velké množství nových informací a zároveň si užila mnoho zábavy.

Nejvíce bych chtěla poděkovat svému vedoucímu práce Mgr. Danielu Pluskalovi, který mi umožnil podílet se na světovém výzkumu, provedl mě velkým množstvím metod v oboru, vždy mi s nekonečnou trpělivostí všechno vysvětlil a pomohl mi tuto práci dotáhnout do konce. Díky němu jsem si celou práci moc užila a tato zkušenost mě motivovala se tomuto oboru věnovat i nadále.

Nakonec bych ráda poděkovala Tereze Šustrové a Bc. Kateřině Sochorové, BSc. za jejich cenné rady ohledně práce v laboratoři a psaní odborné práce, a také své rodině a svým kamarádům za neskutečnou podporu a důvěru.

Práce byla provedena za podpory výzkumné infrastruktury RECETOX (ID LM2023069, MŠMT, 2023–2026).

We acknowledge CEITEC Proteomics Core Facility of CIISB, Instruct-CZ Centre, supported by MEYS CR (LM2023042, CZ.02.01.01/00/23\_015/0008175, e-INFRA CZ (ID:90254)).

We acknowledge CF Biomolecular Interactions and Crystallography of CIISB, Instruct-CZ Centre, supported by MEYS CR (LM2023042) and European Regional Development Fund-Project „Innovation of Czech Infrastructure for Integrative Structural Biology“ (No. CZ.02.01.01/00/23\_015/0008175).

# Anotace

Bioluminescence, emise světla s původem v živých organismech, nachází mnoho využití ve vědě, průmyslu i zdravotnictví. Bioluminiscenční systém mořského korálu *Renilla reniformis* nabízí emisi světla s nebývalou účinností, a proto byl v minulosti stabilizován pro vytvoření sondy nesoucí jméno IRrIS využívající rezonanční transfer energie bioluminescence (BRET). IRrIS má potenciál výhodně zastoupit jiné formy značení, např. radioaktivní anebo čistě fluorescenční, ale v současnosti je schopná emise pouze zeleného světla, které není vhodné pro všechny aplikace. Cílem této práce je rozšíření využitelnosti sondy IRrIS inženýrstvím zeleného fluorescenčního proteinu z *R. reniformis* (RGFP) pro delší vlnovou délku emise za zachování jeho biologické kompatibility s luciferázou (RLuc) z téhož organismu. V rámci práce byla na základě vlastní sekvenčně-strukturní analýzy navržena a provedena mutageneze RGFP. Ta úspěšně poskytla žlutě emitující varianty RGFP (RYFP) schopné interagovat s RLuc. Nejlepší zkonstruovaná varianta RYFP nese oproti původnímu RGFP mutace S66G a H197Y. Při charakterizaci variant RYFP co do fotofyzikálních vlastností, stability a schopnosti interagovat s RLuc, byly také identifikovány a diagnostikovány jejich nedostatky, spočívající především ve slabé celkové intenzitě jejich fluorescence. Jako příčina byla odhalena nízká excitabilita a narušená maturace proteinů, řešitelná nejspíše stabilizací a kompenzací acidobazických vlastností vnitřní struktury proteinu rozrušené vnesením mutace H197Y. Získané znalosti poskytují vhled do možností inženýrství proteinu RGFP a poslouží jako pevný základ pro další inženýrství RYFP coby akceptorového fluorescenčního proteinu pro sondu IRrIS.

## Klíčová slova

Bioluminescence; bioluminiscenční rezonanční transfer energie (BRET); IRrIS; mutageneze; proteinové inženýrství; RLuc8; RGFP; RYFP; zobrazování bioluminiscencí

# Annotation

Bioluminescence, the emission of light by living organisms, finds numerous applications in science, industry, and medicine. The bioluminescent system of the marine coral *Renilla reniformis* exhibits exceptionally high emission efficiency, and for this reason, it was previously stabilized to create a bioluminescent probe, IRrIS, which exploits bioluminescence resonance energy transfer (BRET). IRrIS has the potential to advantageously replace other labeling strategies, such as radioactive or purely fluorescent methods; however, it is currently confined to the green spectral range, which is not fully suitable for all applications. This work aims to expand the applicability of the IRrIS probe by engineering the fluorescent protein from *R. reniformis* (RGFP) to emit at longer wavelengths while preserving its biological compatibility with luciferase from the same organism (RLuc). Based on an original sequence-structure analysis, targeted mutagenesis of RGFP was designed and performed. This approach successfully yielded yellow-emitting RGFP variants (RYFP) that interact with RLuc. The best engineered RYFP variant carries the mutations S66G and H197Y relative to the parental RGFP. During the characterization of RYFP variants with respect to their photophysical properties, stability, and ability to interact with RLuc, several shortcomings were identified and analysed. The main limitation is their overall low fluorescence intensity. The cause was determined to be low excitability and impaired protein maturation, most likely resulting from destabilization and disruption of the acid–base properties of the internal protein structure induced by the H197Y mutation. These issues may be addressed through stabilization and engineering of the protein interior. The knowledge gained in this work provides insight into the engineering potential of RGFP and serves as a solid foundation for further development of RYFP as an acceptor fluorescent protein for the IRrIS probe.

## Keywords

Bioluminescence; bioluminescence imaging; bioluminescence resonance energy transfer (BRET); IRrIS; mutagenesis; protein engineering; RLuc8; RGFP; RYFP

# Obsah

|       |                                                                                   |    |
|-------|-----------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1     | Úvod                                                                              | 8  |
| 2     | Teorie                                                                            | 9  |
| 2.1   | Luminiscence a biologické zdroje světla .....                                     | 9  |
| 2.2   | Fluorescence .....                                                                | 9  |
| 2.3   | Bioluminiscence – produkce světla živými organismy .....                          | 9  |
| 2.3.1 | Molekulární principy bioluminiscence                                              | 10 |
| 2.4   | Principy energetického transferu mezi proteiny .....                              | 11 |
| 2.5   | Bioluminiscenční systém korálu <i>Renilla reniformis</i> .....                    | 12 |
| 2.5.1 | Luciferin koelenterazin                                                           | 13 |
| 2.5.2 | Luciferáza RLuc                                                                   | 13 |
| 2.5.3 | Zelený fluorescenční protein RGFP                                                 | 14 |
| 2.5.4 | Podobnost RGFP s dalšími fluorescenčními proteiny                                 | 15 |
| 2.6   | Molekulární interakce mezi RGFP a RLuc .....                                      | 16 |
| 3     | Cíle práce                                                                        | 17 |
| 4     | Materiály a Metodika                                                              | 18 |
| 4.1   | Pufry, roztoky a živná média .....                                                | 18 |
| 4.2   | Bioinformatický návrh mutací proteinu RGFP .....                                  | 19 |
| 4.3   | Návrh a příprava mutagenezních primerů pro metodu MegaPrimer .....                | 19 |
| 4.4   | Cílená mutageneze metodou MegaPrimer .....                                        | 20 |
| 4.5   | Prescreening kandidátních fluorescenčních proteinů .....                          | 22 |
| 4.6   | Produkce rekombinantních proteinů ve velkém objemu .....                          | 23 |
| 4.7   | Purifikace rekombinantních proteinů .....                                         | 23 |
| 4.8   | SDS-PAGE .....                                                                    | 24 |
| 4.9   | UV/Vis spektrofotometrie .....                                                    | 25 |
| 4.10  | Fluorescenční spektrometrie .....                                                 | 25 |
| 4.11  | Hmotnostní spektrometrie .....                                                    | 26 |
| 4.12  | NanoDSF a DLS .....                                                               | 26 |
| 4.13  | Analýza BRET interakce mezi fluorescenčními proteiny a RLuc8 .....                | 26 |
| 4.14  | TRIC/MST .....                                                                    | 27 |
| 5     | Výsledky a Diskuze                                                                | 28 |
| 5.1   | Návrh mutací pro prodloužení vlnové délky emise RGFP .....                        | 28 |
| 5.2   | Příprava genů mutantů RGFP navržených pro prodloužení vlnové délky jeho emise ... | 29 |
| 5.3   | Prescreening navržených mutantů RGFP .....                                        | 30 |
| 5.4   | Produkce a purifikace nejlepších variant RYFP .....                               | 31 |

|      |                                                                                        |    |
|------|----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.5  | Fluorescenční spektrometrie variant RYFP .....                                         | 33 |
| 5.6  | Stanovení termostability variant RYFP .....                                            | 34 |
| 5.7  | Hmotnostní spektrometrie variant RYFP .....                                            | 34 |
| 5.8  | UV-VIS spektrometrie variant RYFP .....                                                | 35 |
| 5.9  | Stanovení hydrodynamického poloměru a oligomerního stavu variant RYFP .....            | 37 |
| 5.10 | Spektroluminometrická analýza interakce RLuc8 a variant RYFP .....                     | 37 |
| 5.11 | TRIC/MST analýza interakce RLuc8 a variant RYFP .....                                  | 39 |
| 5.12 | Shrnutí vlastností nejlepší varianty RYFP a návrh dalšího postupu jejího inženýrství.. | 41 |
| 6    | Závěr .....                                                                            | 42 |
| 7    | Použitá literatura .....                                                               | 43 |
| 8    | Seznam použitých zkratk .....                                                          | 49 |
| 9    | Příloha č.1: Návrh mutací a prescreening mutantů RGFP .....                            | 51 |
| 9.1  | Návrh primerů a mutantů pro mutagenezi RGFP .....                                      | 51 |
| 9.2  | Excitační intenzita naměřená během prescreeningu .....                                 | 52 |
| 9.3  | SDS-PAGE analýza .....                                                                 | 53 |
| 10   | Příloha č. 2: Chromatogramy SEC separace purifikovaných proteinů .....                 | 54 |
| 11   | Příloha č. 3: Stanovení termostability variant RYFP .....                              | 56 |
| 12   | Příloha č. 4: Hmotnostní spektra RYFP GY a RYFP SY .....                               | 57 |
| 13   | Příloha č. 5: Spektra ze spektroluminometrické analýzy .....                           | 59 |

# 1 ÚVOD

Metody využívající emisi biologického světla – fluorescenci anebo bioluminiscenci – mají v dnešní době významné postavení jak v průmyslu, tak ve zdravotnictví a stále skrývají velký potenciál pro další rozvoj. Fluorescence i bioluminiscence jsou klíčovými hráči při fluorescenční mikroskopii, jsou využívány například pro značení rakovinotvorných buněk, pozorování činnosti neuronů, jako kontrola čistoty v nemocnicích nebo pro mapování znečištění v ekosystémech.[1]

Fluorescenční mikroskopie, využívající například fluorescenčních proteinů jako značek, je schopná neinvazivně poskytnout vysoce kvalitní informace o průběhu pozorovaného děje přímo v živé buňce.[2] U fluorescenční mikroskopie je ale nutné využívat k excitaci fluoroforu a produkci fotonu intenzivní externí záření, čímž ale dochází k negativním vlivům jak na zkoumaný vzorek, tak na samotnou fluorescenční značku. Jedná se například o fotovybělování (trvalá ztráta schopnosti fluorescence fluoroforu po příliš dlouhém vystavení silnému zdroji světla) nebo o poškození tkáně okolo zkoumaného vzorku.[3, 4] Těmto nevýhodám je možné se vyhnout použitím bioluminiscenčních enzymů namísto fluorescence. Bioluminiscenční enzym emituje světlo pomocí chemické reakce bez nutnosti externího excitačního záření. Tato metoda ale dlouho nebyla významně využívána z toho důvodu, že bioluminiscenční sondy nebyly schopné poskytnout dostatečný jas a byly ve finále méně efektivní než sondy fluorescenční, i přes jejich nevýhody.[5, 6]

V Loschmidtových Laboratořích byl v roce 2022 zkonstruován prototyp bioluminiscenčního systému IRrIS, který je stabilizovaným komplexem zeleného fluorescenčního proteinu (RGFP) a k němu biologicky kompatibilní luciferázy RLuc se společným původem v mořském žahavci renile fialové (*Renilla reniformis*).[7] IRrIS využívá mechanismu rezonančního transferu bioluminiscenční energie (BRET) k emisi zeleného světla, a díky své unikátní konstrukci dosahuje bezprecedentní, téměř ideální (>99,5%) účinnosti transferu energie mezi zúčastněnými molekulami.[8, 10] Toto je nezanedbatelná výhoda oproti jiným bioluminiscenčním sondám, které mají efektivitu často mnohonásobně nižší.[6] V současné době ale IRrIS dovede emitovat pouze zelené světlo; vytvoření jinak barevných mutantů s podobnou efektivitou energetického přenosu by přineslo mnoho benefitů i možností využití systému. Těmi jsou například značení více struktur v buňce zároveň či jejich souběžné pozorování v reálném čase (tzn. není potřeba fotit snímky s různými strukturami s časovým odstupem zvláště a teprve později je skládat) za využití pouze jednoho substrátu. Dalším přínosem posunu emise směrem k červené části spektra je menší reabsorpce záření tkáněmi, což vede ke snazší detekci hlouběji ve tkáních a tím i k vyšší citlivosti metod.[7, 9, 10]

Tato práce se zabývá tvorbou žlutě emitující varianty fluorescenčního proteinu RGFP a její následnou charakterizací co do chemických a fyzikálních vlastností a schopnosti interakce s luciferázou RLuc8 jako hlavního faktoru pro efektivní BRET v rámci komplexu RGFP/RLuc8.

## 2 TEORIE

### 2.1 Luminiscence a biologické zdroje světla

Pojem luminiscence označuje proces, při kterém dochází k netepelné spontánní emisi světla. Původ luminiscence může být různý, jak chemický, tak biologický či fyzikální, nicméně pro tuto práci i biotechnologický průmysl jsou důležité zejména fluorescence a bioluminiscence.[11, 12]

Revoluce v tomto odvětví přišla v roce 1962, kdy Osamu Shimomura publikoval práci o bioluminiscenční medúze *Aequorea victoria*, za kterou v roce 2008 získal Nobelovu cenu za chemii. Původně měl Shimomura zkoumat pouze malou molekulu luciferin a související bioluminiscenční enzym, které jsou spolu zdrojem bioluminiscence této medúzy. Během práce však objevil také zelený fluorescenční protein (green fluorescent protein; GFP) a princip bioluminiscenčního systému *A. victoria*, založený na kombinaci bioluminiscence a fluorescence propojených mechanismem rezonančního transferu bioluminiscenční energie (bioluminiscence resonance energy transfer; BRET).[13, 14]

### 2.2 Fluorescence

Fluorescence je emise světla, kde je zdrojem excitační energie absorpce fotonu elektronem fluorescenční látky. Excitovaný elektron pak při návratu do základního stavu vyzáří přebytečnou energii v podobě fotonu s o něco nižší energií. Při fluorescenci nedochází ke změně spinu elektronu a doba života emise je tedy krátká, pohybující se v řádu desítek nanosekund.[15, 16]

Fluorescenci můžeme najít u všech živých organismů, byť tato schopnost není vždy na první pohled viditelná: vlastní fluorescenci vykazuje celá řada pro živé organismy běžných látek, např. NADH (nikotinamidadenin dinukleotid) a FAD (flavinadenin dinukleotid)[17], aminokyseliny tyrosin či tryptofan[18] anebo chlorofyl[19]. Většinou je ale fluorescence vedlejší jev způsobený zkrátkou vhodnou strukturou dané molekuly. Účelně fluorescenční molekuly se v přírodě vyskytují spíše zřídka.[14, 20] Vnitřní fluorescenci řady látek je možné využít nejen ve fluorescenční mikroskopii a spektrometrii, ale také ke složitějším analytickým metodám.[15] Příkladem může být například diferenční skenovací fluorimetrie (DSF), u které je sledována fluorescence vnitřních či vnějších fluorescenčních sond reagující na změny např. ve sbalení a struktuře proteinů či jiných molekul.[21]

### 2.3 Bioluminiscence – produkce světla živými organismy

Bioluminiscence je proces emise studeného světla jako důsledek chemické reakce s původem v živém organismu. V přírodě pro organismy znamená schopnost bioluminiscence poměrně velkou konkurenční výhodu. V průběhu evoluce si různé organismy pro bioluminiscenci našly mnoho

způsobů využití, protože průběh bioluminiscence může organismus často poměrně dobře regulovat. Prvním z nich je obrana, kdy organismus využívá bioluminiscenci k odstrašení predátora nebo využije moment překvapení k rychlému útěku. Takovým organismem může být například již zmiňovaná medúza *A. victoria*, která svým světlem vyleká nebo oslepí predátora, který by ji chtěl napadnout. Druhým využitím je naopak lov. Toho využívají často ryby žijící ve velkých hloubkách, kam se už sluneční světlo přes sloupec vody nedostane. Příkladem může být d'as rodu *Melanocostus*, kdy samice má na výrůstku nad ústním otvorem zavěšený váček s bioluminiscenčními bakteriemi. Tato svítící „lampička“ láká menší ryby přímo k tlamě d'ase, který bez větší námahy svou potravu pozře. Světlušky (například rodu *Pteroptyx* v jižní Asii) našly zase jiné využití bioluminiscence, a to pro komunikaci. Tisíce světlušek jsou schopné synchronizovat záblesky světla s přesností až na 20 milisekund mezi vzdálenými stromy.[14, 22]

Na světě existuje mnoho různých bioluminiscenčních systémů, které jsou rozprostřeny napříč celým fylogenetickým stromem.[22] V jedné z teorií evoluce bioluminiscence vědci došli až do doby před výskytem kyslíku v atmosféře, kdy kyslík a jeho sloučeniny byly pro organismy toxické. Tato teorie tvrdí, že tehdy žijící organismy, jako například bakterie, si musely vyvinout systém pro zbavování se kyslíku, k čemuž se hodí i mechanismus bioluminiscence, kde v první fázi dochází k oxidaci luciferinu. Znamenalo by to tedy, že světlo z reakce mohlo být původně odpadní látka, a ne jev, ze kterého by organismus těžil.[14]

### 2.3.1 Molekulární principy bioluminiscence

Princip většiny bioluminiscenčních systémů je založen na podobném molekulárním mechanismu. Za katalýzy enzymem, tzv. luciferázou, dochází k oxidaci energeticky bohaté molekuly, tzv. luciferinu, do podoby tzv. oxyluciferinu. Oxyluciferin při takové reakci vzniká v elektronově excitovaném stavu a jeho spontánní návrat do základního stavu je příčinou emise fotonu. Jednotlivé luciferázy a luciferiny specifické pro různé skupiny organismů či dokonce konkrétní organismy se ale i přes podobný reakční mechanismus liší, a s tím přichází i rozdíly v detailech konkrétních mechanismů bioluminiscence.[23] Kromě přítomnosti kyslíku, bez kterého by reakce neproběhla, je u některých systémů nutná přítomnost dalších látek, tzv. kofaktorů, jako například molekuly ATP (adenosintrifosfát) a iontů  $Mg^{2+}$  u světlušek anebo iontů  $Ca^{2+}$  u řady mořských živočichů.[14, 24]

Informaci o účinnosti bioluminiscenční reakce popisuje bezrozměrná veličina kvantový výtěžek  $\Phi$ , definovaná jako poměr počtu emitovaných fotonů a počtu molekul substrátu spotřebovaných enzymem pro jejich emisi.[15, 25]. Analogicky lze vyjádřit kvantový výtěžek fluorescence jako poměr počtu fotonů fluoroforem emitovaných a fotonů fluoroforem absorbovaných při jeho excitaci. Kvantový výtěžek za účasti energetického transferu (např. při mechanismu BRET popsaném v kapitole 2.4) je definovaný jako poměr počtu fotonů emitovaných akceptorovým fluorescenčním

proteinem a počtu molekul substrátu spotřebovaných donorovým bioluminiscenčním enzymem pro jejich emisi.[26]

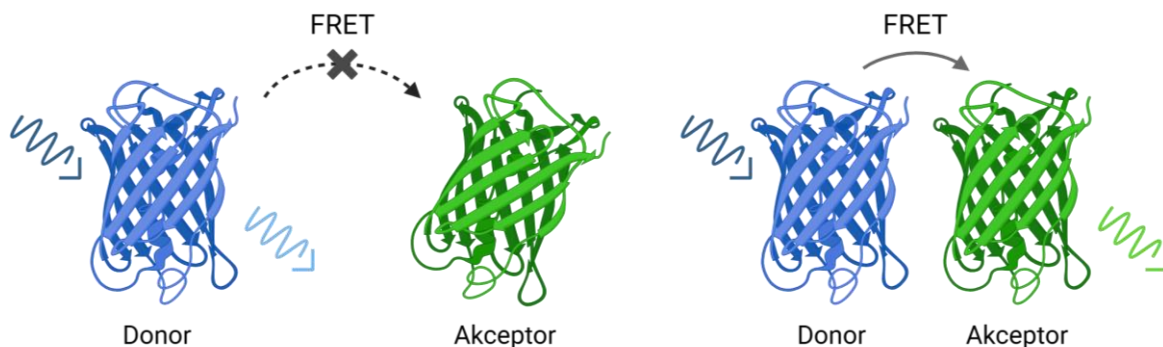
## 2.4 Principy energetického transferu mezi proteiny

Součástí kompletních bioluminiscenčních mechanismů bývá často nejen samotná luciferázová reakce, ale také následný transfer excitační energie z excitovaného, donorového oxyluciferinu na fluorofor funkčního, akceptorového fluorescenčního proteinu. Příkladem přírodních fluorescenčních proteinů fungujících jako „zesilovače“ bioluminiscence mohou být například zmiňovaný RGFP z *R. reniformis* anebo AvGFP z *A. victoria*. [15] Kromě fluorescenčních proteinů tyto systémy obsahují i další komponenty, které zásadně ovlivňují princip komplexního mechanismu bioluminiscence – například substrát-vazebné proteiny reagující na přítomnost signálních iontů[27], anebo systémy pro řízení dodávky kyslíku pro reakce[28].

V přírodě existuje vícero mechanismů, jakými může energetický transfer mezi komponenty bioluminiscenčních systémů probíhat. Nejjednodušším je triviální transfer energie zářením: oxidovaný luciferin emituje foton, který je náhodně reabsorbován fluoroforem fluorescenčního proteinu a zapříčiní tak jeho excitaci. Triviální transfer je nejméně efektivní způsob energetického přenosu z toho důvodu, že tento mechanismus zahrnuje dva různé procesy excitace-emise a také pravděpodobnost, že foton se dostane ke fluoroforu je poměrně malá.[9]

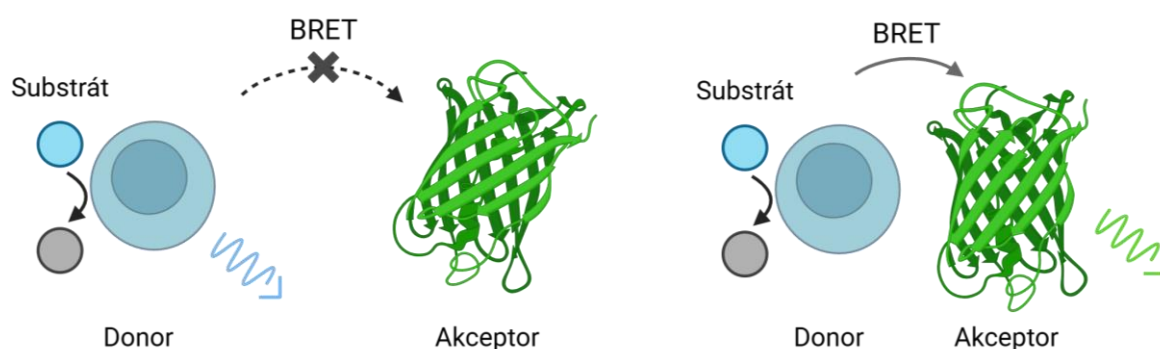
Efektivnější než triviální transfer jsou mechanismy nezářivého transferu energie. Příkladem může být Dexterův transfer energie založený na přímé výměně excitovaného elektronu donoru za elektron v základním stavu akceptoru při jejich přímém kontaktu. Poněvadž v případě bioluminiscence jsou ale donor i akceptor uloženy uvnitř proteinových struktur, přenos energie prostřednictvím Dexterova transferu je velmi nepravděpodobný.[29]

Mechanismus, který umožňuje vysoce účinný transfer energie v rámci bioluminiscenčních systémů, je založený na principu Försterova rezonančního přenosu energie (Förster resonance energy transfer, FRET; Obr. 1). Při transferu energie pomocí FRET dochází k současné deexcitaci donoru a excitaci akceptoru skrze síť coulombických interakcí zprostředkovanou např. uspořádanými molekulami rozpouštědla. Nedochází k fyzické výměně elektronu, pouze k předání excitační energie. Aby ke FRET mohlo účinně dojít, musí být splněny určité podmínky: molekuly si musí být dostatečně blízko, během přenosu musí být správně orientované a musí být energeticky kompatibilní – emisní spektrum donoru a excitační spektrum akceptoru se musí překrývat, resp. přenášená energie musí být vhodná a dostatečná pro excitaci akceptoru.[15, 30, 31]



Obr. 1: Znáornění příkladu systému využívajícího FRET. Modré a zelené struktury znázorňují fluorescenční proteiny, vlnité šipky znázorňují fotony. Vlevo donor a akceptor nesplňují podmínky pro úspěšný FRET (přílišná vzdálenost, nevhodná orientace) a FRET tedy neprobíhá. Vpravo donor a akceptor podmínky FRET splňují a dochází k přenosu energie.

Zmiňovaný mechanismus zodpovědný za přenos energie v rámci komplexních bioluminiscenčních systémů je tzv. rezonanční přenos bioluminiscenční energie (bioluminescence resonance energy transfer, BRET; Obr. 2). BRET je speciální případ FRET, kdy je zdrojem excitační energie biochemická reakce (např. taková, kterou katalyzují luciferázy); donorem energie je tedy excitovaný oxyluciferin a akceptorem fluoroforescenčního proteinu, který je teprve zdrojem emise BRET systému. BRET musí pro svůj správný průběh splnit stejné výše uvedené podmínky, jako jakýkoliv FRET proces.[8, 26]



Obr. 2: Znáornění příkladu systému využívajícího BRET. Modrá větší struktura znázorňuje luciferázu, modrá menší struktura znázorňuje luciferin (substrát) a zelená struktura znázorňuje fluorescenční protein., vlnité šipky znázorňují fotony. Vlevo donor a akceptor nesplňují podmínky pro úspěšný BRET (přílišná vzdálenost, nevhodná orientace) a BRET tedy neprobíhá. Vpravo donor a akceptor podmínky BRET splňují a dochází k přenosu energie.

## 2.5 Bioluminiscenční systém korálu *Renilla reniformis*

*Renilla reniformis* neboli renila fialová je průměrně 2-4 centimetry velký mořský korál vyskytující se především v severním Atlantiku od Severní Karolíny po Floridu.[14, 32] Tento korál je některými zdroji kolokviálně označován také jako „sea pansy“ = „mořská maceška“, nicméně tento název není pro *R. reniformis* výhradní a používá se pro více různých druhů žahavců.[33] *R. reniformis* disponuje vlastním bioluminiscenčním systémem; jeho luciferinem je koelenterazin (CTZ) a jádro jeho bioluminiscenčního systému zahrnuje CZT-dependentní luciferázu (RLuc), zelený fluorescenční

protein (RGFP) a CTZ-vazný protein (*Renilla* coelenterazin-binding protein, RCBP), který luciferin stabilizuje a znepřístupňuje pro volnou spotřebu, čímž kontroluje a ovlivňuje průběh bioluminiscence.[27, 34] RCBP uvolní vázaný CTZ pouze za přítomnosti vápenatých iontů, čímž *Renilla* dokáže velmi přesně a efektivně regulovat reakci luciferinu s kyslíkem. Korál emituje světlo z bodových zdrojů (tzv. fotocytů), které se nacházejí na povrchu těla. Bioluminiscenci využívá primárně k zastrašení predátora.[14]

CTZ se v aktivním místě luciferázy RLuc katalyticky oxiduje za vzniku koelenteramidu v excitovaném stavu. Za přítomnosti RGFP dochází k formaci komplexu RGFP/RLuc, přenosu excitační energie na fluorofor RGFP mechanismem BRET a vysoce účinné emisi fotonu o vlnové délce zeleného viditelného světla s emisním maximem 508,5 nm. Za absence RGFP je luciferáza taktéž schopná emise, nicméně její kvantový výtěžek je dramaticky snížen, samotná luciferázová reakce probíhá mnohem pomaleji a emitované světlo má barvu modrou (cca 480 nm v závislosti na konkrétních podmínkách reakce).[10, 14]

### 2.5.1 Luciferin koelenterazin

Koelenterazin (CTZ) je jedním z nejběžnějších luciferinů v mořském prostředí, kde se vyskytuje v bioluminiscenčních, ale i nebioluminiscenčních organismech. Většina organismů využívající CTZ k emisi světla není schopna si jej syntetizovat sama, takže ho musí získávat prostřednictvím potravy; proces biosyntézy ani hlavní zdroj CTZ v potravním řetězci nebyl dosud identifikován.[35] CTZ je chemicky nestabilní, je citlivý na přítomnost oxidovadel a také na teplotu a světlo; díky své povaze se jednoduše oxiduje, což naznačuje, že v organismech, které CTZ nevyužívají k bioluminiscenci, může plnit roli antioxidantu.[36, 37] Aby ale u organismů, které CTZ využívají k bioluminiscenci, nedocházelo ke ztrátě energie uložené v CTZ touto neproduktivní cestou, je CTZ často *in vivo* stabilizovaný pomocí sulfurylace enzymem koelenterazin sulfokinasou. V tomto stavu je ale nedostupný i pro luciferázu, proto před jeho využitím pro bioluminiscenci musí být stejným enzymem přeměněn zpět na původní koelenterazin.[27, 38, 39]

### 2.5.2 Luciferáza RLuc

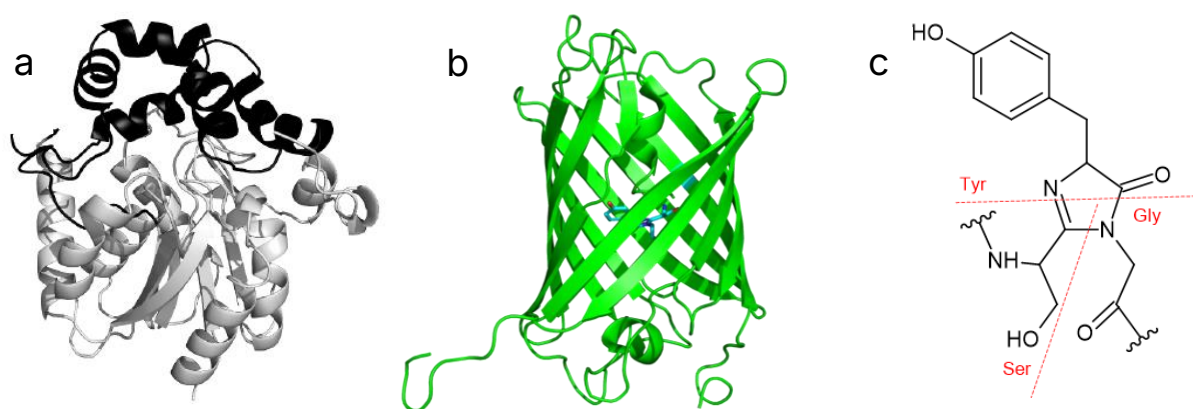
Luciferáza z *R. reniformis* (RLuc) je katalytickou komponentou bioluminiscenčního systému svého organismu a jednou z biotechnologicky nejčastěji využívaných luciferáz. RLuc je 311 aminokyselin dlouhý monomerní enzym o hmotnosti přibližně 36 kDa.[40] Luciferáza RLuc má typickou  $\alpha/\beta$ -hydrolasovou strukturu tvořenou dvěma doménami; hlavní doména je složena z osmiřetězcového  $\beta$ -skládaného listu, okolo kterého se nachází šest  $\alpha$ -šroubovic, víčková doména obsahuje výhradně  $\alpha$ -šroubovice (Obr. 3a). Katalytické místo luciferázy se nachází uvnitř dutiny mezi těmito doménami.[40, 41] RLuc katalyzuje řízenou oxidaci CTZ pomocí kyslíku bez přítomnosti

kofaktoru, což vede k uvolnění energie uložené v CTZ.[27] Molekula divokého typu luciferázy se po zpracování zhruba 100 CTZ molekul inaktivuje.[41] Mechanismus tohoto děje dosud nebyl spolehlivě objasněn. Inaktivace RLuc společně se silnou produktovou inhibicí enzymu vede k emisi bioluminiscence nikoliv trvalým svícením, ale typickými rychlými záblesky, které korál využívá k zastrašení predátora. Inaktivace RLuc je však při lidských aplikacích nežádoucí. Mimoto divoký typ enzymu začíná být nestabilní již při teplotě 35 °C. Tyto, ale i další nežádoucí vlastnosti enzymu brání technologickému využití RLuc, vedly ke hledání mutací, které by vlastnosti enzymu vylepšily.[42] Výsledkem je varianta RLuc8, která oproti divokému typu obsahuje osm bodových mutací. RLuc8 má oproti RLuc zvýšený kvantový výtěžek bioluminiscence, při *in vivo* aplikacích je její emise 200× stabilnější a zmiňovaný inaktivační mechanismus byl zcela odstraněn. V reakci ani ve struktuře se RLuc8 nicméně neliší od původní RLuc a je tedy mnohem lepším modelem a kandidátem pro vědecké i průmyslové využití.[27, 42]

### 2.5.3 Zelený fluorescenční protein RGFP

Zelený fluorescenční protein z *R. reniformis* (RGFP) je hlavním emitorem energie bioluminiscenčního systému svého organismu.[43] RGFP je protein o hmotnosti přibližně 26 kDa a délce 233 aminokyselin. V roztoku tvoří RGFP stabilní dimer. Díky své kompaktní struktuře je RGFP velmi stabilní, a to vůči tepelné, chemické i enzymatické denaturaci.[40]

Z hlediska terciární struktury je RGFP  $\beta$ -soudok, uvnitř kterého je uložen fluorofor, který je zdrojem fluorescence proteinu s excitačním maximem při 498 nm a emisním maximem při 508,5 nm (Obr. 3b).[40] Fluorofor je formován autokatalyticky ze tří následujících aminokyselin proteinu: Ser66, Tyr67 a Gly68 (Obr. 3c). Fluorofor je tak v proteinu vázán kovalentní vazbou, což může za poměrně vysokou teplotní stabilitu a nejspíše i vysoký kvantový výtěžek fluorescence ( $80 \pm 2 \%$ ).[44] Fluorofor je díky své pozici uvnitř  $\beta$ -soudku dobře chráněn před vlivy okolí



Obr. 3: (a) Terciární struktura luciferázy RLuc8. Bíle je značena hlavní doména, černě doména víčková, mezi nimi se nachází zanořené aktivní místo luciferázy.[10] (b) Terciární struktura monomeru RGFP (zeleně) ukazující strukturu  $\beta$ -soudku s fluoroforem (modře) chráněným uvnitř struktury.[46] (c) Struktura maturovaného fluoroforu RGFP s vyznačením původu jeho jednotlivých částí (červeně).[10]

a náhodným zhášením; aminokyseliny zasahují do blízkosti fluoroforu zároveň utvářejí pro fluorofor mikroprostředí umožňující stabilní a kvalitní fluorescence.[44] Fluorescence fluoroforu RGFP se však fundamentálně neodlišuje od fluorescence např. malých organických barviv. Stejně jako v jejich případě je fluorescence RGFP ovlivnitelná co do excitačního a emisního spektra, kvantového výtěžku nebo doby dosvitu vlastnostmi prostředí, ve kterém se fluorofor nachází[45], čehož lze dobře využít při inženýrství fluorescenčních proteinů.[46] Fluorofor nejen že reaguje na obecné parametry prostředí, jako například jeho celkovou polaritu anebo průměrný náboj[45]; pro fluorofor pevně ukotvený v proteinu lze mikroprostředí definovat velmi specificky např. prostřednictvím konkrétního umístění nábojů v okolí fluoroforu, rozšíření delokalizované elektronové hustoty pomocí  $\pi$ - $\pi$  interakcí s fluoroforem[44] anebo částečnou disipací excitační energie cílenou deprotonací excitovaného stavu pro prodloužení Stokesova posunu.[6] Pevné ukotvení fluoroforu tak umožňuje inženýrskou „laditelnost“ fluorescence fluorescenčních proteinů prostřednictvím mutagenese aminokyselin v nitru proteinu.[45, 46]

#### 2.5.4 Podobnost RGFP s dalšími fluorescenčními proteiny

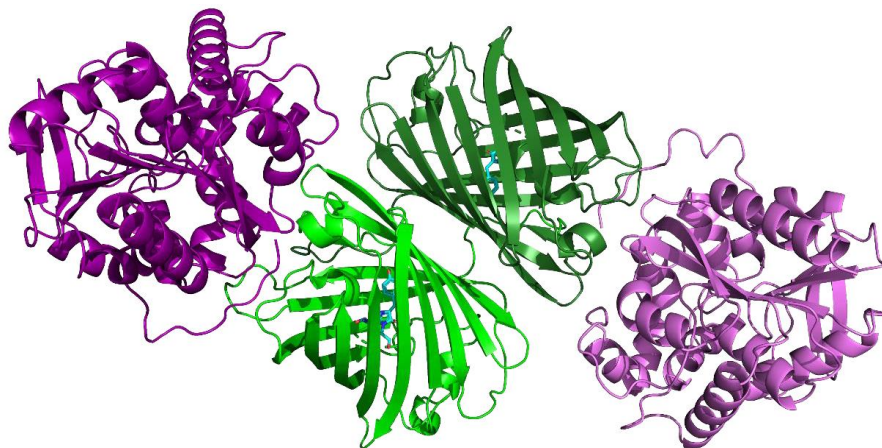
Protein RGFP je svojí strukturou i funkcí velmi podobný řadě dalších fluorescenčních proteinů, ale sekvenční podobnost je často nízká. Největší podobnost můžeme najít u fluorescenčních proteinů pocházejících z jiných korálů než z *R. reniformis*, například protein DsRed z korálu *Discosoma sp.*[47], dendFP z korálu *Dendronephthya sp.*[48] nebo proteiny eqFP578 a eqFP611 ze sasanky *Entacmaea quadricolor*[49]. Byť jsou tyto proteiny RGFP sekvenčně podobnější než jiné, jsou stále příbuzensky docela vzdálené a výrazně se liší funkcí (všechny od přírody emitují červené světlo). Z důvodu nízké přenositelnosti výzkumu provedeného na červených proteinech na zelené fluorescenční proteiny takové postupy nejsou dobrým základem pro inženýrství RGFP, a je tak nutné čerpat z evolučně vzdálenějších, ale funkčně bližších proteinů, jako například zelený fluorescenční protein z *A. victoria* – AvGFP.[44, 46]

Bioluminiscenční systém *A. victoria* byl jedním z prvních bioluminiscenčních systémů, které kdy byly dopodrobna popsány.[13] Protože AvGFP byl v minulosti velmi často používán, zkoumán a mutován, dal vzniknout ohromnému množství variant s výhodnými vlastnostmi dále využitelných ve vědě, zdravotnictví nebo průmyslu. Společně s tím ale podružně vznikala i logicky propojená síť informací, jakýsi inženýrský „fylogenetický strom“, zahrnující návaznost mnoha generací člověkem vyvíjených variant fluorescenčních proteinů, nesoucí informace popisující možnosti racionálního inženýrství zelených fluorescenčních proteinů.[13, 50] Důkladnou analýzou a využitím těchto informací pro identifikaci mutací klíčových pro změny různých vlastností AvGFP je možné takové změny přenést i na jiné zelené fluorescenční proteiny – kupříkladu RGFP, dříve prakticky nedotčený inženýrskými postupy, který ale nově nalezl aplikace v komplexu s luciferázou RLuc8.[40, 43]

## 2.6 Molekulární interakce mezi RGFP a RLuc

Fakt, že RLuc ve svém organismu nepracuje sama, a že RLuc a RGFP jsou vlivem své koevoluce biologicky kompatibilní, začínal být zřejmý již při raných pokusech o purifikaci proteinu RLuc přímo z organismu *R. reniformis*. I přes významné rozdíly ve fyzikálně-chemických vlastnostech RLuc a RGFP docházelo k jejich kopurifikaci.[43, 51] Až později bylo odhaleno, že mezi RLuc a RGFP dochází k energetickému transferu a že příčinou je spontánní specifická protein-proteinová interakce: i malá koncentrace RLuc a RGFP stačila k dosažení efektivního energetického transferu, což by za podmínek jejich homogenní disperze nebylo možné. Právě tato fyzická interakce je klíčová pro správný průběh transferu energie mezi RLuc a RGFP; mechanismus tohoto transferu byl později identifikován jako BRET na základě jeho nebývalé účinnosti dosahující téměř 100 %.[10, 43] Toto ale není způsobeno pouze způsobem přenosu energie – navzdory předchozím představám o funkci fluorescenčních proteinů se RGFP v systému nechová pouze jako emitör, ale svou interakcí přímo ovlivňuje luciferázovou reakci, čímž dále zvyšuje její účinnost i rychlost. Takový systém se zdá ideální pro průmyslové využití, nicméně trpí velkým nedostatkem takové aplikace znemožňující – fyzická interakce je vysoce citlivá na iontovou sílu prostředí a i při o mnoho nižší než fyziologické koncentraci iontů se rozpadá.[9, 43]

Tato zjištění podkládá i nedávno vyřešená struktura komplexu RGFP/RLuc8 (Obr. 4). Tato ukazuje vazebnou stechiometrii 2:2, kdy každá z molekul RGFP na sebe váže jednu molekulu RLuc8. Tato struktura představuje vůbec první detailní popis přírodního komplexu bioluminiscenčního enzymu a fluorescenčního proteinu vůbec a umožňuje bezprecedentní vhled do způsobů, jakým jsou přírodní bioluminiscenční systémy organizované.[7, 9, 10] Na základě této struktury byl komplex RGFP/RLuc8 později úspěšně stabilizován za účelem zpřístupnění výše popsaného mimořádně efektivního komplexního bioluminiscenčního mechanismu pro technologické využití. Prototyp systému má v současné době ale pouze základní funkce a jejich rozšíření prostřednictvím inženýrství nových vlastností RGFP za zachování interakce RGFP/RLuc je tak hlavní motivací této práce.[7, 10]



Obr. 4: Struktura komplexu RGFP/RLuc8 (IRrIS). Ve struktuře jsou zelenou barvou rozlišeny jednotlivé molekuly dimeru RGFP, fluorofory RGFP jsou vyznačeny modře. Molekuly RLuc8 jsou zobrazeny fialově.[10]

### 3 CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem této práce je změna barvy světla emitovaného při fluorescenci RGFP z původní zelené na žlutou za zachování fyzické interakce mezi RGFP a RLuc8. Pro splnění tohoto cíle bylo stanoveno několik dílčích úkolů:

- Provedení literární rešerše ohledně principů luminiscence s důrazem na fluorescenci a bioluminiscenci, bioluminiscenčního systému *Renilla reniformis* a strategii při mutagenезi fluorescenčních proteinů.
- Návrh mutace či mutací proteinu RGFP na základě dostupné literatury, informací v databázích a vlastní bioinformatické analýzy sekvence a struktury proteinu RGFP s cílem změnit barvu fluorescence RGFP ze zelené na žlutou.
- Molekulárně-biologická realizace a rekombinantní produkce navrženého proteinu RYFP včetně optimalizace procesu jeho purifikace.
- Stanovení základních fyzikálně-chemických vlastností připraveného proteinu RYFP, zejména termostability, velikosti, a také intenzity a emisního a excitačního spektra jeho fluorescence, a parametry jeho interakce s RLuc8.
- Identifikace případných nedostatků nově zkonstruovaného RYFP a návrh budoucího postupu v jeho optimalizaci v kontextu využitelnosti RYFP pro sondu IRrIS.

## 4 MATERIÁLY A METODIKA

### 4.1 Pufry, roztoky a živná média

Tab. 1 shrnuje složení všech použitých pufřů, roztoků a živných médií. Pokud není uvedeno jinak, je příprava roztoku triviální: komponenty se naváží, smíchají a rozpustí v daném rozpouštědle. V případě pufřů se pH nastaví pomocí vhodných koncentrovaných kyselin/bází, v případě živných médií po přípravě následuje sterilizace; sterilizace autoklávem probíhá při 121 °C po dobu 20 minut, sterilizace filtrací probíhá pomocí sterilního PES stříkačkového filtru o velikosti pórů 0,2 µm.

Tab. 1: Pufry, roztoky a živná média použité v experimentální části práce a jejich složení.

|                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2x LB médium                                                                           | instantní LB (lysogenní médium/Lennox-Bertani) médium 40 g (Sigma-Aldrich); d H <sub>2</sub> O 1 l; sterilizace autoklávem                                                                                                                                                                 |
| Draseln-fosfátový pufr                                                                 | 16,5 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 3,6 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 500 mM NaCl; 5 mM imidazol; dest. H <sub>2</sub> O; pH 7,5                                                                                                                                              |
| Ekvilibrační Tris pufr                                                                 | 50 mM Tris (2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol); 500 mM NaCl; 5 mM imidazol; dest. H <sub>2</sub> O; pH 7,5                                                                                                                                                                          |
| Eluční Tris pufr                                                                       | 50 mM Tris; 100 mM NaCl; 500 mM imidazol; dest. H <sub>2</sub> O; pH 7,5                                                                                                                                                                                                                   |
| Gel pro agarosovou elektroforézu                                                       | 1,2 g agarosy rozpustit ve 120 ml 1× TAE pufru roztavit v mikrovlnné troubě, po zchladnutí na dotek přidat 4 µl GelRED (Biotium); tuhnutí                                                                                                                                                  |
| Indukční médium (IM)                                                                   | 2× LB médium; 0,6% laktosa; 50 mM HEPES (kyselina 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethan-1-sulfonová)(pH 7,4); 0,5 mM IPTG (izopropyl β-D-1-thiogalaktopyranosid); ampicilin 100 µg/ml; sterilizace filtrací                                                                            |
| LB agar (1,5%)                                                                         | instantní LB médium 4 g; agar 3 g; d H <sub>2</sub> O 200 ml; sterilizace autoklávem                                                                                                                                                                                                       |
| LB médium                                                                              | instantní LB médium 20 g; d H <sub>2</sub> O 1 l; sterilizace autoklávem                                                                                                                                                                                                                   |
| Minimální Tris pufr                                                                    | 10 mM Tris; 5 mM KCl; dest. H <sub>2</sub> O; pH 7,5                                                                                                                                                                                                                                       |
| Nanášecí pufr pro SDS-PAGE (elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti SDS) | 4 ml 10% SDS (dodecylsírán sodný); 1,2 ml 1 M Tris-HCl (pH 6,8); 300 µl 1% bromfenolová modř; DTT (dithiotreitol) 0,308 g; glycerol 2 ml; dest. H <sub>2</sub> O 0,6 ml                                                                                                                    |
| Promývací Tris pufr                                                                    | 50 mM Tris; 100 mM NaCl; 5 mM imidazol; dest. H <sub>2</sub> O; pH 7,5                                                                                                                                                                                                                     |
| Pufr pro SDS-PAGE (pro použití 5× ředěno)                                              | Tris 6,06 g; glycin 28,83 g; SDS 1 g; EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová) 0,584 g; dest. H <sub>2</sub> O 200 ml                                                                                                                                                                      |
| Rozlišovací gel 15% (na 10 gelů)                                                       | rozlišovací pufr 11,5 ml; acrylamide 30% 22,5 ml; dest. H <sub>2</sub> O 10 ml; APS (peroxidisírán amonný) 10% 450 µl; SDS 10% 450 µl; TEMED (tetramethylethylendiamid) 35 µl                                                                                                              |
| Rozlišovací pufr (pro použití 4× ředěno)                                               | 1,5 M Tris; dest. H <sub>2</sub> O; pH 8,8                                                                                                                                                                                                                                                 |
| SOC médium (Super Optimal broth with Catabolite represion)                             | trypton 20 g (Millipore); kvasnicový extrakt 5 g (Millipore); 8,56 mM NaCl 0,5 g; 2,5 mM KCl 0,186 g; 10 mM MgSO <sub>4</sub> 2,46 g; 10 mM MgCl <sub>2</sub> 2,033 g; doplnění do 1 l miliQ; sterilizace autoklávem; po sterilizaci doplnění 20 mM glukosa 3,6 g (sterilizované filtrací) |
| Startovací médium (SM)                                                                 | 2× LB médium; 0,5% glukosa; ampicilin 100 µg/ml; sterilizace filtrací                                                                                                                                                                                                                      |

|                                          |                                                                                                                                                            |
|------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| TAE 10×                                  | Tris 48,4 g; kyselina octová 11,42 ml; 3,7 g EDTA                                                                                                          |
| Zaostřovací gel 5% (na 10 gelů)          | zaostřovací pufr 5 ml; 30% roztok akrylamid/bis-akrylamid 29:1 (Bio-Rad) 2,7 ml; dest. H <sub>2</sub> O 10 ml; aPS 10% 300 μl; SDS 10% 200 μl; TEMED 25 μl |
| Zaostřovací pufr (pro použití 4× ředěno) | 0,5 M Tris; H <sub>2</sub> O; pH 6,8                                                                                                                       |

## 4.2 Bioinformatický návrh mutací proteinu RGFP

Prvním krokem práce bylo navržení mutací pro změnu barvy emise RGFP ze zelené na žlutou. Vzhledem k vysoké podobnosti terciární struktury proteinu RGFP s proteinem AvGFP a velkému množství v literatuře již popsaného výzkumu zaměřeného právě na protein AvGFP (popsáno v kapitole 2.5.4) jsme se rozhodli pro racionální cílenou mutagenezi založenou na adaptaci mutací měnících vlastnosti AvGFP pro RGFP. Strategie cílené mutagenese spočívá ve vnášení přesných, konkrétních mutací do sekvence proteinu, resp. jeho genu. V této práci byla pro cílenou mutagenezi využita metoda MegaPrimer.[52]

Pro nalezení vhodných mutací byla využita databáze fluorescenčních proteinů FPbase[46] ve spojení s odpovídající literaturou, pomocí které byly nalezené mutace verifikovány. Databáze FPbase zahrnuje mimo jiné inženýrské fylogenetické stromy popisující vývojové dráhy jednotlivých přírodních i člověkem vyvinutých fluorescenčních proteinů. Na základě těchto stromů je pak možné stopovat, které mutace mohou být zodpovědné za který typ změn ve vlastnostech fluorescenčních proteinů. U mutantů AvGFP byly hledány takové mutace, které vedly ke změně vlnové délky jejich emisního maxima z původních ~508 nm >525 nm.[50] Takto vytipované mutanty byly strukturně porovnány s proteinem RGFP na základě jejich strukturního přiložení provedeného programem PyMOL 4.6.0. Při rozhodování, zda daná mutace bude zanesena do proteinu RGFP, bylo zvažováno, zda se v odpovídajícím místě RGFP daná aminokyselina již přirozeně nenachází, jak se liší vlastnosti původní a nově vnášené aminokyseliny a zda má vnesení nové aminokyseliny potenciál negativně zasáhnout do struktury proteinu prostřednictvím významných strukturních kolizí. Porovnáním sekvenčního přiložení AvGFP a RGFP provedeného algoritmem MUSCLE v programu Unipro UGene 52.1 s původním strukturním přiložením pak byla určena finální pozice vložení navržených mutací.

## 4.3 Návrh a příprava mutagenezních primerů pro metodu MegaPrimer

Po nalezení vhodných mutací bylo přistoupeno k návrhu primerů pro metodu MegaPrimer mutagenese. V případě běžné polymerázové řetězové reakce (PCR) je primer obvykle fragment deoxyribonukleové kyseliny (DNA) dlouhý 18 – 30 bází.[53] V případě metody MegaPrimer je struktura primeru o něco složitější – mutagenezní primer ve směru 5'-3' obsahuje nejprve cca 21 bází odpovídajících kodonům před místem mutagenese, poté jeden či maximálně několik málo kodonů vnášejících vlastní mutaci, a následně dalších cca 21 bází odpovídajících sekvenci genu za místem

mutageneze.[52] Při výběru nově vnášených kodonů bylo bráno v potaz jejich využití hostitelským organismem – degenerované kodony byly vybírané dle jejich nejčastějšího výskytu u *E. coli*. Dalším zohledněným faktorem při návrhu primerů byla jejich délka, protože ta může měnit stabilitu či specifitu vazby primeru na templát. Vlastnosti navržených primerů – konkrétně jejich teplota tání, tvorba vnitřních sekundárních struktur anebo homo- či heterodimerů – byla analyzována nástrojem OligoAnalyzer (IDT)[54]. Poslední zkoumanou vlastností byla teplota hybridizace primerů, která uvádí, při jaké teplotě bude daná kombinace primerů schopná se nejlépe začlenit do templátové DNA na míru konkrétní DNA polymeráze; tato informace byla zjištěna pomocí Tm Calculator (New England Biolabs)[55]. Při návrhu mutagenezních primerů bylo také zváženo, zdali je lepší daný mutagenezní primer hybridizovat k antikódujícímu (Fw; forward primer) anebo kódujícímu (Rv; reverse primer) vlákně genu.

Takto námi navržené primery byly vyrobeny firmou Merck Millipore.

#### 4.4 Cílená mutageneze metodou MegaPrimer

Prvním krokem k produkci mutovaného proteinu byla mutageneze DNA původního genu kódujícího RGFP. Pro mutagenezi byla použita metoda MegaPrimer využívající pro vložení mutací do cílové sekvence DNA dvě následné PCR. V první PCR (Tab. 2, Tab. 3) dojde k vytvoření mutovaného fragmentu genu (MegaPrimeru) pomocí kombinace univerzálního a mutagenního primeru anebo dvou mutagenních primerů.[52, 56]

Tab. 2: Složení PCR směsi pro syntézu MegaPrimeru; reakční pufr „Phusion HF Buffer“, dNTPs a DNA polymeráza Phusion jsou výrobky firmy New England Biolabs. DNA templát pochází z genové banky Loschmidtových laboratoří.

| Komponenty                 | Koncentrace zásobního roztoku | Objem (μl) |
|----------------------------|-------------------------------|------------|
| MilliQ voda                | -                             | 33,5       |
| Phusion HF Buffer          | 5× koncentrovaný roztok       | 10         |
| Směs dNTPs                 | 10 mM každý                   | 1          |
| Primery                    | 10 μM každý                   | 2 každý    |
| DNA templát (pET21b::RGFP) | ±100 ng/μl                    | 1          |
| DNA polymeráza Phusionp    | 2000 U/ml                     | 0,5        |
| <b>Celkový objem</b>       | -                             | <b>50</b>  |

Tab. 3: Průběh PCR pro syntézu MegaPrimeru.

| Teplota (°C) | Čas    | Počet cyklů |
|--------------|--------|-------------|
| 98           | 30 s   | 1×          |
| 98           | 10 s   | celé 30×    |
| 55           | 20 s   |             |
| 72           | 40 s   |             |
| 72           | 2 min  | 1×          |
| 12           | 59 min | 1×          |

Produkt první PCR byl po reakci smíchán s 10 µl nanášecího pufru „Purple loading dye“ (New England Biolabs) a pomocí horizontální agarózové gelové elektroforézy (120 V, 400 mA, 35 min) izolován od nečistot. V každé dráze gelu bylo separováno maximálně 30 µl vzorku. Proužek gelu obsahující zamýšlený PCR produkt byl pod modrým světlem vyříznut. MegaPrimer DNA byla z vyříznutého proužku extrahována pomocí kitu NucleoSpin Gel (Macherey Nagel) dle protokolu výrobce. Koncentrace a čistota izolované DNA byla stanovena pomocí spektrofotometru NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific).

DNA vzniklá při první PCR je použita coby primer (odtud název MegaPrimer) ve druhé PCR (Tab. 4) s plasmidem nesoucím původní gen jako templátem; mutace je do cílového plasmidu vnesena amplifikací celé délky plasmidu. Druhá PCR proběhla stejným způsobem jako první PCR s tím rozdílem, že místo primerů bylo použito ~100 ng produktu první PCR (dle skutečného objemu roztoku MegaPrimeru byl upraven objem vody pro dosažení celkového objemu PCR směsi 25 µl). Takto vznikla nově syntetizovaná sekvence kompletního plasmidového vektoru pET21b, který obsahoval gen s požadovanou mutací.

Tab. 4: Složení PCR směsi pro syntézu kompletního plasmidového vektoru.

| Komponent                 | Koncentrace zásobního roztoku | Objem (µl) |
|---------------------------|-------------------------------|------------|
| MilliQ voda               | -                             | 17,75      |
| Phusion HF Buffer         | 5× koncentrovaný roztok       | 5          |
| Směs dNTPs                | 10 mM každý                   | 0,5        |
| MegaPrimer DNA            | ± 100 ng/µl                   | 1          |
| DNA templát (pET21b:RGFP) | ± 100 ng/µl                   | 0,5        |
| DNA polymeráza Phusion    | 2000 U/ml                     | 0,25       |
| <b>Celkový objem</b>      | -                             | <b>25</b>  |

Templátová DNA byla z reakční směsi odstraněna pomocí restriční endonukleázy DpnI selektivně štěpící methylovanou DNA (v tomto případě je templátová DNA methylovaná aparátem zdrojových klonovacích buněk *E. coli* DH5α), zatímco nemethylovaná při PCR syntetizovaná DNA štěpena není a zůstává v roztoku nezměněna.

Vytvořenými plasmidy byly transformovány bakteriální buňky *E. coli* DH5α (New England Biolabs) metodou teplotního šoku. Transformace proběhla smísením 10 µl suspenze chemokompetentních buněk *E. coli* DH5α se 100 ng vytvořeného plasmidu a po dvacetiminutové společné inkubaci v ledové tříšti byly buňky vloženy na přesně 45 sekund do termobloku vyhřátého na teplotu 42 °C, načež byly vloženy zpět do ledové tříště. Po pětiminutové inkubaci bylo k buňkám přidáno 200 µl SOC média a buňky byly inkubovány 80 minut při teplotě 37 °C. Následně byly buňky rozetřeny po Petriho misce s agarovým LB médiem s obsahem 100 µg/ml ampicilinu umožňujícího selekci transformovaných buněk; vytvořený plasmid kromě genu zájmu nese také gen

pro rezistenci vůči tomuto antibiotiku a buňka tak na agaru proliferuje pouze tehdy, pokud byla úspěšně transformována plasmidem zájmu. Agary pak byly inkubovány při 37 °C přes noc.

Druhý den bylo vždy pomocí jedné bakteriální kolonie naočkováno 10 ml LB média a médium bylo inkubováno přes noc při 37 °C za třepání (130 rpm). Plasmidy byly z nočních kultur izolovány pomocí kitu NucleoSpin Plasmid (Macherey Nagel) dle protokolu výrobce, načež byla změřena jejich koncentrace a čistota pomocí spektrofotometru NanoDrop One; noční kultury byly použity také pro založení glycerinových konzerv smísením buněčné kultury se sterilním 30% glycerolem v objemovém poměru 1:1 a zamražením směsi při -70 °C. Správnost sekvencí plasmidů byla ověřena komerční sekvenací izolovaných plasmidů poskytovanou firmou Eurofins Genomics.

#### 4.5 Prescreening kandidátních fluorescenčních proteinů

Kontrola, zda navržené mutace změnily barvu fluorescence RGFP na žlutou a zdali při jejich produkci či purifikaci nevzniká nějaký problém, byla provedena pomocí souběžné produkce všech navržených variant RGFP a kontrolních proteinů v malém měřítku. Prvním krokem byla transformace buněk *E. coli* BL21(DE3) (New England Biolabs) pomocí plasmidů nesoucí geny kontrolních proteinů (pET21b::RGFP, pET21b::RLuc8 a pET21b::mLemon; Loschmidtovy laboratoře) a pomocí připravených plasmidů nesoucích mutovaný RGFP (postup transformace byl shodný s postupem v kapitole 4.4). Transformované buňky byly kultivovány při 37 °C přes noc na LB agaru s přídavkem ampicilinu (100 µg/ml).

Do každé z jamek sterilní 24jamkové destičky byly přidány vždy 2 ml SM média. Každá z jamek byla naočkováána pomocí jediné kolonie buněk nesoucích gen pro některý z mutantů RGFP nebo kontrolní protein; pro každý protein byly naočkovány tři jamky pomocí tří různých kolonií bakterií. Destička byla přelepena plynopropustnou membránou a kultivována za třepání (5 h, 37 °C, 200 rpm). Po uplynutí tohoto času bylo do každé jamky sterilně přidáno 2 ml IM média a kultivace pokračovala přes noc při 20 °C (200 rpm).

Destičky byly centrifugovány (10 min, 4 °C, 2000 × g), supernatant byl odstraněn a do každé jamky bylo k buněčnému peletu přidáno vždy 1,3 ml promývacího Tris pufru anebo draselno-fosfátového pufru. Buňky byly resuspendovány a dezintegrovány ultrazvukem. Destičky byly znovu centrifugovány (20 min, 4 °C, 4600 × g). Supernatant z každé jamky destičky byl přenesen do vlastní mikrozkušavky s 12,5 µl resinu pro metaloafinitní purifikaci (TALON SuperFlow Metal affinity Resin, Takara Bio) a inkubován na válcové míchačce (2 h, 4 °C, 40 rpm). Nenavázané proteiny byly odstraněny pomocí centrifugace (2 min, 100 × g), odsátím supernatantu a dvěma opakováními promytí resinu 900 µl daného purifikačního pufru následovanými centrifugací (2 min, 100 × g) a odsátím supernatantu. Do každé mikrozkušavky bylo nakonec přidáno 120 µl

daného purifikačního pufru, směs byla promíchána a 100 µl suspenze bylo přeneseno do jamky 96jamkové černé mikrotitrační destičky s plným dnem. Zbylých 20 µl suspenze bylo smíseno s nanášecím pufrem pro SDS-PAGE a zamraženo při -20 °C pro pozdější analýzu pomocí SDS-PAGE.

Mikrotitrační destička byla analyzována pomocí spektrální čtečky mikrotitračních destiček CLARIOstar Plus (BMG Labtech), pomocí které byly při 25 °C naměřeny první fluorescenční spektra mutovaných proteinů. Analyzovány byly jak excitační (em. 550/8 nm, ex. 320/8-530/8 nm), tak emisní (ex. 450/8 nm, em. 470/8-650/8 nm) spektra.

#### **4.6 Produkce rekombinantních proteinů ve velkém objemu**

Pro získání dostatečného množství proteinů pro jejich důkladnou biochemickou charakterizaci byly vybrané proteiny připraveny ve velkém měřítku. Chemokompetentní buňky *E. coli* BL21(DE3) byly transformovány metodou teplotního šoku (popsáno v kapitole 4.4). Transformované buňky byly nejdříve kultivovány při 37 °C přes noc na LB agaru s ampicilinem (100 µg/ml). Pomocí jediné kolonie bylo naočkováno 10 ml LB média s přidavkem ampicilinu (100 µg/ml) a médium bylo inkubováno na stolní třepačce (5 h, 37 °C, 180 rpm).

10 ml prekultury bylo naředěno do 1 l LB média s přidavkem ampicilinu (100 µg/ml). Kultivace pokračovala další ~3 hodiny, dokud optická hustota (OD<sub>600</sub>) buněčné suspenze nedosáhla hodnoty 0,6 – 0,8, načež byla kultura ochlazená na 20 °C. Do kultury bylo sterilně přidáno IPTG o finální koncentraci 500 µM pro spuštění exprese genu proteinu zájmu. Buňky byly přes noc inkubovány při 20 °C za třepání (115 rpm) a následující den sklizeny pomocí centrifugace (15 min, 4 °C, 3800 × g). Buňky byly resuspendovány v 40 ml ekvilibračního Tris pufru s vysokým obsahem soli (pro zamezení interakce RGFP a jeho mutantů s nukleovými kyselinami) a zamraženy při -70 °C.

#### **4.7 Purifikace rekombinantních proteinů**

Purifikace připravených proteinů proběhla za účelem získání vzorků proteinů zájmu v dostatečné čistotě pro jejich neovlivněnou analýzu. Kdykoliv to bylo možné, kroky purifikace byly provedeny na ledové tříšti anebo v chladové místnosti (8 °C) pro zabránění nežádoucí degradace proteinů zájmu. FPLC (rychlá proteinová kapalinová chromatografie) byla prováděna na přístroji ÄKTA Pure (Cytiva) umístěném v klimatické skříni (8 °C).

Prvotní uvolnění rekombinantního proteinu z šetrně rozmražené buněčné suspenze bylo provedeno desintegrací ultrazvukem za přidavku DNasy I (deoxyribonukleasa I; Merck) o finální koncentraci 50 µg/ml pro naštěpení bakteriální DNA a snížení viskozity suspenze. Nerozpustná složka buněk byla odstraněna centrifugací (30 min, 4 °C, 19 500 × g). Nukleové kyseliny byly

sražený pomocí streptomycin sulfátu o finální koncentraci 1 % (w/w) a po 30 minutách inkubace na ledu byl zbytek nerozpustných složek odstraněn centrifugací (30 min, 4 °C, 19 500 × g).

Pro separaci proteinu zájmu ze získaného bezbuněčného extraktu bylo využito metody IMAC (metaloafinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech) na metaloafinitním resinu TALON.[57] Všechny připravované proteiny nesou hexahistidinovou kotvu; RGFP a jeho varianty na N-konci a RLuc8 na C-konci proteinu.

1 ml resinu bylo ve třech opakováních promyto vždy pomocí přidavku 1 ml ekvilibračního Tris pufru, centrifugace (1 min, 100 × g) a odstraněním supernatantu. Resin byl nakonec rozmíchán v 1 ml ekvilibračního Tris pufru a směs byla smíchána s celým objemem bezbuněčného extraktu. Směs byla inkubována na válcové míchačce (2 h, 40 rpm). Směs byla nanášena na kolonu s gravitačním tokem a mobilní fáze byla odpuštěna. Resin byl promyt postupně 50 ml ekvilibračního Tris pufru a 50 ml promývacího Tris pufru. Následně byl uzavřen spodní vývod kolony, k resinu bylo přidáno 2 ml elučního Tris pufru a směs byla 2 minuty inkubována a eluát byl sebrán do čisté mikrozkušavky; eluce byla provedena ve dvou opakováních.

Proteiny zájmu byly dočistěny pomocí SEC (molekulová vylučovací chromatografie)[58]; pomocí tohoto kroku také proběhlo odstranění imidazolu ze vzorku a výměna pufru za minimální Tris pufr. Získaný eluát byl pomocí FPLC přístroje ÄKTA Pure separován na koloně HiLoad 16/600 Superdex 75pg (Cytiva) ekvilibrované minimálním Tris pufrem. Průběh purifikace byl sledován na základě absorpce při 280 a 498 nm a míry vodivosti. Frakce obsahující protein zájmu byly sloučeny a jejich koncentrace byla upravena na 1 mg/ml buďto naředěním minimálním Tris pufrem anebo zakoncentrováním pomocí centrifugačního filtru Amicon s mezí molekulové hmotnosti 10 kDa (Sigma-Aldrich) dle protokolu výrobce; koncentrace proteinů byla stanovena pomocí spektrofotometru NanoDrop One. Proteinové vzorky byly ve 100 µl alikvotech vitrifikovány v tekutém dusíku a uchovány v hlubokomrazícím boxu při -70 °C. Čistota proteinů byla stanovena pomocí SDS-PAGE.

## 4.8 SDS-PAGE

SDS-PAGE byla využita pro analýzu složení a čistoty proteinových vzorků.[59] Do vertikální formy byla nalita vrstva rozlišovacího gelu, přelita butanolem a ponechána ztuhnout. Butanol byl odsát a přelit vrstvou zaostřovacího gelu; před zatuhnutím byl do gelu vložen hřebínek, který vytvořil jamky pro vzorky. Gel byl umístěn do vertikální aparatury a zalit pufrem pro SDS-PAGE. Vzorky byly smíchány v poměru 1:1 s nanášecím pufrem pro SDS-PAGE, inkubovány při teplotě 95 °C po dobu 10 minut a následně zchlazeny na ledu. Do jedné jamky gelu byly nanášeny 2 µl hmotnostního žebříčku Color Prestained Protein Standard, Broad Range (New England Biolabs), do dalších jamek

bylo nanášeno vždy 10 µl jednotlivých proteinových vzorků. Elektroforetická separace probíhala při konstantním napětí 120 V a proudu 400 mA po dobu cca 90 minut. Gel byl po analýze 30 minut za třepání barven v lázni InstantBlue (Expedeon), dalších 30 minut za třepání promýván v deionizované vodě a následně zdokumentován.

#### 4.9 UV/Vis spektrofotometrie

Měření schopnosti absorpce UV a viditelného světla purifikovaných vzorků bylo provedeno pomocí spektrofotometru Nanodrop One. Rozsah vlnových délek při měření byl od 220 nm do 750 nm. Koncentrace vzorku činila 1 mg/ml a spektrum bylo získáno jako průměr pěti opakování. Pro proteiny byly také vyhodnoceny poměry absorpce při 280/498 nm, 280/517 nm a nakonec 280/394 nm.

#### 4.10 Fluorescenční spektrometrie

Měření excitačních a emisních spekter probíhalo pomocí spektrální čtečky mikrotitračních destiček CLARIOstar Plus vždy pro 100 µl purifikovaného vzorku v jamce černé 96jamkové destičky s plným dnem při konstantní teplotě 25 °C. Toto měření přináší informaci o vlnových délkách, kterými je možné protein optimálně excitovat a které vlnové délky jsou proteinem emitovány (jakou má fluorescence barvu): excitační spektrum vyjadřuje závislost intenzity fluorescence na vlnové délce excitace, emisní spektrum zase udává závislost intenzity fluorescence na její vlnové délce při zvoleném konstantním excitačním záření. Měření excitace probíhalo v rozmezí vlnových délek od 320/8-530/8 nm při emisi 550/8 nm, měření emise probíhalo v rozmezí vlnových délek od 470/8-650/8 nm při excitaci 450/8 nm. Tyto vlnové délky byly zvoleny pro získání kompletního tvaru spekter, avšak takto není možné porovnávat celkovou intenzitu emise zelených a žlutých fluorescenčních proteinů; zvolené parametry pro měření emisních spekter inherentně zvýhodňují žlutě emitující fluorofor a *vice versa*. Pro porovnání celkové intenzity fluorescence proto bylo provedeno odlišné měření pro zohlednění rozdílů ve vlastnostech fluoroforů, kdy byl každý z proteinů excitován vlnovou délkou o právě 20 nm nižší, než jeho stanovené excitační maximum a emise byla měřena jako jediná diskrétní hodnota v rozmezí  $\pm 20$  nm okolo emisního maxima daného proteinu. Všechna měření byla provedena ve třech opakováních pro purifikované proteiny o shodné koncentraci 1 mg/ml.

#### 4.11 Hmotnostní spektrometrie

Měření pomocí hmotnostního spektrometru proběhlo za účelem zjištění skutečně intaktní hmotností proteinů, kontroly kvality purifikace a kvůli sekvenaci trypsinových digestů, zejména pak fragmentu zahrnujícím aminokyseliny RGFP 66-68, z čehož je možné kvantitativně určit, jestli a jaký podíl proteinu se nachází ve správně maturované formě. Měření intaktní hmotnost bylo provedeno metodou MALDI-TOF (Matrix assisted Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight), kdy je vzorek smíchán s ionizační matricí a v suchém stavu ozářen pulsem laseru, čímž dochází k současné ionizaci a desorpci celé molekuly proteinu. Ionty jsou urychleny a jejich letová doba určí jejich  $m/z$ . [60] Sekvence trypsinových digestů proteinů byla provedena pomocí LC-MS/MS (LC – kapalinová chromatografie; MS/MS – hmotnostní spektrometrie); protein je nejprve štěpen pomocí enzymu trypsinu na kratší peptidy, které se poté separují pomocí LC, jsou ionizovány a převedeny do plynné fáze pomocí elektrospreje a identifikovány pomocí MS/MS, což umožňuje specifitější a podrobnější analýzu složitějších vzorků a určení jejich struktury. [61]

Měření a analýza dat byla poskytnuta laboratoří Proteomika při CEITEC MU; měření bylo provedeno zaměstnanci této laboratoře.

#### 4.12 NanoDSF a DLS

Termostabilita proteinů byla stanovena metodou nanoDSF (diferenční skenovací fluorimetrie v nanoformátu). Fluorescence tryptofanu je měřena ve dvou vlnových délkách, 330 a 350 nm, jejichž poměr  $E_{350}/E_{330}$  je hlavní měřená veličina. [62] Měření proběhlo pro vzorky proteinů v koncentraci cca 0,1 mg/ml, vždy ve třech opakováních. Vzorky byly naplněny kapiláry, které byly analyzovány pomocí přístroje Prometheus Panta (Nanotemper) co do parametru  $E_{350}/E_{330}$  v závislosti na tepelné rampě (25 – 95 °C, 1 °C/min).

Stejným přístrojem byly stejné vzorky proteinů analyzovány pomocí DLS (dynamický rozptyl světla) v pokusu o stanovení jejich hydrodynamického poloměru. [62]

#### 4.13 Analýza BRET interakce mezi fluorescenčními proteiny a RLuc8

Kromě vlnové délky emitovaného světla je pro aplikabilitu předmětu této práce důležitá informace, zda jsou mutované proteiny s případnou žlutou emisí stále schopné interagovat s luciferázou RLuc8 prostřednictvím BRET. Veškeré měření v této kapitole bylo provedeno pomocí přístroje CLARIOstar Plus, v bílé 96jamkové mikrotitrační destičce s plným dnem, v triplicátu, při teplotě 25 °C.

Pro fluorescenční protein byla připravena řadící řada v minimálním Tris pufru s konstantní koncentrací RLuc8 200 nM v každém bodě ředící řady. Finální koncentrace RGFP a mutovaných

fluorescenčních proteinů byla v rozsahu 6,25 nM – 6,4 μM. Mimoto byl analyzován i kontrolní vzorek bez přítomnosti fluorescenčního proteinu. Ke každému vzorku bylo automaticky pumpou přístroje přidán CTZ o finální koncentraci 15 μM. Jamka byla promíchána zatřepáním (3 s, 450 rpm, dvojité orbital) a dvě sekundy stabilizována, načež bylo stanoveno emisní spektrum vzniklé luminiscence (em. 350/8-700/8 nm). Takto byly sekvenčně změřeny všechny body ředící řady.

Vyhodnocení dat proběhlo na základě extrakce intenzity emise při 475±3 nm, 508±3 nm pro RGFP a 525±3 nm pro žluté mutanty RGFP z emisního spektra a vynesemím dat coby titrační křivky závislosti poměru emise  $E_{475}/E_{508}$  resp.  $E_{475}/E_{525}$  na koncentraci fluorescenčního proteinu v daném bodě ředící řady. Titrační křivka byla proložena modelem vazby dle Hilla a Langmuira pomocí software GraphPad Prism.[63]

#### 4.14 TRIC/MST

TRIC/MST (teplotně závislá změna fluorescence a termoforéza v mikroměřítku) je metoda pro důkaz a stanovení vazebné afinity dvou molekul vyjádřené kvantitativně disociační konstantou  $K_d$ . Sledovaná veličina je poměr normalizované fluorescence kapiláry naplněné roztokem fluorescenčního nebo fluorescenčně značeného vzorku před a v daném čase po lokálním zahřátí vzorku infračerveným laserem; fluorescence je měřena v místě ohřevu vzorku.[64]

Pro RLuc8 byla připravena ředící řada v minimálním Tris pufru s konstantní koncentrací fluorescenčního proteinu v každém bodě ředící řady. Finální koncentrace RLuc8 činila 0,41 nM – 13,5 μM, finální koncentrace RGFP činila 20 nM, pro RYFP SY a GY činila 100 nM. Roztoky byla naplněna sada skleněných kapilár, která byla analyzována pomocí přístroje Monolith NT.115 (NanoTemper) dle standardního protokolu výrobce. Fluorescence byla sledována při ex. 465-490 nm a em. 500-550 nm. Měření proběhlo v triplicátu, při počáteční teplotě kapilár 22 °C.

Změna fluorescence byla vyhodnocena pomocí software výrobce přístroje MO.Affinity analysis v2.3 proložením pomocí modelem kooperativní vazby dle Hilla-Langmuira[10] pro získání disociační konstanty  $K_d$  a Hillova koeficientu interakce  $n_H$ . [65]

Měření bylo provedeno samostatně autorkou práce ve sdílené laboratoři pro biomolekulární interakce a krystalografii při CEITEC MU na přístroji v majetku této laboratoře.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 Návrh mutací pro prodloužení vlnové délky emise RGFP

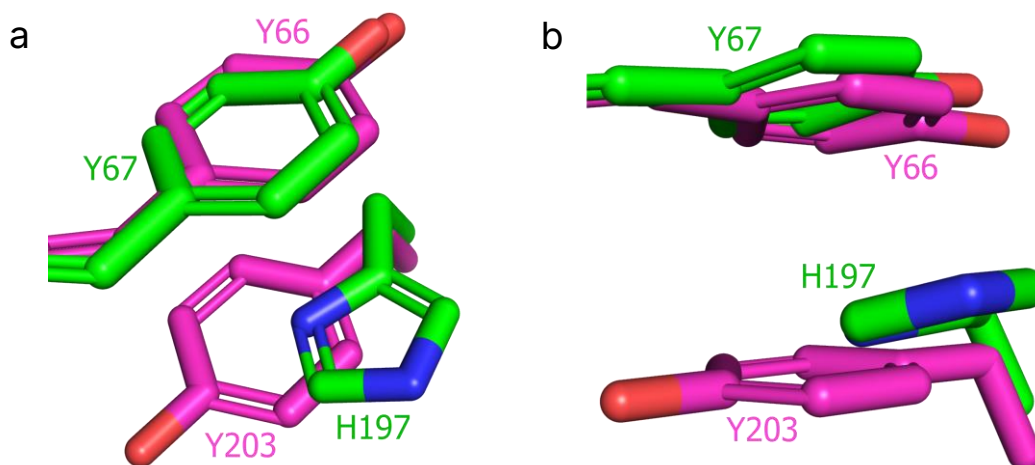
Prvním krokem pro přípravu mutantů RGFP s delší vlnovou délkou emise byl racionální návrh mutací na základě přenosu znalostí o vlivu různých mutací na vlnovou délku emise AvGFP.

Jako první klíčová lokace pro mutagenezi AvGFP byla identifikována jeho pozice 203; v divokém typu AvGFP se zde nachází threonin.[44] Z analýzy databáze fluorescenčních proteinů bylo zjištěno, že záměnou Thr203 za residuum aromatické aminokyseliny (tyrosin nebo fenylalanin) spolehlivě dochází k červenému posunu emisního maxima proteinu o zhruba 20 nm, z původních 508,5 nm na cca 526 – 528 nm. K této výrazné změně dochází i v rámci jedné generace inženýrství fluorescenčního proteinu: AvGFP → EYFP, Superfolder GFP → Superfolder YFP anebo mChartreuse → mLemon jako příklady mutace T203Y anebo EYFP → SHardonnay a EGFP → mAmertine jako příklady mnohem méně prováděné mutace T203F.[46] Toto bylo objasněno vlastním strukturním srovnáním AvGFP (PDB ID 1EMA) se strukturami příbuzných žlutých fluorescenčních proteinů nesoucích tuto mutaci – EYFP (PDB ID 3V3D) a Venus (PDB ID 1MYW) – a srovnáním s dřívějšími studiemi[44] na toto téma. Bylo zjištěno, že změna emise je pravděpodobně způsobena tím, že se postranní řetězec nově vložené aromatické aminokyseliny dostane do strukturního zákrytu rovnoběžně s aromatickým kruhem Tyr66 fluoroforu AvGFP, čímž dojde k vytvoření nové  $\pi$ - $\pi$  interakce a tím rozšíření delokalizované elektronové hustoty fluoroforu proteinu.

Na základě strukturního a sekvenčního přiložení bylo zjištěno, že pozice AvGFP 203 odpovídá pozici RGFP 197; v divokém typu RGFP se zde již nachází histidin, podobně aromatický, jako tyrosin či fenylalanin. Toto by mohlo nasvědčovat tomu, že by již RGFP měl emitovat žlutě. V praxi tomu tak nicméně není, nejspíše proto, že na rozdíl od méně polárního tyrosinu nebo fenylalaninu je histidin silně polární, a jeho imidazolová postranní skupina má aromatickou povahu pouze v protonovaném stavu, který není ve struktuře zaručen. K aromaticitě histidinu je potřeba alespoň slabě kyselé prostředí, nicméně strukturní okolí histidinu v RGFP se chová spíše zásaditě.[66, 67]

Pro větší jistotu byla struktura RGFP (PDB ID 8S1V) v tomto ohledu porovnána se strukturou Venus (Obr. 5) a EYFP. Bylo zjištěno, že v místě aromatického kruhu Tyr203 proteinů odvozených od AvGFP se His197 RGFP chová odlišně a není rovnoběžný s Tyr66 fluoroforu AvGFP (resp. Tyr67 v případě RGFP), což prakticky vylučuje  $\pi$ - $\pi$  interakci vyžadující paralelní uspořádání aromatických kruhů a dále vysvětluje zelenou emisi RGFP.[68] V tomto byl nalezen konflikt s jednou z ranných studií AvGFP popisující mimo jiné mutant AvGFP S65T/T203H.[44] Studie připisuje mutantu T203H žlutou emisi, avšak toto nepodporují žádná následná publikovaná měření, ani vlastnosti jiných

mutantů odvozených od AvGFP nesoucích tuto mutaci (např. Clover nebo mGreenLantern), kdy byla barva emise vždy zelená, a záznam o žluté emisi AvGFP T203H je tak nejspíše chybný.



Obr. 5: Porovnání relativní pozice Y203 a Y66 ve Venus (růžově) a relativní pozice H197 a Y67 v RGFP (zeleně). Modré části struktury odpovídají dusíku a červené kyslíku; (a) pohled šikmo vůči rovině aromatických kruhů tyrosinů, (b) pohled rovnoběžně s rovinou aromatických kruhů tyrosinů.

Dalšími mutacemi navrženými pro první kolo mutagenese RGFP byly změny v první aminokyselině fluoroforu S66 (resp. S65 v případě AvGFP). Žluté mutanty AvGFP v této pozici často nesou mimo serinu buďto glycín (zejména žluté fluorescenční proteiny odvozené od EYFP, ale i mLemon odvozený od Superfolder GFP anebo Hyperfolder YFP odvozený od linie proteinu Clover) anebo méně často threonin (např. Superfolder YFP anebo žlutě emitující fluorescenční proteiny v původní studii krystalografické struktury AvGFP).[44, 46, 69] Význam těchto mutací není v kontextu žluté emise zřejmý, v případě glycínu se ale může jednat např. o zlepšení intenzity emise vlivem větší flexibility fluoroforu díky malému glycínu umožňujícímu běžně nedosažitelné torsní úhly páteře proteinu anebo menší sterické zábrany při maturaci fluoroforu.[70]

Souhrnem, pro mutagenesi RGFP byly navrženy mutace H197Y, H197F, S66G a S66T.

## 5.2 Příprava genů mutantů RGFP navržených pro prodloužení vlnové délky jeho emise

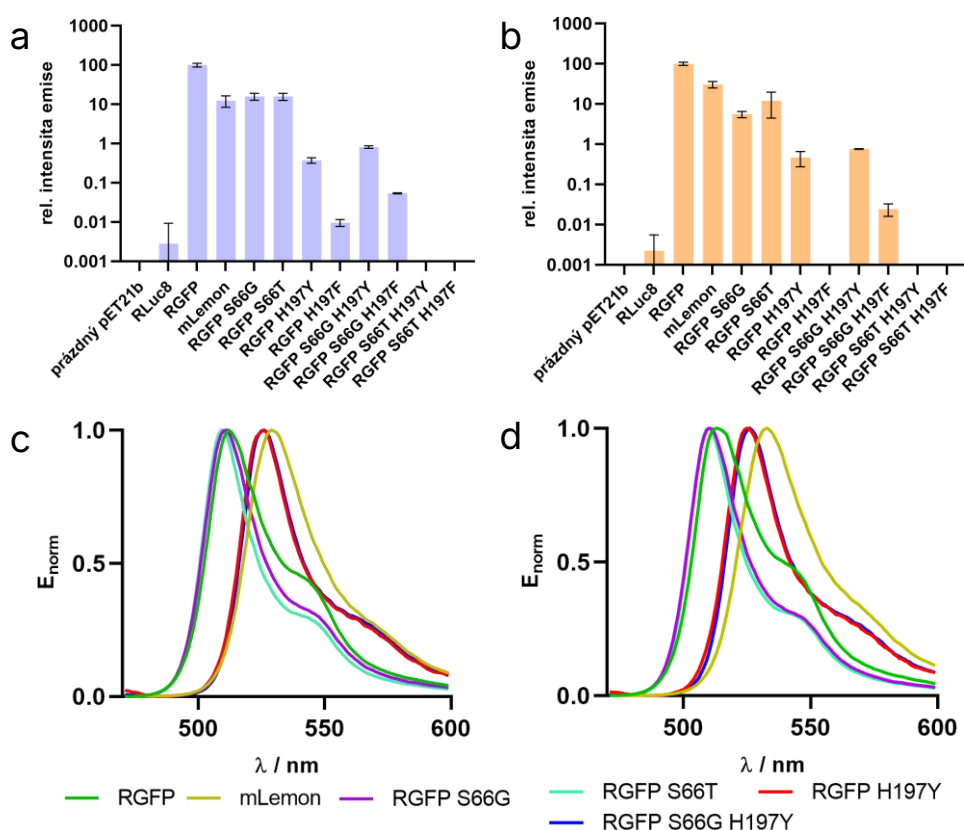
Na základě designu provedeného v kapitole 5.1 byly navrženy 4 primery (Tab. P1) pro vnesení navržených mutací do genu RGFP jak jednotlivě, tak ve všech smysluplných kombinacích. Primery pro mutaci pozice 197 byly navrženy pro vazbu ke kódujícímu vlákně genu a elongaci směrem k počátku genu (Rv), primery pro mutaci pozice 66 byly navrženy pro vazbu k antikódujícímu vlákně genu a elongaci směrem ke konci genu (Fw). Takto bylo úspěšně připraveno celkem 8 MegaPrimerů pro přípravu mutantů RGFP (Tab. P2, Obr. P1), pomocí kterých byly následně úspěšně vytvořeny varianty plasmidu pET21b nesoucí jednotlivé navržené varianty RGFP.

### 5.3 Prescreening navržených mutantů RGFP

Krokem následujícím po přípravě genů mutantů RGFP byla příprava těchto proteinů v malém měřítku pro předběžné stanovení, zda byla změna emisního spektra RGFP úspěšná. Mimo samotné mutanty RGFP byly paralelně produkovány také kontrolní proteiny: divoký typ RGFP, nefluorescenční RLuc8, žlutě fluoreskující mLemon, a nakonec také kultura nesoucí pouze prázdný plasmid pET21b (Obr. 6). Od fluorescence všech produkováných proteinů bylo odečteno pozadí (fluorescence purifikátu buněk nesoucích prázdný plasmid) pro vyloučení vlivu nespecifické fluorescence na měření; tato fluorescence byla velice nízká a identická s fluorescence purifikátu z kultury produkující RLuc8. Purifikace všech proteinů byla provedena ve dvou různých standardních pufrch pro posouzení vlivu prostředí na kvalitu purifikace.

Připravené mutanty RGFP S66G a S66T dle očekávání emitovaly zelené světlo s o něco sníženou intenzitou oproti divokému typu RGFP; toto odpovídá literatuře, ze které bylo při návrhu těchto mutací čerpáno.[44]

Z předběžné charakterizace mutantů RGFP vyplynulo, že dva z nich – RGFP H197Y a RGFP S66G/H197Y – vykazují výraznou žlutou fluorescenci s maximem emise při 525–526 nm, přičemž mutant RGFP S66G/H197Y fluoreskoval zhruba 3× jasněji než mutant H197Y. Tento výsledek byl



Obr. 6: (a) Relativní intenzita emise a (c) emisní spektrum vybraných mutantů s nejvyšší intenzitou emise a kontrol v promývacím Tris pufru, identické měření (b, d) pro proteiny v prostředí draseln-fosfátového pufru. Proteiny byly vždy excitovány při 498 nm. Popisky emisních spekter jsou společné pro oba grafy.

překvapivý z důvodu opačného trendu, než je pozorován při srovnání RGFP S66G s divokým typem RGFP, kdy mutace S66G způsobuje naopak snížení intenzity emise. Emise obou žlutě fluoreskujících mutantů je však slabší než emise divokého typu RGFP anebo proteinu mLemon. Nutno podotknout, že varianty RGFP nesoucí mutaci H197F vykazovaly emisi spektrálně velice podobnou variantám nesoucím mutaci H197Y, taktéž došlo k červenému posunu emise, avšak jejich fluorescence byla co do intenzity emise velice nízká, často na limitu detekce přístroje. Naměřená emisní maxima proteinů s významnou intenzitou emise jsou shrnuta v Tab. P3.

Využití promývacího Tris pufru poskytnulo obecně kvalitnější výsledky purifikace, získané výsledky byly nicméně pro prostředí promývacího Tris pufru a draselno-fosfátového pufru co do interpretace shodné.

Připravené proteiny byly analyzovány pomocí SDS-PAGE. Analýza proběhla pro vzorky buněčného extraktu a proteinu purifikovaného pomocí metaloafinitního resinu, pro purifikaci v prostředí promývacího Tris pufru i draselno-fosfátového pufru. Gely jsou zdokumentovány v Obr. P3 a Obr. P4. Pozorovaná velikost RLuc8 odpovídala očekávaným cca 36 kDa[40], stejně tak velikost RGFP a mLemon odpovídala očekávaným cca 27 kDa.[40, 71] Velikost připravených mutantů byla dle očekávání podobná velikosti RGFP mimo mutant RGFP H197F; příčina zdánlivě větší velikosti RGFP H197F nebyla odhalena. Z analýzy pomocí SDS-PAGE je patrné, že při využití draselno-fosfátového pufru je purifikace málo účinná a na metaloafinitním resinu dochází k významnému zadržování některých proteinů *E. coli*; tyto proteiny jsou patrné i pro stopu, ve které byl separován vzorek připravený z kultury nesoucí pouze prázdný plasmid pET21b.

Na základě předběžné charakterizace byly pro další produkci a charakterizaci vybrány mutanty RGFP H197Y (dále označován jako RYFP SY) a RGFP S66G/H197Y (alias RYFP GY). Pro purifikaci a další charakterizaci fluorescenčních proteinů bylo zvoleno prostředí Tris pufr, který se pro tyto účely ukázal celkově vhodnější než draselno-fosfátový pufr.

## 5.4 Produkce a purifikace nejlepších variant RYFP

Při prescreeningu identifikované kandidátní proteiny RYFP SY a RYFP GY byly vyprodukovány a purifikovány ve velkém měřítku. Stejným způsobem byl připraven také divoký typ RGFP coby referenční protein a luciferáza RLuc8 pro testy interakce s kandidátními variantami RYFP.

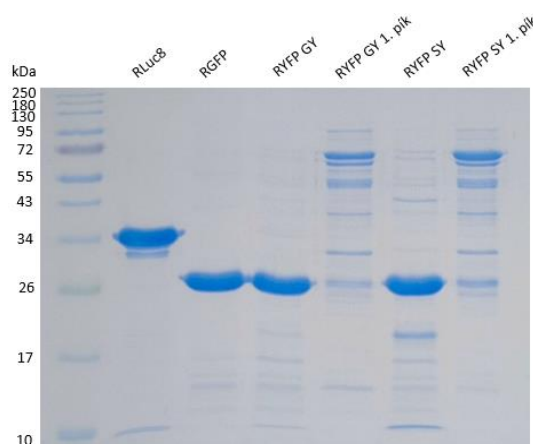
Při první purifikaci proteinů bylo zjištěno, že varianty RGFP nejsou dobře separovány od nukleových kyselin; purifikované proteiny vykazovaly absorpční maximum při 260 nm, spíše než při 280 nm. Toto bylo při produkci RGFP v Loschmidtových laboratořích pozorováno již dříve, a znečištění nukleovými kyselinami je přisuzováno kombinaci kladného náboje RGFP při pH

purifikace a využití DNasy pro štěpení DNA v buněčném extraktu na menší fragmenty, lépe přenositelné nespecifickou vazbou na RGFP.[72] Pracovní postup byl proto oproti prescreeningu mírně upraven: obsah NaCl v ekvilibračním Tris pufru byl navýšen na 500 mM pro potlačení elektrostatických interakcí, a po sedimentaci nerozpustných složek pufru byl přidán krok srážení nukleových kyselin streptomycinem následovaný opětovnou sedimentací sraženiny s obsahem nukleových kyselin.

Chromatogramy SEC separace jsou k vidění v kapitole 10. RLuc8 a RGFP byly eluovány v jednom píku dle očekávání, srovnatelně s jejich dřívějšími separacemi pomocí SEC provedenými v Loschmidtových laboratořích. Chromatogramy separace RYFP SY a RYFP GY oproti píku absorbujícímu při 280 i 498 nm (tedy pravděpodobně obsahujícímu protein zájmu) obsahovaly ještě druhý významný pík v nižším retenčním čase, absorbující pouze při 280 nm. Prozatím není jasné, zda se jedná o vyšší oligomerní stav či agregát daných variant RYFP anebo zda se jedná o nesouvisející kontaminující molekuly; identita neznámých látek eluovaných v těchto picích byla dále zkoumána.

Celkový výtěžek proteinů činil 15,8 mg RLuc8, 17,3 mg RGFP, 10,3 mg RYFP SY a 4,0 mg RYFP GY z 1 l původní kultury; mimoto bylo z těžších frakcí RYFP SY a RYFP GY získáno 3,6 a 2,8 mg proteinů o neznámé identitě. Obě varianty RYFP byly získané v nižším výtěžku než RGFP. Zjištěné hodnoty výtěžků částečně vysvětlují jejich nižší intenzitu emise při prescreeningu, avšak ne zcela: ze získaných hodnot vyplývá, že nižší výtěžek nemůže být jediným důvodem snížené emise proteinů.

Pro purifikované proteinové frakce byla provedena kontrola kvality pomocí SDS-PAGE. Pro proteiny RLuc8 a RGFP byla detekována očekávaná denaturovaná velikost[40], pro proteiny RYFP SY a RYFP GY byla detekována velikost shodná s výsledky SDS-PAGE prováděné při prescreeningu (Obr. 7). Densitometricky stanovená čistota proteinů činila pro všechny vzorky > 98 %.

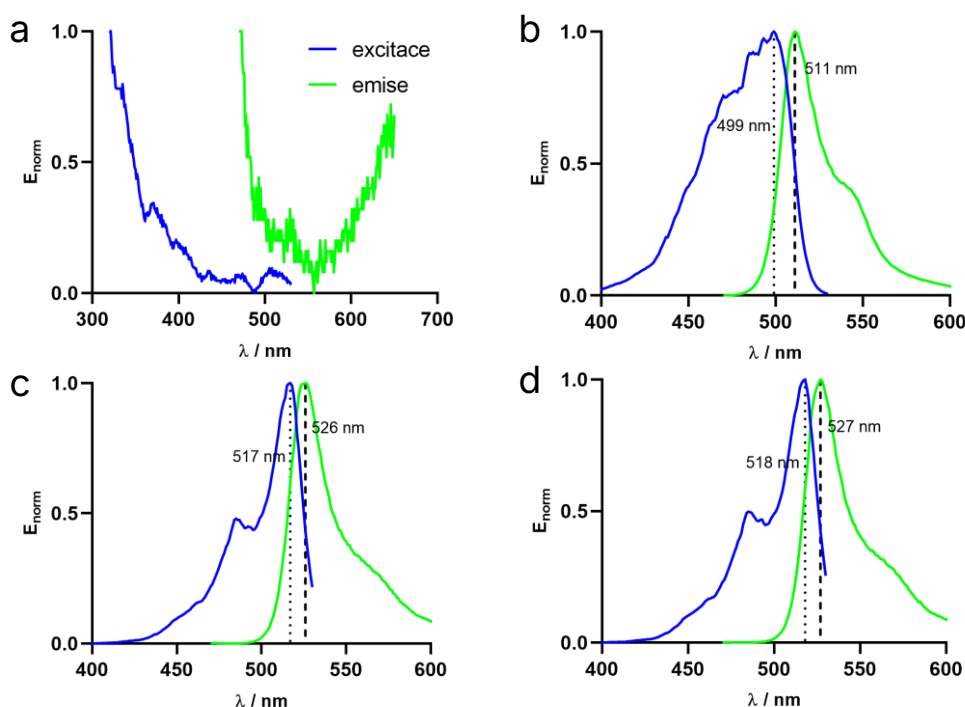


Obr. 7: SDS-PAGE analýza purifikovaných proteinů RLuc8, divokého typu RGFP, kandidátních mutantů (RYFP SY a RYFP GY) a těžší frakce získané (první píky) získané při SEC separaci těchto mutantů.

Souběžně se vzorky proteinů byly pomocí SDS-PAGE analyzované také těžší frakce získané při SEC separaci RYFP SY a RYFP GY. V obou případech těžší frakce nejspíše obsahují malé množství dané varianty RYFP, avšak většina detekovaného proteinu má vyšší hmotnost, která není násobkem hmotnosti RYFP; není pravděpodobné, že se jedná o formy RYFP. Hmotnost majoritních složek (cca 54 a 70 kDa) by mohla být vysvětlena přítomností neočekávaných dimerů a trimerů proteinů, avšak mimoto frakce obsahují řadu dalších komponent a jejich identifikace tak byla provedena pomocí MS.

## 5.5 Fluorescenční spektrometrie variant RYFP

Pro purifikované proteiny RYFP SY a RYFP GY byla změřena fluorescenční emisní i excitační spektra za účelem zisku referenčních měření na co nejčistším možném vzorku. Naměřená excitační i emisní spektra RYFP SY i RYFP GY ukazují červený posun v porovnání s divokým typem RGFP, čímž se potvrdilo měření z jejich prescreeningu. Excitační a emisní maximum RGFP bylo stanoveno jako 499 a 511 nm; stanovené emisní spektrum je mírně vyšší oproti běžně pozorované hodnotě 508,5 nm[13, 40]; toto je nejspíše způsobeno mírným efektem vnitřního filtru z důvodu vyšší než ideální koncentrace RGFP při měření (1 mg/ml).[73, 74] Emisní maxima RYFP SY a RYFP GY byly stanoveny jako 526 resp. 527 nm (Obr. 8), tedy dle zažitých norem lze tyto proteiny skutečně označovat jako „žluté“ podobně jako např. EYFP (ex. 513 nm, em. 527 nm).[75] Excitační spektra RYFP SY a RYFP GY vykazují excitační maximum při 517 resp. 518 nm s výrazným lokálním maximem okolo 475 nm. Toto lokální maximum se velmi dobře překrývá s emisním maximem luciferázy RLuc8, a proto lze předpokládat, že excitace variant RYFP pomocí energie uvolňované RLuc8 z CTZ při luciferázové reakci je realistická.



Obr. 8: Porovnání normalizovaných excitačních a emisních spekter (a) RLuc8 jako nefluorescenční kontroly, (b) divokého typu RGFP, (c) RYFP SY a (d) RYFP GY.

Jedním z nedostatků variant RYFP zjištěných při prescreeningu byla jejich zdánlivě nižší intenzita emise oproti RGFP. Poněvadž z emisních/excitačních spekter však toto nelze kvantitativně srovnávat, proběhlo i měření samotné srovnatelné intenzity emise. Oproti relativní emisivitě RGFP ( $1,000 \pm 0,002$ ) byla při shodné koncentraci proteinu pro RYFP SY naměřena hodnota  $0,054 \pm 0,001$  a pro RYFP GY hodnota  $0,082 \pm 0,001$ . Oproti RGFP tedy dochází k mnohem slabší emisi, a to cca  $12\times$  pro RYFP GY a téměř  $19\times$  pro RGFP SY. Toto může být způsobeno vícero faktory – buďto protein není energii schopen akceptovat (nízký excitační koeficient), není ji schopen emitovat (nízký kvantový výtěžek fluorescence) anebo část proteinů ve vzorku nemusí být z důvodu nově vnesených mutací schopná správné maturace fluoroforu, a tedy není fluorescenční vůbec.

## 5.6 Stanovení termostability variant RYFP

Termostabilita RYFP SY a RYFP GY byla stanovena pomocí nanoDSF. Termostabilita RLuc8 a RGFP se významně nelišila od dříve naměřených hodnot.[10] Stanovené hodnoty teplot tání pro varianty RYFP SY i RYFP GY ukazují, že jejich termostabilita zůstala oproti RGFP nezměněna, případně jen mírně snížena; teplotní stabilita obou mutantů je ale stále velmi dobrá. Všechny parametry stanovené pro termostabilitu připravených proteinů jsou shrnuty v Tab. 5. Naměřené křivky tepelné denaturace jsou vyneseny v Obr. P9. Nezvyklý tvar křivek a dva inflexní body v křivkách termostability fluorescenčních proteinů jsou způsobené dvoukrokovou denaturací typickou pro fluorescenční proteiny se strukturou  $\beta$ -soudku společně s tím, že do nanoDSF měření se promítá i přítomnost resp. zánik fluorescence fluoroforu proteinu s rostoucí teplotou.[10]

Tab. 5: Hodnoty naměřené pomocí nanoDSF pro kontrolní proteiny RLuc8 a RGFP, mutanty RYFP SY a GY, a těžší frakci získanou při purifikaci RYFP GY. Při teplotě  $T_{\text{onset}}$  se protein začíná rozbalovat, při teplotě  $T_{m1}$  je právě polovina proteinu ve vzorku rozbalena a  $T_{m2}$  nese stejnou informaci pro případný druhý krok rozbalování struktury.

| vzorky             | RLuc8            | RGFP             | RYFP SY             | RGFP GY          | GY 1. pík        |
|--------------------|------------------|------------------|---------------------|------------------|------------------|
| $T_{m1}$           | $50,60 \pm 0,36$ | $45,58 \pm 0,31$ | $46,27 \pm 0,78$    | $47,72 \pm 0,16$ | $50,72 \pm 0,18$ |
| $T_{m2}$           | -                | $63,79 \pm 0,25$ | $63,35 \pm 0,32$    | $57,92 \pm 0,80$ | -                |
| $T_{\text{onset}}$ | $44,12 \pm 1,17$ | $34,80 \pm 2,89$ | $25,00 \pm 0,00004$ | $31,09 \pm 0,81$ | $44,72 \pm 0,48$ |

Proteiny přítomné v těžších frakcích získaných při SEC separaci variant RYFP vykazují učebnicový průběh denaturační křivky s jedním inflexním bodem při cca  $51\text{ }^{\circ}\text{C}$  bez náznaků charakteristik typických pro fluorescenční proteiny. To podporuje myšlenku, že látky v těchto frakcích jsou od fluorescenčních proteinů fundamentálně odlišné a může se tak jednat spíše o zbytkové kontaminující proteiny z hostitelského organismu

## 5.7 Hmotnostní spektrometrie variant RYFP

Vzorky RYFP SY a RYFP GY byly analyzovány pomocí MALDI-TOF a také LC-MS/MS jejich digestu pro detailní ověření velikosti, kontroly přítomnosti vnášených mutací, zjištění míry maturace

fluoroforu fluorescenčních proteinů a identifikace neznámých proteinů získaných při SEC separaci variant RYFP.

Pro připravený RLuc8 byla stanovena intaktní hmotnost 36,76 kDa bez tvorby kovalentních oligomerů. Pro připravený RGFP byla stanovena intaktní hmotnost 26,80 kDa bez tvorby kovalentních oligomerů; v maturované podobě bylo detekováno 81 % proteinu.

Pro protein RYFP GY byla stanovena intaktní hmotnost 26,79 kDa (Obr. P10) bez tvorby kovalentních oligomerů. Peptid 57-76 (ve kterém se nachází fluorofor proteinu) byl v maturované podobě detekován pouze ze 42 %, dalších 25 % peptidu bylo detekováno v nemodifikované formě, avšak 33 % peptidu bylo detekováno o 2,016 Da lehčích, než bylo očekáváno. Tato hmotnostní změna by odpovídala dehydrogenaci peptidu svědčící o možné nově vnesené neproduktivní dráze změn ve fluoroforu, kterou bude nutné při dalším vývoji RYFP odstranit. Tato změna hmoty neodpovídá žádné známé kanonické změně při autokatalytické maturaci fluoroforu kromě jeho oxidace, která však běžně probíhá až jako finální krok maturace a tudíž jí pozorovaná změna hmotnosti nelze přičíst.[76] Stejně výsledky byly získány pro protein RYFP SY, kde byla stanovena intaktní hmotnost 26,82 kDa bez přítomnosti kovalentních oligomerů (Obr. P12) a fluorofor byl detekován z 52 % v maturované, z 24 % v nemodifikované a z 24 % v dehydrogenované formě.

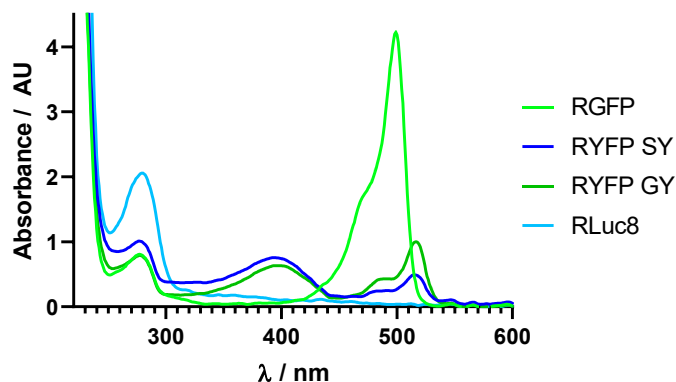
V těžších frakcích získaných při SEC separaci RYFP GY není fluorescenční protein zdaleka dominantní složkou (Obr. P11). Ve vzorku byly obsaženy výhradně běžné bakteriální proteiny s původem v *E. coli* a při SEC separaci byly patrné nejspíše z důvodu nižšího výtěžku RYFP GY oproti RGFP. Stanovené hmotnosti detekovaných proteinů dobře vysvětlují pásy pozorované při analýze vzorků pomocí SDS-PAGE a vylučují přítomnost oligomerů či agregátů RYFP. Stejný výsledek byl zjištěn i pro těžší frakce získané při SEC separaci RYFP SY (Obr. P13).

## 5.8 UV-VIS spektrometrie variant RYFP

Pro stanovení míry schopnosti variant RYFP absorbovat světlo byla použita UV-VIS spektrometrie. Naměřená spektra jsou vynesena v Obr. 9; vyhodnocované parametry  $A_{\text{fluo}}/A_{280}$  a  $A_{394}/A_{280}$  jsou shrnuty v Tab. 6.

Tab. 6: Shrnutí parametrů  $A_{\text{fluo}}/A_{280}$  a  $A_{394}/A_{280}$  vyhodnocovaných pro proteiny RLuc8, RGFP, RYFP SY a RYFP GY.  $A_{\text{fluo}}$  nabývá pro daný protein hodnoty absorpčního maxima fluoroforu, tedy  $A_{498}$  pro RGFP a  $A_{516}$  pro varianty RYFP; pro RLuc8 byla použita arbitrárně hodnota  $A_{498}$ .

| protein                   | RLuc8           | RGFP            | RYFP SY         | RYFP GY         |
|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| $A_{\text{fluo}}/A_{280}$ | $0.02 \pm 0.02$ | $5.3 \pm 0.2$   | $0.49 \pm 0.05$ | $1.30 \pm 0.08$ |
| $A_{394}/A_{280}$         | $0.05 \pm 0.02$ | $0.07 \pm 0.01$ | $0.76 \pm 0.07$ | $0.82 \pm 0.07$ |



Obr. 9: UV-VIS absorpční spektra v rozmezí 220 – 600 nm pro proteiny RGFP, RLuc8 a varianty RYFP SY a GY o shodné koncentraci 1 mg/ml.

Absorpční spektrum RLuc8 nevykazuje žádnou abnormální absorpci, pouze pro proteiny charakteristický absorpční pík při 280 nm. Absorpční spektrum RGFP dle očekávání kromě absorpce při 280 nm vykazuje výrazný absorpční pík s maximem při 498 nm odpovídající absorpci fluoroforem proteinu. Stejně tak absorpční spektra variant RYFP obsahují absorpční pík s maximem při 516 nm coby absorpci fluoroforem. Ze srovnání měrné excitability (úměrné  $A_{394}/A_{280}$ ) vyplývá, že varianty RYFP absorbují světlo mnohem hůře než RGFP. Toto zároveň nelze vysvětlit pouze nižší mírou maturace fluoroforu; jak bylo zjištěno při MS analýze, maturace variant RYFP je oproti RGFP zhruba poloviční, zatímco jejich měrná excitabilita je oproti RGFP snížena zhruba 4× pro RYFP GY a 11× pro RYFP SY. Lze tedy usuzovat, že snížená emise variant RYFP je spíše, než nízkým kvantovým výtěžkem způsobena sníženým excitačním koeficientem – zhoršenou schopností fluorofor excitovat, ať již produktivně či neproduktivně.

Kromě absorpčních píků fluoroforu však spektra obou variant RYFP obsahují i nečekaný výrazný široký absorpční pík s maximem při 394 nm. Podíl této absorpce ( $A_{394}/A_{280}$ ) je však pro obě varianty RYFP stejný. Tento absorpční pík se zajímavě shoduje s UV absorpcí AvGFP. V případě AvGFP je absorpční pík při 394 nm způsoben absorpcí nenabitého fluoroforu, zatímco absorpce při 475 nm je způsobena absorpcí fluoroforu deprotonovaného na hydroxylové skupině původního tyrosinového residua fluoroforu – tedy aromatického kruhu, který ve variantách RYFP interaguje s nově vneseným Y196.[69, 77] Absorpce při 394 nm je ale v případě variant RYFP neproduktivní; jak bylo zjištěno při spektrofluorometrické analýze proteinů, při excitaci touto vlnovou délkou nedochází na rozdíl od AvGFP ke kýžené fluorescenční emisi. Přítomnost nechtěné absorpce při 395 nm tak naznačuje, že varianty RYFP nejsou schopné udržovat svůj fluorofor ve správném elektronovém stavu, možná z důvodu, že právě toto mohla být původní funkce nyní nepřítomného H197. V každém případě je příčina absorpce při 394 nm výraznou vadou, kteroužto je při dalším inženýrství proteinu RYFP více než žádoucí odstranit – a vlnová délka této absorpce prozrazuje, kterým směrem se při inženýrství vydat.

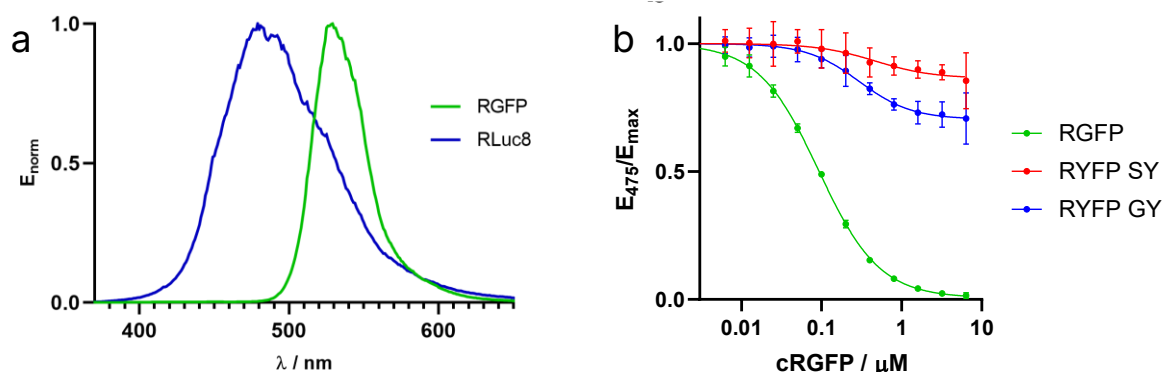
## 5.9 Stanovení hydrodynamického poloměru a oligomerního stavu variant RYFP

Při stanovení termostability fluorescenčních proteinů proběhl také pokus o stanovení hydrodynamického poloměru variant RYFP pomocí metody DLS. Bylo však zjištěno, že tato metoda je pro fluorescenční proteiny nevhodná. Pro proteiny, které prošly DLS měřením bylo při následné nanoDSF analýze stanovena až o 20 °C nižší než běžná teplota tání, což svědčí o významném poškození proteinů v průběhu DLS měření. Získané DLS křivky navíc byly nereprodukovatelné, s artefakty a výraznými odlišnostmi i mezi dvěma následujícími technickými opakováními téhož měření pro tentýž vzorek. Toto je nejspíše způsobeno zvýšenou tendencí fluorescenčních proteinů absorbovat záření vysoce výkonného laseru používaného při měření DLS. Připravený protein RLuc8 přitom žádné z pozorovaných anomálií nevykazoval. Od analýzy pomocí DLS tak bylo ustoupeno a získaná data nebyla zohledněna při vyhodnocování vlastností proteinů.

## 5.10 Spektroluminometrická analýza interakce RLuc8 a variant RYFP

Míra produktivní interakce mezi variantami RYFP a luciferázou RLuc8 byla stanovena titrací RLuc8 fluorescenčním proteinem a spektrální analýzou odezvy světelného výstupu roztoku na přítomnost fluorescenčního proteinu po přidavku CTZ. Cílem bylo stanovení zjevné síly interakce coby disociační konstanty  $K_d$ , dále míry účinnosti přenosu energie mezi luciferázou a fluorescenčním proteinem a konečně míry kooperativity interakce vyjádřené Hillovým koeficientem  $n_H$ . Analyzovanou mírou odezvy byl poměr emise při vlnové délce 475 nm a při vlnové délce maxima emise použitého fluorescenčního proteinu (508 anebo 525 nm) vztažených k referenčnímu měření emise samotnou luciferázou RLuc8. Veličina  $E_{475}/E_{\max}$  takto nabývá hodnoty od 1 (emise pouze luciferázou) po 0 (emise pouze fluorescenčním proteinem).

Nejprve byla stanovena referenční spektra luminiscence samotné RLuc8 a následně luminiscence RLuc8 saturované nadbytkem RGFP; ta se projevila emisí identickou s fluorescenční emisí RGFP bez detekovatelné zbytkové modré emise RLuc8 ( $E_{475}/E_{\max} = 0,01 \pm 0,01$ ; Obr. 10a). Stanovené



Obr. 10: (a) Referenční spektrum luminiscenční reakce RLuc8 a kontrolní spektrum téže reakce RLuc8 saturované nadbytkem RGFP. (b) Titrací křivky titrace RLuc8 proteiny RGFP, RYFP SY a RYFP GY proložené modelem vazby dle Hilla a Langmuira.

titrační křivky jsou vyneseny v Obr. 10b , vyhodnocené parametry jsou shrnuty v Tab. 7 a surová naměřená spektra normalizovaná vůči maximu emise jsou vynesena v Obr. P14.

Tab. 7: Souhrn parametrů vyhodnocených z titračních křivek titrace RLuc8 proteiny RGFP, RYFP SY a RYFP GY proložení modelem vazby dle Hilla a Langmuira. Veličina  $K_d$  je označení pro disociační konstantu,  $n_H$  je hodnota Hillova koeficientu, který vyjadřuje míru kooperativity interakce.

| titrace proteinem      | RGFP           | RYFP SY       | RYFP GY        |
|------------------------|----------------|---------------|----------------|
| $K_d$ / nM             | $126 \pm 2$    | $528 \pm 144$ | $396 \pm 19$   |
| $n_H$                  | $1,2 \pm 0,1$  | $1,2 \pm 0,1$ | $1,3 \pm 0,1$  |
| max. zhášení RLuc8 / % | $96,5 \pm 2,6$ | $7,7 \pm 0,4$ | $48,7 \pm 1,7$ |

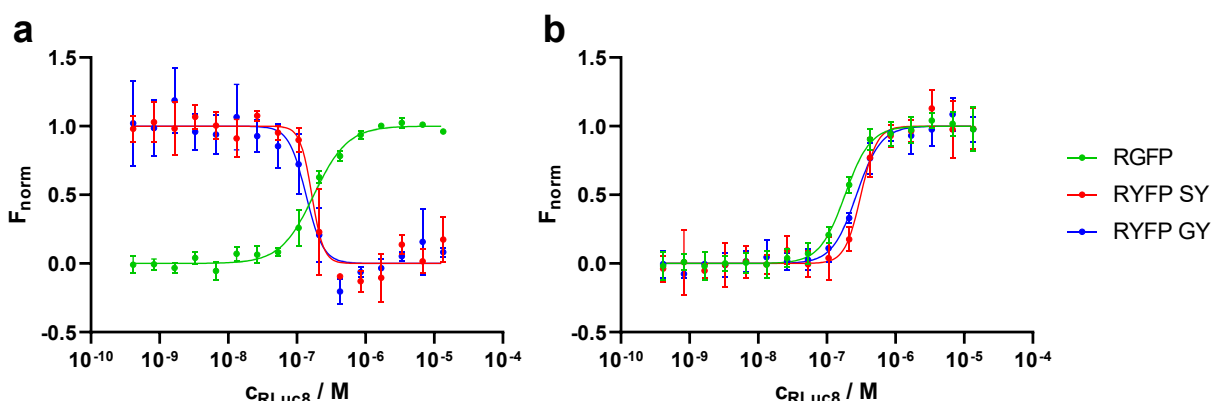
Přítomnost vyšší koncentrace fluorescenčního proteinu měla vždy za následek snížení pozorované emise RLuc8 a zvýšení emise odpovídající fluorescenci daného proteinu. Pro RGFP byla zjištěna ideální interakce s  $K_d$  cca 126 nM; toto souhlasí s dříve publikovanými daty (dříve naměřená hodnota  $K_d$  se pohybuje okolo 200 nM).[10] Pro obě varianty RYFP byla pozorovaná afinita k RLuc8 zhoršená, avšak jen mírně – toto potvrzuje, že vytvořené varianty RYFP jsou stále schopné specifické vazby na RLuc8. Největší změna však byla pozorovaná ve schopnosti fluorescenčního proteinu zhášet luciferázovou reakci RLuc8. Zatímco při nadbytku RGFP je reakce RLuc8 zhášena téměř úplně, pro obě varianty RYFP je tato hodnota nižší. V případě proteinu RYFP GY se nicméně míra zhášení reakce významně shoduje s podílem maturovaného proteinu ve vzorku stanoveným pomocí MS (viz kapitola 5.7). Toto naznačuje, že RYFP GY by za předpokladu správné maturace mohl být schopen plného zhášení reakce RLuc8, resp. že pozorované neúplné zhášení luciferázové reakce je zapříčiněno vazbou RLuc8 na nematurované molekuly RYFP GY, neschopné akceptovat excitační energii. V případě RYFP SY je situace odlišná; při úplné saturaci RLuc8 dochází ke zhášení luciferázové reakce jen z cca 8 % při podobném podílu maturovaných molekul jako v případě RYFP GY. Zde se nabízí možnosti, že je protein nedostatečný pro výstup RLuc8 co do excitability – luciferázová reakce poskytuje za daný čas více energie, než je fluorescenční protein schopen akceptovat. V každém smyslu je v případě RYFP SY neschopnost akceptovat excitační energii způsobená nejspíše významnou kombinací vícero vad.

Pro titrace všemi fluorescenční proteiny byla zjištěna hodnota Hillova koeficientu  $n_H$  blízká 1. Z toho lze vyvozovat, že vazba fluorescenčního proteinu na luciferázu z pohledu titrace luciferázy fluorescenčním proteinem je spíše nekooperativní. Toto zjištění v případě RGFP souhlasí s dříve publikovanými daty[10] a naznačuje tak, že mechanismus vazby zůstává v případě variant RYFP nezměněn.

## 5.11 TRIC/MST analýza interakce RLuc8 a variant RYFP

Analýza vazebné interakce RLuc8 a fluorescenčních proteinů RGFP, RYFP SY a RYFP GY byla provedena za účelem validace dat získaných předchozí spektroluminometrickou analýzou a zároveň získu informace při opačném uspořádání experimentu (kdy je fluorescenční protein titrován luciferázou). Cílem bylo opět stanovení zjevné síly interakce coby disociační konstanty  $K_d$  a míry kooperativity interakce vyjádřené Hillovým koeficientem  $n_H$ . Pro každý měřený bod titrace byla před i po TRIC/MST experimentu na základě analýzy fluorescenčních profilů měřících kapilár vyloučena adheze fluorescenčních proteinů na stěny kapilár.

Při experimentu nebylo využito žádné fluorescenční značení. Analyzovaným ukazatelem byla vlastní fluorescence fluorescenčních proteinů; míra interakce byla stanovena na základě klasického TRIC/MST měření i na základě změny počáteční fluorescence fluorescenčních proteinů v důsledku titrace luciferázou. Stanovené titrační křivky jsou vyneseny v Obr. 11 a vyhodnocené parametry jsou shrnuty v Tab. 8.



Obr. 11: (a) Titrační křivky RGFP, RYFP SY a RYFP GY vyhodnocené z klasického TRIC/MST měření (b) a ze změny počáteční fluorescence fluorescenčního proteinu po smísení s luciferázou.

Při titraci divokého typu RGFP byly parametry  $K_d$  i  $n_H$  stanoveny shodně pro oba způsoby vyhodnocení; všechny parametry se zároveň shodují s jejich dříve stanovenými hodnotami.[10]

Tab. 8: Souhrn parametrů vyhodnocených z titračních křivek titrace RGFP, RYFP SY a RYFP GY luciferázou RLuc8. Řádky označené "MST/TRIC" byly získány při vyhodnocení klasického TRIC/MST experimentu (Obr. 11a), řádky označené "poč. fluo." byly získány vyhodnocením změny počáteční fluorescence fluorescenčního proteinu po smísení s luciferázou (Obr. 11b). Veličina  $K_d$  je označení pro disociační konstantu,  $n_H$  je hodnota Hillova koeficientu, který vyjadřuje míru kooperativity složek.

| titrovaný protein       | RGFP          | RYFP SY       | RYFP GY       |
|-------------------------|---------------|---------------|---------------|
| $K_d / nM$ (TRIC/MST)   | $177 \pm 13$  | $165 \pm 19$  | $153 \pm 19$  |
| $K_d / nM$ (poč. fluo.) | $184 \pm 7$   | $314 \pm 20$  | $271 \pm 17$  |
| $n_H$ (TRIC/MST)        | $1.9 \pm 0.2$ | $2.3 \pm 0.5$ | $2.2 \pm 0.4$ |
| $n_H$ (poč. fluo.)      | $2.3 \pm 0.4$ | $2.0 \pm 0.4$ | $2.4 \pm 0.6$ |

Pro obě varianty RYFP byla potvrzena schopnost interakce s RLuc8. V případě analýzy TRIC/MST však obě varianty RYFP na titraci RLuc8 reagují anomálně – rostoucí koncentrace luciferázy nezpůsobila očekávaný nárůst retence fluorescence v místě zahřátí kapiláry, nýbrž naopak. Tento jev není obvyklý a může být způsoben například tím, že struktura fluorescenční molekuly je mírně nestabilní a vazba s interakčním partnerem ji stabilizuje, což vede k vyšší počáteční fluorescenci, která je ale paradoxně více zhasena tepelným gradientem.[64, 78] V případě RYFP SY nebo GY k tomuto mohlo dojít například destabilizací  $\beta$ -soudku anebo pozměněným uložením fluoroforu uvnitř proteinu z důvodu provedené mutagenese; tato interpretace je podpořena také sníženou termostabilitou variant RYFP zjištěnou pomocí metody nanoDSF. V případě analýzy počáteční fluorescence vzorků se obě varianty RYFP chovají dle očekávání.

Při vyhodnocení počáteční fluorescence stanovená vazebná afinita dobře odpovídá výsledkům spektroluminometrické analýzy interakce (kapitola 5.10), tedy varianty RYFP se na RLuc8 váží s mírně nižší afinitou než RGFP. Analýza klasických TRIC/MST dat však tvrdí opak; toto nicméně může být artefakt výše popisovaného anomálního chování variant RYFP. Nehledě na způsob stanovení vazebných parametrů se ale interakce obou variant RYFP s luciferázou RLuc8 zdá velice podobná jako v případě původního RGFP a v interakci tak vlivem vnesených mutací pravděpodobně nedošlo k žádným výrazným změnám.

Při vazbě RLuc8 na RGFP byla zjištěna významná kooperativita; hodnota  $n_H$  se nehledě na variantu proteinu či způsob vyhodnocení pohybuje kolem hodnoty 2. Tato hodnota je očekávaná, dobře odpovídá stechiometrii komplexu RGFP/RLuc a v případě RGFP odpovídá dříve publikovaným výsledkům; shodně se spektroluminometrickou analýzou interakce tak analýza TRIC/MST podporuje tvrzení, že mechanismus vazby zůstává v případě variant RYFP nezměněn.

Zdánlivý nesoulad výsledků TRIC/MST (svědčících o kooperativní vazbě) a spektroluminometrické analýzy (ukazujících nekooperativní vazbu) je vysvětlen jednoduše uspořádáním experimentů. V případě TRIC/MST pozorujeme pevné dimery malého množství molekul fluorescenčního proteinu, na které se vždy mohou vázat dvě molekuly RLuc8. Ty jsou při TRIC/MST experimentu přítomny v nadbytku a při saturaci je tak nejpravděpodobnější stechiometrie komplexu 2:2. V případě spektroluminometrické analýzy je situace opačná. Pozorovaný výstup tvoří malé množství molekul RLuc8. Ty při saturaci nadbytkem dimerního fluorescenčního proteinu tvoří nejpravděpodobněji komplex se stechiometrií 1:2, a interakce je tak zdánlivě nekooperativní.

## 5.12 Shrnutí vlastností nejlepší varianty RYFP a návrh dalšího postupu jejího inženýrství

Ze srovnání všech naměřených vlastností připravených variant RYFP vyplývá, že nejlepší variantou pro další inženýrství je RYFP GY (resp. RGFP S66G/H197Y).

RYFP GY vykazuje kanonicky žlutou emisi s maximem při 527 nm s maximem excitace při 518 nm společně s dobrou excitabilitou při vlnových délkách emise RLuc8 zajišťující jejich energetickou kompatibilitu. Problémem je nízká celková intenzita fluorescenční emise. Toto je nejspíše způsobeno kombinací nižší strukturní stability či pozměněním uložení fluoroforu v proteinu, nedokonalou maturací a problémem s udržením správného elektronového stavu fluoroforu. Všechny tyto příčiny jdou ruku v ruce také s pozorovanou mírně sníženou termostabilitou proteinu. Pro lepší diagnostiku by bylo možné využít rentgenovou krystalografii pro stanovení současné struktury RYFP GY anebo stanovení závislosti jeho fluorescence a UV-VIS spektra na pH. Kvantový výtěžek fluorescence RYFP GY nebyl pro nevhodnost (neúplnou maturaci) vzorku stanoven. Ze stanovených parametrů proteinu lze ale předpokládat, že kvantový výtěžek RYFP GY se příliš neliší od RGFP, poněvadž snížená emise RYFP GY je zcela vysvětlitelná jeho nižší měrnou excitabilitou a neúplnou maturací.

RYFP GY je schopen fyzické i funkční interakce s RLuc8. Síla a mechanismus interakce se zdají nezměněné vůči RGFP a ze získaných výsledků lze předpokládat, že kdyby byla vyřešena absorpční vada a neúplná maturace RYFP GY, BRET interakce s luciferázou RLuc8 by probíhala se stejnou účinností jako v případě RGFP. RYFP GY obecně vykazuje dobrou kompatibilitu se stejnými pufrý a podmínkami jako RGFP. U RYFP GY byla také zachována robustní dimerní kvarterní struktura. Toto nebylo prokázáno přímo, avšak dobře to vyplývá z výsledků SEC separace i TRIC/MST analýzy. Pro jednoduché experimentální stanovení oligomerního stavu je možné využít např. nativní gelovou elektroforézu. RYFP GY sice vzniká s nižším výtěžkem než RGFP, avšak bez výrazného podílu nerozpustné složky; je tedy nasnadě, že vyřešením problémů se sníženou funkční stabilitou dojde i ke zlepšení výtěžku proteinu a jiných kroků nebude třeba.

Nejlepší cestou pro další vývoj RYFP se nyní zdá inženýrství okolí Tyr67 fluoroforu a nově vneseného Tyr197 pro odstranění sterických zábran a udržení správného náboje fluoroforu současně s celkovou stabilizací proteinu. Tohoto je možné dosáhnout racionální cestou „transplantací“ tohoto okolí např. z proteinu EYFP anebo jiné žluté varianty AvGFP s vyřešenou strukturou, anebo obecně za pomoci bioinformatických nástrojů typu ProteinMPNN, RosettaMP, FireProt, HotSpot Wizard anebo RaSP. Možností je také náhodná mutageneze, poněvadž pro screening fluorescence jsou dobře dostupné vysoce účinné metody, např. kombinace epPCR a FACS (fluorescenčně aktivované třídění buněk).

## 6 ZÁVĚR

- Bioluminiscenční sonda IRrIS je jako kombinace biologicky kompatibilní luciferázy a zeleného fluorescenčního proteinu schopná pouze zelené emise. Toto není vhodné pro všechny její zamýšlené aplikace, ale jiné kompatibilní fluorescenční proteiny neexistují a je třeba je vytvořit inženýrstvím původního kompatibilního fluorescenčního proteinu.
- Na základě kombinace sekvenční a strukturní analýzy s informacemi v literatuře a databázích fluorescenčních proteinů byla navržena strategie mutagenese zeleného fluorescenčního proteinu z *R. reniformis* pro prodloužení vlnové délky jeho emise.
- Metodou MegaPrimer bylo připraveno 8 variant genu pro RGFP. Pro řadu z připravených variant proteinu byl při prescreeningu zjištěn úspěšný posun emisního maxima z původních 508,5 nm na 526–528 nm; pro další charakterizaci byly vybrány mutanty RGFP H197Y (RYFP SY) a RGFP S66G/H197Y (RYFP GY), které byly úspěšně vyprodukovány ve velkém měřítku a purifikovány do vysoké čistoty.
- Fluorescenční spektrometrie potvrdila žádoucí fluorescenční vlastnosti obou variant RYFP, avšak intenzita jejich fluorescenční emise byla nižší než v případě RGFP.
- UV-VIS spektrometrie odhalila nízkou excitabilitu a zároveň absorpční vadu obou variant RYFP jako možné příčiny jejich slabé fluorescence. Absorpční vada může být způsobena problémem s udržením správného elektronového stavu fluoroforu.
- Hmotnostní spektrometrie odhalila vadu při maturaci fluoroforu variant RYFP jako další možnou příčinu jejich slabé fluorescence.
- Metodou TRIC/MST bylo potvrzeno, že obě varianty RYFP jsou schopné správné fyzické interakce s luciferázou RLuc8, avšak spektroluminometrická analýza ukázala, že pro funkční BRET interakci splňuje předpoklad pouze RYFP GY.
- Metody nanoDSF a TRIC/MST naznačily problém se stabilitou a potenciálně uložením fluoroforu v molekulách variant RYFP jako další možnou příčinu jejich slabé fluorescence.
- Byl navržen postup pro další inženýrství RYFP a kompenzaci výše uvedených vad.
- Všechny cíle práce byly splněny. Varianta RYFP GY poslouží jako základ pro další inženýrství RYFP a výsledky práce budou publikovány jako součást článku v odborném impaktovaném periodiku.

## 7 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] J. SYED, Aisha a James C. ANDERSON. Applications of bioluminescence in biotechnology and beyond. *Chemical Society Reviews* [online]. 2021, **50**(9), 5668–5705. Dostupné z: doi:10.1039/D0CS01492C
- [2] RENZ, Malte. Fluorescence microscopy—A historical and technical perspective. *Cytometry Part A* [online]. 2013, **83**(9), 767–779. ISSN 1552-4930. Dostupné z: doi:10.1002/cyto.a.22295
- [3] KWON, Jiwoong, Mohamed Saleh ELGAWISH a Sang-Hee SHIM. Bleaching-Resistant Super-Resolution Fluorescence Microscopy. *Advanced Science* [online]. 2022, **9**(9), 2101817. ISSN 2198-3844. Dostupné z: doi:10.1002/advs.202101817
- [4] DUNST, Sebastian a Pavel TOMANCAK. Imaging Flies by Fluorescence Microscopy: Principles, Technologies, and Applications. *Genetics* [online]. 2019, **211**(1), 15–34. Dostupné z: doi:10.1534/genetics.118.300227
- [5] SAITO, Kenta, Y.-F. CHANG, Kazuki HORIKAWA, Noriyuki HATSUGAI, Yuriko HIGUCHI, Mitsuru HASHIDA, Yu YOSHIDA, Tomoki MATSUDA, Yoshiyuki ARAI a Takeharu NAGAI. Luminescent proteins for high-speed single-cell and whole-body imaging. *Nature Communications* [online]. 2012, **3**(1), 1262. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/ncomms2248
- [6] CHU, Jun, Younghee OH, Alex SENS, Niloufar ATAIE, Hod DANA, John J MACKLIN, Tal LAVIV, Erik S WELF, Kevin M DEAN, Feijie ZHANG, Benjamin B KIM, Clement Tran TANG, Michelle HU, Michelle A BAIRD, Michael W DAVIDSON, Mark A KAY, Reto FIOLKA, Ryohei YASUDA, Douglas S KIM, Ho-Leung NG a Michael Z LIN. A bright cyan-excitable orange fluorescent protein facilitates dual-emission microscopy and enhances bioluminescence imaging in vivo. *Nature Biotechnology* [online]. 2016, **34**(7), 760–767. ISSN 1087-0156, 1546-1696. Dostupné z: doi:10.1038/nbt.3550
- [7] PLUSKAL, Daniel. *Inženýrství makromolekulárního komplexu rezonančně přenášejícího energii bioluminiscenčního záření*. Brno, 2023. Diplomová práce. Masarykova Univerzita.
- [8] BACART, Johan, Caroline CORBEL, Ralf JOCKERS, Stéphane BACH a Cyril COUTURIER. The BRET technology and its application to screening assays. *Biotechnology Journal* [online]. 2008, **3**(3), 311–324. ISSN 1860-6768, 1860-7314. Dostupné z: doi:10.1002/biot.200700222
- [9] DANIEL PLUSKAL. *Engineering of genetically encoded bioluminescent systems*. Brno, 2025. Minithesis. Masarykova Univerzita.
- [10] PLUSKAL, Daniel. *Biochemická analýza luciferasového komplexu*. Brno, 2021. Masarykova Univerzita.
- [11] GOLDBERG, Marvin C. a Eugene R. WEINER. The Science of Luminescence. *ACS Symposium Series* [online]. 1989 [vid. 2026-01-18]. Dostupné z: doi:10.1021/bk-1989-0383.ch001
- [12] JAMESON, David M. *Introduction to Fluorescence*. B.m.: CRC Press, 2025. ISBN 978-1-040-32070-9.
- [13] *A Brief History of GFP* [online]. [vid. 2025-08-27]. Dostupné z: <https://press.asimov.com/articles/gfp#passing-the-torch>

- [14] THÉRESE WILSON, J. Woodland Hastings. *Bioluminescence - Living lights, lights for living*. 2013.
- [15] LAKOWICZ, Joseph R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy* [online]. Boston, MA: Springer US, 1999 [vid. 2025-12-28]. ISBN 978-1-4757-3063-0. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4757-3061-6
- [16] LAGORIO, M. Gabriela, Gabriela B. CORDON a Analia IRIEL. Reviewing the relevance of fluorescence in biological systems. *Photochemical & Photobiological Sciences* [online]. 2015 [vid. 2026-01-18]. Dostupné z: doi:10.1039/C5PP00122F
- [17] BARTOLOMÉ, Fernando a Andrey Y. ABRAMOV. Measurement of Mitochondrial NADH and FAD Autofluorescence in Live Cells. *Methods in Molecular Biology* [online]. 2015 [vid. 2026-01-18]. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-2257-4\_23
- [18] SIDDARAMAIAH, Manjunath, Bola Sadashiva S. RAO, Manjunath B. JOSHI, Anirbit DATTA a Al ET. Interrogation of an autofluorescence-based method for protein fingerprinting. *Journal of Biophotonics* [online]. 2018 [vid. 2026-01-18]. Dostupné z: doi:10.1002/jbio.201700393
- [19] MURCHIE, E.H. a T. LAWSON. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of Experimental Botany* [online]. 2013, **64**(13), 3983–3998. ISSN 0022-0957. Dostupné z: doi:10.1093/jxb/ert208
- [20] MARSHALL, Justin a Sonke JOHNSEN. Fluorescence as a means of colour signal enhancement. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* [online]. 2017 [vid. 2026-01-18]. Dostupné z: doi:10.1098/rstb.2016.0335
- [21] STRUTZ, Wyatt. Exploring Protein Stability by NanoDSF. *Biophysical Journal* [online]. 2016, **110**(3), 393a. ISSN 0006-3495, 1542-0086. Dostupné z: doi:10.1016/j.bpj.2015.11.2126
- [22] WILSON, Thérèse a J. Woodland HASTINGS. BIOLUMINESCENCE. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* [online]. 1998, **14**(1), 197–230. ISSN 1081-0706, 1530-8995. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.cellbio.14.1.197
- [23] LEE, John. Perspectives on Bioluminescence Mechanisms. *Photochemistry and Photobiology* [online]. 2017, **93**(2), 389–404. ISSN 1751-1097. Dostupné z: doi:10.1111/php.12650
- [24] VYSOTSKI, Eugene S. a John LEE. Ca<sup>2+</sup>-Regulated Photoproteins: Structural Insight into the Bioluminescence Mechanism. *Accounts of Chemical Research* [online]. 2004, **37**(6), 405–415. ISSN 0001-4842. Dostupné z: doi:10.1021/ar0400037
- [25] LAKOWICZ, Joseph R. Introduction to Fluorescence. In: Joseph R. LAKOWICZ, ed. *Principles of Fluorescence Spectroscopy* [online]. Boston, MA: Springer US, 1999 [vid. 2025-08-28], s. 1–23. ISBN 978-1-4757-3061-6. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4757-3061-6\_1
- [26] DIMRI, Shalini, Soumya BASU a Abhijit DE. Use of BRET to Study Protein–Protein Interactions In Vitro and In Vivo. *Methods in Molecular Biology* [online]. 2016 [vid. 2026-01-18]. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-3724-0\_5
- [27] MARKOVA, S. V. a E. S. VYSOTSKI. Coelenterazine-dependent luciferases. *Biochemistry (Moscow)* [online]. 2015, **80**(6), 714–732. ISSN 0006-2979, 1608-3040. Dostupné z: doi:10.1134/S0006297915060073

- [28] TSAI, Yueh-Lin, Chia-Wei LI, Tzay-Ming HONG, Jen-Zon HO, En-Cheng YANG, Wen-Yen WU, G. MARGARITONDO, Su-Ting HSU, Edwin B.L. ONG a Y. HWU. Firefly Light Flashing: Oxygen Supply Mechanism. *Physical Review Letters* [online]. 2014, **113**(25), 258103. ISSN 0031-9007, 1079-7114. Dostupné z: doi:10.1103/PhysRevLett.113.258103
- [29] Dexter Energy Transfer. *Chemistry LibreTexts* [online]. 2. říjen 2013 [vid. 2026-01-18]. Dostupné z: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\\_Textbook\\_Maps/Supplemental\\_Modules\\_\(Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\)/Fundamentals/Dexter\\_Energy\\_Transfer](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Fundamentals/Dexter_Energy_Transfer)
- [30] Fluorescence Resonance Energy Transfer. *Chemistry LibreTexts* [online]. 2. říjen 2013 [vid. 2026-01-18]. Dostupné z: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\\_Textbook\\_Maps/Supplemental\\_Modules\\_\(Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\)/Fundamentals/Fluorescence\\_Resonance\\_Energy\\_Transfer](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Fundamentals/Fluorescence_Resonance_Energy_Transfer)
- [31] WILSON, Thérèse a J. Woodland HASTINGS. BIOLUMINESCENCE. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* [online]. 1998, **14**(1), 197–230. ISSN 1081-0706, 1530-8995. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.cellbio.14.1.197
- [32] *Shallow Octocorals of the SAB - Renilla reniformis* [online]. [vid. 2025-11-19]. Dostupné z: <https://www.dnr.sc.gov/marine/sertc/octocoral%20guide/Renilla%20reniformis.htm>
- [33] *Cnidarian | Definition, Life Cycle, Classes, & Facts | Britannica* [online]. 24. prosinec 2025 [vid. 2026-01-18]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/animal/sea-pansy>
- [34] KRICKA, L.J. BIOLUMINESCENCE. In: *Encyclopedia of Analytical Science* [online]. B.m.: Elsevier, 2005 [vid. 2025-11-19], s. 277–284. ISBN 978-0-12-369397-6. Dostupné z: doi:10.1016/B0-12-369397-7/00045-5
- [35] HADDOCK, Steven H.D., Mark A. MOLINE a James F. CASE. Bioluminescence in the Sea. *Annual Review of Marine Science* [online]. 2010, **2**(1), 443–493. ISSN 1941-1405, 1941-0611. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-marine-120308-081028
- [36] DE WERGIFOSSE, Bertrand, Marlène DUBUISSON, Jacqueline MARCHAND-BRYNAERT, André TROUET a Jean-François REES. Coelenterazine: a two-stage antioxidant in lipid micelles. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. 2004, **36**(3), 278–287. ISSN 08915849. Dostupné z: doi:10.1016/j.freeradbiomed.2003.11.008
- [37] SHIMOMURA, Osamu. Presence of coelenterazine in non-bioluminescent marine organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* [online]. 1987, **86**(2), 361–363. ISSN 03050491. Dostupné z: doi:10.1016/0305-0491(87)90306-3
- [38] TZERTZINIS, George, Brenda BAKER, Jack BENNER, Elizabeth BROWN, Ivan R. Corrêa JR, Laurence ETTWILLER, Colleen MCCLUNG a Ira SCHILDKRAUT. Coelenterazine sulfotransferase from *Renilla muelleri*. *PLOS ONE* [online]. 2022, **17**(10), e0276315. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0276315
- [39] TZERTZINIS, George, Brenda BAKER, Jack BENNER, Elizabeth BROWN, Ivan R. CORRÊA, Laurence ETTWILLER, Colleen MCCLUNG a Ira SCHILDKRAUT. Coelenterazine sulfotransferase from *Renilla muelleri*. *PLoS ONE* [online]. 2022, **17**(10), e0276315. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0276315

- [40] LOENING, Andreas Markus, Timothy David FENN a Sanjiv Sam GAMBHIR. Crystal Structures of the Luciferase and Green Fluorescent Protein from *Renilla reniformis*. *Journal of Molecular Biology* [online]. 2007, **374**(4), 1017–1028. ISSN 00222836. Dostupné z: doi:10.1016/j.jmb.2007.09.078
- [41] WOO, Jongchan a Albrecht G. VON ARNIM. Mutational optimization of the coelenterazine-dependent luciferase from *Renilla*. *Plant Methods* [online]. 2008, **4**(1), 23. ISSN 1746-4811. Dostupné z: doi:10.1186/1746-4811-4-23
- [42] LOENING, A. M. Consensus guided mutagenesis of *Renilla* luciferase yields enhanced stability and light output. *Protein Engineering Design and Selection* [online]. 2006, **19**(9), 391–400. ISSN 1741-0126, 1741-0134. Dostupné z: doi:10.1093/protein/gzl023
- [43] WARD, W.W. a M.J. CORMIER. An energy transfer protein in coelenterate bioluminescence. Characterization of the *Renilla* green-fluorescent protein. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 1979, **254**(3), 781–788. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9258(17)37873-0
- [44] ORMÖ, Mats, Andrew B. CUBITT, Karen KALLIO, Larry A. GROSS a Al ET. Crystal Structure of the *Aequorea victoria* Green Fluorescent Protein. *Science* [online]. 1996 [vid. 2026-01-12]. Dostupné z: doi:10.1126/science.273.5280.1392
- [45] *Basic Concepts in Fluorescence* [online]. [vid. 2026-01-18]. Dostupné z: <https://evidentscientific.com/en/microscope-resource/knowledge-hub/techniques/fluorescence/fluorescenceintro>
- [46] LAMBERT, Talley. FPbase: The Fluorescent Protein Database. *FPbase* [online]. [vid. 2025-11-24]. Dostupné z: <https://www.fpbse.org/>
- [47] LAMBERT, Talley. DsRed at FPbase. *FPbase* [online]. [vid. 2025-12-21]. Dostupné z: <https://www.fpbse.org/protein/dsred/>
- [48] LAMBERT, Talley. dendFP at FPbase. *FPbase* [online]. [vid. 2025-12-21]. Dostupné z: <https://www.fpbse.org/protein/dendfp/>
- [49] *Protein BLAST: search protein databases using a protein query* [online]. [vid. 2025-12-21]. Dostupné z: [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LAST\\_SPEC=&LINK\\_LOC=blasttab&LAST\\_PAGE=blastp](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LAST_SPEC=&LINK_LOC=blasttab&LAST_PAGE=blastp)
- [50] LAMBERT, Talley. avGFP at FPbase. *FPbase* [online]. [vid. 2026-01-18]. Dostupné z: <https://www.fpbse.org/protein/avgfp/>
- [51] WARD, William W. Energy Transfer Processes in Bioluminescence. *Photochemical and Photobiological Reviews* [online]. 1979 [vid. 2026-01-18]. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4684-3551-1\_1
- [52] BARIK, Sailen. Site-Directed Mutagenesis In Vitro by Megaprimer PCR. In: Michael K. TROWER *In Vitro Mutagenesis Protocols* [online]. New Jersey: Humana Press, 1996 [vid. 2026-01-19], s. 203–216. ISBN 978-0-89603-332-0. Dostupné z: doi:10.1385/0-89603-332-5:203
- [53] APTE, Arun a Saurabha DANIEL. PCR Primer Design. *Cold Spring Harbor Protocols* [online]. 2009 [vid. 2026-01-19]. Dostupné z: doi:10.1101/pdb.ip65

- [54] Primer Analysis Tool and Tm Calculator | IDT. *Integrated DNA Technologies* [online]. [vid. 2025-12-18]. Dostupné z: <https://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>
- [55] *NEB Tm Calculator* [online]. [vid. 2025-12-18]. Dostupné z: <https://tmcalculator.neb.com/#!/main>
- [56] M. J. MCPHERSON. *PCR*. 2000. vyd. B.m.: BIOS Scientific Publishers, nedatováno.
- [57] SPRIESTERSBACH, Anne, Jan KUBICEK, Frank SCHÄFER, Helena BLOCK a Al ET. Purification of His-Tagged Proteins. *Methods in Enzymology* [online]. 2015 [vid. 2026-01-20]. Dostupné z: doi:10.1016/bs.mie.2014.11.003
- [58] HALL, Martin. Size Exclusion Chromatography (SEC). *Biopharmaceutical Processing* [online]. 2018 [vid. 2026-01-20]. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-100623-8.00021-9
- [59] AL-TUBULY, Abdulhamid A. SDS-PAGE and Western Blotting. In: Andrew J. T. GEORGE a Catherine E. URCH, ed. *Diagnostic and Therapeutic Antibodies* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, 2000 [vid. 2026-01-20], s. 391–405. ISBN 978-1-59259-076-6. Dostupné z: doi:10.1385/1-59259-076-4:391
- [60] HOSSEINI, Samira a Sergio O. MARTINEZ-CHAPA. Principles and Mechanism of MALDI-ToF-MS Analysis. *SpringerBriefs in Applied Sciences and Technology* [online]. 2016 [vid. 2026-01-26]. Dostupné z: doi:10.1007/978-981-10-2356-9\_1
- [61] HUANG, Eric C. a Jack D. HENION. LC/MS and LC/MS/MS determination of protein tryptic digests. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* [online]. 1990 [vid. 2026-01-26]. Dostupné z: doi:10.1016/1044-0305(90)85052-N
- [62] NanoTemper - Tools for Challenging Biophysical Characterizations. *NanoTemper Technologies* [online]. [vid. 2026-01-26]. Dostupné z: <https://nanotempertech.com/>
- [63] *GraphPad Prism 10 Curve Fitting Guide - Equation: One site -- Specific binding* [online]. [vid. 2026-01-26]. Dostupné z: [https://www.graphpad.com/guides/prism/latest/curve-fitting/reg\\_one\\_site\\_specific.htm](https://www.graphpad.com/guides/prism/latest/curve-fitting/reg_one_site_specific.htm)
- [64] JERABEK-WILLEMSSEN, Moran, Timon ANDRÉ, Randy WANNER, Heide Marie ROTH, Stefan DUHR, Philipp BAASKE a Dennis BREITSPRECHER. MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond. *Journal of Molecular Structure* [online]. 2014, **1077**, Fluorescence studies of biomolecular association processes., 101–113. ISSN 0022-2860. Dostupné z: doi:10.1016/j.molstruc.2014.03.009
- [65] Equations for Fitting MST Data. *NanoTemper Technologies* [online]. [vid. 2026-01-18]. Dostupné z: <https://support.nanotempertech.com/hc/en-us/articles/19206980835345-Equations-for-Fitting-MST-Data>
- [66] BANK, RCSB Protein Data. *RCSB PDB - 2RH7: Crystal Structures of the Luciferase and Green Fluorescent Protein from Renilla Reniformis* [online]. [vid. 2026-01-26]. Dostupné z: <https://www.rcsb.org/structure/2RH7>
- [67] JAN KOOLMAN, Klaus\_Heinrich Röhn a JÜRGEN WIRTH. *Barevný atlas biochemie*. Překlad 4. vydání. B.m.: Grada, 2012.
- [68] CHOURASIA, Mukesh, G. Madhavi SASTRY a G. Narahari SASTRY. Aromatic–Aromatic Interactions Database, A2ID: An analysis of aromatic  $\pi$ -networks in proteins. *International*

- Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2011, **48**(4), 540–552. ISSN 0141-8130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2011.01.008
- [69] KAIN, Steven R. a Paul KITTS. Expression and Detection of Green Fluorescent Protein (GFP). *Recombinant Protein Protocols* [online]. nedatováno [vid. 2026-02-04]. Dostupné z: doi:10.1385/0-89603-481-X:305
- [70] YAN, Bo Xu a Ying Qing SUN. Glycine Residues Provide Flexibility for Enzyme Active Sites \*. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 1997, **272**(6), 3190–3194. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.272.6.3190
- [71] LAMBERT, Talley. mLemon at FPbase. *FPbase* [online]. [vid. 2026-01-13]. Dostupné z: <https://www.fpbase.org/protein/mlemon/>
- [72] ZHANG, Zhe, Shawn WITHAM a Emil ALEXOV. On the role of electrostatics in protein–protein interactions. *Physical Biology* [online]. 2011 [vid. 2026-01-25]. Dostupné z: doi:10.1088/1478-3975/8/3/035001
- [73] KIMBALL, Joseph, Jose CHAVEZ, Luca CERESA, Emma KITCHNER a Al ET. On the origin and correction for inner filter effects in fluorescence Part I: primary inner filter effect-the proper approach for sample absorbance correction. *Methods and Applications in Fluorescence* [online]. 2020 [vid. 2026-01-25]. Dostupné z: doi:10.1088/2050-6120/ab947c
- [74] CERESA, Luca, Joseph KIMBALL, Jose CHAVEZ, Emma KITCHNER, Zhangatay NUREKEYEV, Hung DOAN, Julian BOREJDO, Ignacy GRZYCZYNSKI a Zygmunt GRZYCZYNSKI. On the origin and correction for inner filter effects in fluorescence. Part II: secondary inner filter effect -the proper use of front-face configuration for highly absorbing and scattering samples. *Methods and Applications in Fluorescence* [online]. 2021, **9**(3), 035005. ISSN 2050-6120. Dostupné z: doi:10.1088/2050-6120/ac0243
- [75] LAMBERT, Talley. EYFP at FPbase. *FPbase* [online]. [vid. 2026-01-22]. Dostupné z: <https://www.fpbase.org/protein/eyfp/>
- [76] GRIGORENKO, Bella L., Anna I. KRYLOV a Alexander V. NEMUKHIN. Molecular Modeling Clarifies the Mechanism of Chromophore Maturation in the Green Fluorescent Protein. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2017 [vid. 2026-01-25]. Dostupné z: doi:10.1021/jacs.7b00676
- [77] ROPP, J. Dezz, Christopher J. DONAHUE, David WOLFGANG-KIMBALL, Jeffrey J. HOOLEY a Al ET. *Aequorea* green fluorescent protein analysis by flow cytometry. *Cytometry* [online]. 1995 [vid. 2026-02-04]. Dostupné z: doi:10.1002/cyto.990210402
- [78] Binding curve direction for Temperature-Related Intensity Change (TRIC). *NanoTemper Technologies* [online]. [vid. 2026-02-04]. Dostupné z: <https://support.nanotempertech.com/hc/en-us/articles/19814170578449-Binding-curve-direction-for-Temperature-Related-Intensity-Change-TRIC>

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

APS – peroxodisíran amonný

ATP – adenosintrifosfát

AvGFP – zelený fluorescenční protein z *aequorea victoria*

BRET – rezonanční přenos bioluminiscenční energie

CTZ – koelenterazin

DLS – dynamický rozptyl světla

DNA – deoxyribonukleová kyselina

DNasa – deoxyribonukleasa

dNTPs – volné trifosfáty deoxyribonukleotidů

(nano)DSF – diferenční skenovací fluorimetrie (v nanoformátu)

DTT – dithiotreitol

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová

FACS – fluorescenčně aktivované třídění buněk

FAD – flavinadenindinukleotid

FRET – Försterův rezonanční přenos energie

HEPES – kyselina 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethan-1-sulfonová

IPTG – izopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranosid

IM – indukční médium

IMAC – metaloafinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech

IRrIS – označení komplexu RLuc8/RGFP

LB médium – lysogenní médium/Lennox-Bertani médium

LC-MS/MS – LC, kapalinová chromatografie; MS/MS – hmotnostní spektrometrie

MALDI-TOF – Matrix assisted Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight

NADH – nikotinamidadenindinukleotid

PCR – polymerázová řetězová reakce

RCBP – CTZ-vazný protein (Renilla coelenterazin-binding protein)

RGFP – zelený fluorescenční protein z *Renilla reniformis*

RYFP (SY a GY) – žlutý fluorescenční protein z *Renilla reniformis* (H197Y a S66G/H197Y)

RLuc – koelenterazin-dependentní luciferáza z *Renilla reniformis*

RLuc8 – koelenterazin-dependentní luciferáza z *Renilla reniformis* obsahující 8 mutací

SDS – dodecylsírán sodný

SDS-PAGE – elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti SDS

SEC – molekulová vylučovací chromatografie

SM – startovací médium

SOC médium – superoptimální médium s katabolickou represí

TEMED – tetramethylethylenediamid

TRIC/MST – teplotně závislá změna fluorescence a termoforéza v mikroměřítku

Tris – (2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol

## 9 PŘÍLOHA Č.1: NÁVRH MUTACÍ A PRESCREENING MUTANTŮ RGFP

### 9.1 Návrh primerů a mutantů pro mutagenezi RGFP

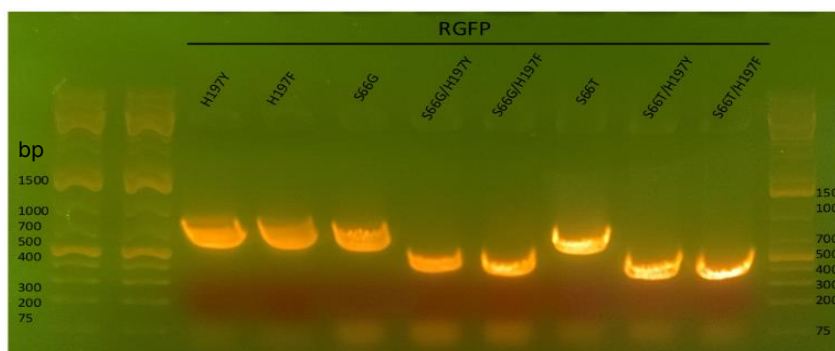
V Tab. P1 je uveden seznam sekvencí použitých primerů pro mutagenezi s cílem prodloužení vyzařované emise. V Tab. P2 jsou navrženy mutanti proteinu RGFP spolu s kombinací primerů použitých k jejich vytvoření a Obr. P1 zobrazuje analýzu pomocí gelové elektroforézy úspěšně připravených MegaPrimerů.

Tab. P1: Seznam sekvencí primerů pro generování MegaPrimerů při mutagenezi RGFP. Primery jsou uvedeny ve směru 5'-3'.

|           |                                                |
|-----------|------------------------------------------------|
| 197Y_Rv   | AACATTGGTTTTTAACCAGACGATACTGAATAAAGTGATACAGCGG |
| 197F_Rv   | AACATTGGTTTTTAACCAGACGAAACTGAATAAAGTGATACAGCGG |
| 66T_Fw    | GATATTGTTAGCGTTGCCTTTACCTATGGCAATCGTGCATATACC  |
| 66G_Fw    | GATATTGTTAGCGTTGCCTTTGGCTATGGCAATCGTGCATATACC  |
| pET21b_Fw | TAATACGACTCACTATAGGG                           |
| pET21b_Rv | GCTAGTTATTGCTCAGCGG                            |

Tab. P2: Seznam zkonstruovaných mutantů proteinu RGFP a kombinace primerů použitých k jejich vytvoření. Templátem byl vždy gen RGFP.

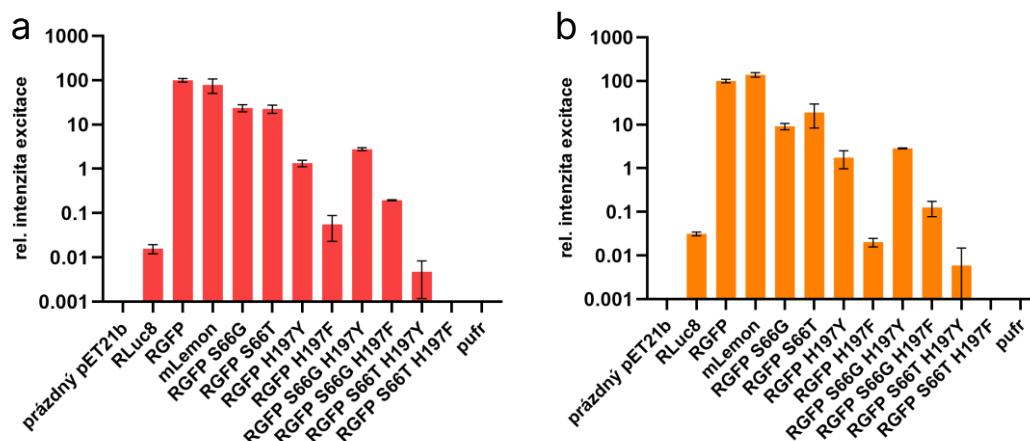
| Mutant RGFP | Kombinace primerů  |
|-------------|--------------------|
| H197Y       | pET21b_Fw; 197Y_Rv |
| H197F       | pET21b_Fw; 197F_Rv |
| S66G        | 66G_Fw; pET21b_Rv  |
| S66G/H197Y  | 66G_Fw; 197Y_Rv    |
| S66G/H197F  | 66G_Fw; 197F_Rv    |
| S66T        | 66T_Fw; pET21b_Rv  |
| S66T/H197Y  | 66T_Fw; 197Y_Rv    |
| S66T/H197F  | 66T_Fw; 197F_Rv    |



Obr. P1: Analýza úspěšně připravených MegaPrimerů pomocí gelové elektroforézy. Všechny připravené MegaPrimery měly očekávanou velikost (bp – páry bází), kvalitu bez vedlejších produktů a dostačující výtěžek.

## 9.2 Excitační intenzita naměřená během prescreeningu

Během prescreeningu byly naměřené také hodnoty intenzity excitace pro všechny mutanty a kontroly v promývacím Tris pufru (Obr. P2a) i draselno-fosfátovém pufru (Obr. P2b).



Obr. P2: Relativní intenzita excitace připravených mutantů a kontrol v prostředí (a) promývacího Tris pufru a (b) draselno-fosfátového pufru.

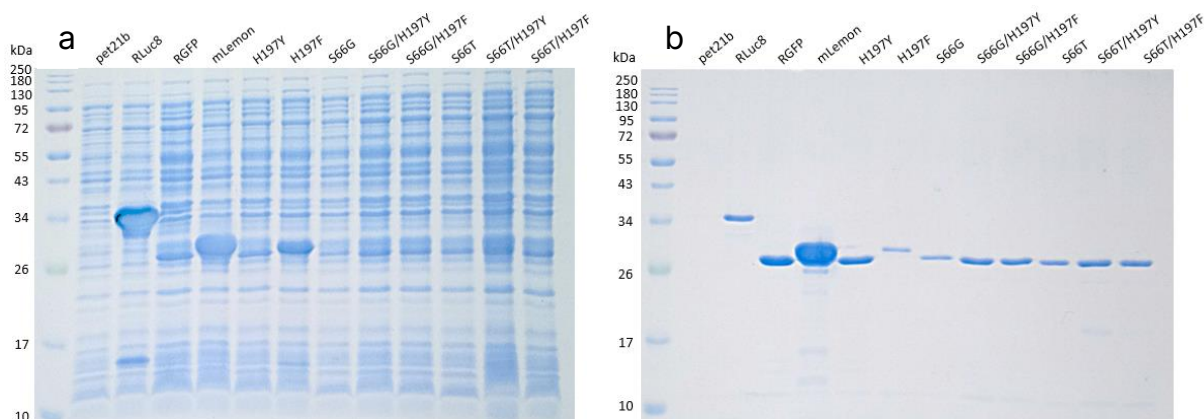
V Tab. P3 jsou uvedeny naměřené emisní maxima pro referenční proteiny RGFP a mLemon a mutované proteiny s nejvyšší intenzitou fluorescence v prostředí promývacího Tris pufru a draselno-fosfátového pufru.

Tab. P3: Emisní maxima naměřená během prescreeningu referenčních proteinů RGFP a mLemon a mutovaných proteinů s nejvyšší intenzitou fluorescence v promývacím Tris pufru a draselno-fosfátovém pufru.

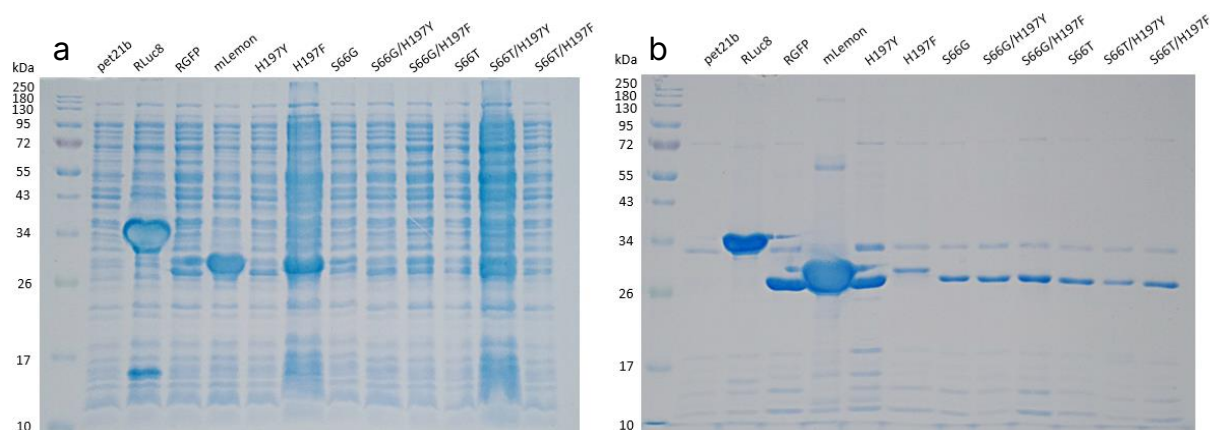
| Protein         | Emisní max. v promývacím Tris pufru | Emisní max. v draselno-fosfátový pufru |
|-----------------|-------------------------------------|----------------------------------------|
| RGFP            | 512 nm                              | 513 nm                                 |
| mLemon          | 529 nm                              | 533 nm                                 |
| RGFP S66G       | 511 nm                              | 510 nm                                 |
| RGFP S66T       | 510 nm                              | 510 nm                                 |
| RGFP H197Y      | 526 nm                              | 525 nm                                 |
| RGFP S66G/H197Y | 528 nm                              | 526 nm                                 |

### 9.3 SDS-PAGE analýza

Gely se vzorky buněčného extraktu a purifikovaných proteinů v prostředí promývacího Tris pufru a draselno-fosfátového pufru jsou zdokumentovány v Obr. P3 a Obr. P4. Výsledky jsou popsány v kapitole 5.3.



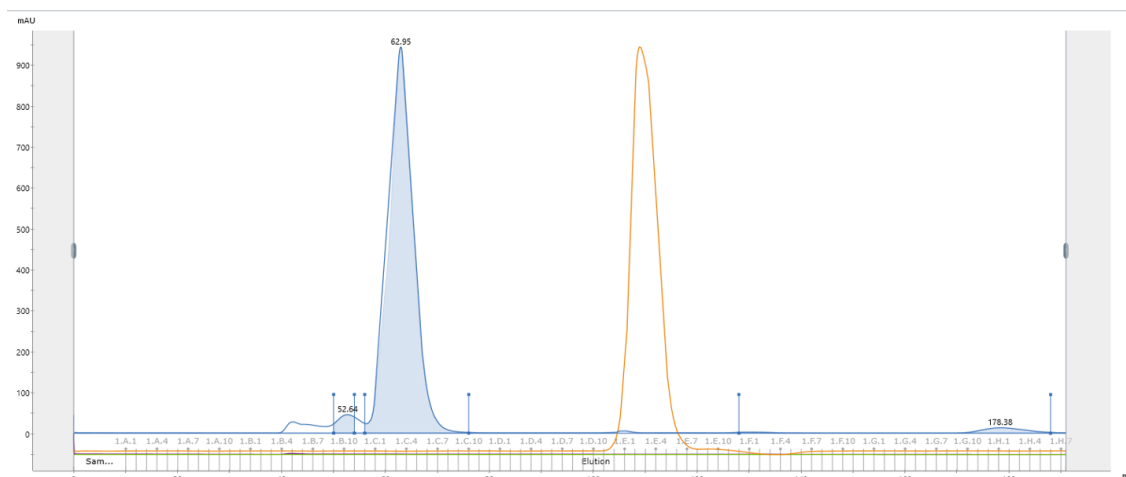
Obr. P3: SDS-PAGE analýza mutantů RGFP navržených pro prodloužení vlnové délky jeho emise ve vzorku (a) buněčného extraktu a (b) purifikovaného proteinu při purifikaci za použití promývacího Tris pufru.



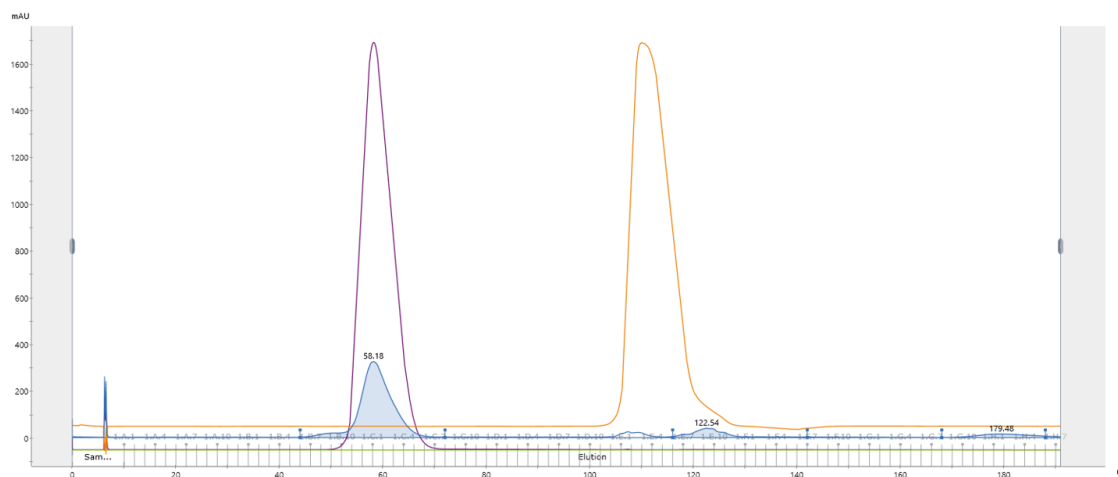
Obr. P4: SDS-PAGE analýza mutantů RGFP navržených pro prodloužení vlnové délky jeho emise ve vzorku (a) buněčného extraktu a (b) purifikovaného proteinu při purifikaci za použití draselno-fosfátového pufru.

## 10 PŘÍLOHA Č. 2: CHROMATOGRAMY SEC SEPARACE PURIFIKOVANÝCH PROTEINŮ

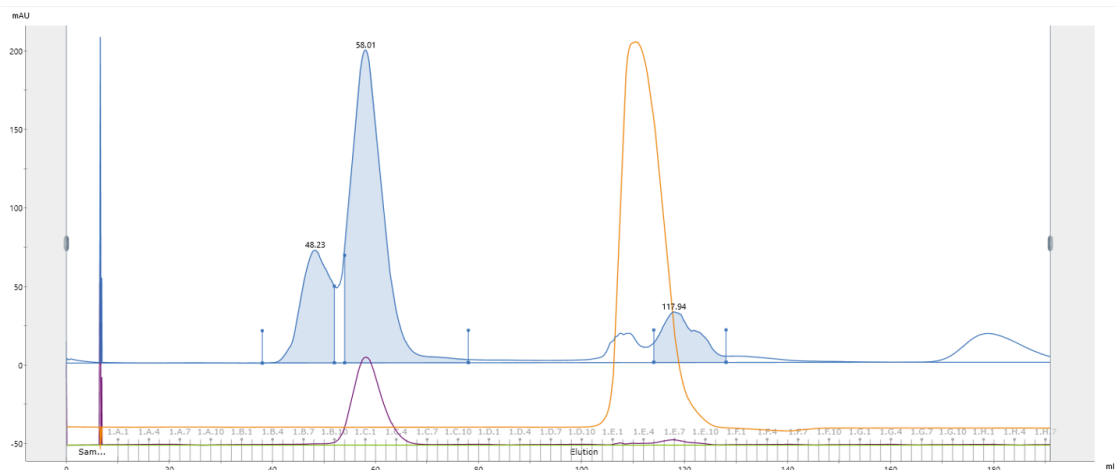
Během purifikace pomocí metody SEC byly pro každý protein naměřeny chromatogramy, podle kterých bylo zjišťováno, které frakce obsahují protein našeho zájmu. Chromatogramy luciferázy RLuc8 (Obr. P5) a proteinu RGFP (Obr. P6) odpovídají dříve naměřeným datům v Loschmidtových laboratořích. Chromatogramy mutantů RYFP SY (Obr. P7) a RYFP GY (Obr. P8) se ale oproti RGFP liší obsahem poměrně velkého píku před očekávaným píkem. Tento pík byl dále zkoumán v kapitole Výsledky.



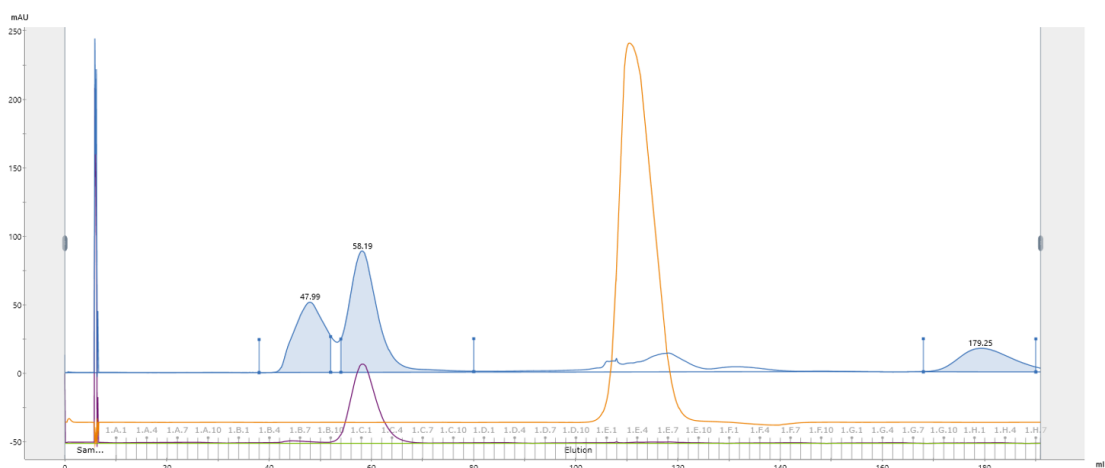
Obr. P5: Chromatogram naměřený během purifikace luciferázy RLuc8 metodou SEC. Modrá křivka znázorňuje absorpci při 280 nm, oranžová křivka zobrazuje vodivost, zelená křivka zobrazuje tlak v systému a fialová křivka absorpci při 498 nm.



Obr. P6: Chromatogram naměřený během purifikace RGFP metodou SEC. Modrá křivka znázorňuje absorpci při 280 nm, oranžová křivka zobrazuje vodivost, zelená křivka zobrazuje vodivost a fialová křivka absorpci při 498 nm.



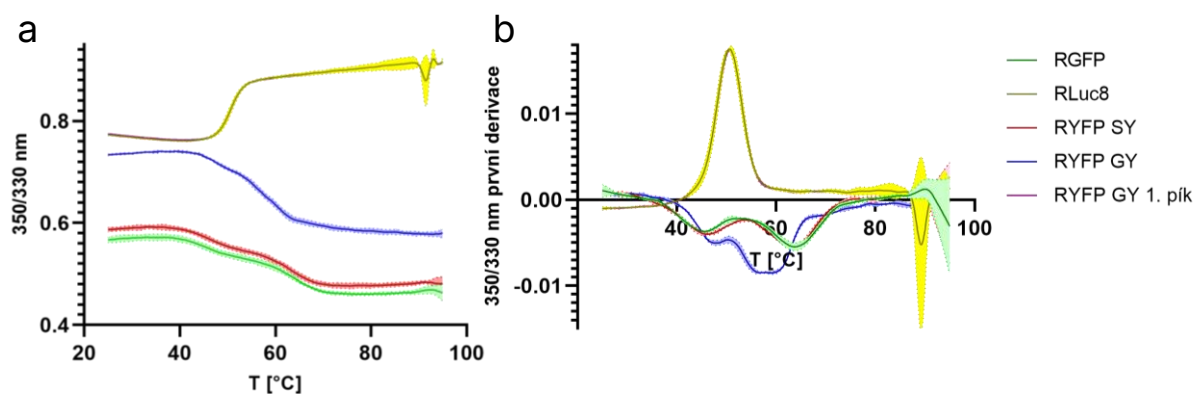
Obr. P7: Chromatogram naměřený během purifikace RYFP SY metodou SEC. Modrá křivka znázorňuje absorpci při 280 nm, oranžová křivka zobrazuje vodivost, zelená křivka zobrazuje tlak v systému a fialová křivka absorpci při 498 nm. U tohoto vzorku došlo k naměření neočekávaného píku před typickým píkem RGFP, první pík byl dále zkoumán.



Obr. P8: Chromatogram naměřený během purifikace RYFP GY metodou SEC. Modrá křivka znázorňuje absorpci při 280 nm, oranžová křivka zobrazuje vodivost, zelená křivka zobrazuje tlak v systému a fialová křivka absorpci při 498 nm. U tohoto vzorku došlo k naměření neočekávaného píku před typickým píkem RGFP, první pík byl dále zkoumán.

## 11 PŘÍLOHA Č. 3: STANOVENÍ TERMOSTABILITY VARIANT RYFP

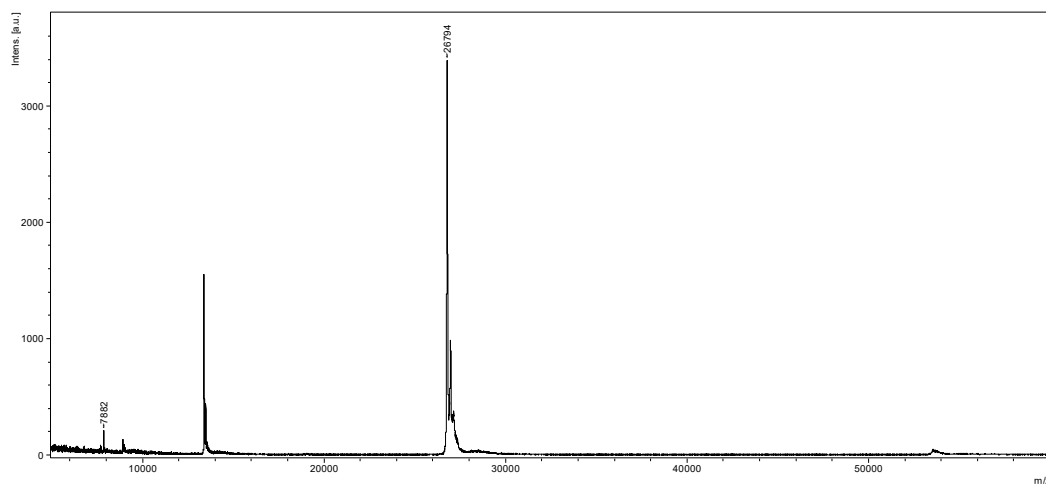
Obr. P9 zobrazuje křivky tepelné denaturace naměřené pomocí nanoDSF. Výsledky jsou popsány v kapitole 5.6.



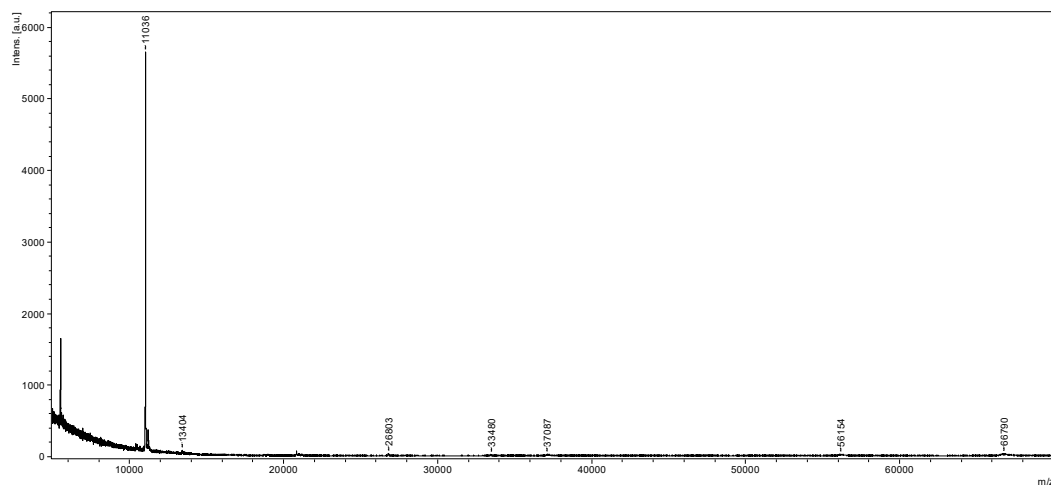
Obr. P9: Křivky určují hodnotu poměru naměřených dat termostability pomocí nanoDSF. (a) Zobrazuje čistě poměr hodnot při 350 a 220 nm, (b) pak jejich první derivaci.

## 12 PŘÍLOHA Č. 4: HMOTNOSTNÍ SPEKTRA RYFP GY A RYFP SY

Obr. P10 zobrazuje MALDI-TOF hmotnostní spektrum proteinu RYFP GY a Obr. P11 zobrazuje hmotnostní spektrum těžších frakcí získaných při SEC separaci RYFP GY. Výsledky jsou popsány v kapitole 5.7.

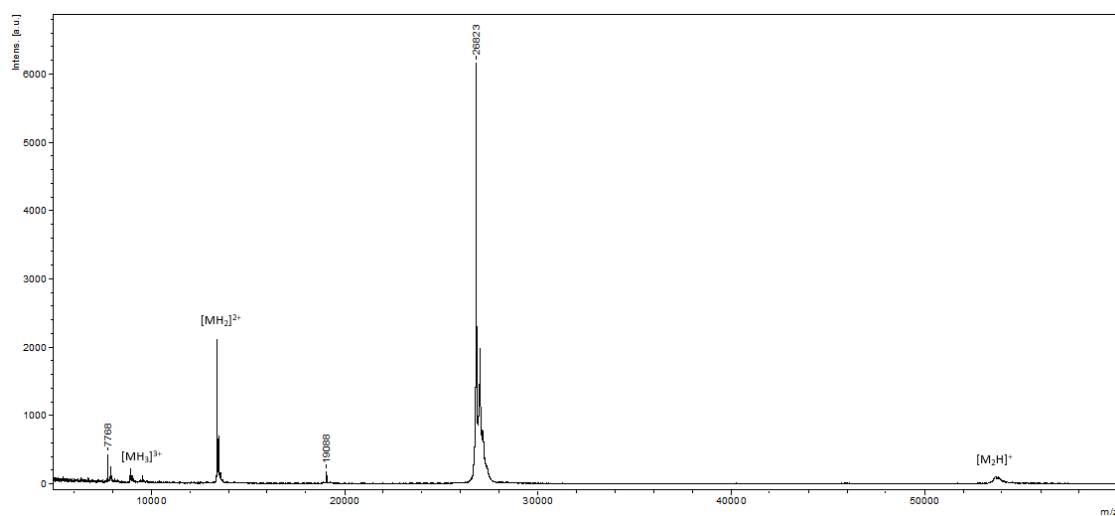


Obr. P10: Hmotnostní spektrum MALDI-TOF analýzy vzorku RYFP GY.

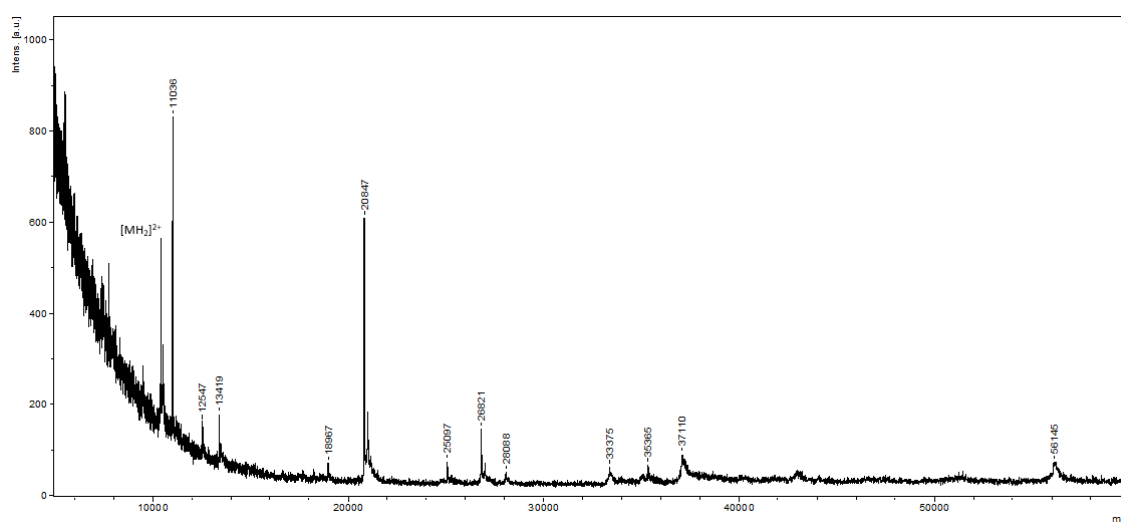


Obr. P11: Hmotnostní spektrum MALDI-TOF analýzy vzorku těžších frakcí získaných při SEC separaci RYFP GY.

Obr. P12 zobrazuje MALDI-TOF hmotnostní spektrum proteinu RYFP SY a Obr. P13 zobrazuje hmotnostní spektrum těžších frakcí získaných při SEC separaci RYFP SY. Výsledky jsou popsány v kapitole 5.7.



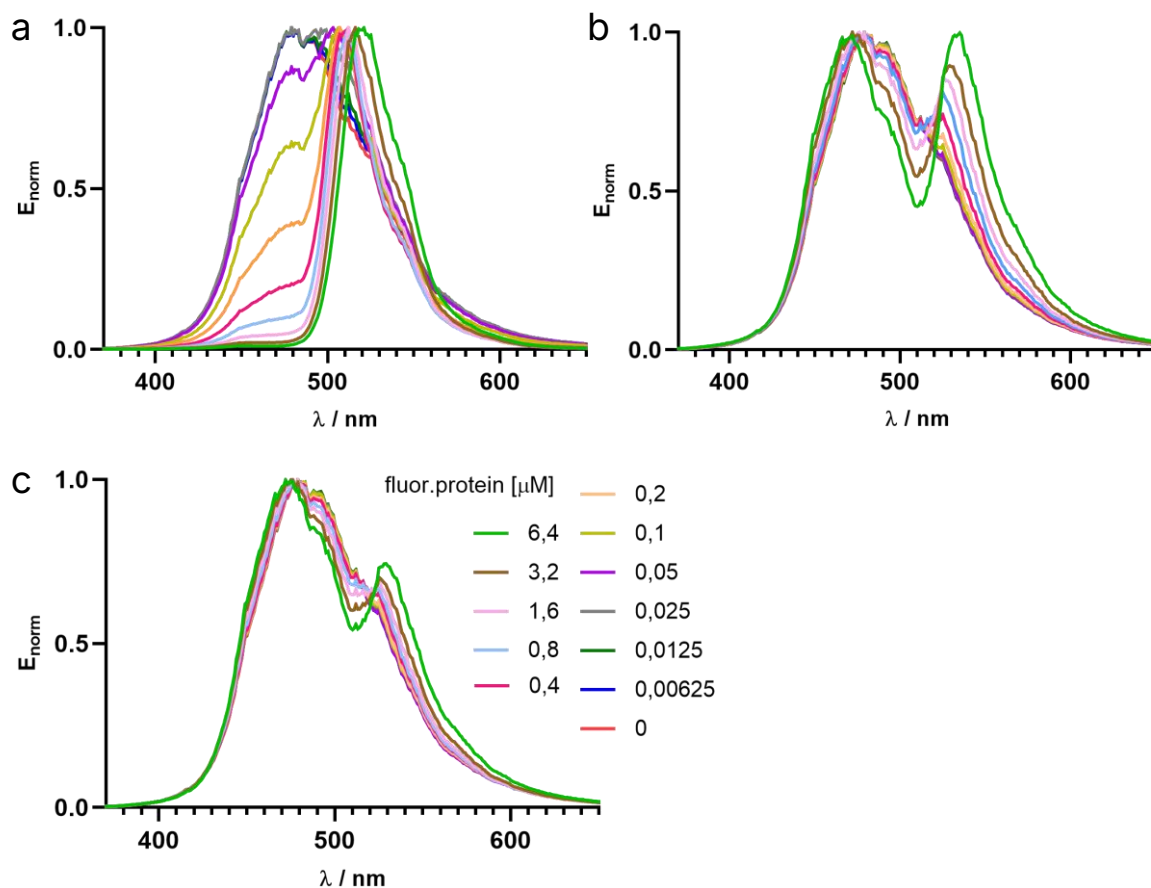
Obr. P12: Hmotnostní spektrum MALDI-TOF analýzy vzorku RYFP SY.



Obr. P13: Hmotnostní spektrum MALDI-TOF analýzy vzorku těžších frakcí získaných při SEC separaci RYFP SY.

## 13 PŘÍLOHA Č. 5: SPEKTRA ZE SPEKTROLUMINOMETRICKÉ ANALÝZY

Během spektroluminometrické analýzy byla naměřena spektra titrací RLuc8 fluorescenčními proteiny a z nich dále byla provedena analýza interakce mezi RGFP (Obr. P14a) a jeho variant (pro RYFP GY Obr. P14b, RYFP SY Obr. P14c) s RLuc8.



Obr. P14: Surová naměřená spektra normalizovaná vůči maximu emise spektroluminometrické analýzy RLuc8 a (a) divokého typu RGFP, (b) RYFP GY a (c) RYFP SY. Legenda je pro všechny tři grafy společná.