



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

**Implementace laboratorní medicíny do systému vzdělávání na Univerzitě Palackého v Olomouci**

reg. č.: CZ.1.07/2.2.00/28.0088

Vybrané metody studia buněčných procesů  
KBB/VMSBP

STUDIUM PROTEINOVÝCH INTERAKCÍ IN VITRO

## OBSAH

Teoretický úvod .....	3
Regulace buněčných procesů .....	3
Vzájemná interakce mezi proteiny .....	3
Vybrané metody studia proteinových interakcí .....	4
In vitro metody .....	4
In vivo metody .....	8
Syntéza proteinů in vitro .....	10
Detekční metody – SDS-PAGE a western blot .....	11
Metabolismus léčiv .....	13
Pregnanový X receptor .....	14
Praktická část .....	15
Úkol .....	15
Materiál a chemikálie .....	16
Pracovní postup .....	18
DEN 1 .....	18
DEN 2 .....	20
DEN 3 .....	24
Vyhodnocení .....	26
Literatura .....	26

## TEORETICKÝ ÚVOD

### REGULACE BUNĚČNÝCH PROCESŮ

Buněčné pochody, které v organismu probíhají, zajišťují přísun energie potřebný pro udržení vysokého stupně organizace a předávání biologických vlastností. Regulace dílčích biologických dějů zajišťuje jednak udržení homeostázy a jednak vhodné reakce na změny životního prostředí organismu. Veškeré pochody, např. exprese genů, buněčný růst, proliferace, příjem živin, metabolismus, morfologie, pohyb, intracelulární komunikace a apoptosa, se neobejdou bez přítomnosti proteinů a nukleových kyselin, pro jejichž vznik je nutný složitý syntetický aparát. V procesu svého vzniku tvoří proteiny a nukleové kyseliny vzájemně na sobě závislý celek: bílkovinné katalyzátory zajišťují energetickou a kinetickou stránku procesu a nukleové kyseliny podmiňují stránku informační. Vzhledem k tomu, že buňky reagují na bezpočet podnětů, exprese proteinů je vysoce dynamický proces. Proteiny, které se účastní dokončení konkrétních úkolů, nemusí být vždy exprimovány nebo aktivní.

Hromadným studiem proteinů a jejich vlastností se zabývá proteomika. Hlavním cílem proteomiky je identifikace všech proteinů kódovaných lidským genomem (popřípadě genomy dalších, zejména tzv. modelových organismů) s následným stanovením:

- a) jejich exprese v různých buňkách daného organismu – expresní proteomika
- b) jejich subcelulární lokalizace v různých organelách
- c) jejich posttranslačních modifikací
- d) jejich vzájemných interakcí (b – d strukturní proteomika)
- e) vztahu mezi strukturou a funkcí (funkční proteomika)

### VZÁJEMNÁ INTERAKCE MEZI PROTEINY

Odhaduje se, že z 30.000 genů lidského genomu vzniká  $1 \times 10^6$  proteinů prostřednictvím sestřihu genů a řady postranslačních modifikací. Ačkoliv malá část z těchto proteinů je schopna fungovat v relativní izolaci, většina spolupracuje s ostatními proteiny ve formě komplexů prostřednictvím proteinových sítí („interactome“), kde vzájemné vazby proteinů přechodně vznikají a zanikají. Interakce mezi proteiny jsou důležité pro většinu biologických funkcí. Signály z vnějšku jsou přenášeny dovnitř buňky pomocí proteinových interakcí signálních molekul. Z receptorů vedou různé signalizační kaskády dovnitř buňky, kde ovlivňují různé buněčné procesy včetně změn v expresi genů. Jedním z náročných

úkolů buněčné biologie je detailní objasnění těchto pochodů. Přínos nových informací o těchto interakcích zlepší naše chápání nemocí a může být základem pro nové terapeutické přístupy.

#### **Proteinové interakce mohou způsobit tyto změny:**

- Změnit kinetické vlastnosti enzymů - nepatrné změny na úrovni vazby substrátu nebo na úrovni allosterického účinku
- Nasměrovat substrát v multienzymovém komplexu a určit tak konečný produkt (tzv. „Substrate channeling“; př. Pyruvátdehydrogenásový komplex
- Vytvořit nové vazebné místo - typické pro malé efektorové molekuly
- Inaktivovat nebo zahájit degradaci proteinu
- Změnit specifitu proteinu pro substrát interakcí s jiným vazebným partnerem
- Regulovat předcházející nebo následné reakce

#### **Typy proteinových interakcí**

Proteinové interakce mohou být klasifikovány na základě biologického významu: interakce enzym-inhibitor, antigen-protilátka, receptor-ligand nebo na základě chemické podstaty: trvalé-přechodné, silné-slabé, vodíkové vazby a další. Důležitou vlastností interakce je specifita. Interakce přechodného charakteru kontrolují většinu buněčných procesů včetně enzymové modifikace, při tvorbě transkripčních komplexů, během transportu proteinů přes membrány nebo při skládání proteinů, signalizaci a během buněčného cyklu.

### **VYBRANÉ METODY STUDIA PROTEINOVÝCH INTERAKCÍ**

#### **IN VITRO METODY**

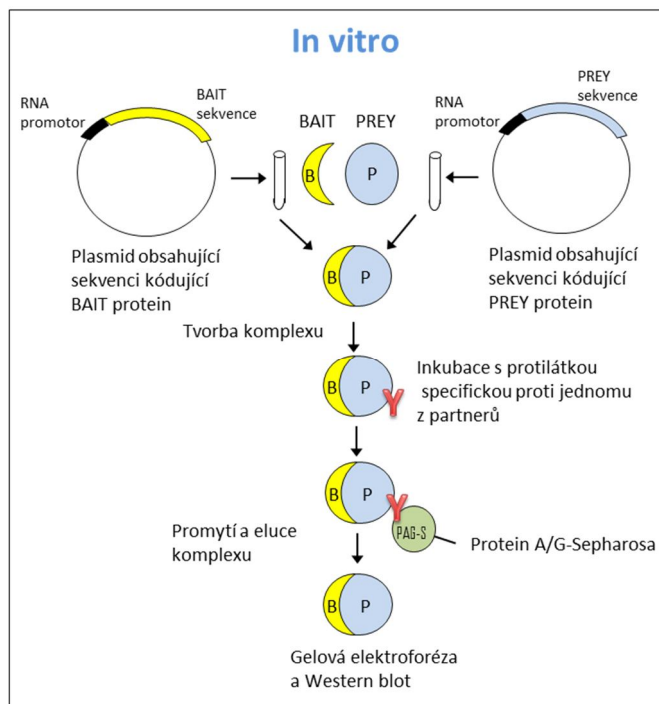
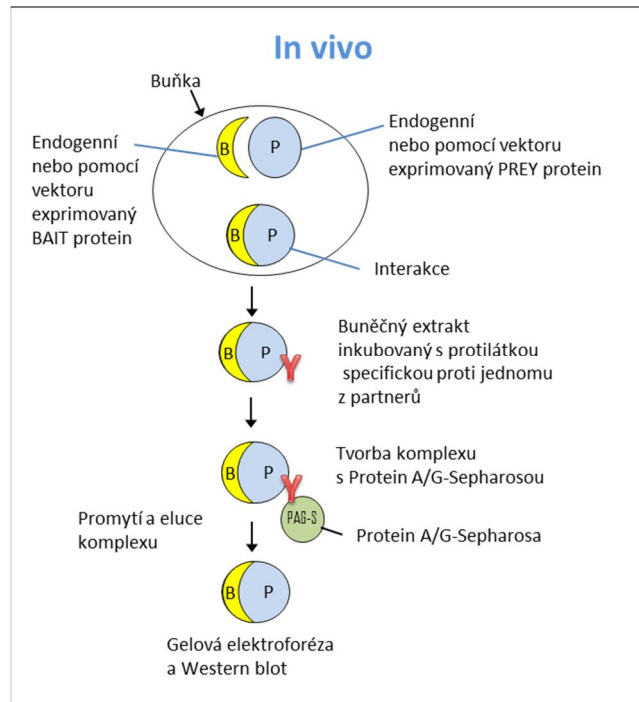
##### **Metody využívající vazby na nosič**

Studovaný protein je po navázání na nosič využit k zachycení interakčních partnerů např. z buněčného extraktu nebo retikulocytárního lyzátu (viz níže). Protein může být vázán kovalentně, na komerčně dostupné aktivované nosiče nebo nekovalentně prostřednictvím afinitní vazby. Nejčastěji je využíváno fúzní sekvence např. histidinová kotva (6xHis), glutathion S-transferasa (GST), aminokyselinový epitop FLAG, která je při translaci připojena k N- či C- konci studovaného proteinu. Po odstranění nespecificky navázaných proteinů promytím nosiče jsou studované komplexy z nosiče uvolněny denaturací nebo za nativních podmínek např. přidávkem solí, kompetujícími molekulami nebo chaotropními rozpouštědly. Navázané proteiny jsou nejčastěji detekovány SDS-PAGE, western blotem, hmotnostní spektroskopií, N-koncovým sekvenováním nebo autoradiograficky.

## A) Ko-imunoprecipitace (Co-IP)

Tato dnes běžně využívaná metoda studia proteinových interakcí využívá interakce protilátky immobilizované na matrici s antigenem za vzniku tzv. imunoprecipitátu. Vzhledem k tomu, že imunoglobuliny mají v molekule nejméně dvě identická vazebná centra pro daný antigen, mohou při vhodném koncentračním poměru obou partnerů vznikat polymerní, nerozpustné a snadno detekovatelné komplexy. Antigen vázaný na protilátku nazýváme „návnada“ (z angl. bait) a protein s ním interagující „kořist“ (z angl. prey). Tradiční co-IP metody využívají protein A/G agarosový konjugát (protein ze *Staphylococcus aureus*). Rizikem je ovšem vznik falešně pozitivního pozadí, které vytváří lehké a těžké řetězce protilátky uvolněné během eluce a komigrující společně s bandy studovaných proteinů během následné elektroforézy. Nežádoucí pozadí při následné detekci je možné eliminovat náhradou A/G agarosové matrice za matrici vytvářející kovalentní vazbu s protilátkou tzv. „Aminolink Couplig resin“. Protilátka reaguje s aldehydickými skupinami matrice za vzniku Schiffovy báze. Redukcí Schiffovy báze pomocí kyanoborohydridu sodného je docíleno stabilizace konjugátu. Neredukující eluční pufr umožňuje disociaci studovaného proteinového komplexu, přičemž protilátka zůstává vázaná na matrici a je možné ji opakovaně použít pro další imunoprecipitaci. Proteinový komplex je poté eluován bez toho aniž by se protilátka uvolnila do prostředí. Výsledný proteinový komplex je separován SDS-PAGE a detekován pomocí western blotu s využitím protilátky proti druhému z partnerů.

Tato metoda se používá pro testování interakcí mezi dvěma známými proteiny i pro identifikaci nových interakcí. Při tomto postupu je nezbytné, aby proteinový komplex zůstal nativní během série promývacích kroků. Výhodou koimunoprecipitace je detekce interakcí za fyziologických podmínek v buňce včetně posttranslačních modifikací interagujících proteinů. Je možné studovat interakce proteinů exprimovaných nejen v buňkách a také exprimované in vitro syntézou.



Obrázek č. 1: Demonstrace CO-IP proteinů získaných z buněčného extraktu (in vivo) nebo in vitro translací

## B) Separace pomocí afinitních ligandů (Pull-down Assays)

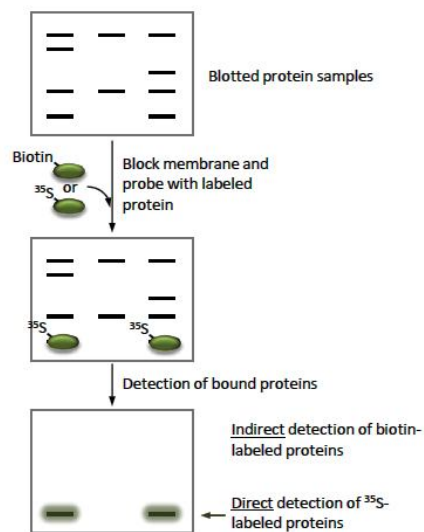
Princip spočívá v připojení afinitního ligandu pro navázání nebo identifikaci proteinu. V současné době je využívána řada fúzních ligandů např. 6xHis, GST, FLAG. Testovaný protein s připojeným ligandem je purifikován pomocí komerčních afinitních nosičů (Ni-NTA, anti-FLAG Ab, glutathion) a je použit jako „návnada“ pro interagující proteiny přítomné v buněčném lyzátu.

### C) Tandemová afinitní purifikace (TAP)

K proteinu jsou připojeny dvě a více fúzních sekvencí. Fúzní protein je nejprve purifikován pomocí jedné fúzní sekvence, která je posléze odstraněna proteolytickým štěpením, čímž dojde k odhalení druhé fúzní sekvence využitelné pro další purifikaci. K identifikaci interagujících proteinů po jejich elektroforetickém rozdělení se využívá technik MALDI-TOF MS nebo tandemové hmotnostní spektroskopie. Přes patrné přednosti není TAP univerzální metodou, vhodnou pro všechny případy. Přítomnost TAP-fúzní sekvence (~ 20 kDa) může negativně ovlivňovat konformaci proteinu, a tím i jeho interakci s vazebnými partnery.

### Detekce interakcí imobilizovaných na membráně - Far western

Tato metoda využívá strategie metody western blot s tím rozdílem, že protilátka z klasické detekce je nahrazena vhodně značeným „bait“ proteinem jako sonda. Membrána s rozdělenými proteiny, je po zablokování nespecifických interakcí inkubována s proteinem, pro nějž hledáme interakční partnery. V závislosti na podobě sondy je poté interakce detekovaná radioisotopicky, chemiluminiscencí nebo kolorimetry.



Obrázek č. 2: Far western (Promega)

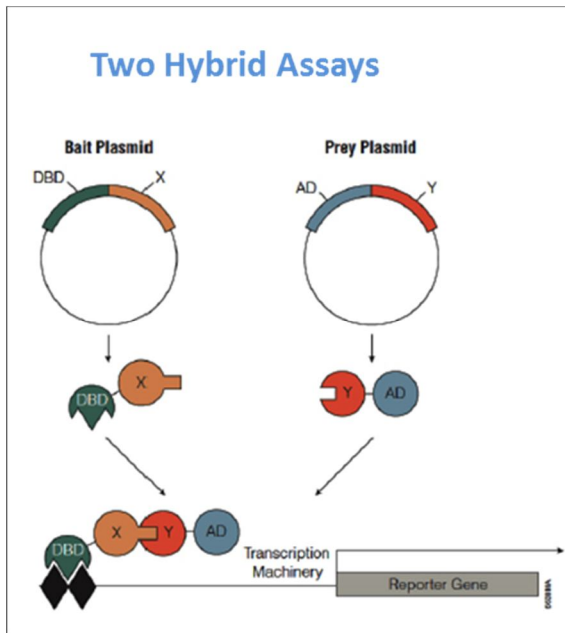
### **Two-Hybrid System**

Systém byl původně vyvinut v kvasinkách (Yeast Two-hybrid System) a poté přizpůsoben pro použití v savčích buňkách (Mammalian Two-hybrid System). Jedná se o metodu založenou na rekonstituci funkčního transkripčního faktoru, sestávajícího z DNA-vazebné domény (DBD), zajišťující lokalizaci faktoru na specifickém místě DNA, a aktivační domény (AD), která je vlastně katalyticky aktivní doménou pro transkripci. Rozdělení DBD a AD inaktivuje transkripční faktor, ale jeho funkce může být obnovena koexpresí a opětovnou asociací DBD a AD. Systém využívá tohoto jevu k identifikaci interakce proteinů, které zajistí spojení obou domén (DBD a AD) a tím aktivaci transkripčního faktoru. Pro tento účel je konstruovaná fúze DBD s proteinem X, ke kterému hledáme interakčního partnera, „návnadu“ (bait protein), a fúze AD s knihovnou potenciálních interakčních partnerů Y, tzv. „kořist“ (prey protein). V případě interakce studovaných proteinů dojde k asociaci připojených domén DBD a AD a k indukci transkripce reporterového genu. Jeho exprese umožní defektivním kvasničným buňkám růst na selektivním médiu (např. minimální médium bez histidinu. Kolonie rostoucí na médiu bez histidinu jsou klony, u nichž došlo k hledané interakci. Kromě auxotrofie pro histidin jsou často využívány i geny, kódující snadno detekovatelnou enzymovou aktivitu (např. lacZ pro  $\beta$ -galaktosidasu, MEL1 pro  $\alpha$ -galaktosidasu). V případě savčích buněk dochází k expresi reporterového genu například luciferasy a tím ke zvýšení chemiluminiscence.

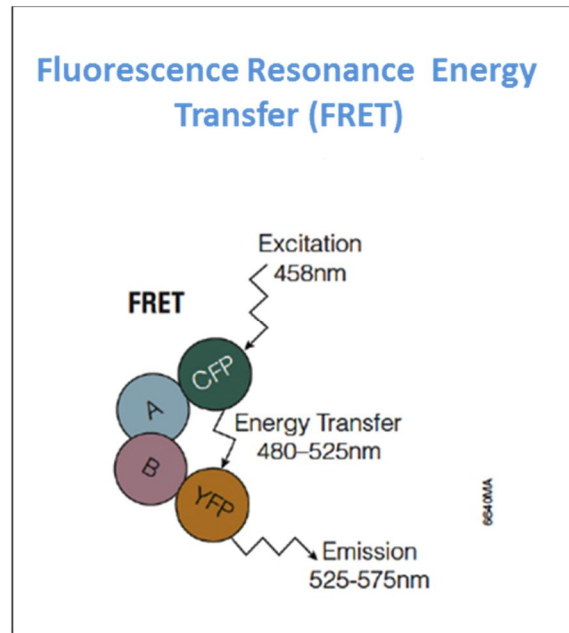
### **Immunofluorescence/FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)**

Přenos rezonance fluorescenční energie (fluorescence resonance energy transfer - FRET) je jedinečná a velmi účinná metoda pro zjištění konformace, asociace či disociace molekul, a pro detekci intra- či intermolekulárních interakcí proteinů v živých buňkách. Studované molekuly jsou označeny odlišnými fluorochromy, které jsou zvoleny tak, aby se emisní spektrum jednoho z nich překrývalo s excitačním spektrem druhého. Pokud tyto molekuly vzájemně reagují a jejich fluorochromy se dostanou velice blízko (typicky 10–100 Å), energie excitovaného světla se může přenést z jednoho fluorochromu na druhý. Tedy při osvětlení komplexu excitačním světlem prvního fluorochromu dostaneme emisní světlo odpovídající druhému fluorochromu. Pro FRET je možné použít proteiny, připravené jako fúzní konstrukty s GFP nebo jeho variantami (např. modrozelený fluorescenční protein (cyan fluorescent protein – CFP), žlutý fluorescenční protein (yellow fluorescent protein – YFP), nebo proteiny, které byly chemicky modifikovány kovalentním připojením k syntetickým fluoroforům (například k fluorescein isothiokyanátu – FITC).





Obrázek č. 3: Princip Two-Hybrid Assay (Promega)



Obrázek č. 4: Princip FRET (Promega)

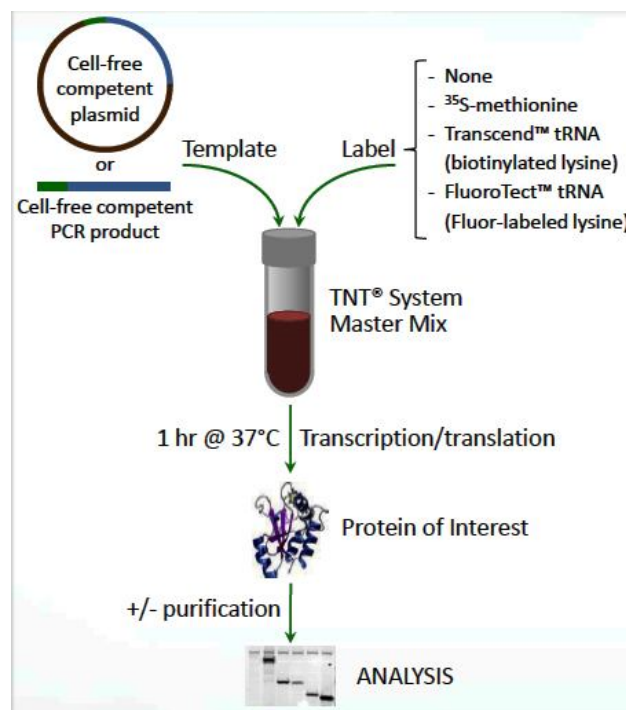
## SYNTÉZA PROTEINŮ IN VITRO

In vitro syntéza proteinů z bezbuněčných extraktů je důležitým nástrojem molekulární biologie umožňující syntézu proteinů mimo buňku.

Oproti in vivo expresi, exprese in vitro je vhodnější v případě že je protein toxický pro hostitelskou buňku, je podroben rychlé proteolytické degradaci intracelulárních proteáz, popřípadě se ho nedaří izolovat v dostatečném množství. Tuto metodu je možné aplikovat například pro rychlou identifikaci genových produktů a obecně při studiu vlastností proteinů (např. studium skládání proteinů).

Pro syntézu in vitro se obecně uplatňují buněčné systémy, které jsou přizpůsobeny k velmi rychlé syntéze proteinů. Nejčastěji je využíván lyzát z králičích retikulocytů. Retikulocyty jsou prekurzory erytrocytů s funkčním transkripčním a translačním aparátem. Tyto nezralé červené krvinky nemají jádro, ale obsahují odpovídající mRNA a kompletní translační mašinerii pro rozsáhlou expresi globinu. Pro účely syntézy in vitro je retikulocytární lyzát ošetřen nukleasou, která eliminuje přítomnost globinové mRNA.

Jako templát je možné použít RNA (tzv. Standard translation reaction) i DNA (tzv. Linked or Coupled Transcription:Translation). Systémy pro syntézu proteinů z exogenních DNA templátů obvykle kombinují prokaryotickou fágovou RNA polymerázu a promotor (T7, T3 a SP6) z eukaryotických nebo prokaryotických extraktů. DNA templát pro transkripčně translační reakci může být klonován do vektorů nebo vytvořen pomocí PCR.



Obrázek č. 5: Demonstrace přípravy proteinu in vitro translací (Promega)

Identifikace proteinových interakcí vyžaduje izolaci komplexu a následnou analýzu pomocí standardních detekčních metod. Pro detekci se nejčastěji využívá diskontinuální gelová elektroforéza v přítomnosti SDS (SDS-PAGE) s následným western blotem na membránu nebo analýza hmotnostní spektrometrií.

Elektromigračními neboli elektroforetickými metodami je označován soubor technik, které využívají pohybu ionizovaných částic v elektrickém poli. Elektroforéza jako separační technika byla poprvé použita pro dělení proteinů Tisellem v roce 1937. Částice nesoucí náboj rozpuštěné v elektrolytu se v elektrickém poli pohybují konstantní rychlostí úměrnou velikosti jejich nábojů, anionty k anodě a kationty ke katodě.

Elektroforetické metody jsou často využívány při studiu makromolekul, umožňují jejich rozdělení a následné bližší charakterizaci. V současnosti pravděpodobně nejpoužívanějším technickým provedením elektroforézy v polyakrylamidovém gelu je diskontinuální elektroforéza v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE), která umožňuje stanovit molekulovou hmotnost proteinů. SDS uděluje proteinům uniformní záporný náboj, a ty se všechny pohybují k anodě, přičemž pohyblivost je dána velikostí molekuly. Bylo zjištěno, že pohyblivost bílkovin v gelu v přítomnosti SDS je nepřímo úměrná logaritmu molekulové hmotnosti. To znamená, že na základě měření nejméně tří molekul se známou molekulovou hmotností v SDS-PAGE lze gel nakalibrovat a metodu použít ke stanovení relativní molekulové hmotnosti neznámé bílkoviny. Název diskontinuální elektroforéza znamená, že vzorek putuje po čas separace přes dva gely s různou porozitou a s různými elektrolyty. Nejpoužívanější je modifikace dle Laemmliho. Úkolem prvního gelu (koncentrující; stacking gel), obsahujícího velké póry, je zakoncentrování (fokusace) vzorku do úzké zóny. Takto koncentrovaný vzorek vstupuje do dělicího gelu (running gel), jehož separační účinnost je pak vysoká bez ohledu na původní objem vzorku.

Pro některé účely (sekvenční analýza, imunoanalýza, apod.) je výhodné převést separované proteiny z gelu na membránu, kde dochází k fixaci proteinů adsorbčními případně kovalentními silami. Metod umožňující tento proces se nazývá Western blotting a byla poprvé použita Towbinem v roce 1979.

Otisk molekul (tzv. blotting) se obecně využívá nejen pro přenos proteinů, ale také pro přenos nukleových kyselin – DNA (Southern blot), RNA (Northern blot). Molekuly jsou přeneseny z mobilní fáze (např. agarosový nebo polyakrylamidový gel) do pevné fáze, na kterou jsou fixovány (např. nitrocelulózoová membrána). Přenos bývá nejčastěji uskutečňován pomocí jednosměrného elektrického proudu (electroblotting) nebo filtrací roztoku přes membránu (dot blotting) pomocí

speciálních zařízení. Molekuly přenesené z gelových nosičů a fixované na pevné fázi se zviditelňují přímo po fixaci různými barevnými reakcemi, autoradiografií nebo reakcí se specifickými protilátkami (immunoblotting).

Membrány používané pro blotting mají unikátní mikroporézní povrch s vysokou vazebnou kapacitou. Fixované proteiny lze dlouhodobě skladovat. Mezi nejčastěji používané materiály membrán patří nitrocelulóza (má však špatné mechanické vlastnosti) a polyvinylidendifluorid (PVDF). PVDF membrány jsou mechanicky velmi odolné. Oba dva typy membrán vykazují vysokou vazebnou kapacitu.

V případě elektroblottingu existují dva možné způsoby uspořádání: tankový (tank, wet) a polosuchý (semi-dry) blotting.

Při tankové variantě se do speciální kazety skládá následující vrstva (sendvič): porézní houbička, filtrační papír, gel, membrána, filtrační papír, porézní houbička. Poté se kazeta vloží do blotovací komůrky naplněné přenosovým pufrům. Přenos proteinů na membránu probíhá při konstantním proudu, jehož hodnota závisí na ploše membrány ( $0,8 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$ ).

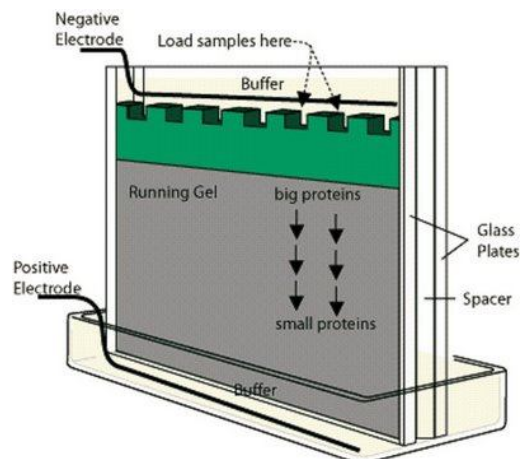
Při uspořádání semi-dry se používají plošné grafitové elektrody. Skládání je obdobné jako u tankového uspořádání. Na elektrody se naskládá několik vrstev filtračního papíru nasyceného blotovacím pufrům, gel, blotovací membrána, opět filtrační papíry a nahoru se položí druhá elektroda. Hlavními výhodami polosuchého blottingu v porovnání s tankovým jsou - homogenní elektrické pole, možnost vyššího napěťového gradientu, menší spotřeba přenosového pufru, možnost simultánního přenosu z několika gelů.

Pro kontrolu přenosu proteinů na membránu se používají činidla Ponceau S, Amidočern 10B a Fast Green, která lze buď jednoduše vymýt destilovanou vodou, nebo se používá odbarvovací roztok.

Proteiny fixované na membráně se nejčastěji detekují imunochemicky pomocí specifických protilátek. Podstatou všech imunochemických metod je interakce mezi antigenem a protilátkou in vitro za tvorby imunokomplexu antigen-protilátka. Imunochemická detekce proteinu na membráně se provádí pomocí série dvou protilátek. První protilátka reaguje imunochemicky s detekovaným proteinem za tvorby komplexu. Takto vytvořený komplex je rozpoznán druhou protilátkou značenou detekovatelnou sondou (např. vázaná alkalická fosfatasa AP, křenová peroxidasa HRP, atom izotopu atd.).

Před samotnou aplikací protilátek je nutné blokovat místa na membráně, neboť povrch membrány váže proteiny, tj. jak antigen, tak i následně přidané protilátky. Blokování těchto nespecifických míst

se nejčastěji provádí umístěním membrány do zředěného roztoku např. 3 - 5 % BSA či netučné suché mléko v TBS, s přídatkem slabého detergentu jako je Tween 20 (0,05%). Proteiny BSA či mléčného kaseinu z roztoku se naváží na všechna místa, kam se dosud nenavázaly proteiny při přenosu. Po přidání protilátky se už molekuly imunoglobulinů nemohou nespecificky navázat na prázdný povrch membrány, ale musí specificky "hledat" svůj epitop na přebloetovaných antigenech. Blokování výrazně snižuje šum pozadí a odstraňuje falešné pozitivita.



Obrázek č. 6: Demonstrace elektroforézy

## METABOLISMUS LÉČIV

Koordinace mezi buňkami a tkáněmi v mnohobuněčném organismu je řízena chemickými signály, které se přenášejí jednak krví a jednak nervovými drahami. Podle toho se rozlišuje humorální regulace zprostředkovaná hormony a regulace v níž chemickými signály jsou tzv. neurotransmitery. Obecný mechanismus působení hormonu je dvojího typu. Polární hormony (katecholaminy, peptidové a bílkovinné hormony a prostaglandiny) nevstupují do buněk, ale reagují se specifickými receptory v cytoplazmatické membráně a jejich vliv se přenáší dovnitř buňky prostřednictvím konformačních změn receptoru. Nepolární hormony (steroidy) procházejí membránou do cytosolu, kde se spojují s receptory a vzniklé komplexy vstupují do jádra, kde regulují syntézu specifických proteinů.

Indukční účinky léčiv i endogenních steroidů jsou založeny na ovlivnění exprese cílových genů prostřednictvím aktivace tzv. nukleárních receptorů. Tento proces umožňuje transkripční regulaci konkrétních genů podle aktuálních potřeb organismu. V tomto ohledu jsou významné mimo jiné změny v expresi genů biotransformačních enzymů a transportních proteinů, které představují základní eliminační mechanismus bránící kumulaci některých endogenních látek nebo xenobiotik. Klíčovou roli v transkripční regulaci těchto detoxikačních procesů mají dva nukleární receptory – pregnanový X receptor (PXR) a konstitutivní androstanový receptor (CAR).

## PREGNANOVÝ X RECEPTOR

Pregnanový X receptor je jedním z klíčových nukleárních receptorů ovlivňující detoxikační procesy v buňce (PXR, gen NR1I2). V těle je přítomen ve velké míře především v játrech, méně v tenkém a tlustém střevě, v žaludku a v ledvinách. PXR působí jako tzv. sensor toxických endogenních metabolitů i exogenních chemických látek. Aktivovaný PXR reguluje transkripci cílových genů kódující enzymy metabolizující léčiva (enzymy I a II fáze) a lékové transportéry. Kromě metabolismu léčiv, PXR je také transkripčním faktorem a koaktivátorem kontrolující na základě proteinových interakcí glukoneogenesi, oxidaci mastných kyselin, ketogenesi a podílí se tak na regulaci energetického metabolismu jater.

Aktivace PXR probíhá přímou vazbou ligandu. Součástí procesu je uvolnění korepresorových proteinů a navázání koaktivátorů na ligandem obsazený receptor a rozvolnění struktury histony/DNA. PXR tvoří dimer s retinoidním X receptorem- $\alpha$  (RXR $\alpha$ ) a společně rozpoznávají specifické sekvence promotorové DNA regulovaných cílových genů označované jako responzivní element PXR-RE.

Aktivace PXR vazbou ligandu není jediným faktorem, který reguluje změnu transkripční aktivity tohoto receptoru. Je známo, že významnou roli v regulaci PXR hrají post-translační modifikace, např. fosforylace, acetylace sumoylace či ubiquitinylace. Fosforylace a proteinové interakce jsou dynamickým regulačním mechanismem ovlivňující nejen funkci proteinu, ale také umožňující specifitu a komunikaci mezi signálními drahami. Bylo prokázáno, že aktivace protein kinasy C alfa (PKC $\alpha$ ) způsobila represi aktivity receptoru PXR zesílením vazby PXR s NCoR korepresorem a naopak narušením interakce se SRC-1 koaktivátorem. Toto pozorování naznačuje změnu fosforylačního statutu na některém z dvojice PXR/NCoR a nebo PXR/SRC-1.

Nejjednodušší způsob, jak napodobit fosfo-skupinu je náhrada aminokyseliny, která může být fosforylovaná (Ser, Thr, Tyr) aminokyselinou, která bude mít navenek záporný náboj (např. Asp, Glu). V případě, že potřebujeme potvrdit/vyvrátit účinek fosforylace, je třeba nahradit původní AK aminokyselinou, která nemůže být fosforylovaná ani neneset záporný náboj (např. Ala, Val). Tato náhrada se provádí místně specifickou mutagenézí. Hovoříme tak o fosfomimetické (Asp, Glu) či fosfodeficientní mutaci (Ala, Val). V případě, že chceme sledovat účinek např. acetylace či ubiquitinace, dochází k náhradě aminokyseliny Lysinu buď glutaminem (acetyl-mimetická mutace) nebo argininem (acetyl-deficientní mutace).

ÚKOL

Byla provedena místně specifická mutagenese threoninu 248 (fosforylace) a lysinu 210 (acetylace) u PXR receptoru. Cílem cvičení je stanovit, zda dochází ke změnám v interakci receptoru PXR a RXR, které mohou být způsobeny cílenou mutací vybraných aminokyselin v PXR a tak potvrdit či vyvrátit, zda fosforylace/acetylace/ubikvitinace může mít významný vliv na transkripci cílových genů regulovaných skrz PXR.

Tabulka č. 1: Místně specifická mutagenese PXR

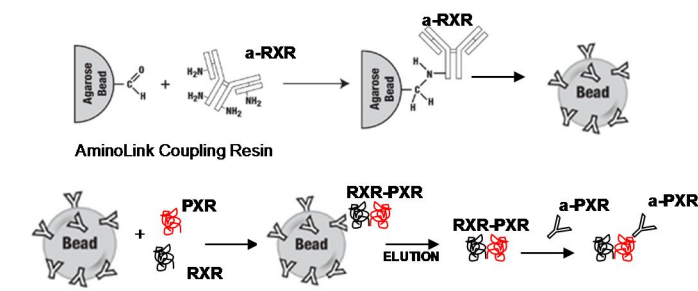
	MIMETICKÁ mutace	DEFICIENTNÍ mutace
<b>Thr248</b>	Thr248Asp	Thr248Val
<b>Lys210</b>	Lys210Gln	Lys210Arg

Záměnou threoninu za kyselinu asparagovou dochází díky přítomnosti karboxylové skupiny k napodobení fosfátové skupiny tzv. fosfo-mimetická mutace. Záměnou za valin naopak získáme tzv. fosfo-deficientní mutaci.

V případě studia acetylace je lysin nahrazen za glutamin simulující acetylovou skupinu (acetyl-mimetická mutace) nebo za arginin, u kterého k acetylaci nemůže docházet (acetyl-deficientní mutace).

Hlavní úkoly cvičení:

1. Připravit potřebné proteiny in vitro bez použití buněčného systému
2. Provést ko-imunoprecipitaci receptoru RXR s PXR a jeho mutanty (obrázek č. 6)
3. Vizualizovat interakci proteinů pomocí metod SDS-PAGE a western blot



Obrázek č. 7: CO-IP proteinů PXR-RXR pomocí AminoLink Coupling Resin

**Poznámka:**

**Každá dvojice bude pracovat s receptorem PXR, který nebyl mutován (pozitivní kontrola) a dále si zvolí jednoho z mutantů, tak aby v rámci skupiny byly studovány všechny typy mutací uvedené v tabulce č. 1.**

## MATERIÁL A CHEMIKÁLIE

### IN VITRO TRANSLACE

- Kit - TNT Quick Coupled Transcription/Translation System (příloha)
- Expresní plasmidy – pSG5-hPXR, pSG5-hRXR- $\alpha$
- termoblok, pipety, špičky, zkumavky, led, popisovač

### CO-IMUNOPRECIPITACE

- Pierce Co-Immunoprecipitation Kit (příloha)
- Protilátka proti RXR- $\alpha$
- 1M DTT
- Proteinové extrakty získané in vitro translací - RXR- $\alpha$ , hPXR
- pipety, špičky, ependorfky, parafilm, 15mL zkumavky
- centrifuga, rotační třepačka, termoblok,

### SDS-PAGE a WESTERN BLOT

- Vzorke proteinů izolované pomocí CO-IP
- Roztoky pro přípravu gelů (uchovávat při 4°C)
  - akrylamid-N,N'-metylenbisakrylamid: 40 % (w/v) akrylamidu, 0,8 % bisakrylamidu (w/v) ve vodě
  - pufr do zaostřovacího gelu (stacking gel buffer): 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
  - pufr do dělicího gelu (running gel buffer): 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
  - TEMED - N,N'-tetrametyléndiamin
  - 10 % (w/v) APS - persíran amonný
  - 10% (w/v) SDS
  - isopropanol
- Elektrodotový pufr: 0,025 M Tris, 0,192 M glycin, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,3
- Standardy molekulové hmotnosti (upřesní vedoucí cvičení)
- Barvicí roztok s Ponceau S: 0,2% (w/v) Ponceau S v 10% (v/v) kys. octové
- Blotovací pufr: 0,025 M Tris, 0,192 M glycin, 20% (v/v) methanol, pH 8,3
- Tris-pufr pro imunodetekci obsahující 0,05 % Tween 20 (TTBS): 20 mM Tris , 500 mM NaCl, 0,05% Tween, pH 7,5
- 0,5 % odtučněné mléko v TTBS
- 1 % BSA v TTBS



- Primární protilátka: monoklonální protilátka proti hPXR v 1 % BSA TTBS (ředění dle pokynů vyučujícího)
- Sekundární protilátka: myší polyklonální protilátka v 0,5 % mléku TTBS (ředění dle pokynů vyučujícího)
- vyvolávací filmy, chemiluminiscenční substrát
- kádinky, automatické pipety, ependorfky, mikrocentrifuga, vyhřívací box do 100°C, nalévací stojánek, elektroforetická komůrka, skla pro elektroforézu, mezerníky (spacers), hřebínek, stříčka s destilovanou vodou, stříčka s lihem, třepačka, zdroj pro elektroforézu, blotovací aparatura, misky na barvení, nůžky, misky pro imunodetekci

## DEN 1

## IN VITRO TRANSLACE

1. Reagencie uvedené v tabulce č. 2 vyjmeme z  $-80^{\circ}\text{C}$ . Master Mix rozmrazíme zahříváním v ruce a poté ihned umístíme na led. Ostatní komponenty mohou být rozmrazeny při pokojové teplotě a poté umístěny na led
2. Podle tabulky č. 2 namícháme reagencie do 0,5mL mikrozkušavek podle uvedeného pořadí. Množství DNA templátu přepočítáme podle dané koncentrace konkrétního plasmidu. Vždy použijeme novou špičku! Po přidání všech komponent opatrně propipetujeme, krátce centrifugujeme
3. Směs inkubujeme při  $30^{\circ}\text{C}$  60-90 minut
4. Po uplynutí inkubační doby umístíme vzorky na led

Tabulka č. 2: In vitro translační mix

<b>TNT Quick Master Mix</b>	<b>40uL</b>
<b>Methionin, 1mM</b>	<b>1uL</b>
<b>DNA templát (plasmid)</b>	<b>1ug</b>
<b>Dest. voda (RNAse free)</b>	<b>do 50uL</b>

## CO-IMUNOPRECIPITACE

## A. Imobilizace protilátky

## Centrifugujeme při laboratorní teplotě, 1000 x g!

1. Všechny reagencie potřebné pro imobilizaci vytemperujeme na laboratorní teplotu – tj. Coupling buffer, matrice (Resin), Quenching buffer, Sodium Cyanoborohydrate solution, Wash solution
2. Pro jednotlivé kolonky si připravíme 2mL 1x Coupling Buffer naředěním zásobního roztoku
3. Polyklonální protilátku anti-RXR naředíme podle tabulky č. 3

Tabulka č. 3: Příprava protilátky

<b>Ředění pro 1 ks kolonky v uL</b>	
<b>Destilovaná voda</b>	<b>182,5</b>
<b>20x Coupling Buffer</b>	<b>10</b>
<b>Anti-RXR (2ug/uL) – 15ug</b>	<b>7,5</b>
<b>TOTAL</b>	<b>200</b>

4. Důkladně promícháme matrici (AminoLink Coupling Resin) a ustříženou špičkou odebereme 50uL do kolonek. Kolonky umístíme do 2mL sběrných zkumavek a centrifugujeme 1000 x g 1 minutu
5. Promyjeme dvakrát 200uL 1x Coupling Buffer, centrifugujeme 1000 x g 1 minutu. Tekutinu ze sběrné zkumavky odebereme do odpadu

6. Opatrně osušíme dno kolonky a uzavřeme zátkou. Kolonku nenecháváme dlouho bez přítomnosti pufru a ihned aplikujeme 200 uL naředěné protilátky anti-RXR
7. V digestoři přidáme do jednotlivých kolonek 3uL Sodium Cyanoborohydrate Solution (vysoce toxický!)
8. Uzavřeme víčkem a inkubujeme na rotační třepačce při pokojové teplotě 90-120 minut
9. Odzátujeme, povolíme víčko a opět umístíme do 2mL sběrné zkumavky a centrifugujeme při obvyklých otáčkách
10. Přidáme 200uL 1x Coupling Buffer, centrifugujeme. Tento krok zopakujeme. Nezapomeneme vyprázdnit sběrné zkumavky!
11. Přidáme 200uL Quenching Buffer, centrifugujeme
12. Osušíme dno a uzavřeme zátkou. Přidáme 200uL Quenching Buffer na resin
13. V digestoři opět přidáme 3uL Sodium Cyanoborohydrate Solution, uzavřeme víčkem a inkubujeme 15 minut (mírné třepání nebo kývání)
14. Odzátujeme a povolíme víčko. Kolonku umístíme do sběrné zkumavky, centrifugujeme a tekutinu odebereme do odpadu.
15. Resin dvakrát promyjeme 200 uL 1x Coupling buffer, pokaždé centrifugujeme
16. 6x promyjeme 150uL Wash Solution, pokaždé centrifugujeme. Nezapomeneme vyprázdnit sběrné zkumavky!
17. Podle pokynů vyučujícího buď přejdeme ke Co-IP (bod B.) popř. resin uchováme podle níže uvedeného postupu
18. Dvakrát promyjeme 200uL 1x Coupling Buffer, pokaždé centrifugujeme
19. Osušíme dno, uzavřeme zátkou, přidáme 200uL 1x Coupling Buffer, zašroubujeme a umístíme do 4°C. Pro dlouhodobé skladování přidáváme azid sodný (final. konc. 0,02%)

## B. Co-imunoprecipitace:

- **Všechny IP kroky provádíme na ledu, centrifugujeme při 1000 x g a 4°C**

1. Podle tabulky č. 4 smícháme RXR- $\alpha$  (bait) a hPXR (prey) proteiny připravené *in vitro*. Směs inkubujeme 30 minut při 30°C a poté přidáme IP Lysis/Wash Buffer a dorovnáme tak na objem 200uL. Podle pokynů vyučujícího připravíme potřebné experimentální kontroly.

Tabulka č. 4: Příprava směsi proteinů pro jednotlivé kolonky

	1	2	3	4	5
	PXR-RXR (pozitivní kontrola)		MUT-RXR		Negativní kontrola (PXR)
<b>Koncentrace</b>	K1	K2	K1	K2	K1
<b>PXR nebo mutant</b>	8uL	4uL	8uL	4uL	8uL
<b>RXR</b>	8uL	4uL	8uL	4uL	-
<b>Inkubace 30 minut/30°C</b>					
<b>IP/Lysis pufr</b>	Doplnit do 200uL				

2. Resin obsahující navázanou protilátku promyjeme dvakrát přidavkem 200uL IP Lysis/Wash Buffer, zcentrifugujeme, osušíme dno a zazátkujeme
3. Připravenou směs proteinů přidáme do příslušné kolonky, kterou si popíšeme. Uzavřeme vrškem a zátkou. Inkubujeme pomalým mícháním nebo houpáním přes noc při 4°C

---

DEN 2

## CO-IMUNOPRECIPITACE

### Co-imunoprecipitace – pokračování:

4. Odzátujeme, povolíme šroubovací uzávěr a kolonku umístíme do sběrné zkumavky. Centrifugujeme, propuštěnou tekutinu uložíme pro následnou analýzu
5. Sejmeme šroubovací uzávěr, kolonku umístíme do nové zkumavky, přidáme 200 $\mu$ L IP Lysis/Wash Buffer a centrifugujeme
6. Vzorky promyjeme 4x 200uL IP Lysis/ Wash Buffer a pokaždé centrifugujeme. Špička kolonky nesmí být ponořena do tekutiny ve zkumavce!

### C. ELUCE:

1. Kolonku umístíme do nové sběrací zkumavky. Přidáme 10uL elučního pufru, centrifugujeme
2. Kolonku ponecháme ve zkumavce a přidáme 50uL elučního pufru, inkubujeme 5 minut při laboratorní teplotě (není potřeba zavírat nebo míchat)
3. Centrifugujeme, eluát ponecháme pro analýzu. Pokud je potřeba, je možné provést další eluce zopakováním kroků C1-C3

- Pro zachování aktivity protilátek vázaných na resin, okamžitě přejdeme k části D, regenerace a skladování

#### D. Regenerace a skladování

- Přidáme 100uL 1x Coupling Buffer, centrifugujeme, tento krok zopakujeme
- Zazátkujeme dno, přidáme 200μL 1X Coupling buffer. Uzavřeme a dno zkumavky izolujeme parafilmem, aby se zabránilo vysychání. Pro dlouhodobé skladování (tj.> 2 týdny) přidat azid sodný v konečné koncentraci 0,02%.

#### E. Příprava vzorku pro SDS-PAGE analýzu

- 5x Vzorkovací pufr (SB – Sample Buffer) vytemperujeme na laboratorní teplotu, 5-10 krát promícháme. Pro redukující gel (denat. podmínky) přidáme 1M DTT ve finální koncentraci 100mM
- K jednotlivým vzorkům přidáme připravený vzorkovací pufr tak, aby jeho finální koncentrace byla 1x (tj. 5uL SB do 20uL vzorku)
- Zahříváme na 98°C – 5 minut, ochladíme na laboratorní teplotu, krátce centrifugujeme

---

### SDS-PAGE

#### **UPOZORNĚNÍ!**

**Akrylamid a N,N'- methylenbisakrylamid jsou neurotoxické látky. S jejich roztokem vždy pracujeme s největší opatrností a v gumových rukavicích!**

- Skleněné desky očistíme ethanolem a připravíme k nalévání gelu (konkrétní postup vysvětlí vedoucí cvičení). Mezi skla vložíme hřebínek a na skleněnou desku popisovačem označíme vzdálenost jednoho cm od konce zubů hřebínku. Poté hřebínek odstraníme
- Přichystáme si dvě označené kádinky na přípravu zaostřovacího a dělicího gelu
- Podle tabulky č. 5 připravíme jednotlivé roztoky (složky gelu) do příslušných kádinek

Tabulka č. 5: Složení separačního a zaostřovacího gelu (objemy jsou uvedeny v mL)

Typ gelu	AA/BIS 40%/0,8%	Tris HCl 1,5 M, pH 8,8	Tris HCl 0,5 M, pH 6,8	10 % SDS	H <sub>2</sub> O	TEMED	START 10 % APS
<b>8% dělicí</b>	2	2,5	-	0,10	5,4	0,01	<b>0,10</b>
<b>4% zaostřovací</b>	0,4	-	1,0	0,04	2,56	0,004	<b>0,03</b>

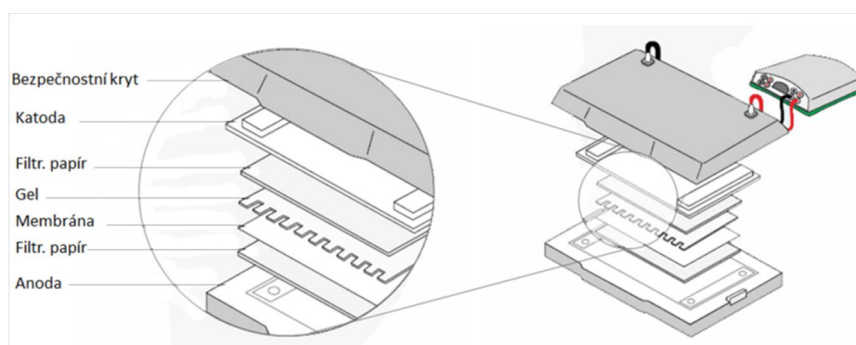
- Přídavkem persíranu amonného (APS) do kádinky, obsahující komponenty pro dělicí gel, je zahájena polymerace gelu. Připravenou směs po promíchání rychle přeneseme pomocí pipety do

prostoru mezi skla. V roztoku mezi skly se nesmí objevit vzduchové bubliny. Gel naléváme až po značku na skle (tj. 1 cm pod hřebínek)

5. Gel převrstvíme isopropanolem. Po 20 minutách polymerace se ujistíme, že je gel již tuhý
6. Odstraníme isopropanol, povrch gelu opláchneme destilovanou vodou a vysušíme pomocí filtračního papíru
7. Zaostřovací gel - po nastartování polymerizace přidavkem roztoku persíranu amonného do příslušné kádinky, přeneseme připravenou směs pomocí pipety do prostoru mezi skla na již zpolymerovaný dělicí gel
8. Do gelu vložíme opatrně hřebínek. Pod zuby hřebínku se nesmí dostat vzduchové bubliny. Stane-li se tak, hřebínek rychle vyjmeme a znovu vsuneme. Pozor, roztok se stává silně viskózní během několika minut. Po nalití necháme gel polymerovat 30 min
9. Skla s připraveným gelem vložíme do elektroforetické komůrky (konkrétní postup vysvětlí vedoucí cvičení). Popisovačem si můžeme vyznačit zuby hřebínku. Hřebínek opatrně vyjmeme.
10. Do komůrky nalijeme elektrodotový pufr (množství dle typu komůrky upřesní vedoucí cvičení)
11. Do jamek aplikujeme vzorky. Elektrodotovou nádobu uzavřeme víkem a připojíme ke zdroji. Pozor na možnou záměnu elektrod – orientace víka!!!). Dělení probíhá při konstantním proudu. Na zdroji nastavíme 15mA
12. Jakmile zóna doputuje na rozhraní zaostřovacího a dělicího gelu nastavíme zdroj na 25mA
13. Po doputování zóny téměř na úroveň dolního okraje skla vypneme zdroj. Odstraníme víko a vylijeme pufr. Pomocí plastové špachtle oddělíme od gelu skla a gel označíme odkrojením levého dolního rohu (nutné pro orientaci ve vzorcích při vyhodnocování gelu)

## WESTERN BLOT

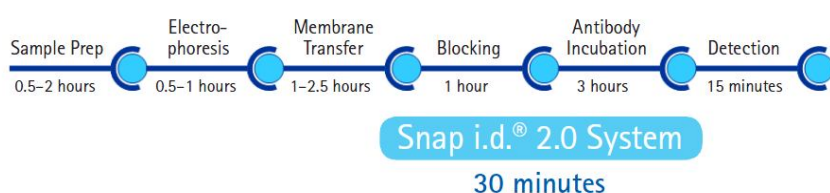
1. Připravíme si blotovací membránu (PVDF) a 4 ks filtračních papírů stejné velikosti, jako jsou rozměry gelu a ponoříme je do blotovacího pufru. Pozor – s membránou manipulujeme pouze pomocí pinzety a v rukavicích!
2. Membránu ponoříme do methanolu (snížení hydrofobicity membrány), propláchneme v dest. vodě a ponoříme do vychlazeného blotovacího pufru
3. Ve stejném roztoku inkubujeme 5 min připravený gel po SDS-PAGE
4. Do blotovací kazety skládáme jednotlivé vrstvy podle obrázku č. 9: filtrační papír 2 ks, membrána (spodní elektroda je kladná), gel po SDS-PAGE, filtrační papír 2 ks
5. Pomocí skleněné tyčinky odstraníme vzduchové bubliny mezi gelem a membránou. Nadbytečný vytlačený pufr odsajeme z elektrody filtračním papírem. Uzavřeme kazetu a zatížíme
6. Připojíme ke zdroji, nastavíme proud 400mA a blotujeme 75 minut
7. Pro ověření přenosu proteinů na membránu použijeme činidlo Ponceau S. Membránu opláchneme destilovanou vodou a poté obarvíme činidlem. Po 5 minutové inkubaci se na membráně vizualizují přenesené proteiny. Membránu poté opláchneme destilovanou vodou a necháme osušit



Obrázek č. 9: Skládání blotovací kazety

## RYCHLÁ IMUNODETEKCE NA PŘÍSTROJI SNAP I. D.

Přístroj SNAP i. d. umožňuje imunodetekci proteinů na membráně. Oproti standardnímu postupu, který trvá několik hodin, systém SNAP využívá podtlak vakua, čímž se výrazně sníží doba inkubace a proteiny je možné detekovat již po 30 minutách.



1. SNAP i. d. položíme na rovnou plochu pracovního stolu. Připojíme hadici přívodu vakua k zadní části přístroje. Druhý konec hadice připojíme ke zdroji vakua, použijeme odsávací láhev a filtr pro ochranu zdroje vakua před kapalinami a kontaminací.
2. Před zahájením práce ořízneme membránu (podle pokynů vyučujícího) a připravíme potřebné roztoky a protilátky podle tabulky č. 6:

Tabulka č. 6: Roztoky potřebné pro imunodetekci membrány

	Objem v mL
<b>Blokovací roztok - 0,5% Nízkoúčinné mléko v TTBS</b>	15
<b>Promývací roztok - TTBS</b>	15
<b>Primární protilátka proti hPXR v 1% BSA TTBS (1:250)</b>	1,5
<b>Sekundární protilátka v 0,5% Mléku TTBS (1:1500)</b>	1,5

3. Otevřeme víko komůrky blotu, nedotýkáme se bílého vnitřního povrchu. Navlhčíme bílý vnitřní povrch držáku deionizovanou vodou. Vložíme navlhčenou membránu na střed s proteiny směrem dolů
4. Pomocí válečku odstraníme veškeré vzduchové bubliny mezi blotovací membránou a povrchem komůrky držáku. Na membránu položíme podložku (není třeba vlhčit) tak, aby kompletně pokrýval celou blokovací membránu, a znovu jemným pohybem přejedeme válečkem
5. Uzavřeme víko (uslyšíme cvaknutí). Otevřeme víko přístroje a vložíme do něj držák komůrkou směrem vzhůru tak, aby držák zapadl v těle přístroje. Zavřeme víko přístroje
6. Do každé komůrky pro dvě membrány nalijeme vždy 15 ml 0,5% roztoku nízkoúčinného mléka v TTBS a ihned zapneme přívod vakua otočením přepínače vakua příslušného držáku. Po úplném vyprázdnění komůrky držáku (10-20 sekund) vypneme zdroj vakua otočením přepínače
7. Do každé komůrky aplikujeme 2 mL primární monoklonální myši anti-hPXR protilátky ředěné 1:500 v 1% BSA s TTBS. Roztok protilátky musí rovnoměrně pokrýt celý povrch komůrky!



8. Inkubujeme 10 minut při laboratorní teplotě (přívod vakua musí být vypnutý!)
9. Po uplynutí 10 min zapojíme zdroj vakua a vyčkáme 10-20 sekund pro dokonalé odstranění roztoku protilátky z komůrky držáku
10. Promyjeme každou komůrku 3x 15 ml promývacího roztoku Tween-20 v TBS. Po posledním promývání a úplném odsátí promývací roztoku odpojíme zdroj vakua
11. Aplikujeme 2 mL sekundární anti-myší protilátky v 0,5% mléku s TTBS ředěné 1:2500
12. Se zdrojem vakua stále odpojeným, inkubujeme 10 min při laboratorní teplotě. Po uplynutí 10 min zapojíme zdroj vakua a vyčkáme 10-20 sekund pro dokonalé odstranění roztoku protilátky z komůrky
13. Promyjeme každou komůrku 3x 15 ml promývacího roztoku Tween-20 v TBS. Po posledním promývání a úplném odsátí promývací roztoku odpojíme zdroj vakua
14. Vydáme držák blotu z přístroje, položíme na pracovní plochu komůrkou a otevřeme víko držáku. Pinzetou opatrně vyjmeme membránu a pokračujeme v postupu vizualizace proteinů zvolenou metodou. Držák blotu a přístroj opláchneme destilovanou vodou a necháme osušit
15. Sekundární protilátka je značená křenovou peroxidase, proto pro detekci použijeme chemiluminiscenční substrát
16. Přeneseme membránu na skleněnou desku a připravíme si roztok komerčního luminolu smícháním roztoku A a roztoku B (Množství sdělí vyučující). Pozor, pro každý roztok použijeme čistou špičku, aby nedošlo ke kontaminaci a možnému znehodnocení roztoku
17. Připraveným roztokem lehce převrstvíme membránu a inkubujeme 5 minut
18. Po ukončení inkubace odsajeme nadbytečný roztok luminolu a spustíme expozici na film (detaily vysvětlí vyučující)

## VYHODNOCENÍ

Pomocí markeru odhadneme velikost detekovaných proteinů. Porovnáním s kontrolou rozhodneme, zda místně specifická mutace způsobila změnu v interakci s RXR receptorem.

Ze získaných výsledků vypracujeme protokol obsahující princip použitých metod, pracovní postup, vyhodnocení výsledků a závěr.

## LITERATURA

Alberts B. a kol. Molecular Biology of the Cell, 4th ed.. Garland Science, New York, 2002. ISBN 0815340729

Wildová M., Rumlová V. (2008) Metody studia vzájemných interakcí proteinů. Chem. Listy 102, 28–34

Jansen J.C., Rydén L.(1998) Protein Purification, Wiley-VCH, Weinheim

Cooper G. M. The cell. A molecular approach. ASM Press, Washington DC, USA, 1997

Peč P. a kolektiv: Laboratorní cvičení z biochemie, vydavatelství UP, Olomouc 2000



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

### INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Návod ke cvičení byl zpracován v rámci projektu **OP VK CZ.1.07/2.2.00/28.0088 - Implementace laboratorní medicíny do systému vzdělávání na Univerzitě Palackého v Olomouci.**

**Vypracovala: Mgr. Aneta Vávrová, Ph.D.**