

# ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové  
Katedra biochemických věd

Kandidát: Tereza Lundová

Školitel: Prof. Ing. Vladimír Wsól, Ph.D.

Název diplomové práce: Klonování, exprese a purifikace lidské AKR1B1

Aldosareduktasa (EC 1.1.1.21) AKR1B1 je jedním ze 13 lidských enzymů z AKR nadrodiny. Všechny lidské AKR jsou cytosolické a NADP(H) dependentní. AKR1B1 hraje důležitou roli v metabolismu endogenních i exogenních látek. Hlavním endogenním substrátem je glukosa. Její redukce na sorbitol je důsledně spojena se sekundárními diabetickými komplikacemi. Z xenobiotik je metabolizován pomocí AKR1B1 daunorubicin, protinádorové léčivo ze skupiny antracyklinů, které je redukováno na daunorubicinol. Tento metabolit je méně aktivní než původní léčivo a je příčinou antracyklinem způsobené kardiotoxicity. V současnosti je mnoho projektů zaměřených na zkoumání AKR1B1 jako cílového enzymu a hledání specifických inhibitorů.

Rekombinantní protein byl připraven v *E. coli* společně s pET-28b(+) expresním vektorem. Nejprve byla izolována z *E. coli* cDNA pro AKR1B1 v pOTB7. Kódová sekvence AKR1B1 byla namnožena pomocí PCR. PCR byla provedena s Phusion Hot Start II polymerasou a párem forward a reverse primerů, které obsahují restrikční místa pro *NdeI* a *XhoI*. Jako vektor byl použit plasmid pET-28b(+). Purifikované PCR fragmenty i plasmid byly dvojitě štěpeny výše uvedenými restrikčními endonukleasami a purifikovány, následovala ligace do mnohočetného klonovacího místa. Po ligaci byla provedena transformace za použití metody tepelného šoku. K expresi proteinu byl využit kmen *E. coli* BL21 (DH3), indukce byla provedena přidáním 1 mM IPTG. Protein byl purifikován pomocí kitu Ni-NTA Fast Start, kde purifikace je založena na afinitě proteinu k nikelnatým iontům a koncentrace proteinu byla stanovena metodou dle Bradfordové.