

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Michaela Kohlová

Školitel: doc. PharmDr. Tomáš Šimůnek

Školitel-konzultant: Mgr. Monika Schmidt

Název diplomové práce: Konstrukce, exprese a purifikace disulfid oxidoreduktázy *Francisella tularensis*

Konzervovaný hypotetický lipoprotein s označením FTT1103 (pro *Francisella tularensis* subsp. *tularensis*) je jedním z faktorů virulence u gramnegativní intracelulární bakterie *Francisella tularensis*. Protein FTT1103 je homologem k periplazmatickému proteinu DsbA *E. coli*, patří do rodiny disulfid oxidoreduktáz a je zodpovědný za tvorbu disulfidických vazeb u nově vzniklých proteinů. Tyto vazby jsou v proteinech nezbytné pro udržení správné konformace a aktivity. Bioinformatická analýza proteinu FTT1103 ukázala, že tento protein obsahuje N-koncovou FKBP doménu, u které se předpokládá dimerizační funkce a/nebo funkce chaperonová. Tyto funkce domény však nebyly dosud zcela potvrzeny.

Cílem této diplomové práce bylo ověření, zda je N-koncová FKBP doména skutečně zodpovědná za správnou funkci a aktivitu proteinu DsbA. Pomocí molekulárně biologických metod jsme připravili mutantní gen *dsbA* s deletovanou FKBP_N doménou (*dsbAΔFKBP_N*). Tento gen jsme pomocí klonování vložili do plazmidu pET28b a tento rekombinantní plazmid jsme poté transformovali do buněk *E. coli* XL-1. Z narostlých kolonií jsme plazmid s vloženým rekombinantním genem vyizolovali a transformovali metodou teplotního šoku do chemokompetentních buněk *E. coli* BL-21. U vzniklého rekombinantního proteinu rDsbAΔFKBP_N jsme testovali přítomnost oxidoreduktázové aktivity. Oxidoreduktázová aktivita DsbA proteinu s deletovanou FKBP_N doménou byla měřena jako schopnost redukovat disulfidické vazby lidského inzulínu v přítomnosti DTT.