

# Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Petra Kořínková

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

Název diplomové práce: Klonování a exprese lidské AKR1A1

Aldo–ketoreduktasa 1A1 (AKR1A1) je monomerní cytosolický enzym patřící do skupiny karbonyl redukujících enzymů, nadrodiny aldo–ketoreduktas. Rodina aldo–ketoreduktas se významně podílí na redukčních reakcích endogenních substrátů i první fáze biotransformace xenobiotik. V lidském organismu se nachází 15 zástupců této velké rodiny, které lze nalézt v různých tkáních. Největší zastoupení mají v hepatocytech a renálních buňkách.

AKR1A1 katalyzuje reakce aromatických i alifatických aldehydů na jejich odpovídající alkoholy. Z endogenních látek je jeho substrátem mevalonát. Jeho významnými substráty jsou i některá léčiva ze skupiny antracyklinových antibiotik – doxorubicin a daunorubicin. Dále se podílí na biotransformaci sorbitolu a rozvoji diabetických komplikací.

Příprava rekombinantního enzymu byla provedena v *E. coli* za pomoci expresního vektoru pET28b(+). Izolovaná cDNA byla namnožena polymerasovou řetězovou reakcí, katalyzována Phusion Hot Start II polymerasou za přítomnosti specifických primerů, obsahujících restrikční místa pro endonukleasy *NdeI* a *XhoI*, kterými byly naštěpeny purifikované produkty PCR i plasmid. Takto naštěpené produkty byly pomocí DNA-ligasy zaligovány a transformovány do kompetentních buněk *E. coli* kmen HB101 metodou tepelného šoku. K expresi proteinu byly využity buňky *E. coli* kmen BL21. Indukce byla provedena pomocí isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranosidu. Koncentrace enzymu byla stanovena metodou dle Bradforda a enzym byl purifikován na purifikátoru Äcta. Ověření aktivity proběhlo inkubací s *p*-nitrobenzaldehydem.

klíčová slova: AKR1A1, karbonyl redukující enzymy, rekombinantní enzym