

# ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

**Řešitel:** Kateřina Šedivá

**Školitel:** Mgr. Eva Novotná, Ph.D.

**Název diplomové práce:** Klonování, exprese a purifikace mykobakteriální dihydrofolátreduktasy

Dihydrofolátreduktasa je enzym nezbytný pro metabolismus kyseliny listové – katalyzuje redukci dihydrofolátu na tetrahydrofolát. Tetrahydrofolát je důležitým kofaktorem při reakcích přenášejících jednouhlíkaté zbytky. Hraje klíčovou roli v syntéze DNA, RNA a proteinů.

Dihydrofolátreduktasa se nachází také u *M. tuberculosis*. Tato bakterie je nejčastějším původcem tuberkulózy u lidí. Právě dihydrofolátreduktasa by mohla být potenciálním cílem pro vývoj nových antituberkulotik.

Rekombinantní protein dihydrofolátreduktasa byl připraven v několika krocích. Sekvence kódující protein byla nejprve amplifikována polymerázovou řetězovou reakcí. Ligací namnoženého úseku DNA a plazmidu pET-28b(+) vznikl rekombinantní plazmid, který byl metodou tepelného šoku transformován do kompetentních buněk *E. coli* kmen HB101. K expresi proteinu byly použity buňky *E. coli* kmen BL21(DE3). Samotná exprese byla indukována přidáním isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosidu (IPTG). Získaný rekombinantní protein byl izolován a purifikován metodou afinitní chromatografie. Metodou dle Bradfordové byla určena koncentrace enzymu. Aktivita enzymu byla ověřena reakcí enzymu s dihydrofolátem za přítomnosti NADPH. Tento enzym může být použit k dalšímu výzkumu, zejména k hledání látek inhibujících jeho aktivitu.

**Klíčová slova:**

mykobakterium, dihydrofolátreduktasa, klonování, exprese, purifikace, aktivita