

## Abstrakt

Proteinfosfatasa PPM1D je negativním regulátorem odpovědi buněk na poškození DNA. V procesech opravy poškozené DNA má nezastupitelnou funkci tumor supresorový protein p53. Jedním z jeho hlavních negativních regulátorů je právě fosfatasa PPM1D, jejíž exprese je proteinem p53 zároveň řízena. Fyziologicky se PPM1D inaktivací p53 podílí na obnově homeostázy v buňkách. Nadměrná exprese PPM1D je však spojena se vznikem a rozvojem několika typu nádorů. Porozumění mechanismům, jakými dochází k regulaci PPM1D, proto může být důležitým krokem v boji proti nádorovým onemocněním.

Struktura PPM1D se kromě kompaktní fosfatasové domény vyznačuje i přítomností několika flexibilních a nestrukturovaných částí. Obtížným úkolem je proto i příprava tohoto proteinu, což výrazně sťažuje možnosti jeho charakterizace *in vitro*. Proto byl v této práci použit zkrácený protein PPM1D<sub>1-397</sub> (PPM1D NTD). S cílem získat stabilní protein o vysoké čistotě byla exprese a purifikace PPM1D NTD extenzivně optimalizována. Získané SAXS data naznačují, že smyčka bohatá na prolin (30–99), která je specifická pro PPM1D, zaujímá v roztoku rozvinutou a pravděpodobně flexibilní konformaci. Dlouhodobým cílem projektu je studium protein-proteinových interakcí fosfatasy PPM1D. Jedním z interakčních partnerů PPM1D je i protein LZAP. Měření fosfatasové aktivity v přítomnosti LZAP prokazují negativní vliv LZAP na aktivitu PPM1D. Tato zjištění jsou v rozporu s předcházejícími studiemi vlivu LZAP na aktivitu PPM1D. V rámci této diplomové práce je diskutována také možná interakce PPM1D s proteiny 14-3-3. Tyto proteiny vazbou na fosforylované motivy modulují aktivitu a strukturu svých vazných partnerů. PPM1D obsahuje několik sekvenčních motivů, které jsou rozeznávány proteiny 14-3-3. Dvě z těchto míst (Ser46, Ser97) jsou zároveň fyziologicky fosforylována a nacházejí se v nestrukturované smyčce bohaté na prolin. Pro účely studia této interakce byl optimalizován protokol, jímž byla PPM1D NTD *in vitro* fosforylována využitím proteinkinasy A.

**Klíčová slova:** rekombinantní proteiny, fosfatasa, signalizace, inhibice, regulace, p53