

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Eliška Armerová**

Deregulace E3 ubiquitin ligáz v zánětlivých onemocněních střev  
Dysregulation of E3 ubiquitin ligases in inflammatory bowel diseases

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Silvia Petrezsélyová, Ph.D.

Ústav molekulární genetiky AV ČR, v. v. i.  
Laboratoř transgenních modelů nemocí

2020

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 13.08.2020

Podpis.....

Eliška Armerová

## **Poděkování**

Tímto bych chtěla velmi poděkovat své školitelce Mgr. Silvii Petrezsélyové, Ph.D., vedoucí mé práce, za odborné vedení, trpělivost, cenné rady, připomínky a čas, který mi věnovala po celou dobu psaní mé závěrečné práce.

## Seznam zkratek

AMPK	AMP-aktivovaná protein kinasa
AMPs	antimikrobiální peptidy
APC/C	anafázi podporující komplex
ATG16L1	esenciální gen autofágie
ATM	serin/threoninová kináza
ATP	adenosintrifosfát
Bcl-2	<i>z angl. B-cell lymphoma</i>
BRCA1	<i>z angl. BReast CAncer</i>
CD	Crohnova choroba
CRH	hormon uvolňující kortikotropiny
DSS	<i>z angl. Dextran Sodium Sulfate</i>
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DUB	deubikvitinační enzym
E1	ubikvitin aktivující enzym
E2	ubikvitin konjugující enzym
E3	enzym - ubikvitin ligáza
ENS	enterální nervový systém
EOS	eosinofil
ER	endoplasmatické retikulum
ERAD	<i>z angl. Endoplasmatic Reticulum-Associated Degradation</i>
FcR $\gamma$	Fc-receptor gama
GC	pohárková buňka ( <i>z angl. goblet cell</i> )
GIT	gastrointestinální trakt
GWAS	<i>z angl. Genome Wide Association Studies</i>

HECT	homologní s E6-asociovaným proteinovým C-koncem doména
IKK $\beta$ , I $\kappa$ B	kinázy - inhibitory podjednotky NF- $\kappa$ B
ISZ	idiopatické střevní záněty
ITAM	z angl. <i>Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif</i>
JAK	Janusovy kinázy
KRK	kolorektální karcinom
M	makrofág
MC	žírná buňka
MHCII	MHC glykoproteiny II třídy
Nedd4	E3 ubivitin-protein ligáza
NEUT	neutrofil
NF- $\kappa$ B	jaderný faktor kappa B
NLR	z angl. NOD-like receptor
NOD2	z angl. <i>Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2</i>
P53	tumor supresorový gen
PC	Panethova buňka
RING	z angl. <i>really interesting new gene</i>
RNA	ribonukleová kyselina
SP	látka P
SUMO	z angl. <i>small ubiquitin-like modifier</i>
TJs	těsné spoje
TLR	z angl. tool-like receptor
TNBS	kyselina trinitrobenzensulfonová
Treg	regulační T-lymfocyt
UPS	ubikvitin-proteazový systém
Ub	ubikvitin

Ube1/Uba1 z angl. *ubiquitin activating enzyme E1*

UC ulcerózní kolitida

VIP vazoaktivní střevní polypeptid

## Abstrakt

E3 ubikvitin ligázy jsou početnou rodinou enzymů, které se účastní mnoha buněčných dějů jako je oprava poškozené DNA, transport membránových proteinů, modifikace chromatinu, buněčný cyklus a apoptóza. Bylo dokázáno, že E3 ubikvitin ligázy se významně podílejí na udržování střevní homeostázy a jejich abnormální funkce spojená s jejich deregulací přispívají k zánětlivým onemocněním střev jako je ulcerózní kolitida a Crohnova choroba. V posledních letech bylo identifikováno přibližně 200 rizikových lokusů, které jsou náchylné k těmto onemocněním, včetně těch kódujících E3 ubikvitin ligázy. Těch bylo aktuálně identifikováno 10. Cílem této práce je porovnat již identifikované E3 ubikvitin ligázy spojené s těmito onemocněními a podat jejich přehled se zaměřením na regulaci střevní homeostázy.

Klíčová slova: E3, ubikvitinace, idiopatické střevní záněty, střevní homeostáza, CD, UC

## Abstract

E3 ubiquitin ligases are a large family of enzymes involved in many cellular processes such as repair of damaged DNA, transport of membrane proteins, chromatin modification, cell cycle and apoptosis. E3 ubiquitin ligase has been shown to play a significant role in the maintenance of intestinal homeostasis, and their abnormal function associated with their deregulation contributes to inflammatory bowel diseases such as ulcerative colitis and Crohn's disease. In recent years, approximately 200 risk loci have been identified that are susceptible to these diseases, including those encoding E3 ubiquitin ligase. 10 of them have been identified. The aim of this work is to compare the already identified E3 ubiquitin ligases associated with these diseases and to give an overview of them with a focus on the regulation of intestinal homeostasis.

Key words: E3, ubiquitination, inflammatory bowel diseases, intestinal homeostasis, CD, UC

# Obsah

SEZNAM ZKRATEK.....	3
ABSTRAKT .....	6
ABSTRACT .....	6
SEZNAM OBRÁZKŮ .....	3
SEZNAM TABULEK .....	3
ÚVOD .....	- 9 -
<b>1 ZÁNĚTLIVÁ ONEMOCNĚNÍ STŘEV.....</b>	<b>- 10 -</b>
1.1 UL CERÓZNÍ KOLITIDA .....	- 10 -
1.2 CROHNOVA CHOROBA .....	- 10 -
1.3 REGULACE STŘEVNÍ HOMEOSTÁZY .....	- 11 -
<b>2 UBIKVITINACE .....</b>	<b>- 15 -</b>
2.1 ZPŮSOBY VAZEB UB ŘETĚZCŮ .....	- 17 -
2.2 E3 UBIKVITIN LIGÁZY .....	- 18 -
2.2.1 RING E3 ligázy .....	- 19 -
2.2.2 HECT E3 ligázy .....	- 20 -
2.2.3 RBR E3 ligázy .....	- 20 -
2.2.4 U-box E3 ligázy .....	- 21 -
<b>3 E3 LIGÁZY ASOCIOVANÉ S ISZ.....</b>	<b>- 21 -</b>
<b>4 ZÁVĚR .....</b>	<b>- 27 -</b>
<b>5 SEZNAM LITERATURY .....</b>	<b>- 28 -</b>

## Seznam obrázků

Obr. 1 – Schéma hlavních typů střevních buněk a molekulárních funkcí jako cílů, souvisejících s funkcí střevní bariéry pro terapeutické strategie v ISZ (upraveno z [8])....	- 12 -
Obr. 2 Autofágie v patologii ISZ (upraveno [21]). .....	- 14 -
Obr. 3 - Ubikvitinační systém (upraveno z [26]). .....	- 16 -
Obr. 4 - Trojrozměrná krystalová struktura RING domény [26]. .....	- 19 -

## Seznam tabulek

Tabulka 1 - E3 ligázy asociované s ISZ. ....	- 22 -
--	--------



## Úvod

E3 ubikvitin ligázy (E3) jsou velmi početnou rodinou proteinů, které se podílí na řadě buněčných procesů. Ubikvitinace je jednou z nejčastějších posttranslačních modifikací v eukaryotických buňkách, při které dochází k napojení malého polypeptidu ubikvitinu (Ub) kovaletní vazbou skrze ubikvitinační kaskádu na cílový protein. Takto označený protein může být rozpoznán proteazomem 26S a následně degradován, avšak ubikvitinace může také vést k změně buněčné lokalizace proteinu, jeho funkce a nebo k jeho interakci s jiným proteinem [1] [2].

Díky tomuto mechanismu, který je schopný zajistit neustálé proteinové změny v buňce je udržena homeostáza. Jakákoli změna v ubikvitin-proteazovém systému (UPS) dokáže vyvolat nevratné změny a způsobit zánětlivá, onkologická a jiná závažná onemocnění [3]. Je známo, že právě E3 přispívají k regulaci zánětlivých onemocnění střev (ISZ) jako je ulcerózní kolitida (UC) a Crohnova choroba (CD) [4].

Epiteliální bariéra je semipermeabilní a hraje zásadní roli v regulaci imunitního systému. Umožňuje absorpci živin a omezuje transport mikroorganismů a škodlivých antigenů. Tato bariéra je regulovaná tím, že musí docházet k vzájemné souhře mezi molekulárními interakcemi a strukturálními složkami na střevní sliznici jako je buněčná proliferace, diferenciací a apoptóza. Pokud nastane nerovnováha v tomto procesu, tak může docházet k narušení sliznice a následným onemocněním [5].

Autofágie je jedním z klíčových mechanismů pro udržení střevní homeostázy, při kterém dochází k lyzomálnímu rozkladu proteinů. Dalšími mohou být změny v mucinové vrstvě a buněčných spojích, kde díky zvýšené expresi daných proteinů naruší rovnováhu střevního epitelu [5].

Cílem této práce je popsat konkrétní E3, které jsou spojeny s ISZ, kde regulují homeostázu střev. Existuje hned několik prací, které poukazují, že právě E3 ligázy jsou velmi důležité při těchto zánětlivých onemocněních.

# **1 Zánětlivá onemocnění střev**

Idiopatická střevní onemocnění, jako je Crohnova choroba (CD) a ulcerózní kolitida (UC) patří do skupiny autoimunitních zánětlivých poruch, které ovlivňují gastrointestinální trakt (GIT). Tyto dvě nemoci mají mnoho společného, ale liší se částí střeva, kterou postihují a také do jaké hloubky postihují střevní sliznici. Zatímco u UC je postihnuto jen tlusté střevo s konečníkem, kde je zánět kontinuálně omezen na střevní sliznici, tak u CD může být napadena jakákoli část z GIT a zánět bývá submukózní [4]. Nejběžnější obecné příznaky ISZ jsou bolesti břicha, krvácení z konečníku, průjem a ztráta hmotnosti. Etiologie těchto chorob je komplexní. Genetika spolu s vnějšími vlivy hraje významnou roli v patogenezi těchto zánětů [4].

## **1.1 Ulcerózní kolitida**

UC je nespecifický hemoragicko-katarální kontinuální zánět sliznice tlustého střeva postihující především konečník a přilehlou část - tračník. UC může být diagnostikována v jakémkoli věku a vyskytuje se u obou pohlaví téměř stejně. Nedávné studie však prokázali, že se vyskytuje častěji u mužské populace. Výskyt bývá vyšší v USA (postiženo 800 000 obyvatel) a v Evropě (postiženo 1 400 000 obyvatel), než to bývá v rozvojových zemích, např. v Asii a Oceánii [6].

U UC jsou nejčastějšími projevy průjemy, které mohou být doprovázeny hustým hlenem a krví a bolestmi břicha s nutkáním na stolici. Nejzávažnější komplikace při UC je kolorektální karcinom (KRK). Celosvětově je toto civilizační onemocnění velmi vážný problém i z hlediska ekonomiky. V ČR je diagnostikováno 7 800-8 100 obyvatel ročně a přibližně polovina pacientů na KRK zemře. Tím se bohužel naše země řadí mezi přední světové příčky v incidenci tohoto závažného onemocnění [6].

## **1.2 Crohnova choroba**

Toto onemocnění je diagnostikováno převážně v mládí ve věku kolem 15-30 let a u žen je výskyt častější než u mužů. Nejvíce rozšířeno je v USA a v Evropě, kde prevalence onemocnění ve Spojených státech je 201/100 000 obyvatel (dospělých) a v Evropě to je 12,7/100 000 obyvatel/rok [6]. Je charakterizováno tím, že je postižen vždy pouze určitý úsek tenkého nebo tlustého střeva, případně obě dvě části. Úseky mezi jednotlivými

nemocnými oblastmi mohou být zcela zdravé. Zánětlivý proces postihuje nejen sliznici, ale může proniknout i do střevní stěny a vést ke vzniku píštělí nebo až k perforaci střeva. Klasické příznaky bývají bolesti břicha, dlouhodobý průjem a tím pádem i úbytek na váze. Také dle toho, kde je nemoc lokalizovaná, tak se pojí s mnoha zdravotními komplikacemi jako je např. anémie, horečka, krvácení, obstrukce, striktury a perianální postižení jako jsou píštěle a abscesy [6].

Právě píštěle jsou velmi nepříjemnou komplikací. Jsou to spoje mezi kličkami střeva nebo mezi již zmiňovanými kličkami a jinými tělními orgány. Perianální píštěle se vyskytují u 15-35 % pacientů CD a jsou způsobené převážně bakteriemi *Escherichia coli* [6].

### 1.3 Regulace střevní homeostázy

Střevní epitel, který je tvořen z jednoduchého cylindrického epitelu, je velmi dynamická tkáň, která se kompletně obnoví každých 3-5 dní skrz buněčné dělení. Aby tento systém mohl správně fungovat, musí být udržována rovnováha mezi proliferací epiteliálních buněk, jejich diferenciací a apoptózou [7].

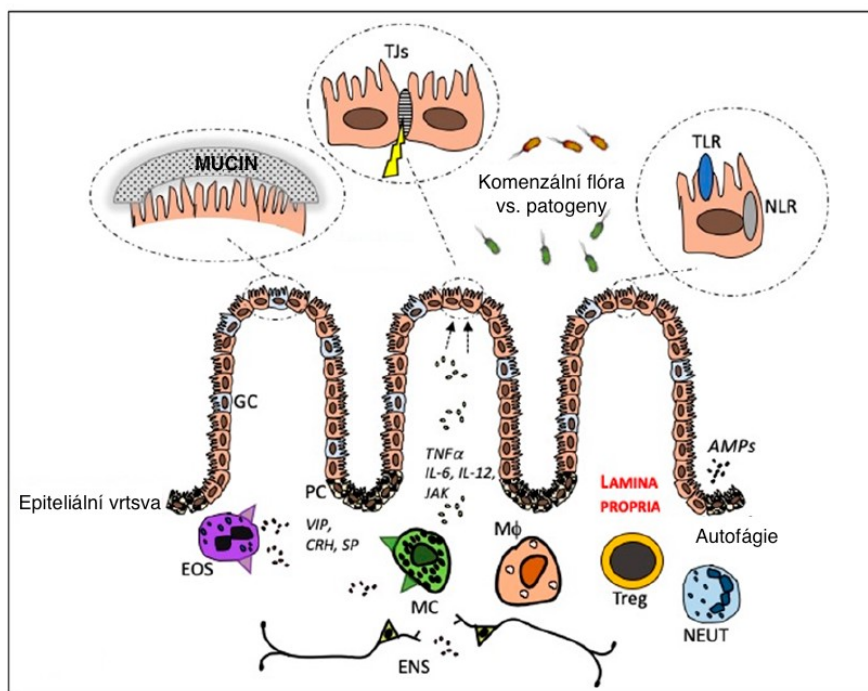
Epiteliální vrstva buněk obsahuje enterocyty (resorpční buňky), pohárkové buňky, které produkují hlen - mucin a Panethovy buňky, které vylučují peptidy antimikrobiálního původu. Ty podporují transport velkých apikálních antigenů a bakterií do imunitních buněk ve sliznici tvořenou vazivem tzv. *lamina propria*. Lamina propria je nejsilnější polarizovaná monovrstva, která se nachází na nejspodnější části střevní bariéry a je téměř nepropustná [8].

Mucinová vrstva je první vrstva epiteliální bariéry a funguje jako lubrikační a fyzická bariéra mezi povrchem sliznice a apikálním obsahem. Je složena z velkých molekul oligosacharidů o přibližné molekulové hmotnosti 1 - 20x10<sup>6</sup> Daltonů [9]. Hlen - mucin se skládá ze dvou vrstev [10] s tím, že vnitřní vrstva je bez bakterií. U myši bylo zjištěno, že absence Mucinu 2 vede k redukci vnitřní vrstvy hlenu a tím pádem ke kontaktu s bakteriemi a to k rozvinutí spontánní kolitidy [11][12].

Druhá bariéra je fyzická a tvoří ji buněčné spoje: těsné spoje tzv. tight junctions, adhezní spoje a desmozomy. Těsné spoje mohou umožnit propustnost malých molekul a iontů do velikosti 20 kDa. Naopak desmozomy a adhezní spoje vytvářejí mezi sebou silné

vazby, které jsou zodpovědné za integritu a kohezi tkáně [8][7][13]. Jakékoli strukturální změny a změny exprese v těchto spojích vedou k rozvoji zánětlivých onemocnění [14].

Nejspodnější vrstva, která byla zmíněna již výše je tzv. lamina propria, která hraje úlohu ve vrozené imunitě. Imunitní systém je závislý na rovnováze mezi střevní a hostitelskou mikroflórou, kde jakékoli patogenní změny mohou vyvolat zánětlivé onemocnění. Tyto změny jsou rozpoznány signálními receptory TLR (z angl. *tool-like receptor*), NLR (z angl. *nucleotide oligomerization domain like receptors*) [8].



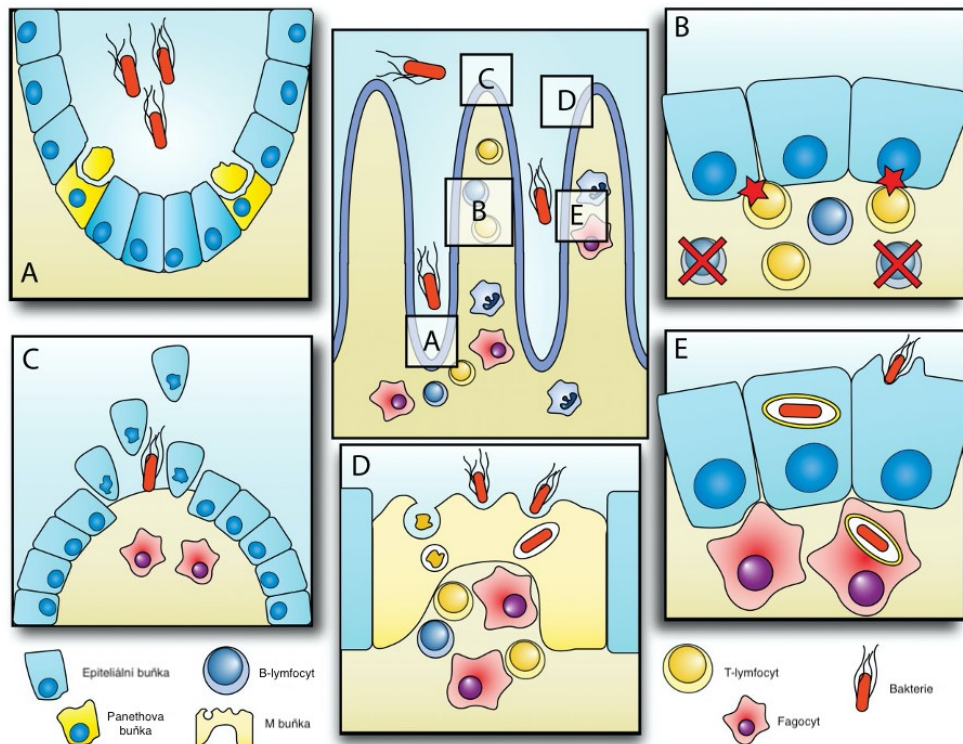
Obr. 1 – Schéma hlavních typů střevních buněk a molekulárních funkcí jako cílů, souvisejících s funkcí střevní bariéry pro terapeutické strategie v ISZ (upraveno z [8]).

*AMPs = antimikrobiální peptidy, CRH = hormon uvolňující kortikotropiny, ENS = enterální nervový systém, EOS = eosinofil, GC = pohárková buňka, JAK = Janusovy kinázy, M = makrofág, MC = žírná buňka, NEUT = neutrofil, NLR = z angl. NOD-like receptor, PC = Panethova buňka, SP = látka P, TJs = těsné spoje, TLR = z angl. toll-like receptor, Treg = regulační T-lymfocyt, VIP = vazoaktivní střevní polypeptid.*

Pro udržení epiteliální homeostázy, která je úzce spjata s efektivní střevní bariérou, je důležité zachování rovnováhy mezi buněčnou proliferací a apoptózou [7].

Signální dráha NF- $\kappa$ B je zásadní pro regulaci apoptózy a proliferaci. Její aktivace je do určité míry závislá na typu buněk. V buňkách střevního epitelu zpomaluje apoptózu a silně vyvolává zánětlivé reakce. Zvýšená aktivace NF- $\kappa$ B je často pozorována v tlustém střevě u pacientů, kteří trpí idiopatickými střevními záněty. U myši, s delecí IKK $\beta$ , byla také vypořádována zvýšená aktivace NF- $\kappa$ B. Tyto myši vykazují zvýšenou expresi a aktivaci proteinu p53, což je tumor supresorový protein, a naopak dochází ke snížení exprese Bcl-2 [15]. IKK $\beta$  je kináza, která spolu s I $\kappa$ B kinázou dokáže fosforylovat proteiny I $\kappa$ B. Tato fosforylace vede k následné degradaci daných proteinů a aktivaci genové exprese NF- $\kappa$ B [84]. Mimo to se NF- $\kappa$ B se také podílí na signalizační kaskádě, která je aktivována pomocí NOD2, který vykazuje vysokou expresi v Panethových buňkách, dendritických buňkách, granulocytech a makrofázích. NOD2 dokáže identifikovat MDP (muramyl dipeptid) skrze rozpoznávající leucinové receptory a následně vyvolat protizánětlivou imunitní odpověď [16].

U pacientů s CD byly zjištěny abnormality i v Panethových buňkách. Ale pouze u těch, kteří vykazovali homozygotní alelu T300A genu *ATG16L1* – esenciální gen autofágie. Autofágie je velmi konzervovaná stresová reakce, která je klíčová pro udržení střevní homeostázy, antimikrobiální ochrany, vrozené adaptivní imunity a dalších fyziologických procesů. V konečné fázi dochází k lysozomálnímu rozkladu proteinů. Tato stresová reakce se vyvinula, aby odstraňovala poškozené orgány, intracelulární mikroorganismy a poskytovala živiny buňkám [17][18][19, 20]. Právě zvýšený buněčný stres vede ke ztrátě mucinu a antimikrobiálních peptidů [21].



Obr. 2 Autofágie v patologii ISZ (upraveno [21]).

(A) – Krypty jsou za normálních podmínek sekretoricky udržovány pomocí Panethových buněk, kde tyto buňky vylučují antimikrobiální peptidy. Snížení nebo ztráta této sekretorické funkce má za následek zvýšení mikrobů v kryptách a dochází k celkové změně mikrobiální flóry. (B) – Autofágie je důležitá pro vývoj T-lymfocytů. Defekty v tomto procesu mohou způsobit zvýšení autoreaktivních T-lymfocytů ve střevě a snížení B-lymfocytů. Díky tomu mohou být T-lymfocyty spouštěčem zánětu vlastním antigenem. Ke snížení odolnosti vůči bakteriím povede také ztráta vrozených protilátek B-lymfocytů. (C) – Udržení těsných spojů mezi epiteliálními buňkami je důležité, aby nedošlo k úniku střevního obsahu ven. Poruchy tohoto spojení mohou vést ke ztrátě integrity při nahrazování buněk. (D) – M buňky mají při autofágii do určité míry nejasnou roli, avšak tyto buňky jsou výhodnými portály pro řadu infekčních agens. Pravděpodobně jsou tedy M buňky náchylnější k infekcím při neplnohodnotné autofágii. V konečné fázi bude zvýšený zánět, více infekcí a také změna imunitní odpovědi na střevní flóru. (E) – Fagocyty a epiteliální buňky spoléhají při kontrole napadajících bakterií a přítomnosti cytosolických antigenů na MHCII na autofágii. Následné autofagické defekty díky tomu povedou ke zvýšenému riziku infekce, zpomalení iniciace imunitních odpovědí a k méně schopné bakteriální manipulaci a dodávce antigenu.

Podobně byla identifikovaná souvislost mezi stresem endoplasmatického retikula (ER) a UPR (z angl. *unfolded protein response*). Aby sekretorické buňky udržovaly stále svoji funkci, musí být koordinován transport sekrečních proteinů a skládání proteinů pomocí sítí ER a Golgi. UPR je vyvoláno nahromaděním špatně složených proteinů nebo jejich rozložením v ER. To znamená, že Panethovy a pohárkové buňky, které jsou vysoce citlivé na stres ER musejí být udržovány funkčním UPR, aby byla zachována homeostáza ve střevním epitelu [22].

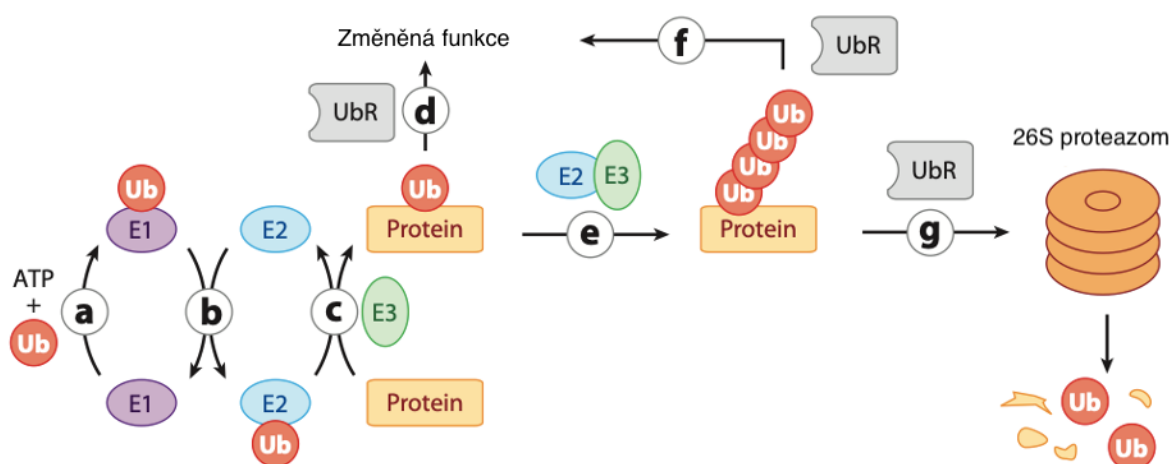
## 2 Ubikvitinace

Ubikvitinace je reverzibilní proces připojení ubikvitinu k cílovému proteinu. Ub je malý protein s globulární strukturou, který se skládá ze 76 aminokyselin a je přítomen ve všech eukaryotických buňkách (z lat. *ubique*, všude). Proces ubikvitinace byl prvně popsán v roce 1980 a za tenhle objev byla Avramovi Hershkovi, Aaronovi Ciechanoverovi a Irwinovi Roseovi v roce 2004 udělena Nobelova cena za chemii [23, 24]. Tento proces se svou regulační schopností účastní prakticky většiny buněčných dějů, např. při opravách DNA, při regulaci buněčného cyklu, signální transdukci, apoptóze, hraje také roli v imunitní odpovědi a zánětu [25].

Označení cílových proteinů ubikvitinem je nejvíce známo jako signál pro jejich degradaci prostřednictvím 26S proteazomu, ale taky může vést k změně jejich buněčné lokalizace, ovlivnit jejich funkci nebo interakci s jiným proteinem. Tato post-translační modifikace proteinů je mnohostupňový a ATP-závislý proces, zprostředkován sérií enzymů: ubikvitin-aktivačního E1, ubikvitin-konjugačního E2 a ubikvitin-ligázou E3 (*Obr.1*). Výsledkem enzymatické kaskády je formování izopeptidové vazby mezi C-terminálním koncem Ub a obvykle lyzinem cílového proteinu [26].

Aktivaci E1 umožňuje pouze jeden enzym - Uba1 (z angl. *ubiquitin activating enzyme E1*) [27, 28]. Díky velkému počtu E2 jsme schopni rozeznat u člověka přibližně 40 podtypů, které se podílejí na přenosu Ub nebo Ubl (z angl. *Ubiquitin-like proteins*) proteinů jako jsou například SUMO a NEDD8 [29]. Významným a posledním krokem v této enzymatické kaskádě je ligace, tj. vytvoření finální izopeptidové vazby mezi Ub a substrátem pomocí E3 ligáz. V lidském genomu existuje více než 600 genů kódujících tyto enzymy, které celému procesu udávají specifitu [30].

Ubikvitinace je ovšem vratný děj, neboť Ub může být z proteinu odstraněn činností deubikvitináz (DUBs), kterých je v lidském genomu přibližně sto. DUB umějí odštěpit Ub z proteinu a také dokáží udržet v buňce konstantní množství volného Ub. Mají katalytickou aktivitu, která se zakládá na štěpení izopeptidové vazby mezi C-koncem Ub a N-koncem lyzinu [31]. DUBs si můžeme spojit s mnoha buněčnými procesy jako je zpracování RNA, transkripce, přeměnu proteinů a v systému ERAD [32]. Tyto enzymy byly identifikovány i jako onkongeny a nádorové supresory [33].



Obr. 3 - Ubikvitinační systém (upraveno z [26]).

(a) Ub jsou aktivovány pomocí E1. (b) Aktivovaný Ub je přes thioesterovou vazbu přenesen z aktivního místa cysteinu E1 na cystein v aktivním místě E2. (c) E2~Ub interaguje s E3 ligázou, která pak realizuje přenos Ub z E2~Ub na lyzinový zbytek cílového proteinu. Monoubikvitinovaný substrát může disociovat z E3 (d) nebo v dalším kroku získat další Ub modifikace ve formě vícenásobných jednoduchých vazeb ubikvitinu (není v obrázku) (e) nebo ve formě Ub řetězce, který může být lineární nebo rozvětvený pozůstávající z různých lyzinových zbytků Ub. Zatímco monoubikvitinace a některé typy Ub řetězců (např. přes K63) vedou nejčastěji ke změně funkce modifikovaného proteinu (f), polyubikvitinové řetězce přes zbytek K48 navádí připojený substrát k proteazomu, který ho následně degraduje (g). ATP – adenosintrifosfát, Ub – ubikvitin, E1 – ubikvitin aktivující enzym, E2 – ubikvitin konjugující enzym, E3 – ubikvitin ligáza, UbR – ubikvitinové receptory.



## 2.1 Způsoby vazeb Ub řetězců

Proteiny v buňce mohou být označeny jednou molekulou Ub (monoubikvitinace) nebo dvěma a více molekulami Ub (polyubikvitinace) skrze lyzinový zbytek cílového proteinu. Ub obsahuje 7 lyzinových zbytků (K6, K11, K27, K29, K33, K48 a K63; aminokyselinové zbytky jsou číselně označeny podle postavení v Ub molekuly), z nichž všechny mohou sloužit ke tvorbě izopeptidové vazby, kterou jsou jednotlivé Ub spojeny v řetězec. Komplexita ubikvitinace je ještě navýšena existencí mnohopočetné monoubikvitinace a smíšených nebo rozvětvených řetězců. Navíc byla popsána vazba skrz N-terminální konec (M1) Ub, která je často využívána pro tvorbu lineárních řetězců a identifikována při regulaci aktivace transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B v zánětlivých a imunitních reakcích [1, 34].

Nejčastější způsoby vazby při polyubikvitinaci jsou přes K48, která vytváří 29% všech vazeb a přes K63, která vytváří 17% všech ubikvitinových vazeb [1]. K48 je tetramér, který je složen minimálně ze čtyř ubikvitinových molekul. Významnou roli hraje při degradaci proteinů v proteazomu 26S, uvnitř kterého specifické receptory rozeznají vazbu přes K48, protein určený k degradaci označí a prakticky okamžitě zneškodní. U K11 bylo zjištěno více funkcí. Jedna z nich je v buněčném cyklu, konkrétně u mitózy, přičemž K11-značené proteiny jsou odsouzené k degradaci pomocí APC/C (anafázi podporující komplex). Pokud je tento komplex aktivní během mitózy, tak se množství vazeb u K11 rapidně zvyšuje [35]. Také byla zjištěna důležitá funkce K11 u mechanismu degradace spojená s ER která se nazývá ERAD (z *angl. endoplasmatic reticulum-associated degradation*). Tento mechanismus dokáže odstranit proteiny z ER, které mohou být nějakým způsobem poškozeny a zároveň zamezuje tomu, aby tyto proteiny dále pokračovaly ve své sekreční dráze. Nejdříve jsou proteiny podrobeny cytosolické proteolýze pomocí proteazomu 26S, kde následně dochází k odstranění z ER [35] [36] [37].

Zatímco K11 a K48 se uplatňují při degradaci proteinů, K63 řetězce mají zejména regulační funkci. Tyto řetězce se velmi úzce podílejí na signálních procesech, které vedou k aktivaci transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B, a také mají zásadní funkci při degradaci a opravách DNA [1, 38]. K63 má také důležitou úlohu v receptorové endocytóze *in vivo* a signální transdukcii. Jisté studie poukázaly na to, že takto označené proteiny mohou být degradovány a rozpoznány v proteazomu 26S [39]. U K63 se přišlo také na to, že je

klíčový při opravách dvouvláknových zlomů DNA, u pacientek s mutovaným genem *BRC1*, který je zodpovědný za rakovinu prsu [38]. Molekuly tohoto řetězce jsou pouze izopeptidového charakteru [1].

Vazba skrze K6 není až tak běžnou a její fyziologická role není objasněna. Vazby tohoto typu byly identifikovány pomocí proteinů, které se nacházejí na vnější mitochondriální membráně [34]. Za to K27 řetězec se účastní reakce u poškození DNA, kdy je aktivována ATM kináza, která je významně zodpovědná za fosforylační a ubikvitinační kaskádu kde je tato ligáza schopna indukovat ubikvitinaci chromatinu. K27 vazba je důležitá při správné aktivaci DNA [40]. Značení přes K29 se uplatňuje jako inhibitor Wnt/ $\beta$ -katenin signální dráhy, která hraje ústřední roli při embryogenezi a její deregulace je úzce spojena s vývojem a růstem nádorů [41]. Poslední K33 řetězec je spojen s negativní regulací T-antigenu a proteinové kinázy sdruženou s AMPK [42, 43].

## 2.2 *E3 ubikvitin ligázy*

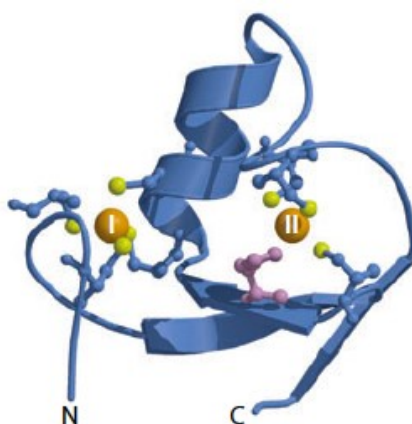
V savčím genomu můžeme najít přes 600 genů kódujících E3 ligázy (přehledně shrnuty např. v [26, 44, 45]), které určují specificitu ubikvitinace rozpoznáváním cílových proteinů. V eukaryotních organismech rozeznáváme různé typy enzymů E3. Největšími a také nejpočetnějšími rodinami jsou RING a HECT. Základní rozdíl mezi těmito typy E3 enzymů je, že RING doména netvoří thioesterový katalytický meziprodukt s Ub, jak to je u HECT domény, ale přímo katalyzuje přenos z E2 na cílový protein [45]. Mezi E3 ligázy patří taky méně početná RBR (*z angl. RING-between-RING*) rodina a podskupina malých konzervovaných proteinů nesoucích U-Box doménu, která je odvozená od rodiny RING [46]. Některé E3 mohou tvořit monomery jako například c-CBL, homodimery, např. RNF4, BIRC7, IDOL, cIAP a TRIM5 $\alpha$  a heterodimery, např. BRCA1-BARD1, Mdm2-MdmX a RING1B-Bmi1. Z těchto třech dvojic mají vždy Brca1, Mdm2 a RING1B vazebná místa pro E2 a vykazují E3 aktivitu. Naopak jejich partneři, Bard1, MdmX a Bmi1, E3 aktivitu nevykazují, ale jejich RING domény interagují s RING doménou interagujícího proteinu, přičemž tvoří heterodimér a stimulují E3 aktivitu [26, 47].

Zvláštní podskupinu RING ligáz představují Cullin RING ligázy (CRL), které jsou sestaveny z více podjednotek. Jsou velmi rozmanitou a významnou podskupinou a jejich počet přesahuje bezmála 200 odlišných cullin-RING ligáz [48] [49]. Tyto ligázy

prostřednictvím konzervovaných cullinových domén vážou proteiny RING-boxu na svém N-konci (např. Rbx1) a substrátový receptor (např. Skp2) s adaptérovým proteinem (např. Skp1) na svém C-konci. Největší roli mají při cílení proteinů, které jsou určené k následné degradaci. V lidském genomu můžeme najít celkem sedm komplexů tvořené Cul1, Cul2, Cul3, Cul4, Cul5, Cul7 a Cul9 [47, 50, 51].

### 2.2.1 RING E3 ligázy

RING doména byla poprvé popsána Paul S. Freemontem a jeho kolegy [52]. Termín RING (Really Interesting New Gene) byl původně zaveden v kontextu proteinů nesoucích tzv. zinkový prst (z angl. *zinc finger*) kvůli přítomnosti zinku v jejich unikátní doméně. Tento motiv byl prvně popsán u Ring1 proteinu a následně u několika desítek dalších, přičemž se domnívalo, že je zodpovědný za jejich vazbu na DNA. Další výzkumy však toto tvrzení vyvrátily, když bylo zjištěno, že proteiny nesoucí RING doménu vykazují Ub-ligázovou aktivitu. Kanonické typy RING domén jsou charakteristické přítomností sedmi cysteiny a jedním nebo dvěma histidinovými zbytky v lineární řadě koordinujících zbytků ( $C_3H_2C_3$  a  $C_3HC_4$ ), avšak existuje vícero variant RING domén [26] [52] [53] [54]. Osm aminokyselinových zbytků (cystein nebo histidin) tvoří ve struktuře RING domény dvě vazební místa pro  $Zn^{2+}$  atomy (*Obr.2*). Přesný mechanismus přenosu Ub z E2 na cílový protein není známý. Je ovšem jasné, že v tom velkou roli sehrává právě katalytická aktivita domény RING, která napomáhá k zvýšenému střetu mezi E2 a cílovým proteinem [28].



Obr. 4 - Trojrozměrná krystalová struktura RING domény [26].

### 2.2.2 HECT E3 ligázy

V lidském genomu se nachází přibližně 30 genů, které kódují E3 ligázy s tzv. HECT (z angl. *Homologous to E6AP C terminus*) doménou. HECT E3 ligázy katalyzují přenos Ub na cílový protein dvoustupňovou reakcí. V prvním kroku je Ub přenesen na katalytický cystein HECT E3 ligázy a poté z ligázy na cílový protein. Tenhle typ Ub transferu vyžaduje existenci strukturně flexibilní HECT domény, což je zajištěno přítomností tzv. dvou laloků (z angl. *bi-lobed*), která je umístěna na C-konci proteinů. Zatímco N-terminální lalok interaguje s Ub-konjugovaným E2, C-terminální lalok obsahuje katalytický cystein. Při Ub transferu pak dochází k přiblížením obou laloků přes ohybný kloub, přičemž se mění relativní orientace obou laloků [45]. HECT ligázy můžeme dělit na tři podrodiny. První se nazývá Nedd4 (z angl. *neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4*) s motivem (WW) tryptofan - tryptofan. Tato podrodina obsahuje mimo jiné proteiny Smurf1 (z angl. *SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1*) a Smurf2 (z angl. *SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2*). Druhou podrodinou je HERC, která je charakteristická přítomností dvou domén: HECT a RLD (z angl. *regulator of chromosome condensation-like domain*). Typickým členem této podrodiny je E6AP (z angl. *E6-associated protein*). Podílí se na degradaci cílených proteinů a je kódován genem *UBE3A* (z angl. *ubiquitin-protein ligase E3A*). Nejdříve byl tento protein identifikován jako onkoprotein, který hraje úlohu v degradaci proteinu p53. Avšak tato informace nebyla prokázána a onkogenní funkce E6AP nejsou příliš známy [55]. U E6AP bylo později zjištěno, že přispívá k rozvoji vážných lidských onemocnění jako je například vzácná genetická porucha zvaná Angelmanův syndrom, v důsledku ztráty funkce E6AP neboli inaktivaci. Může mít vliv také na karcinogenezi děložního čípku, kdy ale dochází naopak k aktivaci E6AP [56]. Poslední jsou „jiné“ HECT rodiny, které obsahují další domény [47].

### 2.2.3 RBR E3 ligázy

Název RBR rodiny je odvozen z přítomnosti dvou různých RING domén (RING1 a RING2), které jsou odděleny doménou IBR (z angl. *in-between ring*). Jedním z nejvýznamnějších členů této rodiny, který hraje významnou roli u projevů Parkinsonovy choroby – Parkin. Můžeme jmenovat další příklady jako je např. Parc (z angl. *p53-associated parkin-like cytoplasmatic protein*), RNF144 (z angl. *ring finger protein 144*) a HOIP1 (z angl. *HOIL-interacting protein*) [47]. Veškeré E3 této rodiny jsou

multidoménové. Analogicky jako HECT E3 ligázy, RBR E3 ligázy katalyzují přenos Ub na cílový protein ve dvou krocích. První doména – RING1 se váže s Ub-konjugovaným E2, přičemž RING2 doména obsahuje tzv. „katalytický cystein“, přes který přijímá molekulu Ub od E2. Jelikož RING2 doména strukturně nezodpovídá kanonické RING struktuře, byla proto pojmenována jako Rcat (z angl. *required-for-catalysis*). IBR doména je strukturně stejná jako RING2 doména, ale chybí ji katalytický zbytek cysteinu, a proto se nazývá BRcat (z angl. *benign-catalytic*) [57].

#### 2.2.4 U-box E3 ligázy

U-box je nejméně početná rodina E3 ligáz odvozena od rodiny RING. Na rozdíl od RING domény, která je stabilizována vazbami s  $Zn^{2+}$ , struktura U-box domény je udržována nabitými a polárními zbytky a stabilizačními vodíkovými vazbami. Bylo zjištěno, že proteiny U-Boxu rodiny dokáží samostatně fungovat jako E3, které jsou při ubikvitinaci závislé na E2. U-box E3 ligázy hrají důležitou roli v kontrolním systému kvality proteinů, který je základní reakcí buněčného stresu na intracelulární akumulaci abnormálních proteinů. Mezi zástupce tohoto typu E3 ligáz patří např. Ufd2, CYC4 a PRP19 [58].

### 3 E3 ligázy asociované s ISZ

Velkým přínosem pro poznání genetické determinace ISZ jsou celogenomové asociační studie GWAS (z angl. *Genome Wide Association Studies*), které identifikovaly přibližně 200 rizikových lokusů. Přesto však nalezené varianty rizikových genů jako jsou například *NOD2*, *ATG16L1*, *IRGM*, *IL23R*, *RNF186* a *CARD9* nevysvětlují heritabilitu ISZ, kdy se zřejmě uplatňují i další mechanismy – vzájemné interakce genů, epigenetické modifikace apod. [4].

Konkrétně byly identifikovány tyto E3 ligázy: Rnf186, Rnf5, Rnf183, TRIM62, A20, XIAP, ITCH E3, MARCH8, Pellino3 a TRIM31. Tyto E3 ligázy vykazují určitou asociaci s ISZ a jejich buněčné procesy narušují funkční bariéru střeva ať už ve změně produkce mucinu, narušení buněčných spojů, defektech v autofágii eventuálně v defektní produkci AMPs. Konkrétněji budou jednotlivé ligázy popsány níže.

Na myších modelech byl proveden experiment, konkrétně u Rnf186, který spočíval v orálním podání polysacharidu DSS (z angl. *dextran sodium sulfate*), kde tato

látka nejdříve naruší střevní bariéru a následně je vyvolán zánět. Tato forma je velice věrohodná, protože napodobuje přesné klinické vlastnosti ISZ [59] [60].

V této studii bylo zjištěno, že Rnf186 výrazně zvyšuje expresi Ocln – genu kódující okcludin. Kde došlo k narušení těsných spojů v epiteliální bariéře skrze okcludin (integrální membránový protein, nacházející se v těsných spojích) [59]. Již třetí den od podání DSS jsme schopni pozorovat první příznaky UC a přibližně sedmý den můžeme pozorovat rozsáhlejší formu zánětlivého onemocnění. Hlavně díky významné expresi zánětlivých proteinů tzv. cytokinů a chemokinů (IL-6, IL-1, TNF-a, KC a Interferonu-c), které jsou podstatně zvýšené a naopak syntéza protizánětlivých cytokinů je velmi snížena (IL-10) [60].

Ukazatelem zánětlivého onemocnění může být například délka střeva, které se zkracuje a také nižší váha dané myši, které byl podán DSS při porovnání s kontrolní kohortou, které DSS podáván nebyl. Ačkoli DSS kolitidu dokáže vyvolat, tak bohužel jeho mechanismus je stále neznámý [60].

Tabulka 1 - E3 ligázy asociované s ISZ.

E3 ligáza	Substrát	Buněčný proces	Onemocnění	Citace
Rnf186	BNip1	regulace stresu ER a indukce apoptózy pomocí BNip1	UC	[63]
Rnf5	S100A8	regulace degradace proteinů pomocí S100A8 skrze NF-κB dráhu a TLR	UC	[64]
RNF183	DR5	iniciace zánětu pomocí DR5, aktivace dráhy NF-κB zvýšením ubikvitinace a degradace IκBa	UC	[69]
TRIM62	CARD9	zvýšená produkce cytokinů pomocí dráhy NF-κB	ISZ	[70]
A20	TNFAIP3	negativní regulace B buněk, závislé na NF-κB	ISZ	[75, 74]
XIAP	NOD2	ubikvitinace RIPK1, LUBAC komplex aktivuje NF-κB dráhu pomocí stimulace NOD2	ISZ	[76]
ITCH E3	NOD2, Ndfip1	ubikvitinace JunB a tím je zabráněna produkce IL-4 a IL5	ISZ	[77]
MARCH8	IL1RAP	degradace IL1RAP vede k negativní regulaci signálních drah, indukovaných IL-1β, autofágie	ISZ	[80]
Pellino3	RIP2	oslabení ubikvitinace RIP2 skrze Nod2, nižší aktivace NF-κB	CD	[81]
TRIM31	NLRP3	inhibice aktivace zánětlivých buněk degradací NLRP3	CD KRR	[82][83]

*UC – ulcerózní kolitida, CD – Crohnova choroba, ISZ – idiopatické střevní záněty, KRRK – kolorektální karcinom.*

Rnf186 je ligáza, u které byla zjištěna významná exprese v lidských buňkách střevního epitelu, oproti imunitní tkáni. Přesněji se jedná o variantu A64T, která byla objevena v roce 2006, kde je aminokyselina alanin nahrazena treoninem na pozici 64 [59]. Vzhledem k tomu, že se tato ligáza nachází v doméně RING s aktivitou E3 ubikvitin-proteinové ligázy, tak je tato varianta klíčová. O E3 je totiž známo, že jsou schopny regulovat důležité protizánětlivé dráhy [61] [62]. Pokud u nějaké biologické funkce v ER nastane určitý defekt, tak může vést k nahromadění rozložených bílkovin a tím naruší regulaci  $Ca^{2+}$  v lumen ER a tím vyvolá značné množství komplikací. Tyto komplikace nazýváme rozvinuté proteinové odpovědi (z angl. *unfolded protein response - UPR*), které zajišťují zprvu normální funkci homeostázy. Pokud UPR nedokáže nějakým způsobem vyrovnat tyto komplikace, resp. poškození, tak je buňka odsouzena k apoptóze [63]. U *RNF186* byl identifikován in vivo BNip1, který patří do proteinové rodiny Bcl-2 (z angl. *B-cell lymphoma*), který je polyubikvitován pomocí *RNF186* skrze vazby K29 a K63. Těmito vazbami je podpořen transport BNip1 do mitochondrií, ale nemá absolutně žádný vliv na jeho množství proteinu. Díky stresu v ER, který je způsoben pravděpodobně nahromaděním *RNF186*, je ubikvitinace BNip1 velmi výrazně zlepšena. Důležité také je, že díky redukcí genové exprese u BNip1 bylo zjištěno, že zeslabuje signály stresu v ER, který navodí *RNF186*. Díky tomu můžeme říci, že BNip1 funguje jako regulátor stresu ER asociovaného apoptotickou signalizací u *RNF186*. U této ligázy bylo také zjištěno, že může spustit aktivaci kaspázy 12 a 9 a tudíž apoptotická dráha, která je specifická pro stres ER vyvolaná *RNF186* je závislá na kaspázách [63].

RNF5 ligáza, u které byl identifikován substrát S100A8 reguluje degradaci proteinů a také hraje roli, stejně tak jako *RNF186*, v regulaci vývoje UC vyvolané DSS. V tomto případě ale skrze S100A8 a signální komponenty NF- $\kappa$ B a TLR (z angl. *toll-like receptor*) [64]. S100A8 je protein o nízké molekulové hmotnosti, který je složkou kalprotektinu, což je leukocytární cytosolový protein, který na sebe váže  $Ca^{2+}$  a o kterém bylo dokázáno, že hraje roli ve střevní sliznici DAMP (z angl. *danger associated molecular patterns*). DAMP jsou biomolekuly, které dokáží podnítit a udržet zánětlivou odpověď [64] [65]. Kalprotektin slouží jako značný endogenní signál, který podněcuje zánět a dokáže vyvolat signalizační kaskády, vedoucí k rozvolnění hlavních iniciačních zánětlivých faktorů, které následně vyvolají různé zánětlivé procesy. Mnoho těchto iniciačních faktorů, jako jsou např. TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 jsou v substrátu S100A8 výrazně zvýšeny [64].

Dalším biomarkerem při ISZ je RNF183, který je převážně exprimován v ledvinách. Ovšem některé studie poukazují na expresi i ve střevním epitelu po podání látky DSS nebo TNBS [66]. U RNF183 byla pomocí transfekce zjištěna negativní regulace miRNA-7, která podněcuje střevní zánět zvýšením ubikvitinace pomocí dráhy NF- $\kappa$ B a degradaci I $\kappa$ B $\alpha$  [67] [68]. U RNF183 jako substrát DR5, kdy je skrze vazbu K63 cílový protein transportován do lysozomu, kde je následně degradován. DR5 se účastní apoptózy, která souvisí s TNF (z angl. *tumor necrosis factor*). Ten následně vyvolá signál pro programovanou buněčnou smrt, kdy TNF je indukovaný pomocí TRAIL (z angl. *TNF-related apoptosis-inducing ligand*) prostřednictvím interakce s kaspázou 8. Bylo zjištěno, že inhibice RNF183 právě potlačuje indukovanou aktivaci TRAIL kaspázy 8 a kaspázy 3. Tím je podpořen transport DR5 do lysozomů a apoptóza [66] [69].

TRIM62 má také úlohu v zánětlivých onemocnění střev. Spolu s ní byl označen in vitro substrát CARD9, který je hlavní složkou vrozené imunitní signalizace. Jisté mutace v CARD9 způsobují poruchy související s imunitou, ale existuje i méně obvyklá varianta, která je klíčová pro ISZ [70]. CARD9 je protein s n-koncovou doménou vázán skrze vazbu K27, který může současně vázat dva nebo více dalších proteinů a tím je schopen vytvořit komplex. Na svém c-konci nemá jasnou doménu a regulační způsob na tomto konci není ještě zcela jasně objasněn. V každém případě je c-konec zásadním pro regulační aktivitu CARD9. Jeho signální kaskáda je zahájena pomocí  $\beta$ -glukanů po zapojení Dectinu-1, což je transmembránový protein, který obsahuje ITAM motiv v intracelulární části. Díky tomu dojde k fosforylaci Dectinu-1 případně k připojení Dectinu-2 a to má za následek fosforylaci signalizace, která obsahuje ITAM s FcR $\gamma$ . Následně se aktivuje Syk kináza, která dá podnět PKC5 ke konečné fosforylaci CARD9 v T231. CARD9 za vzniku komplexu CARD9-BCL10-MALT1 přijme BCL10 (z angl. *B-cell lymphoma/leukemia 10*) a MALT1 (z angl. *mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1*), který aktivuje signální dráhu NF- $\kappa$ B [70] [71] [72].

A20 je Ub-editační enzym, který má jak ubikvitinační, tak i deubikvitinační aktivitu a ubikvitinovou vazebnou funkci pro regulaci signalizační dráhy NF- $\kappa$ B. A20 omezuje aktivační signály u TNF, TLR, CD40 a NOD pomocí úpravy Ub-řetězců na signalizačních proteinech, které daný signál dokáží přenést. Hlavně zvýšení TNF, na kterém je obvykle závislá apoptóza ukazuje, že A20 má zánětlivé účinky na střevní epitel [73] [74]. Vzhledem k tomu, že programovaná buněčná smrt pomocí TNF je závislá na



tvorbě signalizačních komplexů, tak je důležitá je také aktivita RIPK1. Klasická apoptóza při inhibici antiapoptických proteinů je zprostředkována komplexem II a Komplex II b neboli Ripoptozom je závislý na RIPK1 a způsobuje apoptózu v buňkách, které spustí kaspázu SMAC a ta následně degraduje cIAP1. Při blokaci kaspázy ovšem aktivita komplexu III závisí právě na RIPK1 a RIPK3, které indukují apoptózu. Bylo zjištěno, že inhibitory RIPK1 programované buněčné smrti bránily, kdežto u RIPK 3 tomu tak nebylo [73] [74]. Mutace v tomto genu jsou spojeny s idiopatickými střevními záněty, ale také je důležitý v patogenezi jiných onemocnění jako jsou například artritida a diabetes 1. typu [74]. U A20 byl identifikován substrát TNFAIP3, exprimovaný ve střevních epiteliálních buňkách, který je schopný negativním způsobem regulovat aktivaci B buněk, které jsou závislé na NF- $\kappa$ B signální dráze [75] [74].

XIAP (z angl. *X-linked inhibitor of apoptosis protein*) a ITCH hrají úlohu v kontrole degradace u ISZ a jejich mutace jsou spojeny s imunodeficiencí. Substrátem u obou je NOD2. Pro tento substrát je nezbytná XIAP ligáza, která ubikvitinuje RIPK2 a vpravuje LUBAC (z angl. *linear ubiquitin chain assembly complex*) do NOD2. LUBAC aktivita je klíčová pro aktivaci NF- $\kappa$ B dráhy. Po stimulaci NOD2 je také aktivita LUBAC důležitá pro vylučování protizánětlivých cytokinů [76]. ITCH je ligáza, která patří do jedné z nejpočetnějších rodin a to HECT. Mutace v ní vede k rozvoji zánětu tlustého střeva, kde ovlivňuje expresi IL-17. ITCH ubikvitinuje RIPK2 (z angl. *receptor interacting serin/threonin kinase 2*), na kterou se může vázat NOD2 [77]. Dalším možným substrátem byl identifikován Ndfip1, který zprostředkovanou ubikvitinací podporuje degradaci různých signálních proteinů a tím je potlačena aktivace T-lymfocytů a možný zánět. Jedná se o degradaci JunB, který pomáhá zvýšit produkci TH2 protizánětlivých cytokinů jako IL-4 a IL-5. Když je samozřejmě Ndfip1 méně, tak TH2 buňky zprostředkovávají zánětlivé onemocnění [78, 79].

MARCH8 je ubikvitin ligáza, identifikovaná jako supresor IL-1 $\beta$  indukovaných pomocí aktivačních drah NF- $\kappa$ B a MAPK. Vysoká exprese této ligázy způsobuje inhibici právě těchto aktivačních drah, zatímco snížení aktivity MARCH8 způsobí excitaci. MARCH8 interaguje s IL1RAP (z angl. *interleukin-1 receptor accessory protein*), zacílený na Lys512, kde je polyubikvitován skrze vazbu K48. I když se IL1RAP neváže přímo na IL-1 $\beta$ , tak jeho příjem do IL-1RI je stěžejní, aby mohl vytvořit aktivovaný komplex určitých membránových receptorů. Tyto komplexy jsou schopny pojmout

proteiny a kinázy jako třeba MyD88, IRAK1 a IRAK4. Funguje to tak, že IRAK4 fosforyluje a následně aktivuje IRAK1, který pak přijme TRAF6, který vykazuje aktivitu E3 [80]. Takto ubikvitovaný TRAF6 aktivuje další dráhy kináz a proteiny, což vede k aktivaci TAK1, který inaktivuje IKK- $\alpha$  a IKK- $\beta$  kinázy. Ty fosforylují proteiny I $\kappa$ B a aktivují signální dráhu NF- $\kappa$ B [80].

Pellino3 mající vliv převážně na CD je mediátor v NOD2 signalizační dráze, který reguluje střevní zánět. Jako substrát tady hraje úlohu kináza RIPK2, na kterou se váže Pellino 3 a dochází k ubikvitinaci díky K63 vazbě. Snížení exprese této ligázy vede k oslabení ubikvitinace kinázy, iniciovanou skrz NOD2 a také ke snížení aktivace NF- $\kappa$ B a MAPK [81].

TRIM31 E3 ligáza je poměrně nově identifikovaným členem, který hraje roli v mnoha biologických procesech. Bylo zjištěno, že má vliv na rakovinu tlustého střeva a konečníku, ale tento mechanismus je stále neprobádaný. TRIM31 byl ale identifikována jako zpětnovazebný supresor NLRP3, na který se přímo váže prostřednictvím vazby K48 [82] [83]. Navázaná ligáza TRIM31 přispívá k samotné polyubikvitinaci a degradaci proteinu NLRP3. Nižší exprese TRIM31 pak přispívá k vyšší aktivaci NLRP3 a ta zhoršuje zánět. Zajímavé je, že deficit ligázy zmírňuje závažnost UC, která byla uměle vyvolaná DSS. V tomto případě má NLRP3 ochrannou funkci. Bohužel konkrétní způsob exprese tohoto proteinu zůstává stále neznámý [82].

## 4 Závěr

V posledních letech bylo díky GWAS identifikováno přibližně 200 rizikových lokusů spjatých se zánětlivými onemocněními střev [4]. Z toho 10 jich bylo identifikovaných jako E3 ligázy. Díky tomu jsem jako první mohla podat takto ucelený přehled genetiky kandidátních E3 ubikvitin ligáz, které mají významnou úlohu v regulaci střevní homeostázy u idiopatických střevních zánětů, jako je Crohnova choroba a ulcerózní kolitida.

Budoucí studie v této oblasti jsou zcela nezbytné a díky těmto vědeckým výzkumům se postupem času s největší pravděpodobností podaří identifikovat díky GWAS větší množství dalších citlivých lokusů a jejich genetických variant.

Vzhledem k tomu, že idiopatickými střevními onemocněními trpí ve světě čím dál tím více převážně mladé populace, tak je velmi žádoucí objasnit přesnější patologii a mechanismy ISZ [18]. A právě identifikace dalších rizikových lokusů a následující rozsáhlejší studie jsou velmi důležité pro následný vývoj léků a cílenou léčbu těchto onemocnění.

## 5 Seznam literatury

1. Komander, D., *The emerging complexity of protein ubiquitination*. Biochem Soc Trans, 2009. **37**(Pt 5): p. 937-53.
2. \*Popovic, D., D. Vucic, and I. Dikic, *Ubiquitination in disease pathogenesis and treatment*. Nat Med, 2014. **20**(11): p. 1242-53.
3. \*Nandi, D., et al., *The ubiquitin-proteasome system*. J Biosci, 2006. **31**(1): p. 137-55.
4. \*Uniken Venema, W.T., et al., *The genetic background of inflammatory bowel disease: from correlation to causality*. J Pathol, 2017. **241**(2): p. 146-158.
5. Vancamelbeke, M. and S. Vermeire, *The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease*. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2017. **11**(9): p. 821-834.
6. Hoch, J.L., K., *Idiopatické střevní záněty*. Nemoci střev, 2018: p. 318-338.
7. \*Edelblum, K.L., et al., *Regulation of apoptosis during homeostasis and disease in the intestinal epithelium*. Inflamm Bowel Dis, 2006. **12**(5): p. 413-24.
8. Schoultz, I. and A.V. Keita, *Cellular and Molecular Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Disease-Focusing on Intestinal Barrier Function*. Cells, 2019. **8**(2).
9. \*Shirazi, T., et al., *Mucins and inflammatory bowel disease*. Postgrad Med J, 2000. **76**(898): p. 473-8.
10. Johansson, M.E., et al., *The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(39): p. 15064-9.
11. Van der Sluis, M., et al., *Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection*. Gastroenterology, 2006. **131**(1): p. 117-29.
12. \*Rescigno, M., *The intestinal epithelial barrier in the control of homeostasis and immunity*. Trends Immunol, 2011. **32**(6): p. 256-64.
13. Vancamelbeke, M., et al., *Genetic and Transcriptomic Bases of Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction in Inflammatory Bowel Disease*. Inflamm Bowel Dis, 2017. **23**(10): p. 1718-1729.
14. Schmitz, H., et al., *Altered tight junction structure contributes to the impaired epithelial barrier function in ulcerative colitis*. Gastroenterology, 1999. **116**(2): p. 301-9.
15. Egan, L.J., et al., *IkappaB-kinasebeta-dependent NF-kappaB activation provides radioprotection to the intestinal epithelium*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(8): p. 2452-7.
16. Girardin, S.E., et al., *Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection*. J Biol Chem, 2003. **278**(11): p. 8869-72.
17. Larabi, A., N. Barnich, and H.T.T. Nguyen, *New insights into the interplay between autophagy, gut microbiota and inflammatory responses in IBD*. Autophagy, 2020. **16**(1): p. 38-51.
18. \*Iida, T., K. Onodera, and H. Nakase, *Role of autophagy in the pathogenesis of inflammatory bowel disease*. World J Gastroenterol, 2017. **23**(11): p. 1944-1953.
19. \*Lassen, K.G. and R.J. Xavier, *Mechanisms and function of autophagy in intestinal disease*. Autophagy, 2018. **14**(2): p. 216-220.
20. \*Kabi, A., et al., *Digesting the genetics of inflammatory bowel disease: insights from studies of autophagy risk genes*. Inflamm Bowel Dis, 2012. **18**(4): p. 782-92.
21. \*Huett, A. and R.J. Xavier, *Autophagy at the gut interface: mucosal responses to stress and the consequences for inflammatory bowel diseases*. Inflamm Bowel Dis, 2010. **16**(1): p. 152-74.
22. \*Maloy, K.J. and F. Powrie, *Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease*. Nature, 2011. **474**(7351): p. 298-306.

23. Hershko, A., et al., *Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(4): p. 1783-6.
24. Ciechanover, A., et al., *ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(3): p. 1365-8.
25. \*Kwon, Y.T. and A. Ciechanover, *The Ubiquitin Code in the Ubiquitin-Proteasome System and Autophagy*. Trends Biochem Sci, 2017. **42**(11): p. 873-886.
26. \*Deshaies, R.J. and C.A. Joazeiro, *RING domain E3 ubiquitin ligases*. Annu Rev Biochem, 2009. **78**: p. 399-434.
27. Lee, I. and H. Schindelin, *Structural insights into E1-catalyzed ubiquitin activation and transfer to conjugating enzymes*. Cell, 2008. **134**(2): p. 268-78.
28. \*Pickart, C.M. and M.J. Eddins, *Ubiquitin: structures, functions, mechanisms*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1695**(1-3): p. 55-72.
29. \*Stewart, M.D., et al., *E2 enzymes: more than just middle men*. Cell Res, 2016. **26**(4): p. 423-40.
30. Li, W., et al., *Genome-wide and functional annotation of human E3 ubiquitin ligases identifies MULAN, a mitochondrial E3 that regulates the organelle's dynamics and signaling*. PLoS One, 2008. **3**(1): p. e1487.
31. \*Komander, D., M.J. Clague, and S. Urbe, *Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(8): p. 550-63.
32. Sowa, M.E., et al., *Defining the human deubiquitinating enzyme interaction landscape*. Cell, 2009. **138**(2): p. 389-403.
33. \*Hussain, S., Y. Zhang, and P.J. Galardy, *DUBs and cancer: the role of deubiquitinating enzymes as oncogenes, non-oncogenes and tumor suppressors*. Cell Cycle, 2009. **8**(11): p. 1688-97.
34. \*Akutsu, M., I. Dikic, and A. Bremm, *Ubiquitin chain diversity at a glance*. J Cell Sci, 2016. **129**(5): p. 875-80.
35. Jin, L., et al., *Mechanism of ubiquitin-chain formation by the human anaphase-promoting complex*. Cell, 2008. **133**(4): p. 653-65.
36. Locke, M., J.I. Toth, and M.D. Petroski, *Lys11- and Lys48-linked ubiquitin chains interact with p97 during endoplasmic-reticulum-associated degradation*. Biochem J, 2014. **459**(1): p. 205-16.
37. Lord, J.M., et al., *Endoplasmic reticulum-associated protein degradation*. Semin Cell Dev Biol, 2000. **11**(3): p. 159-64.
38. \*Chen, Z.J. and L.J. Sun, *Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling*. Mol Cell, 2009. **33**(3): p. 275-86.
39. Saeki, Y., et al., *Lysine 63-linked polyubiquitin chain may serve as a targeting signal for the 26S proteasome*. EMBO J, 2009. **28**(4): p. 359-71.
40. Gatti, M., et al., *RNF168 promotes noncanonical K27 ubiquitination to signal DNA damage*. Cell Rep, 2015. **10**(2): p. 226-38.
41. \*Clevers, H. and R. Nusse, *Wnt/beta-catenin signaling and disease*. Cell, 2012. **149**(6): p. 1192-205.
42. Huang, H., et al., *K33-linked polyubiquitination of T cell receptor-zeta regulates proteolysis-independent T cell signaling*. Immunity, 2010. **33**(1): p. 60-70.
43. Al-Hakim, A.K., et al., *Control of AMPK-related kinases by USP9X and atypical Lys(29)/Lys(33)-linked polyubiquitin chains*. Biochem J, 2008. **411**(2): p. 249-60.
44. \*Zheng, N. and N. Shabek, *Ubiquitin Ligases: Structure, Function, and Regulation*. Annu Rev Biochem, 2017. **86**: p. 129-157.
45. \*Metzger, M.B., V.A. Hristova, and A.M. Weissman, *HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 3): p. 531-7.

46. Aravind, L. and E.V. Koonin, *The U box is a modified RING finger - a common domain in ubiquitination*. *Curr Biol*, 2000. **10**(4): p. R132-4.
47. Morreale, F.E. and H. Walden, *Types of Ubiquitin Ligases*. *Cell*, 2016. **165**(1): p. 248-248 e1.
48. \*Petroski, M.D. and R.J. Deshaies, *Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005. **6**(1): p. 9-20.
49. \*Nguyen, H.C., W. Wang, and Y. Xiong, *Cullin-RING E3 Ubiquitin Ligases: Bridges to Destruction*. *Subcell Biochem*, 2017. **83**: p. 323-347.
50. \*Teixeira, L.K. and S.I. Reed, *Ubiquitin ligases and cell cycle control*. *Annu Rev Biochem*, 2013. **82**: p. 387-414.
51. \*Fouad, S., et al., *Cullin Ring Ubiquitin Ligases (CRLs) in Cancer: Responses to Ionizing Radiation (IR) Treatment*. *Front Physiol*, 2019. **10**: p. 1144.
52. Freemont, P.S., I.M. Hanson, and J. Trowsdale, *A novel cysteine-rich sequence motif*. *Cell*, 1991. **64**(3): p. 483-4.
53. Everett, R.D., et al., *A novel arrangement of zinc-binding residues and secondary structure in the C3HC4 motif of an alpha herpes virus protein family*. *J Mol Biol*, 1993. **234**(4): p. 1038-47.
54. Yanagisawa, S., *A novel DNA-binding domain that may form a single zinc finger motif*. *Nucleic Acids Res*, 1995. **23**(17): p. 3403-10.
55. Nuber, U., S.E. Schwarz, and M. Scheffner, *The ubiquitin-protein ligase E6-associated protein (E6-AP) serves as its own substrate*. *Eur J Biochem*, 1998. **254**(3): p. 643-9.
56. Matentzoglou, K. and M. Scheffner, *Ubiquitin ligase E6-AP and its role in human disease*. *Biochem Soc Trans*, 2008. **36**(Pt 5): p. 797-801.
57. \*Spratt, D.E., H. Walden, and G.S. Shaw, *RBR E3 ubiquitin ligases: new structures, new insights, new questions*. *Biochem J*, 2014. **458**(3): p. 421-37.
58. \*Hatakeyama, S. and K.I. Nakayama, *U-box proteins as a new family of ubiquitin ligases*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. **302**(4): p. 635-45.
59. Fujimoto, K., et al., *Regulation of intestinal homeostasis by the ulcerative colitis-associated gene RNF186*. *Mucosal Immunol*, 2017. **10**(2): p. 446-459.
60. Laroui, H., et al., *Dextran sodium sulfate (DSS) induces colitis in mice by forming nano-lipocomplexes with medium-chain-length fatty acids in the colon*. *PLoS One*, 2012. **7**(3): p. e32084.
61. Beaudoin, M., et al., *Deep resequencing of GWAS loci identifies rare variants in CARD9, IL23R and RNF186 that are associated with ulcerative colitis*. *PLoS Genet*, 2013. **9**(9): p. e1003723.
62. Rivas, M.A., et al., *A protein-truncating R179X variant in RNF186 confers protection against ulcerative colitis*. *Nat Commun*, 2016. **7**: p. 12342.
63. Wang, P., et al., *A novel RING finger E3 ligase RNF186 regulate ER stress-mediated apoptosis through interaction with BNip1*. *Cell Signal*, 2013. **25**(11): p. 2320-33.
64. Fujita, Y., et al., *Regulation of S100A8 Stability by RNF5 in Intestinal Epithelial Cells Determines Intestinal Inflammation and Severity of Colitis*. *Cell Rep*, 2018. **24**(12): p. 3296-3311 e6.
65. \*Shabani, F., et al., *Calprotectin (S100A8/S100A9): a key protein between inflammation and cancer*. *Inflamm Res*, 2018. **67**(10): p. 801-812.
66. Okamoto, T., K. Imaizumi, and M. Kaneko, *The Role of Tissue-Specific Ubiquitin Ligases, RNF183, RNF186, RNF182 and RNF152, in Disease and Biological Function*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(11).
67. Yu, Q., et al., *E3 Ubiquitin ligase RNF183 Is a Novel Regulator in Inflammatory Bowel Disease*. *J Crohns Colitis*, 2016. **10**(6): p. 713-25.
68. Wu, Y., et al., *Transmembrane E3 ligase RNF183 mediates ER stress-induced apoptosis by degrading Bcl-xL*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018. **115**(12): p. E2762-E2771.

69. Wu, Y., et al., *Inflammatory bowel disease-associated ubiquitin ligase RNF183 promotes lysosomal degradation of DR5 and TRAIL-induced caspase activation*. *Sci Rep*, 2019. **9**(1): p. 20301.
70. Cao, Z., et al., *Ubiquitin Ligase TRIM62 Regulates CARD9-Mediated Anti-fungal Immunity and Intestinal Inflammation*. *Immunity*, 2015. **43**(4): p. 715-26.
71. Leshchiner, E.S., et al., *Small-molecule inhibitors directly target CARD9 and mimic its protective variant in inflammatory bowel disease*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017. **114**(43): p. 11392-11397.
72. Strasser, D., et al., *Syk kinase-coupled C-type lectin receptors engage protein kinase C-delta to elicit Card9 adaptor-mediated innate immunity*. *Immunity*, 2012. **36**(1): p. 32-42.
73. Garcia-Carbonell, R., et al., *Elevated A20 promotes TNF-induced and RIPK1-dependent intestinal epithelial cell death*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018. **115**(39): p. E9192-E9200.
74. Hammer, G.E., et al., *Expression of A20 by dendritic cells preserves immune homeostasis and prevents colitis and spondyloarthritis*. *Nat Immunol*, 2011. **12**(12): p. 1184-93.
75. Chen, D., et al., *A20 Restores Impaired Intestinal Permeability and Inhibits Th2 Response in Mice with Colitis*. *Dig Dis Sci*, 2020. **65**(5): p. 1340-1347.
76. Damgaard, R.B., et al., *The ubiquitin ligase XIAP recruits LUBAC for NOD2 signaling in inflammation and innate immunity*. *Mol Cell*, 2012. **46**(6): p. 746-58.
77. Tao, M., et al., *ITCH K63-ubiquitinates the NOD2 binding protein, RIP2, to influence inflammatory signaling pathways*. *Curr Biol*, 2009. **19**(15): p. 1255-63.
78. Kurzweil, V., A. Tarangelo, and P.M. Oliver, *Gastrointestinal microbiota do not significantly contribute to T cell activation or GI inflammation in Ndfip1-cKO mice*. *PLoS One*, 2012. **7**(4): p. e34478.
79. Ramon, H.E., et al., *The ubiquitin ligase adaptor Ndfip1 regulates T cell-mediated gastrointestinal inflammation and inflammatory bowel disease susceptibility*. *Mucosal Immunol*, 2011. **4**(3): p. 314-24.
80. Chen, R., et al., *The E3 ubiquitin ligase MARCH8 negatively regulates IL-1beta-induced NF-kappaB activation by targeting the IL1RAP coreceptor for ubiquitination and degradation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(35): p. 14128-33.
81. Yang, S., et al., *Pellino3 ubiquitinates RIP2 and mediates Nod2-induced signaling and protective effects in colitis*. *Nat Immunol*, 2013. **14**(9): p. 927-36.
82. Song, H., et al., *The E3 ubiquitin ligase TRIM31 attenuates NLRP3 inflammasome activation by promoting proteasomal degradation of NLRP3*. *Nat Commun*, 2016. **7**: p. 13727.
83. Wang, H., et al., *TRIM31 regulates chronic inflammation via NF-kappaB signal pathway to promote invasion and metastasis in colorectal cancer*. *Am J Transl Res*, 2018. **10**(4): p. 1247-1259.
84. Yamamoto, Y., M.J. Yin, and R.B. Gaynor, *IkappaB kinase alpha (IKKalpha) regulation of IKKbeta kinase activity*. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(10): p. 3655-66.

Review jsou označeny hvězdičkou.