

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

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

AMPs	antimikrobiální peptidy
ATM	serin/treoninová kináza
ATP	adenosintrifosfát
Bcl-2	z angl. <i>B-cell lymphoma</i>
BRCA1	z angl. <i>BReast CAncer 1</i>
CARD9	z angl. <i>caspase recruitment domain-containing protein 9</i>
CD	Crohnova choroba, z angl. <i>Crohn`s disease</i>
CRL	Cullin RING ligázy
DAMP	z angl. <i>danger-associated molecular patterns</i>
DSS	dextran sulfát sodný
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DUB	deubikvitinační enzym
E1	ubikvitin aktivující enzym
E2	ubikvitin konjugující enzym
E3	enzym - ubikvitin ligáza
ERAD	z angl. <i>Endoplasmatic Reticulum-Associated Degradation</i>
GIT	gastrointestinální trakt
GWAS	z angl. <i>Genome Wide Association Studies</i>
HECT	homologní s E6-asociovaným proteinovým C-koncem doména
I κ B	kináza - inhibitor podjednotky NF- κ B
ISZ	idiopatické střevní záněty
KRK	kolorektální karcinom
MAMP/PAMP	z angl. <i>microbial/pathogen-associated molecular pattern</i>
MC	mastocyt nebo žírná buňka
NF- κ B	jaderný faktor kappa B

NLR	z angl. <i>NOD-like receptor</i>
NLRP3	z angl. <i>NLR family pyrin domain containig 3</i>
NOD2	z angl. <i>Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2</i>
OTU	z angl. <i>ovarian tumor domain</i>
p53	tumor supresorový gen p53
PC	Panethova buňka
PRR	z angl. <i>pattern recognition receptors</i>
RING	z angl. <i>really interesting new gene</i>
RIPK2	z angl. <i>receptor interacting serin/threonin kinase 2</i>
RNA	ribonukleová kyselina
TJs	těsné spoje
TLR	z angl. toll-like receptor
TNBS	kyselina 2,4,6-trinitrobenzensulfonová
UPS	ubikvitin-proteazový systém
Ub	ubikvitin
UC	ulcerózní kolitida
XIAP	z angl. <i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>

Abstrakt

E3 ubikvitin ligázy jsou početnou rodinou enzymů, které se účastní mnoha buněčných dějů jako jsou opravy 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 díky GWAS přibližně 200 rizikových lokusů, které jsou náchylné k těmto onemocněním. Včetně těch kódujících E3 ubikvitin ligázy. 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 DNA damage repair, transport of membrane proteins, chromatin modification, cell cycle and apoptosis. E3 ubiquitin ligases have 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, GWAS has identified approximately 200 risk loci that are susceptible to these diseases. Including those encoding E3 ubiquitin ligases. 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 zkratk	- 5 -
Abstrakt	- 7 -
Abstract	- 7 -
Obsah	- 3 -
Seznam obrázků	- 3 -
Seznam tabulek	- 3 -
Úvod	- 8 -
1 Zánětlivá onemocnění střev	- 9 -
1.1 Ulcerózní kolitida	- 9 -
1.2 Crohnova choroba	- 9 -
1.3 Regulace střevní homeostázy	- 10 -
2 Ubikvitinace	- 13 -
2.1 Způsoby vazeb Ub řetězců	- 15 -
2.2 E3 ubikvitin ligázy	- 16 -
2.2.1 RING E3 ligázy	- 17 -
2.2.2 HECT E3 ligázy	- 18 -
2.2.3 RBR E3 ligázy	- 19 -
2.2.4 U-box E3 ligázy	- 19 -
3 E3 ligázy asociované s ISZ	- 20 -
4 Závěr	- 26 -
5 Seznam literatury	- 27 -

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 {Schoultz, 2019 #38})	- 12 -
Obr. 2 - Ubikvitinační systém (upraveno z {Deshaies, 2009 #5})	- 14 -
Obr. 3 - Trojrozměrná krystalová struktura RING domény {Deshaies, 2009 #5}	- 18 -

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 ke změně buněčné lokalizace proteinu, jeho funkce, nebo k jeho interakci s jiným proteinem (Komander, 2009, Popovic et al., 2014).

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 (Nandi et al., 2006). Je známo, že E3 přispívají k regulaci zánětlivých onemocnění střev (ISZ) jako je ulcerózní kolitida (UC) a Crohnova choroba (CD). V důsledku dysfunkce nebo deregulace specifických E3 ligáz dochází k vzájemnému nesouladu mezi molekulárními interakcemi a strukturálními složkami na střevní sliznici. Tyto změny na úrovni proteinů pak vedou k rozvoji patofyziologických buněčných procesů - narušení fyzické epiteliální bariéry nebo nesprávné imunitní odpovědi a v konečném důsledku k rozvoji ISZ.

Cílem této práce je popsat biologické procesy, které přispívají k udržování a obnově střevního epitelu, dále podat shrnutí aktuálních poznatků o E3 ligázách a přinést přehled těch, které byly identifikovány jako klíčoví hráči v kontrole střevní homeostázy na proteinové úrovni ve vztahu s ISZ.

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 kontinuální zánět omezen na střevní sliznici, tak u CD může být napadena jakákoli část z GIT a zánět bývá submukózní. 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 (shrnutí v (Beaudoin et al., 2013) (Khor et al., 2011)).

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. Prevalence tohoto onemocnění bývá vyšší v rozvinutých zemích jako je třeba USA oproti těm rozvojovým. U UC jsou nejčastějšími projevy průjmy, které mohou být doprovázeny hustým hlenem, krví a bolestmi břicha s nutkáním na stolici. Nástup všech těchto příznaků může být rychlý, nebo naopak postupný. UC se běžně v populaci vyskytuje více, než je tomu u CD (shrnutí v (Ordas et al., 2012, Adams and Bornemann, 2013)).

1.2 Crohnova choroba

CD je diagnostikována převážně v mladém věku a bývá častější u kuřáků a také jsou mnohem náchylnější na onemocnění ženy než muži. Nejvíce rozšířena je v USA a v Evropě. Je charakterizována 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. Právě píštěle jsou velmi nepříjemnou komplikací. Jsou to spoje mezi kličkami střeva nebo mezi již zmiňovanými kličkami a jinými tělními orgány (shrnuto v (Baumgart and Sandborn, 2012)(Cleynen et al., 2016)(Roda et al., 2020).

1.3 Regulace střevní homeostázy

K rozvoji UC a CD vedou různé patofyziologické transformace na střevním epitelu, který je tvořen z jednoduchého cylindrického epitelu. Je to velmi dynamická tkáň, která se kompletně obnoví každých 3-5 dní skrze buněčné dělení. Aby tento systém mohl správně fungovat, musí být udržována rovnováha mezi proliferací epiteliálních buněk, jejich diferenciací a apoptózou (Edelblum et al., 2006). Epiteliální vrstva buněk, která je pokrytá mucinózní vrstvou, obsahuje enterocyty (resorpční buňky), pohárkové buňky, které produkují hlen - mucin a Panethovy buňky, které vylučují peptidy antimikrobiálního původu (AMP). 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 v nejspodnější části střevní bariéry a je téměř nepropustná. Poškození této bariéry může vést k vyšší propustnosti patogenů díky poškození těsných spojů (viz. níže) (Ordas et al., 2012, Schoultz and Keita, 2019).

Mucinová vrstva je tedy 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 - 20x10⁶ Daltonů (Shirazi et al., 2000). Hlen - mucin se skládá ze dvou vrstev (Johansson et al., 2008) s tím, že vnitřní vrstva je bez bakterií. Na myších modelech bylo zjištěno, že absence Mucinu 2 vede k redukcí vnitřní vrstvy hlenu a tím pádem ke kontaktu s bakteriemi a následně k rozvinutí spontánní kolitidy a průjmům (Sun et al., 2016)(Van der Sluis et al., 2006).

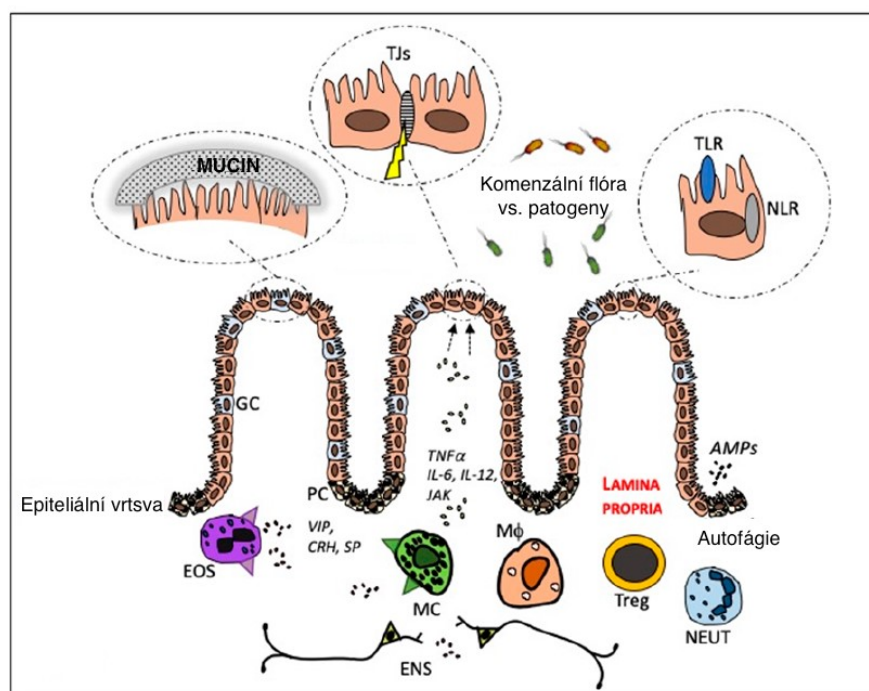
Druhá bariéra je fyzická a tvoří ji buněčné spoje: těsné spoje tzv. *tight junctions*, adhezní spoje a desmozomy. Těsné spoje mohou umožnit propustnost malých molekul a iontů do velikosti 20 kDa. Naopak desmozomy a adhezní spoje vytvářejí mezi sebou silné vazby, které jsou zodpovědné za integritu a kohezi tkáně. Jakékoli strukturální změny a

změny exprese v těchto spojích vedou k rozvoji zánětlivých onemocnění (Schmitz et al., 1999, Schoultz and Keita, 2019).

Kromě fyzické bariéry je samotný střevní epitel součástí systému nespecifické imunity. Imunitní systém je závislý na rovnováze mezi střevní a hostitelskou mikroflórou, kde jakékoli patogenní změny mohou vyvolat zánětlivé onemocnění. U vrozené imunitní odpovědi jsou hlavními buněčnými složkami dendritické buňky, makrofágy a granulocyty, které se chovají jako fagocyty a jsou antigen prezentujícími buňkami. Vrozená imunita je evolučně konzervovaná a závislá na tzv. MAMP/PAMP (z angl. *microbial/pathogen-associated molecular pattern*), molekulárních vzorech spojených s mikroby nebo patogeny (Aslam et al., 2009). Na povrchu fagocytů jsou přítomny různé druhy receptorů takovýchto MAMP/PAMP označované jako PRR (z angl. *pattern recognition receptors*). Je známa řada povrchových nebo sekretovaných PRR vázajících sacharidové molekuly typické pro bakterie nebo plísňe, které patří do rodiny TLR (z angl. *toll-like receptor*) nebo NLR [z angl. NOD- (*nucleotide oligomerization domain-*) *like receptors*] (Schoultz and Keita, 2019, Elia et al., 2015, Kopp and Medzhitov, 2003, Lichtenberger et al., 2004). V intestinálních epiteliálních buňkách se za normálních podmínek exprimují TLR2, TLR3, TLR4 a TLR5 (Cario and Podolsky, 2000). Bylo dokázáno, že u pacientů s ISZ se exprese těchto receptorů různě mění v závislosti na typu onemocnění. U pacientů s CD a UC je TLR4 výrazně zvýšen, kdežto TLR2 a TLR5 zůstává nezměněn. U CD je také snížena exprese TLR3, ale u UC tomu tak není. Tyto změny exprese TLR mohou být spojeny se vznikem ISZ, ale zatím není zcela jasné, jestli imunitní nerovnováha u těchto onemocnění vede opravdu k dysregulaci TLR v epiteliálních buňkách (Cario and Podolsky, 2000). Zatímco TLR zkoumají extracelulární prostor, NLR neboli NOD mají za úkol chránit intracelulární cytosolický kompartment. Tyto receptory po rozpoznání MAMP/PAMP rozeznávají jiné buněčné kinázy a adaptační proteiny, které dokážou následně spustit další signální kaskády a ty mohou vyústit v aktivaci drah, např. NF- κ B (Elia et al., 2015).

Právě signální dráha NF- κ B hraje zásadní roli v regulaci transkripčního systému kontrolující střevní biologické procesy, jako jsou buněčná proliferace, apoptóza, diferenciace, zánět a karcinogeneze. Její aktivace je do určité míry závislá na typu buněk. Zvýšená aktivace NF- κ B je často pozorována v tlustém střevě u pacientů, kteří trpí ISZ (Atreya et al., 2008). Mimo to se NF- κ B se také podílí na signalizační kaskádě, která je

aktivována pomocí NOD2 receptoru, který byl objeven jako první rizikový gen, asociující s ISZ (Hugot et al., 2001), a který vykazuje vysokou expresi v Panethových buňkách, dendritických buňkách, granulocytech a makrofázích. NOD2 je nezbytný pro udržování střevní homeostázy prostřednictvím produkce AMPs a dokáže identifikovat MDP (z angl. *muramyl dipeptid*) skrze rozpoznávající leucinové receptory a následně vyvolat protizánětlivou imunitní odpověď (Girardin et al., 2003)(Schoultz and Keita, 2019).



Obr. 1 – Schéma hlavních typů střevních buněk a molekulárních funkcí jako cílů, souvisejících s funkcí střevní bariéry pro terapeutické strategie v ISZ (upraveno z (Schoultz and Keita, 2019)).

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 = substance P, TJs = těsné spoje, TLR = z angl. toll-like receptor, Treg = regulační T-lymfocyt, VIP = vazoaktivní střevní polypeptid.

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 (Hershko et al., 1980)(Ciechanover et al., 1980). Tento proces se 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 (Kwon and Ciechanover, 2017).

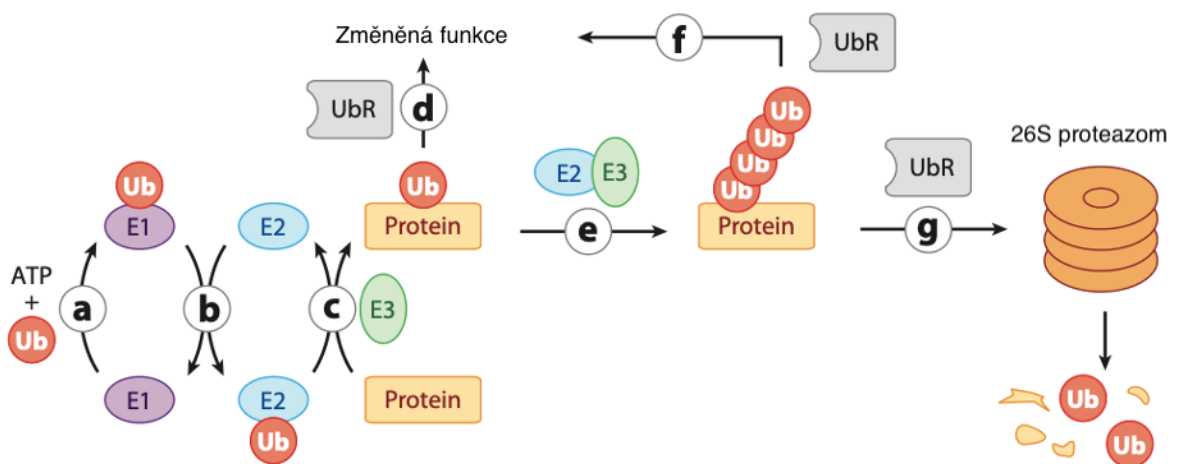
Označení cílových proteinů ubikvitinem je nejvíce známo jako signál pro jejich degradaci prostřednictvím 26S proteazomu, ale taky může vést k změně jejich buněčné lokalizace, ovlivnit jejich funkci nebo interakci s jiným proteinem. Tato post-translační modifikace proteinů je mnohostupňový a ATP-závislý proces, zprostředkován sérií enzymů: ubikvitin-aktivačního E1, ubikvitin-konjugačního E2 a ubikvitin-ligázou E3 (*Obr.2*). Výsledkem enzymatické kaskády je formování izopeptidové vazby mezi C-terminálním koncem Ub a obvykle lyzinem cílového proteinu (Deshaies and Joazeiro, 2009).

Aktivaci E1 umožňuje pouze jeden enzym - Uba1 (z angl. *ubiquitin activating enzyme E1*) (Lee and Schindelin, 2008)(Pickart and Eddins, 2004). 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 (Stewart et al., 2016). 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 (Li et al., 2008).

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 dokážou 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 (Komander et al., 2009). Tyto enzymy byly identifikovány i jako onkogeny a nádorové supresory (Hussain et al., 2009).

Ubikvitinace a deubikvitinace jsou spojeny s mnoha buněčnými procesy jako je zpracování RNA, transkripce, přeměny proteinů nebo v systému ERAD (z *angl. endoplasmatic reticulum-associated degradation*), zodpovědným za degradaci špatně sbalených proteinů asociovaných s endoplazmatickým retikulem (ER).



Obr. 2 - Ubikvitinační systém (upraveno z (Deshaies and Joazeiro, 2009)).

(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- κ B v zánětlivých a imunitních reakcích (Komander, 2009)(Akutsu et al., 2016).

Nejčastější způsoby vazby při polyubikvitinaci jsou přes K48, která vytváří 29% všech vazeb a přes K63, která vytváří 17% všech ubikvitinových vazeb (Komander, 2009). Vazba skrze K48 hraje významnou roli při degradaci proteinů v proteazomu 26S, uvnitř kterého specifické receptory tuto vazbu rozeznají. Protein, který určený k degradaci označí a prakticky okamžitě zneškodní. Proteazom 26S potřebuje minimálně čtyři Ub molekuly typu K48 na rozeznání. Čím více je K48 ubikvitinových molekul, tím je vyšší afinita mezi proteazomem a lyzinovým zbytkem proteinu (Thrower et al., 2000). 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 (Jin et al., 2008). Také byla zjištěna důležitá funkce K11 u mechanismu degradace pomocí ERAD (Jin et al., 2008)(Locke et al., 2014)(Lord et al., 2000).

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- κ B, a také mají zásadní funkci při degradaci a opravách DNA (Komander, 2009)(Chen and Sun, 2009). K63 má také důležitou úlohu v receptorové endocytóze *in vivo* a signální transdukci. Jisté studie poukázaly na to, že takto označené proteiny mohou být degradovány a rozpoznány proteazomem 26S (Saeki et al., 2009). U K63 se přišlo také na to, že je klíčový při opravách dvouvláknových zlomů DNA, u pacientek s mutovaným genem *BRCA1*, který je zodpovědný za rakovinu prsu

(Chen and Sun, 2009). Molekuly tohoto řetězce jsou pouze izopeptidového charakteru (Komander, 2009).

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 (Akutsu et al., 2016). 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 (Gatti et al., 2015). Značení přes K29 se uplatňuje jako inhibitor Wnt/ β -katenin signální dráhy, která hraje ústřední roli při embryogenezi a její deregulace je úzce spojena s vývojem a růstem nádorů (Clevers and Nusse, 2012). Poslední K33 řetězec je spojen s negativní regulací T-antigenu a proteinové kinázy sdruženou s AMPK (AMP-aktivovaná protein kináza) (Huang et al., 2010)(Al-Hakim et al., 2008).

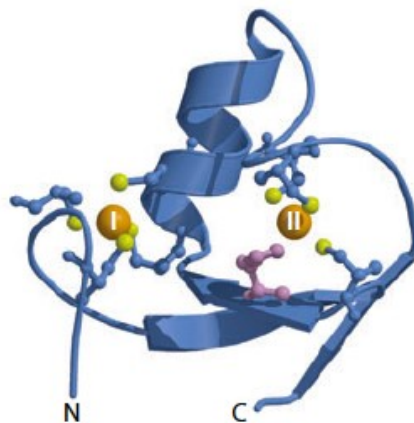
2.2 E3 ubikvitin ligázy

V savčím genomu můžeme najít přes 600 genů kódujících E3 ligázy (přehledně shrnutý např. v (Zheng and Shabek, 2017, Deshaies and Joazeiro, 2009, Metzger et al., 2012)), 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 (Metzger et al., 2012). 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 (Aravind and Koonin, 2000). Některé E3 mohou tvořit monomery jako například c-CBL, homodimery, např. RNF4, BIRC7, IDOL, cIAP a TRIM5 α 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 (Morreale and Walden, 2016, Deshaies and Joazeiro, 2009).

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 (Petroski and Deshaies, 2005) (Nguyen et al., 2017). 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 určeny k následné degradaci. V lidském genomu můžeme najít celkem sedm komplexů tvořené Cul1, Cul2, Cul3, Cul4, Cul5, Cul7 a Cul9 (Teixeira and Reed, 2013) (Morreale and Walden, 2016)(Fouad et al., 2019).

2.2.1 RING E3 ligázy

RING doména byla poprvé popsána Paul S. Freemontem a jeho kolegy (Freemont et al., 1991). 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 (Deshaies and Joazeiro, 2009, Freemont et al., 1991, Everett et al., 1993, Yanagisawa, 1995). Osm aminokyselinových zbytků (cystein nebo histidin) tvoří ve struktuře RING domény dvě vazební místa pro Zn^{2+} atomy (*Obr.3*). 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 (Pickart and Eddins, 2004).



Obr. 3 - Trojrozměrná krystalová struktura RING domény (Deshaies and Joazeiro, 2009).

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 přiblížení obou laloků přes ohybný kloub, přičemž se mění relativní orientace obou laloků (Metzger et al., 2012). 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 (Nuber et al., 1998). 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 (Matentzoglou and Scheffner, 2008). Poslední jsou „jiné“ HECT rodiny, které obsahují další domény (Morreale and Walden, 2016).

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*) (Morreale and Walden, 2016). 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*) (Spratt et al., 2014).

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 dokážou 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 (Hatakeyama and Nakayama, 2003).

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. (Beaudoin et al., 2013).

Doposud bylo identifikováno přibližně tucet E3 ligáz asociovaných s ISZ a jejich seznam neustále narůstá (Xiao et al., 2020). Valná většina takto identifikovaných E3 ligáz patří do rodiny RING, jako jsou např. Rnf183, Rnf186, TRIM62, XIAP, Pellino-3, apod. ITCH E3 ligáza jako jediná z nich patří do rodiny HECT (Perry et al., 1998). Neobvyklým typem ligázy je pak A20, která má jak ubikvitinační, tak i deubikvitinační aktivitu (Wertz et al., 2004). Veškeré tyto E3 ligázy katalyzují posttranslační proteolytické nebo neproteolytické funkce ve fyziologických nebo patologických procesech. Významná skupina těchto E3 ligáz sehrává úlohu v buněčných procesech spojených s udržením funkční bariéry střeva, jako je zánět-asociovaná signální transdukce (Zhu et al., 2020)(Fujita et al., 2018)(Yu et al., 2016)(Wu et al., 2019) kontrola buněčných spojů (Fujimoto et al., 2017), autofáгии (Lear et al., 2019), eventuálně kontrolu produkci AMPs (Damgaard et al., 2012, Cao et al., 2015, Song et al., 2016). Konkrétněji budou jednotlivé ligázy popsány níže a shrnuty v tabulce 1.

Jedním z významných kandidátů E3 ligáz, který je asociován s UC a patří do rodiny RING je RNF186. RNF186 sehrává úlohu v ERAD dráze. Jako výsledek deregulace této E3 ligázy, byla u *Rnf186*-deficientních myších pozorována zvýšená hladina vícero substrátů včetně proteinu pevných buněčných spojů - okcludinu, což vedlo k narušení permeability střevního epitelu a k vyšší citlivosti zvířat na DSS (dextran sulfát sodný)-indukovanou kolitidu (Fujimoto et al., 2017). Autoři Fujimoto a kolektiv (2017) zároveň dokázali, že zavedení lidské UC-asociované A64T mutace do myšního genu *Rnf186* vedlo k narušení E3 ligázové aktivity a k zvýšení střevního zánětu (Fujimoto et al., 2017). Další blíže studovanou genetickou variantou je varianta proteinu zkrácena o druhou transmembránovou doménu - R179X, která naopak nositelům přispívá k ochraně

proti UC (Rivas et al., 2016). Tento ochranný mechanismus tkví pravděpodobně ve ztrátě funkce nebo interakce jako důsledek nesprávné lokalizace proteinu. Inhibice lokalizace RNF186 do membrán ER pak následně může vést k ztrátě K29- a K63-spojené schopnosti polyubikvitinace proapoptického BNip1 rodiny Bcl-2 (z angl. *B-cell lymphoma*), který byl popsán jako RNF186 substrát na lidských buňkách (Wang et al., 2013). Zajímavé bylo také zjištění, že tato zkrácená varianta byla identifikovaná jako faktor, který je spojen s rizikem chronického onemocnění ledvin (Sveinbjornsson et al., 2014). Je nepochybné, že RNF186 hraje významnou roli v autofágii a aktivaci mTOR (z angl. *mechanistic Target Of Rapamycin*) komplex 1 dráhy, primárních drah podílejících se na regulaci metabolismu, odpovědi na stres a dostupnost živin, nakolik bylo dokázáno, že tato E3 ligáza ubikvitinuje proteiny důležité v kontrole těchto procesů - sestrin-2 a efrin-2 (Lear et al., 2019, Zhang et al., 2020). V neposlední řadě, *in vitro* experimenty prokázali roli RNF186 v kontrole signalizace inzulínu v primárních buňkách hepatocytů (Tong et al., 2018), i když mechanismus kontroly nebyl objasněn. Je nepochybné, že regulace střevní homeostázy přes RNF186 E3 ligázu bude komplexnější, nakolik počet jejich substrátů narůstá.

Tabulka 1 - E3 ligázy asociované s ISZ.

Rodina	E3 ligáza	Substrát	Buněčný proces	ISZ	Citace
RING	RNF186	okludin Bnip1 sestrin-2 EFNB2	Regulace stresu ER, indukce apoptózy a autofagie.	UC	(Fujimoto et al., 2017) (Wang et al., 2013) (Lear et al., 2019) (Zhang et al., 2020)
	RNF5	S100A8	Regulace degradace proteinů skrze ERAD.	UC	(Fujita et al., 2018)
	RNF183	Bcl-X1 DR5 IκBα	Kontrola aktivace dráhy NF-κB a degradace IκBα.	UC	(Yu et al., 2016) (Wu et al., 2018) (Wu et al., 2019).
	TRIM62	CARD9	Regulace TLR dráhy.	UC CD	(Cao et al., 2015)
	Pellino-3	RIPK2	Regulace signalizační dráhy NF-κB.	CD	(Yang et al., 2013)
	TRIM31	NLRP3	Inhibice aktivace inflamazómu NLRP3.	CD KRK	(Song et al., 2016)
	XIAP	NOD2	Regulace signalizační dráhy NF-κB.	UC CD	(Damgaard et al., 2012)
HECT	ITCH	NOD2	Regulace signalizační dráhy NF-κB.	UC CD	(Tao et al., 2009)
OTU	A20	RIPK1	Regulace signalizační dráhy NF-κB.	UC CD	(Garcia-Carbonell et al., 2018)

UC – ulcerózní kolitida, CD – Crohnova choroba, KRK – kolorektální karcinom.

RNF5 je ligáza z RING rodiny, u které byl identifikován substrát S100A8 (Fujita et al., 2018). S100A8 je protein o nízké molekulové hmotnosti, který je složkou kalprotektinu, což je leukocytární cytosolový protein, který na sebe váže Ca^{2+} a patří do skupiny DAMP (z angl. *danger-associated molecular patterns*). DAMP jsou biomolekuly, které dokážou podnítit a udržet zánětlivou odpověď a jsou známými hráči v etiologii ISZ (Boyapati et al., 2016). Kalprotektin slouží jako endogenní signál, který podněcuje zánícení 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- α , IL-1, IL-6 bylo výrazně zvýšených u *Rnf5*-deficientních myší (Fujita et al., 2018).

Dalším biomarkerem, který patří do RING rodiny a je asociován s ISZ, je RNF183, který je převážně exprimován v ledvinách. Ovšem některé studie, které byly experimentálně provedeny na myším modelu, poukazují na zvýšenou expresi i ve střevním epitelu po podání látky DSS nebo TNBS (kyselina 2,4,6-trinitrobenzensulfonová) (Yu et al., 2016, Wu et al., 2018). U RNF183 byla *in vitro* zjištěna negativní regulace pomocí miRNA-7, která podněcuje střevní zánět aktivací dráhy NF- κ B zvýšením ubikvitinace a degradací I κ B α (Yu et al., 2016). U RNF183 byl identifikován taky substrát DR5 receptor (z angl. *death receptor 5*) patřící do rodiny TNF (z angl. *tumor necrosis factor*), kdy je skrze vazbu K63 cílový protein ubikvitinován a následně transportován do lysozomu k degradaci. Navíc bylo dokázáno, že tato E3 ligáza spouští aktivaci TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand)-zprostředkovanou apoptózu skrze interakce s kaspázou 8 (Wu et al., 2019).

TRIM62 E3 ligáza je netypická tím, že patří do rodiny TRIM/RBCC obsahující proteiny, které nesou B-box, RING a tzv. „coiled-coil“ doménu (Huang et al., 2013). TRIM 62 má úlohu v ISZ, a to prostřednictvím regulace aktivace CARD9 (z angl. *caspase recruitment domain-containing protein 9*) - centrální signalizační molekuly ve vrozené imunitní reakci (Cao et al., 2015). *CARD9* byl identifikován jako jeden z genů asociovaných s ISZ pomocí GWAS (Beaudoin et al., 2013). Cao a kolektiv (2015) prokázali, že *CARD9* protein interaguje s TRIM62 E3 ligázou přes jeho C konec, který je zároveň zásadním pro regulaci aktivity *CARD9*. TRIM62 zprostředkovává ubikvitinaci *CARD9* skrz K27 vazbu, což vede k aktivaci CLR (C-type lectin receptors)-*CARD9* a

kanonické NF κ B signální kaskády, výsledkem čeho je produkce zánětlivých cytokinů jako TNF α , IL-6 a IL-1 β (Cao et al., 2015).

TRIM31 E3 ligáza je dalším identifikovaným členem z RING rodiny, kde její úloha v udržení homeostázy střevního epitelu je nepostradatelná. Bylo zjištěno, že má vliv na rakovinu tlustého střeva a konečníku (Wang et al., 2018), ale tento mechanismus je stále neprobádaný. Ve studii Song a kol. (2016) zkoumali funkci TRIM31 na IL-1 závislém modelu myši peritonitidy, která byla injekčně vyvolána pomocí kamence. Na tomto modelu bylo prokázáno, že TRIM31 může inhibovat aktivitu inflamazómu NLRP3 (z angl. *NLR family pyrin domain containig 3*), čímž následně vyvolá akumulaci imunitních buněk. TRIM31 byla identifikována jako zpětnovazebný supresor NLRP3, na který se přímo váže a prostřednictvím vazby K48 zprostředkuje jeho ubikvitinaci, co vede k jeho degradaci. Zajímavé je, že deficit ligázy zmírňuje závažnost UC, která byla uměle vyvolaná DSS. V tomto případě má NLRP3 ochrannou funkci (Song et al., 2016).

Zajímavé jsou ligázy XIAP (z angl. *X-linked inhibitor of apoptosis protein*), Pellino-3 a ITCH, což je z angl. *E3 ubiquitin-protein ligase Itchy homolog*. Zatímco XIAP a Pellino-3 se nachází v rodině RING, tak ITCH jako jediná z E3 ligáz v rodině HECT. A ač mají rozdílné domény, tak je spojuje hodně společného. Všechny tyto E3 ligázy hrají úlohu v kontrole degradace NOD2 u ISZ a jejich mutace jsou spojeny s imunodeficiencí (Tao et al., 2009)(Damgaard et al., 2012)(Yang et al., 2013). XIAP ligáza dokáže ubikvitinovat RIPK2 (z angl. *receptor interacting serin/threonin kinase 2*) a rekrutovat LUBAC (z angl. *linear ubiquitin chain assembly complex*) komplex k NOD2. LUBAC aktivita je klíčová pro aktivaci NF- κ B dráhy připojením lineárních Ub řetězců, čehož výsledkem je vylučování protizánětlivých cytokinů (Damgaard et al., 2012).

Pellino-3, patřící do RING rodiny, byl také popsán jako kritický pozitivní regulátor NOD2 signalizace (Yang et al., 2013, Topal and Gyrd-Hansen, 2020), přičemž mutace NOD2 jsou spojeny s CD u lidí a myších modelů (Rubino et al., 2012). Pellino-3 se váže na RIPK2 kinázu a umožňuje její ubikvitinaci skrze K63 vazby, následkem čeho dochází k aktivaci NF- κ B signální dráhy, produkci peptidů antimikrobiálního původu a zánětlivých cytokinů (Yang et al., 2013).

ITCH patří do jedné z nejpočetnějších rodin E3 ligáz - HECT (Perry et al., 1998). Název je odvozen od *Itchy* fenotypu myši, u kterých byly zkoumány genetické varianty barvy myši srsti (Hustad et al., 1995). ITCH ubikvitinuje RIPK2 kinázu skrze vazbu K63,

na který se následně může vázat NOD2 (Tao et al., 2009). Chhangani a kolektiv (2014) ve své práci poukázali na to, že ITCH E3 ligáza má také úlohu v regulaci autofágie (Chhangani et al., 2014).

Zvláštním typem ligázy je A20, která patří do tzv. OTU (z angl. *ovarian tumor*) rodiny s ubikvitinační a deubikvitinační aktivitou. Ty jsou dány přítomností sedmi C2/C2 zinkových prstů na C-terminálním konci a OTUD-deubikvitinační doménou na N-terminálním konci proteinu (Wertz et al., 2004). A20 ligáza je kódována genem *TNFAIP3*, který je exprimovaný ve střevních epitelálních buňkách. A20 protein byl popsán jako negativní regulátor signální dráhy NF- κ B, schopný katalyzovat polyubikvitinace RIPK1, čímž přispívá k degradaci kritické NF- κ B aktivační efektorové molekuly (Garcia-Carbonell et al., 2018). Mutace v tomto genu jsou spojeny s ISZ, ale také je důležitý v patogenezi jiných onemocnění jako je například artritida (Plenge et al., 2007) a celiakie (Trynka et al., 2009).

4 Závěr

Díky UPS, který zajišťuje nepřetržité proteinové změny v buňce, je neustále udržována homeostáza. Jakákoli transformace v tomto systému dokáže vyvolat nevratné změny a způsobit zánětlivá či jiná závažná onemocnění. Je známo, že E3 ubikvitin ligázy přispívají k regulaci ISZ jako je právě UC a CD.

V posledních letech bylo díky GWAS, identifikováno přibližně 200 rizikových lokusů spjatých se zánětlivými onemocněními střev. V mnoha jiných studiích (např. v (Zhang et al., 2020)) bylo identifikovaných přibližně tucet E3 ligáz RNF186, RNF5, RNF183, TRIM62, Pellino-3, TRIM31, XIAP, ITCH a A20, u kterých bylo dokázáno, že se zásadním způsobem podílejí na regulaci střevní homeostázy, kde sehrávají krucální roli v buněčných procesech jako je např. zánětem-asociovaná signální transdukce, kontrola buněčných spojů, autofágie, případně kontrola produkce antimikrobiálních peptidů.

Budoucí studie v této oblasti jsou zcela nezbytné a díky těmto různým vědeckým výzkumům GWAS, se postupem času s největší pravděpodobností podaří identifikovat větší množství dalších citlivých lokusů a jejich genetických variant. V minulém roce vyšla nová publikace od Zhang a kol. (2020) (Zhang et al., 2020), která se touto problematikou zabývá.

Cílem této práce bylo podat ucelenější přehled genetiky kandidátních E3 ubikvitin ligáz, které mají významnou úlohu v regulaci střevní homeostázy u ISZ, jako je CD a UC.

Vzhledem k tomu, že ISZ trpí ve světě čím dál tím více převážně mladé populace, tak je velmi žádoucí objasnit přesnější patologii a mechanismy ISZ. 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

- ADAMS, S. M. & BORNEMANN, P. H. 2013. Ulcerative colitis. *Am Fam Physician*, 87, 699-705.
- AKUTSU, M., DIKIC, I. & BREMM, A. 2016. Ubiquitin chain diversity at a glance. *J Cell Sci*, 129, 875-80.
- AL-HAKIM, A. K., ZAGORSKA, A., CHAPMAN, L., DEAK, M., PEGGIE, M. & ALESSI, D. R. 2008. Control of AMPK-related kinases by USP9X and atypical Lys(29)/Lys(33)-linked polyubiquitin chains. *Biochem J*, 411, 249-60.
- ARAVIND, L. & KOONIN, E. V. 2000. The U box is a modified RING finger - a common domain in ubiquitination. *Curr Biol*, 10, R132-4.
- ASLAM, S. N., ERBS, G., MORRISSEY, K. L., NEWMAN, M. A., CHINCHILLA, D., BOLLER, T., MOLINARO, A., JACKSON, R. W. & COOPER, R. M. 2009. Microbe-associated molecular pattern (MAMP) signatures, synergy, size and charge: influences on perception or mobility and host defence responses. *Mol Plant Pathol*, 10, 375-87.
- ATREYA, I., ATREYA, R. & NEURATH, M. F. 2008. NF-kappaB in inflammatory bowel disease. *J Intern Med*, 263, 591-6.
- BAUMGART, D. C. & SANDBORN, W. J. 2012. Crohn's disease. *Lancet*, 380, 1590-605.
- BEAUDOIN, M., GOYETTE, P., BOUCHER, G., LO, K. S., RIVAS, M. A., STEVENS, C., ALIKASHANI, A., LADOUCEUR, M., ELLINGHAUS, D., TORKVIST, L., GOEL, G., LAGACE, C., ANNESE, V., BITTON, A., BEGUN, J., BRANT, S. R., BRESSO, F., CHO, J. H., DUERR, R. H., HALFVARSON, J., MCGOVERN, D. P., RADFORD-SMITH, G., SCHREIBER, S., SCHUMM, P. L., SHARMA, Y., SILVERBERG, M. S., WEERSMA, R. K., QUEBEC, I. B. D. G. C., CONSORTIUM, N. I. G., INTERNATIONAL, I. B. D. G. C., D'AMATO, M., VERMEIRE, S., FRANKE, A., LETTRE, G., XAVIER, R. J., DALY, M. J. & RIOUX, J. D. 2013. Deep resequencing of GWAS loci identifies rare variants in CARD9, IL23R and RNF186 that are associated with ulcerative colitis. *PLoS Genet*, 9, e1003723.
- BOYAPATI, R. K., ROSSI, A. G., SATSANGI, J. & HO, G. T. 2016. Gut mucosal DAMPs in IBD: from mechanisms to therapeutic implications. *Mucosal Immunol*, 9, 567-82.
- CAO, Z., CONWAY, K. L., HEATH, R. J., RUSH, J. S., LESHCHINER, E. S., RAMIREZ-ORTIZ, Z. G., NEDELSKY, N. B., HUANG, H., NG, A., GARDET, A., CHENG, S. C., SHAMJI, A. F., RIOUX, J. D., WIJMENGA, C., NETEA, M. G., MEANS, T. K., DALY, M. J. & XAVIER, R. J. 2015. Ubiquitin Ligase TRIM62 Regulates CARD9-Mediated Anti-fungal Immunity and Intestinal Inflammation. *Immunity*, 43, 715-26.
- CARIO, E. & PODOLSKY, D. K. 2000. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun*, 68, 7010-7.
- CHEN, Z. J. & SUN, L. J. 2009. Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling. *Mol Cell*, 33, 275-86.
- CHHANGANI, D., UPADHYAY, A., AMANULLAH, A., JOSHI, V. & MISHRA, A. 2014. Ubiquitin ligase ITCH recruitment suppresses the aggregation and cellular toxicity of cytoplasmic misfolded proteins. *Sci Rep*, 4, 5077.

- CIECHANOVER, A., HELLER, H., ELIAS, S., HAAS, A. L. & HERSHKO, A. 1980. ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77, 1365-8.
- CLEVERS, H. & NUSSE, R. 2012. Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell*, 149, 1192-205.
- CLEYNEN, I., BOUCHER, G., JOSTINS, L., SCHUMM, L. P., ZEISSIG, S., AHMAD, T., ANDERSEN, V., ANDREWS, J. M., ANNESE, V., BRAND, S., BRANT, S. R., CHO, J. H., DALY, M. J., DUBINSKY, M., DUERR, R. H., FERGUSON, L. R., FRANKE, A., GEARRY, R. B., GOYETTE, P., HAKONARSON, H., HALFVARSON, J., HOV, J. R., HUANG, H., KENNEDY, N. A., KUPCINSKAS, L., LAWRENCE, I. C., LEE, J. C., SATSANGI, J., SCHREIBER, S., THEATRE, E., VAN DER MEULEN-DE JONG, A. E., WEERSMA, R. K., WILSON, D. C., INTERNATIONAL INFLAMMATORY BOWEL DISEASE GENETICS, C., PARKES, M., VERMEIRE, S., RIOUX, J. D., MANSFIELD, J., SILVERBERG, M. S., RADFORD-SMITH, G., MCGOVERN, D. P., BARRETT, J. C. & LEES, C. W. 2016. Inherited determinants of Crohn's disease and ulcerative colitis phenotypes: a genetic association study. *Lancet*, 387, 156-67.
- DAMGAARD, R. B., NACHBUR, U., YABAL, M., WONG, W. W., FIIL, B. K., KASTIRR, M., RIESER, E., RICKARD, J. A., BANKOVACKI, A., PESCHEL, C., RULAND, J., BEKKER-JENSEN, S., MAILAND, N., KAUFMANN, T., STRASSER, A., WALCZAK, H., SILKE, J., JOST, P. J. & GYRD-HANSEN, M. 2012. The ubiquitin ligase XIAP recruits LUBAC for NOD2 signaling in inflammation and innate immunity. *Mol Cell*, 46, 746-58.
- *DESHAIES, R. J. & JOAZEIRO, C. A. 2009. RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem*, 78, 399-434.
- EDELBLUM, K. L., YAN, F., YAMAOKA, T. & POLK, D. B. 2006. Regulation of apoptosis during homeostasis and disease in the intestinal epithelium. *Inflamm Bowel Dis*, 12, 413-24.
- ELIA, P. P., TOLENTINO, Y. F., BERNARDAZZI, C. & DE SOUZA, H. S. 2015. The role of innate immunity receptors in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Mediators Inflamm*, 2015, 936193.
- EVERETT, R. D., BARLOW, P., MILNER, A., LUISI, B., ORR, A., HOPE, G. & LYON, D. 1993. A novel arrangement of zinc-binding residues and secondary structure in the C3HC4 motif of an alpha herpes virus protein family. *J Mol Biol*, 234, 1038-47.
- FOUAD, S., WELLS, O. S., HILL, M. A. & D'ANGIOLELLA, V. 2019. Cullin Ring Ubiquitin Ligases (CRLs) in Cancer: Responses to Ionizing Radiation (IR) Treatment. *Front Physiol*, 10, 1144.
- FREEMONT, P. S., HANSON, I. M. & TROWSDALE, J. 1991. A novel cysteine-rich sequence motif. *Cell*, 64, 483-4.
- FUJIMOTO, K., KINOSHITA, M., TANAKA, H., OKUZAKI, D., SHIMADA, Y., KAYAMA, H., OKUMURA, R., FURUTA, Y., NARAZAKI, M., TAMURA, A., HATAKEYAMA, S., IKAWA, M., TSUCHIYA, K., WATANABE, M., KUMANOGOH, A., TSUKITA, S. & TAKEDA, K. 2017. Regulation of intestinal homeostasis by the ulcerative colitis-associated gene RNF186. *Mucosal Immunol*, 10, 446-459.
- FUJITA, Y., KHATEB, A., LI, Y., TINOCO, R., ZHANG, T., BAR-YOSEPH, H., TAM, M. A., CHOWERS, Y., SABO, E., GERASSY-VAINBERG, S., STAROSVETSKY, E., JAMES, B., BROWN, K., SHEN-ORR, S. S., BRADLEY, L. M., TESSIER, P. A. & RONAI, Z. A. 2018. Regulation of S100A8 Stability by RNF5 in Intestinal Epithelial

- Cells Determines Intestinal Inflammation and Severity of Colitis. *Cell Rep*, 24, 3296-3311 e6.
- GARCIA-CARBONELL, R., WONG, J., KIM, J. Y., CLOSE, L. A., BOLAND, B. S., WONG, T. L., HARRIS, P. A., HO, S. B., DAS, S., ERNST, P. B., SASIK, R., SANDBORN, W. J., BERTIN, J., GOUGH, P. J., CHANG, J. T., KELLIHER, M., BOONE, D., GUMA, M. & KARIN, M. 2018. Elevated A20 promotes TNF-induced and RIPK1-dependent intestinal epithelial cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115, E9192-E9200.
- GATTI, M., PINATO, S., MAIOLICA, A., ROCCHIO, F., PRATO, M. G., AEBERSOLD, R. & PENENGO, L. 2015. RNF168 promotes noncanonical K27 ubiquitination to signal DNA damage. *Cell Rep*, 10, 226-38.
- GIRARDIN, S. E., BONECA, I. G., VIALA, J., CHAMAILLARD, M., LABIGNE, A., THOMAS, G., PHILPOTT, D. J. & SANSONETTI, P. J. 2003. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem*, 278, 8869-72.
- HATAKEYAMA, S. & NAKAYAMA, K. I. 2003. U-box proteins as a new family of ubiquitin ligases. *Biochem Biophys Res Commun*, 302, 635-45.
- HERSHKO, A., CIECHANOVER, A., HELLER, H., HAAS, A. L. & ROSE, I. A. 1980. 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*, 77, 1783-6.
- HUANG, F., XIAO, H., SUN, B. L. & YANG, R. G. 2013. Characterization of TRIM62 as a RING finger E3 ubiquitin ligase and its subcellular localization. *Biochem Biophys Res Commun*, 432, 208-13.
- HUANG, H., JEON, M. S., LIAO, L., YANG, C., ELLY, C., YATES, J. R., 3RD & LIU, Y. C. 2010. K33-linked polyubiquitination of T cell receptor-zeta regulates proteolysis-independent T cell signaling. *Immunity*, 33, 60-70.
- HUGOT, J. P., CHAMAILLARD, M., ZOUALI, H., LESAGE, S., CEZARD, J. P., BELAICHE, J., ALMER, S., TYSK, C., O'MORAIN, C. A., GASSULL, M., BINDER, V., FINKEL, Y., CORTOT, A., MODIGLIANI, R., LAURENT-PUIG, P., GOWER-ROUSSEAU, C., MACRY, J., COLOMBEL, J. F., SAHBATOU, M. & THOMAS, G. 2001. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, 411, 599-603.
- HUSSAIN, S., ZHANG, Y. & GALARDY, P. J. 2009. DUBs and cancer: the role of deubiquitinating enzymes as oncogenes, non-oncogenes and tumor suppressors. *Cell Cycle*, 8, 1688-97.
- HUSTAD, C. M., PERRY, W. L., SIRACUSA, L. D., RASBERRY, C., COBB, L., CATTANACH, B. M., KOVATCH, R., COPELAND, N. G. & JENKINS, N. A. 1995. Molecular genetic characterization of six recessive viable alleles of the mouse agouti locus. *Genetics*, 140, 255-65.
- JIN, L., WILLIAMSON, A., BANERJEE, S., PHILIPP, I. & RAPE, M. 2008. Mechanism of ubiquitin-chain formation by the human anaphase-promoting complex. *Cell*, 133, 653-65.
- JOHANSSON, M. E., PHILLIPSON, M., PETERSSON, J., VELCICH, A., HOLM, L. & HANSSON, G. C. 2008. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 15064-9.
- KHOR, B., GARDET, A. & XAVIER, R. J. 2011. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, 474, 307-17.
- KOMANDER, D. 2009. The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochem Soc Trans*, 37, 937-53.

- KOMANDER, D., CLAGUE, M. J. & URBE, S. 2009. Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 550-63.
- KOPP, E. & MEDZHITOV, R. 2003. Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol*, 15, 396-401.
- KWON, Y. T. & CIECHANOVER, A. 2017. The Ubiquitin Code in the Ubiquitin-Proteasome System and Autophagy. *Trends Biochem Sci*, 42, 873-886.
- LEAR, T. B., LOCKWOOD, K. C., OUYANG, Y., EVANKOVICH, J. W., LARSEN, M. B., LIN, B., LIU, Y. & CHEN, B. B. 2019. The RING-type E3 ligase RNF186 ubiquitinates Sestrin-2 and thereby controls nutrient sensing. *J Biol Chem*, 294, 16527-16534.
- LEE, I. & SCHINDELIN, H. 2008. Structural insights into E1-catalyzed ubiquitin activation and transfer to conjugating enzymes. *Cell*, 134, 268-78.
- LI, W., BENGTSON, M. H., ULBRICH, A., MATSUDA, A., REDDY, V. A., ORTH, A., CHANDA, S. K., BATALOV, S. & JOAZEIRO, C. A. 2008. 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*, 3, e1487.
- LICHTENBERGER, G. S., FLAVELL, R. A. & ALEXOPOULOU, L. 2004. Innate immunity and apoptosis in IBD. *Inflamm Bowel Dis*, 10 Suppl 1, S58-62.
- LOCKE, M., TOTH, J. I. & PETROSKI, M. D. 2014. Lys11- and Lys48-linked ubiquitin chains interact with p97 during endoplasmic-reticulum-associated degradation. *Biochem J*, 459, 205-16.
- LORD, J. M., DAVEY, J., FRIGERIO, L. & ROBERTS, L. M. 2000. Endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Semin Cell Dev Biol*, 11, 159-64.
- MATENTZOGLU, K. & SCHEFFNER, M. 2008. Ubiquitin ligase E6-AP and its role in human disease. *Biochem Soc Trans*, 36, 797-801.
- METZGER, M. B., HRISTOVA, V. A. & WEISSMAN, A. M. 2012. HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance. *J Cell Sci*, 125, 531-7.
- MORREALE, F. E. & WALDEN, H. 2016. Types of Ubiquitin Ligases. *Cell*, 165, 248-248 e1.
- NANDI, D., TAHILIANI, P., KUMAR, A. & CHANDU, D. 2006. The ubiquitin-proteasome system. *J Biosci*, 31, 137-55.
- NGUYEN, H. C., WANG, W. & XIONG, Y. 2017. Cullin-RING E3 Ubiquitin Ligases: Bridges to Destruction. *Subcell Biochem*, 83, 323-347.
- NUBER, U., SCHWARZ, S. E. & SCHEFFNER, M. 1998. The ubiquitin-protein ligase E6-associated protein (E6-AP) serves as its own substrate. *Eur J Biochem*, 254, 643-9.
- ORDAS, I., ECKMANN, L., TALAMINI, M., BAUMGART, D. C. & SANDBORN, W. J. 2012. Ulcerative colitis. *Lancet*, 380, 1606-19.
- PERRY, W. L., HUSTAD, C. M., SWING, D. A., O'SULLIVAN, T. N., JENKINS, N. A. & COPELAND, N. G. 1998. The itchy locus encodes a novel ubiquitin protein ligase that is disrupted in a18H mice. *Nat Genet*, 18, 143-6.
- PETROSKI, M. D. & DESHAIES, R. J. 2005. Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 9-20.
- PICKART, C. M. & EDDINS, M. J. 2004. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta*, 1695, 55-72.
- PLENGE, R. M., COTSAPAS, C., DAVIES, L., PRICE, A. L., DE BAKKER, P. I., MALLER, J., PE'ER, I., BURTT, N. P., BLUMENSTIEL, B., DEFELICE, M., PARKIN, M., BARRY, R., WINSLOW, W., HEALY, C., GRAHAM, R. R., NEALE, B. M., IZMAILOVA, E., ROUBENOFF, R., PARKER, A. N., GLASS, R., KARLSON, E. W., MAHER, N., HAFLER, D. A., LEE, D. M., SELDIN, M. F., REMMERS, E. F., LEE, A. T., PADYUKOV, L., ALFREDSSON, L., COBLYN, J., WEINBLATT, M. E., GABRIEL, S. B., PURCELL, S., KLARESKOG, L., GREGERSEN, P. K., SHADICK,

- N. A., DALY, M. J. & ALTSHULER, D. 2007. Two independent alleles at 6q23 associated with risk of rheumatoid arthritis. *Nat Genet*, 39, 1477-82.
- POPOVIC, D., VUCIC, D. & DIKIC, I. 2014. Ubiquitination in disease pathogenesis and treatment. *Nat Med*, 20, 1242-53.
- RIVAS, M. A., GRAHAM, D., SULEM, P., STEVENS, C., DESCH, A. N., GOYETTE, P., GUDBJARTSSON, D., JONSDOTTIR, I., THORSTEINSDOTTIR, U., DEGENHARDT, F., MUCHA, S., KURKI, M. I., LI, D., D'AMATO, M., ANNESE, V., VERMEIRE, S., WEERSMA, R. K., HALFVARSON, J., PAAVOLA-SAKKI, P., LAPPALAINEN, M., LEK, M., CUMMINGS, B., TUKIAINEN, T., HARITUNIANS, T., HALME, L., KOSKINEN, L. L., ANANTHAKRISHNAN, A. N., LUO, Y., HEAP, G. A., VISSCHEDIJK, M. C., CONSORTIUM, U. I. G., CONSORTIUM, N. I. G., MACARTHUR, D. G., NEALE, B. M., AHMAD, T., ANDERSON, C. A., BRANT, S. R., DUERR, R. H., SILVERBERG, M. S., CHO, J. H., PALOTIE, A., SAAVALAINEN, P., KONTULA, K., FARKKILA, M., MCGOVERN, D. P., FRANKE, A., STEFANSSON, K., RIOUX, J. D., XAVIER, R. J., DALY, M. J., BARRETT, J., DE LANE, K., EDWARDS, C., HART, A., HAWKEY, C., JOSTINS, L., KENNEDY, N., LAMB, C., LEE, J., LEES, C., MANSFIELD, J., MATHEW, C., MOWATT, C., NEWMAN, B., NIMMO, E., PARKES, M., POLLARD, M., PRESCOTT, N., RANDALL, J., RICE, D., SATSANGI, J., SIMMONS, A., TREMELLING, M., UHLIG, H., WILSON, D., ABRAHAM, C., ACHKAR, J. P., BITTON, A., BOUCHER, G., CROITORU, K., FLESHNER, P., GLAS, J., KUGATHASAN, S., LIMBERGEN, J. V., MILGROM, R., PROCTOR, D., REGUEIRO, M., SCHUMM, P. L., SHARMA, Y., STEMPAK, J. M., TARGAN, S. R. & WANG, M. H. 2016. A protein-truncating R179X variant in RNF186 confers protection against ulcerative colitis. *Nat Commun*, 7, 12342.
- *RODA, G., CHIEN NG, S., KOTZE, P. G., ARGOLLO, M., PANACCIONE, R., SPINELLI, A., KASER, A., PEYRIN-BIROULET, L. & DANESE, S. 2020. Crohn's disease. *Nat Rev Dis Primers*, 6, 22.
- RUBINO, S. J., SELVANANTHAM, T., GIRARDIN, S. E. & PHILPOTT, D. J. 2012. Nod-like receptors in the control of intestinal inflammation. *Curr Opin Immunol*, 24, 398-404.
- SAEKI, Y., KUDO, T., SONE, T., KIKUCHI, Y., YOKOSAWA, H., TOH-E, A. & TANAKA, K. 2009. Lysine 63-linked polyubiquitin chain may serve as a targeting signal for the 26S proteasome. *EMBO J*, 28, 359-71.
- SCHMITZ, H., BARMEYER, C., FROMM, M., RUNKEL, N., FOSS, H. D., BENTZEL, C. J., RIECKEN, E. O. & SCHULZKE, J. D. 1999. Altered tight junction structure contributes to the impaired epithelial barrier function in ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 116, 301-9.
- SCHOULTZ, I. & KEITA, A. V. 2019. Cellular and Molecular Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Disease-Focusing on Intestinal Barrier Function. *Cells*, 8.
- SHIRAZI, T., LONGMAN, R. J., CORFIELD, A. P. & PROBERT, C. S. 2000. Mucins and inflammatory bowel disease. *Postgrad Med J*, 76, 473-8.
- SONG, H., LIU, B., HUAI, W., YU, Z., WANG, W., ZHAO, J., HAN, L., JIANG, G., ZHANG, L., GAO, C. & ZHAO, W. 2016. The E3 ubiquitin ligase TRIM31 attenuates NLRP3 inflammasome activation by promoting proteasomal degradation of NLRP3. *Nat Commun*, 7, 13727.
- SPRATT, D. E., WALDEN, H. & SHAW, G. S. 2014. RBR E3 ubiquitin ligases: new structures, new insights, new questions. *Biochem J*, 458, 421-37.
- STEWART, M. D., RITTERHOFF, T., KLEVIT, R. E. & BRZOVIC, P. S. 2016. E2 enzymes: more than just middle men. *Cell Res*, 26, 423-40.

- SUN, J., SHEN, X., LI, Y., GUO, Z., ZHU, W., ZUO, L., ZHAO, J., GU, L., GONG, J. & LI, J. 2016. Therapeutic Potential to Modify the Mucus Barrier in Inflammatory Bowel Disease. *Nutrients*, 8.
- SVEINBJORNSSON, G., MIKAELSDOTTIR, E., PALSSON, R., INDRIDASON, O. S., HOLM, H., JONASDOTTIR, A., HELGASON, A., SIGURDSSON, S., JONASDOTTIR, A., SIGURDSSON, A., EYJOLFSSON, G. I., SIGURDARDOTTIR, O., MAGNUSSON, O. T., KONG, A., MASSON, G., SULEM, P., OLAFSSON, I., THORSTEINSDOTTIR, U., GUDBJARTSSON, D. F. & STEFANSSON, K. 2014. Rare mutations associating with serum creatinine and chronic kidney disease. *Hum Mol Genet*, 23, 6935-43.
- TAO, M., SCACHERI, P. C., MARINIS, J. M., HARHAJ, E. W., MATESIC, L. E. & ABBOTT, D. W. 2009. ITC K63-ubiquitinates the NOD2 binding protein, RIP2, to influence inflammatory signaling pathways. *Curr Biol*, 19, 1255-63.
- *TEIXEIRA, L. K. & REED, S. I. 2013. Ubiquitin ligases and cell cycle control. *Annu Rev Biochem*, 82, 387-414.
- THROWER, J. S., HOFFMAN, L., RECHSTEINER, M. & PICKART, C. M. 2000. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J*, 19, 94-102.
- TONG, X., ZHANG, Q., WANG, L., JI, Y., ZHANG, L., XIE, L., CHEN, W. & ZHANG, H. 2018. RNF186 impairs insulin sensitivity by inducing ER stress in mouse primary hepatocytes. *Cell Signal*, 52, 155-162.
- TOPAL, Y. & GYRD-HANSEN, M. 2020. RIPK2 NODs to XIAP and IBD. *Semin Cell Dev Biol*.
- TRYNKA, G., ZHERNAKOVA, A., ROMANOS, J., FRANKE, L., HUNT, K. A., TURNER, G., BRUINENBERG, M., HEAP, G. A., PLATTEEL, M., RYAN, A. W., DE KOVEL, C., HOLMES, G. K., HOWDLE, P. D., WALTERS, J. R., SANDERS, D. S., MULDER, C. J., MEARIN, M. L., VERBEEK, W. H., TRIMBLE, V., STEVENS, F. M., KELLEHER, D., BARISANI, D., BARDELLA, M. T., MCMANUS, R., VAN HEEL, D. A. & WIJMENGA, C. 2009. Coeliac disease-associated risk variants in TNFAIP3 and REL implicate altered NF-kappaB signalling. *Gut*, 58, 1078-83.
- VAN DER SLUIS, M., DE KONING, B. A., DE BRUIJN, A. C., VELCICH, A., MEIJERINK, J. P., VAN GOUDOEVER, J. B., BULLER, H. A., DEKKER, J., VAN SEUNINGEN, I., RENES, I. B. & EINERHAND, A. W. 2006. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology*, 131, 117-29.
- WANG, H., YAO, L., GONG, Y. & ZHANG, B. 2018. TRIM31 regulates chronic inflammation via NF-kappaB signal pathway to promote invasion and metastasis in colorectal cancer. *Am J Transl Res*, 10, 1247-1259.
- WANG, P., WU, Y., LI, Y., ZHENG, J. & TANG, J. 2013. A novel RING finger E3 ligase RNF186 regulate ER stress-mediated apoptosis through interaction with BNip1. *Cell Signal*, 25, 2320-33.
- WERTZ, I. E., O'ROURKE, K. M., ZHOU, H., EBY, M., ARAVIND, L., SESHAGIRI, S., WU, P., WIESMANN, C., BAKER, R., BOONE, D. L., MA, A., KOONIN, E. V. & DIXIT, V. M. 2004. De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature*, 430, 694-9.
- WU, Y., KIMURA, Y., OKAMOTO, T., MATSUHISA, K., ASADA, R., SAITO, A., SAKAUE, F., IMAIZUMI, K. & KANEKO, M. 2019. Inflammatory bowel disease-associated ubiquitin ligase RNF183 promotes lysosomal degradation of DR5 and TRAIL-induced caspase activation. *Sci Rep*, 9, 20301.

- WU, Y., LI, X., JIA, J., ZHANG, Y., LI, J., ZHU, Z., WANG, H., TANG, J. & HU, J. 2018. Transmembrane E3 ligase RNF183 mediates ER stress-induced apoptosis by degrading Bcl-xL. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115, E2762-E2771.
- XIAO, Y., HUANG, Q., WU, Z. & CHEN, W. 2020. Roles of protein ubiquitination in inflammatory bowel disease. *Immunobiology*, 225, 152026.
- YANAGISAWA, S. 1995. A novel DNA-binding domain that may form a single zinc finger motif. *Nucleic Acids Res*, 23, 3403-10.
- YANG, S., WANG, B., HUMPHRIES, F., JACKSON, R., HEALY, M. E., BERGIN, R., AVIELLO, G., HALL, B., MCNAMARA, D., DARBY, T., QUINLAN, A., SHANAHAN, F., MELGAR, S., FALLON, P. G. & MOYNAGH, P. N. 2013. Pellino3 ubiquitinates RIP2 and mediates Nod2-induced signaling and protective effects in colitis. *Nat Immunol*, 14, 927-36.
- YU, Q., ZHANG, S., CHAO, K., FENG, R., WANG, H., LI, M., CHEN, B., HE, Y., ZENG, Z. & CHEN, M. 2016. E3 Ubiquitin ligase RNF183 Is a Novel Regulator in Inflammatory Bowel Disease. *J Crohns Colitis*, 10, 713-25.
- ZHANG, H., CUI, Z., CHENG, D., DU, Y., GUO, X., GAO, R., CHEN, J., SUN, W., HE, R., MA, X., PENG, Q., MARTIN, B. N., YAN, W., RONG, Y. & WANG, C. 2020. RNF186 regulates EFNB1 (ephrin B1)-EPHB2-induced autophagy in the colonic epithelial cells for the maintenance of intestinal homeostasis. *Autophagy*, 1-18.
- *ZHENG, N. & SHABEK, N. 2017. Ubiquitin Ligases: Structure, Function, and Regulation. *Annu Rev Biochem*, 86, 129-157.
- ZHU, L., LI, Y., ZHOU, L., YANG, G., WANG, Y., HAN, J., LI, L. & ZHANG, S. 2020. Role of RING-Type E3 Ubiquitin Ligases in Inflammatory Signalling and Inflammatory Bowel Disease. *Mediators Inflamm*, 2020, 5310180.

Review jsou označeny hvězdičkou.