

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Tomáš Dvořáček

Funkce adaptorového proteinu NDFIP1 v T lymfocytech
Function of adaptor protein NDFIP1 in T lymphocytes

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Mgr. Tomáš Brdička, Ph.D.

Praha, 2020

Poděkování:

Rád bych poděkoval svému školiteli Mgr. Tomáši Brdičkovi, Ph.D. za vstřícnost a cenné rady při vedení této bakalářské práce.

Prohlášení:

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

V Praze, 03.06. 2020

Podpis:

Abstrakt

T lymfocyty specificky rozpoznávají a zprostředkovávají imunitní odpověď proti patogenním agens, která ohrožují zdraví hostitelského organismu. Tato schopnost však musí být přísně kontrolovaná, aby nedošlo k reakci vůči neškodným antigenům nebo proti antigenům vlastních tkání, která by zbytečně poškozovala organismus. Pro udržení této tolerance existuje řada molekulárních mechanismů regulujících T lymfocyty. Protein NDFIP1 je důležitou součástí těchto mechanismů. Tento transmembránový adaptorový protein váže E3 ubikvitin ligázy z rodiny NEDD4, které jsou za normálních okolností v neaktivním stavu. Vazba NDFIP1 vede k jejich aktivaci a umožní těmto ligázám kontrolovat chování T lymfocytů. Deficience NDFIP1 u myši vyvolává vývoj zánětlivého onemocnění postihujícího kůži, plíce a trávicí soustavu. Charakteristické je pro něj zejména zvýšené množství aktivovaných CD4⁺ T lymfocytů a eozinofilů, které infiltrují postižené tkáně. Toto onemocnění je nakonec smrtelné. Cílem této práce je popsat funkci proteinu NDFIP1 v T lymfocytech, které jsou zásadně důležité pro rozvoj tohoto onemocnění. Nepřítomnost NDFIP1 v T buňkách naruší několik molekulárních mechanismů, jako je degradace transkripčních faktorů JUNB a ROR γ T a regulace aktivity dráhy mTOR. Tyto a zřejmě i další dosud neznámé molekulární mechanismy se pak podílejí na zvýšené aktivaci a proliferaci T lymfocytů, zvýšené diferenciaci Th2 a Th17 lymfocytů, nadprodukcii IL-4 a destabilizaci Treg lymfocytů. Důsledkem je pak rozvoj patologického zánětu.

Klíčová slova: NDFIP1, ITCH, NEDD4, T lymfocyty, JUNB, E3 ubikvitin ligázy, IL-4

Abstract

T lymphocytes specifically recognize and promote immune response against pathogenic agents, which endanger health of host organism. However, this ability must be tightly controlled to prevent response against innocuous or self-tissue antigens, which would unnecessarily damage an organism. For a maintenance of this tolerance, there is a number of molecular mechanisms regulating T lymphocytes. The protein NDFIP1 is important component of these mechanisms. This transmembrane adaptor protein binds to E3 ubiquitin ligases from the NEDD4 family, which are under normal circumstances in inactive state. Binding of NDFIP1 leads to their activation and facilitates regulation of T cell behaviour by these ligases. NDFIP1 deficiency in mice causes the development of inflammatory disease affecting the skin, lungs and gastrointestinal tract. It is characterized by increased numbers of activated CD4⁺ T lymphocytes and eosinophils, which infiltrate the affected tissues. The disease is ultimately fatal. The aim of this work is to describe the function of the NDFIP1 protein in T lymphocytes, which are essential for the development of this pathology. The absence of NDFIP1 in T cells disrupts several molecular mechanisms, including the degradation of the transcription factors JUNB and ROR γ T and the regulation of mTOR pathway activity. These and probably other hitherto unknown molecular events then contribute to increased activation and proliferation of T lymphocytes, increased differentiation of Th2 and Th17 lymphocytes, overproduction of IL-4 and destabilization of Treg lymphocytes. The result is the development of pathological inflammation.

Key words: NDFIP1, ITCH, NEDD4, T lymphocytes, JUNB, E3 ubiquitin ligases, IL-4

Seznam použitých zkratek

NDFIP – NEDD4 family interacting protein

NFκB – Nuclear factor kappa B

ATP – adenosintrifosfát

AMP – adenosinmonofosfát

RING – Really Interesting New Gene

RBR – Ring between ring

HECT – Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus

C-CBL – c-Casitas B-lineage Lymphoma

GRB – Growth factor receptor-bound protein

EGF – Epidermal growth factor

SMAD – Mothers against decapentaplegic homolog

UBCH7/UBE2L3 – Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3

SMURF – SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase

E6-AP – E6-associated protein

N4WBP5 – Nedd4 WW domain-binding protein 5

NEDD4 – Neural precursor cell expressed developmentally down-regulator protein 4

WWP – WW domain-containing E3 ubiquitin protein ligase

AIP – ABI3-interacting protein

RSP5P – Reverses Spt⁻ Phenotype

JNK1 – c-Jun N-terminal kinase 1

GLI – Gliotactin

CD – cluster of differentiation

RAG – Recombination activating gene

IL – Interleukin

WT – wild type

IFN – Interferon

Ig – immunoglobulin

FRAP – Fluorescence recovery after photobleaching

GFP – Green fluorescent protein

ROR – RAR-related orphan receptor

BLIMP – B lymphocyte-induced maturation protein
GM-CSF – Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
TCR – T cell receptor
TNF – Tumor necrosis factor
CCL – C-C motif chemokine ligand
FOXP3 – Forkhead box P3
TGF – Transforming growth factor
ICOS – Inducible T cell costimulator
GITR – Glucocorticoid-induced TNFR-related
PD – Programmed cell death
CNS – Conserved non-coding DNA sequence
mTORC – mammalian/mechanistic Target of rapamycin complex
JAK – Janus kinase
NFAT – Nuclear factor of activated T-cells
ERK – Extracellular-signal-regulated kinase
MAP – Mitogen activated protein
STAT – Signal transducer and activation of stranscription
Kru – krusty
BIM – Bcl2-interacting mediator of cell death
AIRE – Autoimmune regulator
HEL – Hen egg lysozyme

Obsah

1.	Úvod	1
2.	Ubikvitinace proteinů	2
2.1.	Enzymy provádějící ubikvitinaci	2
3.	Protein NDFIP1	4
4.	Rodina NEDD4	5
5.	Regulace aktivity E3 ligáz z rodiny NEDD4	7
5.1.	Autoinhibiční mechanismus E3 ligáz z rodiny NEDD4	7
5.2.	Aktivace E3 ligáz z rodiny NEDD4	7
6.	Funkce proteinu NDFIP1 v T lymfocytech	8
6.1.	Deficience NDFIP1 a její vliv na diferenciaci T lymfocytů	8
6.1.1.	Vztah NDFIP1 k lidským chorobám	9
6.1.2.	Buňky ovlivněné deficiencí NDFIP1	10
6.1.3.	Diferenciaci <i>Ndfip1</i> ^{-/-} T lymfocytů	10
6.1.4.	NDFIP1-dependentní degradace JUNB ligázou ITCH	11
6.1.5.	Rozdíly mezi <i>Itch</i> ^{-/-} a <i>Ndfip1</i> ^{-/-} myšmi	12
6.2.	Mechanismus regulace aktivity E3 ubikvitin ligáz z rodiny NEDD4 proteinem NDFIP1	13
6.3.	NDFIP1 jako negativní regulátor aktivace T lymfocytů	14
6.3.1.	<i>Ndfip1</i> ^{-/-} T lymfocyty jsou nezávislé na CD28 kostimulaci	14
6.3.2.	NDFIP-dependentní degradace JAK1	17
6.4.	Funkce NDFIP1 v Th17 lymfocytech	18
6.4.1.	Zvýšené množství Th17 lymfocytů v <i>Ndfip1</i> ^{-/-} myších	18
6.4.2.	Probíhající Th2 imunitní odpověď podporuje vývoj Th17 lymfocytů	18
6.4.3.	NDFIP1-dependentní degradace RORγT ligázou ITCH	19
6.5.	Funkce NDFIP1 v regulačních T lymfocytech	21
6.5.1.	<i>Ndfip1</i> ^{-/-} myši jsou defektní v diferenciaci indukovaných T regulačních lymfocytů	21
6.5.2.	Nestabilita <i>Ndfip1</i> ^{-/-} Treg lymfocytů	22
6.6.	NDFIP1 jako regulátor periferní tolerance	25
6.6.1.	NDFIP1 omezuje dělení nedostatečně stimulovaných CD4 ⁺ T lymfocytů	25
6.6.2.	NDFIP1 snižuje signalizaci přes T buněčný receptor CD8 ⁺ T lymfocytů	26
7.	Závěr	29
8.	Použitá literatura	30

1. Úvod

T lymfocyty představují velice důležitou součást adaptivní imunity. Tyto buňky musí být schopny aktivace, proliferace a diferenciaci na efektorové T lymfocyty při setkání s prezentovaným antigenem patogenního agens. Zároveň existují mechanismy tolerance, které zabraňují tomu, aby T lymfocyty takto reagovaly na setkání s neškodným antigenem nebo antigenem vlastních buněk a poškozovaly vlastní organismus. Součástí těchto mechanismů je i protein NDFIP1, jehož deficiencie u myši vede k selhání těchto ochranných mechanismů. NDFIP1 je evolučně konzervovaný transmembránový adaptorový protein, který je exprimován mimo jiné i v T lymfocytech. Tento protein je velice důležitý pro aktivitu E3 ubikvitin ligáz z rodiny NEDD4, se kterými interaguje. Umožňuje tak ubikvitinovat a degradovat cíle těchto ligáz. Jeho důležitost je možno dokázat i na úrovni organismu, protože myši, které postrádají tento protein, onemocní zánětlivou chorobou postihující plíce, kůži a sliznici trávicí soustavy. Do těchto orgánů migrují aktivované T lymfocyty, které v naprosté většině vykazují fenotyp Th2 lymfocytů, a to při absenci nákazy patogenním agens. Tato patologie je tak vážná, že způsobí předčasnou smrt těchto myši. NDFIP1 je tedy nezbytný pro mechanismy zabraňující nadměrné aktivitě T lymfocytů a ovlivňující diferenciaci T lymfocytů. Poznání tohoto proteinu a jeho funkce nám pomáhá lépe pochopit tyto mechanismy a také lidská onemocnění, kde dochází k jejich selhání. Tato práce si klade za cíl popsat naše poznatky o struktuře proteinu NDFIP1 a způsobu jakým ovlivňuje aktivitu E3 ubikvitin ligáz a zejména pak shrnout dosavadní znalosti o jeho funkci v T lymfocytech.

2. Ubikvitinace proteinů

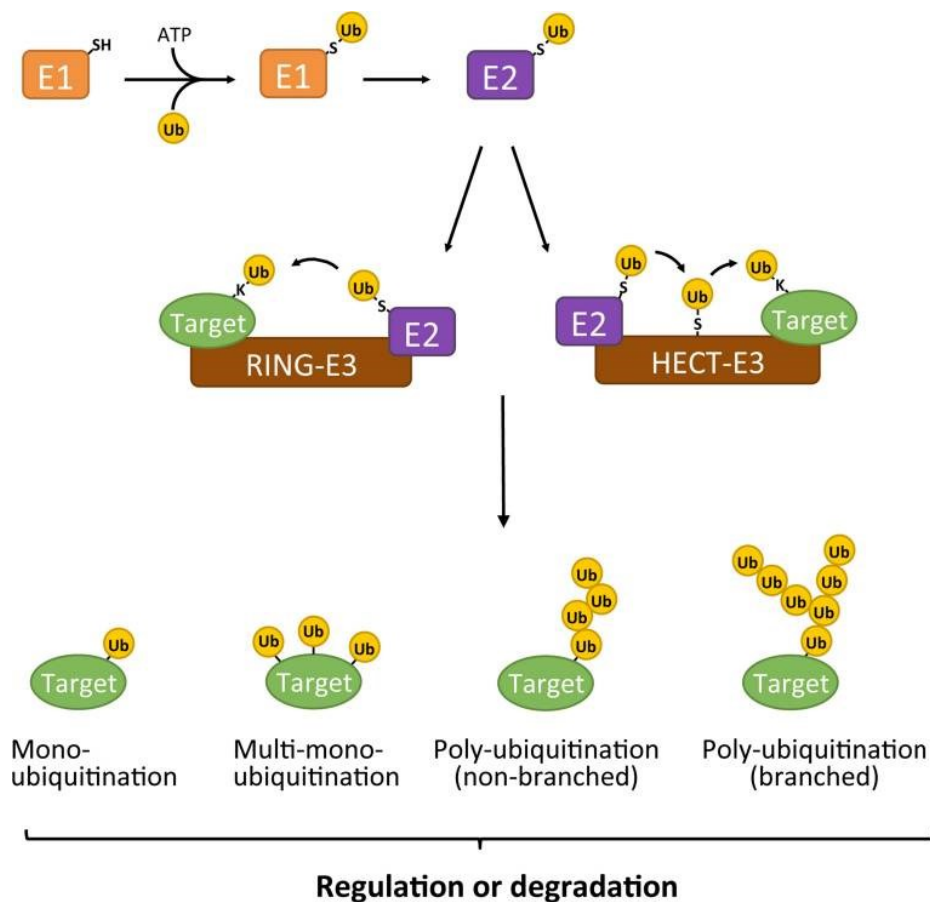
Ubikvitinace proteinů je posttranslační modifikace, kdy je na cílový protein připojen další malý polypeptid ubikvitin. Ubikvitin se skládá ze 76 aminokyselin a jeho připojení se uskutečňuje pomocí peptidové vazby mezi lysinem cílového proteinu a C koncovým glycinem ubikvitinu¹. Ubikvitin sám má ve své sekvenci 7 lysinů, na které mohou být stejným způsobem připojeny další ubikvitiny stejně jako na N koncový methionin ubikvitinu. Propojením většího množství ubikvitinů se takto může na proteinu vytvořit polyubikvitinový řetězec. Vzhledem k tomu, že existuje celkem 8 možností propojení 2 ubikvitinů, výsledné řetězce mají různé uspořádání, které ovlivňuje výsledek této modifikace². Častým uspořádáním je polyubikvitinace, kde jsou ubikvitiny spojeny přes lysin na pozici 48. Takto označené proteiny jsou poté vázány a štěpeny proteazomem^{3,4}. Ubikvitinace tedy může sloužit jako označení proteinu určeného k degradaci a reguluje životnost různých proteinů. Tato modifikace tak nabízí možnost, jak odstraňovat poškozené nebo špatně složené proteiny. Tím, že dokáže regulovat, které proteiny budou v dané chvíli v buňce přítomny, ovlivňuje homeostázu buňky a různé buněčné procesy jako buněčný cyklus, apoptózu a genovou expresi⁵⁻⁷. Ubikvitinace ale má i role nezávislé na proteazomu. Například ubikvitinace transmembránového proteinu na plazmatické membráně může poskytnout signál, který vede k endocytóze tohoto proteinu a k jeho degradaci v lysozomu⁸. Dále je ubikvitinace důležitá pro opravy DNA⁹ a receptorovou signalizaci jako jsou např. signální dráhy celé řady receptorů vedoucí k aktivaci NFκB¹⁰.

2.1. Enzymy provádějící ubikvitinaci

Pro napojení ubikvitinu na cílový protein je potřeba součinnost 3 enzymů, které se označují jako E1, E2 a E3. E1 je ubikvitin aktivační enzym. E1 nejdříve vytvoří ubikvitin adenylát za rozštěpení jedné molekuly ATP a poté formuje thioesterovou vazbu s C koncovým glycinem ubikvitinu za uvolnění AMP. E2, ubikvitin konjugační enzym, pak přebírá ubikvitin od E1 a vytváří s ním vlastní thioesterovou vazbu. E3, ubikvitin ligáza, nakonec přenáší ubikvitin na lysinovou postranní skupinu cílového proteinu. Existuje mnoho typů E3 ubikvitin ligáz, které jsou specifické pro různé proteiny. Je jich mnohem více než E1 a E2 enzymů, což ukazuje, že různé E2 enzymy spolupracují s více ligázami¹¹. E3 ligázy se dají rozdělit do tří hlavních skupin podle toho, kterou katalytickou doménu obsahují. Jedna skupina ubikvitin ligáz obsahuje doménu RING. Tyto ligázy interagují pomocí své RING domény s E2 enzymem, pomocí jiné domény s cílovým proteinem a umožní přímý přenos ubikvitinu z E2 na substrát, aniž by samy vytvářely kovalentní vazbu s ubikvitinem. Zbývající dvě skupiny ubikvitin ligáz obsahují katalytickou RBR nebo HECT doménu. Tyto ligázy nejprve převezmou ubikvitin od

E2 enzymu, naváží ho pomocí thioesterové vazby na svůj konzervovaný cystein a poté je tento ubikvitin přenesen na lysin cílového proteinu ¹².

E3 ubikvitin ligázy mohou rozeznávat svůj cílový protein nepřímo pomocí adaptorového proteinu, který váže danou ligázu a cílový protein, který má být ubikvitinován. Například ligáza c-Cbl využívá adaptorový protein GRB2 pro ubikvitinaci receptoru pro EGF ¹³. Někdy adaptorový protein může také zprostředkovat vazbu E2 enzymu a ubikvitin ligázy, jako je to v případě adaptoru Smad7, který podporuje vazbu UbcH7 k ligáze Smurf2 ¹⁴. Adaptorový protein se může podílet i na zvýšení aktivity ubikvitin ligázy, se kterou interaguje. To je například případ virového adaptoru E6, který interaguje s ligázou E6-AP a zvyšuje její schopnost degradovat protein RING1B ¹⁵.



Obr. 1: Schématické znázornění kaskády enzymatických reakcí, které vedou k ubikvitinaci cílového proteinu, se znázorněním odlišných mechanismů katalýzy E3 ubikvitin ligáz s doménou RING a s doménou HECT (převzato z ¹⁶)

3. Protein NDFIP1

V roce 2000 byl identifikován nový protein, který byl nejdříve nazván NEDD4 WW domain-binding protein 5 (N4WBP5) a později přejmenován na NEDD4 family interacting protein 1 (NDFIP1, dále bude používáno toto jméno). NDFIP1 byl objeven v rámci práce zaměřené na vyhledávání proteinů, které se váží na E3 ligázu NEDD4 a které by mohly být jejími potenciálními substráty. cDNA tohoto proteinu byla izolována z cDNA knihovny myšího plodu starého 16 dní¹⁷. Předpokládaná molekulová hmotnost tohoto proteinu je 26 kDa. Obsahuje 3 konzervované [L/P]PXY (PY) motivy v N-koncovém regionu a 3 hydrofobní sekvence v C-koncové části, které zřejmě představují transmembránové domény a ukotvují tento protein v membráně¹⁸ (<https://www.uniprot.org>).

U savců byl odhalen ještě podobný protein, který byl pojmenován NEDD4 family interacting protein 2 (NDFIP2). Proteiny NDFIP1 a NDFIP2 jsou z 52 % identické. Ndfip2 také obsahuje tři konzervované PY motivy. V *Drosophila melanogaster* můžeme najít pouze jeden NDFIP protein, tento homolog je příbuznější spíše proteinu NDFIP1 a obsahuje jen dva [L/P]PXY motivy (<https://www.uniprot.org>). Tři transmembránové domény obsahují všechny zmiňované NDFIP proteiny¹⁸.

Gen pro NDFIP1 má dva transkripty – jeden je velký 2,1 kbp a druhý 1,2 kbp. Nejvyšší exprese NDFIP1 byla nalezena v játrech, mozku, ledvinách a srdci dospělých myší a převažoval delší transkript. U lidí byla nalezena exprese tohoto proteinu ve většině tkání, vysoká exprese je v mozkové tkáni dospělých lidí (v levé i pravé polovině mozečku, hypofýze a talamu). Dále je vysoká exprese v ledvinách, játrech, varlatech, slinných žlázách a placentě dospělých lidí a také v mozku, ledvinách a plicích lidského plodu¹⁸.

WW domény myšího proteinu NEDD4 mohou interagovat s PY motivy proteinu NDFIP1. Mutace PY motivů proteinu NDFIP1 oslabí tuto interakci^{18,19}. Další testy odhalily, že proteiny NEDD4 a NDFIP1 spolu interagují i *in vivo* a mutace PY motivů oslabí jejich interakci. Protein NDFIP1 dále interaguje s WW doménami lidských proteinů NEDD4, NEDD4-2, NEDL1, WWP2/AIP2, AIP4 a myšího proteinu ITCH¹⁸. Dále bylo ukázáno, že NDFIP1 aktivuje E3 ligázu SMURF1²⁰. Fakt, že NDFIP1 může interagovat s více členy rodiny NEDD4, je velice zajímavý, protože už dříve bylo zjištěno, že vazba WW domén a ligandu je závislá nejen na přítomnosti PY motivu, ale i na aminokyselinách, které jsou v blízkosti tohoto motivu, a tím pádem dokáže být velice specifická²¹. Bylo také ukázáno, že při vazbě NDFIP1 a NEDD4 je NDFIP1 ubikvitinován a ubikvitinace snížila jeho poločas života v buňce¹⁸.

Pomocí fluorescenčních protilátek rozeznávajících protein NDFIP1 bylo zjištěno, že NDFIP1 je integrální protein Golgiho aparátu a endozomů s tím, že jeho N konec je orientován směrem do cytosolu, aby mohl interagovat s členy rodiny NEDD4. Výzkum lokalizace proteinu NDFIP1 v některých buňkách, kam byl protein NDFIP1 transfekován, ukázal také narušení struktury Golgiho komplexu. Tyto výsledky ukazují, že protein NDFIP1 má pravděpodobně vliv na funkci Golgiho komplexu ¹⁸.



Obr. 2: schématické znázornění struktury NDFIP proteinu se zobrazením interakce s E3 ubikvitin ligázou (převzato z ²², upraveno).

4. Rodina NEDD4

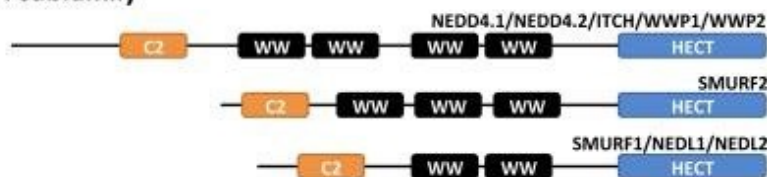
Rodina NEDD4 zahrnuje E3 ubikvitin ligázy, které se svým složením domén podobají ligáze NEDD4 ²³. Protein NEDD4 byl nalezen v roce 1992 při hledání genů, jejichž exprese byla zvýšena v mozku myšího embrya a jejichž exprese se postupně při vývoji snižovala ²⁴. členové rodiny NEDD4 se nachází v různých eukaryotických organismech od kvasinek po savce. V kvasince *Saccharomyces cerevisiae* se nachází jen jeden takovýto protein – RSP5P. U savců nacházíme celkem 9 členů této rodiny ²⁵.

Na strukturní úrovni se E3 ubikvitin ligázy rodiny NEDD4 skládají celkem ze tří typů domén: z C2 domény, 2 – 4 WW domén a z HECT domény. C2 doména je na N konci proteinu, tato doména je např. u protein kináz C, kde se stará o vazbu na membránové fosfolipidy při zvýšené koncentraci vápenatých kationtů ²⁶. Při zvýšení vnitrobuněčné koncentraci vápenatých kationtů C2 doména proteinu NEDD4 zprostředkovává jeho přemístění z cytosolu na plazmatickou membránu, nejeví však zvýšenou afinitu k některému konkrétnímu typu fosfolipidu ²⁷. U C2 domény NEDD4 bylo dokonce ukázáno, že se při zvýšené koncentraci vápenatých kationtů váže na transmembránový protein ANNEXIN XIII ²⁸.

WW domény jsou globulární, velké asi 40 aminokyselin, obsahují 2 konzervované Tryptofany a zprostředkovávají interakci s jinými proteiny²⁹. Vyznačují se afinitou k ligandům, které obsahují sekvenci bohatou na prolin³⁰, nebo fosforylované seriny či fosforylované threoniny³¹. Jednotlivé WW domény na jednom proteinu nejsou úplně identické, a tak by každá WW doména mohla mít trochu jinou roli a např. zprostředkovávat interakci s jinými proteiny.

Na C konci proteinů z rodiny NEDD4 je HECT doména, jejíž E3 ubikvitin ligázová aktivita je popsána výše.³²

NEDD4 subfamily



Obr. 3: Schématické znázornění stavby E3 ligáz z rodiny NEDD4 s vyznačením jejich domén (převzato z¹⁶, upraveno).

5. Regulace aktivity E3 ligáz z rodiny NEDD4

5.1. Autoinhibiční mechanismus E3 ligáz z rodiny NEDD4

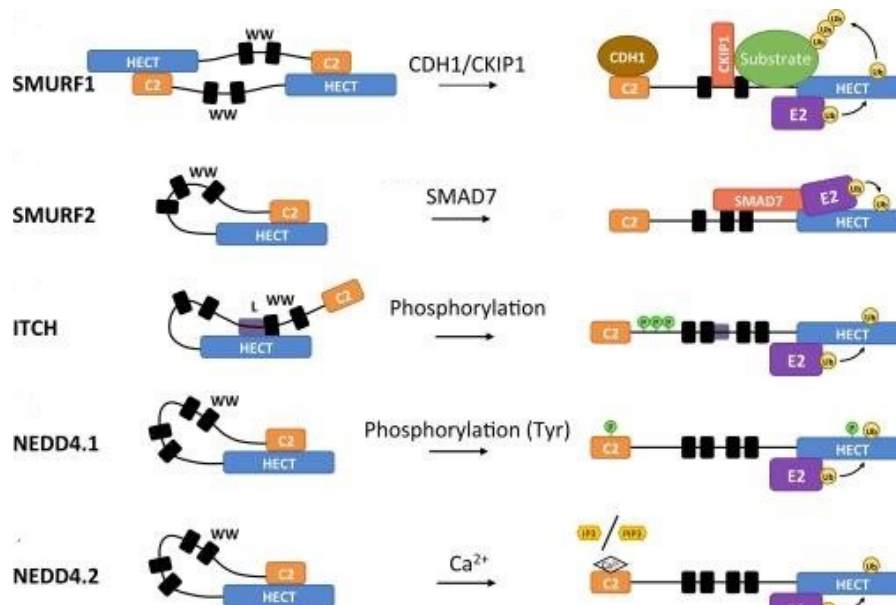
Ligázy z rodiny NEDD4 se v klidovém stavu nacházejí v neaktivní, inhibované konformaci. V některých případech je tohoto neaktivního stavu dosaženo tím, že se C2 doména v rámci jedné molekuly váže na HECT doménu poblíž konzervovaného cysteinu. Takováto vazba pak brání vytvoření thioesterové vazby s ubikvitinem. Tento autoinhibiční mechanismus, jehož základem je intramolekulární vazba C2 domény na HECT doménu, se objevuje u proteinů NEDD4, NEDD4-2 a SMURF2. Mutanti těchto proteinů, kterým chybí C2 doména, ochotněji ubikvitinují své substráty^{33,34}. To se odráží i v jejich autoubikvitinaci, která jako negativní zpětnovazebný mechanismus vede k degradaci těchto proteinů a ke snížení jejich hladiny. Lze tedy říct, že autoinhibice pomáhá udržovat stabilní množství těchto ligáz v buňce³³. Podobnou autoinhibici vykazuje i ligáza ITCH, která také patří do rodiny NEDD4. U ní je však tohoto stavu docíleno jiným způsobem. U proteinu ITCH se na jeho HECT doménu váže druhá a třetí WW doména a spojovací sekvence mezi druhou a třetí WW doménou, opět v rámci jedné molekuly³⁵. Stejný nebo velice podobný způsob inhibice se objevuje i u ligáz WWP1 a WWP2. Tyto proteiny mají totiž identickou primární strukturu v místech, která jsou zodpovědná za intramolekulární inhibiční vazbu. Delece těchto míst vyústí ve zvýšenou aktivitu těchto ligáz^{36,37}. Odlišný inhibiční mechanismus můžeme najít u ligázy SMURF1. Tato ligáza se do inhibovaného stavu dostává tak, že se C2 doména jedné ligázy SMURF1 váže na HECT doménu druhé ligázy SMURF1. Takto SMURF1 vytváří dimery a nejspíše i oligomery vyšších řádů³⁸.

5.2. Aktivace E3 ligáz z rodiny NEDD4

Aby mohly E3 ligázy z rodiny NEDD4 vykonávat svoji funkci, musí být uvolněny z autoinhibiční interakce. Jedna možnost, jak aktivovat tyto proteiny je zvýšení koncentrace vápenatých kationtů v buňce. U proteinů NEDD4 a NEDD4-2 se vápenaté kationty naváží na C2 doménu, odstraní intramolekulární inhibiční interakci a zprostředkují umístění ligázy na plazmatickou membránu^{27,34}. Další možnost aktivace je fosforylace E3 ligázy. Tuto regulaci vidíme u ligázy ITCH, která je fosforylována pomocí kinázy JNK1. Tato fosforylace poruší inhibiční vazbu mezi druhou WW doménou a HECT doménou a to se projeví jako větší míra ubikvitinace proteinu ITCH³⁹. Poslední známá možnost aktivace je pomocí adaptorového proteinu, který uvolní inhibiční interakci. To můžeme vidět u proteinu SMURF2, který může být aktivován svým adaptorovým proteinem SMAD7. SMAD7 může zvýšit aktivitu ligázy SMURF2 tím, že jeho vazba zabraňuje autoinhibiční interakci³³, a také zvyšuje aktivitu ligázy Smurf2 tím, že rekrutuje E2 ubikvitin konjugační enzym k E3 ligáze¹⁴.

Dalším příkladem je protein NUMB, který se váže na WW doménu E3 ubikvitin ligázy ITCH a na protein GLI1. ITCH se při vazbě proteinu NUMB dostává do aktivního stavu a ubikvitinuje protein GLI1. NUMB zde aktivuje E3 ubikvitin ligázu ITCH a zprostředkovává interakci s jejím substrátem GLI1

40



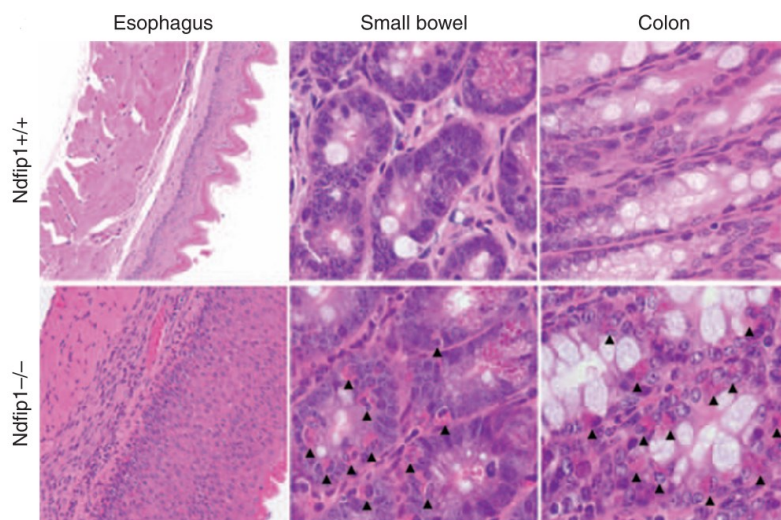
Obr. 4: Schématické znázornění E3 ligáz z rodiny NEDD4 v inhibovaném stavu a způsob jejich aktivace (převzato z ¹⁶, upraveno)

6. Funkce proteinu NDFIP1 v T lymfocytech

6.1. Deficience NDFIP1 a její vliv na diferenciaci T lymfocytů

Protein NDFIP1 je schopen vázat a aktivovat E3 ubikvitin ligázy z rodiny NEDD4 ^{18,19}. Pro vyšetření role a důležitosti tohoto proteinu v organismu byly vytvořeny *Ndfip1*^{-/-} myši, u kterých transkripce genu pro NDFIP1 vedla k vytvoření zkrácené mRNA nebo mRNA obsahující předčasný stop kodon. Až do věku 6 týdnů se tato zvířata zdála zdravá, v tomto věku se jim však začaly objevovat kožní léze kolem uší, došlo u nich ke zvětšení jater, sleziny a ke zkrácení a segmentování ocasu. Histologická analýza orgánů odhalila další defekty. Kůže kolem uší byla postižena zánětem s infiltrací převážně lymfocytů a eozinofilů. V játrech a slezině byly nalezeny ostrůvky extramedulární hematopoézy a došlo k vytvoření intrahepatických žlučovodů. Plíce byly postiženy zánětem s hyperplázií pohárkových buněk a zánětlivým infiltrátem ⁴¹. Při analýze trávicí soustavy bylo zjištěno, že tyto myši mají zvětšené tenké střevo a epiteliální vrstvu jícnu. V jícnu a střevu byl nalezen zánětlivý infiltrát,

který se skládal hlavně z eozinofilů a CD4⁺ T lymfocytů. Eozinofily byly dokonce nalezeny i v žaludku. Takto postižené myši vážily méně, než stejně staré *Ndfip1*^{+/+} myši⁴². Vyšetření primárních a sekundárních krvetvorných orgánů odhalilo zvýšený počet buněk myeloidní linie a T lymfocytů, které byly z velké části aktivované, a snížený počet B lymfocytů⁴¹. V krvi *Ndfip1*^{-/-} myši bylo větší procentuální zastoupení eozinofilů než v krvi *Ndfip1*^{+/+} myši⁴². *Ndfip1*^{-/-} zvířata měla výrazně zkrácenou dobu dožití a umírala ve věku 10 – 14 týdnů⁴¹.



Obr. 5: Histologická analýzy jícnu (20 x), tenkého střeva (40 x) a tlustého střeva (40 x) stejně starých *Ndfip1*^{+/+} a *Ndfip1*^{-/-} myši. (převzato z⁴², upraveno)

6.1.1. Vztah NDFIP1 k lidským chorobám

Výše zmíněný symptom eozinofilní infiltrace trávicí soustavy je často pozorován u lidí se zánětlivou střevní chorobou (inflammatory bowel disease), což je označení pro skupinu zánětlivých onemocnění postihující trávicí soustavu^{43,44}. Mezi tyto choroby patří Ulcerózní kolitida nebo Crohnova choroba. Příčiny těchto nemocí nejsou ještě dostatečně prozkoumány. Bylo ale identifikováno mnoho genetických a imunitních faktorů, které přispívají k jejich vývoji a jsou s nimi spojené⁴⁵. Vzhledem k podobnosti těchto chorob a některých znaků *Ndfip1*^{-/-} myši byl zkoumán vztah proteinu NDFIP1 k zánětlivé střevní chorobě u lidí. Vskutku provedená analýza naznačila, že některé jednonukleotidové polymorfismy v genu pro NDFIP1 jsou častější u takto nemocných lidí než u zdravých lidí⁴². Mutace v genu pro NDFIP1 by tedy mohly podmiňovat náchylnost k onemocnění Crohnovou chorobou nebo Ulcerózní kolitidou. Poznání funkce proteinu NDFIP1 by tedy mohlo být zajímavé i pro medicínské účely. Pro potvrzení asociace zánětlivé střevní choroby s mutacemi genu pro NDFIP1 budou ale muset být provedeny další studie.

6.1.2. Buňky ovlivněné deficiencí NDFIP1

Změny v buňkách hematopoetické linie mohly být způsobeny samotnou deficiencí NDFIP1 v těchto buňkách, nebo mohly být důsledkem zánětu a působení jiných NDFIP1 deficientních buněk. U myších *Ndfip1^{+/+}* (WT) recipientů *Ndfip1^{-/-}* kostní dřeně se též vyvinuly patologické symptomy. Tyto myši měly zvětšená játra a slezinu, zánět kůže, který byl charakterizován hlavně infiltrací eozinofilů a lymfocytů, a extramedulární hematopoézu v játrech a slezině. Zvětšení jater a sleziny bylo ale menší, nedošlo k poškození ocasu ani k vytvoření intrahepatických žlučvodů⁴¹. Z těchto důvodů lze usoudit, že i buňky, které nepatří do hematopoetické linie, se podílejí na fenotypu *Ndfip1^{-/-}* myši. Deficience NDFIP1 v buňkách hematopoetické linie však postačuje k vytvoření zánětu, který je nakonec pro myši fatální⁴¹. Lze tedy předpokládat, že NDFIP1 bude mít nějakou důležitou roli v buňkách imunitního systému. Pro určení toho, které buňky jsou zodpovědné za vznik zánětu, byly vytvořeny myši chiméry, které nesly směs *Ndfip1^{-/-}* a WT buněk kostní dřeně. WT i *Ndfip1^{-/-}* buňky byly v tomto organismu vystaveny stejným podmínkám. Když byly porovnány *Ndfip1^{-/-}* a WT buňky těchto myši ještě před rozvojem příznaků zánětlivého onemocnění, bylo zjištěno, že větší procento T lymfocytů ve slezině mělo genotyp *Ndfip1^{-/-}* a větší procento *Ndfip1^{-/-}* T lymfocytů bylo aktivováno⁴¹. To znamená, že k aktivaci *Ndfip1^{-/-}* T lymfocytů dochází ještě před vznikem viditelných příznaků zánětlivého onemocnění. Tento závěr potvrdila ještě jiná studie, která odhalila, že čtyřtýdenní *Ndfip1^{-/-}* myši mají větší procentuální zastoupení aktivovaných CD4⁺ T lymfocytů v periferních lymfatických orgánech. Některé *Ndfip1^{-/-}* myši v tomto věku měly už také větší procentuální zastoupení CD4⁺ T lymfocytů v jícnu. To ale neplatilo pro eozinofily, které jsou v jícnu přítomny až u starších *Ndfip1^{-/-}* myši postižených zánětem. Zajímavé je, že v *Ndfip1^{-/-} Rag1^{-/-}* myších, které nemají T lymfocyty ani B lymfocyty, nedojde k infiltraci eozinofilů ani ke vzniku zánětlivého onemocnění. K zánětu a eozinofilní infiltraci do trávicí soustavy však dojde, když jsou do *Rag1^{-/-}* myši přeneseny pouze *Ndfip1^{-/-}* CD4⁺ T lymfocyty⁴². Deficience NDFIP1 v T lymfocytech je tedy primární příčinou vývoje zánětlivého onemocnění. Bez těchto buněk nedojde k zánětu. Nevylučuje to však možnost, že i další buňky imunitního systému jsou přímo ovlivněny ztrátou NDFIP1.

6.1.3. Diferenciace *Ndfip1^{-/-}* T lymfocytů

Při *in vitro* testování *Ndfip1^{-/-}* T lymfocytů se zjistilo, že tyto buňky pro svou aktivaci stále vyžadují stimulaci T buněčného receptoru. Když obdržely tento signál, tak proliferovaly lépe než WT T lymfocyty⁴¹. Byl také vytvořen model *Ndfip1^{-/-}* myši, jejíž veškeré T lymfocyty rozeznávaly ovalbumin a ty si v jeho nepřítomnosti udržely naivní fenotyp⁴⁶. NDFIP1 by se tedy mohl podílet na tom, jak T lymfocyty odpovídají na aktivaci. Když se aktivované T lymfocyty kultivovaly v podmínkách, které podporují diferenciaci Th2 lymfocytů, tak *Ndfip1^{-/-}* T lymfocyty produkovaly více IL-4 než WT T

lymfocyty. Naopak neprodukovaly více IFNy v podmínkách, které podporovaly diferenciaci Th1 lymfocytů a v neutrálních podmínkách neprodukovaly více IFNy ani IL-4 než WT T lymfocyty⁴¹. IL-4 je cytokin nezbytný pro vývoj Th2 lymfocytů a pro imunitní odpověď založenou na Th2 lymfocytech⁴⁷. Zánětlivé poruchy kůže, plic a trávicí soustavy s přítomností eozinofilů jsou často zprostředkovány Th2 lymfocyty⁴⁸⁻⁵¹. Lze tedy očekávat, že zánětlivé onemocnění *Ndfip1*^{-/-} myši by se také mohlo vyznačovat přítomností a působením Th2 lymfocytů. Když byly WT myši transplantované *Ndfip1*^{-/-} hematopoetickými buňkami imunizovány pomocí ovalbuminu a různými adjuvans podporujícím diferenciaci Th1 nebo Th2, jen málo *Ndfip1*^{-/-} T lymfocytů produkovalo IFNy bez ohledu na použité adjuvans, a naopak více jich produkovalo IL-4 a to bez imunizace i po imunizaci nezávisle na typu adjuvans. Imunizované i neimunizované myši s *Ndfip1*^{-/-} T lymfocyty měly také větší hladinu IgE než WT myši, což je v souladu s jejich zvýšenou produkcí IL-4⁴¹. *Ndfip1*^{-/-} myši mají také vyšší sérovou hladinu IL-5 a za to byly také odpovědné *Ndfip1*^{-/-} CD4⁺ T lymfocyty, které produkují vyšší množství IL-5 než WT T lymfocyty⁴². IL-5 je jeden z cytokinů, který je také produkován Th2 lymfocyty⁵². Vysoká hladina IL-5 může vést ke zvýšení počtu eozinofilů a k jejich migraci do různých tkání, včetně plic, střeva a jícnu, jako je tomu v případě *Ndfip1*^{-/-} myši^{53,54}. Pokud jsou *Ndfip1*^{-/-} myším podávány protilátky proti IL-5, dojde u nich ke snížení procentuálního zastoupení eozinofilů v jícnu a tenkém střevě. Nadměrná produkce IL-5 *Ndfip1*^{-/-} CD4⁺ T lymfocyty tedy vede k infiltraci eozinofilů na místa zánětu⁴². Tyto výsledky tedy vedou k závěru, že deficience NDFIP1 v T lymfocytech způsobuje, že tyto buňky snadněji prolifерují po stimulaci T buněčného receptoru, ochotně diferencují na Th2 lymfocyty a produkují IL-4 a IL-5. Tyto aktivované *Ndfip1*^{-/-} T lymfocyty poté iniciují vznik zánětlivého onemocnění NDFIP1-deficientních myši.

6.1.4. NDFIP1-dependentní degradace JUNB ligázou ITCH

Fenotyp *Ndfip1*^{-/-} zvířat připomíná fenotyp myši, které postrádají protein ITCH, což je E3 ubikvitin ligáza patřící do rodiny NEDD4. Tyto myši měly také zánětlivou poruchu, která zasáhla jejich plíce, kůži a trávicí soustavu^{42,55}. U strašičích ITCH-deficientních myši byl pozorován zvýšený počet aktivovaných/paměťových T lymfocytů ve slezině. *Itch*^{-/-} T lymfocyty se také snadněji dělí po stimulaci T buněčného receptoru a mají větší tendenci diferencovat se na Th2 lymfocyty a produkovat IL-4 a IL-5. *Itch*^{-/-} T lymfocyty po aktivaci T buněčného receptoru také akumulují více transkripčního faktoru JUNB⁵⁶. Tento faktor aktivuje transkripci genu pro IL-4⁵⁷. Bylo potvrzeno, že ligáza ITCH ubikvitinuje transkripční faktor JUNB a tím brání nadměrné produkci IL-4⁵⁸. ITCH se tedy podílí na regulaci Th2 imunitní odpovědi a na regulaci tolerance Th2 lymfocytů⁵⁹. Vzhledem k tomu, že *Ndfip1*^{-/-} a *Itch*^{-/-} myši mají podobný fenotyp a NDFIP1 se váže na WW domény proteinu ITCH

*in vitro*¹⁸, byla vytvořena hypotéza, že NDFIP1 reguluje ITCH a že tyto proteiny spolu *in vitro* interagují.

Při analýze buněčných lysátů bylo zjištěno, že *Ndfip1*^{-/-} a WT T lymfocyty mají stejné množství proteinu ITCH. To znamená, že NDFIP1 pravděpodobně nereguluje expresi proteinu ITCH. Když byl ITCH imunoprecipitován z aktivovaných T lymfocytů, tak byl s ním koimunoprecipitován i NDFIP1. Tento výsledek potvrdil, že NDFIP1 asociuje s proteinem ITCH v aktivovaných T lymfocytech. Když se zkoumala lokalizace těchto proteinů v T lymfocytech, zjistilo se, že nebyl-li T lymfocyt stimulován, nedocházelo k expresi NDFIP1 a ligáza ITCH zůstala ve vezikulech v cytoplazmě. Po aktivaci T lymfocytů se však protein NDFIP1 začal postupně objevovat na vnitřní straně plazmatické membrány a ITCH ho následoval. NDFIP1 by tedy mohl změnit lokalizaci proteinu ITCH⁴¹. Toto pozorování je v souladu s hypotézou, že NDFIP1 nějakým způsobem reguluje aktivitu proteinu ITCH. Jak již bylo zmíněno, jedna z rolí ligázy ITCH je ubikvitinovat transkripční faktor JUNB, který je pak degradován⁵⁸. Bylo tedy měřeno množství JUNB v *Ndfip1*^{-/-} nebo WT T lymfocytech v různých časech od stimulace nebo bez stimulace. V *Ndfip1*^{-/-} i WT T lymfocytech došlo ke zvýšení množství proteinu JUNB po dvou hodinách od stimulace. Ve WT T lymfocytech se potom jeho množství začalo snižovat. K tomuto snížení však nedošlo v *Ndfip1*^{-/-} T lymfocytech. NDFIP1 se tedy s proteinem ITCH podílí na kontrole množství JUNB v aktivovaných T lymfocytech a má roli v indukci degradace tohoto faktoru. Byly získány i další důkazy podporující tuto hypotézu. Například nadměrná exprese proteinu NDFIP1 vedla k rychlejší degradaci JUNB, nebo bylo zjištěno, že v T lymfocytech *Ndfip1*^{-/-} myši bylo asi pětkrát více JUNB než v T lymfocytech z *Ndfip*^{+/+} myši⁴¹. Zvýšené množství JUNB v *Ndfip1*^{-/-} T lymfocytech pak vede k produkci IL-4, který podporuje diferenciaci Th2 lymfocytů. NDFIP1 by se také mohl podílet i na jiných funkcích, které jsou zprostředkovány ligázou ITCH jako například na udržení tolerance Th2 lymfocytů.

6.1.5. Rozdíly mezi *Itch*^{-/-} a *Ndfip1*^{-/-} myšmi

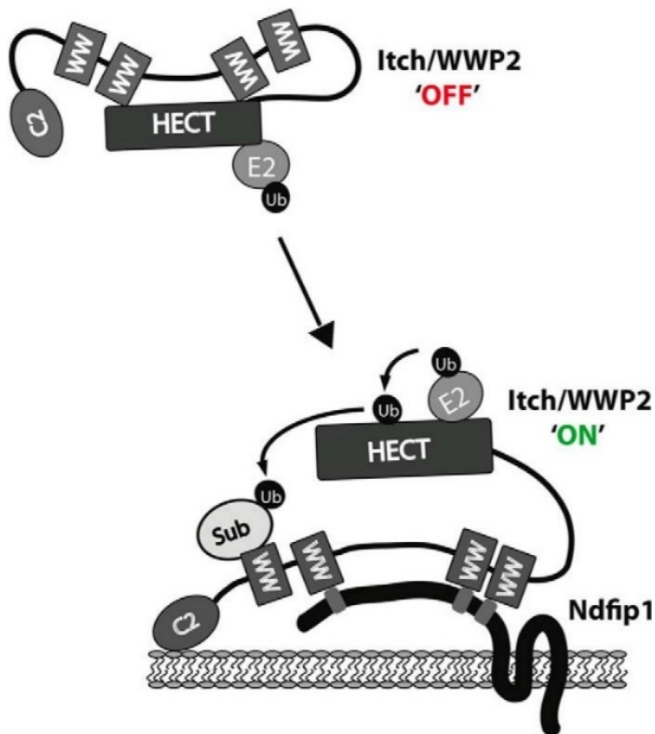
Když ale srovnáme podrobněji fenotyp *Itch*^{-/-} a *Ndfip1*^{-/-} myši, uvidíme též rozdíly. Myši obou těchto genotypů vyvinou zánětlivou chorobu, která je zprostředkována Th2 lymfocyty a zasahuje hlavně kůži a plíce. Nicméně *Ndfip1*^{-/-} myši vykazují první příznaky této choroby často již v šestém týdnu svého života, naproti tomu *Itch*^{-/-} myši tuto chorobu vyvinou mezi pátým a šestým měsícem života^{41,55,56}. Když byl analyzován trávicí trakt *Itch*^{-/-} myši ve věku pěti až šesti měsíců, zjistilo se, že mají zvýšený počet eozinofilů v jícnu, ale tento počet byl stále menší než u *Ndfip1*^{-/-} myši ve věku pět až osm týdnů. Histologicky u nich byl zánět mírnější v porovnání s *Ndfip1*^{-/-} myšmi. Také tenké a tlusté střevo *Itch*^{-/-} myši vykazovalo mnohem menší počet eozinofilů a počet eozinofilů tenkého střeva se

dokonce nelišil signifikantně od WT myši. *Itch*^{-/-} myši také vykazovaly zvýšenou hladinu IL-5 v krvi, ale tato hladina byla nižší než u *Ndfip1*^{-/-} myši a mladé *Itch*^{-/-} myši dokonce v krvi nevykazovaly detekovatelné množství IL-5⁴². Vzhledem k větší závažnosti fenotypu *Ndfip1*^{-/-} myši můžeme usoudit, že protein NDFIP1 má i jiné role, které nesouvisí s ligázou ITCH. Nabízí se zejména myšlenka, že NDFIP1 reguluje *in vivo* i jiné ligázy rodiny NEDD4 než jen ITCH.

6.2. Mechanismus regulace aktivity E3 ubikvitin ligáz z rodiny NEDD4 proteinem NDFIP1

Jak bylo zmíněno výše, E3 ubikvitin ligázy z rodiny NEDD4 jsou často v neaktivním stavu a pro správnou funkci je nutné je aktivovat. Inhibičního stavu je dosaženo intramolekulární vazbou³³. To vedlo k hypotéze, že NDFIP1 protein by mohl vazbou na ligázy z rodiny NEDD4 tyto enzymy aktivovat. Když byly k E3 ligázám NEDD4 a ITCH přidány fragmenty proteinu NDFIP1, které obsahovaly jeho

cytoplazmatické části včetně PY motivů, došlo k aktivaci těchto ligáz. Ta se projevila jako jejich autoubikvitinace a ubikvitinace fragmentů proteinu NDFIP1. NDFIP1 fragmenty vázaly a aktivovaly ligázy pouze, pokud nebyly porušeny jejich PY motivy. Mutace každého z PY motivů vedla k redukované aktivitě ligáz s tím, že druhý a třetí PY motiv měly výraznější efekt. Stejně tak mutace WW domén ligáz vedla ke snížení schopnosti interagovat s proteinem NDFIP1. Alespoň 2 WW domény byly nutné k interakci ligázy a NDFIP1. Vazba PY motivů na WW domény ligáz rodiny NEDD4 tedy přispívá nejen ke změně jejich lokalizace, ale také k jejich aktivaci¹⁹. Dynamika vazby mezi NDFIP1 a E3 ligázami z rodiny NEDD4 je velmi rychlá, jak naznačují experimenty využívající metodu FRAP s fúzními proteiny GFP-NEDD4. To by mohlo znamenat, že pro zrušení inhibiční intramolekulární vazby ligáz postačuje jen krátký čas interakce s NDFIP1. Ligáza by pak mohla disociovat od NDFIP1 proteinu a zůstat chvíli v aktivním stavu, kdy by mohla modifikovat své substráty. To by vyřešilo problém možné kompetice mezi NDFIP1 a substráty ligáz o volné WW domény. Také je ale možné, že NDFIP1 obsadí jen 2 – 3 WW domény a ty zbývající budou postačující pro vazbu substrátu¹⁹. V případě vazby a ubikvitinace proteinu JUNB ligázou ITCH jedna studie vyslovila hypotézu, že se vytváří komplex jehož součástí je ITCH, JUNB a NDFIP1. První WW doména ligázy ITCH váže protein JUNB a další WW domény zprostředkovávají vazbu s proteinem NDFIP1³⁶.



Obr. 6: Modelové znázornění autoinhibice E3 ligázy ITCH a její aktivace vazbou na NDFIP1. ITCH se udržuje v inhibovaném stavu pomocí vazby WW domén na katalytickou HECT doménu. Tato vazba je narušena, když se NDFIP1 váže na WW domény, a E3 ligáza ITCH se aktivuje. (převzato z ³⁵)

6.3. NDFIP1 jako negativní regulátor aktivity T lymfocytů

Zánětlivé onemocnění *Ndfip1*^{-/-} myši podněcuje *Ndfip1*^{-/-} T lymfocyty, které jsou aktivované a zmnožené ještě předtím, než se objeví první příznaky nemoci. Zvýšené množství aktivovaných T lymfocytů nelze vysvětlit pouze pomocí deregulace produkce IL-4. *Ndfip1*^{-/-} *Il-4*^{-/-} myši si také vyvinou zánětlivé onemocnění se zvýšeným procentuálním zastoupením CD4⁺ T lymfocytů ve sliznicích jícnu a plic⁶⁰. To vedlo některé autory k domněnce, že by se NDFIP1 mohl podílet na negativní regulaci aktivity T lymfocytů.

6.3.1. *Ndfip1*^{-/-} T lymfocyty jsou nezávislé na CD28 kostimulaci

Zvýšená aktivita *Ndfip1*^{-/-} T lymfocytů je způsobena jejich endogenním defektem, protože myši, kterým chyběl NDFIP1 jen v T lymfocytech, měly podobně zvýšené procentuální zastoupení aktivovaných T lymfocytů jako *Ndfip1*^{-/-} myši⁶⁰. *Ndfip1*^{-/-} T lymfocyty však stále vyžadovaly prezentaci antigenu pro aktivaci⁶⁰. Vypadá to tedy, že NDFIP1 ovlivňuje schopnost T lymfocytů odpovídat na stimulační signály a jeho ztráta zvyšuje schopnost T lymfocytů se aktivovat.

Izolované T lymfocyty z *Ndfip1*^{-/-} a WT myší, byly stimulovány *in vitro* pomocí anti-CD3 protilátky s kostimulací pomocí anti-CD28 protilátky nebo bez ní a byla měřena hladina aktivačních znaků CD44 a α řetězce receptoru pro IL-2 (dále už jen CD25). U WT T lymfocytů došlo v prvním dni od stimulace ke zvýšení hladiny IL-2R α . Bez kostimulace však během tří dnů došlo k jejímu poklesu a v pátém dni byla většina těchto buněk mrtvá. V přítomnosti kostimulačního signálu WT T lymfocyty stabilně vykazovaly vysokou hladinu CD25 a přežily po dobu trvání celého experimentu. Expresí CD25 *Ndfip1*^{-/-} T lymfocytů, které obdržely kostimulaci, měla stejný průběh jako u WT T lymfocytů. Bez kostimulace se však chovaly podobně, jako kdyby kostimulaci obdržely⁶⁰. Ve třetím a pátém dnu experimentu vyprodukovaly do kultury signifikantně více IL-2 než WT T lymfocyty a také se více množily, zatímco u stimulovaných WT T lymfocytů bez kostimulace nebyla vidět žádná proliferace. Ať už byla pro stimulaci bez anti-CD28 použita jakákoliv koncentrace anti-CD3, tak *Ndfip1*^{-/-} T lymfocyty vždy produkovaly více IL-2 než WT T lymfocyty⁶⁰.

Jiná studie odhalila, že NDFIP1 se podílí na snížení signální transdukce přes receptor pro IL-2 a jiné receptory tím, že umožňuje degradovat kinázu JAK1. Ovšem uvádí také, že pro zabránění degradace JAK1 jsou důležité oba NDFIP proteiny. Při deficienci jen jednoho z těchto proteinů probíhá degradace JAK1 normálně⁶¹.

Výše uvedená zjištění byla poté testována na *Ndfip1*^{-/-} *CD28*^{-/-} myších. Po stimulaci anti-CD3 produkovaly buňky ze sleziny těchto myší IL-4 na rozdíl od buněk ze sleziny *Ndfip1*^{+/+} *CD28*^{-/-} myší. Analýza *in vivo* ukázala, že v osmém týdnu života měly *Ndfip1*^{-/-} *CD28*^{-/-} myši signifikantně více CD4⁺ T lymfocytů s aktivovaným/paměťovým fenotypem. Zvýšené množství aktivovaných CD4⁺ T lymfocytů korelovalo se zvýšeným zánětem v těchto zvířatech. Patologie *Ndfip1*^{-/-} *CD28*^{-/-} myší důvěryhodně kopírovala patologii *Ndfip1*^{-/-} myší s tím rozdílem, že *Ndfip1*^{-/-} *CD28*^{-/-} myši ji rozvinuly průměrně o 3 týdny později⁶⁰. To, že ztráta CD28 u *Ndfip1*^{-/-} myší neodvrátí zánětlivé onemocnění, je v souladu s tím, že *Ndfip1*^{-/-} T lymfocyty nejsou závislé na kostimulačním signálu přes CD28.

Některé starší studie ukázaly, že *Itch*^{-/-} T lymfocyty také nejsou závislé na CD28 kostimulaci. Místo vstupu do stavu anergie, se tyto buňky začnou dělit a produkovat IL-2^{56,59}. NDFIP1 by tedy mohl snižovat produkci IL-2 po stimulaci T buněčného receptoru prostřednictvím aktivace ligázy ITCH. Když ale byly v novější studii⁶⁰ naivní *Itch*^{-/-} T lymfocyty stimulovány pomocí anti-CD3, tak nevytvářely více IL-2 než jejich WT protějšky. To je v rozporu s uvedenými výsledky popsanými výše^{56,59}. Ty však byly získány s použitím s T lymfocytů, které byly už předtím aktivovány *in vitro*, nebo s efektorovými T lymfocyty⁶⁰. ITCH a NDFIP1 se tedy podílejí na omezení produkce IL-2 efektorovými T lymfocyty, které jsou stimulovány jen přes T buněčný receptor. NDFIP1 má zřejmě ale i funkci v omezování produkce IL-2 při stimulování naivních T lymfocytů. Jeho role netkví v tom, že by reguloval intenzitu

exprese IL-2, ale spíše omezuje dobu trvání této exprese po stimulaci T buněčného receptoru. Po 12 hodinách od stimulace totiž měly *Ndfip1*^{-/-} i WT T lymfocyty stejnou hladinu mRNA pro IL-2. Po 24 hodinách stimulace se snížila hladina mRNA pro IL-2 u WT T lymfocytů, zatímco *Ndfip1*^{-/-} T lymfocyty stále exprimovaly IL-2⁶⁰.

Kromě exprese IL-2 indukuje stimulace T buněčného receptoru také expresi samotného NDFIP1. Její průběh je velmi podobný průběhu exprese IL-2^{60,62}. Tato podobnost je následkem toho, že exprese IL-2 i NDFIP1 je řízena stejnými proteiny NFAT a ERK. Když se při stimulaci T lymfocytů použijí inhibitory těchto faktorů, nedojde k expresi NDFIP1⁶⁰. NFAT je transkripční faktor přímo regulující gen pro IL-2. Při stimulaci T buněčného receptoru je tento faktor defosforylován fosfatázou kalcineurin a je mu umožněno vstoupit do jádra. MAP kináza ERK je fosforylací aktivovaná kináza a její fosforylace také je součástí signální transdukce T buněčného receptoru. Expresi IL-2 stimuluje nepřímo prostřednictvím transkripčních faktorů, které fosforyluje⁶³.

Ke zvýšené aktivitě *Ndfip1*^{-/-} T lymfocytů by mohl přispívat i fakt, že tyto buňky po své aktivaci produkují IL-4⁴¹. IL-4 by pak mohl nepřímo ovlivnit produkci IL-2. *Ndfip1*^{-/-} *Il-4*^{-/-} T lymfocyty ale produkovaly více IL-2 než *Il-4*^{-/-} kontroly, když byly aktivovány pomocí anti-CD3 *in vitro*. Přímé srovnání produkce IL-2 u *Ndfip1*^{-/-} T lymfocytů a *Ndfip1*^{-/-} *Il-4*^{-/-} T lymfocytů však bohužel nebylo provedeno. Při analýze *Ndfip1*^{-/-} *Il-4*^{-/-} myši bylo zjištěno, že absence IL-4 oddálí vývoj zánětlivé nemoci zhruba o 6 týdnů. Tyto myši však stejně předčasně zemřou. I u těchto myši bylo naměřeno zvýšené procentuální zastoupení CD4⁺ T lymfocytů, eozinofilů a neutrofilů ve sliznici plic a jícnu. Analýza slezin neprokázala statisticky významný rozdíl v procentuálním zastoupení aktivovaných T lymfocytů u *Ndfip1*^{-/-} a *Ndfip1*^{-/-} *Il-4*^{-/-} myši⁶⁰. Nutno však podotknout, že v *Ndfip1*^{-/-} *Il-4*^{-/-} myších se obnoví diferenciaci iTreg lymfocytů, která je narušena u *Ndfip1*^{-/-} myši (podrobněji níže)⁴⁶. Nadprodukce IL-4 v *Ndfip1*^{-/-} myších je tedy jeden z faktorů, který vede k vývoji onemocnění, není její jedinou příčinou. *Ndfip1*^{-/-} T lymfocyty se více aktivují a pomnoží *in vivo* a produkují více IL-2 i v nepřítomnosti IL-4. Aktivované T lymfocyty pak migrují do sliznic, které jsou vystaveny antigenům. Za T lymfocyty pak migrují eozinofily a neutrofilů. Součinnost těchto buněk vede k zánětlivému onemocnění, které je nakonec pro myši fatální. Nadprodukce IL-2 *Ndfip1*^{-/-} T lymfocyty je další znak, který přispívá k vývoji zánětlivé choroby *Ndfip1*^{-/-} myši a umožňuje aktivovat T lymfocyty i bez kostimulace pomocí CD28. Aktivované *Ndfip1*^{-/-} T lymfocyty by pak mohly reagovat i na neškodné antigeny z prostředí a na antigeny vlastních tkání. NDFIP1 se podílí na regulaci produkce IL-2 u naivních i diferencovaných T lymfocytů. Ligáza ITCH nemá vliv na regulaci produkce IL-2 v naivních T lymfocytech. Regulace produkce IL-2 proteinem NDFIP1 je tedy alespoň v naivních T lymfocytech nezávislá na ligáze ITCH. Tato funkce proteinu NDFIP1 by mohla být zprostředkována jinou ligázou z rodiny NEDD4. Její identita je však zatím neznámá.

6.3.2. NDFIP-dependentní degradace JAK1

Jiná studie ukázala, že NDFIP1 podporuje přechod aktivovaného T lymfocytu do stavu, kdy je snížena jeho míra signalizace přes některé cytokinové receptory, jako je například receptor pro IL-2. Tuto funkci však má i protein NDFIP2. *Ndfip1*^{-/-} *Ndfip2*^{-/-} myši (dále NDFIP-deficientní myši) vykazují ještě závažnější zánětlivé onemocnění postihující sliznice než *Ndfip1*^{-/-} myši. V porovnání s *Ndfip1*^{-/-} myšmi mají tato zvířata více CD4⁺ T lymfocytů ve slezině. Většina z nich má aktivovaný/paměťový fenotyp a většina z nich produkuje IL-4. Dále tyto aktivované buňky více proliferují než NDFIP1-deficientní T lymfocyty a lépe přežívají než WT T lymfocyty. Větší proliferace NDFIP-deficientních T lymfocytů je viditelná, i když jsou tyto buňky kultivovány *in vitro* s WT T lymfocyty⁶¹. V NDFIP-deficientních myších tedy dochází k expanzi aktivovaných T lymfocytů, které produkují IL-4 a tyto buňky poté mohou mít patogenní účinky. Zvýšená míra proliferace a přežívání těchto buněk se nedá zcela vysvětlit tím, že si samy produkují více podpůrných cytokinů.

Oba NDFIP proteiny dokáží zprostředkovat degradaci kinázy JAK1 a to nejspíše prostřednictvím ubiquitin ligázy ITCH⁶¹. JAK1 se podílí na signální transdukcii receptorů obsahujících γ podjednotku cytokinového receptoru pro IL-2 (CD132)⁶⁴, jejíž součástí je aktivace transkripčních faktorů STAT5A a STAT5B. Tuto podjednotku obsahují receptory pro cytokiny IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 a IL-21⁶⁵⁻⁷⁰. Signál z těchto receptorů je důležitý pro udržení homeostázy T lymfocytů a pro regulaci expanze a přežití T lymfocytů^{71,72}. Mutace genu pro CD132 vede u lidí k těžké kombinované imunodeficienci vázané na X chromozom, která je charakterizovaná nepřítomností T lymfocytů⁷³. To jen potvrzuje důležitost výše zmíněných cytokinů pro vývoj a funkci T lymfocytů. Stimulace T buněčného receptoru vede k expresi NDFIP proteinů, které zprostředkují degradaci kinázy JAK1 a tím sníží citlivosti T lymfocytu na podpůrné cytokiny. Hladina JAK1 byla vyšší v NDFIP-deficientních buňkách než ve WT buňkách a to i bez stimulace. Po stimulaci byl v těchto buňkách detekován vyšší obsah fosforylovaného faktoru STAT5A/B než ve WT lymfocytech, což znamená, že nedocházelo k degradaci JAK1. Stejného zvýšení bylo dosaženo přidáním IL-2 *in vitro* bez stimulace⁶¹.

Zvýšená stabilita proteinu JAK1 vysvětluje zvýšenou expanzi a aktivaci NDFIP-deficientních T lymfocytů. NDFIP proteiny jsou exprimovány po stimulaci T buněčného receptoru, aby navodily stav, kdy T lymfocyt neodpovídá na cytokiny právě pomocí degradace JAK1. Při jejich deficienci dochází k tomu, že T lymfocyt dostává podpůrné signály pomocí receptoru pro IL-2 a další cytokiny. Tomu může pomáhat i to, že *Ndfip1*^{-/-} T lymfocyty po stimulaci mohou produkovat větší množství IL-2 a jsou nezávislé na kostimulaci CD28⁶⁰. V této situaci se pak tedy mohou aktivovat i T lymfocyty, které jsou specifické vůči neškodným antigenům z prostředí a zprostředkují zánětlivou chorobu.

V případě *Ndfip1*^{-/-} CD4+ T lymfocytů také dochází k nadměrné aktivaci a množení^{60,62}. V tomto případě dochází k expresi NDFIP2 a degradaci JAK1⁶¹. NDFIP1 má tedy i další funkce, ve kterých nemůže být zastoupen svým homologem NDFIP2 a které omezují aktivaci a množení CD4+ T lymfocytů. Nemožnost degradovat JAK1 by se však mohla projevit v první stimulaci *Ndfip1*^{-/-} T lymfocytů, protože po první stimulaci je NDFIP1 exprimován více než jeho homolog NDFIP2⁶¹.

6.4. Funkce NDFIP1 v Th17 lymfocytech

6.4.1. Zvýšené množství Th17 lymfocytů v *Ndfip1*^{-/-} myších

Analýza buněk z výplachu průdušek a plicních sklípků *Ndfip1*^{-/-} myši ukázala, že *Ndfip1*^{-/-} myši mají více neutrofilů v plicích prostorech než WT myši. Jejich zvýšené množství bylo pozorováno i ve střevech^{74,75}. To nasvědčovalo tomu, že vedle dříve pozorovaných Th2 lymfocytů by tyto myši mohly v plicích mít i Th17 lymfocyty, které produkují IL-17. IL-17 by pak následně mohl podporovat infiltraci neutrofilů do místa zánětu⁷⁶. Další analýza plic odhalila, že *Ndfip1*^{-/-} zvířata v této tkáni mají skutečně zvýšený počet Th17 lymfocytů, které produkují IL-17, ale počet těchto lymfocytů byl stále menší než počet Th2 lymfocytů⁷⁴. Ke zvýšenému počtu Th17 lymfocytů v *Ndfip1*^{-/-} myších zřejmě přispívá fakt, že NDFIP1 negativně reguluje aktivaci T lymfocytů a jejich proliferaci po aktivaci^{60,62}. Naskýtá se ale i myšlenka, že NDFIP1 se specificky podílí na regulaci diferenciaci Th17 lymfocytů. Když však byla testována ochota *Ndfip1*^{-/-} T lymfocytů diferencovat na Th17 lymfocyty *in vitro*, *Ndfip1*^{-/-} T lymfocyty vytvořily méně Th17 lymfocytů než WT T lymfocyty⁷⁴. IL-4 inhibuje vývoj Th17 lymfocytů⁷⁷. *Ndfip1*^{-/-} T lymfocyty kultivované v podmínkách podporující diferenciaci Th17 lymfocytů stále produkovaly více IL-4 než WT T lymfocyty. IL-4 produkovaný těmito buňkami mohl znemožnit diferenciaci Th17 lymfocytů a místo toho upřednostnit diferenciaci Th2. Svědčí proto výsledek experimentu, ve kterém po přidání protilátek blokujících IL-4 docházelo k diferenciaci Th17 lymfocytů se stejnou intenzitou jako v případě kultivace WT buněk. T lymfocyty z *Ndfip1*^{-/-} *Il-4*^{-/-} myši se také diferencovaly na Th17 lymfocyty normálně⁷⁴.

6.4.2. Probíhající Th2 imunitní odpověď podporuje vývoj Th17 lymfocytů

Výsledky experimentů popsaných v předchozí kapitole ukázaly, že v *Ndfip1*^{-/-} myších musí být i jiné faktory, které podporují vývoj Th17 lymfocytů, jejichž vliv se neuplatnil v kulturách *in vitro*. Jeden takový faktor by mohl být IL-6⁷⁸. IL-6 aktivuje transkripční faktor STAT3⁷⁹, který indukuje expresi RORγT⁸⁰. RORγT je transkripční faktor, který je nezbytný pro vývoj Th17 lymfocytů a řídí

transkripci prozánětlivých cytokinů jako je IL-17A⁸¹ a GM-CSF⁸². Bylo zjištěno, že *Ndfip1*^{-/-} myši mají vyšší hladinu IL-6 v krvi. Když byly *Ndfip1*^{-/-} myším od čtyř týdnů jejich života podávány po dobu dvou týdnů protilátky proti IL-6, byl u nich zjištěn menší počet neutrofilů a Th17 lymfocytů v plicích a byl u nich snížen i plicní zánět⁷⁴. Přestože jsou *Ndfip1*^{-/-} T lymfocyty defektní v diferenciaci na Th17 lymfocyty *in vitro* díky nadměrné produkci IL-4, dojde v *Ndfip1*^{-/-} myších ke zvýšení počtu Th17 lymfocytů v důsledku zvýšené hladiny IL-6. Analýza produkce IL-6 restimulovanými buňkami izolovanými z plic a sleziny *Ndfip1*^{-/-} myši ukázala, že více IL-6 produkujících buněk bylo ve slezině než v plicích. Slezina *Ndfip1*^{-/-} myši obsahovala zvýšené množství eozinofilů a tyto buňky se nejvíce podílely na produkci IL-6. Mohly by tedy být zdrojem zvýšené hladiny IL-6 v krvi *Ndfip1*^{-/-} myši⁷⁴.

Zda probíhající Th2 imunitní odpověď může opravdu podporovat diferenciaci Th17 lymfocytů bylo testováno v experimentech *Ndfip1*^{-/-} *Il-4*^{-/-} myšmi. Tato zvířata skutečně vykazovala menší hladinu IL-6 v krvi a buňkách sleziny, včetně eozinofilů. Bylo také nalezeno méně neutrofilů, Th17 lymfocytů a buněk produkujících Th2 cytokiny v plicích, ve kterých se snížil zánět⁷⁴. U těchto myši došlo také ke snížení množství CD4⁺ T lymfocytů v tenkém střevě, eozinofilů v jícnu, ke snížení počtu leukocytů v plicích, což vedlo ke snížení patologie trávicí soustavy a plic. Ke snížení patologie také mohl přispět fakt, že v *Ndfip1*^{-/-} *Il-4*^{-/-} myších se obnoví vývoj iTreg lymfocytů⁴⁶ (podrobněji níže). Imunitní odpověď v *Ndfip1*^{-/-} myších, která je charakterizovaná zvýšeným počtem Th2 lymfocytů a eozinofilů tedy přispívá k tvorbě Th17 lymfocytů, které rekrutují neutrofilů do místa zánětu a přispívají k vážnosti patologie.

6.4.3. NDFIP1-dependentní degradace ROR γ T ligázou ITCH

Ndfip1^{-/-} *Il-4*^{-/-} myši mají však stále větší procentuální zastoupení Th17 lymfocytů než *Il-4*^{-/-} myši⁷⁵. To ukazuje, že NDFIP1 se podílí na diferenciaci Th17 lymfocytů ještě dalším způsobem, který je nezávislý na IL-4. Potvrzují to i výsledky experimentů s myšimi chimérami transplantovanými směsí buněk kostní dřeně z *Ndfip1*^{-/-} *Il-4*^{-/-} a *Il-4*^{-/-} myši. Přestože byly v tomto uspořádání vystaveny stejnému cytokinovému prostředí, NDFIP1-deficientní buňky měly větší pravděpodobnost stát se Th17 lymfocyty a tuto zvýšenou pravděpodobnost nemohla vysvětlit zvýšená aktivace *Ndfip1*^{-/-} T lymfocytů⁷⁵. Další pokusy s myšimi chimérami ukázaly, že *Ndfip1*^{-/-} *Il-4*^{-/-} Th17 lymfocyty proliferují více než *Il-4*^{-/-} Th17 lymfocyty a přečísli je, i když jsou tyto buňky v jednom organismu⁷⁵. NDFIP1 tedy neovlivňuje přímo diferenciaci Th17 lymfocytů, ale má nějakou roli v už diferencovaných Th17 lymfocytech. Při *in vitro* restimulaci Th17 lymfocytů bylo zjištěno, že během šesti hodin od restimulace se zvýší exprese NDFIP1 a vrátí se na základní hodnotu až v čase 24 hodin od restimulace. Po restimulaci *Ndfip1*^{-/-} *Il-4*^{-/-} a *Il-4*^{-/-} Th17 lymfocytů bylo zjištěno, že NDFIP1-deficientní buňky začaly

produkovat IL-17 přibližně ve stejném čase, kdy se zvyšuje exprese NDFIP1 a po 24 hodinách od restimulace vyprodukovaly do média více IL-17A, IFN γ a GM-CSF⁷⁵. NDFIP1 by se tedy mohl podílet na degradaci některého faktoru, který vede k produkci těchto prozánětlivých cytokinů.

E3 ubikvitin ligáza ITCH je schopná ubikvitinovat ROR γ T⁸³. Kromě toho plicní Th17 lymfocyty z *Itch*^{-/-} *Il-4*^{-/-} myši byly zmnoženy a po restimulaci produkovaly více IL-17, IFN γ a GM-CSF⁷⁵. To jsou stejné znaky, jaké byly pozorovány u *Ndfip1*^{-/-} *Il-4*^{-/-} Th17 lymfocytů. Při testování schopnosti degradovat ROR γ T bylo zjištěno, že *Il-4*^{-/-} Th17 lymfocyty degradovaly ROR γ T mezi 30 minutami až 4 hodinami od restimulace TCR. Naproti tomu *Ndfip1*^{-/-} *Il-4*^{-/-} Th17 lymfocyty si udržely v tomto čase stabilní hladinu ROR γ T⁷⁵. Tyto výsledky tedy vedou k závěru, že NDFIP1 je důležitý pro degradaci faktoru ROR γ T po restimulaci a pro snížení produkce prozánětlivých cytokinů. To, že *Ndfip1*^{-/-} *Il-4*^{-/-} Th17 lymfocyty produkují více IL-17 a dalších prozánětlivých cytokinů, bylo potvrzeno při přenosu *Ndfip1*^{-/-} *Il-4*^{-/-} Th17 lymfocytů do *Rag1*^{-/-} myši. Tyto myši byly častěji postiženy zánětem a poškozením střeva, ve kterém měly více buněk produkujících IL-17, IFN γ a GM-CSF. Produkce zánětlivých cytokinů u nich také vedla k infiltraci neutrofilů do střeva⁷⁵.

NDFIP1 tedy ovlivňuje počet Th17 lymfocytů nepřímou i přímou cestou. Nepřímý vliv spočívá v tom, že deficiencie NDFIP1 podporuje diferenciaci Th2 lymfocytů místo Th17 lymfocytů. Zvýšený počet Th2 lymfocytů v *Ndfip1*^{-/-} myších ale vyvolá zvýšení počtu eozinofilů, které produkcí IL-6 podporují diferenciaci buněk Th17. Tento vliv deficiencie NDFIP1 se neprojeví v myších, které zároveň nemají IL-4. Tyto myši mají méně Th17 lymfocytů, ale stále jich mají více než WT myši. Za tento rozdíl je zodpovědný přímý vliv NDFIP1 na početnost Th17 lymfocytů. NDFIP1 se však neangažuje v regulaci diferenciaci Th17 lymfocytů, ale podílí se prostřednictvím ligázy ITCH na degradaci transkripčního faktoru ROR γ T v již diferencovaných Th17 lymfocytech. V nepřítomnosti NDFIP1 se tento faktor hromadí, a to vede k větší stabilitě Th17 lymfocytů a k větší produkci prozánětlivých cytokinů. Tyto NDFIP1-deficientní Th17 lymfocyty se pak mohou podílet na zánětu plic a střeva. Zvýšená aktivita faktoru ROR γ T však nemůže vysvětlit zvýšenou produkci cytokinů IFN γ a TNF α , jejichž exprese není ovládána pomocí ROR γ T^{81,82,84}. Je tedy pravděpodobné, že existuje ještě jiný faktor, jehož degradace je závislá na přítomnosti NDFIP1. Jeden takový kandidátní protein může být BLIMP1, který v Th17 lymfocytech řídí produkci IFN γ a i GM-CSF⁸⁵. Zajímavé je, že Th17 lymfocyty postrádající ITCH produkují více IL-17, IFN γ a GM-CSF než *Ndfip1*^{-/-} Th17 lymfocyty. ITCH tedy reguluje tyto cytokiny i dalším mechanismem nezávislým na NDFIP1. Jedna možnost je, že ITCH může využívat příbuzný protein NDFIP2, který ji také dokáže vázat a aktivovat^{19,61}.

6.5. Funkce NDFIP1 v regulačních T lymfocytech

6.5.1. *Ndfip1*^{-/-} myši jsou defektní v diferenciaci indukovaných T regulačních lymfocytů

Analýza buněk izolovaných z tenkého střeva *Ndfip1*^{-/-} myši odhalila, že *Ndfip1*^{-/-} myši mají menší počet a procentuální zastoupení FOXP3⁺ T lymfocytů v tenkém střevě, zatímco počet FOXP3⁺ T lymfocytů v thymu byl normální⁴⁶. FOXP3 je transkripční faktor, který hraje důležitou roli ve vývoji a funkci regulačních T lymfocytů⁸⁶⁻⁸⁸. Regulační T lymfocyty představují populaci buněk, které jsou důležité pro udržení imunitní rovnováhy. Potlačují totiž imunitní odpověď vůči vlastním antigenům a neškodným antigenům z prostředí. Nepřítomnost regulačních T lymfocytů vede k vývoji autoimunitních chorob⁸⁹. To, že počet FOXP3⁺ T lymfocytů NDFIP1-deficientních myši se sníží v tenkém střevě, ale ne v thymu ukazuje, že absence NDFIP1 vede k defektu ve vývoji indukovaných regulačních T lymfocytů (dále jen iTreg lymfocyty). Střevo a se střevem asociovaná lymfatická tkáň je místo, kde dochází ve velké míře k vývoji těchto buněk^{90,91}. iTreg lymfocyty se vyvíjejí z naivních CD4⁺ T lymfocytů a hrají důležitou roli v udržení tolerance vůči antigenům z prostředí, se kterými se setkáváme na sliznicích a zmírňují průběh chronického zánětu⁹². Při dalším testování se ukázalo, že naivní *Ndfip1*^{-/-} T lymfocyty diferencují na iTreg lymfocyty *in vitro* a *in vivo* hůře než naivní WT T lymfocyty⁴⁶. Podobně jako *Ndfip1*^{-/-} T lymfocyty ITCH-deficientní T lymfocyty jsou také defektní v diferenciaci na iTreg buňky⁹³. Při porovnávání schopnosti *Ndfip1*^{-/-} a *Itch*^{-/-} T lymfocytů diferencovat na iTreg lymfocyty *in vitro* bylo zjištěno, že *Ndfip1*^{-/-} T lymfocyty diferencují hůře⁴⁶. Když byla sledována exprese faktoru FOXP3 v *Ndfip1*^{-/-} T lymfocytech, *Ndfip1*^{-/-} T lymfocyty exprimovaly podobné množství FOXP3 jako WT T lymfocyty ještě 2 dny po indukci diferenciace, ale do pátého dne od indukce byla exprese faktoru FOXP3 zastavena. Podobné to bylo i s hladinou mRNA kódující FOXP3 v *Ndfip1*^{-/-} T lymfocytech, ta se začala snižovat již v prvním dni po indukci diferenciace⁴⁶. Zdá se tedy, že v těchto buňkách přeměna na iTreg lymfocyty započne, ale jen vzácně je dotažena do konce.

Jak je uvedeno výše, *Ndfip1*^{-/-} T lymfocyty ochotně exprimují IL-4⁴¹. Je též známo, že IL-4 má negativní vliv na diferenciaci iTreg lymfocytů⁹⁴. Z toho vyplývá otázka, zda produkce IL-4 *Ndfip1*^{-/-} T lymfocyty může narušit proces vývoje iTreg lymfocytů. Experimenty *in vitro* ukázaly, že na rozdíl od WT T lymfocytů *Ndfip1*^{-/-} T lymfocyty podstupující diferenciaci v přítomnosti iTreg polarizujícího cytokinu TGF-β produkovaly IL-4 a už po 48 hodinách diferenciace se množství IL-4 dostalo na úroveň, která dokázala zamezit této diferenciaci ve WT buňkách. ITCH-deficientní T lymfocyty produkovaly při této kultivaci IL-4 také, ale v menším množství. Když byly při kultivaci *Ndfip1*^{-/-} T lymfocytů použity protilátky blokující IL-4, došlo k obnově diferenciace iTreg lymfocytů. Podobný efekt měla i deficience IL-4 v *Ndfip1*^{-/-} *Il-4*^{-/-} myších *in vivo*, která vedla ke zvýšení

procentuálního zastoupení iTreg lymfocytů na stejnou úroveň jako u *Ndfip1^{+/+} Il-4^{-/-}* myši. Vedla také ke zlepšení jejich zdravotního stavu (viz výše) ⁴⁶.

Studium *Ndfip1^{-/-}* T lymfocytů odhalilo některé zajímavé časové aspekty diferenciaci iTreg buněk. Produkce IL-4 se u *Ndfip1^{-/-}* T lymfocytů zvýší mezi 24 až 48 hodinami po začátku indukce diferenciaci na iTreg lymfocyty. V tomto časovém intervalu také dochází ke zvýšení exprese receptoru pro IL-4 u WT i *Ndfip1^{-/-}* T lymfocytů. Když byly přidány protilátky blokující IL-4 do kultury podporující diferenciaci iTreg, bylo zjištěno, že přidání protilátek v čase 24 hodin od počátku kultivace vedlo k obnovení diferenciaci *Ndfip1^{-/-}* iTreg lymfocytů. Když ale byly přidány později, k vytvoření iTreg lymfocytů nedošlo ⁴⁶. Tyto výsledky ukazují, že časový interval mezi 24 a 48 hodinami od počátku diferenciaci iTreg lymfocytů, kdy jsou T lymfocyty citlivé na signály z prostředí (např. IL-4), je rozhodující pro úspěšnost diferenciaci. V tomto intervalu by mohla být potřebná přítomnost NDFIP1 v T lymfocytech, která by bránila produkci IL-4. Při měření syntézy mRNA kódující NDFIP1 ve WT T lymfocytech kultivovaných v podmínkách indukující vznik iTreg lymfocytů, bylo zjištěno, že po prvním dni kultivace je v buňkách nejvíce mRNA kódující NDFIP1. To je zároveň čas, kdy T lymfocyty exprimují FOXP3 a receptor pro IL-4. Důležité je, že exprese NDFIP1 byla větší, když byl v médiu TGF- β ⁴⁶. TGF- β tedy během diferenciaci T lymfocytů na iTreg lymfocyty zvyšuje expresi proteinu NDFIP1. To vede ke snížení produkce IL-4 a tím zvýšení efektivity diferenciaci.

Další testy ukázaly, že během indukce diferenciaci iTreg lymfocytů *Ndfip1^{-/-}* T lymfocyty obsahují větší množství proteinu JUNB než WT T lymfocyty, protože je znemožněna jeho degradace ⁴⁶. To lze vysvětlit příspěvkem NDFIP1 k aktivaci ubikvitin ligázy ITCH a degradaci JUNB ⁴¹. Nadbytek JUNB v *Ndfip1^{-/-}* T lymfocytech způsobuje produkci IL-4, která znemožňuje diferenciaci iTreg lymfocytů. Kultivace *Ndfip1^{-/-}* a WT T lymfocytů za různých podmínek ukázala, že TGF- β a stimulace TCR podporují expresi JUNB. To platilo pro oba genotypy ⁴⁶. Fakt, že TGF- β podporuje expresi JUNB, je zvláštní, protože, jak bylo uvedeno výše, zároveň indukuje expresi NDFIP1, který zprostředkovává degradaci JUNB.

6.5.2. Nestabilita *Ndfip1^{-/-}* Treg lymfocytů

Jiná studie analyzovala funkci NDFIP1 v Treg lymfocytech pomocí myšního modelu, který měl deletován NDFIP1 jen v buňkách exprimujících FOXP3 (*Ndfip1^{fl/fl} FoxP3-Cre*). Podobně jako u celotělové deficiencie NDFIP1 došlo k rozvoji onemocnění charakterizovaného zánětem kůže, plic, trávicí soustavy a zvětšením sleziny. Zvýšená hladina protilátek IgE ukázala, že zánět je zprostředkován Th2 imunitní odpovědí. V plicích a slezině měly tyto myši zvýšené procentuální zastoupení CD4⁺ T lymfocytů, které vykazovaly aktivovaný/paměťový fenotyp, a v plicích měly

zvýšené procentuální zastoupení CD4⁺ T lymfocytů produkujících IL-4, IL-17 nebo IFN- γ . V porovnání s myši, které mají *Ndfip1* deletován ve všech buňkách, se u *Ndfip1^{fl/fl} FoxP3-Cre* myši onemocnění vyvine později a to ve věku 9 – 16 týdnů. Tyto myši měly v plicích a slezinách zvýšený počet a procentuální zastoupení Treg lymfocytů a větší podíl těchto buněk vykazoval fenotyp aktivovaných/efektorových Treg lymfocytů (dále jen eTreg lymfocyty) než tomu bylo u WT myši. Měly však stejný počet Treg lymfocytů s neaktivovaným/klidovým fenotypem, označovaných též jako centrální Treg (cTreg). Větší podíl Treg lymfocytů s eTreg fenotypem není zapříčiněn zvýšenou mírou přeměny cTreg lymfocytů na eTreg lymfocyty, protože deficiencie NDFIP1 neměla vliv na produkci Treg lymfocytů v thymu a zároveň se nelišil počet cTreg lymfocytů mezi WT a *Ndfip1^{fl/fl} FoxP3-Cre* myši. NDFIP1-deficientní eTreg lymfocyty také exprimovaly více molekul ICOS, GITR, PD-1 a CD25 než WT eTreg lymfocyty. Další experimenty ukázaly, že zatímco zvýšení exprese PD-1 a CD25 je pouze důsledkem probíhajícího zánětu, exprese ICOS a GITR je regulována NDFIP1. Ztráta NDFIP1 však neovlivnila schopnost Treg lymfocytů inhibovat proliferaci WT konvenčních T lymfocytů⁹⁵.

Stejná situace byla u myši, které měly *Ndfip1* deletovaný přibližně ve dvou pětinach FOXP3⁺ T lymfocytů. Také tyto myši byly postiženy zánětem. Jejich CD4⁺ T lymfocyty izolované z plic po *ex vivo* restimulaci produkovaly více prozánětlivých cytokinů a měly zvýšené množství Treg lymfocytů, které vykazovaly většinou fenotyp eTreg lymfocytů. Jejich *Ndfip1^{-/-}* FOXP3⁺ T lymfocyty také snadněji proliferovaly⁹⁵. Bylo překvapivé, že v těchto zvířatech došlo k rozvoji zánětu i v přítomnosti velkého množství normálních *Ndfip1^{+/+}* Treg buněk (více než polovina celkového počtu Treg). Toto pozorování vedlo k hypotéze, že *Ndfip1^{-/-}* Treg nějakým způsobem aktivně podporují rozvoj zánětlivé odpovědi.

Pro další experimenty byly připraveny chimérické myši, transplantované směsí buněk kostní dřeně z WT a *Ndfip1^{fl/fl} FoxP3-Cre* myši. Při měření produkce cytokinů po *ex vivo* stimulaci bylo zjištěno, že na rozdíl od WT Treg lymfocytů *Ndfip1^{fl/fl} FoxP3-Cre* Treg lymfocyty produkovaly cytokiny podporující zánětlivou odpověď, zejména IL-4. Oproti očekávání také část konvenčních *Ndfip1^{fl/fl} FoxP3-Cre* T lymfocytů (FOXP3⁺) produkovala IL-4⁹⁵. To vedlo k domněnce, že tyto IL-4 produkující buňky vznikly z Treg, které ztratily expresi *FoxP3*. Vzhledem k tomu, že signalizace přes receptor pro IL-4 vede k metylaci regionu CNS2 v lokusu pro *FoxP3*, která omezí jeho expresi⁹⁶, mohlo se stát, že IL-4 produkovaný *Ndfip1^{-/-}* Treg lymfocyty zapříčinil ztrátu FOXP3 v těchto buňkách. Metylace regionu CNS2 byla opravdu větší v *Ndfip1^{-/-}* Treg lymfocytech než WT Treg lymfocytech. Při *in vitro* kultivaci Treg lymfocytů s IL-4 *Ndfip1^{-/-}* i WT Treg lymfocyty ztratily expresi FOXP3 stejnou mírou. Ale po adoptivním přenosu *Ndfip1^{-/-}* Treg lymfocytů do *Rag1^{-/-}* myši ztratilo průměrně 60 % *Ndfip1^{-/-}* Treg expresi *FoxP3*. Naproti tomu v případě přenosu WT Treg lymfocytů ztratilo průměrně 30 % těchto buněk expresi *FoxP3*. V obou případech byl s Treg lymfocyty do *Rag1^{-/-}* myši přeneseny i WT konvenční T lymfocyty⁹⁵. NDFIP1 tedy přispívá ke stabilitě Treg lymfocytů tím, že blokuje produkci

IL-4 a tak stabilizuje expresi faktoru FOXP3. Role NDFIP1 jako regulátoru produkce IL-4 však nevysvětluje zvýšenou proliferaci, aktivaci a expresi ICOS. *Ndfip1^{-/-} Il-4^{-/-}* myši měly totiž větší procentuální zastoupení Treg lymfocytů než *Il-4^{-/-}* myši a jejich proliferace byla větší. Treg lymfocyty v *Ndfip1^{-/-} Il-4^{-/-}* myších s větší frekvencí vykazovaly fenotyp eTreg lymfocytů a eTreg lymfocyty v *Ndfip1^{-/-} Il-4^{-/-}* myších exprimovaly větší množství ICOS⁹⁵.

Při dalších analýzách bylo zjištěno, že *Ndfip1^{-/-}* Treg lymfocyty vykazují vyšší aktivitu komplexu mTORC1 a změny v metabolismu. Při aktivaci konvenčních T lymfocytů se změní jejich metabolismus, začnou ve zvýšené míře využívat glukózu jako zdroj energie, aby mohly proliferovat a syntetizovat potřebné proteiny a naopak se sníží jejich míra oxidace mastných kyselin. Pro tento metabolický přesmyk je důležitá kináza mTOR, jejíž aktivita se v těchto buňkách výrazně zvýší^{97,98}. Na rozdíl od efektorových T lymfocytů se Treg lymfocyty více spoléhají na oxidaci mastných kyselin⁹⁹. U nich je naopak nutné pro jejich zdárný vývoj aktivitu mTOR zmírnit^{100,101}. Delece mTOR v T lymfocytech dokonce vede k tomu, že přednostně diferencují na Treg lymfocyty¹⁰². Míra využívání glykolýzy Treg lymfocytů je obvykle malá. Stimulací je však možné docílit jejího zvýšení. Při *in vitro* restimulaci *Ndfip1^{-/-}* Treg lymfocytů se intenzita jejich glykolýzy zvýšila více než po restimulaci WT Treg lymfocytů. Díky zvýšené aktivitě mTORC1 a většímu využívání glykolýzy *Ndfip1^{-/-}* Treg lymfocyty více proliferují a jejich počet v organismu se zvýší. Zvýšená aktivita mTORC1 spolu se zvýšenou produkcí IL-4 pravděpodobně také vede k tomu, že se Treg stanou nestabilními, ztratí expresi FOXP3 a to přispěje k rozvoji zánětlivého onemocnění. Přesný mechanismus, kterým NDFIP1 reguluje aktivitu mTOR však není znám.

Lze tedy shrnout, že NDFIP1 reguluje funkci a stabilitu Treg lymfocytů prostřednictvím celé řady mechanismů. Tyto mechanismy zahrnují inhibici produkce IL-4, regulaci exprese proteinů ICOS a GITR, regulaci metabolismu a aktivity komplexu mTORC1. Na stabilitu Treg lymfocytů má vliv hlavně produkce IL-4 a aktivita mTORC1, které jsou prostřednictvím NDFIP1 inhibovány. V nepřítomnosti NDFIP1 vede zvýšená aktivita těchto dvou drah ke zvýšené proliferaci a ke ztrátě exprese transkripčního faktoru FOXP3. Ztráta exprese FOXP3 vyústí k destabilizaci těchto buněk, které ztratí svůj regulační potenciál a přispějí k rozvoji zánětlivého onemocnění.

6.6. NDFIP1 jako regulátor periferní tolerance

6.6.1. NDFIP1 omezuje dělení nedostatečně stimulovaných CD4⁺ T lymfocytů

Role NDFIP1 v periferní toleranci byla testována pomocí *Ndfip1^{kru/kru}* myši připravených za použití chemické mutagenese. Exprimují pouze velmi malé množství zkráceného NDFIP1 proteinu, takže je lze považovat za NDFIP1-deficientní kmen. Rozvine se u nich stejná nemoc jako u *Ndfip1^{-/-}* myši, pouze s o něco pomalejší kinetikou. Když byly WT myši imunizovány antigenem za tolerogenních podmínek, kdy je antigen injikován pokusným zvířatům v nepřítomnosti adjuvans, antigenně specifické buňky se nejdříve pomnožily, ale tato reakce byla do šesti dnů zastavena a jejich množství se opět snížilo⁶². Při stejném setkání *Ndfip1^{kru/kru}* T lymfocytů s antigenem se tyto buňky množily více a diferencovaly na Th2 lymfocyty a ani po šesti dnech neopustily buněčný cyklus, nedošlo k jejich apoptóze ani nebyly ve stavu anergie. Podobná reakce byla pozorována u *Ndfip1^{kru/kru}* T buněk po adoptivním transferu do WT myši, kde se nacházely normální počty WT regulačních T lymfocytů a dalších buněk⁶². Jedním z mechanismů periferní tolerance, který má zabránit takovéto nekontrolované aktivitě, je apoptóza zprostředkovaná proteinem BIM, která je zodpovědná za umírání T lymfocytů po jejich aktivaci¹⁰³. Při stejném pokusu s BIM-deficientními T lymfocyty také došlo k pomnožení, ale to bylo menší než v případě *Ndfip1^{kru/kru}* T lymfocytů. Po několika kolech dělení vstoupily tyto T lymfocyty do G₀ fáze buněčného cyklu. To se však nestalo u *Ndfip1^{kru/kru}* T lymfocytů, které se dále dělily⁶².

Aktivace T lymfocytů vede ke zvýšení exprese proteinu NDFIP1^{60,62}. Tyto výsledky ukazují, že exprese NDFIP1 je důležitá pro zastavení dělení T lymfocytů stimulovaných antigenem za tolerogenních podmínek. Tento mechanismus může být důležitým prvkem udržování periferní tolerance při utlumování buněk, které unikly negativní selekci v thymu. Pro thymickou negativní selekci je kritický protein AIRE¹⁰⁴. *Aire^{-/-} Ndfip1^{kru/kru}* myši trpí mnohem závažnější autoimunitou než *Aire^{-/-}* myši. Umírají již ve věku 30 až 40 dnů a dojde u nich k infiltraci lymfocytů do pankreatu a k následné destrukci exokrinních pankreatických buněk. Mechanismus, jehož základem je NDFIP1, je však důležitý, i v případech kdy je negativní selekce T lymfocytů funkční. Pro následující experimenty byl vytvořen myši model, kde T lymfocyty nesly transgenní T buněčný receptor specifický pro HEL protein a tento protein byl u nich zároveň exprimován v pankreatu. Tyto myši onemocněly při absenci proteinu NDFIP1 diabetem ve věku 60 dní. Myši s alespoň jednou funkční alelou pro NDFIP1 zůstaly zdravé. Je nutné podotknout, že nepřítomnost NDFIP1 proteinu neměla vliv na průběh negativní selekce T lymfocytů⁶². Tudíž mechanismus periferní tolerance zprostředkovaný proteinem NDFIP1 v tomto případě kontroloval autoreaktivní T lymfocyty, které unikly thymové selekci. Když byl tento model upraven tak, že autoreaktivní HEL-specifické *Ndfip1^{kru/kru}* T lymfocyty představovaly jen malou populaci z celkového počtu T lymfocytů, došlo k expanzi těchto buněk, bez vývoje diabetu. Při

injikování roztoku HEL proteinu se zvýšila míra proliferace těchto buněk až na úroveň postačující pro destrukci pankreatických ostrůvků a vývoj diabetu⁶². To je v souladu s předchozím tvrzením, že NDFIP1 je důležitý pro kontrolu autoreaktivních T lymfocytů. Pokud má jedinec jen malý počet autoreaktivních T lymfocytů, tak se u nich deficeence NDFIP1 nemusí viditelně projevit. Množství prezentovaného antigenu však hraje také důležitou roli ve výsledku imunitní odpovědi a v řízení akumulace *Ndfip1^{kru/kru}* T lymfocytů⁶². Když se tyto autoreaktivní T lymfocyty dostanou do styku s velkým množstvím specifického autoantigenu, což se může stát např. při rozsáhlejších poškození tkáně a uvolnění tohoto autoantigenu, tak se tyto autoreaktivní *Ndfip1^{kru/kru}* T lymfocyty mohou pomnožit, diferencovat a zprostředkovat destrukci dané tkáně.

Výše uvedené výsledky nám naznačují, že NDFIP1 funguje tak, že zvyšuje aktivační práh T lymfocytů, který je nutný pro udržení proliferace těchto buněk. T lymfocyty, které obdrží pouze suboptimální aktivační signály, jsou nuceny vstoupit do G₀ fáze. V nepřítomnosti NDFIP1 však tyto signály stačí k tomu, že se mohou dělit dále a diferencovat do efektorových buněk. Není zatím jasné, jestli NDFIP1 omezuje dělení T lymfocytů tím, že omezí jejich produkci IL-2, nebo jiným mechanismem. Pro vyřešení této otázky by bylo nutné provést experimenty s *Ndfip1^{-/-} IL-2^{-/-}* T lymfocyty. NDFIP1 by také mohl zabránit tomu, aby T lymfocyty, které proliferují po aktivaci, produkovaly IL-4, který snižuje jejich úmrtnost¹⁰⁵. Tato pozitivní zpětná vazba by odstranila závislost T lymfocytů na cytokinech produkovaných ostatními buňkami a vedla by k tomu, že T lymfocyty by se množily, úspěšně diferencovaly na efektorové T lymfocyty a nevstoupily do stavu anergie i v reakci na tolerogen. Není jasné do jaké míry se na regulaci periferní tolerance proteinem NDFIP podílí ubiquitin ligáza ITCH. Jedna studie popsala, že ITCH je nezbytný pro toleranci Th2 lymfocytů. Ta samá studie ale také uvádí, že v tomto případě se ITCH aktivuje tak, že je fosforylován kinázou JNK po stimulaci T buněčného receptoru a mohl by tedy být aktivní i bez NDFIP1⁵⁹. Jestli NDFIP1 aktivuje ITCH i v této situaci není jisté, zároveň to ale nemůžeme vyloučit.

Zajímavé je, že NDFIP1 není důležitý pro udržení tolerance vůči bakteriím střevní mikroflóry. Byť střevní mikroflóra představuje zdroj antigenů, které jsou prezentovány T lymfocytům, tak *Ndfip1^{-/-}* myším, kterým byla podávána antibiotika po celý život, se nezměnilo procentuální zastoupení CD4⁺ T lymfocytů s aktivovaným/paměťovým fenotypem ve slezině a měly stejné příznaky zánětu střeva a jícnu jako kontrolní *Ndfip1^{-/-}* myši¹⁰⁶.

6.6.2. NDFIP1 snižuje signalizaci přes T buněčný receptor CD8⁺ T lymfocytů

Jak již bylo zmíněno výše, *Ndfip1^{kru/kru}* myši mají zvýšené množství aktivovaných/paměťových CD4⁺ T lymfocytů. Mimo to mají i více aktivovaných CD8⁺ T lymfocytů. Jejich zmnožení je ale

následkem zánětu, který zprostředkovávají hlavně *Ndfip1^{kru/kru}* CD4⁺ T lymfocyty⁶². Zvýšená hladina IL-4 u *Ndfip1^{-/-}* myši také vede k expanzi jedné populace paměťových CD8⁺ T lymfocytů¹⁰⁷. Je tudíž těžké odděleně studovat roli NDFIP1 v CD8⁺ T lymfocytech. Byl však vytvořen myší model, který generoval naivní *Ndfip1^{kru/kru}* CD8⁺ T lymfocyty specifické pro ovalbumin. Ty pak mohly být přeneseny do recipientů exprimujících ovalbumin v buňkách pankreatických ostrůvků. Přenesené *Ndfip1^{kru/kru}* i WT CD8⁺ T lymfocyty proliferovaly při setkání s antigenem, ale nevytvořily aktivní cytotoxické buňky a zemřely apoptózou. Tyto výsledky ukázaly, že u nich za těchto podmínek nedošlo k porušení periferní tolerance (na rozdíl od *Ndfip1^{-/-}* CD4⁺ T lymfocytů vystavených podobným podmínkám, viz výše). Když však těmto myším byly ještě injikovány tři velké dávky roztoku ovalbuminu v době 1 den před přenosem, 1 den po přenosu a 2 dny po přenosu buněk, tak u 84 % myši došlo k proliferaci *Ndfip1^{kru/kru}* CD8⁺ T lymfocytů a destrukci pankreatických ostrůvků. Malé dávky ovalbuminu toto množení a destrukci nevyvolaly¹⁰⁸. NDFIP1 tedy může také hrát roli v omezení expanze CD8⁺ T lymfocytů po střetnutí vysokou dávkou antigenu.

Podání vysoké dávky antigenu, který má vyvolat toleranci podporuje v CD8⁺ T lymfocytech anergický stav¹⁰⁹. *Ndfip1^{kru/kru}* CD8⁺ T lymfocyty se při *in vivo* střetu s velkou dávkou antigenu více množily, méně umíraly a ochotněji diferencovaly na cytolytické buňky. Jejich cytokinová produkce se nelišila od WT CD8⁺ T lymfocytů specifických na ovalbumin. Když byly při pokusu o navození anergického stavu vysokou dávkou antigenu zkoumány *Ndfip1^{kru/kru}* CD8⁺ T lymfocyty, měly při restimulaci *in vitro* provedené čtvrtý den po indukci anergie vyšší množství fosforylované kinázy ERK, více fosforylovaného ribozomálního proteinu S6 (cíle mTOR) a byly větší než WT CD8⁺ T lymfocyty. Rozdíl v množství fosforylované kinázy ERK a ve velikosti buněk pak nebyl znovu pozorován, pokud byla restimulace provedena v šestém dni od indukce anergie, ale zvýšené množství fosforylovaného proteinu S6 bylo stále vidět¹⁰⁸. Když se WT CD8⁺ T lymfocyty setkají s velkou koncentrací antigenu, který má navodit toleranci/anergii, je jejich fosforylace kinázy ERK i aktivita mTOR vyvolaná stimulací T buněčného receptoru, inhibovaná^{109,110}. Nedostatečná inhibice těchto drah v *Ndfip1^{kru/kru}* buňkách zřejmě přispívá k vyšší expanzi a diferenciaci CD8⁺ T lymfocytů v reakci na vysoké dávky antigenu. NDFIP1 se tak může podílet např. na imunitní toleranci vůči antigenům z prostředí, se kterými se setkáváme ve velkém množství. Naproti tomu NDFIP1 neovlivňuje CD8⁺ T lymfocyty během akutní infekce¹⁰⁸.

NDFIP1 má tedy funkci i v regulaci CD8⁺ T lymfocytů, která se liší od jeho funkce v CD4⁺ T lymfocytech. NDFIP1-deficientní CD8⁺ T lymfocyty při střetu s velkou dávkou tolerogenního antigenu expandují, ale ne kvůli zástavě buněčného cyklu, ale kvůli tomu, že nedojde k dostatečnému snížení jejich signalizace přes T buněčný receptor. Jejich stimulace vysokou dávkou antigenu pak vede k pomnožení, menšímu umírání a získání cytolytických vlastností. Přesný molekulární mechanismus není známý. Můžeme jen spekulovat, že NDFIP1 by se mohl podílet na degradaci některých signálních molekul, které jsou zapojeny do signalizace přes T buněčný receptor. Vhodným kandidátem by mohl být např. některý člen signální dráhy mTOR, protože aktivita mTOR je u *Ndfip1*^{kru/kru} CD8⁺ T lymfocytů, které by měly být anergické, zvýšena po jejich restimulaci¹⁰⁸. Jak bylo popsáno výše, NDFIP1 omezuje aktivitu dráhy mTORC1 i v regulačních T lymfocytech⁹⁵.

7. Závěr

NDFIP1 je adaptorový transmembránový protein, který má 3 [L/P]PXY motivy. Tyto motivy se váží na WW domény E3 ligáz z rodiny NEDD4 a tím zprostředkovávají jejich aktivaci a usnadňují ubikvitinaci jejich substrátů. Deficience tohoto proteinu může vést ke snížení funkčnosti ligáz z rodiny NEDD4. U myši jeho mutace vede k vývoji zánětlivého onemocnění charakterizovaného nadměrnou aktivací T lymfocytů, které expandují, diferencují na efektorové T lymfocyty, migrují do kůže, plic, trávicí soustavy a zde zprostředkovávají poškozující zánět. Přítomnost *Ndfip1*^{-/-} T lymfocytů je naprosto nezbytná pro vývoj této choroby. Tato práce si kladla za cíl popsat funkci proteinu NDFIP1 v T lymfocytech a vysvětlit, jak jeho nepřítomnost vede k zánětlivé chorobě.

Ndfip1^{-/-} T lymfocyty stále vyžadují pro svou aktivaci rozeznání antigenu. Jejich aktivace však vyvolá větší produkci IL-2, který pozitivně reguluje proliferaci, a to až do takové míry, že aktivace těchto T lymfocytů se stane nezávislou na kostimulačním signálu přes CD28. Aktivované *Ndfip1*^{-/-} T lymfocyty nepřestanou proliferovat ani, když jsou aktivovány za tolerogenních podmínek. Pomnoží se do většího počtu a diferencují na efektorové T lymfocyty.

NDFIP1 dále reguluje diferenciaci Th2 lymfocytů a to tak, že aktivuje ligázu ITCH, která ubikvitinuje transkripční faktor JUNB, který je pak degradován. Bez NDFIP1 dojde k akumulaci JUNB, který řídí produkci IL-4 a IL-5. IL-4 poté podporuje diferenciaci Th2 lymfocytů a znemožňuje diferenciaci indukovaných regulačních T lymfocytů. IL-5 podporuje zvýšení počtu eozinofilů a jejich migraci do míst zánětu. Eozinofily následně produkují IL-6 podporující diferenciaci Th17 lymfocytů, které zhoršují průběh choroby. V Th17 lymfocytech se projeví deficience NDFIP1 i tak, že ligáza ITCH není schopná ubikvitinovat transkripční faktor ROR γ T, což vede ke stabilizaci těchto buněk a nadměrné produkci cytokinů. NDFIP1-zprostředkovaná degradace faktoru JUNB je také důležitá pro udržení stability regulačních T lymfocytů. Bez NDFIP1 tyto buňky produkují IL-4, který u nich může zapříčinit ztrátu transkripčního faktoru FoxP3 definující linii Treg lymfocytů. Při jeho ztrátě *Ndfip1*^{-/-} regulační T lymfocyty začnou produkovat prozánětlivé cytokiny, zvýší se u nich aktivita signální dráhy mTOR a začnou podporovat zánět.

ITCH pravděpodobně není jedinou ubikvitin ligázou regulovanou NDFIP1. Její deficience sice vede k řadě podobných příznaků jako deficience NDFIP1, nižší závažnost těchto příznaků však ukazuje, že NDFIP1 je důležitý i pro regulaci dalších T lymfocytárních proteinů, a je pravděpodobné, že mezi ně budou patřit i další členové rodiny NEDD4.

8. Použitá literatura

1. Hershko A, Ciechanover A, Heller H, Haas AL, Rose IA. 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):1783-1786. doi:10.1073/pnas.77.4.1783
2. *Swatek KN, Komander D. Ubiquitin modifications. *Cell Res*. 2016;26(4):399-422. doi:10.1038/cr.2016.39
3. Chau V, Tobias JW, Bachmair A, et al. A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science*. 1989;243(4898):1576-1583.
4. Thrower JS, Hoffman L, Rechsteiner M, Pickart CM. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J*. 2000;19(1):94-102. doi:10.1117/12.21634
5. *Teixeira LK, Reed SI. Ubiquitin Ligases and Cell Cycle Control. *Annu Rev Biochem*. 2013;82(1):387-414. doi:10.1146/annurev-biochem-060410-105307
6. *Gupta I, Singh K, Varshney NK, Khan S. Delineating crosstalk mechanisms of the ubiquitin proteasome system that regulate apoptosis. *Front Cell Dev Biol*. 2018;6(FEB):1-25. doi:10.3389/fcell.2018.00011
7. *Yao T, Ndoja A. Regulation of gene expression by the ubiquitin-proteasome system. *Semin Cell Dev Biol*. 2012;23(5):523-529. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted
8. *Foot N, Henshall T, Kumar S. Ubiquitination and the regulation of membrane proteins. *Physiol Rev*. 2017;97(1):253-281. doi:10.1152/physrev.00012.2016
9. *Uckelmann M, Sixma TK. Histone ubiquitination in the DNA damage response. *DNA Repair (Amst)*. 2017;56:92-101. doi:10.1016/j.dnarep.2017.06.011
10. *Courtois G, Fauvarque MO. The many roles of ubiquitin in NF- κ B signaling. *Biomedicines*. 2018;6(2):1-47. doi:10.3390/biomedicines6020043
11. *Pickart CM. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem*. 2001;70:503-533.
12. *Zheng N, Shabek N. Ubiquitin Ligases: Structure, Function, and Regulation. *Annu Rev Biochem*. 2017;86(1):129-157. doi:10.1146/annurev-biochem-060815-014922
13. Waterman H, Katz M, Rubin C, et al. A mutant EGF-receptor defective in ubiquitylation and endocytosis unveils a role for Grb2 in negative signaling. *EMBO J*. 2002;21(3):303-313. doi:10.1093/emboj/cdf422a
14. Ogunjimi AA, Briant DJ, Pece-Barbara N, et al. Regulation of Smurf2 ubiquitin ligase activity by anchoring the E2 to the HECT domain. *Mol Cell*. 2005;19(3):297-308. doi:10.1016/j.molcel.2005.06.028
15. Mortensen F, Schneider D, Barbic T, et al. Role of ubiquitin and the HPV E6 oncoprotein in E6AP-mediated ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(32):9872-9877. doi:10.1073/pnas.1505923112
16. *Sluimer J, Distel B. Regulating the human HECT E3 ligases. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75(17):3121-3141. doi:10.1007/s00018-018-2848-2
17. Jolliffe CN, Harvey KF, Haines BP, Parasivam G, Kumar S. Identification of multiple proteins expressed in murine embryos as binding partners for the WW domains of the ubiquitin-protein ligase Nedd4. *Biochem J*. 2000;351(3):557-565. doi:10.1042/0264-6021:3510557

18. Harvey KF, Shearwin-Whyatt LM, Fotia A, Parton RG, Kumar S. N4WBP5, a potential target for ubiquitination by the Nedd4 family of proteins, is a novel Golgi-associated protein. *J Biol Chem.* 2002;277(11):9307-9317. doi:10.1074/jbc.M110443200
19. Mund T, Pelham HRB. Control of the activity of WW-HECT domain E3 ubiquitin ligases by NDFIP proteins. *EMBO Rep.* 2009;10(5):501-507. doi:10.1038/embor.2009.30
20. Wang Y, Tong X, Ye X. Ndfip1 Negatively Regulates RIG-I–Dependent Immune Signaling by Enhancing E3 Ligase Smurf1-Mediated MAVS Degradation. *J Immunol.* 2012;189(11):5304-5313. doi:10.4049/jimmunol.1201445
21. Zarrinpar A, Lim WA. Converging on proline: the mechanism of WW domain peptide recognition. *Nat Struct Biol.* 2000;7(8):611-613. doi:10.1038/77891
22. Trimpert C, Wesche D, De Groot T, et al. NDFIP allows NEDD4/NEDD4L-induced AQP2 ubiquitination and degradation. *PLoS One.* 2017;12(9):1-18. doi:10.1371/journal.pone.0183774
23. *Harvey KF, Kumar S. Nedd4-like proteins: An emerging family of ubiquitin-protein ligases implicated in diverse cellular functions. *Trends Cell Biol.* 1999;9(5):166-169. doi:10.1016/S0962-8924(99)01541-X
24. Kumar S, Tomooka Y, Noda M. Identification of a set of genes with developmentally down-regulated expression in the mouse brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;185(3):1155-1161. doi:10.1016/0006-291X(92)91747-E
25. *Ingham RJ, Gish G, Pawson T. The Nedd4 family of E3 ubiquitin ligases: Functional diversity within a common modular architecture. *Oncogene.* 2004;23(11 REV. ISS. 1):1972-1984. doi:10.1038/sj.onc.1207436
26. Knopf JL, Lee MH, Sultzman LA, et al. Cloning and expression of multiple protein kinase C cDNAs. *Cell.* 1986;46(4):491-502. doi:10.1016/0092-8674(86)90874-3
27. Plant PJ, Yeger H, Staub O, Howard P, Rotin D. The C2 domain of the ubiquitin protein ligase Nedd4 mediates Ca²⁺-dependent plasma membrane localization. *J Biol Chem.* 1997;272(51):32329-32336. doi:10.1074/jbc.272.51.32329
28. Plant PJ, Lafont F, Lecat S, Verkade P, Simons K, Rotin D. Apical membrane targeting of Nedd4 is mediated by an association of its C2 domain with annexin XIIIb. *J Cell Biol.* 2000;149(7):1473-1483. doi:10.1083/jcb.149.7.1473
29. Bork P, Sudol M. The WW domain: a signalling site in dystrophin? *Trends Biochem Sci.* 1994;19(12):531-533. doi:10.1016/0968-0004(94)90053-1
30. Chen HI, Sudol M. The WW domain of Yes-associated protein binds a proline-rich ligand that differs from the consensus established for Src homology 3-binding modules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(17):7819-7823. doi:10.1073/pnas.92.17.7819
31. Lu AP, Zhou XZ, Shen M, et al. Function of WW Domains as Phosphoserine- or Phosphothreonine-Binding Modules Published by : American Association for the Advancement of Science Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/2896589> Linked references are available on JSTOR for this article : Fu. 2016;283(5406):1325-1328.
32. Huibregtse JM, Scheffner M, Beaudenon S, Howley PM. A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(7):2563-2567. doi:10.1073/pnas.92.7.2563
33. Wiesner S, Ogunjimi AA, Wang HR, et al. Autoinhibition of the HECT-Type Ubiquitin Ligase

- Smurf2 through Its C2 Domain. *Cell*. 2007;130(4):651-662. doi:10.1016/j.cell.2007.06.050
34. Wang J, Peng Q, Lin Q, Childress C, Carey D, Yang W. Calcium activates Nedd4 E3 ubiquitin ligases by releasing the C2 domain-mediated auto-inhibition. *J Biol Chem*. 2010;285(16):12279-12288. doi:10.1074/jbc.M109.086405
 35. Riling C, Kamadurai H, Kumar S, et al. Itch WW Domains Inhibit Its E3 Ubiquitin Ligase Activity by Blocking E2-E3 Ligase Trans-thiolation. *J Biol Chem*. 2015;290(39):23875-23887. doi:10.1074/jbc.M115.649269
 36. Zhu K, Shan Z, Chen X, et al. Allosteric auto-inhibition and activation of the Nedd4 family E3 ligase Itch. *EMBO Rep*. 2017;18(9):1618-1630. doi:10.15252/embr.201744454
 37. Wang Z, Liu Z, Chen X, et al. A multi-lock inhibitory mechanism for fine-tuning enzyme activities of the HECT family E3 ligases. *Nat Commun*. 2019;10(1). doi:10.1038/s41467-019-11224-7
 38. Wan L, Zou W, Gao D, et al. Cdh1 regulates osteoblast function through an APC/C-independent modulation of Smurf1. *Mol Cell*. 2011;44(5):721-733. doi:10.1016/j.jsbmb.2011.07.002.Identification
 39. Gallagher E, Gao M, Liu YC, Karin M. Activation of the E3 ubiquitin ligase Itch through a phosphorylation-induced conformational change. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(6):1717-1722. doi:10.1073/pnas.0510664103
 40. Di Marcotullio L, Greco A, Mazzà D, et al. Numb activates the E3 ligase Itch to control Gli1 function through a novel degradation signal. *Oncogene*. 2011;30(1):65-76. doi:10.1038/onc.2010.394
 41. Oliver PM, Cao X, Scott Worthen G, et al. Ndfip1 protein promotes the function of itch ubiquitin ligase to prevent T cell activation and T helper 2 cell-mediated inflammation. *Immunity*. 2006;25(6):929-940. doi:10.1016/j.immuni.2006.10.012
 42. Ramon HE, Riling CR, Bradfield J, Yang B, Hakonarson H, Oliver PM. The ubiquitin ligase adaptor Ndfip1 regulates T cell-mediated gastrointestinal inflammation and inflammatory bowel disease susceptibility. *Mucosal Immunol*. 2011;4(3):314-324. doi:10.1038/mi.2010.69
 43. Bischoff SC, Wedemeyer J, Herrmann A, et al. Quantitative assessment of intestinal eosinophils and mast cells in inflammatory bowel disease. *Histopathology*. 1996;28(1):1-13. doi:10.1046/j.1365-2559.1996.262309.x
 44. Al-Haddad S, Riddell RH. The role of eosinophils in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2005;54(12):1674-1675. doi:10.1136/gut.2005.069419
 45. *Graham DB, Xavier RJ. Pathway paradigms revealed from the genetics of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2020;578(7796):527-539. doi:10.1038/s41586-020-2025-2
 46. Beal AM, Ramos-Hernandez N, Riling CR, Nowelsky EA, Oliver PM. TGF- β induces the expression of the adaptor Ndfip1 to silence IL-4 production during iTreg cell differentiation. *Nat Immunol*. 2011;13(1):77-85. doi:10.1016/j.physbeh.2017.03.040
 47. *Walker JA, McKenzie ANJ. TH2 cell development and function. *Nat Rev Immunol*. 2018;18(2):121-133. doi:10.1038/nri.2017.118
 48. Romagnani S, Maggi E, Parronchi P, Macchia D, Piccinni MP, Ricci M. Increased numbers of Th2-like CD4+ T cells in target organs and in the allergen-specific repertoire of allergic patients: Possible role of IL-4 produced by non- T cells. *Int Arch Allergy Immunol*. 1991;94(1-4):133-136. doi:10.1159/000235344

49. Kaminuma O, Nishimura T, Kitamura N, Saeki M, Hiroi T, Mori A. T-Helper type 2 cells direct antigen-induced eosinophilic skin inflammation in mice. *Allergy, Asthma Immunol Res.* 2018;10(1):77-82. doi:10.4168/aaair.2018.10.1.77
50. Robinson DS, Hamid Q, Ying S, et al. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med.* 1992;326(5):298-304.
51. Straumann A, Bauer M, Fischer B, Blaser K, Simon HU. Idiopathic eosinophilic esophagitis is associated with a TH2-type allergic inflammatory response. *J Allergy Clin Immunol.* 2001;108(6):954-961. doi:10.1067/mai.2001.119917
52. Lantelme E, Mantovani S, Palermo R, Campanelli B, Sallusto F, Giachino C. Kinetics of GATA-3 gene expression in early polarizing and committed human T cells. *Immunology.* 2001;102(2):123-130. doi:10.1046/j.1365-2567.2001.01168.x
53. Dent LA, Strath M, Mellor AL, Sanderson CJ. Eosinophilia in transgenic mice expressing interleukin 5. *J Exp Med.* 1990;172(5):1425-1431. doi:10.1084/jem.172.5.1425
54. Mishra A, Hogan SP, Brandt EB, Rothenberg ME. IL-5 Promotes Eosinophil Trafficking to the Esophagus. *J Immunol.* 2002;168(5):2464-2469. doi:10.4049/jimmunol.168.5.2464
55. Hustad CM, Perry WL, Siracusa LD, et al. Molecular genetic characterization of six recessive viable alleles of the mouse agouti locus. *Genetics.* 1995;140(1):255-265.
56. Fang DY, Elly C, Gao BX, et al. Dysregulation of T lymphocyte function in itchy mice: a role for itch in T(H)2 differentiation. *Nat Immunol.* 2002;3(3):281-287. doi:10.1038/ni763
57. Li B, Tournier C, Davis RJ, Flavell RA. Regulation of IL-4 expression by the transcription factor JunB during T helper cell differentiation. *EMBO J.* 1999;18(2):420-432. doi:10.1093/emboj/18.2.420
58. Gao M, Labuda T, Xia Y, et al. Jun turnover is controlled through JNK-dependent phosphorylation of the E3 ligase itch. *Science (80-).* 2004;306(5694):271-275. doi:10.1126/science.1099414
59. Venuprasad K, Elly C, Gao M, et al. Convergence of itch-induced ubiquitination with MEKK1-JNK signaling in Th2 tolerance and airway inflammation. *J Clin Invest.* 2006;116(4):1117-1126. doi:10.1172/JCI26858
60. Ramos-Hernandez N, Ramon HE, Beal AM, Laroche A, Dekleva EA, Oliver PM. Ndfip1 enforces a requirement for CD28 costimulation by limiting IL-2 production. *J Immunol.* 2013;191(4):1536-1546. doi:10.4049/jimmunol.1203571
61. O'Leary CE, Riling CR, Spruce LA, et al. Ndfip-mediated degradation of Jak1 tunes cytokine signalling to limit expansion of CD4+ effector T cells. *Nat Commun.* 2016;7. doi:10.1038/ncomms11226
62. Altin JA, Daley SR, Howitt J, et al. Ndfip1 mediates peripheral tolerance to self and exogenous antigen by inducing cell cycle exit in responding CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(6):2067-2074. doi:10.1073/pnas.1322739111
63. *Smith-garvin JE, Koretzky G a, Jordan MS. T Cell Activation. *Immunology.* 2010;27:591-619. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132706.T
64. Russell SM, Johnston JA, Noguchi M, et al. Interaction of IL-2R β and γ c chains with Jak1 and Jak3: Implications for XSCID and XCID. *Science (80-).* 1994;266(5187):1042-1045. doi:10.1126/science.7973658

65. Kondo M, Takeshita T, Ishii N, et al. Sharing of the interleukin-2 (IL-2) receptor γ chain between receptors for IL-2 and IL-4. *Science* (80-). 1993;262(5141):1874-1877. doi:10.1126/science.8266076
66. Noguchi M, Nakamura Y, Russell SM, et al. Interleukin-2 receptor γ chain: A functional component of the interleukin-7 receptor. *Science* (80-). 1993;262(5141):1877-1880. doi:10.1126/science.8266077
67. Giri JG, Ahdieh M, Eisenman J, et al. Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. *EMBO J*. 1994;13(12):2822-2830. doi:10.1002/j.1460-2075.1994.tb06576.x
68. Habib T, Senadheera S, Weinberg K, Kaushansky K. The common γ chain (γ c) is a required signaling component of the IL-21 receptor and supports IL-21-induced cell proliferation via JAK3. *Biochemistry*. 2002;41(27):8725-8731. doi:10.1021/bi0202023
69. Kimura Y, Takeshita T, Kondo M, et al. Sharing of the IL-2 receptor gamma chain with the functional IL-9 receptor complex. *Int Immunol*. 1995;7(1):115-120. doi:10.1093/intimm/7.1.115
70. Takeshita T, Asao H, Ohtani K, et al. Cloning of the gamma chain of the human IL-2 receptor. *Science*. 1992;257(5068):379-382. doi:10.1126/science.1631559
71. Nakajima H, Shores EW, Noguchi M, Leonard WJ. The common cytokine receptor γ chain plays an essential role in regulating lymphoid homeostasis. *J Exp Med*. 1997;185(2):189-195. doi:10.1084/jem.185.2.189
72. Akbar AN, Borthwick NJ, Wickremasinghe RG, et al. Interleukin-2 receptor common gamma-chain signaling cytokines regulate activated T cell apoptosis in response to growth factor withdrawal: selective induction of anti-apoptotic (bcl-2, bcl-xL) but not pro-apoptotic (bax, bcl-xS) gene expression. *Eur J Immunol*. 1996;2(2):294-299.
73. Noguchi M, Yi H, Rosenblatt HM, et al. Interleukin-2 receptor γ chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans. *Cell*. 1993;73(1):147-157. doi:10.1016/0092-8674(93)90167-O
74. Ramon HE, Beal AM, Liu Y, Worthen GS, Oliver PM. The E3 ubiquitin ligase adaptor Ndfip1 regulates Th17 differentiation by limiting the production of proinflammatory cytokines. *J Immunol*. 2012;188(8):4023-4031. doi:10.4049/jimmunol.1102779
75. Layman AA, Sprout S, Phillips D, Oliver PM. Ndfip1 restricts Th17 cell potency by limiting lineage stability and proinflammatory cytokine production. *Sci Rep*. 2017;7:39649. doi:10.1038/srep39649
76. *Li Y, Wei C, Xu H, et al. The immunoregulation of Th17 in host against intracellular bacterial infection. *Mediators Inflamm*. 2018;2018. doi:10.1155/2018/6587296
77. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*. 2005;6(11):1123-1132. doi:10.1038/ni1254
78. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006;441(7090):235-238. doi:10.1038/nature04753
79. Zhong Z, Wen Z, Darnell JEJ. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science*.

- 1994;264(5155):95-98. doi:10.1126/science.8140422
80. Tanaka S, Suto A, Iwamoto T, et al. Sox5 and c-Maf cooperatively induce Th17 cell differentiation via ROR γ t induction as downstream targets of Stat3. *J Exp Med*. 2014;211(9):1857-1874. doi:10.1084/jem.20130791
 81. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, et al. The Orphan Nuclear Receptor ROR γ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17+ T Helper Cells. *Cell*. 2006;126(6):1121-1133. doi:10.1016/j.cell.2006.07.035
 82. Codarri L, Gyölvészii G, Tosevski V, et al. ROR γ 3t drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nat Immunol*. 2011;12(6):560-567. doi:10.1038/ni.2027
 83. Kathania M, Khare P, Zeng M, et al. Itch inhibits IL-17-mediated colon inflammation and tumorigenesis by ROR- γ t ubiquitination. *Nat Immunol*. 2016;17(8):997+. doi:10.1038/ni.3488
 84. Xiao S, Yosef N, Yang J, et al. Small-molecule ROR γ t antagonists inhibit T helper 17 cell transcriptional network by divergent mechanisms. *Immunity*. 2014;40(4):477-489. doi:10.1016/j.immuni.2014.04.004.Small
 85. Jain R, Chen Y, Kanno Y, et al. Interleukin-23-Induced Transcription Factor Blimp-1 Promotes Pathogenicity of T Helper 17 Cells. *Immunity*. 2016;44(1):131-142. doi:10.1016/j.immuni.2015.11.009
 86. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol*. 2003;198(3):986-992. doi:10.1038/ni904
 87. Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor Foxp3. *Immunity*. 2005;22(3):329-341. doi:10.1016/j.immuni.2005.01.016
 88. Khattri R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+T regulatory cells. *J Immunol*. 2003;198(3):993-998. doi:10.1038/ni909
 89. *Wing K, Sakaguchi S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol*. 2010;11(1):7-13. doi:10.1038/ni.1818
 90. Sun CM, Hall JA, Blank RB, et al. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med*. 2007;204(8):1775-1785. doi:10.1084/jem.20070602
 91. Coombes JL, Siddiqui KRR, Arancibia-Cárcamo C V., et al. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF- β -and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med*. 2007;204(8):1757-1764. doi:10.1084/jem.20070590
 92. Curotto de Lafaille MA, Kutchukhidze N, Shen S, Ding Y, Yee H, Lafaille JJ. Adaptive Foxp3+ Regulatory T Cell-Dependent and -Independent Control of Allergic Inflammation. *Immunity*. 2008;29(1):114-126. doi:10.1016/j.immuni.2008.05.010
 93. Venuprasad K, Huang H, Harada Y, et al. The E3 ubiquitin ligase Itch regulates expression of transcription factor Foxp3 and airway inflammation by enhancing the function of transcription factor TIEG1. *Nat Immunol*. 2008;9(3):245-253. doi:10.1038/ni1564
 94. Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H, et al. Interleukin 4 inhibits TGF-beta-induced-FoxP3+ T cells and generates, in combination with TGF-beta, FoxP3-effector T cells that produce interleukins 9 and 10. *Nat Immunol*. 2008;9(12):1347-1355. doi:10.1038/ni.1677.Interleukin

95. Layman AAK, Deng G, O'Leary CE, et al. Ndfip1 restricts mTORC1 signalling and glycolysis in regulatory T cells to prevent autoinflammatory disease. *Nat Commun.* 2017;8. doi:10.1038/ncomms15677
96. Feng Y, Arvey A, Chinen T, Van Der Veecken J, Gasteiger G, Rudensky AY. Control of the inheritance of regulatory T cell identity by a cis element in the foxp3 locus. *Cell.* 2014;158(4):749-763. doi:10.1016/j.cell.2014.07.031
97. Frauwirth KA, Riley JL, Harris MH, et al. The CD28 Signaling Pathway Regulates Glucose Metabolism. *Immunity.* 2002;16:769-777.
98. Sample PA, Boden C, Zhang Z, et al. The transcription factor Myc controls metabolic reprogramming upon T lymphocyte activation. *Methods.* 2007;46(10):3684-3692. doi:10.1038/nature09421.Oxidative
99. Michalek RD, Gerriets VA, Jacobs SR, et al. Cutting Edge: Distinct Glycolytic and Lipid Oxidative Metabolic Programs Are Essential for Effector and Regulatory CD4+ T Cell Subsets. *J Immunol.* 2011;186(6):3299-3303. doi:10.4049/jimmunol.1003613.Cutting
100. Apostolidis SA, Rodriguez-Rodriguez N, Suarez-Fueyo A, et al. Protein phosphatase 2A is requisite for the function of regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2016;17(5):556-564. doi:10.1016/j.physbeh.2017.03.040
101. Shrestha S, Yang K, Guy C, Vogel P, Neale G, Chi H. Treg cells require the phosphatase PTEN to restrain TH1 and TFH cell responses. 2015;16(2):178-187. doi:10.1038/ni.3076.Regulatory
102. Delgoffe GM, Kole TP, Zheng Y, et al. mTOR differentially regulates effector and regulatory T cell lineage commitment. *Immunity.* 2009;30(6):832-844. doi:10.1016/j.immuni.2009.04.014.mTOR
103. Hildeman DA, Zhu Y, Mitchell TC, et al. Activated T cell death in vivo mediated by proapoptotic Bcl-2 family member Bim. *Immunity.* 2002;16(6):759-767. doi:10.1016/S1074-7613(02)00322-9
104. Liston A, Lesage S, Wilson J, Peltonen L, Goodnow CC. Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. *Nat Immunol.* 2003;4(4):350-354. doi:10.1038/ni906
105. Vella AT, Dow S, Potter TA, Kappler J, Marrack P. Cytokine-induced survival of activated T cells in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(7):3810-3815. doi:10.1073/pnas.95.7.3810
106. Kurzweil V, Tarangelo A, Oliver PM. Gastrointestinal microbiota do not significantly contribute to T cell activation or GI inflammation in Ndfip1-cKO mice. *PLoS One.* 2012;7(4):e34478. doi:10.1371/journal.pone.0034478
107. Kurzweil V, LaRoche A, Oliver PM. Increased peripheral IL-4 leads to an expanded virtual memory CD8+ population. *Journal Immunol (Baltimore, Md 1950).* 2014;192(12):5643-5651. doi:10.1038/jid.2014.371
108. Wagle M V., Marchingo JM, Howitt J, Tan SS, Goodnow CC, Parish IA. The Ubiquitin Ligase Adaptor NDFIP1 Selectively Enforces a CD8+ T Cell Tolerance Checkpoint to High-Dose Antigen. *Cell Rep.* 2018;24(3):577-584. doi:10.1016/j.celrep.2018.06.060
109. Redmond WL, Marincek BC, Sherman LA. Distinct Requirements for Deletion versus Anergy during CD8 T Cell Peripheral Tolerance In Vivo. *J Immunol.* 2005;174(4):2046-2053. doi:10.4049/jimmunol.174.4.2046
110. Zheng Y, Collins SL, Lutz MA, et al. A Role for Mammalian Target of Rapamycin in Regulating T

Cell Activation versus Anergy. *J Immunol.* 2007;178(4):2163-2170.
doi:10.4049/jimmunol.178.4.2163

Některé informace byly získány z proteinové databáze UniProt (<https://www.uniprot.org>)

* sekundární citace