



Gasdermin 膜打孔蛋白——细胞焦亡的执行官*

侯彦婕 丁璟玮**

(中国科学院生物物理研究所, 生物大分子国家重点实验室, 中国科学院生物大分子卓越创新中心, 北京 100101)

摘要 细胞焦亡是一种由膜打孔蛋白 gasdermin (GSDM) 家族介导的膜裂解性细胞程序性坏死, 在机体抵御病原感染、清除变异或有害细胞等生物学过程中发挥关键作用。哺乳动物具有双结构域自抑制特征的 GSDM 蛋白通过上游蛋白酶切割释放 N 端的效应结构域, 在细胞膜上发生剧烈的构象变化并寡聚打孔, 介导裂解性的细胞焦亡。GSDM 蛋白进化保守, 在包括细菌在内的多种生物体中普遍存在, 蛋白酶切割释放膜打孔活性是 GSDM 蛋白激活的通用机制。最近在一些低等真核生物中发现了缺少 C 端自抑制结构域的非经典 GSDM 蛋白, 它们采用非酶切依赖的全新机制激活膜打孔活性, 介导细胞死亡。由于细胞焦亡高度促炎的免疫学特征, 机体通过基因转录和蛋白质翻译后修饰等多种方式精确地调控 GSDM 蛋白的活性, 从而控制细胞焦亡的程度和产生的炎症效应; 病原菌在和宿主免疫系统的博弈中, 也进化出专门的机制直接拮抗宿主的细胞焦亡免疫防御。本文围绕近年来 GSDM 蛋白介导细胞焦亡领域的研究进展, 系统地总结了 GSDM 蛋白的基本生物学特征, 及其丰富多样的活化和调控机制, 并展望了细胞焦亡研究的生物学意义和未来方向。

关键词 细胞焦亡, 打孔蛋白, 激活机制, 调控机制, 病原菌

中图分类号 Q51, Q71

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0283

细胞死亡是以细胞为基本单位的生物体重要的生理现象, 可以由“意外”损伤导致的偶发性细胞死亡 (accidental cell death, ACD), 被称为细胞坏死 (necrosis), 也可以是细胞特定基因编码的“程序”决定并精准调控的细胞主动死亡, 被称为程序性细胞死亡 (programmed cell death, PCD)^[1]。最先被发现并得到深入研究的 PCD 是细胞凋亡 (apoptosis), 由一系列半胱天冬氨酸蛋白酶 (caspase) 介导, 表现为细胞核内的 DNA 片段化、细胞膜皱缩内陷并形成多个包裹胞质的凋亡小体, 再通过吞噬细胞清除, 是一种不引起炎症反应的“干净”的细胞死亡方式^[2]。而细胞焦亡是近年来发现的与细胞凋亡截然不同的 PCD 方式, 表现为细胞肿胀吹泡直至细胞膜破裂, 细胞内容物大量释放从而引发强烈炎症反应^[3]。

早在 1986 年, Friedlander^[4] 就观察到被炭疽毒素处理的小鼠巨噬细胞会发生细胞膜裂解、内容物释放的死亡现象; 随后, Zychlinsky 等^[5-6] 发现, 福氏志贺菌 (*Shigella flexneri*) 入侵巨噬细胞后会

引起强烈的细胞死亡, 并伴有大量由 caspase-1 切割成熟的炎症因子白介素-1 (interleukin-1, IL-1) 的释放, 但由于 DNA 片段化和 caspase 参与等特征, 被误认为是细胞凋亡。之后的许多研究都表明, 这种细菌感染后发生的巨噬细胞死亡依赖于 caspase-1 的激活, 且细胞膜的完整性被破坏^[7-8]。2001 年, Cookson 等^[9] 提出用“pyroptosis”, 即细胞焦亡, 描述这种明显有别于细胞凋亡的炎症性的 PCD。随着细胞焦亡研究的深入, 在多种非巨噬细胞中发现除 caspase-1 外, 人源的 caspase-4/5 和鼠源的 caspase-11 可以直接识别进入细胞质的革兰氏阴性菌细胞壁组分脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS), 诱导细胞焦亡的发生^[10-12]。2015 年, caspase-1 和 caspase-4/5/11 介导细胞焦亡的共同底物蛋白 gasdermin D (GSDMD) 被发现, 揭示了细胞焦亡的分子基础^[13-15], 开启了细胞焦亡研究的

* 国家重点研发计划 (2023YFA0914900), 中国科学院先导专项 (XDB37030202) 和中国科学院青年创新促进会资助。

** 通讯联系人。

Tel: 010-64888548, E-mail: jding@ibp.ac.cn

收稿日期: 2024-07-01, 接受日期: 2024-08-24

新纪元。随后发现,包括 GSDMD 在内的 gasdermin (GSDM) 蛋白家族的多数成员,被蛋白酶切割激活后释放的 N 端效应结构域,都可以在细胞膜上寡聚成孔,破坏细胞膜引发细胞焦亡^[16-17]。这样 GSDM 蛋白就被认为是细胞焦亡的直接执行者,而细胞焦亡也被重新定义为 GSDM 蛋白介导的程序性细胞坏死^[18]。

目前的研究已发现,细胞焦亡在活化机体免疫、抵御病原感染、清除变异细胞等过程中发挥重要作用,而异常的细胞焦亡与败血症、自身炎症性疾病及肿瘤的产生和发展密切相关^[19]。因此,深入研究细胞焦亡发生和调控的分子机制可以帮助理解相关疾病的致病机理,并为探索抗菌感染、免疫调节、抗炎治疗和抗肿瘤提供新靶点和新策略。本文围绕 GSDM 蛋白介导细胞焦亡的分子机制,重点对 GSDM 蛋白介导细胞焦亡的活化和效应机制,以及调控机理进行总结,并介绍病原菌直接拮抗宿主细胞焦亡防御的反制机制。

1 细胞焦亡执行蛋白 GSDM 家族

GSDM 蛋白最初是在哺乳动物中发现的,第一个被发现的家族成员 GSDMA 在小鼠的胃肠道组织 (gastrointestinal tract) 和皮肤 (dermis) 中特异表达,因而被命名为 gasdermin^[20]。人类基因组编码了 6 个 GSDM 蛋白 (图 1): GSDMA、GSDMB、GSDMC、GSDMD、GSDME 和 pejkakin (PJVK); 小鼠不编码 GSDMB, 却拥有 3 个 GSDMA 同源蛋白 (GSDMA1~3) 和 4 个 GSDMC 同源蛋白 (GSDMC1~4)^[21]。除 PJVK 外,这些 GSDM 蛋白都由保守的 N 端和 C 端结构域以及两个结构域之间差异显著的连接区组成 (图 1)。N 端作为效应结构域负责上膜打孔, C 端结构域则与 N 端结构域互作,将全长蛋白质锁定在自抑制状态^[17]。

1.1 GSDM 蛋白的表达具有组织特异性

人源的 GSDMA 蛋白主要在皮肤、乳腺、胃和食道等器官的上皮细胞中表达^[20],也存在于 T 淋巴细胞中^[22];鼠源的 GSDMA1 蛋白在皮肤和胃贲门的上皮细胞中表达,而 GSDMA2 和 GSDMA3 蛋白则分别在腺胃和皮肤的上皮细胞中特异性表达^[23]。GSDMB 主要在气道和胃肠道上皮细胞、肝脏细胞、神经内分泌细胞和免疫细胞等中表达。人源 GSDMB 存在 6 种剪切变体^[24],遗传学分析显示,其单核苷酸多态性与哮喘、炎症性肠病等疾病有关,并且在胃癌、结肠癌、乳腺癌、宫颈癌、子

宫癌中表达上调^[25-26]。GSDMC 最初在转移性黑色素瘤中被发现异常高表达,因此被视作黑色素瘤发展的标记分子^[27],之后在皮肤、食道、脾脏、气管等正常组织中也发现了 GSDMC 的表达^[28]。GSDMD 在包括免疫细胞、胃肠道上皮在内的几乎所有组织中都被检测到表达^[28],与病原感染导致的败血症以及自身炎症性疾病等发生息息相关,并且被报道可以抑制胃癌、结直肠癌、卵巢癌等的发展,而对肺癌、乳腺癌等则起促进作用^[25]。GSDME 最初被发现突变会导致家族遗传性耳聋,早期被命名为 DFNA5 (deafness, autosomal dominant 5)^[29],在耳蜗、大脑、胎盘、胃肠道等组织中均有表达,同时 GSDME 可以作为抑癌基因抑制黑色素瘤、乳腺癌和结肠癌的发生,然而在多数肿瘤细胞中 GSDME 被甲基化沉默,这导致激活 GSDME 介导细胞焦亡的化疗药物对肿瘤作用不明显却对正常组织产生毒副作用^[30-31]。PJVK 作为最特殊的 GSDM 蛋白,由于遗传突变可以引起常染色体隐性遗传的听力障碍而受到关注^[32],在内耳、睾丸、脑垂体和卵巢中均有表达,它虽然具有 GSDM 蛋白保守的 N 端结构域,但是相对短小的 C 端结构域与其他家族成员差异明显 (图 1)。GSDM 蛋白表达的多样性也暗示了其丰富的生物学功能。

1.2 GSDM 蛋白广泛分布于各物种

从进化的角度看,GSDME 和 PJVK 是真核生物最古老的 GSDM 蛋白。GSDME 在珊瑚、水螅等刺胞动物门的低等真核生物中就开始出现^[33-34];而 PJVK 则从脊椎动物亚门圆口纲 (如七鳃鳗) 开始出现,在鱼类、两栖类、爬行类、鸟类和哺乳动物中普遍存在。随后进化出的成员是 GSDMA,在部分鱼类、爬行类、鸟类及哺乳动物中出现,而 GSDMB、GSDMC、GSDMD 则仅在哺乳动物中存在^[35]。有趣的是,最近的研究在最低等的真核后生动物——扁盘动物门的代表性物种丝盘虫 (*Trichoplax adhaerens*) 中也发现了 GSDM 蛋白,这是一种非经典的 GSDM 蛋白,只含有 N 端打孔结构域 (图 1),可以释放膜打孔活性引发焦亡样的裂解性细胞死亡^[36]。在更低等的真核生物丝状真菌中同样存在 GSDM 样蛋白,它们在序列上与哺乳动物的 GSDM 蛋白差异很大,但都通过在细胞膜上打孔的方式介导裂解性的细胞死亡,参与丝状真菌同种异体识别 (allorecognition) 引发的细胞融合致死过程^[37-39]。其中鹅柄孢壳菌 (*Podospora anserina*) 中发现的 GSDM 样蛋白

HET-Q1 拥有非常短小的C端结构域^[37] (图1); 而粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*) 中发现的 GSDM 样蛋白 RCD-1 仅含有打孔结构域, 也是一种非经典的 GSDM 蛋白^[38-39] (图1)。在更原始的原核生物——细菌中同样发现了 GSDM 样蛋白, 其编码基因分布在细菌抗噬菌体基因簇中, 可以被遗传连锁的蛋白酶切割激活 (图1), 释放打孔结构域,

介导细菌发生裂解性死亡, 帮助细菌抵御噬菌体^[40]。这些发现反应了 GSDM 蛋白的多样性, 也说明 GSDM 家族蛋白拥有极其古老的进化起源, 很可能是真核生物和原核生物免疫防御的核心组件, 而由 GSDM 膜打孔介导的细胞死亡可能代表了 PCD 进化上最早的原型。

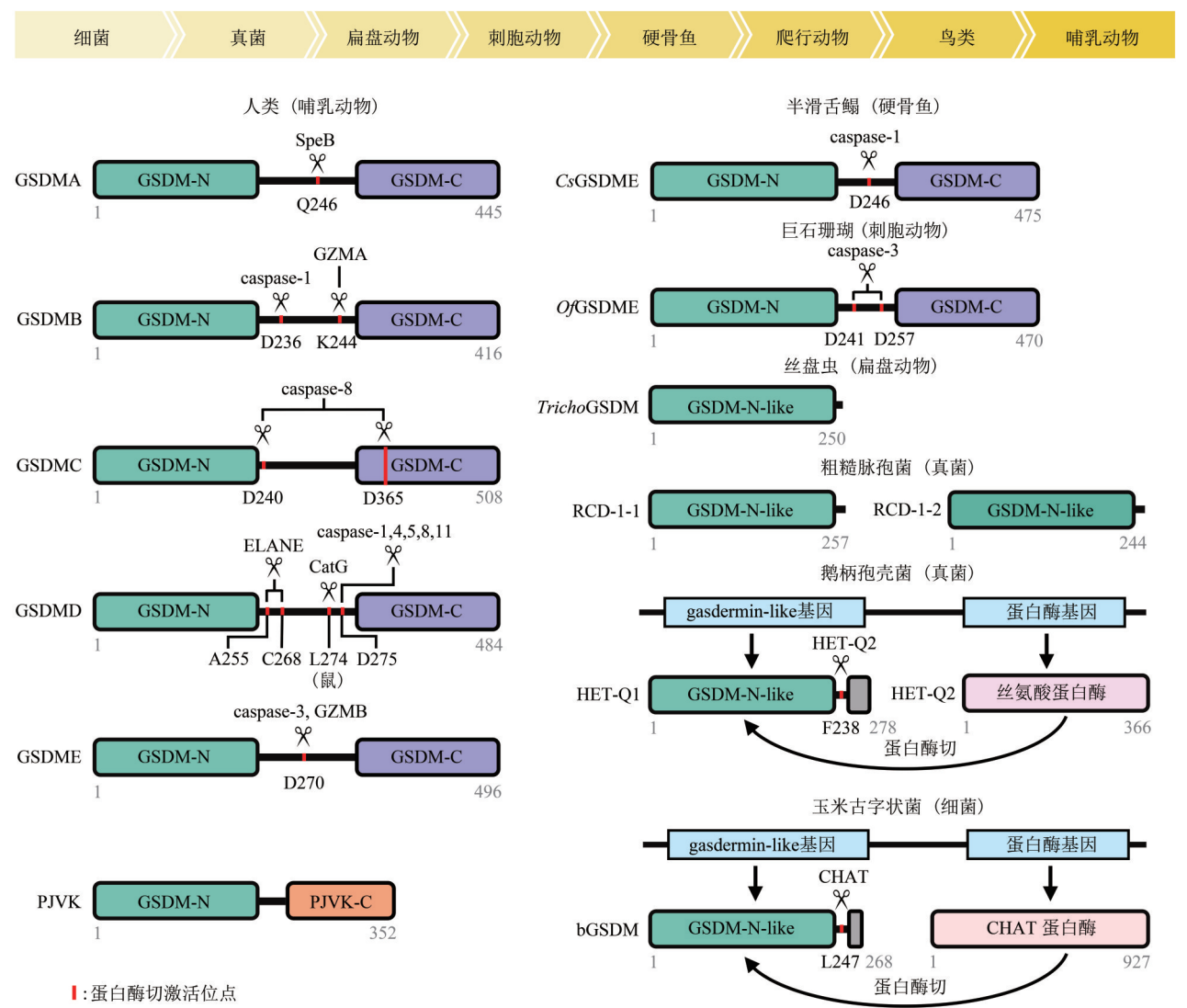


Fig. 1 Schematic overview of the GSDM protein family

图1 GSDM蛋白家族结构示意图

GSDM蛋白家族成员在从细菌到哺乳动物中都广泛分布。大多数GSDM蛋白的激活需要蛋白酶切, 图中标出了目前已知的蛋白酶及其相应的酶切位点, 并图示说明细菌和真菌中编码GSDM样蛋白和相应蛋白酶的基因在基因组中紧密连锁的现象。

2 GSDM蛋白介导细胞焦亡的分子机制

GSDM蛋白的N端效应结构域负责上膜打孔, 因而具有很强的细胞毒性。在未被上游信号激活

时, 全长GSDM蛋白的C端结构域与N端结构域相互作用, 形成分子内自抑制的结构特征。上游的蛋白酶在两个结构域的连接区进行特异性切割, 释放N端结构域, 执行上膜打孔的功能, 引发细胞焦

亡。对于新近发现的只含有N端结构域的非经典GSDM蛋白,则采取了完全不同的方式维持非激活态,因此激活的机制也不同于经典的双结构域GSDM蛋白^[36]。但总体而言,GSDM蛋白介导细胞焦亡的过程都可以分为自抑制、激活、上膜打孔3个阶段(图2)。

2.1 GSDM蛋白的自抑制机制

最早鉴定出GSDMD是细胞焦亡关键蛋白的研究发现,全长的GSDMD蛋白或单独的C端结构域蛋白(GSDMD-C)都不像N端结构域蛋白(GSDMD-N)一样具有细胞毒性,且过表达的GSDMD-C可有效抑制GSDMD-N的细胞毒性,这暗示了GSDMD的C端结构域可能通过与N端结构域的分子内相互作用抑制N端介导细胞焦亡的功能^[13-14]。随后解析的小鼠GSDMA3全长蛋白的高分辨率晶体结构完整展示了GSDM全长蛋白的结构特征,并阐明其自抑制状态的分子机制^[17](图2a)。结构显示,GSDMA3-C通过两个作用面(interface I和II)将GSDMA3-N紧紧锁住,位于两个结构域之间的interface I起主要作用,在这个作用面上,GSDMA3-N伸出的疏水残基插入GSDMA3-C的一个疏水口袋中,而附近的碱性残基与GSDMA3-C口袋中的酸性残基通过静电作用,进一步稳定interface I(图2a)。Interface II远离结构主体的中央部位,由GSDMA3-N通过两段柔性的loop区展现出的一段小螺旋与GSDMA3-C一侧的疏水残基相互作用组成(图2a)。通过突变两个作用面内位于GSDMA3-C一侧的残基可以破坏全长蛋白的自抑制结构,使GSDMA3全长蛋白以非蛋白酶切断裂的方式释放出GSDMA3-N的膜打孔活性,从而具有了引发细胞焦亡的能力^[17]。GSDMA3参与自抑制作用的关键残基在绝大多数人源和鼠源GSDM蛋白中高度保守,突变其他GSDM蛋白C端结构域参与自抑制作用的保守残基也可以使全长GSDM蛋白具有组成性的焦亡活性,这表明GSDMA3全长蛋白结构所揭示的自抑制分子机制在GSDM家族中高度保守^[17]。在随后解析的GSDMD和GSDMB全长蛋白的结构中,这一自抑制机制也得到了很好的验证^[41-43](图2a)。

对于低等脊柱动物,如硬骨鱼类半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*),以及更低等的无脊椎动物,如刺胞动物巨石珊瑚(*Orbicella faveolata*)中发现的GSDM蛋白都与哺乳动物的GSDME同源,拥有保守的C端结构域,通过各自物种中上游的

caspase切割激活^[34, 44](图1),因此推测它们也采用了和哺乳动物GSDM类似的自抑制结构维持非激活态。

对于更低等的丝状真菌鹅柄孢壳菌中发现的GSDM样蛋白HET-Q1,其长度明显短于上述GSDM蛋白,除了发挥打孔功能的N端结构域以外,只有长度约为40个氨基酸残基的C端结构域负责维持自抑制结构^[37](图1)。而更为原始的细菌GSDM样蛋白与哺乳动物GSDM蛋白的序列同源性非常低。通过解析多种细菌GSDM样蛋白的结构发现,它们同样具有和哺乳动物GSDM-N结构类似的效应结构域,并通过C端短小的结构原件实现分子内自抑制的作用以维持非激活态,同时在N端的第3位或第4位Cys观察到棕榈酰(palmitoyl)修饰,这种长链脂肪酰修饰与C端序列共同维持了全长蛋白的自抑制状态^[40]。

而对于只含有N端打孔结构域的非经典GSDM蛋白,则需要采取其他机制来维持非激活态,从而避免组成性的细胞毒性。来自丝盘虫的GSDM蛋白TrichoGSDM,通过3对分子间二硫键形成同源二聚体,将两个单体维持在了非激活的自抑制状态;而来自粗糙脉孢菌的GSDM样蛋白RCD-1-1和RCD-1-2单独存在时虽然可以通过识别酸性磷脂结合在细胞膜上,却不能同源寡聚组装形成典型的GSDM跨膜分子孔道,因而维持在非激活的静息状态。这些非经典的GSDM蛋白独特的自抑制机制意味着它们需要非酶切的全新方式来激活膜打孔活性介导细胞死亡^[36]。

2.2 GSDM蛋白的激活机制

2.2.1 GSDM蛋白酶切依赖的激活机制

细胞焦亡发生的关键是GSDM蛋白打开自抑制状态,释放出N端效应结构域,对于经典的GSDM蛋白,这一步是通过上游的蛋白酶切割GSDM蛋白来实现的。作为第一个被鉴定出来的焦亡执行蛋白,GSDMD的激活需要通过炎症性caspase-1和caspase-4/5/11在GSDMD两个结构域连接区的四肽位点“²⁷²FLTD₂₇₅”(对于小鼠GSDMD,四肽位点是“²⁷³LLSD₂₇₆”)后进行切割活化,而炎症性caspase-1和caspase-4/5/11的活化分别需要上游的经典炎症小体通路和非经典炎症小体通路来实现。

在经典炎症小体通路中,细胞通过模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs),如NOD样受体(NOD-like receptor, NLR)、黑色素瘤缺乏

因子2 (absent in melanoma 2, AIM2)、Pyrin等, 特异性识别各自的病原或损伤相关分子模式 (pathogen-/danger-associated molecular patterns, PAMPs/DAMPs), 寡聚活化后与凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC) 组装成蛋白复合物, 进一步招募前体形式的 caspase-1 (pro-caspase-1) 形成炎症小体, pro-caspase-1 在炎症小体平台上自剪切活化, 成为有蛋白酶活性的 caspase-1^[45-46]。激活的 caspase-1 切割 GSDMD 以及前体形式的炎症因子 pro-IL-1 β 和 pro-IL-18, GSDMD-N 在细胞膜上寡聚成孔引发裂解性的细胞焦亡, 而成熟的炎症因子 IL-1 β 、IL-18 则通过 GSDMD 孔道或焦亡造成的细胞膜损伤释放到胞外^[13, 16-17]。在非经典炎症小体通路中, 细胞内 caspase-4/5/11 作为固有免疫受体直接识别病原菌的 LPS 并寡聚激活^[10-11], 活化的 caspase-4/5/11 同样切割 GSDMD, 释放 GSDMD-N 上膜打孔, 介导细胞焦亡^[13-14]。伴随着细胞膜破裂, 钾离子 (K⁺) 外流的信号可以激活 NLR 家族的 NOD 样受体蛋白 3 (NOD-like receptor protein 3, NLRP3) 炎症小体通路, 通过活化 caspase-1 实现对 pro-IL-1 β 和 pro-IL-18 的切割, 这些成熟的炎症因子通过 GSDMD 孔道释放, 引发炎症反应^[10]。经典的炎症小体通路主要存在于固有免疫细胞 (如单核/巨噬细胞) 中, 而非经典炎症小体通路还广泛存在于许多非免疫细胞 (如上皮细胞) 中, 最新的研究发现, 在这些非免疫细胞内, 炎症因子 pro-IL-18 是通过非经典炎症小体通路活化的 caspase-4/5 来切割活化的^[47]。

caspase 因在细胞凋亡通路中的关键作用得到了广泛研究, 传统上认为 caspases 识别底物蛋白切割位点的 “xxxD” 四肽序列 (x 代表任意残基, D 代表天冬氨酸残基), 在 D 后切割肽键使底物活化, 不同的 caspases 具有不同的四肽序列偏好性, 从而实现了对底物的选择^[48-49]。然而在对炎症性 caspases 如何切割和活化 GSDMD 进行研究时发现, 将 GSDMD 中的四肽序列 “FLTD” 突变为 “AAAD”, 并不影响 caspases 的识别和切割, 进一步的研究发现, caspase-1 和 caspase-4/11 特异识别的是 GSDMD-C 结构域, 而非切割位点的四肽序列^[50]。通过解析 caspase-1/4/11 与 GSDMD-C 复合物的晶体结构, 发现激活形式的 caspase-1/4/11 的 p20/p10 异源二聚体进一步二聚形成四聚体, 两个二聚体界面上形成一个分子间 β 折叠, 伸向

GSDMD-C 的一个疏水口袋中, 这个 β 折叠独立于 caspase 的半胱氨酸活性中心, 形成了底物结合的外位点 (exosite) (图 2b)。caspase-1/4/11 通过保守的外位点特异地识别 GSDMD-C 来招募底物 GSDMD 蛋白, 而位于两个结构域连接区的切割位点四肽序列则进入 caspase 的半胱氨酸活性中心完成切割和活化^[50] (图 2b)。随后, caspase-1 与鼠源 GSDMD 全长蛋白的晶体结构进一步证实了外位点在识别 GSDMD 时的关键作用以及半胱氨酸活性中心对 GSDMD 四肽序列的结合和切割^[51]。因此, GSDMD 的 C 端结构域不仅是维持 GSDMD 非激活态的自抑制结构域, 也是上游炎症性 caspases 特异性识别和招募 GSDMD 的重要分子基础。有趣的是, caspase-1/4/5 特异性识别焦亡蛋白 GSDMD 的外位点同样负责了对 pro-IL-18 的识别, 表明外位点是炎症性 caspase-1/4/5 底物识别的关键位点^[47, 52]。

除了炎症小体通路中的 caspase-1/4/5/11 外, 近来的研究发现 GSDMD 还可被其他蛋白酶切割激活。如在细胞凋亡通路中广泛研究的 caspase-8 可在耶尔森氏杆菌 (*Yersinia*) 感染的巨噬细胞中被激活, 同样在 GSDMD 的 “FLTD” 四肽序列后切割, 诱发细胞焦亡^[53-54]。在中性粒细胞通过胞外诱捕网 (neutrophil extracellular traps, NETs) 抵御病原感染时, GSDMD 会被中性粒细胞释放的弹性蛋白酶 (elastase, neutrophil expressed, ELANE) 和组织蛋白酶 G (cathepsin G, CatG) 切割活化, 前者的切割位点为 A255 和 C268, 后者为鼠源 GSDMD 的 L274^[55-57]。

对于经典的 GSDM 蛋白, 蛋白酶特异切割释放 N 端效应结构域是其活化的通用机制 (图 1)。GSDMA 可以被 A 族链球菌 (group A *Streptococcus*, GAS) 分泌的毒力因子热原外毒素 B (streptococcal pyrogenic exotoxin B, SpeB) 在 Q246 后直接切割, 通过激活皮肤细胞的焦亡来抵御细菌感染^[58]。GSDMB 被细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic T lymphocytes, CTLs) 分泌的颗粒酶 A (granzyme A, GZMA) 在 K244 后切割活化, 在抗感染和肿瘤免疫过程中发挥重要功能^[59]; 此外, GSDMB 还被报道可以被 caspase-1 在 “²³³EEKD₂₃₆” 后切割, 诱发细胞焦亡^[24]。三羧酸循环的中间代谢产物 α 酮戊二酸 (α -ketoglutarate, α -KG) 可提高细胞内的活性氧类 (reactive oxygen species, ROS) 水平, 使死亡受体 6 (death receptor 6,

DR6) 在氧化后发生多聚, 进而内吞入胞质, 形成 DR6 受体小体 (receptosome), 在招募并激活 caspase-8 的同时也招募 GSDMC, 使 caspase-8 在 “²³⁷TFQD₂₄₀” 后切割活化 GSDMC, 释放 GSDMC-N, 引发细胞焦亡^[60]; 另外, 在乳腺癌细胞中, GSDMC 可以被激活的 caspase-8 在 “³⁶²LELD₃₆₅” 后切割, 有趣的是, 这个切割位点位于 GSDMC-C 内部而非连接区, 释放的效应结构域可以将肿瘤坏死因子- α (tumour necrosis factor- α , TNF- α) 诱导的细胞凋亡转化为焦亡^[61]。GSDME 则被经典的细胞凋亡通路活化的 caspase-3 在 “²⁶⁷DMPD₂₇₀” 后切割活化, 将免疫沉默的细胞凋亡转换成高度促炎的细胞焦亡, 这可能是许多化疗药导致组织损伤和毒副作用的重要原因^[31]; 另外, GSDME 还可以被 CTLs 分泌的颗粒酶 B (granzyme B, GZMB) 在与 caspase-3 相同的位点切割活化, 触发表达 GSDME 的肿瘤细胞发生焦亡^[30]。

在低等动物中, 硬骨鱼半滑舌鳎中发现的 CsGSDME 不同于人源 GSDME 被 caspase-3 切割活化, 主要被该物种的 caspase-1 在 “²⁴³FEVD₂₄₆” 后切割, 该物种的 caspase-3/7 也在相同的位点切割, 但活性远弱于 caspase-1^[44]。巨石珊瑚中发现的 *O*/GSDME 则由该物种的 caspase-3 在 “²³⁸DATD₂₄₁” 和 “²⁵⁴DEPD₂₅₇” 两个位点都进行了切割, 释放的 N 端结构域可以引起珊瑚发生细胞焦亡, 抵御病原菌对珊瑚的感染^[34]。而在另一种刺胞动物水螅 (*Hydra vulgaris*) 中发现了可被 LPS 识别和激活的古老的炎症性 HyCaspA, 可以激活类似 caspase-3 的 HyCARD2, 进一步切割 HyGSDME, 触发细胞焦亡, 帮助水螅抵御细菌侵染^[33], 此外, 由 HyCARD2-GSDME 介导的细胞焦亡还被发现促进了水螅头部和足部的组织再生^[62]。

在真菌和细菌中发现的 GSDM 样蛋白, 尽管发挥自抑制作用的 C 端结构原件比高等生物的 GSDMD-C 短小, 但也需要酶切激活来释放 N 端打孔结构域。丝状真菌鹅柄壳菌的 GSDM 样蛋白 HET-Q1 的激活需要遗传背景不同的菌株基因组中同一等位基因位点编码的蛋白酶 HET-Q2 (一种类枯草杆菌蛋白酶的丝氨酸蛋白酶)。表达 HET-Q1 和 HET-Q2 的菌株发生融合时, HET-Q2 对 HET-Q1 进行酶切, 移除 C 端结构域, 释放其 N 端结构域促使不该发生融合的细胞死亡, 有效避免菌株间遗传物质的交换, 保证菌株遗传背景的纯合性^[37]。值得注意的是, 真菌基因组约有 80% 的 GSDM 样蛋白

编码基因附近存在编码丝氨酸蛋白酶结构域或类似 caspase 的 CHAT (caspase HetF associated with tetratricopeptide repeats) 蛋白酶结构域的基因, 组成了与 *het-Q1/het-Q2* 类似的双基因系统^[63] (图 1)。与大多数真菌基因组编码的 GSDM 样蛋白类似, 细菌的 GSDM 样蛋白在基因组上也紧密连锁一个蛋白酶样的分子 (图 1), 这个蛋白酶通过响应噬菌体感染的上游信号而活化, 切割细菌的 GSDM 样蛋白, 释放其上膜打孔活性, 介导细菌像细胞焦亡一样的裂解性死亡, 帮助菌群抵御噬菌体^[40]。这些研究说明了酶切激活 GSDM 样蛋白在真菌和细菌中具有普遍性, 也表明 GSDM 蛋白和它们介导的膜打孔细胞死亡方式在生命进化的长河中高度保守, 并且在多种生物体内都发挥着免疫防御的重要生理功能。

2.2.2 GSDM 蛋白非酶切依赖的激活机制

然而, 对于只含有 N 端效应结构域的非经典 GSDM 蛋白并不需要酶切来激活, 而是根据其非激活态的特征, 采取不同的激活机制。丝盘虫 *TrichoGSDM* 通过分子间二硫键形成二聚体来维持非激活态, 将二硫键还原可以使二聚体转化为单体, 激活 *TrichoGSDM* 的上膜打孔活性。利用胞内维持还原环境的谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 或硫氧还蛋白 (thioredoxin, TRX) 都可以实现这一激活过程^[36]。粗糙脉孢菌不同菌株中的等位基因编码的 GSDM 样蛋白 RCD-1-1 和 RCD-1-2, 在不同菌株发生融合时彼此相遇, 通过互补配对的分子间相互作用形成异源二聚体并进一步寡聚组装来激活打孔活性, 促使不该发生融合的细胞死亡^[36]。这些非经典 GSDM 蛋白采用的非酶切激活机制, 意味着 GSDM 蛋白可以响应更广泛的生物学信号, 参与更为丰富的生命活动。

2.3 GSDM 蛋白执行细胞焦亡的膜打孔机制

GSDM 蛋白作为细胞焦亡的執行者, 上膜寡聚打孔、破坏细胞膜的完整性是其核心功能。当蛋白酶解除 GSDM 蛋白的自抑制状态后, 释放出来的 N 端效应结构域可以特异性结合包括磷脂酰肌醇 (phosphoinositides, PIs)、磷脂酸 (phosphatidic acid, PA)、磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine, PS) 和心磷脂 (cardiolipin, CL) 在内的酸性磷脂^[16-17]。唯一的例外是 GSDMB, 有研究报道 GSDMB 可以结合 PIs 和硫脂 (sulfatide), 却不能结合 CL^[64]。PIs、PA 和 PS 都存在于哺乳动物细胞膜的内侧, 而 CL 是线粒体内膜和细菌细胞膜的组

成分^[65-66], 这样 GSDM 蛋白只能从细胞内部对细胞膜打孔或者对线粒体膜和细菌细胞膜打孔^[16-17, 67]。GSDM 蛋白在由这些磷脂组成的脂质体膜上可形成规则的跨膜分子孔道^[17], 利用去垢剂将这些分子孔道抽提出来, 通过冷冻电镜解析这些孔道的三维结构, 清晰地展示了 GSDM-N 组装成孔的分子机制。

最先得到解析的是小鼠 GSDMA3 的分子孔道, 结构显示, 26~28 个 GSDMA3-N 单体肩并肩排列, 形成了外径 28 nm、内径 18 nm、高 7 nm 的分子孔道 (图 2c), 这个大小足够使许多细胞内的蛋白质, 如炎症因子 IL-1 β 和 IL-18, 以及乳糖脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 等顺利通过。与全长 GSDMA3 的自抑制结构相比, 分子孔道寡聚体结构中的 GSDMA3-N 的主体球形结构域变化不大, 以 $\alpha 1$ 螺旋为中心, GSDMA3-N 伸出了 2 对平行的 β 发卡 (β -harpin) 穿过细胞膜, 这些 GSDMA3-N 的 β 发卡在寡聚体中组成一个完整的跨膜 β 桶 (图 2c)。亲水和疏水氨基酸在 β 发卡上交错排列, 保证了孔道内侧是亲水的而外侧的膜结合区是疏水的。位于球形结构域靠近 β 发卡一侧、由 $\alpha 1$ 螺旋和 $\beta 1$ - $\beta 2$ 组成的正电区负责与细胞膜上酸性磷脂的极性头部通过静电作用结合, 这个区域在 GSDMA3 全长蛋白的自抑制结构中完全被 C 端结构域封闭。相邻的 GSDMA3-N 之间除了依靠插膜部分 β 发卡片之间的氢键网络外, 球形结构域中还有两个作用面, 分别由单体间的 $\alpha 2$ 和 $\alpha 3$ 螺旋, 以及 $\alpha 1$ 螺旋首尾相接组成的, 主要依赖氢键和疏水作用来稳定分子间的相互作用^[68]。随后解析的 GSDMD 和 GSDMB 分子孔道的电镜结构, 也遵循了 GSDMA3 保守的组装方式, 只是组成孔道的分子数略有不同^[42-43, 69] (图 2d)。有趣的是, 在 GSDMA3 和 GSDMD 分子孔道结构解析的过程中观察到了没有形成跨膜 β 桶, 只有球形结构域组成的分子孔道前体 (pre-pore), 这可能是一种插膜前的预组装模式, 暗示了 GSDM 蛋白 N 端结构域成孔的过程^[68-69]。

最近报道的黏细菌 (*Vitiosangium*) GSDM 样蛋白的冷冻电镜结构显示其寡聚成了大小远超哺乳动物 GSDM 蛋白的分子孔道, 并且除了常规的单层跨膜通过, 还可以形成螺旋的“弹簧”样结构。重构的孔道由 52 个单体组成, 是目前已知最大的

GSDM 孔道, 但组装方式仍是保守的。而在细菌 GSDM 样蛋白全长结构中发现的帮助维持自抑制作用的 Cys 棕榈酰修饰, 在成孔过程中插入磷脂双分子层, 增强了 GSDM 蛋白与膜的相互作用, 促进了完整孔道的形成^[70]。值得注意的是, 细菌 GSDM 样蛋白在与脂类分子结合时缺乏选择性, 这可能是因为细菌膜的组成较为简单所导致的^[40, 70]。

对于非经典的 GSDM 蛋白, 尽管采用了非酶切的激活机制, 但其寡聚成孔的机制与经典 GSDM 蛋白基本一致。丝盘虫 *Tricho*GSDM 被还原成单体激活后, 在膜上形成超过 40 个单体组成的同源寡聚体孔道 (图 2d); 粗糙脉孢菌的 RCD-1-1 和 RCD-1-2 彼此互作激活形成异源二聚体后, 异源二聚体之间的相互作用驱动了分子孔道的形成, 11 个异源二聚体寡聚成由 22 个单体分子组成的目前已知的最小 GSDM 分子孔道^[36] (图 2d)。

GSDM 孔道的寡聚组装过程呈现出了动态化的特征, 利用高分辨率延时原子力显微镜 (atomic force microscopy, AFM) 观察到 GSDMD 和 GSDMA3 孔道形成过程中不仅存在环状的 pre-pore 到成熟孔道的状态转换, 还存在线形、狭缝、弧形等寡聚状态, 这些寡聚体也存在膜结合的前体和插膜成熟的不同状态, 并且可以进一步融合和生长, 成为成熟的环状分子孔道^[71-72]。pre-pore 的孔道中通常充满了脂分子和未能成孔的 GSDM-N 蛋白, 而一旦完成插膜这些分子就会被移除, 孔道开放^[71]。这样 GSDM 孔道的形成可能是一个顺序进行的过程, GSDM-N 被切割释放后, 结合脂分子, 随后组装并形成各种形状和大小的动态寡聚体, 最终通过排出脂质和蛋白质从 pre-pore 过渡到成熟的孔道。当用 AFM 在细胞上直接观察 GSDMD 和 GSDME 的孔道时, 发现它们可以继续融合形成直径达到 700 nm, 甚至 10 μ m 的巨大孔道, 加速了细胞的肿胀和破裂^[73]。另一方面, 由于细胞膜破裂而内流的钙离子可以激活内吞体分选转运复合物 III (endosomal sorting complexes required for transport III, ESCRT-III), 其被招募到损伤的细胞膜区域, 将损伤部分转移至微囊泡中再以小泡的形式排出胞外, 从而修复由 GSDMD 孔道对细胞膜造成的损伤, 抑制炎症因子的释放和细胞焦亡的发生^[74]。

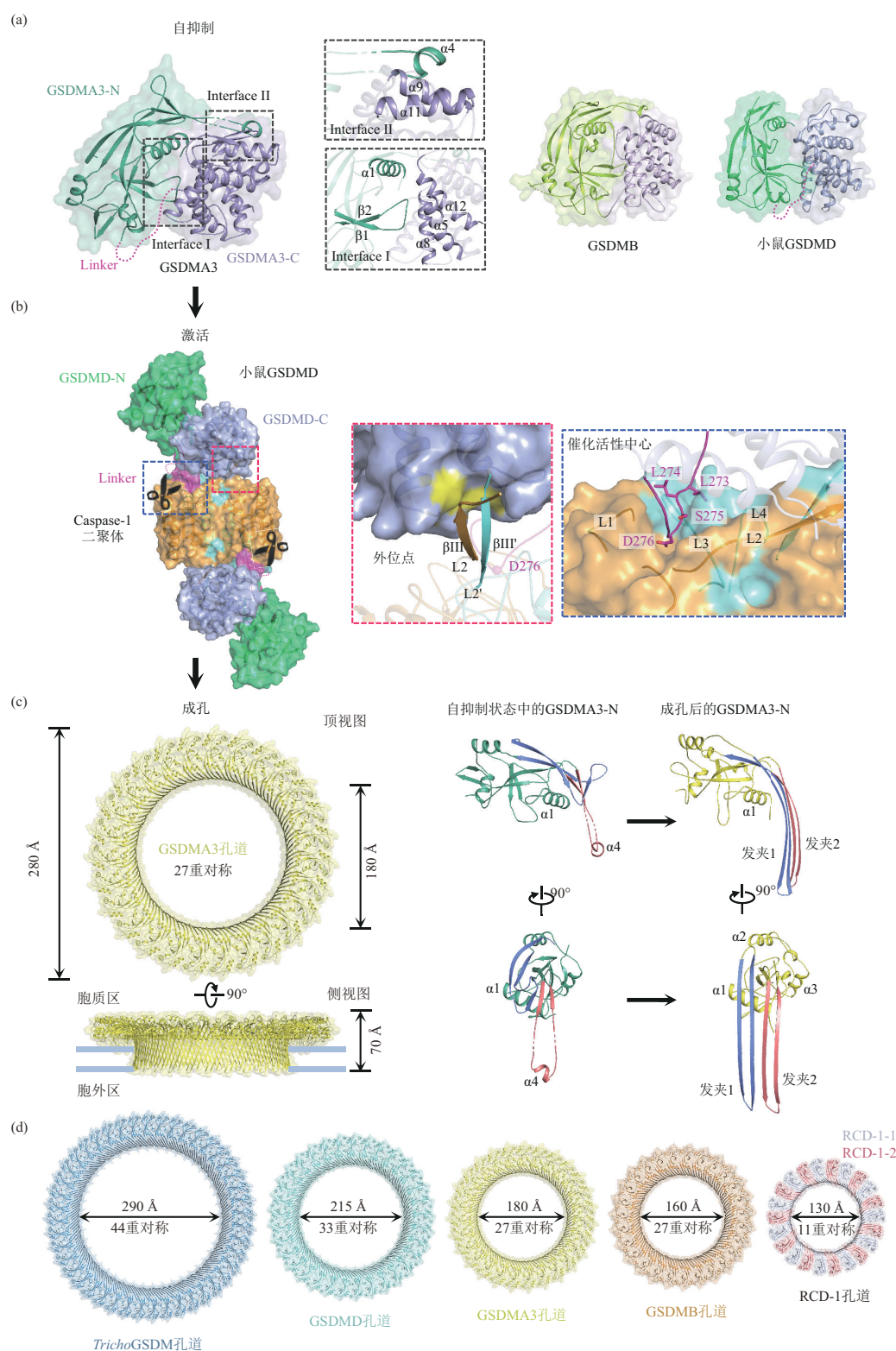


Fig. 2 Mechanisms of GSDM autoinhibition, activation and pore formation

图2 GSDM蛋白自抑制、酶切激活和上膜打孔的分子机制

(a) GSDM蛋白形成自抑制结构的分子机制, 图中展示结构的PDB ID分别为GSDMA3: 5B5R, GSDMB: 8GTJ, 小鼠GSDMD: 6N9N。
 (b) 炎症性caspases识别和切割激活GSDMD的分子机制, 图中展示的是caspase-1和小鼠GSDMD的复合物(PDB ID 6VIE)结构, 其中caspase-1二聚体形成的外位点识别的GSDMD-C疏水口袋为黄色, 小鼠GSDMD的酶切激活位点“ $_{273}$ LLSD $_{276}$ ”被标出。(c) GSDM蛋白上膜打孔的机制, 图中展示的GSDMA3孔道结构的PDB ID为6CB8。(d) 真核GSDM蛋白形成孔道大小比较, PDB ID分别为TrichoGSDM: 8JYW, GSDMD: 6VFE, GSDMA3: 6CB8, GSDMB: 8GTN, RCD-1: 8JYZ。

3 GSDM蛋白活性的调控机制

细胞焦亡具有高度促炎的免疫学特征, 体内发生的焦亡需要被严格控制, 防止过度炎症反应造成机体损伤, 从而导致炎症性疾病。作为细胞焦亡最终执行者的GSDM蛋白, 其上膜打孔活性可以被多种方式调控。

3.1 蛋白酶切抑制GSDM蛋白活性

经典的GSDM蛋白被蛋白酶在连接区切割后激活, 释放出N端效应结构域, 而某些蛋白酶会在N端结构域内部切割, 破坏其完整性, 导致GSDM蛋白失去上膜打孔的活性。在丝氨酸蛋白酶8/9 (dipeptidyl peptidase-8/9, DPP8/9) 抑制剂如VbP (Val-boroPro) 等诱导单核细胞和巨噬细胞的NLRP1炎症小体通路活化、引发焦亡时, caspase-1会活化细胞凋亡通路中的caspase-3和caspase-7, 二者可以在GSDMD-N的D87 (小鼠GSDMD-N的D88) 后切割 (图3), 产生不完整的GSDMD-N (1~87), 抑制细胞焦亡的发生^[75-76]; 而在小肠上皮细胞中, 食物抗原也可以激活caspase-3/7, 在上述位点切割GSDMD, 产生的不完整GSDMD-N片段可在核孔复合物的帮助下进入细胞核, 增强主要组织相容性复合体II (major histocompatibility complex II, MHCII) 的表达, 进而诱导由调节性T细胞1 (type 1 regulatory T cells, Tr1) 介导的食物耐受, 这也说明GSDMD在诱导焦亡之外, 还存在更多样的生物学功能^[77]。而肠道病毒 (Enterovirus 71, EV71) 和冠状病毒如严重急性呼吸综合征冠状病毒2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)、中东呼吸综合征冠状病毒 (middle east respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV) 的3C蛋白酶可在GSDMD-N的Q193后切割 (图3), 同样产生没有打孔活性的片段, 这意味着病毒可以通过破坏GSDMD来拮抗宿主的免疫防御^[78-79]。

3.2 翻译后修饰调控GSDM蛋白活性

不同类型的翻译后修饰也是调控GSDM活性的重要方式 (图3)。如细菌LPS持续刺激小鼠巨噬细胞后, 胞内的依康酸 (itaconate) 可在鼠源GSDMD的C77位进行修饰, 抑制caspase-1对GSDMD的切割, 进而阻遏细胞焦亡的发生^[80]。而三羧酸循环的中间代谢物延胡索酸 (fumaric acid) 也被报道可以在GSDMD-N的Cys191 (小鼠GSDMD的Cys192) 和GSDME的Cys45上进行琥

珀酰 (2-(succinyl)) 修饰, 抑制二者的寡聚打孔和细胞焦亡的发生^[81]。GSDMD的Cys191还会发生S-棕榈酰 (S-palmitoylation) 修饰, 促进GSDMD-N向细胞膜的转移和寡聚, 进而促进细胞焦亡^[82-83]。该修饰由棕榈酰转移酶 (zinc finger Asp-His-His-Cys motif-containing, ZDDHC) ZDDHC5、ZDDHC9或ZDDHC7催化, 而ROS可以通过上调这些棕榈酰转移酶的表达来促进GSDMD的棕榈酰修饰^[83-84]。甚至有研究报道棕榈酰化的全长GSDMD可以不经酶切活化, 在膜上形成与GSDMD-N类似的分子孔道, 诱发细胞焦亡, 尽管效率远低于GSDMD-N^[84]。另外, GSDME也可以在棕榈酰转移酶的作用下在Cys407和Cys408发生棕榈酰化修饰, 促进化疗药物诱发的癌细胞焦亡^[85]。由此可见, 棕榈酰修饰是GSDM家族蛋白的一种常见修饰, 在调控GSDM蛋白诱导细胞焦亡的功能中发挥重要作用。磷酸化 (phosphorylation) 作为经典的翻译后修饰, 也会对GSDM蛋白活性起调控作用。腺苷酸活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) 可以在GSDMD的Ser46和GSDME的Thr6进行磷酸化修饰, 分别通过破坏GSDMD-N的上膜寡聚和阻碍GSDME被caspase-3的切割来抑制细胞焦亡的发生^[86-87]。蛋白磷酸酶1 (protein phosphatase 1, PP1) 可以在GSDMD的Thr213进行磷酸修饰, 影响GSDMD-N的寡聚进而抑制细胞焦亡^[88]。GSDMA则可被丝氨酸-苏氨酸激酶 (serine-threonine Polo-like kinase 1, PLK1) 在Thr8进行磷酸化修饰, 完全阻碍其诱导焦亡的功能^[89]。泛素化 (ubiquitination) 作为另一种经典的翻译后修饰, 在炎症小体通路中发挥重要的调节作用^[90]。有研究发现, E3泛素连接酶 (E3 ubiquitin ligase) synoviolin (Syvn1) 可对GSDMD的K203和K204进行泛素化修饰, 促进细胞焦亡^[91]。

3.3 转录和可变剪切调控GSDM活性

除了蛋白质水平的调控, GSDM蛋白还可以受到转录水平的调控。干扰素调节因子2 (interferon regulatory factors 2, IRF2) 可以通过结合GSDMD启动子的特定区域来驱动其表达, 确保炎症小体通路激活后有足量的GSDMD执行细胞焦亡功能, 而IRF2缺乏会导致巨噬细胞、上皮细胞和多种组织中的GSDMD明显减少, 进而抑制细胞焦亡的发生和IL-1 β 的分泌^[92]。编码GSDMB蛋白的基因可以通过mRNA的可变剪接产生不同的蛋

白质亚型, 这些亚型的N端和C端结构域几乎完全相同, 主要差别在于由外显子6和7编码的两个结构域之间的连接区, 不同亚型的GSDMB蛋白具有截然不同的上膜打孔活性。通过解析GSDMB分子孔道的高分辨电镜结构发现, 6号外显子编码的序列对于GSDMB-N寡聚成孔至关重要, 因此含有6号外显子序列的蛋白质亚型才能介导细胞焦亡, 这说明转录水平的可变剪接是调控GSDMB焦亡活性的重要手段^[42-43]。这些蛋白质亚型在不同组织细胞中的表达丰度不同, 具有焦亡活性的亚型在小肠黏

膜和直肠上皮细胞中占主导地位, 这印证了GSDMB在防御肠道感染中的关键作用; 在不同的癌细胞系中不同亚型的表达情况差别也很大, 食道癌细胞OE19内源表达的GSDMB中具有焦亡活性的亚型比例较高, 而通过干扰素刺激可以诱导原本不表达GSDMB的结肠腺癌细胞HT29和乳腺癌细胞HCC1954表达, 并且以具有焦亡活性的亚型为主, 这些肿瘤细胞在GZMA处理的条件下都表现出更高的细胞焦亡效率^[42]。

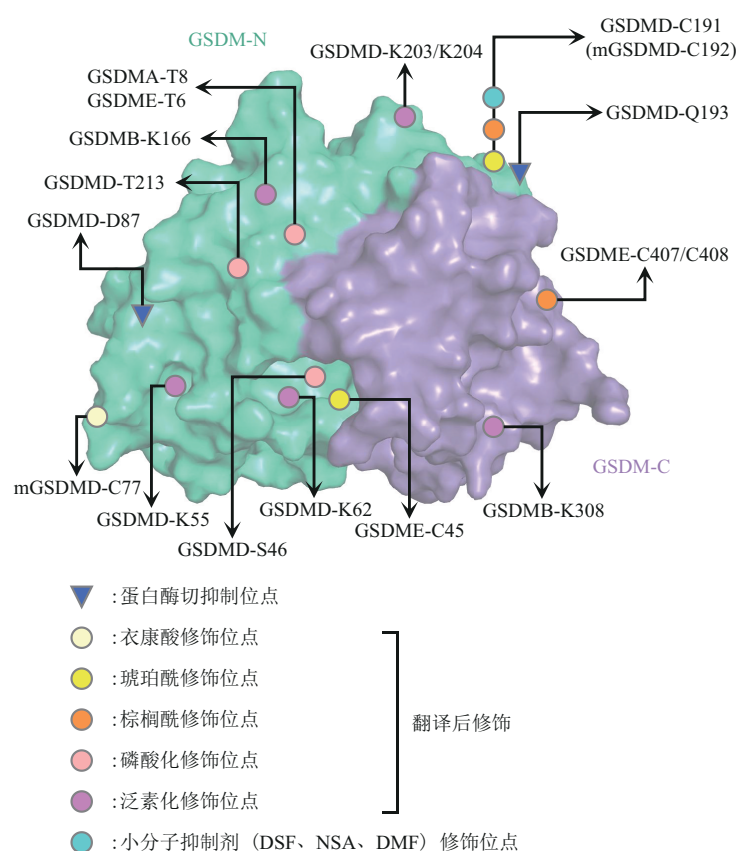


Fig. 3 Schematic diagram shows regulatory sites of GSDM protein

图3 GSDM蛋白的调控位点示意图

GSDM蛋白被蛋白酶抑制、翻译后修饰调控和小分子抑制剂作用的氨基酸位点, mGSDMD表示小鼠GSDMD。

4 病原菌对GSDM蛋白的拮抗机制

细胞焦亡是机体抵御病原菌感染的重要手段, 当宿主的胞外或胞内固有免疫受体感受到病原菌入侵的信号后, 会启动经典或非经典的炎症小体通路, 介导被感染的细胞发生促炎性的细胞焦亡。这直接破坏了病原菌的生存环境, 限制其扩散, 同时还释放出炎症因子等大量细胞内容物, 激活炎症反应并招募更多的免疫细胞来清除病原菌。然而, 病

原菌在与宿主的长期博弈过程中, 进化出了许多“武器”来拮抗宿主的细胞焦亡(图4)。GSDM蛋白作为细胞焦亡的直接执行者, 也受到病原菌的重点“盯防”。

福氏志贺菌又称痢疾杆菌, 是引起细菌性痢疾(shigellosis)的常见革兰氏阴性致病菌, 它可以直接侵入宿主细胞, 迅速逃离入侵所需的膜泡, 在宿主细胞中自由生长繁殖, 并且突破宿主的免疫防御, 引发出血性腹泻和严重的肠道炎症^[93]。

IpaH7.8是福氏志贺菌通过三型分泌系统 (type III secretion system, T3SS) 向宿主细胞中注入的效应蛋白, 由含有 LRR (leucine-rich repeat) 的 N 端结构和位于 C 端的 E3 泛素连接酶催化结构域组成^[94]。其中 LRR 结构域可以特异性识别 GSDMB 和 GSDMD 的 N 端打孔结构域^[42-43, 95], E3 泛素连接酶结构域则对位于二者 N 端的多个赖氨酸进行泛素化修饰 (图 3), 利用宿主的泛素-蛋白酶体系统, 介导两种 GSDM 蛋白发生泛素化降解, 帮助细菌拮抗宿主的细胞焦亡免疫防御^[96-97] (图 4)。除了直接靶向 GSDM 蛋白, 福氏志贺菌通过 T3SS 还会分泌另一种效应蛋白 OspC3, 作用于宿主的胞内免疫受体 caspase-4/11, 阻断宿主的 caspase-4/11 – GSDMD 细胞焦亡通路^[98] (图 4)。OspC3 的分子

本质是一种 ADP-核糖苷酶 (被命名为 ADP-ribosyltransferase), 以烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺) 为配体, 催化 caspase-4/11 酶活中心的关键精氨酸 (Arg341/310) 发生一种新颖的翻译后修饰 ADP-ribosylation, 使 caspase-4/11 失去切割 GSDMD 的能力^[99]。OspC3 的 C 端含有锚蛋白重复结构域 (ankyrin repeat domain, ARD) 负责与 caspase-4/11 互作, N 端的酶活结构域负责完成催化, 在这个过程中宿主的钙调蛋白 (calmodulin, CaM) 作为辅助因子稳定了 OspC3 的 N 端, 极大地提高了酶活^[100]。由此可见, 福氏志贺菌为了逃避宿主的细胞焦亡免疫防御, 通过不同的效应分子, 在多个层面进行了反制, 高效地拮抗了宿主的免疫防御。

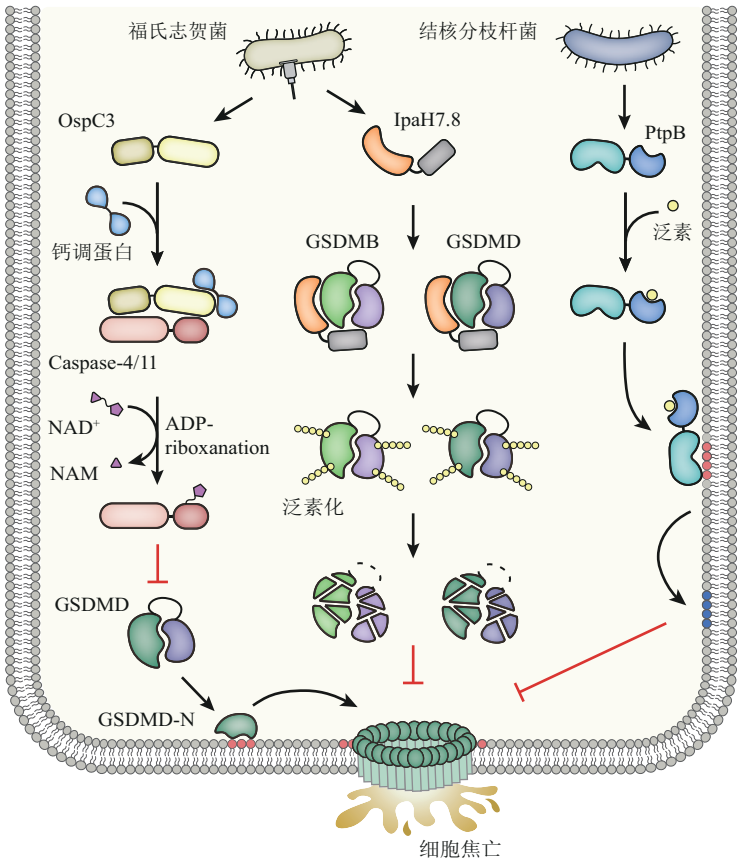


Fig. 4 Bacterial pathogens antagonize GSDM-mediated pyroptosis using effectors
图4 病原菌通过分泌效应蛋白拮抗GSDM蛋白介导的细胞焦亡

福氏志贺菌分泌的效应蛋白OspC3通过特异性ADP-ribosylation修饰caspase-4/11, 抑制GSDMD的切割激活, 从而阻断宿主的细胞焦亡通路; 其分泌的另一种效应蛋白IpaH7.8则直接靶向GSDMB和GSDMD, 通过介导二者发生泛素化降解来抑制细胞焦亡的发生。结核分枝杆菌分泌的效应蛋白PtpB通过改变细胞膜的组成来抑制GSDMD的上膜寡聚, 进而阻碍细胞焦亡。

5 总结与展望

自从 GSDM 蛋白被鉴定为细胞焦亡的关键因子以来,关于其如何介导焦亡的分子机制研究已经取得了显著进展。经典的 GSDM 蛋白在非激活态时需要 C 端的自抑制结构域将 N 端效应结构域锁定,防止 GSDM-N 的细胞毒性;而对于仅含有 GSDM-N 的非经典 GSDM 蛋白,也通过不同方式将 N 端效应结构域维持在非激活态。蛋白酶切是 GSDM 蛋白释放 N 端效应结构域的主要方式,其中炎症性 caspases 通过独立于酶活中心的外位点特异识别 GSDMD 的 C 端结构域,在四肽序列后完成切割,激活 GSDMD,同时这个外位点还是 caspase-1/4/5 切割活化炎症因子 IL-18 的必要条件。而对于已经发现的其他蛋白酶是如何识别和活化 GSDM 家族蛋白的,目前只确定了切割位点,具体的分子机制还有待进一步研究。对于非经典 GSDM 蛋白,则采取了不依赖酶切的激活方式,如 *Tricho*GSDM 的二硫键还原激活和 RCD-1 的分子间互作激活。是否存在更多样的激活方式,以及这些激活方式是否具有普遍性则需要更深入的研究。激活后的 GSDM-N 蛋白遇到细胞膜后发生剧烈的构象变化,形成跨膜的 β 发夹结构,同时位于膜外的头部与酸性磷脂互作,协助插膜区共同寡聚组装成孔,但不同 GSDM-N 在膜上形成的孔道大小差异显著,尚不清楚这种差别是否与这些孔道发挥功能的细胞膜环境以及释放的胞内物质有关。而酶切后释放的 GSDM-C 蛋白在完成抑制 GSDM-N 打孔活性后,是否还有其他功能也有待进一步探索。另外,对于特殊的 GSDM 蛋白 PJVK 的研究仍处于初步的阶段,目前认为 PJVK 不具有上膜打孔的功能,而是参与了内耳毛细胞损伤应激保护^[101],但具体的作用机制并不明确。

GSDM 的功能受到了严密的调控,除了文中描述的生理条件下针对 GSDM 蛋白的调控外,研究人员还通过筛选找到了可以调控 GSDM 功能的小分子,如有研究报道双硫仑(disulfiram, DSF)、坏死磺酰胺(necrosulfonamide, NSA)和富马酸二甲酯(dimethyl fumarate, DMF)通过直接共价修饰 GSDMD 的 Cys 来抑制成孔,阻碍细胞焦亡,从而防止过度焦亡所引发的炎症性疾病^[81, 102-103]。但这些分子的作用并不仅仅针对 GSDMD,因此想要用小分子特异性靶向 GSDMD 来抑制过度焦亡,还需要更广泛和深入的研究。

细胞焦亡作为机体重要的固有免疫效应机制,在清除病原感染的同时,不可避免地会被病原菌采用各种方式来拮抗。除了直接靶向焦亡通路不同靶点的效应蛋白以外,还存在其他方式,例如结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb)分泌的效应蛋白磷酸磷脂酶 PtpB 与宿主泛素蛋白结合后被激活,通过水解宿主细胞膜中的 PIs,改变膜组成,抑制 GSDMD 上膜,从而阻止焦亡的发生^[104](图4)。对这些效应蛋白作用于细胞焦亡机制的研究,可以帮助我们深入理解病原菌与宿主的相互作用,更好地利用这些机制和效应蛋白靶点开发新型抗菌药物。

细胞焦亡在适应性免疫,特别是抗肿瘤免疫的过程中也发挥了重要作用。CTLs 分泌的 GZMA 和 GZMB 分别作用于靶细胞内的 GSDMB 和 GSDME,介导靶细胞发生焦亡,清除病原感染或异常变异的细胞,特别是可以杀伤表达这两个 GSDM 蛋白的肿瘤细胞^[30, 59]。由于细胞焦亡强烈的促炎效应,在杀伤肿瘤细胞的同时,还可以改变肿瘤细胞的免疫微环境,促进抗肿瘤免疫的作用^[30, 59]。研究发现,在小鼠的 4T1 乳腺癌模型中,仅需要诱导不到 15% 的肿瘤细胞发生焦亡就可以清除整个肿瘤^[105]。另外,细胞焦亡还可极大地增强免疫检查点抑制剂,如抗 PD-1 抗体的抗肿瘤效果^[30, 59]。因此,如何通过药物或其他方法激活 GSDM 蛋白,诱导肿瘤细胞发生焦亡,使肿瘤微环境由“冷”变“热”,特别是与免疫检查点抑制剂的联用,是目前肿瘤免疫的研究热点之一。

细胞焦亡的研究正处于方兴未艾、蓬勃发展的阶段,深入探究 GSDM 蛋白在生理、病理状态下的功能及其调控机制,将推动细胞焦亡在抗感染、免疫调节和抗肿瘤等方面的应用,为解决人类的健康问题提供新的思路 and 策略。

参 考 文 献

- [1] Galluzzi L, Bravo-San Pedro J M, Vitale I, *et al.* Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death Differ*, 2015, **22**(1): 58-73
- [2] Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 2007, **35**(4): 495-516
- [3] Bergsbaken T, Fink S L, Cookson B T. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol*, 2009, **7**(2): 99-109
- [4] Friedlander A M. Macrophages are sensitive to anthrax lethal toxin through an acid-dependent process. *J Biol Chem*, 1986, **261**(16): 7123-7126

- [5] Zychlinsky A, Prevost M C, Sansonetti P J. *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. *Nature*, 1992, **358**(6382): 167-169
- [6] Zychlinsky A, Fitting C, Cavaillon J M, *et al.* Interleukin 1 is released by murine macrophages during apoptosis induced by *Shigella flexneri*. *J Clin Invest*, 1994, **94**(3): 1328-1332
- [7] Hersh D, Monack D M, Smith M R, *et al.* The *Salmonella* invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**(5): 2396-2401
- [8] Chen Y, Smith M R, Thirumalai K, *et al.* A bacterial invasin induces macrophage apoptosis by binding directly to ICE. *EMBO J*, 1996, **15**(15): 3853-3860
- [9] Cookson B T, Brennan M A. Pro-inflammatory programmed cell death. *Trends Microbiol*, 2001, **9**(3): 113-114
- [10] Shi J, Zhao Y, Wang Y, *et al.* Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. *Nature*, 2014, **514**(7521): 187-192
- [11] Kayagaki N, Wong M T, Stowe I B, *et al.* Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4. *Science*, 2013, **341**(6151): 1246-1249
- [12] Hagar J A, Powell D A, Aachoui Y, *et al.* Cytoplasmic LPS activates caspase-11: implications in TLR4-independent endotoxic shock. *Science*, 2013, **341**(6151): 1250-1253
- [13] Shi J, Zhao Y, Wang K, *et al.* Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature*, 2015, **526**(7575): 660-665
- [14] Kayagaki N, Stowe I B, Lee B L, *et al.* Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature*, 2015, **526**(7575): 666-671
- [15] He W T, Wan H, Hu L, *et al.* Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1 β secretion. *Cell Res*, 2015, **25**(12): 1285-1298
- [16] Liu X, Zhang Z, Ruan J, *et al.* Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature*, 2016, **535**(7610): 153-158
- [17] Ding J, Wang K, Liu W, *et al.* Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family. *Nature*, 2016, **535**(7610): 111-116
- [18] Shi J, Gao W, Shao F. Pyroptosis: gasdermin-mediated programmed necrotic cell death. *Trends Biochem Sci*, 2017, **42**(4): 245-254
- [19] Magnani L, Colantuoni M, Mortellaro A. Gasdermins: new therapeutic targets in host defense, inflammatory diseases, and cancer. *Front Immunol*, 2022, **13**: 898298
- [20] Saeki N, Kuwahara Y, Sasaki H, *et al.* Gasdermin (*Gsdm*) localizing to mouse Chromosome 11 is predominantly expressed in upper gastrointestinal tract but significantly suppressed in human gastric cancer cells. *Mamm Genome*, 2000, **11**(9): 718-724
- [21] Tamura M, Tanaka S, Fujii T, *et al.* Members of a novel gene family, *Gsdm*, are expressed exclusively in the epithelium of the skin and gastrointestinal tract in a highly tissue-specific manner. *Genomics*, 2007, **89**(5): 618-629
- [22] Rieckmann J C, Geiger R, Hornburg D, *et al.* Social network architecture of human immune cells unveiled by quantitative proteomics. *Nat Immunol*, 2017, **18**(5): 583-593
- [23] Tanaka S, Mizushima Y, Kato Y, *et al.* Functional conservation of *Gsdma* cluster genes specifically duplicated in the mouse genome. *G3 (Bethesda)*, 2013, **3**(10): 1843-1850
- [24] Panganiban R A, Sun M, Dahlin A, *et al.* A functional splice variant associated with decreased asthma risk abolishes the ability of gasdermin B to induce epithelial cell pyroptosis. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, **142**(5): 1469-1478.e2
- [25] Yang X, Tang Z. Role of gasdermin family proteins in cancers. *Int J Oncol*, 2023, **63**(3): 100
- [26] Lutkowska A, Roszak A, Lianeri M, *et al.* Analysis of rs8067378 polymorphism in the risk of uterine cervical cancer from a Polish population and its impact on gasdermin B expression. *Mol Diagn Ther*, 2017, **21**(2): 199-207
- [27] Watabe K, Ito A, Asada H, *et al.* Structure, expression and chromosome mapping of *MLZE* a novel gene which is preferentially expressed in metastatic melanoma cells. *Jpn J Cancer Res*, 2001, **92**(2): 140-151
- [28] Fagerberg L, Hallström B M, Oksvold P, *et al.* Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Mol Cell Proteomics*, 2014, **13**(2): 397-406
- [29] Van Laer L, Huizing E H, Verstreken M, *et al.* Nonsyndromic hearing impairment is associated with a mutation in *DFNA5*. *Nat Genet*, 1998, **20**(2): 194-197
- [30] Zhang Z, Zhang Y, Xia S, *et al.* Gasdermin E suppresses tumour growth by activating anti-tumour immunity. *Nature*, 2020, **579**(7799): 415-420
- [31] Wang Y, Gao W, Shi X, *et al.* Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase-3 cleavage of a gasdermin. *Nature*, 2017, **547**(7661): 99-103
- [32] Delmaghani S, del Castillo F J, Michel V, *et al.* Mutations in the gene encoding pejbakin, a newly identified protein of the afferent auditory pathway, cause DFNB59 auditory neuropathy. *Nat Genet*, 2006, **38**: 770-778
- [33] Chen S, Li S, Chen H, *et al.* Caspase-mediated LPS sensing and pyroptosis signaling in *Hydra*. *Sci Adv*, 2023, **9**(29): eadh4054
- [34] Jiang S, Zhou Z, Sun Y, *et al.* Coral gasdermin triggers pyroptosis. *Sci Immunol*, 2020, **5**(54): eabd2591
- [35] De Schutter E, Roelandt R, Riquet F B, *et al.* Punching holes in cellular membranes: biology and evolution of gasdermins. *Trends Cell Biol*, 2021, **31**(6): 500-513
- [36] Li Y, Hou Y, Sun Q, *et al.* Cleavage-independent activation of ancient eukaryotic gasdermins and structural mechanisms. *Science*, 2024, **384**(6697): adm9190
- [37] Clavé C, Dyrka W, Turcotte E A, *et al.* Fungal gasdermin-like proteins are controlled by proteolytic cleavage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2022, **119**(7): e2109418119
- [38] Daskalov A, Mitchell P S, Sandstrom A, *et al.* Molecular characterization of a fungal gasdermin-like protein. *Proc Natl*

- Acad Sci USA, 2020, **117**(31): 18600-18607
- [39] Daskalov A, Gladieux P, Heller J, *et al.* Programmed cell death in *Neurospora crassa* is controlled by the allorecognition determinant *rcd-1*. Genetics, 2019, **213**(4): 1387-1400
- [40] Johnson A G, Wein T, Mayer M L, *et al.* Bacterial gasdermins reveal an ancient mechanism of cell death. Science, 2022, **375**(6577): 221-225
- [41] Liu Z, Wang C, Yang J, *et al.* Crystal structures of the full-length murine and human gasdermin D reveal mechanisms of autoinhibition, lipid binding, and oligomerization. Immunity, 2019, **51**(1): 43-49.e4
- [42] Zhong X, Zeng H, Zhou Z, *et al.* Structural mechanisms for regulation of GSDMB pore-forming activity. Nature, 2023, **616**(7957): 598-605
- [43] Wang C, Shivcharan S, Tian T, *et al.* Structural basis for GSDMB pore formation and its targeting by IpaH7.8. Nature, 2023, **616**(7957): 590-597
- [44] Jiang S, Gu H, Zhao Y, *et al.* Teleost gasdermin E is cleaved by caspase 1, 3, and 7 and induces pyroptosis. J Immunol, 2019, **203**(5): 1369-1382
- [45] Broz P, Dixit V M. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. Nat Rev Immunol, 2016, **16**(7): 407-420
- [46] Lu A, Magupalli V G, Ruan J, *et al.* Unified polymerization mechanism for the assembly of ASC-dependent inflammasomes. Cell, 2014, **156**(6): 1193-1206
- [47] Shi X, Sun Q, Hou Y, *et al.* Recognition and maturation of IL-18 by caspase-4 noncanonical inflammasome. Nature, 2023, **624**(7991): 442-450
- [48] Poreba M, Stróżyk A, Salvesen G S, *et al.* Caspase substrates and inhibitors. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013, **5**(8): a008680
- [49] Crawford E D, Wells J A. Caspase substrates and cellular remodeling. Annu Rev Biochem, 2011, **80**: 1055-1087
- [50] Wang K, Sun Q, Zhong X, *et al.* Structural mechanism for GSDMD targeting by autoprocessed caspases in pyroptosis. Cell, 2020, **180**(5): 941-955.e20
- [51] Liu Z, Wang C, Yang J, *et al.* Caspase-1 engages full-length gasdermin D through two distinct interfaces that mediate caspase recruitment and substrate cleavage. Immunity, 2020, **53**(1): 106-114.e5
- [52] Dong Y, Bonin J P, Devant P, *et al.* Structural transitions enable interleukin-18 maturation and signaling. Immunity, 2024, **57**(7): 1533-1548.e10
- [53] Orning P, Weng D, Starheim K, *et al.* Pathogen blockade of TAK1 triggers caspase-8-dependent cleavage of gasdermin D and cell death. Science, 2018, **362**(6418): 1064-1069
- [54] Sarhan J, Liu B C, Muendlein H I, *et al.* Caspase-8 induces cleavage of gasdermin D to elicit pyroptosis during *Yersinia* infection. Proc Natl Acad Sci USA, 2018, **115**(46): E10888-E10897
- [55] Sollberger G, Choidas A, Burn G L, *et al.* Gasdermin D plays a vital role in the generation of neutrophil extracellular traps. Sci Immunol, 2018, **3**(26): eaar6689
- [56] Kambara H, Liu F, Zhang X, *et al.* Gasdermin D exerts anti-inflammatory effects by promoting neutrophil death. Cell Rep, 2018, **22**(11): 2924-2936
- [57] Burgener S S, Leborgne N G F, Snipas S J, *et al.* Cathepsin G inhibition by Serpinb1 and Serpinb6 prevents programmed necrosis in neutrophils and monocytes and reduces GSDMD-driven inflammation. Cell Rep, 2019, **27**(12): 3646-3656.e5
- [58] Deng W, Bai Y, Deng F, *et al.* Streptococcal pyrogenic exotoxin B cleaves GSDMA and triggers pyroptosis. Nature, 2022, **602**(7897): 496-502
- [59] Zhou Z, He H, Wang K, *et al.* Granzyme A from cytotoxic lymphocytes cleaves GSDMB to trigger pyroptosis in target cells. Science, 2020, **368**(6494): eaaz7548
- [60] Zhang J Y, Zhou B, Sun R Y, *et al.* The metabolite α -KG induces GSDMC-dependent pyroptosis through death receptor 6-activated caspase-8. Cell Res, 2021, **31**(9): 980-997
- [61] Hou J, Zhao R, Xia W, *et al.* PD-L1-mediated gasdermin C expression switches apoptosis to pyroptosis in cancer cells and facilitates tumour necrosis. Nat Cell Biol, 2020, **22**(10): 1264-1275
- [62] Chen S, Gong Y, Li S, *et al.* Hydra gasdermin-gated pyroptosis signalling regulates tissue regeneration. Dev Comp Immunol, 2023, **149**: 104904
- [63] Daskalov A, Glass N L. Gasdermin and gasdermin-like pore-forming proteins in invertebrates, fungi and bacteria. J Mol Biol, 2022, **434**(4): 167273
- [64] Chao K L, Kulakova L, Herzberg O. Gene polymorphism linked to increased asthma and IBD risk alters gasdermin-B structure, a sulfatide and phosphoinositide binding protein. Proc Natl Acad Sci USA, 2017, **114**(7): E1128-E1137
- [65] van Meer G, Voelker D R, Feigenson G W. Membrane lipids: where they are and how they behave. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008, **9**(2): 112-124
- [66] Schlame M. Cardiolipin synthesis for the assembly of bacterial and mitochondrial membranes. J Lipid Res, 2008, **49**(8): 1607-1620
- [67] Miao R, Jiang C, Chang W Y, *et al.* Gasdermin D permeabilization of mitochondrial inner and outer membranes accelerates and enhances pyroptosis. Immunity, 2023, **56**(11): 2523-2541.e8
- [68] Ruan J, Xia S, Liu X, *et al.* Cryo-EM structure of the gasdermin A3 membrane pore. Nature, 2018, **557**(7703): 62-67
- [69] Xia S, Zhang Z, Magupalli V G, *et al.* Gasdermin D pore structure reveals preferential release of mature interleukin-1. Nature, 2021, **593**(7860): 607-611
- [70] Johnson A G, Mayer M L, Schaefer S L, *et al.* Structure and assembly of a bacterial gasdermin pore. Nature, 2024, **628**(8008): 657-663
- [71] Mari S A, Pluhackova K, Pipercevic J, *et al.* Gasdermin-A3 pore formation propagates along variable pathways. Nat Commun, 2022, **13**(1): 2609
- [72] Mulvihill E, Sborgi L, Mari S A, *et al.* Mechanism of membrane pore formation by human gasdermin-D. EMBO J, 2018, **37**(14): e98321
- [73] Liu Y, Zhang T, Zhou Y, *et al.* Visualization of perforin/gasdermin/

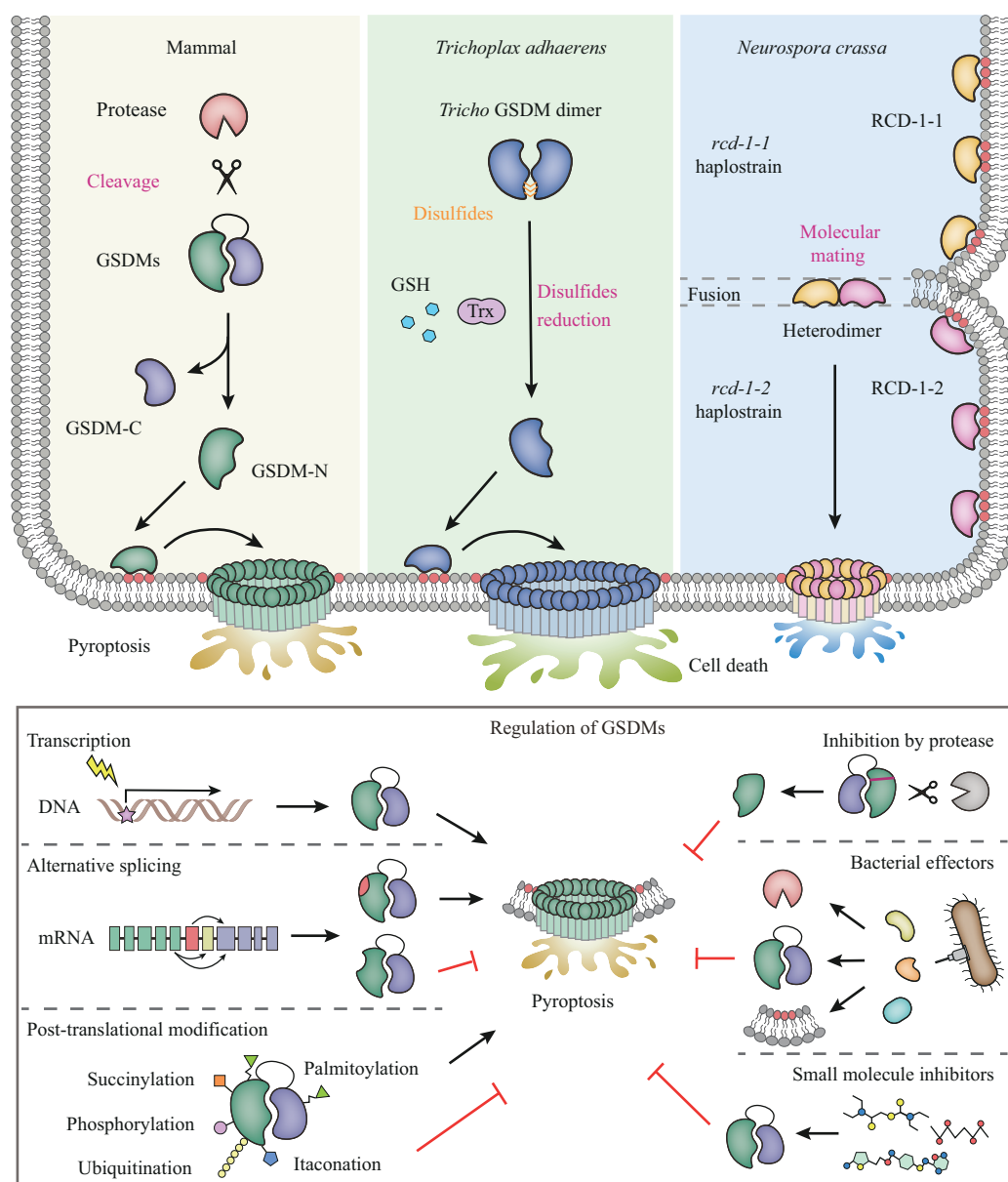
- complement-formed pores in real cell membranes using atomic force microscopy. *Cell Mol Immunol*, 2019, **16**(6): 611-620
- [74] Rühl S, Shkarina K, Demarco B, *et al.* ESCRT-dependent membrane repair negatively regulates pyroptosis downstream of GSDMD activation. *Science*, 2018, **362**(6417): 956-960
- [75] Taabazuing C Y, Okondo M C, Bachovchin D A. Pyroptosis and apoptosis pathways engage in bidirectional crosstalk in monocytes and macrophages. *Cell Chem Biol*, 2017, **24**(4): 507-514.e4
- [76] Rogers C, Fernandes-Alnemri T, Mayes L, *et al.* Cleavage of DFNA5 by caspase-3 during apoptosis mediates progression to secondary necrotic/pyroptotic cell death. *Nat Commun*, 2017, **8**: 14128
- [77] He K, Wan T, Wang D, *et al.* Gasdermin D licenses MHCII induction to maintain food tolerance in small intestine. *Cell*, 2023, **186**(14): 3033-3048.e20
- [78] Shi F, Lv Q, Wang T, *et al.* Coronaviruses Nsp5 antagonizes porcine gasdermin D-mediated pyroptosis by cleaving pore-forming p30 fragment. *mBio*, 2022, **13**(1): e0273921
- [79] Lei X, Zhang Z, Xiao X, *et al.* Enterovirus 71 inhibits pyroptosis through cleavage of gasdermin D. *J Virol*, 2017, **91**(18): e01069-17
- [80] Bambouskova M, Potuckova L, Paulenda T, *et al.* Itaconate confers tolerance to late NLRP3 inflammasome activation. *Cell Rep*, 2021, **34**(10): 108756
- [81] Humphries F, Shmuel-Galia L, Ketelut-Carneiro N, *et al.* Succination inactivates gasdermin D and blocks pyroptosis. *Science*, 2020, **369**(6511): 1633-1637
- [82] Zhang N, Zhang J, Yang Y, *et al.* A palmitoylation-depalmitoylation relay spatiotemporally controls GSDMD activation in pyroptosis. *Nat Cell Biol*, 2024, **26**(5): 757-769
- [83] Balasubramanian A, Hsu A Y, Ghimire L, *et al.* The palmitoylation of gasdermin D directs its membrane translocation and pore formation during pyroptosis. *Sci Immunol*, 2024, **9**(94): eadn1452
- [84] Du G, Healy L B, David L, *et al.* ROS-dependent S-palmitoylation activates cleaved and intact gasdermin D. *Nature*, 2024, **630**(8016): 437-446
- [85] Hu L, Chen M, Chen X, *et al.* Chemotherapy-induced pyroptosis is mediated by BAK/BAX-caspase-3-GSDME pathway and inhibited by 2-bromopalmitate. *Cell Death Dis*, 2020, **11**(4): 281
- [86] Chu X, Xiao X, Wang G, *et al.* Gasdermin D-mediated pyroptosis is regulated by AMPK-mediated phosphorylation in tumor cells. *Cell Death Dis*, 2023, **14**(7): 469
- [87] Ai Y L, Wang W J, Liu F J, *et al.* Mannose antagonizes GSDME-mediated pyroptosis through AMPK activated by metabolite GlcNAc-6P. *Cell Res*, 2023, **33**(12): 904-922
- [88] Li Y, Pu D, Huang J, *et al.* Protein phosphatase 1 regulates phosphorylation of gasdermin D and pyroptosis. *Chem Commun*, 2022, **58**(85): 11965-11968
- [89] Rogers C, Erkes D A, Nardone A, *et al.* Gasdermin pores permeabilize mitochondria to augment caspase-3 activation during apoptosis and inflammasome activation. *Nat Commun*, 2019, **10**(1): 1689
- [90] Cockram P E, Kist M, Prakash S, *et al.* Ubiquitination in the regulation of inflammatory cell death and cancer. *Cell Death Differ*, 2021, **28**(2): 591-605
- [91] Shi Y, Yang Y, Xu W, *et al.* E3 ubiquitin ligase SYVN1 is a key positive regulator for GSDMD-mediated pyroptosis. *Cell Death Dis*, 2022, **13**(2): 106
- [92] Kayagaki N, Lee B L, Stowe I B, *et al.* IRF2 transcriptionally induces GSDMD expression for pyroptosis. *Sci Signal*, 2019, **12**(582): eaax4917
- [93] Kotloff K, Riddle M, Platts-Mills J, *et al.* Shigellosis. *Lancet*, 2018, **391**(10122): 801-812
- [94] Sandstrom A, Mitchell P S, Goers L, *et al.* Functional degradation: a mechanism of NLRP1 inflammasome activation by diverse pathogen enzymes. *Science*, 2019, **364**(6435): eaau1330
- [95] Yin H, Zheng J, He Q, *et al.* Insights into the GSDMB-mediated cellular lysis and its targeting by IpaH7.8. *Nat Commun*, 2023, **14**(1): 61
- [96] Luchetti G, Roncaioli J L, Chavez R A, *et al.* *Shigella* ubiquitin ligase IpaH7.8 targets gasdermin D for degradation to prevent pyroptosis and enable infection. *Cell Host Microbe*, 2021, **29**(10): 1521-1530.e10
- [97] Hansen J M, de Jong M F, Wu Q, *et al.* Pathogenic ubiquitination of GSDMB inhibits NK cell bactericidal functions. *Cell*, 2021, **184**(12): 3178-3191.e18
- [98] Kobayashi T, Ogawa M, Sanada T, *et al.* The *Shigella* OspC3 effector inhibits caspase-4, antagonizes inflammatory cell death, and promotes epithelial infection. *Cell Host Microbe*, 2013, **13**(5): 570-583
- [99] Li Z, Liu W, Fu J, *et al.* *Shigella* evades pyroptosis by arginine ADP-ribosylation of caspase-11. *Nature*, 2021, **599**(7884): 290-295
- [100] Hou Y, Zeng H, Li Z, *et al.* Structural mechanisms of calmodulin activation of *Shigella* effector OspC3 to ADP-ribosylate caspase-4/11 and block pyroptosis. *Nat Struct Mol Biol*, 2023, **30**(3): 261-272
- [101] Defourny J, Aghaie A, Perfettini I, *et al.* Pejvakin-mediated pexophagy protects auditory hair cells against noise-induced damage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, **116**(16): 8010-8017
- [102] Hu J J, Liu X, Xia S, *et al.* FDA-approved disulfiram inhibits pyroptosis by blocking gasdermin D pore formation. *Nat Immunol*, 2020, **21**(7): 736-745
- [103] Rathkey J K, Zhao J, Liu Z, *et al.* Chemical disruption of the pyroptotic pore-forming protein gasdermin D inhibits inflammatory cell death and sepsis. *Sci Immunol*, 2018, **3**(26): eaat2738
- [104] Chai Q, Yu S, Zhong Y, *et al.* A bacterial phospholipid phosphatase inhibits host pyroptosis by hijacking ubiquitin. *Science*, 2022, **378**(6616): eabq0132
- [105] Wang Q, Wang Y, Ding J, *et al.* A bioorthogonal system reveals antitumour immune function of pyroptosis. *Nature*, 2020, **579**(7799): 421-426

Gasdermins, The Executor of Pyroptosis*

HOU Yan-Jie, DING Jing-Jin**

(Key Laboratory of Biomacromolecules (CAS), National Laboratory of Biomacromolecules, CAS Center for Excellence in Biomacromolecules, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Graphical abstract



* This work was supported by grants from National Key R&D Program of China (2023YFA0914900), the CAS Strategic Priority Research Program (XDB37030202), and the Youth Innovation Promotion Association CAS.

** Corresponding author.

Tel: 86-10-64888548, E-mail: jding@ibp.ac.cn

Received: July 1, 2024 Accepted: August 24, 2024

Abstract Pyroptosis is a form of lytic programmed cell death executed by a family of pore-forming proteins named gasdermin (GSDM). Pyroptosis plays crucial roles in host defense against pathogen infection and eliminating abnormal and harmful cells, while excessive pyroptosis causes inflammatory diseases including cytokine storm and septic shock. Mammalian GSDMs, except for pejpakin (PJVK), adopt an autoinhibited two-domain architecture, in which the N-terminal cytotoxic domain (GSDM-N) is restrained in an inactive state by the intramolecular interaction with the C-terminal inhibitory domain (GSDM-C). These two-domain proteins are activated by upstream protease cleavage within the interdomain linkers. The unleashed GSDM-N binds to acidic phospholipids in the cytoplasmic leaf of plasma membranes and undergoes dramatic conformational changes and oligomerization, then assembling into transmembrane pores for pyroptosis induction. GSDM pores lead to membrane rupture, cell swelling, and cytosol release, thereby mobilizing proinflammatory responses. GSDMs are evolutionarily conserved and have been discovered across all kingdoms of life, including bacteria, fungi, invertebrates such as cnidarians and mollusks, and all vertebrates. Proteolytic cleavage to liberate the pore-forming activity of GSDM-N appears to be a universal mechanism for most GSDMs activation, despite low sequence homology among the GSDMs from diverse species. However, recent studies discover that there exist noncanonical GSDMs lack of functional C-terminal inhibitory domains in some lower eukaryotic species. These noncanonical GSDMs are activated by unprecedented mechanisms independent of proteolytic cleavage. *Tricho*GSDM, present in the basal metazoan *Trichoplax adhaerens*, is a pore-forming domain-only protein and exists as a disulfides-linked autoinhibited dimer. Reduction of the disulfides by the conserved cytoplasmic antioxidant system, including glutathione (GSH) and thioredoxin (Trx), generates pore-forming active monomers capable of inducing lytic cell death. In filamentous fungus *Neurospora crassa*, polymorphic regulator of cell death-1 (*rca-1*) encodes two GSDM-like proteins RCD-1-1 and RCD-1-2 in incompatible haplostrains, which trigger pyroptosis-like cell death in nonself discrimination (allorecognition) upon encountering during somatic cell fusion. RCD-1-1 and RCD-1-2 are both monomers and structurally similar to mammalian GSDM-N domains, lacking autoinhibitory fragments. They alone could bind acidic phospholipids, and associate with cell membrane in a resting state. Coexistence of RCD-1-1 and RCD-1-2 leads to formation of RCD-1-1/RCD-1-2 heterodimers through molecular mating, which further oligomerize into membrane-inserted pores, causing rapid lytic cell death. These findings reveal mechanistic diversities in GSDM activation and indicate versatile functions of GSDMs. Due to the highly proinflammatory nature of pyroptosis, the pore-forming activities of GSDMs have been illustrated to be precisely regulated at multiple levels. GSDMD transcription and expression is characterized to be induced by interferon regulatory factors 2 (IRF2). mRNA alternative splicing of *GSDMB* generates various isoforms, some of which exhibit potent pore-forming activity whereas the others bear none. Additionally, different types of post-translational modifications have been identified on GSDMs, playing distinct regulatory roles. For examples, itaconation of GSDMD, succinylation of GSDMD and GSDME, and phosphorylation of GSDMA, GSDMD and GSDME, negatively regulate GSDM pore formation, thereby inhibiting pyroptosis. Conversely, palmitoylation of GSDMD and GSDME, and ubiquitination of GSDMD promote the pore-forming activities and pyroptosis. Moreover, some proteases can cleave within the GSDM-N domains to block their pore-forming activities. On the other hand, bacterial pathogens evolve specific effectors to hijack host pyroptotic defense pathway through targeting upstream caspases, GSDMs or plasma membrane phospholipids. Given the crucial roles of GSDMD in immune defense and pathological inflammation, a few small-molecule inhibitors have been found to directly inhibit GSDMD activity. Since the identification of GSDMs as the executioners of pyroptosis, the GSDM family has attracted broad attention in immunology researches. Significant progress has been made to greatly advance our knowledge about how GSDMs action, and what are the immunological functions of pyroptosis. Investigations of GSDM-targeting therapies are emerging as a promising translational direction. In this paper, we review recent progress in the field of pyroptosis researches, with focus on various molecular mechanisms underlying GSDMs activation and regulation. The biological implication and future direction of pyroptosis research are also discussed.

Key words pyroptosis, gasdermins, activation mechanism, regulation mechanism, pathogenic bacteria

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0283