

Received: 18.02.2020
Accepted: 15.12.2020
Published: 25.05.2021

Rodzina białek gazdermin jako czynnik permeabilizujący błonę komórkową w procesie pyroptozy*

Gasdermin family proteins as a permeabilization factor of cell membrane in pyroptosis process

Dorota Kuc-Ciepluch, Karol Ciepluch, Michał Arabski

Zakład Biologii Medycznej, Instytut Biologii, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach

Streszczenie:

Rodzaj śmierci komórkowej, tj. apoptoza, autofagia, nekroza czy pyroptoza zależy od czynnika indukującego oraz fazy cyklu komórkowego. Główną rolę w odpowiedzi immunologicznej organizmu na mikroorganizmy odgrywa proces zwany pyroptozą. Pyroptoza jest rodzajem śmierci komórki indukowanym przez różnego rodzaju czynniki zapalne aktywowane w odpowiedzi na wzorce cząsteczkowe i molekularne związane z patogenami w tym lipopolisacharyd bakteryjny na drodze szlaku kanonicznego lub niekanonicznego w zależności od rodzaju biorących w nich udział kaspaz. W pyroptozie istotną rolę pełni białko gazdermina D należące do rodziny białek gazdermin (A, B, C, D, E i DFNB59), która charakteryzuje się swoistą tkankowo ekspresją genów, głównie w komórkach nabłonkowych, skóry oraz układu pokarmowego i odpowiada za regulację proliferacji i różnicowania komórek, a także za hamowanie lub rozwój nowotworów w różnych narządach. Rodzina GSDM jest odpowiedzialna za tworzenie porów w błonie komórkowej, umożliwiając sekrecję cytokin prozapalnych (IL-1 β i IL-18), biorących udział w inicjacji szlaków reakcji zapalnej przez rekrutację i aktywację komórek odpornościowych w miejscu infekcji. Zasadniczą rolę w procesie pyroptozy na drodze niekanonicznej pełni białko gazdermina D, którego N-koniec, tworząc pory w błonie komórkowej powoduje powstanie obrzęku, lizy osmotycznej aż do śmierci zainfekowanej komórki.

Słowa kluczowe:

gazdermina, pyroptoza, cytokiny prozapalne, permeabilizacja

Summary:

The type of cell death, i.e. apoptosis, autophagy, necrosis or pyroptosis, depends on the inducing factor and the phase of the cell cycle. The main role in immunological response to microorganisms is played by a process called pyroptosis. Pyroptosis induces various types of inflammatory factors in response to molecular patterns associated with pathogens, e.g., bacterial lipopolysaccharide in the canonical or non-canonical pathway depending on the type of caspases involved. In pyroptosis, the gasdermin D protein belonging to the gasdermin protein family (A, B, C, D, E and DFNB59) plays an important role, which is characterized by specific tissue gene expression mainly in epithelial cells, skin and the digestive system and is responsible for regulating the proliferation and differentiation of cells and is responsible for inhibiting or developing cancers in various organs. The GSDM family is responsible for the formation of pores in the cell membrane, enabling the secretion of proinflammatory cytokines (IL-1 β and IL-18) involved in initiating inflammatory response pathways by recruiting and activating immune cells at the site of infection. The gasdermin D protein plays an essential role in the non-canonical pyroptosis process, whose N-terminal forming pores in the cell membrane leads to edema, osmotic lysis and, consequently, to the death of the infected cell.

Keywords:

gasdermin, pyroptosis, proinflammatory cytokines, permeabilization

*Praca sfinansowana w ramach projektu Narodowego Centrum Nauki nr 2017/27/B/NZ6/00199

GICID	01.3001.0014.8985
DOI:	10.5604/01.3001.0014.8985
Word count:	5 012
Tables:	–
Figures:	2
References:	47

Adres autorki: mgr Dorota Kuc-Ciepluch, Zakład Biologii Medycznej, Instytut Biologii, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach, ul. Uniwersytecka 7, 25-406 Kielce; e-mail: dorota.kuc.ciepluch@gmail.com

Wykaz skrótów: **ALR** – receptory AIM-2 podobne (AIM2-like receptor ALR), **Apaf-1** – apoptotyczny czynnik aktywujący proteazę-1 (apoptotic protease activating factor 1), **ASC** – adaptorowe białko apoptotyczne (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD), **CARD** – domena rekrutująca i aktywująca kaspazy (caspase activation and recruitment domain), **cGAS** – cykliczna syntaza GMP-AMP (cyclic GMP-AMP synthase), **CLR** – receptory lektyny typu C (types C-type lectin receptors), **Cyt c** – kompleks cytochromu (cytochrome complex), **DAMPs** – wzorce molekularne związane ze zniszczeniami pochodzącymi z komórek gospodarza (damage-associated molecular pattern), **ECMV** – wirus zapalenia mózgu i mięśnia sercowego (encephalomyocarditis virus), **GBP** – białko wiążące guanozynę (guanylate binding protein), **GSDM (family)** – rodzina białek zawierających domenę gasdermin (gasdermin-domain-containing protein family), **HtrA2** – mitochondrialna proteaza serynowa HTRA2 (mitochondrial serine protease HtrA2), **IFN** – interferon, **IFN-β** – interferon typu I beta (type I interferon beta), **LPS** – lipopolisacharyd, **MAPK** – kinazy aktywowane mitogenami (mitogen activated protein kinase), **MyD88** – białko pierwotnej odpowiedzi różnicowania szpiku 88 (myeloid differentiation primary response 88), **NBD** – domena centralna receptorów NOD-podobnych, **NF-κB** – jądrowy czynnik transkrypcyjny (nuclear transcription factor), **NLR** – receptory NOD-podobne (NOD-like receptor), **OMV** – zewnątrzkomórkowe pęcherzyki (outer membrane vesicles), **PAMPs** – wzorce molekularne związane z patogenami (pathogen-associated molecular patterns), **PFD** – domeny tworzące pory (pore-forming domain), **PRRs** – receptory rozpoznające patogeny (pattern recognition receptors), **PYD** – domena zawierająca pirynę (pyrin domains), **RLR** – receptory RIG-I-podobne (RIG-I-like receptors), **SID** – domena hamująca solubilizację (solubilizing inhibitory domain), **SNP** – polimorfizmy pojedynczych nukleotydów (single nucleotide polymorphism), **STING** – stymulator genów interferonu (stimulator of interferon genes), **TGF-β** – transformujący czynnik wzrostu beta (transforming growth factor β), **TLR** – receptory Toll-podobne (Toll-like receptor), **TNF-α** – czynnik martwicy nowotworów (tumor necrosis factor α), **TOM70** – receptor importu mitochondriów (mitochondrial import receptor), **TRAP1** – białko związane z receptorem TNF-1 (TNF receptor-associated protein 1), **TRIF** – białko zawierające domenę TIR (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β), **VSV** – wirus zapalenia jamy ustnej (vesicular stomatitis virus).

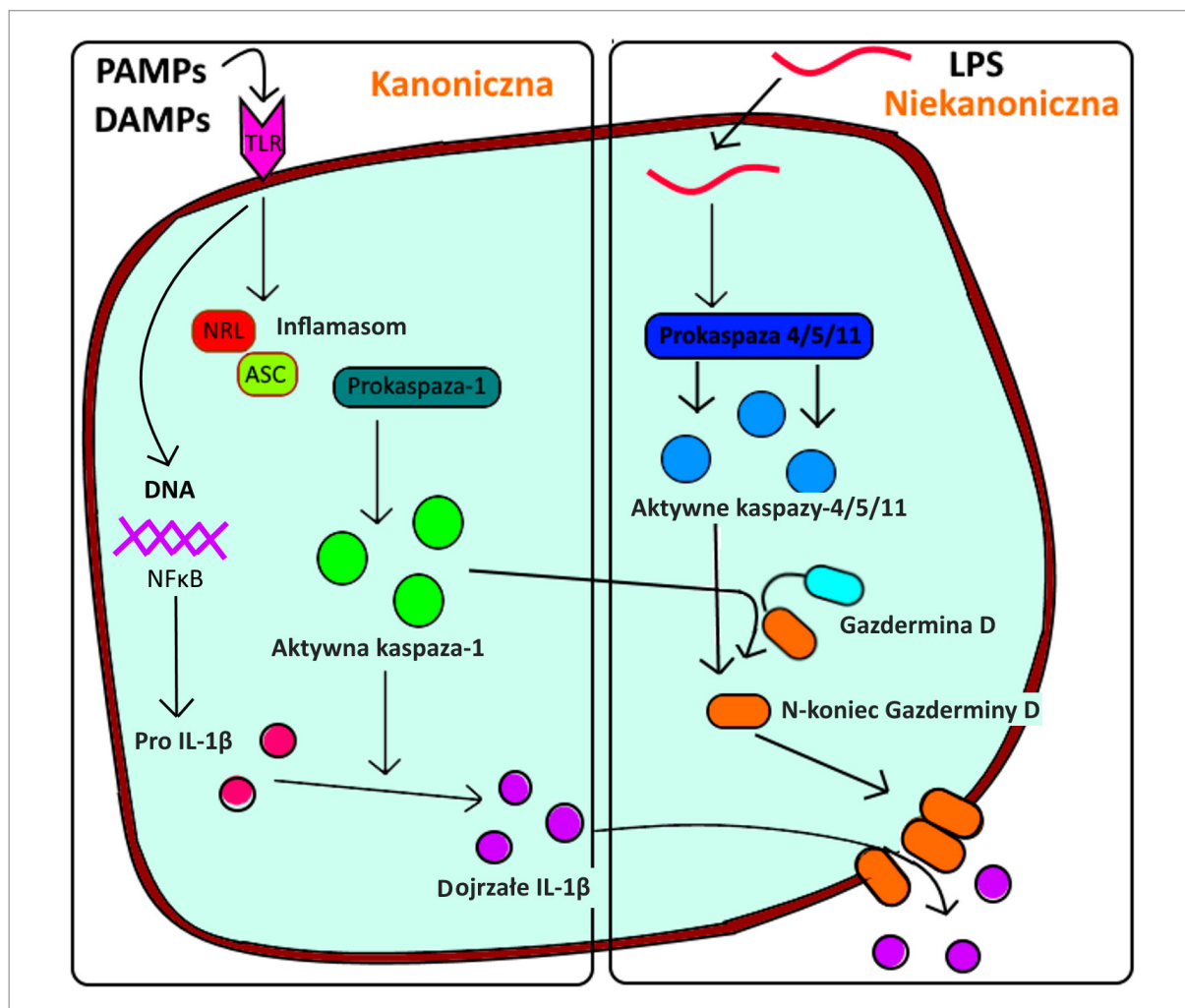
WSTĘP

Programowana śmierć komórki to jeden z podstawowych mechanizmów wpływających na prawidłowe funkcjonowanie systemu immunologicznego oraz przebieg procesów fizjologicznych. Procesy: apoptozy, autofagii, katastrofy mitotycznej, nekrozy, pyroptozy oraz starzenia się obejmują ukierunkowane na śmierć komórki szlaki metaboliczne zależne od czynników inicjujących czy też fazy cyklu komórkowego [37]. Spośród wymienionych wyżej różnych rodzajów śmierci komórki można wyróżnić pyroptozę, której mechanizm różni się od apoptozy i jest ściśle związany z odpowiedzią zapalną wywołowaną przez wewnątrzkomórkowe patogeny. W przebiegu pyroptozy dochodzi do aktywacji kaspaz-1 lub -4, -5 i -11, a następnie białka; gazdermina, która tworząc pory w błonie biologicznej, umożliwia... sekrecję interleukiny-1 beta oraz interleukiny-18 [3]. Białka z rodziny gazdermin poza zdolnością do formowania porów w błonie komórek eukariotycznych mogą również tworzyć

pory w zewnętrznej błonie komórkowej bakterii Gram-ujemnych w czasie infekcji [31]. Inicjacja procesu pyroptozy może się odbywać na drodze jednego z dwóch szlaków zależnych od aktywacji swoistych dla nich receptorów błonowych i pośrednio kaspaz (ryc. 1). Aktywacja tych receptorów może być wywołowana przez różne patogeny, takie jak: wirusy, bakterie, grzyby czy pasożyty [15].

Szlak kanoniczny i niekanoniczny pyroptozy

Śmierć komórki w procesie pyroptozy jest aktywowana przez szlak kanoniczny lub niekanoniczny w zależności od rodzaju kaspaz (kaspaza-1, -11 [19], -4, -5 [1]) zaangażowanych w daną ścieżkę sygnalizacyjną (ryc. 1). W przypadku drogi kanonicznej pyroptozy, wzorce molekularne związane z patogenami PAMP i niezakaźne związane z uszkodzeniem komórek DAMP są rozpoznawane przez receptory PRR: zewnątrzkomórkowe TLR [12] i CLR [26] lub wewnątrzkomórkowe NLR [47], RLR i ALR. W wyniku



Ryc. 1. Schemat procesu pyroptozy z uwzględnieniem szlaków kanonicznego i niekanonicznego

aktywacji receptorów tworzy się kompleks białkowy zwany inflamasomem, który poza receptorami PRR głównie NLR, zawiera: białko AIM2, pirynę, białko adaptorowe ASC oraz prokaspazę-1 [26, 40, 47]. Aktywacja inflamasomu prowadzi do oligomeryzacji receptorów NLR, a następnie przekazania sygnału w procesie fosforylacji, przez ich N-kończową domenę pirynową PYD, na białko ASC. Białko ASC poprzez swoją domenę rekrutacyjną CARD oddziałuje z domeną CARD (oddziaływania CARD-CARD) prokaspazy-1, powodując powstanie jej aktywnej postaci w wyniku proteolitycznego cięcia w miejscu dwóch katalitycznych domen kaspazy: podjednostki p10 i p20. Podjednostki te w wyniku oligomeryzacji tworzą proteolityczne tetramery zdolne do przekształcenia pro-interleukin proIL-1 β i -18 do ich aktywnych postaci [18, 26, 40, 47]. IL-1 β i IL-18 są uwalniane przez pory w błonie komórkowej utworzone przez białko gazderminę D (GSDMD). Aktywna postać kaspazy-1 odpowiada nie tylko za uwalnianie interleukin i inicjację odpowiedzi immunologicznej w wyniku kanonicznej pyroptozy, ale również za indukcję niekanonicznego szlaku przez aktywację GSDMD, łącząc tym samym obie drogi, zmieniając przepuszczalność błony komórkowej [18, 19]. O ile kaspaza-1 może brać udział

w szlaku kanonicznym i niekanonicznym, o tyle kaspazy ludzkie -4, -5 czy mysia -11 mogą niezależnie od kaspazy-1, inflamasomu i klasycznej drogi pyroptozy aktywować sygnalizację niekanoniczną i indukować gazderminę D. Aktywacja ta prowadzi do sekrecji interleukin IL-1 β i IL-18, tak jak to się dzieje w przypadku szlaku kanonicznego [47].

Rodzina białek gazdermin

Białka z rodziny gazdermin tworzą pory w błonie komórkowej w czasie pyroptozy. Rodzina ta składa się z gazderminy A, B, C, D, E i DFNB59 o homologii na poziomie 45%.

Białka te składają się z domeny C-końcowej (SID) i N-końcowej (PFD), które są konserwatywne w obrębie tej rodziny w przeciwieństwie do domeny środkowej [31]. Domena C-końcowa spełnia rolę kontrolną i hamującą aktywność N-końca, który charakteryzuje się cytotoksyczną aktywnością i może tworzyć pory w błonie komórkowej. Tak więc zdolność domeny N-końcowej do zmiany przepuszczalności błony komórkowej sugeruje skłonność białek z rodziny gazdermin do permeabilizacji błony. C-końiec

białek z rodziny gazdermin przeważnie zawiera strukturę α -helikalną, podczas gdy N-koniec ma dodatkowo strukturę β -harmonijki odpowiedzialną za tworzenie części transmembranowej porów, natomiast część α -helisy jest odpowiedzialna za łączenie się z częścią hydrofilową lipidów błon np. z kardioliipiną [43]. Jednak poza gazderminą A, D i E, których mechanizm tworzenia porów jest poznany, sposób permeabilizacji innych białek wymaga dalszych badań [38]. Geny kodujące GSDMA i GSDMB znajdują się na chromosomie 17q21.2, a dla GSDMC i GSDMD na chromosomie 8q24. Ekspresja genów gazderminy jest swoista tkankowo i ujawnia się głównie w komórkach nabłonkowych układu pokarmowego [41] i płuc [23], ale również można ją zaobserwować w tkankach szyjki macicy, piersi [4], naskórka [41] oraz w komórkach układu odpornościowego [21]. Rodzina GSDM odpowiada za regulację proliferacji i różnicowania komórek nabłonkowych oraz procesu apoptozy odgrywając tym samym istotną rolę w rozwoju nowotworów różnych narządów [25]. Białka te mogą być zarówno supresorami, jak i onkogenami nowotworowymi. GSDMA, GSDMC i GSDMD hamują rozwój raka żołądka i przełyku w przeciwieństwie do GSDMB, której nadekspresja jest widoczna w przebiegu raka żołądka, szyjki macicy oraz raku piersi i jest związana ze stopniem rozwoju nowotworu i przerzutami [4, 46]. GSDMC jest uznawana za onkogen w raku jelita grubego [25] i skóry [4]. Natomiast zwiększona ekspresja GSDMD przyczynia się do progresji i powstania przerzutów w nowotworach płuc [11].

Gazdermina A

Ekspresja genu *GSDMA* kodującego białko gazderminę A występuje w komórkach nabłonkowych skóry, w których jest odpowiedzialna za stan zapalny, obecna jest również w nabłonku górnego odcinka przewodu pokarmowego i płuc oraz uczestniczy w apoptozie komórek żołądka przez aktywację kaspazy-3 i -7 [10, 22]. Gen *GSDMA* jest też odpowiedzialny za regulację prawidłowego wzrostu gruczołów i przewodów sutkowych. Mutacja w genie *GSDMA* wpływa na przewlekłą aktywację układu odpornościowego, co prowadzi do powstawania przewodów sutkowych o różnej długości i zaburzenia funkcji wydzielniczej gruczołu [13]. Zaobserwowano również związek między zmiennością genetyczną w obrębie genu *GSDMA* a ryzykiem wystąpienia astmy [46]. Gazdermina A jest powiązana z zależną od TGF- β sygnalizacją apoptotyczną. Na skutek zwiększenia ekspresji *GSDMA* przez czynnik wzrostu TGF- β dochodzi do aktywacji apoptozy w nabłonku żołądka i zahamowania nowotworzenia [31, 46]. Białko to pełni także funkcję regulatorową szlaku apoptozy indukowanej przez czynnik TNF- α , a po jej aktywacji następuje stymulacja kaspazy-3 i apoptozy w keranocytach i autofagii na szlaku zależnym od mitochondriów [31]. Według Ruan i wsp. w mysim modelu *GSDMA3* zaobserwowano tworzenie się porów w błonie komórkowej na skutek powinowactwa α -helisy do lipidów błony, takich jak kardioliopina, co powoduje zmianę konformacji N-końca *GSDMA3* i powstanie porów [35]. Przypuszcza się, że mysia *GSDMA3* może tworzyć pory w błonie mitochondrialnej komórki oddziałując przez receptor TOM70 z białkiem TRAP1.

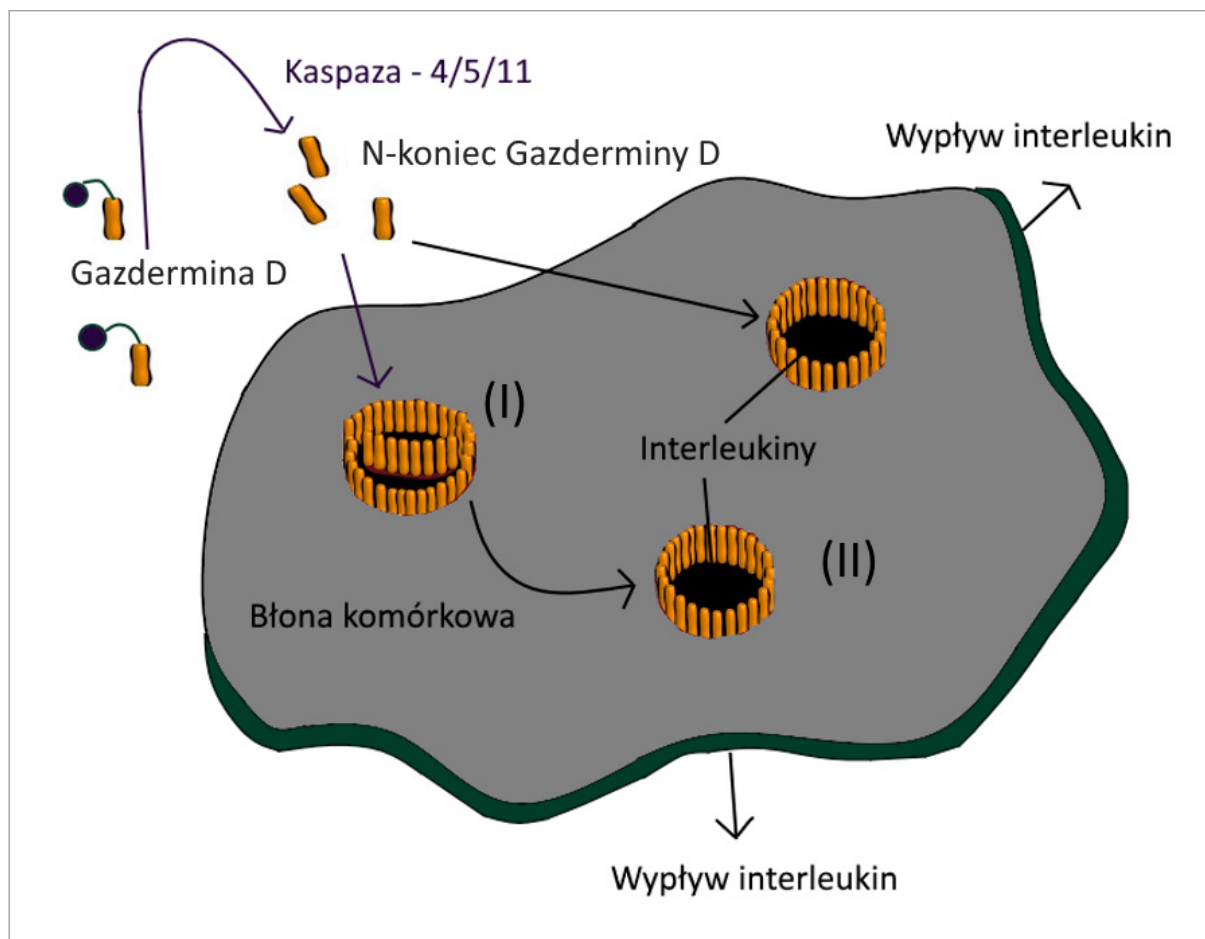
Aktywność tego białka zmniejsza mitochondrialny stres oksydacyjny, hamując tym samym tworzenie porów i związaną z tym apoptozę. Podczas oddziaływania *GSDMA3* z TRAP1 dochodzi do zahamowania funkcji TRAP1, a więc również indukcji powstania porów [10].

Gazdermina B

Nadekspresję genu *GSDMB* kodującego białko gazderminę B wykryto w: komórkach nabłonkowych [29], nowotworowych żołądka, szyjki macicy i piersi [4] oraz limfocytach i hepatocytach [21]. Ponadto polimorfizm *GSDMB* wiąże się z występowaniem nieswoistego zapalenia jelit [4] lub zmniejszeniem podatności na astmę w wyniku utraty zdolności indukcji pyroptozy [28]. *GSDMB* jednak różni się od innych białek gazdermin tym, iż może być aktywną postacią białka o pełnej długości lub samego N-końca i oddziaływać zarówno z fosfolipidami, tak jak w przypadku innych gazdermin, jak również z siarczanami glikolipidów. Umożliwia to *GSDMB* oddziaływanie z zewnętrzną błoną komórkową. Jednocześnie dwie aktywne postaci gazderminy B sugerują, że domena C-końcowa *GSDMB*, nie ma zdolności do hamowania jego N-końca. Jednak tylko białko w postaci N-końca jest zdolne do tworzenia porów i indukcji cech podobnych do pyroptozy w błonie komórek ludzkich [10]. Podobnie jak w gazderminie D, może dojść do cięcia gazderminy B przez apoptotyczne kaspazy-3, -6 i -7 [4]. Gazdermina B może również zostać zaktywowana przez NF- κ B, a to wywołuje aktywację kaspazy-4 niezbędnej do przecięcia gazderminy D, w konsekwencji uruchamiając niekanoniczny szlak pyroptozy. W wyniku sprzężenia zwrotnego aktywnej kaspazy-4 może dojść do przecięcia gazderminy B [5]. Indukcja pyroptozy może również zajść poprzez kaspazę-1, która rozkłada *GSDMB* na C i N-końce, tworząc pory w błonie cytoplazmatycznej umożliwiając tym samym sekrecję IL-1 β jak w przypadku gazderminy D oraz IL-33 [28]. Po aktywacji apoptotycznej kaspazy-3, zarówno białko *GSDMB* jak i *GSDMD* mogą ulec inaktywacji, a to zapobiega inicjacji procesu pyroptozy [21].

Gazdermina C

Zwiększoną ekspresję genu *GSDMC* kodującego białko gazderminę C zaobserwowano w komórkach nowotworowych jelita grubego, skóry oraz czerniaka [4, 25]. Zwiększona ekspresja *GSDMC* w raku jelita grubego jest powiązana z mutacjami występującymi w genie kodującym białko TGFB2. TGFB2 jest jednym z białek należących do szlaku sygnalizacyjnego TGF- β , który odpowiada za hamowanie tworzenia nowotworów oraz regulację procesów biologicznych, takich jak: różnicowanie komórek, apoptoza i odpowiedź immunologiczna. W wyniku mutacji *TGFB2* dochodzi do inaktywacji białka TGFB2, a tym samym również do zahamowania szlaku TGF- β , co jest charakterystyczne dla wielu nowotworów. Jednocześnie zostaje uruchomiona nadekspresja genu gazderminy C i zwiększona proliferacja komórek nowotworowych w jelicie [25]. Ekspresja *GSDMC* występuje również w: prawidłowych komórkach nabłonkowych tchawicy,



Ryc. 2. Schemat tworzenia się porów w błonie komórkowej. N-koniec wiąże się z lipidami w błonie komórkowej, ulegając oligomeryzacji i tworząc pory o wielkości ok. 12 nm w kształcie szczelinowym (I), łukowym (I) lub pierścieniowym (II). Pory szczelinowe i łukowe przechodzą później w pierścieniowe (II). Schemat według Mulvihill [25] (zmieniony)

śledzenie, przełyku i żołądka [36]. W komórkach żołądka i przełyku w wyniku nowotworzenia dochodzi do jej obniżenia. Wykazano również, że gazdermina C odpowiada za hamowanie proliferacji tych komórek nowotworowych, co sugeruje jej rolę jako supresora w nowotworach żołądka i przełyku [25, 36]. Zwiększona ekspresja N-końca GSDMC indukuje cechy podobne do pyroptozy [10].

Gazdermina E

Gazderminę E wcześniej nazywano białkiem DFNA5. Mutacja genu kodującego GSDME powoduje rozwój głuchoty związanej z dziedziczeniem autosomalnym dominującym [6]. W ostatnich latach zbadano udział gazderminy E w zjawisku pyroptozy indukowanej przez kaspazę-3. Przez apoptotyczną kaspazę-3 dochodzi do pocięcia gazderminy E na C- i N-koniec, które odpowiadają za permeabilizację błony komórkowej. Powstałe w błonie pory, umożliwiają uwolnienie DAMP, które są sygnałem dla komórek odpornościowych rekrutując je w miejsce apoptozy lub stanu zapalnego oraz zewnętrznej błony komórkowej mitochondriów. Jednocześnie uwalniają one krytyczne czynniki proapoptotyczne Cyt c i HtrA2. Powstanie porów odbywa się tu przez oddziaływanie N-końca GSDME

z lipidami błony komórkowej czy mitochondrialnej. Wielkość porów waha się w granicach 10–18 nm w zależności od rodzaju lipidów budujących błonę mitochondrialną. Taki rozmiar porów w błonie mitochondrialnej umożliwia uwolnienie czynników proapoptotycznych Cyt c i HtrA2, mających średnicę około 3 nm [33, 34]. Uwolniony cyt c zwiększa aktywację apoptotycznego czynnika apoptosomu Apaf-1 i w wyniku dodatniego sprzężenia zwrotnego uaktywnia kaspazę-3. Tak więc po permeabilizacji błony mitochondrialnej N-koniec GSDME powoduje tworzenie porów w błonie komórkowej i wtórną martwicę bądź pyroptozę [34]. Szlak GSDME kierujący komórkę na drogę apoptozy może się łączyć ze szlakiem GSDMD, która w wyniku aktywacji przez zapalne kaspazy może również permeabilizować błonę mitochondrialną przez aktywację kaspazy-3 i wywołać apoptozę. Oba białka gazderminy E i D są zdolne do indukcji wrodzonej odpowiedzi immunologicznej podczas infekcji bakteryjnej i zabicia patogenów wewnątrzkomórkowych [33]. W wyniku takich działań może dojść do wtórnej martwicy. Jeśli komórki apoptotyczne nie są usunięte dochodzi do ich obrzęku i lizy charakterystycznej dla pyroptozy lub nekrozy. Gazdermina E odpowiada również za uwięzienie apoptotycznych

patogenów wewnątrz komórki, takich jak wirus zapalenia jamy ustnej (VSV) czy wirus zapalenia mózgu i mięśnia sercowego (ECMV) i ich eliminację w procesie fagocytozy [24, 34]. Jednak niedawne doniesienia Tixeira i wsp. zaprzeczają roli gazderminy E jako białka powodującego wtórną martwicę [42]. GSDME może być supresorem w różnych typach nowotworów żołądka, jelita grubego i piersi [6].

Białko DFNB59

Białko DFNB59, inaczej nazywane białkiem PJKV, zalicza się do rodziny gazdermin ze względu na homologię sekwencji genu [10, 41]. N-końcowa domena efektorowa białka DFNB59 nie spełnia tej samej funkcji jak w innych białkach należących do gazdermin [14], natomiast C-końcowa domena jest krótsza od pozostałych przedstawicieli rodziny [21]. W wyniku stresu oksydacyjnego, białko DFNB59 stymuluje peroksyfagię i tym samym reguluje proliferację peroksyosomów dotyczących komórek włosów i neuronów słuchowych, chroniąc je przed uszkodzeniem [7, 14]. Nie zidentyfikowano aktywności białka DFNB59 związanego z tworzeniem porów w błonie komórkowej, która dotyczy pozostałych członków rodziny gazdermin [20].

Gazdermina D

GSDMD to jedno z najlepiej poznanych białek rodziny gazdermin. Ekspresję GSDMD zaobserwowano w: komórkach immunologicznych, nabłonkowych żołądka, przełyku i jelit [21, 36]. GSDMD pełni ważną funkcję u ludzi w reakcji odpornościowej organizmu, w której jest niezbędnym białkiem aktywującym komórki wrodzonej odpowiedzi immunologicznej, tj. monocyty i makrofagi podczas infekcji drobnoustrojowej, wywołując ich lizę osmotyczną w wyniku pyroptozy [32]. Istotną jest tu budowa białka charakterystyczna dla wszystkich członków rodziny. GSDMD składa się z domeny C-końcowej, która spełnia rolę kontrolną, części łączącej i domeny N-końcowej odpowiedzialnej za tworzenie porów w błonie komórkowej.

Gazdermina D jest odpowiedzialna za szlak niekanoniczny zjawiska pyroptozy. Aktywatorem tego szlaku jest lipopolisacharyd bakteryjny wchodzący w skład zewnętrznej błony komórkowej bakterii Gram-ujemnych [32, 39, 45]. Składa się z lipidu A, części rdzeniowej oligosacharydu oraz antygeny O. Lipid A jest odpowiedzialny za oddziaływanie z domenami CARD ludzkich kaspaz-4 i -5, u myszy kaspazy-11 [15]. LPS jest transportowany przez rodzaj zewnątrzkomórkowych pęcherzyków OMV tworzonych przez bakterie z ich zewnętrznej błony. OMV zawierają składniki macierzystej bakterii, takie jak: PAMP, LPS, lipoproteiny, peptydoglikan, RNA i DNA, które aktywują sygnały prozapalne zależne od receptorów PRR. Zewnątrzkomórkowe pęcherzyki w wyniku endocytozy przenikają do środowiska wewnątrzkomórkowego, gdzie dochodzi do uwolnienia LPSu z endosomów do cytozolu przez białka GBP [29] i aktywacji kaspazy-1 lub -4 i -5.

Aktywacja ta powoduje uruchomienie niekanonicznego szlaku pyroptozy [15, 29, 39]. Aktywacja kaspaz-4, -5 lub -1 prowadzi do pocięcia gazderminy D i powstania C- i N-końców [30]. Fragmenty te wiążą się z lipidami błony komórkowej, tj. fosforanami fosfatydyloinozytolu oraz fosfatydyloseryną. Ulegają one oligomeryzacji i tworzą pory o wielkości około 12 nm o kształcie szczelinowym, łukowym lub pierścieniowym. Pory szczelinowe i łukowe przechodzą później w pierścieniowe (ryc. 2). Następnie składniki tworzące pory, takie jak lipidy i białko gazdermina, mogą zostać uwolnione na zewnątrz [27]. N-końiec zaktywowanej gazderminy może również wykazywać powinowactwo do kardiolipiny i fosfatydyloseryny komórek bakteryjnych i w ten sposób prowadzić do śmierci bakterii wewnątrz komórki, jak i prawdopodobnie komórek bakteryjnych na zewnątrz komórki gospodarza *in vitro* [31].

Szlak niekanoniczny łączy się ze szlakiem kanonicznym pyroptozy przez możliwość aktywacji inflamasomu NLRP3 w tym białka ASC, które mogą stymulować kaspazę-1 należącą do szlaku kanonicznego [19]. Kaspaza-1 może również w dalszej kolejności powodować cięcie gazderminy D, tak samo jak kaspazy szlaku niekanonicznego i również powoduje tworzenie porów, w celu uwolnienia IL-1 β i IL-18. Uwalnianie interleukin poprzez pory gazderminowe jest możliwe ze względu na rozmiar tych interleukin IL-1 β (4,5 nm) i IL-18 (5,0 nm), który umożliwia im wydostanie się do środowiska zewnątrzkomórkowego [21]. Interleukina-18 powoduje wydzielanie interferonu γ (IFN- γ) w komórkach Th1, NK i cytotoksycznych komórkach T oraz bierze udział w rozwoju komórek Th2, wzmacniając tym samym dalszą odpowiedź immunologiczną [16]. Natomiast IL-1 β jest cytokiną prozapalną, która odpowiada za indukowanie komórek wrodzonej odpowiedzi immunologicznej i modulowanie komórek swoistej odpowiedzi immunologicznej [16].

Gazdermina D odpowiada więc za uwalnianie interleukin podczas hiperaktywacji makrofagów oraz indukcji pyroptozy. Białko to jest bifunkcyjne w odpowiedzi immunologicznej komórki. Pośredniczy w uwalnianiu cytokin zapalnych podczas procesu pyroptozy, a to prowadzi do lokalnej odpowiedzi immunologicznej przy jednoczesnej śmierci komórki. Podczas pyroptozy, na skutek powstałych porów, dochodzi do zaburzenia gradientu jonowego, a więc zaburzenia ciśnienia osmotycznego, powodując obrzęk, lizę osmotyczną, śmierci komórki i w wyniku tego uwalniają się z niej cytokiny. GSDMD uczestniczy również w uwalnianiu tej interleukiny podczas hiperaktywacji makrofagów. Interleukiny uwalniane są z żywych makrofagów, komórek dendrytycznych czy też neutrofilów za pośrednictwem gazderminy, które nie są kierowane na drogę pyroptozy, czyli nie dochodzi do śmierci komórki. W tym procesie w wyniku aktywacji komórek przez patogeny stymulowany jest inflamasom aktywujący kaspazę-1, która tworząc gazderminę tworzącą pory, powodując uwolnienie interleukin. Jednak ten proces charakteryzuje mniejsza ilość uwalnianych cytokin niż podczas pyroptozy [8, 9, 17]. Poza wydzielaniem

interleukin może dojść również do uwalniania innych białek cytozolowych, których rozmiar umożliwi przejście przez pory utworzone przez GSDMD [17]. Inną rolą białka GSDMD jest funkcja regulatorowa wpływu jonów K⁺ oraz zależna od cGAS odpowiedź interferonu na cytozole DNA. Gazdermina D może również być aktywowana podczas indukcji białka AIM2 inflammasomu i szlaku cGAS-STING-IFN- β za pomocą cytozole DNA, w wyniku czego dochodzi do wypływu jonów K⁺ przez pory gazderminowe powstałe w błonie komórkowej. Wyciek jonów natomiast hamuje cGAS, a więc wykrycie cytozole DNA. Tym samym zatrzymana jest odpowiedź interferonu typu I [2].

PIŚMIENNICTWO

- [1] Baker P.J., Boucher D., Bierschenk D., Tebartz C., Whitney P.G., D'Silva D.B., Tanzer M.C., Monteleone M., Robertson A.A., Cooper M.A., Alvarez-Diaz S., Herold M.J., Bedoui S., Schroder K., Masters S.L.: NLRP3 inflammasome activation downstream of cytoplasmic LPS recognition by both caspase-4 and caspase-5. *Eur. J. Immunol.*, 2015; 45: 2918–2926
- [2] Banerjee I., Behl B., Mendonca M., Shrivastava G., Russo A.J., Menoret A., Ghosh A., Vella A.T., Vanaja S.K., Sarkar S.N., Fitzgerald K.A., Rathinam V.A.: Gasdermin D restrains type I interferon response to cytosolic DNA by disrupting ionic homeostasis. *Immunity*, 2018; 49: 413–426.e5
- [3] Bergsbaken T., Fink S.L., Cookson B.T.: Pyroptosis: Host cell death and inflammation. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2009; 7: 99–109
- [4] 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: E1128–E1137
- [5] Chen Q., Shi P., Wang Y., Zou D., Wu X., Wang D., Hu Q., Zou Y., Huang Z., Ren J., Lin Z., Gao X.: GSDMB promotes non-canonical pyroptosis by enhancing caspase-4 activity. *J. Mol. Cell Biol.*, 2019; 11: 496–508
- [6] De Beeck K.O., Van Laer L., Van Camp G.: DFNA5, a gene involved in hearing loss and cancer: A review. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 2012; 121: 197–207
- [7] Defourny J., Aghaie A., Perfettini I., Avan P., Delmaghani S., Petit C.: Pejvakin-mediated pexophagy protects auditory hair cells against noise-induced damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2019; 116: 8010–8017
- [8] Evavold C.L., Kagan J.C.: Defying death: The (w)hole truth about the fate of GSDMD pores. *Immunity*, 2019; 50: 15–17
- [9] Evavold C.L., Ruan J., Tan Y., Xia S., Wu H., Kagan J.C.: The pore-forming protein gasdermin D regulates interleukin-1 secretion from living macrophages. *Immunity*, 2018; 48: 35–44
- [10] Feng S., Fox D., Man S.M.: Mechanisms of gasdermin family members in inflammasome signaling and cell death. *J. Mol. Biol.*, 2018; 430: 3068–3080
- [11] Gao J., Qiu X., Xi G., Liu H., Zhang F., Lv T., Song Y.: Downregulation of GSDMD attenuates tumor proliferation via the intrinsic mitochondrial apoptotic pathway and inhibition of EGFR/Akt signaling and predicts a good prognosis in non-small cell lung cancer. *Oncol. Rep.*, 2018; 40: 1971–1984
- [12] Gonzalez Ramirez M.L., Poreba M., Snipas S.J., Groborsz K., Drag M., Salvesen G.S.: Extensive peptide and natural protein substrate screens reveal that mouse caspase-11 has much narrower substrate specificity than caspase-1. *J. Biol. Chem.*, 2018; 293: 7058–7067
- [13] Guo H., Xu S., Liu Y., Yang Y., Deng F., Xing Y., Lian X., Li Y.: Gsdma3 is required for mammary gland development in mice. *Histochem. Cell Biol.*, 2017; 147: 575–583
- [14] Harris S.L., Kazmierczak M., Pangršič T., Shah P., Chuchvara N., Barrantes-Freer A., Moser T., Schwander M.: Conditional deletion of pejvakin in adult outer hair cells causes progressive hearing loss in mice. *Neuroscience*, 2017; 344: 380–393
- [15] Hayward J.A., Mathur A., Ngo C., Man S.M.: Cytosolic recognition of microbes and pathogens: Inflammasomes in action. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2018; 82: e00015–18
- [16] He Y., Hara H., Arbor A.: HHS Public Access. 2017; 41: 1012–1021
- [17] Heilig R., Dick M.S., Sborgi L., Meunier E., Hiller S., Broz P.: The gasdermin-D pore acts as a conduit for IL-1 β secretion in mice. *Eur. J. Immunol.*, 2018; 48: 584–592
- [18] Huang X., Feng Y., Xiong G., Whyte S., Duan J., Yang Y., Wang K., Yang S., Geng Y., Ou Y., Chen D.: Caspase-11, a specific sensor for intracellular lipopolysaccharide recognition, mediates the non-canonical inflammatory pathway of pyroptosis. *Cell Biosci.*, 2019; 9: 31
- [19] Kayagaki N., Stowe I.B., Lee B.L., O'Rourke K., Anderson K., Warmington S., Cuellar T., Haley B., Roose-Girma M., Phung Q.T., Liu P.S., Lill J.R., Li H., Wu J., Kummerfeld S. i wsp.: Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature*, 2015; 526: 666–671
- [20] Kazmierczak M., Kazmierczak P., Peng A.W., Harris S.L., Shah P., Puel J.L., Lenoir M., Franco S.J., Schwander M.: Pejvakin, a candidate stereociliary rootlet protein, regulates hair cell function in a cell-autonomous manner. *J. Neurosci.*, 2017; 37: 3447–3464
- [21] Kovacs S.B., Miao E.A.: Gasdermins: Effectors of pyroptosis. *Trends Cell Biol.*, 2017; 27: 673–684
- [22] Lin H.Y., Lin P.H., Wu S.H., Yang L.T.: Inducible expression of gasdermin A3 in the epidermis causes epidermal hyperplasia and skin inflammation. *Exp. Dermatol.*, 2015; 24: 897–899
- [23] Liu X., Zhang Z., Ruan J., Pan Y., Magupalli V.G., Wu H., Lieberman J.: Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature*, 2016; 535: 153–158
- [24] Lu H., Zhang S., Wu J., Chen M., Cai M.C., Fu Y., Li W., Wang J., Zhao X., Yu Z., Ma P., Zhuang G.: Molecular targeted therapies elicit concurrent apoptotic and GSDME-dependent pyroptotic tumor cell death. *Clin. Cancer Res.*, 2018; 24: 6066–6077
- [25] Miguchi M., Hinoi T., Shimomura M., Adachi T., Saito Y., Niitsu H., Kochi M., Sada H., Sotomaru Y., Ikenoue T., Shigeyasu K., Tanakaya K., Kitadai Y., Sentani K., Oue N. i wsp.: Gasdermin C is upregulated by inactivation of transforming growth factor β receptor type II in the

PODSUMOWANIE

Białka należące do rodziny gazdermin pełnią ważną rolę w odpowiedzi immunologicznej organizmu. Ich charakterystyczna cecha, jaką jest tworzenie porów w błonach komórkowych, może mieć istotne znaczenie w dalszych badaniach nad infekcjami bakteryjnymi, szczególnie bakterii Gram-ujemnych, których barierą jaką jest zewnętrzna błona komórkowa trudno pokonać. Jeśli udało by się udowodnić rolę gazdermin w oddziaływaniu na błonę komórkową bakterii, stworzyłoby to nowe możliwości w terapii przeciwbakteryjnej.

presence of mutated Apc, promoting colorectal cancer proliferation. *PLoS One*, 2016; 11: e0166422

[26] Moossavi M., Parsamanesh N., Bahrami A., Atkin S.L., Sahebkar A.: Role of the NLRP3 inflammasome in cancer. *Mol. Cancer*, 2018; 17: 158

[27] Mulvihill E., Sborgi L., Mari S.A., Pfreundschuh M., Hiller S., Müller D.J.: Mechanism of membrane pore formation by human gasdermin-D. *EMBO J.*, 2018; 37: e98321

[28] Panganiban R.A., Sun M., Dahlin A., Park H.R., Kan M., Himes B.E., Mitchell J.A., Iribarren C., Jorgenson E., Randell S.H., Israel E., Tantisira K., Shore S., Park J.A., Weiss S.T. i wsp.: A functional splicing variant associated with decreased asthma risk abolishes the ability of gasdermin B to induce epithelial cell pyroptosis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2018; 142: 1469–1478.e2

[29] Pfalzgraff A., Weindl G.: Intracellular lipopolysaccharide sensing as a potential therapeutic target for sepsis. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2019; 40: 187–197

[30] Platnich J.M., Chung H., Lau A., Sandall C.F., Bondzi-Simpson A., Chen H.M., Komada T., Trotman-Grant A.C., Brandelli J.R., Chun J., Beck P.L., Philpott D.J., Girardin S.E., Ho M., Johnson R.P., MacDonald J.A., Armstrong G.D., Muruve D.A.: Shiga toxin/lipopolysaccharide activates caspase-4 and gasdermin D to trigger mitochondrial reactive oxygen species upstream of the NLRP3 inflammasome. *Cell Rep.*, 2018; 25: 1525–1536.e7

[31] Qiu S., Liu J., Xing F.: „Hints” in the killer protein gasdermin D: Unveiling the secrets of gasdermins driving cell death. *Cell Death Differ.*, 2017; 24: 588–596

[32] Ramos-Junior E.S., Morandini A.C.: Gasdermin: A new player to the inflammasome game. *Biomed. J.*, 2017; 40: 313–316

[33] Rogers C., Erkes D.A., Nardone A., Aplin A.E., Fernandes-Alnemri T., Alnemri E.S.: Gasdermin pores permeabilize mitochondria to augment caspase-3 activation during apoptosis and inflammasome activation. *Nat. Commun.*, 2019; 10: 1689

[34] Rogers C., Fernandes-Alnemri T., Mayes L., Alnemri D., Cingolani G., Alnemri E.S.: Cleavage of DFNA5 by caspase-3 during apoptosis mediates progression to secondary necrotic/pyroptotic cell death. *Nat. Commun.*, 2017; 8: 14128

[35] Ruan J., Xia S., Liu X., Lieberman J., Wu H.: Cryo-EM structure of the gasdermin A3 membrane pore. *Nature*, 2018; 557: 62–67

[36] Saeki N., Usui T., Aoyagi K., Kim D.H., Sato M., Mabuchi T., Yanagihara K., Ogawa K., Sakamoto H., Yoshida T., Sasaki H.: Distinctive expression and function of four GSDM family genes (GSDMA-D) in

normal and malignant upper gastrointestinal epithelium. *Genes Chromosomes Cancer*, 2009; 48: 261–271

[37] Samali A., Zhivotovsky B., Jones D., Nagata S., Orrenius S.: Apoptosis: Cell death defined by caspase activation. *Cell Death Differ.*, 1999; 6: 495–496

[38] Sborgi L., Rühl S., Mulvihill E., Pipercevic J., Heilig R., Stahlberg H., Farady C.J., Müller D.J., Broz P., Hiller S.: GSDMD membrane pore formation constitutes the mechanism of pyroptotic cell death. *EMBO J.*, 2016; 35: 1766–1778

[39] Shi J., Zhao Y., Wang K., Shi X., Wang Y., Huang H., Zhuang Y., Cai T., Wang F., Shao F.: Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature*, 2015; 526: 660–665

[40] Song N., Li T.: Regulation of NLRP3 inflammasome by phosphorylation. *Front. Immunol.*, 2018; 9: 2305

[41] Tamura M., Tanaka S., Fujii T., Aoki A., Komiyama H., Ezawa K., Sumiyama K., Sagai T., Shiroishi T.: 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: 618–629

[42] Tixeira R., Shi B., Parkes M.A., Hodge A.L., Caruso S., Hulett M.D., Baxter A.A., Phan T.K., Poon I.K.: Gasdermin E does not limit apoptotic cell disassembly by promoting early onset of secondary necrosis in Jurkat T cells and THP-1 monocytes. *Front. Immunol.*, 2018; 9: 2842

[43] Xia S., Ruan J., Wu H.: Monitoring gasdermin pore formation in vitro. *Methods Enzymol*, 2019; 625: 95–107

[44] Xiao J., Wang C., Yao J.C., Alippe Y., Xu C., Kress D., Civitelli R., Abu-Amer Y., Kanneganti T.D., Link D.C., Mbalaviele G.: Gasdermin D mediates the pathogenesis of neonatal-onset multisystem inflammatory disease in mice. *PLoS Biol.*, 2018; 16: e3000047

[45] Yi Y.S.: Regulatory roles of the caspase-11 non-canonical inflammasome in inflammatory diseases. *Immune Netw.* 2018; 18: e41

[46] Yu J., Kang M.J., Kim B.J., Kwon J.W., Song Y.H., Choi W.A., Shin Y.J., Hong S.J.: Polymorphisms in GSDMA and GSDMB are associated with asthma susceptibility, atopy and BHR. *Pediatr. Pulmonol.*, 2011; 46: 701–708

[47] Yuan Y.Y., Xie K.X., Wang S.L., Yuan L.W.: Inflammatory caspase-related pyroptosis: Mechanism, regulation and therapeutic potential for inflammatory bowel disease. *Gastroenterol. Rep.*, 2018; 6: 167–176

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.