



炎性小体中ASC斑点形成机理及调控机制

方仁东^{1#}, 巫芮^{1#}, 申艳娜^{2*}

¹ 西南大学动物科技学院, 重庆 400715

² 天津医科大学医学检验学院, 天津 300203

摘要: 在一系列微生物感染及内外源性刺激物的作用下, 细胞质中多种蛋白复合物组装成炎性小体, 其主要功能是活化半胱天冬酶-1, 引起一系列促炎细胞因子的分泌和半胱天冬酶-1依赖性的细胞死亡。凋亡相关斑点样蛋白(ASC)是炎性小体中连接胞浆内受体和半胱天冬酶-1的接头蛋白, 在炎性小体活化中ASC聚集成大分子的二聚体, 被称为ASC斑点(ASC-speck)。ASC斑点的形成对半胱天冬酶-1的活化至关重要, 调控ASC斑点的形成是炎性小体相关疾病的治疗和预防的新途径。本文从ASC斑点形成的分子机理, 以及磷酸化、泛素化和去泛素化、离子通道等方面, 对近年来ASC斑点的调控机制相关的研究进展进行综合评述, 总结了ASC斑点的形成机理及主要调控机制, 最后结合作者相关研究成果和观点对该领域的研究前景进行了展望。

关键词: 炎性小体, ASC斑点, 半胱天冬酶-1, 半胱天冬酶募集结构域

天然免疫系统通过模式识别受体(PRRs)识别病原体相关分子模式(PAMPs), 是机体对抗微生物病原的第一道防线。目前发现的PRRs有5大家族, 包括 Toll样受体(Toll-like receptors, TLRs)、C型凝集素受体(C-type lectin receptors, CLRs)、RIG-I样受体(RIG-I like receptors, RLRs)、NOD样受体(NOD-like receptors, NLRs)和AIM2样受体(AIM2-like receptors, ALRs)家族, 不同类别的PRRs可定位于细胞膜、胞内体、内质网膜或胞质

内, 分别识别不同的PAMPs^[1]。炎性小体是细胞质中由多种蛋白组成的复合物, 包括胞浆内的PRRs、凋亡相关斑点样蛋白(Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC)和半胱天冬酶-1的前体(pro-caspase-1)。炎性小体通过PRRs识别PAMPs和损伤相关分子模式(DAMPs)并激活caspase-1, 在天然免疫中起重要作用^[2]。参与组装炎性小体的PRRs主要是NLRs家族或ALRs家族, 主要由位于N端的热蛋白结构域(PYD)或半胱

基金项目: 国家自然科学基金(31400762, 81101222); 中央高校基本科研业务费专项(XDJK2015B002, SWU114032); 重庆市科委专项(cstc2015shmszx80010); 天津市自然科学基金(15JCYBJC49700)

*通信作者。Tel/Fax: +86-22-60357712; E-mail: shenyanna@tmu.edu.cn

#共同第一作者。

收稿日期: 2015-12-11; 修回日期: 2016-01-14; 网络出版日期: 2016-03-11

天冬酶募集结构域(CARD), C端的亮氨酸重复序列(LRRs)或造血干扰素诱导核蛋白HIN-200结构域构成。此外NLRs家族还含有1个位于中心的NOD样结构域(也被称为NACHT或NBD)。PYD和CARD结构域作为效应区域, 而LRRs和HIN-200结构域则是激动剂识别区域。人类基因组分别编码22个NLRs和4个ALRs, 而鼠类基因组分别编码34个NLRs和14个ALRs^[3-4], 其中NLRP1、NLRP3、NLRC4和AIM2是4个研究的比较清楚的炎性小体受体, 另外近年来的研究表明NLRP2、NLRP6、NLRP7、NLRP12及IFI16等受体分子也参与炎性小体的形成^[5-6]。

炎性小体复合物的组装始于NLR或ALR识别特定的刺激, 受体蛋白构象变化而解除自我抑制, 发生寡聚化并招募pro-caspase-1至效应区域。具有CARD结构域的NLRs通过CARD-CARD的同源蛋白相互作用与pro-caspase-1结合, 而包含PYD结构域的NLRP3或AIM2等受体则需要借助接头蛋白来募集pro-caspase-1。ASC利用其N端的PYD和C端的CARD结构域同源蛋白相互作用来招募NLRs和pro-caspase-1, 从而组装成炎性小体。炎性小体活化中ASC聚集成大分子的二聚体, 被称为ASC斑点(ASC-speck)。ASC斑点是procaspase-1活化为caspase-1的平台。活化的caspase-1切割和加工IL-1 β 和IL-18的前体, 使其变成具有生物活性的成熟体并分泌至细胞外, caspase-1还可以诱导细胞焦亡(Pyroptosis)^[7-8]。ASC斑点在炎性小体和caspase-1活化中起重要作用, 成为近年来炎性小体研究的热点。本文将结合作者的相关研究成果对ASC斑点的形成机理及调控机制的最新研究进展进行综合评述。

1 ASC斑点的形成机理

1999年, Masumoto等^[9]在白血病细胞中发现ASC分子, 其分子量大小为22 kDa。在多种巨噬细胞中, ASC均有较高水平的组成性表达。在未

受刺激的细胞中, ASC作为可溶蛋白存在于细胞质和细胞核中^[10]。细胞凋亡时, ASC在胞质中聚集成中空的斑点状, 故称为凋亡相关斑点样蛋白。随后研究表明ASC蛋白是炎性小体的重要接头蛋白, 一方面募集pro-caspase-1到炎性小体复合物中, 另一方面ASC聚集形成caspase-1活化平台——ASC斑点^[11]。炎性小体活化时, 几乎所有的ASC分子都聚集到一起形成这一胞质超分子聚合物, 此过程受严格调控且聚集十分迅速, 多数情况下1个细胞只能形成1个ASC斑点^[12]。最新的研究利用单细胞内聚合物三维成像技术发现caspase-1形成二聚体包裹在球形的ASC斑点外周^[13]。关于ASC斑点募集pro-caspase-1并诱导其自我水解活化的过程已经研究比较清楚, 但炎性小体活化时ASC斑点形成的具体机理尚不明确。一个可能的解释是由寡聚化的NLRs或是PYHIN受体的效应区域募集ASC, 引起ASC分子间紧密接触, 从而诱发最初的ASC聚集, 以此为核心形成ASC斑点。我们结合最新的ASC斑点相关研究成果对ASC斑点形成机理进行评述。

ASC斑点是ASC二聚体的一种寡聚物, ASC可能通过CARD-CARD或者PYD-PYD同源蛋白相互作用结合。当在COS-7细胞中过表达时, 缺失PYD或是CARD结构域的ASC突变体聚集形成丝状体样聚合物, 提示PYD和CARD结构域都参与ASC斑点形成。PYD结构域内的1个点突变(K26A)可以阻止ASC斑点的形成, 证实PYD结构域在ASC斑点形成过程中具有重要作用。ASC的PYD结构域具有带正电荷和负电荷的曲面, 2个结合位点分别位于PYD结构域的两端, 这对与其他PYD分子的结合和相互作用非常重要^[14]。然而, 另一项研究表明CARD结构域是ASC斑点形成的关键区域, 因为过表达的ASC的CARD结构域可以在caspase-1的CARD结构域的参与下形成ASC斑点样聚合物, 并且研究者也证实了ASC的CARD结构域上斑点形成必需的氨基酸残基(尤其

是Glu¹³⁰, Asp¹³⁴和Glu¹⁴⁴)^[15-16]。我们的研究也发现CARD结构域上Tyr144的磷酸化对ASC斑点形成起关键作用^[17]。因此, ASC分子中PYD和CARD 2个结构域在斑点形成过程中均有可能发挥着重要作用。

最新研究表明NLRP3和AIM2可诱导ASC像朊病毒方式的聚合^[18-19]。Cai等研究者利用基因和生物化学的方法发现NLRP3和AIM2的激活剂可以使ASC在酵母菌中形成朊蛋白, 进一步研究表明含有PYD结构域的ASC重组体可以形成朊蛋白样纤维聚合, 将非活化的ASC转变成为活化的朊蛋白, 这对下游的免疫、炎症信号通路非常关键。NLRP3和AIM2炎性小体的过表达情况下三维成像可显示丝状结构, 但是这些丝状结构如何组装成1个大的斑点尚不明了。有些病原菌, 如鼠伤寒沙门氏菌(*S. Typhimurium*), 可以活化多个NLR受体, 但是每个细胞里面也只有1个斑点, 呈现多层的指环状结构。在沙门氏菌感染的巨噬细胞中, 外层是ASC聚集的斑点, 内层是NLRC4和NLRP3, 中心是活化的caspase-1^[20]。

采用核磁共振方法研究PYD的三维结构, 发现ASC斑点不是ASC分子的无序聚集, 而是一个非常有序的手脚架样结构。ASC斑点形成至少包括2个不同层面的压缩聚集: 首先是PYD-PYD和CARD-CARD结构域之间的特异性的同源相互作用; 而随后的聚集压缩可以被L25A的突变所抑制。PYD结构域有6个独立的螺旋束状结构, 接头允许2个结构背向, 这有助于其与多个结构相互作用, 特异性同源作用就是依靠PYD上的异种电荷间的背向背的聚合作用, 其可能的压缩组装机制作用模式有: 一是螺旋H1和H4在一个表面, 螺旋H2和H3在另一个表面相互作用。二是螺旋H4和H4、H5环在一个表面, 而H5、H6环在另一个表面。另外, 还有可能是螺旋H3在一个表面, 而H1、H2、H3、H4环在另一个表面相互作用^[21-22]。

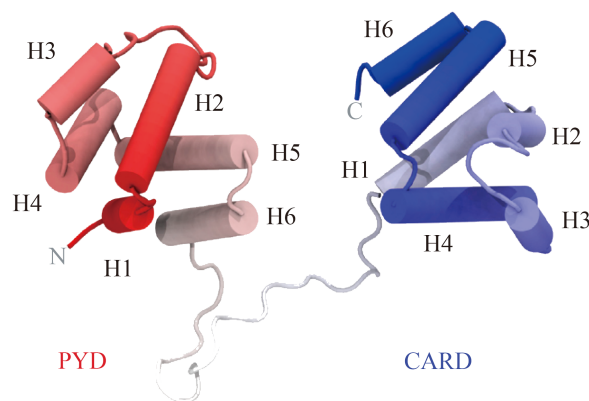


图 1. ASC蛋白结构图^[22]

Figure 1. The structure of ASC^[22].

ASC斑点形成的另一个有趣问题是ASC分子在细胞内是如何运动并聚集形成斑点的? 有研究表明微管有可能参与ASC斑点的形成, ASC沿着微管运输到达ASC斑点形成的位置^[23]。末端绑定蛋白(end-binding protein 1, EB1)是1种参与微管稳定和伸长的微管追踪蛋白, EB1的表达下调可以影响ASC斑点的形成^[24], 这一研究支持了微管在ASC斑点形成中的作用。但是另一研究发现游离的ASC分子通过自由扩散到达ASC斑点形成区域, 而不是通过主动运输^[12]。鉴于这些研究使用的是Hela、COS-7等细胞系, 在巨噬细胞等免疫细胞中炎性小体活化后内源性ASC是否通过被动扩散或是主动运输, 或是其他机制到达ASC斑点形成位置尚不清楚。

2 ASC斑点的调控机制

在炎性小体激活过程中, ASC从核内转移至胞浆形成ASC斑点并最终形成炎性小体聚合物。近年来, 对ASC斑点的调控机制研究有了较大进展。Syk和JNK介导的ASC的磷酸化, 如分子开关一般控制ASC分子沿微管移动至斑点形成的位置。泛素化系统是另一套分子开关, 调控ASC斑点的形成和降解。ASC斑点形成是受磷酸化、泛素化和离子通道等协同调节, 由炎性小体受体、

Syk、JNK和微管等共同参与的一系列细胞内事件协作完成的。

2.1 ASC的磷酸化

多种激酶和磷酸酶控制信号蛋白的磷酸化/去磷酸化是免疫应答调控的基本机制。有研究报道了酪氨酸激酶抑制剂AG126能抑制caspase-1活化。最近一项研究表明一种酪氨酸磷酸酶抑制剂正钒酸钠(Sodium orthovanadate), 可诱导ASC斑点形成, caspase-1活化和IL-1 β 成熟, 提示酪氨酸磷酸化可能会调控ASC斑点形成或炎性小体活化^[25]。有研究表明在肿瘤坏死因子(TNF)的刺激下, ASC分子的PYD结构域会发生磷酸化。我们研究报道了在NLRP3和AIM2炎性小体活化中, ASC的磷酸化发生在Syk和JNK的下游。Syk或JNK的抑制剂可以减弱由NLRP3和AIM2激动剂诱导的IL-18分泌, caspase-1活化和ASC斑点形成, 而不影响ASC和NLRP3的相互作用。因此炎性小体活化中ASC的磷酸化需要Syk和JNK的参与, 并且小鼠ASC分子CARD结构域上的Tyr144被证实为斑点形成的一个重要的磷酸化位点。总而言之, 在Syk和JNK的下游, ASC分子(Tyr144)的磷酸化在调节ASC斑点形成和炎性小体介导的免疫应答中具有重要作用^[17], 但是ASC磷酸化和ASC斑点形成的分子机制尚不清楚。在HEK293细胞转染系统中, Syk和JNK的过表达可以引起ASC的磷酸化, 但却几乎不引起ASC斑点形成, 这表明Syk和JNK下游ASC的磷酸化不足以引起ASC斑点形成。尽管Y144F突变会极大影响ASC斑点形成, 但是这个ASC突变体仍然能够二聚化/寡聚化。并且在巨噬细胞炎性小体活化过程中, ASC与位于细胞核或其周围的磷酸化的JNK结合在一起。因此, 我们可以推测依赖于Syk和JNK的ASC的磷酸化是空间调控ASC斑点的形成, 磷酸化并不诱导ASC的二聚化或寡聚化。ASC聚集可能是被一种未知的胞浆内的因子抑制, 而ASC的磷酸化可以

解除这种抑制作用。ASC磷酸化机制和它在ASC斑点形成的作用仍需进一步研究, ASC的磷酸化作为控制炎性小体活性的一个靶标, 有非常重要的潜在应用价值。

2.2 ASC的泛素化与去泛素化

泛素化作为一种蛋白翻译后的修饰, 在维持细胞稳态中起重要作用。泛素化的类型包括K-63、K-48、M1连接的多聚泛素化和单泛素化。不同的泛素修饰对底物蛋白的作用不同, 包括活化、失活和降解等。有报道表明ASC斑点、AIM2和NLRP3炎性小体与自噬溶酶体结合, 被自噬降解。Lys-63(K63)连接的多聚泛素化与自噬接头蛋白p62相互作用, 在选择靶蛋白自噬降解中发挥着重要作用。泛素化介导的自噬途径是负调控ASC斑点和炎性小体复合物诱导的炎症反应的一种机制^[26-27]。

Guan等^[28]研究表明K-63连接的ASC分子泛素化对RNA病毒感染中ASC斑点形成起关键作用。线粒体抗病毒信号蛋白(Mitochondrial antiviral signaling protein, MAVS)既是RIG-I与下游效应蛋白(TBK1、IKK、STING等)连接的桥梁, 也在控制炎性应答中起重要作用。研究表明MAVS通过募集E3连接酶TRAF3到ASC上, 促使ASC分子第174位赖氨酸的多聚泛素化, 诱导ASC的斑点形成。MAVS-TRAF3-ASC作为ASC斑点形成的一个信号级联反应, 是调控炎性小体活性途径的新发现。

去泛素化酶(Deubiquitinase enzymes, DUBs)可以移去蛋白上的泛素基团, 在蛋白运输、基因转录和信号通路中起调控作用。Lopez-Castejon等^[29]报道DUB的抑制剂会抑制炎性小体的活性。在鼠和人的巨噬细胞模型中, DUB抑制剂会破坏NLRP3炎性小体中ASC的寡聚化和ASC斑点形成, 从而阻断caspase-1活化以及随后的IL-1 β 的成熟与分泌。但是DUB抑制剂的调控作用发生在炎

性小体组装的上游,尚不清楚具体是影响NLRP3的寡聚化、NLRP3-ASC的相互作用还是ASC的聚集?同时也不能排除DUB抑制剂其它尚不明确的作用。Juliana等^[30]研究报道去泛素化对活化NLRP3起作用。Rodgers等^[31]报道巨噬细胞中ASC的线性泛素化对NLRP3和AIM2炎性小体的活化起作用。

总之,以上研究表明ASC在组装之前发生一系列细胞内的修饰,其中越来越多的证据表明泛素化系统对炎性小体的活性具有调控作用。K-63连接的多聚泛素化可能既能对ASC斑点形成起促进作用,又能标记ASC斑点通过自噬途径降解。泛素化系统作为分子开关调控炎症应答,是细胞体内复杂而精准的调控系统之一。

2.3 离子通道对ASC斑点的调控

2007年Fernandes-Alnemri等在一篇报道中指出细胞内K⁺水平下降会诱导ASC斑点的形成^[11]。研究中指出细胞内K⁺消耗剂可诱导ASC斑点的形成,增加细胞外K⁺浓度(30–60 mmol/L)可抑制由NLRP3激活剂脂多糖(LPS)诱导的ASC斑点形成。但是,由于K⁺外流参与了NLRP3炎性小体的活化,ASC斑点的形成也可能是由于K⁺外流介导的NLRP3炎性小体活化所引起的。另一项研究表明,由鞭毛蛋白、沙门氏菌和李斯特菌诱导的caspase-1的蛋白水解活化在高K⁺水平(20 mmol/L)培养下不受影响,且不伴随着细胞内K⁺的外流。因此尚无法明确K⁺外流直接诱导ASC斑点形成的假说。尽管可以通过细胞外高浓度K⁺(130–140 mmol/L)来抑制多种炎性小体诱导的caspase-1的活化,但是在这些试验条件下胞外高浓度K⁺可能引起的毒性作用也要考虑。纯化的ASC蛋白在体外聚集为ASC斑点可完全被生理浓度下的K⁺(125–150 mmol/L)抑制,这直接证明了ASC的自我装配能够被生理浓度的K⁺抑制。因此,可以推测ASC装配中K⁺浓度依赖性的抑制作用可能是阻止ASC斑点自发性形成的一种机制。

Compan等研究者发现ASC可以在低渗条件下不依赖NLRP3而形成斑点,但是这种斑点的形成既不能活化caspase-1,也不能导致细胞焦亡(Pyroptosis),在低渗条件下ASC的活化是受瞬时受体电位辣椒素2 (TRPV2)离子通道介导的信号调控^[32]。研究中指出ASC斑点可以有不同形式的组装,ASC受刺激后先是迅速形成一些小的斑点,最终聚集形成一个大的斑点。大斑点的形成依赖于NLRP3,并最终成为caspase-1活化的平台。低渗条件下15 min后ASC就发生寡聚化,25 min后可以检测到活化的caspase-1和成熟的IL-1 β 。因此,低渗条件下,RVD和TAK1磷酸化激活TRPV2通道,诱导ASC斑点形成。细胞膨胀,共同的信号途径主导ASC斑点形成和寡聚化与NLRP3的活化。

2.4 其他调控机制

CARD16和CARD17一直被认为是抑制caspase-1的同系物。近期Karasawa等^[33]报道CARD16的寡聚化可以作为caspase-1的激动剂。ASC的CARD结构域可以与CARD16相互作用,也可以检测到CARD16与ASC斑点的共定位。但是CARD16在ASC斑点中的作用尚不清楚。

Nuclear factor E2-related Factor-2 (Nrf2)在AIM2和NLRP3炎性小体中,可直接促进ASC斑点形成,而在NLRC4炎性小体中不起作用。ROS是Nrf2的激动剂,研究结果表明Nrf2在线粒体ROS介导的炎性小体激活中起作用^[34]。Nrf2在胞浆中ASC聚集区域,提示其对ASC斑点聚集起作用或者是对一些未知因子的转录调控。因此Nrf2可能对caspase-1的上游信号分子起作用,而不直接对caspase-1起作用。

另外,自然存在的ASC剪切变体被切去顶端后均不能够形成异常的ASC斑点。ASC异构体调节caspase-1的活化以及下游IL-1 β 的分泌能力。ASC-c在PYD结构域缺少60个氨基酸的ASC异构

体, 在巨噬细胞内异位表达时, 可抑制NLRP3炎性小体活性。因此, ASC异构体的表达可能是调控ASC介导的免疫应答的一种调控方式^[35-36]。

3 ASC 斑点及炎性小体的研究前景

炎性小体自2002年发现至今, 作为炎症和细胞死亡的重要调节因子, 其在固有免疫和免疫炎性疾病中的重要作用越来越清晰。炎性小体是一把“双刃剑”, 过度或不受调控的炎性小体的活化与一系列自身免疫性和自身炎症性疾病相关, 如荨麻疹、肠炎、白癜风、风湿性关节炎、动脉硬化、痛风、糖尿病等等^[37-38]。已有较多研究表明抑制NLRP3炎性小体的激活可以影响II型糖尿病的发展进程, 抑制IL-1信号通路能改善血糖和胰岛素的分泌。已有直接针对IL-1靶向治疗的临床试验, 采用IL-1受体拮抗剂或者IL-1 β 多克隆抗体治疗II型糖尿病^[39-40]。将来抑制IL-1上游NLRP3炎性小体的激活也可以作为II型糖尿病的治疗途径, NLRP3炎性小体中ASC斑点的调控可作为未来治疗II型糖尿病的药物靶标。另外, 在痛风的发病机制研究中发现尿酸钠晶体(MSU)通过激活炎性小体诱发炎症反应^[41]。我们的研究发现ASC斑点的形成对MSU激活炎性小体的通路起关键作用, 且Syk和JNK均参与到MSU诱导的炎症反应^[17]。调控ASC磷酸化的蛋白激酶可以作为包括痛风在内的炎性小体相关疾病治疗的药物靶标, 目前Syk和JNK的抑制剂作为临床上炎症性疾病的治疗药物研究已经进入临床试验阶段^[42-43]。

总之, 炎性小体结构和作用机制的阐明有助于与炎性小体有关的诸多疾病发病机制的理解、新型疫苗的开发以及相关免疫治疗方案的制定等等。研究调控炎性小体的活化机制, 特别是ASC斑点的调控机制可以为许多疾病的治疗提供新的靶标和思路。

参考文献

- [1] Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *International Review of Immunology*, 2011, 30(1): 16-34.
- [2] Lamkanfi M, Dixit VM. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell*, 2014, 157(5): 1013-1022.
- [3] Cridland JA, Curley EZ, Wykes MN, Schroder K, Sweet MJ, Roberts TL, Ragan MA, Kassahn KS, Stacey KJ. The mammalian PYHIN gene family: phylogeny, evolution and expression. *BMC Evolutionary Biology*, 2012, 12(1): 140.
- [4] Harton JA, Linhoff MW, Zhang JH, Ting JPY. Cutting edge: CATERPILLER: a large family of mammalian genes containing CARD, pyrin, nucleotide-binding, and leucine-rich repeat domains. *The Journal of Immunology*, 2002, 169(8): 4088-4093.
- [5] Lupfer C, Kanneganti TD. Unsolved mysteries in NLR biology. *Frontiers in Immunology*, 2013, 4: 285.
- [6] Man SM, Kanneganti TD. Regulation of inflammasome activation. *Immunological Reviews*, 2015, 265(1): 6-21.
- [7] Gross O, Thomas CJ, Guarda G, Tschopp J. The inflammasome: an integrated view. *Immunological Reviews*, 2011, 243(1): 136-151.
- [8] Tsuchiya K, Hara H. The inflammasome and its regulation. *Critical Reviews in Immunology*, 2014, 34(1): 41-80.
- [9] Masumoto J, Taniguchi S, Ayukawa K, Sarvotham H, Kishino T, Niikawa N, Hidaka E, Katsuyama T, Higuchi T, Sagara J. ASC, a novel 22-kDa protein, aggregates during apoptosis of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(48): 33835-33838.
- [10] Bryan NB, Dorfleutner A, Rojanasakul Y, Stehlik C. Activation of inflammasomes requires intracellular redistribution of the apoptotic speck-like protein containing a caspase recruitment domain. *The Journal of Immunology*, 2009, 182(5): 3173-3182.
- [11] Fernandes-Alnemri T, Wu J, Yu JW, Datta P, Miller B, Jankowski W, Rosenberg S, Zhang J, Alnemri ES. The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. *Cell Death and Differentiation*, 2007, 14(9): 1590-1604.
- [12] Cheng J, Waite AL, Tkaczyk ER, Ke K, Richards N, Hunt AJ, Gumucio DL. Kinetic properties of ASC protein aggregation in epithelial cells. *Journal of Cellular Physiology*, 2010, 222(3): 738-747.

- [13] Sanders MG, Parsons MJ, Howard AGA, Liu J, Fassio SR, Martinez JA, Bouchier-Hayes L. Single-cell imaging of inflammatory caspase dimerization reveals differential recruitment to inflammasomes. *Cell Death & Disease*, 2015, 6(7): e1813.
- [14] Taniguchi S, Sagara J. Regulatory molecules involved in inflammasome formation with special reference to a key mediator protein, ASC. *Seminars in Immunopathology*, 2007, 29(3): 231–238.
- [15] Proell M, Gerlic M, Mace PD, Reed JC, Riedl SJ. The CARD plays a critical role in ASC foci formation and inflammasome signalling. *The Biochemical Journal*, 2013, 449(3): 613–621.
- [16] Vajjhala PR, Mirams RE, Hill JM. Multiple binding sites on the pyrin domain of ASC protein allow self-association and interaction with NLRP3 protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(50): 41732–41743.
- [17] Hara H, Tsuchiya K, Kawamura I, Fang RD, Hernandez-Cuellar E, Shen YN, Mizuguchi J, Schweighoffer E, Tybulewicz V, Mitsuyama M. Phosphorylation of the adaptor ASC acts as a molecular switch that controls the formation of speck-like aggregates and inflammasome activity. *Nature Immunology*, 2013, 14(12): 1247–1255.
- [18] Cai X, Chen JQ, Xu H, Liu SQ, Jiang QX, Halfmann R, Chen ZJ. Prion-like polymerization underlies signal transduction in antiviral immune defense and inflammasome activation. *Cell*, 2014, 156(6): 1207–1222.
- [19] Lu A, Magupalli VG, Ruan J, Yin Q, Atianand MK, Vos MR, Schroder GF, Fitzgerald KA, Wu H, Egelman EH. Unified polymerization mechanism for the assembly of ASC-dependent inflammasomes. *Cell*, 2014, 156(6): 1193–1206.
- [20] Man SM, Hopkins LJ, Nugent E, Cox S, Gluck IM, Tourlomousis P, Wright JA, Cicuta P, Monie TP, Bryant CE. Inflammasome activation causes dual recruitment of NLRP4 and NLRP3 to the same macromolecular complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(20): 7403–7408.
- [21] de Alba E. Structure and interdomain dynamics of apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC). *The Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(47): 32932–32941.
- [22] Sahillioglu AC, Sumbul F, Ozoren N, Haliloglu T. Structural and dynamics aspects of ASC speck assembly. *Structure*, 2014, 22(12): 1722–1734.
- [23] Balci-Peynircioglu B, Waite AL, Schaner P, Taskiran ZE, Richards N, Orhan D, Gucer S, Ozen S, Gumucio D, Yilmaz E. Expression of ASC in renal tissues of familial mediterranean fever patients with amyloidosis: postulating a role for ASC in AA type amyloid deposition. *Experimental Biology and Medicine*, 2008, 233(11): 1324–1333.
- [24] Wang LJ, Hsu CW, Chen CC, Liang Y, Chen LC, Ojcius DM, Tsang NM, Hsueh C, Wu CC, Chang YS. Interactome-wide analysis identifies end-binding protein 1 as a crucial component for the speck-like particle formation of activated absence in melanoma 2 (AIM2) inflammasomes. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2012, 11(11): 1230–1244.
- [25] Ghonime MG, Shamaa OR, Eldomany RA, Gavrilin MA, Wewers MD. Tyrosine phosphatase inhibition induces an ASC-dependent pyroptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2012, 425(2): 384–389.
- [26] Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2011, 27(1): 107–132.
- [27] Shi CS, Shenderov K, Huang NN, Kabat J, Abu-Asab M, Fitzgerald KA, Sher A, Kehrl JH. Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 β production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. *Nature Immunology*, 2012, 13(3): 255–263.
- [28] Guan K, Wei CW, Zheng ZR, Song T, Wu FX, Zhang YH, Cao Y, Ma SL, Chen W, Xu QB, Xia WW, Gu J, He X, Zhong H. MAVS promotes inflammasome activation by targeting ASC for K63-Linked ubiquitination via the E3 ligase TRAF3. *The Journal of Immunology*, 2015, 194(10): 4880–4890.
- [29] Lopez-Castejon G, Luheshi NM, Compan V, High S, Whitehead RC, Flitsch S, Kirov A, Prudovsky I, Swanton E, Brough D. Deubiquitinases regulate the activity of caspase-1 and interleukin-1 β secretion via assembly of the inflammasome. *The Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(4): 2721–2733.
- [30] Juliana C, Fernandes-Alnemri T, Kang S, Farias A, Qin F, Alnemri ES. Non-transcriptional priming and deubiquitination regulate NLRP3 inflammasome activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(43): 36617–36622.
- [31] Rodgers MA, Bowman JW, Fujita H, Orazio N, Shi MD, Liang QM, Amatya R, Kelly TJ, Iwai K, Ting J, Jung JU. The linear

- ubiquitin assembly complex (LUBAC) is essential for NLRP3 inflammasome activation. *The Journal of Experimental Medicine*, 2014, 211(7): 1333–1347.
- [32] Compan V, Martín-Sánchez F, Baroja-Mazo A, López-Castejón G, Gomez AI, Verkhatsky A, Brough D, Pelegrín P. Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD forms specks but does not activate caspase-1 in the absence of NLRP3 during macrophage swelling. *The Journal of Immunology*, 2015, 194(3): 1261–1273.
- [33] Karasawa T, Kawashima A, Usui F, Kimura H, Shirasuna K, Inoue Y, Komada T, Kobayashi M, Mizushima Y, Sagara J, Takahashi M. Oligomerized CARD16 promotes caspase-1 assembly and IL-1 β processing. *FEBS Open Bio*, 2015, 5(1): 348–356.
- [34] Zhao CC, Gillette DD, Li XH, Zhang ZB, Wen HT. Nuclear factor E2-related factor-2 (Nrf2) is required for NLRP3 and AIM2 inflammasome activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(24): 17020–17029.
- [35] Bryan NB, Dorfleutner A, Kramer SJ, Yun C, Rojanasakul Y, Stehlik C. Differential splicing of the apoptosis-associated speck like protein containing a caspase recruitment domain (ASC) regulates inflammasomes. *Journal of Inflammation*, 2010, 7(1): 23.
- [36] Matsushita K, Takeoka M, Sagara J, Itano N, Kurose Y, Nakamura A, Taniguchi S. A splice variant of ASC regulates IL-1 β release and aggregates differently from intact ASC. *Mediators of Inflammation*, 2009, 2009: 287387.
- [37] Jin Y, Mailloux CM, Gowan K, Riccardi SL, LaBerge G, Bennett DC, Fain PR, Spritz RA. *NALP1* in vitiligo-associated multiple autoimmune disease. *The New England Journal of Medicine*, 2007, 356(12): 1216–1225.
- [38] Masters SL. Specific inflammasomes in complex diseases. *Clinical Immunology*, 2013, 147(3): 223–228.
- [39] Cavelti-Weder C, Babians-Brunner A, Keller C, Stahel MA, Kurz-Levin M, Zayed H, Solinger AM, Mandrup-Poulsen T, Dinarello CA, Donath MY. Effects of gevokizumab on glycemia and inflammatory markers in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 2012, 35(8): 1654–1662.
- [40] Larsen CM, Faulenbach M, Vaag A, Ehses JA, Donath MY, Mandrup-Poulsen T. Sustained effects of interleukin-1 receptor antagonist treatment in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 2009, 32(9): 1663–1668.
- [41] Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*, 2006, 440(7081): 237–241.
- [42] Plantevin Krenitsky V, Nadolny L, Delgado M, Ayala L, Clareen SS, Hilgraf R, Albers R, Hegde S, D'Sidocky N, Sapienza J, Wright J, McCarrick M, Bahmanyar S, Chamberlain P, Delker SL, Muir J, Giegel D, Xu L, Celeridad M, Lachowitz J, Bennett B, Moghaddam M, Khatsenko O, Katz J, Fan R, Bai A, Tang Y, Shirley MA, Benish B, Bodine T, Blease K, Raymon H, Cathers BE, Satoh Y. Discovery of CC-930, an orally active anti-fibrotic JNK inhibitor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2012, 22(3): 1433–1438.
- [43] Weinblatt ME, Kavanaugh A, Genovese MC, Musser TK, Grossbard EB, Magilavy DB. An oral spleen tyrosine kinase (Syk) inhibitor for rheumatoid arthritis. *The New England Journal of Medicine*, 2010, 363(14): 1303–1312.

Advances in formation and regulation of ASC-speck in inflammasome activation - A review

Rendong Fang^{1#}, Rui Wu^{1#}, Yanna Shen^{2*}

¹ College of Animal Science and Technology, Southwest University, Chongqing 400715, China

² School of Laboratory Medicine, Tianjin Medical University, Tianjin 300203, China

Abstract: Under the effects of a series of microbial infection and endogenous or exogenous stimuli, inflammasomes are assembled as multiple protein complexes in the cytoplasm, which mainly contain pattern recognition receptors (PRRs), apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC), and pro-caspase-1. The inflammasomes are the platform for caspase-1 activation and subsequent proinflammatory cytokines secretion, and caspase-1 dependent cell death as well. As a key adaptor protein, ASC concatenates PRRs and pro-caspase-1 in the cytoplasm. During inflammasome activation, ASC molecules assemble into large molecule dimers, which is called ASC-speck. The formation of ASC-speck is critical for caspase-1 activation, and ASC-speck becomes a target for the therapy and prevention of inflammatory diseases. In this review, advances in molecular mechanism of ASC-speck formation and the regulation systems for ASC-speck are summarized from the aspects of phosphorylation, ubiquitination and iron channels etc. Finally, the research prospects in this field are discussed.

Keywords: inflammasome, ASC-speck, caspase-1, CARD

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31400762, 81101222), by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (XDJK2015B002, SWU114032), by the Chongqing Science and Technology Commission (cstc2015shmszx80010), and by the Tianjin Natural Science Foundation (15JCYBJC49700)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-22-60357712; E-mail: shenyanna@tmu.edu.cn

#These authors contributed equally to this work.

Received: 11 December 2015; Revised: 14 January 2016; Published online: 11 March 2016