

NLRP10 蛋白的结构和自组装*

冷方伟^{1, 2, 3)} 谢 灿^{3)**} 王大成^{1, 2)**}

⁽¹⁾ 中国科学院生物物理研究所, 生物大分子国家重点实验室, 北京 100101; ⁽²⁾ 中国科学院大学, 北京 100049;

⁽³⁾ 北京大学生命科学学院, 北京 100871)

摘要 NLRP10 是 NOD 样受体(NOD-like receptor, NLR)蛋白家族的特殊成员, 它具有 N 端热蛋白结构域(pyrin-like domain, PYD)和中间的核苷酸结合寡聚结构域 (nucleotide-binding and oligomerization domain, NOD), 却不具有亮氨酸富集重复结构域(leucine-rich repeat domain, LRR), 这表明 NLRP10 可能并不直接参与病原微生物的识别, 而是行使免疫调节的功能. 研究表明, NLRP10 能促进 NOD1 介导的免疫反应, 也能抑制 NLRP3 炎症小体的激活. 在参与免疫调控时, NLRP10 以聚集体的形式与接头蛋白 ASC 结合, 继而招募相应免疫信号通路中的其他成员. NLRP10 蛋白在结构方面的研究很有限, 目前仅有 PYD 结构域的相关报道. 本文在尝试纯化全长人源 NLRP10 时, 同时得到了 PYD 结构域缺失的稳定蛋白片段, 电镜结果表明存在条形和环形两种形态的聚集体. 通过序列分析和定点突变, 我们找到了潜在的蛋白质降解位点, 从而解决了纯化过程中蛋白质降解的问题, 为后期的高分辨结构测定奠定了基础.

关键词 NLRP10, PYD, 自组装, 免疫调控

学科分类号 Q5, Q6

DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0306

在机体识别入侵病原微生物相关致病因子继而启动天然免疫应答的过程中, 模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)起着至关重要的作用. 目前已发现的四大类模式识别受体分别为定位于细胞膜的 Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)和 C 型凝集素受体(C-type lectin receptors, CLRs), 以及胞质内的 RIG- I 样受体(retinoic acid-inducible gene (RIG)- I -like receptors, RLRs)和 NOD 样受体(NOD-like receptors, NLRs)^[1]. 通过同源比较, 人类基因组中至少有 22 种 R 基因同源物, 组成了人源 NLR 家族, 它们在结构域组成上非常相似^[2]. NLR 蛋白有 3 种基本的结构域, 亮氨酸重复(leucine-rich repeat, LRR)位于 NLRs 的 C 端, 主要负责探测和识别配体. NLRs 结构的中间区域为 NLR 蛋白家族各成员共有的特征性结构域, 称为 NACHT 或是核苷酸结合寡聚结构域(nucleotide-binding and oligomerization domain, NOD), NOD 结构域对于 NLR 的寡聚体化和活化非常重要. NLRs 的 N 端为效应结构域, 可以是热蛋白结构域(PYD)、半胱氨酸天冬酰胺特异蛋白酶

活化募集结构域(caspase activation and recruitment domain, CARD)或者是杆状病毒程序性细胞死亡抑制蛋白重复序列结构域(BIR). 根据 NLR 家族各蛋白不同的结构域组成, 特别是 N 端效应结构域的不同, 一般将 NLRs 分为 4 个亚家族, 分别为: NLRP, NLRP1 ~ NLRP14; NLRC/X, NLRC1 ~ NLRC5, NLRX1; C II TA; NAIP^[3]. 天然状态下的 NLR 蛋白分子处于自抑制状态, LRR 结构域通常与 NOD 结构域并排形成 U 字形构型以掩盖后者发挥作用的部位. LRR 一旦与配体结合, 处于自抑制状态的 NLR 分子就会伸展开来, 暴露 NACHT 寡聚结构域以形成聚集体, 继而募集接头蛋白以启动相应的下游信号通路. NLRs 有多种激活模式, 如 NOD1 和 NOD2 参与的 nodosome, 以

* 中国科学院先导专项资助项目(XDB08020200).

** 通讯联系人.

王大成. Tel: 010-64888547, E-mail: dcwang@ibp.ac.cn

谢 灿. Tel: 010-62756697, E-mail: canxie@pku.edu.cn

收稿日期: 2015-09-30, 接受日期: 2015-11-20

及 NLRP1、NLRP3、NLRP6 等参与的炎症小体 (inflammasome) 激活模式^[4-8]。炎症小体是由 NLR 蛋白募集凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC) 等衔接蛋白, 进而招募促炎症蛋白酶 Caspase-1 而形成的一种超大蛋白质复合物, 经炎症小体激活的 Caspase-1 能切割 IL-1 β 和 IL-18 的前体, 产生成熟的 IL-1 β 和 IL-1 以参与免疫调节。目前已经鉴定出来的炎症小体主要有 NLRP1 炎症小体、NLRP3 炎症小体、NLRP6 炎症小体、NLRC4 炎症小体以及 AIM2 (absent in melanoma 2) 炎症小体^[9]。它们都由核心的 NLRs 蛋白、起衔接作用的接头蛋白以及 Caspase 蛋白组成, 各种蛋白之间通过 CARD 和 PYD 这种同质结构域相互衔接起来。

NLRP10 是 NLR 蛋白家族的特殊成员, 在结构域组成上, 它具有 N 端 PYD 结构域和中间的 NOD 结构域, 却不具有 LRR 结构域。这种结构组成提示, NLRP10 可能并不直接参与识别病原微生物的致病因子, 而是行使免疫调控的功能。目前的研究发现, NLRP10 在 nodosome 和 inflammasome 信号通路中都起着调控作用^[9-11]。在 NOD1 信号通路中, NLRP10 能与该信号通路中的诸多成员相互作用, 以增强 NOD1 介导的免疫反应。而在 NLRP3 参与的 inflammasome 信号通路中, NLRP10 通过其 PYD 结构域与接头蛋白 ASC 相互作用, 形成多蛋白复合体 (multi-protein interaction platform) 继而与 Caspase-1 相互作用, 以在 NLRP3 inflammasome 的激活过程中起负调控作用^[12]。另有研究发现, 淀粉样蛋白能激活 NLRP3 inflammasome, 而此过程与依赖于组织蛋白酶的 NLRP10 的降解密切相关^[13]。

NLRs 的结构域都是极易引起蛋白聚集的结构域, PYD 结构域之间的同型相互作用能介导 NLRs 与 ASC 等接头蛋白相互作用。NOD 结构域是核苷酸结合寡聚结构域, 在结合核苷酸之后能形成聚集体, 是 NLRs 形成炎症小体的核心结构域。LRR 结构域之间也能在配体的介导下相互作用。在行使天然免疫功能时, NLRs 也往往以蛋白质复合物的形式参与。蛋白质高聚的问题向来是蛋白质纯化过程中令人头疼的问题, 因此 NLRs 在蛋白质的表达纯化方面存在着极大困难, 目前人们很难通过常规的纯化方案得到足量的全长蛋白质样品用于结构生物学研究。现阶段, 更多的是采用截短的方法, 分结

构域对 NLRs 的结构进行解析。本文通过大量的尝试, 得到了 NLRP10 的蛋白样品, 并结合电镜, 分析了 NLRP10 蛋白样品的状态, 为后续的结构生物学研究以及功能研究打下了良好的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

质粒扩增菌株为 TIANGEN 公司的 TOP10 感受态细胞, 蛋白表达菌株为抗噬菌体 BL21(DE3) 感受态细胞 (实验室自制)。表达载体 PHM-4 是实验室在 TAKARA 公司的 Pcold-TF 载体基础上改造而成。基因克隆所用酶均购自 NEB 公司。Ni-NTA 亲和层析柱购自 QIAGEN 公司, MBP 亲和层析柱购自 NEB 公司, Superose 6 10/300 GL(S6) 分子筛层析柱和 Resource Q, 1 ml 离子交换柱购自 GE Healthcare 公司。cock-tail 蛋白酶抑制剂购自罗氏公司。超薄铜网购自北京中镜科仪有限公司。

1.2 基因克隆与突变

将 NLRP10 全长基因克隆至 PHM-4 载体上。在后续纯化实验过程中, 另构建了 173~655 位氨基酸的截短体克隆 NLRP10(173~655), 以及 173 位氨基酸的单点突变克隆 NLRP10(G173A), 甘氨酸突变为丙氨酸, 同样克隆至 PHM-4 载体上。

1.3 蛋白质表达与纯化

克隆得到 NLRP10 的表达质粒后, 将质粒转化至大肠杆菌表达菌株 BL21(DE3)。转化平板在 37 $^{\circ}$ C 培养 14 h 后, 挑取单菌落至 30 ml LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 条件下培养 8 h 后再转接至 700 ml LB 培养基中, 继续 37 $^{\circ}$ C 培养 2~3 h 至 $A=0.6$ 。待锥形瓶和 LB 培养基预冷至 15 $^{\circ}$ C 后, 加入 IPTG 诱导表达, 继续培养 18~24 h 后收菌。在尝试了不同 IPTG 诱导浓度后, 我们最终选择 0.1 mmol/L 终浓度的 IPTG 进行诱导。收菌后, 用 Ni 结合缓冲液 (20 mmol/L Tris pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L imidazole, 10 mmol/L 2-mercaptoethanol) 充分重悬菌体, 添加适量罗氏 cock-tail 蛋白酶抑制剂后冰浴超声破菌, 待菌体裂解充分后于 16 000 r/min, 4 $^{\circ}$ C 离心 1 h, 收集上清进行亲和层析。

NLRP10 的纯化采用亲和层析、分子筛层析和离子交换层析相结合的方法进行。在 PHM-4 载体中进行表达, 使得 NLRP10 的 N 端带有 His 和 MBP 两种亲和标签, 纯化时先用 Ni 柱 (QIAGEN) 和 MBP 亲和柱 (NEB) 进行两步亲和层析, 经

HRV3C 酶切过夜后, 再反挂 Ni 柱, 收集穿透样品, 即可去掉 His 和 MBP 标签. HRV3C 是半胱氨酸蛋白酶, 识别的酶切位点为 Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln/Gly-Pro, 在 4°C 下有着很高的特异性酶切活性, 在 Gln 和 Gly 之间切开, 实验中 HRV3C 与 NLRP10 以 1:20 的摩尔比进行酶切. 浓缩上一步收集到的 Ni 柱反挂穿透样品, 过 Superose 6 10/300 GL 分子筛 (20 mmol/L Tris pH 8.5, 50 mmol/L NaCl), 目标蛋白在 10~12 ml 之间出峰, 电泳确定目的蛋白后收集样品, 用 Resource Q 进行进一步的纯化. 离子交换层析纯化时, A 液为 20 mmol/L Tris pH 8.5, 50 mmol/L NaCl, B 液为 20 mmol/L Tris pH 8.5, 1 mol/L NaCl, 用 25% B 液洗脱, 即可得到目标蛋白. 最后浓缩收集的样品, 用 Superose 6 分子筛完成最后一步的纯化 (20 mmol/L Tris pH 8.5, 50 mmol/L NaCl), 取峰尖部位的蛋白制备负染电镜样品, 分析蛋白样品的状态. NLRP10(G173A) 的纯化与 NLRP10 原始序列蛋白样品的纯化略有不同, 主要区别在于分子筛纯化时选用 Superdex 200 10/300 GL column (GE Healthcare). NLRP10(173~655) 截短体的纯化从诱导表达亲和纯化与 NLRP10 全长蛋白的纯化一致, 由于等电点的区别, 后续分子筛层析缓冲液改为 MES pH 6.5, 200 mmol/L NaCl.

1.4 电镜成像与二维分类

在最后一步分子筛纯化后, 取目标峰尖的样品用于负染电镜制样. 超薄铜网购自北京中镜科仪有限公司, 制样前铜网在 JEOL ion sputter JFC-1100 中辉光放电 2 min (0.5 kV, 2 mA). 先取 10 μ l 稀释好的蛋白样品滴到镊子固定好的铜网上, 1 min 后用滤纸吸干溶液, 用水漂洗铜网后再用醋酸铀溶液染色 1 min, 吸掉染色液后晾干铜网, 即可用于电镜观察. 成像是在 FEI Tecnai G2 20 Twin 上完成的, 数据收集使用 Eagle™ 4K CCD, 电压 120 kV, 放大倍数为 50 000 倍, 所有数据均为手动收集. 颗粒样品均为手动挑取样品颗粒时, 每张图像的欠焦值用 CTFFIND3^[44] 确定, 相位矫正使用 EMAN 中的 "applyctf". 无参照的二维分类程序使用 EMAN2 的 "e2refine2d.py".

2 结果与分析

2.1 人源 NLRP10 的纯化与 PYD 缺失片段的分析鉴定

人源 NLRP10 全长 655 位氨基酸, 预测分子质

量为 75 ku. 为了获得 NLRP10 的全长蛋白样品, 我们将 NLRP10(1~655) 克隆至 PHM-4 载体上 (图 1a), 并转化至大肠杆菌表达菌株 BL21(DE3) 中进行诱导表达. 经过 Ni 柱与 MBP 柱亲和层析, 以及 HRV3C 酶切和 Ni 亲和层析反挂, 得到了较高纯度的 NLRP10 全长蛋白样品. 在用分子筛进行进一步的纯化时, 我们最初选用了 Superdex 200 10/300 GL column (S200) (GE Healthcare). 电泳结果显示 NLRP10 全长蛋白样品在 S200 分子筛中紧临穿透峰, 无法进行有效的纯化, 于是选择了更有助于分离大分子质量蛋白质样品的 Superose 6 10/300 GL 分子筛进行纯化. 电泳结果显示, Superose 6 分子筛中, NLRP10 能与穿透峰有效分离, 但与分子伴侣的峰有一定程度的叠加 (详见附件图 S1). 经过 Resource Q 的进一步纯化, 除去了分子伴侣, 但除了全长 NLRP10 的条带之外, 还有一条 50 ku 大小的条带被共纯化出来 (图 1b). 质谱结果显示, 这条带为 NLRP10 N 端缺失的蛋白样品. 通过对 NLRP10 原始序列的仔细分析, 发现在 N 端 PYD 结构域与 NOD 结构域之间的位置有一个与 HRV3C 酶切时所识别的氨基酸序列类似的位点 (图 1d), N 端缺失片段的出现极有可能是由 HRV3C 在 172Q 和 173G 之间的不完全酶切造成的, 原始的电泳结果很好地证明了这一分析, N 端缺失的条带确实是在 HRV3C 酶切后出现的新的条带 (图 1b).

2.2 PYD 结构域缺失引起 NLRP10 自组装形式改变的电镜分析

为了分析 NLRP10 蛋白样品的状态, 我们在纯化的最后一步 Superose 6 分子筛之后, 取峰尖部位的蛋白样品制备了负染电镜样品 (图 1c). 电镜结果显示, 蛋白质样品存在条状和环状两种不同形态的颗粒 (详见附件图 S1). 在手动挑取了大量原始颗粒后, 对条形颗粒和环形颗粒分别进行了二维分类 (图 2a, b). 条形颗粒是由较小尺寸的颗粒以简单串联的方式组成, 小颗粒的数量有所变化, 这导致条形颗粒的长度也有所变化, 其中以 3 个小颗粒形成的条形颗粒数量最多. 环形颗粒则是由一些较小尺寸的颗粒盘绕而成, 环形颗粒中间部位密度较低, 但也能明显看到高亮度部位的存在, 可见环形颗粒并不是完全中空的. 条形颗粒的直径和环形颗粒的长度都在 20 nm 左右, 这也解释了两种颗粒在分子筛中无法分开的原因. 考虑到用于制样的蛋白质样品本身有 2 条带, 而电镜结果又显示存在 2 种形态迥异的颗粒, 这 2 种颗粒极有可能分别对应于

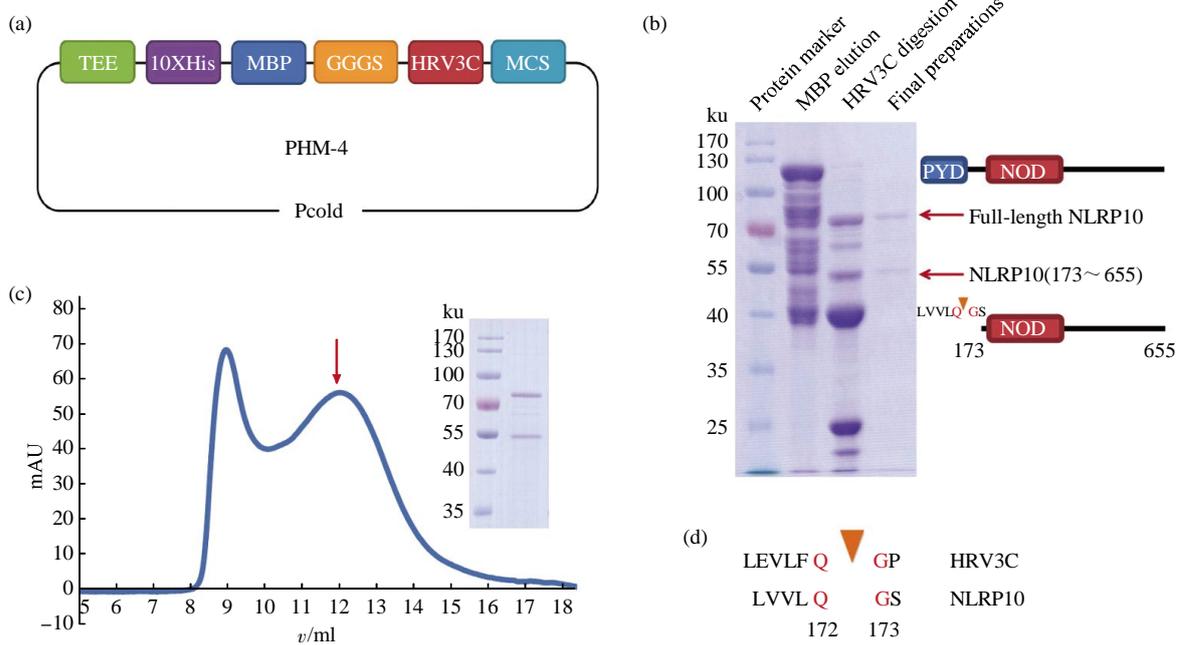


Fig. 1 Purification of full-length NLRP10

(a) Schematic of the PHM-4 vector. (b) HRV3C digestion. (c) The final NLRP10 preparations obtained after Superose 6 10/300 GL column contain full-length NLRP10 and NLRP10 without PYD domain. (d) Potential protease cleavage site exists in the original sequence of NLRP10.

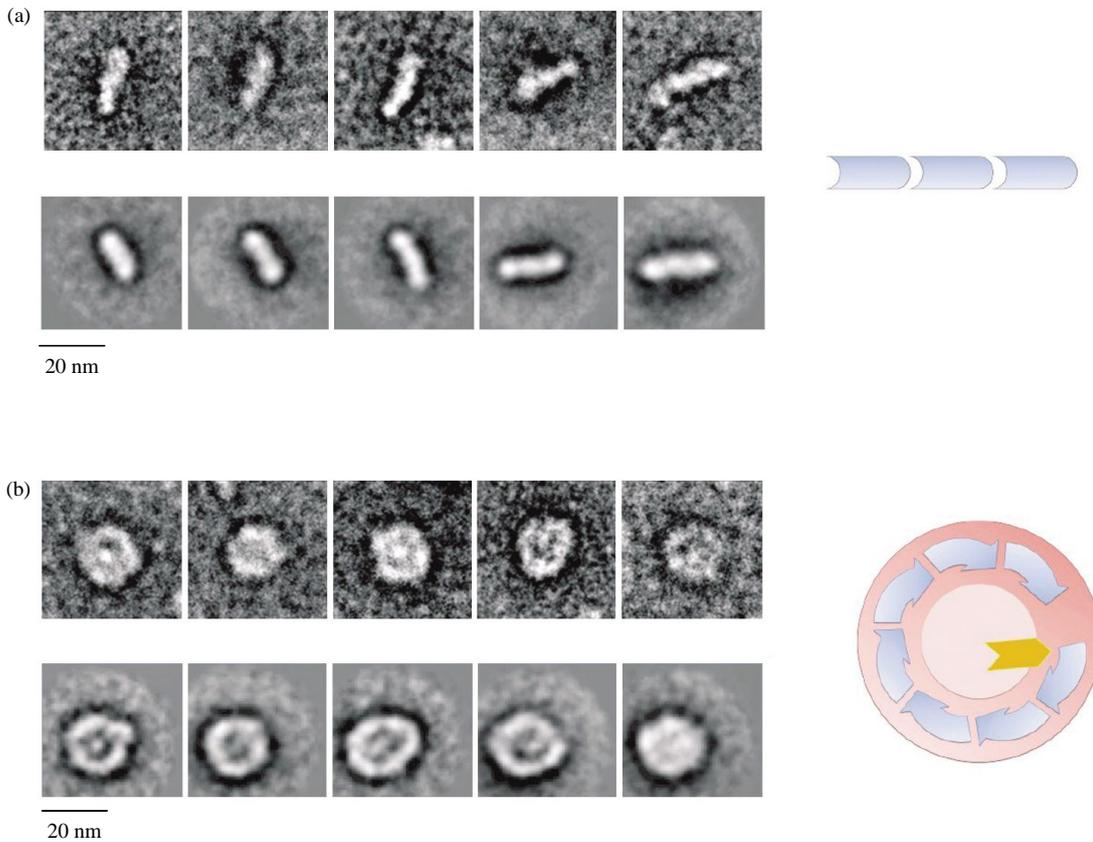


Fig. 2 Negative-EM study of NLRP10 oligomers

(a) Representative raw particles (above) and experimentally determined class averages (below) of stick shaped NLRP10 oligomers. (b) Representative raw particles (above) and experimentally determined class averages (below) of circular NLRP10 oligomers. 2D-cartoon models show the linear and circular assembly pattern of NLRP10.

全长 NLRP10 和 NLRP10(173~655). 作为 NLR 蛋白家族的成员, NLRP10 拥有 PYD 和 NOD 这两种极易导致蛋白寡聚的结构域. PYD 结构域之间的同型相互作用是接头蛋白 ASC 与 NLR 家族蛋白及其他免疫蛋白相互作用继而启动下游信号通路的关键. 而 NOD 结构域, 又称核苷酸寡聚结构域, 是形成 STAND 家族的轮状(wheel)结构^[15]及 NLR 家族的 inflammasome^[6, 16]和凋亡小体(apoptosome)^[17]等蛋白质复合物的关键, 目前的普遍观点认为先是在 NOD 结构域的参与下形成轮状结构的蛋白质复合物平台, 再募集其他蛋白质以形成相应的功能小体. 考虑到 PYD 结构域和 NOD 结构域的特性, 条形颗粒有可能是全长 NLRP10 在 PYD 结构域同型相互作用模式的介导下互相串联而形成的聚集体. 而环形颗粒则是 NLRP10 在缺失了 PYD 结构域之后, 在暴露的 NOD 结构域介导下自主装形成的聚集体.

值得注意的是, 之前有研究报道, 淀粉样蛋白

引起的 NLRP3 inflammasome 激活与组织蛋白酶降解 NLRP10 的过程密切相关^[13], 而在 NLRP10 的降解片段中, 正好有一条 50 ku 的稳定条带, 与本文中 NLRP10(173~655)的大小一致. 这提示我们发现的 NLRP10(173~655)所形成的环形结构极有可能是 NLRP10 参与免疫调节的一种功能形态.

2.3 NLRP10(G173A)的纯化及电泳分析

为了研究 N 端 PYD 结构域对 NLRP10 整体结构的影响, 我们尝试在 173 位氨基酸引入突变, 将甘氨酸突变为丙氨酸, 以期获得 NLRP10 的全长蛋白. 纯化结果显示, 突变之后的 NLRP10, 在纯化过程的后续 HRV3C 酶切之后仍为全长, 并无 PYD 缺失片段的出现(图 3b). 不过在分子筛层析时, 我们发现 NLRP10 的聚集状态有了很大的改变, 在同样用 Superose 6 10/300 GL 分子筛进行纯化时, NLRP10(G173A)的出峰位置相较于突变前的 NLRP10 样品有了很大的后移(图 3c), 这表明 NLRP10(G173A)的聚集状态与之前的样品有了很

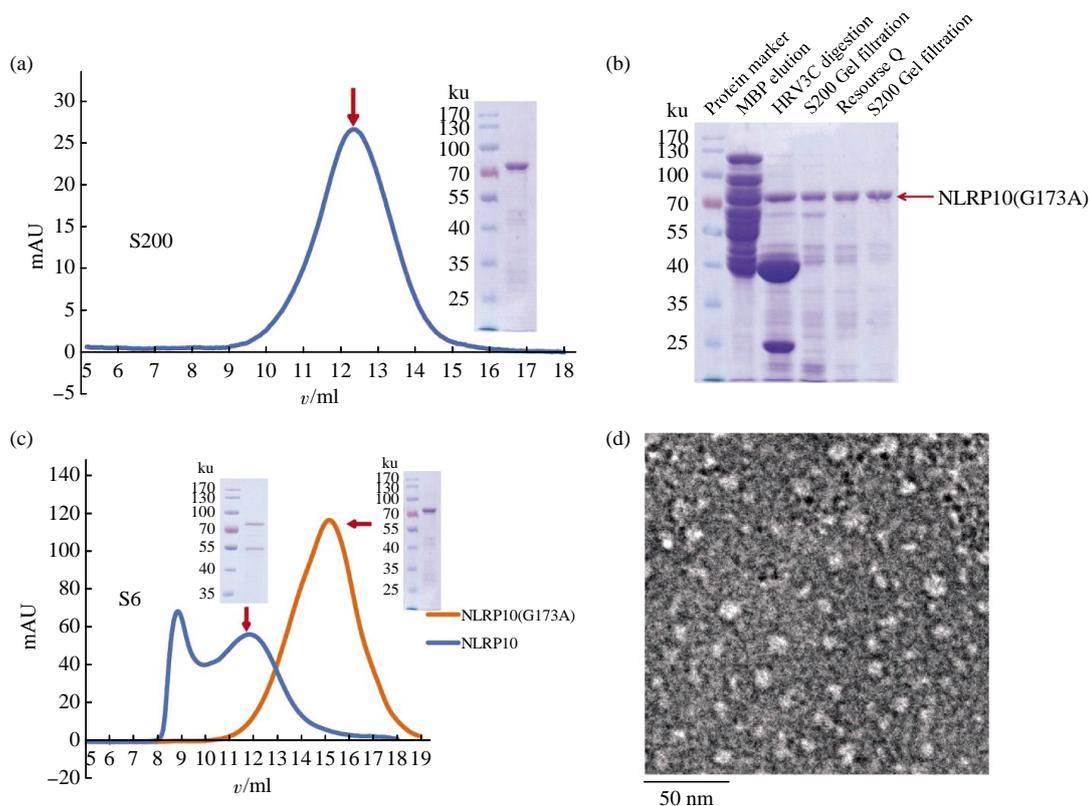


Fig. 3 Purification of NLRP10 (G173A)

(a) Elution profiles of NLRP10(G173A) in Superdex 200 size exclusion chromatography. (b) SDS-PAGE of NLRP10(G173A) purification. The fragment of NLRP10 without PYD domain no longer appeared after HRV3C digestion. (c) Elution profiles of NLRP10 preparations and NLRP10(G173A) preparations in Superose 6 size exclusion chromatography. The peak shift between NLRP10(G173A) preparations (yellow) and NLRP10 preparations (blue) indicates a hydrodynamic radius change between them, suggesting utterly different status of these two preparations. Panel insert shows the SDS-PAGE of NLRP10 and NLRP10(G173A) preparations. (d) Raw Negative-EM image of the final NLRP10(G173A) preparations obtained from Superdex 200 column.

大的变化. 在改用在 Superdex 200 10/300 GL 分子筛纯化时, NLRP10(G173A)的蛋白峰在 12 ml 左右(图 3a), 取峰尖位置蛋白样品制备负染电镜样品. 电镜结果显示, NLRP10(G173A)蛋白样品的颗粒在尺寸和形态上较为均一, 并无严重的聚集出现. 以上结果表明, PYD 结构域的缺失导致 NOD 结构域暴露, 会促进 NLRP10 的聚集.

3 讨 论

NLR 蛋白家族的很多成员都能参与识别病原微生物致病因子, 而 NLRs 往往以聚集体的形式行使功能, 因此当尝试在 *E. coli* 中进行表达纯化时, 往往会遇到高聚的问题. 当然, 这在一定程度上也与 NLR 蛋白本身的结构域组成有关, PYD/CARD、NOD 和 LRR 都是极易引起蛋白质聚集的结构域. NLRP10 不具有 LRR 结构域, 一般的观点认为 NLRP10 并不直接参与病原微生物的识别, 因此我们大胆地选择 *E. coli* 表达系统来进行表达尝试, 最终成功在 PHM-4 载体系统中摸索到了 NLRP10 的高表达条件. 在经过亲和层析、酶切、反挂等纯化流程后, 我们最初选用 Superdex 200 10/300 GL 分子筛进行进一步的纯化, 结果发现 NLRP10 的蛋白峰紧邻穿透峰出现, 明显是以高聚的形式存在. 在改用 Superose 6 10/300 GL 分子筛层析结合 Resource Q 离子交换层析之后, 成功地得到了 NLRP10 样品. 结合电镜分析, 发现 NLRP10 的聚集是有规律的自组装.

在鉴定 NLRP10 的降解位点时, 我们发现 NLRP10 被蛋白酶识别的位点在 NLR 蛋白家族中是一个较为保守的位点, 该位点是潜在的核苷酸结合位点. 在对 NLR 家族的其他蛋白进行研究时, 发现该位点的确极易被蛋白酶识别并攻击, 这其中是否存在某种特定的降解机制, 而该降解机制又是否与 NLR 家族蛋白的特定功能形式相关有待进一步研究. 值得注意的是, 之前有研究报道, 淀粉样蛋白能引起 NLRP3 inflammasome 的激活, 而该激活过程与组织蛋白酶降解 NLRP10 的过程密切相关^[3]. 根据文章提供的数据, 在 NLRP10 被组织蛋白酶降解的片段中, 正好有一条 50 ku 的稳定条带, 与本文中 NLRP10(173~655)的大小一致. 这提示我们发现的 NLRP10(173~655)的剪切形式也可能存在于体内, 极有可能是 NLRP10 参与免疫调节的一种特定功能形态.

本文中出现的条形结构也值得重视. 我们在研

究该家族其他蛋白的时候, 同样发现了类似的条形聚集体, 这提示 NLRP10 可能存在多种功能形态. 根据之前的文献报道, NLR 家族蛋白在天然免疫系统中往往拥有着多重功能, NLRP10 也是如此, 这与其聚集形式上的多样性不谋而合.

除了构建 173 位氨基酸单突变, 我们也构建了 173~655 位氨基酸的截短体克隆 NLRP10(173~655). 初期的诱导表达、亲和层析以及酶切、Ni 柱反挂等结果与全长 NLRP10 蛋白并无太大区别, 而在分子筛层析时, NLRP10(173~655)均在穿透峰中出现, 这也证明在缺少 PYD 结构域的情况下, NLRP10 确实有严重的聚集趋势.

致谢 本文电镜相关工作在北京大学电镜室完成. 感谢北京大学谢灿老师实验室管哲同学和电镜室张岩在电镜使用过程中给予的帮助. 也感谢清华大学王宏伟老师实验室刘忠民在电镜数据处理过程中给予的帮助.

附件 图 S1, 见本文网络版附录(<http://www.pibb.ac.cn>).

参 考 文 献

- [1] Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *International Reviews of Immunology*, 2011, **30**(1): 16-34
- [2] Ye Z, Ting J P. NLR, the nucleotide-binding domain leucine-rich repeat containing gene family. *Curr Opin Immunol*, 2008, **20**(1): 3-9
- [3] Williams A, Flavell R A, Eisenbarth S C. The role of NOD-like Receptors in shaping adaptive immunity. *Curr Opin Immunol*, **22**(1): 34-40
- [4] Latz E. The inflammasomes: mechanisms of activation and function. *Curr Opin Immunol*, 2010, **22**(1): 28-33
- [5] Shaw P J, Lamkanfi M, Kanneganti T D. NOD-like receptor (NLR) signaling beyond the inflammasome. *Eur J Immunol*, 2010, **40**(3): 624-627
- [6] Bryant C, Fitzgerald K A. Molecular mechanisms involved in inflammasome activation. *Trends in Cell Biology*, 2009, **19**(9): 455-464
- [7] Pedra J H, Cassel S L, Sutterwala F S. Sensing pathogens and danger signals by the inflammasome. *Curr Opin Immunol*, 2009, **21**(1): 10-16
- [8] Lamkanfi M, Dixit V M. Inflammasomes: guardians of cytosolic sanctity. *Immunol Rev*, 2009, **227**(1): 95-105
- [9] Wang Y, Hasegawa M, Imamura R, *et al.* PYNOD, a novel Apaf-1/CED4-like protein is an inhibitor of ASC and caspase-1. *International Immunology*, 2004, **16**(6): 777-786

- [10] Lautz K, Damm A, Menning M, *et al.* NLRP10 enhances Shigella-induced pro-inflammatory responses. *Cellular Microbiology*, 2012, **14**(10): 1568–1583
- [11] Imamura R, Wang Y, Kinoshita T, *et al.* Anti-inflammatory activity of PYNOD and its mechanism in humans and mice. *Journal of Immunology*, 2010, **184**(10): 5874–5884
- [12] Damm A, Lautz K, Kufer T A. Roles of NLRP10 in innate and adaptive immunity. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 2013, **15**(6–7): 516–523
- [13] Murphy N, Grehan B, Lynch M A. Glial uptake of amyloid beta induces NLRP3 inflammasome formation *via* cathepsin-dependent degradation of NLRP10. *Neuromolecular Medicine*, 2014, **16**(1): 205–215
- [14] Mindell J A, Grigorieff N. Accurate determination of local defocus and specimen tilt in electron microscopy. *J Struct Biol*, 2003, **142**(3): 334–347
- [15] Danot O, Marquet E, Vidal-Ingigliardi D, *et al.* Wheel of life, wheel of death: a mechanistic insight into signaling by STAND proteins. *Structure*, 2009, **17**(2): 172–182
- [16] Latz E. The inflammasomes: mechanisms of activation and function. *Current Opinion in Immunology*, 2010, **22**(1): 28–33
- [17] Riedl S J, Salvesen G S. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2007, **8**(5): 405–413

Structure and Self-assembly of NLRP10*

LENG Fang-Wei^{1,2,3}, XIE Can^{3**}, WANG Da-Cheng^{1,2**}

⁽¹⁾ *Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;*

⁽²⁾ *University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;*

⁽³⁾ *College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China*

Abstract NLRP10 is a special member of NOD-like receptors (NLRs) family that lacks the leucine-rich repeats, suggesting that NLRP10 may act as an immunity regulator rather than directly receptor recognizing intracellular pathogen products. Previous studies on NLRP10 show that NLRP10 can interact with several components of NOD1 pathway thereby enhancing NOD1-mediated innate immune responses. In particular models, NLRP10 also negatively affects the activation of NLRP3 inflammasome. It has been proposed that NLRP10 oligomers interact with ASC to form a multi-protein platform for the recruitment of caspase-1 or other signaling components. Here, we show that pyrin-like domain (PYD) degradation induce the formation of NLRP10 oligomers, which present stick-shaped and circular structure. With the NLRP10 mutant G173A made by means of site-directed mutagenesis, we successfully obtain homogeneous full-length NLRP10 preparations. Corresponding gel filtration analysis and electron microscope (EM) data further proved that the PYD domain is important in protecting NLRP10 against aggregation.

Key words NLRP10, PYD, self-assembly, immunity regulation

DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0306

*This work was supported by a grant from the Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences (XDB08020200).

**Corresponding author.

WANG Da-Cheng. Tel: 86-10-64888547, E-mail: dcwang@ibp.ac.cn

XIE Can. Tel: 86-10-62756697, E-mail: canxie@pku.edu.cn

Received: September 30, 2015 Accepted: November 20, 2015

附 录

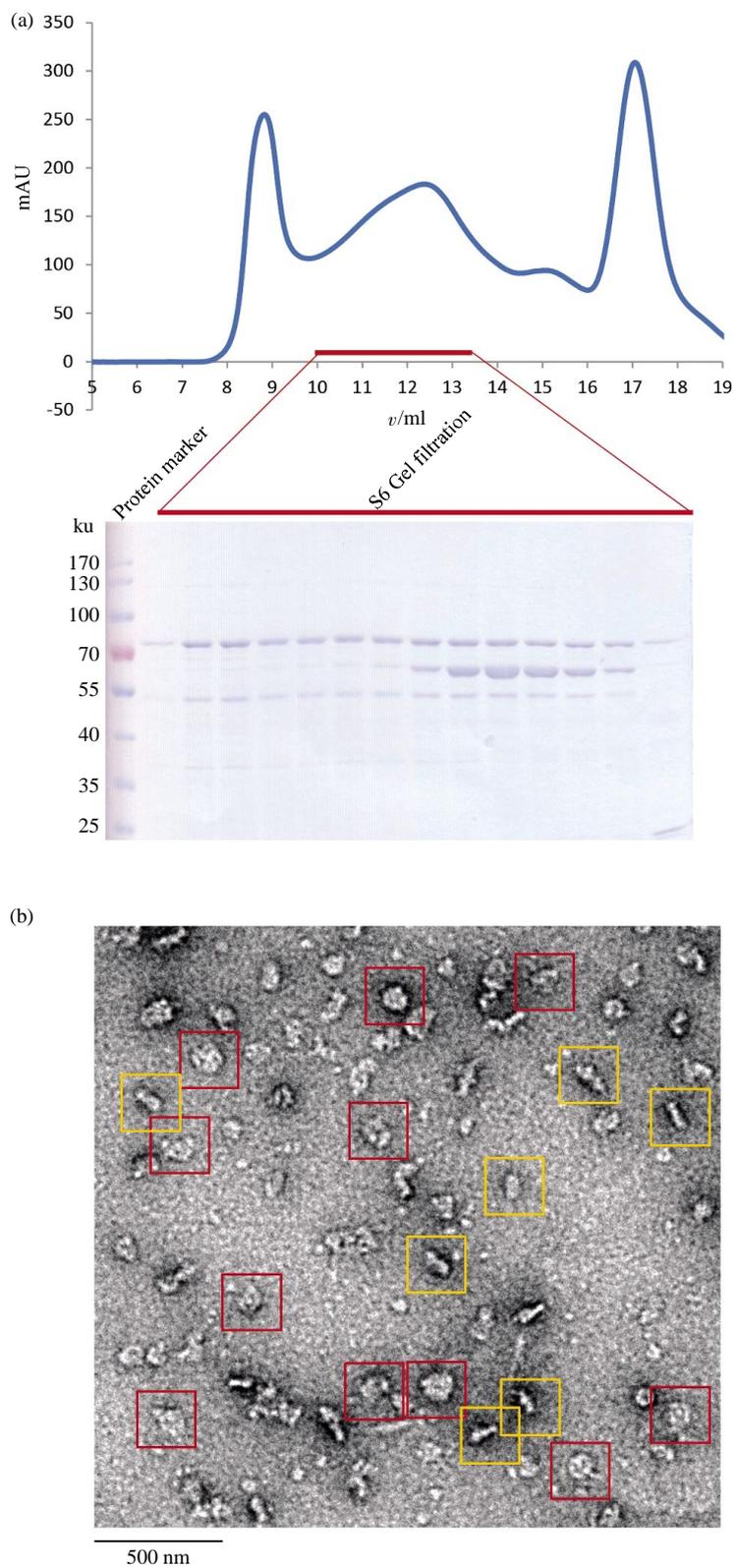


Fig. S1 Purification of NLRP10 and negative-EM study of NLRP10 preparations

(a) Purification of NLRP10 by Superose 6 10/300 GL column. (b) Raw Negative-EM image of NLRP10 preparations. Stick-shaped particles and circular particles were marked by yellow box and red box respectively.