

综述

RIP3及其生物学功能研究进展

尚 蕾[#] 熊 鲲[#] 王 慧 黄菊芳^{*}

(中南大学湘雅医学院人体解剖与神经生物学系, 长沙 410013)

摘要 受体相互作用蛋白3(receptor-interacting protein 3, RIP3)是RIP家族成员之一, 具有特异的丝氨酸/苏氨酸激酶活性。其独特的C端结构不具有介导死亡所需要的蛋白结构域却能够感受细胞内环境的变化从而调控细胞的死亡; 它具有RIP同型结构域(RIP homotypic interaction motif, RHIM), 能与RIP1结合并发生磷酸化从而调控核因子- κ B (nuclear factor-kappa B, NF- κ B)的活性变化, 这与细胞的存活密切相关。本文对RIP3的结构特性、它与其他信号分子的相互作用、其所具有的生物学功能等方面的研究情况作一综述。

关键词 RIP3; 细胞死亡; 核因子- κ B; 肿瘤坏死因子- α

1 RIP蛋白家族

受体相互作用蛋白家族(receptor-interacting protein family, RIPs)是一类具有特异的丝氨酸(serine)/苏氨酸(threonine)激酶活性的蛋白, 其在结构上都具有一段保守的激酶结构域, 因此, 该蛋白家族成员具有一些共同的生物学功能, 在细胞受到外界环境的胁迫时, 如病原体感染、炎症反应, 它们被上游信号激活, 将引发一系列下游的级联反应。有的成员能介导激活转录因子; 而有些成员被激活后则协助死亡信号的转导从而促进细胞死亡。因此, RIP蛋白家族是一类重要的调节细胞死亡或存活的信号分子。目前, RIP家族了解得较多的主要是RIP1、RIP2^[1]、RIP3^[2,3]和RIP4^[4], 近年来研究人员发现了RIP5^[5]、RIP6和RIP7。RIP6与RIP7由于富含亮氨酸重复序列(leucine-rich repeat, LRR), 因此又称LRRK1和LRRK2^[6]。RIP1的C末端是一段死亡结构域(death domain, DD)序列, 而RIP2是天冬氨酸特异性的半胱氨酸蛋白水解酶募集域(caspase recruitment domain, CARD)元件, RIP4和RIP5均为11个重复的锚蛋白(ankyrin repeats, ANK)。与家族中其他成员不同, RIP6和RIP7则含有一些特殊的蛋白序列元件, 如: LRR序列、Roc/COR结构域(Ras of complex protein, Roc; C-terminal of Roc, COR)以及WD40重复序列(图1)。有研究者^[7]称, RIP7的这些特殊的结构可能与老年性痴呆等一系列的神经退行性疾病有关。更为特殊的是, RIP3具有一个非常独特的

C末端, 其不存在某种特定结构, 如死亡结构域, 却能够介导细胞的死亡和存活^[8]。

RIP3和RIP1在N、C末端之间都拥有一个RIP同源结构域, 这使得二者可以相互作用。正是由于RIP3在这些方面的特殊性, 使得它的功能有别于其他家族成员。因此, 越来越多的学者开始关注RIP3及其可能发挥的生物学效用。

2 RIP3的分子结构和生物学功能

2.1 RIP3的亚细胞定位与分子结构

2.1.1 RIP3简介 早在1999年, Sun^[8]和Yu等^[9]发现RIP3(receptor-interacting protein 3)是属于RIP家族的新成员, 因其N端含有一段激酶结构域, 又称之为RIPK-3^[10]。它拥有一段家族成员中所共有的高度同源的激酶结构域, 却有着和其他家族成员截然不同的C末端, 它的C端不存在死亡结构域(图1)。RIP3拥有丝氨酸(serine)/苏氨酸(threonine)激酶活性, 能够感受细胞内环境变化, 进而调控细胞的死亡和存活^[11]。它广泛表达于胚胎和大量成熟组织中^[12], 已报道表

收稿日期: 2010-10-26 接受日期: 2010-11-30

国家自然科学基金(No.81070729)、中南大学研究生学位论文创新基金(No.2010ssxt258)和高等学校博士学科点专项科研基金(No.20100162110067)资助项目

[#]共同第一作者。

^{*}通讯作者。Tel: 0731-88830001, Fax: 0731-88879841, E-mail: huangjufang@mail.csu.edu.cn

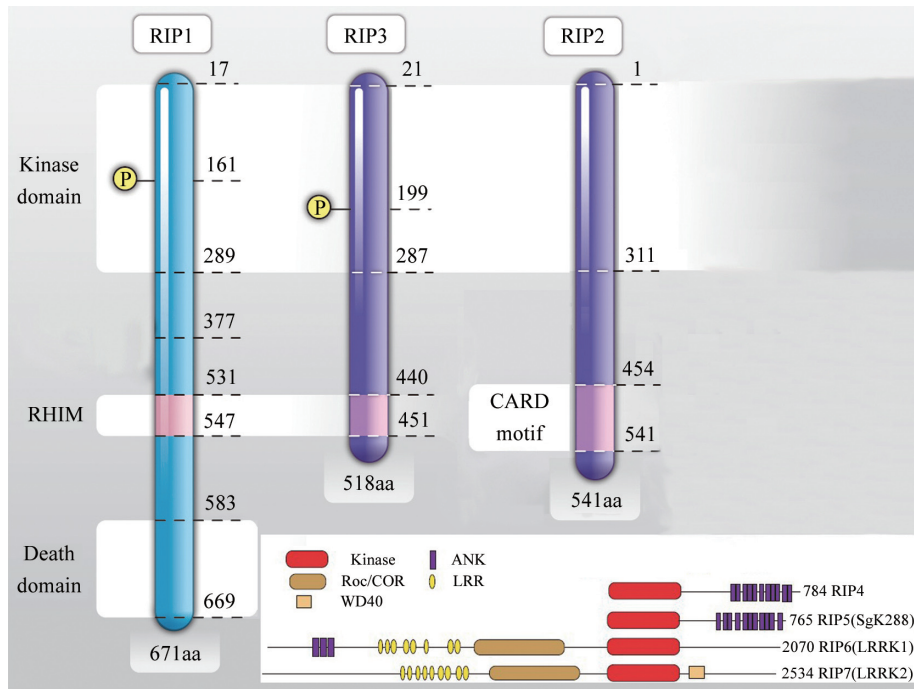


图1 RIP蛋白激酶家族成员(据参考文献^[11,13]修改)

Fig.1 The members of RIP kinase family(modified from references^[11,13])

达RIP3的组织有: 肝、肾、脑、肺、心脏、睾丸、脾、前列腺、淋巴细胞、胎盘、胰腺、骨骼肌、结肠。在染色体上的研究显示, 其定位于人类染色体14q11.2, 小鼠染色体14B1。Jeong等^[14]发现RIP3拥有一个 α 螺旋结构且存在温度依赖型的构象变化。

2.1.2 亚细胞定位——核质穿梭蛋白 尽管人们弄明白了RIP3在哪些组织中表达, 但关于其在哪些细胞器中存在至今尚无定论。有研究者^[2]称RIP3定位于线粒体。外源表达的RIP3或RIP1, 在细胞内以点状形式分布于线粒体, 因此二者很有可能在线粒体处发生相互作用。利用 caspase抑制剂z-VAD-Fmk和特异性抑制caspase-3、-6、-7、-8、-10的抑制剂z-DEVD来处理细胞, 发现RIP3作用于线粒体上游以激活caspase, 并且认为可能RIP1或RIP3与I型肿瘤坏死因子受体相关的配合物分子(TNFR-1-associated adapter molecule, RAIDD)类似蛋白相互作用, 在线粒体激活caspase-2, 而不是在TNFR1信号复合体中激活caspases^[15]。但是, Yang等^[16]在Hela细胞中过量表达RIP3, 发现RIP3定位于胞质, 并且可以在胞质和核之间穿梭。他们在RIP3上找到一段非经典的核定位信号(nuclear localization signal, NLS)和富含亮氨酸的核输出信号(nuclear export signal,

NES), 分别为NLS(aa 442~472)、NES1(aa 255~264)、NES2(aa 344~354)、NES3 I(aa 116~126)和NES3 II(aa 121~131)。其中NES1和NES2以染色体区域维护蛋白1(chromosome region maintenance I, CRM1)依赖的方式介导RIP3出核^[17], NES3则不需要CRM1的协助。另外, Hela细胞中外源表达的RIP3在来普霉素B(Leptomycin B, LMB)^[17,18]中通过37℃处理后, 发现其大多定位于细胞核内, 说明RIP3是一个能够自由在核质间穿梭的蛋白, 主要的核输出方式是CRM1依赖的, 即通过NES1和NES2实现^[16]。

2.1.3 RIP3剪切体——RIP3 β 和RIP3 γ 研究指出^[19], RIP3在细胞内存在两种剪切体, 即RIP3 β 和RIP3 γ , 它们来源于两种不同的剪切方式。与全长的RIP3不同, RIP3 β 和RIP3 γ 均拥有被截断的N端结构域, 且C末端更短, 因而缺乏核质穿梭以及诱导凋亡的能力^[19]。相对于正常组织, RIP3 γ 对RIP3的比例在结肠癌和肺癌细胞中明显增大^[19], 预示着失去了凋亡活性的RIP3 γ 可能与肿瘤发生有着重要关联。RIP3 β 和RIP3 γ 两者可以下调RIP3诱导的凋亡, 它们能把RIP3诱导凋亡的比例下调将近一半左右^[19]。

RIP3的亚细胞定位以及相关分子结构的分析, 使得我们对它的细节了解得越来越多, 这有助于

我们进一步将其结构与其所具有的生物学功能相互联系起来,从而更好的理解其在细胞中可能发挥的作用以及它的生物学意义。

2.1 RIP3的生物学功能

2.2.1 RIP3与caspase依赖型凋亡 过量表达的RIP3可以诱导细胞凋亡^[8,9,20],在一些细胞系中发现有过量表达的RIP3,并且能最终导致细胞的死亡,例如:Phoenix-A(293T)细胞、Hela细胞、293E肾上皮细胞(293E renal epithelial cells)和MCF-7乳腺癌细胞(breast carcinoma cells)。同时在Hela细胞中还发现caspase被激活,而RIP3可能是位于Ble-2家族成员的上游^[2],并认为caspase-2、-3、-7、-10是该途径中的成员,这一过程依赖于RIP3的C末端,而不是激酶结构域或者RIP1与其的相互作用的区域(RHIM),这也就是说过量的RIP3能够诱导caspase依赖的细胞凋亡^[2,9]。后续的研究表明^[9],在过量表达显性负突变的RIP3(突变的位点为1~436 aa)的细胞中,观察到肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor α , TNF- α)介导的caspase的活性被抑制,这预示着RIP3参与TNF- α 介导的凋亡通路。进一步研究显示^[21],在人体肝癌细胞系QGY-7703中,仅仅含有其独特的C末端(224~518 aa)截断的RIP3(truncated RIP3, tRIP3),可介导凋亡,说明其C端在介导凋亡的过程中发挥了重要作用。负显性的Fas相关的死亡结构域蛋白(dominant-negative mutant of Fas-associate with death domain protein, FADD-DN)明显阻断tRIP3介导的凋亡,负显性的RIP3(RIP3-DN)却不能阻断FADD介导的凋亡,因此推测tRIP3可能是位于肿瘤坏死因子受体1(tumor necrosis factor receptor 1, TNFR1)信号通路中FADD的上游^[21]。FADD在TNFR1凋亡通路中起着非常关键的作用,但是,它并不是TNF- α 介导的凋亡中的唯一途径^[22,23]。将显性负突变的FADD转染入过量表达RIP3的乳腺癌细胞MCF-7细胞中,发现凋亡过程并没有被抑制,而在RIP3显性负突变的细胞中, TNFR1诱导的细胞死亡在一定程度上被抑制^[8],说明RIP3可能是处于TNF-介导的死亡通路的下游的一条途径。这一现象与之前在人肝癌细胞系QGY-7703中观察到的不同,可能是由于运用的细胞系类型不同所带来的差异。

2.2.2 RIP3与程序性坏死 除了细胞凋亡这种“主动的自杀”式死亡,很早人们就已经发现细胞受到物理因素(如高温、低温、辐射、缺氧)、化学因素(如强酸、强碱、有毒物质)或生物因素(如病原体、

营养不良、细胞因子刺激)等环境因素的伤害时,细胞也会出现大量急速死亡,这种死亡的方式通常称之为坏死。研究发现当caspase被抑制或者没有充分活化时,介导凋亡的细胞因子也可以导致坏死^[24]。因此,为了区别这种受体介导的坏死和通常所提及的物理或化学因素导致的坏死,有学者又将这种细胞死亡定义为程序性坏死^[25],例如,在小鼠纤维肉瘤L929细胞中, TNF- α 导致坏死而不是凋亡^[26]。在缺乏caspase-8激活配合蛋白FADD的人类白血病Jurkat细胞系的T细胞中,活化TNF- α 的受体会导致坏死^[27]。虽然有文献报道其发生过程可能和溶酶体以及线粒体损伤有关^[28],但TNF- α 介导的细胞坏死的具体机制仍然不明。在TNF- α 诱导的程序性坏死过程中, caspase-8作用于RIP1的Asp324位点,将其剪切^[29,30],生成的C末端产物,无法激活NF- κ B,但能促进细胞凋亡^[30]。在凋亡刺激下, caspase-8也能够特异性的剪切RIP3的Asp328位点^[31],剪切之后的RIP3缺乏激酶结构域,且该凋亡过程可以被caspase的抑制剂z-VAD-Fmk阻断,说明全长的RIP3可以介导caspase依赖型和非caspase依赖型的细胞凋亡途径并激活NF- κ B,通过剪切以后的RIP3(329~518 aa)仅仅能介导caspase依赖的凋亡,但NF- κ B的活化程度却提高了,也进一步说明RIP3的激酶活性是非caspase依赖性的凋亡激活所必须的。据Zhang等^[32]报道,大量RIP3使细胞的能量代谢出现紊乱,通过上调糖原磷酸化酶(PYGL)以及谷氨酸脱氢酶(GLUD1)活性,过量产生相关底物——磷酸化葡萄糖和 α -酮戊二酸,加速线

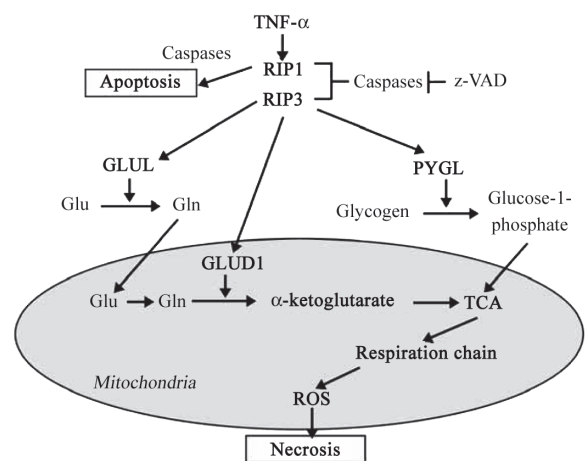


图2 RIP3引发的坏死机制图(据参考文献^[32]修改)
Fig.2 The mechanism of RIP3-induced necrosis(modified from reference^[32])

粒体内三羧酸循环,引起活性氧物质(reactive oxygen species, ROS)过量聚集,最终导致细胞出现死亡(图2)。

与此同时,其他一些研究人员对该方面的工作进行了很好的补充,并指出ROS、RIP1、RIP3是NO介导的细胞死亡所必要的^[33]。使用necrostatin-1以及RIP1和RIP3沉默的细胞可以更好地抵抗NO介导的坏死,说明细胞抵抗坏死需要RIP激酶和抗氧化物。迄今为止,很多的研究都证明RIP1和RIP3介导的细胞死亡是通过受体信号级联反应来实现的。然而,非受体依赖型程序性坏死的RIP1和RIP3介导模式是通过NO起作用的^[33]。

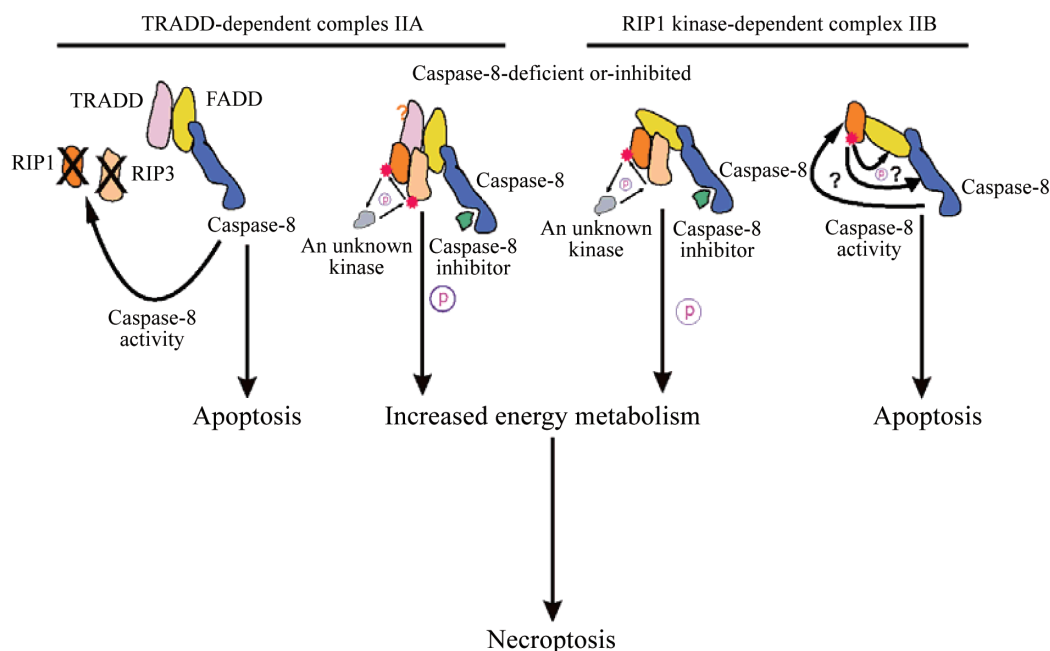
总之,RIP1和RIP3不仅仅介导TNF- α 诱导的程序性坏死,还可能参与NO介导的细胞坏死。这很好地说明了RIP3在细胞坏死中发挥的作用,并且,进一步让我们明白,RIP3介导的细胞死亡是多方面的,且有其复杂性。

2.2.3 RIP3与细胞存活 RIP3调节细胞的存活,主要是通过调节NF- κ B的活性来实现的。而RIP3在NF- κ B通路中的作用并不仅仅是负调控那么简单。现有实验结果显示,RIP3在NF- κ B激活过程中的作用是复杂而又矛盾的^[2,8,9,20]:(1) RIP3抑制NF- κ B的激活:RIP3能与RIP1相互作用并结合于TNFR1信号复合体内,RHIM和核定位信号(NLS, 442~472 aa)是二者相互作用的结构基础^[34,35]。在RIP3双突变的小鼠胸腺细胞中,由TNF- α 、TLR2和TLR4介导的NF- κ B激活没有任何下调迹象^[12],可见,NF- κ B的激活并不完全依赖于RIP3。相反,RIP3通过RHIM结合RIP1,使后者发生磷酸化,从而抑制RIP1或TNF- α 诱导的NF- κ B活化^[25]。这种抑制作用依赖于RIP3和RIP1的RHIM结构域以及RIP3的激酶活性^[36]。A20缺陷型小鼠在出生后不久就因为炎症而死亡,并且它的细胞对TNF- α 诱导的凋亡非常敏感^[37],但RIP3双突变小鼠却是健康的。这可能说明RIP3对于NF- κ B的调控,对于细胞的生存而言并不是那么重要^[12]。另外,在Trif依赖的NF- κ B信号通路中,RIP3也起了负调控作用,它同样借助RHIM与Trif竞争结合RIP1,下调Trif诱导的NF- κ B的激活^[38];(2) 过量的RIP3促进NF- κ B的激活:有报道^[8]指出在293E细胞中过量表达RIP3并不能激活NF- κ B,相对于RIP1和TNFR1提高NF- κ B报告基因的表达水平而言,RIP3对NF- κ B的作用不应被认为是正调控。也有报道^[9]指出Phoenix-A细胞中过量表达的RIP3会提高NF- κ B基因的表达

水平,并且这种情况只需要RIP3的C末端序列而不依赖RIP3的激酶活性。两者看似矛盾,却共同说明了一个问题:即过量表达RIP3会在一定程度上促进NF- κ B激活。Kasof等^[2]进一步确认了RIP3在NF- κ B激活过程中的作用,他利用在Hela细胞中过量表达的RIP1或RIP3,并用TNF- α 诱导,结果表明,过量表达RIP1后,几乎整个细胞内的NF- κ B均移位入核,过量表达RIP3则使大约50%的NF- κ B移位,而对照则仅有10% NF- κ B移位入核。说明,过量表达RIP3对NF- κ B的激活有着一定程度的增强作用,不过这种调控能力明显低于RIP1。

2.2.4 RIP3与细胞因子的相互作用 用TNF- α 处理后,细胞表达的RIP3使得细胞转向程序性坏死^[39]。Zhang等^[32]的研究发现RIP3并不在A型的NIH 3T3细胞中表达,这种A型的NIH 3T3细胞是一种在zVAD存在时可避免TNF- α 介导的凋亡的细胞;然而,在zVAD存在时,RIP3使得N型的NIH 3T3细胞中TNF- α 介导的程序性坏死增强了,此时,通过下调N型的NIH 3T3细胞中的RIP3表达量可避免程序性坏死。He等^[39]和Cho等^[40]也证明了程序性坏死的信号通路的必要条件是RIP3的激酶活性和RIP3的RHIM。这些都表明RIP3是一种可以转换程序性坏死和存活的关键分子,且它们会形成一个功能性的复合体,这一复合体与其他诱导凋亡和NF- κ B的复合体不同。接下来,He等^[39]在小鼠L929细胞、zVAD存在的巨噬细胞等细胞中对TNF- α 介导的程序性坏死进行了深入研究,发现在不表达RIP3的细胞系中,联合TNF- α 和Smac mimetic处理可导致凋亡(这种凋亡可以被zVAD抑制)且不能介导程序性坏死的转换,说明RIP3在程序性坏死的转换过程中发挥了重要作用。

尽管RIP3不是TNFR1介导的复合物I的组成物,但是,在Smac mimetic存在的情况下,它和TRADD依赖的复合物IIA或者RIP1依赖的复合物IIB存在相互联系(图3)。目前还不是特别清楚RIP3和RIP1在这些复合物中形成的是异型二聚体还是同型二聚体。RIP3在复合物IIA或者IIB中被激活并且在199号丝氨酸处发生自身磷酸化,但是,这一激活机制的发生顺序至今仍不很明朗。在体内,RIP1和RIP3的磷酸化以及它们对FADD的募集作用是相互依赖的^[40],RIP1和RIP3的相互作用可以被RIP1激酶抑制剂necrostatin-1消除,说明RIP1激酶活性对于RIP1和RIP3稳定的联系是必需的。necrostatin-1还可以消

图3 RIP3与细胞因子的相互作用(据参考文献^[13]修改)Fig.3 The interaction of RIP3 with some cytokines(modified from reference^[13])

除RIP3程序性坏死所导致的特异性磷酸化。然而,在体外, RIP1不能使RIP3发生磷酸化, RIP3却可以对RIP1进行一定程度的磷酸化。总的说来, RIP1、RIP3和未知激酶相互间的磷酸化仍然是个未知数, RIP3与一些细胞因子的相互作用如图3所示。

Cho等^[40]的后续工作表明, FADD对于RIP3的募集是必需的, RIP3在TNF- α 处理过的Jurkat细胞的活化过程中是必需的。然而, 现在还不清楚如何去解释用TNF- α 处理FADD缺陷型的Jurkat细胞后, 所表现出来的对于程序性坏死的耐受。另外, 在RIP1激酶抑制剂necrostatin-1存在的情况下, RIP1仍然会在TNF- α 处理的FADD缺陷型Jurkat细胞中发生磷酸化。这说明, RIP1和RIP3在缺少FADD的情况下可以被激活, 两者可能作为TRADD复合物IIA的组成物。接下来他们还发现在复合物IIA中的RIP1可以在凋亡过程中被剪切, 这种情况可以被zVAD所抑制。在凋亡刺激下, RIP1的剪切机制可能是用来保证蛋白处于非活化状态时, 细胞对凋亡的耐受, 从而避免RIP1介导的基因活化和程序性坏死。Cho推断, 虽然RIP1可被caspase剪切, 但这可能并不活化激酶, zVAD可能使细胞对于程序性坏死敏感化, 当存在caspase抑制剂的时候, 全长的RIP1仍然可以在复合物IIA中被检测出来, 因此这一过程是通过一些因子

来调控, 而不是通过避免RIP剪切来施行。

3 其他

3.1 程序性坏死的干预与调控

有研究者^[41]发现, 小鼠巨细胞病毒感染会导致RIP3依赖型的坏死。而RIP3激酶活性和RHIM依赖的相互作用可以控制病毒相关的坏死, 病毒介导的死亡的发生不依赖于RIP1, 因此, 它和TNF- α 依赖的程序性坏死有很大区别。在病毒感染期间, vIRA(M45病毒编码的RIP激活抑制物)与RIP3结合并破坏TNF- α 依赖的程序性坏死中的RIP3与RIP1的相互作用。因此, 它可以抑制这两种死亡途径, 更重要的是, vIRA突变的病毒在正常小鼠中的减少和在RIP3缺陷型小鼠中的减少是一致的, 因此, 寄主在抵抗病毒感染介导的坏死时vIRA发挥着非常重要的功能, 并且对于多种病毒编码的细胞死亡起到了很好的抑制作用, 它不仅会抑制凋亡而且也会抑制病毒清除的坏死机制。同时, Northington等^[42]发现单剂量的necrostatin-1可以降低脑缺血缺氧损伤后细胞的坏死, 同时推测该药物很可能是通过干扰RIP1-RIP3引发的氧化损伤和炎症反应来发挥作用的。有研究^[43]指出在成熟的T细胞中存在一种T细胞受体介导的程序性坏死, 并且在FADD缺陷型的成熟T细

胞中, 该凋亡过程显著增加, T细胞受体介导的程序性坏死似乎并没有RIP3的参与也不需要自噬体, 说明FADD可以负调控T细胞受体介导的程序性坏死, 且不需要RIP3的参与。

3.2 RIP3与其他因子的关联

Huang等^[44]在大鼠体内证明, 当升高Hcys水平时, rHCY2会显著上调, rHCY2可介导鸡胚胎细胞凋亡和胚胎畸形, 其N端和人源性的RIP3(human RIP3, hRIP3)很相似。Zhao等^[45]使用了正常的和异常的人类胎儿心脏以及培养的正常人类胎儿心肌细胞来探索其中是否存在关联, 结果表明, 先天性心血管畸形和hRIP3的过量表达是相关的。并且, 他们证明了同型半胱氨酸介导的先天性心血管畸形和过量表达的hRIP3相关。Mucha等^[46]发现RIP3位于微管中和肌动蛋白-13家族成员AtKinesin-13A相互作用, 参与微管结构的重组并且可能与Rho蛋白(Rho proteins, ROP)调控的植物顶端生长有关。

4 展望

RIP3是通过能量代谢和细胞死亡相联系的, 因此, RIP3可能在一些代谢类的疾病中发挥作用, 例如, 脑缺血和糖尿病中抑制RIP3可以降低坏死的程度, RIP3将来可能作为坏死相关疾病的药物靶点。同时, 对于一些神经退行性疾病, 如阿尔茨海默病、亨廷顿氏病, 它可能也发挥着作用。急性青光眼早期神经元也会出现死亡, 这种细胞死亡或许也有一部分是通过RIP3来介导的。这会使得某些激酶抑制剂类的药物得到发展, 从而降低神经元死亡的数量, 最大程度地减少病人视野的丢失。而且, 一些病毒的感染也会在一定程度上抑制RIP3依赖的程序性坏死, 通过深入研究这些病毒中的关键分子, 或许能开发出相关的药物来抑制细胞的坏死。在肿瘤中凋亡途径通常都是没有被激活的, 那么, 或许能够通过药物的刺激或者条件的改变来诱发肿瘤细胞通过RIP3来诱导其死亡。

参考文献(References)

- 1 Lee SH, Stehlik C, Reed JC. Cop, a caspase recruitment domain-containing protein and inhibitor of caspase-1 activation processing. *J Biol Chem* 2001; 276(37): 34495-500.
- 2 Kasof GM, Prosser JC, Liu D, Lorenzi MV, Gomes BC. The RIP-like kinase, RIP3, induces apoptosis and NF-kappaB nuclear translocation and localizes to mitochondria. *FEBS Lett* 2000; 473(3): 285-91.
- 3 Xie LN, Zhang N, Chen ML, Li QX, Zhou HM. Preparation and subcellular localization of antibody against RIP3. *细胞与分子免疫学杂志* 2006; 22(5): 660-3.
- 4 Meylan E, Martinon F, Thome M, Gschwendt M, Tschopp J. RIP4 (DIK/PKK), a novel member of the RIP kinase family, activates NF-kappa B and is processed during apoptosis. *EMBO Rep* 2002; 3(12): 1201-8.
- 5 Zha J, Zhou Q, Xu LG, Chen D, Li L, Zhai Z, *et al.* RIP5 is a RIP-homologous inducer of cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 319(2): 298-303.
- 6 Greggio E, Lewis PA, van der Brug MP, Ahmad R, Kaganovich A, Ding J, *et al.* Mutations in LRRK2/dardarin associated with Parkinson disease are more toxic than equivalent mutations in the homologous kinase LRRK1. *J Neurochem* 2007; 102(1): 93-102.
- 7 Dachsel JC, Nishioka K, Vilarino-Guell C, Lincoln SJ, Soto-Ortolaza AI, Kachergus J, *et al.* Heterodimerization of Lrrk1-Lrrk2: Implications for LRRK2-associated Parkinson disease. *Mech Ageing Dev* 2010; 131(3): 210-4.
- 8 Sun X, Lee J, Navas T, Baldwin DT, Stewart TA, Dixit VM. RIP3, a novel apoptosis-inducing kinase. *J Biol Chem* 1999; 274(24): 16871-5.
- 9 Yu PW, Huang BC, Shen M, Quast J, Chan E, Xu X, *et al.* Identification of RIP3, a RIP-like kinase that activates apoptosis and NFkappaB. *Curr Biol* 1999; 9(10): 539-42.
- 10 Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T, Kroemer G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11(10): 700-14.
- 11 Meylan E, Tschopp J. The RIP kinases: crucial integrators of cellular stress. *Trends Biochem Sci* 2005; 30(3): 151-9.
- 12 Newton K, Sun X, Dixit VM. Kinase RIP3 is dispensable for normal NF-kappa Bs, signaling by the B-cell and T-cell receptors, tumor necrosis factor receptor 1, and Toll-like receptors 2 and 4. *Mol Cell Biol* 2004; 24(4): 1464-9.
- 13 Vandenabeele P, Declercq W, Van Herreweghe F, Vanden Berghe T. The role of the kinases RIP1 and RIP3 in TNF-induced necrosis. *Sci Signal* 2010; 3(115): re4.
- 14 Jeong MS, Park JS, Jang SB. Cloning, overexpression, purification, and characterization of receptor-interacting protein 3 truncation in *Escherichia coli*. *Appl Biochem Biotechnol* 2007; 141(2-3): 175-86.
- 15 Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Brenner C, Larochette N, *et al.* Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J Exp Med* 1999; 189(2): 381-94.
- 16 Yang Y, Ma J, Chen Y, Wu M. Nucleocytoplasmic shuttling of receptor-interacting protein 3 (RIP3): identification of novel nuclear export and import signals in RIP3. *J Biol Chem* 2004; 279(37): 38820-9.
- 17 Fukuda M, Asano S, Nakamura T, Adachi M, Yoshida M, Yanagida M, *et al.* CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature* 1997; 390(6657): 239-43.

- 308-11.
- 18 Kudo N, Matsumori N, Taoka H, Fujiwara D, Schreiner EP, Wolff B, *et al.* Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(16): 9112-7.
- 19 Yang Y, Hu W, Feng S, Ma J, Wu M. RIP3 beta and RIP3 gamma, two novel splice variants of receptor-interacting protein 3 (RIP3), downregulate RIP3-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 332(1): 181-7.
- 20 Pazdernik NJ, Donner DB, Goebel MG, Harrington MA. Mouse receptor interacting protein 3 does not contain a caspase-recruiting or a death domain but induces apoptosis and activates NF-kappaB. *Mol Cell Biol* 1999; 19(10): 6500-8.
- 21 Feng S, Ma L, Yang Y, Wu M. Truncated RIP3 (tRIP3) acts upstream of FADD to induce apoptosis in the human hepatocellular carcinoma cell line QGY-7703. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 347(3): 558-65.
- 22 Yeh WC, Pompa JL, McCurrach ME, Shu HB, Elia AJ, Shahinian A, *et al.* FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. *Science* 1998; 279(5358): 1954-8.
- 23 Zhang J, Cado D, Chen A, Kabra NH, Winoto A. Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1. *Nature* 1998; 392(6673): 296-300.
- 24 Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. RIP kinases initiate programmed necrosis. *J Mol Cell Biol* 2009; 1(1): 8-10.
- 25 Van Herreweghe F, Festjens N, Declercq W, Vandenabeele P. Tumor necrosis factor-mediated cell death: to break or to burst, that's the question. *Cell Mol Life Sci* 2010; 67(10): 1567-79.
- 26 Rebsamen M, Heinz LX, Meylan E, Michallet MC, Schroder K, Hofmann K, *et al.* DAI/ZBP1 recruits RIP1 and RIP3 through RIP homotypic interaction motifs to activate NF-kappaB. *EMBO Rep* 2009; 10(8): 916-22.
- 27 Chan FK, Shisler J, Bixby JG, Felices M, Zheng L, Appel M, *et al.* A role for tumor necrosis factor receptor-2 and receptor-interacting protein in programmed necrosis and antiviral responses. *J Biol Chem* 2003; 278(51): 51613-21.
- 28 Festjens N, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1757(9-10): 1371-87.
- 29 Lin Y, Devin A, Rodriguez Y, Liu ZG. Cleavage of the death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis. *Genes Dev* 1999; 13(19): 2514-26.
- 30 Martinon F, Holler N, Richard C, Tschopp J. Activation of a pro-apoptotic amplification loop through inhibition of NF-kappaB-dependent survival signals by caspase-mediated inactivation of RIP. *FEBS Lett* 2000; 468(2-3): 134-6.
- 31 Feng S, Yang Y, Mei Y, Ma L, Zhu DE, Hoti N, *et al.* Cleavage of RIP3 inactivates its caspase-independent apoptosis pathway by removal of kinase domain. *Cell Signal* 2007; 19(10): 2056-67.
- 32 Zhang DW, Shao J, Lin J, Zhang N, Lu BJ, Lin SC, *et al.* RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science* 2009; 325(5938): 332-6.
- 33 Davis CW, Hawkins BJ, Ramasamy S, Irrinki KM, Cameron BA, Islam K, *et al.* Nitration of the mitochondrial complex I subunit NDUFB8 elicits RIP1- and RIP3-mediated necrosis. *Free Radic Biol Med* 2010; 48(2): 306-17.
- 34 Sun X, Yin J, Starovasnik MA, Fairbrother WJ, Dixit VM. Identification of a novel homotypic interaction motif required for the phosphorylation of receptor-interacting protein (RIP) by RIP3. *J Biol Chem* 2002; 277(11): 9505-11.
- 35 Li M, Feng S, Wu M. Multiple roles for nuclear localization signal (NLS, aa 442-472) of receptor interacting protein 3 (RIP3). *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 372(4): 850-5.
- 36 Makarova KS, Aravind L, Koonin EV. A novel superfamily of predicted cysteine proteases from eukaryotes, viruses and *Chlamydia pneumoniae*. *Trends Biochem Sci* 2000; 25(2): 50-2.
- 37 Lee EG, Boone DL, Chai S, Libby SL, Chien M, Lodolce JP, *et al.* Failure to regulate TNF-induced NF-kappaB and cell death responses in A20-deficient mice. *Science* 2000; 289(5488): 2350-4.
- 38 Meylan E, Burns K, Hofmann K, Blancheteau V, Martinon F, Kelliher M, *et al.* RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nat Immunol* 2004; 5(5): 503-7.
- 39 He S, Wang L, Miao L, Wang T, Du F, Zhao L, *et al.* Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha. *Cell* 2009; 137(6): 1100-11.
- 40 Cho YS, Challa S, Moquin D, Genga R, Ray TD, Guildford M, *et al.* Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell* 2009; 137(6): 1112-23.
- 41 Upton JW, Kaiser WJ, Mocarski ES. Virus inhibition of RIP3-dependent necrosis. *Cell Host Microbe* 2010; 7(4): 302-13.
- 42 Northington FJ, Chavez-Valdez R, Graham EM, Razdan S, Gauda EB, Martin LJ. Necrostatin decreases oxidative damage, inflammation, and injury after neonatal HI. *J Cereb Blood Flow Metab* 2010; 31(1): 178-89.
- 43 Osborn SL, Diehl G, Han SJ, Xue L, Kurd N, Hsieh K, *et al.* Fas-associated death domain (FADD) is a negative regulator of T-cell receptor-mediated necroptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(29): 13034-9.
- 44 Huang RF, Huang SM, Lin BS, Wei JS, Liu TZ. Homocysteine thiolactone induces apoptotic DNA damage mediated by increased intracellular hydrogen peroxide and caspase 3 activation in HL-60 cells. *Life Sci* 2001; 68(25): 2799-811.
- 45 Zhao L, Wang G, Lu D, Wu J, Song F, Dong J, *et al.* Homocysteine, hRIP3 and congenital cardiovascular malformations. *Anat Embryol (Berl)* 2006; 211(3): 203-12.
- 46 Mucha E, Hoeffle C, Huckelhoven R, Berken A. RIP3 and AtKinesin-13A - A novel interaction linking Rho proteins of plants to

Progress in RIP3 and Its Biological Function

Lei Shang[#], Kun Xiong[#], Hui Wang, Ju-Fang Huang^{*}

(Department of Anatomy and Neurobiology, Xiangya Medical School, Central South University, Changsha 410013, China)

Abstract Receptor-interacting protein 3 (RIP3), a member of the RIP kinase family, is characterized by the N-terminal Serine/Threonine kinase, RIP homotypic interaction motif (RHIM) and a unique C terminus lacks the death domain. It can promote programmed necrosis(necroptosis) in the absence of caspase activation. With the assist of RHIM, RIP3 can interact with RIP1, induce the phosphorylation of RIP1 and the activation of NF- κ B and then participate in the cell survival. In this review, the structural properties of RIP3, the other cytokines which interacted with RIP3 and the biological functions of the RIP3 were summarized.

Key words RIP3; cell death; NF- κ B; TNF- α

Received: October 26, 2010 Accepted: November 30, 2010

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.81070729), Graduate Degree Thesis Innovation Foundation of Central South University (No.2010ssxt258) and Doctoral Foundation of Ministry of Education of China (No.20100162110067)

[#]These two authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding author. Tel:86-731-88830001, Fax: 86-731-88879841, E-mail:huangjufang@mail.csu.edu.cn