

REVIEW ARTICLE

간, 췌장 질환에서 Necroptosis

윤재훈, 전대원¹, 최호순¹

한림대학교 의과대학, 한양대학교 의과대학¹ 내과학교실

Necroptosis in Liver and Pancreatic Diseases

Jai Hoon Yoon, Dae Won Jun¹ and Ho Soon Choi¹

Departments of Internal Medicine, Hallym University College of Medicine, Chuncheon, Hanyang University College of Medicine, Seoul¹, Korea

Cell death is an integral part of life of an organism that is necessary to maintain organs and tissues. Apoptosis, autophagy, and necrosis were noted as three morphologically distinct types of cell death. Apoptosis is a well identified process that is driven by programmed molecular mechanism. Until now, the investigators believed that necrosis was not a programmed molecular event. However, recently, an alternative death pathway called 'necroptosis' was delineated and proposed as a form of 'programmed necrosis'. According to the recent recommendations by the Nomenclature Committee of Cell Death, this term denotes necrotic cell death dependent on receptor-interacting protein kinase (RIPK3). Its role in a variety of diseases, such as ischemia-perfusion injury, infection, inflammatory bowel disease, pancreatitis, steatohepatitis etc., is being elucidated. Necroptosis is currently attracting the attention of the scientific community. Herein we discuss the clinical implications and the role of necroptosis in gastrointestinal tract focusing on liver and pancreatic diseases. (*Korean J Gastroenterol* 2014;64:182-188)

Key Words: Cell death; Necroptosis; Necrosis; Receptor-interacting protein kinase; Tumor necrosis factor-alpha

서 론

최근까지도 세포사멸과 세포 생존에 대한 연구는 광범위하게 이루어져 왔으나 세포가 어떤 결정적 계기를 통해 생사를 결정하는지는 확실하게 알려져 있지 않다. 역사적으로 세포사멸의 기전은 크게 조절된(regulated) 것과 조절되지 않은(unregulated) 것으로 분류할 수 있다. 세포자멸사(apoptosis)는 조절된 세포사멸의 대표적인 예이고, 괴사(necrosis)는 조절되지 않은 세포사멸의 대표적인 예이다. 이들에 관여하는 세포사멸의 과정 중 치료 목적으로 사용될 가능성이 있는 과정이나 물질들이 있다. 또한 동일한 세포사멸 유도물질에 노출되어도 물질의 농도에 따라 다양한 종류의 다른 세포사멸들이 뒤섞여 관찰된다. 조절된 세포사멸은 유전적으로 통제되는 반면 조절되지 않은 세포사멸은 세포가 과도한 스트레스를 이

겨내지 못할 때 일어난다. 여러 종류의 세포사멸 중 자멸사와 괴사는 잘 알려진 형태로 상이한 세포사멸의 유형이다. 세포자멸사, 괴사 및 자가포식(autophagy)은 주된 세포사멸의 유형으로 각각 특이적인 분자적, 생화학적, 형태학적 특징을 갖는다.

세포괴사는 세포의 사멸의 한 형태로 질환의 원인이 될 수도 있고 결과로 관찰될 수도 있다. 일련의 분자생물학 기전을 통한 프로그램화된 세포죽음의 한 형태로 세포자멸사 개념이 알려진 이후 세포괴사와 다른 형태의 세포사멸로 여러 질환에서의 병리기전 등에 대한 연구가 이루어지고 있으며,¹ 특히 암을 비롯하여 많은 질환에서 세포자멸사는 병태생리에 매우 중요한 역할을 하고 있음이 밝혀졌다. 세포자멸사는 일련의 분자생물학 기전을 통한 프로그램화된 세포죽음의 한 형태로 카스파제(caspase proteases)의 활성화에 의한 기전으로 세포

© This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

교신저자: 최호순, 133-791, 서울시 성동구 왕십리로 222, 한양대학교의료원 소화기내과

Correspondence to: Ho Soon Choi, Department of Gastroenterology, Hanyang University Medical Center, 222 Wangsimni-ro, Seongdong-gu, Seoul 133-791, Korea. Tel: +82-2-2290-8379, Fax: +82-2-2298-9183, E-mail: hschoi96@hanyang.ac.kr

Financial support: None. Conflict of interest: None.

형태의 변형을 유발하게 된다.² 이와 다르게 세포괴사의 경우 세포사멸의 일련의 과정이 프로그램화되어 있지 않다.³ 그러나, 최근 이러한 괴사성 세포사멸 중 지금까지 알려진 세포괴사가 아닌 정해진 분자생물학 기전을 통해서 ‘프로그램화된 세포괴사(programmed necrosis)’가 이루어진다는 것이 알려졌다.^{4,6} 최근 이러한 괴사성 세포 사멸의 한 종류로 프로그램화된 세포괴사를 “necroptosis”라 정의하였다(Fig. 1). Necroptosis는 괴사와 유사한 예비 세포사멸 기전으로 세포사멸사가 차단되었을 때 개시된다. 세포사멸사의 경로는 카스파제에 의존하는 반면 necroptosis의 경로는 키나아제(kinase)에 의존하므로, kinase activity containing protein의 일종인 receptor interacting protein (RIP)이 세포 스트레스를 감지하는 데 필수적이다. Necroptosis에 대한 정의는 2012년에 Galluzzi 등^{6,7}에 의해 발표된 권고에 따라 RIPK3 (receptor-interacting protein kinase 3)에 의한 괴사성 세포사멸로 기술하고자 한다(Fig. 1). Necroptosis에 대한 분자생물학 기전이 밝혀짐에 따라서 이전에는 조절할 수 없었던 세포괴사와 연관된 질환에 대한 치료접근이 가능해질 것으로 생각된다. 최근 심근경색,⁸ 뇌경색, 동맥경화, 허혈-재관류로 인한 조직 손상,⁹ 괴사성 췌장염,^{10,11} 염증성 장질환,¹² 지방간염¹³ 등 다양한 질환에서 necroptosis에 대한 이해를 바탕으로 한 병리

기전 및 치료방법에 대한 연구들이 활발히 진행되고 있다. 이 종설에서는 necroptosis에 대한 소개 및 간, 췌장질환과 관련된 연구에 대해 설명하고자 한다.

본 론

1. Necroptosis에 대한 소개

세포사멸사는 카스파제의 활성화를 일으키는 일련의 분자생물학 기전에 의한 세포죽음을 의미하고 궁극적으로는 세포 형태의 변화를 유발한다.^{2,14} 반면, necroptosis는 발견 초기 카스파제의 작용이 아닌 tumor necrotic factor (TNF)에 의해 유발되는 일종의 “caspase-independent form”의 세포 사멸로 알려졌다.^{4,6,8,14,15} Necroptosis의 개념이 알려지기 전에 TNF는 카스파제 8을 활성화시키는 단백질 상호작용을 통해 세포사멸사를 유발하는 것으로 알고 있었다.¹⁶ 이러한 necroptosis와 세포 사멸사를 유발시키는 분자생물학적인 신호 전달 소자(upstream signaling elements)는 일정부분을 공유하고 있다.^{17,18} 공유하는 신호전달 경로에 반응하는 결과에 따라 necroptosis가 유발될 수도 있고, 세포사멸사가 유도될 수도 있다. 아직 어떠한 요인에 의한 세포의 운명이 세포사멸사가 유도될 것인지 아니면 necroptosis가 발생할 것인지에

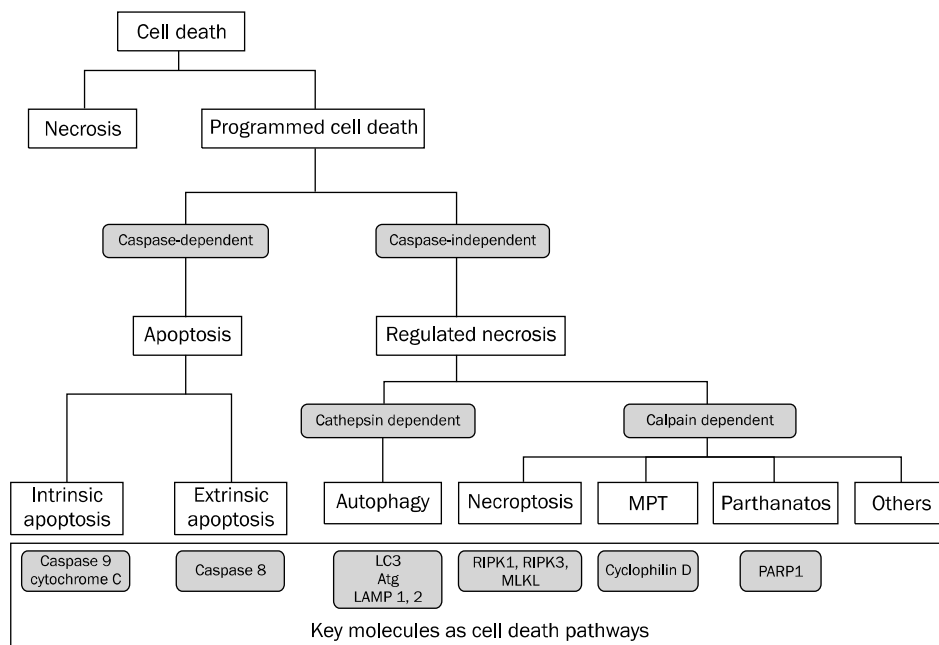


Fig. 1. Types of cell death. Programmed cell death can be divided into apoptosis and regulated necrosis. There are two subtypes of apoptosis: intrinsic apoptosis mediated by caspase 9 vs. extrinsic apoptosis mediated by caspase 8. As for regulated necrosis, there are several subtypes including necroptosis regulated by RIPK1, RIPK3 and MLKL, and MPT mediated by cyclophilin D. In addition to necroptosis and MPT, we suspect that there would be another regulated necrosis pathway.

Note: The classification shown is not a confirmative one but has been presented for descriptive purposes.

MPT, mitochondrial permeability transition; LC3, light chain 3; Atg, autophagy-related protein; LAMP, lysosomal associated membrane protein; RIPK, receptor-interacting protein kinase; MLKL, mixed lineage kinase domain-like; PARP1, poly [ADP-ribose] polymerase 1.

대한 연구는 부족하다. 다만 몇 개의 선행 연구에서 이러한 반응 정도는 FLIP (Fas-associated death domain-like interleukin-1 β -converting enzyme [FLICE]-like inhibitory proteins),^{18,19} deubiquitinase A20, cIAP1 (cellular inhibitor of apoptosis I)과 cIAP2의 세포내 억제제 등과 같은 조절인자 등에 의해 조절된다는 것이 밝혀졌다.²⁰ Necroptosis는 tumor necrosis factor receptor (TNFR) 이외에 다른 죽음수용체(death receptors; Fas, TNF-related apoptosis-inducing ligand [TRAIL] receptor)나²¹ toll-like receptors를 통해서 유발되기도 한다(Fig. 2).²² 최근에는 DAI (DNA-dependent activator of interferon regulatory factors)나 protein kinase R같은 세포내 necroptosis 유발인자가 밝혀져

있다.²³ TNF수용체에 TNF가 결합하면 RIPK1 및 NEMO (nuclear factor [NF- κ B] essential modulator)의 poly-ubiquitination을 포함하는 NF- κ B를 통한 신호전달을 유도한다(Fig. 2).²⁴ RIP1은 세포의 생사를 결정짓는 데 중요한 작용을 하는 키나아제로 생각되고 있다. RIP1에는 necroptosis에 필요한 serine/threonine kinase domain, homotypic interaction motif를 포함하는 intermediate domain, 그리고 apoptosis 활성을 위한 death domain까지 총 3개의 domain이 있다. RIP1의 ubiquitination은 세포생존을 촉진하고, deubiquitination은 반대로 세포내에서 세포사멸을 일으키게 된다.^{15,17,18,25} RIP1에는 여러 개의 domain이 존재하기에 RIP1의 활성화는 NF- κ B, mitogen-activated protein kin-

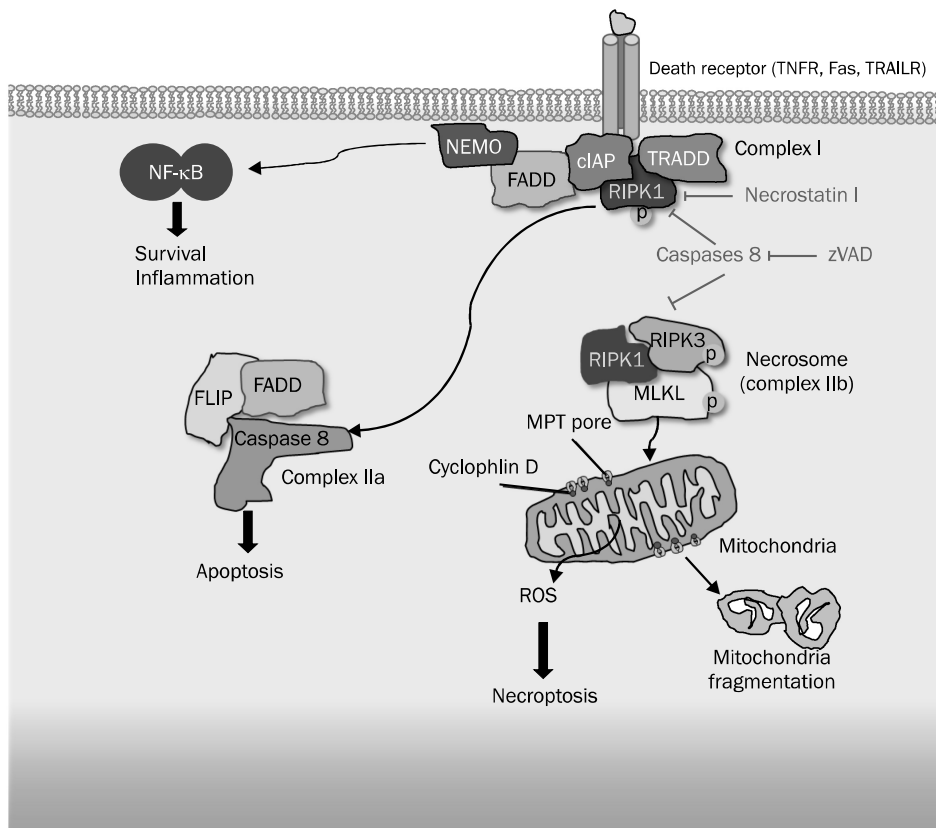


Fig. 2. Signaling pathway of apoptosis and necroptosis induced by death receptor such as TNF receptor. Stimulation of cells with TNF leads to recruitment of TRADD, FADD, and RIPK1 to TNF receptor. The different outcomes are determined by distinct TNF receptor-associated signaling complexes. FADD and caspase-8 are the essential adapter proteins involved in apoptosis. Under conditions of impaired apoptosis, TNF receptor-1 can induce necroptosis, which involves RIPK1 and RIPK3 kinases. RIPK1 and RIPK3 engage in physical and functional interactions with MLKL to form a multiprotein complex called necrosome. The necrosome stimulates regulated necrosis at the mitochondrial level by inhibiting adenine nucleotide transferase, by exacerbating glutaminolysis (not shown) and hence, inducing the overgeneration of reactive oxygen species (ROS), and by promoting mitochondrial fragmentation. Consequently, cell death is induced by necroptosis. TNFR, tumor necrosis factor (TNF) receptor; TRAILR, TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor; NF, nuclear factor; NEMO, NF- κ B essential modulator; FADD, Fas associated death domain; cIAP, cellular inhibitor of apoptosis; RIPK, receptor-interacting protein kinase; TRADD, TNF-receptor-associated death domain; zVAD fluoromethyl ketone, benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp[OMe] fluoromethyl ketone; MLKL, mixed lineage kinase domain-like; MPT, mitochondrial permeability transition; FLIP, Fas-associated death domain-like interleukin-1 β -converting enzyme [FLICE]-like inhibitory proteins.

ases (MAPK), apoptosis나 necrosis 등 다양한 결과를 초래할 수 있다. Necrostatin-1 (nec-1)은 RIP1 kinase 활성을 차단하여 death receptor에 의해 유도되는 necroptosis를 막는다. RIP3은 programmed necrosis를 조절하고, necrosome에서의 RIP1 recruitment를 늘린다. RIP1과 RIP3 키나아제 외에도 여러 다른 키나아제들이 RIP1과 RIP3의 인산화에 관여한다.

TNF가 수용체에 결합하면, adapter protein인 FADD (Fas associated death domain)와 TRADD (TNF-receptor-associated death domain)가 모이게 되고 이후 procaspase 8 (caspase의 inactive form)과 결합한다.¹⁸ 프로카스파제(Procaspase) 8이 homodimer 형태에서 활성화되어 세포자멸사를 유발하게 된다.²⁶ 이와 달리, FLIP이라 알려진 카스파제 8과 비슷한 구조를 가지나 프로테아제(protease)로 기능은 없는 단백질이 많을 경우 프로카스파제 8과 heterodimer를 형성하여 카스파제 8을 통한 세포자멸사나 RIPK3를 통한 necroptosis가 일어나지 않게 된다.^{26,27} NF- κ B의 활성화에 의해 FLIP의 발현은 증가된다. FLIP이나 카스파제 8이 없어지거나 기능을 하지 못하게 되면 RIPK1이 RIPK3와 세포내에서 결합하여 아밀로이드(amyloid)와 유사한 구조체인 necrosome을 형성하여 necroptosis를 유발하게 된다(Fig. 2).^{18,19}

활성화된 RIP3는 necroptosis에 기여하는 몇 가지의 downstream 신호들을 활성화시키는 것으로 알려져 있다. 이 중에는 necrosome의 형성, mixed-lineage kinase domain-like (MLKL)의 활성화, phosphoglycerate mutase 5 (PGAM5), 그리고 활성산소(reactive oxygen species, ROS)의 생성과 막 투과를 유도하는 dynamin-related protein (Drp1) 등이 있다.^{28,29} 미토콘드리아의 ROS의 생성은 미토콘드리아의 에너지 대사가 과사가 발생하는 데 중요하게 작용하기 때문에 necroptosis의 강력한 결정인자로 생각된다(Fig. 2). 모든 종류의 necroptosis에서 ROS의 생성이 필수적인 것은 아니지만 RIP3 인산화 활성화도는 미토콘드리아의 에너지 대사와 ROS의 과도한 생성과 관계가 있다. 따라서 미토콘드리아 막을 손상시켜 결국 세포내 ROS가 증가하므로 necroptosis가 유발된다. 또, JNK (c-Jun N-terminal kinases) 활성을 통해 RIP1/RIP3 카스파제 cascade는 미토콘드리아의 산화스트레스를 조절하는 것으로 알려졌다. RIP3 발현의 증가는 pro-inflammatory cytokine 발현의 증가 및 inflammasome 활성화 과도 관련된 것으로 생각된다. 또한 RIP3는 에너지 대사에도 관계하며, 세포자멸사와 과사 사이의 '스위치를 누르는' 역할을 할 수 있고, 최근 RIP3의 억제가 허혈-재관류 신장손상 (renal ischemic-reperfusion injury) 모델에서의 이형이식 (allograft) 후 생존율을 증가시키는 것이 보고되었다.

Oberst 등²⁷과 Dillon 등³⁰은 mouse를 이용한 동물실험에

서 FADD, FLIP, 카스파제 8을 결손시킨 모델을 통하여 RIPK3의 necroptosis 기전을 규명하였다. 조직에 따른 FADD 혹은 카스파제 8 유전자의 선택적 결손이 장기별 질환을 유발할 수도 있다.^{12,31} 따라서 FADD-caspase 8-FLIP 복합체가 RIPK3와 연관된 necroptosis를 예방하거나 유발할 수 있을 것이다. 그러나 necroptosis의 분자생물학적 신호전달 과정은 아직 명확히 알려져 있지 않다. 세포 내 면역 단백질 물질들이 사멸한 세포 내에 격리되는 세포자멸사와 달리, necroptosis는 강력한 선천적, 후천적 면역 반응 유발효과를 보인다.³² RIPK3는 RHIM (receptor-interacting protein homotypic interacting motif) domain을 가지고 있는 다른 단백질과 상호작용을 할 수 있다.¹⁸ 인간 유전체중 RHIM domain을 가지고 있는 단백질은 현재까지 RIPK1, RIPK3, DAI, TRIF (toll-interleukin-1 receptor [TIR]-domain-containing adapter-inducing interferon- β)가 알려져 있다.¹⁵ TRIF는 toll-like receptor 3과 4에 의해 necroptosis를 유발할 수 있다.³³ DAI는 세포질 내에서 바이러스를 인식 후 necroptosis를 일으키는 데 작용하는 것으로 알려져 있다.³⁴ 또한 interferon type I과 II에 의해 세포자멸사와 necroptosis가 모두 유발될 수 있고, 이를 통해 바이러스에 감염된 세포를 제거시킬 수 있다.³⁵ Enteropathogenic *Escherichia coli* 등 몇몇 바이러스 및 세균은 카스파제 8의 활성을 억제하고 necroptosis를 유발시키기도 한다.³⁶ 이와 같은 현재까지의 이해를 토대로 necroptosis는 세포내로 침입하는 바이러스 및 세균 등에 대한 방어기전으로 추정할 수도 있다. 앞서 언급한 FLIP의 세포내 발현이 감소하면 세포자멸사와 necroptosis가 유발될 수 있다.^{18,19} FLIP은 NF- κ B의 활성화에 의해 발현되고 빠른 turnover를 보이기 때문에 FLIP의 합성, 발현이 방해받거나 NF- κ B의 작용이 억제되면 세포는 세포자멸사 혹은 necroptosis를 통해 사멸할 수 있다.¹⁵ 이러한 necroptosis의 과정을 현재까지 정확하게 이해할 수는 없지만, 일부 바이러스 감염 등의 질환에서는 방어기전으로 추측할 수 있으나 다른 질환에서는 병리기전의 일부로 작용할 수도 있을 것이다.

2. 췌장 질환에서 necroptosis

Cerulein 유발 췌장염 동물실험이 소화기 관련 necroptosis 중 처음으로 발표되었다.⁴ 췌사성 췌장염은 현재까지는 수액투여, 진통제, 항생제 등을 이용한 집중치료, 일부 내시경을 이용하거나 혹은 수술로 췌사조직의 제거를 하는 치료 등으로 제한적인 치료만 가능하고 근본적으로 췌사를 막는 치료는 개발된 것이 없기 때문에, 췌사성 췌장염에서 necroptosis를 억제할 수 있는 방법이 있다면 획기적인 치료법으로 사용될 수 있을 것이다. *Ripk3*^{-/-} mice를 이용한 cerulein 유발 췌장염 동물모델 실험에서 necroptosis를 억제하여 췌사성

췌장염에서 췌장 보호효과를 명확히 관찰할 수 있었다.^{4,37} 그러나, nec-1 (RIPK1 inhibitor)의 투여는 췌장염 발생을 억제하지 못했고, 반면에 췌장조직 손상 및 혈청 리파아제, 아밀라아제 상승을 유발했다.¹⁰ 최근 *Mkl1*^{-/-} mice에서도 cerulein에 의한 췌장염에 대한 보호효과가 보고되었지만, 아직 기전 및 치료제로서의 가능성에 대해 이견들이 있다.¹¹ 이는 현재 실험에 사용되는 RIP1 inhibitor인 nec-1의 반감기가 너무 짧아서 necroptosis의 억제 효과가 미약한 것으로 추정된다.¹⁵ 향후 새로운 nec-1이 개발된다면 이러한 의혹을 풀 수 있을 것으로 생각한다.

최근에는 인돌구조를 기반으로 한 necroX가 활성산소, 활성질소 생성을 억제하여 과도한 ROS 발생으로 인한 necroptosis의 downstream을 조절하고 세포괴사를 효과적으로 억제할 수 있어 허혈-재관류 간손상 실험, 아세타아미노펜 과량 투여 간손상, celulein 유발췌장염 모델 등에서 실험이 진행 중이다.³⁸⁻⁴⁰ 또한 췌장염에서 자가포식의 역할에 대해 최근 많이 연구되고 있다.⁴¹ 자가포식은 lysosome에 의해 손상된 세포의 미토콘드리아를 포함하는 세포내 기관 및 단백질을 분해하는 일련의 과정을 의미한다.¹⁴ 췌장염은 long-lived 단백질의 분해를 감소 등의 자가포식 기능이 저하되고,⁴² 유비퀴틴이 부착된 응집된 단백질의 자가포식에 관여하는 단백질인 sequestosome 1으로 알려진 p62의 발현이 증가한다.⁴³ 자가포식과 necroptosis는 복잡하게 연결되어 있을 것으로 생각되나 분자생물학적인 기전은 거의 알려진 바가 없다. 몇몇 연구에서는 L929 cells, 림프구 같은 세포주에서 TNF- α 작용에 의해 자가포식이 활성화되고, necroptosis는 억제된다고 하였다.⁴⁴ 췌장염과 췌장암 등의 병리기전 및 치료물질 개발을 위해 향후 자가포식과 necroptosis의 상호 연관성에 대한 연구가 도움이 될 것으로 생각된다.

3. 간질환에서 necroptosis

간질환에서 NF- κ B에 의한 세포사멸의 유발 및 억제 기전은 간내 TNF의 의한 세포사멸 과정에 대한 여러 연구들에 의해 많이 밝혀져 있다.⁴⁵ 최근에는 세포사멸과 지방간염, 독성간염 등 간질환과의 관계에 있어 세포사멸사와 세포괴사 외에 necroptosis의 역할에 대해 새롭게 연구되고 있다. 다른 연구에서 밝혀진 허혈-재관류 조직손상에서 발생하는 necroptosis의 경로처럼, 간질환에서도 TNF에 의한 necroptosis를 유발하는 경로일 것으로 추정된다.¹⁵ 최근 들어 necroptosis의 표지자(surrogate marker)에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있으며, 동물실험 모델과 약인성 간손상(drug induced liver injury) 환자에서 인산화된 MLKL을 necroptosis의 가능성 있는 지표로 소개하기도 하였다.⁴⁶

현재까지 간질환과 necroptosis의 연관성에 대한 실험자료

들은 주로 쥐를 이용한 실험을 통해 얻은 결과들이고, 인체 간세포를 이용한 실험은 없다. Mice를 이용한 실험에서 보면 폐나 비장 같은 조직에서는 RIPK3가 발현되지 않고, 간조직에서는 풍부하게 발현된다.⁴⁷ 또한 정상적인 조건에서는 RIP3의 발현이 없거나 적으나, 카스파제를 억제하여 세포사멸사를 억제시킨 세포에서 RIPK3의 발현이 증가하는 것을 관찰할 수 있다.⁴⁸ 아세트아미노펜이나 에탄올로 유발시킨 독성 간손상 mice 실험모델에서 RIPK3의 발현이 억제되면 간세포 사멸이 감소하는 연구결과도 있다. 이를 통해 간접적으로 독성 간손상에서 necroptosis가 병리기전의 일부로 관여함을 추정할 수 있다.^{49,50} 그러나 necroptosis에 함께 관여하는 RIP1과 MLKL의 경우, RIP1 및 MLKL1 억제가 세포사멸에 미치는 연구결과는 다소 다양하게 나타나고 있다. 일부 연구에서는 nec-1을 이용한 RIPK1의 억제나 MLKL의 necroptosis의 억제는 손상초기에만 효과가 있는 것으로 추정된다.^{49,51} RIPK3 결핍 mice 모델 실험에서 24시간에서는 아세트아미노펜 유발 독성 간손상을 억제할 수 없었다.⁴⁹ 이는 nec-1의 반감기가 짧아서 생기는 현상일 수도 있고 RIPK3의 결핍을 보상하는 다른 기전이 존재할 수도 있다. 향후 간손상의 기전에 있어 세포사멸사와 necroptosis의 상호 관계 및 RIPK3를 통한 necroptosis의 분자생물학적 기전에 대한 연구가 필요할 것이다.

결론

최근 괴사성 세포사멸 중 지금까지 알려진 세포괴사가 아닌 정해진 분자생물학 기전을 통해서 '프로그램화된 세포괴사 (programmed necrosis)'가 존재함이 밝혀졌다. 이러한 프로그램화된 세포괴사는 "necroptosis"라 정의되었고, 최근 소화기 질환 중에 괴사성 췌장염, 염증성 장질환, 에탄올 유발 간손상 등에서 necroptosis의 역할에 대한 연구들이 보고되었다. 아직 자세한 분자생물학적인 기전 및 다른 세포사멸의 종류인 세포사멸사, 자가포식 등과의 관계는 밝혀져 있지 않아 향후 연구를 통해 밝혀야 할 것이다. Necroptosis의 기전 연구를 통해 앞서 언급한 소화기 질환에서 병리기전의 이해를 높일 수 있고, 치료제 개발에 큰 영향을 줄 것으로 생각한다.

REFERENCES

1. Kerr JF. Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J Pathol* 1971;105:13-20.
2. Bortner CD, Cidlowski JA. Cellular mechanisms for the repression of apoptosis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2002;42: 259-281.
3. Kitanaka C, Kuchino Y. Caspase-independent programmed cell

- death with necrotic morphology. *Cell Death Differ* 1999;6:508-515.
4. Zhang DW, Shao J, Lin J, et al. RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science* 2009;325:332-336.
 5. Degtarev A, Huang Z, Boyce M, et al. Chemical inhibitor of non-apoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol* 2005;1:112-119.
 6. Galluzzi L, Kroemer G. Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. *Cell* 2008;135:1161-1163.
 7. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* 2012;19:107-120.
 8. Smith CC, Davidson SM, Lim SY, Simpkin JC, Hothersall JS, Yellon DM. Necrostatin: a potentially novel cardioprotective agent? *Cardiovasc Drugs Ther* 2007;21:227-233.
 9. Linkermann A, Bräsen JH, Himmerkus N, et al. Rip1 (receptor-interacting protein kinase 1) mediates necroptosis and contributes to renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int* 2012;81:751-761.
 10. Linkermann A, Bräsen JH, De Zen F, et al. Dichotomy between RIP1- and RIP3-mediated necroptosis in tumor necrosis factor- α -induced shock. *Mol Med* 2012;18:577-586.
 11. Wu J, Huang Z, Ren J, et al. Mkl1 knockout mice demonstrate the indispensable role of Mkl1 in necroptosis. *Cell Res* 2013;23:994-1006.
 12. Günther C, Martini E, Wittkopf N, et al. Caspase-8 regulates TNF- α -induced epithelial necroptosis and terminal ileitis. *Nature* 2011;477:335-339.
 13. von Montfort C, Matias N, Fernandez A, et al. Mitochondrial GSH determines the toxic or therapeutic potential of superoxide scavenging in steatohepatitis. *J Hepatol* 2012;57:852-859.
 14. Smith CC, Yellon DM. Necroptosis, necrostatins and tissue injury. *J Cell Mol Med* 2011;15:1797-1806.
 15. Linkermann A, Green DR. Necroptosis. *N Engl J Med* 2014;370:455-465.
 16. Vercammen D, Beyaert R, Denecker G, et al. Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. *J Exp Med* 1998;187:1477-1485.
 17. Nikolettou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta* 2013;1833:3448-3459.
 18. Han J, Zhong CQ, Zhang DW. Programmed necrosis: backup to and competitor with apoptosis in the immune system. *Nat Immunol* 2011;12:1143-1149.
 19. Silke J, Strasser A. The FLIP side of life. *Sci Signal* 2013;6:pe2.
 20. Vanlangenakker N, Vanden Berghe T, Bogaert P, et al. cIAP1 and TAK1 protect cells from TNF-induced necrosis by preventing RIP1/RIP3-dependent reactive oxygen species production. *Cell Death Differ* 2011;18:656-665.
 21. Holler N, Zaru R, Micheau O, et al. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol* 2000;1:489-495.
 22. Schworer SA, Smirnova II, Kurbatova I, et al. Toll-like receptor-mediated down-regulation of the deubiquitinase cylindromatosis (CYLD) protects macrophages from necroptosis in wild-derived mice. *J Biol Chem* 2014;289:14422-14433.
 23. Khan N, Lawlor KE, Murphy JM, Vince JE. More to life than death: molecular determinants of necroptotic and non-necroptotic RIP3 kinase signaling. *Curr Opin Immunol* 2014;26:76-89.
 24. Gerlach B, Cordier SM, Schmukle AC, et al. Linear ubiquitination prevents inflammation and regulates immune signalling. *Nature* 2011;471:591-596.
 25. Mevissen TE, Hospenthal MK, Geurink PP, et al. OTU deubiquitinases reveal mechanisms of linkage specificity and enable ubiquitin chain restriction analysis. *Cell* 2013;154:169-184.
 26. Oberst A, Green DR. It cuts both ways: reconciling the dual roles of caspase 8 in cell death and survival. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011;12:757-763.
 27. Oberst A, Dillon CP, Weinlich R, et al. Catalytic activity of the caspase-8-FLIP(L) complex inhibits RIPK3-dependent necrosis. *Nature* 2011;471:363-367.
 28. Zhao J, Jitkaew S, Cai Z, et al. Mixed lineage kinase domain-like is a key receptor interacting protein 3 downstream component of TNF-induced necrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:5322-5327.
 29. Sun L, Wang H, Wang Z, et al. Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. *Cell* 2012;148:213-227.
 30. Dillon CP, Oberst A, Weinlich R, et al. Survival function of the FADD-CASPASE-8-cFLIP(L) complex. *Cell Rep* 2012;1:401-407.
 31. Welz PS, Wullaert A, Vlantis K, et al. FADD prevents RIP3-mediated epithelial cell necrosis and chronic intestinal inflammation. *Nature* 2011;477:330-334.
 32. Kaczmarek A, Vandenabeele P, Krysko DV. Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity* 2013;38:209-223.
 33. Kaiser WJ, Upton JW, Long AB, et al. RIP3 mediates the embryonic lethality of caspase-8-deficient mice. *Nature* 2011;471:368-372.
 34. Kaiser WJ, Upton JW, Mocarski ES. Viral modulation of programmed necrosis. *Curr Opin Virol* 2013;3:296-306.
 35. Thapa RJ, Nogusa S, Chen P, et al. Interferon-induced RIP1/RIP3-mediated necrosis requires PKR and is licensed by FADD and caspases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:E3109-E3118.
 36. Li S, Zhang L, Yao Q, et al. Pathogen blocks host death receptor signalling by arginine GlcNAcylation of death domains. *Nature* 2013;501:242-246.
 37. He S, Wang L, Miao L, et al. Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF- α . *Cell* 2009;137:1100-1111.
 38. Shirinzadeh H, Eren B, Gurer-Orhan H, Suzen S, Ozden S. Novel indole-based analogs of melatonin: synthesis and in vitro antioxidant activity studies. *Molecules* 2010;15:2187-2202.
 39. Kim HJ, Koo SY, Ahn BH, et al. NecroX as a novel class of mitochondrial reactive oxygen species and ONOO⁻ scavenger. *Arch Pharm Res* 2010;33:1813-1823.
 40. Choi JM, Park KM, Kim SH, et al. Effect of necrosis modulator necroX-7 on hepatic ischemia-reperfusion injury in beagle dogs. *Transplant Proc* 2010;42:3414-3421.

41. Gukovsky I, Li N, Todoric J, Gukovskaya A, Karin M. Inflammation, autophagy, and obesity: common features in the pathogenesis of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology* 2013;144:1199-1209.e4.
42. Mareninova OA, Hermann K, French SW, et al. Impaired autophagic flux mediates acinar cell vacuole formation and trypsinogen activation in rodent models of acute pancreatitis. *J Clin Invest* 2009;119:3340-3355.
43. Moscat J, Diaz-Meco MT. p62: a versatile multitasker takes on cancer. *Trends Biochem Sci* 2012;37:230-236.
44. Farkas T, Daugaard M, Jäättelä M. Identification of small molecule inhibitors of phosphatidylinositol 3-kinase and autophagy. *J Biol Chem* 2011;286:38904-38912.
45. Luedde T, Kaplowitz N, Schwabe RF. Cell death and cell death responses in liver disease: mechanisms and clinical relevance. *Gastroenterology* 2014;147:765-783.e4.
46. Wang H, Sun L, Su L, et al. Mixed lineage kinase domain-like protein MLKL causes necrotic membrane disruption upon phosphorylation by RIP3. *Mol Cell* 2014;54:133-146.
47. Luedde M, Lutz M, Carter N, et al. RIP3, a kinase promoting necroptotic cell death, mediates adverse remodelling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2014;103:206-216.
48. Vucur M, Reisinger F, Gautheron J, et al. RIP3 inhibits inflammatory hepatocarcinogenesis but promotes cholestasis by controlling caspase-8- and JNK-dependent compensatory cell proliferation. *Cell Rep* 2013;4:776-790.
49. Ramachandran A, McGill MR, Xie Y, Ni HM, Ding WX, Jaeschke H. Receptor interacting protein kinase 3 is a critical early mediator of acetaminophen-induced hepatocyte necrosis in mice. *Hepatology* 2013;58:2099-2108.
50. Roychowdhury S, McMullen MR, Pisano SG, Liu X, Nagy LE. Absence of receptor interacting protein kinase 3 prevents ethanol-induced liver injury. *Hepatology* 2013;57:1773-1783.
51. Sharma M, Gadang V, Jaeschke A. Critical role for mixed-lineage kinase 3 in acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Mol Pharmacol* 2012;82:1001-1007.