

APOPTÓZA ZPROSTŘEDKOVANÁ DEATH RECEPTORY: ÚLOHA FASL A TRAIL PŘI SMRTI MALIGNÍCH BUNĚK

DEATH RECEPTORS-MEDIATED APOPTOSIS: ROLE OF FASL AND TRAIL IN CANCER CELLS KILLING

DUBSKÁ L.^{1,2}, SHEARD M.A.^{1,3}

¹ MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV BRNO

² PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA MU BRNO

³ DIVISION OF HEMATOLOGY-ONCOLOGY, CHILDREN'S HOSPITAL LOS ANGELES

Souhrn: Určité ligand:receptorové interakce na povrchu buňky, včetně FasL:Fas a TRAIL:TRAIL-Rs, vedou k indukci programované buněčné smrti. Abnormality na různých úrovních těchto drah, např. ztráta receptoru Fas z povrchu buněk, delece nebo mutace genů kódujících receptory pro TRAIL, zvýšená exprese *decoy* receptorů či proteinu FLIP, inhibitoru aktivace kaspáz, byly zaznamenány u různých typů nádorů u člověka. Buněčná smrt procesem apoptózy navozená aktivací Fas a TRAIL-Rs je v některých případech doprovázena uvolněním pro-apoptotických molekul z mitochondrií/ER. Zvýšení či obnovení citlivosti (pre)neoplastických buněk k apoptóze indukované ligandy FasL a TRAIL přispívá k léčebnému účinku chemo- a radioterapie a hraje úlohu při imunoterapeutických léčebných postupech. Pokud se navíc zabrání toxicitě pro nemaligní buňky, může být likvidace nádorových buněk exogenními ligandy, především TRAIL, do budoucna novým přístupem k léčbě rakoviny.

Klíčová slova: Fas/CD95, TRAIL, apoptóza, nádorová onemocnění

Summary: Programmed cell death can be initiated upon ligand:receptor interactions at the cell surface, especially involving FasL:Fas and TRAIL:TRAIL-receptors. In various human cancers, abnormalities in the levels of these pathways have been identified in human cancer, including loss of Fas surface expression, deletion or mutation of TRAIL-Rs, and overexpression of decoy receptors or of the caspase activation inhibitor, FLIP. Apoptotic cell death triggered by ligation of Fas and TRAIL-Rs can in some cases be connected with release of pro-apoptotic molecules from mitochondria/ER. Enhancement or reactivation of sensitivity to FasL- and TRAIL-induced apoptosis in neoplastic cells contributes to chemo- and radiotherapy and play a role in immunotherapeutical strategies. Furthermore, if toxicity in normal cells can be circumvented, exogenous ligands, in particular TRAIL, promise to offer a new approach in cancer therapy.

Key words: Fas/CD95, TRAIL, apoptosis, cancer

Rovnováha mezi buněčným dělením a programovanou buněčnou smrtí (PCD) je nezbytná pro udržení tkáňové homeostázy. Jako PCD je označována buněčná smrt závislá na signálech nebo řízených aktivitách uvnitř umírající buňky. Nejstudovanější typem PCD je apoptóza definovaná původně morfologickými kritérii, jako jsou kondenzace chromatinu do kompaktních útvarů a rozpad buňky na fragmenty obalené cytoplazmatickou membránou (1). S přibývajícím informacemi o různých typech PCD bývá za apoptózu považována buněčná smrt, při které dochází k aktivaci kaspáz, což jsou enzymy z rodiny cysteinových proteáz schopné po své aktivaci z prekurzorů dezintegrovat buňku (2-5).

Klíčovou podmínkou pro nádorové bujení je neregulovaná proliferace bez kontroly počtu buněk PCD, nejčastěji právě apoptózou (6). Samotný charakter změn navozujících růst nádorové populace - zvýšená aktivita onkoproteinů, inaktivace nádorových supresorů - má obvykle za následek aktivaci kaspáz a následnou apoptózu. Pro kontinuální růst populace maligních buněk je tedy nutné spojit signály stimulující růst s redukcí smrtícího potenciálu zpravidla inaktivací pro-apoptotických proteinů (např. mutace nádorového supresoru p53, inaktivace proteinu Apaf-1) nebo zvýšenou aktivitou anti-apoptotických proteinů (např. aktivace Akt kinázové dráhy, zvýšená hladina *heat shock* proteinů či zvýšená exprese proteinu Bcl-2).

Represe apoptotického programu je také jedním z mechanismů úniku maligní buňky protinádorové imunitní bariéře tvořené cytotoxickými T-lymfocyty (CTLs) a *natural killer* (NK) buňkami. CTLs a NK buňky mohou aktivovat kaspá-

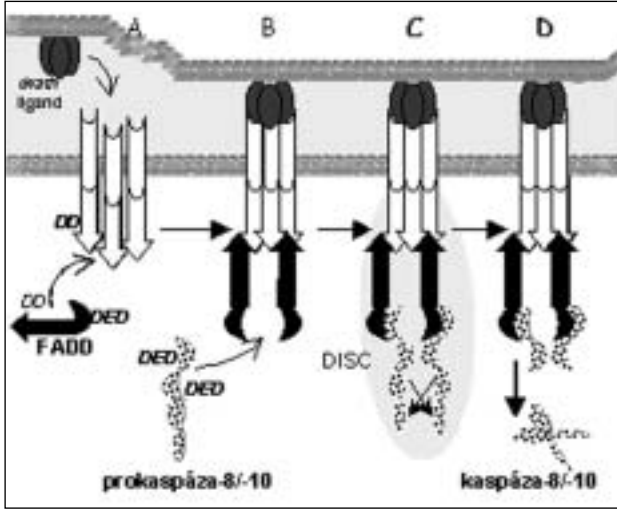
zy a tak indukovat buněčnou smrt exocytózou granzymu B nebo ligací *death* receptorů na povrchu cílových potenciálně nebezpečných buněk. Tyto specializované membránové receptory s jedinečnou schopností zprostředkovat likvidaci buňky patří do rodiny TNFR (*tumor necrosis factor receptor*) a jejich solubilní nebo membránově vázané ligandy do rodiny TNF.

Ligandy TNF a receptory TNFR se účastní především vývoje a funkce imunitního systému a buněk lymfoidního původu (7), např. TNF hraje zásadní roli při zánětlivé reakci, lymphotoxin je klíčovou molekulou pro vývoj periferních lymfoidních orgánů. Některé receptory TNFR, nazvané *death* receptory jmenovitě TNF-R1, CD95/Fas, DR3/TRAMP, DR5/TRAIL-R2, DR4/TRAIL-R1 a DR6, se vyznačují intracelulární *death* doménou (DD), jejíž prostřednictvím mohou více či méně efektivně aktivovat iniciační kaspázy a spustit apoptotický program (*obr. 1, 2*) V rámci onkologického výzkumu je pozornost zaměřena na *death* receptory CD95/Fas, DR5/TRAIL-R2 a DR4/TRAIL-R1 a to díky jejich úloze při imunitní reakci CTLs a NK-buněk proti potencionálně rakovinným buňkám a v případě DR5 a DR4 také díky selektivní toxicitě jejich ligandu TRAIL pro transformované buňky (19).

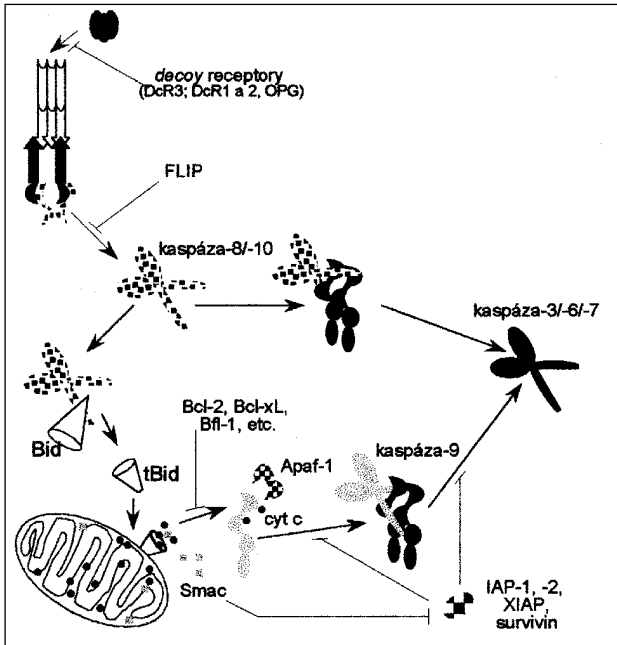
REGULACE APOPTÓZY ZPROSTŘEDKOVANÉ RECEPTORY CD95, DR5 A DR4.

Buněčná smrt zprostředkovaná *death* receptory je regulována na několika úrovních a inhibice apoptotické signalizace na některé z nich je častým způsobem obrany (pre)neoplastických buněk před protinádorovou imunitní bariérou.

Obr. 1. Aktivace death receptoru a iniciačních kaspáz. /A/ Trimerický death ligand indukuje oligomerizaci membránových molekul příslušného receptoru. Asociace receptorových molekul vede k homotypické interakci death domén (DD) receptoru s DD adaptorového proteinu FADD (8, 9). /B/ FADD interaguje prostřednictvím DED (*death effector domain*, 10) s prokaspázou-8/-10 /C/ za vzniku komplexu DISC (*Death Induced Signaling Complex*, 11), v němž dochází k autokatalýze kaspázových prekurzorů (12). /D/ Aktivní kaspáza-8/-10 se skládá ze dvou malých a dvou velkých podjednotek.



Obr. 2. Model regulace aktivace efektorových kaspáz po ligaci death receptoru. Iniciační kaspáza-8/-10 štěpením aktivuje efektorové kaspázy a/nebo štěpením proteinu Bid indukuje uvolnění pro-apoptotických molekul z mitochondriálního mezimembránového prostoru a z endoplazmatického retikula (ER) včetně cytochromu *c* (cyt *c*), který pak v cytozolu umožňuje interakci proteinu Apaf-1, ATP, prekurzorů kaspázy-9, aktivaci tohoto enzymu (13) a následně efektorových kaspáz. Mechanismus je regulován na mnoha úrovních. Interakce prokaspázy-8/-10 s death receptorem je inhibována proteinem FLIP (14). U některých typů buněk je apoptotický proces významně regulován mitochondriálním Bcl-2 homology (15). Aktivita či aktivace efektorových kaspáz (-3, -6, -7) je modulována negativně inhibitory IAP-1, -2, XIAP (16), Survivin (17); a pozitivně mitochondriálními proteiny Smac/DIABLO (18).



Funkčnost receptorů a jejich výskyt: Příklad mutací a nefunkčního p53

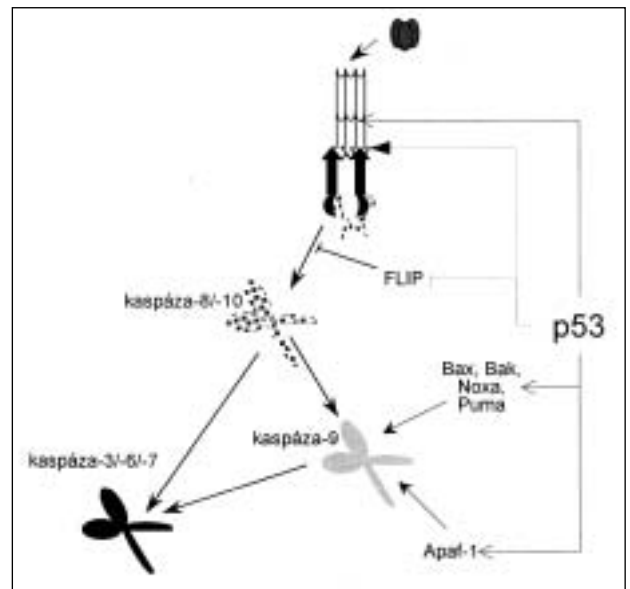
Absence funkčních death receptorů na povrchu buňky může být jednak důsledkem zárodečných nebo somatických mutací

v genech kódujících tyto receptory, případně díky snížené aktivitě jejich transkripčních faktorů, nebo na posttranslační úrovni důsledkem ztráty receptorů z povrchu buňky.

335 aminokyselin dlouhý receptor CD95/Fas je exprimován mnoha typy buněk, vyskytuje se především na povrchu thymocytů a aktivovaných T-lymfocytů a hojně také na membránách buněk jater, srdce a ledvin (20). Fenotypový projev deficiencie či mutace genu *fas* vyplývá především z úlohy tohoto receptoru při formování a funkci imunitního systému, tedy eliminaci autoreaktivních T- a B-lymfocytů během klonální selekce aktivovaných T-buněk na konci imunitní reakce (21). Nicméně kromě lymfadenopatie, splenomegalie, autoimunitních onemocnění (22-25) je zárodečná mutace v genu *fas* asociována se zvýšeným výskytem lymfoproliferativním malignit (23, 26). Somatické mutace tohoto genu byly poprvé popsány u lymfoidních nádorů (27-31) a později také u solidních nádorů např. karcinomu močového měchýře (32), nemalobuněčného plicního karcinomu (32, 33), maligního melanomu (34) a testikulárních nádorů (35). Jen u 30% nádorů s *fas* mutací byla zaznamenána ztráta heterozygoty (36) a klinický fenotyp se projevuje již při monoalelické mutaci genu *fas* (22, 25), což je dáno pravděpodobně tím, že je třeba interakce tří *wild type* molekul k vytvoření funkčního receptoru.

Apoptotické receptory ligandu TRAIL, tedy DR4 a DR5, mají výrazně podobnou sekvenční strukturu i lokalizaci exprese. Transkripty pro 445 aminokyselin dlouhý DR4 se nacházejí v mnoha tkáních především v srdci, ve slezině, v periferní krvi, v tenkém střevě a v brzlíku (37). Transkript pro 411 aminokyselin dlouhý receptor DR5 byl detekován v nejvyšších hladinách v srdci, játrech, plicích, ledvinách, periferní krvi, vaječnících, tenkém střevě a periferní krvi (38-40). Geny kódující receptory pro TRAIL se v lidském genomu nacházejí v oblasti 8p21-2 (38, 41, 42), jejíž delecce je asociována s patogenezí některých nádorů (43-46) a jejich vyšší invazivitou (47). Translokace vedoucí k delecí částí genu pro DR4 byla detekována u nazofaryngeální nádorové buněčné linie (48), vyšší frekvence určitého polymorfismu genu pro DR4 je asociována s vývojem různých malignit (49, 50) a některé nádorové buněčné linie

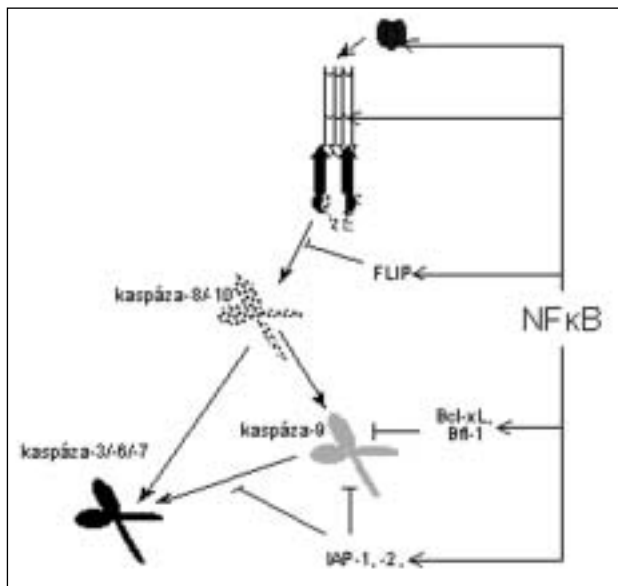
Obr. 3. Úloha nádorového supresoru p53 při regulaci apoptózy prostřednictvím death receptorů. Protein p53 je významným transaktivátorem receptorů CD95/Fas a DR5 (60, 61). Také přímo kontroluje expresi pro-apoptotických Bcl-2 homologů, Bax, Bak (62, 63), Noxa (64), Puma (65); a expresi proteinu Apaf-1 (66) klíčového pro aktivaci prokaspázy-9. Byla také popsána pro-apoptotická role p53 nezávislá na jeho transkripční aktivitě (zobrazeno čárkovaně) spočívající v indukci translokace death receptorů na buněčnou membránu (67) nebo degradace inhibitoru FLIP prostřednictvím ubiquitin-proteazomové dráhy (68).



neexprimují DR4 vůbec (51-53). Somatické mutace obou apoptotických receptorů ligandu TRAIL hrají roli v patogenezi ne-Hodgkinských lymfomů (54) a metastazujících prsních nádorů (55). Inaktivující mutace DR5 byla nalezena u nemalobuněčných plicních karcinomů (32, 56), nádorů trávicí soustavy (57) a nádorů hlavy a krku (58).

Na úrovni exprese může být příčinou redukce *death* receptorů maligní charakter buňky, např. hypermetylace v promotorové oblasti genu *fas* onkoproteinem H-Ras vede k inhibici exprese receptoru (59). Z hlediska neoplastické transformace je významným regulátorem exprese *death* receptorů nádorový supresor p53 (*obr. 3*), jehož konsenzus sekvence se nachází jak v genu kódujícím CD95/Fas tak DR5 (60, 61). V důsledku toho je ztráta transaktivční funkce proteinu p53 u většiny nádorů příčinou redukce CD95/Fas na povrchu transformovaných buněk (69), což bylo potvrzeno pomocí genetického modelu inaktivace p53 (213) spolu ze zásadní rolí funkce tohoto proteinu při up-regulaci povrchových receptorů po působení agens poškozující DNA (70-72). Úloha p53 při kontrole exprese receptoru DR4 zůstává zatím nejasná. Promotorové a transkripčně regulační oblasti nebyly zatím charakterizovány, přičemž většina studií prezentuje up-regulaci DR4 následkem genotoxického stresu bez ohledu na funkční status p53 (73-75). Nicméně práce s jinými modelovými systémy demonstrují expresi *DR4* v závislosti na aktivitě p53 (76, vlastní pozorování). Dále jsou *death* receptory transkripčně regulovány paradoxně převážně anti-apoptotickým NFκB (*obr. 4*). Podle některých studií je NFκB zásadním mediátorem genotoxiny-indukované up-regulace DR4 a DR5 (73, 77, 78) a v některých případech i CD95/Fas (79, 80).

Obr. 4. Mechanismus protichůdné úlohy transkripčního faktoru NFκB při apoptóze zprostředkované *death* receptory. Anti-apoptotická aktivita NFκB je spojena s transaktivací genů zodpovědných za přežití buňky jako jsou Bcl-2 homology Bcl-x₁ a Bfl-1/A-1 (150, 152, 153); inhibitory apoptózy IAP-1, IAP-2, (154, 155); nebo inhibitor aktivace kaspázy-8/-10, FLIP (156, 157). Na druhé straně je NFκB transkripčním faktorem DR4, DR5 (73, 77, 78), CD95/Fas (79); a FasL (158).



Přítomnost ligandů a jejich aktivita: Případ protiútoků nádorů

Ke spuštění *death* receptorové signalizace je nutná interakce receptoru s aktivujícím cytokinem zvaným *death* ligand (*obr. 1*). *Death* ligandy se primárně vyskytují jako membránově vázané proteiny, ale jsou ve větší či menší míře detekovány také jako solubilní proteiny v séru (81, 82). FasL je transkripčně regulován faktory NFκB, AP-1 a c-JUN (83) a je exprimován

velmi specificky pouze CTLs a NK-buňkami, a buňkami tkáň chráněných před imunitní reakcí (*immune privileged sites*, 84-87). Expres FasL neoplastickými buňkami (88-91) je považována za jednu z forem úniku těchto buněk imunitnímu systému organismu - za tzv. protiútok nádorů (*tumor counterattack*), při němž maligní buňky aktivně likvidují CD95/Fas⁺ imunitní buňky infiltrující nádor (92-96) a tím přispívají k poškození tkáně a šíření nádoru (97, 98). Solubilní forma ligandu, sFasL, vzniká odštěpováním molekuly z povrchu buněk jedním z enzymů asociovaných s nádory, metaloproteinázou-7 (99, 100), a funkčně se pravděpodobně liší od membránově vázaného ligandu (101). sFasL spíše přispívá k narušení cytotoxického efektu FasL vázaného na membrány buněk imunitního systému tím, že se váže na receptor CD95/Fas na povrchu neoplastických buněk, aniž by byl schopen spustit apoptotický program (102, 103, 193). Jiné studie poukazují na toxicitu sFasL pro T-lymfocyty vedoucí k oslabení protinádorové imunitní bariéry (104-106) a jeho zvýšená hladina v séru byla detekována u lymfocytární leukemie a určitého typu lymfomů (82).

Relativně málo je známo o transkripční regulaci ligandu TRAIL, nicméně přibývající data ukazují na zvýšenou expresi tohoto ligandu po vystavení buněk různým cytokinům. U různých buněčných typů jsou oba typy interferonů, tedy INF- α - β a IFN- γ , schopny up-regulovat hladinu povrchového ligandu TRAIL u periferních T-buněk (107), monocytů a dendritických buněk (108, 109) a stejný výsledek byl pozorován po vystavení určitého subsetu NK-buněk IL-2, interferonům a IL-15 (107). Data vycházející z myšského *in vivo* modelu naznačují fyziologickou úlohu ligandu TRAIL při vrozené imunitní reakci spojené s interferony a NK-buňkami (110), včetně suprese nádorového bujení (111, 112).

Decoy receptory: Případ odlákání pozornosti

Buňky mohou na extracelulární úrovni redukovat buněčnou smrt odlákáním pozornosti (angl. *decoy*) od *death* receptorů exprese tzv. *decoy* receptorů interagujících s příslušnými ligandy, avšak bez schopnosti spustit apoptotickou dráhu (113).

Je znám jeden *decoy* receptor pro FasL, DcR3, jehož gen je amplifikován u mnoha karcinomů střeva a plic (114-115).

TRAIL se váže se dvěma membránově vázanými *decoy* receptory, DcR1 (TRAIL-R3/TRID) (39, 42, 116) a DcR2 (TRAIL-R4/TRUNDD) (41, 117, 118), a jedním solubilním, osteoprotegriinem (OPG; 119, 120). Zvýšená exprese DcR1 byla detekována u některých nádorů trávicí soustavy (121) a OPG u několika nádorových buněčných linií (122). Oproti tomu byla hypermetylací promotorových oblastí snížena exprese DcR1 a DcR2 popsána u neuroblastomu (123). Výskytem *decoy* receptorů na povrchu netransformovaných buněk bývá také vysvětlována jejich relativní rezistence k TRAIL-indukované apoptóze (36, 117, 124). Nicméně následné studie neprokázaly významnou korelaci mezi expresí *decoy* receptorů a senzitivitě k působení ligandu TRAIL (52, 125-127).

Aktivace iniciačních kaspáz: Případ kaspáza-8/-10 vs. FLIP

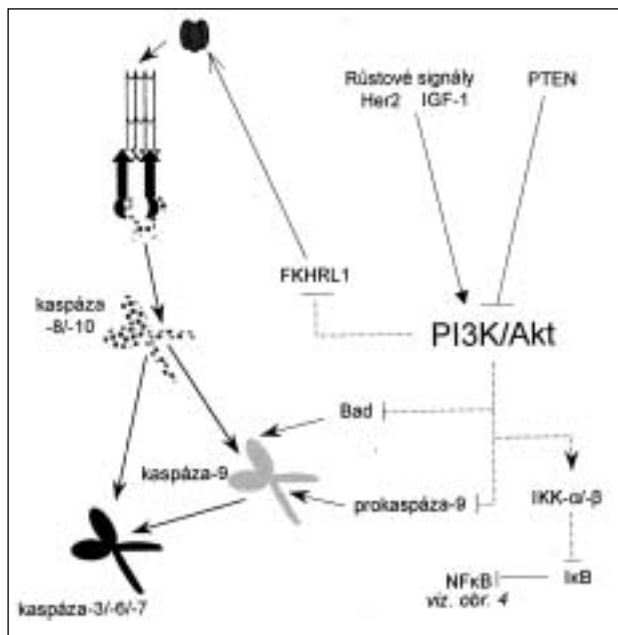
Klíčovým enzymem zahajujícím kaspázovou kaskádu po ligaci *death* receptoru je kaspáza-8 (*obr. 2*). Byla detekována delece v úseku kódujícím DED kaspázy-8 u buněk karcinomu (128) a patogeneze některých typů nádorů je patrně spojena s hypermetylací regulačních sekvencí a tím redukovanou transkripční genů kódujícího pro kaspázu-8 (129). K aktivaci iniciační kaspázy-10 po ligaci *death* receptorů patrně nedochází u všech typů buněk. U některých modelových systémů nedocházelo k interakci pro kaspázy-10 s aktivovanými receptory (130) a apoptóza probíhala bez ohledu na aktivitu kaspázy-10 (131). V jiných případech byla kaspázy-10 schopna funkčně nahradit kaspázu-8 (132, 133) a snížení její aktivity u neoplastických buněk je častější než v případě kaspázy-8 (134, 135). Velmi významným inhibitorem aktivace iniciačních kaspáz je protein FLIP. Anti-apoptotický v-FLIP se nachází u některých

virů, včetně HHV-8 (136). Savcí c-FLIP je exprimován v několika sestřihových variantách (137) homologních s kaspázou-8/-10, nicméně bez katalytického potenciálu (14). Zvýšená hladina proteinu c-FLIP spojená s rezistencí k *death* receptory zprostředkované buněčné smrti byla detekována u melanomů a dalších typů nádorů (125, 138, 139). Nedávné studie poukazují na snížení hladiny c-FLIP v důsledku genotoxické terapie, což může být jeden z mechanismů, jak tyto látky přispívají u nádorových buněk k aktivaci apoptotického programu (140-142).

Posílení apoptotického signálu: Příklad zapojení mitochondrií

Dva základní způsoby indukce apoptózy, prostřednictvím *death* receptorů a stresem indukované uvolnění pro apoptotických proteinů z mitochondrií a endoplazmatického retikula (ER) se prolínají při aktivaci proteinu Bid kaspázou-8/-10 (143-145) (obr. 2). Aktivní fragment tBid translokuje do membrány mitochondrií/ER a přispívá tak k uvolnění cytochromu *c* a další pro-apoptotických molekul (146). Zapojení mitochondrií/ER po ligaci *death* receptorů slouží pravděpodobně k amplifikaci apoptotického signálu a je více (např. neuronální prekursor) či méně (např. lymfocyty) vyžadováno pro dokončení apoptotického programu u různých typů buněk (15). Interakce nebo obecně poměr pro- a anti-apoptotických proteinů Bcl-2 (147) tak mohou významně ovlivnit osud buňky po ligaci *death* receptorů (77, 130, 148-151). Mitochondriální apoptotické rameno je významně regulováno pro-apoptickou aktivitou proteinu p53 (obr. 3), transkripční aktivitou NFκB (obr. 4) a kinázovou aktivitou Akt (obr. 5). Inaktivace p53 (163, 164) nebo naopak zvýšená aktivita NFκB (165, 166) a kinázy Akt (167-169) u nádorových buněk jsou tak častou příčinou rezistence nebo redukované citlivosti buněk k *death* receptory zprostředkované apoptóze.

Obr. 5. Mechanismus regulace *death* receptorové buněčné smrti prostřednictvím aktivity Akt kinázy. Extracelulární stimulace receptorů pro růstové faktory, cytokiny a integriny indukuje aktivitu fosfatidyl inozitol 3 kinázy (PI3K), což vede k vytvoření fosforylovaných fosfoinozitiidů negativně regulovaných proteinem PTEN a následně aktivaci kinázy Akt. Fosforylační aktivita Akt vede k inhibici funkce pro-apoptotického Bcl-2 homologu Bad (159), fosforylovaný prekurzor prokaspázy-9 není štěpen na aktivní enzym (160), fosforylace FKHL1 transaktivujícího FasL vede k exkluzi tohoto transkripčního faktoru z jádra (161), inaktivující fosforylace inhibitoru κB prostřednictvím IKK-α a IKK-β má za následek aktivaci NFκB (162) a jeho převážně anti-apoptotické funkce (obr. 4).



ALTERNATIVNÍ DEATH RECEPTOROVÁ SIGNALIZACE

Ligace *death* receptorů nevede výhradně k aktivaci kaspáz a apoptotické smrti buňky. Alternativní dráhy mohou vést s různou významností podle typu receptoru k aktivaci NFκB (170) a JNK/AP-1 (171, 172), což má roli především při diferenciaci (40, 173). V některých případech, v závislosti na typu buňky a celkovém kontextu, indukuje FasL a TRAIL alternativní signální dráhy vedoucí k buněčné smrti nezávislé na kaspázách, která bývá označována jako nekróza (174-177) (obr. 6).

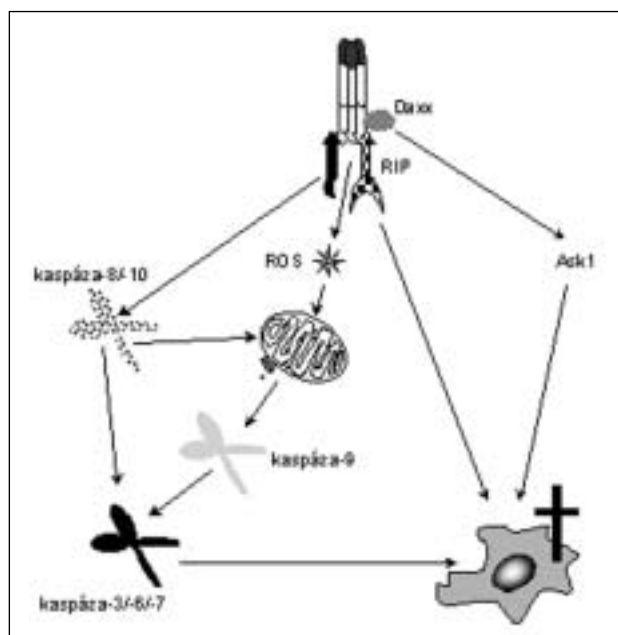
DEATH RECEPTORY V TERAPII NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ:

Jednou z strategií protinádorové terapie je obnovení schopnosti nádorových buněk spustit apoptotický program a aktivace *death* receptorů může být alternativou, jak obejít konvenční způsob aktivace apoptotického programu působením stresových podmínek (záření, chemoterapie). Pro klinickou praxi má z tohoto hlediska význam především zvýšení/obnovení citlivosti maligních buněk ke spuštění apoptotického programu aktivací *death* receptorů buňkami imunitního systému popř. z okolí nádoru a/nebo zvýšení cytotoxického účinku *death* ligandů v rámci imunoterapeutických postupů či zvažované přímé administrace exogenních *death* ligandů nebo agonistických protilátek.

Odstranění maligního charakteru buňky má často za následek obecně pro-apoptický efekt a ve většině případů i vzhledem k *death* receptorové signalizaci. Příkladem je stabilizace a aktivace p53 působením genotoxických látek (71, 182-184) a záření (72, 185), přispívající k obnovení/zvýšení citlivosti buněk k apoptóze indukované ligandy FasL a TRAIL na několika úrovních (obr. 3) především díky pozitivní regulaci exprese receptorů.

Maligní charakter mnoha nádorů je spojen s nekontrolovanou aktivitou PI3K/Akt kinázové dráhy způsobenou, např. mutací genu kódujícího fosfatázu PTEN u některých typů nádorů

Obr. 6. Buněčná smrt po ligaci *death* receptorů. U některých typů buněk indukuje FasL a TRAIL buněčnou smrt nezávislou na kaspázové aktivitě označovanou jako nekróza (178), popsána byla nekrotická smrti prostřednictvím kinázy RIP (177) interagující s *death* receptory. Aktivace CD95/Fas může vést prostřednictvím adaptoru Daxx k buněčné smrti spuštěné Ask1 kinázou (179, 180). Některé studie naznačují bezprostřední roli *death* receptorů při produkci volných kyslíkových radikálů (181) vedoucí k depolarizaci vnější mitochondriální membrány a následně smrti buňky.



(186), zvýšenou koncentrací IGF-1 a neurotrofinů v mikroprostředí nádoru (187, 188) či zvýšenou expresí receptoru Her2 na povrchu buněk karcinomů prsu (189). Reverze PI3K/Akt signalizace odstraněním růstových faktorů (190) či inhibicí Her2 dráhy (191) je jedním ze způsobů odstranění rezistence buněk k *death* receptory zprostředkované apoptóze (obr. 5).

Po objevení jedinečné schopnosti indukovat apoptózu se začalo uvažovat o protinádorovém terapeutickém potenciálu jak *death* ligandů, tak konstruktů agonistických protilátek proti *death* receptorům. Nicméně přímá administrace FasL nebo protilátky aktivující Fas/CD95 má za následek závažnou toxicitu především díky masivní apoptóze hepatocytů (192, 193). Velmi slibná byla *in vitro* data stejně jako výsledky preklinických studií (194-196) demonstrující tumoricidní účinek exogenního rekombinantního ligandu TRAIL bez závažné toxicity pro normální tkáň. Nicméně po zjištění, že buňky získané z lidských jater (197) a mozku (198) jsou značně senzitivní k apoptóze po ligaci receptorů pro TRAIL, byly první klinické pokusy o terapii rekombinantním konstruktem ligandu TRAIL plánované na r. 2000 odloženy a další výzkum se v tomto směru zabývá specifitou toxicity jednotlivých rekombinantních ligandů (199-202) a zároveň způsoby protekce normálních buněk před cytotoxickým účinkem exogenních ligandů, např. inhibicí kaspázy-9 u zdravých hepatocytů (203).

Biologická úloha *death* ligandů v rámci imunitního systému implikuje podíl receptorové buněčné smrti na léčebném účinku protinádorových imunoterapeutických postupů. Cytokiny podávané v rámci nespecifických imunoterapeutických postupů zvyšují expresi a funkci složek *death* receptorových drah, což přispívá k eliminaci nádorových buněk buňkami imunitního systému, např. IL-2 pozitivně reguluje expresi FasL a TRAIL T-lymfocyty (204); interferony jsou výraz-

ným stimulantem exprese ligandu TRAIL na povrchu CTLs a NK buněk a tím přispívají k jejich tumoricidnímu potenciálu (108, 110, 195, 205, 206) a zároveň zvyšují senzitivitu některých typů maligních buněk k *death* receptory zprostředkované apoptóze (207-209). Některé způsoby stávající a výhledové imunoterapie kombinují cílení imunitní reakce proti nádorovým buňkám s inhibicí jejich růstového potenciálu. Léčebný efekt v klinické praxi používaných protilátek jakými jsou Rituxan (210) specifický pro CD20 a Herceptin (211) cílený na Her-2/neu exprimující nádory je založen na likvidaci cílových buněk jednak aktivací mechanismů ADCC (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) a CDC (*complement-dependent cell lysis*), ale také ovlivněním buněčné signalizace směrem ke zvýšení citlivosti buněk k apoptóze (212). Díky tomuto mechanismu mohou zmíněné protilátky stejně jako zvažované konstrukty protilátek konjugované s cytostatikem, jeho prekurzorem, enzymem, popř. radionuklidem účinně specificky eliminovat (pre)neoplastické buňky buňkami aktivovaného imunitního systému prostřednictvím buněčné smrti zprostředkované jak granzymy, tak *death* receptory.

Apoptóza zprostředkovaná *death* receptory nejen přispívá k léčebnému účinku klinicky používané chemo- a radioterapie, ale představuje také potenciál pro likvidaci maligních buněk rezistentních ke stresem indukované apoptóze jako zásadního nástroje konvenční protinádorové terapie. Vzhledem k minimalizaci toxicity terapie pro zdravé buňky je zásadní podmínkou zvažovaných léčebných postupů využívajících *death* ligandy obnovení apoptotického potenciálu maligních buněk a současně protekce zdravých buněk před buněčnou smrtí.

Práce byla podpořena grantovými projekty IGA MZ ČR č. NC7133-2/2002 a GA ČR č. 301/03/0545.

Literatura

1. Wyllie A.H., Kerr J.F.R. et Currie A.R. Cell Death: The significance of Apoptosis. *Int R Cytol* 68:251-306, 1980.
2. Stroh C et Schultze-Osthoff K. Death by a thousand cuts: an ever increasing list of caspase substrates. *Cell Death Differ* 5: 997-1000, 1998.
3. Kaufmann SH, Hengartner MO. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol* 11:526-34. *Trends Cell Biol* 11:526-34, 2001.
4. Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* 69:217-45, 2000.
5. Ferri KF, Kroemer G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol* 3:E255-63, 2001.
6. Lowe S.W. & Lin A.W. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 21:485-95, 2000.
7. Gravelstein LA, Borst J. Tumor necrosis factor receptor family members in the immune system. *Semin Immunol* 10:423-34, 1998.
8. Flynn DC. Adaptor proteins. *Oncogene* 20:6270-2, 2001.
9. Chinnaiyan AM, Tepper CG, Seldin MF et al. FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem* 271:4961-5, 1996.
10. Tibbetts MD, Zheng L, Lenardo MJ. The death effector domain protein family: regulators of cellular homeostasis. *Nat Immunol* 4:404-9, 2003.
11. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I et al. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 14:5579-88, 1995.
12. Muzio M, Stockwell BR, Stennicke HR et al. An Induced Proximity model for Caspase-8 Activation. *J Biol Chem* 273: 2926-3, 1998.
13. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91: 479-89, 1997.
14. Irmiler M, Thome M, Hahne M et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 386: 517-21, 1997.
15. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Clin* 2:647-56, 2002.
16. Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J* 16:6914-25, 1999.
17. Tamm I, Wang Y, Sausville E et al. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res* 58:5315-20, 1998.
18. Verhagen AM, Vaux DL. Cell death regulation by the mammalian IAP antagonist Diablo/Smac. *Apoptosis* 7:163-6, 2002.
19. French L.E. et Tschopp J. The TRAIL to selective tumor death. *Nature Med* 5:146-7, 1999.
20. Martinez OM, Krams SM. Involvement of Fas-Fas ligand interactions in graft rejection. *Int Rev Immunol* 18:527-46, 2001.
21. Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407: 789-95, 2000.
22. Fisher GH, Rosenberg FJ, Straus SE et al. Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* 81:935-46, 1995.
23. Rieux-Laucat F, Le Deist F, Hivroz C et al. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* 268:1347-9, 1995.
24. Le Deist F, Emile JF, Rieux-Laucat F et al. Clinical, immunological, and pathological consequences of Fas-deficient conditions. *Lancet* 348:719-23, 1996.
25. Aspinall AI, Pinto A, Auer IA et al. Identification of new Fas mutations in a patient with autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) and eosinophilia. *Blood Cells Mol Dis* 25:227-38, 1999.
26. Lim MS, Straus SE, Dale JK et al. Pathological findings in human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Am J Pathol* 153:1541-50, 1998.
27. Xerri L, Carbuccia N, Parc P, Birg F. Search for rearrangements and/or allelic loss of the fas/APO-1 gene in 101 human lymphomas. *Am J Clin Pathol*. 1995 Oct;104(4):424-30.
28. Landowski TH, Qu N, Buyuksal I et al. Mutations in the Fas antigen in patients with multiple myeloma. *Blood* 90:4266-70, 1997.
29. Maeda T, Yamada Y, Moriuchi R et al. Fas gene mutation in the progression of adult T cell leukemia. *J Exp Med* 189:1063-71, 1999.
30. Gronbaek K, Straten PT, Ralfkiaer E et al. Somatic Fas mutation in Non-Hodgkin's lymphoma: association with extra-nodal disease and autoimmunity. *Blood* 92: 3018-24, 1998.
31. Takakuwa T, Dong Z, Nakatsuka S et al. Frequent mutations of Fas gene in nasal NK/T cell lymphoma. *Oncogene* 21:4702-5, 2002.
32. Lee SH, Shin MS, Kim HS et al. Alterations of the DR5/TRAIL receptor 2 gene in non-small cell lung cancers. *Cancer Res* 59:5683-6, 1999.
33. Boldrini L, Faviana P, Pistolesi F et al. Alterations of Fas (APO-1/CD95) gene and its relationship with p53 in non small cell lung cancer. *Oncogene* 20:6632-7, 2001.
34. Shin MS, Park WS, Kim SY et al. Alterations of Fas (Apo-1/CD95) gene in cutaneous malignant melanoma. *Am J Pathol* 154:1785-91, 1999.

35. Takayama H, Takakuwa T, Tsujimoto Y et al. Nagata S, Aozasa K. Frequent Fas gene mutations in testicular germ cell tumors. *Am J Pathol* 161:635-41, 2002.
36. Müschen G, Warskulat U, Beckmann MW. Defining CD95 as a tumor suppressor gene. *J. Mol. Med* 78:312-25, 2000.
37. Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM et al. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 276: 111-3, 1997.
38. Walczak H, Degli-Esposti MA, Johnson RS et al. TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J* 16:5386-97, 1997.
39. Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM et al. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* 277:818-21, 1997.
40. Chaudhary PM, Eby M, Jasmin A et al. Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway. *Immunity* 7:821-30, 1997.
41. Degli-Esposti MA, Dougall WC, Smolak PJ et al. The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity* 7:813-20, 1997.
42. Degli-Esposti MA, Smolak PJ, Walczak H et al. Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. *J Exp Med* 186:1165-70, 1997.
43. Emi M, Fujiwara Y, Nakajima T et al. Frequent loss of heterozygosity for loci on chromosome 8p in hepatocellular carcinoma, colorectal cancer, and lung cancer. *Cancer Res* 52:5368-72, 1992.
44. Wistuba II, Behrens C, Virmani AK et al. Allelic losses at chromosome 8p21-23 are early and frequent events in the pathogenesis of lung cancer. *Cancer Res* 59:1973-9, 1999.
45. Kagan J, Stein J, Babaian RJ et al. Homozygous deletions at 8p22 and 8p21 in prostate cancer implicate these regions as the sites for candidate tumor suppressor genes. *Oncogene* 11:2121-6, 1995.
46. El-Naggar AK, Coombes MM, Batsakis JG et al. Localization of chromosome 8p regions involved in early tumorigenesis of oral and laryngeal squamous carcinoma. *Oncogene* 16:2983-7, 1998.
47. Yaremko ML, Kutza C, Lyzak J et al. Loss of heterozygosity from the short arm of chromosome 8 is associated with invasive behavior in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 16:189-95, 1996.
48. Özören N, Fisher MJ, Kim K et al. Homozygous deletion of the death receptor DR4 gene in a nasopharyngeal cancer cell line is associated with TRAIL resistance. *Int J Oncol* 16:917-25, 2000.
49. Fisher MJ, Virmani AK, Wu L et al. Nucleotide substitution in the ectodomain of trail receptor DR4 is associated with lung cancer and head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 7:1688-97, 2001.
50. Hazra A, Chamberlain RM, Grossman HB et al. Death receptor 4 and bladder cancer risk. *Cancer Res* 63:1157-9, 2003.
51. Eggert A, Grotzer M.A., Zuzak TJ et al. Resistance to Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced Apoptosis in Neuroblastoma Cells Correlates with a Loss of Caspase-8 Expression. *Cancer Res* 61:1314-9, 2001.
52. Kim K., Fisher M.J., Xu S-Q, El-Deiry W.S. Molecular Determinants of Response to TRAIL in Killing of Normal and Cancer Cells. *Clin. Cancer Res* 6: 335-46, 2000.
53. McDonald ER 3rd, Chui PC, Martelli PF et al. Death domain mutagenesis of KILLER/DR5 reveals residues critical for apoptotic signaling. *J Biol Chem* 276:14939-45, 2001.
54. Lee SH, Shin MS, Kim HS et al. Somatic mutations of TRAIL-receptor 1 and TRAIL-receptor 2 genes in non-Hodgkin's lymphoma. *Oncogene* 20:399-403, 2001.
55. Shin MS, Kim HS, Lee SH et al. Mutations of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 (TRAIL-R1) and receptor 2 (TRAIL-R2) genes in metastatic breast cancers. *Cancer Res* 61:4942-6, 2001.
56. Wu WG, Soria JC, Wang L et al. TRAIL-R2 is not correlated with p53 status and is rarely mutated in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 20:4525-9, 2000.
57. Park WS, Lee JH, Shin MS et al. Inactivating mutations of KILLER/DR5 gene in gastric cancers. *Gastroenterology* 121:1219-25, 2001.
58. Pai SI, Wu GS, Ozoren N et al. Rare loss-of-function mutation of a death receptor gene in head and neck cancer. *Cancer Res* 59:2747-53, 1999.
59. Peli J, Schroter M, Rudaz C et al. Oncogenic Ras inhibits Fas ligand-mediated apoptosis by downregulating the expression of Fas. *EMBO J* 18:1824-31, 1999.
60. Müller M, Wilder S, Bannasch D et al. p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J Exp Med* 188:2033-45, 1998.
61. Takimoto R, El-Deiry WS. Wild-type p53 transactivates the KILLER/DR5 gene through an intronic sequence-specific DNA-binding site. *Oncogene*, 19:1735-43, 2000.
62. Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M et al. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9:1799-805, 1994.
63. Jones NA, Turner J, McIlwrath AJ et al. Cisplatin- and paclitaxel-induced apoptosis of ovarian carcinoma cells and the relationship between bax and bak up-regulation and the functional status of p53. *Mol Pharmacol* 53:819-26, 1998.
64. Oda E, Ohki R, Murasawa H et al. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 288:1053-8, 1998.
65. Ungefroren H, Voss M, Bernstorff WV et al. Immunological escape mechanisms in pancreatic carcinoma. *Ann NY Acad Sci*, 880:243-51, 1999.
66. Robles AI, Bemmels NA, Foraker AB, Harris CC. APAF-1 is a transcriptional target of p53 in DNA damage-induced apoptosis. *Cancer Res* 61:6660-4, 2001.
67. Bennett M, Macdonald K, Chan SW et al. Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science* 282:290-3, 1998.
68. Fukazawa T, Fujiwara T, Uno F et al. Accelerated degradation of cellular FLIP protein through the ubiquitin-proteasome pathway in p53-mediated apoptosis of human cancer cells. *Oncogene* 20:5225-31, 2001.
69. Fukazawa T, Fujiwara T, Morimoto Y et al. Differential involvement of the CD95 (Fas/APO-1) receptor/ligand system on apoptosis induced by the wild-type p53 gene transfer in human cancer cells. *Oncogene* 18: 2189-99, 1999.
70. Wu G.S., Burns T.F., McDonald E.R. 3rd et al. *KILLER/DR5* is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nature Genet* 17:141-3, 1997.
71. Wen J., Ramadevi N., Nguyen D et al. Antileukemic drugs increase death receptor 5 levels and enhance Apo-2L-induced apoptosis of human acute leukemia cells. *Blood* 96:3900-6, 2000.
72. Sheard MA, Vojtesek B, Janakova L et al. Up-regulation of Fas (CD95) in human p53 wild-type cancer cells treated with ionizing radiation. *Int J Cancer* 73:757-62, 1997.
73. Gibson S.B., Oyer R., Spalding A.C. et al. Increased Expression of Death Receptors 4 and 5 Synergizes the Apoptosis Response to Combined Treatment with Etoposide and TRAIL. *Mol Cell Biol* 20: 205-12, 2000.
74. Sheikh MS, Fornace AJ Jr. Death and decoy receptors and p53-mediated apoptosis. *Leukemia* 14:1509-13, 2000.
75. Nagane M, Pan G, Weddle JJ et al. Increased death receptor 5 expression by chemotherapeutic agents in human gliomas causes synergistic cytotoxicity with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vitro and in vivo. *Cancer Res* 60: 847-53, 2000.
76. Guan B, Yue P, Clayman GL, Sun SY. Evidence that the death receptor DR4 is a DNA damage-inducible, p53-regulated gene. *J Cell Physiol* 188:98-105, 2001.
77. Ravi R., Bedi G.C., Engstrom L.W. et al. Regulation of death receptor expression and TRAIL/Apo2L-induced apoptosis by NF-κB. *Nature Cell Biol*, 3:409-16, 2001.
78. Spalding AC, Jotte RM, Scheinman RI et al. TRAIL and inhibitors of apoptosis are opposing determinants for NF-kappaB-dependent, genotoxin-induced apoptosis of cancer cells. *Oncogene* 21:260-71, 2002.
79. Ouazz F., Li M., Beg A.A. A Critical Role for the RelA Subunit of Nuclear Factor κB in Regulation of Multiple Immune-response Genes and in Fas-induced Cell Death. *J Exp Med* 189: 999-1004, 1999.
80. Kuhnel F, Zender L, Paul Y et al. NFκappaB mediates apoptosis through transcriptional activation of Fas (CD95) in adenoviral hepatitis. *J Biol Chem* 275:6421-7, 2000.
81. Cheng J, Zhou T, Liu C et al. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* 263: 1759-62, 1994.
82. Tanaka M, Suda T, Haze K et al. Fas ligand in human serum. *Nat Med* 2:317-22, 1996.
83. Nagata, S. Apoptosis by death receptors. *Cell* 88:335-365, 1997.
84. Hunt JS, Vassmer D, Ferguson TA, Miller L. Fas ligand is positioned in mouse uterus and placenta to prevent trafficking of activated leukocytes between the mother and the conceptus. *J Immunol*, 158:4122-8, 1997.
85. Ferguson TA, Green DR. Fas-ligand and immune privilege: the eyes have it. *Cell Death Differ* 8:771-2, 2001.
86. Ferguson TA, Green DR, Griffith TS. Cell death and immune privilege. *Int Rev Immunol* 21:153-72, 2002.
87. Griffith T, Brunner T, Fletcher SM et al. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 270: 1189-92.
88. Sato K, Kimura F, Nakamura Y et al. An aggressive nasal lymphoma accompanied by high levels of soluble Fas ligand. *Br J Haematol* 94:379-82, 1996.
89. Hahne M, Rimoldi D, Schroter M et al. Melanoma cell expression of Fas (Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* 274: 1363-6, 1996.
90. Saas P, Walker PR, Hahne M et al. Fas ligand expression by astrocytoma in vivo: maintaining immune privilege in the brain? *J Clin Invest* 99:1173-8, 1997.
91. Niehans GA, Brunner T, Frizelle SP et al. Human lung carcinomas express Fas ligand. *Cancer Res* 57:1007-12, 1997.
92. O'Connell J, O'Sullivan G, Collins JK, Shanahan F. The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand. *J Exp Med* 184:1075-82, 1996.
93. Bennett MW, O'Connell J, O'Sullivan GC et al. The Fas counterattack in vivo: apoptotic depletion of tumor-infiltrating lymphocytes associated with Fas ligand expression by human esophageal carcinoma. *J Immunol* 160:5669-75, 1998.
94. Bennett MW, O'Connell J, O'Sullivan GC et al. Expression of Fas ligand by human gastric adenocarcinomas: a potential mechanism of immune escape in stomach cancer. *Gut* 44: 156-62, 1999.
95. Lim SC. Fas-related apoptosis in gastric adenocarcinoma. *Oncol Rep* 10:57-63, 2003.
96. Mann B, Gratchev A, Bohm C et al. FasL is more frequently expressed in liver metastases of colorectal cancer than in matched primary carcinomas. *Br J Cancer* 79:1262-9, 1999.
97. Reichmann E. The biological role of the Fas/FasL system during tumor formation and progression. *Semin Cancer Biol* 12:309-15, 2002.
98. Giordano C, Stassi G, De Maria R et al. Potential involvement of Fas and its ligand in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. *Science* 275: 960-3, 1997.

100. Chervonsky AV, Wang Y, Wong FS et al. The role of Fas in autoimmune diabetes. *Cell* 89:17-24, 1997.
101. Powell WC, Fingleton B, Wilson CL et al. The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis. *Curr Biol* 9:1441-7, 1999.
102. Suda T, Hashimoto H, Tanaka M et al. Membrane Fas ligand kills human peripheral blood T lymphocytes, and soluble Fas ligand blocks the killing. *J Exp Med* 186:2045-50, 1997.
103. Suliman A., Lam A., Datta R, Srivastava R.K. Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways. *Oncogene* 20:2122-33, 2001.
103. Tanaka M, Itai T, Adachi M, Nagata S. Downregulation of Fas ligand by shedding. *Nat Med* 4:31-6, 1998.
104. Tanaka M, Suda T, Takahashi T, Nagata S. Expression of the functional soluble form of human fas ligand in activated lymphocytes. *EMBO J* 14:1129-35, 1995.
105. Mischen M, Moers C, Warskulat U et al. CD95 ligand expression as a mechanism of immune escape in breast cancer. *Immunology* 99:69-77, 2000.
106. Hoffmann TK, Dworacki G, Tsukihito T et al. Spontaneous apoptosis of circulating T lymphocytes in patients with head and neck cancer and its clinical importance. *Clin Cancer Res* 8:2553-62, 2002.
107. Kayagaki N, Yamaguchi N, Nakayama M et al. Type I interferons (IFNs) regulate tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expression on human T cells: A novel mechanism for the antitumor effects of type I IFNs. *J Exp Med* 189:1451-60, 1999.
108. Fanger NA, Maliszewski CR, Schooley K, Griffith TS. Human dendritic cells mediate cellular apoptosis via tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *J Exp Med* 190:1155-64, 1999.
109. Griffith TS, Wiley SR, Kubin MZ et al. Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis factor-related cytokine, TRAIL. *J Exp Med* 189:1343-54, 1999.
110. Smyth MJ, Cretney E, Takeda K et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) contributes to interferon gamma-dependent natural killer cell protection from tumor metastasis. *J Exp Med* 193:661-70, 2001.
111. Cretney E, Takeda K, Yagita H et al. Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice. *J Immunol* 168:1356-61, 2002.
112. Takeda K, Smyth MJ, Cretney E et al. Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development. *J Exp Med* 195:161-9, 2002.
113. Meng RD, McDonald ER 3rd, Sheikh MS et al. The TRAIL decoy receptor TRUNDD (Dcr2, TRAIL-R4) is induced by adenovirus-p53 overexpression and can delay TRAIL-, p53-, and KILLER/DR5-dependent colon cancer apoptosis. *Mol Ther* 1:130-44, 2000.
114. Pitti RM, Marsters SA, Lawrence DA et al. Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature* 396:699-702, 1998.
115. Bai C., Connolly B., Metzker M.L et al. Overexpression of M68/Dcr3 in human gastrointestinal tract tumors independent of gene amplification and its location in a four-gene cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 200, 97: 1230-5.
116. Pan G, Ni J, Wei YF et al. An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* 277:815-8, 1997.
117. Pan G, Ni J, Yu G et al. TRUNDD, a new member of the TRAIL receptor family that antagonizes TRAIL signalling. *FEBS Lett* 424:41-5, 1998.
118. Marsters SA, Sheridan JP, Pitti RM et al. A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Curr Biol* 7:1003-6, 1997.
119. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89:309-19, 1997.
120. Emery JG, McDonnell P, Burke MB et al. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 273:14363-7, 1998.
121. Sheikh MS, Huang Y, Fernandez-Salas EA et al. The antiapoptotic decoy receptor TRID/TRAIL-R3 is a p53-regulated DNA damage-inducible gene that is overexpressed in primary tumors of the gastrointestinal tract. *Oncogene* 18:4153-9, 1999.
122. Hoken I, Croucher PI, Hamdy FC, Eaton CL. Osteoprotegerin (OPG) is a survival factor for human prostate cancer cells. *Cancer Res* 62:1619-23, 2002.
123. van Noesel MM, van Bezouw S, Salomons GS et al. Tumor-specific down-regulation of the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand decoy receptors Dcr1 and Dcr2 is associated with dense promoter hypermethylation. *Cancer Res* 62:2157-61, 2002.
124. Degli-Esposti M. To die or not to die-the quest of the TRAIL receptors. *J Leukoc Biol* 65:535-42, 1999.
125. Griffith TS, Chin WA, Jackson GC et al. Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells. *J Immunol* 161:2833-40, 1998.
126. Zhang XD, Franco A, Myers K et al. Relation of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor and FLICE-inhibitory protein expression to TRAIL-induced apoptosis of melanoma. *Cancer Res* 59:2747-53, 1999.
127. Nguyen T., Zhang X.D., Hersey P. Relative Resistance of Fresh Isolates of Melanoma to Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL)-induced Apoptosis. *Clin. Cancer Res* 7:966-73, 2001.
128. Liu B, Peng D, Lu Y et al. A novel single amino acid deletion caspase-8 mutant in cancer cells that lost proapoptotic activity. *J Biol Chem* 277:30159-64, 2002.
129. Fulda S, Kufer MU, Meyer E et al. Sensitization for death receptor- or drug-induced apoptosis by re-expression of caspase-8 through demethylation or gene transfer. *Oncogene* 20:5865-77, 2001.
131. Seol DW, Li J, Seol MH et al. Signaling events triggered by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): caspase-8 is required for TRAIL-induced apoptosis. *Cancer Res* 61:1138-43, 2001.
132. Wang J, Chun HJ, Wong W et al. Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(24):13884-8, 2001.
133. Kischkel FC, Lawrence DA, Tinel A et al. Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J Biol Chem* 276: 46639-46, 2001.
134. Shin MS, Kim HS, Kang CS et al. Inactivating mutations of CASP10 gene in non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 99:4094-9, 2002.
135. Harada K, Toyooka S, Shivapurkar N et al. Deregulation of caspase 8 and 10 expression in pediatric tumors and cell lines. *Cancer Res* 62:5897-901, 2002.
136. Thome M., Schneider P., Hofmann K et al. Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* 386:517-21, 1997.
137. Tschopp J, Irmeler M, Thome M. Inhibition of fas death signals by FLIPs. *Curr Opin Immunol* 10:552-8, 1998.
138. French LE, Tschopp J. Inhibition of death receptor signaling by FLICE-inhibitory protein as a mechanism for immune escape of tumors. *J Exp Med* 190:891-3, 1999.
139. Bullani RR, Huard B, Viard-Leveugle I et al. Selective expression of FLIP in malignant melanocytic skin lesions. *J Invest Dermatol* 117:360-4, 2001.
140. Hyer ML, Sudarshan S, Kim Y et al. Downregulation of c-FLIP sensitizes DU145 prostate cancer cells to Fas-mediated apoptosis. *Cancer Biol Ther* 1:401-6, 2002.
141. Kelly MM, Hoel BD, Voelkel-Johnson C. Doxorubicin Pretreatment Sensitizes Prostate Cancer Cell Lines to TRAIL Induced Apoptosis Which Correlates with the Loss of c-FLIP Expression. *Cancer Biol Ther* 1:520-7, 2002.
142. Guo F, Bhalla K. The FLIP Variation on the TRAIL DISC: Doxorubicin Conducts the Swan Song. *Cancer Biol Ther* 1:528-9, 2002.
143. Luo X, Budihardjo I, Zou H et al. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94:481-90, 1998.
144. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94:491-501, 1998.
145. Gross A, Yin XM, Wang K et al. Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J Biol Chem* 274:11566-63, 1999.
146. Kuwana T, Smith JJ, Muzio M et al. Apoptosis induction by caspase-8 is amplified through the mitochondrial release of cytochrome c. *J Biol Chem* 273:16589-94, 1998.
147. Adams J.M. et Cory S. The Bcl-2 Protein Family: Arbiters of Cell Survival. *Science* 281:1322-26, 1998.
148. Knight MJ, Rifkin CD, Muscat AM et al. Analysis of FasL and TRAIL induced apoptosis pathways in glioma cells. *Oncogene* 20:5789-98, 2001.
149. Fulda S, Meyer E, Debatin KM. Inhibition of TRAIL-induced apoptosis by Bcl-2 overexpression. *Oncogene* 21:2283-94, 2002.
150. Ravi R et Bedi A. Requirement of Bax for TRAIL/Apo2L-induced Apoptosis of Colorectal Cancers: Synergism with Sulindac-mediated Inhibition of Bcl-xL. *Cancer Research* 62:1583-7, 2002.
151. de Almodovar C.R., Ruiz-Ruiz C., Muñoz-Pinedo C et al. The differential sensitivity of Bcl-2-overexpressing human breast tumor cells to TRAIL or doxorubicin-induced apoptosis is dependent on Bcl-2 protein levels. *Oncogene* 20:7128-33, 2001.
152. Karin M., Cao Y., Greten F.R., Li Z.-W. NF- κ B in cancer: From innocent bystander to major culprit. *Nature Rev. Cancer* 2:301-10, 2002.
153. Wang C.-Y., Guttridge D.C., Mayo M.W. Baldwin A.S. Jr. NF- κ B Induces Expression of the Bcl-2 Homologue A1/Bfl-1 To Preferentially Suppress Chemotherapy-Induced Apoptosis. *Mol Cell Biol* 9:5923-9, 1999.
154. Erl W, Hansson GK, de Martin R et al. Nuclear factor-kappa B regulates induction of apoptosis and inhibitor of apoptosis protein-1 expression in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 84:668-77.
155. Maeda S, Yoshida H, Mitsuno Y et al. Analysis of apoptotic and antiapoptotic signalling pathways induced by *Helicobacter pylori*. *Gut* 50:771-8, 2002.
156. Kreuz S, Siegmund D, Scheurich P, Wajant H. NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling. *Mol Cell Biol* 21:3968-73, 2001.
157. Micheau O, Lens S, Gaide O, Alevizopoulos K, Tschopp J. NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP. *Mol Cell Biol* 21:5299-305, 2001.
158. Teixeira E, Garcia-Sahuquillo A, Alarcon B, Bragado R. Apoptosis-resistant T cells have a deficiency in NF-kappaB-mediated induction of Fas ligand transcription. *Eur J Immunol* 29:745-54, 1999.
159. del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, Herrera R, Nunez G. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 278:687-9, 1997.
160. Cardone MH, Salvesen GS, Widmann S, Johnson G, Frish SM. The regulation of anoikis: MEKK-1 activation requires cleavage by caspases. *Cell* 90: 315-23, 1997.
161. Brunet A, Bonni A, Zigmund MJ et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96:857-68, 1999.

162. Karin M, Delhase M. JNK or IKK, AP-1 or NF-kappaB, which are the targets for MEK kinase 1 action? *Proc Natl Acad Sci USA* 95:9067-9, 1999.
163. Sheard MA, Vojtesek B. Simian virus-40 infection inhibits DNA damage-induced enhancement of CD95 expression and function. *Oncogene* 21:190-7, 2002.
164. Arizono Y, Yoshikawa H, Naganuma H et al. A mechanism of resistance to TRAIL/Apo2L-induced apoptosis of newly established glioma cell line and sensitisation to TRAIL by genotoxic agents. *Br J Cancer* 88:298-306, 2003.
165. Eid MA, Lewis RW, Abdel-Mageed AB, Kumar MV. Reduced response of prostate cancer cells to TRAIL is modulated by NFkappaB-mediated inhibition of caspases and Bid activation. *Int J Oncol* 21:111-7, 2002.
166. Jeremias I, Kupatt C, Baumann B et al. Inhibition of nuclear factor kappaB activation attenuates apoptosis resistance in lymphoid cells. *Blood* 91:4624-31, 1998.
167. Park SY, Seol DW. Regulation of Akt by EGF-R inhibitors, a possible mechanism of EGF-R inhibitor-enhanced TRAIL-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 295:515-8, 2002.
168. Kandasamy K, Srivastava RK. Role of the phosphatidylinositol 3'-kinase/PTEN/Akt kinase pathway in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *Cancer Res* 62:4929-37, 2002.
169. O'Gorman DM, McKenna SL, McGahon AJ, Cotter TG. Inhibition of PI3-kinase sensitises HL60 human leukaemia cells to both chemotherapeutic drug- and Fas-induced apoptosis by a JNK independent pathway. *Leuk Res* 25:801-11, 2001.
170. Trauzold A., Wermann H., Arlt A et al. CD95 and TRAIL receptor-mediated activation of protein kinase C and NF-kB contributes to apoptosis resistance in ductal pancreatic adenocarcinoma cells. *Oncogene* 2001, 20: 4258-69.
171. Wilson CA, Browning JL. Death of HT29 adenocarcinoma cells induced by TNF family receptor activation is caspase-independent and displays features of both apoptosis and necrosis. *Cell Death Differ* 9:1321-33, 2002.
172. Roulston A, Reinhard C, Amiri P, Williams LT. Early activation of c-Jun N-terminal kinase and p38 kinase regulate cell survival in response to tumor necrosis factor alpha. *J Biol Chem* 273:10232-9, 1998.
173. Siegmund D., Mauri D., Peters N., Juo P et al. Fas-associated Death Domain Protein (FADD) and Caspase-8 Mediate Up-regulation of c-Fos by Fas Ligand and Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL) via a FLICE Inhibitory Protein (FLIP)-regulated Pathway. *J Biol Chem* 276:32585-90, 2001
174. Beg AA, Baltimore D. An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science* 274:782-4, 1996.
175. Vercaammen D, Brouckaert G, Denecker G et al. Dual signaling of the Fas receptor: initiation of both apoptotic and necrotic cell death pathways. *J Exp Med* 188:919-30, 1998.
176. Matsumura H, Shimizu Y, Ohsawa Y et al. Necrotic death pathway in Fas receptor signaling. *J Cell Biol* 151:1247-56, 2000.
177. Holler N, Zaru R, Micheau O, Thome M, Attinger A, Valitutti S, Bodmer JL, Schneider P, Seed B, Tschopp J. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol* 1:489-95, 2000.
178. Kitanaka C, Kuchino Y. Caspase-independent programmed cell death with necrotic morphology. *Cell Death Differ* 6:508-15, 1999.
179. Chang HY, Nishitoh H, Yang X et al. Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by the adapter protein Daxx. *Science* 281:1860-3, 1998.
180. Charette SJ, Landry J. The interaction of HSP27 with Daxx identifies a potential regulatory role of HSP27 in Fas-induced apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* 926:126-31, 2000.
181. Lee MW, Park SC, Kim JH et al. The involvement of oxidative stress in tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in HeLa cells. *Cancer Lett* 182: 75-82, 2002.
182. Siervo-Sassi RR, Marrangoni AM, Feng X et al. Physiological and molecular effects of Apo2L/TRAIL and cisplatin in ovarian carcinoma cell lines. *Cancer Lett* 190:62-71, 2003.
183. Keane M.M., Ettenberg S.A., Nau M.M et al. Chemotherapy Augments TRAIL-induced Apoptosis in Breast Cell Lines. *Cancer Res* 59:734-41, 1999.
184. Lacour S., Hammann A., Wotawa A et al. Anticancer Agents Sensitize Tumor Cells to Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand-mediated Caspase-8 Activation and Apoptosis. *Cancer Res* 61:1645-54, 2001.
185. Belka C, Schmid B, Marini P et al. Sensitization of resistant lymphoma cells to irradiation-induced apoptosis by the death ligand TRAIL. *Oncogene* 20:2190-6, 2001.
186. Leslie NR, Downes CP. PTEN: The down side of PI 3-kinase signalling. *Cell Signal* 14:285-95, 2002.
187. Encinas M, Iglesias M, Llecha N, Comella JX. Extracellular-regulated kinases and phosphatidylinositol 3-kinase are involved in brain-derived neurotrophic factor-mediated survival and neurogenesis of the neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *J Neurochem* 73:1409-21, 1999.
188. Krystal GW, Sulanke G, Litz J. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt signaling blocks growth, promotes apoptosis, and enhances sensitivity of small cell lung cancer cells to chemotherapy. *Mol Cancer Ther* 1:913-22, 2002.
189. Peles E, Bacus SS, Koski RA et al. Isolation of the neu/HER-2 stimulatory ligand: a 44 kd glycoprotein that induces differentiation of mammary tumor cells. *Cell* 69:205-16, 1992.
190. Poulaki V, Mitsiades CS, Kotoula V et al. Regulation of Apo2L/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in thyroid carcinoma cells. *Am J Pathol* 161:643-54, 2002.
191. Cuello M, Ettenberg SA, Clark AS et al. Down-regulation of the erbB-2 receptor by trastuzumab (herceptin) enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in breast and ovarian cancer cell lines that overexpress erbB-2. *Cancer Res* 61:4892-900, 2001.
192. Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R et al. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* 364:806-9, 1993.
193. Schneider P, Holler N, Bodmer JL et al. Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J Exp Med* 187:1205-13, 1998.
194. Walczak H., Miller R.E., Ariail K et al. Tumorocidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nature Med* 5:157-63, 1999.
195. Takeda K, Smyth MJ, Cretney E et al. Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in NK cell-mediated and IFN-gamma-dependent suppression of subcutaneous tumor growth. *Cell Immunol* 214:194-200, 2001.
196. Ashkenazi A, Pai RC, Fong S et al. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest* 104:155-62, 1999.
197. Jo M, Kim TH, Seol DW et al. Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Nat Med* 6:564-7, 2000.
198. Nitsch R, Beschmann I, Deisz RA et al. Human brain-cell death induced by tumour-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Lancet* 356:827-8, 2000.
199. Nagane M., Huang H.-J.S, Cavene W.K. The potential of TRAIL for cancer chemotherapy. *Apoptosis* 6:191-7, 2001.
200. Lawrence D, Shahrokh Z, Marsters S et al. Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions. *Nat Med* 7:383-5, 2001.
201. El-Deiry W.S. Insights into cancer therapeutic design based on p53 and TRAIL receptor signaling. *Cell Death Differ* 8:1066-75, 2001.
202. Ichikawa K, Liu W, Zhao L et al. Tumorocidal activity of a novel anti-human DR5 monoclonal antibody without hepatocyte cytotoxicity. *Nat Med* 7:954-60, 2001.
203. Özören N., Kim K., Burns T.F. et al. The Caspase 9 Inhibitor Z-LEHD-FMK Protects Human Liver Cells while Permitting Death of Cancer Cells Exposed to Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand. *Cancer Res* 60:6259-65, 2000.
204. Snell Y, Clodi K, Zhao S et al. Activity of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in haematological malignancies. *Br J Haematol* 99:618-24, 1997.
205. Zamai L, Ahmad M, Bennett IM et al. Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *J Exp Med* 88:2375-80, 1998.
206. Kayagaki N, Kawasaki A, Ebata T et al. Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. *J Exp Med* 182:1777-83, 1995.
207. Moers C, Warskulat U, Mischen M et al. Regulation of CD95 (Apo-1/Fas) ligand and receptor expression in squamous-cell carcinoma by interferon-gamma and cisplatin. *Int J Cancer* 80:564-72, 1999.
208. Varela N, Munoz-Pinedo C, Ruiz-Ruiz C et al. Interferon-gamma sensitizes human myeloid leukemia cells to death receptor-mediated apoptosis by a pleiotropic mechanism. *J Biol Chem* 276:17779-87, 2001.
209. Chawla-Sarkar M, Leaman DW, Jacobs BS, Borden EC. IFN-beta pretreatment sensitizes human melanoma cells to TRAIL/Apo2 ligand-induced apoptosis. *J Immunol* 169:847-55, 2002.
210. Coiffier B, Lepage E, Briere J et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 346:235-42, 2002.
211. Ligibel JA, Winer EP. Trastuzumab/chemotherapy combinations in metastatic breast cancer. *Semin Oncol* 29:38-43, 2002.
212. Zhou BP, Hu MC, Miller SA et al. HER-2/neu blocks tumor necrosis factor-induced apoptosis via the Akt/NF-kappaB pathway. *J Biol Chem* 275:8027-31, 2000.
213. Sheard MA, Uldrijan S et Vojtesek B. Role of p53 in Regulating Constitutive and X-radiation-Inducible CD95 Expression and Function in Carcinoma Cells. *Cancer Res* 64:3:***-***, 2003.