

Apoptózis és a daganatok

Kopper László

Semmelweis Egyetem, I. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Budapest

Krompecher emlékérem tulajdonosának lenni nagy megtiszteltetés. Egyrészt a nagy előd, Krompecher Ödön miatt, aki a hazai patológusok közül a nemzetközileg is legismertebb tettet hajtotta végre a 20. század elején a bazocelluláris rák (basalioma) leírásával. Máig is rejtély a daganattípus klinikai viselkedése, az invazív képesség mellett a ritka metasztázálás, ami önmagában jelzi, hogy a daganat progressziójának e két meghatározó eseménye feltehetően eltérő módon szabályozódik. Másrészt, természetesen, megtiszteltetés a szakma elismerése, amit ezúton is köszönök. A következőkben olyan témáról szólnék, ami az utóbbi évek biomedicinális kutatásainak, a betegségek kialakulása megértésének egyik izgalmas kérdése: a programozott sejthalál, azaz az apoptózis. Magát a jelenséget kevesen vonják kétségbe, a betegségmeghatározó vagy terápiát alapvetően befolyásoló szerepét azonban igen. (Bár ez itt nem a reklám helye, mégis utalnék a Medicina könyvkiadónál nemrég megjelent „Apoptózis” c. könyvre azoknak, akik e területről valóban többet szeretnének tudni; most csak néhány kiragadott részletről lesz szó.(1)) A magam részéről a hívőket támogatom, azzal, hogy igen sok nyitott kérdés vár még megválaszolásra. A következőkben az apoptózis és a daganatkeletkezés, valamint az apoptózis és a daganatterápia kapcsolatáról szólok részletesebben. Előbb azonban tekintsük át - ha vázlatosan is - az apoptózis mechanizmusát.

Az apoptózisról általában

A sejttrendszerek működését szabályozó egyik legfontosabb mechanizmus a program szerinti sejthalál, az apoptózis. Ez távolítja el a feleslegessé vált vagy a károsodott sejteket, megakadályozva többek között azt, hogy a genetikai állományukban hibát hordozó sejtek szaporodjanak. Minden olyan tényező, amely az apoptózis ellen hat, potenciálisan a daganatkeletkezést elősegítőnek tekinthető, hiszen a sejthalál elmaradásával megnő az esélye annak, hogy a sejtek génhibáikkal együtt felhalmozódjanak. A daganatok esetében két ok vezethet ahhoz, hogy az apoptózis programja nem tud

érvényesülni: (a) a program hibás (valamelyik résztvevő működészavara miatt) vagy (b) a program gátlás alatt áll (pl. a túlélési faktorok túlermelése miatt). Az előbbi esetben a hiba kijavításával, az utóbbi esetben a túlélési faktor eltávolításával a gátolt program – elvileg – újból működtethető. Valószínű, hogy a daganatok keletkezéséhez mind a sejtproliferációt, mind a sejthalált szabályozó rendszernek el kell romlania, és fordítva, a terápiának nemcsak a proliferációt kell gátolnia, hanem képesnek kell lennie az apoptózis indukálására is. Mindez persze általánosságban igaz, az egyes daganattípusok, ezen belül egyes daganatok esetében a hangsúlyok eltérőek lehetnek. (Ne feledkezzünk el arról, hogy a daganatok biológiai viselkedése több, mint a proliferáció és az apoptózis zavarára, ezt a terápiának is figyelembe kell venni; gondoljunk pl. az invázió, az angiogenezis, a metasztázálás eseményeire.)

Az apoptózist a patológusok már régen ismerik, morfológiailag igen hasonló lehet a nekrosis során megfigyelt piknózishoz, de a nekrotizálól való elkülönítése alig három évtizedes. Morfológiai jellegzetességei közé tartoznak: a citoplazma-kitüremkedések (blebek) megjelenése, a sejt zsugorodása, a kromatin kondenzációja a sejtmagmembrán mentén (marginizáció), a lebontott sejtkomponensek membránokba csomagolása (apoptotikus testek). Metszetekben, HE-festéssel elsősorban az utóbbiakat lehet jól megfigyelni (1. ábra). Az apoptotikus sejt maradványait a környező makrofágok vagy parenchymasejtek bekebelezik, lebontják, anélkül, hogy a sejtalkotórészek a környezetbe kerüljenek. Ezért a nekrotikus sejtekkel ellentétben az apoptózis nem vált ki gyulladást, bár a fagocitáló sejteket aktiválhatja és így az immunrendszert stimulálhatja. Ha az inzultus erősebb, akkor a nekrotizálhoz hasonló jelenségek is felléphetnek: sejtduzzadás, a sejtmembrán korai károsodása (másodlagos nekrosis). Feltételezések szerint az apoptózis és a nekrosis bekövetkezését az határozza meg, hogy a sejtben a sejtpusztulás programjához elegendő ATP áll-e rendelkezésre. Ha igen, akkor apoptózis következik be; a sejtmembrán és a sejtorganellumok egy ideig még működőképesek, ha nem, akkor nekrosis lép fel; a sejtmembrán károsodása nyomán az elhalt sejt alkotórészei a környezetbe jutnak – ami a gyulladást okozó sejtek megjelenését provokálja.

Az apoptózis mechanizmusában – más sejtválaszhoz hasonlóan – jelátviteli utak működnek. Az apoptózist kiváltó külső jelek általában a halál-ligand/halálreceptor-utat, a sejtben keletkező je-

Közlésre érkezett: 2003. április 29.
Elfogadva: 2003. május 18.

Levelezési cím: Dr. Kopper László, Semmelweis Egyetem,
I. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet,
1085 Budapest, Üllői út 26. Telefon/Fax: 317-0891

lek a mitokondriális utat választják (1. táblázat). A szabályozásnak, mint látni fogjuk, nemcsak elősegítői, hanem gátlói is vannak (ahogy ez egy tisztességes szabályozó mechanizmustól elvárható.) Mielőtt mindkettőről szólnok néhány szót, meg kell említenem, hogy az apoptózis, valamint a sejtbe kerülő anyagok és a sejtalkatrészek lebontásával foglalkozó más rendszerek (lizoszómális rendszer, ubikvitin-proteasóma rendszer) közötti kapcsolatról még nem sokat tudunk.

Mégeggy megjegyzés: az apoptózis jeleit szállítók és a döntést kivitelező molekulák között taláunk igen sok olyat, amelyeket a sejtproliferáció szabályozása során ismertünk meg (pl. p53, pRB, MYC, RAS stb.), jelezve, hogy a sejt kulcsfontosságú válaszreakcióinak szabályozása számos ponton összefügg. Néha az összefüggés igen sajátos. Pl. a pRB (retinoblasztoma-fehérje) gátolni képes mind a sejtproliferációt, mind az apoptózist. A kaszpázok azonban képesek úgy hasítani a pRB-t, hogy a keletkezett forma az apoptózist segítse elő.

A halálligand-halálreceptor-út

A halálreceptorok az apoptózis evolúciójának legmagasabb szintjén – az emlőssejtekben – jelen-

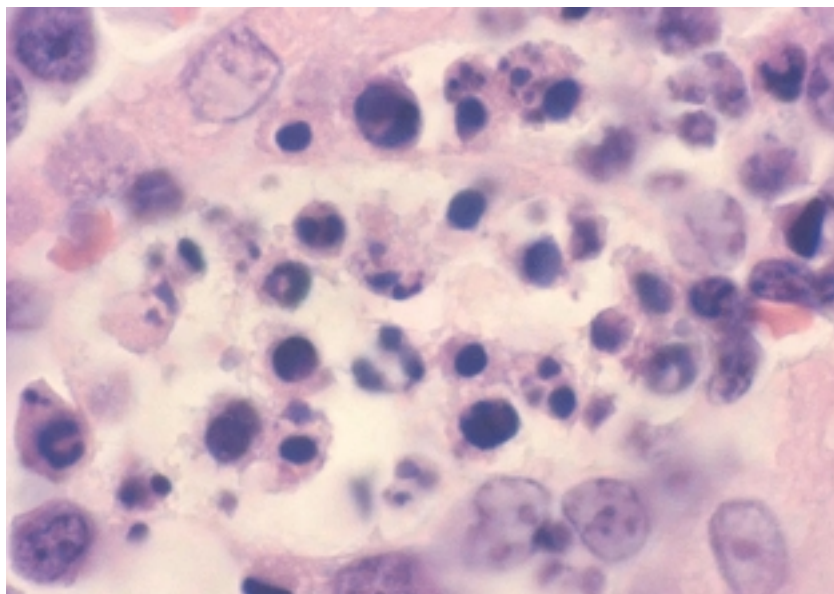
nek meg. A halálligandok olyan citokinek, amelyek a specifikus halálreceptorokkal való kapcsolódás után az arra érzékeny sejtek apoptózisát indítják el. Olyan receptor- és ligandcsaládról, illetve ezekhez kapcsolódó jelátviteli mechanizmusokról van szó, amelyek lehetővé teszik, hogy a sejt egy másik sejtnek – vagy saját magának – azt a parancsot adja, hogy pusztítsa el önmagát („instruktív” apoptózis); ami a kiváltó okot tekintve eltér a sejtkárosodás vagy a növekedésfaktor-megvonás kiváltotta sejthaláltól.

Receptorok és ligandjaik. A halálreceptorok a tumornekrózisfaktor-receptorok családjába tartozó transzmembrán glikoproteinek, melyek intracitoplazmatikus részén található a jeltovábbítást felelős haláldomén. A család tagjai az ún. ál-halálreceptorok [csalétek (decoy) receptorok] is, amelyek homológiát mutatnak a valódiakkal, azonban a haláldoménjük hiányzik vagy hiányos, így bár képesek megkötni a halálligandokat, nem közvetítik a jelet a sejt belseje felé. Jelentőségük az, hogy a halálligandok elvonásával csökkentik a valódi halálreceptorok aktiválódásának – és így a sejt pusztulásának – esélyét. Hasonló szerepet játszanak a halálreceptorok szolúbilis formái, amelyek vagy proteolitikus hasítással jönnek létre, vagy a génről átíródó alternatív mRNS olyan fehérjét kódol, amelynek nincs transzmembrán része. A szolúbilis receptorok a sejten kívül képesek kötődni a ligandokhoz, csökkentve a halálreceptorok aktiválásának esélyét. A halálligandok is transzmembrán fehérjék, melyeket elsősorban mátrixmetalloproteázok (MMP) hasítanak le a sejt felszínéről. A halálligandok membránkötött és szolúbilis formáinak biológiai viselkedése eltérő lehet.

A halálligand-halálreceptor-úton az apoptózis szabályozása történhet a halálligandok expressziójának és/vagy a receptorokat expresszáló sejtek érzékenységének a befolyásolásával. A TNFR1 és a FAS sok szövetben jelen van; viszont a ligandok (TNF, FASL) csak néhány sejttypusban, illetve csak stressz hatására expresszálódnak. Más ligandok (pl. a TRAIL- és a DR3L-mRNS) szinte az egész szervezetben kimutathatók, ezért ezekre a halálligandokra csak kevés normális szövet érzékeny.

Szignálkomplex és adapter fehérjék. A halálliganddal aktivált receptorok intracelluláris haláldoménjei és a hozzájuk kapcsolódó adapterfehérjék képezik az apoptózist indukáló szignálkomplexet (DISC: death initiation signal complex). A TNF-receptorcsaládhoz kapcsolódó jelátvivő fehérjék két jellegzetes szerkezeti egységgel rendelkeznek: a TNF-receptort kötő fehérjedomén (TRAF: TNF receptor associated factor) és a haláldomén (DD: death domain). A jelátvitelt segítő leggyakoribb adapter fehérje a FADD (FAS associated death domain) és a TRADD (TNF receptor associated death domain). A FADD egyik fehérjedoménje – a CARD (caspase recruiting domain) fehérjecsaládba tartozó – haláleffektordomén (DED: death effector domain). Ezek teszik lehetővé az adapterfehérjék kaszpázokhoz, illetve a kaszpázok egymáshoz történő kapcsolódását. A halálreceptor-úton a leggyakoribb „jelindító” (iniciá-

1. ábra.
Apoptózis daganatban
(HE festés)



1. táblázat. Az apoptózist kiváltó jelutak

Külső stimulusra aktiválódó jelút	A jelutak lépcsői	Belső stimulusra aktiválódó jelút
Halálligandok	Stimulus	p53, ROS, NO, ceramid
Halálreceptorok	Szenzor	Mitokondriummembrán- permeabilitás
DISC	Jeltovábbítók, adapterek (+,-)	Adapterek (+,-)
Iniciátor kaszpáz (kaspáz-8)	Effektor	Iniciátor kaszpáz (kaspáz-9)
Effektor kaszpázok	Effektor Kaspázszubsztrátok Apoptózis	Effektor kaszpázok

tor) kaszpáz a kaszpáz-8 (bizonyos esetekben a kaszpáz-10). A DISC-ben a prokaspáz-8 autokatalitikusan aktiválódik, illetve az aktív kaszpáz-8 proteolitikusan aktivál újabb prokaspáz-8-molekulákat, öngerősítő enzimkaspázkat indítva el.

A szignálkomplexbe más molekulák is tartoznak, amelyek gátolják vagy serkentik a halálreceptorok apoptózist indukáló hatását, illetve alternatív jelutakat indíthatanak el. Ebből következik, hogy a halálreceptor jelenléte nem feltétlenül jelenti a sejt adott halálliganddal szembeni érzékenységet. A gátlófehérjék közé tartozik pl. a receptorokhoz kapcsolódó SODD (silencer of death domain), vagy a c-FLIP (c: celluláris; FLICE inhibitory protein), amely a kaszpáz-8-cal nagyfokú homológiát mutat, azzal komplexet képez, és így azt gátló fehérje. (A FLIP aktív centrumából a kaszpázműködéshez nélkülözhetetlen ciszteinrész hiányzik.)

Jelátviteli utak. A halálreceptorok és a halálligandok kapcsolódása után a közvetítőfehérjéken keresztül – részben az iniciátor kaszpázok részvételével – több jelátviteli út aktiválódhat: az NF- κ B aktivációs kaszkád, a MAP-kinázoké, a ceramid és az aktív gyökök képződésével aktiválódó út, amelyek vagy az effektor kaszpázokat aktiválják, vagy a túlélési jeleket erősítik. (A kaszpázokon kívül ezek az utak más sejtfunkciókért is felelősek lehetnek.) Fontos, hogy a halálligandok önmaguk és egymás expresszióját is fokozhatják és ezzel az apoptotikus jelek öngerősítését képesek indukálni. (Általában ebben az esetben is igaz, hogy a jelek ellentétes sejtválaszt is képesek indukálni, függően a sejt aktuális állapotától, az éppen jelenlevő – és működő – molekuláktól.)

Az NF- κ B transzkripciós faktor, amely gátlójától, az I κ B-től (inhibitor of κ B) megszabadulva bejut a sejtmagba. Számos gén promoterében megtaláljuk a kötőhelyét, azonban az NF- κ B hatására kialakuló biológiai válasz sejttypustól függően eltérő lehet, illetve függ más transzkripciós faktorok együttes jelenlététől. Az NF- κ B aktivációja fokozhatja a sejtek apoptotikus hatásokkal szembeni rezisztenciáját, pl. elősegítve az apoptózist gátló BCL-X_L és cIAP2 fehérjék expresszióját. A szabályozás fontos eleme, hogy a kaszpáz-8 proteolitikusan inaktíválhatja az NF- κ B-t aktiváló fehérjét (RIP, NIK). A kaszpáz-8 aktivációja eldöntheti tehát a sejt sorsát, ami lehet a kaszpázkaszkád révén bekövetkező sejthalál, de lehet az NF- κ B irányította génexpresszió, és ennek következtében a sejt túlélése is.

A MAP-kináz-kaszkád a ceramidhoz hasonlóan a sejt általános stresszválasz-rendszere. A sejtek JNK-aktivációra adott válasza a sejttypustól és más stimulusok, környezeti faktorok jelenlététől függően lehet apoptózis, proliferáció vagy valamilyen differenciált működés. A JUN-kinázok és a ceramidrendszer közötti kapcsolat létrehozásában szerepe van a RAC1 G-proteinnek. A ceramid aktiválja a RAC1-et, ez pedig a MEKK1-kinázon keresztül a JNK/SAPK kaszkádot. Nagyon fontos kapcsolatot jelent a DNS-károsodás és a halálreceptor okozta apoptózis között az, hogy a DNS-károsító szerek, illetve az UV-sugárzás hatá-

sára aktiválódó JNK az AP-1-en keresztül fokozza a FASL és más halálligandok expresszióját. A reaktív szabadgyökök hatására a SAPK2/p38 aktiválja a BID-et, elősegítve a mitokondriummembrán depolarizációját.

A ceramid képződhet szfingomielinből szfingomielináz hatására (pl. membránkárosodás után), illetve de novo, a ceramid-szintetáz segítségével. A ceramid nem idézi elő közvetlenül a mitokondriummembrán depolarizációját, viszont a Golgi-apparátusban a ceramidból képződő GD3-gangliozid igen. Közvetett proapoptotikus mechanizmus az, amikor a ceramid gátolja a sejt túléléséért felelős AKT-ot (amelyik foszforilál és ezáltal gátol számos proapoptotikus molekulát).

Az oxigéntartalmú reaktív gyökök (ROS: reactive oxygen species) felhalmozódása elsősorban a lipidek és más makromolekulák károsításával idézhet elő sejthalált, de szubtoxikus koncentrációban jelátvivőként is viselkedhet. A sejtben a ROS elsődleges forrása a mitokondrium. A légzési lánc reakciói során szuperoxidgyökök képződnek, amelyeket a szuperoxid-dizmutáz hidrogén-peroxiddá alakít át. A hidrogén-peroxidot a glutation-peroxidáz és a kataláz semlegesítheti. A hidrogén-peroxidból azonban rendkívül agresszív hidroxilgyökök keletkezhetnek. A ROS-képző szerek hatása, valamint az intracelluláris antioxidánsok hiánya apoptózist válthat ki. Ugyanakkor az apoptózis során a mitokondriumból nagy mennyiségű ROS szabadul fel. Bizonyos citotoxikus szerek (pl. doxorubicin) adásakor a mitokondriumban képződő ROS okozza a sejt halálát.

A nitrogén-monoxid (NO) is igen reaktív vegyület, melynek jelátvivő szerepe közismert. A sejtben a nitrogén-oxid-szintetázok (NOS) termelik, ezek közül kettő (eNOS és nNOS) számos sejttypusban állandóan jelen van. Az NO pro- és antiapoptotikus hatására egyaránt van példa. Apoptózist úgy gátolnak, hogy a kaszpázok aktív centrumában lévő ciszteint az NO nitrozilálja és ezzel inaktíválja.

A mitokondriális út

A mitokondrium központi szerepet játszik az eukarióta sejtek életében és halálában is. Azt már régóta tudjuk, hogy a nekrozisként ismert sejtelhalást az ATP-hiány, a mitokondrium károsodása, az oxidatív foszforiláció elégtelensége okozza, illetve kíséri. Ezzel ellentétben az apoptózishoz energiára van szükség, és ezt a mitokondriumnak kell szolgáltatnia. Hogyan lehet érintett a mitokondrium az apoptózisban?

Az apoptózist kiváltó – elsősorban a sejtben keletkezett – proapoptotikus jelekre a mitokondriummembránon átmeneti permeabilitását fokozó pórusok keletkeznek és ezeken keresztül számos fehérje hagyja el a mitokondriumot. A mitokondriummembrán átjárhatóságának szabályozásában fontos szerepet játszanak a BCL-2 család tagjai, a VDAC (feszültségfüggő anioncsatorna), és az ANT (adeninnukleotid-transzlokátor). Valószínű, hogy pl. a BCL-X_L zárja, a BAX pedig nyitja a VDAC pórust.

A mitokondriumból kikerülő egyik leghatékonyabb proapoptotikus fehérje a citokróm-c, amely a citoplazmában az APAF-1-gyel, valamint a dATP-vel vagy az ATP-vel és a prokaspáz-9-cel együtt alkotja az apoptoszómát. Ennek a nagy enzimkomplexnek a feladata a prokaspáz-9 aktiválása és ezen keresztül a kaspázkaskád elindítása. Nemrég kiderült, hogy számos prokaspáz (-2, -3, -9) a mitokondriumban is előfordul, és a PTP megnyílása után kerül ki a citoszolba. A mitokondriumból szabadul ki az oxidoreduktáz aktivitással rendelkező apoptózisindukáló faktor (AIF) is, melynek hatására mitokondriummembrán-depolarizáció, citokróm-c-kiszabadulás, a sejtmagban a kromatin kondenzációja, valamint a plazmamembrán foszfatidilserinjeinek a külső lipidrétegbe vándorlása tapasztalható. Valószínű, hogy kaspáz- és BCL-2-független folyamatról van szó. A mitokondriumból más proapoptotikus fehérjék is kiszabadulnak: pl. a SMAC (Diablo) vagy az OMI (HTRA2), amelyek az IAP-okhoz kötődve azok kaspázgátló tulajdonságát felfüggeszthetik. Az OMI szerin-proteáz és feltehetően a kaspáz-független sejthalálhoz is hozzá tud járulni.

A BCL-2-fehérjecsald – amely pro- és antiapoptotikus tagokból áll – névadója az antiapoptotikus BCL-2 (BCL: B cell lymphoma; 18q21), amelyet a B-sejtes follikuláris lymphomákban előforduló transzlokáció felismerésekor azonosítottak (t:14;18). A BCL-2-család tagjai általában a különböző sejtorganellumok (mitokondrium, endoplazmás retikulum és a sejtmag) membránjában helyezkednek el. Néhányuk (BID, BAX, BAD) a citoplazmában található és csak megfelelő stimulus hatására vándorol valamelyik sejtorganellum – általában a mitokondrium – külső membránjába. Ezek a fehérjék az apoptózist serkentő vagy gátló hatásukat többnyire a citokróm-c mitokondriumból való kiáramlásának szabályozása révén fejtik ki. A BCL-2-család fehérjeinek mindegyike tartalmazza a BCL-2-homológ fehérjedoménnek egyikét (BH1–BH4). Az antiapoptotikus tulajdonsággal rendelkezőknek általában legalább három BH doménjük van. A BCL-2 és BCL-X_L fehérjék antiapoptotikus hatása nagyrészt úgy érvényesül, hogy a proapoptotikus ta-

gokkal heterodimereket alkotnak, így azok pórusformálásra képtelenné válnak. Ugyanez fordítva is igaz: a proapoptotikusok az antiapoptotikusokhoz kapcsolódva inaktívvá válhatnak azokat. A pro- és antiapoptotikus fehérjék aktuális arányát – és ezzel a mitokondrium-út aktiválását – a családtagok termelődését befolyásoló jelek szabályozzák. Az antiapoptotikus tagokban a gátlásért, a proapoptotikus fehérjékben a sejthalál kiváltásáért a BH3 domén felelős. Vannak olyan proapoptotikus tagok (pl. BID, BIK, BAD), melyek csak BH3 doménnel rendelkeznek.

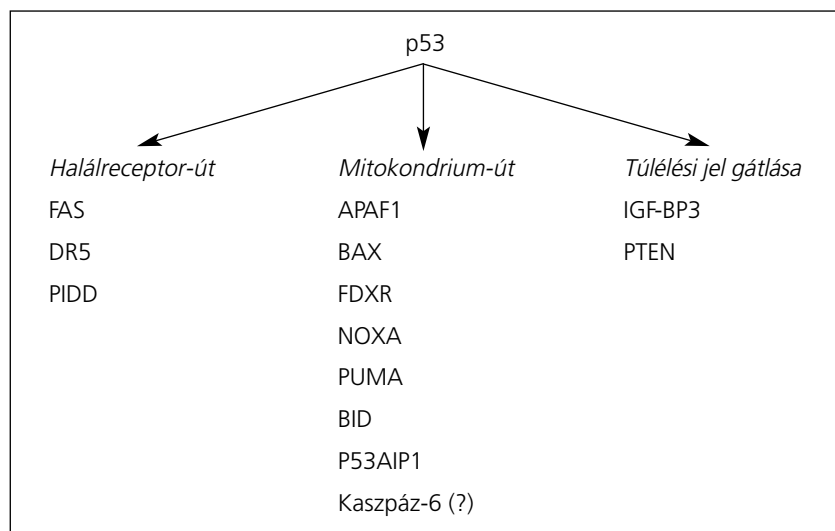
A sejtben keletkező proapoptotikus jelek közé sorolható a már említettek mellett a p53, amely nemcsak a mitokondrium-út egyes elemeit befolyásolja, hanem a halálreceptor-utat is, a túlélési jeleket pedig képes gátolni (2. táblázat). A p53 központi szerepet játszik az apoptózis indukciójában, akkor, amikor a sejt nem képes a DNS-ben keletkezett károsodásokat kijavítani. Ebből következik, hogy a p53-út zavara, melyet mind a p53 mutációja, mind a vad típusú p53 inaktíválása okozhat (az ok lehet: mutáns p53, HDM2, vírusfehérjék), az apoptózis indukálhatóságának csökkenéséhez vezet. Az emlőrákok 70%-ában a vad típusú p53 hatása az ASPP (apoptosis stimulating protein of p53) hiánya miatt nem érvényesül. Az ASPP elősegíti a p53 kötődését és transzaktivációs funkcióját a proapoptotikus gének promoterein (ezzel a p53 proapoptotikus hatását), de a proliferáció p53-függő lépéseit nem befolyásolja. (Részletkérdés, hogy pl. az ionizáló sugárzás okozta p53-függő apoptózishoz a tímuszban szükség van a DR5 halálreceptor indukciójára, míg a lépben nincsen – tehát a hatás szervenként is eltérő lehet.)

A kaspázkaskád és gátlói

Iniciátor és végrehajtó kaspázok. Az apoptózis jelátviteli, majd végrehajtó szakaszában fontos szerepet játszanak a kaspázok (aszparaginsav mellett hasító proteázok). Degradatív enzimsajátságaik miatt a kaspázok prokaspázok formájában találhatók – elsősorban – a sejtek citoplazmájában. Az „érett” kaspázok heterotetramer szerkezetűek (heterodimerek homodimerjei); két nagy és két kis alegységből állnak. A további adaptermolekulák megkötésére alkalmas DED-ek kettőződése formájában találhatók a prokaspáz-8-ban és -9-ben. Az CARD a kaspáz-1-, -2-, -4-, és -9-ben fordul elő és az aktivációban játszik szerepet.

A kaspáz-8 és -9 a leggyakoribb ún. iniciátor kaspáz, amely a jelátviteli úton elindítja a kaspázkádát, míg a legfontosabb végrehajtó kaspáz a kaspáz-3 (segítői: a kaspáz-6 és -7). A kaspáz-3 igen sok szubsztráttal rendelkezik, ezek részben struktúrfehérjék, részben olyan enzimek, amelyek aktiválásuk után résztvesznek a sejt lebontásában. Az utóbbiak közé tartozik pl. a kaspáz-2, -6, -8 és -10, valamint az ICAD/CAD komplexből felszabadított DNáz (CAD), amely a DNS-fragmentáció egyik kulcsenzime. (Megemlítendő, hogy a kaspázokon kívül – leggyakrabban a citotoxikus sejtek által termelt – granzim B proteáz is aszparaginsav mellett hasít, képes apoptózist is

2. táblázat.
A p53 által aktivált
gének/géntermékek



indukálni. A sejtbe való bejutását a pórusképző porin segíti elő.)

A kaszpázok gátlói közül említettem már a FLIP-et, amely főleg a kaszpáz-8 hatását függeszti fel. Újabb adatok szerint a kaszpáz-8 és a FLIP szintje közötti egyensúly dönti el, hogy a sejt érzékeny-e a halálreceptor-úton érkező apoptotikus jelre vagy sem. A helyzetet bonyolítja, hogy a FLIP dimerizációja nem gátolja, hanem serkenti a kaszpáz-8-at. A kaszpáz-3 és -9 legfontosabb gátlói az IAP (inhibitor apoptosis protein) család tagjai: XIAP, cIAP1, cIAP2, livin, survivin. Minden IAP fehérje szerkezetében találunk legalább egy kb. 70 aminosavat tartalmazó BIR (baculovirus IAP repeat) domént, ez szükséges az antiapoptotikus hatásához. Az IAP fehérjéket egyrészt az ubikvitinálás, másrészt az endogén IAP-gátlók (pl. SMAC, OMI) hatástalanítják. Számos humán daganatban mutatták ki az IAP-család egyes tagjainak fokozott expresszióját. (A neurológiai betegségek közül a spinális muscularis atrophia-ban az antiapoptotikus NAIP (neuronal apoptosis inhibitor protein) és a BCL-2 hatását fokozó SMN hiánya felelős a neurodegenerációért.)

Apoptózisgátlók lehetnek bizonyos hősokkfehérjék is. A HSP27 a halálreceptor-úton a DAXX fehérjéhez kötődve gátolja annak proapoptotikus hatását. A mitokondriális úton a mitokondrium-ból kikerülő citokróm-c-hez kapcsolódik, így az nem tud az APAF-1-hez kötődni, és elmarad a prokaspáz-9 aktiválódása. A HSP70 és HSP90 támadáspontja nem a citokróm-c, hanem az APAF-1. A HSP70 kompetitív módon gátolja az APAF-1 prokaspáz-9-hez kapcsolódását. A HSP90 az APAF-1 citokróm-c-függő oligomerizációját gátolja. A HSP90 közvetetten is gátolhatja az apoptotikus programot, úgy, hogy stabilizálja az AKT foszforilált formáját. Fordítva: HSP90 hiányában az AKT defoszforilálódik és nem tudja foszforilálni – azaz inaktíválni – sem a BAD, sem a prokaspáz-9 fehérjét.

I. és II. típusú sejtek

A halálreceptorokon keresztüli apoptózisindukció mechanizmusában a sejtek között eltérések lehetnek. Erre több magyarázat is lehetséges: (a) bizonyos sejtekben az apoptózis beindításához elegendő mennyiségű DISC képződik és kaszpáz-8 aktiválódik (I. típusú sejtek), de előfordulhat az is, hogy az aktiválódó kaszpáz-8 mennyisége nem elég, ezért jelerősítő mechanizmusra, pl. a mitokondriális út bekapcsolására van szükség (II. típusú sejtek); (b) egy másik feltételezés szerint a II. típusú sejtekben az antiapoptotikus IAP fehérjék gátlás alatt tartják a végrehajtókaspázokat (2. ábra). A mitokondriális depolarizáció során a mitokondriumból felszabaduló SMAC (Diablo) fehérje leválasztja az IAP fehérjéket a kaszpázokról, felszabadítva azokat a gátlás alól. Az említett két jelút a FAS-receptorra vonatkozik, azonban hasonlóan továbbítja az apoptózisszignálokat. A fentiek azt is bizonyítják, hogy az apoptózis két útja sok esetben egymást erősítheti.

Apoptózis és a daganatok keletkezése

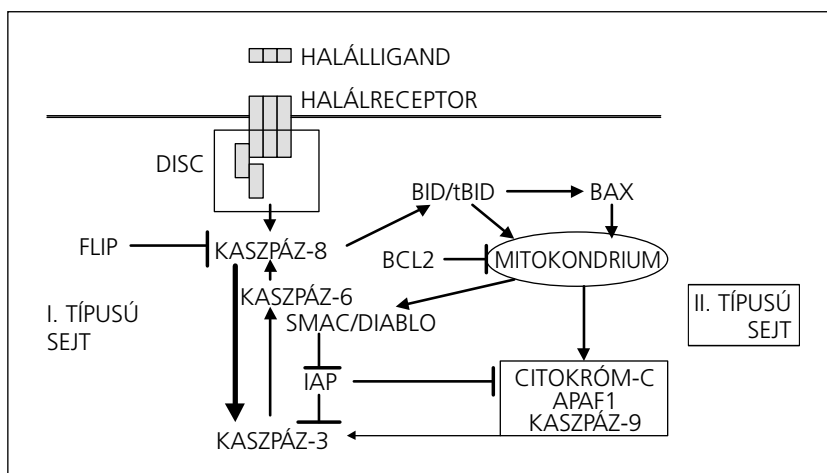
A daganatok keletkezésében vagy a proapoptotikus aktivitás hiánya, vagy az antiapoptotikus hatás fokozódása játszik szerepet. Ezek zömmel génextpresszió-változás következményei, de előfordul, hogy a fehérjék működése változik. A vírusok antiapoptotikus hatása hozzájárulhat ahhoz, hogy a génhibát szenvedett sejtek nem pusztulnak el, és így a hibát tovább tudják adni az utódsejteknek.

A vírusok antiapoptotikus hatása

A vírusfertőzés által kiváltott egyik korai celluláris válasz az interferonok termelése. Az interferonok feladata az, hogy korlátozzák a vírustermelést és a fertőzés áttérjedését a szomszédos sejtekre, például úgy, hogy a fertőzött sejt apoptózist indukálják. Az I-es típusú interferonok által indukált gének között szerepel az a kettős szálú RNS (dsRNS), amely proteinkinázt (PKR) aktivál és ez pedig apoptózist indukál. A vírusok különböző trükkökkel védekeznek a proapoptotikus hatással szemben: a HCV két fehérjét is kódol a PKR-aktivitás gátlására; az adenovírusok, a HIV és az EBV pedig úgy gátolják a PKR aktiválódását, hogy nagy mennyiségben szintetizálnak olyan agonista RNS-t, amely kötődik a PKR-hez és így kompetitív módon akadályozza annak dsRNS-hez történő kapcsolódását. Más vírusok más antiapoptotikus stratégiával érik el, hogy a litikus fertőzés perzisztenssé szelődüljön. A p53-at inaktíválja a KSHV latenciaasszociált sejtmagi antigénje (LANA), míg az EBV a PKR-gátlás és a BCL-2-indukció révén tartja fent a látens fertőzést (a PKR aktiválódását az EBER fehérje akadályozza, a BCL-2-t pedig az LMP1 stimulálja az A20 fehérje indukcióján keresztül). BCL-2-homológ fehérjét gyárt a HHV8 is (KSBCL2). A KSHV v-FLIP-et is termel (gátolva a kaszpázokat), a HPV E6 fehérjéje a p53-függő utat gátolja, a HTLV TAX fehérjéje aktiválhatja az NF- κ B-t, de elősegítheti a FASL-ot megkötő és inaktíváló áltreceptor (DcR3) expresszióját (csökkentve ezzel pl. az immunrendszer FAS-közvetített citotoxicitását).

Mindezek azért történnek, mert a vírusoknak „nem érdeke” az, hogy az őt előállító gazdasejtet

2. ábra.
Az apoptózis
kölsönhatása



elpusztítsa. A vírusok antiapoptotikus hatásának egyik legsúlyosabb következménye az, hogy a fertőzött sejt túlélésének biztosításával hozzájárulhatnak a daganatok kialakulásához.

Az antiapoptotikus fehérjék túltermelése

A daganatsejtekben az apoptózissal szembeni rezisztencia egyik oka az antiapoptotikus gének fokozott expressziója, az antiapoptotikus fehérjék túltermelése.

A daganatsejtek szolúbilis halálreceptorokkal is gátolhatják a halálligandokat. Számos daganat termel szolúbilis FAS-t, melynek emelkedett szérumszintjét kapcsolatba hozták a rosszabb prognózissal. Ugyancsak FASL-et gátol az egyik áltreceptor (DcR3) is, ennek fokozott expresszióját találták pl. tüdőrákban, vastagbélrákban, glioblastomákban.

A BCL-2-család antiapoptotikus tagjainak legjellegzetesebb képviselőjét, a BCL-2-t már említettem. A fokozott BCL-2-termelés oka lehet a gén egyik részének transzlokációja az immunoglobulin nehézlánc génjéhez (t:14;18), de előfordulhat túltermelés transzlokáció nélkül, pl. amplifikációval is. A fokozott BCL-2-szint – amelyet igen sok, nemcsak hemopoetikus rendszert érintő daganat esetében kimutáltak – a kemo- és a sugárterápiával szembeni rezisztencia egyik legfontosabb oka, ezért rossz prognosztikai faktornak is tekinthető. Az egyéb családtagok közül a BCL-X_L és az MCL1 fokozott expresszióját is megfigyelték.

Az antiapoptotikus molekulák közül a prokaspáz-8-at gátló FLIP szintje pl. a melanomákban vagy a Hodgkin-lymphomában (a Sternberg-Reed-sejtekben) fokozódott. Valószínű, hogy a daganatellenes immunitásban szerepet játszó perforin-granzim B-utat is gátolja a FLIP. Ugyancsak a daganatsejtek citotoxikus limfocitákkal szembeni ellenállását fokozza a granzim B-t gátló szerinproteáz-gátló (PI-9/SPI-6).

Az IAP-család tagjai közül a survivin tumor-specifikus, hiszen igen sok humán tumorban termelődik, viszont a felnőttek normális szöveteiben általában nem. Neuroblastomákban az expressziója összefügg a rossz prognózissal. A MALT-lymphomák (MALT: mucosa associated lymphoid tissue) kb. felében fordul elő a t(11;18)(q21;q21) fúziós transzlokáció, amely a cIAP2 gént és az MLT/MALT1 gént érinti. Az előbbi kaspázgátló cIAP2-t, az utóbbi parakaspázt termel. Az esetek genetikai heterogenitását (következésképpen változó fúziós fehérjék megjelenését) részben a töréspontok eltérései, részben az MLT-mRNS splicing-variánsai okozzák. (Érdekesség, hogy az ilyen transzlokációt hordozó gyomorlymphomák rezisztensek a *Helicobacter pylori*-ellenes terápiára). Melanomákban az ML-IAP fokozott expresszióját találták, ez a normális melanocitákban nem fordult elő. Az ML-IAP-ot termelő melanomák sokkal ellenállóbbak voltak a gyógyszerindukált apoptózissal szemben, mint a nem termelők.

Sajátos a helyzet a cMYC szerepét illetően, amelyről ismert, hogy a proliferációt is serkent

heti és apoptózist is indukálhat. Számos adat utal arra, hogy a cMYC akkor válik „veszélyessé”, ha az apoptózisprogram hibája miatt (pl. a p53 mutációja következtében) a proapoptotikus hatása nem érvényesülhet, a proliferációt serkentő hatása viszont változatlan. (Ha emellett még a termelődése is fokozott – pl. Burkitt-lymphomában a transzlokációk eredményeképpen –, akkor a permanens proliferáció és a kiesett apoptózisprogram a daganatkeletkezés fő okainak tartatók.)

A proapoptotikus fehérjék csökkent termelése

A BCL-2-család proapoptotikus tagja a BAX, melynek génjében – sok tumor esetében – funkciócsökkenéssel járó mutációt és leolvasásikereteltolódást találtak. A csökkent BAX-expresszió a kemoterápiás szerekekkel elérhető választ is csökkenti. A BAX-gén a p53 egyik legfontosabb célgénje, ezért a hibája a p53-közvetített utat is gátolja. (A BAX-hiányos egerekben a daganatnövekedés felgyorsult, az apoptotikus sejtek gyakorisága csökkent; ennek alapján a BAX szuppresszorgénnek is tekinthető.)

A metasztatikus melanomákban a daganatsejtek úgy kerülnek el az apoptózis mitokondriális útját, hogy nem működik az apoptoszóma egyik eleme, az APAF1; az egyik allélje igen gyakran hiányzik, a megmaradt allél pedig metiláció inaktíválja. Az APAF1-negatív melanomák a kemoterápiára igen rosszul reagálnak. Hasonló stratégiával találkozunk az N-MYC amplifikációját mutató neuroblastomákban, ahol a kaspáz-8 génjében ugyancsak delécio vagy metiláció fordulhat elő. A kisesejtes tüdőrákok közel 80%-ában igen alacsony vagy hiányzik a prokaspáz-8 expressziója, míg a nem kisesejtes tüdőrákokban ez a hiba ritka.

Igen sok daganatban – pl. májrák, vastagbélrák, melanoma – a daganatsejteken (a megfelelő normális sejtekhez viszonyítva) a halálreceptorok közül a FAS expressziója jelentősen csökken vagy hiányzik. Myelomákban és T-sejt-leukemiákban a FAS-gén olyan pontmutációit írták le, amelyek a „haláldomén”-t változtatták meg, illetve olyan deléciót, amely csökevényes receptort eredményezett.

Ezek a hibás FAS receptorok domináns-negatív módon gátolhatják a receptoron keresztül közvetített apoptózist. A FAS csírasejtes mutációit mutató családokban, ahol rendszerint autoimmun limfoproliferatív szindróma (ALPS) alakul ki, fokozott a lymphomák kialakulásának esélye. Deléciókat és mutációkat a TRAIL-receptorok részéről is megfigyeltek. A TRAILR2-t érinti az a 8p21-22 régióban előforduló delécio, amely a fejnaki daganatokban és a nem kisesejtes tüdőrákban gyakori. A mutációk a haláldomént változtatták meg, vagy csökevényes receptor kialakulásához vezettek. Több daganatban a proapoptotikus XAF1 (XIAP-associated factor 1) csökkent termelését figyelték meg, amely így nem tudja antagonizálni a kaspázgátló XIAP-ot: az eredmény az apoptózis gátlása.

Az apoptózisgátlás egyéb lehetőségei

Az apoptózis bekövetkeztét a normális és a daganatos sejtekben is erőteljesen gátolják a túlélési jelek. Ilyen jeleket közvetít pl. lipid-kináz-út (PI3K), melynek aktivitását jelentősen fokozhatja a mutáns RAS vagy a BCR-ABL fúziós fehérje. Az út leghatékonyabb terméke az AKT (szerin/treonin-kináz), mely igen sok proapoptotikus fehérje inaktiválására képes. Az AKT fokozott termelését számos humán daganatban megfigyelték. A PI3K-út aktivitását a PTEN (lipid-foszfátáz) csökkenti, így a hatása végső soron proapoptotikus. A PTEN mutációját – ami a túlélési jel fokozott termelését támogatja – ugyancsak sok daganatban kimutatták.

Az apoptózist befolyásoló fontos szabályozók közé tartozik a már említett NF- κ B. Normálisan az NF- κ B inaktív állapotban a citoplazmában található (gátlójával, az I κ B-vel komplexet alkotva). Sok külső stimulus – pl. citokinek, stressz, kemoterápiás szerek – az NF- κ B-t aktiválja, a DNS-kötő domén a sejtmagba transzlokálódik, ahol stimulálja célgénjeit. A stimulustól és a sejt aktuális állapotától függően az NF- κ B proapoptotikus (FAS, FASL, TRAILR) és antiapoptotikus (IAP-ok, BCL-X_L) fehérjék génjeit aktiválhatja. Humán daganatokban az NF- κ B és az I κ B fehérjéket kódoló gének amplifikációját és transzlokációját egyaránt megfigyelték. Hodgkin-lymphomában az NF- κ B fokozott aktivitását észlelték. A MALT-lymphomában előforduló transzlokációk egyikének – t(1;14)(p22;q32) – résztvevője a BCL-10. A BCL-10 CARD domént tartalmazó fehérjét kódol, ez mind proapoptotikus, mind NF- κ B-t aktiváló hatással rendelkezhet. (A klasszikus NF- κ B-út mellett alternatív is működik: ekkor a p100-ból keletkezett p52 lesz a RelB partnere, és ezek aktiválják az NF- κ B célgénjeit.)

Az extracelluláris mátrix is hozzájárulhat az apoptózissal szembeni rezisztenciához in vivo. Ezt az antiapoptotikus jelet a daganatsejt-mátrix kölcsönhatásban fontos szerepet játszó integrinek közvetítik. A hámsejtek a mátrixról leválva apoptotizálnak, ezt nevezik anoikisnek.

Apoptózis és a daganatterápia

Az apoptózis eddigi ismereteink szerint a terápiás válaszban is nagy szerepet játszik, ugyanis a szervezet védekezőmechanizmusai (pl. citotoxikus sejtek) mellett – az esetek jelentős részében – a kemoterápia és a sugárterápia is a sejthalál programját indukálva pusztítja el a daganatsejtet. Ennek elmaradása a kezeléssel szemben rezisztenciát eredményezhet.

A proapoptotikus molekulák indukciója vagy fokozása

A daganatok keletkezésekor az egyik változás a halálreceptorok expressziójának csökkenése, ami megakadályozza, hogy külső jelek – pl. a citotoxikus gazdaszervezeti sejtek vagy éppen a szomszédos daganatsejtek által termelt halálligandok –

apoptózist indukáljanak (2-4). Kimutatták, hogy a kemoterápia számos daganatban képes FAS-negatív daganatsejtekben elősegíteni a FAS-expresszióját (5). A FAS-expresszió indukciója sokszor p53-függő (pl. vastagbélrákokban 5-fluorouracil hatására) (6), azonban előfordul elég gyakran, hogy mutáció miatt a p53 nem működik. Ilyen esetben pl. az interferon- γ helyettesítheti a p53-at a FAS-expresszió aktiválásában (7). Ez a magyarázata annak, hogy az IFN- γ fokozza az 5-fluorouracil terápiás hatását (8).

Logikus lépés lenne halálligandok adása, természetesen abban az esetben, ha a daganat hordozza a megfelelő halálreceptort. Az eddigi klinikai vizsgálatok a halálligandok közül a TNF és a FASL szisztémás adásakor kudarcba fulladtak a ligandok súlyos toxikus hatása miatt (9, 10). Meglepetést okozott, hogy ezzel ellentétben a TRAIL igen sok humán daganatsejtvonallal szemben citotoxikusnak mutatkozott, a normális sejteken viszont nem (11). E szelektív hatás oka még nem ismert. Feltételezik, hogy az egyik – ha nem is teljes – magyarázat az lehet, hogy a normális sejteken lényegesen több az álreceptor (DcR1 és DcR2), mint a daganatsejteken, és ezzel védenék meg magukat a ligand hatásától (12). A TRAIL toxicitásával kapcsolatos viták még nem ülték el (egyesek hepatotoxicitást találtak) (13), azonban valószínű, hogy az eltérő eredmények hátterében eltérő forrású rekombináns TRAIL áll (14). Preklinikai vizsgálatok során a TRAIL hatékonynak mutatkozott glioma és vastagbélrák esetében (11, 15), míg emlőráknál a hatás attól függött, hogy milyen citotoxikus szert használtak a kombinációban (doxorubicin vagy 5-fluorouracil esetében a TRAIL fokozta a hatást, methotrexat, melphalan vagy paclitaxel esetében nem) (16). Egyes sejttípusoknál a TRAIL hatásához a mitokondrium-út – pl. a BAX és a BAK – aktivitása is szükséges, ami már most megkérdőjelezi, hogy a TRAIL minden daganatsejt esetében hatásosan működne. (Az említett példánál ugyanis a mitokondrium-út zavar megakadályozná a TRAIL hatását.)

Egyre több olyan anyagról számolnak be (lodinamin, arzenit, betulinsav, CD437, és amfipatikus kationos α -helikális peptid), amelyek a mitokondriummembrán permeabilitását képesek fokozni. A hatás vagy közvetlenül a membránra irányul, vagy az átmeneti permeabilitási póruskomplexre. Ezzel elvileg elő lehetne segíteni a proapoptotikus molekulák (pl. citokróm-c, SMAC/Diablo, AIP) mitokondriumból történő kiszabadulását – akkor, amikor a konvencionális daganatellenes szerek nem hatnak. Ugyancsak logikus megközelítés az apoptózis fokozására a proapoptotikus BCL-2-családtagok expressziójának fokozása (hiszen a szabályozást elsősorban a pro- és antiapoptotikus családtagok közötti egyensúly biztosítja). Kísérleti rendszerekben a BAX gén bevitelével – Ad-DF3-BAX vektor-gén komplexet alkalmazva – a daganatimplantátumok 99%-át sikerült elpusztítani (17).

A kaspázok hatásának fokozása is terápiás stratégia lehet, bár a szelektív toxicitás biztosítása – mint a daganatelleni terápia más területein – itt

is igen nehéz feladat. Az egyik lehetséges megközelítés azon alapszik, hogy számos humán daganatban (pl. neuroblastoma, rhabdomyosarcoma, kissejtes tüdőrák) a kaszpáz-8 aktivitása a gén promoterrégiójának hipermetilációja miatt igen alacsony, vagy hiányzik (18–21). Ezért folynak olyan kísérletek, amelyek metilációgátlókkal (pl. 5-azadezoxi-citidin) próbálják meg a kaszpáz-8 expresszióját helyreállítani (22).

Jogos a felvetés, hogy a proapoptotikus tényezők közül nem maradhat ki a p53 sem, hiszen abban, hogy a terápia nem képes apoptózist indukálni, a mutáns p53-nak is szerepe lehet. Érthető, hogy igen sok kísérlet történt és történik a mutáns p53 működésének gátlására, illetve a normális p53 gén bevitelére. A p53 gén hiánya esetén a génbevitel eredményes lehet, azonban a túltermelés kapcsán a legnehezebb probléma az, hogy a mutáns p53 képes komplexet képezni a normális p53-mal, és így inaktiválni.

Az antiapoptotikus molekulák gátlása

A halálreceptorok indukálhatóságát számos szabályozó molekula befolyásolja, serkentheti vagy gátolhatja. Az utóbbiak közé tartozik a FAS esetében a FAP-1, megakadályozva a receptorról a jelátvitelt (23, 24). Olyan oligopeptidet szintetizáltak, amelyek a FAP-1 hatását felfüggesztve képesek a FAS indukálhatóságát helyreállítani (23). A FLIP a kaszpáz-8 gátlásán keresztül mind a FASL, mind a TRAIL által elindított jelutakat gátolhatja. A FLIP expresszióját FLIP-elleni antiszenz oligonukleotiddal próbálták kiiktatni (25); cholangiocarcinoma sejtekben sikerült a FAS-közvetített apoptózisutakat így aktiválni (26).

A BCL-2 expressziójának fokozódását – transzlokáció vagy amplifikáció miatt – igen sok humán daganatban kimutatták. Érthető, hogy a BCL-2 termelésének gátlása a daganatterápiával kapcsolatban fontos kérdéssé vált. A számos megközelítés közül legeredményesebbnek az antiszenz oligonukleotid alkalmazása bizonyult. A kiterjedt klinikai vizsgálatok olyan oligóval történtek, amely a BCL-2 első hat kódoló kodonját célozza meg (G-3139, Genta) (27). A várakozásnak megfelelően előnyös terápiás hatást elsősorban kombinációkban tapasztaltak, mégpedig olyan szerekekkel, amelyek az adott daganattípusnál már hatékonynak mutatkoztak (ezek a vizsgálatok különböző klinikai fázisban vannak). Az antiszenz-BCL-2 pl. a lymphomák esetén cyclophosphamiddal, kissejtes tüdőráknál paclitaxellel, hormonrezisztens prosztataráknál mitoxantronnal, emlőráknál docetaxellel, vastagbélráknál irinotecannal, relapszusban levő akut leukaemiánál fludarabinnal és citozin arabinoziddal, melanómában pedig dacarbazinnal együtt adva fokozta a terápiás hatást (27).

Folynak a vizsgálatok más antiszenz oligonukleotidokkal és ribozimokkal is; reménytelen célpontra az antiapoptotikus BCL-X_L (28), illetve az IAP-család tagjai (beleértve a survivint is). Az utóbbiak esetén tüdőrák és melanoma kapcsán figyeltek meg pozitív eredményt (29). Proteaszómagátlók-

kal az IκB degradációját próbálják csökkenteni, ami az NF-κB aktiválását akadályozná meg.

Igen sok daganatban az apoptotikus mechanizmus működését (indukálhatóságát) a túlélési jelek fokozott termelése akadályozza. Az esetek jelentős részében azonban ez csak feltételezés, a jeleket azonosítani még nem sikerült. Az azonban ismert, hogy az egyik leghatékonyabb túlélési jel hordozó molekula (nem kevésbé azért, mert igen sok proapoptotikus elemet gátol) a foszfát-dilinozitol-úton keletkező AKT (30). Következésképpen, az AKT-termelés megakadályozása a daganatsejtek túlélési küszöbét jelentősen csökkenti. Ilyen szer pl. a PI3K-t gátló wortmannin. A PI3K-út stimulálásában igen sok jel szerepel, pl. az ABL (és így az ABL/BCR fúziós gén is) vagy a RAS. Valószínű, hogy az ABL/BCR-túltermelést gátlók (antiszenz oligonukleotidok vagy antitestek, pl. a Gleevec) előnyös hatása is ezen az úton – ennek gátlásával – érvényesül (31).

Zárszó helyett

Az apoptóziskérdés természetesen nem lezárt fejezet, naponta jelennek meg új eredmények, vagy az eddigieket támogatók, nem egyszer cáfolók. Ez az előadás egy pillanatkép csupán, része annak a komplex történetnek, amit a hatékonyabb daganatfelismerés és daganatellenes kezelés érdekében az onkológia elméleti és gyakorlati szakemberei egymást segítve folytatnak. Örömmel tölt el, ha a Krompecher-emlékérem átvételekor azt érezhetem, hogy ehhez az együttműködéshez eddigi eredményeimmel, igen szerényen bár, de hozzájárulhattam.

Irodalom

1. Apoptózis. Szerk: Kopper L, Fésűs L. Medicina, 2002
2. Moller P, Koretz K, Leithauser F, et al. Expression of APO-1 (CD95), a member of the NGF/TNF receptor superfamily, in normal and neoplastic colon epithelium. *Int J Cancer* 57:371-377, 1994
3. Lowin B, Hahne M, Mattmann C, Tschopp J. Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. *Nature* 370:650-652, 1994
4. Harwood FG, Kasibhatla S, Petak I, et al. Regulation of FasL by NF-kappaB and AP-1 in Fas-dependent thymineless death of human colon carcinoma cells. *J Biol Chem* 275:10023-10029, 2000
5. Muller 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* 188:2033-2045, 1998
6. Petak I, Tillman DM, Houghton JA. p53 dependence of Fas induction and acute apoptosis in response to 5-fluorouracil-leucovorin in human colon carcinoma cell lines. *Clin Cancer Res* 6:4432-4441, 2000
7. Tillman DM, Petak I, Houghton JA. A Fas-dependent component in 5-fluorouracil/leucovorin-induced cytotoxicity in colon carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 5:425-430, 1999
8. Schwartzberg LS, Petak I, Stewart C, et al. Modulation of the Fas signaling pathway by IFN-gamma in therapy of colon cancer: phase I trial and correlative studies of IFN-gamma, 5-fluorouracil, and leucovorin. *Clin Cancer Res* 8:2488-2498, 2002
9. Kettelhut IC, Fiers W, and Goldberg AL. The toxic effects of tumor necrosis factor in vivo and their prevention by cyclooxygenase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:4273-4277, 1987

10. Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M, et al. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice [published erratum appears in *Nature* 1993 7;365(6446):568]. *Nature* 364: 806-809, 1993
11. Ashkenazi A, Pai RC, Fong S, et al. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest* 104:155-162, 1999
12. Marsters SA, Pitti RA, Sheridan JP, Ashkenazi A. Control of apoptosis signaling by Apo2 ligand. *Recent Prog Horm Res* 54:225-234, 1999
13. Jo M, Kim TH, Seol DW, et al. Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Nat Med* 6:564-567, 2000
14. Lawrence D, Shahrokh Z, Marsters S, et al. Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions. *Nat Med* 7:383-385, 2001
15. Pollack IF, Erff M, Ashkenazi A. Direct stimulation of apoptotic signaling by soluble apo2l/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand leads to selective killing of glioma cells. *Clin Cancer Res* 7:1362-1369, 2001
16. Keane MM, Ettenberg SA, Nau MM, et al. Chemotherapy augments TRAIL-induced apoptosis in breast cell lines. *Cancer Res* 59:734-741, 1999
17. Tai YT, Strobel T, Kufe D, Cannistra SA. In vivo cytotoxicity of ovarian cancer cells through tumor-selective expression of the BAX gene. *Cancer Res* 59: 2121-2126, 1999
18. Teitz T, Wei T, Valentine MB, et al. Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nat Med* 6:529-535, 2000
19. Petak I, Douglas L, Tillman DM, et al. Pediatric rhabdomyosarcoma cell lines are resistant to Fas-induced apoptosis and highly sensitive to TRAIL-induced apoptosis. *Clin Cancer Res* 6:4119-4127, 2000
20. Mazumder S, Almasan A. Is caspase-8 a neuroendocrine lung tumor suppressor? *Cancer Biol Ther* 1:70-71, 2002
21. Shivapurkar N, Toyooka S, Eby MT, et al. Differential inactivation of caspase-8 in lung cancers. *Cancer Biol Ther* 1:65-69, 2002
22. 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* 20:5865-5877, 2001
23. Yanagisawa J, Takahashi M, Kanki H, et al. The molecular interaction of Fas and FAP-1. A tripeptide blocker of human Fas interaction with FAP-1 promotes Fas-induced apoptosis. *J Biol Chem* 272:8539-8545, 1997
24. Li Y, Kanki H, Hachiya T, et al. Negative regulation of Fas-mediated apoptosis by FAP-1 in human cancer cells. *Int J Cancer* 87:473-479, 2000
25. Tschopp J, Irmeler M, and Thome M. Inhibition of fas death signals by FLIPs. *Curr Opin Immunol* 10:552-558, 1998
26. Que FG, Phan VA, Phan VH, et al. Cholangiocarcinomas express Fas ligand and disable the Fas receptor. *Hepatology* 30:1398-1404, 1999
27. Banerjee D. Genasense (Genta Inc). *Curr Opin Investig Drugs* 2:574-580, 2001
28. Olie RA, Zangemeister-Wittke U. Targeting tumor cell resistance to apoptosis induction with antisense oligonucleotides: progress and therapeutic potential. *Drug Resist Updat* 4:9-15, 2001
29. Yamamoto T, Tanigawa N. The role of survivin as a new target of diagnosis and treatment in human cancer. *Med Electron Microsc* 34:207-212, 2001
30. Khwaja A. Akt is more than just a Bad kinase [news; comment]. *Nature* 401:33-34, 1999
31. Capdeville R, Buchdunger E, Zimmermann J, et al. Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. Perspectives on the development of a molecularly targeted agent. *Nat Rev Drug Discov* 1:493-502, 2002