

Mechanizmy działania i strategie oporności komórek nowotworowych przeciwko apoptozie indukowanej przez TRAIL

Mechanism of activity and defensive strategies of cancer cells against TRAIL-induced apoptosis

Karolina Piechna, Przemysław Juszczyński

Zakład Hematologii Eksperymentalnej, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa

Streszczenie

TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) jest białkiem z rodziny czynnika martwicy nowotworów działającego za pośrednictwem swoistych receptorów śmierci (DR4, DR5) i charakteryzującym się zdolnością indukcji apoptozy w komórkach docelowych. W wyniku wiązania TRAIL do DR4 i/lub DR5 następuje aktywacja zewnątrzpochodnej, a w niektórych komórkach również wewnątrzpochodnej ścieżki apoptozy. Ponieważ ekspresja receptorów śmierci na powierzchni komórek prawidłowych jest zwykle niższa niż na nowotworowych, to ligandy DR4 i DR5 budzą duże zainteresowanie jako potencjalne leki przeciwnowotworowe. Mimo wysokiej aktywności TRAIL i jego analogów w modelach in vitro i przedklinicznych modelach in vivo, w badaniach klinicznych wykazywał on niską skuteczność. Przyczyną takiego stanu rzeczy jest pierwotna lub wtórna oporność na TRAIL pojawiająca się w komórkach nowotworowych. W niniejszej pracy przeprowadzono systematyczny przegląd mechanizmów oporności na apoptozę indukowaną przez aktywację receptorów śmierci. Ich identyfikacja stwarza perspektywę celowanej ingerencji farmakologicznej przywracającej wrażliwość komórek na TRAIL lub ich wykorzystania jako „negatywnych” biomarkerów identyfikujących chorych, u których terapie oparte na ligandach receptorów śmierci nie mają szans powodzenia.

Słowa kluczowe: TRAIL, receptory śmierci, DR4, DR5, mechanizmy oporności, apoptoza

Hematologia 2019; 10, 3: 135–147

Abstract

TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand), a protein belonging to the tumor necrosis factor family, causes apoptosis induction through activation of its cognate death receptors (DR4, DR5). Binding TRAIL leads to induction of extrinsic or, in some cell types, intrinsic apoptosis pathways. Because of the lower death receptors surface expression on non-transformed cells than on cancer cells, DR4 and DR5 ligands attract a lot of attention as potential anti-cancer drugs. Despite exhibiting high activity in preclinical in vitro and in vivo models, in clinical trials TRAIL treatment proved to be inefficient. Lack of apoptotic activity is caused by intrinsic or secondary resistance to TRAIL, that is observed in cancer cells. Herein, we systematically review the resistance mechanisms to death-receptor triggered apoptosis. Identification of such mechanisms in clinical setting

Adres do korespondencji: Przemysław Juszczyński, Zakład Hematologii Eksperymentalnej, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, ul. Indiry Gandhi 14, 02–776 Warszawa, tel. 22 349 64 77, faks 22 34 96 237, e-mail: pjuszczyński@ihit.waw.pl

might serve as a “negative” biomarker, excluding patients unlikely to benefit from TRAIL-based therapies or present a possibility of pharmacological modulation.

Key words: TRAIL, death receptors, DR4, DR5, resistance mechanisms, apoptosis

Hematologia 2019; 10, 3: 135–147

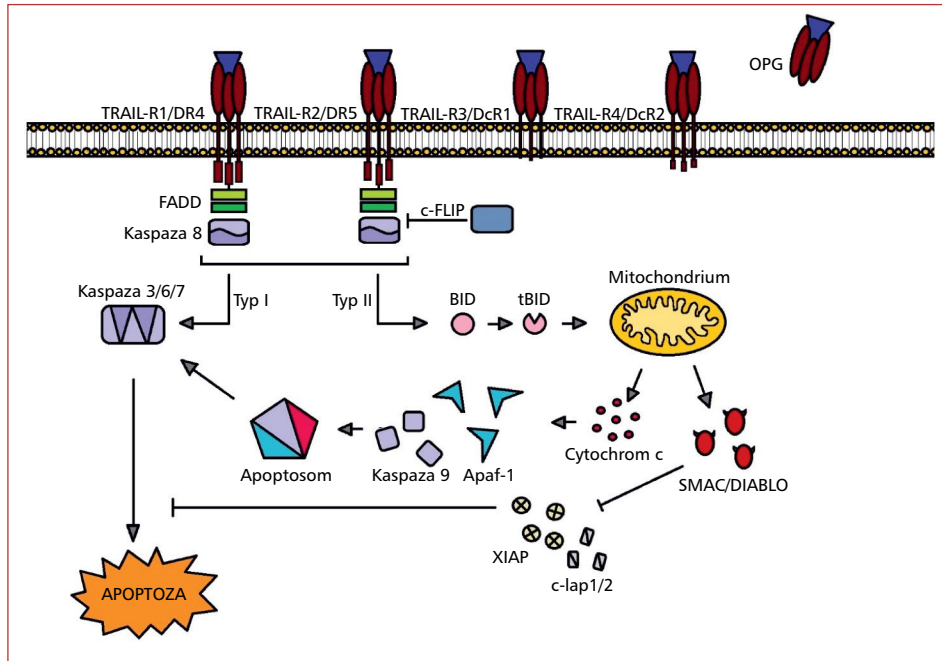
Wprowadzenie

Apoptoza jest procesem niezbędnym do prawidłowego rozwoju, utrzymania homeostazy organizmu oraz usuwania zbędnych komórek. Programowana śmierć komórki może być indukowana na drodze wewnątrzpochodnej i zewnątrzpochodnej. Ścieżka wewnątrzpochodna apoptozy jest wzbudzana przez uszkodzenia komórki powodowane między innymi przez stres, światło ultrafioletowe, promieniowanie jonizujące, substancje chemiczne lub aktywację onkogenów [1]. Proces ten jest regulowany i kontrolowany głównie przez pro- i antyapoptotyczne białka z rodziny BCL2 (*B-cell leukemia/lymphoma 2*), które wpływają na inicjację bądź blokowanie efektorowej fazy apoptozy [2]. Zewnątrzpochodną ścieżkę apoptozy aktywuje wiązanie ligandu do specyficznego receptora komórkowego, w wyniku którego następuje aktywacja kaspaz prowadząca do śmierci komórki [3]. Ligandy należące do nadrodziny czynnika martwicy nowotworów (TNF, *tumor necrosis factor*), wiązane przez receptory śmierci, indukują zewnątrzpochodną ścieżkę apoptozy. Czynnikiem martwicy nowotworów alfa (TNF α , *tumor necrosis factor alpha*) i ligand Fas (FasL) są najlepiej poznanymi ligandami indukującymi programowaną śmierć komórki, jednak poważne działania niepożądane po ich zastosowaniu, przypominające wstrząs septyczny, wykluczają ich wykorzystanie w terapii [4, 5]. Odmienną charakterystykę w tym zakresie ma białko TRAIL/Apo-2L (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) — białko błonowe typu II, także należące do nadrodziny TNF [6, 7]. Wywołuje ono apoptozę w komórkach nowotworowych przy stosunkowo niskiej toksyczności wobec komórek nietransformowanych. Wysoki potencjał terapeutyczny TRAIL wiąże się także z wyższą ekspresją jego receptorów na komórkach w wielu nowotworach z zachowaniem niskiej ekspresji w komórkach niestransformowanych [6]. Głównym ograniczeniem wykorzystania TRAIL w terapii jest wywoływana przez różne mechanizmy oporność komórek na indukowaną przez TRAIL apoptozę.

Receptory TRAIL i aktywacja szlaków prowadzących do śmierci komórki

TRAIL może się wiązać z pięcioma różnymi receptorami należącymi do rodziny receptorów TNF (ryc. 1). DR4/TRAIL-R1 (*death receptor 4/TRAIL receptor 1*) i DR5/TRAIL-R2 (*death receptor 5/TRAIL receptor 2*) są receptorami śmierci, z którymi TRAIL wiąże się z wysokim powinowactwem [8]. Należą do nadrodziny receptorów TNF i charakteryzują się bogatymi w cysteinę domenami zewnątrzkomórkowymi [9]. Zarówno DR4, jak i DR5 zawierają cytoplazmatyczną domenę śmierci, która odpowiada za agregację białek promujących transdukcję sygnału apoptotycznego. Ekspresja receptorów śmierci zachodzi w większości tkanek ludzkich [10, 11]. DcR1/TRAIL-R3 (*decoy receptor 1/TRAIL receptor 3*) wiąże TRAIL na powierzchni komórki, jednak nie zawiera cytoplazmatycznej domeny pozwalającej na przekazanie sygnału [12]. DcR2/TRAIL-R4 (*decoy receptor 2/TRAIL receptor 4*) zawiera region cytoplazmatyczny, brakuje w nim jednak znacznej części tworzącej domenę śmierci i przekazującej sygnał apoptotyczny [13]. DcR2 zachowuje zdolność przekazania sygnału do aktywacji czynnika jądrowego κ B (NF κ B, *nuclear factor κ B*) [13], co może się przyczyniać do zwiększonej oporności na apoptozę wywołaną przez TRAIL [14]. Geny wymienionych powyżej receptorów są zależne od p53 aktywowanego uszkodzeniem DNA [15]. Piąty receptor TRAIL to osteoprotegeryna (OPG), która jest rozpuszczalnym białkiem reagującym z TRAIL z niskim powinowactwem [16].

Wiązanie TRAIL przez jeden z receptorów śmierci skutkuje jego trimeryzacją i rekrutacją białka FADD (*FAS-associated death domain*) przez część cytoplazmatyczną. W swojej strukturze FADD zawiera domenę śmierci (DD, *death domain*) i domenę efektorową (DED, *death effector domain*) [17, 18]. Domena efektorowa białka FADD wiąże DED obecne w prokaspazach 8 i/lub 10 [19], co prowadzi do formowania kompleksu sygnałowego indukującego śmierć komórki (DISC, *death inducing signaling complex*) [20], a następnie



Rycina 1. Receptory TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) i aktywacja szlaku apoptotycznego: w wyniku wiązania ligandu receptorów TRAIL-R1/DR4 i TRAIL-R2/DR5 następują rekrutacja białek tworzących kompleks sygnałowy indukujący śmierć komórki (DISC, *death inducing signaling complex*) i aktywacja proteolitycznej kaskady sygnałowej. Indukcja apoptozy może zachodzić na ścieżce zewnętrznej lub wewnętrzzpochniej (mitochondrialnej); R1 — receptor 1; DR4 — *death receptor 4*; R2 — receptor 2; DR5 — *death receptor 5*; DR3 — *death receptor 3*; DcR1 — *decoy receptor 1*; R4 — receptor 4; DcR2 — *decoy receptor 2*; OPG — osteoprotegeryna; FADD — *FAS-associated death domain*; c-FLIP — *cellular FLICE-like inhibitory protein*; BID (*BCL2 inhibitory BH3-domain containing protein*) — białko zawierające domenę BH3 hamująca BCL2; tBID — *truncated BID*; Apaf-1 — *apoptosis activating factor-1*; SMAC/DIABLO — *second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP binding protein with low pI*; XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis*) — inhibitor apoptozy sprzężony z chromosomem X; c-IAP1/2 — *cellular inhibitor of apoptosis 1*

aktywacji proteolitycznej kaskady sygnałowej [21]. W zależności od rodzaju komórki, w wyniku wiązania TRAIL, indukcja apoptozy może przebiegać według dwóch alternatywnych schematów. W tak zwanych komórkach typu I (do których należą m.in. limfocyty) rekrutacja FADD do receptorów śmierci powoduje aktywację kaspazy 8/10, a następnie kaspaz 3, 6 i 7 (tzw. kaspaz wykonawczych) i śmierć komórek (ryc. 1) [22]. W komórkach typu II wywołanie apoptozy wymaga udziału białka zawierającego domenę BH3 hamującą BCL2 (BID, *BCL2 inhibitory BH3-domain containing protein*) [22], które po proteolitycznej aktywacji przez kaspazę 8 rozpoczyna wewnątrzpochną (mitochondrialną) ścieżkę apoptozy [23]. Aktywność i ekspresja białka — inhibitora apoptozy sprzężonego z chromosomem X (XIAP, *X-linked inhibitor of apoptosis*) — mogą przełączać schemat procesu apoptozy; w komórkach z wysoką aktywnością XIAP apoptoza przebiega według schematu typu 2, a w komórkach z niską jego aktywnością — według schematu

typu 1 (ryc. 1) [22]. Wyłączenie aktywności XIAP metodami genetycznymi lub farmakologicznymi przełącza schemat indukcji apoptozy z typu 2 na typ 1 [22]. W wyniku migracji tBID (*truncated BID*) do mitochondrium następuje oligomeryzacja BAX (*BCL2-associated X protein*) oraz BAK (*BCL2 antagonist killer 1*) i utworzenie przez nie kanałów permeabilizujących zewnętrzną błonę mitochondrialną (MOMP, *mitochondrial outer membrane permeabilization*) [24]. W konsekwencji tych zjawisk następuje uwolnienie czynników proapoptycznych, takich jak: cytochrom c, SMAC/DIABLO (*second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP binding protein with low pI*), HTRA2/Omi (*HtrA serine peptidase 2/serine protease Omi*) [25]. Cytochrom c jest kluczowy w aktywacji kaspaz wykonawczych podczas wewnątrzpochniej ścieżki apoptozy [26]. W cytozolu cytochrom c wraz z APAF1 (*apoptosis activating factor-1*) i prokaspazą 9 formują apoptosom [27]. Aktywowana mechanizmem *induced-proximity* kaspaza 9 indukuje

aktywację kaspaz wykonawczych — 3, 6 i 7 [28], które następnie degradują białka wewnątrzkomórkowe niezbędne do utrzymania integralności komórki. Z kolei SMAC/DIABLO promuje aktywację prokaspazy 9 poprzez wiązanie białek z rodziny inhibitora apoptozy (IAP, *inhibitor of apoptosis proteins*), takich jak c-IAP1, c-IAP2, XIAP i surwiwina [29]. Podobne działanie promujące apoptozę wykazuje HTRA2/Omi [30]. Hamuje wiązanie kaspaz przez XIAP oraz tnie XIAP do jego nieaktywnej formy [31].

Poza apoptozą TRAIL indukuje także alternatywną ścieżkę prowadzącą do śmierci komórki — regulowaną nekrozę (nekroptozę) zależną od kinaz RIP (*receptor interacting protein*) [32]. Nekroptoza może działać jako system zapasowy, kiedy ścieżka apoptotyczna jest nieaktywna lub aktywnie hamowana [33, 34]. Nekroptoza wymaga uformowania się kompleksu nekrosomu, w skład którego wchodzi RIPK1 i RIPK3 [35, 36]. RIPK3, aktywowane przez autofosforylację, rekrutuje i fosforyluje pseudokinazę MLKL (*mixed lineage kinase-like*) związaną z efektorową fazą nekroptozy [1, 37, 38].

Mechanizmy oporności na apoptozę indukowaną przez TRAIL

TRAIL efektywnie indukuje apoptozę w wielu ludzkich i mysich liniach komórkowych, jednak część linii komórkowych i komórek pierwotnych wykazuje oporność na indukowaną przez ten ligand śmierć komórki [40]. Efektywność wywoływania procesu apoptozy przez TRAIL zależy w sposób krytyczny od dostępności i funkcjonalności jego receptorów. Ich utrata w sposób oczywisty musi oznaczać oporność na ten ligand. Ponadto oporność może być wywoływana przez mechanizmy zaburzające przewodzenie sygnału apoptotycznego w komórce.

Mechanizmy oporności zależne od ekspresji i aktywności receptorów śmierci

Przyczyną niskiej ekspresji receptorów śmierci mogą być aberracje strukturalne dotyczące ich genów lub czynnościowe zahamowanie ich transkrypcji, w tym zależne od mechanizmów epigenetycznych. Zaburzenia powierzchniowej ekspresji receptorów śmierci mogą również wynikać z zahamowanej translacji białek lub ich przyspieszonej endocytozy i/lub degradacji.

Geny kodujące receptory śmierci znajdują się na chromosomie 8p21-22, w miejscu częstych delecji w wielu rodzajach nowotworów [41]. Mutacje w obrębie genu kodującego receptor DR5 wykryto

u 5% pacjentów z nowotworami głowy i szyi oraz u 10% chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca (NSCLC, *non-small cell lung carcinoma*) [42, 43]. Natomiast u 8 na 117 pacjentów z chłoniakiem nie-Hodgkina (NHL, *non-Hodgkin lymphoma*) wykryto mutacje nonsensowne i zmiany sensu w domenie śmierci receptorów DR4 lub DR5 albo tuż przed nią [44].

Mechanizmy transkrypcyjne i epigenetyczne odpowiadające za ekspresję receptorów śmierci

Kolejnym mechanizmem, obok zaburzeń integralności strukturalnej *loci* receptorów śmierci, który może wpływać na zmniejszenie ich ekspresji, są zmiany w transkrypcji ich genów. Ekspresja DR4 i DR5 jest regulowana przez wiele szlaków sygnałowych i czynników transkrypcyjnych będących ich efektorami. W promotorach *DR4* i *DR5* lokalizują się miejsca wiązania między innymi dla p53, NFκB i FOXO (*Forkhead box protein O*) [45, 46].

Indukcja transkrypcji *DR4* i *DR5* przez aktywne białko p53 stanowi prawdopodobne podłoże molekularne zwiększonej wrażliwości komórek, które uległy ekspozycji na chemioterapeutyki, na apoptozę indukowaną przez TRAIL. W opornych na chemioterapię komórkach chłoniakowych z mutacjami *TP53* zmienione białko p53 nie zwiększa ekspresji receptora DR5 po inkubacji z etopozydem lub doksorubicyną [47]. Podobnie poziom ekspresji receptora TRAIL-R2 nie wzrastał w limfoblastycznej linii komórkowej z mutacją *TP53* po inkubacji z fludarabiną lub ekspozycji na promieniowanie jonizujące [48]. U chorych na rozlanego chłoniaka z dużych komórek B (DLBCL, *diffuse large B-cell lymphoma*), u których stwierdzono obecność mutacji *TP53*, ekspresja DR5 była obniżona w największym stopniu spośród wszystkich genów o zmienionej ekspresji w porównaniu z chorymi z dzikim *TP53* [49].

Innym mechanizmem indukcji ekspresji receptorów śmierci jest aktywacja czynnika transkrypcyjnego NFκB. Czynniki jądrowe κB wykazują funkcję zarówno antyapoptotyczną, poprzez promowanie ekspresji białek z rodziny IAP oraz homologów BCL2, Bfl-1/A1 i BCL-XL [50–53], jak i proapoptotyczną [53]. Zarówno w części promotorowej genu *DR4* [55], jak i w pierwszym intronie genu *DR5* zidentyfikowano miejsca wiązania NFκB [45]. Wykazano, że c-Rel, czynnik transkrypcyjny z rodziny NFκB, wpływa na zwiększoną ekspresję obu receptorów śmierci. Wprowadzenie ekspresji zmutowanego, nieaktywnego transkrypcyjnie c-Rel odwraca ten efekt [56]. Indukcja innej podjednostki

NFκB, RelA, prowadzi jednak do zwiększonej ekspresji BCL-XL i chroni przed apoptozą indukowaną przez TRAIL [56]. Ostateczny efekt działania NFκB (anty- lub proapoptotyczny) może zatem zależeć od rodzaju aktywowanych podjednostek i obecności innych, towarzyszących sygnałów wpływających na procesy transkrypcji zależnej od NFκB.

Kolejnym mechanizmem regulującym ekspresję receptorów śmierci jest aktywacja związanej ze stresem siateczki śródplazmatycznej (*endoplasmic reticulum* [ER] stress) odpowiedzi komórek na nieprawidłowo sfałdowane białka (UPR, *unfolded protein response*), podczas której są uruchamiane szlaki enzymatyczne i czynniki transkrypcyjne mające przywrócić homeostazę [57]. Długi i silny stres ER może prowadzić do aktywacji wewnątrzpochodnej ścieżki apoptozy, a jednym z elementów sygnałowania apoptotycznego jest aktywacja ekspresji CHOP (*CCAAT/enhancer-binding protein-homologous protein*) [58]. Miejsca wiązania CHOP lokalizują się w promotorze genu *DR5* i wykazano wpływ jego aktywacji przez stres oksydacyjny i związki chemiczne indukujące UPR (rotleryna, tritlenek diarsenu) na ekspresję *DR5* [59, 60]. Mutacja w miejscu wiązania CHOP na promotorze *DR5* oraz wyciszenie CHOP metodą siRNA odwracają efekt aktywacji transkrypcji *DR5* [59].

Ying Yang 1 (YY1) jest represorem transkrypcji *DR5* [61]. Antagonista BCL2 i BH3-mimetyk, oba toklaks, między innymi poprzez pośrednie hamowanie czynnika transkrypcyjnego YY1 przyczynia się do zwiększonej ekspresji *DR5* i uwrażliwienia komórek agresywnych chłoniaków na TRAIL [62].

Regulacja powierzchniowej ekspresji receptorów śmierci przez endocytozę i degradację

W wyniku inkubacji komórek z TRAIL liczba receptorów śmierci na powierzchni komórki i w cytoplazmie szybko maleje. Odpowiadają za to dwa mechanizmy — endocytoza i niezależna od niej degradacja receptora ubikwitynowanego [63, 64]. Po związaniu TRAIL przez DR4/DR5 receptory ulegają monoubikwitynacji z udziałem ligazy E3 ubikwityny, białka c-CBL (*casitas B-lineage lymphoma*) [65]. Monoubikwitynacja nie wpływa na internalizację receptora, ale jest niezbędna do jego degradacji, przynajmniej w niektórych typach komórek (linie komórkowe raka prostaty) [64]. Zgodnie z tymi obserwacjami zahamowanie CBL przy użyciu shRNA uwrażliwia komórki prostaty na TRAIL w modelach *in vitro* i *in vivo* [66].

Oprócz degradacji receptorów TRAIL po związaniu ligandu, na ich ekspresję i lokalizację wpływają

także endocytoza i recykling receptora. Endocytoza receptorów TRAIL następuje między innymi w mechanizmie zależnym od klatryny i jest regulowana przez dynaminę 1 (DNM1) [67]. Aktywacja kaspazy 8 indukuje S-nitrozylację wapniowych kanałów rianodynowych i prowadzi do wyrzutu jonów wapnia z retikulum cytoplazmatycznego (ER, *endoplasmic reticulum*) [68]. Powoduje to aktywację kalcyneuryny, która defosforyluje i aktywuje DNM1, prowadząc do endocytozy receptorów śmierci i zwiększonej oporności na TRAIL [69].

Regulacja aktywności receptorów śmierci poprzez glikozylację

Glikozylacja jest jednym z procesów kontrolujących właściwe tworzenie DISC [70]. W liniach komórkowych raka trzustki, NSCL i czerniaków oraz w pierwotnym materiale diagnostycznym u ponad 30% chorych z różnymi nowotworami obserwowano nadekspresję GALNT14 (*N-acetylgalactosaminyltransferase 14*) — enzymu inicjującego proces O-glikozylacji poprzez przeniesienie N-acetylogalaktozaminy (GalNAc) na serynę lub treoninę białek docelowych [70]. Wyciszenie GALNT14 z użyciem siRNA zmniejsza wrażliwość komórek na TRAIL, natomiast nadekspresja promuje odpowiedź na ligand [71]. Glikozylacja prawdopodobnie przyczynia się do agregacji receptorów DR4 i DR5 i aktywacji ścieżki apoptotycznej [71].

Oba receptory śmierci zawierają potencjalne miejsca O-glikozylacji, natomiast regulacja sygnałowania przez N-glikozylację może nastąpić jedynie w receptorze DR4 [70]. Komórki z ekspresją receptora DR4 pozbawionego miejsca N-glikozylacji są mniej wrażliwe na TRAIL od komórek dzikich [72]. Wiąże się to ze słabszą agregacją receptorów i obniżoną rekrutacją kaspazy 8 i/lub 10 do DISC, natomiast nie wpływa to na powinowactwo receptorów do ligandu [72]. Aktywacja UPR (i ścieżek CHOP i JNK [*c-Jun N-terminal kinase*]) niespecyficznymi inhibitorami glikozylacji powoduje zwiększoną wrażliwość komórek na TRAIL [73, 74]. Paninhibitory glikozylacji indukują zwiększoną ekspresję *DR5*, obniżają stężenia białek, takich jak c-FLIP, IAP czy białek z rodziny BCL2 [75], a ponadto mogą indukować ścieżkę apoptozy niezależną od TRAIL.

Regulacja aktywności receptorów śmierci poprzez ekspresję receptorów kompetycyjnych i organizację błonową

Na lokalną dostępność i aktywność TRAIL może wpływać ekspresja receptorów wabików (DcR1 i DcR2) sekwestrujących TRAIL

i zmniejszających kompetycyjnie jego wiązanie z DR4 i DR5 [76, 77]. Zwiększona ekspresja DcR1 i DcR2 na komórkach nowotworowych koreluje ze zwiększonym tempem progresji choroby i skróceniem czasu przeżycia chorych z nowotworami piersi i przewodu pokarmowego [78, 79]. Blokowanie ekspresji DcR1 i DcR2 w niektórych przypadkach przyczyniało się do większej wrażliwości komórek na apoptozę indukowaną przez TRAIL [80].

Tratwy lipidowe są bogatymi w cholesterol i sfingolipidy strukturami, które odgrywają ważną rolę w gromadzeniu się receptorów powierzchniowych i tworzeniu się kompleksów sygnałowych [81]. W komórkach opornych na TRAIL kompleks sygnałowy tworzy się poza tratwami lipidowymi i prowadzi do aktywacji NF- κ B i kinaz regulowanych sygnałem zewnątrzkomórkowym 1/2 (ERK1/2, *extracellular signal-regulated kinases 1/2*) [82]. W wygenerowanej odpornej na TRAIL linii komórkowej NSCLC obserwowano porównywalną całkowitą ekspresję powierzchniową receptorów śmierci do linii, z której się wywodziła, ale receptory linii odpornej lokalizowały się poza tratwami lipidowymi. Taka lokalizacja powodowała mniejszą wydajność tworzenia się DISC po związaniu ligandu i mogła stanowić przyczynę oporności komórek [83].

Mechanizmy oporności zależne od przewodzenia sygnału z receptorów śmierci

Związanie funkcjonalnego receptora z ligandem rozpoczyna kaskadę zjawisk prowadzącą do apoptozy. Komórki nowotworowe mają zdolność blokowania przekazywania tego sygnału w różnych mechanizmach i w konsekwencji unikania śmierci zależnej od układu ligando-receptorowego TRAIL.

Funkcjonalność DISC

Najbardziej proksymalnym i najwcześniejszym zjawiskiem w procesie transdukcji sygnału apoptotycznego jest formowanie DISC. Utrata białek kluczowych dla jego działania lub rekrutacja dodatkowych białek o działaniu antyapoptotycznym może być czynnikiem warunkującym oporność komórek na TRAIL. Szlak apoptozy indukowany przez wiązanie TRAIL przez DR4 i DR5 w dużej mierze zależy od białka FADD [84]. W komórkach pozbawionych genu *FADD* apoptoza indukowana przez TRAIL nie zachodziła — w przeciwieństwie do komórek, w których jego ekspresja została przywrócona [84].

Na poziomie DISC aktywacja kaspazy 8 i/lub 10 może być zatrzymana przez wiążące się z FADD białko c-FLIP (*cellular FLICE-like inhibitory protein*) [85]. Białko to zawiera sekwencję homo-

logiczną do kaspaz 8 i 10, ale nie wykazuje funkcji proteolitycznej [86]. Wysokie stężenie c-FLIP odnotowano w wielu rodzajach nowotworów, zarówno w ustalonych liniach komórkowych (jelita grubego, żołądka, trzustki, jajników, prostaty, czerniaka), jak i w pierwotnych komórkach nowotworowych chorych na białaczkę, nowotwory pęcherza moczowego, płuca, wątroby czy pęcherzyka żółciowego [87–93]. Hamowanie ekspresji c-FLIP uwrażliwia niektóre linie komórkowe na apoptozę wywołaną przez TRAIL [94].

Innym mechanizmem, od którego zależy funkcjonalność DISC, jest rekrutacja białka oddziałującego z receptorem 1 (RIP1, *receptor-interacting protein 1*). W wyniku hamowania przez cFLIP aktywacji kaspazy 8 następuje częściowa proteoliza RIP1 w domenie kinazowej i aktywacja szlaku NF κ B. W komórkach chłoniaków proces ten zachodzi w sposób konstytutywny i przyczynia się do oporności na indukowaną przez TRAIL apoptozę [95]. Występowanie RIP i cFLIP w DISC obserwuje się w komórkach opornych na TRAIL, a ich wyciszenie siRNA przyczynia się do aktywacji apoptozy [92, 96]. *Knock-out* białka wzmacniającego z powinowactwem do domeny śmierci receptora TNFR1 (TRADD, *TNFR1-associated death domain protein*), uczestniczącego w rekrutacji RIP do DISC, przyczynia się do uwrażliwienia komórek pierwotnie opornych na TRAIL [93].

Mechanizmy oporności zależne od ekspresji białek anti- i proapoptotycznych

Proces apoptozy indukowanej przez TRAIL jest regulowany przez wiele pro- i antyapoptotycznych białek, w tym białek z rodzin BCL2, IAP, c-FLIP i innych. Wiele z nich, w tym c-FLIP i niektóre białka należące do rodziny BCL2, pozostają pod transkrypcyjną kontrolą NF κ B [87, 90, 97].

Komórki typu II do apoptozy wymagają inaktywacji IAP, charakteryzujących się obecnością domeny BIR (*Baculovirus IAP repeats*) w ich strukturze [98, 99] oraz domeny RING, odpowiedzialnej za aktywność E3 ligazy [100]. XIAP bezpośrednio hamuje aktywność kaspaz wykonawczych 9, 7 i 3, wiążąc je i promując ich degradację [30]. Białka z rodziny inhibitora apoptozy wpływają na zewnątrzpochoдную ścieżkę apoptozy także poprzez ubikwitynację RIP1 [100]. Nieubikwitynowany RIP1 może formować kompleks z FADD i kaspazą 8, prowadząc do indukcji apoptozy [100, 101]. Kiedy ścieżka apoptotyczna jest nieaktywna bądź hamowana, RIP1 może także wiązać kinazę RIP3, prowadząc do powstania nekrosomu i w konsekwencji śmierci komórki na drodze nekroptozy [102].

Białka z rodziny BCL2 mogą bezpośrednio lub pośrednio wpływać na przeżycie komórki. Do białek o działaniu antyapoptotycznym należą BCL2, BCL-XL, MCL1, BCL-W i BFL1/A1 [103]. Nadekspresja białek BCL2 i BCL-XL w komórkach typu II powoduje oporność na TRAIL [104, 105]. Białko MCL1 (*myeloid cell leukemia-1*) może hamować proapoptotyczne BID, a jego nadekspresja koreluje z opornością na TRAIL w warunkach *in vitro* [106]. Wyciszenie MCL1 metodą siRNA w komórkach linii Ramos chłoniaka Burkitta powodowało uwrażliwienie na działanie tego ligandu [62]. Co istotne, w komórkach nowotworowych mechanizmy oporności związane z ekspresją różnych białek antyapoptotycznych mogą występować jednocześnie, komplikując dostępne opcje terapeutyczne wyłączające te mechanizmy [107]. Na przykład BID wykazuje zdolność do oddziaływania nie tylko z MCL1, ale także z BCL2, BCL-XL, BCL-W i BFL1-A1 [108].

Wiele białek blokujących apoptozę wywołaną przez ligandy DR lub FAS jest regulowanych przez czynnik transkrypcyjny NFκB [109]. Ponieważ sam TRAIL może powodować aktywację NFκB, to mechanizm ten może stanowić „zawór bezpieczeństwa” zapobiegający nadmiernej i zbyt nasilonej aktywacji apoptozy. Aktywacja szlaku NFκB jest niezależna od sygnałowania FADD, ale od białka adaptorowego TRAF/NIK (*TNF receptor-associated factor/NFκB inducing kinase*) [110]. Za aktywację NFκB w komórkach może odpowiadać również obecność receptora wabika DcR2 niezawierającego funkcjonalnej domeny śmierci, ale zachowującego zdolność do indukcji NFκB [13]. Nadekspresja DcR2 istotnie koreluje z aktywnością NFκB w chłoniakach z tkanki limfatycznej błony śluzowej (MALT, *mucosa-associated lymphoid tissue*) [111]. Hamowanie aktywacji tego czynnika transkrypcyjnego powoduje nasilenie apoptozy i wzrost wrażliwości na TRAIL w niektórych liniach komórkowych, w tym w ostrej białaczce szpikowej (AML, *acute myeloid leukemia*) [112].

Przyczyną oporności na TRAIL mogą być również zmiany w ekspresji białek efektorowych apoptozy powodowane mutacjami genów lub modyfikacjami epigenetycznymi. Jednym z kluczowych białek, którego niska ekspresja może zaburzać szlak apoptotyczny, jest kaspaza 8. Mutacje w obrębie kodującego ją genu wykryto między innymi w raku wątrobowokomórkowym, raku żołądka i jelita grubego [113]. Transfekcja linii 293T wektorem z ekspresją zmutowanej kaspazy 8 powodowała ograniczenie apoptozy komórek i zmniejszenie lub brak cięcia PARP, w zależności od typu mutacji [114]. Obniżona ekspresja kaspazy 8 może być

ponadto związana z hipermetylacją DNA. Inkubacja komórek rdzeniaka i nerwiaka zarodkowego z decytabiną (5-aza-2'-deoksycytydyną) powodowała wzrost ekspresji mRNA i białka kaspazy 8, co korelowało ze zwiększoną wrażliwością na TRAIL [115, 116].

Mechanizmy oporności związane z metabolizmem energetycznym komórek

Komórki nowotworowe, w przeciwieństwie do komórek prawidłowych, swój metabolizm energetyczny zwykle opierają na tlenowej glikolizie (efekt Warburga) [117]. Zahamowanie glikolizy w komórkach chłoniaka z komórek płaszczka i innych nowotworów poprzez ich inkubację z 2-deoksyglukozą zwiększa wrażliwość komórek na TRAIL [118, 119]. U podstaw tego zjawiska leży zaburzenie energetycznej homeostazy komórki i zmniejszenia puli adonozotrifosforanu (ATP, *adenosine triphosphate*). Następcza aktywacja kinazy aktywowanej przez monofosforan adenozyiny (AMPK, *adenosine monophosphate (AMP)-activated kinase*) uruchamia szlaki prowadzące do hamowania ścieżki mTOR, która wpływa na poziom translacji białek i metabolizm komórki. W wyniku tych zjawisk następuje hamowanie translacji antyapoptotycznego białka MCL1 [118, 119]. Zastosowanie aktywatorów AMPK (np. metformina) lub inhibitorów mTOR (np. rapamycyna) przyczynia się do uwrażliwienia komórek na TRAIL [120]. Pośrednim dowodem kluczowej roli zaburzeń w puli ATP w generowaniu oporności na TRAIL jest fakt, że komórki chłoniaka z komórek płaszczka hodowane w medium pozbawionym glukozy, ale w obecności pirogronianu i glutaminy, „przeprogramowują” swój metabolizm energetyczny na oksydacyjny, co pozwala utrzymać równowagę w puli ATP, a komórki stają się mniej wrażliwe na TRAIL. Komórki po zmianie metabolizmu na oksydacyjny mają obniżoną ekspresję powierzchniową receptorów śmierci, wykazują ograniczone formowanie DISC pod wpływem TRAIL, mają zmniejszoną ekspresję białka proapoptotycznego BAX i podwyższoną ekspresję BCL2 i XIAP [119].

Obok zaburzeń homeostazy energetycznej ograniczenia w dostępności glukozy mogą indukować inne mechanizmy powodujące większą wrażliwość na TRAIL. W komórkach raka jelita grubego pozbawionych glukozy zwiększa się stężenie ceramidów, co prowadzi do hamowania 3-kinazy fosfatydyloinozytoli (PI3K, *phosphatidylinositol (PI) 3-kinase*) i/lub aktywowania fosfataz aktywowanych ceramidami z rodziny fosfatazy białkowej 2A (PP2A, *protein phosphatase 2A*) [121]. Wskutek tych zjawisk następuje zmniejszenie aktywności

Tabela 1. Podsumowanie mechanizmów oporności na apoptozę indukowaną przez TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*)

Rodzaj mechanizmu oporności	Mechanizm oporności
Zależne od ekspresji i aktywacji receptorów śmierci	Mutacje i aberracje strukturalne genów Zahamowanie transkrypcji genów; zmiany w szlakach sygnałowych i ekspresji czynników transkrypcyjnych (np. p53, NFκB, FOXO, CHOP) Zahamowanie translacji białek Przyspieszone endocytoza i degradacja białek Glikozylacja receptorów Wysoka ekspresja receptorów kompetycyjnych Organizacja błonowa kompleksu receptora; tworzenie DISC poza tratwami lipidowymi
Zależne od przewodzenia sygnału z receptorów śmierci	Nieprawidłowe formowanie DISC; utrata kluczowych białek (FADD, Cas8), obecność białek antyapoptotycznych w DISC (c-FLIP, RIP1)
Zależne od ekspresji białek pro- i antyapoptotycznych	Wysoka ekspresja białek z rodziny BCL2, IAP, c-FLIP
Związane z metabolizmem energetycznym	Zaburzenie energetycznej homeostazy komórki; przeprogramowanie metabolizmu na oksydacyjny, zmiany stężenia ceramidów
Związane z autofagią	Nasilona autofagia

NFκB (*nuclear factor κB*) — czynnik jądrowy κB, FOXO — *Forkhead box protein O*; CHOP — *CCAAT/enhancer-binding protein-homologous protein*; DISC (*death inducing signaling complex*) — kompleks sygnałowy indukujący śmierć komórki; FADD — *FAS-associated death domain*; Cas8 (*caspase 8*) — kaspaza 8; c-FLIP — *cellular FLICE-like inhibitory protein*; RIP1 (*receptor-interacting protein 1*) — białko oddziałujące z receptorem 1; BCL2 — *B-cell leukemia/lymphoma 2*; IAP (*inhibitor of apoptosis proteins*) — białka z rodziny inhibitorów apoptozy

AKT i uwrażliwienie na indukowaną przez TRAIL apoptozę [122].

Mechanizmy oporności związane z autofagią

Innym procesem metabolicznym związanym z wrażliwością na leki przeciwnowotworowe jest autofagia. To adaptacyjny proces kataboliczny utrzymujący homeostazę komórki poprzez degradację organelli i białek w celu otrzymania potrzebnych substancji odżywczych [123]. Wzrost natężenia procesu autofagii może być odpowiedzią na stres (np. niedobór substancji odżywczych, stres oksydacyjny, substancje chemiczne) [124, 125] i może mieć działanie cytoprotekcyjne lub toksyczne [126]. W liniach komórkowych raka piersi i w modelach mysich obserwowano cytoprotekcyjny efekt zwiększonego natężenia autofagii, która sprzyjała oporności na TRAIL. Nasiloniej autofagii towarzyszyło zmniejszenie błonowej ekspresji receptorów DR4 i DR5 i ich większa lokalizacja w autofagosomach [127]. Zahamowanie strumienia autofagii przywracało ekspresję receptorów śmierci na powierzchni opornych komórek i uwrażliwiało je na TRAIL [127]. Działanie protekcyjne autofagii może także wynikać z jej wpływu na stężenie białek proapoptotycznych z rodziny BCL2 [128].

Podsumowanie

Wysoka ekspresja receptorów śmierci na komórkach nowotworowych oraz względna selek-

tywność działania TRAIL i jego analogów od lat wzbudzają duże zainteresowanie badaczy i klinicystów, budząc nadzieje na ich zastosowania terapeutyczne. Mimo wysokiego potencjału indukcji apoptozy komórek nowotworowych przez TRAIL oraz wielu badań przedklinicznych i klinicznych z wykorzystaniem tej cząstki i jej analogów, żadna z tych strategii nie znalazła do dziś finału w postaci rejestracji. Największym problemem dotyczącym rozwoju tych strategii, leżącym na drodze do zastosowania klinicznego, jest pierwotna lub wtórna oporność na działanie TRAIL i analogów. Poznanie mechanizmów leżących u podstaw tych zjawisk może zatem stanowić opartą na wiedzy drogę do ich blokowania, modulacji i eliminacji. Złożoność i różnorodność mechanizmów oporności (zestawionych w tab. 1) — związanych zarówno z ekspresją receptorów śmierci, przewodzeniem sygnału apoptotycznego, stężeniami białek pro- i antyapoptotycznych, jak i związanych z metabolizmem komórek — nie pozwala jednak zaproponować uniwersalnego rozwiązania. Nawet w obrębie jednego nowotworu procesy warunkujące oporność mogą się różnić lub też działać jednocześnie. Znalezienie odpowiednich biomarkerów wskazujących możliwe mechanizmy w danym nowotworze pozwoli identyfikować chorych, u których leczenie TRAIL nie ma szans powodzenia bądź da możliwość zaproponowania terapii kojarzonej z odpowiednim, ingerującym w dany mechanizm oporności, farmaceutykami.

Podziękowania

Niniejsza praca powstała w ramach realizacji projektu NCBiR nr STRATEGMED2/265566/6/NCBR/2015 pt.: Badania przedkliniczne i kliniczne nad przeciwnowotworowym działaniem nowej cząsteczki, pochodnej TRAIL, ukierunkowanej na sygnalizację śmierci komórki — powołanie krajowego ośrodka badań klinicznych wczesnej fazy w onkologii, ONCOTRAIL, Program STRATEGMED II.

Piśmiennictwo

- Nicholson DW. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature*. 2000; 407(6805): 810–816, doi: [10.1038/35037747](https://doi.org/10.1038/35037747), indexed in Pubmed: [11048733](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11048733/).
- Wei MC, Zong WX, Cheng EH, et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*. 2001; 292(5517): 727–730, doi: [10.1126/science.1059108](https://doi.org/10.1126/science.1059108), indexed in Pubmed: [11326099](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11326099/).
- Ashkenazi A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2(6): 420–430, doi: [10.1038/nrc821](https://doi.org/10.1038/nrc821), indexed in Pubmed: [12189384](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12189384/).
- Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M, et al. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature*. 1993; 364(6440): 806–809, doi: [10.1038/364806a0](https://doi.org/10.1038/364806a0), indexed in Pubmed: [7689176](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7689176/).
- Kimura K, Taguchi T, Urushizaki I, et al. Phase I study of recombinant human tumor necrosis factor. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1987; 20(3): 223–229, doi: [10.1007/bf00570490](https://doi.org/10.1007/bf00570490), indexed in Pubmed: [3315281](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3315281/).
- Wiley SR, Schooley K, Smolak P, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*. 1995; 3(6): 673–682, doi: [10.1016/1074-7613\(95\)90057-8](https://doi.org/10.1016/1074-7613(95)90057-8), indexed in Pubmed: [8777713](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8777713/).
- Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, et al. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem*. 1996; 271(22): 12687–12690, doi: [10.1074/jbc.271.22.12687](https://doi.org/10.1074/jbc.271.22.12687), indexed in Pubmed: [8663110](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8663110/).
- Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, et al. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science*. 1997; 277(5327): 818–821, doi: [10.1126/science.277.5327.818](https://doi.org/10.1126/science.277.5327.818), indexed in Pubmed: [9242611](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9242611/).
- Armitage RJ. Tumor necrosis factor receptor superfamily members and their ligands. *Curr Opin Immunol*. 1994; 6(3): 407–413, doi: [10.1016/0952-7915\(94\)90119-8](https://doi.org/10.1016/0952-7915(94)90119-8), indexed in Pubmed: [7917108](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7917108/).
- Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, et al. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science*. 1997; 276(5309): 111–113, doi: [10.1126/science.276.5309.111](https://doi.org/10.1126/science.276.5309.111), indexed in Pubmed: [9082980](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9082980/).
- Walczak H. TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J*. 1997; 16(17): 5386–5397, doi: [10.1093/emboj/16.17.5386](https://doi.org/10.1093/emboj/16.17.5386), indexed in Pubmed: [9311998](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9311998/).
- 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*. 1997; 186(7): 1165–1170, doi: [10.1084/jem.186.7.1165](https://doi.org/10.1084/jem.186.7.1165), indexed in Pubmed: [9314565](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9314565/).
- Degli-Esposti MA, Dougall WC, Smolak PJ, et al. The novel receptor TRAIL-R4 induces NF- κ B and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity*. 1997; 7(6): 813–820, doi: [10.1016/s1074-7613\(00\)80399-4](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80399-4), indexed in Pubmed: [9430226](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9430226/).
- Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, et al. Suppression of TNF- α -induced apoptosis by NF- κ B. *Science*. 1996; 274(5288): 787–789, doi: [10.1126/science.274.5288.787](https://doi.org/10.1126/science.274.5288.787), indexed in Pubmed: [8864120](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8864120/).
- Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) and its receptors in tumor surveillance and cancer therapy. *Apoptosis*. 2002; 7(5): 449–459, doi: [10.1023/a:1020039225764](https://doi.org/10.1023/a:1020039225764), indexed in Pubmed: [12207178](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12207178/).
- Emery JG, McDonnell P, Burke MB, et al. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem*. 1998; 273(23): 14363–14367, doi: [10.1074/jbc.273.23.14363](https://doi.org/10.1074/jbc.273.23.14363), indexed in Pubmed: [9603945](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9603945/).
- Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, et al. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell*. 1996; 85(6): 803–815, doi: [10.1016/s0092-8674\(00\)81265-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81265-9), indexed in Pubmed: [8681376](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8681376/).
- Boldin MP, Varfolomeev EE, Pancer Z, et al. A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem*. 1995; 270(14): 7795–7798, doi: [10.1074/jbc.270.14.7795](https://doi.org/10.1074/jbc.270.14.7795), indexed in Pubmed: [7536190](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7536190/).
- 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*. 2001; 276(49): 46639–46646, doi: [10.1074/jbc.M105102200](https://doi.org/10.1074/jbc.M105102200), indexed in Pubmed: [11583996](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11583996/).
- 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*. 1995; 14(22): 5579–5588, doi: [10.1002/j.1460-2075.1995.tb00245.x](https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb00245.x), indexed in Pubmed: [8521815](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8521815/).
- Stennicke HR, Jürgensmeier JM, Shin H, et al. Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *J Biol Chem*. 1998; 273(42): 27084–27090, doi: [10.1074/jbc.273.42.27084](https://doi.org/10.1074/jbc.273.42.27084), indexed in Pubmed: [9765224](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9765224/).
- Jost PJ, Grabow S, Gray D, et al. XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis. *Nature*. 2009; 460(7258): 1035–1039, doi: [10.1038/nature08229](https://doi.org/10.1038/nature08229), indexed in Pubmed: [19626005](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19626005/).
- Li H, Zhu H, Xu Cj, et al. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*. 1998; 94(4): 491–501, doi: [10.1016/s0092-8674\(00\)81590-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81590-1), indexed in Pubmed: [9727492](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9727492/).
- Lindsten T, Ross A, King A, et al. The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members Bak and Bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell*. 2000; 6(6): 1389–1399, doi: [10.1016/s1097-2765\(00\)00136-2](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)00136-2), indexed in Pubmed: [11163212](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11163212/).
- Arnoult D, Gaume B, Karbowski M, et al. Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *EMBO J*. 2003; 22(17): 4385–4399, doi: [10.1093/emboj/cdg423](https://doi.org/10.1093/emboj/cdg423), indexed in Pubmed: [12941691](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12941691/).
- Li K, Li Y, Shelton J, et al. Cytochrome c deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis. *Cell*. 2000; 101(4): 389–399, doi: [10.1016/s0092-8674\(00\)80849-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80849-1), indexed in Pubmed: [10830166](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10830166/).
- Zou H, Li Y, Liu X, et al. An APAF-1/cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem*. 1999; 274(17): 11549–11556, doi: [10.1074/jbc.274.17.11549](https://doi.org/10.1074/jbc.274.17.11549), indexed in Pubmed: [10206961](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10206961/).

28. Boatright KM, Scott FL, Sperandio S, et al. A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell*. 2003; 11(2): 529–541, doi: [10.1016/s1097-2765\(03\)00051-0](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(03)00051-0), indexed in Pubmed: [12620239](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12620239/).
29. Du C, Fang M, Li Y, et al. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*. 2000; 102(1): 33–42, doi: [10.1016/s0092-8674\(00\)00008-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00008-8), indexed in Pubmed: [10929711](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10929711/).
30. Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, et al. A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell*. 2001; 8(3): 613–621, doi: [10.1016/s1097-2765\(01\)00341-0](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(01)00341-0), indexed in Pubmed: [11583623](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11583623/).
31. Hunter AM, LaCasse EC, Korneluk RG. The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. *Apoptosis*. 2007; 12(9): 1543–1568, doi: [10.1007/s10495-007-0087-3](https://doi.org/10.1007/s10495-007-0087-3), indexed in Pubmed: [17573556](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17573556/).
32. Kemp TJ, Kim JS, Crist SA, et al. Induction of necrotic tumor cell death by TRAIL/Apo-2L. *Apoptosis*. 2003; 8(6): 587–599, doi: [10.1023/a:1026286108366](https://doi.org/10.1023/a:1026286108366), indexed in Pubmed: [14739604](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14739604/).
33. Mocarski ES, Upton JW, Kaiser WJ. Viral infection and the evolution of caspase 8-regulated apoptotic and necrotic death pathways. *Nat Rev Immunol*. 2011; 12(2): 79–88, doi: [10.1038/nri3131](https://doi.org/10.1038/nri3131), indexed in Pubmed: [22193709](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22193709/).
34. Festjens N, Vanden Berghe T, Vandenaebelle P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1757(9-10): 1371–1387, doi: [10.1016/j.bbabi.2006.06.014](https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.06.014), indexed in Pubmed: [16950166](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16950166/).
35. Cho YS, Challa S, Moquin D, et al. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell*. 2009; 137(6): 1112–1123, doi: [10.1016/j.cell.2009.05.037](https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.037), indexed in Pubmed: [19524513](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19524513/).
36. Li J, McQuade T, Siemer AB, et al. The RIP1/RIP3 necrosome forms a functional amyloid signaling complex required for programmed necrosis. *Cell*. 2012; 150(2): 339–350, doi: [10.1016/j.cell.2012.06.019](https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.019), indexed in Pubmed: [22817896](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22817896/).
37. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science*. 1995; 267(5203): 1445–1449, doi: [10.1126/science.7878463](https://doi.org/10.1126/science.7878463), indexed in Pubmed: [7878463](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7878463/).
38. Zhao J, Jitkaew S, Cai Z, et al. Mixed lineage kinase domain-like is a key receptor interacting protein 3 downstream component of TNF-induced necrosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012; 109(14): 5322–5327, doi: [10.1073/pnas.1200012109](https://doi.org/10.1073/pnas.1200012109), indexed in Pubmed: [22421439](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22421439/).
39. Sun L, Wang H, Wang Z, et al. Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. *Cell*. 2012; 148(1-2): 213–227, doi: [10.1016/j.cell.2011.11.031](https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.031), indexed in Pubmed: [22265413](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22265413/).
40. Dyer MJS, MacFarlane M, Cohen GM. Barriers to effective TRAIL-targeted therapy of malignancy. *J Clin Oncol*. 2007; 25(28): 4505–4506, doi: [10.1200/JCO.2007.13.1011](https://doi.org/10.1200/JCO.2007.13.1011), indexed in Pubmed: [17906217](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17906217/).
41. MacFarlane M, Ahmad M, Srinivasula SM, et al. Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem*. 1997; 272(41): 25417–25420, doi: [10.1074/jbc.272.41.25417](https://doi.org/10.1074/jbc.272.41.25417), indexed in Pubmed: [9325248](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9325248/).
42. Lee S, Shin M, Kim H, et al. Alterations of the DR5/TRAIL receptor 2 gene in non-small cell lung cancers. *Cancer Res*. 1999; 59(22): 5683–5686, indexed in Pubmed: [10582684](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10582684/).
43. Pai SI, Wu GS, Ozören N, et al. Rare loss-of-function mutation of a death receptor gene in head and neck cancer. *Cancer Res*. 1998; 58(16): 3513–3518, indexed in Pubmed: [9721851](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9721851/).
44. 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*. 2001; 20(3): 399–403, doi: [10.1038/sj.onc.1204103](https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204103), indexed in Pubmed: [11313970](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11313970/).
45. Yoshida T, Maeda A, Tani N, et al. Promoter structure and transcription initiation sites of the human death receptor 5/TRAIL-R2 gene. *FEBS Lett*. 2001; 507(3): 381–385, doi: [10.1016/s0014-5793\(01\)02947-7](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(01)02947-7), indexed in Pubmed: [11696376](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11696376/).
46. Shetty S, Graham BA, Brown JG, et al. Transcription factor NF-kappaB differentially regulates death receptor 5 expression involving histone deacetylase 1. *Mol Cell Biol*. 2005; 25(13): 5404–5416, doi: [10.1128/MCB.25.13.5404-5416.2005](https://doi.org/10.1128/MCB.25.13.5404-5416.2005), indexed in Pubmed: [15964798](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15964798/).
47. Wagner KW, King F, Nomoto K, et al. Activation and suppression of the TRAIL death-receptor pathway in chemotherapy sensitive and resistant follicular lymphoma cells. *Cancer Biol Ther*. 2003; 2(5): 534–540, doi: [10.4161/cbt.2.5.453](https://doi.org/10.4161/cbt.2.5.453), indexed in Pubmed: [14614322](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14614322/).
48. Rosenwald A, Chuang EY, Davis RE, et al. Fludarabine treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia induces a p53-dependent gene expression response. *Blood*. 2004; 104(5): 1428–1434, doi: [10.1182/blood-2003-09-3236](https://doi.org/10.1182/blood-2003-09-3236), indexed in Pubmed: [15138159](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15138159/).
49. Young KH, Weisenburger DD, Dave BJ, et al. Mutations in the DNA-binding codons of TP53, which are associated with decreased expression of TRAILreceptor-2, predict for poor survival in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2007; 110(13): 4396–4405, doi: [10.1182/blood-2007-02-072082](https://doi.org/10.1182/blood-2007-02-072082), indexed in Pubmed: [17881637](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17881637/).
50. Beg AA, Baltimore D. An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science*. 1996; 274(5288): 782–784, doi: [10.1126/science.274.5288.782](https://doi.org/10.1126/science.274.5288.782), indexed in Pubmed: [8864118](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8864118/).
51. Zong WX, Edelstein LC, Chen C, et al. The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-kappaB that blocks TNFalpha-induced apoptosis. *Genes Dev*. 1999; 13(4): 382–387, doi: [10.1101/gad.13.4.382](https://doi.org/10.1101/gad.13.4.382), indexed in Pubmed: [10049353](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10049353/).
52. Chen C, Edelstein LC, Gélinas C. The Rel/NF-kappaB family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x(L). *Mol Cell Biol*. 2000; 20(8): 2687–2695, doi: [10.1128/mcb.20.8.2687-2695.2000](https://doi.org/10.1128/mcb.20.8.2687-2695.2000), indexed in Pubmed: [10733571](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10733571/).
53. Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, et al. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science*. 1998; 281(5383): 1680–1683, doi: [10.1126/science.281.5383.1680](https://doi.org/10.1126/science.281.5383.1680), indexed in Pubmed: [9733516](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9733516/).
54. Ryan KM, Ernst MK, Rice NR, et al. Role of NF-kappaB in p53-mediated programmed cell death. *Nature*. 2000; 404(6780): 892–897, doi: [10.1038/35009130](https://doi.org/10.1038/35009130), indexed in Pubmed: [10786798](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10786798/).
55. Mendoza FJ, Ishdorj G, Hu X, et al. Death receptor-4 (DR4) expression is regulated by transcription factor NF-kappaB in response to etoposide treatment. *Apoptosis*. 2008; 13(6): 756–770, doi: [10.1007/s10495-008-0210-0](https://doi.org/10.1007/s10495-008-0210-0), indexed in Pubmed: [18421578](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18421578/).
56. Ravi R, Bedi GC, Engstrom LW, et al. Regulation of death receptor expression and TRAIL/Apo2L-induced apoptosis by NF-kappaB. *Nat Cell Biol*. 2001; 3(4): 409–416, doi: [10.1038/35070096](https://doi.org/10.1038/35070096), indexed in Pubmed: [11283615](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11283615/).
57. Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*. 2011; 334(6059): 1081–1086, doi: [10.1126/science.1209038](https://doi.org/10.1126/science.1209038), indexed in Pubmed: [22116877](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22116877/).

58. He Q, Lee DK, Rong R, et al. Endoplasmic reticulum calcium pool depletion-induced apoptosis is coupled with activation of the death receptor 5 pathway. *Oncogene*. 2002; 21(17): 2623–2633, doi: [10.1038/sj.onc.1205345](https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205345), indexed in Pubmed: [11965535](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11965535/).
59. Lim JH, Park JW, Choi KS, et al. Rottlerin induces apoptosis via death receptor 5 (DR5) upregulation through CHOP-dependent and PKC delta-independent mechanism in human malignant tumor cells. *Carcinogenesis*. 2009; 30(5): 729–736, doi: [10.1093/carcin/bgn265](https://doi.org/10.1093/carcin/bgn265), indexed in Pubmed: [19037087](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19037087/).
60. Kim EH, Yoon MJ, Kim SU, et al. Arsenic trioxide sensitizes human glioma cells, but not normal astrocytes, to TRAIL-induced apoptosis via CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein-dependent DR5 up-regulation. *Cancer Res*. 2008; 68(1): 266–275, doi: [10.1158/0008-5472.CAN-07-2444](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2444), indexed in Pubmed: [18172319](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18172319/).
61. Seligson D, Horvath S, Huerta-Yepez S, et al. Expression of transcription factor Yin Yang 1 in prostate cancer. *Cancer Res*. 2005; 65(9 Suppl).
62. Martínez-Paniagua MA, Baritaki S, Huerta-Yepez S, et al. Mcl-1 and YY1 inhibition and induction of DR5 by the BH3-mimetic Obatoclax (GX15-070) contribute in the sensitization of B-NHL cells to TRAIL apoptosis. *Cell Cycle*. 2011; 10(16): 2792–2805, doi: [10.4161/cc.10.16.16952](https://doi.org/10.4161/cc.10.16.16952), indexed in Pubmed: [21822052](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21822052/).
63. Shirley S, Morizot A, Micheau O. Regulating TRAIL receptor-induced cell death at the membrane : a deadly discussion. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*. 2011; 6(3): 311–323, doi: [10.2174/157489211796957757](https://doi.org/10.2174/157489211796957757), indexed in Pubmed: [21756247](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21756247/).
64. Song JJ, Szczepanski MJ, Kim SoY, et al. c-Cbl-mediated degradation of TRAIL receptors is responsible for the development of the early phase of TRAIL resistance. *Cell Signal*. 2010; 22(3): 553–563, doi: [10.1016/j.cellsig.2009.11.012](https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2009.11.012), indexed in Pubmed: [19932172](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19932172/).
65. Sanjay A, Horne WC, Baron R. The Cbl family: ubiquitin ligases regulating signaling by tyrosine kinases. *Sci STKE*. 2001; 2001(110): pe40–pe40, doi: [10.1126/scisignal.1102001pe40](https://doi.org/10.1126/scisignal.1102001pe40), indexed in Pubmed: [11724969](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11724969/).
66. Kim SY, Kim JH, Song JJ. c-Cbl shRNA-expressing adenovirus sensitizes TRAIL-induced apoptosis in prostate cancer DU-145 through increases of DR4/5. *Cancer Gene Ther*. 2013; 20(2): 82–87, doi: [10.1038/cgt.2012.88](https://doi.org/10.1038/cgt.2012.88), indexed in Pubmed: [23306613](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23306613/).
67. Zhang Y, Zhang B. TRAIL resistance of breast cancer cells is associated with constitutive endocytosis of death receptors 4 and 5. *Mol Cancer Res*. 2008; 6(12): 1861–1871, doi: [10.1158/1541-7786.MCR-08-0313](https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-08-0313), indexed in Pubmed: [19074831](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19074831/).
68. Fauconnier J, Meli AC, Thireau J, et al. Ryanodine receptor leak mediated by caspase-8 activation leads to left ventricular injury after myocardial ischemia-reperfusion. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108(32): 13258–13263, doi: [10.1073/pnas.1100286108](https://doi.org/10.1073/pnas.1100286108), indexed in Pubmed: [21788490](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21788490/).
69. Reis CR, Chen PH, Bendris N, et al. TRAIL-death receptor endocytosis and apoptosis are selectively regulated by dynamin-1 activation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017; 114(3): 504–509, doi: [10.1073/pnas.1615072114](https://doi.org/10.1073/pnas.1615072114), indexed in Pubmed: [28049841](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28049841/).
70. Micheau O. Regulation of TNF-related apoptosis-inducing ligand signaling by glycosylation. *Int J Mol Sci*. 2018; 19(3), doi: [10.3390/ijms19030715](https://doi.org/10.3390/ijms19030715), indexed in Pubmed: [29498673](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29498673/).
71. Wagner KW, Punnoose EA, Januario T, et al. Death-receptor O-glycosylation controls tumor-cell sensitivity to the proapoptotic ligand Apo2L/TRAIL. *Nat Med*. 2007; 13(9): 1070–1077, doi: [10.1038/nm1627](https://doi.org/10.1038/nm1627), indexed in Pubmed: [17767167](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17767167/).
72. Dufour F, Rattier T, Shirley S, et al. N-glycosylation of mouse TRAIL-R and human TRAIL-R1 enhances TRAIL-induced death. *Cell Death Differ*. 2017; 24(3): 500–510, doi: [10.1038/cdd.2016.150](https://doi.org/10.1038/cdd.2016.150), indexed in Pubmed: [28186505](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28186505/).
73. Jung YH, Lim EJ, Heo J, et al. Tunicamycin sensitizes human prostate cells to TRAIL-induced apoptosis by upregulation of TRAIL receptors and downregulation of cIAP2. *Int J Oncol*. 2012; 40(6): 1941–1948, doi: [10.3892/ijo.2012.1402](https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1402), indexed in Pubmed: [22426894](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22426894/).
74. Zhang HY, Du ZX, Liu BQ, et al. Tunicamycin enhances TRAIL-induced apoptosis by inhibition of cyclin D1 and the subsequent downregulation of survivin. *Exp Mol Med*. 2009; 41(5): 362–369, doi: [10.3858/emm.2009.41.5.041](https://doi.org/10.3858/emm.2009.41.5.041), indexed in Pubmed: [19307757](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19307757/).
75. MacFarlane M, Robinson GL, Cain K. Glucose — a sweet way to die: metabolic switching modulates tumor cell death. *Cell Cycle*. 2012; 11(21): 3919–3925, doi: [10.4161/cc.21804](https://doi.org/10.4161/cc.21804), indexed in Pubmed: [22983094](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22983094/).
76. Marsters SA, Sheridan JP, Pitti RM, et al. A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Curr Biol*. 1997; 7(12): 1003–1006, doi: [10.1016/s0960-9822\(06\)00422-2](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(06)00422-2), indexed in Pubmed: [9382840](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9382840/).
77. Pan G, Ni J, Wei YF, et al. An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science*. 1997; 277(5327): 815–818, doi: [10.1126/science.277.5327.815](https://doi.org/10.1126/science.277.5327.815), indexed in Pubmed: [9242610](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9242610/).
78. 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*. 1999; 18(28): 4153–4159, doi: [10.1038/sj.onc.1202763](https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202763), indexed in Pubmed: [10435597](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10435597/).
79. Sanlioglu AD, Dirice E, Aydin C, et al. Surface TRAIL decoy receptor-4 expression is correlated with TRAIL resistance in MCF7 breast cancer cells. *BMC Cancer*. 2005; 5: 54, doi: [10.1186/1471-2407-5-54](https://doi.org/10.1186/1471-2407-5-54), indexed in Pubmed: [15916713](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15916713/).
80. Horak P, Pils D, Haller G, et al. Contribution of epigenetic silencing of tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand receptor 1 (DR4) to TRAIL resistance and ovarian cancer. *Mol Cancer Res*. 2005; 3(6): 335–343, doi: [10.1158/1541-7786.MCR-04-0136](https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-04-0136), indexed in Pubmed: [15972852](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15972852/).
81. Simons K, Vaz W. Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 2004; 33(1): 269–295, doi: [10.1146/annurev.biophys.32.110601.141803](https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.32.110601.141803), indexed in Pubmed: [15139814](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15139814/).
82. Song JH, Tse MCL, Bellail A, et al. Lipid rafts and nonrafts mediate tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand induced apoptotic and nonapoptotic signals in non small cell lung carcinoma cells. *Cancer Res*. 2007; 67(14): 6946–6955, doi: [10.1158/0008-5472.CAN-06-3896](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3896), indexed in Pubmed: [17638906](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17638906/).
83. Ouyang W, Yang C, Zhang S, et al. Absence of death receptor translocation into lipid rafts in acquired TRAIL-resistant NSCLC cells. *Int J Oncol*. 2013; 42(2): 699–711, doi: [10.3892/ijo.2012.1748](https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1748), indexed in Pubmed: [23258590](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23258590/).
84. Kuang AA, Diehl GE, Zhang J, et al. FADD is required for DR4- and DR5-mediated apoptosis: lack of trail-induced apoptosis in FADD-deficient mouse embryonic fibroblasts. *J Biol Chem*. 2000; 275(33): 25065–25068, doi: [10.1074/jbc.C000284200](https://doi.org/10.1074/jbc.C000284200), indexed in Pubmed: [10862756](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10862756/).
85. Golks A, Brenner D, Fritsch C, et al. c-FLIPR, a new regulator of death receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 2005; 280(15): 14507–14513, doi: [10.1074/jbc.M414425200](https://doi.org/10.1074/jbc.M414425200), indexed in Pubmed: [15701649](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15701649/).
86. Tschoep J, Irmeler M, Thome M. Inhibition of Fas death signals by FLIPs. *Curr Opin Immunol*. 1998; 10(5): 552–558, doi: [10.1016/s0952-7915\(98\)80223-9](https://doi.org/10.1016/s0952-7915(98)80223-9), indexed in Pubmed: [9794838](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9794838/).

87. Griffith TS, Chin WA, Jackson GC, et al. Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells. *J Immunol.* 1998; 161(6): 2833–2840, indexed in Pubmed: [9743343](#).
88. Hernandez A, Wang QD, Schwartz SA, et al. Sensitization of human colon cancer cells to trail-mediated apoptosis. *J Gastrointest Surg.* 2001; 5(1): 56–65, doi: [10.1016/s1091-255x\(01\)80014-7](#), indexed in Pubmed: [1309649](#).
89. Griffith TS, Fialkov JM, Scott DL, et al. Induction and regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo-2 ligand-mediated apoptosis in renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 2002; 62(11): 3093–3099, indexed in Pubmed: [12036919](#).
90. Fulda S, Meyer E, Debatin KM. Inhibition of TRAIL-induced apoptosis by Bcl-2 overexpression. *Oncogene.* 2002; 21(15): 2283–2294, doi: [10.1038/sj.onc.1205258](#), indexed in Pubmed: [11948412](#).
91. Geserick P, Drewniok C, Hupe M, et al. Suppression of cFLIP is sufficient to sensitize human melanoma cells to TRAIL- and CD95L-mediated apoptosis. *Oncogene.* 2008; 27(22): 3211–3220, doi: [10.1038/sj.onc.1210985](#), indexed in Pubmed: [18084329](#).
92. Bellail AC, Tse MCL, Song JH, et al. DR5-mediated DISC controls caspase-8 cleavage and initiation of apoptosis in human glioblastomas. *J Cell Mol Med.* 2010; 14(6A): 1303–1317, doi: [10.1111/j.1582-4934.2009.00777.x](#), indexed in Pubmed: [19432816](#).
93. Cao X, Pobezinskaya YL, Morgan MJ, et al. The role of TRADD in TRAIL-induced apoptosis and signaling. *FASEB J.* 2011; 25(4): 1353–1358, doi: [10.1096/fj.10-170480](#), indexed in Pubmed: [21187341](#).
94. Braun FK, Mathur R, Sehgal L, et al. Inhibition of methyltransferases accelerates degradation of cFLIP and sensitizes B-cell lymphoma cells to TRAIL-induced apoptosis. *PLoS One.* 2015; 10(3): e0117994, doi: [10.1371/journal.pone.0117994](#), indexed in Pubmed: [25738497](#).
95. Duprez L, Bertrand MJM, Vanden Berghe T, et al. Intermediate domain of receptor-interacting protein kinase 1 (RIPK1) determines switch between necroptosis and RIPK1 kinase-dependent apoptosis. *J Biol Chem.* 2012; 287(18): 14863–14872, doi: [10.1074/jbc.M111.288670](#), indexed in Pubmed: [22362767](#).
96. Sun J, Luo H, Nie W, et al. Protective effect of RIP and c-FLIP in preventing liver cancer cell apoptosis induced by TRAIL. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015; 8(6): 6519–6525, indexed in Pubmed: [26261530](#).
97. Nesterov A, Lu X, Johnson M, et al. Elevated AKT activity protects the prostate cancer cell line LNCaP from TRAIL-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 2001; 276(14): 10767–10774, doi: [10.1074/jbc.M005196200](#), indexed in Pubmed: [11278284](#).
98. Lopez J, Meier P. To fight or die - inhibitor of apoptosis proteins at the crossroad of innate immunity and death. *Curr Opin Cell Biol.* 2010; 22(6): 872–881, doi: [10.1016/j.ceb.2010.08.025](#), indexed in Pubmed: [20888210](#).
99. Miller LK. An exegesis of IAPs: salvation and surprises from BIR motifs. *Trends Cell Biol.* 1999; 9(8): 323–328, doi: [10.1016/s0962-8924\(99\)01609-8](#), indexed in Pubmed: [10407412](#).
100. Bertrand MJM, Milutinovic S, Dickson KM, et al. cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination. *Mol Cell.* 2008; 30(6): 689–700, doi: [10.1016/j.molcel.2008.05.014](#), indexed in Pubmed: [18570872](#).
101. Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell.* 2003; 114(2): 181–190, doi: [10.1016/s0092-8674\(03\)00521-x](#), indexed in Pubmed: [12887920](#).
102. Meylan E, Tschopp J. The RIP kinases: crucial integrators of cellular stress. *Trends Biochem Sci.* 2005; 30(3): 151–159, doi: [10.1016/j.tibs.2005.01.003](#), indexed in Pubmed: [15752987](#).
103. Letai AG. Diagnosing and exploiting cancer's addiction to blocks in apoptosis. *Nat Rev Cancer.* 2008; 8(2): 121–132, doi: [10.1038/nrc2297](#), indexed in Pubmed: [18202696](#).
104. Hinz S, Trauzold A, Boenicke L, et al. Bcl-XL protects pancreatic adenocarcinoma cells against CD95- and TRAIL-receptor-mediated apoptosis. *Oncogene.* 2000; 19(48): 5477–5486, doi: [10.1038/sj.onc.1203936](#), indexed in Pubmed: [11114725](#).
105. Sinicrope FA, Penington RC, Tang XiM. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis is inhibited by Bcl-2 but restored by the small molecule Bcl-2 inhibitor, HA 14-1, in human colon cancer cells. *Clin Cancer Res.* 2004; 10(24): 8284–8292, doi: [10.1158/1078-0432.CCR-04-1289](#), indexed in Pubmed: [15623604](#).
106. Clohessy JG, Zhuang J, de Boer J, et al. Mcl-1 interacts with truncated Bid and inhibits its induction of cytochrome c release and its role in receptor-mediated apoptosis. *J Biol Chem.* 2006; 281(9): 5750–5759, doi: [10.1074/jbc.M505688200](#), indexed in Pubmed: [16380381](#).
107. Ndozangue-Touriguine O, Sebbagh M, Mérino D, et al. A mitochondrial block and expression of XIAP lead to resistance to TRAIL-induced apoptosis during progression to metastasis of a colon carcinoma. *Oncogene.* 2008; 27(46): 6012–6022, doi: [10.1038/onc.2008.197](#), indexed in Pubmed: [18560353](#).
108. Hata AN, Engelman JA, Faber AC. The BCL2 family: key mediators of the apoptotic response to targeted anticancer therapeutics. *Cancer Discov.* 2015; 5(5): 475–487, doi: [10.1158/2159-8290.CD-15-0011](#), indexed in Pubmed: [25895919](#).
109. Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF-kappaB in the immune system. *Annu Rev Immunol.* 1994; 12(1): 141–179, doi: [10.1146/annurev.iy.12.040194.001041](#), indexed in Pubmed: [8011280](#).
110. Malinin NL, Boldin MP, Kovalenko AV, et al. MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature.* 1997; 385(6616): 540–544, doi: [10.1038/385540a0](#), indexed in Pubmed: [9020361](#).
111. Anees M, Horak P, Schiefer AI, et al. The potential evasion of immune surveillance in mucosa associated lymphoid tissue lymphoma by DcR2-mediated up-regulation of nuclear factor-κB. *Leuk Lymphoma.* 2015; 56(5): 1440–1449, doi: [10.3109/10428194.2014.953149](#), indexed in Pubmed: [25248880](#).
112. Fadeev RS, Solovieva ME, Slyadovskiy DA, et al. [Inhibition of NF-κB activation decreases resistance in acute myeloid leukemia cells to TRAIL-induced apoptosis in multicellular aggregates]. [Article in Russian]. *Biofizika.* 2015; 60(6): 1146–1150, indexed in Pubmed: [26841509](#).
113. Crowder RN, El-Deiry WS. Caspase-8 regulation of TRAIL-mediated cell death. *Exp Oncol.* 2012; 34(3): 160–164, indexed in Pubmed: [23070000](#).
114. Soung YH, Lee JW, Kim SY, et al. CASPASE-8 gene is inactivated by somatic mutations in gastric carcinomas. *Cancer Res.* 2005; 65(3): 815–821, indexed in Pubmed: [15705878](#).
115. Eggert A, Grotzer M, Zuzak T, et al. Resistance to TRAIL-induced apoptosis in neuroblastoma cells correlates with a loss of caspase-8 expression. *Med Pediatr Oncol.* 2000; 35(6): 603–607, doi: [10.1002/1096-911x\(20001201\)35:6<603::aid-mpo24>3.0.co;2-1](#), indexed in Pubmed: [11107127](#).
116. Grotzer MA, Eggert A, Zuzak TJ, et al. Resistance to TRAIL-induced apoptosis in primitive neuroectodermal brain tumor cells correlates with a loss of caspase-8 expression. *Oncogene.* 2000; 19(40): 4604–4610, doi: [10.1038/sj.onc.1203816](#), indexed in Pubmed: [11030149](#).
117. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proli-

- feration. *Science*. 2009; 324(5930): 1029–1033, doi: [10.1126/science.1160809](https://doi.org/10.1126/science.1160809), indexed in Pubmed: [19460998](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19460998/).
118. Pradelli LA, Bénétteau M, Chauvin C, et al. Glycolysis inhibition sensitizes tumor cells to death receptors-induced apoptosis by AMP kinase activation leading to Mcl-1 block in translation. *Oncogene*. 2010; 29(11): 1641–1652, doi: [10.1038/onc.2009.448](https://doi.org/10.1038/onc.2009.448), indexed in Pubmed: [19966861](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19966861/).
 119. Robinson GL, Dinsdale D, Macfarlane M, et al. Switching from aerobic glycolysis to oxidative phosphorylation modulates the sensitivity of mantle cell lymphoma cells to TRAIL. *Oncogene*. 2012; 31(48): 4996–5006, doi: [10.1038/onc.2012.13](https://doi.org/10.1038/onc.2012.13), indexed in Pubmed: [22310286](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22310286/).
 120. Pradelli LA, Bénétteau M, Chauvin C, et al. Glycolysis inhibition sensitizes tumor cells to death receptors-induced apoptosis by AMP kinase activation leading to Mcl-1 block in translation. *Oncogene*. 2010; 29(11): 1641–1652, doi: [10.1038/onc.2009.448](https://doi.org/10.1038/onc.2009.448), indexed in Pubmed: [19966861](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19966861/).
 121. Salinas M, López-Valdaliso R, Martín D, et al. Inhibition of PKB/Akt1 by C2-ceramide involves activation of ceramide-activated protein phosphatase in PC12 cells. *Mol Cell Neurosci*. 2000; 15(2): 156–169, doi: [10.1006/mcne.1999.0813](https://doi.org/10.1006/mcne.1999.0813), indexed in Pubmed: [10673324](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10673324/).
 122. Nam SY, Amoscato AA, Lee YJ. Low glucose-enhanced TRAIL cytotoxicity is mediated through the ceramide-Akt-FLIP pathway. *Oncogene*. 2002; 21(3): 337–346, doi: [10.1038/sj.onc.1205068](https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205068), indexed in Pubmed: [11821946](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11821946/).
 123. Kroemer G, Mariño G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell*. 2010; 40(2): 280–293, doi: [10.1016/j.molcel.2010.09.023](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.023), indexed in Pubmed: [20965422](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20965422/).
 124. Green DR, Levine B. To be or not to be? How selective autophagy and cell death govern cell fate. *Cell*. 2014; 157(1): 65–75, doi: [10.1016/j.cell.2014.02.049](https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.049), indexed in Pubmed: [24679527](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24679527/).
 125. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*. 2008; 132(1): 27–42, doi: [10.1016/j.cell.2007.12.018](https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.018), indexed in Pubmed: [18191218](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18191218/).
 126. Rubinstein AD, Kimchi A. Life in the balance - a mechanistic view of the crosstalk between autophagy and apoptosis. *J Cell Sci*. 2012; 125(Pt 22): 5259–5268, doi: [10.1242/jcs.115865](https://doi.org/10.1242/jcs.115865), indexed in Pubmed: [23377657](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23377657/).
 127. Di Xu, Zhang G, Zhang Y, et al. Accumulation of autophagosomes in breast cancer cells induces TRAIL resistance through down-regulation of surface expression of death receptors 4 and 5. *Oncotarget*. 2013; 4(9): 1349–1364, doi: [10.18632/oncotarget.1174](https://doi.org/10.18632/oncotarget.1174), indexed in Pubmed: [23988408](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23988408/).
 128. Hou W, Han J, Lu C, et al. Enhancement of tumor-TRAIL susceptibility by modulation of autophagy. *Autophagy*. 2008; 4(7): 940–943, doi: [10.4161/auto.6769](https://doi.org/10.4161/auto.6769), indexed in Pubmed: [18769107](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18769107/).