

APOPTOSI E AUTOFAGIA NEI TUMORI: INDIVIDUAZIONE DI NUOVI BERSAGLI TERAPEUTICI E INDICATORI PROGNOSTICI E PREDITTIVI DI RISPOSTA ALLA TERAPIA

Walter Malorni (a), Paola Matarrese (a), Marina Pierdominici (b)

(a) Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(b) Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma

In questi ultimi anni l'approccio alla diagnostica e alla terapia dei tumori è stato fortemente influenzato dalla disponibilità di sempre maggiori informazioni riguardanti due differenti processi cellulari che rappresentano un target importante per la cosiddetta *molecularly targeted therapy*: l'apoptosi e l'autofagia. In particolare, l'attenzione maggiore è stata rivolta verso le cascate intracellulari che si attivano in questi due processi sia in termini di *signaling* che di effettori enzimatici.

L'apoptosi è un processo ormai ben noto. La sequenza di eventi che si susseguono durante l'apoptosi richiede energia sotto forma di adenosina trifosfato (ATP) e, soprattutto, è soggetta a meccanismi di controllo rigorosi e complessi, che assicurano un corretto *turnover* cellulare. Per questo motivo tale processo viene anche detto "morte cellulare programmata". L'apoptosi rappresenta quindi un processo attivo e ben definito che gioca un ruolo importante nello sviluppo degli organismi multicellulari (1) e nella regolazione dell'omeostasi tissutale contribuendo a mantenere un equilibrio tra la produzione di nuove cellule e l'eliminazione di quelle oramai giunte a senescenza, o che hanno subito un grave danno e sono quindi potenzialmente pericolose (2, 3). Un'inibizione dei processi apoptotici ha come conseguenza una eccessiva proliferazione cellulare che può essere causa di malformazioni, durante lo sviluppo embrionale, di patologie autoimmuni (4, 5, 6) e di tumori. Per questo, la comprensione dei fenomeni apoptotici ha assunto una grande importanza nello studio dei tumori e nella loro terapia (7, 8). Molti lavori hanno evidenziato come una riduzione dell'apoptosi può essere coinvolta nell'insorgenza del cancro e nella resistenza alla chemioterapia e, di conseguenza, molte delle recenti ricerche focalizzano l'attenzione su nuove terapie antitumorali che siano in grado di indurre apoptosi e di superare la resistenza intrinseca ai chemioterapici (9). Ricordiamo in breve che l'apoptosi può essere indotta sia per via recettoriale (estrinseca), attraverso l'attivazione di specifici recettori cellulari, per esempio della famiglia del recettore del TNF (*Tumor Necrosis Factor*) (CD95/Fas, TRAIL), sia per via mitocondriale (intrinseca), in risposta ad una varietà di stimoli quali agenti chemioterapici, radiazioni, allontanamento dei fattori di crescita (10, 11). Sono così divenuti d'interesse sia il *triggering* apoptotico recettoriale, tramite l'impiego di ligandi, che quello mitocondriale, attraverso sostanze mitocondriotropiche. Tutti gli effettori e i repressori dell'apoptosi sono divenuti bersagli terapeutici rilevanti: dai recettori di superficie della famiglia del TNF agli enzimi coinvolti nel programma di morte cellulare. Alcuni di questi sono inoltre divenuti importanti *tools* diagnostici e prognostici, come ad esempio il fattore di trascrizione p53, nonché indicatori di risposta alla terapia.

Per ciò che riguarda l'autofagia, fino a pochi anni fa considerata un tipo di morte cellulare distinto dall'apoptosi, questa è oggi invece considerata un meccanismo di citoprotezione che la cellula mette in atto per sopravvivere in condizioni di stress (12, 13). È sostanzialmente un meccanismo che consente alla cellula, attraverso i lisosomi, di eliminare e riciclare materiale citoplasmatico, proteine o interi organelli per ricavarne energia in situazioni di scarsa

disponibilità di nutrienti o di aumentata richiesta da parte della cellula (come per esempio in seguito ad uno stress metabolico) ed è biochimicamente distinta da altri processi degradativi che avvengono nella cellula e sono dipendenti dall'attività del proteasoma. Solo quando tutte le risorse interne sono esaurite, l'autofagia esita nella morte della cellula.

Alterazioni del macchinario autofagico sono state associate alla patogenesi di un ampio spettro di patologie, dalle malattie infettive ai disordini neurodegenerativi, al cancro. In particolare, l'associazione tra autofagia e cancro appare complessa e contraddittoria (14, 15). Infatti, se da una parte l'autofagia rappresenta un meccanismo di soppressione tumorale, mitigando il danno cellulare in risposta allo stress, dall'altra, essa consente alle cellule tumorali di tollerare vari tipi di stress (per esempio l'ipossia del microambiente tumorale, la deprivazione di nutrienti), rappresentando quindi uno dei principali ostacoli al raggiungimento di un risultato efficace nella terapia antitumorale. In aggiunta, complesse interazioni tra autofagia e apoptosi sono state descritte in differenti tipi cellulari, dove l'inibizione del *pathway* apoptotico induce un'attivazione di quello autofagico e viceversa (16). Per riconciliare questi dati, è stato suggerito che il significato dell'autofagia nei tumori potrebbe essere differente in rapporto alle diverse fasi del processo di formazione del tumore. Nella tumorigenesi, la sua funzione potrebbe essere quella di opporsi alla proliferazione delle cellule trasformate mentre, nelle fasi più tardive, ad esempio nella metastatizzazione, potrebbe promuovere la sopravvivenza delle cellule tumorali alla terapia farmacologica e la loro disseminazione.

Anche per l'autofagia, i meccanismi e i fattori che ne determinano il flusso sono oggi in parte noti e il programma autofagico e le sue componenti, ad esempio il *pathway* costituito da fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3K) di classe I, Akt/proteina chinasi B (Akt/PKB) e la proteina chinasi Tor (*mammalian Target of Rapamycin*, mTOR), sono divenuti bersaglio per la cosiddetta *targeted therapy* e per la terapia metabolica. Nuovi farmaci sono quindi in sperimentazione clinica con l'obiettivo di modulare l'autofagia nella cellula tumorale (17). Tuttavia, considerando il differente significato che l'autofagia può assumere nelle diverse fasi della crescita tumorale e che la funzione dell'autofagia dipende dal complesso substrato genetico della cellula e dal microambiente tumorale, l'identificazione di un profilo che includa tutti questi parametri è essenziale al fine di selezionare un trattamento efficace. Al momento attuale però, la maggioranza degli studi clinici di fase I/II che hanno utilizzato farmaci a bersaglio in monoterapia hanno mostrato una modesta attività antitumorale, verosimilmente dovuta alla ridondanza delle vie di trasduzione dei segnali che sono deregolate nelle cellule tumorali. Infatti, appare poco verosimile che il blocco di un singolo bersaglio possa consentire di correggere l'insieme dei meccanismi di segnalazione, alterati nella cellula neoplastica. Pertanto, la combinazione razionale di farmaci rappresenta la strategia da perseguire per ottimizzare la terapia con farmaci a bersaglio molecolare.

In questo contesto il nostro gruppo ha sostanzialmente focalizzato i propri studi su:

- terapia a bersaglio molecolare (*molecularly targeted therapy*);
- indicatori innovativi di progressione tumorale e di risposta alla terapia;
- genere e tumori.

Terapia a bersaglio molecolare

Per quanto riguarda lo sviluppo della *molecularly targeted therapy*, sono stati affrontati e si stanno affrontando alcuni punti chiave in collaborazione con numerosi gruppi di ricerca sia clinica che di base. Un primo argomento di interesse per i nostri studi è rappresentato dal ruolo svolto dal microambiente nell'espansione tumorale. In particolare, uno dei punti di interesse del

microambiente tumorale è il suo ruolo fondamentale nel processo di metastatizzazione. Alcune proteasi lisosomiali svolgono un'importante attività sia all'interno della cellula che nell'ambiente ad essa circostante, dove vengono secrete dalle cellule tumorali. Nei nostri studi sono state prese in considerazione le catepsine. Le catepsine sono una famiglia di proteasi coinvolte in vari processi fisiologici, come la presentazione dell'antigene nel sistema immunitario (18), e in processi patologici, come l'invasività e la metastatizzazione tumorale (19). Infatti, da numerosi studi emerge che molti tipi di tumori umani esprimono e secernono nel microambiente circostante elevate quantità di catepsine attive, che conferiscono loro una maggiore capacità invasiva (20). Abbiamo quindi studiato, in collaborazione con il dott. Marco Paggi e il dott. Carlo Leonetti (Istituto Regina Elena, Roma) e la dott.ssa Caterina Catricalà (Istituto San Gallicano, Roma) se e come l'inibizione delle catepsine potesse modulare l'invasività tumorale e abbiamo individuato nella catepsina B un importante e innovativo target terapeutico (21). Sono in corso studi in collaborazione con l'Università di Siena (prof. Maurizio Botta) per individuare e sintetizzare differenti inibitori della catepsina B, anche attraverso uno screening *in silico*. Uno studio pilota condotto *in vitro* e *in vivo* dal nostro gruppo ha evidenziato le possibilità applicative degli inibitori della catepsina B al fine di inibire i processi invasivi, in particolare nel melanoma (21). L'impiego terapeutico di inibitori sintetici della catepsina B con buona tollerabilità rappresenterebbe una strategia innovativa mirata ad interferire specificamente con la malattia metastatica (22). Ricordiamo infatti che la catepsina B è overespressa nel melanoma metastatico, non solo cutaneo, ma non nel primitivo e che la malattia metastatica rappresenta la maggiore complicanza clinica nella gestione della patologia oncologica soprattutto in quei tumori, come il melanoma, dove la chirurgia risulta totalmente risolutiva verso il tumore primario.

Il secondo obiettivo della nostra ricerca è rappresentato dall'individuazione di nuovi bersagli terapeutici legati all'apoptosi e all'autofagia. Nonostante i progressi terapeutici, le strategie di trattamento attualmente disponibili non assicurano una cura adeguata della malattia ad una significativa porzione di pazienti, suggerendo la necessità di nuove strategie terapeutiche. Nostri dati sia *in vitro* ed *ex vivo* di recente acquisizione, ottenuti in collaborazione con l'Istituto dei Tumori di Milano (prof. Carmelo Carlo-Stella), suggeriscono che farmaci a bersaglio molecolare (es. la perifosina, inibitore di PI3K/AKT/mTOR e l'inibitore multichinasico Sorafenib), possono rappresentare molecole promettenti per il trattamento del linfoma recidivato o refrattario in quanto capaci di bersagliare differenti meccanismi cruciali delle vie di trasduzione del segnale sia apoptotico che autofagico.

L'integrità funzionale del mitocondrio è fondamentale nella sopravvivenza cellulare e la sua alterazione rappresenta un evento chiave nell'induzione di apoptosi (23-28). Il mitocondrio può pertanto considerarsi un potenziale target terapeutico per incrementare l'apoptosi nelle cellule tumorali. I nostri studi al riguardo sono stati effettuati soprattutto su cellule leucemiche ed hanno messo in evidenza il ruolo chiave dei glicosfingolipidi nel *remodelling* mitocondriale (equilibrio fissione/fusione) che esita nella morte cellulare (28). Alcuni farmaci specificamente *targeted* ai mitocondri, ad esempio edelfosina e perifosina, in grado di interferire con i *lipid rafts* e i processi di fissione, sono attualmente in studio nei nostri laboratori. Inoltre, la cascata biochimica che sottende il *triggering* e l'esecuzione dell'apoptosi rappresenta anch'essa un possibile bersaglio terapeutico. È noto che le cellule tumorali presentano difetti nel macchinario apoptotico che sono, almeno in parte, responsabili della resistenza del tumore agli agenti chemioterapici comunemente usati. Gli studi condotti dal nostro gruppo in cellule di melanoma metastatico hanno evidenziato come alcuni farmaci capaci di interferire con la cascata apoptotica, superando eventuali difetti del macchinario biochimico di morte, possano parzialmente ripristinare la suscettibilità all'apoptosi (29, 30).

Le principali problematiche che si accompagnano alla terapia dei tumori sono quindi legate essenzialmente a due aspetti: (i) la resistenza all'apoptosi indotta dai farmaci, che si può sviluppare nelle cellule tumorali anche in corso di terapia e (ii) la tossicità associata all'uso dei farmaci antineoplastici. In considerazione di questi aspetti, una molecola biologica particolarmente promettente nella terapia dei tumori è TRAIL. Appartenente alla superfamiglia di citochine facenti capo al TNF. TRAIL rappresenta una molecola potenzialmente utile nella terapia dei tumori grazie alla sua selettività nell'indurre apoptosi in cellule tumorali con minimo impatto sulle cellule "normali" (31). TRAIL, anche noto come APO-2, così come altri membri della famiglia del TNF, induce apoptosi nelle cellule bersaglio che esprimono gli appropriati recettori di morte (32). Nella membrana plasmatica sono stati identificati 5 recettori, due soli dei quali inducono apoptosi quando legano TRAIL (TRAIL-R1/DR4 e TRAIL-R2/DR5). Entrambi sono espressi nella maggior parte dei tessuti umani normali e tumorali. Il legame di TRAIL con i recettori DR4 e DR5 sarebbe in grado di indurre apoptosi attraverso l'attivazione diretta di proteine effettrici come le caspasi (la 3, la 6 e la 7) o attraverso la disattivazione di proteine anti-apoptotiche della famiglia BCL-2 e la conseguente attivazione della caspasi 9. È stato recentemente dimostrato che il recettore DR5 viene reclutato a livello dei *lipid rafts* di membrana dal legame con TRAIL e che tale reclutamento ne determina l'attivazione (33). Appare quindi evidente che, oltre al livello di espressione di DR5 in membrana, anche la sua localizzazione a livello dei *lipid rafts* può contribuire a determinare la suscettibilità di una cellula alla morte mediata da TRAIL. Sulla base di quanto detto, l'obiettivo della nostra ricerca è quello di valutare la possibilità di utilizzare con successo TRAIL, da solo o in associazione a farmaci antitumorali convenzionali, su linee cellulari di varia origine (linfomi, carcinomi, melanomi) caratterizzati da una alta resistenza intrinseca ai trattamenti farmacologici. Parallelamente stiamo valutando la citotossicità indotta da TRAIL su cellule non trasformate di endotelio umano al fine di verificare la selettività di TRAIL e di prevedere possibili effetti tossici vascolari *in vivo*.

Indicatori innovativi di progressione tumorale e di risposta alla terapia

Il termine di marcatore tumorale comprende una serie di molecole in grado di rivelare l'insorgenza di un tumore e/o la sua progressione. L'assenza di segni clinici nella fase iniziale di malattia, l'eterogeneità fenotipica del tumore, la variabilità interindividuale della risposta al trattamento farmacologico o della durata di remissione, rappresentano alcune delle criticità nella gestione clinica dei tumori che giustificano il forte impegno della ricerca traslazionale nella identificazione di nuovi marcatori tumorali che consentano un costante monitoraggio dello stato della malattia. In aggiunta, l'introduzione della *molecularly targeted therapy* implica l'identificazione di nuovi marcatori di risposta alla terapia associati ai nuovi trattamenti. Il nostro lavoro è indirizzato verso l'individuazione di marcatori cellulari e/o sierici tumore-specifici correlati all'apoptosi e/o all'autofagia di possibile utilizzo sia nella prognosi che nel monitoraggio della risposta terapeutica.

L'identificazione di determinanti autofagici, di possibile uso nella pratica clinica come indicatori prognostici e/o di risposta alla terapia, è, ad esempio, un obiettivo chiave di uno studio in collaborazione con l'Istituto Tumori di Milano (prof. Alessandro M. Gianni, prof. Carmelo Carlo-Stella), riguardante il ruolo dell'autofagia nel modulare la risposta terapeutica a farmaci a bersaglio molecolare di pazienti con linfoma recidivato o refrattario. I linfomi sono malattie geneticamente eterogenee con una marcata tendenza a divenire resistenti agli stimoli

citotossici e pro-apoptotici (34). È quindi evidente la necessità di individuare nuovi marcatori prognostici da utilizzare al momento della diagnosi o, nel caso di recidiva, per identificare i sottogruppi di pazienti ad alto rischio al fine di indirizzarli a programmi terapeutici dedicati.

La correlazione che abbiamo osservato tra livelli di autofagia e parametri clinici di malattia in pazienti arruolati in *trial* clinici di fase II in trattamento con i farmaci suddetti sembra suggerire il possibile utilizzo di marcatori correlati all'autofagia (es. la proteina LC3, ERK) come bioindicatori prognostici e di risposta alla terapia. Il dato è particolarmente interessante in quanto ottenuto nei linfociti del sangue periferico dei pazienti. L'analisi di questo biomarcatore consentirebbe quindi di monitorare lo stato di malattia con un esame non invasivo.

Recentemente è stato anche evidenziato che la presenza di specifici autoanticorpi può essere indice di malattia neoplastica. Pertanto, il dosaggio degli autoanticorpi come marcatori surrogati potrebbe rivelarsi assai utile per monitorare la progressione tumorale e la risposta alla terapia. È infatti ormai nota l'associazione tra malattie autoimmuni e tumori (35). Nel caso ad esempio dei linfomi, è stato dimostrato che il repertorio degli autoanticorpi sierici è sovrapponibile, almeno in parte, con quello osservato nelle malattie autoimmuni (36). Lo studio di autoanticorpi sierici specifici verso un pannello di autoantigeni noti o neoantigeni, inclusi quelli associati ad apoptosi, da identificare mediante un approccio di immunoproteomica, è in corso nel nostro laboratorio in differenti tumori solidi e/o ematologici.

Genere e tumori

Da ultimo, si sta affrontando un aspetto molto innovativo riguardo allo studio dei tumori: la questione del genere (37-40). Esistono infatti neoplasie prevalenti (come ad esempio il carcinoma mammario, prevalente, ma non esclusivo, nel genere femminile) o esclusive di uno dei due generi (come il carcinoma della prostata, dell'utero e delle ovaie). Ma ciò che maggiormente colpisce sono le differenze d'incidenza, risposta alla terapia e mortalità che si riscontrano in tumori non strettamente *gender*-associati (come ad esempio, alcuni linfomi, il melanoma, i carcinomi del colon e del polmone ecc). Tali differenze sono in parte legate al diverso assetto ormonale che caratterizza l'uomo e la donna e che può fortemente influenzare l'insorgenza e lo sviluppo del tumore e gli effetti della terapia. Ma non tutte le differenze evidenziate sono riconducibili all'aspetto ormonale. Infatti, importanti differenze di genere sono anche state osservate nel caso di tumori infantili quali leucemie e linfomi. Questi dati epidemiologici, solo recentemente evidenziati, indicano un nuovo obiettivo nella ricerca per lo sviluppo della terapia a bersaglio molecolare: la sempre maggiore personalizzazione della cura sulla base delle caratteristiche biologiche del tumore, del substrato genetico del paziente e del suo genere di appartenenza.

Bibliografia

1. Jacobson MD, Weil M, Raff MC. Programmed cell death in animal development. *Cell* 1997; 88:347-54.
2. Lockshin RA, Zakeri Z. Programmed cell death and apoptosis: Origins of the theory. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:545-50.
3. Horvitz HR. Nobel lecture. Worms, life and death. *Biosci Rep* 2003;23:239-303.
4. Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 1992;356:314-7.

5. Siegel RM, Chan FK, Chun HJ, Lenardo MJ. The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity. *Nat Immunol* 2000;1:469-74.
6. Lauber K, Blumenthal SG, Waibel M, Wesselborg S. Clearance of apoptotic cells: Getting rid of the corpses. *Mol Cell* 2004;14:277-87.
7. Andersen MH, Becker JC, Straten P. Regulators of apoptosis: Suitable targets for immune therapy of cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2005;4:399-409.
8. Wright SC, Zhong J, Larrick JW. Inhibition of apoptosis as a mechanism of tumor promotion. *FASEB J* 1994;8:654-60.
9. Call JA, Eckhardt SG, Camidge DR. Targeted manipulation of apoptosis in cancer treatment. *Lancet Oncol* 2008;9:1002-11.
10. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: Critical control points. *Cell* 2004;116:205-19.
11. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nunez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G. Classification of cell death: Recommendations of the nomenclature committee on cell death 2009. *Cell Death Differ* 2009;16:3-11.
12. Klionsky DJ. Autophagy: From phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8:931-7.
13. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 2008;32:27-42.
14. Morselli E, Galluzzi L, Kepp O, Vicencio JM, Criollo A, Maiuri MC, Kroemer G. Anti- and pro-tumor functions of autophagy. *Biochim Biophys Acta* 2009;1793:1524-32.
15. White E, DiPaola RS. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15:5308-16.
16. Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and self-killing: Crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:741-52.
17. Dalby KN, Tekedereli I, Lopez-Berestein G, Ozpolat B. *Targeting* the prodeath and prosurvival functions of autophagy as novel therapeutic strategies in cancer. *Autophagy* 2010; 6:322-9.
18. Turk V, Turk B, Turk D. Lysosomal cysteine proteases: Facts and opportunities. *EMBO J* 2001;20:4629-33.
19. Fehrenbacher N, Gyrd-Hansen M, Poulsen B, Felbor U, Kallunki T, Boes M, Weber E, Leist M, Jaattela M. Sensitization to the lysosomal cell death *pathway* upon immortalization and transformation. *Cancer Res* 2004;64:5301-10.
20. Rochefort H, Garcia M, Glondu M, Laurent V, Liaudet E, Rey JM, Roger P. Cathepsin d in breast cancer: Mechanisms and clinical applications, a 1999 overview. *Clin Chim Acta* 2000;291:157-70.
21. Matarrese P, Ascione B, Ciarlo L, Vona R, Leonetti C, Scarsella M, Mileo AM, Catricala C, Paggi MG, Malorni W. Cathepsin B inhibition interferes with metastatic potential of human melanoma: An *in vitro* and *in vivo* study. *Mol Cancer* 2010;9:207.
22. Federici C, Brambilla D, Lozupone F, Matarrese P, de Milito A, Lugini L, Iessi E, Cecchetti S, Marino M, Perdicchio M, Logozzi M, Spada M, Malorni W, Fais S. Pleiotropic function of ezrin in human metastatic melanomas. *Int J Cancer* 2009;124:2804-12.
23. Sorice M, Matarrese P, Tinari A, Giammarioli AM, Garofalo T, Manganelli V, Ciarlo L, Gambardella L, Maccari G, Botta M, Misasi R, Malorni W. Raft component GD3 associates with tubulin following CD95/Fas ligation. *FASEB J* 2009;23:3298-308.
24. Sorice M, Manganelli V, Matarrese P, Tinari A, Misasi R, Malorni W, Garofalo T. Cardiolipin-enriched raft-like microdomains are essential activating platforms for apoptotic signals on mitochondria. *FEBS Lett* 2009;583:2447-50.

25. Giammarioli AM, Vona R, Gambardella L, Ascione B, Maselli A, Barbati C, Tinari A, Malorni W. Interferon-gamma bolsters CD95/Fas-mediated apoptosis of astrogloma cells. *FEBS J* 2009;276:5920-35.
26. Ciarlo L, Manganelli V, Garofalo T, Matarrese P, Tinari A, Misasi R, Malorni W, Sorice M. Association of fission proteins with mitochondrial raft-like domains. *Cell Death Differ* 2010;17:1047-58.
27. Costa V, Giacomello M, Hudec R, Lopreiato R, Ermak G, Lim D, Malorni W, Davies KJ, Carafoli E, Scorrano L. Mitochondrial fission and cristae disruption increase the response of cell models of Huntington's disease to apoptotic stimuli. *EMBO Mol Med* 2010;2:490-503.
28. Sorice M, Garofalo T, Misasi R, Manganelli V, Vona R, Malorni W. Ganglioside GD3 as a raft component in cell death regulation. *Anticancer Agents Med Chem* 2011, May 9 (online prima della stampa).
29. Giammarioli AM, Maselli A, Casagrande A, Gambardella L, Gallina A, Spada M, Giovannetti A, Proietti E, Malorni W, Pierdominici M. Pyrimethamine induces apoptosis of melanoma cells via a caspase and cathepsin double-edged mechanism. *Cancer Res* 2008;68:5291-300.
30. Pierdominici M, Giammarioli AM, Gambardella L, De Felice M, Quinti I, Iacobini M, Carbonari M, Malorni W, Giovannetti A. Pyrimethamine (2,4-diamino-5-p-chlorophenyl-6-ethylpyrimidine) induces apoptosis of freshly isolated human T lymphocytes, bypassing CD95/Fas molecule but involving its intrinsic pathway. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;315:1046-57.
31. Lavazza C, Carlo-Stella C, Giacomini A, Cleris L, Righi M, Sia D, Di Nicola M, Magni M, Longoni P, Milanese M, Francolini M, Gloghini A, Carbone A, Formelli F, Gianni AM. Human CD34+ cells engineered to express membrane-bound tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand target both tumor cells and tumor vasculature. *Blood* 2010;115:2231-40.
32. Carlo-Stella C, Lavazza C, Locatelli A, Vigano L, Gianni AM, Gianni L. *Targeting* trail agonistic receptors for cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2007;13:2313-7.
33. Min Y, Shi J, Zhang Y, Liu S, Liu Y, Zheng D. Death receptor 5-recruited raft components contributes to the sensitivity of jurkat leukemia cell lines to trail-induced cell death. *IUBMB Life* 2009;61:261-7.
34. Kuppers R. The biology of hodgkin's lymphoma. *Nat Rev Cancer* 2009;9:15-27.
35. Lleo A, Invernizzi P, Gao B, Podda M, Gershwin ME. Definition of human autoimmunity-autoantibodies versus autoimmune disease. *Autoimmun Rev* 2010;9:A259-66.
36. Martin DN, Mikhail IS, Landgren O. Autoimmunity and hematologic malignancies: Associations and mechanisms. *Leuk Lymphoma* 2009;50:541-50.
37. Lista P, Straface E, Brunelleschi S, Franconi F, Malorni W. On the role of autophagy in human diseases: A gender perspective. *J Cell Mol Med* 2011;15(7):1443-57.
38. Maselli A, Matarrese P, Straface E, Canu S, Franconi F, Malorni W. Cell sex: A new look at cell fate studies. *FASEB J* 2009;23:978-84.
39. Ruggieri A, Barbati C, Malorni W. Cellular and molecular mechanisms involved in hepatocellular carcinoma gender disparity. *Int J Cancer* 2010;127:499-504.
40. Paggi MG, Vona R, Abbruzzese C, Malorni W. Gender-related disparities in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett* 2010;298:1-8.