

# Potenziale utilizzo terapeutico dei “death receptors”

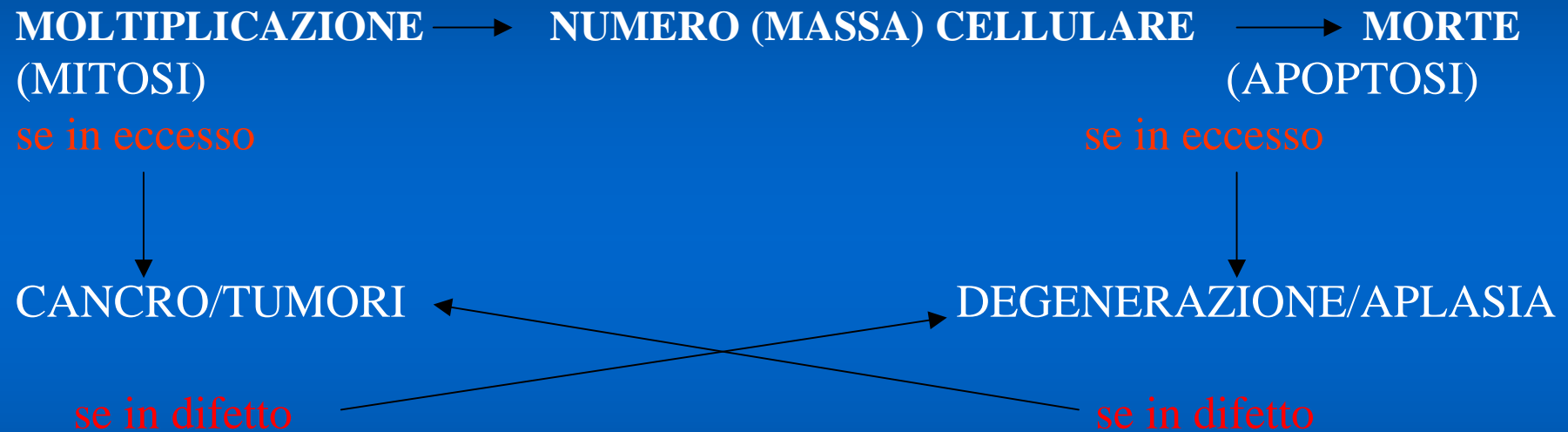
A cura di Nicola Russo  
(BJL)

# APOPTOSI: morte cellulare programmata o “suicidio cellulare”

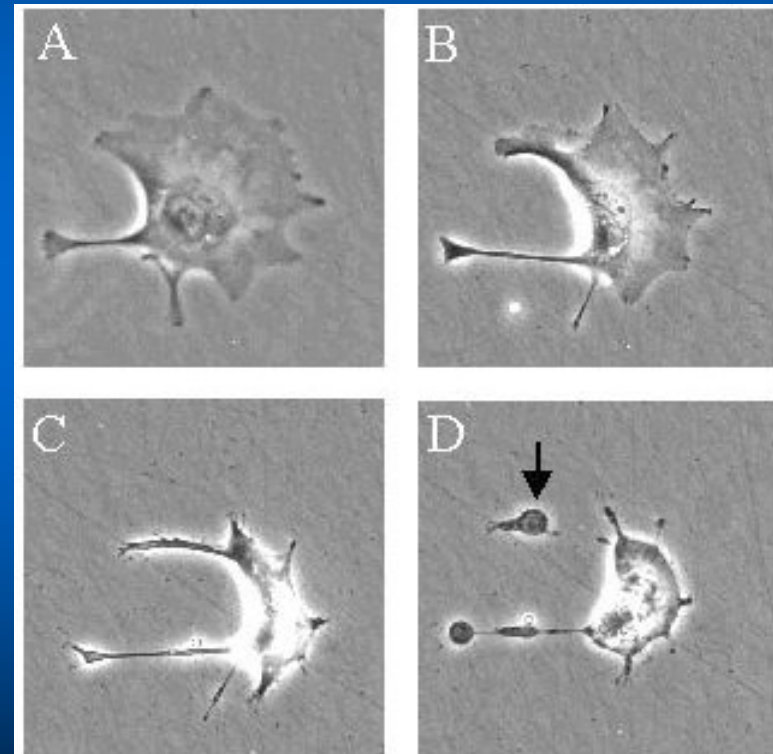
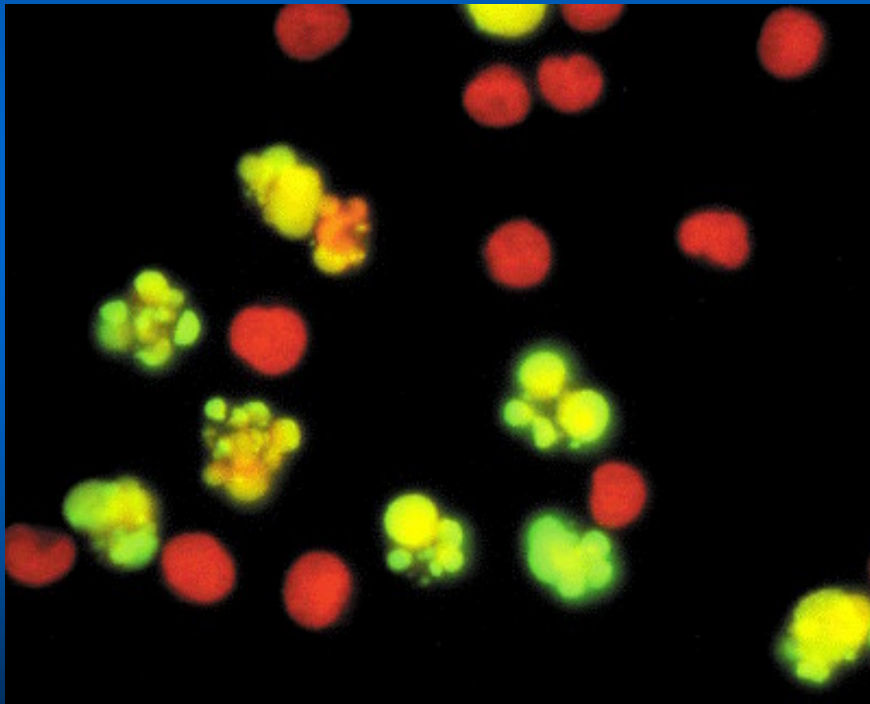
- È una modalità di morte cellulare “attiva”, tipica di cellule di organismi pluricellulari
- È una forma di “suicidio altruista”: spesso la cellula “si sacrifica” per il bene dell’intero organismo
- Le modalità della morte sono finalizzate a evitare l’instaurarsi di fenomeni di INFIAMMAZIONE e di AUTOIMMUNITÀ
- Il fatto che non dia luogo a fenomeni di infiammazione fa sì che la morte cellulare non sia avvertita dall’organismo (morte indolore)

# Omeostasi cellulare e apoptosi

L'omeostasi cellulare è frutto di un sottile equilibrio, finemente regolato, tra proliferazione e morte cellulare



**La cellula in apoptosi subisce modificazioni morfologiche e biochimiche che portano alla sua frammentazione e ne favoriscono la fagocitosi**



# CARATTERISTICHE PRINCIPALI DEI GENI DELL'APOPTOSI

- SONO CONSERVATI NEL CORSO DELL'EVOLUZIONE
- RISPONDONO A PIÙ STIMOLI
- APPARTENGONO A UNA DELLE SEGUENTI CATEGORIE:
  1. recettori di membrana (Fas/APO1/CD95, TNF, TRAIL)
  2. adattatori (FADD, APAF-1)
  3. modulatori (anti-apoptotici, come Bcl-2 e pro-apoptotici come Bax)
  4. effettori (caspasi, endonucleasi e proteasi)
  5. inibitori (CrmA, cFLIP, survivin...)
  6. *induttori (p53, c-myc,)*
  7. *della fagocitosi (flippasi)*

**L'apoptosi può cominciare a seguito di diversi stimoli quali:**

1. Deprivazione di fattori di crescita
2. Radiazioni UV e  $\gamma$
3. Chemioterapici
4. Attivazione dei recettori di morte (famiglia TNFR)

### **I RECETTORI DI MORTE**

TNF-R1 (CD120a)

CD95 (APO-1:Fas)

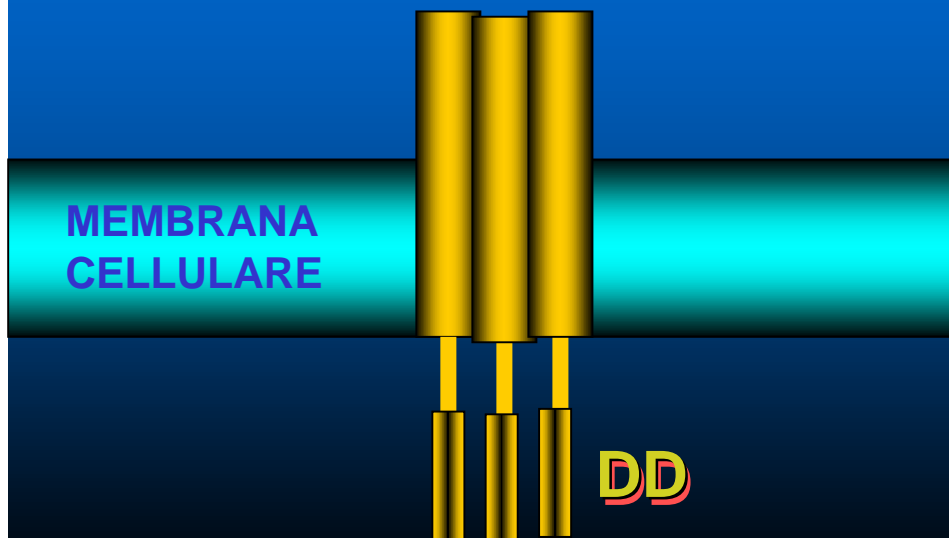
DR3 (APO-3, LARD, TRAMP, WSL1)

TRAIL-R1 (APO-2, DR4)

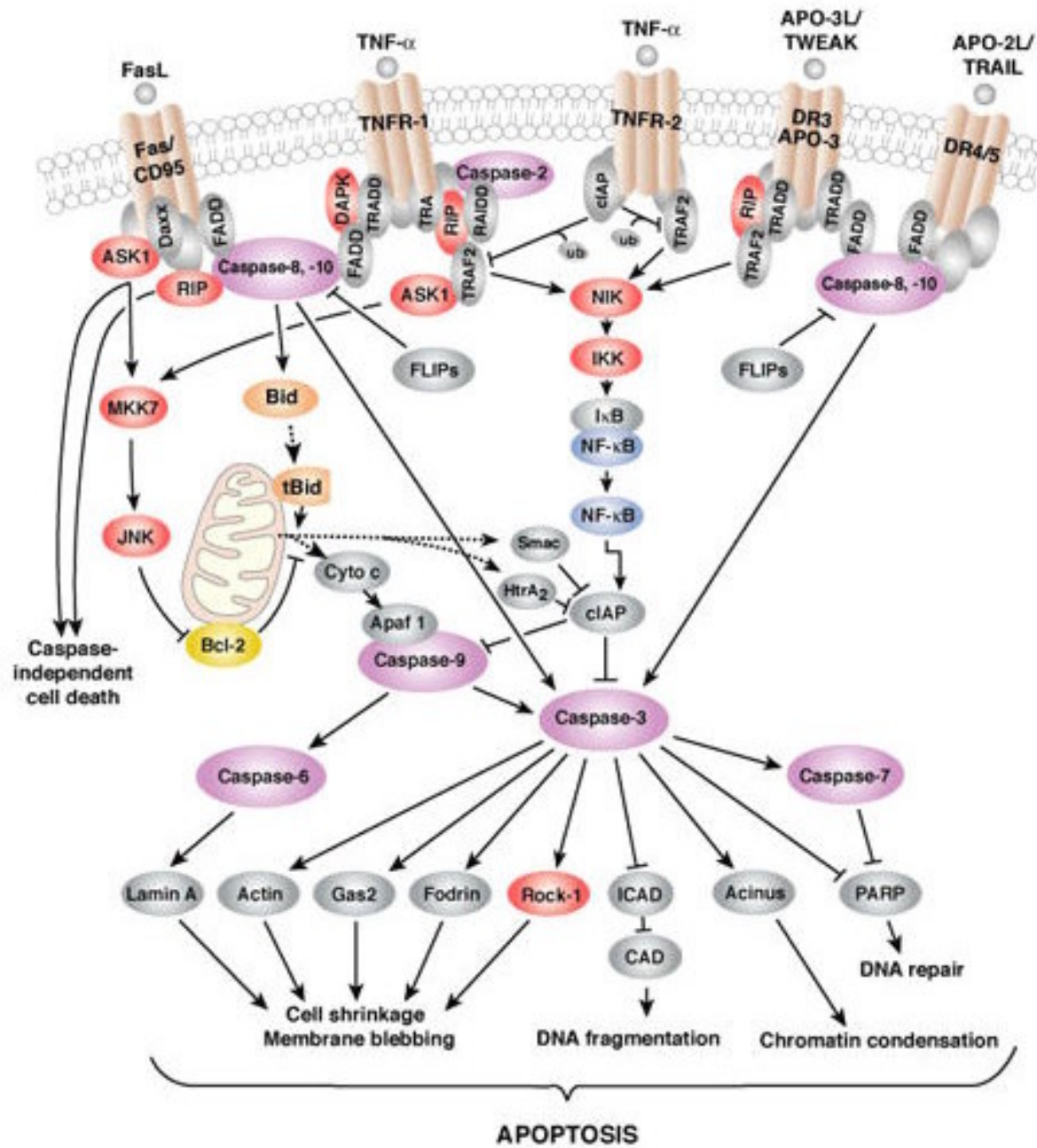
TRAIL-R2 (DR5, KILLER, TRICK2)

DR6

**possiedono un dominio intracellulare definito "death domain" (DD), essenziale per la trasduzione del segnale apoptotico**



# Death Receptor Signaling



**A seguito della trimerizzazione i recettori della morte legano tramite i domini DD delle “molecole adattatrici”:**

*FADD/Mort1*

**Fas-Associated-Death-Domain protein**

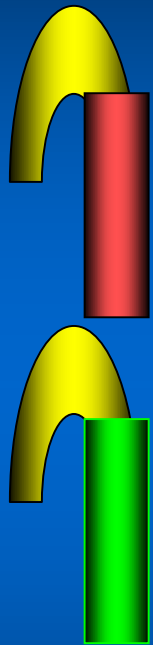
*RIP*

**Receptor-Interacting-Protein**

*TRADD*

**TNF-Associated-Death-Domain protein**

Le caspasi vengono divise in iniziatrici ed effettrici. Le proteine adattatrici legano e attivano le caspasi "iniziatrici" che poi attiveranno le caspasi "effettrici"



**Caspasi-10 - 8**  
**DED = Death Effector Domain**

DEDD  
TRADD  
FADD  
RIP

**Caspasi-9 - 4 - 2 - 1**  
**CARD = Caspase Recruitment Domain**

APAF = Apoptotic  
Proteases Activating  
Factors

Caspasi-7 - 6 - 3

Effettori Apoptotici

**Le IAP (inhibitor of apoptosis) costituiscono una importante classe di regolatori dell'apoptosi**

**IAP-1,  
IAP-2  
XIAP  
Survivin  
Livin(ML-IAP)**

**clAP-1 e -2 si legano ai TRAFs (TNF-receptor associated factors) 1 e 2**

**Survivin é implicata nel controllo del ciclo cellulare**

**XIAP inibisce le caspasi-3, -6 e -7**

**ML-IAP inibisce le caspasi-3, -7, -9**

## La famiglia delle proteine Bcl-2 (*B cell lymphoma gene 2*)

Più di 30 regolatori dell'apoptosi, comprendono **INIBITORI** e **PROMOTORI**  
Si localizzano sulla membrana mitocondriale esterna, sul reticolo endoplasmico e nel nucleo

### Promotori di apoptosi:

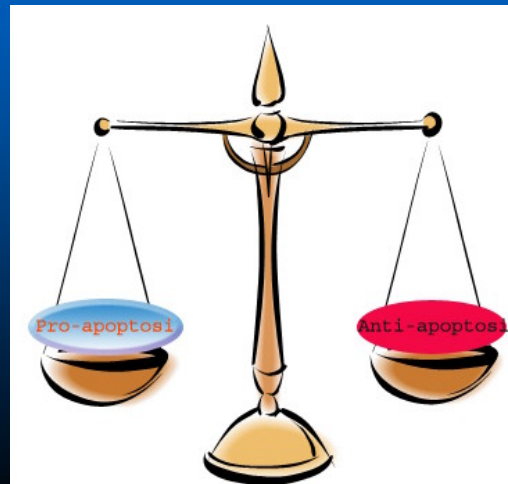
**Bax**  
**Bak**  
**Bok**  
**Bad**  
**Bim/Bod**  
**Bid**  
**Bik/Nbk/Blk**  
**Bmk**  
**Hrk/DP5**  
**Noxa**  
**Puma/Bbc3**

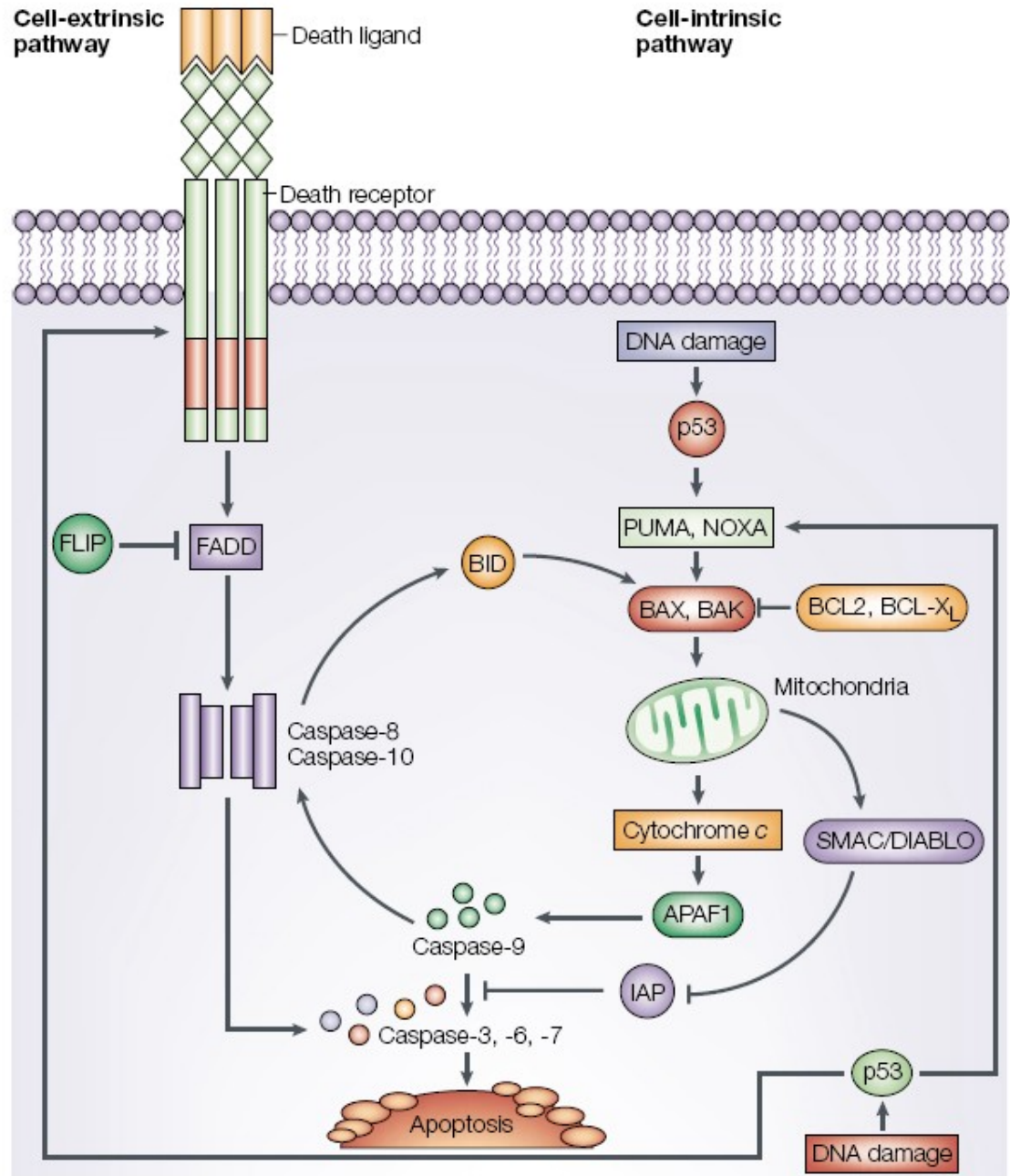
### Inibitori di apoptosi:

**Bcl-2**  
**Bcl-XL**  
**Bcl-xs**  
**A1**  
**Bcl-2L1**  
**Mcl-1**

### DIMERI

Proteine anti- e pro-apoptotiche formano eterodimeri regolatori. I livelli relativi di queste proteine possono decidere se la cellula muore o sopravvive





# Alterazione della via dei death receptors nei tumori umani

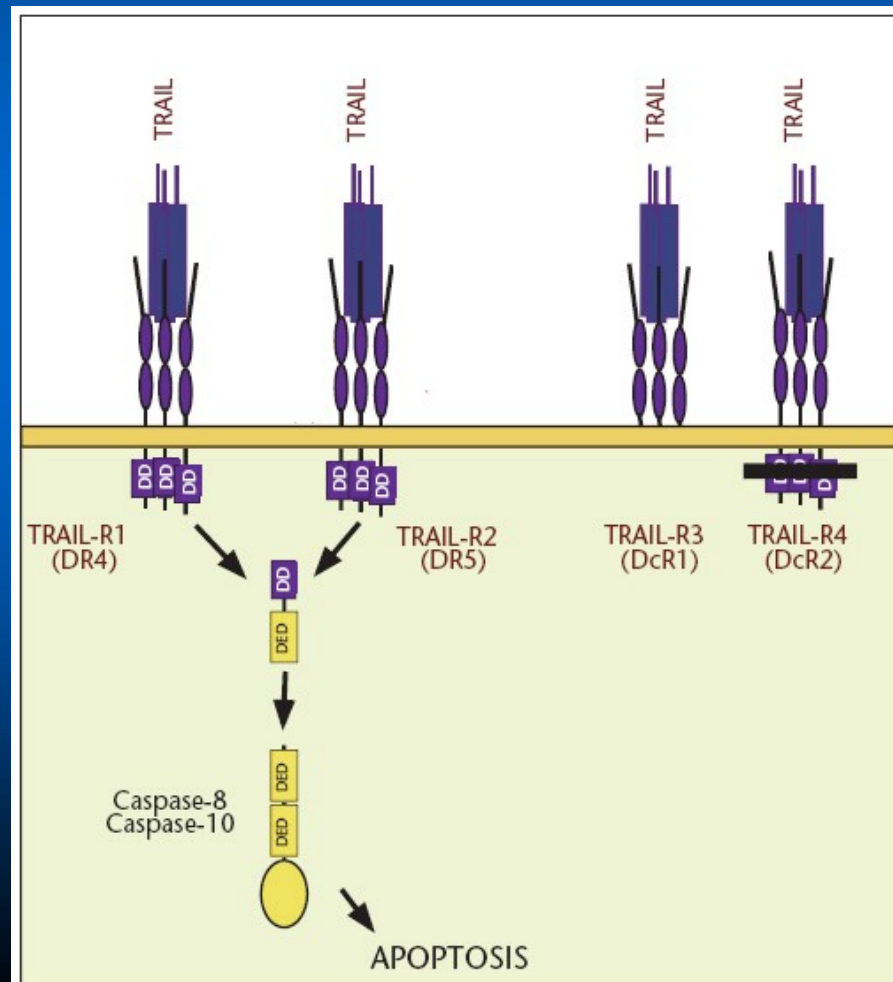
## CAUSE:

- **Variazione dell'espressione superficiale dei death receptors.**  
(S. Fulda e M.S. Shin)
- **Aumento dell'espressione di recettori o molecole antagoniste come CD95 solubile, DcR3 e TRAIL-R3 (carcinoma polmonare, carcinoma del colon e glioblastoma).**  
(A. Ashkenazi)
- **Eventi di LOH (Loss of Heterozygosity) per TRAIL-R1 e TRAIL-R2 (cancro colon-rettale e mammario e carcinoma polmonare).**  
(M.S. Shin e T.Arai)
- **Impossibilità di legare fattori di trascrizione a causa di ipermetilazione dei promotori e alterazione della cromatina (neuroblastoma e carcinoma del colon).**  
(M.M. van Noesel e P.Marks)
- **Inibizione della via dei death receptors grazie all'attività di molecole inibitrici come FLIP (sarcoma di Kaposi e linfoma di Hodgkin).**  
(M.Sturlz e S.Mathas)

# Il sistema TRAIL è il più indicato per la terapia

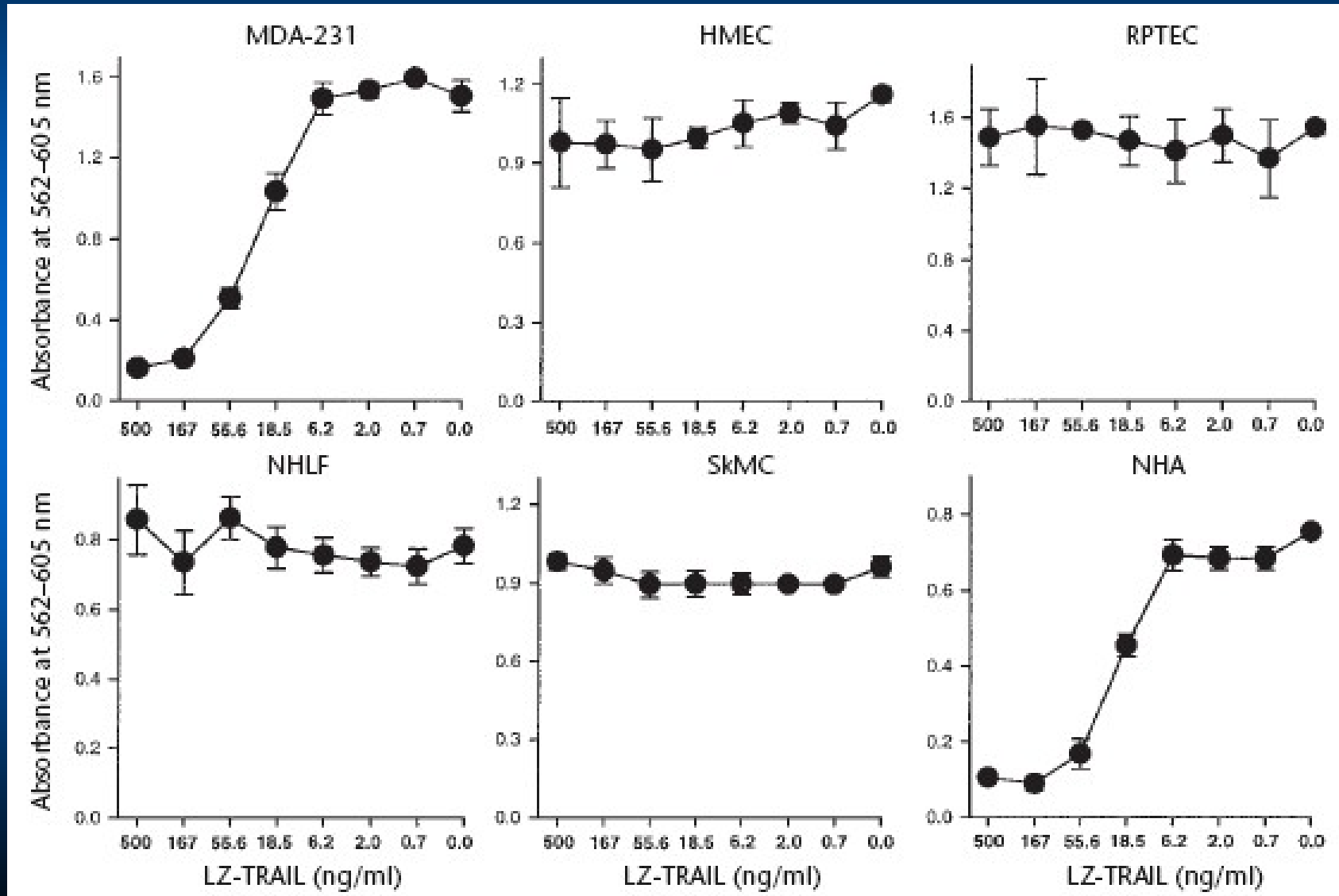
TRAIL favorisce l'apoptosi nelle cellule tumorali ma non risulta avere nessun effetto nelle cellule normali:

Nelle cellule normali è evidente una maggiore espressione di recettori antagonisti di TRAIL che non innescano l'apoptosi (es. TRAIL-R3 e TRAIL-R4).



# TRAIL non è citotossico nelle cellule normali

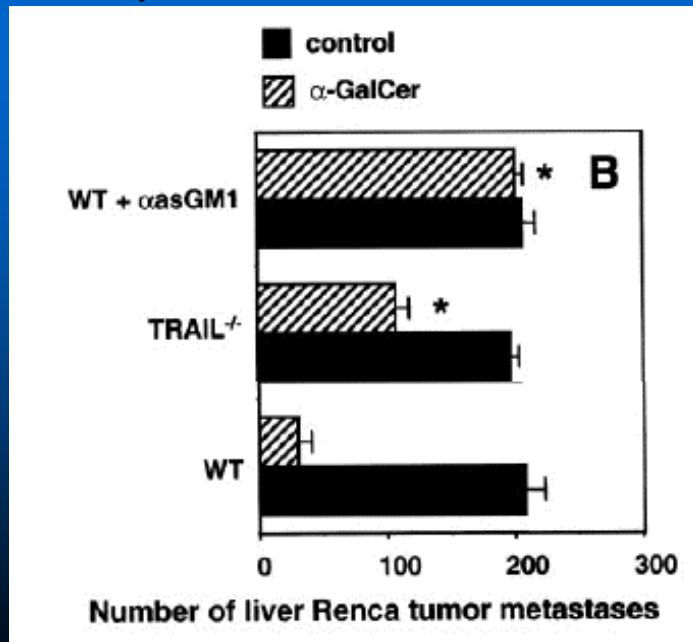
H. Walczak *in vitro*



# Il sistema TRAIL è implicato nel regolare la progressione tumorale

Nei topi TRAIL<sup>-/-</sup> le metastasi sono più resistenti rispetto a quelle dei topi wild-type per TRAIL.

E.Cretney et al



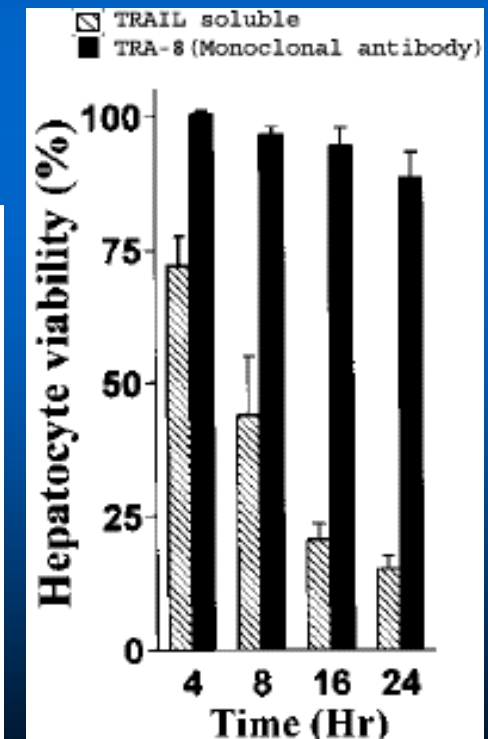
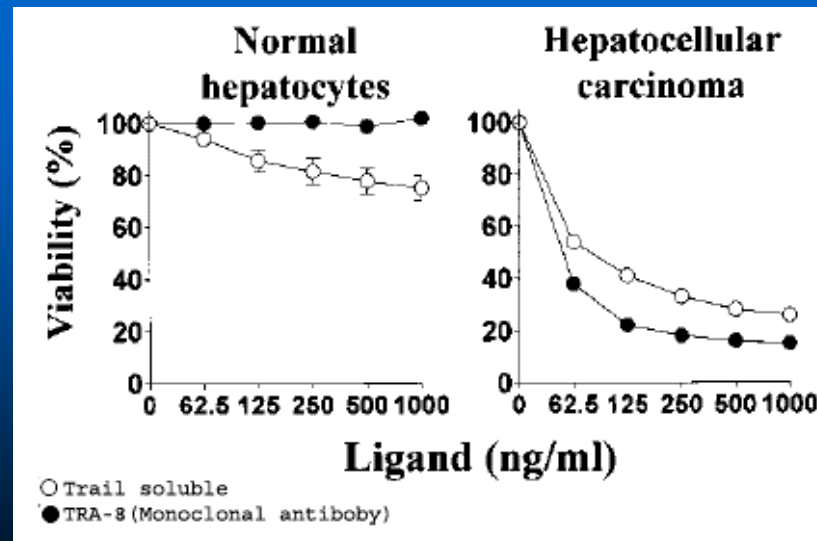
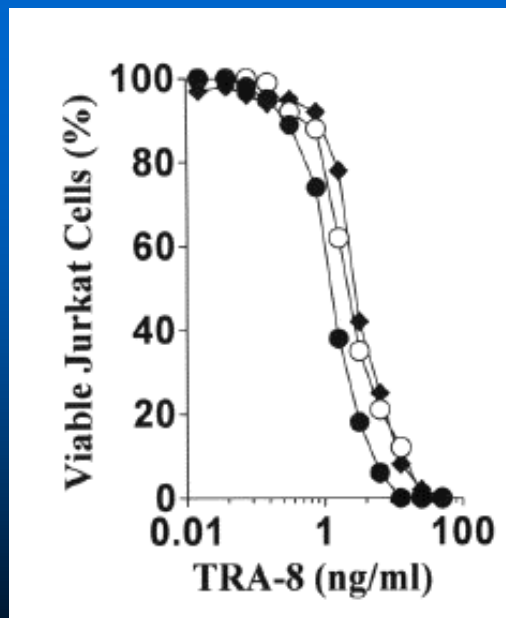
In topi SCID, trasformati con cellule umane di carcinoma del colon, si evidenzia in seguito al trattamento con molecole ricombinanti di TRAIL una riduzione dell'incidenza tumorale e del volume della massa tumorale.

H.Walczac

Tumor implanted <sup>a</sup>	Treatment of mice <sup>b</sup>	Day of measurement	Tumor incidence	Mean tumor size (mm <sup>2</sup> ) <sup>c</sup>
COLO-205		14	10/10	34.4 ± 4.9
		28	10/10	89.6 ± 11.0
		42	10/10	123.2 ± 21.5
	LZ-huTRAIL	14	1/10	4
		28	1/10	4
		42	3/10	8.1 ± 6.0
HCT-15		14	8/10	9.5 ± 2.6
		28	9/10	33.2 ± 9.6
		42	9/10	80.6 ± 19.6
	LZ-huTRAIL	14	0/10	0
		28	0/10	0
		42	1/10	20.2

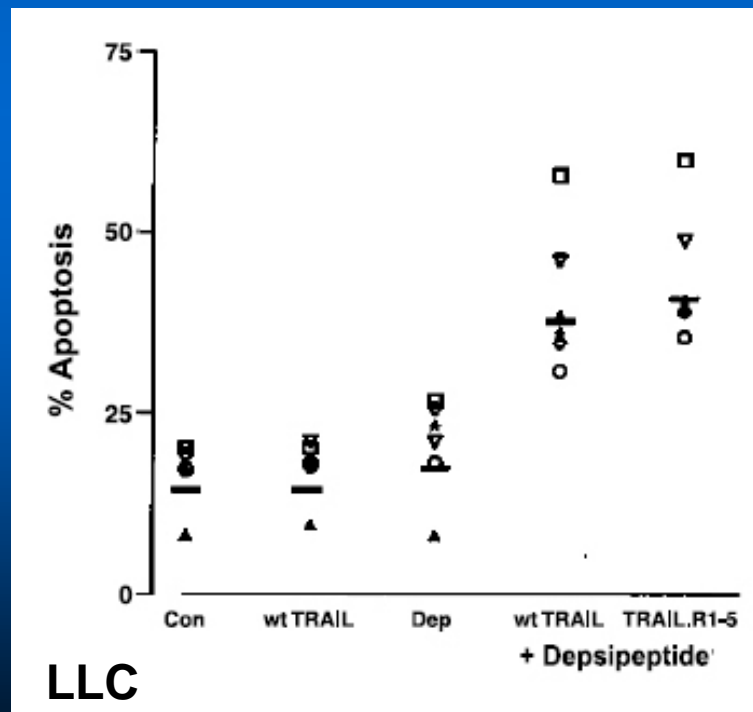
# Terapie tumorali che sfruttano la via di TRAIL hanno i seguenti bersagli:

Utilizzo di molecole ricombinanti di TRAIL, anticorpi monoclonali agonistici di TRAIL-R1oR2.



# Attività sinergica di TRAIL con sostanze antitumorali

Diversi lavori evidenziano un'attività sinergica di TRAIL con sostanze antitumorali e con i protocolli chemioterapici.



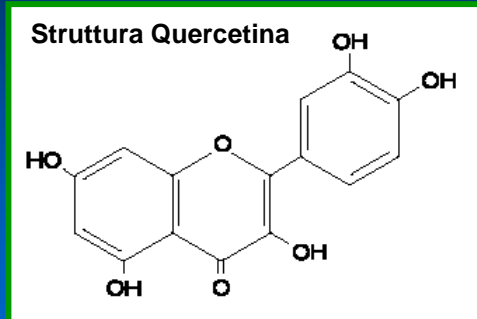
Gerald M. Cohen

# Oggetto delle ricerche del gruppo BJL: CHEMIOPREVENZIONE

- Si riferisce all'uso di agenti in grado di inibire, revertare, o ritardare la cancerogenesi.
- Meccanismi di chemioprevenzione: bloccare o sopprimere in vari stadi la carcinogenesi.
- Chemioprevenzione alimentare: Fitochimici-Antiossidanti naturali.



Partendo da questi dati, nel nostro laboratorio, testiamo l'attività sinergica di molecole antiossidanti di origine naturale come la **QUERCETINA** in associazione con TRAIL.

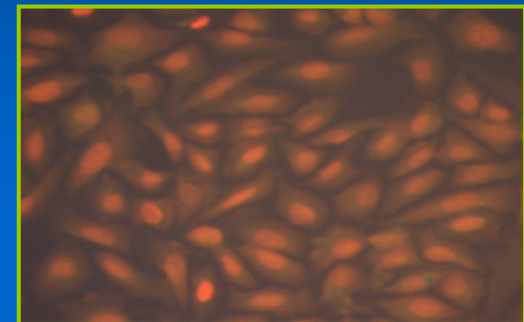


**U2Os**

**Controllo**



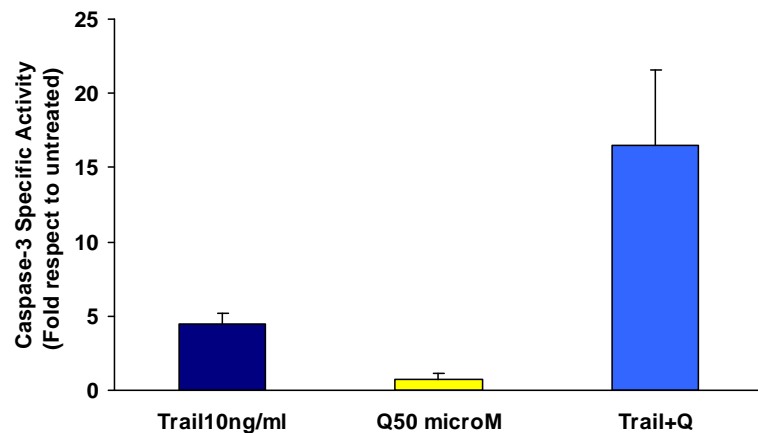
**Quercetina**



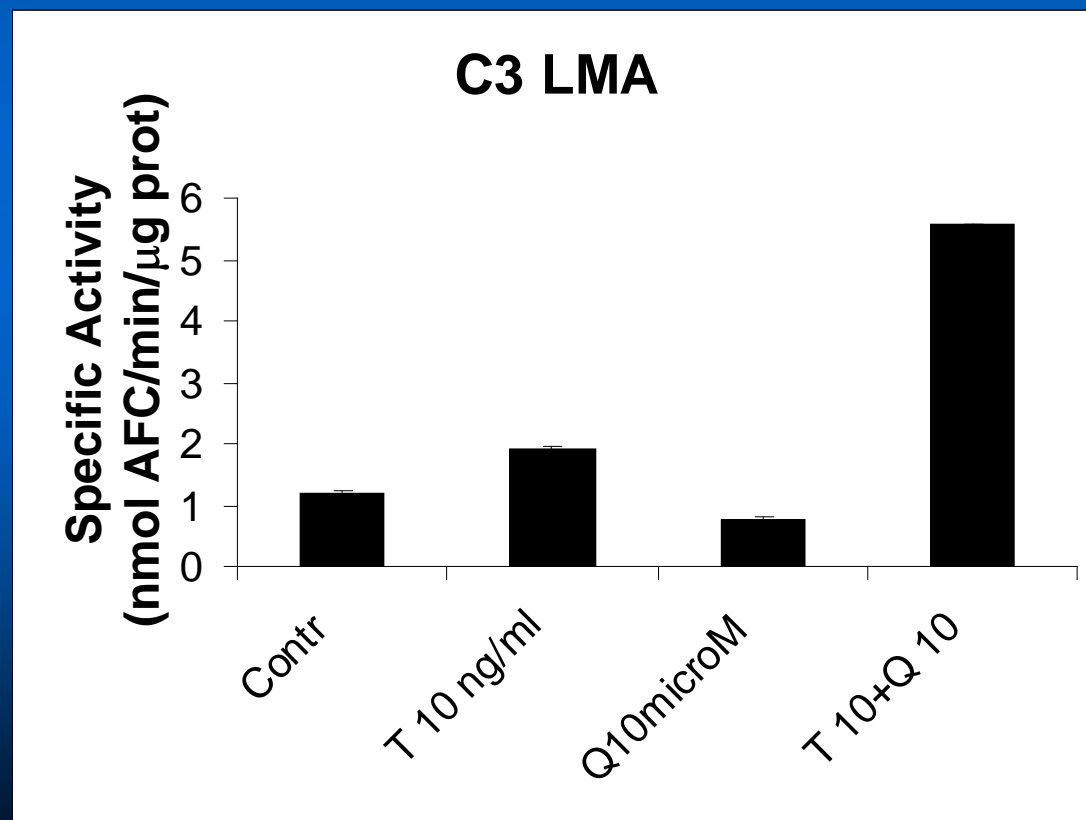
**TRAIL**



**TRAIL + Quercetina**



## Attività sinergica di TRAIL con la quercetina su linfociti di pazienti leucemici.



# CONCLUSIONI

- **Meccanismi di innesco e di regolazione dell'apoptosi**
- **Identificazione delle disfunzioni del sistema apoptotico nelle cellule tumorali riguardanti i death receptors**
- **Ricerca di sostanze antitumorali che non rivelino attività citotossica nei confronti delle cellule normali**