

## Studio del ruolo della proteina anti-apoptotica BAG3 nel melanoa umano

### Abstract

BAG3 protein, a member of BAG family of co-chaperones, has a pro-survival role in several tumor types. BAG3 anti-apoptotic properties rely on its characteristic to bind several intracellular partners, thereby modulating crucial events such as apoptosis, differentiation, cell motility and autophagy. In human melanomas, BAG3 positivity is correlated with the aggressiveness of the tumor cells and can sustain IKK- $\gamma$  levels, allowing a sustained activation of NF- $\kappa$ B. Furthermore, BAG3 is able to modulate BRAF<sup>V600E</sup> levels and activity in thyroid carcinomas.

BRAF<sup>V600E</sup> mutation is the most frequent detected in malignant melanomas and is targeted by Vemurafenib, a molecule used for the treatment of advanced melanoma. However a subset of patients resulted not sensitive or acquired resistance to this molecule.

Here we confirmed that BAG3 expression is significantly enhanced in metastasis in respect to primary tumors, than we demonstrated that BAG3 protein expression was significantly enhanced in metastasis of patients carrying BRAF<sup>V600E</sup> mutation. Furthermore we found a significant correlation between BAG3 positivity and patients' overall survival (OS), disease-specific survival (DSS) and disease-free survival (DFS) from surgery in patients with melanoma metastatic lymph nodes.

Moreover here we show that BAG3 down-modulation interferes with BRAF levels in melanoma cells and sensitizes them to Vemurafenib treatment.

Furthermore, in an *in vitro* model of acquired resistance to Vemurafenib, we demonstrated that the down-modulation of BAG3 protein can resensitize this cells to BRAF<sup>V600E</sup> specific inhibition interfering with BRAF pathway, causing reduction of ERK and its targets phosphorylation.

Further studies will be focused in demonstrating our hypothesis that the molecular interactions between BAG3 and mutated BRAF can represent a target for novel multi-drugs treatment design and that BAG3 expression could contribute to prognosis and patient stratification for specific therapeutic approaches.

## Sommario

La proteina BAG3 è un membro della famiglia di co-chaperone caratterizzati dalla presenza del BAG domain nei pressi della porzione carbossi-terminale.

Tale proteina sostiene la sopravvivenza cellulare in diversi tipi di tumore ed ha quindi una proprietà anti-apoptotica. La proprietà anti-apoptotica di BAG3 è dovuta alla sua caratteristica capacità di legare diversi partner intracellulari, modulando in tal modo eventi cruciali quali l'apoptosi, il differenziamento, la motilità cellulare e l'autofagia. Nel melanoma umano, la positività per BAG3 è correlata all'aggressività del tumore e può sostenere i livelli di IKK- $\gamma$ , permettendo l'attivazione di NF- $\kappa$ B. Inoltre, BAG3 è in grado di modulare i livelli e l'attività di BRAF<sup>V600E</sup> nei carcinomi tiroidei. La mutazione BRAF<sup>V600E</sup> è la più mutazione che si riscontra più frequentemente nei melanomi maligni ed è il bersaglio del Vemurafenib, una molecola utilizzata per il trattamento del melanoma allo stadio avanzato. Tuttavia un sottogruppo di pazienti dopo un'iniziale risposta al trattamento acquisisce resistenza all'inibitore di BRAF mutato.

In questo lavoro di tesi abbiamo confermato che l'espressione di BAG3 è significativamente aumentata nel melanoma metastatico rispetto ai tumori primari, abbiamo, poi, dimostrato che l'espressione della proteina BAG3 è significativamente aumentata nelle lesione metastatiche dei pazienti caratterizzati dalla presenza della mutazione BRAF<sup>V600E</sup>.

Inoltre abbiamo trovato una correlazione significativa tra la positività per BAG3 e la sopravvivenza globale dei pazienti (OS), la sopravvivenza specifica per la malattia (DSS) e la sopravvivenza libera da malattia (DFS) dopo l'intervento chirurgico in pazienti affetti da melanoma con linfonodi metastatici.

Inoltre, in tale lavoro abbiamo dimostrato che la down-modulazione di BAG3 interferisce con i livelli di BRAF in cellule di melanoma e le sensibilizza al trattamento con Vemurafenib. Inoltre, in un modello *in vitro* di resistenza acquisita al Vemurafenib, abbiamo dimostrato che la *down-modulazione* della proteina BAG3 può risensibilizzare queste cellule alla specifica inibizione di BRAF<sup>V600E</sup> interferendo con la via di segnalazione molecolare di BRAF, inducendo la riduzione della fosforilazione della chinasi ERK e dei suoi bersagli a valle.

Ulteriori studi dovranno essere focalizzati a dimostrare la nostra ipotesi secondo cui l'interazione molecolare tra BAG3 e BRAF mutato può rappresentare un bersaglio per trattamenti combinati innovativi e secondo cui l'espressione di BAG3 potrebbe contribuire a determinare la prognosi e la stratificazione dei pazienti per specifici approcci terapeutici.