



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO
Dipartimento di Farmacia

Dottorato di ricerca
in *Biologia dei Sistemi*

Ciclo *XIV Nuova Serie* — Anno di discussione 2016

Coordinatore: Chiar.mo Prof. *Antonietta Leone*

BAG3 extracellulare: target cellulari e molecolari

settore scientifico disciplinare di afferenza: *BIO/10*

Dottorando

Dott. *Raffaella D'Auria*

Tutore

Chiar.mo Prof. *Maria Pascale*

al Dr Landino



Abstract

Abstract 1

Sommario

Sommario 2

Capitolo I. La proteina BAG3

1.1 La proteina BAG3 citoplasmatica 3
 1.1.1 Ruolo della proteina BAG3 nella regolazione dell'apoptosi 5
 1.1.2 Ruolo della proteina BAG3 nell'adesione e migrazione cellulare 7
 1.1.3 Ruolo della proteina BAG3 nell'autofagia 7
 1.2 La proteina BAG3 extracellulare 8
 1.2.1 Localizzazione extracellulare della proteina BAG3 8
 1.2.2 La proteina BAG3 ricombinante lega la superficie dei macrofagi 8
 1.2.3 Identificazione dei recettori di membrana per eBAG3 9
 1.2.4 Neuropilina -1 9
 1.2.5 IFITM-2 10

Capitolo II. I Macrofagi nell'infiammazione e nell'immunosorveglianza

2.1 Le cellule macrofagiche 12
 2.2 L'Infiammazione 12
 2.2.1 L'infiammazione nel processo neoplastico 13
 2.3 Funzioni dei macrofagi nell'infiammazione e nell'immunosorveglianza 14

Capitolo III. BAG3 extracellulare: target cellulari e molecolari

3.1 Scopo della tesi 16
 3.2 Risultati e Discussione 17
 3.2.1 Legame della proteina ricombinante BAG3 alla superficie dei macrofagi attraverso i recettori di superficie NRP-1 e IFITM-2 17
 3.2.2 La sotto-regolazione dei recettori di membrana, NRP-1 e IFITM-2, inibisce il rilascio di interleuchina -6 indotto da rBAG3 18
 3.2.3 rBAG3 induce la trascrizione del gene IL-6 nei macrofagi 19
 3.2.4 rBAG3 induce l'attivazione dei pathway PI3K e p38 21
 3.2.5 La sotto modulazione di NRP-1 e IFITM-2 previene la fosforilazione BAG3-indotta delle proteine AKT e p38 23

3.2.6 La proteina BAG3 ricombinante lega la superficie dei monociti umani primari e induce il rilascio di IL-6	25
3.2.7 Profilo di citochine e chemochine BAG3 indotte in monociti umani primari	27
3.2.8 La proteina BAG3 lega la superficie dei linfociti T	30

Capitolo IV. Conclusioni

4.1 Conclusioni.....	32
----------------------	----

Capitolo V. Materiali e Metodi

5.1 Colture Cellulari.....	33
5.2 Preparazione FITC-rBAG3.....	33
5.3 Silenziamento e Trasfezione.....	33
5.4 Citofluorimetria a flusso	34
5.5 Western Blot.....	34
5.6 Estrazione dell'RNA, retrotrascrizione e gel di agarosio.....	34
5.7 Anticorpi e altri reagenti	34

Bibliografia

Bibliografia.....	I-VII
-------------------	-------

Abstract

Bcl-2-associated athanogene 3 (BAG3) belongs to the family of co-chaperone proteins that interact with the heat shock protein 70 (Hsp70) and is involved in a number of cellular processes including proliferation and apoptosis. BAG3 contains the BAG domain which interacts with the ATPase domain of Hsp70. BAG3 is also characterized by the presence of a WW domain, two conserved Ile-Pro-Val (IPV) motifs and a proline-rich (PXXP) repeat that mediate the binding to partners different from Hsp70. These diverse and multiple interactions underlie the ability of BAG3 to modulate major biological processes such as development, cytoskeleton organization and autophagy. In our laboratory, BAG3 has been recently found in a soluble or membrane-associated form and it has been detected in the serum obtained from patients with pancreatic cancer or heart failure. Moreover, we found that BAG3 is able to bind the cell surface of macrophages and activate the production of inflammatory associated components, such as Nitric Oxide (NO) and Interleukin (IL) -6. To identify novel interacting partners of BAG3 an affinity chromatography on nickel-charged resin was performed, in J774A.1 cells, using recombinant BAG3 (rBAG3) followed by mass spectrometry analysis of the rBAG3-containing complexes. Among these, Interferon-Inducible TransMembrane (IFITM) -2 and Neuropilin (NRP) -1 were the only transmembrane proteins and therefore represented good candidates as receptors for BAG3. Our results show that NRP-1 and IFITM-2 are both essential for the binding of rBAG3 to the cell surface of macrophages and its activation for IL-6 release.

We then investigated if BAG3 binding activates some of the signaling pathways known to be involved in macrophage activation. In particular we focused on the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and on the p38 pathway that are both involved in Cox-2, iNOS and IL-6 induction in macrophages. We demonstrated that BAG3 signaling is mediated by the receptor complex we identified, since IFITM-2 and/or NRP-1 silencing abrogates BAG3- induced phosphorylation of AKT and p38.

We then focus our study on human monocytes, rBAG3 binds the cell surface and induces the release of many pro-inflammatory cytokines and chemokines. Furthermore, we have shown that rBAG3 can bind T lymphocytes cells surface after lipopolysaccharide (LPS) stimulus.

All together these findings suggest a role for extracellular BAG3 in immune response.

Sommario

BCL2-associated anthanogene 3 (BAG3) 3 è una proteina appartenente alla famiglia di co-chaperoni che interagiscono con il dominio ATPasico delle proteine Hsc70/Hsp70 (heat shock protein 70) attraverso il dominio BAG ed è coinvolta in una serie di processi cellulari tra cui la proliferazione e l'apoptosi. BAG3 presenta anche un dominio WW due ripetizioni IPV e una regione ricca in prolina (PXXP) che mediano il legame con partner diversi da Hsp70. Queste interazioni sono alla base della capacità di BAG3 di modulare importanti processi biologici quali lo sviluppo, l'organizzazione del citoscheletro e l'autofagia. Nel nostro laboratorio, studi in vitro hanno permesso di identificare una forma solubile della proteina BAG3, inoltre BAG3 è stata rilevata nel siero di pazienti con adenocarcinoma pancreatico o insufficienza cardiaca. Recentemente abbiamo dimostrato che BAG3 è in grado di legarsi alla superficie cellulare dei macrofagi e di attivare la produzione e il rilascio di componenti associati all'infiammazione, come i nitriti e l'interleuchina (IL) -6. Per identificare i recettori responsabili del legame di BAG3 alla superficie dei macrofagi, è stato condotto uno studio di proteomica che ha permesso di individuare due potenziali partner per rBAG3, la Neuropilina (NRP) -1 e l' Interferon- Inducibile TransMembrane (IFITM) -2.

I risultati riportati in questa tesi mostrano che la proteina BAG3 ricombinante attiva i macrofagi attraverso il legame ad un complesso recettoriale specifico che richiede la concomitanza di almeno due differenti proteine: IFITM-2 e NRP-1.

L'attivazione dei macrofagi da parte di rBAG3 è associata alla fosforilazione delle proteine AKT e p38, infatti i nostri risultati mostrano che, bloccando l'attivazione di queste proteine, mediante l'utilizzo di specifici inibitori, l'attivazione dei macrofagi viene drasticamente inibita.

Una seconda parte del progetto è stato dedicato allo studio del legame di rBAG3 ai monociti umani, isolati da cellule di sangue periferico di donatori sani.

rBAG3 lega la superficie dei monociti ed induce il rilascio di diverse citochine e chemochine coinvolte nel processo infiammatorio, inoltre, può legare la superficie di dei linfociti T in seguito a trattamento con LPS.

Complessivamente i risultati, riportati in questa tesi, suggerisco un possibile ruolo per BAG3 extracellulare nella risposte immune.

1. La proteina BAG3

1.1 La proteina BAG3 citoplasmatica

BAG3 (bcl2-associated athanogene 3) è una proteina appartenente alla famiglia di co-chaperoni che interagiscono con il dominio ATPasico delle proteine Hsc70/Hsp70 (heat shock protein 70) attraverso il dominio BAG (110- 124 aminoacidi) (Takayama et al., 1999). Oltre al dominio BAG, la proteina BAG3 contiene anche un dominio WW due ripetizioni IPV (Ile-Pro-Val) e una regione PXXP (proline-rich motifs) attraverso i quali può interagire con partner diversi da Hsp70 (Doong et al., 2003; Beere et al., 2005; Fuchs et al., 2010) (Fig.1).

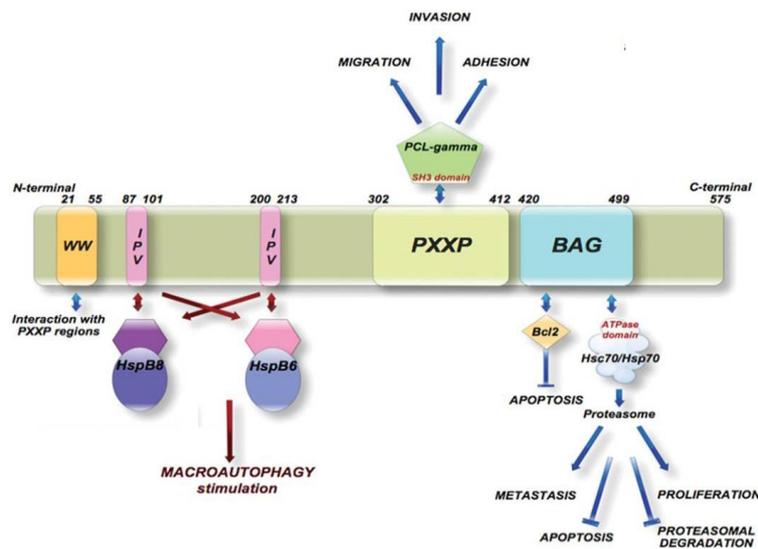


Figura 1 Domini della proteina BAG3 (McCollum et al., 2009)

La proteina BAG3 è stata originariamente identificata in lievito mediante un saggio di screening del doppio ibrido utilizzando come esca il dominio ATPasico di Hsp70 (Takayama et al., 1999).

Ad oggi sono state descritte due forme della proteina BAG3: la full-length prodotta dal gene bag3 e avente una massa apparente di 74 kDa e una più piccola, di circa 40 kDa ritrovata in associazione ai sinaptosomi neuronali, derivante o da splicing alternativo o da un processo proteolitico (Rosati et al., 2011; Bruno et al., 2008).

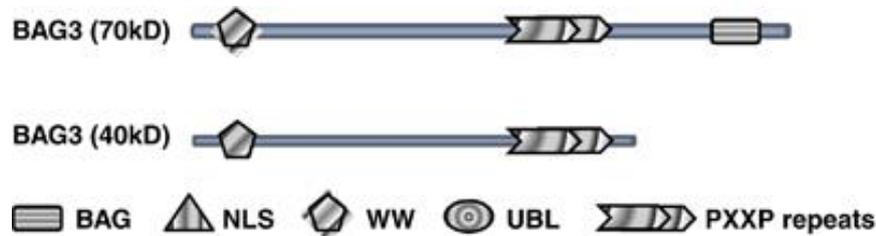


Figura 2 - Rappresentazione schematica della proteina BAG3 full-length e della shorter form (Bruno et al., 2008)

La proteina BAG3 full-length è localizzata nel citoplasma, principalmente nel reticolo endoplasmatico rugoso; in seguito ad esposizione della cellula ad agenti stressanti, può essere osservata una variante di questa forma con un peso molecolare leggermente differente, entrambe le forme coesistono in alcuni tipi cellulari e possono essere osservate come un doppietto in seguito ad una separazione elettroforetica in condizioni denaturanti. L'origine di questo doppietto è ancora sconosciuta, ma potrebbe derivare da modifiche post-traduzionali come le fosforilazioni, BAG3 infatti contiene numerosi residui in serina e 10 residui in tirosina. La fosforilazione in tirosina di BAG3 avviene in seguito a stimolazione con EGF (Epidermal Growth Factor) nelle linee cellulari umane di cancro ai polmoni (Young et al.; 2008). Recentemente è stata riportata anche una fosforilazione di BAG3, alla serina 187, ad opera della protein chinasi C delta (PKC δ). Tale fosforilazione induce la transizione epitelio-mesenchima e aumenta l'invasività delle cellule di cancro alla tiroide, FRO (Li et al; 2013).

La forma di 40 kDa è stata immunoprecipitata da un omogenato di sinaptosomi e caratterizzata successivamente mediante spettrometria di massa (Bruno et al., 2008).

L'espressione del gene *bag3* è costitutiva nei miociti e in pochi altri tipi di cellule normali, mentre è particolarmente espresso in diversi tumori primari o linee cellulari tumorali (leucemie mieloidi e linfoidi, linfomi, mieloma, neuroblastoma, carcinoma del pancreas, della tiroide, della mammella e della prostata, melanoma, osteosarcoma, tumori del rene, colon e dell'ovaio e glioblastoma) (Rosati et al., 2007; Pagliuca et al., 2003; Rosati et al., 2007; Rosati et al., 2009; Ammirante et al., 2010a; Rosati et al., 2012).

Tuttavia la sua espressione può essere indotta in diversi tipi di cellule normali (leucociti, cellule epiteliali e gliali, cellule della retina) in seguito all'esposizione a diversi fattori di stress, come agenti ossidanti, alte temperature, metalli pesanti, privazione di siero, infezioni virali (HIV-1), esposizione a campi ELF (electromagnetic field), stress elettrofilo, ultrasuoni pulsati (Rosati et al., 2007; Pagliuca et al., 2003; Rosati et al., 2007; Rosati et al., 2009; Ammirante et al., 2010a; Basile et al., 2011).

L'aumento di espressione, in seguito a stimoli di stress, è regolato dal fattore trascrizionale HSF1 (heat shock transcription factor 1) (Franceschelli et al., 2008).

Altri fattori trascrizionali conosciuti, in grado di regolare l'espressione di *bag3* sono Egr1 (Early growth response protein 1) (Gentilella et al., 2008), AibZIP (Androgen-Induced bZIP) (Ben et al., 2007) e WT1 (Wilms' tumor suppressor gene) (Cesaro et al., 2010).

Inoltre in alcuni tipi di cellule l'espressione della proteina BAG3 può essere indotta da numerosi farmaci chemioterapici (fludarabina, etoposide, inibitori del proteasoma) contribuendo in questo modo alla resistenza alla terapia farmacologica, infatti il silenziamento di *bag3* aumenta l'apoptosi della cellula neoplastica in risposta ai farmaci (Romano et al., 2003; Chiappetta et al., 2007; Liu et al., 2009; Ammirante et al., 2010; Rosati et al., 2012).

1.1.1 Ruolo della proteina BAG3 nella regolazione dell'apoptosi

Numerosi studi, condotti in linee tumorali di diversa origine, hanno dimostrato che il silenziamento o l'iperespressione della proteina BAG3 inducono, rispettivamente, un aumento o un'inibizione dell'apoptosi indotta da farmaci (Doong et al., 2002; Chiappetta et al., 2007; Rosati et al., 2007; Liu et al., 2009; Jacobs et al., 2009; Wang et al., 2009; Lee et al., 2002; Ammirante et al., 2010a; Jung et al., 2010; Cesaro et al., 2010). La regolazione della sopravvivenza cellulare da parte della proteina BAG3 è dovuta all'interazione con diversi partner molecolari e all'attivazione di diversi meccanismi.

Un primo meccanismo dimostrato si basa sul suo ruolo di co-chaperone nell'indirizzare proteine al proteasoma. È stato dimostrato che BAG1, un altro membro della famiglia BAG, interagisce positivamente con Hsp70 e CHIP (C-terminus of the Hsc70-interacting protein) nel direzionare le proteine al proteasoma; BAG3 può interferire con questo processo competendo con BAG1 (Rosati et al., 2007; Coulson et al., 2005; Gentilella et al., 2008; Du et al., 2008). Infatti, in cellule di melanoma e osteosarcoma, BAG3 protegge IKK- γ (inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit gamma) dalla degradazione proteasomale determinando una costante attivazione di NF- κ B e sopravvivenza cellulare (Ammirante et al., 2010a).

Un diverso meccanismo è stato, invece, osservato in cellule di glioblastoma, in cui BAG3 mantiene la proteina BAX (the Bcl-2-associated X protein) nel citosol, prevenendo la sua traslocazione mitocondriale (Festa et al., 2011). Entrambi i meccanismi si basano su un'interazione tra BAG3 e Hsp70 (Festa et al., 2011; Ammirante et al., 2010a). Attraverso il legame a Hsp70, BAG3 potrebbe anche regolare positivamente o negativamente il folding di altre proteine che regolano il processo apoptotico. Inoltre, è stato visto che Hsp70 è in grado di legare elementi ricchi in AU (AREs) nella regione 3' non tradotta dell'mRNA di alcune proteine, tra cui Bim e di aumentarne la sua stabilità (Matsui et al., 2007). Si potrebbe ipotizzare che BAG3 regoli l'attività di Hsp70 su Bim e su altri possibili mRNAs di proteine coinvolte in diversi meccanismi cellulari. Infine si potrebbero ipotizzare dei meccanismi indipendenti da Hsp 70, grazie alla presenza, nella proteina BAG3, dei domini WW o PXXP attraverso i quali può legare altre proteine influenzandone la stabilità, la localizzazione o l'attività

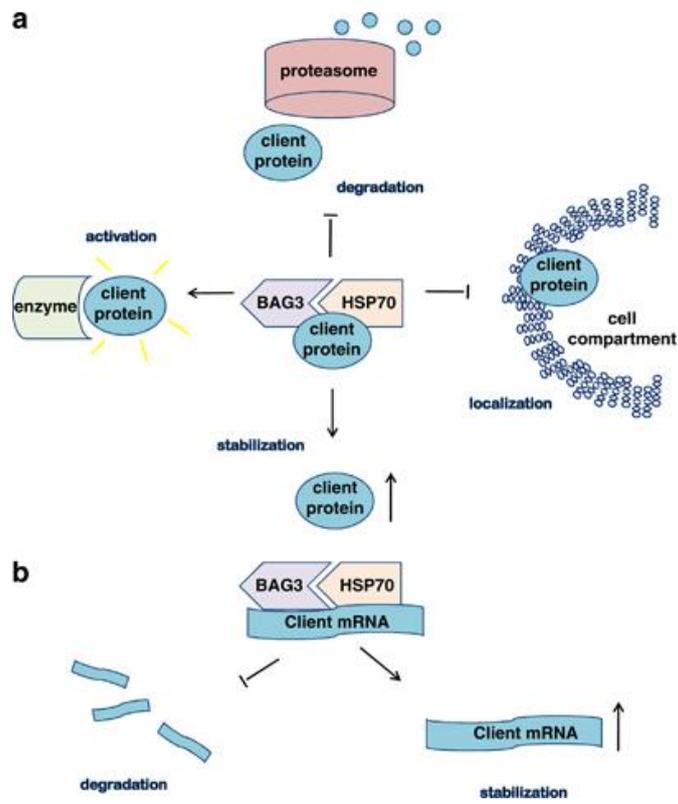


Figura 3 Meccanismi molecolari dell'attività della proteina BAG3 su (a) proteine e (b) mRNAs (Rosati et al., 2011)

1.1.2 Ruolo della proteina BAG3 nell'adesione e migrazione cellulare

E' stato dimostrato sperimentalmente che BAG3 è in grado di modulare anche altri due processi cellulari quali la motilità e l'adesione. Infatti, il silenziamento di bag3 riduce l'adesione e/o la motilità di cellule tumorali epiteliali (mammella, prostata) (Iwasaki et al., 2007; Kassis et al., 2009; Kassis et al., 2006; Fontanella et al., 2010). In cellule umane di tumore al seno (MDA435), l'overespressione di BAG3 determina una diminuzione della migrazione e dell'adesione di molecole della matrice; l'effetto è stato revertito overesprimendo una proteina deleta del dominio PXXP, dimostrando così che nel meccanismo è coinvolta l'interazione di BAG3 con una proteina contenente il dominio SH3 (Kassis et al., 2006). Studi di espressione hanno dimostrato che effettivamente BAG3 regola, in un modo PXXP-dipendente, l'espressione di CCN (Cyr61, connective tissue growth, NOV) 1, una proteina segnale di matrice che promuove l'adesione cellulare attraverso integrine ed eparan-solfato contenenti proteoglicani (Kassis et al., 2009). Inoltre, BAG3 sembra regolare l'adesione cellulare attraverso il legame del dominio WW al motivo PPDY presente al C-terminale della proteina PDZGEF2 (guanine nucleotide exchange factor 2), la quale a sua volta attiva RAP1 (Ras-proximate-1), un regolatore di rimodellamento e delle giunzioni cellula-cellula. Infatti, è stato visto che in un modello PDZGEF2 knockdown, BAG3 mostra una ridotta capacità nell'indurre l'adesione cellulare in cellule Cos7 (Iwasaki et al., 2010).

Recentemente, è stato dimostrato che BAG3, attraverso l'interazione con Hsc70/Hsp70 e CCT (chaperonin containing T-complex polipeptide, chiamato anche TRiC per TCP-1 ring complex) è in grado di regolare il folding dell'actina, regolando in questo modo l'organizzazione del citoscheletro e influenzando non solo la sopravvivenza delle cellule e la migrazione, ma anche il traffico di membrana e la dinamica degli organelli intracitoplasmatici.

Analogamente a quanto descritto per l'apoptosi, anche la regolazione dell'adesione cellulare si basa, quindi, sulla capacità della proteina BAG3 di interagire con diverse proteine mediante i suoi domini strutturali.

1.1.3 Ruolo della proteina BAG3 nell'autofagia

Il ruolo svolto dalla proteina BAG3 nel rimodellamento del citoscheletro e nel traffico di membrana suggerisce la possibilità che possa essere coinvolta anche nei processi di autofagia. Con questo termine si fa riferimento ad un insieme di processi non specifici di degradazione di componenti della cellula (Moreau et al., 2010). Un tipo di autofagia selettivo è quello mediato da chaperone (CMA) in cui le proteine citosoliche che contengono un motivo pentapeptide, sono riconosciute dallo chaperone Hsc70 e trasferite ai lisosomi (Moreau et al., 2010). Essendo la proteina BAG3 un co-chaperone di Hsc/Hsp 70, è possibile immaginare un suo coinvolgimento in questo tipo di autofagia. Altre forme di autofagia sono la micro- e la macroautofagia. Nella macroautofagia le cellule formano delle vescicole con un doppio strato di membrana, chiamate autofagosomi che sono trasportati lungo i microtubuli fino ad arrivare ai lisosomi dove viene degradato il loro contenuto. La microautofagia è, invece, un processo in cui i lisosomi inglobano direttamente componenti del citoplasma (Moreau et al., 2010). L'autofagia aumenta in condizioni di stress ed è un processo che mira a promuovere la sopravvivenza cellulare in

condizioni quali la formazione di aggregati proteici, deprivazione di nutrienti e fattori di crescita, stress del reticolo e infezione da patogeni.

BAG3 partecipa, insieme a HspB8, un membro della famiglia HspB di chaperon molecolari, alla degradazione, mediante macroautofagia, delle proteine mal ripiegate e aggregate. Infatti, HspB8 forma nelle cellule un complesso stabile con BAG3 e la formazione di questo complesso è essenziale per la degradazione della proteina Htt43Q poliglutammina (HunTingTin exon 1 fragment with 43 CAG repeats), una forma patogena di huntingtina che tende a formare aggregati (Carra et al., 2009a; Carra et al., 2009b). HspB8 e BAG3 inducono, in modo Hsp70 indipendente, la fosforilazione del fattore iniziatore eIF2 e questo a sua volta provoca un arresto traslazionale e stimola l'autofagia. Il meccanismo con cui il complesso BAG3/HspB8 induce la fosforilazione di eIF2 non è completamente conosciuto (Carra et al., 2009a; Carra et al., 2009b). Il legame di BAG3 a HspB8 è mediato da due motivi conservati Ile-Pro-Val (IPV) situato tra i domini WW e il Prolin-rich del co-chaperone, infatti la delezione di questi motivi determina un blocco della degradazione di Htt43Q mediata da HspB8 (Fuchs et al., 2009). Attraverso la stessa regione, BAG3 può legarsi anche a HspB6/Hsp20, uno chaperone con importanti proprietà cardioprotettive e in grado di regolare la contrattilità dei miociti (Fan et al., 2005, Dreiza et al., 2010).

1.2 La proteina BAG3 extracellulare

1.2.1 Localizzazione extracellulare della proteina BAG3

Recenti esperimenti, svolti nel nostro laboratorio, hanno permesso di identificare la presenza della proteina BAG3 nello spazio extracellulare (eBAG3). eBAG3 viene rilasciata dai cardiomiociti in forma solubile e/o associata a microvescicole (De Marco et al., 2013) e dalle cellule di carcinoma pancreatico umano PANC-1 (Falco et al., 2013). Il meccanismo attraverso il quale BAG3 viene secreto non è ancora chiaro, in quanto questa proteina non ha un peptide segnale che permetterebbe un rilascio Reticolo Rugoso (ER) -mediata. Pertanto, è probabile che venga rilasciato attraverso un meccanismo noto come secrezione non convenzionale, che può essere o no mediata da vescicole (Rabouille et al., 2012; Malhotra et al., 2013). La proteina eBAG3 è rilevabile anche in campioni di siero di pazienti in seguito a scompenso cardiaco (De Marco et al., 2013) e nel siero di pazienti affetti da Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC) (Falco et al., 2013).

1.2.2 La proteina BAG3 ricombinante lega la superficie dei macrofagi

La presenza della proteina eBAG3 in sieri umani ci ha indotto a studiare il suo possibile coinvolgimento nell'attivazione della risposta infiammatoria e immunitaria. Infatti, l'interazione intracellulare tra la proteina BAG3 e Hsp70, ha permesso di ipotizzare un ruolo per eBAG3 simile a quello riportato in letteratura per Hsp70, in cui un incremento di Hsp70 a livello extracellulare determina una

stimolazione della sintesi di citochine pro-infiammatorie e di chemochine (Asea et al., 2000).

Esperimenti condotti nel nostro laboratorio, hanno dimostrato che la proteina BAG3 è in grado di legare la superficie di cellule macrofagiche murine J774.A1, tale legame è stato confermato, mediante l'utilizzo di una proteina BAG3 ricombinante (rBAG3) coniugata a fluoresceina isotiocianato (FITC), per microscopia confocale e citofluorimetria a flusso. Inoltre, rBAG3 è in grado di indurre una risposta pro-infiammatoria dei macrofagi, monitorata come aumento dell'espressione e l'attività dell'enzima Ossido Nitrico sintasi inducibile (iNOS) che gioca, nel processo infiammatorio, un ruolo citotossico di primaria importanza e della proteina Ciclossigenasi (COX) -2, un enzima chiave nella cascata dell'acido arachidonico che dà origine a molecole infiammatorie quali prostaglandine, trombossani e prostaciline (Rosati *et al.*, 2015).

1.2.3 Identificazione dei recettori di membrana per eBAG3

Uno studio di proteomica, svolto nel nostro laboratorio, ha permesso di identificare nuovi potenziali partners molecolari di eBAG3: in particolare, i recettori di membrana Neuropilina -1 (NRP-1) e Interferon-Induced TransMembrane protein (IFITM) -2 (Rosati *et al.*, 2015). Tali recettori sono coinvolti in vari processi biologici come il rimodellamento della membrana, l'apoptosi, lo sviluppo e la modulazione del sistema immunitario.

1.2.4 Neuropilina -1

La Neuropilina -1 è un recettore non tirosin chinasi di 130 kDa appartenente alla famiglia delle neuropiline, recettori multifunzionali identificati per il loro ruolo critico nello sviluppo del sistema nervoso. La struttura delle neuropiline comprende cinque domini: tre domini extracellulari (a1a2, b1b2 e c), un dominio transmembrana e un piccolo dominio citoplasmatico (PDZ binding motif) (Lee M et al., 2006).

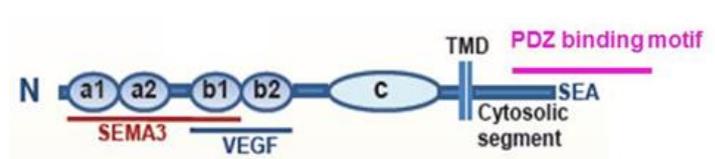


Figura 4 Domini del recettore Neuropilina -1(Lee M et al., 2006)

Non avendo attività chinastica, la Neuropilina da sola non è capace di indurre la trasduzione del segnale all'interno della cellula, agisce pertanto come co-recettore. A seconda del recettore con cui interagisce, il co-recettore NRP-1, gioca un ruolo versatile nell'angiogenesi, nella guida dell'assone, nella sopravvivenza cellulare, nell'apoptosi, nella migrazione e nell'invasione. In questi recettori, NRP-1 partecipa al legame con il ligando ed amplifica la trasduzione del segnale.

Attraverso il dominio a1a2 la Neuropilina-1 lega la semaforina di classe 3, le semaforine sono proteine conosciute per il loro ruolo nello sviluppo neuronale, la segnalazione della classe 3 di semaforine attraverso NRP-1 si verifica solo in associazione con il recettore plexina (Tamagnone L et al., 1999). Il dominio b1b2 è essenziale per legarsi al dominio C-terminale del fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF), in particolare NRP-1 funge da co-recettore per un'isoforma del (VEGF)-A, il VEGF-165 (Soker S et al., 1998; Hansel DE et al., 2004). La presenza della NRP-1 migliora il legame di VEGF-165 con il recettore VEGFR-2 potenziandone la segnalazione e le attività proangiogenetiche (Soker S et al., 2002; Rollin S et al., 2004; Bernatchez PN et al., 2002).

1.2.5 IFITM-2

La proteina IFITM-2 appartiene alla famiglia delle proteine IFITM, piccole proteine transmembrana indotte da Interferone e coinvolte nella regolazione dell'infezione virale (Li et al., 2013). La maggior parte dei vertebrati presenta due o più geni *ifitm*, nell'uomo sono situati sul cromosoma 11 e composti da quattro geni funzionali: *ifitm-1*, *ifitm-2*, *ifitm-3*, *ifitm-5*, *ifitm-10* (Hickford, D. et al., 2012). Tutti i membri della famiglia presentano un dominio conservato CD225, necessario per l'associazione tra le proteine IFITM e per la loro localizzazione subcellulare (Sinu et al., 2013).



Figura 5 Famiglia delle proteine IFITM (Sinu et al., 2013)

Le proteine IFITM-1, IFITM-2 e IFITM-3 sono espresse ubiquitariamente nell'uomo, mentre IFITM-5 è espressa principalmente negli osteoblasti (Jaffe, E. A. et al., 1989).

Alle proteine IFITM sono stati attribuiti ruoli in diversi processi biologici; nella mediazione delle infezioni virali, nei processi di regolazione dell'apoptosi, nella risposta immune e nella mineralizzazione dell'osso (Rebane et al., 2012; Lewin, A. R. et al., 1991).

Sono stati proposti due modelli per spiegare l'attività antivirale di questa famiglia di proteine, nel primo si ipotizza che le proteine IFITM modificano le vescicole endosomiali o lisosomiali in modo tale da impedire la fusione virale. Le proteine IFITM potrebbero realizzare questo alterando le componenti lipidiche della membrana delle vescicole, o interferendo con l'attività della pompa protonica V-type ATPase, responsabile dell'acidificazione dell'endosoma (Wee, Y. S. et al., 2012). Nel secondo modello invece, le proteine IFITM potrebbero impedire l'ingresso dei virus nella cellula bloccandone la fusione con la membrana cellulare (Feeley, E. M. et al. 2011).

2. I Macrofagi nell'infiammazione e nell'immunosorveglianza

2.1 Le cellule macrofagiche

I macrofagi sono cellule della linea di difesa primaria dell'organismo, essi costituiscono i componenti maggiori del sistema dei fagociti mononucleati, (Mononuclear Phagocyte System [MPS]), e sono presenti in diversi organi e tessuti. Oltre ai macrofagi, il sistema MPS include i monociti del sangue, le cellule dendritiche, gli osteoclasti, le cellule della microglia nel sistema nervoso centrale, le cellule di Kupffer nel fegato e le cellule di Langherans nella cute. Le cellule del sistema MPS costituiscono la prima linea di difesa nelle infezioni batteriche e virali e svolgono un ruolo primario nell'immunità naturale e nell'induzione e nel mantenimento del processo infiammatorio (Hume, 2008).

Le cellule macrofagiche, inoltre, giocano un ruolo importante, nel danno e nella riparazione tissutale, nella clearance delle cellule apoptotiche e nella sorveglianza antineoplastica. (Davies et al., 2013; Gautier et al., 2012)

Le specifiche caratteristiche funzionali di tali cellule sono: 1) la capacità di fagocitare microrganismi (ruolo chiave nell'immunità innata), 2) la capacità di processare antigeni e di presentarli ai linfociti T (ruolo chiave nell'immunità acquisita), 3) la sintesi di numerose citochine e chemochine in grado di iniziare e/o amplificare o terminare la reazione infiammatoria, di promuovere il reclutamento di cellule infiammatorie e di modulare la risposta linfocitaria, 4) la capacità di riconoscere e distruggere cellule neoplastiche (Fujiwara N. et al., 2005).

2.2 L'Infiammazione

L'infiammazione, o flogosi, è un meccanismo di difesa non specifico innato che costituisce una risposta protettiva seguente all'azione dannosa di agenti fisici, chimici e biologici, il cui obiettivo finale è l'eliminazione della causa di danno cellulare o tissutale.

Le fasi principali del processo infiammatorio prevedono una iniziale reazione vascolare, caratterizzata da vasocostrizione prontamente soppiantata da vasodilatazione/rallentamento del circolo e aumento della permeabilità vascolare, seguita dalla reazione cellulare consistente nella migrazione dei leucociti verso la sede di infiammazione.

Il processo infiammatorio consiste in una sequenza dinamica di fenomeni che presentano caratteristiche relativamente costanti, nonostante l'infinita varietà di agenti lesivi, poichè sono determinati soprattutto dalla liberazione di sostanze endogene: i mediatori chimici della flogosi. Questi vengono prodotti durante il processo infiammatorio e sono in grado, tramite recettori specifici, di stimolare il rilascio di altri mediatori da parte di cellule bersaglio producendo così effetti di amplificazione e modulazione. Tali sostanze generalmente, una volta prodotte e rilasciate, pur avendo breve emivita sono capaci di agire su uno o più tipi di cellulari e

di esercitare effetti diversi a seconda del tessuto o della cellula bersaglio. Sono distinti in mediatori di origine plasmatica, prodotti dal fegato ed immessi in circolo in forma inattiva che vengono attivati all'occorrenza tramite il fattore XII (importante nel sistema delle chinine e in quello della coagulazione/fibrinolisi) ed il sistema del complemento (fattori che attivati interagiscono in successione in un sistema a cascata), e mediatori di origine cellulare, suddivisi in 2 sottogruppi comprendenti molecole preformate (istamina, serotonina ed enzimi lisosomiali) e molecole sintetizzate ex novo (prostaglandine, leucotrieni, platelet activatig factor (PAF), specie reattive dell'ossigeno, ossido di azoto e citochine.

L'infiammazione viene classificata, secondo un criterio temporale, in infiammazione acuta e cronica.

L'infiammazione acuta è una risposta immediata e precoce ad uno stimolo lesivo ed i segni cardinali che la contraddistinguono sono rubor, tumor, calor, dolor e functio lesa. Una delle funzioni fondamentali dell'infiammazione di tipo acuto è quella di permettere ai leucociti di inglobare agenti lesivi, uccidere batteri, degradare il tessuto necrotico e gli agenti estranei; questo processo, che richiede l'attraversamento dell'endotelio vascolare, avviene in cinque step caratterizzati da: marginazione, rotolamento, adesione, diapedesi e chemiotassi.

L'infiammazione cronica può essere distinta secondo un criterio spaziale in infiammazione diffusa (infiammazione cronica interstiziale) oppure circoscritta (infiammazione cronica granulomatosa). Questo tipo di infiammazione è un processo flogistico di lunga durata che può derivare da una persistenza degli antigeni flogogeni, successivamente ad un'infiammazione acuta non completamente risolta; è possibile che tali antigeni non siano raggiungibili da parte dei sistemi di difesa, oppure che le sostanze litiche prodotte non siano in grado di digerirli. L'infiammazione cronica presenta come caratteristiche patogenetiche: l'infiltrazione cellulare, distruzione o necrosi tissutale e meccanismi di riparazione del tessuto danneggiato (Robbins e Cotan., 2006).

2.2.1 L'infiammazione nel processo neoplastico

La correlazione tra il fenomeno flogistico e quello canceroso ha portato a considerare l'infiammazione come il settimo segno caratteristico del cancro (Colotta et al., 2009; Mantovani et al., 2010).

Negli ultimi anni è stato reso evidente che anche in tumori non primariamente riconducibili a processi infiammatori, la componente infiammatoria è presente e costituisce una tappa essenziale nella formazione del microambiente maligno (Mantovani et al., 2008).

I fattori comuni allo stato infiammatorio e al processo neoplastico sono essenzialmente l'infiltrazione leucocitaria e macrofagica, la presenza di citochine e chemiochine (e.g., interleuchine, il fattore di necrosi tumorale (TNF-alfa) e gli interferoni), di fattori di crescita, di enzimi proteolitici, di proteoglicani, mediatori lipidici e prostaglandine.

Sono stati evidenziati due percorsi molecolari che legano infiammazione e cancro: un percorso intrinseco ed un percorso estrinseco.

Il percorso intrinseco è attivato da eventi genetici capaci di indurre processi neoplastici: tali eventi genetici includono attivazione di vari oncogeni tramite mutazioni, riarrangiamento oppure amplificazione cromosomica ed inattivazione di geni oncosoppressori. Le cellule che subiscono questo tipo di trasformazione producono mediatori dell'infiammazione, generando in tal modo un microambiente infiammatorio in tumori che di base non presentano condizioni di infiammazione (e.g., cancro al seno).

Nel percorso estrinseco, invece, condizioni infiammatorie e/o infettive aumentano il rischio di progressione del cancro verso alcuni siti anatomici (e.g., colon, prostata e pancreas).

I due percorsi convergono causando nelle cellule tumorali l'attivazione di fattori di trascrizione, tra cui il fattore nucleare-kB (NF-Kb), trasduttori del segnale ed attivatori della trascrizione 3 (STAT3) e il hypoxia-inducible factor 1 alfa (HIF-1alfa). L'attivazione di questi fattori comporta, oltre al reclutamento e attivazione di un gran numero di leucociti, la produzione di numerosi mediatori dell'infiammazione, comprese citochine e chemiochine, e di enzimi quali la iNOS e la COX-2, entrambi di fondamentale importanza nell'infiammazione.

2.3 Funzioni dei macrofagi nell'infiammazione e nell'immunosorveglianza

Il macrofago è uno dei protagonisti dell'infiammazione soprattutto di tipo cronico e la sua attivazione può avvenire sia tramite meccanismi immunitari, per opera dei linfociti T attivati, che attraverso meccanismi non immunitari, in cui ad agire sul monocita/macrofago sono mediatori come endotossine (Lipopolysaccaride; LPS) e fibronectina.

I prodotti rilasciati dai macrofagi attivati sono enzimi (tra cui principalmente proteasi neutre ed idrolasi acide), proteine plasmatiche, specie reattive dell'ossigeno e radicali liberi (e.g., monossido d'azoto; NO), metaboliti dell'acido arachidonico, fattori di crescita, citochine ed ossido nitrico. Durante l'infiammazione cronica i macrofagi si accumulano nella sede del danno grazie ad un reclutamento continuo di monociti dal circolo, ad una proliferazione locale dei macrofagi residenti ed alla loro mobilitazione nel tessuto infiammato successiva a fenomeni di chemiotassi.

I macrofagi sono anche considerati come le cellule chiave nell'interrelazione tra cancro ed infiammazione. Il reclutamento di cellule mielomonocitiche è uno dei segni caratteristici dell'infiammazione correlata al cancro (Mantovani et al., 2008). Sebbene la tumorigenesi sia stata classicamente vista come un processo cellula-autonoma che coinvolge cellule geneticamente modificate, è oggi ampiamente chiaro il coinvolgimento del microambiente che circonda il tumore stesso (Reviewed in Bissell and Radisky, 2001; Hanahan and Weinberg, 2000; Tlsty and Coussens, 2006).

Diversi studi hanno dimostrato che il tumore è in grado di reclutare le cellule infiammatorie che a loro volta producono fattori solubili come fattori di crescita che inducono sopravvivenza e/o rimodellamento della matrice, specie reattive dell'ossigeno che influenzano la proliferazione del cancro, l'angiogenesi, l'invasione e le metastasi (De Marzo et al., 1999; Kuper et al., 2000; van Kempen et al., 2006).

Recentemente grande è stata l'attenzione rivolta alla comprensione dell'influenza che l'attività macrofagica esercita nel favorire o nell'inibire la crescita tumorale.

A sostegno di tutto ciò è stata avvalorata l'ipotesi che queste cellule, tramite meccanismi di fagocitosi, giocano un ruolo molto importante nel riconoscimento e nell'eliminazione di cellule estranee, invecchiate e danneggiate (Siddhartha et al. 2010). Al tempo stesso sono capaci di indurre crescita e sopravvivenza cellulare, di promuovere sia il processo di angiogenesi che di metastatizzazione, nonché di favorire la progressione delle cellule verso la malignità grazie alla capacità di inibire la risposta T-cellulare tramite produzione di IL-10 e TGF-beta (Knowles et al. 2007).

Nei tumori si è visto un differenziamento dei monociti in due tipi di cellule con funzioni diverse: macrofagi tumor-suppressive (cellule del tipo M1) e macrofagi tumor-supportive (cellule del tipo M2).

I macrofagi M1 intervengono nella prima fase dell'infiammazione e provvedono ad eliminare gli invasori grazie alla produzione di intermedi reattivi dell'ossigeno (e.g. O²⁻ e OH⁻) e dell'azoto (e.g. NO⁻, NO₂⁻, ONOO⁻) e di citochine infiammatorie (IL-1beta, TNFalfa, IL-6); inoltre, mediano la resistenza verso parassiti intracellulari.

Successivamente interviene la classe di macrofagi M2, o tumor-associated macrophage (TAM) che interrompe l'azione degli M1, provvede a "ripulire" la zona eliminando i detriti rimasti e produce importanti fattori per riparare e ricostruire il tessuto danneggiato, per fare in modo che torni ad essere vascolarizzato correttamente, è proprio questa peculiarità che viene utilizzata dal tumore (Sica et al. 2007). In generale, l'aumento del numero di TAM è significativamente associato a prognosi infausta, suggerendo il loro ruolo nella progressione maligna di molti tumori solidi.

3.1 Scopo della tesi

I macrofagi svolgono un ruolo fondamentale sia nel sistema infiammatorio sia nella patologia tumorale; infatti la loro infiltrazione nel tumore è regolata da numerose citochine e chemochine, spesso rilasciate dal tumore stesso. La proteina BAG3 è sovraespressa in diversi tipi di tumore e solo recentemente è stato dimostrato che viene rilasciata dalle cellule neoplastiche nel microambiente tumorale. La funzione di eBAG3 rilasciata dal tumore è ancora sconosciuta, ma è stato dimostrato che la proteina BAG3 ricombinante è capace di legare ed attivare cellule macrofagiche murine J774.A1.

Lo scopo di questa tesi è di caratterizzare il legame della proteina BAG3 ricombinante alla superficie dei macrofagi murini attraverso i suoi recettori di membrana e di studiare i meccanismi che ne regolano l'attivazione.

Verrà, inoltre, investigato il legame di BAG3 alla superficie di alcune sottopopolazioni leucocitarie allo scopo di delineare il suo ruolo nel processo infiammatorio.

3.2 Risultati e Discussione

3.2.1 Legame della proteina ricombinante BAG3 alla superficie dei macrofagi attraverso i recettori di superficie NRP-1 e IFITM-2

Per indagare il ruolo dei recettori NRP-1 e IFITM-2 nel legame di rBAG3 ai macrofagi, cellule J774A.1 sono state trasfettate con specifici small interfering (si) RNA, capaci di modulare negativamente i livelli di NRP-1 e/o di IFITM-2. Dopo 48 ore le cellule sono state raccolte, risospese in una soluzione bloccante, incubate con FITC-rBAG3 e analizzate mediante citofluorimetria di flusso.

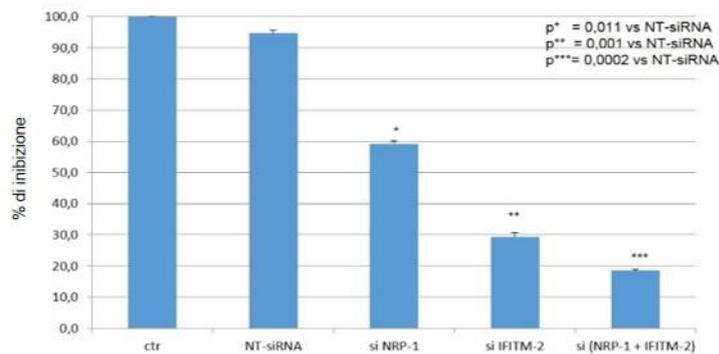


Figura 6a Percentuale di inibizione del legame di FITC-rBAG3 ai macrofagi rispetto a cellule controllo (ctr) e dopo silenziamento con siRNA non target (NT-siRNA) o siRNA specifici per NRP-1 (si NRP-1), IFITM-2 (si IFITM-2) o entrambi (si NRP1+IFITM-2)

La figura 6a mostra che la modulazione negativa di NRP-1, IFITM-2 o di entrambi comporta una diminuzione del legame della proteina ricombinante BAG3 alle cellule. In particolare, la sotto-regolazione di NRP-1 causa una diminuzione del legame di circa il 37%, mentre quella di IFITM-2 produce una riduzione di circa il 68%; il silenziamento di entrambe le proteine porta ad una diminuzione del legame superiore all'88%.

La capacità dei siRNA utilizzati di modulare negativamente i geni target è stata monitorata tramite western blotting (Fig.6b).

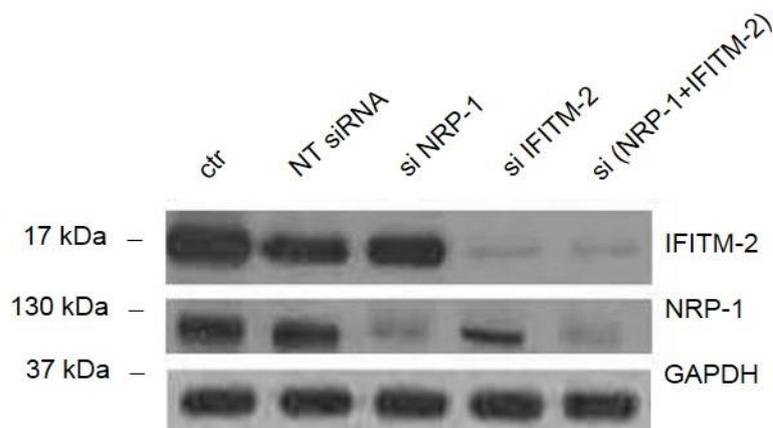


Figura 6b I livelli proteici di NRP-1 e di IFITM-2 sono stati misurati attraverso western blotting in cellule J774A.1 di controllo, trasfettate con un siRNA aspecifico (NT siRNA) o con siRNA specifici per NRP-1 o per IFITM-2

L'effetto della down-modulazione di entrambe le proteine non sembra essere additivo, per cui possiamo ipotizzare che le due proteine costituiscono un unico complesso recettoriale per rBAG3.

3.2.2 La sotto-regolazione dei recettori di membrana, NRP-1 e IFITM-2, inibisce il rilascio di interleuchina -6 indotto da rBAG3

Dati precedenti di laboratorio hanno mostrato che la proteina rBAG3 attiva i macrofagi producendo un aumento del rilascio dell'IL-6. Allo scopo di verificare se la modulazione negativa dei recettori specifici per BAG3 potesse influire su questo effetto funzionale, cellule J774A.1 sono state silenziate per 48 ore con siRNA specifici per NRP-1 e IFITM-2, dopodiché la proteina ricombinante BAG3 è stata aggiunta al mezzo di coltura per 24 ore; il sovranatante è stato quindi analizzato per il dosaggio dell'interleuchina -6, mediante test ELISA.

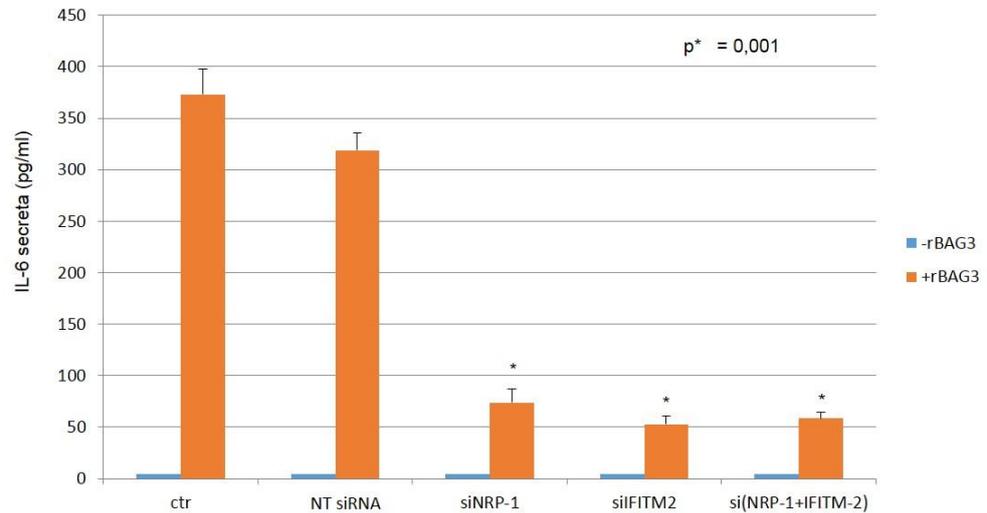


Figura 7 Dosaggio del rilascio di IL-6 nel sovrinatante mediante test ELISA, dopo silenziamento dei recettori NRP-1 e IFITM-2 e successiva stimolazione con rBAG3(6µg/ml)

Nella figura 7 si osserva come la secrezione BAG3-indotta di IL-6 venga drasticamente abolita nelle cellule trasfettate con siRNA specifici per i recettori NRP-1 e IFITM-2. Inoltre è evidente che, il silenziamento di una sola delle due proteine produce un'inibizione superiore al 60%.

3.2.3 rBAG3 induce la trascrizione del gene IL-6 nei macrofagi

Per studiare se l'aumento del rilascio di IL-6 da parte di rBAG3 rifletta un aumento dei livelli di proteina e se quest'ultimo sia dovuto ad un effetto a livello trascrizionale, cellule J774.A1 sono state stimolate con rBAG3 per tempi diversi, processate per l'estrazione dell'RNA e tramite una reazione di retrotrascrizione è stato sintetizzato cDNA. Utilizzando primers specifici per il gene dell'interleuchina -6 e come stampo il cDNA ottenuto, è stata effettuata un'analisi di PCR semiquantitativa.

Il sovrinatante è stato invece utilizzato per il dosaggio della proteina IL-6 rilasciata.

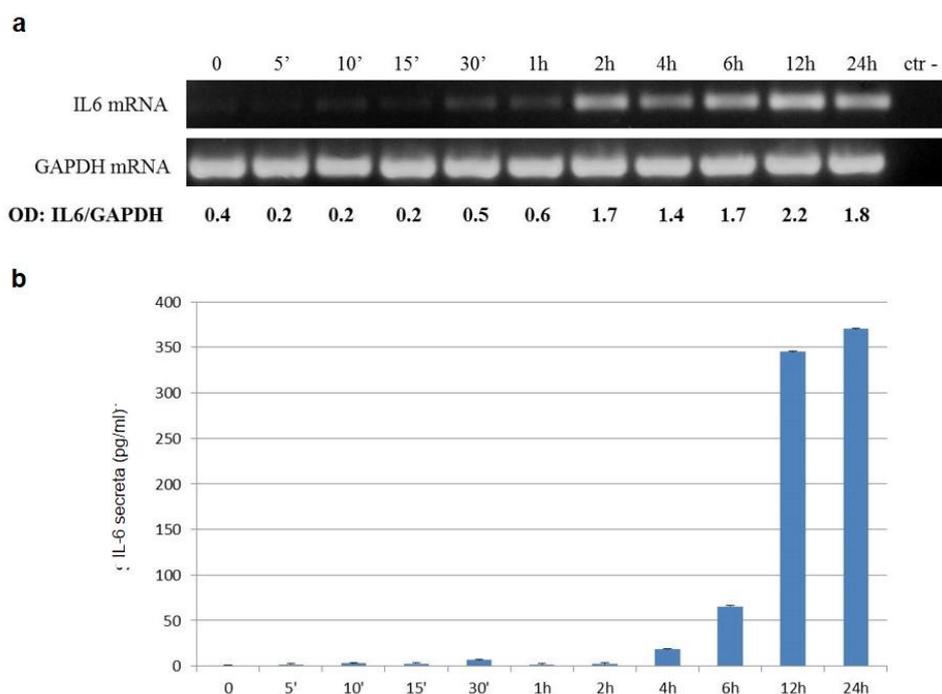


Figura 8 a) RT-PCR del trascritto IL-6 e GAPDH dopo trattamento con rBAG3; **b)** Dosaggio, mediante test ELISA, della proteina IL-6 rilasciata dopo trattamento con rBAG3 (6µg/ml) ai tempi indicati

Come mostrato in figura 8a, dopo 2 ore di stimolazione con rBAG3 c'è un significativo aumento dei livelli dell'RNA messaggero dell'IL-6; tali livelli si mantengono elevati per tutta la durata del trattamento (24h), mentre il rilascio della proteina (figura 8b) è apprezzabile dopo 6 ore di incubazione, con un netto aumento a 12 e 24 ore.

3.2.4 rBAG3 induce l'attivazione dei pathways PI3K e p38

Per investigare la trasduzione del segnale indotta dal legame di rBAG3 ai macrofagi, abbiamo condotto esperimenti che prevedevano l'inibizione di alcune delle vie di segnalazione che sono coinvolte nell'attivazione dei macrofagi. In particolare ci siamo concentrati sul pathway che coinvolge la fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3K) e sul pathway di p38; entrambi coinvolti nell'induzione nei macrofagi di Cox-2, iNOS e IL-6.

Per studiare l'attivazione delle proteine AKT e p38, cellule J774A.1 sono state stimulate con rBAG3 a tempi diversi, come indicato in figura 9, e tramite western blotting è stato analizzato lo stato di fosforilazione delle proteine.

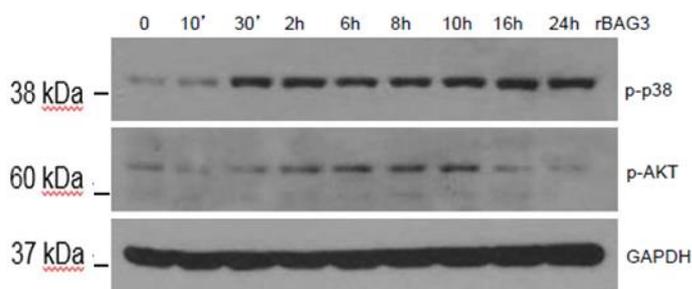


Figura 9a Analisi dello stato di fosforilazione delle proteine p38 e AKT dopo stimolazione con rBAG3 (6µg/ml) ai tempi indicati

Come mostra la figura 9a, la stimolazione con rBAG3 induce la fosforilazione sia di AKT sia di p38, in particolare la fosforilazione di AKT sembra essere più precoce e persistente di p38, infatti il segnale è ancora rilevabile al tempo più lungo di trattamento (24ore).

Per confermare il coinvolgimento dei pathways di PI3K e p38 nel rilascio di IL-6 rBAG3 indotta, cellule J774.A1 sono state pre-incubate per 30 minuti con un inibitore specifico di PI3K (LY294002) o con un inibitore specifico della MAPK p38

(SB203580), in seguito è stato aggiunto rBAG3 o LPS per 24h al mezzo di coltura. Il surnatante è stato analizzato mediante test ELISA per la secrezione di IL-6.

Come mostrato in figura 9b nelle cellule stimulate con rBAG3 e pretrattate con gli inibitori di PI3K o p38 si osserva una drastica diminuzione dei livelli di IL-6 rilasciata.

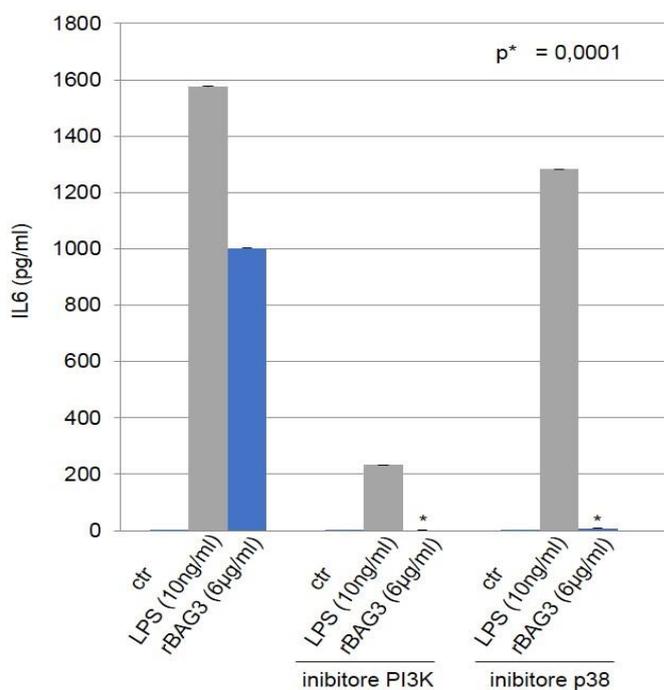


Figura 9b Dosaggio di IL-6 dopo stimolazione con rBAG3 o LPS in presenza o meno degli inibitori PI3K e p38

L'efficacia degli inibitori utilizzati è stata verificata valutando lo stato di fosforilazione delle proteine p-38 e AKT, dopo trattamento con rBAG3 tramite western (figura 9c).

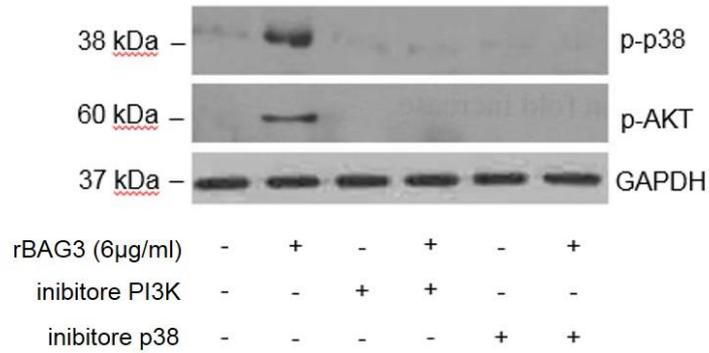


Figura 9c Analisi dello stato di fosforilazione delle proteine p38 e AKT dopo stimolazione con rBAG3 in presenza di inibitori specifici per PI3K e p38

3.2.5 La sotto modulazione di NRP-1 e IFITM-2 previene la fosforilazione BAG3-indotta delle proteine AKT e p38

Come mostrato in figura 10, abbiamo confermato che il segnale di BAG3 è mediato dal complesso recettoriale NRP-1/IFITM-2, infatti modulando negativamente i livelli di NRP-1 di IFITM-2 o di entrambi, e stimolando le cellule con rBAG3 si riscontra la mancata fosforilazione delle proteine AKT e p38.

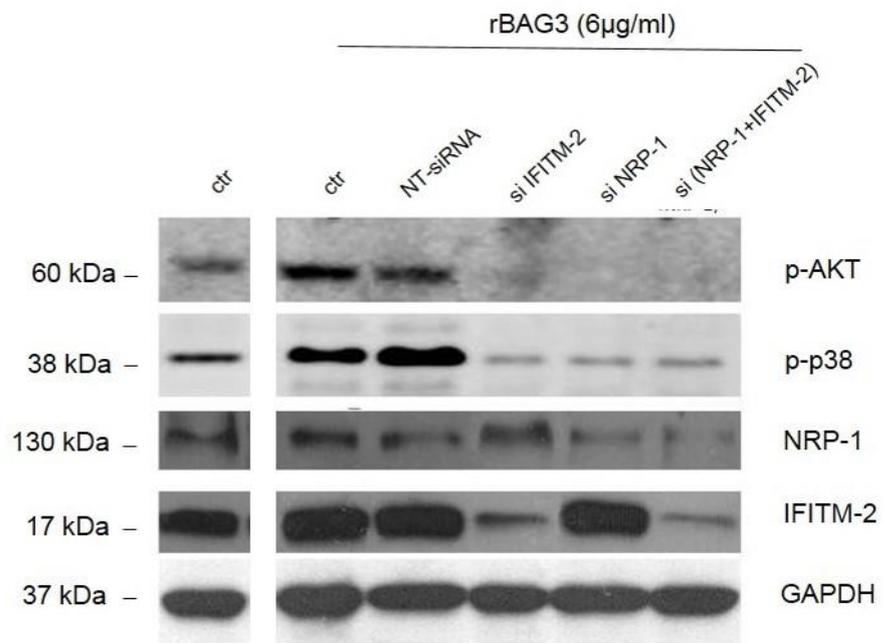


Figura 10 Analisi dello stato di fosforilazione delle proteine p38 e AKT dopo silenziamento dei recettori NRP-1 e IFITM-2 e stimolazione con rBAG3

3.2.6 La proteina BAG3 ricombinante lega la superficie dei monociti umani primari e induce il rilascio di IL-6

Per investigare se la proteina ricombinante rBAG3 fosse capace di legare ed attivare cellule primarie di monociti umani isolate da sangue periferico (PBMC) di donatori sani (HD), cellule PBMC sono state isolate da campioni di sangue intero mediante centrifugazione in gradiente di densità su FICOLL e successivamente i monociti sono stati purificati mediante selezione negativa del marcatore CD14. La purezza della separazione ottenuta è stata valutata utilizzando il marcatore di superficie CD14, specifico per i monociti. Come mostrato in Tabella 1, monociti provenienti da dieci differenti donatori (HD A-L) sono stati analizzati mediante citofluorimetria a flusso per l'espressione dei recettori NRP-1, IFITM-2 e per il legame di FITC-rBAG3 alla loro superficie; una parte degli stessi campioni sono stati messi in coltura e trattati con rBAG3 (6µg/ml) per 24h per valutarne l'attivazione mediante dosaggio dell'IL-6 rilasciata.

HD	% purezza	IFITM-2* fluorescenza media	NRP-1* fluorescenza media2	% legame FITC-rBAG3
A	93.61	72.39	36.30	100
B	87.71	65.94	66.00	96.60
C	89.90	128.39	35.24	89.90
D	94.72	90.12	20.59	99.68
E	91.04	62.33	62.27	82.46
F	93.29	90.18	62.30	88.90
G	95.12	71.99	25.70	92.63
H	91.01	85.30	23.65	90.51
I	91.27	102.5	40.02	99
L	96.65	98.36	30.12	97.56

*le cellule sono 100% positive per l'anticorpo

Tabella 1 Monociti umani isolati da sangue periferico di 10 donatori sani (HD A-L) sono stati analizzati mediante citofluorimetria a flusso per l'espressione dei recettori di superficie NRP-1 e IFITM-2 (fluorescenza media) e per il legame di FITC-rBAG3 (% di legame)

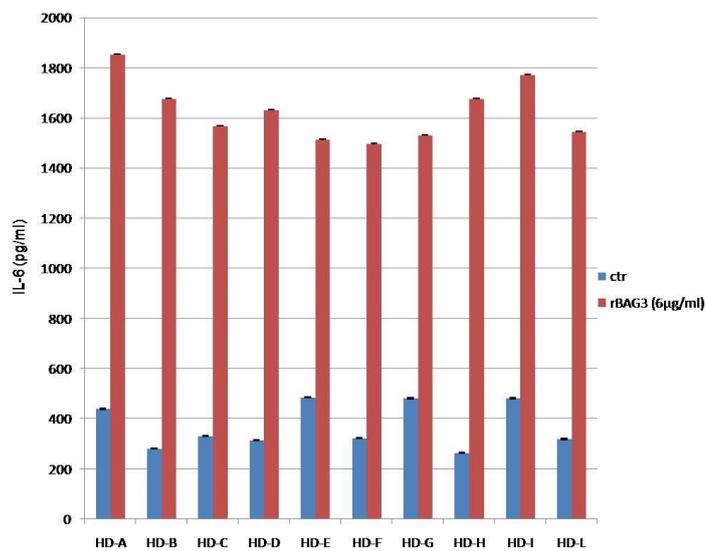


Figura 11 Monociti umani isolati da sangue periferico di 10 donatori sani (HD A-L) sono stati stimolati con rBAG3 e mediante test ELISA è stato dosato il rilascio di IL-6

I monociti di tutti i donatori analizzati esprimono il complesso recettoriale NRP-1/IFITM-2 necessario per il legame di BAG3 alle cellule, inoltre, il trattamento con BAG3 attiva le cellule promuovendo il rilascio di IL-6 (figura 11).

3.2.7 Profilo di citochine e chemochine BAG3 indotte in monociti umani primari

Allo scopo di studiare il profilo di citochine e chemochine rilasciate in seguito alla stimolazione di rBAG3 è stata effettuata un'analisi che ha permesso il monitoraggio di 102 molecole.



Figura 12 Profilo di citochine e chemochine rBAG3 indotte: precoci (a) e tardive (b e c)

Per valutare l'andamento di ciascuna proteina nel tempo, i surnatanti di monociti umani primari sono stati analizzati dopo 2, 4, 6 e 24 ore di stimolazione con rBAG3. La metodica utilizzata ha permesso un'analisi unicamente qualitativa dei risultati ottenuti, tutte le citochine monitorate sono state raggruppate in relazione al loro comportamento rispetto ai trattamenti effettuati. Gli istogrammi della figura 12 mostrano le citochine e chemochine indotte da rBAG3 suddivise in precoci (12a), le molecole rilasciate al tempo più breve di trattamento e tardive (12b e c) quelle rilevate al tempo più lungo.

In figura 13 sono riportate le molecole BAG3 represses, così definite perché i loro livelli di espressione nel mezzo di coltura diminuiscono durante il trattamento rispetto al controllo non trattato. In Tabella 2 sono mostrate le proteine che non hanno subito variazioni in seguito ai trattamenti con rBAG3 (A) o che non erano mai presenti nei terreni di coltura dei campioni analizzati (B).

Quest'analisi ha mostrato che, nei monociti umani, rBAG3 induce il rilascio di un elevato numero di citochine proinfiammatorie come ad esempio TNF- α e IL-1 β e citochine coinvolte nella differenziazione monocito-macrofagica, come la Chitinase3/like1, ENA-78, G-CSF e GM-CSF.

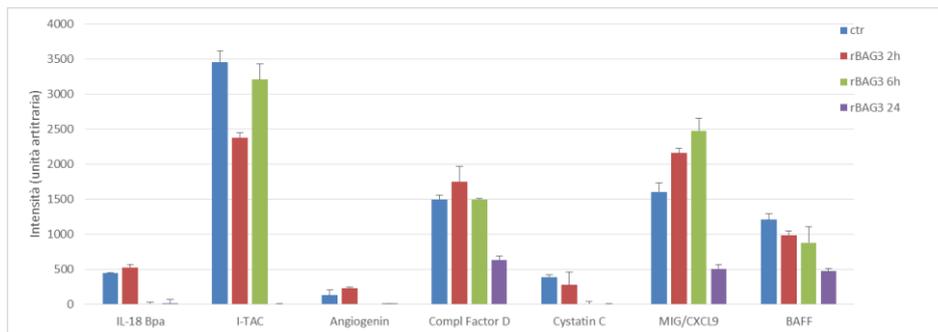


Figura 13 Profilo di citochine e chemochine rBAG3 represses

A	CD14, CD147, IP-10, MIF, MMP-9, MPO, PF4, IL-8, IL-1ra, LCN2, PAI-1
B	Acrp30, Aggrecan, Ang-1, Ang-2, BDNF, C5/C5a, CD30, CD40L, CRP, Cripto-1, Dkk-1, EGF, CD105, CD95L, FGF-2, FGF-19, FLT3LG, GDF-15, GH, HGF, CD54, IFN γ , IGFBP-2, IGFBP-3, IL-2, IL-3, IL-4, IL-11, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17A, IL-23, IL-24, IL-27, IL-31, IL-32 $\alpha\beta\gamma$, IL-33, IL-34, PSA, Leptin, LIF, M-CSF, OPN, PDGF-AA, PDGF-AB/BB, RAGE, RBP4, RLN2, SDF-1 α , SHBG, TFF3, Tfr, TGF α , THBS1, VEGF, VDB, CD26, IL-5, IL-16, Resistin

Tabella 2 Citochine e chemochine rilasciate dai monociti e non influenzate dai trattamenti con rBAG3 (A) e negative in tutti i campioni analizzati (B)

3.2.8 La proteina BAG3 lega la superficie dei linfociti T

Per indagare la possibilità che la proteina rBAG3 potesse legare sottopopolazioni leucocitarie diverse dai monociti, cellule PBMC di donari sani sono state analizzate utilizzando un marcatore specifico dei linfociti T (CD3+).

Come mostrato nel pannello superiore della figura 14, rBAG3 lega la quasi totalità dei monociti, monitorata nella doppia marcatura CD14+FITC-rBAG3, sia in cellule di controllo sia dopo stimolazione con LPS. Il pannello inferiore della figura 14 mostra che BAG3 può legare anche una parte dei linfociti T (circa il 5%) in cellule di controllo, mostrato nel quadrante CD3+FITCrBAG3, tale legame aumenta in seguito al trattamento con LPS per 24 e 48 ore, con una percentuale di legame di rBAG3 ai linfociti T del 35% ai tempi più lunghi di stimolazione.

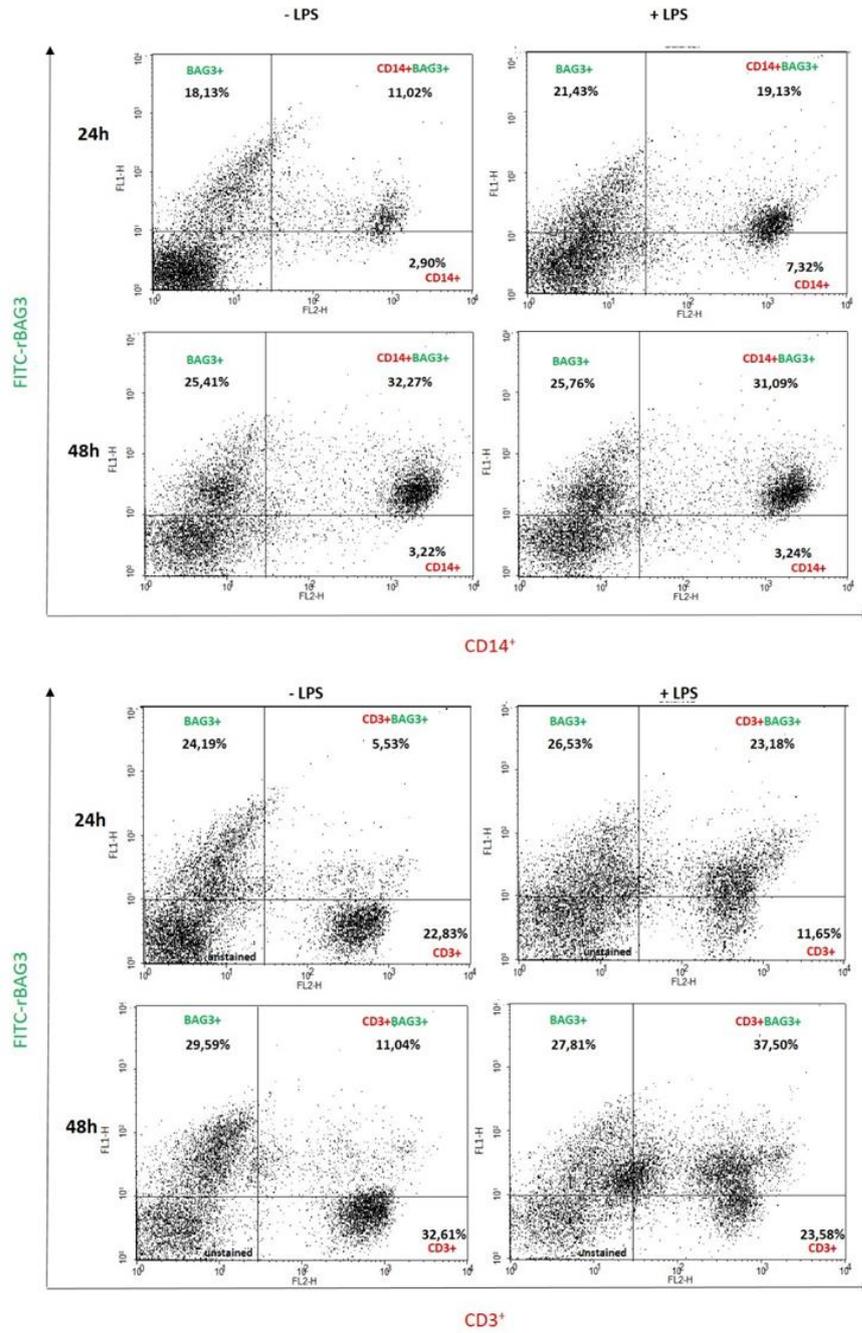


Figura 14 Legame di FITC-rBAG3 alla popolazione CD14+ (pannello superiore) e CD3+ (pannello inferiore) in cellule PBMC.

4.1 Conclusioni

In questo lavoro di tesi abbiamo studiato il legame della proteina BAG3 ricombinante ai suoi recettori di membrana, caratterizzandone i meccanismi che ne regolano l'attivazione.

Per tale studio abbiamo utilizzato, quale sistema sperimentale, principalmente macrofagi murini, anche se sono stati condotti esperimenti preliminari su alcune sottopopolazioni leucocitarie allo scopo di delineare il suo ruolo nel processo infiammatorio.

I risultati ottenuti degli esperimenti condotti evidenziano che:

- 1) la proteina rBAG3 attiva i macrofagi attraverso il legame ad un complesso recettoriale specifico che richiede la concomitanza di almeno due differenti proteine: IFITM-2 e NRP-1;
- 2) l'attivazione dei macrofagi da parte di BAG3 è associata alla fosforilazione delle proteine AKT e p38;
- 3) La proteina rBAG3, è capace di legare i monociti umani e di indurre il rilascio di numero citochine proinfiammatorie e di citochine coinvolte nella differenziazione monocito-macrofagica;
- 4) la proteina rBAG3 lega anche i linfociti T.

Sebbene i meccanismi attraverso i quali BAG3 induce l'attivazione delle cellule macrofagiche richiederanno ulteriori studi così come l'interazione con le sottopopolazioni linfocitarie, i dati presentati lasciano ipotizzare un ruolo della proteina BAG3 extracellulare nel sistema immunitario e speculare sulla possibilità che il trattamento con una molecola che in grado di inibire in modo specifico il legame della proteina rBAG3 ai macrofagi, potrebbe risultare particolarmente efficace nella terapia di quelle patologie caratterizzate dall'attivazione dei macrofagi, come per esempio le malattie neoplastiche, le malattie infiammatorie, immunitarie e degenerative.

5 Materiali e Metodi

5.1 Colture Cellulari

La linea cellulare di macrofagi murini J774.A1, ottenuta dall'American Tissue Culture Collection (ATCC). Le cellule sono state mantenute in coltura continua in DMEM contenente NaHCO₃ (42mM), penicillina (100 unità/ml), streptomicina (100 unità/ml), glutammina (2 mM), HEPES (10 mM) e siero fetale bovino (FBS; 10%) (Hy-Clone, Euroclone, U.K.) a 37°C ad un'atmosfera controllata al 5% di CO₂.

Cellule PBMC sono state isolate da Buffy Coat, ottenuti dal centro trasfusionale di Battipaglia (Sa), isolate mediante centrifugazione in gradiente di densità FICOLL (17-829F, Lonza). I Monociti. (>98% CD14+) sono stati isolate da cellule PBMC con il kit Monocyte Isolation Kit II (Miltenyi Biotec, Miltenyi Biotec S.r.l., BO, Italy). Le cellule sono state mantenute in coltura RPMI-1640 contenente siero fetale bovino (FBS 10%) (Hy-Clone, Euroclone, U.K.), penicillina (100 unità/ml), streptomicina (100 unità/ml). a 37°C ad un'atmosfera controllata al 5% di CO₂

5.2 Preparazione FITC-rBAG3

La proteina ricombinante BAG3 è stata preparata in laboratorio. Il cDNA codificante per la proteina BAG3 umana è stato amplificato attraverso PCR da RNA totale ottenuto dalla linea cellulare di carcinoma mammario MCF-7 ed in seguito clonato nel vettore di espressione pET 30a (+) (Novagen) utilizzando gli enzimi di restrizione NcoI/XhoI. La proteina ricombinante è stata espressa in E. coli e purificata attraverso cromatografia per affinità con le colonne HisTrap HP (GE Healthcare).

La fluoresceina-5-isotiocianato (FITC) è un colorante fluorescente che appartiene al gruppo dei coloranti derivati dallo xantene. Per la sua coniugazione a rBAG3 è stato utilizzato un kit commerciale (FluoroTag-FITC Conjugation Kit, SIGMA) nel quale si utilizza la fluoresceina isotiocianato isomero 1 che presenta un massimo di assorbimento a 495 nm e un'emissione massima a 525 nm.

La coniugazione a FITC si verifica attraverso i gruppi amminici liberi della proteina che formano un legame stabile tiourea con FITC. Il protocollo di coniugazione prevede, inizialmente la solubilizzazione di rBAG3 e FITC nel buffer carbonato-bicarbonato e successiva incubazione al buio per 2 ore in agitazione. Successivamente, è stata effettuata una separazione della proteina coniugata a FITC da quella non coniugata utilizzando una colonna Sephadex G-25. La colonna sephadex è costituita da una resina di destrano a legami crociati ottenuta per polimerizzazione di unità di destano con epichelidrina. La frazione coniugata è stata raccolta e in seguito la concentrazione è stata determinata mediante analisi spettrofotometrica.

5.3 Silenziamento e Trasfezione

Cellule J774.A1 sono state piastrate in multiwell da 24 pozzetti al 40% di confluenza, dopo 24 ore le cellule sono state trasfettate con siRNA specifici, che modulano negativamente NRP-1, IFITM-2 o entrambi i livelli di proteine. NRP-1 siRNA e IFITM-2 siRNA sono stati ottenuti da Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA) e utilizzati per la trasfezione con Transfectin (BIORAD, Carlsbad, Stati Uniti) ad una concentrazione finale di 100 nM. Come controllo negativo è stata utilizzata una sequenza non target (NT-siRNA) ottenuto dalla Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA).

5.4 Citofluorimetria a flusso

Cellule J774.A1 sono state trasfettate con siRNA specifici per NRP-1 e IFITM-2, come descritto precedentemente, dopo 48 ore le cellule sono state raccolte, risospese in una soluzione bloccante (PBS 2% FBS) e incubate in ghiaccio per 30 min. Dopodiché FITC-rBAG3 è stata aggiunta alle cellule per ulteriori 30 minuti in ghiaccio. Le cellule sono state lavate (due volte) con 1ml di soluzione bloccante, centrifugate per 5 min a 200 g e risospese in 300 microlitri di PBS per la lettura al citofluorimetro.

5.5 Western Blot

Le cellule sono state raccolte e lisate in un tampone contenente 20 mM di HEPES (pH 7,5), 150 mM di NaCl, 0.1% di Triton (tampone TNN) addizionato con un cocktail di inibitori delle proteasi (1 mM di phenylmethylsulfonyluoride, 1 mg / ml di pepstatina A, 2 mg / ml aprotinina), e sottoposta a 3 cicli di gelo e scongelamento in ghiaccio secco. I lisati sono stati centrifugati per 20 minuti a 13000 g e conservati a -80°C. La quantità proteica è stata determinata mediante il saggio di Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA) e 30 µg delle proteine totali sono state separate in base al loro peso molecolare su un gel al 10% SDS-PAGE e trasferite elettroforeticamente su una membrana di nitrocellulosa. I filtri di nitrocellulosa (Blot) sono stati bloccati con il 10% di latte in polvere privo di grassi in tampone TBST (20 mM di Tris-HCl, pH 7,4), 500 mM di NaCl e 0,01% di Tween e incubati con l'anticorpo primario in TBST contenente 5% di latte in polvere privo di grassi per tutta la notte a 4 ° C. L'immunoreattività è stata visualizzata dalla successiva incubazione con un anticorpo secondario coniugato a perossidasi e dal reagente ECL (Amersham Life Sciences Inc., Arlington Heights, IL, USA).

5.6 Estrazione dell'RNA, retrotrascrizione e gel di agarosio

L'estrazione dell'RNA è stata eseguita in fenolo/cloroformio seguita da precipitazioni in isopropanolo per tutta la notte a -20°C. L'RNA è stato poi centrifugato a 15000 g, lavato 2 volte con etanolo al 70% e centrifugato a 15000 g ogni volta. Il pellet è stato asciugato all'aria e risospeso in 30µl di acqua RNase-free. Un µg di RNA è stato retrotrascritto utilizzando il QuantiTect Reverse Transcription kit (QIAGEN) secondo i protocolli del produttore. Due microlitri della reazione di retrotrascrizione sono stati amplificati in un volume di reazione totale di 20 microlitri. Il cDNA preparato è stato analizzato mediante la reazione a catena della polimerasi utilizzando i seguenti primers: IL6 forward 5'-GACAAAGCCAGAGTCCTTCAGAGAG-3', IL6 reverse 5'-CTAGGTTTGCCGAGTAGATCTC-3'; GAPDH forward 5'- ACCACAGTCCATGCCATCAC -3' GAPDH reverse 5'- CACCACCCTGTTGCTGTAGCC -3' La miscela di reazione conteneva 10µl HotStarTaq Master Mix (Qiagen), 0,6mM di ciascun primer e acqua RNase-free. Le condizioni del ciclo erano: (1) 95 °C 15 min, (2) 30 cicli: 94 °C 20 sec, 57 °C 30 sec, 72 °C 30 sec e (3) estensione finale a 72 °C per 10 min. I frammenti amplificati sono stati rilevati mediante elettroforesi in gel di agarosio (Sigma-Aldrich) al 2% e colorazione con etidio bromuro.

5.7 Anticorpi e altri reagenti

L'anticorpo anti-GAPDH(6C5), l'anticorpo anti-IFITM-2 (A-6) (sc-373676), l'anticorpo anti-neuropilina (-286 H) (SC-5541), l'anticorpo anti-fosfo-p38 (sc-17852-R) sono stati forniti da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). L'anticorpo anti-fosfo-Akt (9271) è stato fornito da Cell Signaling (Boston, MA, USA). Gli anticorpi anti-CD14 e anti-CD3 sono stati ottenuti dalla eBIOSCIENCE II kit per Mouse IL-6 ELISA (88-

7064-88) è stato fornito da eBioscience, Inc. (San Diego, CA, Stati Uniti). L'inibitore di PI3K (PI3Ki) LY294002, e l'inibitore di p38 (MAPKi) SB203580 sono stati acquistati da Calbiochem (Darmstadt, Germania). Il kit Human Proteome Profiler Cytokine XL Kit è stato acquistato dalla R&D.

BIBLIOGRAFIA

Ammirante M, Rosati A, Arra C, Basile A, Falco A, Festa M, Pascale M, d'Avenia M, Marzullo L, Belisario MA, De Marco M, Barbieri A, Giudice A, Chiappetta G, Vuttariello E, Monaco M, Bonelli P, Salvatore G, Di Benedetto M, Deshmane SL, Khalili K, Turco MC, Leone A. **2010**. IKK {gamma} protein is a target of BAG3 regulatory activity in human tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **107**, 7497-502.

Asea A, Kraeft SK, Kurt-Jones EA, Stevenson MA, Chen LB, Finberg RW, Koo GC, Calderwood SK. **2000**. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med.* **6**(4), 435-42.

Basile A, Zeppa R, Pasquino N, Arra C, Ammirante M, Festa M, Barbieri A, Giudice A, Pascale M, Turco MC, Rosati A. **2011**. Exposure to 50 Hz electromagnetic field raises the levels of the anti-apoptotic protein BAG3 in melanoma cells, *J Cell Physiol.* **226**, 2901-7.

Beere HM. **2005**. Death versus survival: functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways. *J Clin Invest.* **115**, 2633-9.

Ben Aicha S, Lessard J, Pelletier M, Fournier A, Calvo E, Labrie C. **2007**. Transcriptional profiling of genes that are regulated by the endoplasmic reticulum-bound transcription factor AlbZIP/CREB3L4 in prostate cells. *Physiol Genomic.* **31**, 295–305.

Bernatchez PN, Rollin S, Soker S, *et al.* **2002**. Relative effects of VEGF-A and VEGF-C on endothelial cells proliferation, migration and PAF synthesis: role of neuropilin-1. *J Cell Biochem.* **85**, 629 – 39.

Bissell MJ, Radisky D. **2001**. Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer.* **1**(1), 46-54.

Bruno AP, Festa M, Dal Piaz F, Rosati A, Turco MC, Giuditta A. **2008**. Identification of a synaptosome-associated form of BAG3 protein. *Cell Cycle.* **7**, 3104–3105.

Carra S. **2009a**. The stress-inducible HspB8-Bag3 complex induces the eIF2alpha kinase pathway: implications for protein quality control and viral factory degradation?. *Autophagy.* **5**. 428–429.

Carra S, Brunsting JF, Lambert H, Landry J, Kampinga HH. **2009b**. HspB8 participates in protein quality control by a non-chaperone-like mechanism that requires eIF2 {alpha} phosphorylation. *J Biol Chem.* **284**, 5523–5532.

Cesaro E, Montano G, Rosati A, Crescitelli R, Izzo P, Turco MC, Costanzo P. **2010**. WT1 protein is a transcriptional activator of the antiapoptotic bag3 gene. *Leukemia*. **24**(6), 1204-6.

Chen YA, Scheller RH. **2001**. SNARE-mediated membrane fusion, *Nat Rev Mol Cell Biol*. **2**, 98-106.

Chiappetta G, Ammirante M, Basile A, Rosati A, Festa M, Monaco M, et al. **2007**. The antiapoptotic protein BAG3 is expressed in thyroid carcinomas and modulates apoptosis mediated by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. **92**, 1159-63.

Colotta Francesco, Paola Allavena, Antonio Sica, Cecilia Garlanda and Alberto Mantovani. **2009**. Cancer-related Inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*. **30**(7), 1073-1081.

Coulson M, Robert S, Saint R. **2005**. Drosophila starving encodes a tissue-specific BAG-domain protein required for larval food uptake. *Genetics*. **171**, 1799-812.

Davies LC, Rosas M, Jenkins SJ, Liao CT, Scurr MJ, Brombacher F, Fraser DJ, Allen JE, Jones SA, Taylor PR. **2013**. Distinct bone marrow-derived and tissue-resident macrophage lineages proliferate at key stages during inflammation. *Nat Commun*. **4**, 1886.

De Marco M, Falco A, Basile A, Rosati A, Festa M, d'Avenia M, Pascale M, Dal Piaz F, Bisogni R, Barcaroli D, Coppola G, Piscione F, Gigantino A, Citro R, De Rosa R, Vitulano G, Virtuoso N, Manganelli F, Palermo E, Siano F, Rosato G, Hahne M, Tiberti C, De Laurenzi V, Turco MC. **2013**. Detection of soluble BAG3 and anti-BAG3 antibodies in patients with chronic heart failure. *Cell Death Dis*. **4**, e495.

De Marzo AM, Marchi VL, Epstein JI, Nelson WG. **1999**. Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis. *Am J Pathol*. **155**(6):1985-92.

Diamond MS, Farzan M. **2013**. The broad-spectrum antiviral functions of IFIT and IFITM proteins. *Nat Rev Immunol*. **13**(1):46-57.

Doong H, Rizzo K, Fang S, Kulpa V, Weissman AM, Kohn EC. **2003**. CAR-1/BAG-3 abrogates heat shock protein-70 chaperone complex-mediated protein degradation: accumulation of poly-ubiquitinated HSP90 client proteins, *J Biol Chem*, **278**, 28490-500.

Dreiza CM, Komalavilas P, Furnish EJ, Flynn CR, Sheller MR, Smoke CC et al. **2010**. The small heat shock protein, HSPB6, in muscle function and disease. *Cell Stress Chaperones*. **15**, 1-11.

Du ZX, Meng X, Zhang HY, Guan Y, Wang HQ. **2008**. Caspase-dependent cleavage of BAG3 in proteasome inhibitors-induced apoptosis in thyroid cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **369**, 894–898.

Falco A, Rosati A, Festa M, Basile A, De Marco M, d'Avenia M, Pascale M, Dal Piaz F, Tavano F, Di Mola FF, di Sebastiano P, Berloco PB, Nudo F, Caraglia M, Febraro A, Barcaroli D, Scarpa A, Pezzilli R, De Laurenzi V, Turco MC. **2013**. BAG3 is a novel serum biomarker for pancreatic adenocarcinomas. *Am J Gastroenterol.* **108**(7), 1178-80.

Fan GC, Chu G, Kranias EG. **2005**. Hsp20 and its cardioprotection. *Trends Cardiovasc Med.* **15**,138–41.

Feeley E M et al. **2011**. IFITM3 inhibits influenza A virus infection by preventing cytosolic entry, *PLoS Pathog.* **7**, e1002337.

Festa M, Del Valle L, Franco R, Scognamiglio G, Khalili K, De Laurenzi L, et al. **2011**. BAG3 protein is overexpressed in human glioblastoma and is a potential target for its therapy. *Am J Pathol.* **178**, 2504-12.

Fontanella B, Birolo L, Infusini G, Cirulli C, Marzullo L, Pucci P, Turco MC, Tosco A. **2010**. The co-chaperone BAG3 interacts with the cytosolic chaperonin CCT: new hints for actin folding. *Int J Biochem Cell Biol.* **42**(5):641-50.

Franceschelli S, Rosati A, Lerose R, De Nicola S, Turco MC, Pascale M. **2008**. Bag3 Gene Expression is Regulated by Heat Shock Factor 1. *J. Cell. Physiol.* **215**, 575-7.

Fuchs M, Poirier DJ, Seguin SJ, Lambert H, Carra S, Charette SJ, et al. **2009**. Identification of the key structural motifs involved in HspB8/HspB6-Bag3 interaction. *Biochem J.* **425**, 245–55.

Fujiwara N, Kobayashi K **2005**. Macrophages in inflammation. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy.* **4**, 281-6.

Gautier EL, Ivanov S, Lesnik P, Randolph GJ. **2013**. Local apoptosis mediates clearance of macrophages from resolving inflammation in mice. *Blood.* **122**(15), 2714-22.

Gentilella A, Passiatore G, Deshmane S, Turco MC, Khalili K. **2008**. Activation of BAG3 by Egr-1 in response to FGF-2 in neuroblastoma cells. *Oncogene.* **28**, 5011-18.

Hanahan D, Weinberg RA. **2000**. The hallmarks of cancer. *Cell.* **100**(1), 57-70.

Hansel DE, Wilentz RE, Yeo CJ, Schulick RD, Montgomery E, Maitra A. **2004**. Expression of neuropilin-1 in high-grade dysplasia, invasive cancer, and metastases of the human gastrointestinal tract. *Am J Surg Pathol.* **28**, 347–56.

Hickford D, Frankenberg S, Shaw G & Renfree M B. **2012**. Evolution of vertebrate interferon inducible transmembrane proteins. *BMC Genomics.* **13**, 155.

Hume DA. **2008**. Differentiation and heterogeneity in the mononuclear phagocyte system. *Mucosal Immunol.* **1**(6):432-41.

Iwasaki M, Homma S, Hishiya A, Dolezal SJ, Reed JC, Takayama S. **2007**. BAG3 regulates motility and adhesion of epithelial cancer cells. *Cancer Res.* **67**, 10252–10259.

Iwasaki M, Tanaka R, Hishiya A, Homma S, Reed JC, Takayama S. **2010**. BAG3 directly associates with guanine nucleotide exchange factor of Rap1, PDZGEF2, and regulates cell adhesion. *Biochem Biophys Res Commun.* **400**, 413–418.

Jacobs AT, Marnett LJ. **2009**. HSF1-mediated BAG3 expression attenuates apoptosis in 4-hydroxynonenal-treated colon cancer cells via stabilization of anti-apoptotic Bcl-2 proteins. *J Biol Chem.* **284**, 9176–9183.

Jaffe, E. A. et al. **1989**. IFN- α and IFN- γ induce the expression and synthesis of Leu 13 antigen by cultured human endothelial cells. *J. Immunol.* **143**, 3961-3966.

Jung SE, Kim YK, Youn DY, Lim MH, Ko JH, Ahn YS et al. **2010**. Down-modulation of Bis sensitizes cell death in C6 glioma cells induced by oxygen-glucose deprivation. *Brain Res.* **1349**, 1-10.

Kassis JN, Guancial EA, Doong H, Virador V, Kohn EC. **2006**. CAIR-1/BAG-3 modulates cell adhesion and migration by downregulating activity of focal adhesion proteins. *Exp Cell Res.* **312**. 2962–2971.

Kassis JN, Virador VM, Guancial EA, Kimm D, Ho AS, Mishra M, et al. **2009**. Genomic and phenotypic analysis reveals a key role for CCN1 (CYR61) in BAG3-modulated adhesion and invasion. *J Pathol.* **218**, 495–504

Knowles HJ, Harris AL, **2007**. Macrophages and the hypoxic tumour microenvironment. *Front Biosci.* **12**, 4298-314.

Kumanogoh A, Kikutani H. **2013**. Immunological functions of the neuropilins and plexins as receptors for semaphorins. *Nat Rev Immunol.* **13**(11), 802-14.

Kuper H, Adami HO, Trichopoulos D. **2000**. Infections as a major preventable cause of human cancer. *J Intern Med.* **248**(3), 171-83.

Lee MY, Kim SY, Choi JS, Choi YS, Jeon MH, Lee JH, et al. **2002**. Induction of Bis, a Bcl-2-binding protein, in reactive astrocytes of the rat hippocampus following kainic acid-induced seizure. *Exp Mol Med.* **34**, 167-71.

Lewin A R, Reid L E, McMahon M, Stark G R & Kerr I M. **1991**. Molecular analysis of a human interferon-inducible gene family. *Eur, J. Biochem.* **199**(2), 417-423.

Li K, Markosyan RM, Zheng YM, Golfetto O, Bungart B, Li M, Ding S, He Y, Liang C, Lee JC, Gratton E, Cohen FS, Liu SL. **2013**. IFITM proteins restrict viral membrane hemifusion, *PLoS Pathog*, **9**(1), e1003124.

Li N, Du ZX, Zong ZH, Liu BQ, Li C, Zhang Q, Wang HQ. **2013**. PKC δ -mediated phosphorylation of BAG3 at Ser187 site induces epithelial-mesenchymal transition and enhances invasiveness in thyroid cancer FRO cells. *Oncogene.* **32**(38), 4539-48.

Liu P, Xu B, Li J, Lu H. **2009**. BAG3 gene silencing sensitizes leukemic cells to Bortezomib-induced apoptosis. *FEBS Lett.* **583**, 401–406.

Malhotra V. **2013**. Unconventional protein secretion: an evolving mechanism. *EMBO J.* **32**(12), 1660-4.

Mantovani A, Sica A. **2010**. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance and diversity. *Curr Opin Immunol.* **22**(2), 231-7.

Mantovani, A. et al. **2008**. Cancer-related inflammation. *Nature.* **454**, 436-444.

Matsui H, Asou H, Inaba T. **2007**. Cytokines direct the regulation of Bim mRNA stability by heat-shock cognate protein 70. *Mol Cell.* **25**, 99-112.

McCollum AK, Casagrande G, Kohn EC. **2009**. Caught in the middle: the role of Bag3 in disease. *Biochem J.* **425**(1), e1-3.

Moreau K, Luo S, Rubinsztein DC. **2010**. Cytoprotective roles for autophagy. *Curr Opin Cell Biol.* **22**(2):206-11.

Pagliuca MG, Lerose R, Cigliano S, Leone A. **2003**. Regulation by heavy metals and temperature of the human BAG-3 gene, modulator of Hsp70 activity. *FEBS Lett.* **541**, 11-5.

Parker MW, Xu P, Li X, Vander Kooi CW. **2012**. Structural basis for selective vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) binding to neuropilin-1. *J Biol Chem.* **287**(14), 11082-9.

Perreira JM, Chin CR, Feeley EM, Brass AL. **2013**. IFITMs restrict the replication of multiple pathogenic viruses. *J Mol Biol.* **425**(24), 4937-55.

Prud'homme GJ, Glinka Y. **2012**. Neuropilins are multifunctional coreceptors involved in tumor initiation, growth, metastasis and immunity. *Oncotarget.* **3**(9), 921-39.

Rabouille C1, Malhotra V, Nickel W. **2012**. Diversity in unconventional protein secretion. *J Cell Sci.* **125**(Pt 22), 5251-5.

Rebane A, Zimmermann M, Aab A, Baurecht H, Koreck A, Karelson M, Abram K, Metsalu T, Pihlap M, Meyer N, Fölster-Holst R, Nagy N, Kemeny L, Kingo K, Vilo J, Illig T, Akdis M, Franke A, Novak N, Weidinger S, Akdis CA. **2012**. Mechanisms of IFN- γ -induced apoptosis of human skin keratinocytes in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* **129**(5), 1297-306.

Robbins e Cotran. **2006**. *Le Basi Patologiche delle Malattie* (7a edizione), Torino, Elsevier, 2006.

Rollin S, Lemieux C, Maliba R, et al. **2004**. VEGF-mediated endothelial P-selectin translocation: role of VEGF receptors and endogenous PAF synthesis. *Blood.* **103**, 3789–97.

Romano MF, Festa M, Pagliuca G, Lerose R, Bisogni R, Chiurazzi F, et al. **2003**. BAG3 protein controls B-chronic lymphocytic leukaemia cell apoptosis. *Cell Death Differ.* **10**, 383-5.

Rosati A, Ammirante M, Gentilella A, Basile A, Festa M, Pascale M, et al. **2007**. Apoptosis inhibition in cancer cells: a novel molecular pathway that involves BAG3 protein. *Int J Biochem Cell Biol.* **39**, 1337-42.

Rosati A, Basile A, D'Auria R, d'Avenia M, De Marco M, Falco A, Festa M, Guerriero L, Iorio V, Parente R, Pascale M, Marzullo L, Franco R, Arra C, Barbieri A, Rea D, Menichini G, Hahne M, Bijlsma M, Barcaroli D, Sala G, di Mola FF, di Sebastiano P, Todoric J, Antonucci L, Corvest V, Jawhari A, Firpo MA, Tuveson DA, Capunzo M, Karin M, De Laurenzi V, Turco MC. **2015**. BAG3 promotes pancreatic ductal adenocarcinoma growth by activating stromal macrophages. *Nat Commun.* **6**, 8695.

Rosati A, Bersani S, Tavano F, Dalla Pozza E, De Marco M, Palmieri M, et al. **2012**. Expression of the antiapoptotic protein BAG3 is a feature of pancreatic adenocarcinoma and its overexpression is associated with poorer survival. *Am J Path.* **181**, 1524-29.

Rosati A, Graziano V, De Laurenzi V, Pascale M, Turco MC. **2011**. BAG3: a multifaceted protein that regulates major cell pathways. *Cell Death and Disease.* **2**, e141.

Rosati A, Khalili K, Deshmane SL, Radhakrishnan S, Pascale M, Turco MC, et al. **2009**. BAG3 protein regulates caspase-3 activation in HIV-1-infected human primary microglial cells. *J Cell Physiol.* **218**. 264–267.

Siddhartha Jaiswall, Mark P. Chao, Ravindra Majeti and Irving L. Weissman. **2010**. Macrophages as mediators of tumor immunosurveillance, *Trends in Immunology*, 31:212-219.

Sica A, Bronte V. **2007**. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *J Clin Invest.* **117**(5):1155-66.

Soker S, Miao HQ, Nomi M, et al. **2002**. VEGF165 mediates formation of complexes containing VEGFR-2 and neuropilin-1 that enhance VEGF-165-receptor binding. *J Cell Biochem.* **85**, 357–68.

Soker S, Takashima S, Miao HQ, et al. **1998**. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell.* **92**, 735–45.

Takayama S, Xie Z, Reed JC. **1999**. An evolutionarily conserved family of Hsp70/Hsc70 molecular chaperone regulators. *J Biol Chem.* **274**, 781-786.

Tamagnone L, Artigiani S, Chen H, et al. **1999**. Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates. *Cell.* **99**, 71–80.

Tlsty TD, Coussens LM. **2006**. Tumor stroma and regulation of cancer development. *Annu Rev Pathol*, **1**, 119-50.

Van Kempen LC, de Visser KE, Coussens LM. **2006**. Inflammation, proteases and cancer. *Eur J Cancer.* **42**(6), 728-34.

Wang Z, Thurmond DC. **2009**. Mechanisms of biphasic insulin-granule exocytosis- roles of the cytoskeleton, small GTPases and SNARE proteins. *J Cell Sci.* **122**, 893–903.

Wee Y S, Roundy K M, Weis J J & Weis J H. **2012**. Interferon-inducible transmembrane proteins of the innate immune response act as membrane organizers by influencing clathrin and v-ATPase localization and function. *Innate Immun.* **18**, 834-845.

Young P, Anderton E, Paschos K, White R, Allday MJ. **2008**. Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA) 3A induces the expression of and interacts with a subset of chaperones and co-chaperones. *J Gen Virol.* **89**, 866–77.

