



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO
Dipartimento di Farmacia

Dottorato di ricerca
in [Biologia dei Sistemi](#)

Ciclo [XII Nuova Serie](#) — Anno di discussione 2014

Coordinatore: Chiar.mo Prof. [Antonietta Leone](#)

Determinazione del ruolo della proteina BAG3 nelle isole del Langerhans e suo coinvolgimento nel meccanismo di secrezione dell'insulina

settore scientifico disciplinare di afferenza: [BIO/11](#)

Dottorando

Dott. [Vittoria Iorio](#)

Tutore

Chiar.mo Prof. [Maria Caterina Turco](#)

Co-tutore

Chiar.mo Prof. [Gianfranco Tajana](#)

Alla mia famiglia

Abstract

Abstract 1

Sommario

Sommario 2

Capitolo I. Le isole del Langerhans

1.1 Le isole del Langerhans 3
1.2 Le cellule β 4
 1.2.1 La produzione dell'insulina 4
 1.2.2 La secrezione dell'insulina 6
1.3 Il diabete 8

Capitolo II. L'esocitosi dei granuli d'insulina

2.1 Meccanismo di esocitosi dell'insulina 11
2.2 Ruolo delle proteine SNARE 13
2.3 Ruolo dell'actina F citoscheletrica 15
 2.3.1 Pathway di segnalazione del rimodellamento dell'actina 15
2.4 Ruolo delle adesioni focali 17
 2.4.1 FAK 18
 2.4.2 Paxillina 20
 2.4.3 Il rimodellamento delle adesioni focali in seguito a
 stimolazione con glucosio 21

Capitolo III. La proteina BAG3

3.1 BAG3: una proteina che regola numerosi meccanismi molecolari 22
3.2 Ruolo della proteina BAG3 nella regolazione dell' apoptosi 24
3.3 Ruolo della proteina BAG3 nell' adesione e migrazione cellulare 26
3.4 Ruolo della proteina BAG3 nell' autofagia 26

Capitolo IV. Ruolo della proteina BAG3 nelle isole del Langerhans

4.1 Scopo della tesi.....	28
4.2 Risultati e Discussione.....	29
4.2.1 BAG3 è espressa nelle β TC 6 e i suoi livelli aumentano con il processo di maturazione cellulare	29
4.2.2 BAG3 è presente nella frazione dei granuli di insulina	31
4.2.3 Il silenziamento di BAG3 causa un aumento della secrezione d'insulina ..	34
4.2.4 La proteina BAG3 interagisce con il complesso delle adesioni focali FAK/ Paxillina.....	39
4.2.5 BAG3 interagisce con il complesso SNAP-25/Syntaxina intervenendo nel meccanismo di fusione dei granuli alla membrana plasmatica	41
4.2.6 BAG3 è fosforilato in tirosina in seguito a stimolazione con glucosio e tale fosforilazione sembra essere regolata da FAK	43

Capitolo V. Conclusioni

5.1 Conclusioni	46
-----------------------	----

Capitolo VI. Materiali e Metodi

6.1 Materiali	48
6.2 Reagenti e anticorpi	48
6.3 Western blot.....	48
6.4 Secrezione d'insulina stimolata da glucosio	48
6.5 Immunofluorescenza indiretta.....	49
6.6 Frazionamento cellulare per la purificazione dei granuli d'insulina.....	49
6.7 Trasfezione	50
6.8 Coimmunoprecipitazione	50

Bibliografia

Bibliografia.....	I-IX
-------------------	------

Abstract

Diabetes is a metabolic alteration due to a decrease in activity of insulin. In particular, it may be a consequence of a reduced availability of this hormone, of an impediment to its normal action, or of a combination of these two factors. The secretion of insulin is a specialized activity of the β cells of the Langerhans islets that are functional endocrine pancreatic part. Diabetes is a widespread disease, particularly in so-called affluent countries, where some risk factors promote the onset. Actually, it should be considered a syndrome more complex than the simple hyperglycemia. In fact, it is associated with lipid metabolism abnormalities, and increased blood pressure, that, together with abdominal obesity and alterations in glucose homeostasis constitute the so-called 'metabolic syndrome': a multifactorial disease that increases the risk of cardiovascular disease. Given the wide prevalence of this disease, it is therefore necessary a deeper understanding of the normal physiology of β cells and a complete characterization of the molecules involved in the mechanism of insulin secretion. Recently, there has been much progress in this direction, but much remains to be clarified.

BAG3 is a protein involved in some of the most important biological processes, such as apoptosis, autophagy, adhesion, migration, and cell invasion. The strong positivity of BAG3 protein in Langerhans islets, recently found in our laboratory, has prompted us to analyze the role of this protein in the β cells physiological functions. To this end, we analyzed BAG3 expression and subcellular localization in the murine insulinoma cell line β TC 6. BAG3 has an apparent mass of 74kDa and is localized in the cytoplasm, here has been shown the presence of a 60 kDa BAG3 form in the insulin-containing granules. The presence in this fraction can be explained by the fact that BAG3 appears to be associated with proteins constitutively expressed on the granules membranes involved in their exocytosis. Indeed, in this work, has been shown the physical interaction of BAG3 protein with t-SNARE SNAP-25 / Syntaxin, which mediate the fusion and exocytosis of insulin vesicles to the plasma membrane. In particular, BAG3 appears to regulate the assembly of the complex allowing a regulated secretion of insulin.

In addition, we have shown that BAG3 interacts with the focal adhesion complex FAK / Paxillin, involved in glucose-induced F-actin remodelling. The interaction with FAK, induced by high glucose concentrations, appears to be essential for the phosphorylation of BAG3 by such kinases. BAG3 is also able to sustain ERK phosphorylation, contributing to the destruction of the actin cytoskeleton and increased secretion of insulin.

All together these findings disclose a role for BAG3 in regulating insulin release by islet β -cell.

Sommario

Il diabete è un'alterazione metabolica derivante da un calo di attività dell'insulina. In particolare, può essere dovuta ad una ridotta disponibilità di questo ormone, o ad un impedimento della sua normale funzione oppure ad una combinazione di questi due fattori. La secrezione d'insulina è un'attività specializzata delle cellule β delle isole del Langerhans che fanno parte del pancreas endocrino.

Il diabete è una patologia largamente diffusa, in particolar modo nei cosiddetti paesi del benessere dove alcuni fattori di rischio ne favoriscono l'insorgenza. In realtà va considerato una sindrome più complessa della semplice iperglicemia. Esso infatti si associa in vario grado ad alterazioni lipidiche e aumento della pressione arteriosa, che assieme all'obesità addominale e alle alterazioni dell'omeostasi glucidica, costituiscono quella che viene definita 'sindrome metabolica': patologia multifattoriale che aumenta il rischio cardiovascolare.

Considerata la diffusione di tale patologia, si rende quindi necessaria la comprensione della normale fisiologia delle cellule β e una caratterizzazione completa delle molecole coinvolte nel meccanismo di secrezione d'insulina. Negli ultimi anni sono stati fatti molti progressi in tal senso, ma resta ancora molto da chiarire.

BAG3 è una proteina coinvolta in alcuni dei più importanti processi biologici, come l'apoptosi, l'autofagia, l'adesione, la migrazione e l'invasività cellulare. La forte positività di BAG3 nelle cellule del Langerhans, ritrovata recentemente nei nostri laboratori, ci ha spinto ad analizzare il ruolo di tale proteina nella funzionalità delle cellule β . BAG3 ha un peso molecolare di 74 kDa ed è localizzata nel citoplasma principalmente nel reticolo endoplasmatico rugoso, tuttavia è stata ritrovata la presenza di una forma di BAG3 di 60 kDa nella frazione purificata dei granuli d'insulina. La presenza in tale frazione può essere spiegata dal fatto che BAG3 risulta essere associata a proteine presenti sulla membrana di tali granuli, e coinvolte nella loro esocitosi. In questa tesi, infatti, abbiamo riportato l'interazione di BAG3 con il complesso di proteine t-SNARE, SNAP-25/ Syntaxina, che mediano la fusione e l'esocitosi delle vescicole d'insulina alla membrana plasmatica. In particolare BAG3 sembra regolare l'assemblaggio del complesso permettendo una secrezione regolata dell'insulina. Abbiamo inoltre dimostrato, che BAG3 interagisce con il complesso delle adesioni focali FAK / Paxillina, coinvolte nel rimodellamento dell'actina indotto da glucosio. L'interazione con FAK indotta da alte concentrazioni di glucosio, sembra essere essenziale per la fosforilazione di BAG3 da parte di tale chinasi. BAG3 è anche in grado di sostenere la fosforilazione di ERK contribuendo alla distruzione dell'actina citoscheletrica e di aumentare la secrezione d'insulina.

Tutti insieme questi dati rivelano un ruolo di BAG3 nel meccanismo di secrezione dell'insulina da parte delle cellule β .

1. Le isole del Langerhans

Il pancreas è una voluminosa ghiandola annessa all'apparato digerente. Un pancreas adulto di mammifero, è composto di una parte esocrina e una endocrina, quest'ultima formata da un gruppo di cellule, le Isole del Langerhans, che giocano un ruolo importante nel mantenere un livello appropriato di nutrienti nel sangue e nei depositi cellulari.

Le isole pancreatiche sono un mini organo altamente vascolarizzato, che riceve gran parte della frazione del flusso sanguigno pancreatico (fino al 5-10%) rispetto alla porzione esocrina del pancreas. Esse sono integrate nelle cellule acinose esocrine del pancreas e composte da molte cellule esocrine: le cellule α (15-20%) secernenti glucagone, le cellule β (65-90%) secernenti insulina, le cellule δ (3-10%) che rilasciano la somatostatina e le cellule PP (1%) che producono il polipeptide pancreatico (Junghyo *et al.*, 2007) (Fig.1) .

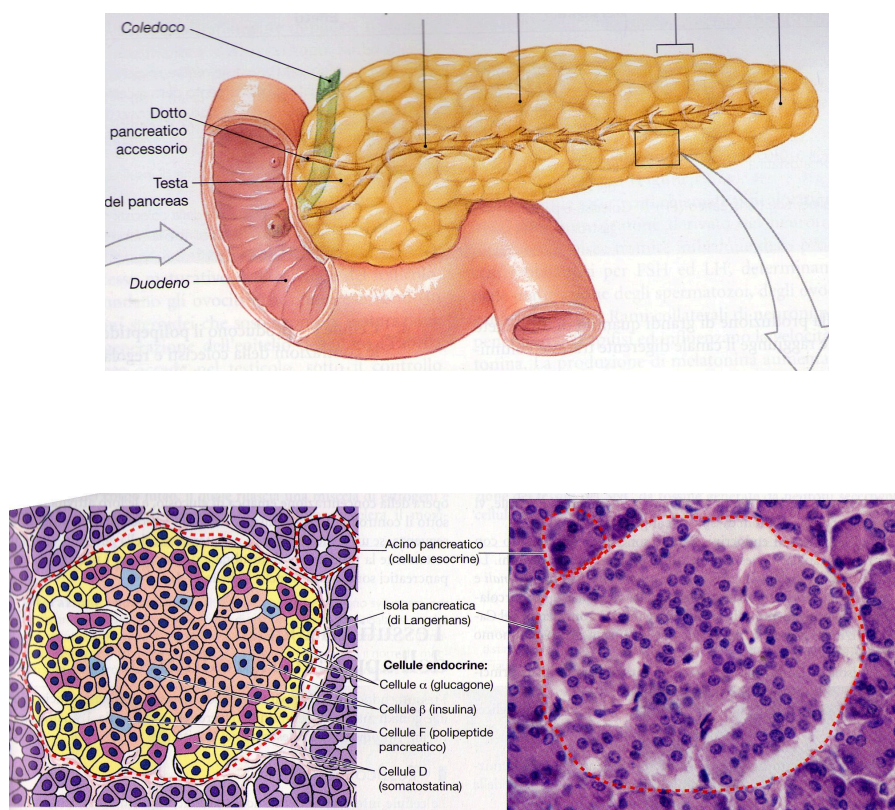


Figura 1 – Rappresentazione del pancreas (a) e delle isole del Langerhans (b)

Glucagone ed insulina sono i principali ormoni responsabili dei processi correlati al metabolismo del glucosio delle cellule. Il glucagone in particolare attiva il catabolismo del glicogeno epatico promuovendo l'immissione di glucosio nella circolazione sanguigna. L'insulina invece attiva il catabolismo del glucosio promuovendo la glicolisi, favorisce l'accumulo di glucosio nel fegato sotto forma di glicogeno e l'immagazzinamento dei grassi. La somatostatina ha un effetto inibitore sulla secrezione di entrambi gli ormoni. Il peptide pancreatico serve invece a regolare la secrezione esocrina del pancreas. Le isole comprendono anche abbondanti cellule endoteliali, fibroblasti, linfociti e macrofagi. Questa complessa organizzazione e la vitale necessità di questo micro-organo, contrastano con la loro piccolissima quantità. Nell'uomo, in condizioni di salute, il numero di isole pancreatiche stimate è di un milione per pancreas, ciò significa che la nostra sopravvivenza dipende da circa un miliardo di cellule beta. Inoltre queste cellule, tutte insieme, formano solo l'1-2% del volume di un normale pancreas di adulto (Brissova *et al.*, 2008).

1.2 Le cellule beta

Il compito principale della cellula beta completamente differenziata è la stretta regolazione dei livelli di glucosio nel sangue tramite la secrezione d'insulina nel flusso sanguigno. Questo richiede caratteristiche molecolari per rilevare il glucosio, processare e rilasciare l'insulina tramite esocitosi (Eberhard *et al.*, 2009). La comunicazione cellulare all'interno delle isole è cruciale per coordinare un appropriato rilascio d'insulina ed è in gran parte raggiunta attraverso la comunicazione mediata dalle gap – junction. Quando queste cellule entrano in contatto con concentrazioni crescenti di glucosio, reclutano le cellule B vicine e le portano ad attivarsi in modo tale che ciascuna cellula sia capace di utilizzare al meglio il glucosio (Fig2) (Meda *et al.*, 1979; Junghyo *et al.*, 2007; Kelly *et al.*, 2011). Inoltre, le interazioni cellula-cellula giocano un ruolo importante nello sviluppo e mantenimento del fenotipo della cellula beta, dal momento che l'espressione del gene dell'insulina è up-regolato nei clusters di tali cellule (Luther *et al.*, 2004).

1.2.1 La produzione dell'insulina

L'insulina è stato il primo ormone peptidico ad essere scoperto. L'insulina fu purificata e cristallizzata da Abel nell'arco di pochi anni dalla scoperta. La sua sequenza amminoacidica fu individuata da Sanger nel 1960 e questo permise sia la sintesi completa della proteina nel 1963 sia la comprensione della sua struttura tridimensionale ad opera di Hodgkin nel 1972. L'insulina è costituita da due catene peptidiche A (di 21 amminoacidi) e B (di 30 amminoacidi) legate tra loro da ponti disolfuro. L'insulina è sintetizzata come precursore caratterizzato da una singola catena polipeptidica in cui le catene A e B sono connesse tramite il peptide C (Fig. 2).

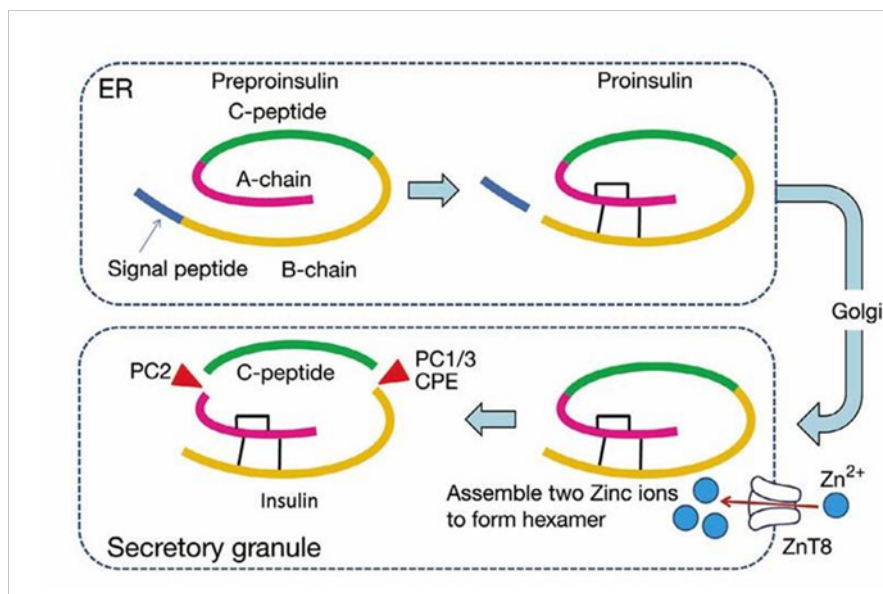


Figura 3– Rappresentazione schematica della biosintesi dell'insulina.

Lo zinco è essenziale per la stabilità strutturale della forma dell'insulina immagazzinata. Quando avviene l'esocitosi dell'insulina, lo zinco è co-secreto con essa nello spazio extracellulare e viene rilasciato dall'insulina quando raggiunge il pH più alto del sangue. Questi ioni zinco forniscono un segnale di spegnimento per il rilascio di glucagone dalle cellule alfa durante la deprivazione di glucosio per la chiusura dei canali del Potassio ATP dipendenti delle cellule α (Kawasaki *et al.*, 2012). La funzione biologica del peptide C non è nota, ma questo peptide può essere sfruttato come un utile indice della secrezione di insulina.

1.2.2 La Secrezione dell'insulina

La secrezione d'insulina è un processo finemente regolato, con l'obiettivo di assicurare concentrazioni costanti di glucosio plasmatico sia durante il digiuno sia dopo i pasti. Glucosio, amminoacidi, acidi grassi e corpi chetonici promuovono la secrezione di insulina. Il glucosio rappresenta lo stimolo principale per la secrezione. Il glucosio entra nella cellula β tramite il trasportatore GLUT-2 localizzato sulla superficie cellulare, viene fosforilato ad opera della glucochinasi e non può più uscire. La sua metabolizzazione comporta un aumento del rapporto intracellulare ATP/ADP (Kennedy *et al.*; 1999), questo implica l'inibizione dei canali del K^+ ATP sensibili e la depolarizzazione della cellula. La depolarizzazione della membrana induce l'apertura dei canali del Ca^{2+} a voltaggio dipendenti, con conseguente ingresso di Ca^{2+} .

nella cellula. L'aumento di Ca^{2+} intracellulare, attiva una serie di meccanismi che hanno come fine ultimo l'esocitosi di granuli contenenti insulina (Safayhi H et al., 1997) (Fig.4).

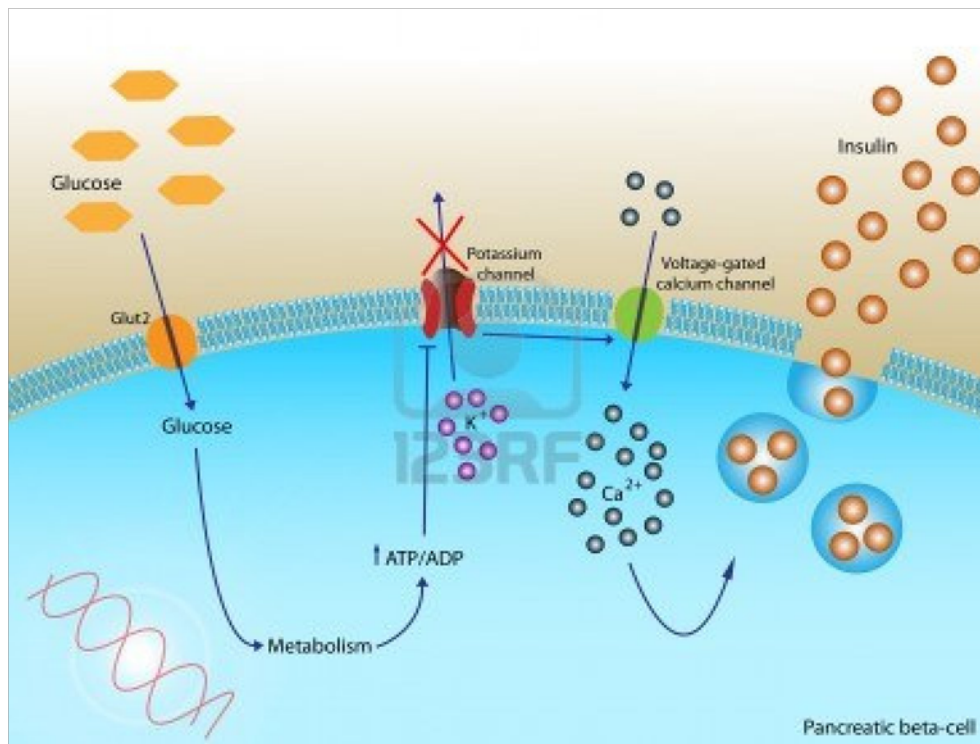


Figura 4- Rappresentazione degli eventi messi in atto dall'ingresso del glucosio nella cellula β .

L'intero processo è collettivamente indicato come "accoppiamento stimolo-secrezione". La rapida esocitosi che avviene nei primi 5-10 minuti di stimolazione è denominata *prima fase* e il successivo, meno vigoroso ma sostenuto rilascio è denominato *seconda fase* di secrezione. La seconda fase può diventare

quantitativamente molto importante, dato che può essere mantenuta fino a diverse ore se i livelli di glucosio elevati nel sangue, persistono (Henquin *et al.*, 2006). La prima fase è importante per raggiungere una concentrazione ottimale dell'insulina nell'istrstizio e per reprimere la produzione epatica del glucosio. Inoltre, la prima fase riflette l'abilità delle cellule sane di rispondere rapidamente alla variazione delle concentrazioni di glucosio. E' stato a lungo e ripetutamente riconosciuto che alterazioni nella prima fase di secrezione dell'insulina rappresentano il primo segno di disfunzione nelle cellule β nei pazienti con diabete di tipo 2.

1.3 Il Diabete

Il diabete è un'alterazione metabolica conseguente ad un calo di attività dell'insulina. In particolare, può essere dovuto ad una ridotta disponibilità di questo ormone, ad un impedimento alla sua normale azione oppure ad una combinazione di questi due fattori. La distruzione delle cellule β è alla base del Diabete di tipo 1, mentre una loro disfunzionalità è causa del Diabete di tipo 2.

Il diabete tipo 1 (DT1), che rappresenta circa il 5-10% di tutte le forme di diabete, è una malattia autoimmune caratterizzata dalla progressiva e selettiva distruzione delle cellule β con conseguente carenza insulinica e iperglicemia. Tale distruzione non avviene nelle altre linee cellulari presenti nelle isole del Langerhans, tuttavia la mancanza d'insulina causa un effetto di disinibizione sulle cellule α secernenti glucagone (Taborsky *et al.*, 1998). La distruzione delle cellule β , principalmente attraverso l'apoptosi, è la conseguenza della risposta immunitaria cellula – mediata in seguito ad infiltrazione di macrofagi e linfociti. Le citochine secrete dai macrofagi sono tossiche per le cellule β (Blandino-Rosano *et al.*, 2008); la presenza di autoanticorpi, che danno le basi per la diagnosi clinica, sono un fattore secondario (Zoka *et al.* ,2013); essi sono dosabili nel siero dei soggetti affetti e di soggetti a rischio di sviluppare la malattia: anticorpi anti-insula pancreatica (anti-ICA), anticorpi anti-insulina, anticorpi anti-GAD e anti-IA-2. E' stato proposto che la morte delle cellule β probabilmente partecipi nell'iniziare la risposta autoimmune, in modo particolare nella fase di presentazione dell'antigene (Kaminitz *et al.*, 2007). Infezioni virali o citochine infiammatorie possono indurre l'accumulo di proteine causando stress del reticolo endoplasmatico, il quale porta all'apoptosi delle cellule β (Eizirik *et al.*, 2009). Gli antigeni rilasciati dalle cellule β apoptotiche sono un segnale importante per attivare le cellule presentanti l'antigene le quali, in seguito, potrebbero raggiungere i linfonodi pancreatici ed essere riconosciute dalle cellule T. Una volta che le cellule T rincontrano gli antigeni delle isole, sono ritenute all'interno di queste innescando il processo infiammatorio (Filippi *et al.* ,2007) (Fig.5).

semplice iperglicemia. Esso infatti si associa in vario grado ad alterazioni lipidiche e aumento della pressione arteriosa, che assieme all'obesità addominale e alle alterazioni dell'omeostasi glucidica costituiscono quella che viene definita 'sindrome metabolica': patologia multifattoriale che aumenta il rischio cardiovascolare e alla cui genesi concorrono fattori genetici (a oggi in larga parte ignoti) e ambientali (bilancio energetico positivo per sedentarietà e abbondanza di cibi grassi). L' iperglicemia, anche se moderata, comporta una riduzione della biosintesi dell'insulina (glucotossicità), mentre l'aumento degli acidi grassi liberi accelera l'apoptosi delle cellule β (lipotossicità) (Abdul-Ghani *et al.*, 2013; Pinget *et al.*, 2002). Per spiegare la glucotossicità sono stati proposti numerosi meccanismi di azione che includono lo stress ossidativo (Robertson *et al.*, 2004), difetti nella secrezione d'insulina (Bertuzzi *et al.*, 1998), diminuzione dell'espressione del gene dell'insulina (Briaud *et al.*, 1999) e l'apoptosi delle cellule β (Butler *et al.*, 2003).

2.1 Meccanismo di esocitosi dell'insulina

L'insulina conservata nei granuli, viene rilasciata tramite esocitosi, un processo a più stadi che condivide molte analogie con l'esocitosi degli altri ormoni peptidici e neurotrasmettitori, in ogni caso implica la fusione, regolata dal Ca^{2+} , delle vescicole secretorie con la membrana plasmatica (Rutter *et al.*, 2006; Lang *et al.*, 1999). Generalmente i granuli sinaptici e secretori, trasportati nel citoplasma, si attaccano alla superficie più interna della membrana cellulare (docking), qui vengono processati biochimicamente, attraverso processi non ancora completamente chiariti, e infine esocitati (Kimura *et al.*, 2011). L' ancoraggio e la fusione delle vescicole con la membrana plasmatica, sono eventi mediati da un gruppo di proteine le proteine della famiglia SNARE (**S**oluble **N**SF **A**ttachment **P**rotein **R**Eceptor) (Chen *et al.*, 2011). Le cellule β contengono all'incirca 10.000 granuli secretori, di questi solo una piccola porzione (circa il 7% del totale) sono ancorati alla membrana plasmatica. Tali granuli fanno parte del 'pool' di granuli che vengono prontamente rilasciati (readily releasable pool) e sono responsabili del picco d'insulina che si rileva entro 5 minuti dall'ingresso del glucosio (prima fase di secrezione). La maggior parte dei granuli fanno parte del pool di riserva e devono subire una serie di reazioni ATP-dipendenti per diventare competenti per l'esocitosi (Brunner *et al.*, 2007), essi intervengono nella seconda fase della secrezione. Tale fase, richiede il movimento dei granuli di riserva alla membrana plasmatica e coinvolge la riorganizzazione dei filamenti di actina (actina F) del network citoscheletrico (Wang *et al.*, 2009) (Fig.6). Tale riorganizzazione ha luogo nella rete di actina F corticale grazie anche all'azione delle adesioni focali.

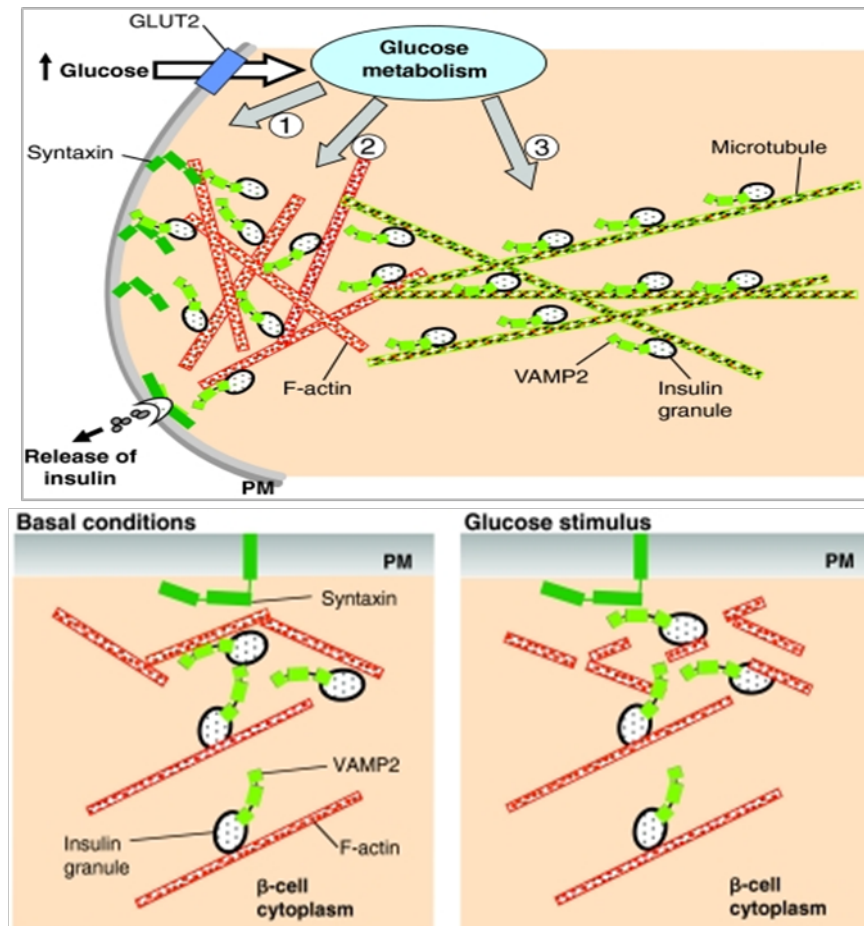


Figura 6 – a. Rappresentazione schematica della secrezione bifasica dell'insulina.
b. Rimodellamento dell'F actina indotto dal glucosio.

Il movimento di tali granuli dal citoplasma alla membrana plasmatica, avviene per traslocazione lungo i microtubuli. Tale fenomeno si verifica ad opera di una proteina motrice, la chinesina 1, che è in grado di utilizzare l'idrolisi dell'ATP, presente in grandi quantità nel citoplasma in seguito all'ingresso del glucosio, per trasportare i granuli lungo la rete micro tubulare.

2.2 Ruolo delle proteine SNARE

Le prime immagini della fusione dei granuli contenenti insulina con la membrana plasmatica, vennero pubblicate nel 1957, ma solo nel 1993 sono state chiarite le basi molecolari della fusione e secrezione delle vescicole, grazie alla scoperta delle proteine SNARE nelle cellule neuronali (Söllner *et al.* 1993). Sulla base di questi studi, ricerche condotte sulle cellule β , hanno portato alla scoperta che il complesso delle proteine SNARE è responsabile anche della secrezione delle vescicole d'insulina (Daniel *et al.*, 1999). Le proteine della famiglia SNARE, presentano una sequenza segnale con elevata potenzialità nel formare spirali avvolte. Tali proteine si trovano localizzate su membrane opposte prima della fusione e sono classificate in due sub famiglie: le v- SNARE (vesicles SNARE) associate alle vescicole e le t-SNAREs (target- SNARE) presenti sulla membrana plasmatica. Fanno parte delle v- SNARE le proteine VAMP, mentre tra le t- SNARE ci sono la famiglia delle syntaxine (syntaxina 1,2,3,e 4) e le proteine SNAP (SNAP 25 e SNAP-23). Nelle cellule β , le isoforme necessarie per la secrezione d'insulina sono Sintaxina 1, sintaxina 3, sintaxina 4, SNAP-25, SNAP 23 e VAMP-2. La sintaxina 1 è richiesta solo nella prima fase di secrezione, mentre la sintaxina 4 è necessaria in entrambe le fasi. In seguito all'ingresso del glucosio nella cellula β e il conseguente aumento di Ca^{2+} intracellulare, la v-SNARE VAMP2, interagisce specificamente con le proteine t-SNARE sintaxina e SNAP-25 (Synaptosomal-associated protein 25) durante lo spostamento delle vescicole verso la membrana, portando così le due membrane in stretta vicinanza per consentire la fusione (Sadoul *et al.*, 1995). Studi in vitro hanno dimostrato che l'interazione del complesso sintaxina-1/SNAP-25 con VAMP2 genera un fascio a spirale che può fornire sufficiente energia per guidare la reazione di fusione (Weber *et al.*, 1998) (Fig.7).

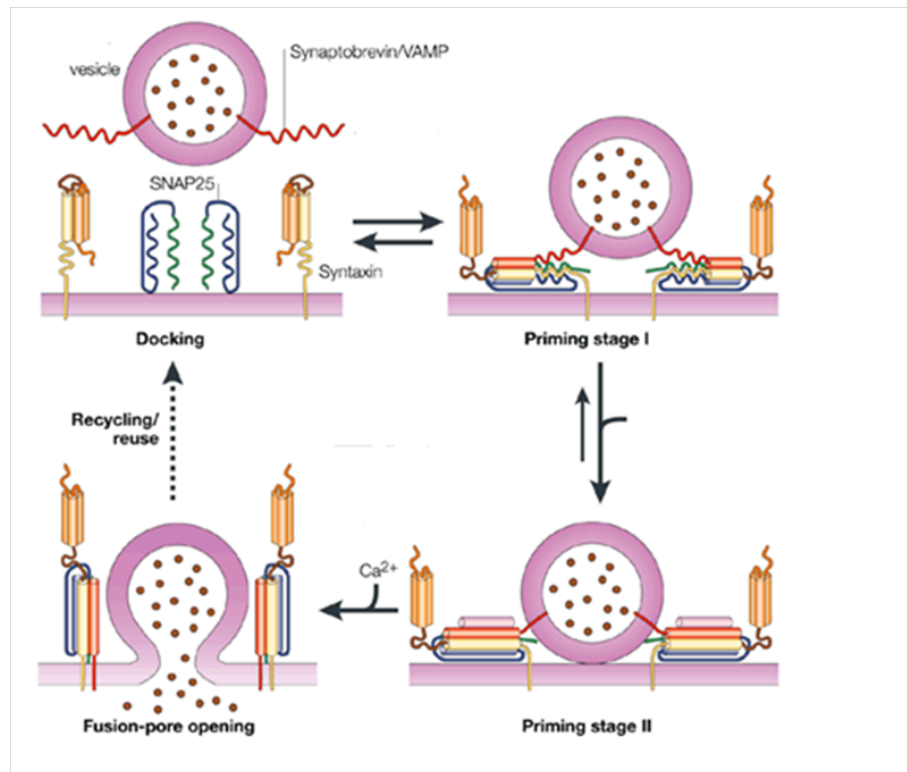


Figura 7- Ciclo di assemblaggio del complesso SNARE nell'esocitosi delle vescicole d'insulina. La sintaxina è presente in una conformazione chiusa che necessita l'apertura per dare inizio all'assemblaggio del complesso (Nucleazione). La chiusura a cerniera (zippering) del fascio di eliche porta le vescicole e la membrana plasmatica in stretta vicinanza tra loro, conducendo così alla fusione della membrana.

Nel meccanismo dell'esocitosi regolata, ulteriori famiglie di altre proteine funzionano come i regolatori SNARE, quali le proteine Sec/Munc18. Munc18-1, un membro della famiglia Munc18, si lega con alta affinità alla sintaxina-1A (Rizo *et al.*, 2002) e l'interazione di Munc18-1 con la sintaxina inibisce l'associazione di VAMP e SNAP25 con quest'ultima (Pevsner *et al.*, 1994). Nel complesso Munc18-1/sintaxina 1A, la sintaxina è in una conformazione chiusa. Il rilascio della sintaxina nella conformazione aperta sembra essere richiesto per la sua associazione con il complesso SNARE (Rizo *et al.*, 2002). Munc18-1, quindi, sembra dover essere rilasciato dalla sintaxina per la fusione. Studi recenti hanno dimostrato che munc18-1 viene fosforilato in serina dalla protein chinasi C (PKC). Nel complesso con la sintaxina, munc 18-1 non è fosforilato, l'attivazione della PKC ad opera dell'aumento

di Ca^{2+} intracellulare, porta alla fosforilazione di munc18-1 e al suo successivo distacco dalla syntaxina (Fujita *et al.*, 1996). Nel processo di fusione delle vescicole con la membrana plasmatica, riveste un ruolo molto importante l'actina F, la quale risulta associata alle proteine t- SNARE in condizioni di non stimolazione, bloccando in questo modo la formazione del complesso t-SNARE/v-SNARE.

2.3 Ruolo dell'actina F citoscheletrica

Circa 40 anni fa, l'actina F è stata riconosciuta come un regolatore dell'esocitosi. L'uso di farmaci che distruggono l'actina F, come la citocalesina, la latrunculina e di farmaci polimerizzanti come la falloidina e il jasplakinolide, ha dato prova del ruolo dell'actina F nei processi secretori in molte linee cellulari. I primi studi sulle cellule β , hanno riportato la presenza di strutture microfilamentose e della loro capacità di influenzare la secrezione di insulina. I granuli d'insulina isolati dalle cellule β , co-sedimentano con l'actina e l'aggiunta di Ca^{2+} riduce il grado di sedimentazione. Analisi ultrastrutturali hanno mostrato che l'actina F è organizzata come una fitta rete sotto la membrana plasmatica, funzionando come una barriera che impedisce l'accesso delle vescicole alla membrana stessa. Più specificamente, l'actina F risulta legata alle t- SNARE impedendo così il legame di queste con le v- SNARE presenti sulle vescicole. In seguito a stimolazione con glucosio, si assiste ad un rimodellamento delle fibre di actina senza alcuna alterazione del rapporto actina F / actina G. Tale rimodellamento permette la rottura momentanea del legame dell'actina F con le t- SNARE, permettendo così il legame alle v- SNARE (Jewell *et al.*, 2008).

2.3.1 Pathway di segnalazione del rimodellamento dell'actina

Il rimodellamento dell'actina in molti tipi cellulari, è conosciuto essere regolato dalla famiglia delle Rho GTPasi, le quali appartengono alla superfamiglia delle GTPasi correlate a Ras e includono Rho, Rac e Cdc42. Le rho GTPasi passano da uno stato inattivo in cui legano GDP ad uno attivo in cui legano GTP, grazie all'intervento di molti fattori (DerMardirossian *et al.*, 2005). Nel 1990 è stato scoperto che Cdc42 e Rac1 partecipano alla seconda fase di secrezione dell'insulina e colocalizzano con i granuli contenenti insulina. Nelle cellule β , Cdc42 è mantenuto nel citoplasma nel suo stato inattivo tramite interazione con l'inibitore di dissociazione della guanina (GDI) Caveolina-1. La Caveolina-1 lega Cdc42 presente sui granuli d'insulina del pool di riserva e il complesso trasloca immediatamente verso la membrana plasmatica dissociandosi entro tre minuti dall'ingresso del glucosio. In tal modo Cdc42 passa allo stato attivo e ciò comporta l'attivazione di Rac1 attraverso la fosforilazione di PAK1 (p21-activated kinase), portando al rimodellamento dell'actina F. La precoce attivazione di Cdc42 servirebbe a facilitare il movimento dei granuli verso la membrana plasmatica, mentre l'attivazione di PAK1 sembra essere essenziale per il rimodellamento dell'actina F (Wang *et al.*, 2007), comportando non solo l'attivazione di Rac1 ma anche della chinasi della catena leggera della miosina

(MLCK). PAK1, inoltre, risulta essere importante per l'attivazione della via Raf/MEK che porta all'attivazione di ERK, il cui ruolo nella secrezione d'insulina è risultato essere necessario (Kalwat *et al.*, 2013) (Fig.8).

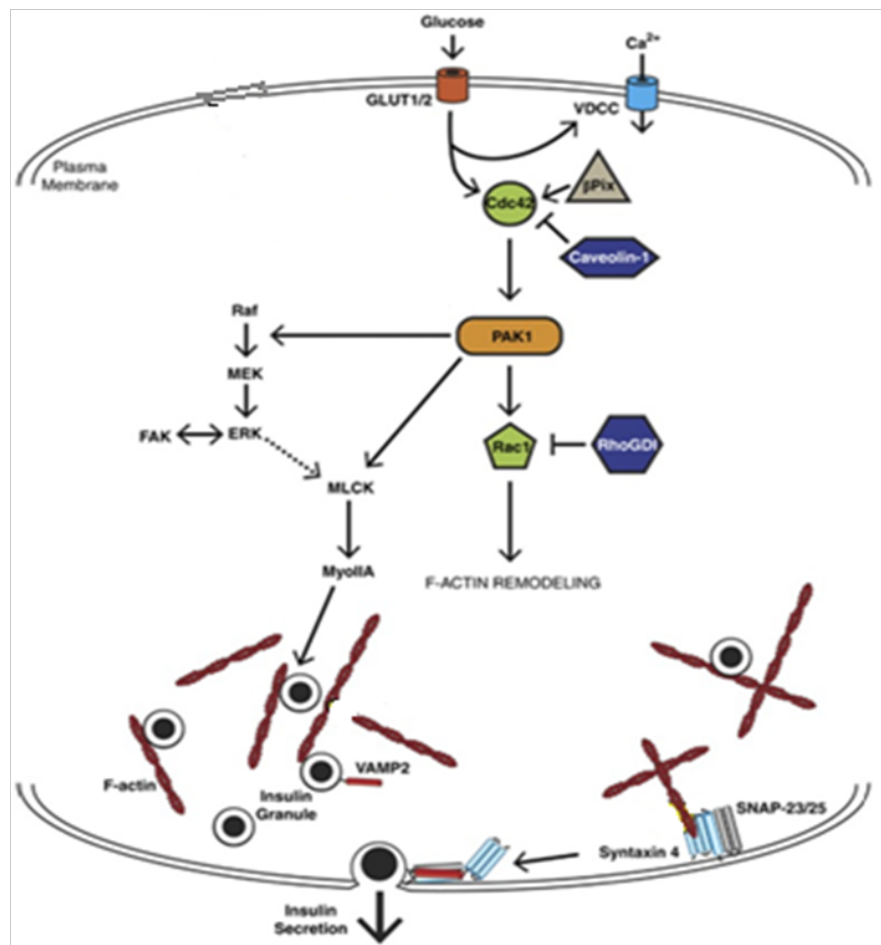


Figura 8 – Vie di segnalazione che portano al rimodellamento dell'actina F in seguito a ingresso del glucosio nelle cellule β

In seguito a stimolazione con glucosio, ERK viene attivato e trasloca parzialmente nel nucleo dove esercita effetti sulla trascrizione dell'insulina e di altre proteine, mentre una parte significativa rimane nel citoplasma (Longuet *et al.*, 2005). L'attivazione di ERK è chiaramente accoppiata all'actina citoscheletrica. È stato visto come ERK è in grado di fosforilare la sinapsina I, la chinasi della catena leggera della miosina (MLCK), la chinasi FAK e la paxillina. Sebbene la sinapsina I non ha un ruolo essenziale nella secrezione d'insulina (Wendt *et al.*, 2012), FAK e MLCK sono risultati essere fattori essenziali (Arous *et al.*, 2013). FAK è richiesto, nelle cellule β , sia per la secrezione basale che in seguito a stimolazione, e partecipa in cross-talk con ERK al rimodellamento dell'actina F. MLCK è una chinasi in grado di fosforilare la catena leggera della miosina (MLC). La miosina II non muscolare (NMII) è la principale proteina citoscheletrica che interagisce con l'actina F contribuendo così ai processi cellulari come la migrazione e l'adesione. NMII è formata da due catene pesanti (MHC), due catene leggere essenziali e due catene leggere regolatorie (MLC). NMII è regolata dalla fosforilazione diretta sia delle catene leggere che di quelle pesanti. La chinasi MLCK e la chinasi ROCK (Rho-associated coiled-coil-containing kinase) attivano NMII attraverso la fosforilazione delle catene leggere MLC, contribuendo alla polimerizzazione dell'actina F (Webb *et al.*, 2004). Nelle cellule β , la segnalazione di Rho-ROCK contribuisce alla stabilizzazione dell'actina citoscheletrica e inibisce la secrezione d'insulina (Hammar *et al.*, 2009), mentre MLCK colocalizza con i granuli d'insulina e sembra avere un ruolo positivo nella secrezione d'insulina (Arous *et al.*, 2013).

2.4 Ruolo delle Adesioni focali

L'interazione della cellula con il suo microambiente fornisce importanti segnali chimici e spaziali che contribuiscono alla regolazione di numerosi processi come lo sviluppo embrionale, la sorveglianza immunologica e l'omeostasi tissutale, attraverso la modulazione di numerose funzioni cellulari come la migrazione, la differenziazione e la proliferazione. Le principali proteine di superficie responsabili della regolazione del legame di una cellula all'ambiente esterno, sono le integrine. Le integrine sono proteine trans membrana costituite da una sub unità α e una β che insieme formano 24 distinti etero dimeri. I domini citoplasmatici delle integrine non hanno in sé attività chinasi intrinseca, per questo, in seguito all'interazione con la matrice extracellulare, si raggruppano e reclutano diversi complessi proteici intracellulari. Tali complessi macromolecolari sono stati osservati nei fibroblasti in coltura come una regione elettronica densa della membrana plasmatica, (Abercrombie *et al.*, 1971) in seguito denominata *complessi focali di adesione* o *adesioni focali*. Le adesioni focali comprendono circa 125 proteine, molte delle quali mostrano molteplici interazioni proteina-proteina (Turner *et al.*, 2000; Zaidel-Bar *et al.*, 2007). L'adesione, l'espansione e la migrazione cellulare implica, quindi, il rimodellamento delle adesioni focali che comporta la riorganizzazione delle strutture citoscheletriche e l'attivazione di numerose vie di segnalazione intracellulare. I siti di contatto focali forniscono sia un

legame strutturale tra la matrice extracellulare (ECM) e le proteine citoscheletriche sia un punto di partenza che porta a cambiamenti nell'attività cellulare e nell'espressione genica. In seguito a stimolazione con glucosio si hanno cambiamenti a livello della membrana basale delle cellule β che ricordano il rimodellamento delle adesioni focali durante la migrazione cellulare (Fig.9), assegnando quindi un ruolo cruciale nella secrezione d'insulina stimolata da glucosio, alle due proteine chiave del complesso dell'adesioni focali, FAK e Paxillina (Rondas *et al.*, 2011).

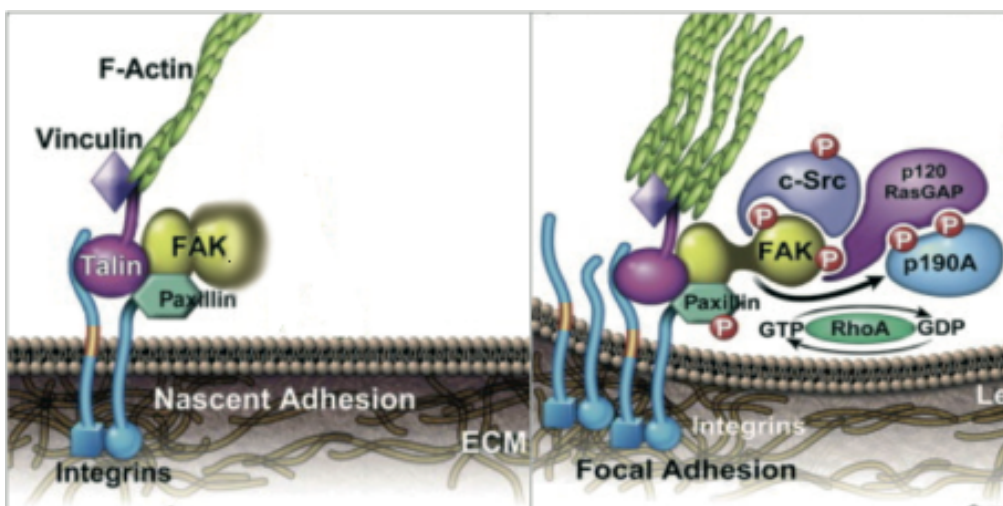


Figura 6- Rappresentazione schematica dell'attivazione delle adesioni focali in seguito a clusterizzazione delle integrine

2.4.1 FAK

La chinasi dell'adesione focale **FAK** è una proteina citoplasmatica ad attività tirosin chinasi che ha un ruolo cruciale nella segnalazione mediata dalle integrine ed è coinvolta nella progressione del ciclo, nella sopravvivenza e nella migrazione cellulare (Schaller *et al.*, 2010). Analisi strutturali e della sequenza rivelano quattro distinti domini all'interno di FAK: un dominio N terminale (FERM domain); un dominio centrale con attività tirosin chinasi; un dominio C- terminale (FAT domain) al quale si legano le altre proteine del complesso focale; e una regione tra il dominio catalitico e il dominio FAT, ricca in prolina (Fig.11).

Il dominio N terminale è importante per l'interazione con le integrine, mentre all'estremità carbossi terminale è presente un residuo in tirosina 397, che nello stato

inattivo è bloccato dal dominio FERM in modo da prevenire l'autofosforilazione di FAK (Frameet *et al.*, 2010).

Il legame con le integrine o con i fattori di crescita, attivano FAK ad auto fosforilarsi, ciò facilita il legame delle proteine Src al dominio ricco in prolina di FAK, attraverso il loro dominio SH2 (src homology 2 domains). L'associazione tra FAK e Src porta alla fosforilazione degli altri residui in tirosina presenti su FAK. Il complesso FAK/Src attivato, fosforila altre proteine associate ai complessi di adesione focale come paxillina e p130Cas e causa la riorganizzazione dell'actina F attraverso la famiglia delle Rho GTPasi (Richardson *et al.*,1997; Bellis *et al.*,1995; Webb *et al.*, 2004; Mitra *et al.*, 2005; Schaller *et al.*,1994).

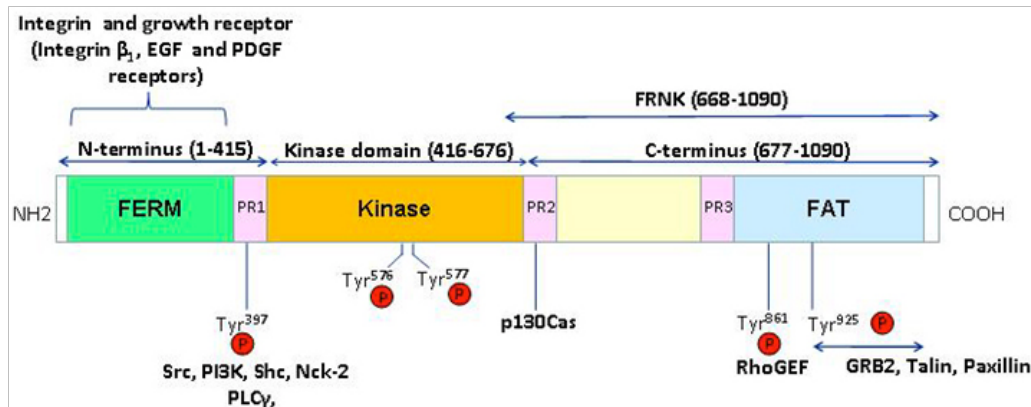


Figura 11 – Rappresentazione schematica dei domini presenti nella struttura della chinasi delle adesioni focali FAK.

2.4.2 Paxillina

La paxillina è una proteina associata alle adesioni focali che contiene numerosi siti di fosforilazione in tirosina, è priva di attività enzimatica ma contiene numerosi siti di attacco per altre proteine, fungendo in tal modo da proteina adattatrice che facilita l'assemblaggio di complessi multiproteici per coordinare la segnalazione cellulare. La paxillina contiene numerosi domini strutturali che mediano l'interazione proteina- proteina e fungono da siti di ancoraggio per le proteine del citoscheletro, le tirosin chinasi, le serine/treonine chinasi, le proteine attivatrici delle GTPasi e altre proteine adattatrici (Fig. 12). Nella regione N-terminale è presente un dominio ricco in prolina che funge da sito di legame per il dominio SH3 di altre proteine; inoltre è presente anche un motivo chiamato LD, contenente cinque copie di una sequenza peptidica in grado di legare altre proteine come FAK, vinculina e actopaxina, facenti parte delle adesioni focali. Nella regione C-terminale sono presenti 4 domini LIM che legano zinco (Schaller *et al.*, 2001). In tutta la struttura della paxillina sono presenti numerosi siti di fosforilazione in serina e tirosina, bersagli di numerose chinasi attivate in seguito a stimoli di adesione e di fattori di crescita. Tali chinasi includono: PAK, FAK-src, ERK, p38 MAP chinasi, JNK, la chinasi 5 ciclina dipendente (CDCK5) (Deakin *et al.*, 2008). Anche l'azione delle fosfatasi è essenziale nel regolare il turnover delle adesioni focali contribuendo alla loro dinamicità e alla motilità cellulare. La tirosina fosfatasi PTP-PEST lega i domini LM3 e LM4 della paxillina regolando in tal modo la sua attività (Turner *et al.*, 2000).

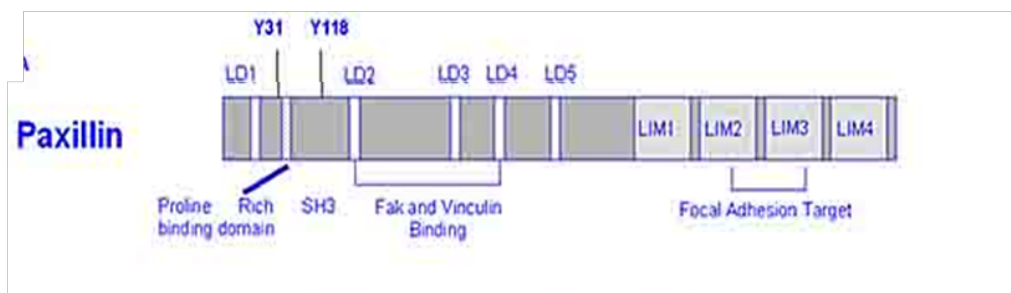


Figura 12 – Rappresentazione schematica dei domini present nella struttura della Paxillina (Turner *et al.*, 2000).

2.4.3 Il rimodellamento delle adesioni focali in seguito a stimolazione con glucosio

L'ingresso del glucosio nelle cellule β porta FAK ad attivarsi, ciò mette in moto la serie di fosforilazioni precedentemente descritte, che comportano il reclutamento di numerose altre proteine nei complessi delle adesioni focali, permettendo in tal modo l'attivazione dei pathway di segnale implicati nel rimodellamento dell'actina citoscheletrica e quindi nella migrazione e movimento cellulare. L'attivazione di FAK, consistente nella sua auto fosforilazione, favorisce il legame con le Src e, di conseguenza, la fosforilazione della paxillina. (Webb *et al.*, 2004). La paxillina così attivata consente il legame di ERK con le chinasi capaci di attivarla e cioè MEK e RAF, permettendo in tal modo l'attivazione di ERK alle adesioni focali. Questo pathway si auto potenzia, in quanto ERK attivato può ulteriormente fosforilare la paxillina aumentando il suo legame a FAK, rafforzando così la sua attivazione (Ishibe *et al.*, 2003). La fosforilazione di FAK e Paxillina è già rilevabile in condizioni basali, ma aumenta significativamente a 15 minuti dalla stimolazione con glucosio. La fosforilazione di ERK, invece, è presente già a 5 minuti. Queste differenze nei livelli di fosforilazione, confermano la presenza di un pathway aggiuntivo nell'attivazione di ERK stimolata dal glucosio. I complessi FAK-paxillina attivati localizzano insieme a ERK fosforilato con i filamenti di actina in prossimità della membrana basale (Rondas *et al.*, 2011). Inoltre, si assiste alla colocalizzazione della fosfo-paxillina con le proteine SNAP-25 e syntaxina-1, suggerendo un ruolo funzionale per le adesioni focali, nel regolare la secrezione di insulina. L'importanza di FAK e Paxillina è data anche dal fatto che l'inibizione di FAK riduce il rimodellamento delle adesioni focali e la secrezione d'insulina, bloccando il rimodellamento dell'actina indotto dal glucosio e stabilizzando l'interazione tra SNAP-25 e F-actina (Rondas *et al.*, 2012); il silenziamento della paxillina comporta una netta diminuzione della fosforilazione di ERK, della formazione dei complessi focali e della secrezione d'insulina (Rondas *et al.*, 2011).

3.1 La proteina BAG3

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 e una regione PXXP (proline-rich motifs) attraverso i quali può interagire con partner diversi da Hsp70 (Doong *et al.*, 2003; Beere , 2005) (Fig.13).

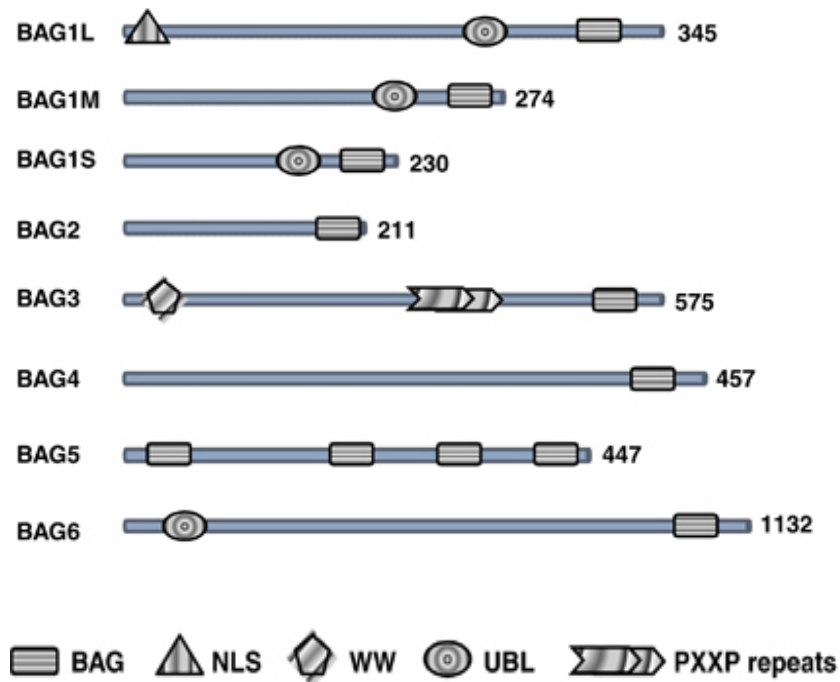


Figura 13 - La famiglia delle proteine BAG. Tutte le sei proteine BAG contengono un dominio BAG nella loro regione C terminale. Alcune proteine BAG contengono altri domini che includono il segnale di localizzazione nucleare (NLS), il dominio simil Ubiquitina (UBL), il dominio WW e uno ricco in prolina (PXXP).

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) (Fig.14).

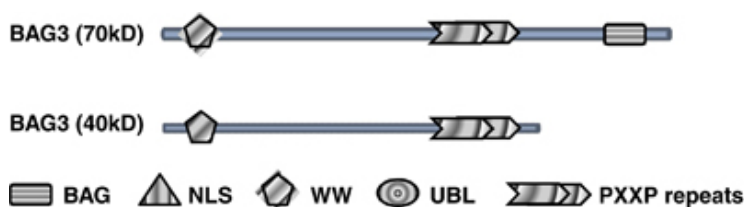


Figura 14 - rappresentazione schematica della proteina BAG3 full – length e della shorter form trovata associata ai sinaptosomi.

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 corrono come un doppietto in un Western Blot standard. 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 nelle linee cellulari umane di cancro ai polmoni (Young *et al.*; 2008). Recentemente è stata riportata anche la fosforilazione, alla serina 187, di BAG3 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; Chen *et al.*, 2004; 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 (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).

3.2 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 (Matsui *et al.*, 2007), 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 (Fig. 15).

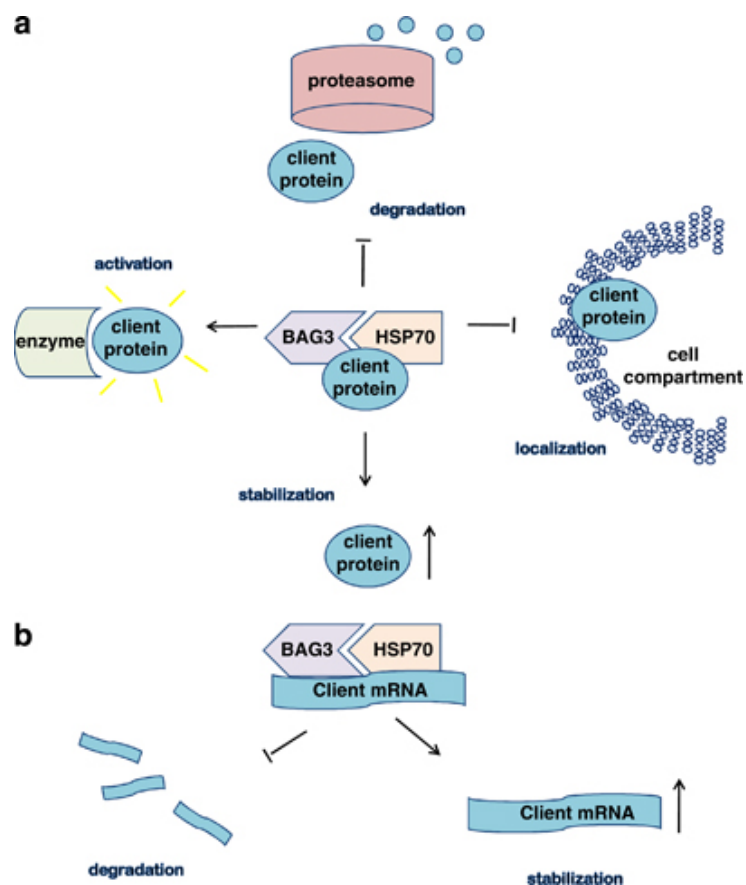


Figura 15 – Meccanismi molecolari dell'attività della proteina BAG3 su (a) proteine e (b) mRNAs (Rosati et al.,2011)

3.3 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).

Inoltre, 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.

3.4 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 come la formazione di aggregati proteici, privazione 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 subunitaria 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 Pro-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, un chaperone con importanti proprietà cardioprotettive e in grado di regolare la contrattilità dei miociti (Fan *et al.*, 2005; Dreiza *et al.*, 2010).

4.1 Scopo della tesi

La proteina BAG3 appartiene alla famiglia di co-chaperones, che interagiscono con il dominio ATPasico di hsp70 attraverso il dominio BAG. Oltre al dominio BAG, BAG3 contiene anche un dominio WW e un dominio ricco in prolina (PXXP), i quali mediano il legame a partner diversi da Hsp70 conferendo in tal modo a BAG3 la capacità di modulare i più importanti processi biologici come l'apoptosi, lo sviluppo, l'organizzazione del citoscheletro e l'autofagia (Rosati A. *et al.*, 2012). Come descritto in precedenza, la proteina BAG3 è espressa costitutivamente in miociti normali ed in alcuni tipi di cellule tumorali. Inoltre, nei nostri laboratori, abbiamo rilevato una forte espressione di BAG3, in campioni umani di pancreas normale, nelle insulae pancreatiche del Langerhans.

Lo scopo di questo progetto di dottorato è stato quello di determinare il ruolo di BAG3 nelle cellule β delle insulae del Langerhans, secernenti insulina. In primo luogo è stata verificata la presenza di BAG3 nel sistema cellulare scelto per tale studio e cioè la linea cellulare di insuloma murino β -TC 6. Tali cellule esprimono BAG3, ed in particolare la presenza di tale proteina è stata ritrovata anche nella frazione purificata dei granuli contenenti insulina.

Allo scopo di valutare un eventuale effetto della proteina BAG3 sulla secrezione d'insulina, è stato utilizzato un siRNA specifico per BAG3, capace di modulare negativamente i livelli della proteina BAG3 nelle cellule β TC 6. Dai risultati ottenuti si è evidenziato un aumento della secrezione di insulina nelle cellule dove i livelli di BAG3 sono stati silenziati sia in condizioni normali di crescita, sia in seguito alla stimolazione delle cellule con concentrazioni elevate di glucosio.

Alla luce di questi risultati, è stata quindi valutata la possibilità che BAG3 sia coinvolto nella regolazione delle interazioni delle principali proteine coinvolte nel processo di esocitosi delle vescicole d'insulina. Gli esperimenti condotti in tal senso hanno dimostrato che BAG3 interagisce sia con il complesso delle proteine delle adesioni focali FAK/ Paxillina, coinvolte nel meccanismo di rimodellamento dell'actina citoscheletrica, sia con il complesso delle proteine t-SNARE SNAP25/Sintaxina implicate nel meccanismo di fusione delle vescicole d'insulina alla membrana plasmatica.

Inoltre è stata evidenziata la specifica fosforilazione in tirosina di BAG3 da parte della chinasi FAK, in seguito ad induzione della secrezione di insulina attraverso alte concentrazioni di glucosio.

Tali risultati sembrano confermare l'ipotesi iniziale di un coinvolgimento di BAG3 nel meccanismo di secrezione dell'insulina da parte delle cellule β delle insulae del Langerhans.

4.2 Risultati e discussione

4.2.1 BAG3 è espressa nelle β TC 6 e i suoi livelli aumentano con il processo di maturazione cellulare

Allo scopo di verificare l'espressione della proteina BAG3 nella linea cellulare di insulinoma murino, β -TC 6, è stato effettuato un western blotting sui lisati cellulari. Dall'analisi western blotting è chiaramente riscontrabile la presenza della forma della proteina a 74kDa, ma anche della short form a 40kDa che è stata ritrovata essere associata ai sinaptosomi (Bruno *et al.*, 2008); inoltre risulta essere presente un'ulteriore banda a 60 kDa. Per confermare che la banda presente a 40 kDa fosse la stessa ritrovata nei sinaptosomi, è stato effettuato un western blotting sui lisati delle β -TC 6, dei sinaptosomi e delle HUVEC (Fig. 16a). Le cellule HUVEC sono state utilizzate come controllo positivo per la forma a 74kDa. Si può chiaramente osservare come la banda a 40 kDa sia presente sia nel lisato delle β -TC 6, sia nei sinaptosomi, mentre è assente nel lisato delle HUVEC.

Al fine di verificare la localizzazione cellulare di BAG3 nelle β -TC 6 sono stati effettuati esperimenti di immunofluorescenza indiretta nei quali è stato usato l'anticorpo monoclonale AC-1, capace di riconoscere la proteina BAG3, e il DAPI per evidenziare i nuclei (Fig 12 b).

Dalle immagini di immunofluorescenza risulta che la proteina BAG3 è localizzata nel citoplasma con una particolare positività al livello della membrana plasmatica.

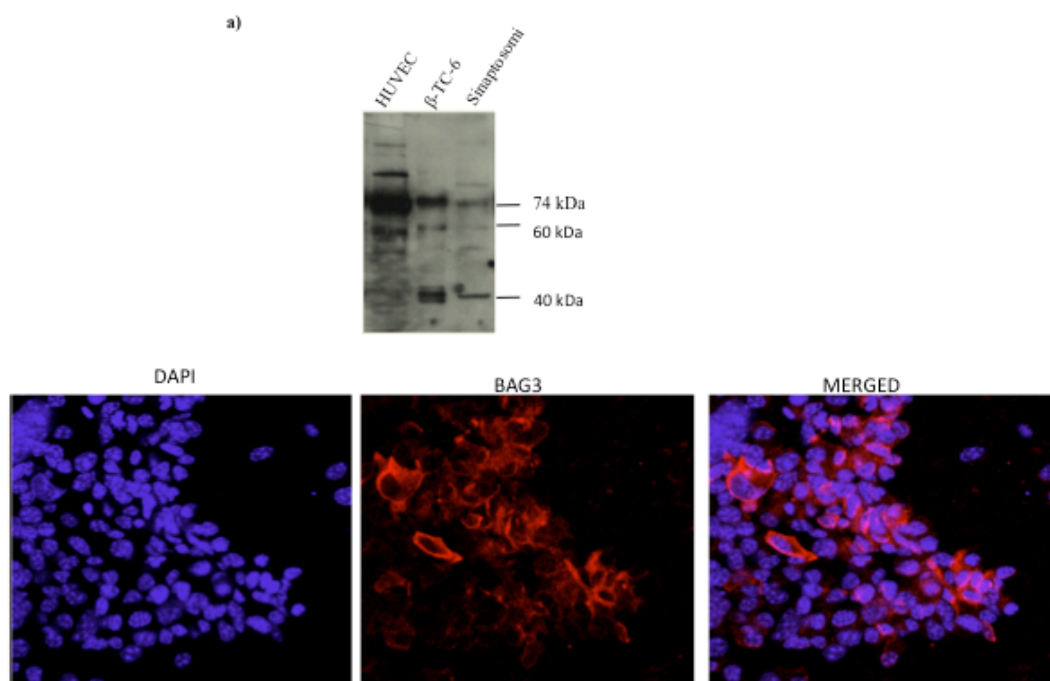


Figura 16- Espressione di BAG3 nelle cellule B TC 6. a) Analisi mediante western blot dell'espressione di BAG3 nel lisato delle β -TC 6: oltre alla banda di BAG3 a 74kDa sono presenti anche una banda a 60kDa e la banda a 40kDa ritrovata nei sinaptosomi. Il lisato dei sinaptosomi e quello delle HUVEC, dove non è presente la banda a 40kDa, conferma la specificità di tale banda. b) Le cellule β -TC 6, cresciute sui vetrini, sono state fissate e incubate con l'anticorpo anti-BAG3(rosso), i nuclei sono stati evidenziati con il DAPI. I campioni sono stati analizzati al microscopio confocale (obiettivo 60X).

In coltura le β -TC 6 tendono ad aggregarsi tra loro formando vere e proprie strutture tridimensionali. La formazione di tali clusters è fondamentale affinché tali cellule possano esercitare la loro funzione. È stato infatti visto come le interazioni intercellulari all'interno delle isole del Langerhans siano importanti per la competenza funzionale dell'isola (Luther M J *et al.*, 2009). Si è quindi deciso di verificare eventuali modificazioni nell'espressione della proteina BAG3 durante il processo di riorganizzazione in clusters di tali cellule. A tale scopo, i livelli di BAG3 e delle forme a diverso peso molecolare identificate sono state monitorate a diversi time points durante il processo di formazione dei clusters (Fig. 17).

Come si può osservare dall'analisi western blotting, l'espressione della proteina a 74 kDa aumenta notevolmente nel tempo; si osserva anche una modulazione dell'espressione della forma della proteina a 40 e 60 kDa. In particolare la forma a 40 kDa compare solo dopo 180 minuti, mentre quella a 60 kDa scompare dopo 48 ore. Ciò probabilmente accade perché a 48 ore si ha la stabilizzazione della proteina che risulta essere presente solo nella sua forma a 74 kDa e 40 kDa. La

modulazione dell'espressione di BAG3 sembra essere dovuta alla formazione degli aggregati tridimensionali e quindi alla formazione dei legami cellula – cellula.

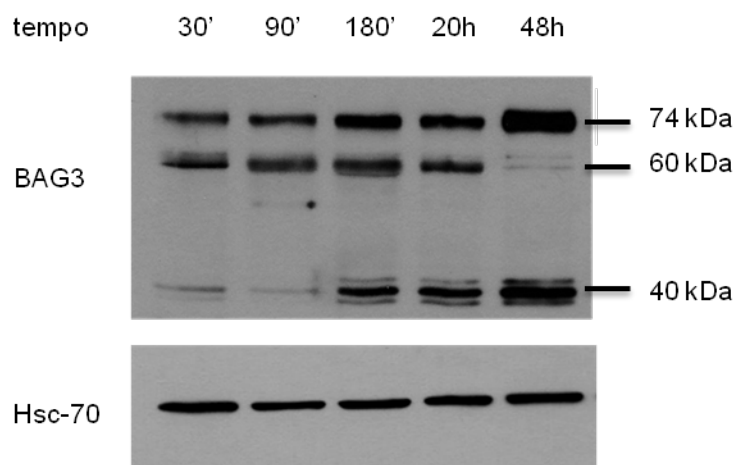


Figura 17 - L'espressione di BAG3 aumenta con il processo di maturazione delle β TC 6. Le cellule β -TC 6 sono state raccolte a diversi tempi dal piastramento (30'-90'-180'-20h-48h) e i lisati sono stati analizzati tramite western blot.

4.2.2 BAG3 è presente nella frazione dei granuli di insulina

Allo scopo di verificare un'eventuale colocalizzazione di BAG3 con le vescicole d'insulina, sono stati effettuati degli esperimenti di immunofluorescenza indiretta utilizzando l'anticorpo monoclonale AC-1, e un anticorpo anti insulina per evidenziare i granuli d'insulina. Dalle immagini di fluorescenza al microscopio confocale, si nota una forte colocalizzazione di BAG3 con l'insulina contenuta nelle vescicole (Fig.18).

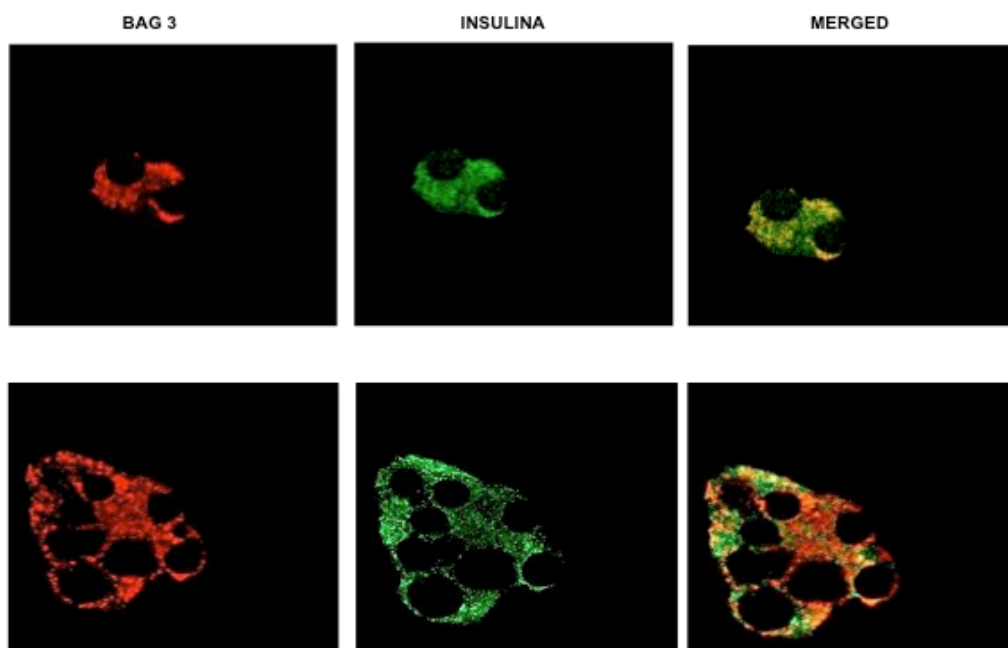


Figura 18 – BAG3 colocalizza con l'insulina presente nei granuli. Immagini al microscopio confocale (Obiettivo 60X) che mostrano la colocalizzazione di BAG3 (rosso) con l'insulina (verde) nelle cellule β TC-6. Le immagini sono rappresentative di tre differenti esperimenti.

Per confermare i dati ottenuti, è stato eseguito un esperimento di frazionamento cellulare che ha permesso di isolare i granuli di insulina, seguendo un protocollo di purificazione presente in letteratura (Brunner *et al.*, 2007). Tale protocollo prevede un frazionamento cellulare a due stadi utilizzando dapprima, un gradiente discontinuo di Nycodenz e in seguito una soluzione di Percoll al 27%. Tale metodo permette un'efficace purificazione delle vescicole contenenti insulina portando alla completa separazione di queste dalle microvescicole 'synaptic – like', le quali cosedimentano con i granuli d'insulina quando il frazionamento è effettuato utilizzando un comune gradiente di saccarosio (0,45 – 2 M) (Iezzi *et al.*, 1999). Le frazioni ottenute sono state analizzate attraverso western blotting utilizzando l'anticorpo anti-BAG3 per rilevare la presenza della proteina nelle frazioni, anticorpi anti-Calregulina per escludere la contaminazione del reticolo endoplasmatico, anti-Cromogranina come marcatore delle vescicole d'insulina e anti-sinaptofisina per evidenziare le vescicole 'synaptic – like' (Fig.19).

Dall'analisi western blotting si può notare come nella frazione contenente i granuli d'insulina, BAG3 sia presente esclusivamente nella sua forma a 60 kDa mentre in tutte le altre frazioni è presente anche la forma a 74 kDa.

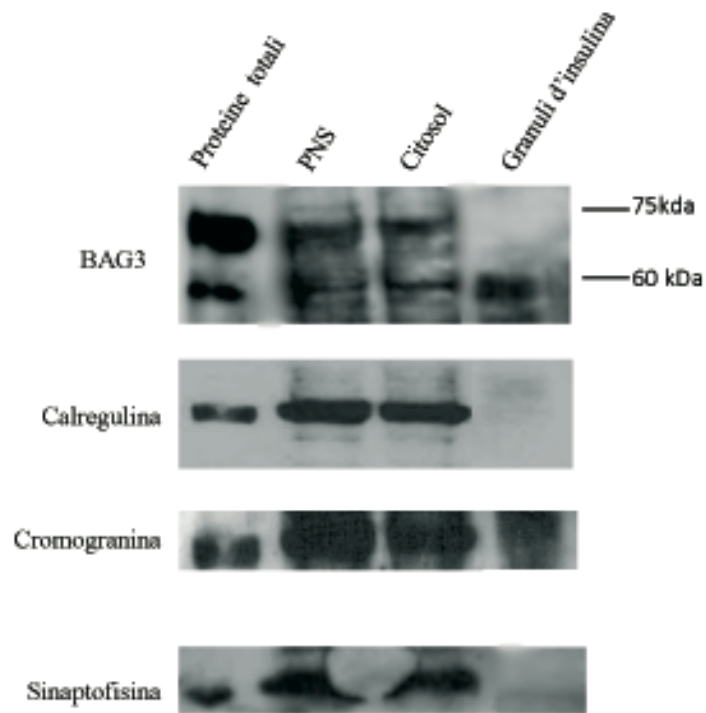


Figura 19 – BAG3 è presente nella frazione purificata dei granuli d'insulina. Analisi western blotting del lisato totale (LT), del post nuclear surnatant (PNS), del citoplasma (C) e dei granuli secretori d'insulina.

4.2.3 Il silenziamento di BAG3 causa un aumento della secrezione d'insulina

Al fine di determinare se l'espressione di BAG3 incide sulle funzioni delle cellule β , le β -TC 6 sono state trasfettate con il siRNA (small interfering RNA) specifico di BAG3 verificando in seguito eventuali variazioni nei livelli e nella secrezione dell'insulina. L'analisi western blotting dei lisati ottenuti dalle cellule trattate per 48h con il siRNA di bag3 o con il non-target siRNA (NTsiRNA), mostra una riduzione dell'espressione dell'insulina intracellulare nelle cellule silenziate rispetto al NTsiRNA (siRNA vs NTsiRNA * $p < 0,05$) e alle cellule di controllo (siRNA vs Ctr ** $p < 0,01$) (Fig.20.a,b).

Per verificare l'effetto del silenziamento di BAG3 sulla secrezione d'insulina stimolata da glucosio, è stato effettuato un test ELISA sui surnatanti delle β -TC 6, raccolti a 15, 30 e 60 minuti dopo stimolazione con glucosio. La secrezione d'insulina sembra aumentare a partire da 15 minuti dalla stimolazione nelle cellule trattate con il siRNA di bag3, rispetto alle cellule di controllo (bag3siRNA vs Ctr * $p < 0,05$) o trattate con il NTsiRNA (bag3siRNA vs NTsiRNA * $p < 0,05$), e raggiunge un massimo a 60 minuti dalla stimolazione (bag3siRNA vs Ctr *** $p < 0,001$; bag3siRNA vs NTsiRNA *** $p < 0,001$)(Fig20c). Probabilmente la diminuzione del contenuto di insulina intracellulare, in seguito a silenziamento di BAG3, si verifica perché si ha un aumento della sua secrezione.

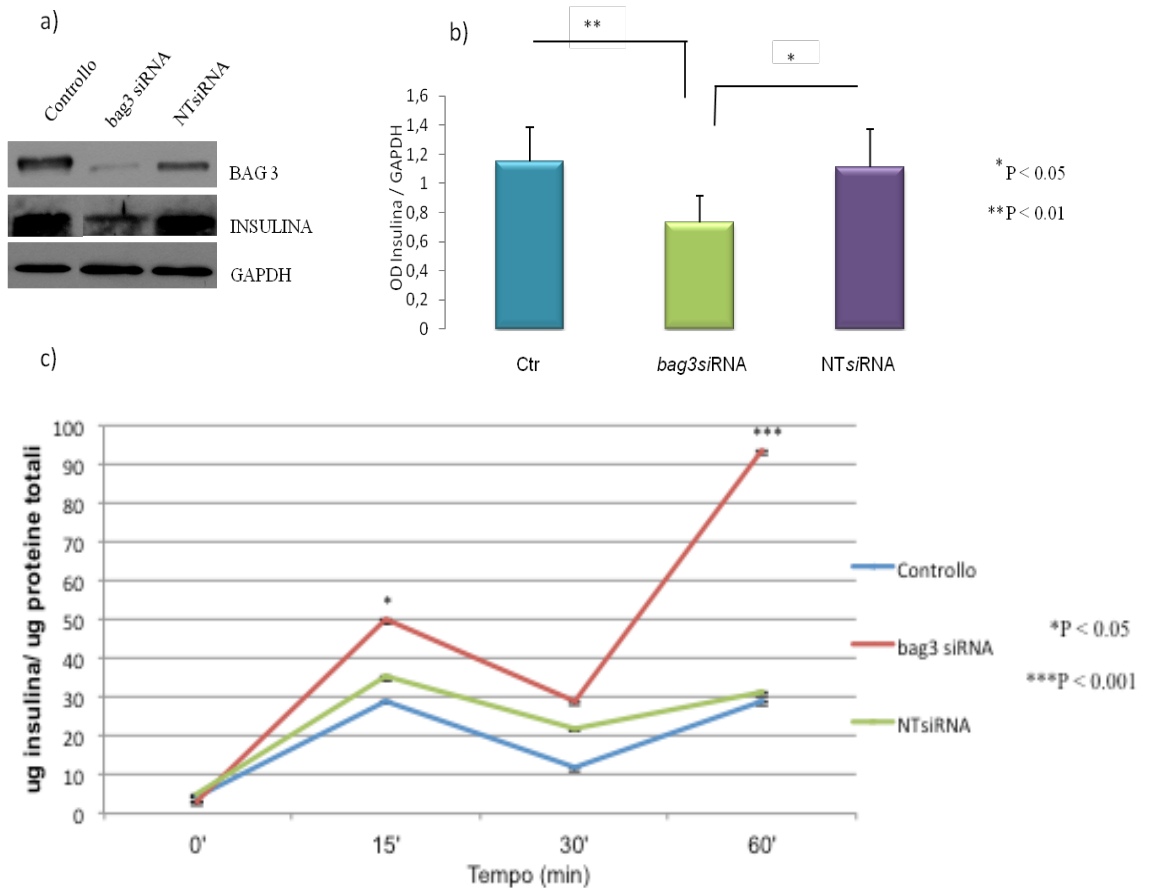


Figura 20 – Il silenziamento di BAG3 riduce l'espressione dell'insulina intracellulare e aumenta la quantità di quella secreta. a). Analisi western blot e b). Analisi densitomerica dell'espressione dell'insulina in cellule di controllo e trattate con il bag3 siRNA o con NTsiRNA c). Analisi dei livelli di insulina secreta in seguito a stimolazione con glucosio 25 M per 15, 30 e 60 minuti in cellule trattate con il siRNA di bag3. La secrezione è stata valutata mediante test ELISA (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Studi in letteratura riportano un aumento dei livelli di insulina secreta nelle cellule trattate con la Latrunculina B, un potente agente sequestrante che lega i monomeri di actina e converte l'actina F in actina G, impedendo in tal modo la

polimerizzazione dell'actina. L'aumento della secrezione d'insulina che si verifica è dovuto al fatto che la depolimerizzazione dell'actina F indotta dalla latrunculina, consente un flusso di granuli d'insulina alla membrana plasmatica anche in assenza dello stimolo dato dal glucosio (Jewell *et al.*, 2008; Thurmond *et al.*, 2003). Pertanto, allo scopo di verificare l'ipotesi di una diretta regolazione da parte di BAG3 sulla secrezione di insulina si è proceduto nell'analizzare l'impatto della proteina BAG3 sulla depolimerizzazione dell'actina citoscheletrica. A tal proposito sono stati effettuati esperimenti di immunofluorescenza usando la falloidina coniugata a TRITC per rivelare le fibre di actina. Nelle cellule di controllo lo scheletro di actina risulta essere intatto, dopo 15 minuti di stimolazione con glucosio si assiste ad una redistribuzione delle fibre di actina in quanto il glucosio comporta una depolimerizzazione dell'actina (Jewell *et al.*, 2008). Stesso andamento si ha nelle cellule trattate con il NTs/RNA. Nelle cellule trattate con il *bag3* siRNA, invece, si ha una netta scomparsa del segnale della falloidina sia in condizioni basali sia dopo 15 minuti di stimolazione con glucosio (Fig. 21). Tale risultato dimostra che il silenziamento di *bag3* induce fortemente la depolimerizzazione dello scheletro di actina, e questo si riflette nell'aumento della secrezione d'insulina.

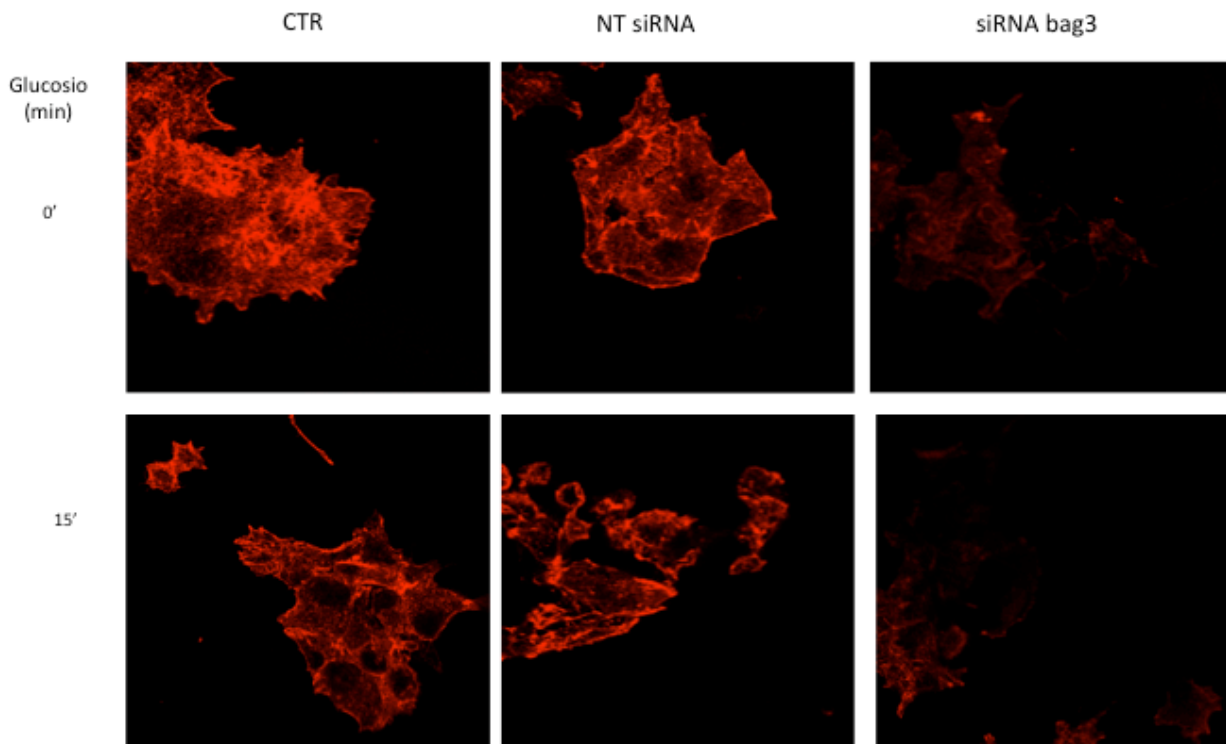


Figura 21 - Depolimerizzazione dell'actina indotta dal siRNA di bag3. Le cellule β TC 6 di controllo e trattate con il bag3siRNA o NT siRNA, sono state stimulate con glucosio per 15 minuti, fissate e incubate con Falloidina TRITC alla concentrazione di 1 μ g/ml. I campioni sono stati analizzati al microscopio confocale (obiettivo 60X). Le figure sono rappresentative di una serie di immagini ottenute da due esperimenti indipendenti.

Nel rimodellamento dello scheletro di actina indotto dal glucosio, ha un ruolo importante anche l'attivazione di ERK1/2 il quale va ad agire sul rimodellamento delle adesioni focali (Rondas *et al.*, 2011) e in particolare sulla Miosina attivando la chinasi della sua catena leggera (Cai *et al.*, 2012; Lida *et al.*, 1995). La fosforilazione di ERK, e quindi la sua attivazione, aumenta già a 5 minuti dall'ingresso del glucosio (Rondas D *et al.*, 2011; Benes *et al.*, 1999; Khoo *et al.*, 2003). Dal momento che è stata riportata una regolazione della fosforilazione di ERK1/2 da parte di BAG3, il cui silenziamento comporta un aumento della fosforilazione di tale chinasi (Falco *et al.*, 2012), è stato ipotizzato che l'effetto della distruzione dell'actina mediato dal siRNA di bag3 fosse dovuto in parte ad un'attivazione persistente di ERK1/2. A questo scopo, si è proceduto con l'effettuare un western blotting sui lisati di cellule in cui BAG3 è stato silenziato e lo stato di fosforilazione di ERK1/2 è stato verificato. Dall'analisi western blotting (Fig. 22) si nota che nei lisati delle cellule in cui BAG3 è stato silenziato, si assiste alla fosforilazione di ERK1/2 già in condizioni basali rispetto alle cellule trattate con il siRNA di controllo. Tale differenza è rilevabile in seguito a stimolazione con alte concentrazioni di glucosio (*bag3*siRNA15' vs NTsiRNA 15' * $p < 0,05$) ERK1/2, infatti, risulta essere fosforilato in quantità maggiore nei campioni silenziati rispetto a quelli di controllo.

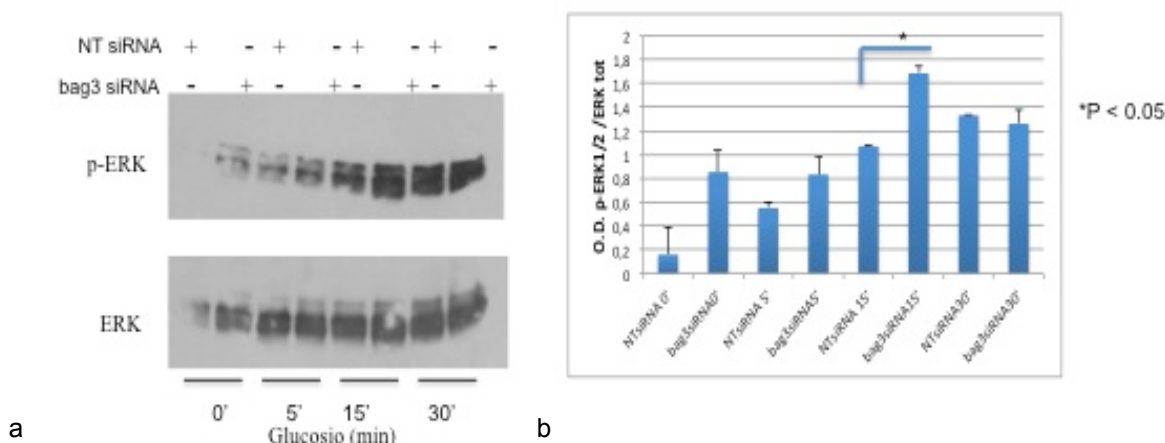


Figura 22 – Il silenziamento di BAG3 aumenta i livelli di fosforilazione di ERK. a) Analisi mediante Western blot dei livelli di fosforilazione di ERK in cellule trattate con NTsiRNA o bag3siRNA. b) Analisi densitometrica dell'espressione di p-ERK.

4.2.4 La proteina BAG3 interagisce con il complesso delle adesioni focali FAK/Paxillina

La formazione delle adesioni focali è essenziale per la secrezione d'insulina stimolata da glucosio. La fosforilazione di FAK è il punto di partenza per l'attivazione delle altre proteine del complesso focale, come la Paxillina, in grado di portare alla formazione di complessi multiproteici che dirigono la polimerizzazione dell'actina citoscheletrica (David *et al.*, 2004; Rondas *et al.*, 2011). La paxillina è una proteina priva di attività chinasi intrinseca definita 'proteina adattatrice' per la sua capacità di legare numerose proteine facilitando l'assemblaggio di complessi multiproteici. In linea con un modello in cui la paxillina interagisce con i suoi partner proteici attraverso sequenze conservate conosciute come PBS (Paxillin binding subdomain) (Schaller. *et al.*, 1994; Nikolopoulos. *et al.*, 2000), è stato possibile identificare una sequenza PBS all'interno della sequenza di BAG3 (aa 212-222). L'allineamento della sequenza PBS di BAG3 con quello di altre proteine che legano la paxillina come vinculina, FAK e actopaxina, ha rivelato una similarità tra queste proteine (Figura 23a.).

Per verificare l'interazione di BAG3 con la paxillina nelle β -TC 6, sono stati effettuati esperimenti di co-immunoprecipitazione. A tale scopo, le cellule sono state stimulate con glucosio alla concentrazione di 25 mM per 5, 15 e 30 minuti. I lisati totali sono stati incubati con l'anticorpo monoclonale anti paxillina o con le IgG di controllo. Gli immunoprecipitati sono stati analizzati per western blotting e rilevati con l'anticorpo anti-BAG3. Dall'analisi western blotting risulta che BAG3 è legato alla paxillina già in condizioni basali, tale legame viene perso dopo 15 minuti dalla stimolazione con glucosio per poi ricomparire nei successivi 30 minuti (Figura 23c).

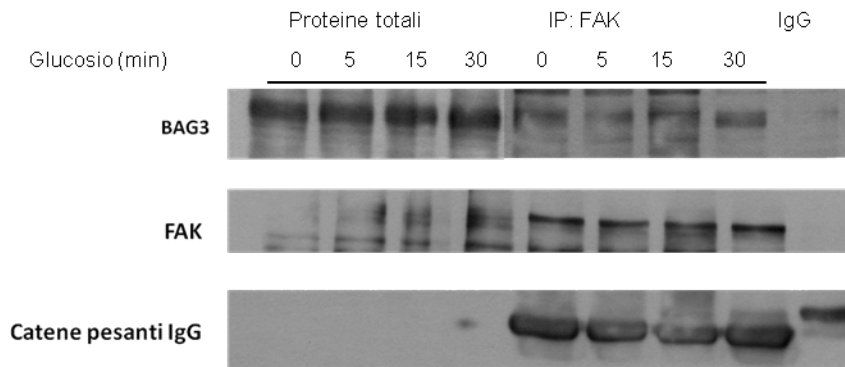
In seguito si è analizzato anche il legame tra BAG3 e FAK utilizzando le medesime condizioni utilizzate per la co-immunoprecipitazione tra BAG3 e paxillina. Dall'analisi western blotting risulta che BAG3 lega anche FAK e che tale legame aumenta a 15 e 30 minuti dalla stimolazione con alte concentrazioni di glucosio (Figura 23b).

a)

PBS sequence

Aa(273-290)	Actopaxin	KHLNKLNLEVTELETQFA
Aa(952-969)	Vinculin	KDIAKASDEVTRLAKEVA
Aa(919-936)	FAK	RSNDKVYENVTLGLVKAVI
Aa(222-233)	BAG3	SIPVIHEQNVTRPAAQPS

b)



c)

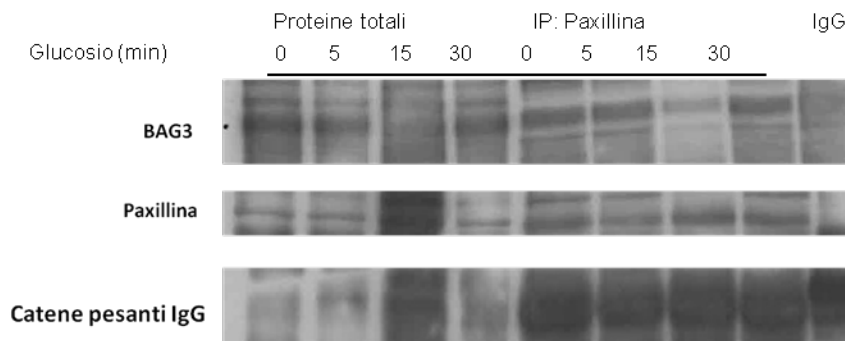


Figura 23 – BAG3 interagisce con il complesso delle adesioni focali FAK/ Paxillina. a) Sequenze PBS in actopaxina, Vinculina, FAK e BAG3. Analisi mediante Western blot dell'immunoprecipitato da estratti di cellule β TC-6 utilizzando l'anticorpo anti-FAK (b) e anti-Paxillina (c). L'immunoprecipitato con IgGs di mouse è stato utilizzato come controllo negativo.

4.2.5. BAG3 interagisce con il complesso SNAP-25/Sintaxina intervenendo nel meccanismo di fusione dei granuli alla membrana plasmatica

L'esocitosi dei granuli d'insulina richiede il legame delle proteine v-SNARE presenti sulla loro superficie, alle proteine t- SNARE presenti sulla membrana plasmatica. L'interazione tra queste proteine è preceduta dalla formazione del complesso tra le due proteine t- SNARE, sintaxina e SNAP-25. La sintaxina è una proteina transmembrana, che in condizioni basali è presente in una conformazione chiusa. SNAP-25, invece, manca del dominio transmembrana, ma è ancorato alla membrana plasmatica. In seguito a stimolazione con glucosio, la sintaxina passa alla sua conformazione 'aperta' consentendo il legame a SNAP-25. Il complesso sintaxina/ SNAP-25 può così legare la proteina v-SNARE, VAMP-2, permettendo l'ancoraggio delle vescicole alla membrana. L'aumento del calcio intracellulare dovuto alla metabolizzazione del glucosio, consente la fusione delle vescicole alla membrana e l'esocitosi dell'insulina nello spazio extracellulare. Le proteine dei complessi t- SNARE/ v- SNARE colocalizzano con le adesioni focali e ERK1/2 in seguito a stimolazione con glucosio, inoltre si ritrovano nella frazione purificata dei granuli d'insulina. (Regazzi *et al.*, 1995; Sadoul *et al.*, 1995; Rizo *et al.*, 2002; Nagamatsu *et al.*, 1996). Considerata l'interazione di BAG3 con le proteine dei complessi focali e la sua colocalizzazione con i granuli contenenti insulina, si è verificata un'eventuale colocalizzazione di BAG3 con il complesso delle proteine SNARE. SNAP-25 e sintaxina sono state immunoprecipitate dai lisati delle β -TC 6 in condizioni basali e in seguito a stimolazione con alte concentrazioni di glucosio, analogamente a quanto fatto per verificare il legame di BAG3 con FAK e Paxillina. Gli immunoprecipitati sono stati rivelati attraverso immunoblotting utilizzando un anticorpo policlonale anti BAG3. I risultati ottenuti mostrano che BAG3 lega SNAP-25 già in condizioni basali, tale legame aumenta a 5' da stimolazione con glucosio per poi scomparire nei successivi 15 e 30 minuti, per contro il legame alla sintaxina persiste per tutto il tempo della stimolazione (Fig. 24).

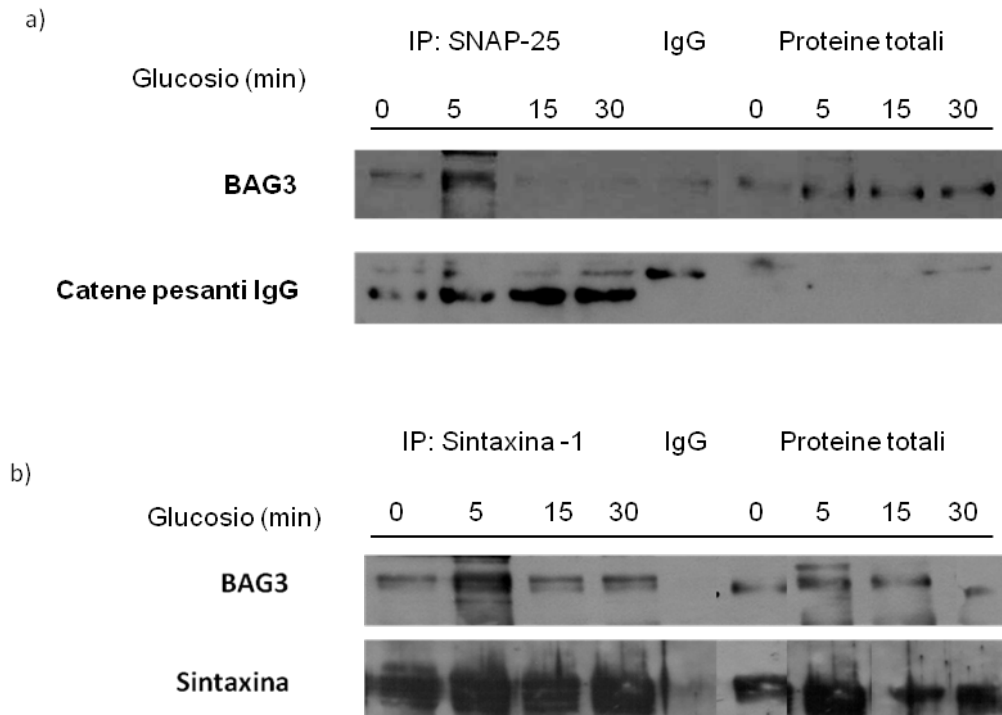


Figura 24 – BAG3 interagisce con il complesso SNAP-25/ Sintaxina. Analisi mediante Western blot dell'immunoprecipitato da estratti di cellule β -TC-6 utilizzando l' anticorpo anti-SNAP-25 e b) anti-Sintaxina -1. L'immunoprecipitato con IgGs di mouse è stato utilizzato come controllo negativo.

Il fatto che BAG3 risulta essere legata sia a SNAP-25 sia a sintaxina in condizioni basali, e che il legame a SNAP25 viene perso dopo 5 minuti di stimolazione, si potrebbe ipotizzare che BAG3 ostacoli la formazione del complesso SNAP25/ Sintaxina quando il meccanismo di secrezione dell'insulina non è attivato. Quando invece, concentrazioni alte di glucosio attivano tale meccanismo, BAG3 si dissocia da SNAP25 consentendo il legame di questo con la Sintaxina. Tale ipotesi spiegherebbe anche il perché dell'aumento della secrezione quando bag3 è silenziato, se infatti bag3 non è presente non può fare da barriera alla formazione del complesso v-SNARE, che quindi risulta essere sempre attivato, comportando una continua esocitosi dei granuli. A ciò si aggiunge l'aumento dello stato di attivazione di ERK e l'eccessiva depolimerizzazione dell'actina citoscheletrica che si verificano silenziando bag3. Nel complesso questi eventi, contribuiscono all'aumento della secrezione d'insulina.

4.2.6 BAG3 è fosforilato in tirosina in seguito a stimolazione con glucosio e tale fosforilazione sembra essere regolata da FAK

Come precedentemente descritto, l'ingresso del glucosio nelle cellule β innesca una serie di fosforilazioni che mediano l'attivazione di numerose proteine coinvolte nel meccanismo di secrezione. Considerando che il legame di BAG3 alla proteina SNAP-25 viene perso in seguito a stimolazione con glucosio, si è verificato se il segnale responsabile della dissociazione da tale proteina, potesse essere quello di una eventuale fosforilazione. BAG3, infatti, contiene nella sua sequenza numerosi possibili siti di fosforilazione in serina e 10 siti in tirosina. Si è quindi proceduto ad analizzare una possibile fosforilazione di BAG3 in seguito al trattamento con glucosio. A tale scopo, le proteine fosforilate sono state purificate attraverso cromatografia per affinità. L'esperimento è stato condotto utilizzando i lisati delle β -TC 6 stimulate con alte concentrazioni di glucosio per 15 minuti. I lisati sono stati caricati sulle colonnine cromatografiche e le frazioni ottenute sono state analizzate tramite western blotting. L'espressione di BAG3 è stata valutata utilizzando un anticorpo policlonale che riconosce l'intera proteina. L'efficienza della purificazione è stata verificata utilizzando un anticorpo anti- p-ERK1/2 che risulta essere solo nella frazione delle proteine fosforilate, e un anticorpo anti GAPDH per il controllo delle frazioni delle proteine non fosforilate. Dall'analisi western blotting delle frazioni purificate si evince che BAG3 è presente nella frazione delle proteine fosforilate e tale presenza aumenta in seguito a trattamento con glucosio(Fig. 25).

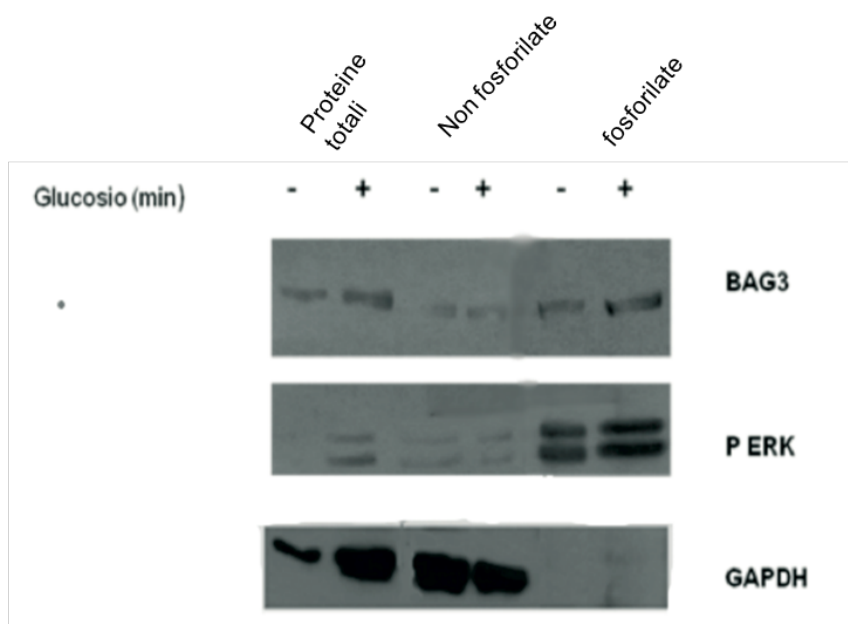


Figura 25 – BAG3 è presente nella frazione delle proteine fosforilate. Analisi western blot delle frazioni purificate delle proteine non fosforilate e fosforilate dai lisati delle β -TC 6 stimulate con Glucosio 25 mM per 15 minuti. L'ibridazione con un anticorpo anti p-ERK e anti GAPDH confermano la purificazione delle frazioni.

Il kit di purificazione, utilizzato, non permette però di discernere tra le proteine fosforilate in serina/treonina da quelle fosforilate in tirosina. Quindi è risultato necessario comprendere su quali siti BAG3 venisse fosforilato. Sulla base delle evidenze fin qui mostrate, ed in particolare sulla base dell'interazione fisica ritrovata tra BAG3 a FAK, quest'ultima una chinasi in grado di fosforilare le proteine esclusivamente sui loro siti in tirosina, si è andati a verificare se la proteina BAG3 presentasse fosforilazioni in tirosina e se tale fosforilazione veniva selettivamente abolita in seguito al trattamento delle cellule con l'inibitore di FAK (Y15). La proteina BAG3 è stata quindi immunoprecipitata e la fosforilazione in tirosina è stata rilevata per western blotting utilizzando un anticorpo anti fosfo-tirosina. Dall'analisi degli immunoprecipitati risulta che tale fosforilazione in tirosina è presente sia per la forma al peso molecolare di 74 kDA sia per quella a 40 kDA e che tale fosforilazione aumenta con l'esposizione delle cellule ad elevate concentrazioni di glucosio, tale aumento, però, non è presente in seguito a trattamento con Y15 (Fig. 26).

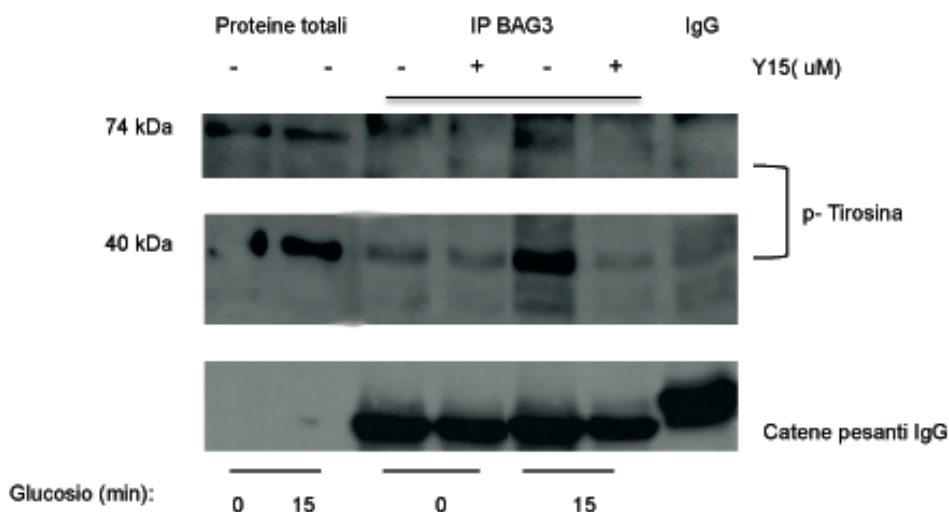


Figura 26 – L'aumento della fosforilazione in tirosina di BAG3 in seguito a glucosio non si verifica con l'inibitore di FAK (Y15). Analisi mediante Western blot dell'immunoprecipitato da estratti di cellule β -TC 6 trattate o no con l'inibitore Y15 (1microM) e il glucosio per 15 minuti utilizzando l' anticorpo anti-BAG3, rilevato con l'anticorpo anti – fosfo tirosina. L'immunoprecipitato con IgGs di mouse è stato utilizzato come controllo negativo.

Questi risultati hanno portato ad ipotizzare che il legame di BAG3 a FAK sia necessario per la sua fosforilazione e per la sua dissociazione dalla proteina SNAP25, permettendo in tal modo la secrezione d'insulina in seguito a stimolazione con glucosio. In letteratura è riportato che l'inibizione di FAK comporta una diminuzione della secrezione d'insulina, uno dei meccanismi coinvolti nella regolazione di tale fenomeno potrebbe essere legato all'inibizione della fosforilazione di BAG3, quest'ultima persiste quindi nella sua forma legata a SNAP25 bloccando così la formazione del complesso syntaxina/SNAP25 e la successiva fusione delle vescicole alla membrana plasmatica.

5.1 Conclusioni

In questa tesi è stato studiato il ruolo della proteina BAG3 nelle cellule β delle isole del Langerhans, in particolare nel meccanismo di secrezione dell'insulina.

I risultati confermano la presenza di BAG3 nelle cellule β e una sua colocalizzazione con le vescicole contenenti insulina. Inoltre BAG3 sembra essere coinvolta nel processo di riorganizzazione di tali cellule in clusters processo che risulta essere fondamentale per la funzionalità delle cellule β .

I risultati dimostrano, inoltre, un coinvolgimento di BAG3 nel meccanismo di secrezione dell'insulina. Tale coinvolgimento sembra operare su più fronti (Fig.27) infatti:

- 1) BAG3 regola il meccanismo di polimerizzazione/depimerizzazione dell'actina agendo sullo stato di fosforilazione di ERK.
- 2) BAG3, interagisce con i principali complessi proteici implicati nella secrezione di tale ormone. Si è dimostrata infatti l'interazione di BAG3 sia con il complesso delle proteine delle adesioni focali FAK e Paxillina sia con il complesso delle proteine t-SNARE SNAP25/ Sintaxina responsabili della fusione dei granuli di insulina con la membrana plasmatica.. In particolare, interagendo con quest'ultimo, sembra regolare la sua formazione in risposta all'attivazione del meccanismo di secrezione dell'insulina. La fosforilazione di BAG3 da parte di FAK, potrebbe essere il segnale che consente a BAG3 di regolare l'interazione di SNAP25 con la sintaxina e consentire così il rilascio di insulina dalle cellule.

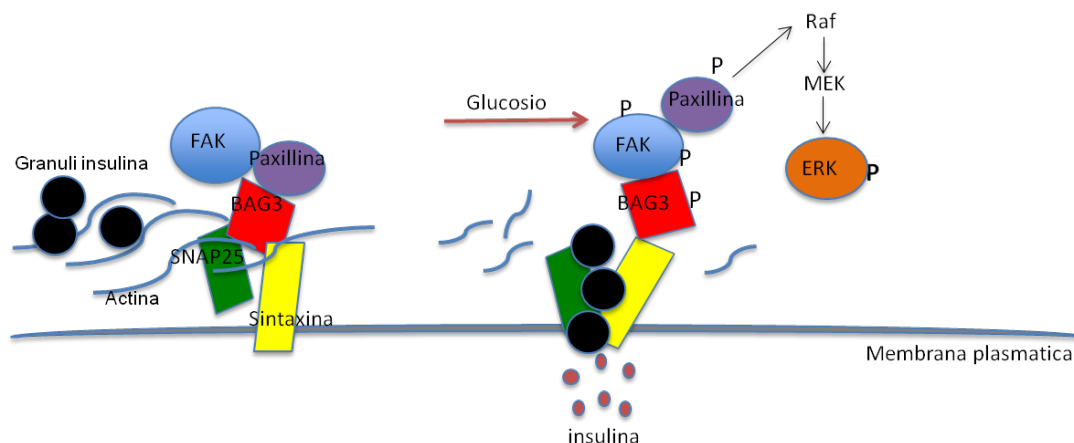


Figura 27 –Ipotesi di meccanismo di azione di BAG3. L'immagine mostra il ruolo di BAG3 nell'esocitosi dell'insulina in base ai dati riportati nella presente tesi.

6.1 Colture cellulari

Gli esperimenti sono stati condotti sulla linea cellulare delle cellule β delle insulae di Langerhans murina β -TC-6, acquistata dall'Istituto Zooprofilattico sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna (IZSLER). Le cellule sono state mantenute in coltura continua utilizzando DMEM a diversa concentrazione glucosio (25mM, 11.5mM, 2.8mM) contenente 10% di siero fetale bovino (FBS), penicillina (100 unità/ml), streptomicina (100 unità/ml), a 37°C ad un'atmosfera controllata al 5% di CO₂.

6.2 Anticorpi e altri reagenti

Gli anticorpi anti insulina, anti FAK, anti p-FAK (Tyr 397), anti calregulina, anti GAPDH, paxillina(C-1), anti- Cromogranina A (H300), anti ERK, anti p-ERK, anti Hsc-70, anti Cromogranina, sono acquistati dalla Santa Cruz Biotechnology, inc.; gli anticorpi anti SNAP 25 (mouse monoclonale) e anti syntaxina 1-A (rabbit policlonale) da Synaptic System; anti SNAP-25 (C-term) (Rabbit policlonale) e Syntaxina (Mouse monoclonale) da Antibodies online; Anti sinaptofisina da Millipore; anti p-Tirosina da Cell Signaling. Gli anticorpi anti-BAG3 policlonale (TOS2) e monoclonale AC-1 sono stati acquistati da BIONIVERSA s.r.l.

L'inibitore di FAK 1,2,4,5-benzenetetraammine tetrahydrochloride (Y15) è stato acquistato da Sigma-Aldrich. Per visualizzare l'F actina è stata usata la Falloidina coniugata a TRITC, acquistata da Sigma-Aldrich. Il kit per la purificazione delle proteine fosforilate è stato acquistato da QIAGEN.

6.3 Western blot

Le cellule sono state lavate con PBS 1X e raccolte nel buffer Nonidet P-40 (25mM Tris, pH7.4, 1% Nonidet P-40, 10% glicerolo, 50mM NaF, 10mM sodio pirofosfato, 137mM NaCl, 1 mM PMSF,) integrato con un cocktail di inibitori di proteasi (1 fluoruro fenilmetilsolfonile mM, 1mg/ml pepstatina A, 2 mg/ml aprotinina) e lisate per 30' in ghiaccio. Le proteine solubili sono state raccolte e conservate a -80°C dopo una centrifugazione a 13.000g per 15 min. La concentrazione proteica è stata determinata mediante il saggio Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA); 15 μ g di proteine totali sono state corse su un gel di elettroforesi all' 8% o al 10% o 15% di acrilammide e trasferite su una membrana di nitrocellulosa. Il filtro di nitrocellulosa è stato bloccato con latte al 10% in TBST buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 500 mM NaCl, and 0.1% Tween 20) e incubato con l'anticorpo primario in TBST contenente 5% di latte o di BSA, overnight a 4°C. L'immunoreattività è stata visualizzata dalla successiva incubazione con un anticorpo secondario coniugato a perossidasi e dal reagente ECL (Western Blotting Luminol Reagent) ottenuto dalla Santa Cruz Biotechnology, inc. La densitometria delle bande è stata determinata utilizzando il software ImageJ.

6.4 Secrezione dell'insulina stimolata da glucosio

Le cellule sono state piastrate in multiwell da sei pozzetti alla densità di $2,5 \times 10^5$ in DMEM contenente 2.8mM di glucosio. Al terzo giorno le cellule sono state lavate 2 volte con la soluzione di Krebs – Ringer (118.5 mmol/l NaCl, 2.54 mmol/l CaCl₂ 2H₂O, 1.19

mmol/l KH_2PO_4 , 4.74 mmol/l KCl, 25 mmol/l NaHCO_3 , 1.19 mmol/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 mmol/l HEPES, 0.1% bovine serum albumin, pH 7.4) e incubate con la stessa soluzione con glucosio 2.8mM per 30 minuti. Successivamente sono state stimolate con la soluzione di Krebs-Ringer con glucosio 25mM per 1h; il surnatante è stato raccolto dopo 5,15,30 e 60 minuti dalla stimolazione. Aliquote di 500ul sono state centrifugate per 2 minuti a 13000 rpm a 4°C e il surnatante conservato a -20°C per la determinazione dell'insulina secreta tramite test ELISA (Mercodia).

6.5 Immunofluorescenza indiretta

Le cellule sono state cresciute su vetrini in multiwell da sei pozzetti ad una confluenza del 60-70%; i vetrini sono stati lavati con PBS 1x, fissati con il 3,7% di formaldeide in PBS 1x per 30 minuti a temperatura ambiente e poi incubati per 5 minuti con PBS 1x 0,1 M glicina. Dopo il lavaggio, le cellule fissate sui vetrini sono state permeabilizzate con 0,1% Triton X-100 per 5 min, lavate di nuovo, e incubate con una soluzione di blocco (5% normal horse serum in PBS 1x) per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo un lavaggio, le cellule sono state incubate a 4 °C con una diluizione 1:100 dell' anticorpo policlonale anti- Insulina e con l' anticorpo monoclonale anti-BAG3 AC-1 alla concentrazione di 3µg/ml. Per evidenziare le fibre di actina F le cellule sono state incubate per 15 minuti con la Falloidina Tritc alla concentrazione di 1µg/ml. I vetrini sono poi stati lavati 3 volte con 1 × PBS ed incubati con una diluizione 1:500 di anticorpo secondario anti-rabbit DyLight coniugato al fluoroforo 488 (ImmunoResearch Jackson) e anti- mouse DyLight coniugato al fluoroforo 594 (ImmunoResearch Jackson) a temperatura ambiente per 1h. I vetrini sono stati nuovamente lavati per 3 volte in PBS e poi in acqua distillata e montati utilizzando glicerolo al 70%(v/v). I campioni sono stati analizzati utilizzando un microscopio confocale a scansione laser (Leica SP5, Leica Microsystems, Wetzlar, Germania). Le immagini sono state acquisite in modalità di scansione sequenziale. Per la produzione delle figure i dati definitivi sono stati assemblati utilizzando Adobe Photoshop 7 e Adobe Illustrator 10.

6.6 Frazionamento cellulare per la purificazione dei granuli d'insulina

I granuli secretori di insulina sono stati ottenuti tramite frazionamento cellulare delle β TC-6. L'intera procedura è stata effettuata a 4°C. Brevemente, circa 8×10^8 cellule, cresciute in piastre da 600 cm², sono state lavate una volta con PBS 1X e raccolte in PBS 1X freddo, utilizzando uno scraper. In seguito le cellule sono state omogeneizzate in 10ml della soluzione SMT (0.27 M saccarosio, 10mM MOPS – Tris ph 6.8) supplementata con inibitori di proteasi 1X tramite 3 passaggi attraverso l'ago 21 gauge seguiti da altrettanti passaggi attraverso l'ago 25 gauge. Detriti cellulari e nuclei sono stati rimossi centrifugando per 5 minuti a 1000 x g. il surnatante è stato trasferito in una nuova provetta, mentre il pellet rimanente è stato omogeneizzato in 10ml di SMT con inibitori di proteasi come fatto precedentemente. L'omogenato è stato centrifugato per 5 minuti a 1000xg, e il surnatante ottenuto è stato unito con il precedente. I surnatanti così uniti sono stati centrifugati per 10 minuti a 1000xg per ottenere il postnuclear surnatant (PNS). Il PNS è stato poi centrifugato a 24700 x g per 20 minuti per separare gli organelli dal citosol. Il pellet è stato risospeso in SMT, caricato su un gradiente discontinuo di Nycodenz (Sigma – Aldrich) composto da tre strati (23,4%,8,8% e 4,4%) e centrifugato a 107000 x g per 75 minuti. La frazione di Nycodenz arricchita dei granuli di insulina è stata recuperata e caricata su una soluzione al 27% di Percoll, che è stata poi centrifugata a 35000 x g per 45 minuti. La frazione di Percoll (Sigma – Aldrich) arricchita dai granuli d'insulina è stata

recuperata alla superficie del gradiente, lavata tre volte con SMT per eliminare le particelle di Percoll. Le frazioni ottenute sono state infine analizzate per western blotting.

6.7 Trasfezione

Le cellule β TC-6 sono state trasfettate utilizzando bag3siRNA (5'-AAGGUUCAGACCAUCUUGGAA-3') o un non-targeted (NT) siRNA (5'-CAGUCGCGUUUGCGACUGG-3'). Per la trasfezione, le cellule sono state piastrate ad una confluenza di $2,5 \times 10^5$ cellule/mw in multiwells da sei pozzetti in DMEM completo di siero fetale bovino. Le cellule sono state trasfettate con una concentrazione di siRNA finale pari a 100 nM, utilizzando come veicolo di trasfezione Hiperfect Transfection Reagent (Qiagen) per 36h. L'efficienza di ogni trasfezione è stata valutata mediante la tecnica Western blot.

6.8 Coimmunoprecipitazione

L'immunoprecipitazione delle proteine: BAG3, SNAP-25, Syntaxina, Paxillina e FAK dai lisati delle B TC 6, è stata effettuata utilizzando la resina della SANTA Cruz Biotechnology, inc (IP matrix mouse). Brevemente: 45ul di resina sono stati incubati per 1h a 4° C, in agitazione continua, con 3ug dell'anticorpo anti BAG3 (AC-1), anti-SNAP-25, anti-Syntaxina, anti-paxillina e anti- Fak. La resina è stata in seguito lavata con PBS + 1% Tween per due volte e centrifugata 1' a 13.000 rpm 4°C. Sulla resina attivata sono state caricate 300ug di proteine ottenute dai lisati delle β TC- 6; resina e lisati sono stati incubati per 2h a 4° C, in agitazione continua. Si è in seguito proceduto a lavare la resina tre volte con RIPA BUFFER (Tris / HCl ph 7.6 50mM, NaCl150mM, EDTA 4mM, NaF 10mM, Sodio pirofosfato 10mM, 1% NP-40, 1% Sodio deossicolato) centrifugando ogni volta 1' a 13000 rpm, 4°C. Infine la resina è stata eluita con 45 ul di Laemmly Buffer 2X e conservata a -20°C. I campioni sono stati successivamente processati per western blotting.

BIBLIOGRAFIA

Abdul-Ghani M.A. **2013** Type 2 diabetes and the evolving paradigm in glucose regulation, *Am J Manag Care.*; **19**, S43-50.

Abercrombie M, Heaysman JE, Pegrum SM. **1971** The locomotion of fibroblasts in culture. IV. Electron microscopy of the leading lamella. *Exp Cell Res.*; **67**, 359-6.

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.

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.

Bellis SL, Miller JT, Turner CE. **1995** Characterization of tyrosine phosphorylation of paxillin in vitro by focal adhesion kinase. *J Biol Chem*; **270**.

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 Genomics*. **31**, 295–305.

Benes C, Marie JC, Martin-Perez J, Roisin MP, Fagard R. **1999**, Mode of regulation of the extracellular signal-regulated kinases in the pancreatic beta-cell line MIN6 and their implication in the regulation of insulin gene transcription. *Biochem J*. **340**, 219-25.

Bertuzzi F, Saccomanno K, Socci C, Davalli AM, Taglietti MV, Berra C, Dalcin E, Monti LD, Pozza G, Pontiroli AE. **1998** Long-term in vitro exposure to high glucose increases proinsulin-like-molecules release by isolated human islets. *J Endocrinol* **158**, 205–211.

Blandino-Rosano M, Perez-Arana G, Mellado-Gil JM, Segundo C, Aguilar-Diosdado M. **2008** Anti-proliferative effect of pro-inflammatory cytokines in cultured beta cells is associated with extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway inhibition: protective role of glucagon-like peptide -1, *J Mol Endocrinol*. Jul; **41**(1):35-44;

Briaud I, Rouault C, Reach G, Poitout V. **1999** Long-term exposure of isolated rat islets of Langerhans to supraphysiologic glucose concentrations decreases insulin mRNA levels. *Metabolism* **48**,319–323.

Brissova M , Powers A.C. **2008**. Architecture of Pancreatic Islets Pancreatic Beta Cell in Health and Disease, pp 3-11.

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

Brunner Y, Couté Y, Iezzi M, Foti M, Fukuda M, Hochstrasser DF, Wollheim CB, Sanchez JC. **2007** *Proteomics analysis of insulin secretory granules*. *Mol Cell Proteomics*. Jun; **6**, 1007-17

Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC. **2003**. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* **52**,102–110,

Cai EP, Casimir M, Schroer SA, Luk CT, Shi SY, Choi D, Dai XQ, Hajmrle C, Spigelman AF, Zhu D, Gaisano HY, MacDonald PE, Woo M. **2012** In vivo role of focal adhesion kinase in regulating pancreatic β -cell mass and function through insulin signaling, actin dynamics, and granule trafficking. *Diabetes*. **61**,1708-18.

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.

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.

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.

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.

Daniel S, Noda M, Straub SG, Sharp GW. **1999**. Identification of the docked granule pool responsible for the first phase of glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes*. **48**,1686-90.

David D Schlaepfer¹ and Satyajit K Mitra, **2004**. Multiple connections link FAK to cell motility and invasion *Curr Opin Genet Dev*. **14**, 92-101. *Review*.

Deakin Nicholas O. and Turner Christopher E. Paxillin comes of age *J Cell Sci*. **2008**, **121** 2435–2444.

DerMardirossian C, Bokoch GM. **2005**. GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends Cell Biol*. **15**, 356-63. *Review*.

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.

Eberhard D, Lammert E. **2009**. The pancreatic beta-cell in the islet and organ community. *Curr Opin Genet Dev*. **194**,69-75.

Eiji Kawasaki. **2012**. ZnT8 and type 1 diabetes *Endocrine Journal*. **59**, 531-537review.

Eizirik, D. L., Colli, M. L.& Ortis, F. **2009**. The role of inflammation in insulinitis and beta-cell loss in type 1 diabetes. *Nat Rev Endocrinol*, **5**, 219-226.

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

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.

Filippi, C. M.& von Herrath, M. G. **2007**. Islet beta-cell death - fuel to sustain autoimmunity? *Immunity*, **27** 183-185.

Frame MC, Patel H, Serrels B, Lietha D, Eck MJ. **2010** The FERM domain: organizing the structure and function of FAK. *Nat Rev Mol Cell Biol*.**11**.802-14.

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.

Fujita Y, Sasaki T, Fukui K, Kotani H, Kimura T, Hata Y, Südhof TC, Scheller RH, Takai Y. **1996** Phosphorylation of Munc-18/n-Sec1/rbSec1 by protein kinase C: its implication in regulating the interaction of Munc-18/n-Sec1/rbSec1 with syntaxin. *J Biol Chem.* Mar **29**, 7265-8.

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.

Hammar E, Tomas A, Bosco D, Halban PA, **2009** Role of the Rho-ROCK (Rho-associated kinase) signaling pathway in the regulation of pancreatic beta-cell function. *Endocrinology.* May.**150**.2072-9.

Henquin JC, Nenquin M, Stiernet P, Ahren B. **2006** In vivo and in vitro glucose-induced biphasic insulin secretion in the mouse: pattern and role of cytoplasmic Ca²⁺ and amplification signals in beta-cells. *Diabetes.* **55**. 441-51.

Ishibe S, Joly D, Zhu X, Cantley LG. **2003**. Phosphorylation-dependent paxillin-ERK association mediates hepatocyte growth factor-stimulated epithelial morphogenesis. *Mol Cell.* Nov.**12**,1275-85.

Iezzi M, Escher G, Meda P, Charollais A, Baldini G, Darchen F, Wollheim CB, Regazzi R. **1999** Subcellular distribution and function of Rab3A, B, C, and D isoforms in insulin-secreting cells. *Mol Endocrinol.***13**, 202-12;

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.

Jewell JL, Luo W, Oh E, Wang Z, Thurmond DC. **2008**. Filamentous actin regulates insulin exocytosis through direct interaction with Syntaxin 4. *J Biol Chem.* **18**, 283.

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.

Junghyo Jo, Moo Young Choi, Duk-Su Koh Size. **2007**. Distribution of Mouse Langerhans Islets *Biophysical Journal.* **93**, 2655–2666;

Kalwat MA, Thurmond DC. **2013** Signaling mechanisms of glucose-induced F-actin remodeling in pancreatic islet β cells. *Exp Mol Med.***45**,e37.

Kaminitz A, Stein J, Yaniv I, Askenasy N. **2007**. The vicious cycle of apoptotic beta-cell death in type 1 diabetes. *Immunol Cell Biol.* **85**, 582-9.

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.

Kelly C, McClenaghan Neville H, Flatt Peter R. **2011**. Role of islet structure and cellular interactions in the control of insulin secretion *Islets* **2**, 41-47;

Kennedy HJ, Pouli AE, Ainscow EK, Jouaville LS, Rizzuto R, Rutter GA. **1999**. Glucose generates sub-plasma membrane ATP microdomains in single islet beta-cells. Potential role for strategically located mitochondria. *J Biol Chem.* **274**, 13281-91;

Khoo S, Griffen SC, Xia Y, Baer RJ, German MS, Cobb MH. **2003**, Regulation of insulin gene transcription by ERK1 and ERK2 in pancreatic beta cells. *J Biol Chem.* **29**;278(35)32969-77;

Kimura T, Niki I. Rab27a, actin and beta-cell endocytosis. **2011**. *Endocr J.* **58**,1-6.

Lang Jochen, **1999** Molecular mechanisms and regulation of insulin exocytosis as a paradigm of endocrine secretion *Eur. J. Biochem.* **259**, 3±17 Review ;

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.

Iida Y, Senda T, Matsukawa Y, Onoda K, Miyazaki JI, Sakaguchi H, Nimura Y, Hidaka H, Niki I. **1997**, Myosin light-chain phosphorylation controls insulin secretion at a proximal step in the secretory cascade. *Am J Physiol.* **273**,E782-9;

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.

Longuet C, Broca C, Costes S, Hani EH, Bataille D, Dalle S. **2005**. Extracellularly regulated kinases 1/2 (p44/42 mitogen-activated protein kinases) phosphorylate synapsin I and regulate insulin secretion in the MIN6 beta-cell line and islets of Langerhans. *Endocrinology.* **146**,643-54.

Luther MJ, Davies E, Muller D, Harrison M, Bone AJ, Jones PM. **2005**. Cell-to-cell contact influences proliferative marker expression and apoptosis in MIN6 cells grown in islet-like structures. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **288**, E502-9;

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.

Meda P, Perrelet A, Orci L. **1979**, Increase of gap junctions between pancreatic B-cells during stimulation of insulin secretion. *J Cell Biol.*; **82**:441-8.

Mitra SK, Hanson DA, Schlaepfer DD. **2005**. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **6**, 56-68. Review.

Moreau et al., 2010).

Nagamatsu S, Fujiwara T, Nakamichi Y, Watanabe T, Katahira H, Sawa H, Akagawa K. **1996** Expression and functional role of syntaxin 1/HPC-1 in pancreatic beta cells. Syntaxin 1A, but not 1B, plays a negative role in regulatory insulin release pathway. *J Biol Chem.* **271**, 1160-5.

Nikolopoulos SN, Turner CE. **2000**, Actopaxin, a new focal adhesion protein that binds paxillin LD motifs and actin and regulates cell adhesion. *J Cell Biol.* **151**. 1435-48;

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.

Pevsner J., Hsu S.C., **1994**. Specificity and regulation of a synaptic vesicle docking complex. *Neuron*, **13**, 353-361;

Pinget M, Boullu-Sanchis S, **2002** Physiological basis of insulin secretion abnormalities, *Diabetes Metab.* **28**, 4S21-32;

Regazzi R, Wollheim CB, Lang J, Theler JM, Rossetto O, Montecucco C, Sadoul K, Weller U, Palmer M, Thorens B. **1995** VAMP-2 and cellubrevin are expressed in pancreatic beta-cells and are essential for Ca(2+)-but not for GTP gamma S-induced insulin secretion. *EMBO J.* **14**, 2723-30.

Richardson A, Malik RK, Hildebrand JD, Parsons JT. **1997**, Inhibition of cell spreading by expression of the C-terminal domain of focal adhesion kinase (FAK) is rescued by coexpression of Src or catalytically inactive FAK: a role for paxillin tyrosine phosphorylation. *Mol Cell Biol*; **17**, 6906–6914.

Rizo J and Sudhof T.C., **2002** Snares and Munc18 in synaptic vesicle fusion *Nt.Rev.Neurosci.* **3**, 641-653;

Robertson RP. **2004** Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *J Biol Chem* **279**: 42351–42354;

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

Rondas d, Tomas A, Halban PA. **2011**. Focal adhesion remodeling is crucial for glucose-stimulated insulin secretion and involves activation of focal adhesion kinase and paxillin. *Diabetes.* **60**, 1146-57.

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, 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.

Rondas D, Tomas A, Soto-Ribeiro M, Wehrle-Haller B, Halban PA. **2012**. Novel mechanistic link between focal adhesion remodeling and glucose-stimulated insulin secretion. *J Biol Chem.* **287**, 2423-36.

Rutter GA, Hill EV. **2006**. Insulin vesicle release: walk, kiss, pause ... then run. *Physiology*. **21**,189-96;

Safayhi H, Haase H, Kramer U, Bihlmayer A, Roenfeldt M, Ammon HP, Froschmayr M, Cassidy TN, Morano I, Ahlijanian MK, Striessnig J. **1997**. L-type calcium channels in insulin-secreting cells: biochemical characterization and phosphorylation in RINm5F cells. *Mol Endocrinol*. **11**,619-29;

Sadoul K, Lang J, Montecucco C, Weller U, Regazzi R, Catsicas S, Wollheim CB, Halban PA, **1995**. SNAP-25 is expressed in islets of Langerhans and is involved in insulin release *J Cell Biol*. **128**,1019-28.

Schaller MD, Parsons JT. **1994**. Focal adhesion kinase and associated proteins. *Curr Opin Cell Biol*. **6**, 705-10. Review.

Schaller MD. **2010**. Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions. *J Cell Sci. Apr* **123**,1007-13. Review;

Schaller MD. **2001**. Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein. *Oncogene*. **20**, 6459-72. Review;

Söllner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P, Rothman JE. **1993**. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature*. **362**,318-24.

Steiner D.F. **2008**. The Biosynthesis of Insulin Pancreatic Beta Cell in Health and Disease, pp 31-49.

Taborsky Jr. G. J. , Ahrén B. and Havel P. J. **1998**. Autonomic mediation of glucagon secretion during hypoglycemia: implications for impaired α -cell responses in type 1 diabetes, *Diabetes*, **47**, 995–1005.

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

Thurmond DC, Gonelle-Gispert C, Furukawa M, Halban PA, Pessin JE. **2003** Glucose-stimulated insulin secretion is coupled to the interaction of actin with the t-SNARE (target membrane soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor protein) complex. *Mol Endocrinol*. **17**, 732-42.

Turner C.E. **2000**. Paxillin interactions *J Cell Sci*. **113**, 4139-40. Review;

Thomas Söllner, Sidney W. Whiteheart, Michael Brunner, Hediye Erdjument-Bromage, Scott Geromanos, Paul Tempst & James E. Rothman SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion *Nature* **362**, 318-324.

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.

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.

Wang Z, Oh E, Thurmond DC. **2007** Glucose-stimulated Cdc42 signaling is essential for the second phase of insulin secretion. *J Biol Chem*. **282**, 9536-46.

Webb DJ, Donais K, Whitmore LA, et al. **2004**. FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat Cell Biol*. **6**,154–161.

Weber T, Zemelman BV, McNew JA, Westermann B, Gmachl M, Parlati F, Söllner TH, Rothman **1998** SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion *JE.Cell*. **92**, 759-72.

Wendt A, Speidel D, Danielsson A, Esguerra JL, Bogen IL, Walaas SI, Salehi A, Eliasson L. **2012** Synapsins I and II are not required for insulin secretion from mouse pancreatic β -cells. *Endocrinology*. **153**, 2112-9;

Zaidel-Bar R, Itzkovitz S, Ma'ayan A, Iyengar R, Geiger B., **2007** Functional atlas of the integrin adhesome. *Nat Cell Biol*. **9**, 858-67.

Zóka A, Múzes G, Somogyi A, Varga T, Szémán B, Al-Aissa Z, Hadarits O, Firneisz G. **2013**. Altered immune regulation in type 1 diabetes. *Clin Dev Immunol.*;

Ringraziamenti

Vorrei ringraziare tutti coloro che hanno reso possibile la realizzazione di questa tesi.

Primo fra tutti ringrazio il Prof. Gianfranco Tajana per avermi guidato verso la ricerca e trasmesso l'amore per essa.

La Prof.ssa Maria Caterina Turco per avermi dato la possibilità di svolgere il mio progetto di ricerca ed avermi seguita durante questi tre anni di dottorato.

La dott.ssa Michelina Festa per i suoi consigli e la sua umanità, per avermi insegnato a mettere in atto le mie idee e per essermi sempre stata vicina, spronandomi nei momenti di difficoltà.

La Dott.ssa Alessandra Rosati per la sua disponibilità e per avermi seguito durante la fase di stesura della tesi.

Maria Caterina De Rosa, Margot De Marco, Raffaella D'Auria, Luana Guerriero, Anna Gorrasi, Roberta Esposito, Gaetano Pierro, Roberta Cotugno, Mariella Caputo, Anna Basile, Antonia Falco, Morena D'Avenia, Francesca Isabella De Simone per aver reso piacevole e familiare l'ambiente in cui ho lavorato in questo tre anni.

Ringrazio infine la mia famiglia e Valerio che ha sempre creduto in me e mi è stato accanto nei momenti di difficoltà.

