



Unione Europea



*Ministero dell'Istruzione,
dell'Università e della Ricerca*



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO

Dipartimento di Scienze Farmaceutiche e Biomediche

Dottorato di ricerca in
Biochimica e patologia dell'azione dei farmaci
IX ciclo nuova serie
2007-2011

Tesi di Dottorato in

Ruolo della proteina BAG3 nel microambiente tumorale

Dottoranda Antonia Falco

Tutor Ch.mo Prof. Maria Caterina Turco

Coordinatore Ch.mo Prof. Antonietta Leone

Alla mia famiglia.

Abstract

Abstract1

Sommario

Sommario2

Capitolo I. Il microambiente tumorale

1.1 Il microambiente tumorale.....3
 1.2 Ruolo dei fibroblasti associati al cancro (CAFs) nello sviluppo tumorale4
 1.3 Cross talk funzionale tra il microambiente infiammatorio e il tumore6
 1.3.1 Componenti cellulari del microambiente infiammatorio9
 1.3.2 Macrofagi associati al tumore (TAMs)10
 1.4 La neoangiogenesi tumorale.....14
 1.4.1 Fattori pro-angiogenici16
 1.4.2 Il VEGF.....18
 1.4.3 Attività biologica dei recettori del VEGF21

Capitolo II. La proteina BAG3

2.1 BAG3: una proteina che regola numerosi meccanismi molecolari24
 2.2 Ruolo della proteina BAG3 nella regolazione dell' apoptosi25
 2.3 Ruolo della proteina BAG3 nell' adesione e migrazione cellulare27
 2.4 Ruolo della proteina BAG3 nell' autofagia27

Capitolo III. Caratterizzazione della proteina BAG3 extracellulare

3.1 Introduzione29
 3.2 Risultati e Discussione29
 3.2.1 Localizzazione extracellulare della proteina BAG329
 3.2.2 Localizzazione subcellulare della proteina BAG3.....30
 3.2.3 Caratterizzazione dei livelli della proteina BAG3 in sieri umani.....32
 3.2.4 Identificazione della proteina BAG3 in siero umano mediante MS36
 3.2.5 Caratterizzazione del meccanismo di rilascio nello spazio extracellulare
 della proteina BAG337
 3.2.6 La proteina BAG3 extracellulare attiva i macrofagi39
 3.2.7 La polimixina B inibisce solo in parte l' attività di rBAG342
 3.2.8 La proteina BAG3 extracellulare lega la superficie dei macrofagi43

Capitolo IV. Ruolo della proteina BAG3 nella neoangiogenesi tumorale

4.1 Introduzione.....	45
4.2 Risultati e Discussione	45
4.2.1 Il silenziamento della proteina BAG3 inibisce la crescita del tumore e la neoangiogenesi	45
4.2.2 La down-modulazione di BAG3 nelle cellule HUVEC determina il blocco del ciclo cellulare in G0/G1	48
4.2.3 Il silenziamento di BAG3 induce un aumento della fosforilazione di pERK1/2 e dei livelli di p15 e p21	50
4.2.4 La proteina BAG3 interagisce con la chinasi ERK1/2 e la sua fosfatasi DUSP6	52

Capitolo V. Conclusioni

5.1 Conclusioni.....	54
----------------------	----

Capitolo VI. Materiali e Metodi

6.1 Materiali.....	55
6.2 Colture cellulari.....	55
6.3 Western blot	56
6.4 Immunofluorescenza indiretta	56
6.5 ELISA	57
6.6 Digestione di proteine da gel.....	57
6.7 Purificazione di microvescicole dal surnatante cellulare	57
6.8 Valutazione dell' accumulo dei nitriti	58
6.9 Coniugazione della rBAG3 a FITC.....	58
6.10 Immunofluorescenza diretta	59
6.11 Analisi della crescita tumorale.....	59
6.12 Immunohistochimica.....	59
6.13 Analisi della densità dei vasi	60
6.14 Saggio di angiogenesi in vivo (DIVAA)	60
6.15 Trasfezione.....	60
6.16 Vitalità cellulare e analisi del ciclo cellulare	61
6.17 Co-immunoprecipitazione	61
6.18 Microscopia immunoelettronica.....	61

Bibliografia

Bibliografia.....	I-XIV
-------------------	-------

Abstract

It is now recognized that tumor microenvironment undergoes extensive changes during tumor development and influences the evolution and progression of cancer. The hypoxic environment of the tumor stimulates angiogenesis which can directly promote tumor cell survival and invasion. Also the inflammatory infiltrate associated with many solid tumors is able to modulate tumor cell behavior, having both anti- and pro-tumor effects. A major role is also played by fibroblasts surrounding the tumor that are able to release growth factors and cytokines that lead to enhanced angiogenesis and increased tumor growth and invasion.

All these components are potential targets for novel therapeutic strategies; indeed several molecules are currently used in clinical trials. Furthermore, recent data provided the evidence that some components of tumor microenvironment can provide important prognostic and predictive informations. A complete characterization of molecules and cells involved in the tumor maintenance is requested for improving our knowledge on tumor biology.

BAG3 is a cytoplasmatic protein that has been recently characterized for its central role in different tumor-associated processes such as survival, proliferation, migration and autophagy. The role of BAG3 in tumor-associated microenvironment has not been characterized so far.

Although lacking a transmembrane domain, we have found that BAG3 can also be associated to the plasma membrane and be released in the extracellular medium of some neoplastic cells and in particular pancreatic cancer cells. We also confirmed the presence of an extracellular form of BAG3 in sera of patients affected by pancreatic adenocarcinoma. After release into the extracellular fluid, BAG3 may bind to the surfaces of tumor-adjacent cells, so we sought to determine if BAG3 can have an effect on macrophages that play a major role in the inflammatory microenvironment. We found that BAG3 is able to bind the macrophage cell surface and to activate the production of inflammatory associated components.

We also identified a novel role for intracellular BAG3 in regulation of neo-angiogenesis. Indeed we showed that BAG3 is expressed in endothelial cells and that is able to regulate cell proliferation by interacting with ERK and its phosphatase DUSP6. As a consequence reduction of BAG3 results in sustained ERK phosphorylation and reduced growth of endothelial cells both in vitro and in vivo. This in turn impairs in vivo tumor growth as a consequence of reduced angiogenesis.

Altogether these results assign to the anti-apoptotic BAG3 novel functions in tumor microenvironment-associated processes that are able to regulate tumor development.

Sommario

Recenti studi hanno dimostrato che il microambiente tumorale subisce numerosi cambiamenti nel corso dello sviluppo del tumore e influenza l'evoluzione e la progressione del cancro. L'ambiente ipossico del tumore stimola l'angiogenesi che può direttamente promuovere la sopravvivenza delle cellule tumorali e la loro invasione. Anche l'infiltrato infiammatorio, associato a molti tumori solidi, è in grado di modulare il comportamento delle cellule tumorali, con effetti anti- e pro-tumorali. Un ruolo importante è svolto anche dai fibroblasti che circondano il tumore, i quali sono in grado di rilasciare fattori di crescita e citochine che stimolano l'angiogenesi, la crescita del tumore e l'invasione.

Tutti questi componenti sono potenziali bersagli per nuove strategie terapeutiche, e, infatti, diverse molecole che agiscono su tali target, sono attualmente utilizzate nelle sperimentazioni cliniche. Inoltre, dati recenti dimostrano che alcuni componenti del microambiente tumorale sono in grado di fornire importanti informazioni prognostiche e predittive.

A tale scopo diventa sempre più evidente che, una caratterizzazione completa delle molecole e delle cellule coinvolte nel microambiente del tumore, è richiesta per una maggiore conoscenza della biologia del tumore.

BAG3 è una proteina citoplasmatica che è stata recentemente caratterizzata per il suo ruolo centrale in diversi processi associati al tumore quali la sopravvivenza, la proliferazione, la migrazione e l'autofagia. Il ruolo di BAG3 nel microambiente associato al tumore non è stato caratterizzato finora.

Pur non avendo un dominio transmembrana, i nostri studi hanno dimostrato che BAG3 può essere associata alla membrana plasmatica e rilasciata nel mezzo extracellulare di alcune cellule neoplastiche e in particolare cellule tumorali del pancreas. Abbiamo anche confermato la presenza di una forma extracellulare di BAG3 nel siero di pazienti affetti da adenocarcinoma pancreatico.

Dopo il rilascio nello spazio extracellulare, BAG3 può legare la superficie di cellule adiacenti al tumore, e in particolare abbiamo cercato di stabilire se BAG3 può avere un effetto sui macrofagi che svolgono un ruolo importante nel microambiente infiammatorio associato al tumore. Abbiamo trovato che BAG3 è in grado di legare la superficie cellulare dei macrofagi e di indurre la produzione di componenti associati al processo infiammatorio.

Abbiamo anche individuato un nuovo ruolo per BAG3 intracellulare nella regolazione della neo-angiogenesi. Infatti, abbiamo dimostrato che BAG3 è espressa nelle cellule endoteliali e che è in grado di regolare la proliferazione cellulare interagendo con ERK1/2 e la sua fosfatasi DUSP6. Come conseguenza, la riduzione di BAG3 determina una sostenuta fosforilazione di ERK1/2 e una ridotta crescita delle cellule endoteliali in vitro e in vivo. Questo, a sua volta induce una ridotta crescita del tumore in vivo in conseguenza alla ridotta angiogenesi.

Complessivamente questi risultati permettono di individuare per la proteina BAG3 un ruolo nuovo nella regolazione dello sviluppo del tumore.

1.1 Il microambiente tumorale

Il microambiente tumorale è un tessuto molto dinamico ed eterogeneo, dove le cellule neoplastiche sono in continua interazione con lo stroma e con le componenti cellulari della risposta infiammatoria (fig.1).

Come per i tessuti normali, anche i tumori sono composti da due distinti sistemi che interagiscono tra loro: parenchima e stroma. Nei tumori, il parenchima è costituito dalle cellule tumorali stesse, mentre lo stroma è costituito dall'insieme di cellule non maligne e dal tessuto connettivo. Gli elementi stromali comprendono vasi sanguigni e linfatici, fibroblasti e cellule infiammatorie. Inoltre, lo stroma include anche tutte quelle macromolecole extracellulari che servono a fornire supporto strutturale come collagene, fibronectina, fibrina, proteoglicani e acido ialuronico. La componente stromale varia in base al tipo di tumore; per esempio, in tumori desmoplastici lo stroma rappresenta l'80% della massa tumorale mentre in altri tumori (come linfomi) lo stroma rappresenta solo una piccola frazione. Anche i tumori "liquidi", come le leucemie, hanno uno stroma costituito dal plasma del sangue in cui circolano. La malignità del tumore però non è direttamente correlata alla quantità di stroma presente (Dvorak *et al.*, 2011). Ciò nonostante, tutti i tumori richiedono la presenza di stroma per soddisfare le loro esigenze di nutrizione, eliminazione dei rifiuti e mantenimento della struttura. Negli ultimi anni è diventato sempre più chiaro che lo stroma risulta essere essenziale per il mantenimento e la crescita del tumore divenendo un potenziale bersaglio terapeutico.

L'idea che le cellule stromali potessero promuovere lo sviluppo del cancro risale al 1863, quando Rudolph Virchow osservò la presenza di leucociti nello stroma di tessuti neoplastici e ipotizzò che il sito dell'infiammazione cronica potesse essere l'origine della malignità (Balkwill *et al.*, 2001). La sua teoria era però concentrata solo sull'infiammazione e non considerava il ruolo di altri componenti stromali, mentre Paget nel 1889, con la sua teoria del "seed and soil", incluse tutti gli altri componenti (Paget, 1889). Solo nel 1982, Bissell delineò una teoria moderna secondo cui alla base dello sviluppo del tumore, sia il microambiente sia le mutazioni genetiche, svolgono un ruolo fondamentale (Bissel *et al.*, 1982).

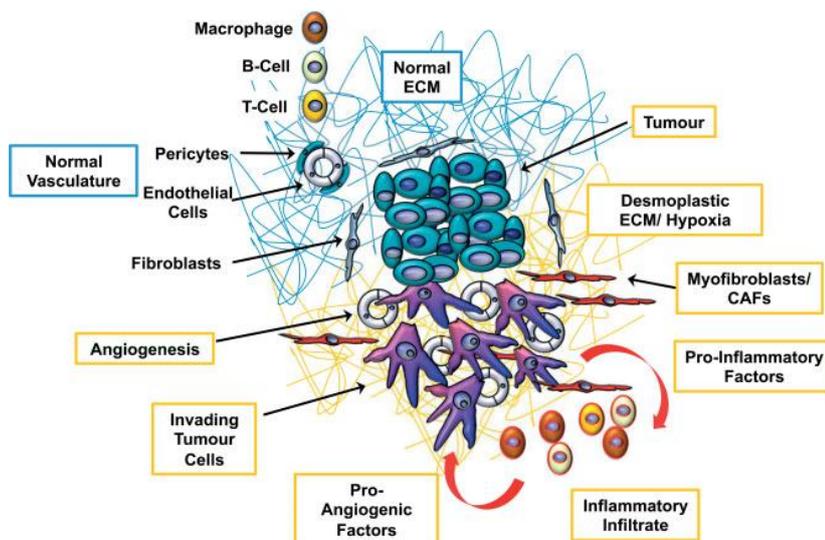


Figura 1- Il microambiente tumorale (Michael *et al.*, 2010).

1.2 Ruolo dei fibroblasti associati al cancro (CAFs) nello sviluppo tumorale.

I fibroblasti rappresentano una delle popolazioni cellulari più abbondanti presenti nel microambiente di tumori solidi; essi sono una componente di grande rilievo nel carcinoma alla mammella, colon e prostata e possono contribuire alla crescita e alla diffusione del tumore attraverso il rilascio di fattori di crescita come EGF (Epidermal Growth Factor), TGF β (Transforming Growth Factor beta) e HGF (Hepatocyte Growth Factor), oltre che chemochine che possono influenzare il comportamento del tumore (Kalluri and Zeisberg, 2006).

Sono state proposte diverse origini per i CAFs: cellule del midollo osseo (BMDCS), fibroblasti normali con mutazioni genetiche o epigenetiche o cellule epiteliali. E' stato anche dimostrato che le cellule tumorali stesse possono favorire la formazione di CAFs da fibroblasti normali attraverso un' "educazione in vivo" (Erez *et al.*, 2010). Le cellule tumorali rilasciando interleuchine pro-infiammatorie, come l' IL-1 β , sono in grado di indurre l'attività del fattore di trascrizione NF- κ B (Nuclear Factor kappa B) nei fibroblasti, che a sua volta induce l' espressione di geni pro-infiammatori e pro-angiogenici che caratterizzano i CAFs (fig.2). I CAFs, infatti, sono fenotipicamente e funzionalmente distinguibili dai fibroblasti normali per la loro aumentata capacità di proliferare e per la presenza di fattori diversi rilasciati nella matrice extracellulare a loro adiacente (Bhowmick *et al.*, 2004; Kalluri and Zeisberg, 2009).

I fibroblasti normali hanno il ruolo di mantenere l' omeostasi epiteliale attraverso la soppressione della proliferazione e di potenziali oncogeni (Begley *et al.*, 2008; Brownmick *et al.*, 2004; Trimboli *et al.*, 2009). Al contrario i CAFs promuovono la crescita del tumore inducendo angiogenesi, reclutamento di cellule progenitrici del midollo e rimodellamento della matrice extracellulare (ECM) (Allinen *et al.*, 2004;

Oluni *et al.*, 1999; Orimo *et al.*, 2005), oltre che mediare la resistenza alla terapia anti-angiogenica (Crawford *et al.*, 2009).

E' stato visto, infatti, che i CAFs rispetto ai fibroblasti normali esprimono livelli più elevati di alcuni geni come ad esempio chemochine (IL-1 β e IL-6) in grado di attirare neutrofili e macrofagi (Bollrath *et al.*,2009), e alcuni geni pro-angiogenici (CYR61 e osteopontina) che favoriscono la migrazione e quindi la metastatizzazione (Anderberg *et al.*, 2009).

Il meccanismo attraverso il quale i CAFs possono indurre la neo-angiogenesi è duplice ossia possono avere un effetto diretto attraverso la secrezione del VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) e di MMP-9 (Matrix Metallo Peptidase 9), o un effetto indiretto attraverso il reclutamento dei macrofagi che a loro volta sono in grado di sostenere il processo della neo-angiogenesi associata al tumore (Condeelis and Pollard, 2006).

Per cui, i CAFs giocano un ruolo cruciale nel generare un microambiente infiammatorio e nel promuovere la neo-angiogenesi favorendo la progressione maligna del tumore.

Oltre al rilascio di chemochine e di fattori di crescita, i CAFs sono anche in grado di generare alterazioni a livello dell' ECM. Molti tumori solidi, infatti, presentano un profilo differente di proteine dell' ECM rispetto alla controparte normale, e molte di queste proteine interagiscono direttamente con le cellule del tumore attraverso integrine o recettori di superficie, influenzando così funzioni come la proliferazione, l' apoptosi e la migrazione (Nelson and Bissell, 2005).

Esempi di proteine costitutivamente aumentate, nell' ECM di tumori solidi, sono TNC (Tenascin-C) e MMPs (Matrix Metallo Proteinases). TNC è una proteina multifunzionale espressa a bassi livelli nel tessuto normale adulto mentre la sua espressione è aumentata in situazioni associate alla migrazione come nel corso dell' embriogenesi, riparazione delle ferite o in caso di tumore. Tra gli enzimi proteolitici, le MMPs, svolgono un ruolo fondamentale nel rimodellamento dell' ECM durante la progressione del tumore (Egeblad *et al.*, 2002), favorendo l' invasività del tumore e la metastatizzazione.

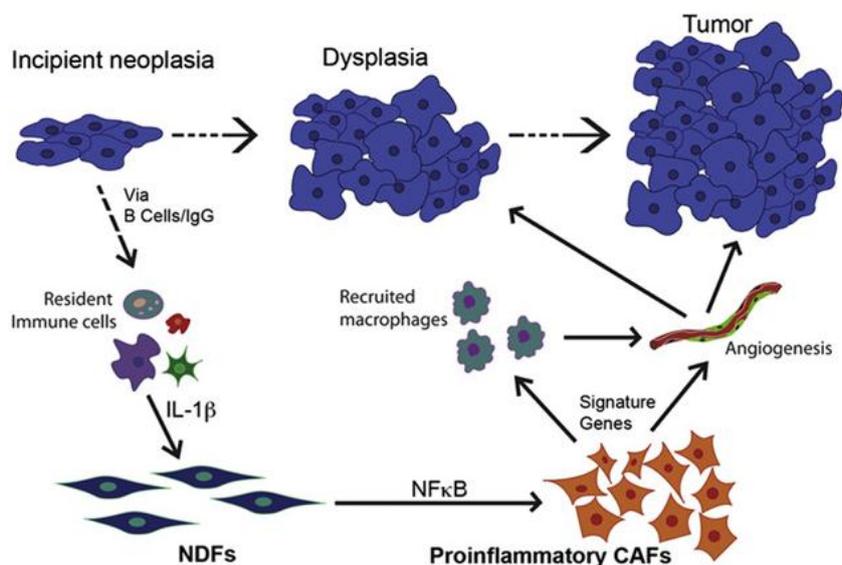


Figura 2- Modello del ruolo dei CAFs nel promuovere il tumore (Erez *et al.*, 2010).

1.3 Cross talk funzionale tra il microambiente infiammatorio e il tumore

La correlazione tra il fenomeno flogistico e quello canceroso ha portato a considerare l'infiammazione come uno dei segni caratteristici del cancro (Colotta *et al.*, 2009; Mantovani *et al.*, 2010). I mediatori e gli effettori cellulari dell'infiammazione sono infatti costituenti importanti del microambiente tumorale. In alcuni tipi di tumore, i processi infiammatori sono presenti prima della trasformazione neoplastica delle cellule. Al contrario, in altri tipi di tumore, un cambiamento oncogenico induce un microambiente infiammatorio che a sua volta promuove lo sviluppo del tumore. La componente infiammatoria stimola la proliferazione e la sopravvivenza di cellule maligne, promuove l'angiogenesi e la metastatizzazione, sovverte le risposte immunitarie adattative e la risposta a chemioterapici. Infatti, negli ultimi anni è stato messo in evidenza che anche in tumori non primariamente riconducibili a processi infiammatori, la componente infiammatoria è presente e costituisce una tappa essenziale nella formazione del microambiente maligno (Mantovani *et al.* 2008).

Le caratteristiche di un tumore correlato ad uno stato infiammatorio sono essenzialmente: l'infiltrazione leucocitaria e macrofagica, la presenza di citochine e chemochine (e.g., interleuchine, TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α), degli interferoni, di fattori di crescita, di enzimi proteolitici, di proteoglicani, di mediatori lipidici e prostaglandine.

Sono state messe in evidenza due vie di attivazione che legano infiammazione e cancro: una via intrinseca ed una via estrinseca (fig. 3).

La via intrinseca è attivata da eventi genetici capaci di indurre processi neoplastici. Tali eventi genetici includono: attivazione di vari oncogeni tramite mutazioni, riarrangiamento oppure amplificazione cromosomica ed inattivazione di geni oncosoppressori. I membri della famiglia RAS sono gli oncogeni maggiormente coinvolti nello sviluppo dei tumori umani e attivano la proliferazione attraverso le chinasi RAS-RAF. Le cellule che subiscono questo tipo di trasformazione producono mediatori dell'infiammazione, generando in tal modo un microambiente infiammatorio in tumori che di base non presentano condizioni di infiammazione (e.g., cancro al seno). Altri oncogeni che svolgono una funzione simile sono la proteina tirosin-chinasi RET, coinvolta nello sviluppo del tumore alla tiroide e MYC, un fattore trascrizionale overespresso in molti tipi di tumori umani. Nella via estrinseca, invece, condizioni infiammatorie e/o infettive aumentano il rischio di progressione del cancro soprattutto in alcuni siti anatomici (colon, prostata e pancreas). Le due vie convergono causando nelle cellule tumorali l'attivazione di fattori di trascrizione, tra cui NF- κ B, STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) e HIF-1 α (Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha).

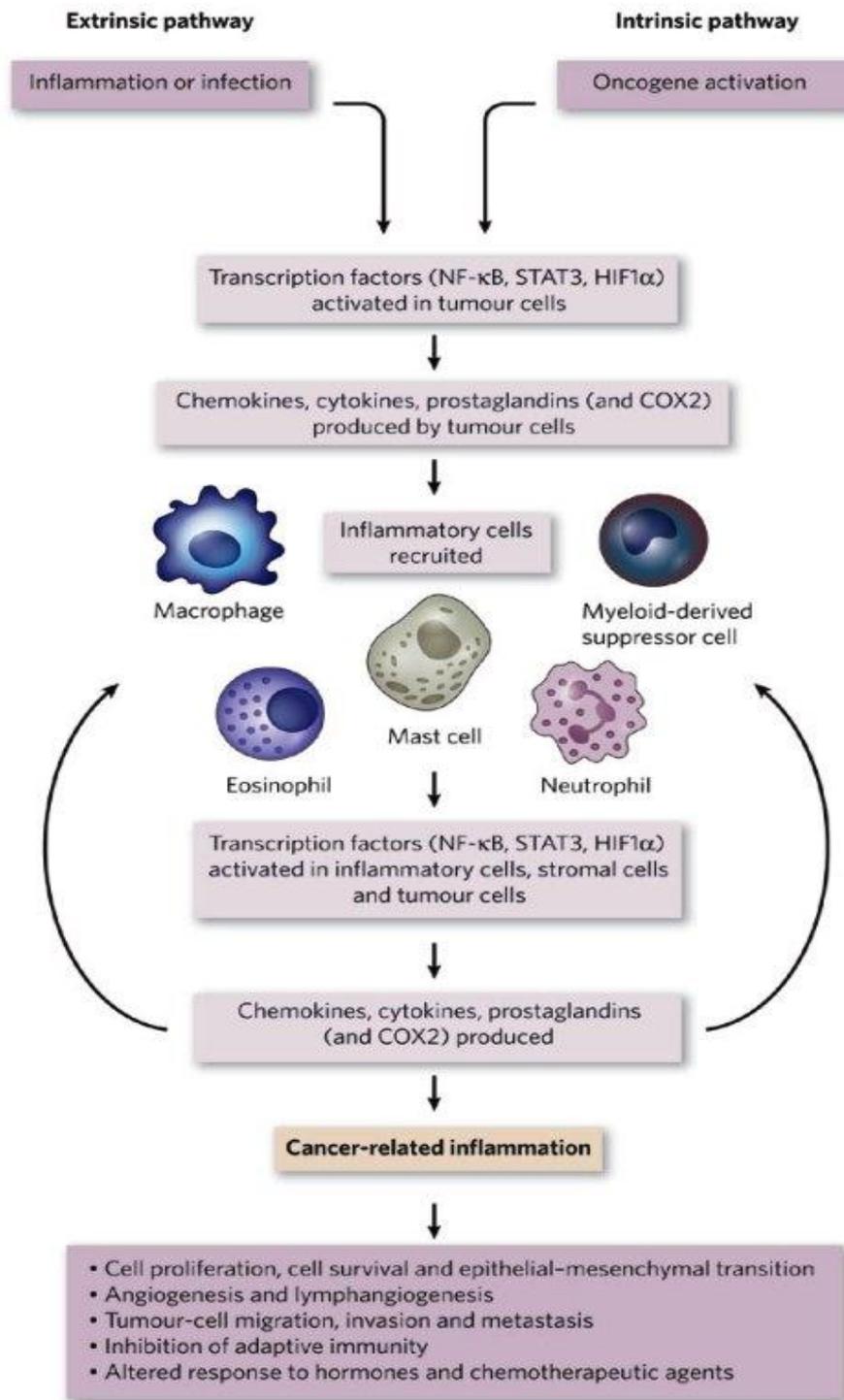


Figura 3- Via intrinseca ed estrinseca che collegano infiammazione e cancro (Mantovani *et al.*, 2008).

L'attivazione di questi fattori comporta, oltre al reclutamento e l'attivazione di un gran numero di leucociti, la produzione di numerosi mediatori dell'infiammazione, comprese citochine e chemochine, e di enzimi quali iNOS (Nitrossido Sintasi) e COX-2 (Ciclossigenasi di tipo 2), entrambi di fondamentale importanza nell'infiammazione.

La NOS è un enzima che catalizza la conversione dell' L-arginina in L-citrullina con concomitante formazione di ossido nitrico (NO), uno dei principali mediatori dell'infiammazione.

L'enzima NOS è classificato in diverse sottofamiglie in base sia alla localizzazione sia alle modalità di espressione nell'organismo, vale a dire, costitutiva o inducibile.

La NOS costitutiva è rilevata nei tessuti neuronali (nNOS) e nelle cellule endoteliali vascolari (eNOS), mentre la NOS inducibile (iNOS) è espressa in diversi tipi cellulari, tra cui i macrofagi, soprattutto in condizioni patologiche. In seguito a stimoli infettivi e pro-infiammatori, la proteina iNOS viene indotta e produce NO in quantità molto più elevate rispetto a quello costitutivamente prodotto (Murakami *et al.* 2007).

La iNOS è un enzima che richiede per la sua attività cofattori quali NADPH (a differenza delle forme costitutive la cui attività è dipendente dal complesso calcio/calmodulina) e tetraidrobiopteridina. La sua espressione è indotta essenzialmente da stimoli batterici, come il lipopolisaccaride (LPS), e da citochine, come il TNF- α e l'interleuchina-1 β , oltre che da linfocine ed interferone γ . Stimoli come quelli prodotti da TNF- α o IL-1 β inducono la trascrizione della iNOS tramite l'attivazione dei fattori di trascrizione NF- κ B e IRF-1 (Saura *et al.*, 1999). Questo pathway è importante nei casi d' infezione microbica, dove la citotossicità mediata dall'NO può risultare fondamentale per la lotta contro l'infezione, tuttavia endotossine o TNF α non sono normalmente presenti nei tumori (Tendler *et al.*, 2001). Nelle parti centrali e non ben vascolarizzate della massa tumorale invece, si instaurano spesso condizioni di ipossia che risultano essere efficaci nell'interagire sinergicamente con l'IFN- γ (Interferone gamma) nell'indurre l'espressione di iNOS attraverso l'interazione tra HIF-1 α e IRF-1 (Tendler *et al.*, 2001; Melillo *et al.*, 1995) (fig.4).

Numerosi studi hanno messo in correlazione l'NO ed il processo neoplastico. L'NO sarebbe coinvolto nell'acquisizione di proprietà metastatiche da parte di tumori benigni in modelli di progressione neoplastica su base infiammatoria (Okada *et al.* 2006) ed attiverebbe, in maniera indiretta, processi di invasione e metastatizzazione tramite induzione di MMP e VEGF (Ishii *et al.* 2003; Kimura *et al.* 2002).

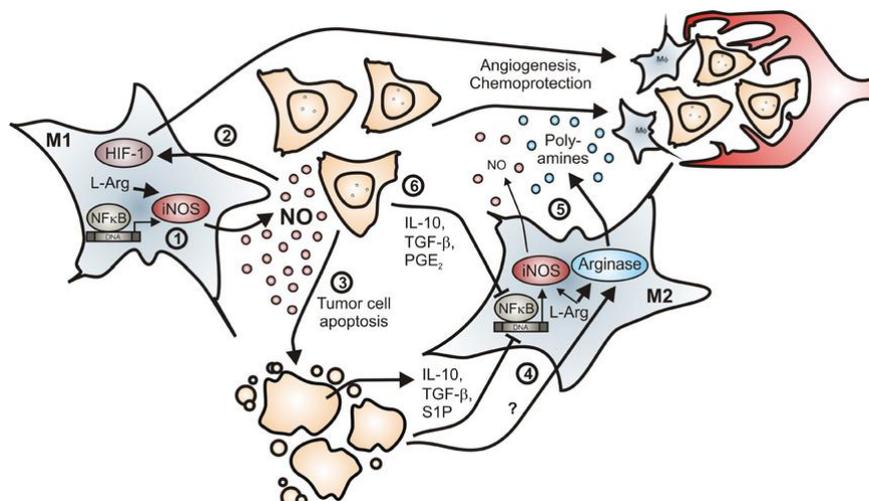


Figura 4- NO prodotto dai macrofagi e progressione tumorale (Weigert *et al.*, 2008).

La COX-1 e la COX-2 catalizzano tappe fondamentali nella formazione di prostanoidei anch'essi centrali mediatori del processo infiammatorio. Mentre la COX-1 è costitutivamente espressa in molti tessuti, in cui controlla normali processi fisiologici, la COX-2 non è rilevabile in condizioni normali (tranne che nel sistema nervoso centrale, reni e vescicole seminali) ma è indotta da stimoli infiammatori e mitogeni. Fattori di crescita (quali EGF e PDGF (platelet-derived growth factor), citochine pro-infiammatorie (come IL-1, IL-2 e TNF), promotori tumorali, acidi biliari, LPS e radiazioni UV sono tutti stimolanti della COX-2 (Chen *et al.* 2001; Dempke *et al.* 2001; Peppelenbosch *et al.* 1993; Zhang *et al.* 1998).

La COX-2 viene, infatti, definita come la forma inducibile e viene considerata come il mediatore che meglio rappresenta le risposte infiammatorie, sia perché la sua espressione è altamente influenzata da stimoli infiammatori, sia perché gioca un ruolo chiave nel processo di carcinogenesi a cui partecipa attivamente con la produzione di sostanze cancerogene capaci di influenzare: apoptosi, angiogenesi e invasione (Dannenberg *et al.*, 2001). In particolare, nell'angiogenesi tumorale riveste particolare importanza la capacità di questo enzima nel catalizzare la produzione di prostanoidei tra cui PGE₂ (prostaglandin E2) e TXA₂ (thromboxane A2) in grado a loro volta di indurre il rilascio di fattori pro-angiogenici come il VEGF (Sawaoka *et al.* 1999).

1.3.1 Componenti cellulari del microambiente infiammatorio

L'infiltrato leucocitario costituisce una componente importante del microambiente tumorale; esso varia per grandezza, composizione e distribuzione ed è presente in molti tipi di tumori solidi. Uno dei componenti dell'infiltrato infiammatorio, in grado di influenzare il comportamento del tumore, sono le cellule T-reg (T-regulatory) che furono identificate per la prima volta nel 1971 da Gershon e Kondo (Gershon and Kondo, 1971). Queste cellule sono classificate come CD4⁺, CD25⁺, FoxP3⁺ e intervengono nella risposta a malattie autoimmuni sopprimendo le cellule self-reattive e bloccando la risposta anti-tumorale. L'importanza delle cellule T-

reg è stata dimostrata grazie ad esperimenti in cui è stato visto che la deplezione intra-tumorale di cellule T CD4⁺ può portare all' eradicazione del tumore e allo sviluppo di una memoria anti-tumorale a lungo termine (Yu *et al.*, 2005).

Anche i neutrofili, presenti in molti tumori, sono in grado di acquisire un fenotipo pro-tumorale in seguito a stimolazione da parte del TGF- β (Fridlender *et al.*, 2009). Inoltre è stato dimostrato che i linfociti B hanno la capacità di promuovere la tumorigenesi attraverso la produzione di anticorpi o secrezione di fattori come ad esempio le linfotossine (de Visser *et al.*, 2006; DeNardo *et al.*, 2010; Ammirante *et al.*, 2010b).

Tuttavia, le cellule maggiormente presenti, sia a livello dei tumori sia delle metastasi, sono i macrofagi, cellule differenziate caratterizzate da un fenotipo caratteristico e dall' espressione di particolari markers (Gordon and Taylor, 2005). Nei topi, i macrofagi esprimono CD11b, F4/80, e il recettore per CSF-1 (colony-stimulating factor-1). Nell'uomo i marcatori caratteristici dei macrofagi sono CD68, CD163, CD16, CD312 e CD115. Queste caratteristiche permettono di distinguere i macrofagi dagli altri membri della linea mieloide come neutrofili ed eosinofili (Joyce and Pollard, 2009).

I macrofagi sono distinti in due popolazioni (M1 e M2) in base al loro profilo trascrizionale e alle citochine prodotte le quali determinano i loro effetti nel favorire o inibire la crescita del tumore (Martinez *et al.*, 2009). I macrofagi M1 intervengono nella prima fase dell'infiammazione e provvedono ad eliminare gli invasori grazie alla produzione di intermedi reattivi dell'ossigeno (e.g. O₂⁻ e OH⁻) e dell'azoto (e.g. NO⁻, NO₂⁻, ONOO⁻) e di citochine infiammatorie (IL-1beta, TNFalfa, IL-6); inoltre, mediano la resistenza verso parassiti intracellulari.

I macrofagi M2 sono associati alla presenza di citochine del tipo T helper 2 (come IL-4 e IL-13) e possono essere identificati usando specifici markers grazie all'espressione di recettori per il mannosio e l' arginasi, per la presenza di alti livelli di IL-10 e bassi livelli di MHC-II e IL-12. Questi bloccano l'azione degli M1, provvedono a 'ripulire' la zona eliminando i detriti rimasti e producono importanti fattori capaci di riparare e ricostruire il tessuto danneggiato in modo da favorire una corretta rivascolarizzazione (Sica *et al.* 2007).

1.3.2 Macrofagi associati al tumore (TAMs)

I macrofagi associati al tumore (TAMs) hanno un fenotipo simile ai macrofagi M2 anche se presentano elementi comuni al tipo M1. Questi producono una serie di fattori che promuovono la crescita del tumore come EGF, VEGF (Lewis *et al.*, 2000; O'Sullivan *et al.*, 1993), citochine ed enzimi che promuovono l' invasività, l' angiogenesi, la metastatizzazione e la down-regolazione dell' espressione da fattori anti-angiogenici come IL-12 (Sica *et al.*, 2000).

In generale, l'aumento del numero di TAMs è significativamente associato a prognosi infausta, suggerendo il loro ruolo nella progressione maligna di molti tumori solidi (tiroide, polmone ed epatocarcinoma) (Zhu *et al.*, 2008).

La differenziazione, crescita e chemiotassi dei macrofagi sono regolate da numerosi fattori di crescita, come CSF-1, GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), IL-3 e chemochine come CCL-2 (Pollard, 2009). Nei tumori al seno, ovaio, endometrio, prostata, fegato e colon retto l'overespressione di CSF-1, il principale regolatore dei macrofagi, è associata ad una prognosi infausta (Grobewska *et al.*, 2007; Mantovani and Sica, 2010; Zhu *et al.*, 2008). Anche

l'overespressione di CCL-2 è associata a prognosi infausta nei tumori al seno, tiroide e colon retto (Tanaka *et al.*, 2009), mentre la sua assenza è associata ad un incremento della sopravvivenza nelle pazienti affette da cancro alla cervice (Zijlmans *et al.*, 2006). Il coinvolgimento di CSF-1 e CCL-2 nel reclutamento di macrofagi è stato confermato da evidenze sperimentali. Infatti, l'ablazione genetica di CSF-1, in un modello di tumore al colon e di osteosarcoma ha ridotto la malignità e lo sviluppo del tumore (Oguma *et al.*, 2008; Kubota *et al.*, 2009). Risultati simili sono stati ottenuti con approcci terapeutici nei quali, utilizzando antisenso o anticorpi che inibiscono CSF-1 o il suo recettore, si è osservato un ridotto reclutamento dei macrofagi e di conseguenza una inibizione della crescita e della metastatizzazione del tumore (Abraham *et al.*, 2010; Aharinejad *et al.*, 2009).

Anche l'ipossia, che si genera nei siti del tumore gioca un ruolo chiave nel determinare il fenotipo dell'infiltrato di monociti. Infatti, i TAMs sono reclutati nei siti d'ipossia e di necrosi (Lewis *et al.*, 2000) e in tali condizioni sono in grado di regolare positivamente HIF1/2 inducendo l'espressione di geni responsivi ad HIF come il VEGF e TIE-2 (tyrosine kinase with Ig and EGF homology domains) e in tal modo di creare un ambiente pro-angiogenico. TIE-2 è un recettore ad attività tirosin chinasi espresso prevalentemente sulla superficie di cellule endoteliali, attivato dall'angiopoietina-2 (ANG-2) e che modula la stabilità dei vasi e l'angiogenesi (Murdoch *et al.*, 2007).

I TAMs svolgono diverse funzioni nelle varie fasi del tumore; promuovono lo sviluppo del tumore, la sua progressione, la sua metastatizzazione e favoriscono la formazione di nuovi vasi (Qian and Pollard, 2010) (fig. 5). Sono state descritte due ipotesi d'iniziazione del tumore; una strettamente correlata alla presenza di una componente infiammatoria e un'altra, definita spontanea, che deriva da mutazioni ereditarie. Nel primo caso i TAMs creano un ambiente mutageno generato dal rilascio di NO e altre specie radicaliche dell'ossigeno (Pang *et al.*, 2007). In particolare, NO reagisce con le perossidasi producendo nitrosoperossicarbonato, una specie molto reattiva che causa mutazioni nelle adiacenti cellule epiteliali (Pang *et al.*, 2007).

Nella seconda ipotesi, invece, l'origine del tumore deriva da mutazioni spontanee o ereditarie non associate a fenomeni flogistici. Tuttavia, in entrambi i casi i TAMs svolgono un ruolo chiave nella progressione del tumore primario.

Infatti il tumore primario rilascia molecole chemioattrattive come CSF-1 e chemochine come CCL-2 richiamando monociti che differenziano in macrofagi e che creano un microambiente infiammatorio. I macrofagi attivati producono EGF il quale a sua volta promuove la migrazione delle cellule tumorali (Wyckoff *et al.*, 2004). Tuttavia i recettori per CSF-1 e per EGF sono presenti sia sulla superficie delle cellule tumorali che sui macrofagi, infatti l'inibizione del segnale di EGF e CSF-1 determina un blocco della migrazione di entrambi i tipi cellulari (Wyckoff *et al.*, 2004; Wyckoff *et al.*, 2007). In rari casi, come nel tumore al seno, viene a mancare questa interazione paracrina, ossia l'EGF ha effetto solo sui macrofagi mentre CSF-1 solo sulle cellule tumorali (Leek *et al.*, 2000). La polarizzazione dei macrofagi e il cambiamento del fenotipo, che li rende capaci di promuovere la migrazione e l'invasività, è regolata dall'IL-4 sintetizzata dalle cellule T CD4⁺ o dalle cellule tumorali. In assenza di IL-4 i macrofagi non sono in grado di promuovere l'invasività e la migrazione delle cellule tumorali e le metastasi sono notevolmente ridotte (DeNardo *et al.*, 2009; Gocheva *et al.*, 2010).

La migrazione sia delle cellule tumorali che dei macrofagi può essere inibita da altri fattori di crescita come l'eregulina e CXCL12 sintetizzati dalle cellule tumorali, fibroblasti e periciti. Anche la matrice extracellulare, che gioca un ruolo importante

nell'invasività del tumore, è regolata dall'attività dei macrofagi. Questi, infatti, sintetizzano SPARC/osteonectina la quale è importante per la deposizione di collagene IV e per l'adesione di altri componenti dell'ECM come la fibronectina, favorendo così la formazione di metastasi dal tumore primario. È stato dimostrato che i macrofagi sono anche in grado di stimolare la sintesi del Collagene Fibrillare 1 che favorisce il processo d'invasività (Ingman *et al.*, 2006).

Tuttavia la migrazione cellulare attraverso la membrana basale e lo stroma richiede una degradazione proteolitica della matrice. I macrofagi, infatti, producono molte proteasi come catepsina, MMPs e serine proteasi che giocano un ruolo fondamentale nella progressione e metastatizzazione del tumore (Egeblad and Werb, 2002; Joyce and Pollard, 2009). Infatti la deplezione di catepsina B e S dai macrofagi determina una riduzione dell'invasività del tumore e una inibizione delle metastasi in modello murino di tumore mammario.

Molti tumori presentano un notevole aumento della densità dei vasi, che determina la transizione del tumore da benigno a maligno, in un processo definito come "switch angiogenico". La formazione di nuovi vasi è un processo complesso che coinvolge molti tipi di cellule tra cui anche i macrofagi. Infatti, l'overespressione di CSF-1, in un modello murino, ha determinato un accumulo prematuro di macrofagi nella lesione iperplastica, un precoce switch angiogenico e di conseguenza ha accelerato la transizione verso la malignità (Lin and Pollard, 2007). La produzione di VEGF, un importante induttore della neoangiogenesi, da parte dei macrofagi può avvenire attraverso un meccanismo duplice. I macrofagi esprimono costitutivamente HIF-1 α , che nei siti ipossici del tumore, si attiva e promuove la trascrizione di geni associati alla neoangiogenesi. Tuttavia i macrofagi possono produrre VEGF anche attraverso la produzione di MMP-9, il quale rilascia VEGF dai depositi extracellulari.

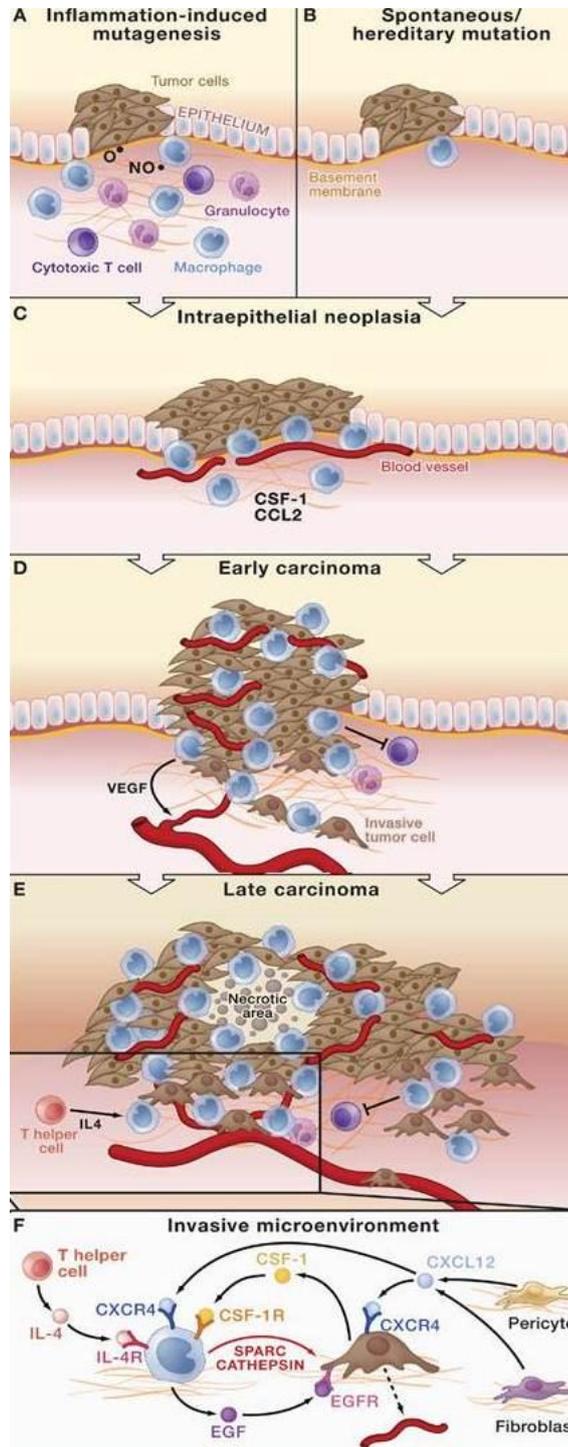


Figura 5- I macrofagi promuovono l' iniziazione, la progressione e la malignità del tumore (Qian and Pollard, 2010).

1.4 Neoangiogenesi tumorale

La neoangiogenesi è un processo sia fisiologico sia patologico sia implica una cascata di eventi sequenziali che portano alla formazione di nuovi vasi sanguigni da unità pre-esistenti. Ciò si realizza attraverso la dissoluzione della membrana del vaso originale, la migrazione e proliferazione delle cellule endoteliali e formazione di un nuovo tubo vascolare (Choi *et al.*, 2003). Essa gioca un ruolo importante durante lo sviluppo embrionale (Breier, 2000), mentre negli organismi adulti è limitata solo ad alcuni processi fisiologici, come la cicatrizzazione delle ferite, l'ovulazione, la gravidanza e il ciclo mestruale (Maas *et al.*, 2001). Diventa, invece, attiva in numerose condizioni patologiche (angiogenesi patologica), quali tumori, ischemia cronica, retinopatia proliferativa, artrite reumatoide e psoriasi (Krikun *et al.*, 2004).

Negli ultimi anni è divenuto sempre più chiaro che, come proposto da Judah Folkman nel 1972, la neoangiogenesi è una fase essenziale nella crescita e nello sviluppo di una massa tumorale; infatti, i tumori crescono e assumono capacità invasive quando sono in grado di formare una rete capillare connessa a quella dell'ospite (Folkman, 1972).

Diversi esperimenti hanno permesso di comprendere l'importanza del microambiente nella regolazione della crescita neoplastica e di elaborare la teoria dell'inibizione dell'angiogenesi tumorale come strumento terapeutico nel suo controllo arrestando la progressione tumorale (Dvorak H., 2002). Le cellule neoplastiche hanno bisogno di circondarsi di una fitta rete di vasi dai quali ricevono ossigeno, nutrimento, fattori di crescita e allo stesso tempo la utilizzano per la diffusione di metastasi. Il tumore dovrà quindi conquistare l'accesso alla vascolarizzazione dell'ospite e crearne una propria.

Per raggiungere questo obiettivo i tumori si sottopongono a un processo detto switch angiogenico (produzione di segnali che stimolano l'angiogenesi). Lo switch angiogenico che stimola l'angiogenesi tumorale è dovuto a uno sbilanciamento dell'omeostasi tra inibitori e attivatori naturali dell'angiogenesi e tale squilibrio può essere indotto da diversi stimoli come lo stress metabolico (ipossia, basso pH o ipoglicemia), stress meccanici (pressione generata da cellule in proliferazione) risposte infiammatorie e immunitarie (infiltrazione delle cellule nei tessuti), mutazioni geniche di geni codificano per le molecole regolatrici (Carmeliet P. *et al.*, 2000).

La rete vascolare che ne deriva si presenta come rimodellata, assume un profilo irregolare, diametro dilatato e non uniforme, tortuosità, elevata permeabilità e tendenza all'emorragia. Nei vasi tumorali il flusso sanguigno è di solito incostante, è rallentato dalla struttura caotica e può quindi indurre una disfunzione a livello capillare.

L'angiogenesi è un processo multistep e sono numerosi i sistemi molecolari coinvolti nella sua regolazione. Coinvolge molteplici interazioni tra cellule tumorali, cellule endoteliali, macrofagi, fibroblasti e la matrice extracellulare; tutte queste componenti cellulari sono in grado di rilasciare fattori pro-angiogenici come il VEGF, bFGF (basic Fibroblast Growth Factor), PDGF, chemochine ed altri, che diffondono nei tessuti vicini e si legano ai recettori delle cellule endoteliali (EC) dei vasi sanguigni preesistenti, portando alla loro attivazione e proliferazione. La neoangiogenesi avviene grazie a un programma d' induzione angiogenica ben codificato. Nel primo step, il capillare della membrana basale (BM) è degradato da enzimi proteolitici (Folkman and D'Amore, 1996; Folkman, 1995) prodotti dalle cellule stromali, dalle cellule

endoteliali e dalle cellule tumorali stesse (Egeblad and Werb, 2002). La degradazione dei capillari BM ha molteplici scopi, tra cui il rilascio delle cellule endoteliali che possono iniziare a migrare e proliferare, il rilascio di fattori di crescita sequestrati (VEGF e bFGF) e il distacco dei periciti che circondano e sostengono i vasi sanguigni (fig. 6).

Questo induce la formazione di un intermedio, e poi di un nuovo vaso maturo (VBM) dopo il reclutamento di cellule periendoteliali, come periciti, e di fibro-cellule muscolari lisce.

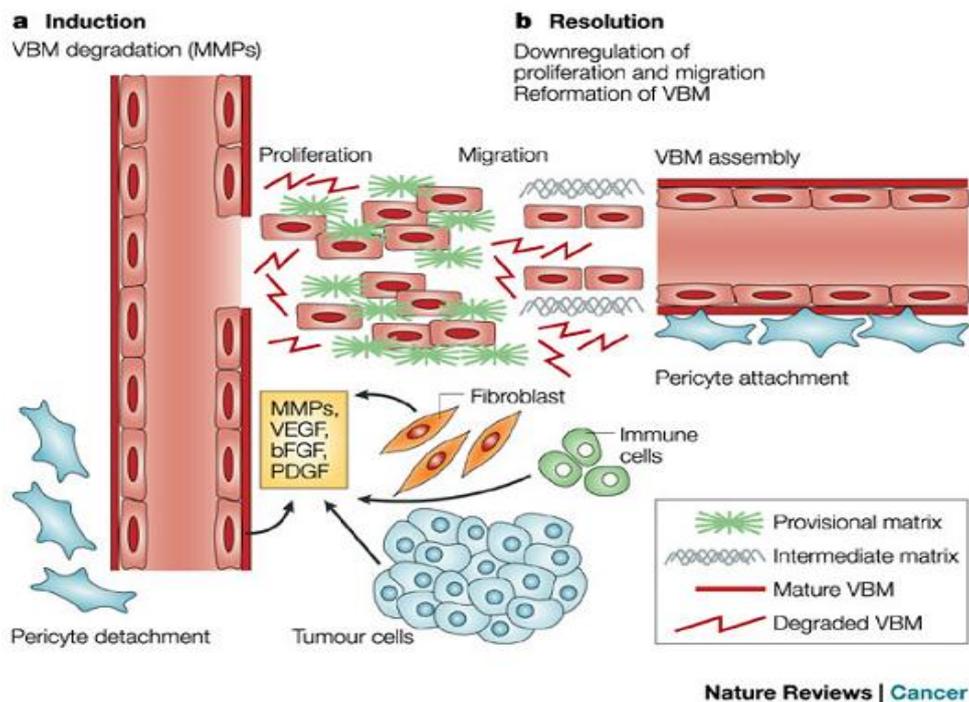


Figura 6 Meccanismo del processo angiogenico associate al tumore (Nature Reviews, Kalluri, 2003)

I vasi tumorali neoformati mancano dei meccanismi di protezione che normalmente i vasi normali acquistano durante la crescita, ad esempio, di cellule perivascolari funzionali, che sono necessarie per proteggere i vasi contro le variazioni ormonali e di ossigeno, fornendo loro il necessario controllo vasoattivo per soddisfare i bisogni metabolici e indurre la quiescenza vascolare (Benjamin *et al.*, 1999).

L'organizzazione caotica della rete vascolare si abbina anche ad un'espressione non uniforme delle molecole di adesione e questo può spiegare perché l'interazione tra endotelio e leucociti attivati avviene diversamente nei vasi tumorali.

Tutte queste condizioni riducono notevolmente le possibilità terapeutiche di farmaci antitumorali, che raggiungono il tumore attraverso il circolo e facilitano la selezione di cloni tumorali più aggressivi e maligni.

1.4.1 Fattori pro-angiogenici

Le molecole che agiscono da induttori del processo di angiogenesi comprendono diverse proteine tra cui il VEGF, bFGF, angiogenina, TGF- α e TGF- β , TNF- α , PDGF, GM-CSF, PlGF (placenta growth factor), interleuchina-8, HGF 3, EGF. (Tabella I).

Oltre a questi, sono stati descritti numerosi altri fattori angiogenici, inclusi l'angiopoietina, il Tie-2, e le integrine.

Tra questi, il PDGF risulta essere particolarmente importante, infatti studi condotti da Betsholtz *et al.* (2001) hanno dimostrato rilevanti proprietà angiogeniche sia in vivo sia in vitro. Si ritiene che il ruolo principale del PDGF nella regolazione dell'angiogenesi è mediato dalla sua capacità di modulare le funzioni dei periciti.

Attualmente, sono stati identificati quattro membri della famiglia del PDGF, in grado di formare omo- ed eterodimeri. PDGF-BB è un omodimero in grado di up-regolare il VEGF nelle cellule vascolari della muscolatura liscia, che a sua volta aumenta la sopravvivenza (Reinmuth *et al.*, 2001) e la proliferazione (Hsu *et al.*, 1995) delle cellule endoteliali.

Activators	Inhibitors
Growth factors	
Vascular endothelial growth factor family	
Acidic and basic fibroblast growth factor	
Angiogenin	
Angiostatin	
Transforming growth factor	
Tumor necrosis factor- α	
Plated-delivered endothelial growth factor	
Hepatocyte growth factor	
Epidermal growth factor	
Placental growth factor	
Granulocyte colony stimulating factor	
Cytokines	
Interleukin-1	
Interleukin-6	Interleukin-10
Interleukin-8	Interleukin-12
Proteases and protease inhibitors	
Cathepsin	Tissue inhibitor metalloprotease
Gelatinase A, B	Prasminogen activator-inhibitor-1
Stromelysin	
Urokinase-type plasminogen activator	
Trace elements	
Copper	Zinc
Oncogenes	
c-myc ras	p53 Rb
c-src v-raf	
c-jun	
Endogenous modulators	
Alpha 5 Beta 3 integrin	Angiopoietin-2
Angiopoitin-1	Angiotensin
Angiostatin II (AT1 receptor)	Angiostatin II (AT2 receptor)
Endothelin	Caveolin-1, -2
Erythropoietin	Endostatin
Hypoxia	Interferon-alpha
Nitric oxide synthase	Isoflsvones
Plated-activating factor Platerat factor 4	
Prostaglandin E	
Prolactin (16 kd fragment)	

Abbreviations: AT1, angiotensin-1; AT2, angiotensin-2.

Tabella I Regolatori endogeni dell' angiogenesi, (Nishida *et al.*, 2006).

1.4.2 II VEGF

I membri della famiglia del VEGF sono secreti come glicoproteine dimeriche di circa 40 kDa. Questa famiglia è composta da cinque membri, VEGF-A,-B,-C,-D e dal PlGF (Leung *et al.*, 1989; Maglione *et al.*, 1991; Olofsson *et al.*, 1996; Joukov *et al.*, 1996; Orlandini *et al.*, 1996) (tabella II). Questi svolgono un ruolo fondamentale e specifico nella neoangiogenesi: regolando la proliferazione, migrazione, permeabilità e sopravvivenza delle cellule endoteliali derivate da vene, arterie e vasi linfatici (Conn *et al.*, 1990; Ferrara *et al.*, 1996; Plou *et al.*, 1989). Sebbene l'endotelio sia il principale bersaglio, sono stati riportati molti studi sugli effetti mitogeni che riguardano altri tipi cellulari come monociti e macrofagi, neuroni, cellule tumorali, cellule epiteliali del rene.

Tutti i membri condividono una regione altamente conservata (VHD), che contiene i siti di legame al VEGFR; composta da otto residui di cisteina tipicamente distanziati (Ferrara *et al.*, 2003).

Il VEGF è rilasciato da molti tipi di cellule e la sua espressione è regolata da citochine pro-infiammatorie come IL-1, IL-6 e fattori di crescita come EGF, TGF- α , PDGF, FGF. I livelli di espressione sono regolati anche dalla tensione di ossigeno presente nei tessuti; in condizioni d'ipossia vi è un aumento del rilascio, attraverso una regolazione a livello trascrizionale. Questa regolazione avviene mediante la stimolazione del fattore trascrizionale HIF-1 α (Claffey K.P. *et al.*, 1998). Al contrario, la normoxia induce una down-regolazione della produzione di VEGF e una regressione della formazione dei vasi (Mukhopadhyay D. *et al.*, 1995; Ikeda E. *et al.*, 1995).

L'effetto specifico è dovuto all'interazione selettiva con i loro recettori, VEGFR-1, denominato anche Fms-like tirosine kinase Flt-1, VEGFR-2, denominato anche Kinase domain receptor (KDR umano o Flk-1 murino) e VEGFR-3; denominato anche fms-like tyrosine kinase (flt)-4 (Shibuya *et al.*, 1990; Terman *et al.*, 1991; Pajusola *et al.*, 1992).

Il VEGF-A, definito anche in generale VEGF, è stato tra i vari membri della famiglia il più studiato per la sua importanza nell'angiogenesi sia fisiologica sia associata al tumore. Il gene che codifica per il VEGF-A è localizzato sul braccio corto del cromosoma 6 e da uno splicing alternativo si originano diverse isoforme con diverse attività biologiche. Le isoforme umane sono indicate come VEGFA₁₂₁, VEGFA₁₄₅, VEGFA₁₆₅, VEGFA₁₈₉ e VEGFA₂₀₆. L'attività delle diverse isoforme del VEGFA dipendono dalle loro diverse capacità di interagire con il VEGFR e con i co-recettori quali quelli delle neuropiline e dell'eparina (fig. 7 b, c). In particolare, il VEGFA lega sia il VEGFR-1 sia VEGFR-2 (fig.7).

Il VEGF-A_{165b} è un naturale antagonista del VEGF-A, che si lega al VEGFR-2 con la stessa affinità di VEGF₁₆₅, ma non attiva a valle alcuna via di segnalazione (Woolard *et al.*, 2004). L'affinità per l'eparina influisce sulla biodisponibilità di questi fattori di crescita, dal momento che le isoforme eparina-dipendenti sono sequestrate dalle catene di eparan solfato dei proteoglicani della ECM e sono attive solo una volta liberate dalle attività di eparinasi, MMPs, plasmina o urochinasi (Plouet *et al.*, 1997). Al contrario, le isoforme non-eparina dipendenti sono liberamente diffusibili (Ferrara *et al.*, 2003).

Il VEGF-B è codificato da un gene di circa 4000 bp localizzato nel cromosoma 11; dallo splicing alternativo dell'mRNA si ottengono due isoforme: VEGF-B₁₆₇ e VEGF-B₁₈₆. La regione promoter del gene del VEGF-B presenta notevoli differenze con quella del VEGF-A e questo si riflette in una diversa regolazione della

trascrizione. Il promotore presenta il sito Egr-1 (early growth response protein 1) ma non il sito HIF-1 α . Di conseguenza l'ipossia (Ristimaki A. *et al.*, 1998) regola l'espressione del VEGF-A, ma non del VEGF-B. I meccanismi di regolazione di questo gene non sono del tutto noti. Inoltre il VEGF-B lega VEGFR-1 ma non VEGFR-2 o VEGFR-3 e l'attivazione di questo recettore induce un debole effetto mitogeno (fig.7).

Il ruolo in vivo del VEGF-B non è chiaro; tuttavia, poiché il fattore è espresso nel muscolo striato, miocardio e tessuto adiposo bruno, si è ipotizzato che la sua funzione sia associata al metabolismo energetico (Enholm B. *et al.*, 1997); è nota anche una sua funzione nell'angiogenesi infiammatoria (Mould A.W. *et al.*, 2003).

Il VEGF-C appartiene alla famiglia dei fattori di crescita PDGF e lega le forme recettoriali VEGFR-2 e VEGFR-3 (fig.7) (Joukov V. *et al.*, 1997). E' prodotto come precursore proteico e la forma matura ha un effetto fitogeno ed induce la migrazione e la sopravvivenza delle cellule endoteliali (Saharinen P. *et al.*, 2004). Poiché il recettore VEGFR-3 è espresso sui vasi linfatici, la sua attivazione induce selettivamente la linfoangiogenesi (Jeltsch M. *et al.*, 1997). La trascrizione dell'mRNA del VEGF-C è indotta in risposta a citochine pro-infiammatorie come l' IL-1; la regolazione da parte di queste citochine indica che il VEGF-C può regolare la funzione dei vasi linfatici durante l'infiammazione e le risposte immuni (Neufeld G. *et al.*, 1994). Inoltre, l'over-espressione di VEGF-C in topi transgenici induce linfoangiogenesi e promuove lo sviluppo di metastasi nel tumore pancreatico e gastrico.

Il VEGF-D lega e attiva i recettori VEGFR-2 e VEGFR-3 (fig.7). Ha quindi un'azione fitogena, angiogenica e linfogenica. Studi recenti hanno dimostrato che l'ipossia stimola la sua espressione attraverso una regolazione a livello trascrizionale (Nilsson I. *et al.*, 2004). Il VEGF-D è presente in molti tessuti umani ma è particolarmente abbondante a livello dei polmoni e della pelle, soprattutto nella fase embrionale (Farnebo F. *et al.*, 1999).

Il PIGF (Placental Growth Factor) fu isolato per la prima volta nel 1991 da una libreria di cDNA di placenta umana ma è espresso anche a livello del cuore e dei polmoni (Persico M.G. *et al.*, 1999). E' capace di stimolare le cellule endoteliali in vitro e in vivo (Ziche M. *et al.*, 1997). Il PIGF non interagisce direttamente con VEGFR-2 ma lega VEGFR-1, suggerendo un'azione indiretta sull' angiogenesi. E' stato, infatti, proposto che PIGF, legando VEGFR-1, spiazzati il VEGF, che è, quindi, disponibile per attivare VEGFR-2 (Carmeliet P.*et al.*, 2001). Recentemente, ricorrendo a topi transgenici in cui il gene di PIGF era stato disattivato, è stato definito chiaramente il coinvolgimento di PIGF e VEGFR-1 in molti stati patologici associati all'angiogenesi (Carmeliet P.*et al.*, 2001), dimostrando che il blocco della loro azione sopprime la neovascolarizzazione in tumori e nella retina ischemica. (Luttun A. *et al.*, 2002).

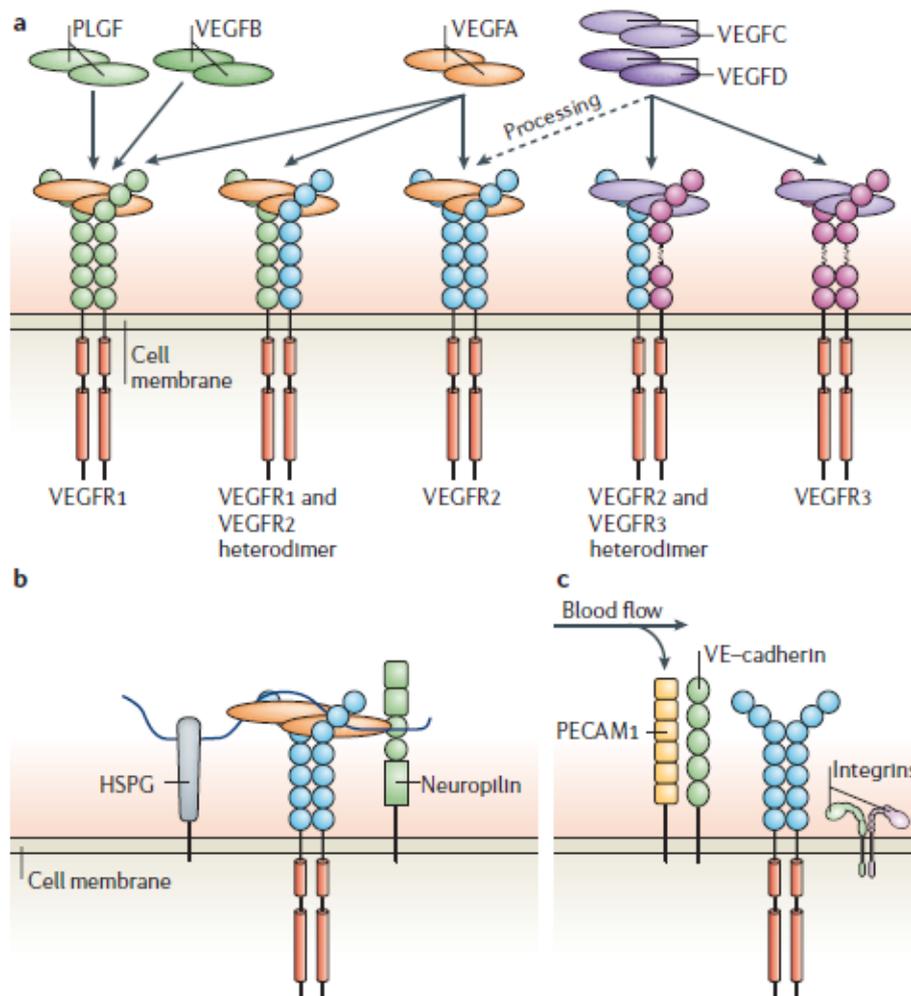


Figura 7- Il legame delle isoforme del VEGF ai loro specifici recettori (Reviews, Olsson *et al.*, 2006).

	VEGF Homology Domain (incl. cystein knot motif)	Length of isoforms* (aa)	% identity with VEGF-A165	Heparin interaction	Heterodimerization with	Receptors
VEGF-A	NH2 CCCCCCCC COOH	121, 145, 148, 162, 165, 165b, 183, 189, 206	100	145, 148, 162, 165, 183, 189, 206	PIGF-1 VEGF-B (VEGF-A ₁₆₅)	VEGFR-1 VEGFR-2 NP-1 (VEGF-A ₁₆₅) NP-2 (VEGF-A ₁₄₅ , VEGF-A ₁₆₅)
PIGF-1, -2, -3, -4	CCCCCCCC	131, 152, 203, 224	42-53	152, 224	VEGF-A ₁₆₅ VEGF-A ₁₂₁ (PIGF-1, PIGF-2)	VEGFR-1 NP-1 (PIGF-2) NP-2 (PIGF-2)
VEGF-B	CCCCCCCC	167, 186	41	167	VEGF-A ₁₆₅	VEGFR-1 NP-1
VEGF-C, -C156S	VEGF-C156S Cys → Ser XXXXXXXXXX BR3P	388	32	no	-	VEGFR-2 (VEGF-C) VEGFR-3 NP-2
VEGF-D	XXXXXXXXXX BR3P	333	31	no	-	VEGFR-2 VEGFR-3 NP-2
VEGF-E (viral strains NZ-2, NZ-7, NZ-10, D1701, VR634)	CCCCCCCC	133	16-29	NZ-2	-	VEGFR-2 NP-1 (NZ-2, -10, D1701)
TfsvVEGF	CCCCCCCC	110-122	50	yes	-	VEGFR-1 VEGFR-2

BR3P: Balbiani ring 3 protein
 C, Cys: Cysteine
 NP: Neuropilin
 Ser: Serine
 TfsvVEGF: Trimeresurus flavoviridis snake venom VEGF
 VEGFR: VEGF receptor

*Length of isoforms refers to the human forms except for VEGF-E and TfsvVEGF
 The VEGF homology domain is drawn in yellow, the peptide extensions of the VEGF-C and -D pre-propeptides in black
 VEGF family members in brackets are the respective isoforms forming heterodimers or binding to indicated receptors

Tabella II. Struttura e proprietà di interazione e di legame dei membri della famiglia del VEGF

1.4.3 Attività biologica dei recettori del VEGF

I recettori del VEGF appartengono alla famiglia dei recettori tirosin chinasi, ossia recettori che presentano all'interno della stessa molecola la funzione di recettore e di enzima. Da un punto di vista strutturale hanno una porzione extracellulare di circa 750 amminoacidi (catena N-terminale) costituita da sette domini immunoglobulin-like e contenenti il sito di legame per il ligando, una regione idrofobica che attraversa la membrana e una porzione intracellulare (catena C-terminale) che contiene il dominio chinasi responsabile dell'attività catalitica. Il dominio chinasi dei tre recettori presenta l'80% di similarità mentre la porzione extracellulare presenta scarsa omologia garantendo una specificità di substrato. Quando il recettore non è stimolato, il sito attivo è nascosto e il recettore non ha attività catalitica.

Oltre che come recettori transmembrana, VEGFR-1 e VEGFR-2 sono anche prodotti come forma solubile derivanti da uno splicing alternativo e costituiti solo dal dominio extracellulare (Kendall *et al*, 1996; Ebos *et al*, 2004). VEGFR-1 solubile può agire come un inibitore competitivo andando a sequestrare VEGF-A, VEGF-B e PIGF. Inoltre, può legare VEGFR-1 e -2 presenti in membrana, attraverso una

eterodimerizzazione e inattivarli. Da ciò deriva che, numerosi studi si sono incentrati sul ruolo di sVEGFR-1 al fine di utilizzarlo come un potenziale inibitore dell'angiogenesi in una varietà di tumori. (Goldman *et al.*, 1998; Maynard *et al.*, 2003). Il significato funzionale di sVEGFR-2 è, invece, ancora sconosciuto.

Il legame del VEGF ai recettori determina un cambio conformazionale che porta all'esposizione del sito attivo e all' innesco della trasduzione del segnale intracellulare che prevede dimerizzazione del recettore e autofosforilazione a livello dei residui di tirosina. Inoltre, VEGFR-1 può trans-fosforilare VEGFR-2, portando a un potenziamento delle funzioni biologiche mediate dal VEGF-A (Autiero *et al.*, 2003). Recenti studi hanno anche dimostrato la formazione di VEGFR-1/2 così come VEGFR-2/3 eterodimeri (fig 7). Tuttavia, mentre ci sono prove che VEGFR-1/2 eterodimeri possono essere più attivi dei rispettivi omodimeri, non ci evidenze biologiche riguardo l' eterodimerizzazione VEGFR-2/3 (Autiero *et al.*, 2003; Dias *et al.* 2002).

Durante lo sviluppo embrionale, VEGFR-1 agisce principalmente come regolatore negativo della vasculogenesi e dell'angiogenesi in quanto topi privi di tale recettore mostrano una proliferazione incontrollata delle cellule endoteliali, che si traduce nell' ostruzione del lume dei vasi (Fong *et al.* 1995).

Nell'adulto, VEGFR-1 è in grado di indurre segnali di crescita e sopravvivenza in cellule endoteliali e periciti del sangue attraverso la PLC- γ (phospholipase C, gamma) e il segnale del pathway delle MAPKs (mitogen activated protein kinase), mentre nei macrofagi induce segnali di migrazione (Ferrara *et al.* , 2003; Shibuya e Claesson-gallese 2006) (fig. 8). È importante notare che, l'espressione di VEGFR-1 è aumentata in condizioni patologiche quali ischemia, patologie infiammatorie, e maligne (Ferrara *et al.*, 2003; Carmeliet *et al.*, 2001).

Al contrario di VEGFR-1, VEGFR-2 è un mediatore fondamentale nell'embriogenesi, infatti embrioni mancanti di questo recettore non riescono a sviluppare cellule endoteliali e di conseguenza vasi (Shalabi *et al.* , 1995; Ferrara *et al.*, 1996).

Anche nell'adulto VEGFR-2 è il principale mediatore mitogeno e regola la crescita, la sopravvivenza e la differenziazione (Ferrara *et al.* 2003). I segnali di proliferazione indotti da VEGFR-2 sono mediati principalmente da PLC- γ e dalla via delle MAPKs, mentre il segnale di sopravvivenza sfrutta la via del PI3K (phosphoinositide kinase-3) / Akt. PI3K-Rac, Cdc42-p38, MAPKs e FAK (focal adhesion kinase) sono coinvolte nella migrazione, tuttavia, i meccanismi di attivazione della via PI3K/ FAK sono finora sconosciuti (Shibuya e Claesson-gallese 2006).

Anche VEGFR-3 gioca un ruolo essenziale nello sviluppo embrionale dei vasi sanguigni prima della formazione dei vasi linfatici (Dumont *et al.*, 1998). Pur essendo, nello sviluppo iniziale, innanzitutto espresso sulle cellule endoteliali nel sangue, nell'adulto è presente essenzialmente nell' endotelio linfatico ed è il principale mediatore dei segnali linfoangiogenesi indotta da VEGF-C e-D. La proliferazione indotta da VEGFR-3 è mediata da PKC (protein kinase C) e dalla via delle MAPKs, mentre i segnali di sopravvivenza sono mediati dall'attivazione di PKB (protein kinase B) / Akt (Shibuya e Claesson-gallese 2006).

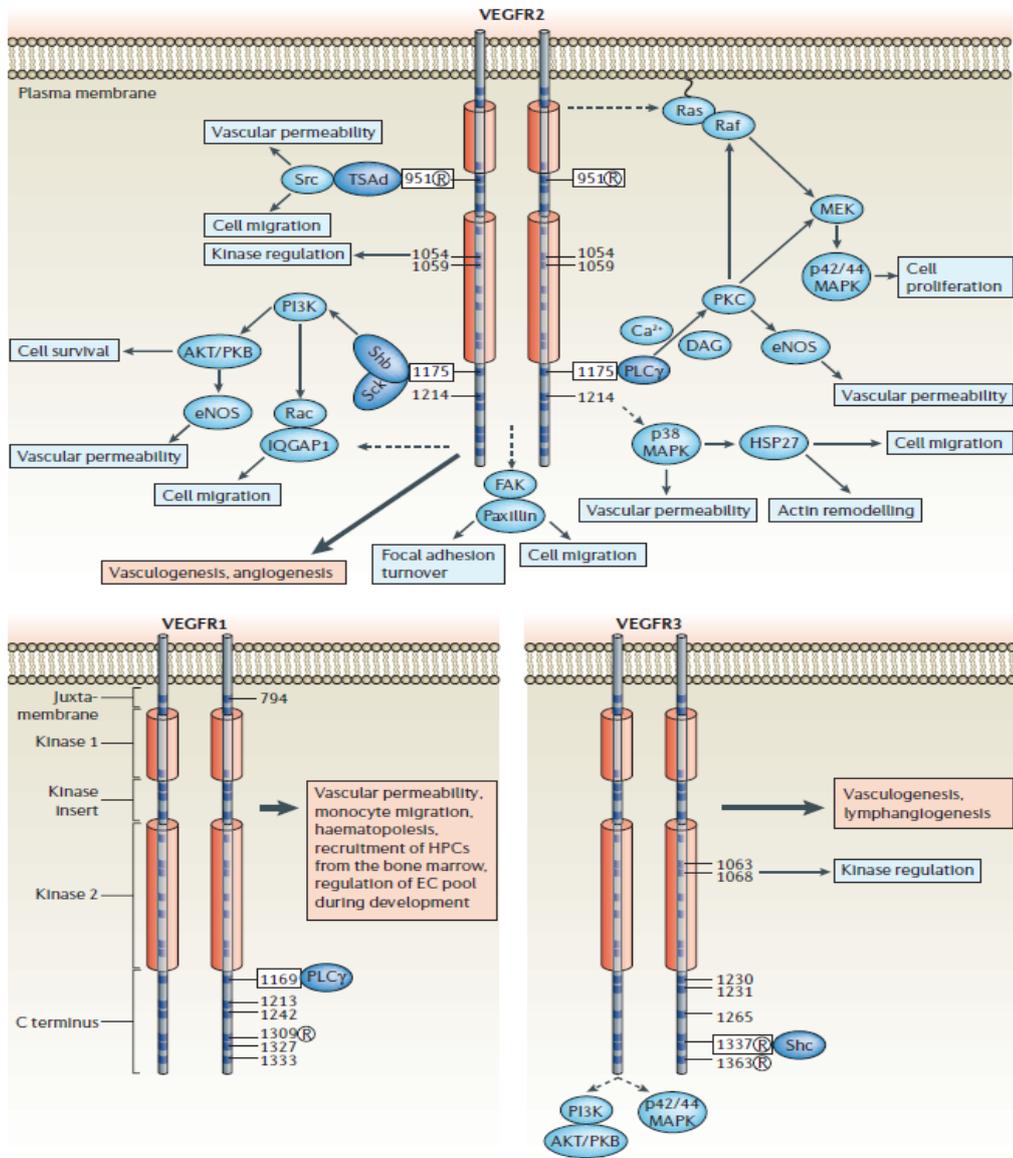


Figura 8- Siti di fosforilazione del VEGFR e trasduzione del segnale (Reviews Olsson et al., 2006).

2.1 BAG3: una proteina che regola numerosi meccanismi cellulari

BAG3 (bcl2-associated athanogene 3) è una proteina appartenente alla famiglia di co-chaperoni caratterizzati dal dominio BAG, attraverso il quale interagiscono con il dominio ATPasico delle proteine Hsc70/Hsp70 (heat shock protein 70). La proteina BAG3 contiene anche un dominio WW e una regione PXXP (proline-rich motifs) (fig. 9a) attraverso i quali può interagire con partner anche diversi da Hsp70. (Doong *et al.*, 2003). Dati recenti in letteratura suggeriscono che BAG3 può essere considerata come una proteina con diverse funzioni in grado di modulare numerosi processi biologici come apoptosi, proliferazione, sopravvivenza, organizzazione del citoscheletro, differenziazione cellulare e autofagia.

I geni della famiglia BAG sono presenti in diverse specie anche filogeneticamente distanti: in lievito (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*), invertebrati (*Caenorhabditis elegans*, *Ciona intestinalis*, *Drosophila*), anfibi (*Xenopus laevis*), mammiferi (humans, mice), piante (*Oryza sativa*, *Arabidopsis thaliana*) (Takayama *et al.*, 1999; Takayama and Reed, 2001; Coulson *et al.*, 2005; Doukhanina *et al.*, 2006; Colinet and Hoffmann, 2010), suggerendo un ruolo biologico di fondamentale importanza.

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.*, 2007; Bruno *et al.*, 2008) (fig. 9b).

La proteina BAG3 full-length è localizzata nel citoplasma, principalmente nel reticolo endoplasmatico rugoso; mentre 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).

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, deprivazione 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 (Romano *et al.*, 2003; Chiappetta *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2009; Ammirante *et al.*, 2010a).

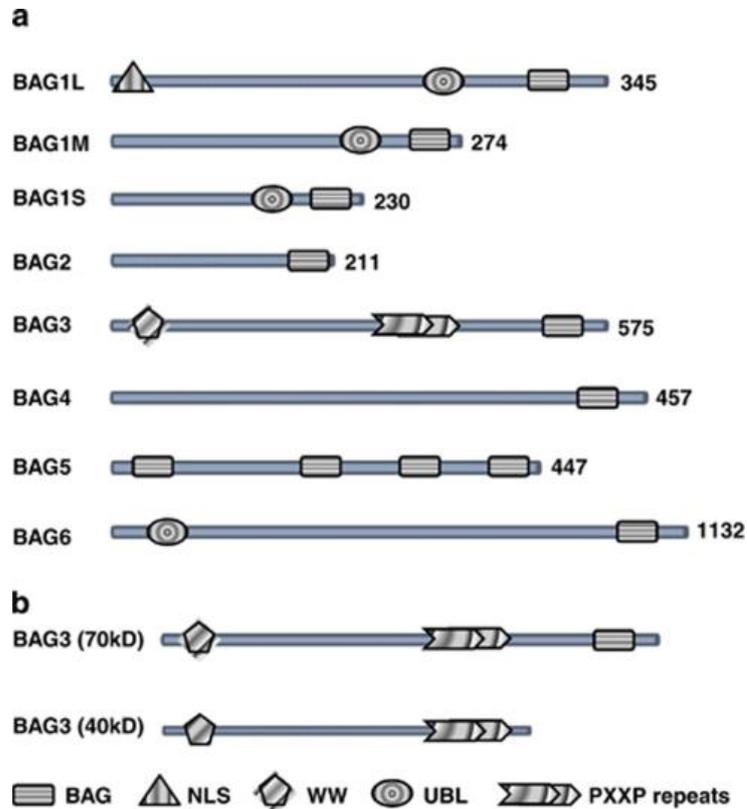


Figure 9- a) La famiglia delle proteine BAG e i loro domini. b) Rappresentazione schematica della proteina full-length e della forma di 40 kD ritrovata associata ai sinaptosomi (Rosati *et al.*, 2011).

2.2 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 (figura 10)

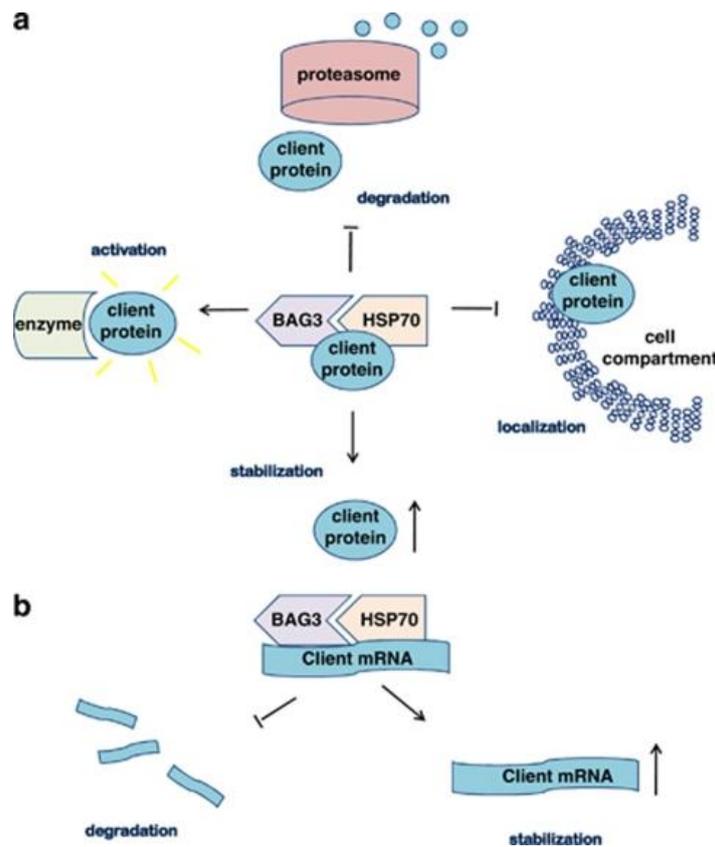


Figura 10- Meccanismi molecolari dell'attività della proteina BAG3 su (a) proteine e (b) mRNAs ((Rosati *et al.*, 2011).

2.3 Ruolo della proteina BAG3 nell'adesione e migrazione cellulare

È 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 revertivo 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.

2.4 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, deprivazione di nutrienti e fattori di crescita, stress del reticolo e infezione da patogeni.

BAG3 partecipa, insieme a HspB8, un membro della famiglia HspB di chaperon molecolari, alla degradazione, mediante macroautofagia, delle proteine mal ripiegate e aggregate. Infatti, HspB8 forma nelle cellule un complesso stabile con BAG3 e la formazione di questo complesso è essenziale per la degradazione della proteina Htt43Q poliglutammina (HunTingTin exon 1 fragment with 43 CAG repeats), una forma patogena di huntingtina che tende a formare aggregati (Carra *et al.*, 2009a; Carra *et al.*, 2009b) HspB8 e BAG3 inducono, in modo Hsp70 indipendente, la fosforilazione subunità α 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, uno chaperone con importanti proprietà cardioprotettive e in grado di regolare la contrattilità dei miociti (Fan *et al.*, 2005).

3.1 Introduzione

Le proteine della famiglia BAG sono coinvolte nella regolazione di diversi processi cellulari inclusi la proliferazione e l'apoptosi. In particolare, l'espressione di BAG3 risulta essere indotta in condizioni di stress esercitando, quindi una funzione indispensabile nella risposta adattativa a diversi stimoli. In aggiunta al suo ruolo protettivo nel citosol, recenti esperimenti hanno mostrato che BAG3 può essere rilasciata nello spazio extracellulare dove può agire sulle varie componenti del microambiente tumorale allo stesso modo di quanto già descritto per Hsp 70.

Hsp 70, infatti, quando è localizzata nello spazio extracellulare o è ancorata alla membrana plasmatica, svolge un importante ruolo nell'attivazione di processi infiammatori (Asea A. *et al.*, 2000; Barretto *et al.*, 2003). Inoltre, nell'uomo la sua presenza nel siero è associata a condizioni di stress come infiammazione, infezioni virali o batteriche, malattie oncologiche.

Lo scopo di questa parte di progetto è stato la caratterizzazione biochimica e funzionale della proteina BAG3 extracellulare. Dai dati ottenuti, si è visto che la proteina BAG3 viene rilasciata in vitro nel surnatante delle cellule tumorali ma anche in vivo nel siero di pazienti.

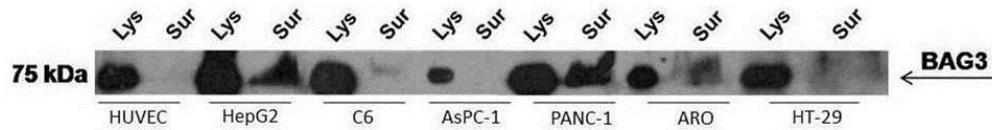
La fase successiva è stata quella di studiare il meccanismo cellulare alla base della secrezione di BAG3 e stabilire se essa è associata a vescicole di membrana.

Infine allo scopo di verificare l'eventuale relazione tra la proteina BAG3 extracellulare e il processo infiammatorio sono stati condotti esperimenti con la proteina ricombinante BAG3 (rBAG3) sulla linea macrofagica murina J774.A1. In particolare è stata valutata l'eventuale modulazione degli enzimi iNOS e COX-2, entrambi coinvolti nell'attivazione dei macrofagi durante il processo infiammatorio.

3.2 Risultati e discussione

3.2.1 Localizzazione extracellulare della proteina BAG3

Recenti esperimenti, svolti nel nostro laboratorio, hanno permesso di identificare, oltre ad una localizzazione citoplasmatica, la presenza della proteina BAG3 nello spazio extracellulare. Sono stati analizzati, mediante saggio di western blotting (fig.11), i surnatanti di diverse linee cellulari mantenute per quattro ore in terreno di crescita senza siero. Sono stati osservati alti livelli della proteina soprattutto nei surnatanti di cellule HepG2 (cellule di epatocarcinoma umano) e PANC-1 (cellule di carcinoma pancreatico umano), mentre la presenza di BAG3 extracellulare non è stata rilevata in colture di cellule primarie normali, quali le HUVEC (cellule endoteliali di vena di cordone ombelicale). Oltre alla proteina BAG3, nei surnatanti è stata rivelata anche la presenza della proteina Hsp70 (dato non riportato), confermando un dato già presente in letteratura. Hsp70, infatti, è localizzata sulla membrana di differenti cellule tumorali, mentre non è presente sulle corrispondenti cellule normali. Hsp70 solubile gioca un importante ruolo nella stimolazione del sistema immunitario, presentando antigeni peptidici al complesso MHC di classe I (Barretto *et al.*, 2003).



HUVEC (Cellule endoteliali umane della vena ombelicale)
 Hep G2 (Epatocarcinoma umano)
 C6 (Cellule di glioma)
 AsPC-1 (Cellule neoplastiche pancreatiche)
 PANC-1 (Adenocarcinoma umano del dotto pancreatico)
 ARO (Carcinoma della tiroide)
 HT-29 (Cellule epiteliali umane di colon adenocarcinoma)

Figura 11 –Rilascio della proteina BAG3 nello spazio extracellulare. Le diverse linee cellulari sono state piastrate ad una confluenza dell' 80% ed incubate in un mezzo senza FBS a 37°C in un ambiente al 5% CO₂. Dopo 4h, i surnatanti sono stati centrifugati a 2000xg per 10 minuti per allontanare le cellule morte, poi a 10000xg per 30 minuti per allontanare i debris e infine precipitati in acetone (vol. 1:9) ed analizzati mediante western blotting.

3.2.2 Localizzazione subcellulare della proteina BAG3

La presenza della proteina BAG3 nello spazio extracellulare è stata avvalorata dall'analisi della sua localizzazione subcellulare in cellule PANC-1. Sono state condotte delle immunofluorescenze indirette utilizzando l'anticorpo monoclonale AC-1, capace di riconoscere la regione amino-terminale, e un anticorpo secondario anti-mouse coniugato a FITC (fluoresceina isotiocianato), un cromoforo fluorescente che eccitato, emette nel verde. L'analisi al microscopio confocale ha permesso di confermare la localizzazione citoplasmatica, ampiamente riportata in letteratura, ma di osservare anche la presenza della proteina in prossimità della membrana plasmatica.

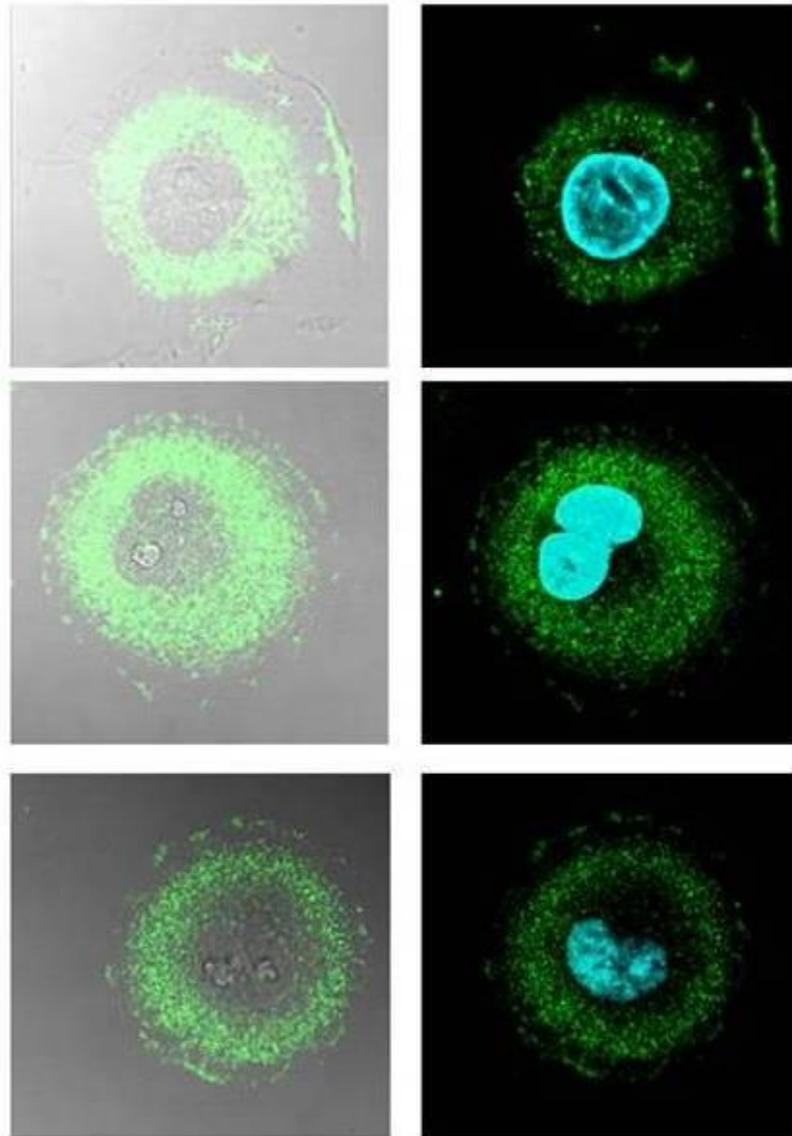


Figura 12 – Localizzazione subcellulare della proteina BAG3 in cellule PANC-1. Le cellule PANC-1, cresciute sui vetrini, sono state lavate con PBS+Ca/Mg e fissate con formaldeide 3,7%. I vetrini sono stati poi incubati, prima con l'anticorpo anti-BAG3 AC-1 alla concentrazione di 3 μ g/ml, poi con l'anticorpo secondario anti-mouse IgG DyLigth 488 alla diluizione di 1:200. I campioni sono stati analizzati al microscopio confocale (LEICA SP5).

3.2.3 Caratterizzazione dei livelli della proteina BAG3 in sieri umani

Negli ultimi anni, molti gruppi di ricerca hanno evidenziato che specifiche proteine espresse nelle cellule tumorali e rilasciate nello spazio extracellulare, potrebbero essere utilizzate come biomarcatori per la diagnosi precoce del cancro. I risultati ottenuti in vitro e l'importanza della proteina BAG3 nello sviluppo del tumore, ci hanno indotto a verificare se tale proteina fosse rilevabile nel siero di pazienti affetti da diversi tipi di tumori. A tale scopo, è stato messo a punto un test ELISA sandwich, il cui modello sperimentale è riportato in figura 13.

La piastra è stata trattata con l'anticorpo primario monoclonale AC-2 e dopo incubazione overnight a 4°C, sono stati aggiunti i sieri per 2 h. La piastra è stata poi lavata e aggiunto ad essa l'anticorpo policlonale TOS-2 ottenuto utilizzando, come antigene, l'intera proteina BAG3 ricombinante. L'eventuale complesso ternario è stato rivelato con un anticorpo secondario anti-rabbit coniugato a perossidasi che in presenza del substrato TMB (tetrametilbenzidina) emette un segnale alla lunghezza d'onda di 450 nm.

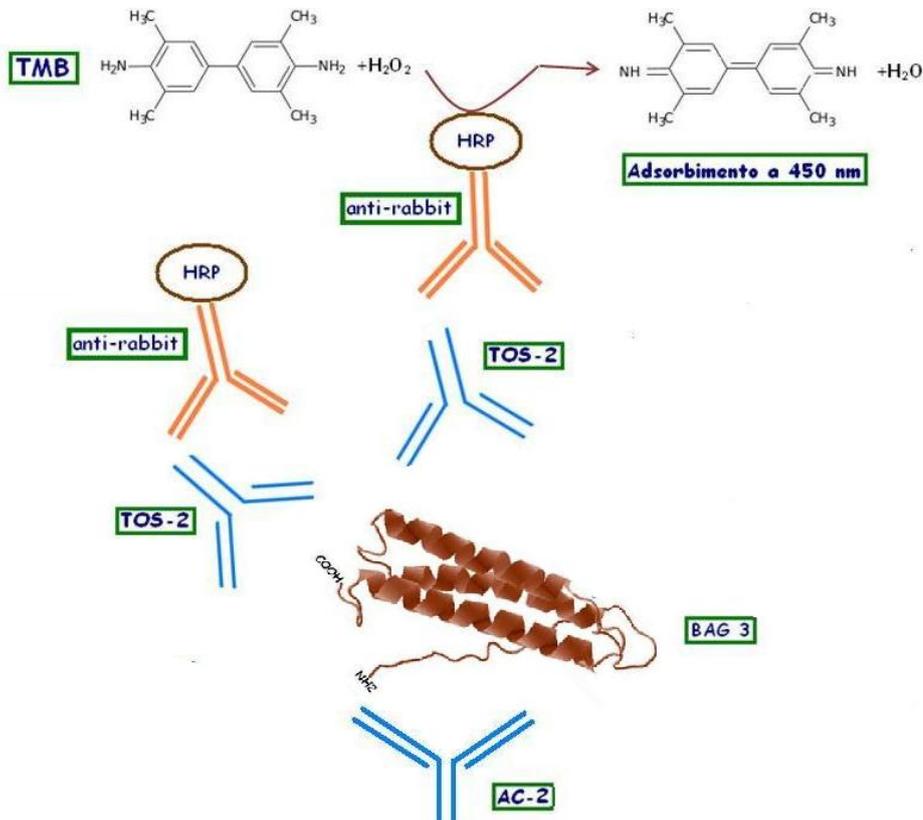


Figure 13 – Rappresentazione grafica del modello sperimentale ELISA sandwich. La piastra è stata trattata con l'anticorpo primario monoclonale AC-2, mentre per la rivelazione è stato utilizzato l'anticorpo policlonale TOS-2. L'eventuale complesso ternario è stato rivelato con un anticorpo secondario anti-rabbit coniugato a perossidasi che in presenza del substrato TMB (tetrametilbenzidina) emette un segnale alla lunghezza d'onda di 450 nm.

La concentrazione sierica della proteina BAG3 di ciascun paziente è stata ricavata interpolando i valori di densità ottica, ottenuti dalla lettura allo spettrofotometro, con i valori della nostra curva di calibrazione (fig.14). Tale curva è stata ottenuta utilizzando concentrazioni scalari della proteina BAG3 ricombinante ricostituita in una soluzione salina con l'aggiunta di albumina sierica di bovino (BSA) al 3%.

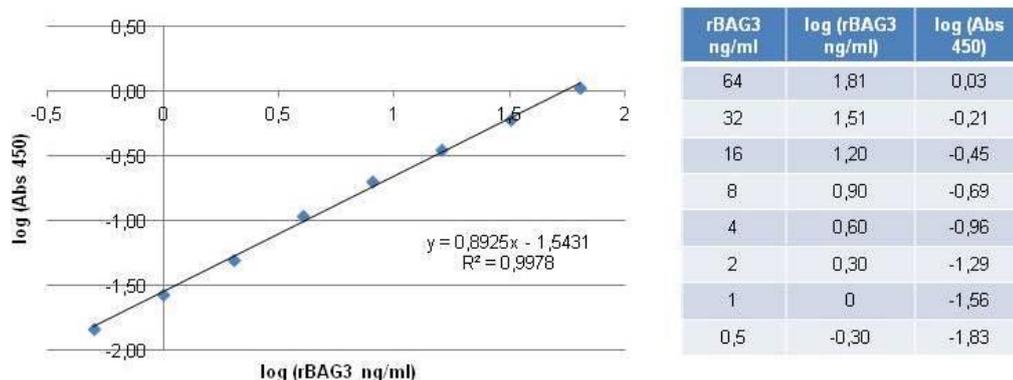


Figure 14 –Retta di taratura del test ELISA. Retta di taratura, in scala logaritmica, ottenuta utilizzando concentrazioni scalari della proteina BAG3 ricombinante.

I sieri dei pazienti analizzati sono stati raccolti in diverse unità operative e i valori ottenuti dal test, espressi in ng/ml, sono stati confrontati a quelli di donatori. Sono stati analizzati i sieri di 85 donatori raccolti presso l'Azienda Ospedaliera San Giuseppe Moscati di Avellino e presso la IRCSS Istituto Nazionale Tumori di Napoli, aventi un range di età dai 21 ai 65 anni.

Nei donatori sani la concentrazione di BAG3 rivelata è stata in media di 2.95 ng/ml (± 0.32 e.s.), ed è stata riscontrata una leggera differenza, statisticamente significativa, correlata all'età. In particolare, nella fascia di età dai 21 ai 43 la media della concentrazione sierica di BAG3 è di 3.13 ng/ml (± 0.50 e.s.), mentre nei donatori tra i 44 e i 65 anni è di 1.80 ng/ml (± 0.40 e.s.) (fig.15).

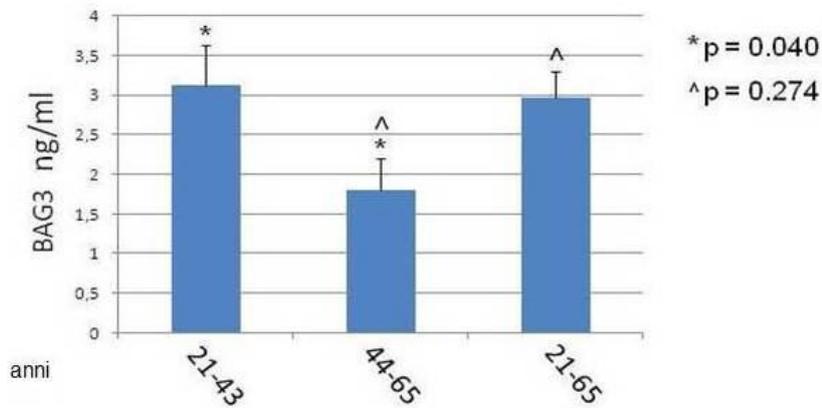


Figure 15 – Rappresentazione grafica delle concentrazioni sieriche di BAG3. La concentrazione sierica di BAG3 è stata espressa in ng/ml e sono stati analizzati i sieri di donatori analizzati. Il grafico riporta l'analisi condotta su 85 donatori con un range di età da 21 a 65 anni e con una concentrazione sierica della proteina BAG3 media di 2.95 ng/ml (± 0.32 e.s.).

Dagli esperimenti in vitro, le linee cellulari neoplastiche che sembravano produrre una quantità più elevata di proteina BAG3 extracellulare erano quelle derivate da adenocarcinoma pancreatico. Allo scopo di verificare se potesse essere rilevabile un incremento della proteina BAG3 anche nei sieri di pazienti affetti da adenocarcinoma pancreatico, sono stati effettuati saggi ELISA su sieri di pazienti con diagnosi di cancro pancreatico raccolti presso: la IRCSS Opera Padre Pio di Foggia e l'ospedale di Benevento "Fatebene Fratelli". Accanto a questi campioni sono stati analizzati anche sieri di pazienti con diagnosi di altri tumori del tratto gastrointestinale e di altri tipi di tumori. Dall'analisi condotta è emerso che i valori medi della proteina BAG3 circolante sono particolarmente aumentati in pazienti con adenocarcinoma pancreatico (31 ng/ml ± 5.57 e.s.). I valori ottenuti dall'analisi di questo gruppo di pazienti sono stati confrontati con i valori dei donatori con un range di età corrispondente a quello dei pazienti, (fig 16). Per verificare inoltre che la presenza della proteina BAG3 extracellulare fosse riconducibile ad una trasformazione neoplastica e non ad un processo infiammatorio sono stati analizzati anche alcuni sieri di pazienti con in corso una pancreatite acuta ottenuti dal Centro Trapianti dell'Ospedale di Roma "Umberto I". In questo caso, negli 8 pazienti analizzati si osservava una concentrazione sierica di BAG3 inferiore a quella presente nei pazienti affetti da adenocarcinoma. La conferma definitiva di questi dati richiederà l'analisi di un numero molto maggiore di pazienti e di donatori sani. Tuttavia, con i dati ottenuti abbiamo ricercato quali potessero essere i valori di sensibilità e di specificità del test BAG3- specifico descritto.

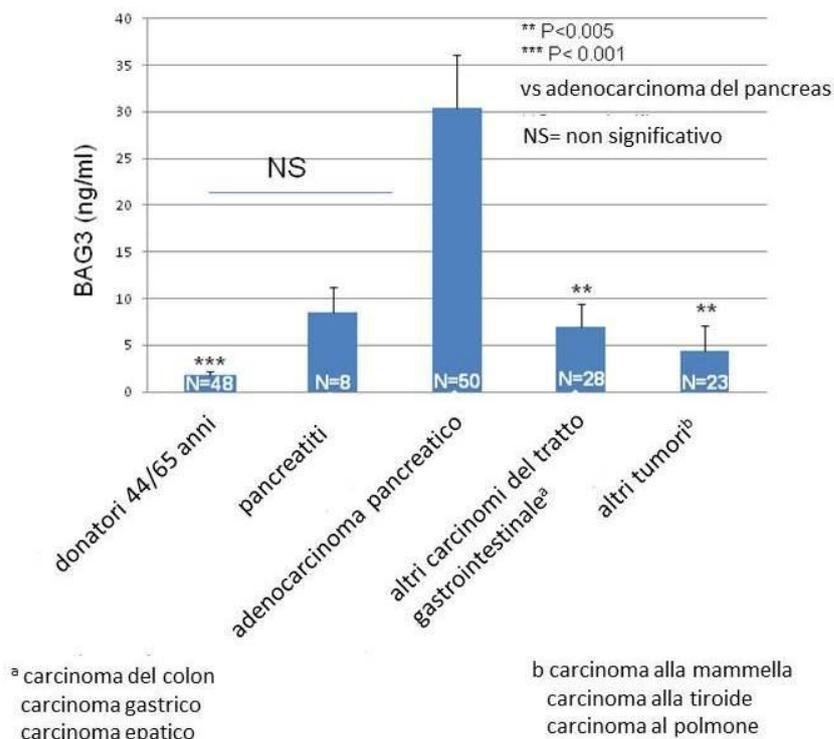


Figure 16 – Rappresentazione grafica delle concentrazioni sieriche di BAG3. La concentrazione sierica è stata espressa in ng/ml e sono stati analizzati sieri di donatori con un range di età da 44 a 65 anni, sieri di pazienti affetti da pancreatite, adenocarcinoma del pancreas e altri tumori. In ogni gruppo è indicato il numero di pazienti analizzati.

Per determinare il valore del parametro (cut-off o valore soglia) in grado di distinguere meglio tra positivo e negativo è stato utilizzato il metodo della curva Receiver Operating Characteristic (ROC). La curva ROC è una rappresentazione grafica che contiene in ordinata i valori di sensibilità e in ascissa quelli di specificità di un test a differenti valori di cut-off. In base al valore di cut off scelto si otterranno diverse condizioni di sensibilità e specificità della nostra analisi. La sensibilità viene vista come la probabilità che un paziente ammalato risulti test-positivo mentre la specificità è la probabilità che un paziente sano risulti test-negativo. Il cut-off ottimale è quello che rappresenta il miglior compromesso fra sensibilità e specificità ed è dato dal valore più vicino all'angolo superiore-sinistro della curva ROC. Più il valore dell'area sottesa dalla curva ROC (AUC) si avvicina a 1 (riconosciuti tutti i veri positivi senza avere falsi negativi), maggiore è il potere diagnostico del test, mentre per un test non informativo il valore è pari a 0.5.

Sono stati, quindi, analizzati i dati ottenuti attraverso un programma di statistica allo scopo di definire i valori di specificità e di sensibilità del nostro test. L'AUC della curva ROC ottenuta è risultato di 0,873 confermando l'accuratezza del test ELISA. Inoltre, ponendo come valore di cut-off 2.76 ng/ml, i valori di sensibilità e di specificità sono risultati rispettivamente di 86.8% e di 77.08%. È illustrata in figura 17 la curva ROC ottenuta con il cut-off indicato.

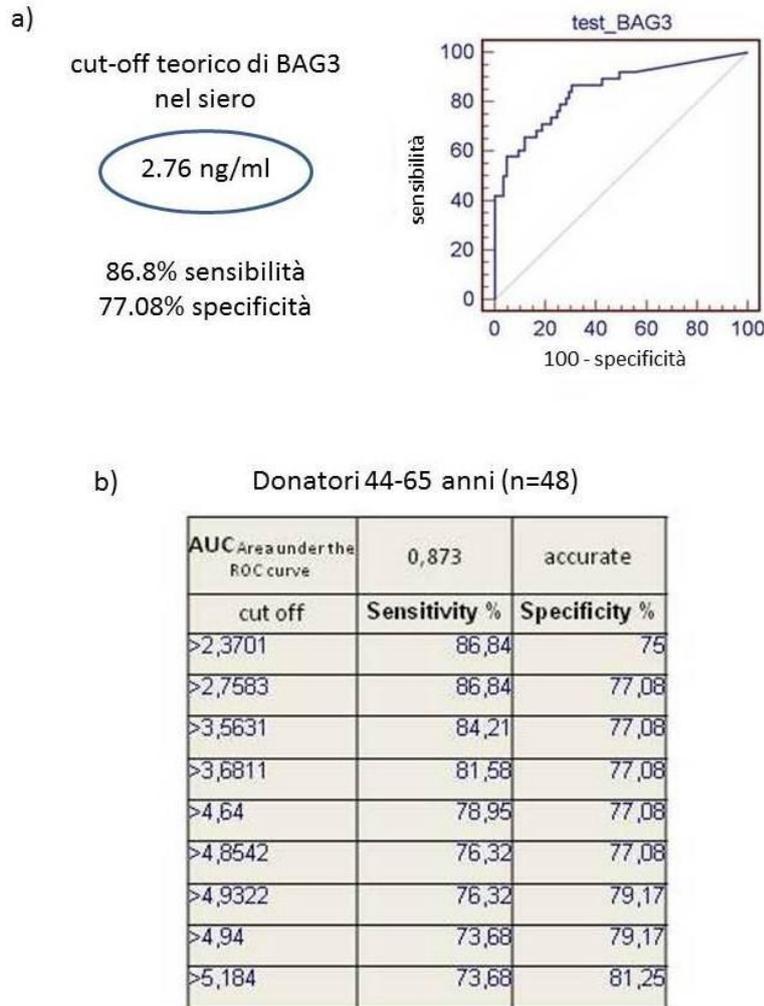


Figure 17 –Analisi statistica del test ELISA. a) Rappresentazione della Curva ROC: i valori positivi al test sono mostrati nell'area della distribuzione superiore, mentre i negativi nella distribuzione inferiore. L'area al di sotto di tale curva corrisponde al potere discriminante del test. b) Tabella riportante i valori di cut-off per ogni condizione di sensibilità e specificità del test.

3.2.4 Identificazione della proteina BAG3 in siero umano mediante spettrometria di massa.

La presenza della proteina BAG3 nel siero umano è stata confermata anche mediante altre tecniche. Due sieri, uno di un donatore e l'altro di un paziente, precedentemente analizzati con il test ELISA, sono stati analizzati mediante western blotting. Tale esperimento ha permesso di identificare, utilizzando un anticorpo policlonale anti-BAG3, una banda corrispondente al peso molecolare della proteina BAG3 (fig.18a). La banda di interesse è stata escissa dal gel e i frammenti, ottenuti dalla digestione enzimatica con tripsina, sono stati analizzati mediante spettrometria di massa (MALDI-ToF) che consente di misurare il rapporto massa su carica (m/z)

dell' analita e, quindi, di ricavare informazioni riguardanti la composizione elementare della sostanza in esame. Gli spettri di massa ottenuti sono stati inseriti nei database del programma "MASCOT" per l'identificazione della proteina. Questo programma identifica i peptidi con una probabilità basata sugli algoritmi e compara gli spettri ottenuti con teorici spettri generati "in silico".

Da tale analisi sono stati rilevati 9 peptidi appartenenti alla proteina BAG3 umana corrispondenti al 83% dell'intera sequenza (fig 18c)

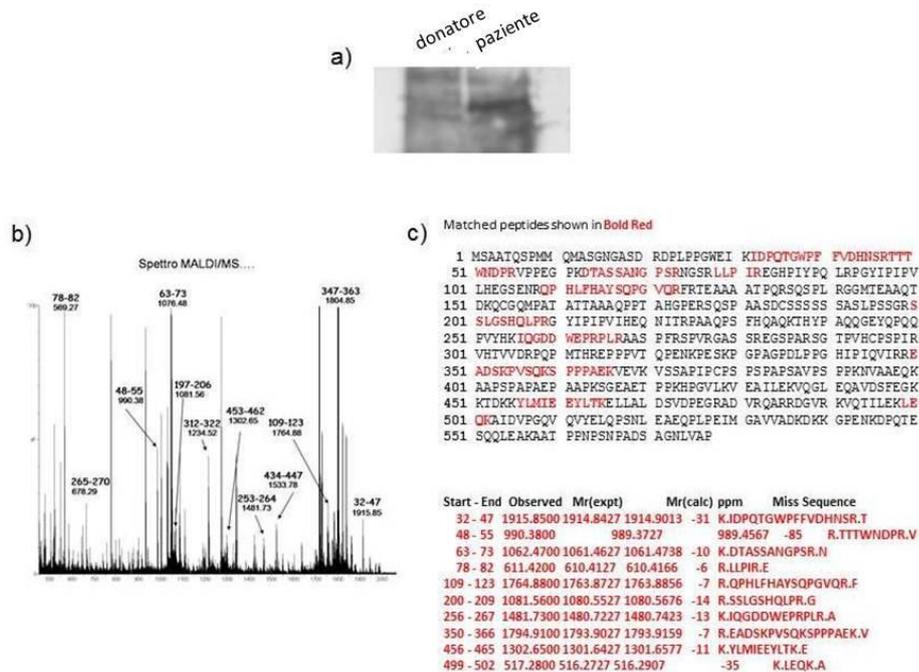


Figure 18- Identificazione mediante MS della proteina BAG3. a) Western blot di sieri umani analizzati con l'anticorpo policlonale anti-BAG3. b) Spettro MALDI/MS dei frammenti ottenuti dalla digestione enzimatica con tripsina di bande escisse dal gel. c) Analisi MASCOT di tutti i peptidi corrispondenti alla proteina BAG3.

3.2.5 Caratterizzazione del meccanismo di rilascio nello spazio extracellulare della proteina BAG3

Allo scopo di studiare il meccanismo di rilascio della proteina BAG3 nello spazio extracellulare è stato analizzato un possibile meccanismo attivo mediato da microvescicole (MVs) descritto anche per il partner molecolare di BAG3, Hsp 70 (Barretto *et al.*, 2003). Queste sono rilasciate da diversi tipi di cellule di origine ematopoietica ma anche da cellule tumorali e possono permanere in prossimità delle cellule di origine o passare nei fluidi biologici. In base alle loro caratteristiche ma anche al meccanismo di formazione si dividono in *shedding vesicle* o *esosomi*. Le *shedding*

vesicle sono chiamate anche ectosomi, microparticles o esovesicicole, sono eterogenee ed hanno dimensioni che vanno da 100 nm a 1 µm. Queste si formano in prossimità della membrana plasmatica a livello di protrusioni della superficie cellulare e il loro rilascio è influenzato da influssi del calcio, riorganizzazione del citoscheletro, redistribuzione dei componenti della membrana (Shara *et al.*, 2009). Gli esosomi sono, invece, vescicole più omogenee, più piccole delle shedding vesicles con dimensioni che vanno da 30 a 120 nm ed hanno un'origine endosomiale. Questi, una volta formati all'interno della cellula, si organizzano in strutture complesse definite multivesicular bodies e vengono rilasciati all'esterno della cellula in seguito alla fusione di queste strutture con la membrana cellulare (Thery *et al.*, 2006).

Nello spazio extracellulare le MVs possono essere catturate, mediante una specifica interazione recettore-ligando, da cellule target. In seguito a tale interazione le cellule target possono attivarsi, infatti, le MVs sono in grado di attivare direttamente cellule endoteliali (Barry *et al.*, 1997), neutrofili polimorfonucleati (Miyamoto *et al.*, 1998) e monociti (Barry *et al.*, 1999) modificando, in questo modo le loro funzioni. Le MVs possono, anche, trasferire recettori da una cellula all'altra. Per esempio possono trasferire la molecola di adesione CD41 dalle piastrine alle cellule endoteliali (Barry *et al.*, 1998) o alle cellule tumorali (Janowska-Wieczorek *et al.*, 2001), conferendo loro proprietà pro-adesione. Altri recettori che possono essere trasferiti dalle MVs includono: il recettore di Fas, che dopo il trasferimento dalle cellule tumorali alle cellule T può indurre, in queste, apoptosi (Kim *et al.*, 2005); i recettori per le chemochine CXCR4 e CCR5 che possono agire come co-recettori per il virus HIV1 favorendo l'ingresso del virus nelle cellule (Mack *et al.*, 2000).

Oltre che recettori le MVs possono anche trasferire proteine (Sharkar *et al.*, 2009), virus o prioni (Facler and Peterlin, 2000) o materiale genetico come mRNA e microRNA (Collino *et al.*, 2010).

Allo scopo di verificare se la proteina BAG3 extracellulare sia contenuta nelle microvescicole o se è rilasciata in forma libera è stato condotto un saggio di purificazione delle microvescicole dal surnatante di cellule PANC-1 e le frazioni ottenute dal processo di separazione sono state analizzate mediante western blotting. In figura 19, si evince che la proteina BAG3 è presente in tutte le frazioni ottenute, in particolare, da questo esperimento si può evincere che una parte viene rilasciata associata a vescicole di membrana, un'altra quota invece, passa nello spazio extracellulare in forma libera. Come marker delle microvescicole è stato utilizzato Rab4, un membro della famiglia Rab GTPasi che regola il trasporto vescicolare in particolare di vescicole esosomiali dall'endosoma precoce attraverso la membrana plasmatica. GAPDH e calnexina sono stati utilizzati come controlli per escludere una contaminazione del surnatante di proteine derivanti da lisi cellulare.

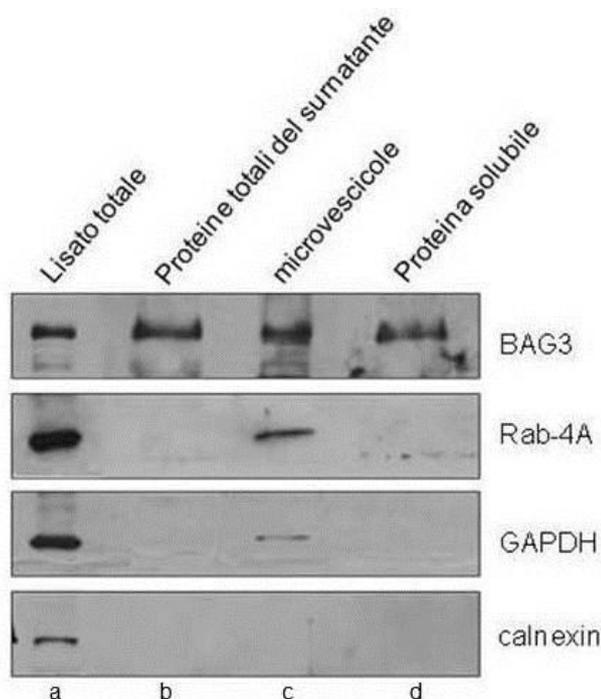


Figure 19 – Meccanismo di rilascio nello spazio extracellulare. In figura è mostrata l'analisi comparativa della composizione di proteine nelle varie frazioni: a) lisato di cellule PANC-1; b) surnatante di cellule PANC-1 precipitato in acetone 1:9; c) microvesicicole ottenute per ultracentrifugazione del surnatante di cellule PANC-1 ; d) surnatante da cui sono state purificate le microvesicicole.

3.2.6 La proteina BAG3 extracellulare attiva i macrofagi

La presenza della proteina BAG3 in sieri umani ci ha indotto ad analizzare un suo possibile coinvolgimento nell'attivazione della risposta infiammatoria e immunitaria. Infatti, l'interazione intracellulare, sia molecolare sia funzionale tra la proteina BAG3 e Hsp70, ha permesso di ipotizzare un ruolo per BAG3 simile a quello riportato in letteratura per Hsp70. Numerosi studi, riportano che un incremento di Hsp70 a livello extracellulare determina una stimolazione della sintesi di citochine pro-infiammatorie e di chemochine (Asea *et al.*2000).

A tale scopo le cellule J774.A1 (macrofagi murini) sono state stimulate per 24 ore con la proteina BAG3 ricombinante a diverse concentrazioni utilizzando come controllo positivo il lipopolisaccaride (LPS), il maggiore componente proinfiammatorio dei batteri Gram negativi ed uno dei più potenti induttori della produzione di citochine da parte dei macrofagi. L'attivazione dei macrofagi è stata valutata analizzando i livelli di espressione e l'attività dell'enzima NO sintasi inducibile (iNOS) che gioca, nel processo infiammatorio, un ruolo citotossico di primaria importanza che si esplica nella cospicua sintesi di monossido di azoto.

Come mostrato in figura 20a la produzione di nitriti da macrofagi J774.A1 incubati per 24 ore con LPS (10ng/ml) è risultata significativamente aumentata rispetto al valore basale di nitriti prodotti da cellule non trattate ($11.06 \pm 0.07 \mu\text{M}$ vs $0.001 \pm 0.00 \mu\text{M}$ del controllo).

La somministrazione della proteina rBAG3 (0.25, 0.5, 1 µg/ml) al mezzo di coltura ha indotto, alle concentrazioni di 0.5 e 1 µg/ml, un significativo aumento del rilascio di nitriti rispetto al controllo (1.88 ± 0.02 µM, $P < 0.001$ vs controllo; 4.44 ± 0.12 µM, $P < 0.001$ vs controllo; rispettivamente per le concentrazioni di 0.5, 1 µg/ml).

Quando al medium cellulare è stato aggiunto contemporaneamente sia la proteina rBAG3 sia l'LPS si è riscontrato un significativo aumento del rilascio di nitriti rispetto a quanto osservato con il solo stimolo flogogeno (13.57 ± 0.23 µM, $P < 0.001$ vs LPS; 13.87 ± 0.23 µM vs LPS.; rispettivamente per le concentrazioni di 0.5 e 1 µg/ml).

Per stabilire se l'effetto indotto dalla proteina rBAG3 sull'attività dell'enzima iNOS, potesse coinvolgere anche modificazioni nella sua espressione, è stata effettuata l'analisi mediante Western blot sui lisati cellulari stimolati secondo le medesime condizioni sperimentali discusse nella determinazione dei nitriti, usando un anticorpo monoclonale anti-iNOS (fig. 20b).

Dall'analisi densitometrica condotta si è osservato che la stimolazione delle cellule J774.A1, con la proteina rBAG3 alle concentrazioni di 0.5 e 1 µg/ml, induce un aumento dei livelli di espressione dell'enzima iNOS rispetto alle cellule di controllo, paragonabile all'effetto indotto dal controllo positivo LPS. L'aumento di espressione dell'enzima è osservabile anche nei lisati di cellule trattate contemporaneamente con la proteina rBAG3 e LPS a tutte le concentrazioni testate.

Accanto all'espressione dell'enzima iNOS, sono stati valutati anche i livelli di espressione della COX-2 (fig. 20b), un enzima chiave nella cascata dell'acido arachidonico che dà origine a molecole infiammatorie quali prostaglandine, trombossani e prostaciline. La presenza della sola proteina ricombinante e del solo LPS, ha fatto riscontrare un aumento significativo dell'espressione della COX-2 rispetto alle cellule di controllo a tutte le concentrazioni testate. Tuttavia in condizioni di co-stimolazione con LPS la proteina rBAG3 non ha alterato in maniera significativa l'espressione della COX-2 rispetto alle cellule trattate con solo LPS. In tutti gli esperimenti è stata somministrata la BSA (albumina sierica di bovino) alla stessa concentrazione di rBAG3 e considerata come controllo negativo.

I nostri risultati indicano, quindi, che la proteina BAG3 è in grado di stimolare la risposta infiammatoria da parte dei macrofagi. Sebbene i meccanismi sottesi a tale stimolazione richiedano ulteriori studi, l'aumento dell'espressione e dell'attività di enzimi quali iNOS e COX-2 contribuiscono ad evidenziare un ruolo pro-infiammatorio di BAG3 con importanti implicazioni in numerose patologie (neoplasie, risposta immunitaria, infiammazione) in cui la funzione macrofagica riveste un ruolo di primaria importanza.

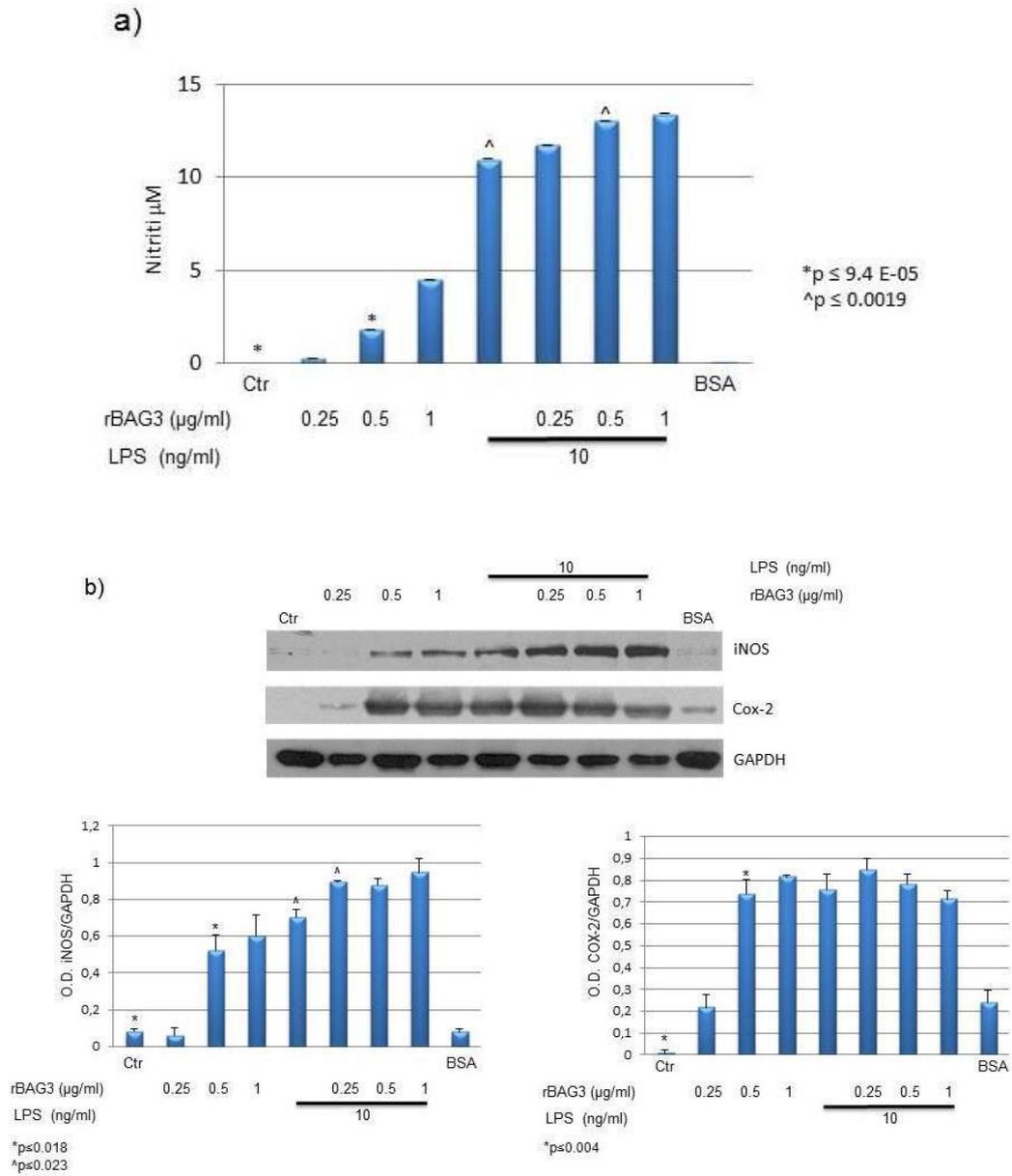
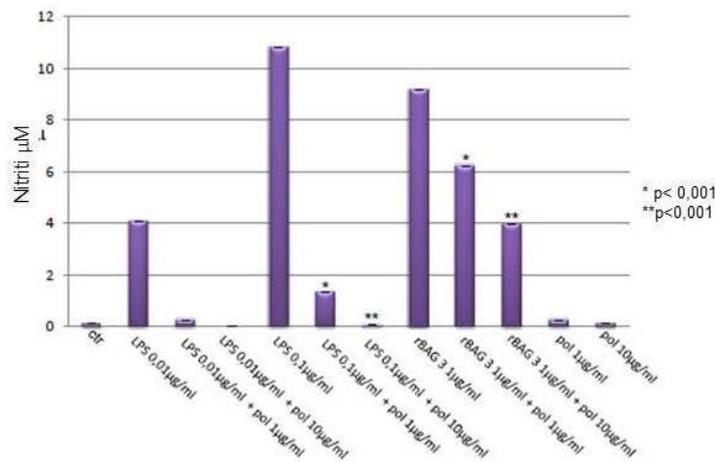


Figure 20 – Effetto della rBAG3 sui macrofagi murini. a) Valutazione del rilascio di nitriti nel mezzo di cellule J774.A1 trattate con LPS e rBAG3 a diverse concentrazioni. La produzione dei nitriti è stata verificata mediante il saggio di Griess ed è espressa in concentrazione µM. b) Analisi mediante western blot dell' espressione di iNOS e COX-2 in lisati di cellule J774.A1 trattate con la proteina BAG3 ricombinante alle concentrazioni di 250-500 ng/ml e 1 µg/ml da sola o in combinazione con LPS alla concentrazione 10 ng/ml. L'anticorpo anti-GAPDH è stato utilizzato come controllo del caricamento.

3.2.7 La Polimixina B inibisce solo in parte l'attività di rBAG3

La ricombinante, utilizzata nei vari esperimenti, è stata prodotta in *Escherichia coli* come riportato nella sezione Materiali e Metodi. La limitazione di queste preparazioni è la possibile contaminazione da endotossine (Salek-Ardakani *et al.*, 2002) tra cui l'LPS presente nei batteri gram-negativi. A tale scopo sono stati condotti degli esperimenti in presenza di polimixina B, un potente antibiotico che lega e neutralizza l'LPS. La polimixina B è un antibiotico decapeptidico ciclico cationico contenente gruppi lipofili e idrofili in grado di legare il lipide A, il maggiore componente delle endotossine. Lo scopo dell'esperimento è stato quello di osservare se l'attività della proteina ricombinante BAG3 potesse essere modificata dalla presenza della polimixina B. L'incubazione della polimixina B con rBAG3 ha determinato una riduzione del 32% e del 57% (rispettivamente alle concentrazioni di polimixina B di 1 e 10 µg/ml) dell'attività della ricombinante. Al contrario l'incubazione con LPS della polimixina B alle stesse concentrazioni, ha determinato un'inibizione totale dell'effetto dell'LPS. Questi risultati dimostrano che l'eventuale presenza di una contaminazione nella preparazione di rBAG3 è responsabile solo in parte dell'effetto osservato. Tuttavia per ridurre qualsiasi interferenza è in corso la produzione della rBAG3 in un sistema eucariotico quali le cellule HEK293.



Addition	Polymyxin B 1µg/ml (% of inhibition)	Polymyxin B 10µg/ml (% of inhibition)
LPS 0.01 µg/ml	93.7%	100%
LPS 0.1 µg/ml	87.7%	99.4%
rBAG3 1 µg/ml	32.2%	56.9%

Figure 21 – Effetto della polimixina B sulla produzione di nitriti in macrofagi murini stimolati con rBAG3. Valutazione del rilascio di nitriti nel mezzo di cellule J774.A1 trattate con LPS e rBAG3 a diverse concentrazioni in presenza o assenza di polimixina B. La polimixina b è stata pre-incubata per 10 minuti con le sostanze e poi somministrata alle cellule. La produzione dei nitriti è stata verificata mediante il saggio di Griess ed è espressa in concentrazione µM.

3.2.8 La proteina BAG3 extracellulare lega la superficie dei macrofagi

I dati ottenuti hanno evidenziato che la proteina BAG3 è capace di interagire con le cellule macrofagiche e che può essere responsabile dell'attivazione della risposta infiammatoria inducendo aumentati livelli dell'enzima NOS inducibile e della COX2 nonché dell'aumentata produzione di nitriti. Allo scopo di verificare se l'effetto sui macrofagi fosse riconducibile ad un legame specifico della proteina Bag3 ricombinante sulla superficie cellulare dei macrofagi, la proteina BAG3 ricombinante è stata coniugata a FITC utilizzando il kit "Fluoro Tag FITC Conjugation" (SIGMA). Allo stesso modo è stata preparata anche la BSA-FITC utilizzata come controllo negativo per validare la specificità dell'eventuale legame. Uguali quantità (1µg/ml) di rBAG3-FITC e BSA-FITC sono state aggiunte, per 1 ora, al mezzo di coltura di cellule J774.A1 cresciute su vetrini. Le cellule sono state fissate con una soluzione di formaldeide al 3.7% e analizzate al microscopio confocale Zeiss LSM. La figura 22a mostra un netto segnale a livello della membrana macrofagica assente nelle cellule incubate con BSA-FITC.

Inoltre l'analisi al microscopio confocale ha consentito l'osservazione non solo lungo l'asse x e y ma anche lungo l'asse z. Le acquisizioni del campione lungo l'asse verticale, ha permesso di ottenere una serie di scansioni successive (sezioni ottiche) corrispondenti ai piani focali sempre più esterni della cellula (fig.22b).

Questi risultati dimostrano per la prima volta che la proteina BAG3 può interagire con strutture e/o molecole specifiche presenti nella porzione extracellulare dei macrofagi. Ulteriori esperimenti saranno necessari per identificare il/i recettori molecolari coinvolti in questo legame e lo studio più approfondito della cascata di segnale innescata dal legame di BAG3 sulla superficie dei macrofagi. Non è di secondaria importanza anche analizzare l'effetto della proteina BAG3 sugli altri tipi cellulari che popolano il microambiente tumorale come: gli altri leucociti, i fibroblasti e le cellule dei vasi sanguigni e linfatici.

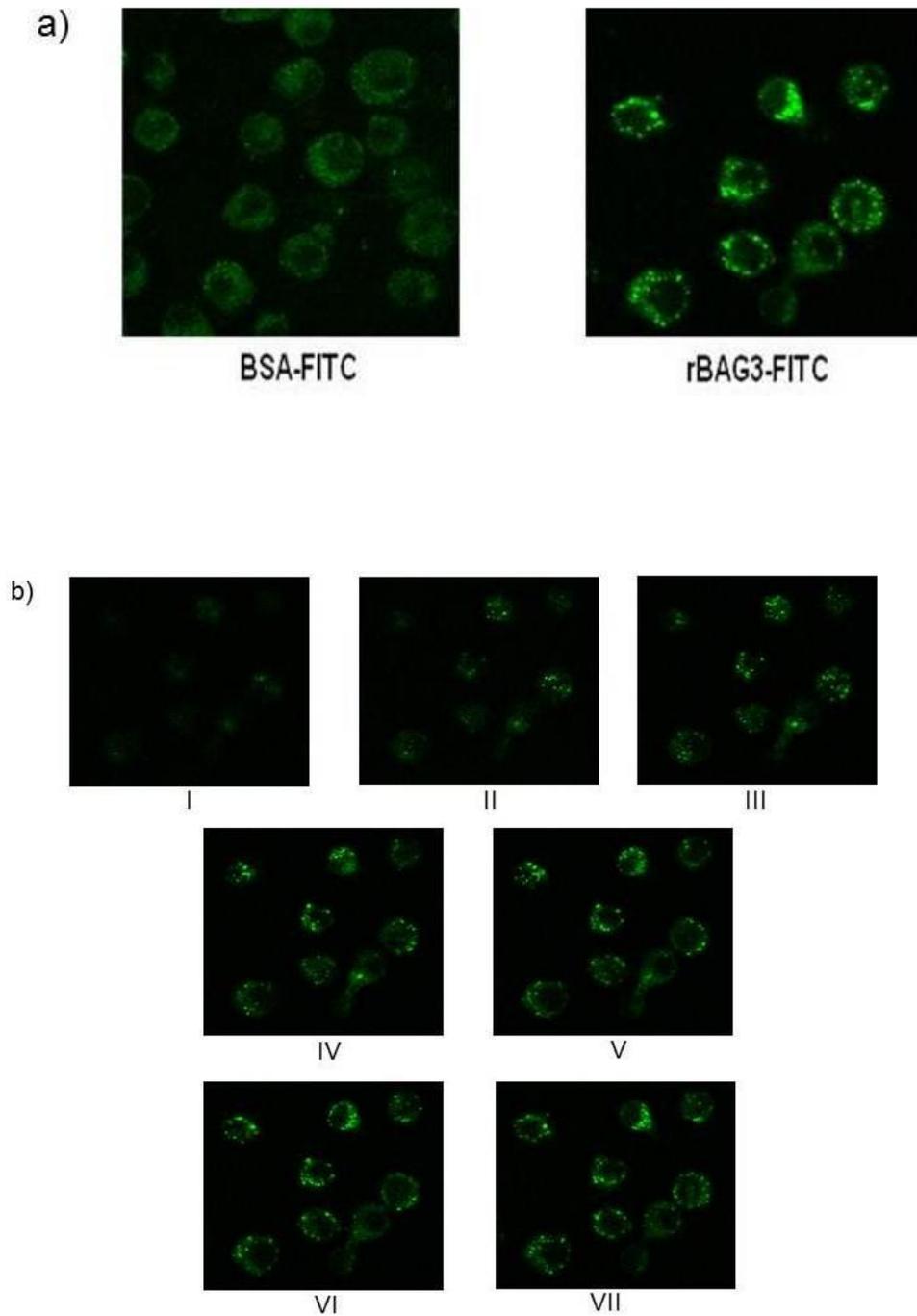


Figure 22 –Analisi del legame di rBAG3 alla superficie dei macrofagi murini. a) Immagini al microscopio confocale rappresentative del legame della rBAG3 coniugata a FITC alla superficie delle cellule J774.A1. La BSA coniugata a FITC è stata utilizzata come controllo della specificità del legame. b) Successione di sezioni ottiche corrispondenti a piani focali dalla parte più esterna fino alla parte più interna di cellule incubate con la rBAG3 coniugata a FITC.

4.1 Introduzione

Nella seconda parte di questo progetto lo scopo è stato quello di identificare un nuovo ruolo di BAG3 nella regolazione della neo-angiogenesi associata al tumore.

La proteina BAG3 è espressa in molti tipi di cellule in seguito a stimoli di stress, mentre la sua espressione è costitutiva in molti tipi di tumori. Inoltre, in precedenti lavori è stato dimostrato che nelle cellule neoplastiche BAG3 svolge una funzione anti-apoptotica favorendo così la progressione del tumore. Tuttavia, gli esperimenti condotti hanno permesso di identificare un nuovo meccanismo attraverso cui la proteina BAG3 può influenzare la crescita del tumore ossia attraverso una riduzione della neo-angiogenesi; infatti, la down-regolazione dell'espressione della proteina determina una riduzione del numero dei vasi, suggerendo un ruolo indiretto di BAG3 nel controllo della crescita del tumore. In questo lavoro è stato anche individuato il meccanismo attraverso il quale BAG3 controlla il ciclo cellulare di cellule endoteliali (HUVEC). La proliferazione di queste cellule è regolata da numerosi fattori di crescita (VEGF, R3-IGF, hEGF e altri) che inducono attraverso i loro specifici recettori, la fosforilazione di ERK1/2. La chinasi fosforilata attiva a valle targets che promuovono la progressione del ciclo da G1 a S. Tuttavia una fosforilazione sostenuta determina il blocco del ciclo per induzione di inibitori di Cdk come p21 e p15. I livelli di fosforilazione di ERK1/2 sono regolati da fosfatasi, in particolare DUSP6. Quello che noi dimostriamo è che BAG3 gioca un ruolo fondamentale in questo meccanismo ed in particolare che BAG3 è richiesta per l'interazione tra DUSP6 e pERK1/2.

4.2 Risultati e discussione

4.2.1 Il silenziamento della proteina BAG3 inibisce la crescita del tumore e la neoangiogenesi

Per analizzare il ruolo di BAG3 nella neoangiogenesi tumorale è stato utilizzato un modello di xenotrapianti di cellule di melanoma umano A375.

Come mostrato in figura 23a il trattamento intratumorale con *bag3 small interfering (si) RNA-Ad* ha determinato un'inibizione della crescita del tumore, mentre il trattamento con l'adenovirus di controllo non ha avuto effetto. L'analisi immunohistochimica dei risultanti tumori, utilizzando HMB-45 come marker delle cellule di melanoma, ha mostrato un'uguale distribuzione del segnale di BAG3 sia nei tumori trattati con *bag3siRNA* sia nel controllo. Al contrario alti livelli nell'espressione della proteina sono stati osservati nei vasi dei tumori non trattati o trattati con AdNull, mentre l'espressione di BAG3 è risultata bassa o assente nei vasi dei tumori trattati con *bag3siRNA-Ad* (fig 23b). La valutazione del numero dei vasi, utilizzando un anticorpo anti-fattore von Willebrand, negli stessi campioni di tumore, ha mostrato una diminuzione del numero di vasi nei tumori trattati con *bag3siRNA-Ad* comparati ai tumori trattati con AdNull e al controllo negativo (fig. 23c).

Questi risultati hanno suggerito che BAG3 influenza la neo-angiogenesi associata al tumore.

Per confermare che BAG3 è effettivamente necessaria per la neoangiogenesi in vivo, è stato condotto un saggio DIVAA (Direct In vivo Angiogenesis Assay), un modello di angiogenesi riportato in letteratura (Guedez *et al.*, 2003; Basile *et al.*, 2011; Norrby 2006). Il saggio consiste in un impianto sottocutaneo, in topi nudi, di cilindri di silicone semichiusi (angioreattori) al cui interno è stata posta matrice

extracellulare miscelata con fattori angiogenici (VEGF/FGF) e rispettivamente con PBS, *bag3s*/RNA-Ad e AdNull. L'invasione della cellule endoteliali murine è stata evidente negli angioreattori di controllo e negli angioreattori nei quali è stato aggiunto un vettore adenovirale di controllo (AdNull); al contrario, negli angioreattori a cui è stato aggiunto il vettore *bag3s*/RNA-Ad, non è stata osservata la presenza di vasi neoformati (fig 23d). La successiva analisi del numero di cellule endoteliali estratte dai tubini e trattate con FITC-Lectin, ha mostrato una significativa diminuzione del numero di cellule endoteliali negli angioreattori trattati con *bag3s*/RNA-Ad (fig.23e). In conclusione, questi dati dimostrano che BAG3 è coinvolta nella neoangiogenesi associata al tumore e la sua down-regolazione determina una riduzione della crescita dei vasi sanguigni attraverso un effetto diretto sulle cellule endoteliali.

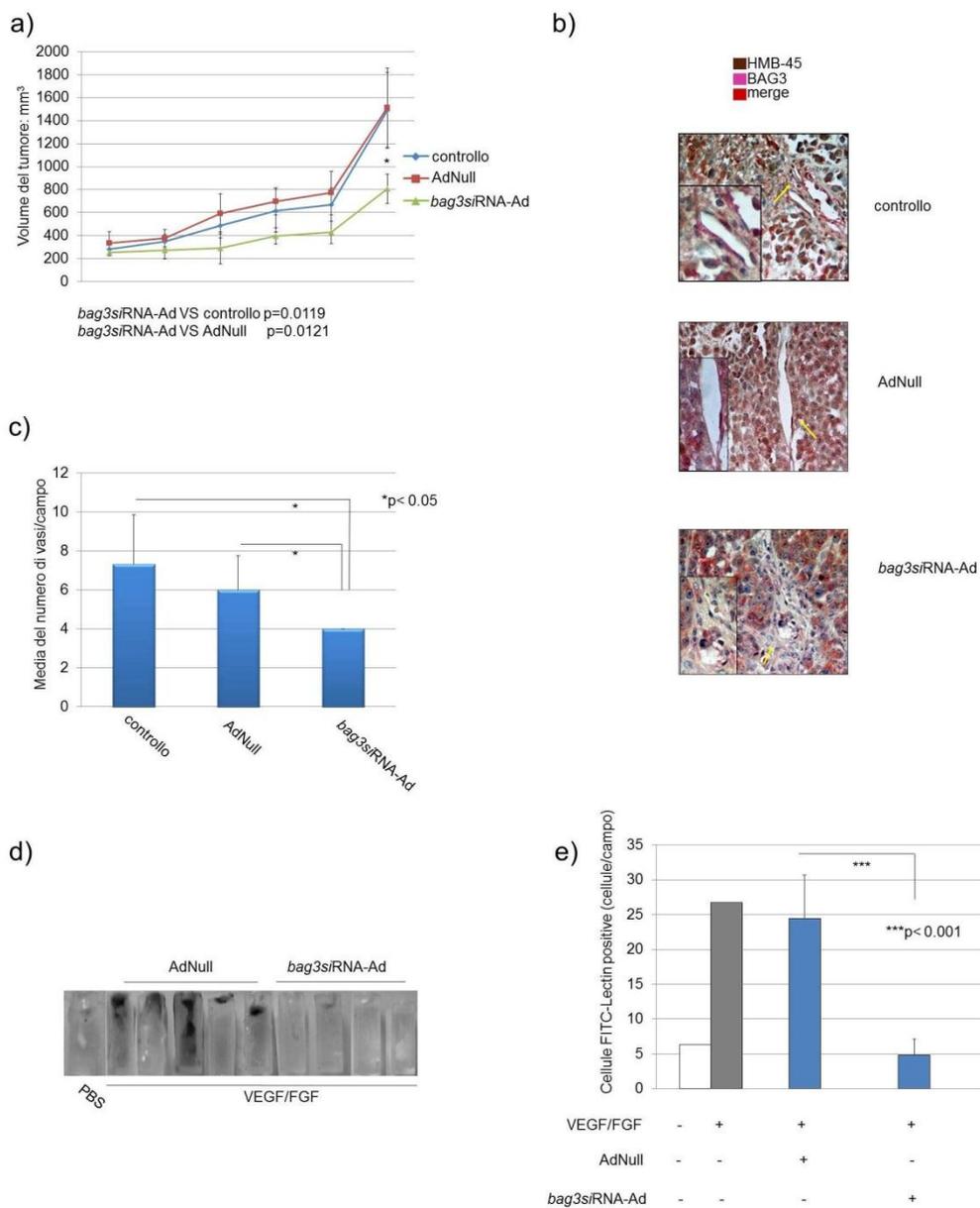


Figure 23 – Il silenziamento di BAG3 inibisce la crescita del tumore e la neo-angiogenesi. a) Curva di crescita dei tumori in modello xenograft A375 trattati con AdNull e *bag3siRNA-Ad*. b) Analisi immunohistochimica dei tumori escissi utilizzando l' anticorpo anti-BAG3 AC-1 e un anti-HMB-45, uno specifico marker delle cellule di melanoma. c) Il grafico riporta la media del numero di vasi per campo calcolata dall'analisi di 10 campi per sezione di tumore. I vasi sono stati colorati con l'anticorpo anti-fattore von Willebrand. d) Foto degli angioreattori escissi dai topi dopo 21 giorni. e) Istogramma della popolazione di cellule endoteliali coniugate a FITC quantizzate al microscopio a fluorescenza. Sono stati analizzati 20 campi per campione e i risultati sono stati espressi come numero di cellule FITC-lectin positive/campo.

4.2.2 La down-modulazione di BAG3 nelle cellule HUVEC determina il blocco del ciclo cellulare in G0/G1

Per analizzare il meccanismo biologico alla base della regolazione dell'angiogenesi da parte di BAG3, sono stati studiati gli effetti del suo silenziamento in vitro in cellule HUVEC (cellule endoteliali umane di vena di cordone ombelicale). La down-modulazione di BAG3, utilizzando specifici small interfering RNA (fig 24a-b), ha determinato un' inibizione della crescita cellulare, mentre il non-target siRNA, utilizzato come controllo, non ha avuto effetto. La differenza nella crescita cellulare è particolarmente significativa a 48 ore dalla trasfezione (NT siRNA vs bag3 siRNA *p < 0,00059).

Inoltre la conta cellulare per esclusione con trypan blue, ha mostrato un'assenza di cellule morte evidenziando, quindi, che la riduzione della crescita è attribuibile ad un effetto citostatico. L'analisi del ciclo cellulare delle cellule trattate nelle stesse condizioni sperimentali ha rivelato che le cellule in cui BAG3 è silenziata, sono bloccate nella fase G1 (fig 24c). L'arresto del ciclo cellulare inizia già a 24 ore dalla trasfezione (*bag3*siRNA vs controllo p<0.022) e raggiunge un blocco quasi totale alle 72/96 ore, parallelamente con la riduzione dei livelli di espressione della proteina (fig 24a).

Anche l'analisi citofluorimetrica non ha evidenziato nessun aumento del picco apoptotico sub-G1 indicando che queste cellule non subiscono morte cellulare programmata in seguito al silenziamento di BAG3, come invece riportato in letteratura in linee cellulari tumorali (Rosati *et al.*, 2011).

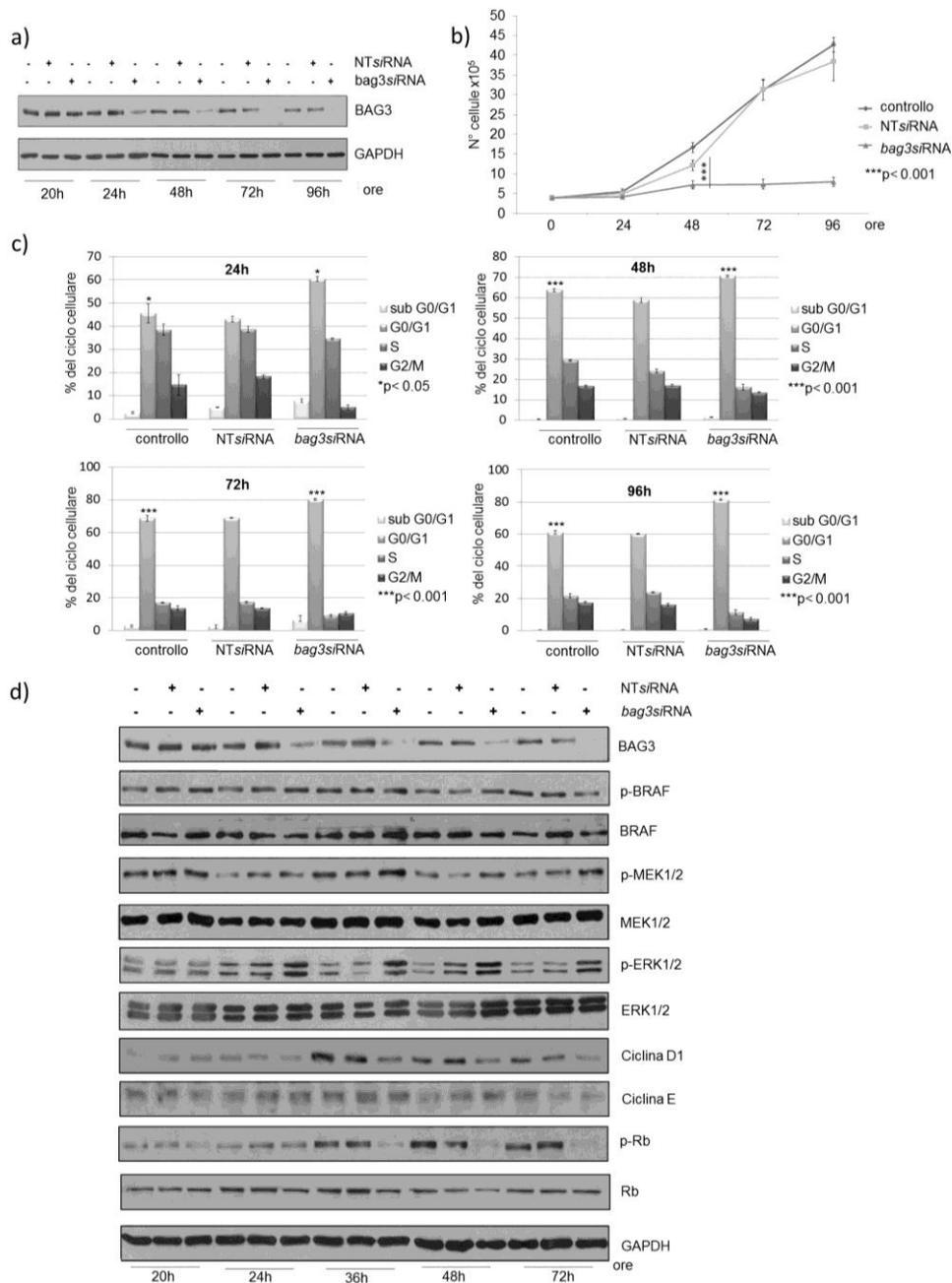


Figure 24 – Il silenziamento di BAG3 in cellule HUVEC determina un blocco in G1. a) Analisi mediante Western blot di lisati di cellule di controllo e trattate con NTsRNA o bag3siRNA ai tempi indicati. b) Grafico riportante il numero di cellule nel tempo in seguito alla trasfezione con i siRNA indicati. c) Gli istogrammi riportano l'analisi citofluorimetrica della distribuzione delle cellule nelle varie fasi del ciclo cellulare in seguito a trattamento con NTsRNA o bag3siRNA. d) Analisi mediante Western blot dei livelli di espressione e/o di fosforilazione di alcuni importanti modulatori coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare. L'anticorpo anti-GAPDH è stato utilizzato come controllo di caricamento.

4.2.3 Il silenziamento di BAG3 induce un aumento della fosforilazione di pERK1/2 e dei livelli di p15 e p21.

Per analizzare i meccanismi molecolari alla base del ruolo di BAG3 nella regolazione del ciclo cellulare di queste cellule, sono stati analizzati gli effetti del suo silenziamento sui livelli di espressione e/o fosforilazione di alcuni importanti modulatori coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare, in particolare quelli coinvolti nella progressione da G1 a S. La figura 24d, mostra che il silenziamento di BAG3 induce un aumento dei livelli di fosforilazione di ERK1/2 e una ridotta fosforilazione di Rb, parallelamente ad una riduzione dei livelli di espressione di BAG3.

ERK (Extracellular signal-regulated kinases) 1/2 è una protein-chinasi mitogeno-attivata (MAPchinasi) che regola varie attività cellulari, come la mitosi, la differenziazione, la proliferazione e la sopravvivenza cellulare.

L'attivazione di ERK1/2 è necessaria per la progressione del ciclo cellulare dalla fase G1 alla fase S, ed è associata ad un' induzione di regolatori positivi del ciclo cellulare e inattivazione di geni antiproliferativi. Tuttavia, in cellule primarie non immortalizzate, un' aumentata e prolungata attivazione di ERK 1/2 induce un arresto del ciclo cellulare per accumulo di inibitori di chinasi ciclina-dipendenti (Bodart 2010; Cagnol e Chambard, 2009; Meloche e Pouysségur, 2007). Il blocco del ciclo è dovuto ad una mancata fosforilazione e quindi inattivazione di Rb da parte del complesso ciclina Cdk4/6 e del complesso ciclina E Cdk2 che, invece, interviene alla fine della fase G1 del ciclo cellulare (Ezhevsky *et al.*, 1997). Questo effetto, a sua volta, è dovuto ad una forte induzione, da parte di pERK1/2, di inibitori delle Cdk come p21, p16 (INK4a) e p15 (INK4b) (Cagnol *et al.*, 2010; Cànepa *et al.*, 2007; Gil *et al.*, 2006; Wanwright *et al.*, 2001).

Come mostrato in figura 24d il silenziamento di BAG3 induce un aumento sostenuto della fosforilazione di ERK1/2 che una sua volta provoca una riduzione della fosforilazione di Rb.

Al fine di comprendere il meccanismo di inibizione della fosforilazione di Rb, sono stati analizzati i livelli di espressione di regolatori del ciclo cellulare come p15, p16, p18 e p21, i quali bloccano l' attività del complesso ciclina-cdk prevenendo l' attivazione del loro target. L'analisi mediante western blot, ha mostrato una significativa induzione dei livelli di espressione degli inibitori p21 (fig.25a) e p15 (fig.25b), nei campioni in cui la proteina BAG3 è stata silenziata.

L'aumento dei livelli di espressione di p15 e la sua traslocazione nucleare sono stati confermati mediante microscopia confocale. La figura 24c mostra che in cellule in cui il segnale di BAG3 è spento vi è una marcata traslocazione dell' inibitore a livello nucleare. Infatti, l' intensità di fluorescenza di p15 nei nuclei è significativamente aumentata nelle cellule (fig.25c) e il numero di nuclei positivi aumenta dell' 89% (fig. 25d). E' interessante notare che nelle cellule in cui BAG3 è silenziato, i livelli di espressione della ciclina D1 sono ridotti fornendo un ulteriore meccanismo attraverso il quale BAG3 può regolare la fosforilazione di Rb e il conseguente blocco in G1.

Il meccanismo descritto in vitro è stato confermato anche in vivo mediante analisi immunostochimica dei campioni tumorali provenienti da animali di controllo o trattati con *bag3s*RNA-Ad o con l'adenovirus di controllo. Come mostrato in figura 25e il trattamento con *bag3s*RNA-Ad determina una riduzione dell' espressione di BAG3 associata ad una aumentata espressione di pERK1/2 e p21. Questi dati mostrano chiaramente che BAG3 è essenziale per la progressione G1/S e che la sua

down-modulazione determina un blocco nella fase G1 attraverso una regolazione di pERK1/2.

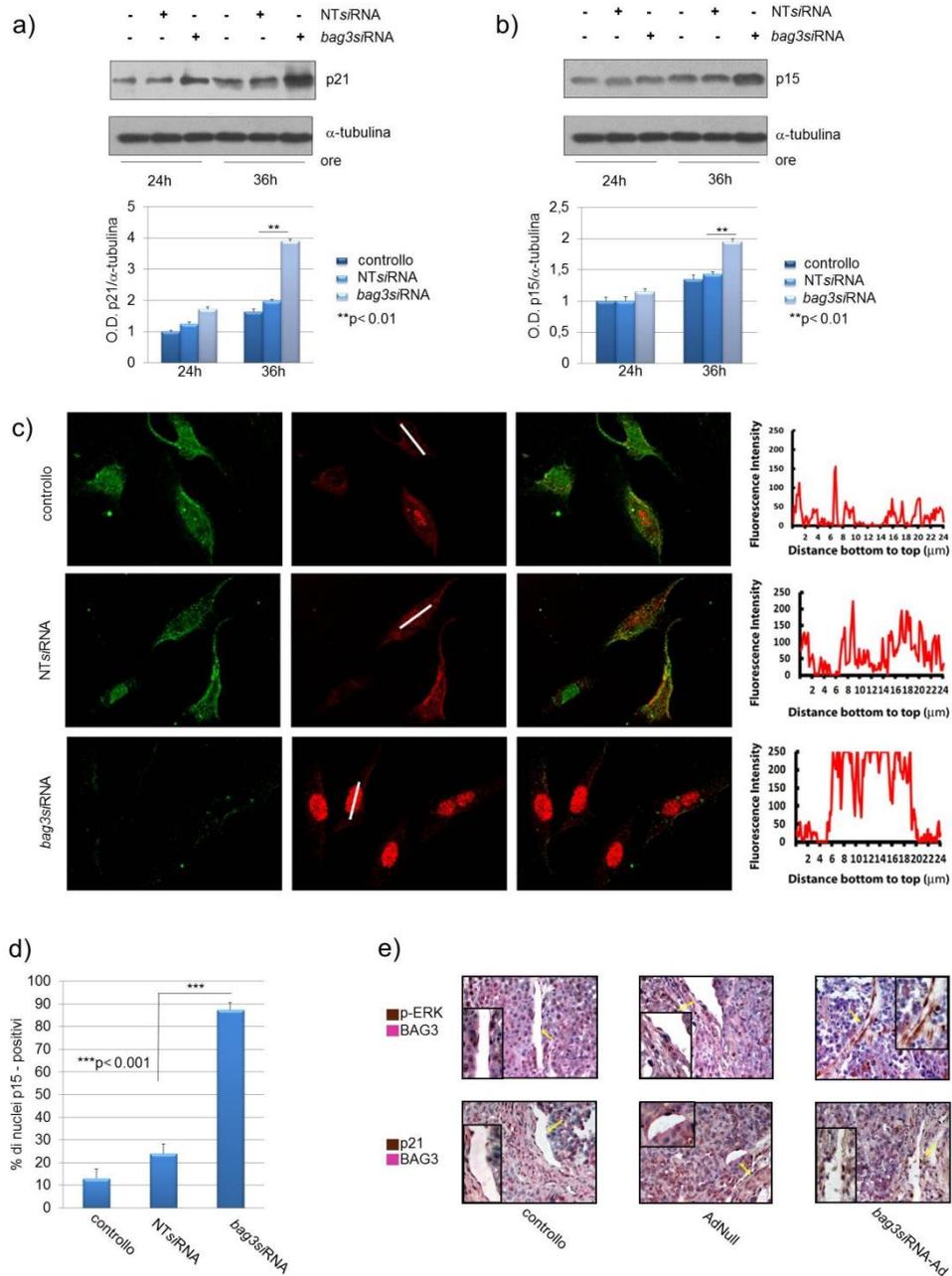


Figure 25 – Il silenziamento di BAG3 induce un aumento della fosforilazione di ERK1/2 e dei livelli di p15 e p21. a,b) Analisi mediante Western blot e analisi densitometrica dei livelli di espressione di p15 e p21 in seguito a trasfezione. Un anticorpo anti- α tubulina è stato utilizzato come controllo di caricamento. c) Analisi di microscopia confocale sulla localizzazione di BAG3 (verde) e p15 (rosso) in cellule HUVEC

trasfettate per 36 ore con NTs/RNA o *bag3s*/RNA. Il pannello a destra riporta il profilo spaziale dell'intensità di pixel per p15 (rosso) e mostra un netto incremento del segnali a livello dei nuclei delle cellule in cui BAG3 è silenziata. e) Analisi immunohistochimica doppia su sezioni tumori escissi utilizzando gli anticorpi anti-BAG3-pERK1/2 e un anti-BAG3-p21.

4.2.4 La proteina BAG3 interagisce con la chinasi ERK1/2 e la sua fosfatasi DUSP6

Un possibile meccanismo attraverso il quale BAG3 può regolare la fosforilazione di ERK1/2 è attraverso il reclutamento di fosfatasi, una classe di enzimi idrolasi che catalizzano la rimozione di gruppi fosfato. Una delle principali fosfatasi che regola i livelli di fosforilazione di ERK 1/2 è DUSP6/MKP-3 (Patterson *et al*, 2009.; Jurek *et al*, 2009.; Owens, 2007).

Pertanto, sono stati effettuati esperimenti al fine di analizzare se BAG3 può avere effetto sull' interazione tra queste proteine. In particolare la proteina BAG3 è stata immunoprecipitata dal lisato di cellule HUVEC e l'immunoprecipitato è stato analizzato mediante western blot con un anticorpo anti-ERK1/2 e anti-DUSP6. Entrambe le proteine sono state co-immunoprecipitate con BAG3 mentre alcun segnale è presente nel controllo IgGs. (fig 26a). Questi dati hanno suggerito che le tre proteine interagiscono tra di loro.

L'immunoprecipitato con un anticorpo anti-DUSP6 ha confermato il legame sia di ERK1/2 sia di BAG3 mentre Hsp70, una proteina ampiamente riportata in letteratura come partner di BAG3, non è presente nel complesso, escludendo così un ruolo diretto della proteina in questo processo (fig. 26d).

L'analisi immunogold ha confermato che le tre proteine co-localizzano nel citosol di cellule HUVEC (fig. 26c).

I risultati ottenuti, hanno portato ad ipotizzare un ruolo fondamentale di BAG3 nel favorire il legame di DUSP6 al suo substrato. Per confermare ciò è stata immunoprecipitata la proteina DUSP6 da estratti di cellule di controllo o trasfettate con NTs/RNA- o *bag3s*/RNA e l'immunoprecipitato è stato analizzato con un anticorpo anti-pERK1/2. Come mostrato in figura 26c nelle cellule in cui la proteina BAG3 è silenziata si osserva una ridotta interazione della fosfatasi DUSP6 al suo substrato rispetto alle cellule di controllo e trattate con il NTs/RNA. In conclusione questi dati hanno dimostrato che la proteina BAG3 è indispensabile per il legame tra DUSP6 e pERK1/2, infatti, in assenza di BAG3 la chinasi non è defosforilata da DUSP6 con conseguente iperfosforilazione e blocco del ciclo cellulare.

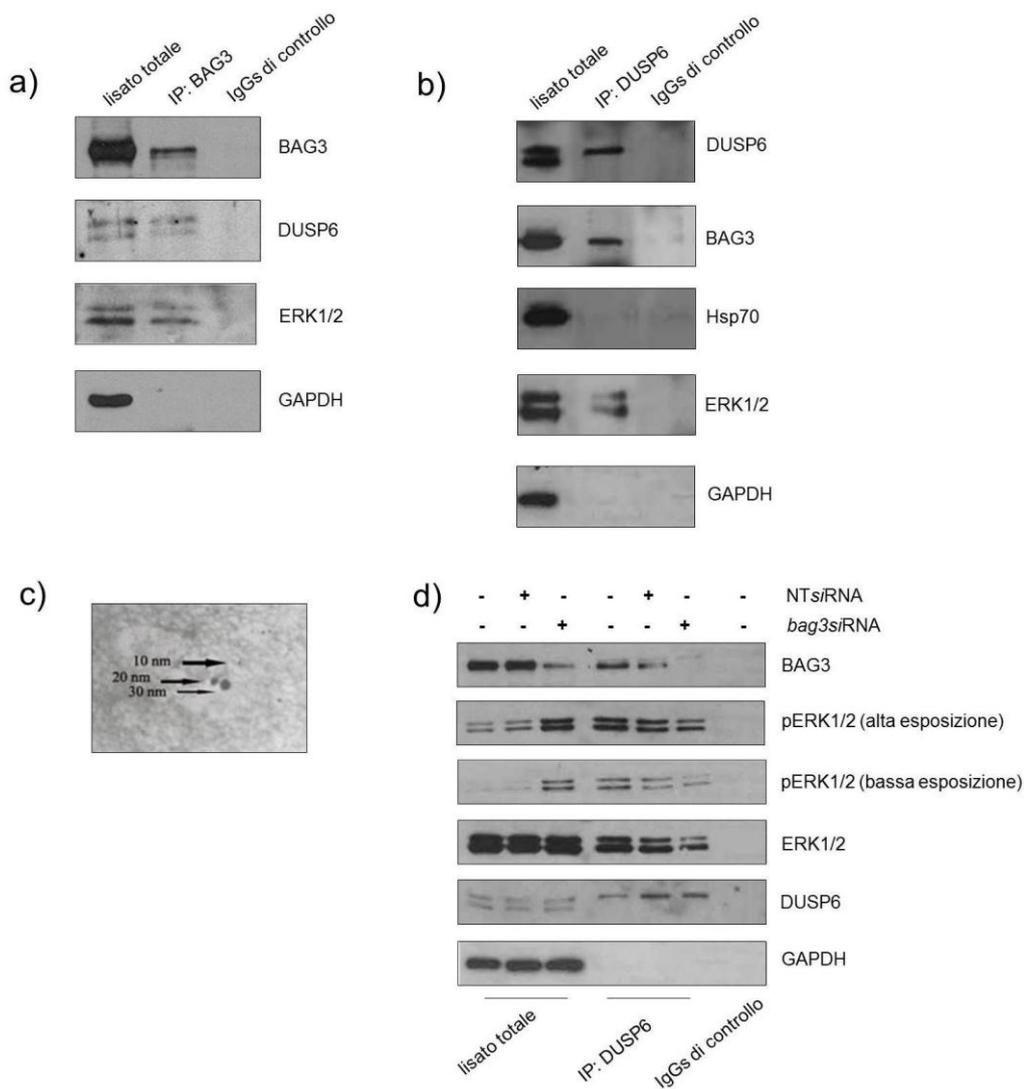


Figura 26 – La proteina BAG3 interagisce con la chinasi ERK1/2 e la sua fosfatasi DUSP6. a) Analisi mediante Western blot dell'immunoprecipitato da estratti di cellule HUVEC utilizzando l' anticorpo anti-BAG3 e b) anti-DUSP6. L'immunoprecipitato con IgGs di mouse è stato utilizzato come controllo negativo. c) Immagine di microscopia elettronica di cellule HUVEC utilizzando anticorpi coniugati anti-DUSP6 (particelle di 10nm), anti-ERK1/2 (particelle di 20nm) e anti-BAG3 (particelle di 30nm). La scala utilizzata è di 0.5 μ m. d) Analisi mediante Western blot dell' immunoprecipitato da estratti di cellule HUVEC trasfettate per 36 ore, utilizzando l' anticorpo anti-DUSP6. L'immunocomplesso è stato poi rivelato con gli anticorpi specifici per BAG3, pERK1/2, ERK1/2, DUSP6 o GAPDH. Sono state riportate due esposizioni per pERK1/2 per dimostrare l'effetto del silenziamento di BAG3

5.1 Conclusioni

In questa tesi è stato studiato il ruolo della proteina BAG3 nel microambiente tumorale; in particolare è stata analizzata l'attività della proteina BAG3 rilasciata dalle cellule tumorali sulle cellule infiammatorie e caratterizzato il suo ruolo intracellulare nella regolazione della neoangiogenesi.

In particolare, i dati suggeriscono che:

- BAG3 è rilasciata dalle cellule tumorali nello spazio extracellulare in forma solubile e/o associata a microvescicole. Inoltre è stata ritrovata, mediante test ELISA, anche in sieri di pazienti affetti da adenocarcinoma pancreatico.
- Nello spazio extracellulare, la proteina BAG3 solubile è in grado di legare la superficie di cellule macrofagiche J774.A1 e di attivarle inducendo un aumento dell'espressione e dell'attività dell'enzima iNOS.
- La proteina BAG3 è in grado di influenzare la crescita del tumore regolando il processo di neoangiogenesi. È stato, infatti, identificato un nuovo meccanismo molecolare attraverso il quale BAG3 agisce sul ciclo di cellule endoteliali favorendo l'interazione tra ERK e la sua fosfatasi.

In conclusione, quindi, la proteina BAG3 è in grado di agire su due componenti importanti del microambiente tumorale, quali le cellule infiammatorie e la rete di vasi che circonda il tumore, suggerendo che essa può essere utilizzata come target di una terapia antineoplastica.

6.1 Materiali

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

La polimixina B (P0972-1MU) è stata acquistata alla Sigma-Aldrich (Milano, Italia)

Gli anticorpi utilizzati per riconoscere BRAF (C-19: sc-166), ERK1/2 (K-23: sc-94), α -tubulina (DM1A:sc-32293), DUSP6 (H-130: sc-28902), Rab4a (D-20: sc-312), calnexina (H-70: sc-11397) e GAPDH sono stati acquistati alla Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA). Gli anticorpi per riconoscere p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204: #9101), p-MEK1/2 (Ser221: #2338), p-B-RAF (Ser445:#2696), p-Rb (Ser780: #9307), ciclina D1 (#2922), p15 INKb (#4822) e MEK1/2 (L38C12: #4694) sono stati acquistati alla Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA). L'anticorpo anti-iNOS e anti-COX-2 sono stati ottenuti dalla Transduction Laboratories, USA. Gli anticorpi utilizzati per riconoscere la proteina BAG3 sono stati: l'anticorpo policlonale TOS-2 (prodotto contro l'intera proteina ricombinante), AC-1 monoclonale (in grado di riconoscere la porzione N-terminale).

Gli anticorpi secondari utilizzati sono stati i seguenti: per anticorpi primari policlonali, goat antirabbit (IgG) coniugati a HRP; per anticorpi primari monoclonali, goat anti-mouse coniugato a HRP (Jackson Immuno Research, PA).

6.2 Colture cellulari

Per gli esperimenti *in vitro* sono state utilizzate le seguenti linee cellulari.

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

Cellule endoteliali umani di vena di cordone ombelicale (HUVEC) sono state acquistate alla Promocell (Heidelberg, Germany). Tutti gli esperimenti sono stati effettuati su colture cellulari a basso passaggio. Le cellule sono state coltivate in EGM (Medium crescita endoteliale) -2 medio (EBM-2, 2% FBS, VEGF, R3-IGF-1, hEGF, hFGF, Idrocortisone, acido ascorbico, eparina e GA-1000) (Clonetics, Cambrex Bio Scienza Walkersville, Inc., Walkersville MD USA) a 37 ° C e in atmosfera il 5% di CO₂.

HepG2 (Hepatocellular carcinoma, human) , PANC-1 (Human pancreatic carcinoma, epithelial-like cell line), C6 (Glioma cell), ARO (human thyroid carcinoma), HT-29 (Epithelial Human Caucasian colon adenocarcinoma), ASPC-1 (Pancreatic Cancer Cell Line) sono state coltivate in piastre Petri da 100 mm , utilizzando diversi mezzi di coltura cellulare: EMEM, EGM, DMEM, RPMI .

6.3 Western blot

Le cellule sono state raccolte e lisate in un buffer contenente 20mM di HEPES (pH 7,5), 150 mM di NaCl, 0,1% Triton (TNN buffer) integrato con un cocktail di inibitori di proteasi (1 fluoruro fenilmetilsolfonile mM, 1mg/ml pepstatina A, 2 mg/ml aprotinina) e successivamente sottoposte a 3 cicli di gelo e scongelamento. Le proteine solubili sono state raccolte e conservate a -80°C dopo una centrifugazione a 12.000g per 15 min. La concentrazione proteica è stata determinata mediante il saggio Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA); 25 µg di proteine totali sono state corse su un gel di elettroforesi 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 ottenuto dalla Amersham Life Sciences Inc. (Arlington Heights, IL, USA).

La densitometria delle bande è stata determinata utilizzando il software Gimp2.

6.4 Immunofluorescenza indiretta

Le cellule Panc-1 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 l'anticorpo monoclonale anti-BAG3 AC-1 alla concentrazione di 3µg/ml. I vetrini sono poi stati lavati 3 volte con 1 x PBS ed incubati con una diluizione 1:500 di anticorpo secondario anti-mouse DyLight coniugato al fluoroforo 488 (ImmunoResearch Jackson) a temperatura ambiente per 45 minuti. 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.

Anche sulle cellule HUVEC è stata condotta un'immunofluorescenza indiretta. Le cellule in questo caso sono state prima trasfettate per 36 ore con 100nM di *bag3* siRNA o Non targeted siRNA. Oltre all'anticorpo AC-1 è stato utilizzato un anticorpo policlonale anti-p15 INK4b alla diluizione 1:100 e come anticorpo secondario un' anti-rabbit DyLight coniugato al fluoroforo 649 (ImmunoResearch Jackson).

6.5 ELISA

ELISA è l'acronimo di Enzime-Linked Immunoassorbent Assay, e rappresenta un saggio biochimico il cui scopo è quello di accertare la presenza e di determinare la quantità di un antigene attraverso l'utilizzo di uno specifico anticorpo, o di un anticorpo con un antigene.

Nel caso specifico è stato effettuato un saggio ELISA a sandwich. Per il saggio sono state utilizzate multiwell da 96 pozzetti (nunc-immunoplate) incubate overnight con una concentrazione di 4 µg/ml di un anticorpo monoclonale anti-BAG3 AC-2 in un buffer di coating, (NaHPO₄ 0.1 M pH 9). Per bloccare i siti aspecifici è stata aggiunta una soluzione di blocking (1% BSA in PBS). I campioni sono stati diluiti in una soluzione salina contenente albumina sierica di bovino (BSA) al 3% e incubati per 2 ore a temperatura ambiente. Una curva di calibrazione è stata ottenuta con concentrazioni scalari della proteina BAG3 ricombinante ricostituita nella medesima soluzione.

La piastra è stata, poi, lavata per tre volte con PBS/Tween (0,5 ml di Tween in 1L di PBS) ed è stato aggiunto per 2h a temperatura ambiente l' anticorpo policlonale TOS-2 1:1000. L'eventuale presenza del complesso ternario è stata rivelata con un anticorpo secondario anti-rabbit 1:2000 coniugato a perossidasi, che in presenza del substrato TMB (tetrametilbenzidina) emette un segnale alla lunghezza d'onda di 450 nm.

6.6 Digestione di proteine da gel

Le bande ottenute dal gel sono state lavate mediante aggiunta di 100µl del buffer AMBIC (ammonio bicarbonato 100 mM pH 7.4) e allontanato l'AMBIC è stata aggiunta una mix AMBIC più acetonitrile (50/50) per 10 min. Questo procedimento di lavaggio è stato ripetuto nuovamente. Successivamente è stato aggiunto DTT 10 mM in AMBIC 100 mM per 45 min. a 54° C .Sono stati ripetuti i lavaggi in AMBIC e AMBIC più acetonitrile. E' stata aggiunta iodoacetammide 50 Mm in AMBIC 100 mM per 30 min. a temperatura ambiente al buio. I lavaggi sono stati ripetuti ed è stato effettuato un lavaggio con solo acetonitrile per 5 min. Gli spot sono stati disidratati fino a secchezza completa in speed vac per almeno 30 min. E' stata aggiunta Tripsina 12 ng/µl in AMBIC 10 mM in ghiaccio per 45 min. Eliminato il liquido presente, è stato aggiunto AMBIC 10 mM fino a copertura del gel. Dopo 3 ore di reazione a 37° C gli spot sono stati analizzati mediante spettrometria di massa (MALDI/MS).

6.7 Purificazione di microvescicole dal surnatante cellulare

Le cellule tumorali sono state tenute in coltura in mezzo completo fino ad ottenere una confluenza dell'80%. Successivamente sono state lavate due volte con PBS e incubate per 16 ore in mezzo senza siero; a tale tempo la vitalità, valutata al trypan blue, era maggiore del 97%. Le microvescicole sono state ottenute dal surnatante delle cellule tumorali attraverso una serie di centrifugazioni ed ultracentrifugazioni. Il surnatante è stato centrifugato a 300 x g per 10 minuti per allontanare le cellule vive, a 2000 x g per 10 minuti per allontanare le cellule morte e

poi a 10000 x g per 30 minuti per allontanare i detriti cellulari. Ad ogni step il pellet è stato eliminato e recuperato il surnatante. Il surnatante finale è stato ultracentrifugato a 100000 x g per 70 minuti e il risultante pellet era corrisponde alle microvescicole. Infine il pellet è stato lavato con 200 μ l di PBS per eliminare la contaminazione delle proteine e ultracentrifugato alla stessa velocità per 70 minuti. Una volta rimosso il surnatante, le microvescicole sono state risospese in un piccolo volume di PBS corrispondente a 20 μ l.

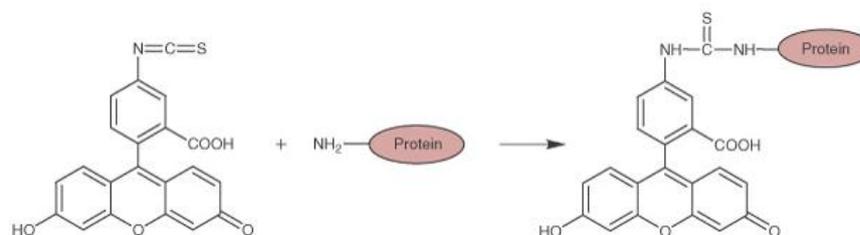
6.8 Valutazione dell'accumulo dei nitriti

La produzione di nitriti (NO_2^-), indice della sintesi di ossido nitrico, è stata misurata nel mezzo di coltura cellulare utilizzando il reattivo di Griess (Green *et al*, 1982) dopo un'incubazione di 24 ore con LPS e/o la proteina rBAG3. Per procedere alla valutazione della concentrazione dei nitriti prodotti, a 100 μ l di *medium* d'incubazione di ciascun campione sono stati aggiunti 100 μ l di reattivo di Griess costituito dall'1% di sulfanilamide e dallo 0.1% di naftiletildiamina, in acido fosforico al 5%. La densità ottica nello spettro del visibile a 550nm (OD_{550}) è stata misurata con uno spettrofotometro Beckman DU62. La concentrazione di nitriti è stata valutata confrontando la OD_{550} del campione con quella di una retta standard di nitrito di sodio preparata nello stesso mezzo di coltura adoperato per l'allestimento dei campioni. I risultati sono stati ottenuti come concentrazione μM di $\text{NO}_2^- \pm$ s.e.m.

6.9 Coniugazione della rBAG3 a FITC

La fluoresceina-5-isotiocianato (FITC) è un colorante fluorescente che appartiene al gruppo dei coloranti derivati dallo xantene. La sua coniugazione a rBAG3 è stata utilizzata per analizzare, al microscopio a fluorescenza, l'eventuale binding alla superficie delle cellule macrofagiche. È stato utilizzato, per effettuare questa coniugazione, un kit commerciale (FluoroTag™ FITC Conjugation Kit, SIGMA) nel quale si utilizza la fluoresceina isotiocianato isomero 1 che presenta un massimo di assorbimento a 495 nm e un'emissione massima a 525 nm.

La coniugazione a FITC si verifica attraverso i gruppi amminici liberi della proteina che formano un legame stabile tiourea con FITC come esemplificato dalla figura:



Il protocollo di coniugazione prevede, inizialmente la solubilizzazione di rBAG3 e FITC nel buffer carbonato-bicarbonato e successiva incubazione al buio per 2 ore in agitazione. Successivamente, è stata effettuata una separazione della proteina

coniugata a FITC da quella non coniugata utilizzando una colonna Sephadex G-25. La colonna sephadex è costituita da una resina di destrano a legami crociati ottenuta per polimerizzazione di unità di destano con epicloridrina. La frazione coniugata è raccolta, e allo spettrofotometro è stata determinata la concentrazione. Infine la rBAG3 coniugata a FITC è stata stabilizzata con albumina sierica bovina 1% e sodio azide 0.1 % e conservata ad una temperatura a 4° C. Con lo stesso protocollo è stata coniugata anche la BSA (albumina sierica bovina), utilizzata nei vari esperimenti come controllo negativo.

6.10 Immunofluorescenza diretta

L'immunofluorescenza è stata condotta su cellule macrofagiche J774.A1 secondo la seguente procedura.

Le cellule sono state piastrate su vetrini in multiwell da 6 ad una densità di 60.000 cellule per pozzetto in 1ml di mezzo di coltura. Dopo 24 ore, le cellule sono state incubate per 1 ora con la proteina ricombinante BAG3-FITC e BSA-FITC alla concentrazione di 1µg/ml.

I vetrini sono stati lavati con PBS e fissati con formaldeide al 3.7% diluita in PBS 1X per 30 min a temperatura ambiente; successivamente è stata aggiunta glicina 0.1 M in PBS per 5 minuti, per neutralizzare la formaldeide. Infine sono stati effettuati due lavaggi con PBS, un lavaggio con acqua deionizzata ed i vetrini sono stati montati con moviol per essere poi osservati al 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.

6.11 Analisi della crescita tumorale

Il modello di xenograft A375 è stato prodotto in topi femmine BALB/c nu/nu di 6 settimane (Charles River Laboratories, Wilmington, MA). Sono state inoculate sottocute 5×10^6 cellule A375 in 500 µl di soluzione salina. Due settimane dopo l'iniezione delle cellule tumorali, i topi sono stati trattati con l' adenovirus in grado di modulare i livelli di BAG3 (*bag3s*/RNA-Ad) e con un adenovirus di controllo (AdNull) come descritto precedentemente in letteratura (Ammirante *et al.*, 2010a). I topi con tumori di dimensioni simili, sono stati divisi in tre gruppi (10 per gruppo) e trattati due volte a settimana con PBS (100 µl), *bag3s*/RNA-Ad o AdNull (10^8 pfu/100µl). Le dimensioni dei tumori sono state misurate due volte a settimana utilizzando un calibro.

6.12 Immunoistochimica

Dopo due settimane di trattamento, i topi sono stati sacrificati e i tumori escissi sono stati inclusi in blocchi di paraffina e sezionati in fette di 6 µm di spessore. L'analisi immunoistochimica doppia è stata condotta usando il sistema EnVision™ G2 Doublestain (peroxidase/alkaline-phosphatase-based visualization system) seguendo il protocollo riportato nelle istruzioni (Dako Denmark A/S, DK). Rispetto a questo, il

protocollo è stato modificato includendo la deparaffinazione in xylene, reidratazione con alcool scalare fino ad arrivare all'acqua e buffer citrato a ph 6 per 30 minuti a 95°C. Dopo alcuni lavaggi con PBS, i campioni sono stati bloccati con il 5% di normal horse serum in TRIS buffer. Le sezioni sono state incubate per 1 ora a temperatura ambiente con l' anticorpo primario diluito come segue: AC-1 1:300; p-ERK 1:750; p-21 1:50; HMB-45 1:50. Infine le sezioni sono state colorate con ematossilina e montate con Permount.

6.13 Analisi della densità dei vasi.

I vasi sono stati colorati utilizzando l'anticorpo contro il fattore Von Willebrand (Dako A/S, Denmark). La conta è stata fatta su 10 campi di ogni sezione di tumore e riportati come la media del numero di vasi/campo.

6.14 Saggio di angiogenesi in vivo (DIVAA)

Il saggio di angiogenesi in vivo (Guedez *et al.*, 2003; Basile *et al.* 2011; Norrby *et al.*, 2006) è stato condotto utilizzando il DIVAA (Directed *in Vivo* Angiogenesis Assay) (Cultrex, Trevigen, Inc. Helgerman Ct., Gaithersburg). Cilindri sterili di silicone, chiusi da un lato (angioreattori), sono stati riempiti con 20 µl di estratto di membrana basale (BME) miscelato a fattori pro-angiogenici (VEGF, FGF) o PBS. Inoltre agli angioreattori sono stati aggiunti *bag3siRNA*-Ad o AdNull (10^8 pfu/100µl) e incubati a 37°C per 1 ora per permettere la formazione del gel, prima dell' impianto sul dorso dei topi (BALB/c nu/nu). Gli animali sono stati anestetizzati con 100 mg/ml di ketamina e 20 mg/ml xilazina. La formazione dei vasi è stata valutata dopo 21 giorni, quando gli angioreattori sono stati rimossi e digeriti in 300 µl di una soluzione CellSpense per 1 ora a 37°C. Dopo la digestione la mix è stata centrifugata a 250 g e il pellet di cellule è stato risospeso in 500 µl di DMEM supplementato con il 10% di FBS e poi piastrate in multiwell da 24 pozzetti per 16 ore a 37°C in presenza di CO₂. Le cellule sono state fissate con formaldeide al 3,7% per 30 minuti e poi incubate con glicina 0,1 M per 5 minuti. Successivamente, le cellule sono state incubate con il reagente FITC-Lectin e osservate al microscopio a fluorescenza (ZEISS, Germany). Il numero di cellule FITC-Lectin positive è stato contato analizzando 20 differenti campi per ogni campione.

6.15 Trasfezione

Le cellule HUVEC 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 $6,5 \times 10^3$ cellule/cm² in multiwells da sei pozzetti o in piastre Petri di 100 mm, in un mezzo (EGM-2) contenente il 2% di siero fetale bovino e fattori di crescita. Le cellule sono state trasfettate con una concentrazione di *siRNA* finale pari a 100 nM, utilizzando come veicolo di trasfezione la Trasfettina (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules CA). L'efficienza di ogni trasfezione è stata valutata mediante la tecnica Western blot.

6.16 Vitalità cellulare e analisi del ciclo cellulare

Le cellule sono state sincronizzate mantenendole ad una confluenza del 100% per 24 ore, in modo da bloccare il ciclo cellulare nella fase G0/G1 per inibizione da contatto (Dai *et al.*, 2007). Le cellule sincronizzate sono state staccate con tripsina e piastrate ad una densità di $6,5 \times 10^3$ cells/cm², dopo due ore sono state trasferite come descritto precedentemente e raccolte dopo 24, 48, 72 e 96 ore. La vitalità cellulare è stata valutata mediante un saggio di esclusione in Trypan Blue. I dati ottenuti sono stati inseriti in un grafico a linee e la crescita cellulare è stata valutata in triplicato sperimentale. L'analisi del ciclo cellulare è stata effettuata dopo l'incubazione delle cellule con una soluzione di PI (2.5 mg/ml ioduro di propidio, 0.75 M sodio citrato a pH 8.0, 0.1% Triton). L'intensità di fluorescenza è stata misurata mediante citometria a flusso (FACScan Becton Dickinson). Per ogni campione sono stati analizzati 10.000 eventi e la percentuale di cellule in ogni fase del ciclo è stata calcolata utilizzando il software ModFit LT.

6.17 Co-immunoprecipitazione

100 µl di Affi-Gel 10 (Bio-Rad, Hercules, CA) sono stati lavati con acqua fredda deionizzata, uniti con 7 µg di anticorpo in 50 µl di tampone di binding (10 mM HEPES pH 7,5) e incubate per 1 ora a temperatura ambiente. Alla fine della reazione, il gel è stato ampiamente lavato con PBS. I siti insaturi sono stati bloccati con l'aggiunta di etanolamina 1M (pH 8) 1/10 in relazione al volume di gel ed incubati per 1 ora a temperatura ambiente. L'eccesso di etanolamina è stato allontanato da ulteriori lavaggi con PBS. Le cellule sono state raccolte e lisate con buffer TNN (20 HEPES mM, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% Triton, 10% glicerolo), 300 µg di proteine sono state incubate a 4°C per 2 ore con 30µl di resina precedentemente coniugata con l'anticorpo. Gli immunocomplessi sono stati precipitati per centrifugazione e lavati 5 volte con buffer TNN. Le proteine ottenute da immunoprecipitazione e 20 µg di proteine totali sono state caricate su un gel SDS-PAGE e trasferiti su una membrana di nitrocellulosa.

6.18 Microscopia immunoelettronica

Le cellule HUVEC sono state disidratate con alcol e infiltrate per 4 ore a temperatura ambiente in una resina bianca acrilica LR (Sigma) e polimerizzata a 60°C per 24 ore. Sezioni sottili sono state incubate per 30 minuti a temperatura ambiente in una soluzione di TBS (20 mM Tris-HCl, pH 7,6, 225 mM NaCl, 1% di albumina di siero bovino) e poi incubate overnight a 4°C con gli anticorpi alle seguenti diluizioni: anti-DUSP-6 (4 µg/ml), anti-ERK1/2 (4 µg/ml) e anti-BAG3 Ac-1 (8 µg/ml).

I campioni sono stati poi incubati per 1 ora a temperatura ambiente, con anticorpi secondari coniugati a particelle di oro colloidale di diverse dimensioni. Le sezioni sono state colorate con acetato di uranile ed esaminate utilizzando un microscopio elettronico JEOL 100S (JEOL, Boston, MA).

Abraham D., Zins K., Sioud M., Lucas T., Schäfer R., Stanley E.R., *et al.* **2010**. Stromal cell-derived CSF-1 blockade prolongs xenograft survival of CSF-1-negative neuroblastoma. *Int. J. Cancer* **126**, 1339–1352.

Aharinejad S., Sioud M., Lucas T. Abraham D. **2009**. Targeting stromal-cancer cell interactions with siRNAs. *Methods Mol. Biol.* **487**, 243–266.

Allinen M., Beroukhim R., Cai L., Brennan C., Lahti-Domenici J., Huang H., *et al.* **2004**. Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell* **6**, 17–32.

Ammirante M, Rosati A, Arra C, Festa M, Basile A, Falco A, *et al.* **2010a**. IKK γ protein is a target of BAG3 regulatory activity in human tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA*; **107**:7497–7502.

Ammirante M, Luo JL, Grivnickov S, Nedospasov S, Karin M. **2010b**. B-cell-derived lymphotoxin promotes castration-resistant prostate cancer. *Nature*; **464**:302–305.

Anderberg, C., Li, H., Fredriksson, L., Andrae, J., Betsholtz, C., Li, X., *et al.* **2009**. Paracrine signaling by platelet-derived growth factor-CC promotes tumor growth by recruitment of cancer-associated fibroblasts. *Cancer Res.* **69**, 369–378.

Asea A, Kraeft SK, Kurt-Jones EA, Stevenson MA, Chen LB, Finberg RW *et al.* **2000**. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med* **6(4)**: 435-442

Autiero, M., Waltenberger, J., Communi, D., Kranz, A., Moons, L., Lambrechts *et al.* **2003**. Role of PIGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat Med* **9**, 936-943.

Balkwill F, Mantovani A. **2001**. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*; **357**: 539–545.

Barreto A, Gonzalez JM, Kalingu E, Asea A and Fiorentino S **2003**. Stress-induced release of HSC70 from human tumors; *Cell Immunol.* **222**: 97-104

Barry OP, Kazanietz MG, Praticò D, FitzGerald GA. **1999**. Arachidonic acid in platelet microparticles up-regulates cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin formation via a protein kinase C/ mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *J Biol Chem*; **274**: 7545-7556.

Barry OP, Praticò D, Lawson JA, FitzGerald GA. **1997**. Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. *J Clin Invest*; **99**: 2118-2127.

Barry OP, Praticò D, Savani RC, FitzGerald GA. **1998**. Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *J Clin Invest*; **102**: 136-144.

Basile A, Del Gatto A, Diana D, Di Stasi R, Falco A, Festa M *et al.* **2011**. Characterization of a Designed Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

Antagonist Helical Peptide with Antiangiogenic Activity in Vivo. *J. Med. Chem*; **54**: 1391–1400

Basile A, Zeppa R, Pasquino N, Arra C, Ammirante M, Festa M, *et al.* **2011**. Exposure to 50 Hz electromagnetic field raises the levels of the anti-apoptotic protein BAG3 in melanoma cells *J Cell physiol.* **226**(11):2901-2907

Begley L.A., Kasina S., MacDonald J., Macoska, J.A. **2008**. The inflammatory microenvironment of the aging prostate facilitates cellular proliferation and hypertrophy. *Cytokine* **43**, 194–199.

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.

Benjamin, L. E., Golijanin D, Itin A, Pode D, Keshet E. **1999**. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J. Clin. Invest.* **103**, 159–165.

Betsholtz C, Karlsson L, Lindahl P. **2001**. Developmental roles of platelet-derived growth factors. *Bioessays*. **23**:494–507.

Bhowmick, N.A., Chytil, A., Plieth, D., Gorska, A.E., Dumont, N., Shappell, S., *et al.* **2004a**. TGF-beta signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia. *Science* **303**: 848–851.

Bissell MJ, Hall HG, Parry G. **1982**. How does the extracellular matrix direct gene expression? *J Theor Biol*; **99**: 31–68.

Bodart JF. **2010**. Extracellular-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase cascade: unsolved issues. *J Cell Biochem*; **109**:850-857

Bollrath J., Phesse T.J., von Burstin V.A., Putoczki T., Bennecke M., Bateman T., *et al.* **2009**. Gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis. *Cancer Cell* **15**, 91–102.

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.

Cagnol S, Chambard JC. **2010**. ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death-apoptosis, autophagy and senescence. *FEBS J*; **277**:2-21.

Cánepa ET, Scassa ME, Ceruti JM, Marazita MC, Carcagno AL, Sirkin PF *et al.* **2007**. INK4 proteins, a family of mammalian CDK inhibitors with novel biological functions. *IUBMB Life*; **59**:419-426.

Carmeliet, P., Moons, L., Luttun, A., Vincenti, V., Compernelle, V., De Mol, M.,

Wu, Y., Bono, F., Devy, L., Beck, H., *et al.* **2001**. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* **7**, 575-583.

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

Cedergren J, Forslund T, Sundqvist T, Skogh T. **2002** Inducible nitric oxide synthase is expressed in synovial fluid granulocytes. *Clin Exp Immunol*; **130**:150–5.

Cesaro E, Montano G, Rosati A, Crescitelli R, Izzo P, Turco MC, *et al.* **2010**. WT1 protein is a transcriptional activator of the antiapoptotic bag3 gene. *Leukemia*; **24**:1204–1206

Chen CC, Sun YT, Chen JJ, Chang YJ: 2001. Tumor necrosis factor- induced cyclooxygenase-2 expression via sequential activation of ceramide-dependent mitogenactivated protein kinases, and I-B kinase 1/2 in human alveolar epithelial cells. *Mol Pharmacol*, **59**, 493–500.

Chen L, Wu W, Dentchev T, Zeng Y, Wang J, Tsui I, *et al.* **2004**. Light damage induced changes in mouse retinal gene expression. *Exp Eye Res.*; **79**:239–247

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. *J Clin Endocrinol Metab.*; **92**:1159–1163.

Choi K.S., Bae M.K., Jeong J.W., Moon H.E. and Kim K.W. **2003** Hypoxia-induced angiogenesis during carcinogenesis. *J. Biochem. Mol. Biol.* **36**: 120-127.

Claffey K.P., Shih S.C., Mullen A., Dziennis S., Cusick J.L., *et al.* **1998**. Identification of a human VPF/VEGF 3' untranslated region mediating hypoxia-induced mRNA stability. *Mol Biol Cell* **9**: 469-81

Colinet H, Hoffmann A. **2010**. Gene and protein expression of *Drosophila* Starvin during cold stress and recovery from chill coma. *Insect Biochem Mol Biol.*; **40**:425–428

Collino F, Deregibus MC, Bruno S, Sterpone L, Aghemo G, Viltono L, *et al.* **2010**. Microvesicles derived from adult human bone marrow and tissue specific mesenchymal stem cells shuttle selected pattern of miRNAs. *PloS One.* **27**; **5**:e11803.

Conn G., Bayne M.L., Soderman D.D., Kwok P.W., Sullivan K.A., Palisi T.M. *et al.* **1990**. Aminoacid and cDNA sequences of a vascular endothelial cell mitogen that is homologous to platelet-derived growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**: 2628-2632.

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

Condeelis, J., and Pollard, J.W. **2006**. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* **124**, 263–266.

Coulson M, Robert S, Saint R. **2005**. Drosophila starvin encodes a tissue-specific BAG-domain protein required for larval food uptake. *Genetics*; **171**:1799–1812

Crawford, Y., Kasman, I., Yu, L., Zhong, C., Wu, X., Modrusan, Z., Kaminker, J., and Ferrara, N. **2009**. PDGF-C mediates the angiogenic and tumorigenic properties of fibroblasts associated with tumors refractory to anti-VEGF treatment. *Cancer Cell* **15**, 21–34.

Cross RK, Wilson KT. **2003**. Nitric oxide in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*; **9**:179–89.

Dai C, Whitesell L, Rogers AB, Lindquist S. **2007**. Heat shock factor 1 is a powerful multifaceted modifier of carcinogenesis. *Cell*; **130**: 1005–1018.

Dannenber AJ, Altorki NK, Boyle JO, Dang C, Howe LR, Weksler BB, Subbaramaiah K: **2001**. Cyclooxygenase-2: a pharmacological target for the prevention of cancer. *Lancet Oncol*, **2**, 544–551.

Dempke W, Rie C, Grothey A, Schmol HJ. **2001**. Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? *J Cancer Res Clin Oncol*, **127**, 411–417.

DeNardo D.G., Barreto J.B., Andreu P., Vasquez L., Tawfik D., Kolhatkar N., *et al.* **2009**. CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. *Cancer Cell* **16**, 91–102

DeNardo D.G., Andreu P, Coussens LM. **2009**. Interaction between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev.* **29**, 309–316

deVisser KE, Eichten A, Coussens LM. **2006**. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer.* **6**: 24-37

Dias, S., Choy, M., Alitalo, K., and Rafii, S. **2002**. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C signaling through FLT-4 (VEGFR-3) mediates leukemic cell proliferation, survival, and resistance to chemotherapy. *Blood.* **99**, 2179-2184.

Doong H, Rizzo K, Fang S, Kulpa V, Weissman AM, Kohn EC. **2003**. CAIR-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.

Doong H, Vrailas A, Kohn EC. **2002**. What's in the 'BAG'?--a functional domain analysis of the BAG-family proteins. *Cancer Lett.*; **188**:25–32.

Doukhanina EV, Chen S, van der Zalm E, Godzik A, Reed J, Dickman MB. **2006**. Identification and functional characterization of the BAG protein family in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem.*; **281**:18793–18801.

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

Dumont, D.J., Jussila, L., Taipale, J., Lymboussaki, A., Mustonen, T., Pajusola, K. *et al.*, **1998**. Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science*. **282**, 946-949.

Dvorak, H.F. **2002**. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol* **20**, 4368-4380.

Dvorak HF, Weaver VM, Tlsty TD, Bergers G. **2011**. Tumor microenvironment and progression. *J Surg Oncol*. **103(6)**:468-74

Ebos, J.M., Bocci, G., Man, S., Thorpe, P.E., Hicklin, D.J., Zhou, D., Jia, X., and Kerbel, R.S. **2004**. A naturally occurring soluble form of vascular endothelial growth factor receptor 2 detected in mouse and human plasma. *Mol Cancer Res*. **2**, 315-326.

Egeblad M., and Werb Z. **2002**. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 161–174.

Enholm B., Paavonen K., Ristimaki A., Kumar V., Gunji Y., Klefstrom J. *et al.*, **1997**. Comparison of VEGF, VEGF-B, VEGF-C and Ang-1 mRNA regulation by serum, growth factors, oncoproteins and hypoxia. *Oncogene* **14**: 2475-2483 .

Erez N., Truitt M., Olson P. and Hanahan D. **2010** Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF- κ B-Dependent Manner. *Cancer Cell* **17**, 135–147

Ezhevsky SA, Nagahara H, Vocero-Akbani AM, Gius DR, Wei MC, Dowdy SF **1997**. Hypo-phosphorylation of the retinoblastoma protein (pRb) by cyclin D:Cdk4/6 complexes results in active pRb. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **94**:10699-10704.

Facler OT, Peterlin BM. **2000**. Endocytic entry of HIV-1. *Curr Biol* **24**;10: 1005-1008.

Fan GC, Chu G, Kranias EG. **2005**. Hsp20 and its cardioprotection. *Trends Cardiovasc Med*; **15**: 138–141.

Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O'Shea, K.S., Powell Braxton, L., Hillan, K.J., and Moore, M.W. **1996**. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* **380**, 439-442.

Ferrara, N., Gerber, H.P., and LeCouter, J. **2003**. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* **9**, 669-676.

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**(6):2504-12.

Folkman J. **1972**. Anti-angiogenesis: a new concept for therapy of solid tumours. *Ann Surg.* **175**:409–416.

Folkman, J. **1995**. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Med.* **1**, 27–31.

Folkman, J. & D'Amore, P. A. **1996**. Blood vessel formation: what is its molecular basis? *Cell.* **87**, 1153–1155.

Fong, G.H., Rossant, J., Gertsenstein, M., and Breitman, M.L. **1995**. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature.* **376**, 66-70.

Fontanella B, Birolo L, Infusini G, Cirulli C, Marzullo L, Pucci P, *et al.* **2010**. The co-chaperone BAG3 interacts with the cytosolic chaperonin CCT: new hints for actin folding. *Int J Biochem Cell Biol.*;**42**:641–650.

Franceschelli S, Rosati A, Lerosé R, De Nicola S, Turco MC, Pascale M. **2008**. Bag3 gene expression is regulated by heat shock factor 1. *J Cell Physiol.*;**215**:575–577

Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Cheng G, Ling L *et al.*, **2009**, Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer cell.* **16**: 183-194

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**: 245–255.

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.*;**27**:5011–5018

Gershon RK, Kondo K. **1971**. Infectious immunological tolerance. *Immunology*; **21**: 903–914.

Gil J, Peters G. **2006**. Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumor suppressor locus: all for one or one for all. *Nat Rev Mol Cell Biol*; **7**:667-677.

Goldman, C.K., Kendall, R.L., Cabrera, G., Soroceanu, L., Heike, Y., Gillespie, G.Y., Siegal, G.P., Mao, X., Bett, A.J., Huckle, W.R., Thomas, K.A., and Curiel, D.T. **1998**. Paracrine expression of a native soluble vascular endothelial growth factor receptor inhibits tumor growth, metastasis, and mortality rate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 8795-8800.

Gordon S and Taylor P.R. **2005**. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat.Rev. Immunol.* **5**, 953-964

Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JJ, Tannebaum SR **1982**. Analysis of nitrate, nitrite and (15N) nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* **126**:131–138

Groblewska M., Mroczko B., Wereszczyńska-Siemiakowska U., Myćeliwiec P., Kedra B., Szmitkowski M. **2007**. Serum levels of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) in pancreatic cancer patients. *Clin. Chem. Lab. Med.* **45**, 30–34.

Guedez L, Rivera AM, Salloum R, Miller ML, Diegmüller JJ, Bungay PM *et al.* **2003**. Quantitative assessment of angiogenic response by the directed in vivo angiogenesis assay. *Am J Pathol* ; **162**:1431–1439.

Hagemann T., Wilson J., Kulbe H., Li N.F., Leinster D.A., Charles K., *et al.* **2005**. Macrophages induce invasiveness of epithelial cancer cells via NF- κ B and JNK. *J. Immunol.* **175**, 1197–1205.

Hsu S, Huang F, Friedman E. **1995**. Platelet-derived growth factor- β increases colon cancer cell growth in vivo by a paracrine effect. *J Cell Physiol* **165**:239–245.

Ikeda E, Achen M.G., Breier G., Risau W. **1995**. Hypoxia-induced transcriptional activation and increased mRNA stability of vascular endothelial growth factor in C6 glioma cells. *J. Biol.Chem.* **270**: 19761-6.

Ingman W.V., Wyckoff J., Gouon-Evans V., Condeelis J., Pollard J.W. **2006**. Macrophages promote collagen fibrillogenesis around terminal end buds of the developing mammary gland. *Dev. Dyn.* **235**, 3222–3229.

Ishii Y, Ogura T, Tatemichi M, Fujisawa H, Otsuka F, Esumi H. **2003**. Induction of matrix metalloproteinase gene transcription by nitric oxide and mechanisms of MMP-1 gene induction in human melanoma cell lines. *Int J Cancer*; **103**:161–168.

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

Janowska-Wieczorek A, Majka M, Kijowski J, Baj-Krzyworzeka M, Reza R, Turner AR, *et al.* **2001**. Platelet-derived microparticles bind to hematopoietic progenitor cells and enhance their engraftment. *Blood.*; **98**: 3143-3149.

Jeltsch M., Kaipainen A., Joukov V., Meng X., Lakso M., Rauvala H. *et al.*, **1997**. Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science* **276** :1423-1425.

Joukov V., Sorsa T., Kumar V., Jeltsch M., Claesson- Welsh L. *et al.*, **1997**. Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C . *EMBOJ*.**16**-38983911.

Joyce J.A. and Pollard J.W. **2009**. Microenvironmental regulation of metastasis. 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

Jurek A, Amagasaki K, Gembarska A, Heldin CH, Lennartsson J. **2009**. Negative and positive regulation of MAPK phosphatase 3 controls platelet-derived growth factor-induced ERK activation. *J Biol Chem.*; **284**: 4626-4634.

Kalluri R, Zeisberg M. **2006**. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*, **6**: 392–401.

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.

Kendall, R.L., Wang, G., and Thomas, K.A. **1996**. Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR. *Biochem Biophys Res Commun* **226**, 324-328.

Kim JW, Wieckowski E, Taylor DD, Reichert TE, Watkins S, Whiteside TL. **2005**. Fas ligand-positive membranous vesicles isolated from sera of patients with oral cancer induce apoptosis of activated T lymphocytes. *Clin Cancer Res.*; **11**: 1010-1020.

Kimura H, Ogura T, Kurashima Y, Weisz A, Esumi H. **2002**. Effects of nitric oxide donors on vascular endothelial growth factor gene induction. *Biochem Biophys Res Commun*; **296**:976–82.

Krikun G., Schatz F. and Lockwood C. J., **2004** Endometrial angiogenesis: from physiology to pathology. *Ann. NY Acad. Sci.* **1034**, 27-35.

Kubota, Y., Takubo, K., Shimizu, T., Ohno, H., Kishi, K., Shibuya, M., *et al.* **2009**. M-CSF inhibition selectively targets pathological angiogenesis and lymphangiogenesis. *J. Exp. Med.* **206**, 1089–1102.

Leek R.D., Hunt N.C., Landers R.J., Lewis C.E., Royds J.A., Harris A.L. **2000**. Macrophage infiltration is associated with VEGF and EGFR expression in breast cancer. *J. Pathol.* **190**, 430–436.

Leung, D.W., Cachianes, G., Kuang, W.J., Goeddel, D.V., and Ferrara, N. **1989**. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* **246**, 1306-1309.

Lewis JS, Landers RJ, Underwood JC, Harris AL., Lewis CE. **2000**. Expression of vascular endothelial growth factor by macrophages is up-regulated in poorly vascularized areas of breast carcinomas. *J Pathol*; **192**: 150–158.

Lin E.Y. and Pollard J.W. **2007**. Tumor-associated macrophages press the angiogenic switch in breast cancer. *Cancer Res.* **67**, 5064–5066.

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

Luttun A, Tjwa M., Moons L., Wu Y., Angelillo-Sherrer A., Liao F. *et al.* **2002**. Revascularization of ischemic tissues by PIGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti Flt1. *Nat Med* **8**:831 – 40.

Maas J. W., Groothuis P. G., Dunselman G. A., de Goeij A. F., Struyker B. H. A. and Evers J. L., **2001** Endometrial angiogenesis throughout the human menstrual cycle. *Hum. Reprod.* **16**, 1557-1561.

Mack M, Kleinschmidt A, Brühl H, Klier C, Nelson PJ, Cihak J, *et al.* Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membranederived microparticles: a mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection. *Nat Med* **2000**; **6**: 769-775.

Maglione, D., Guerriero, V., Viglietto, G., Delli-Bovi, P., and Persico, M.G. **1991**. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 9267-9271.

Mantovani A., Allavena P., Sica A., Balkwill F. **2008**. Cancer-related inflammation. *Nature*, **454**: 436–444.

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

Martinez FO, Helming L., Gordon S. **2009**. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Ann Rev Immunol*, **27**: 451-483

Maynard, S.E., Min, J.Y., Merchan, J., Lim, K.H., Li, J., Mondal, S., Libermann, T.A., Morgan, J.P., Sellke, F.W., Stillman, I.E., Epstein, F.H., Sukhatme, V.P., and Karumanchi, S.A. **2003**. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest* **111**, 649-658.

Melillo G., Musso T, Sica A., Taylor L.S, Cox G.W, Varesio L. **1995**. A hypoxiaresponsive element mediates a novel pathway of activation of the inducible nitric oxide synthase promoter. *J. Exp. Med.* **182**:1683–1693.

Meloche S, Pouysségur J. **2007**. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene*; **26**:3227-3239

Miyamoto S, Kowalska MA, Marcinkiewicz C, Marcinkiewicz MM, Mosser D, Edmunds LH Jr, Niewiarowski S. **1998**. Interaction of leukocytes with platelet

microparticles derived from outdated platelet concentrates. *Thromb Haemost. Dec*; **80**: 982-988.

Mould A.W., Tonks I.D., Cahill M.M., Pettit AR, Thomas R., Hayward NK *et al.*, **2003**. Vegf-b gene knockout mice display reduced pathology and synovial angiogenesis in both antigen- induced and collagen-induced models of arthritis ,*Arthritis Rheum.***48**-2660-2669.

Mukhopadhyay D, Tsiokas L, Zhou XM, Foster D, Brugge JS, SukhatmeVP, **1995**. Hypoxic induction of human vascular endothelial growth factor expression through c-Src activation. *Nature* **375**: 577-581.

Murakami A. and Ohigashi H. **2007**. Targeting NOX, INOS and COX-2 in inflammatory cells: chemoprevention using food phytochemicals. *Int. J. Cancer.* **121**, 2357–2363

Murdoch C, Tazzyman S, Webster S, Lewis CE. **2007**. Expression of Tie2 by human monocytes and their responses to angiopoietin-2. *J Immunol*; **178**: 7405–7411.

Nelson CM, Bissell MJ. **2005**. Modeling dynamic reciprocity: engineering three-dimensional culture models of breast architecture, function, and neoplastic transformation. *Semin Cancer Biol*; **15**: 342–352.

Neufeld G., Tessler S., Gitay-Goren H., Cohen T., Levi BZ. **1994**. Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Prog. GrowthFactorRes.***5**-8997.

Nilsson I., Rolny C., Wu Y., Pytowski B., Hicklin D., Alitalo K., *et al.*, **2004**. Vascular endothelial growth factor receptor-3 in hypoxia-induced vascular development. *FASEB J.***18** -15071515.

Norrby K. **2006** In vivo models of angiogenesis. *J Cell Mol Med*; **10**:588–612.

O'Sullivan C, Lewis CE, Harris AL, Mc Gee JO. **1993**. Secretion of epidermal growth factor by macrophages associated with breast carcinoma. *Lancet*; **342**: 148–149.

Oguma, K., Oshima, H., Aoki, M., Uchio, R., Naka, K., Nakamura, S., *et al.* **2008**. Activated macrophages promote Wnt signalling through tumour necrosis factor-alpha in gastric tumour cells. *EMBO J.* **27**, 1671–1681.

Okada F, Tazawa H, Kobayashi T, Kobayashi M, Hosokawa M. **2006**. Involvement of reactive nitrogen oxides for acquisition of metastatic properties of benign tumors in a model of inflammation-based tumor progression. *Nitric Oxide*; **14**:122–9.

Olofsson, B., Pajusola, K., Kaipainen, A., von Euler, G., Joukov, V., Saksela, O., Orpana, A., Pettersson, R.F., Alitalo, K., and Eriksson, U. **1996**. Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 2576-2581.

Olumi A.F., Grossfeld G.D., Hayward S.W., Carroll P.R., Tlsty T.D., Cunha G.R. **1999**. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res.* **59**, 5002–5011.

Orimo A., Gupta P.B., Sgroi D.C., Arenzana-Seisdedos F., Delaunay T., Naeem R., *et al.* **2005**. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* **121**, 335–348

Orlandini, M., Marconcini, L., Ferruzzi, R., and Oliviero, S. **1996**. Identification of a c-fos-induced gene that is related to the platelet-derived growth factor/vascular endothelial growth factor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11675-11680.

Owens DM, Keyse SM. **2007**. Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene*; **26**:3203-3213. Review.

Paget S. **1889**. The distribution of secondary growth in cancer of the breast. *Lancet.* **133**: 571-573

Pagliuca MG, Lerose R, Cigliano S, Leone A. **2003**. Regulation by heavy metals and temperature of the human BAG-3 gene, a modulator of Hsp70 activity. *FEBS Lett.* **541**:11–13

Pajusola, K., Aprelikova, O., Korhonen, J., Kaipainen, A., Pertovaara, L., Alitalo, R., and Alitalo, K. **1992**. FLT4 receptor tyrosine kinase contains seven immunoglobulin-like loops and is expressed in multiple human tissues and cell lines. *Cancer Res* **52**, 5738-5743.

Pang B., Zhou X., Yu H., Dong M., Taghizadeh K., Wishnok J.S., *et al.* **2007**. Lipid peroxidation dominates the chemistry of DNA adduct formation in a mouse model of inflammation. *Carcinogenesis* **28**, 1807–1813.

Patterson KI, Brummer T, O'Brien PM, Daly RJ. **2009**. Dual-specificity phosphatases: critical regulators with diverse cellular targets. *Biochem J*; **418**:475-489.

Peppelenbosch MP, Tertoolen LG, Hage WJ, de Laat SW. **1993**. Epidermal growth factor-induced actin remodeling is regulated by 5-lipoxygenase and cyclooxygenase products. *Cell*, **74**, 565–575.

Persico M.G., Vincenti V., DiPalma T. **1999**. Structure, expression and receptor-binding properties of placenta growth factor (PlGF), in: L. Claesson-Welsh(Ed.), *Vascular Growth Factors and Angiogenesis*, Springer-Verlag ,Berlin, pp.3140.

Plouet, J., Moro, F., Bertagnolli, S., Coldeboeuf, N., Mazarguil, H., Clamens, S., and Bayard, F. **1997**. Extracellular cleavage of the vascular endothelial growth factor189-amino acid form by urokinase is required for its mitogenic effect. *J Biol Chem* **272**, 13390-13396.

Pollard, J.W. **2009**. Trophic macrophages in development and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 259–270.

Reinmuth N, Liu W, Jung YD *et al.* **2001**. Induction of VEGF in perivascular cells defines a potential paracrine mechanism for endothelial cell survival. *FASEB J* **15**:1239–1241.

Ristimaki A., Narko K., Enholm B., Joukov V., Alitalo K. **1998**. Proinflammatory cytokines regulate expression of the lymphatic endothelial mitogen vascular endothelial growth factor C, *J.Biol.Chem.* **273** :8413-8418.

Romano MF, Festa M, Pagliuca G, Lerose R, Bisogni R, Chiurazzi F, *et al.* **2003**. BAG3 protein controls B-chronic lymphocytic leukaemia cell apoptosis. *Cell Death Differ.*;**10**:383–385.

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, 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**:1337–1342

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

Rosati A, Leone A, Del Valle L, Amini S, Khalili K, Turco MC. **2007**. Evidence for BAG3 modulation of HIV-1 gene transcription. *J Cell Physiol.*;**210**:676–683

Saharinen P., Tammela T., Karkkainen M.J., Alitalo K. **2004**. Lymphatic vasculature: development, molecular regulation and role in tumor metastasis and inflammation. *Trends Immunol.* **25**: 387-395.

Sarkar A, Mitra S, Mehta S, Raices R, Wewers MD. **2009**. Monocyte derived microvesicles deliver a cell death message via encapsulated caspase1. *PLoS One.* **25**; 4: e7140.

Sarkar S, Nuttall RK, Liu S, Edwards DR, Yong VW. **2006**. Tenascin-C stimulates glioma cell invasion through matrix metalloproteinase-12. *Cancer Res*; **66**: 11771–11780.

Saura M., Zaragoza C., Bao C., McMillan A., Lowenstein C.J, **1999**. Interaction of interferon regulatory factor-1 and nuclear factor kappaB during activation of inducible nitric oxide synthase transcription, *J. Mol. Biol.* **289**: 459– 471.

Sawaoka H, Tsuji S, Tsujii M, Gunawas ES, Sasaki Y, Kawano S, *et al.* **1999**. Cyclooxygenase inhibitors suppress angiogenesis and reduce tumor growth *in vivo*. *Laboratory Invest*; **79**: 1469–77.

Schara K, Jansa V, Sustar V, Dolinar D, Pavlic JI, Lokar M, *et al.* **2009**. Mechanisms for the formation of membranous nanostructures in cell-to-cell communication. *Cell Mol Biol Lett.*; 14: 636-656.

Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T.P., Gertsenstein, M., Wu X.F., Breitman, M.L. *et al.* **1995**. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* **376**, 62-66.

Shibuya, M., Yamaguchi, S., Yamane, A., Ikeda, T., Tojo, A., Matsushime, H., and Sato, M. **1990**. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (*flt*) closely related to the *fms* family. *Oncogene* **5**, 519-524.

Shibuya, M., and Claesson-Welsh, L. **2006**. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res* **312**, 549-560.

Sica A, Bronte V. **2007**. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction:tumor development. *J Clinic Invest*; **117**: 1155–65.

Sica A, Saccani A, Bottazzi B, Polentarutti N., Vecchi A., van Damme J, Mantovani A. **2000**. Autocrine production of IL-10 mediates defective IL-12 production and NF- κ B activation in tumor-associated macrophages. *J Immunol*; **164**: 762–767.

Takayama S, Reed JC. **2001**. Molecular chaperone targeting and regulation by BAG family proteins. *Nat Cell Biol*; **3**: 237-41.

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

Tanaka, K., Kurebayashi, J., Sohda, M., Nomura, T., Prabhakar, U., Yan, L., *et al.* **2009**. The expression of monocyte chemotactic protein-1 in papillary thyroid carcinoma is correlated with lymph node metastasis and tumor recurrence. *Thyroid* **19**, 21–25.

Tendler D.S., Bao C, Wang T, Huang E.L., Ratovitski E.A., Pardoll D.A., Lowenstein C.J. **2001** Intersection of interferon and hypoxia signal transduction pathways in nitric oxide-induced tumor apoptosis, *Cancer Res.* **61** 3682–3688.

Terman, B.I., Carrion, M.E., Kovacs, E., Rasmussen, B.A., Eddy, R.L., and Shows, T.B. **1991**. Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene* **6**, 1677-1683.

Thery C, Amigorena S, Raposo G, Clyton A. **2006**. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol. Wiley Online Library*, Chapter 3:Unit 3.22

Trimboli, A.J., Cantemir-Stone, C.Z., Li, F., Wallace, J.A., Merchant, A., Creasap, N., Thompson, J.C., Caserta, E., Wang, H., Chong, J., *et al.* **2009**. Pten in stromal fibroblasts suppresses mammary epithelial tumours. *Nature* **461**, 1084–1091.

Wainwright LJ, Lasorella A, Lavarone A. **2001**. Distinct mechanisms of cell cycle arrest control the decision between differentiation and senescence in human neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **98**:9396-9400.

Wang HQ, Liu BQ, Gao YY, Meng X, Guan Y, Zhang HY, *et al.* **2009**. Inhibition of the JNK signalling pathway enhances proteasome inhibitor-induced apoptosis of kidney cancer cells by suppression of BAG3 expression. *Br J Pharmacol.*; **158**:1405–1412

Woolard, J., Wang, W.Y., Bevan, H.S., Qiu, Y., Morbidelli, L., Pritchard-Jones, R.O., *et al.* **2004**. VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer Res* **64**, 7822-7835.

Wyckoff J.B., Wang Y., Lin E.Y., Li J.F., Goswami S., Stanley, *et al.* **2007**. Direct visualization of macrophage assisted tumor cell intravasation in mammary tumors. *Cancer Res.* **67**, 2649–2656.

Yu P, Lee Y, Liu W, Krausz T., Chong A., Schreiber H., Fu YX. **2005**. Intratumor depletion of CD4 + cells unmasks tumor immunogenicity leading to the rejection of latestage tumors. *J Exp Med*; **201**: 779–791.

Zhang F, Subbaramaiah K, Altorki N, Dannenberg AJ. **1998**. Dihydroxy bile acids activate the transcription of cyclooxygenase-2. *J Biol Chem*, **273**, 2424–2428.

Zhu X.D., Zhang J.B., Zhuang P.Y., Zhu H.G., Zhang W., Xiong Y.Q *et al.* **2008**. High expression of macrophage colony-stimulating factor in peritumoral liver tissue is associated with poor survival after curative resection of hepatocellular carcinoma. *J. Clin. Oncol.* **26**, 2707–2716.

Zhu X.D., Zhang J.B., Zhuang P.Y., Zhu H.G., Zhang, W. Xiong Y.Q *et al.* **2008**. High expression of macrophage colony-stimulating factor in peritumoral liver tissue is associated with poor survival after curative resection of hepatocellular carcinoma. *J. Clin. Oncol.* **26**, 2707–2716.

Ziche N, Maglione D, Ribatti D., Morbidelli L., Lago CT, Battisti M, *et al.* **1997**. Placenta growth factor-1 is chemotactic, mitogenic, and angiogenic. *Lab Invest* **76**: 517 – 531.

Zijlmans, H.J., Fleuren, G.J., Baelde, H.J., Eilers, P.H., Kenter, G.G., Gorter, A. **2006**. The absence of CCL2 expression in cervical carcinoma is associated with increased survival and loss of heterozygosity at 17q11.2. *J. Pathol.* **208**, 507–517.