

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN FARMACIA

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

**LA PROTEINA BAG3 E IL CANCRO: RUOLO
NELL'ONCOGENESI E FUTURIBILI
POSSIBILITÀ TERAPEUTICHE**

RELATORE: prof. Mattia Sturlese

LAUREANDO: Iman Hosseinzadehosseini

ANNO ACCADEMICO: 2023/2024

RINGRAZIAMENTI

Desiderai esprimere la mia più sincera gratitudine a tutte le persone che hanno contribuito alla realizzazione di questa tesi. Innanzitutto, ringrazio il mio professore, Mattia Sturlese, per la sua preziosa guida, il supporto costante e i preziosi consigli che mi ha accompagnato durante tutto il percorso di ricerca. La sua esperienza e la sua dedizione sono stati fondamentali per il successo di questo lavoro. Un ringraziamento speciale va alla mia supervisora, la dottoressa Annagiuglia Favaro, per la sua pazienza, la sua disponibilità e il suo incoraggiamento. La sua competenza e il suo sostegno sono stati di grande ispirazione e mi hanno aiutato a superare le sfide che ho incontrato lungo il cammino.

Vorrei inoltre ringraziare la mia famiglia, i miei genitori per il loro amore incondizionato, il loro sostegno morale e la loro comprensione durante questo periodo di studio intenso. Senza il loro sostegno, nulla di questo sarebbe stato possibile. Infine, un ringraziamento ai miei amici, per la loro amicizia, la loro comprensione e il loro sostegno. La vostra presenza nella mia vita ha reso questo viaggio più leggero e più piacevole.

Grazie di cuore a tutti voi.

Iman Hosseinzadehosseini

Padova, Italy

Luglio, 2022

Indice

RINGRAZIAMENTI.....	iii
Tabella delle figure.....	vii
INTRODUZIONE.....	1
CAPITOLO 1: LA FAMIGLIA DI PROTEINA BAG	3
1.1. classificazione e strutture.....	3
1.2. Origini di BAG.....	5
1.3. La funzione principale dei domini BAG	6
CAPITOLO 2: LA PROTEINA BAG3	11
2.1: Una proteina che regola numerosi meccanismi cellulari.....	11
2.2 L' APOPTOSI E BAG 3	13
2.3. Ruolo della proteina BAG3 nell' autofagia:	18
CAPITOLO 3: BAG 3 E IL SUO RUOLO NELL ONCOGENESI (GENESI TUMORALI).....	21
CAPITOLO 4: GLI INIBITORI DI BAG	25
4.1. Inibitori allosterici di HSP70:	25
4.2. "Scoperta del Primo Modificatore Selettivo di BAG3: Il Derivato 2,4-Tiazolidinedione 28" .	27
4.3. "Sviluppo di Nuovi Inibitori di Bag3: Sintesi e Valutazione dei Derivati del 2,4-Tiazolidinedione"	31
CONCLUSIONE.....	35
BIBLIOGRAFIA.....	37

Tabella delle figure

Figura 1: Contributo dei membri della famiglia BAG (BAGs) ai processi correlati al cancro...	2
Figura 2: Composizioni dei domini proteici dei membri della famiglia BAG umana. Domini BAG conservati (verde), domini simili all'ubiquitina (UBL) (blu), ripetizioni TXSEEX (viola), ripetizioni PxxP (giallo), sequenza del segnale di localizzazione nucleare (NLS).	5
Figura 3: Ciclo di ripiegamento di HSP70. Le proteine appena sintetizzate o non ripiegate sono consegnate dal co-chaperone HSP40 a HSP70 legato all'ATP. L'idrolisi dell'ATP in ADP mediata da HSP40 provoca la chiusura del dominio di legame del substrato (SBD) di HSP70 e un legame stretto con il substrato. Successivamente, HSP40 si dissocia da HSP70. Il fattore di scambio nucleotidico BAG catalizza lo scambio di ADP con un nuovo ATP, aprendo così il coperchio di HSP70 e permettendo il rilascio del substrato [1].	8
Figura 4: Ciclo di HSP-70. I clienti di HSP-70 (che potrebbero essere proteine nascenti o ripiegate) sono consegnati dalla co-chaperonina HSP-40 a HSP-70 nello stato legato ad ATP. Il legame di HSP-40 induce l'idrolisi da ATP a ADP. Di conseguenza, il dominio α SBD si chiude sul dominio β SBD. Successivamente, HSP-40 si dissocia da HSP-70. Nello stato legato ad ADP, il fattore di scambio nucleotidico BAG si lega a HSP-70, stimolando il rilascio di ADP per un nuovo ATP. Pertanto, il coperchio di HSP-70 si apre, permettendo il rilascio del substrato [1].	9
Figura 5: 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.....	12
Figura 6: Un meccanismo proposto per l'effetto anti-apoptotico di BAG3. BAG3 si lega a HSP70 impedendo la degradazione dei clienti anti-apoptotici.	14
Figura 7: Influenza di BAG3 su (a) proteine bersaglio di HSP-70, (b) mRNA cliente.	16
Figura 8: strutture proteica della proteina anti-apoptotica BAG3 [26].....	17
Figura 9: Ruolo di BAG3 nel microambiente delle cellule PDAC. BAG3 si lega ai recettori IFITM-2 stimolando il rilascio di citochine dai macrofagi e, quindi, la crescita del tumore e il processo metastatico. Un anticorpo anti-BAG3 previene l'interazione tra BAG3 e IFITM-2, riducendo così la proliferazione delle cellule tumorali e la formazione di metastasi.	23
Figura 10: Strutture chimiche di MKT-077 e dei suoi derivati.....	27
Figura 11: Il flusso di lavoro del virtual screening per l'identificazione dei ligandi di BAG3. .	29
Figura 12: Analisi del ciclo cellulare del contenuto di DNA, con colorazione con ioduro di propidio, tramite valutazione citometria a flusso. (A) Le fasi del ciclo cellulare delle cellule A375 trattate con 28 (10 o 20 mM) o DMSO per 72 ore. (B) La percentuale di cellule A375 in sub-G1 dopo l'incubazione in un mezzo completo o in un mezzo povero (2% FBS) con il composto 28 (10 o 20 mM) o DMSO per 72 ore o in presenza di staurosporina (1 mM) per ulteriori 6 ore dopo il trattamento con il composto 28 nel mezzo completo. I risultati sono espressi come media \pm S.D. di tre esperimenti eseguiti in duplicato (**P \leq 0.001, **P \leq 0.005, *P \leq 0.05).	30
Figura 13: struttura chimica di composto 28 (2,4-tiazolidinedione).	31

Figura 14: Derivati progettati per l'esplorazione SAR sul lato sinistro della serie delle tiazolidinedioni. 33

INTRODUZIONE

Il cancro è una malattia complessa e eterogenea che continua a rappresentare una delle principali sfide per la medicina moderna. Nonostante i significativi progressi nella diagnosi e nel trattamento, molte forme di cancro rimangono ancora difficili da gestire e rappresentano una causa principale di morbilità e mortalità in tutto il mondo.

Negli ultimi anni, la ricerca ha identificato una serie di molecole cellulari e processi biologici coinvolti nello sviluppo e nella progressione del cancro. Tra queste, la famiglia di proteina BAG ha suscitato un interesse crescente per il suo ruolo multifunzionale e la sua associazione con diverse patologie, comprese le neoplasie (figura 1).

Questa tesi si propone di esplorare il legame tra la proteina BAG3 e il cancro, analizzandone il ruolo nell'oncogenesi ed il suo ruolo nell'evitare l'apoptosi, oltre alle strategie terapeutiche attuali e le prospettive future per l'uso di Bag3 come target terapeutico nel trattamento del cancro.

Nell'ambito di questa ricerca, verranno considerati sia gli studi che evidenziano il coinvolgimento di Bag3 nella progressione tumorale sia le potenziali strategie terapeutiche che mirano a sfruttare l'inibizione di questa proteina per il trattamento del cancro.

Per espletare la sua funzione antiapoptotica, BAG3 attiva diversi percorsi cellulari tramite interazioni con molteplici partner molecolari, con particolare riferimento alle proteine da shock termico da 70 KDa (HSP-70). Nonostante la sua rilevanza, attualmente non esistono farmaci terapeutici per inibire BAG3, il che rende necessario un chiarimento più approfondito del suo ruolo nelle cellule tumorali.

Inoltre, le molecole capaci di interferire con le interazioni proteina-proteina di BAG3 potrebbero servire da strumenti utili nella ricerca di base per investigare il ruolo dell'inibizione di Bag3.



Figura 1: Contributo dei membri della famiglia BAG (BAGs) ai processi correlati al cancro.

CAPITOLO 1: LA FAMIGLIA DI PROTEINA BAG

1.1. classificazione e strutture

I geni della famiglia delle proteine Bag (Bcl-2 associated athanogene) sono conservati evolutivamente, con omologhi trovati dal lievito agli animali [1]. La prima descrizione delle proteine BAG risale al 1995, quando Takayama et al. descrissero una nuova proteina legante BCL-2, successivamente chiamata BAG1 [2].

La prima funzione descritta per BAG1 è stata la sua capacità di proteggere le cellule esposte a stimoli pro-morte, da cui il nome "BCL-2 associated athanogene 1" (dal greco "athanatos", che significa "contro la morte"). Da allora, sono state scoperte più proteine con somiglianze strutturali a BAG1 e classificate nella nuova famiglia di proteine BAG. Fino ad oggi sono stati trovati sei membri della famiglia BAG negli esseri umani. Oltre a BAG1, la famiglia include Bag2, Bag3 (CAIR-1, Bis), Bag 4 (SODD), Bag5 e Bag 6 (Scythe, BAT3) [3]. Tutte queste condividono una regione conservata C-terminale, chiamata dominio Bag, che mostra identità di sequenza del 40-60% tra tutte le proteine Bag e consente alle proteine Bag di legarsi alla famiglia di chaperon molecolari Hsp70 [1].

Ogni membro della famiglia presenta un singolo dominio Bag, tranne Bag 5, che presenta più domini Bag. Tuttavia, i membri della famiglia Bag condividono anche domini proteici specializzati aggiuntivi (figura2). Ad esempio, BAG3 ha molteplici motivi di interazione proteina-proteina, come i domini ricchi di prolina (PxxP) e triptofano-triptofano (WW) così come due motivi IPV (Ile-Pro-Val) per l'interazione con le piccole proteine di shock termico [4] e due motivi di legame 14-3-3 (RSQS). D'altra parte, Bag1 e Bag

6 possiedono un dominio simile all'ubiquitina (UBL) che indirizza i clienti di Hsp70 al proteasoma.

Inoltre, Bag1L e Bag6 condividono una sequenza di localizzazione nucleare (NLS) [1,4], che consente loro di essere principalmente localizzati nel nucleo. Al contrario, gli altri membri di questa famiglia sono principalmente presenti nel citosol, anche se in condizioni di stress sono stati talvolta trovati all'interno del nucleo in certi tipi di cellule. Infine, Bag6 presenta anche un sito di clivaggio per la caspasi-3 (DEQD).

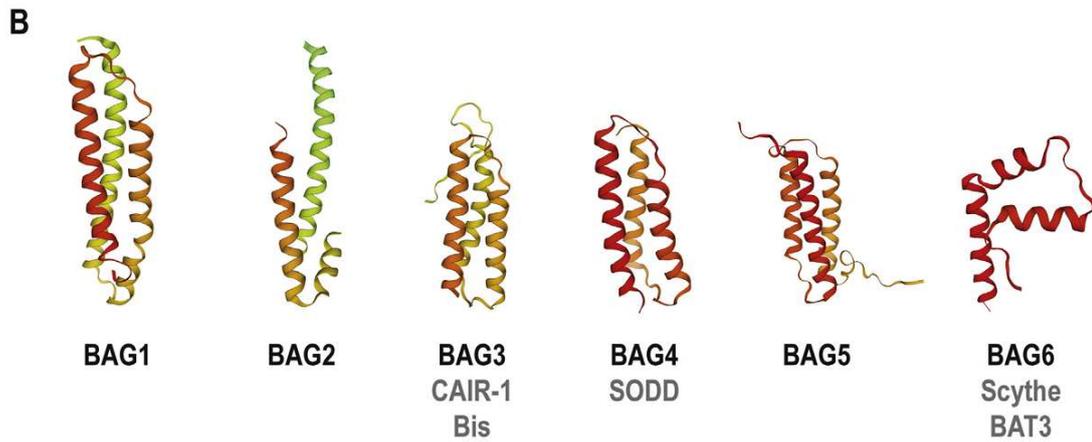
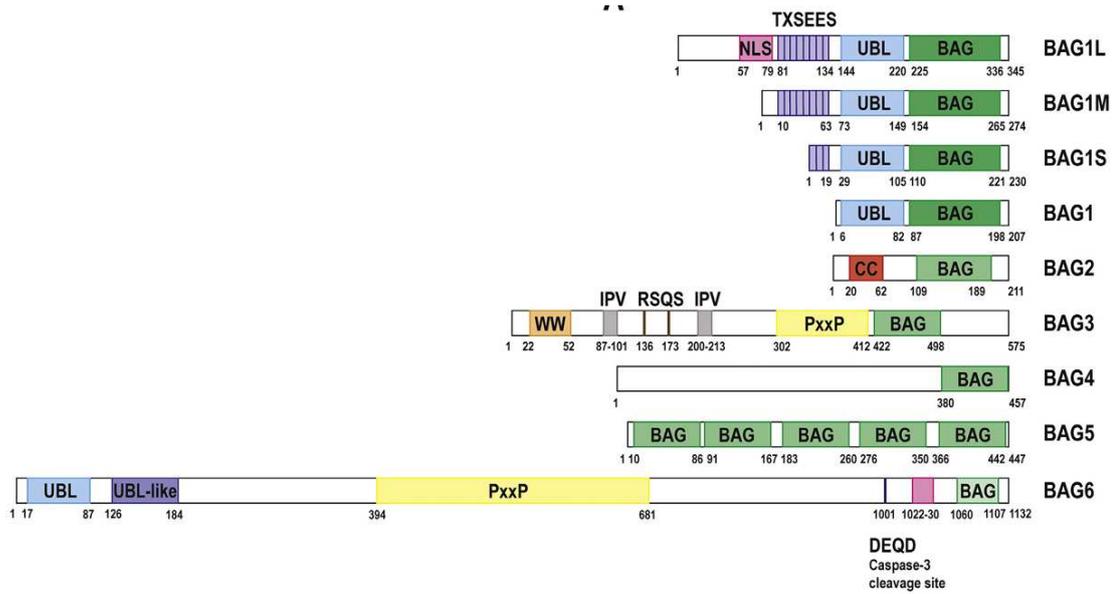


Figura 2: Composizioni dei domini proteici dei membri della famiglia BAG umana. Domini BAG conservati (verde), domini simili all'ubiquitina (UBL) (blu), ripetizioni TXSEEX (viola), ripetizioni PxxP (giallo), sequenza del segnale di localizzazione nucleare (NLS).

1.2. Origini di BAG

I geni associati a Bcl-2

Il primo gene Bag è stato scoperto in uno screening di una libreria di cDNA di embrioni di topo utilizzando la proteina Bcl-2 umana ricombinante come esca per identificare nuovi partner interagenti di Bcl -2.

Bcl-2 è una proteina anti-apoptotica situata nella membrana esterna dei mitocondri e nella membrana del reticolo endoplasmatico. La sovraespressione di Bcl-2 blocca il rilascio di citocromo c attraverso l'inibizione delle proteine pro-apoptotiche BAX e BAK [5]. La funzione di Bcl-2 come proto-oncogene, scoperta per la prima volta nel punto di rottura cromosomica del t(14;18) che porta linfomi B-cellulari umani [6], era ampiamente conosciuta al momento della descrizione di Bag1. Le analisi funzionali eseguite subito dopo la scoperta della proteina Bag1 hanno evidenziato una somiglianza tra queste due proteine, BCL-2 e BAG1, nella loro capacità di inibire la morte cellulare in risposta a vari stimoli citotossici. A causa di questa connessione, il nome scelto per questa proteina di recente scoperta rifletteva comprensibilmente la sua forte associazione funzionale con Bcl-2 [7]. Successivamente, approcci simili di screening utilizzando il dominio ATPasi di Hsp70 come esca hanno identificato altre proteine che interagiscono fisicamente con Hsp70 e condividono somiglianze strutturali con Bag1. Queste proteine sono state quindi denominate Bag2 e Bag3 [8].

1.3. La funzione principale dei domini BAG

L'attività di co-chaperone di proteine da shock termico da 70 KDa (Hsp-70)

La proteina BAG è stata individuata in diversi organismi, dai lieviti ai mammiferi. Negli esseri umani, il dominio BAG del pioniere BAG1 è composto da 110 aminoacidi disposti in tre eliche antiparallele di 30-40 aminoacidi ciascuna [9]. Altri membri presentano domini BAG più corti rispetto a BAG1 e alcuni di essi mostrano solo una omologia ridotta (ad esempio, Bag 6). Tuttavia, il dominio BAG è responsabile dell'interazione con il sito di legame dell'ATP di Hsp70, agendo come fattore di scambio nucleotidico (NEF).

L'HSP70 assiste il ripiegamento delle proteine attraverso cicli guidati da ATP di legame e rilascio del substrato (figura 3). L'HSP70 adotta una conformazione aperta quando l'ATP è legato al suo dominio di legame del

nucleotide (NBD), consentendo un'accomodazione dinamica della proteina cliente nel dominio di legame del substrato (SBD). Al contrario, l'idrolisi dell'ATP provoca un cambiamento nella conformazione strutturale che blocca la regione idrofobica della proteina [10]. L'HSP70 ha un'attività ATPasica molto bassa di per sé e il ciclo di ripiegamento è strettamente controllato da una moltitudine di co-chaperoni conservati evolutivamente (figura 4).

Inoltre, la capacità delle proteine Bag di interagire direttamente con i substrati - attraverso motivi di legame proteina-proteina aggiuntivi o attraverso il dominio Bag stesso - potrebbe essere utilizzata per reclutare il NEF nei complessi HSP70-cliente, accelerando così il rilascio delle proteine. L'insieme di co-chaperoni regola la proteostasi, sorvegliando l'equilibrio tra sintesi proteica, ripiegamento corretto, traffico e degradazione proteica.

Se si verifica una deregolazione della macchina chaperone, può svilupparsi una grave proteotossicità, causando diversi disturbi, tra cui neurodegenerazione, malattie legate ai lisosomi, fibrosi cistica e neoplasie [11]. Tutti gli isoforme di Bag1 regolano in modo o simile l'attività ATPasica di HSP70, ma Bag1M è molto meno efficace nel stimolare il ripiegamento proteico mediato da HSP70 rispetto alle isoforme più corte (Bag1S) e più lunghe (Bag1L).

In sintesi, questi risultati suggeriscono che i membri della famiglia BAG si siano evoluti da un antenato che ha progressivamente divergendo dalla sua funzione di co-chaperone Hsp70 verso nuove funzioni ancora da esplorare. La presenza di omologhi di BAG nell'animale, vegetale e nei regni fungini supporta l'idea di una funzione cellulare di base svolta dalle proteine contenenti il dominio Bag.

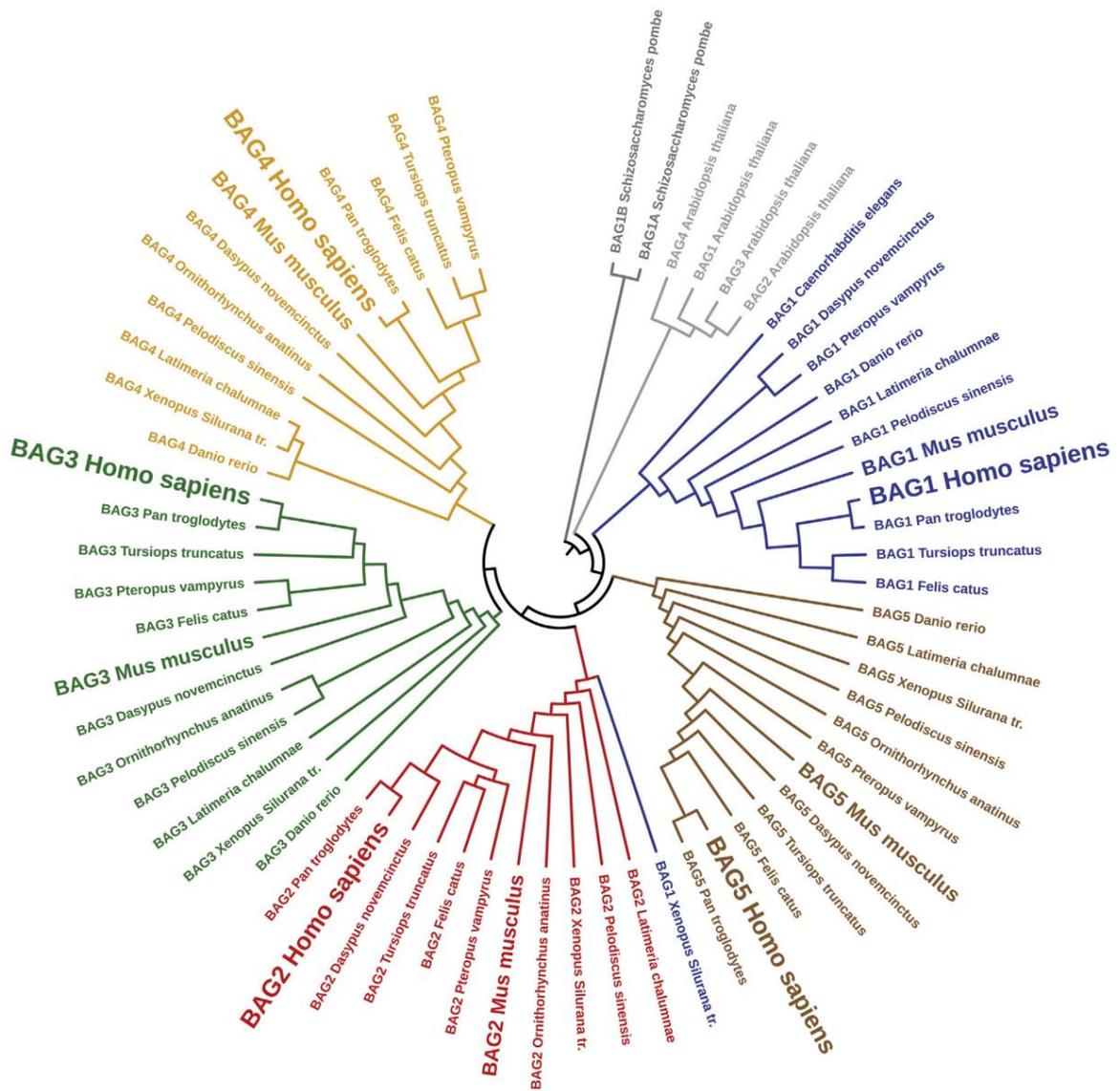


Figura 3: Ciclo di ripiegamento di HSP70. Le proteine appena sintetizzate o non ripiegate sono consegnate dal co-chaperone HSP40 a HSP70 legato all'ATP. L'idrolisi dell'ATP in ADP mediata da HSP40 provoca la chiusura del dominio di legame del substrato (SBD) di HSP70 e un legame stretto con il substrato. Successivamente, HSP40 si dissocia da HSP70. Il fattore di scambio nucleotidico BAG catalizza lo scambio di ADP con un nuovo ATP, aprendo così il coperchio di HSP70 e permettendo il rilascio del substrato [1].

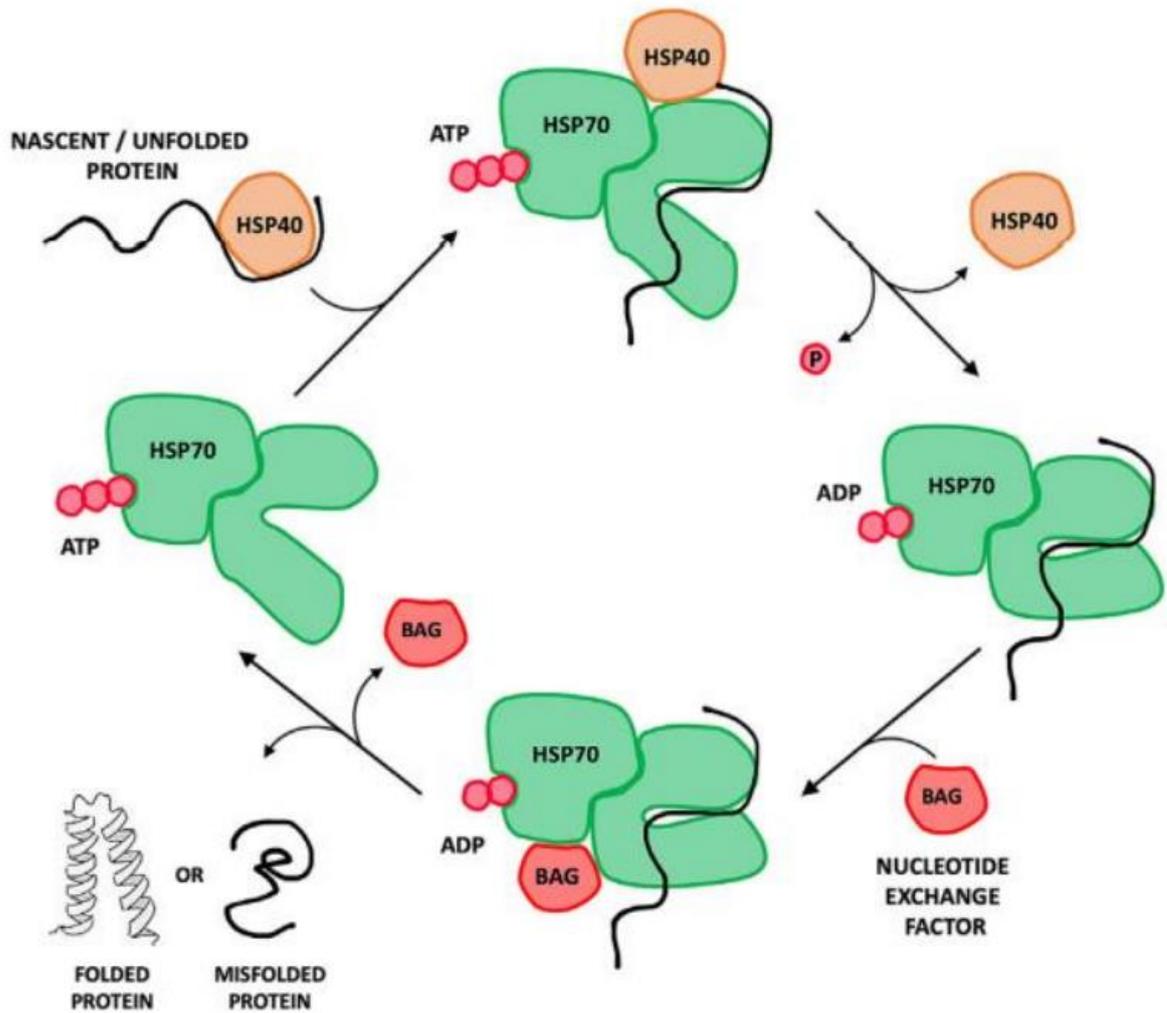


Figura 4: Ciclo di HSP-70. I clienti di HSP-70 (che potrebbero essere proteine nascenti o ripiegate) sono consegnati dalla co-chaperonina HSP-40 a HSP-70 nello stato legato ad ATP. Il legame di HSP-40 induce l'idrolisi da ATP a ADP. Di conseguenza, il dominio α SBD si chiude sul dominio β SBD. Successivamente, HSP-40 si dissocia da HSP-70. Nello stato legato ad ADP, il fattore di scambio nucleotidico BAG si lega a HSP-70, stimolando il rilascio di ADP per un nuovo ATP. Pertanto, il coperchio di HSP-70 si apre, permettendo il rilascio del substrato [1].

CAPITOLO 2: LA PROTEINA BAG3

2.1: Una proteina che regola numerosi meccanismi cellulari

BAG3 (bcl2-associated athanogene 3), è una proteina che ha un ruolo chiave in vari processi cellulari. Appartenente alla famiglia dei co-chaperoni, caratterizzata dal dominio BAG, interagisce con il dominio ATPasico delle proteine Hsp70 (heat shock protein 70). Inoltre, contiene un dominio WW e una regione PXXP (proline-rich motifs) (figura 5) che le consentono di interagire con diverse proteine oltre a Hsp70 [3].

Ricerche recenti suggeriscono che BAG3 svolga molteplici funzioni regolando processi biologici come apoptosi, proliferazione, sopravvivenza cellulare, organizzazione del citoscheletro, differenziazione cellulare e autofagia.

Bag3 è stata inizialmente identificata nel lievito tramite un saggio di screening del doppio ibrido utilizzando il dominio ATPasico di Hsp70.

Attualmente sono conosciute due forme di BAG3: una forma full-length prodotta dal gene bag3 con una massa di circa 74 kDa e una forma più piccola di circa 40 kDa, riscontrata nei sinaptosomi neuronali, probabilmente derivante da splicing alternativo o da processi proteolitici [12].

La forma full-length di BAG3 è principalmente localizzata nel citoplasma, soprattutto nel reticolo endoplasmatico rugoso, mentre la forma di 40 kDa è stata individuata nei sinaptosomi neuronali e caratterizzata tramite spettrometria di massa [13].

L'espressione del gene bag3 è costitutiva in alcuni tipi di cellule normali come i miociti, ma è particolarmente elevata in diversi tumori e linee cellulari tumorali. Tuttavia, può essere indotta anche in cellule normali in risposta a vari fattori di stress come agenti ossidanti, alte temperature, infezioni virali, campi elettromagnetici, elettrofilo e ultrasuoni pulsati.

L'aumento dell'espressione di BAG3 in risposta allo stress è regolato dal fattore trascrizionale HSF1, insieme ad altri fattori come Egr1, Aib ZIP e WT1[14]. In alcuni tipi di cellule, l'espressione di BAG3 può anche essere indotta da farmaci chemioterapici, contribuendo alla resistenza alla terapia farmacologica [15,16].

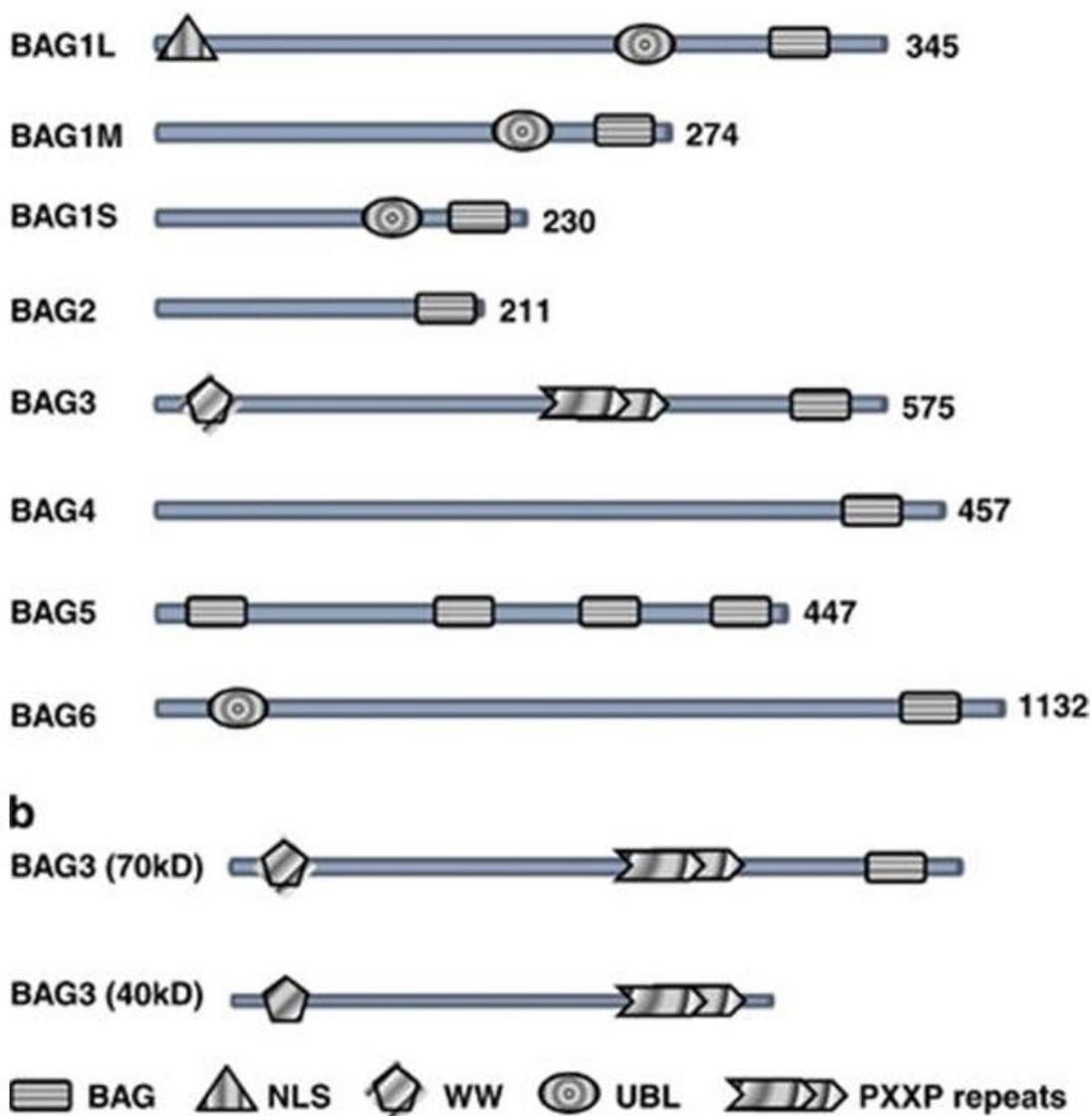


Figura 5: La famiglia delle proteine BAG e i loro domini. b) Rappresentazione schematica della proteina full-length e della forma di 40 kD ritrovata associata ai sinaptosomi.

2.2 L' APOPTOSI E BAG 3

I due principali processi di morte cellulare comprendono necrosi e l'apoptosi. La necrosi, una morte violenta della cellula, può derivare da diversi fattori e spesso è associata a un processo infiammatorio. Al contrario, l'apoptosi è una morte cellulare programmata cruciale per mantenere l'omeostasi tissutale, l'embriogenesi e la difesa immunitaria [17]. Regolato con precisione, l'apoptosi permette all'organismo di mantenere il giusto numero di cellule e di eliminare quelle danneggiate o infettate da virus, ma un disequilibrio nella sua regolazione può portare a malattie gravi. Alcune condizioni come la Malattia di Alzheimer, il Parkinson e il morbo di Huntington sono associate a un aumento dell'apoptosi, mentre il cancro e malattie autoimmuni come il Lupus eritematoso sistemico sono legate a una sua riduzione. Le cellule rispondono costantemente a segnali pro apoptotici e antiapoptotici, e il bilanciamento di questi segnali determina se l'apoptosi avviene o meno. Esistono principalmente due vie per l'apoptosi: la via intrinseca (o mitocondriale) e la via estrinseca, legata ai recettori di morte. Entrambe richiedono l'attivazione di caspasi, proteasi che degradano i componenti cellulari. Queste caspasi si dividono in iniziatrici ed effettrici e il loro attivamento avviene attraverso segnali estrinseci come TNF e TRAIL o intrinseci come danni al DNA o alterazioni dei gradienti ionici cellulari. In entrambi i casi, l'apoptosi è un processo attivo che richiede energia (ATP) e può essere avviato direttamente da segnali esterni o indirettamente attraverso la via intrinseca.

BAG3 è classificato come una proteina anti-apoptotica: diversi studi su linee cellulari cancerogene mostrano che il silenziamento o la sovraespressione di BAG3 rispettivamente potenziano e inibiscono il processo apoptotico. Inoltre, il clivaggio di BAG3 da parte delle caspasi promuove l'apoptosi [18,19].

BAG3 protegge le cellule dagli stimoli apoptotici attivando diverse vie cellulari attraverso interazioni con vari partner molecolari, come HSP-70 [20].

Il primo meccanismo proposto alla base dell'effetto anti-apoptotico di BAG3 è la sua capacità di prevenire la degradazione proteica mediata dal complesso Hsp70. In particolare, BAG3 impedisce il legame di Apoptosis Signal-Regulating Kinase(Akt) a Hsp70, provocando un fallimento nel targeting di Akt al proteasoma[21]. Pertanto, Akt non viene distrutto,

portando ad un aumento dei livelli intracellulari di Akt. Akt, quando attivato, fosforila vari substrati proteici, propagando segnali cellulari anti-apoptotici e di sopravvivenza. Ad esempio, Akt fosforila e attiva il chinasi IKK α , risultando nella degradazione di I κ B e nella traslocazione nucleare di NF- κ B, che induce l'espressione degli inibitori di caspasi c-Myb e Bcl-xL. Inoltre, Akt impedisce l'apoptosi indotta dalla MAP chinasi e l'attivazione delle caspasi fosforilando Ser 674 di Mixed LINEAGE kinase 3 (MLK3), Ser83 del chinasi 1 regolatore del segnale apoptotico (ASK1) e Ser196 di Caspase-9.

Un altro meccanismo simile, che sottende all'effetto anti-apoptotico di BAG3, è la sua capacità di competere nel legame con Hsp70 con BAG1, che, grazie al suo dominio UBL, coopera positivamente con Hsp70 e l'ubiquin ligasi CHIP (carbossi-terminale della proteina interagente Hsc70) per indirizzare le proteine cliente di Hsp70 al proteasoma (figure 6) [22].

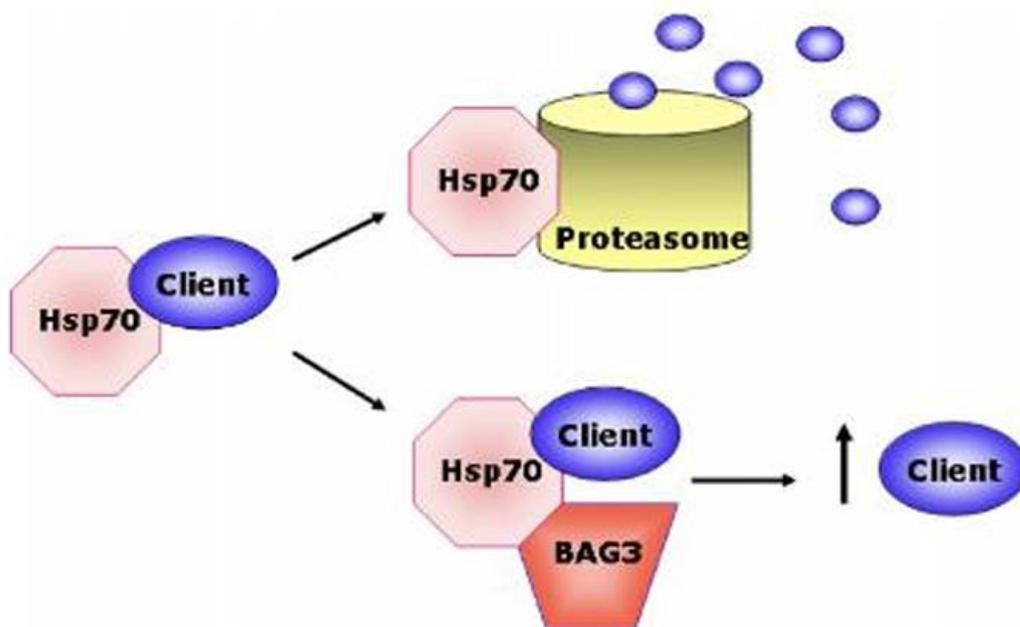


Figura 6: Un meccanismo proposto per l'effetto anti-apoptotico di BAG3. BAG3 si lega a HSP70 impedendo la degradazione dei clienti anti-apoptotici.

A seconda dei livelli cellulari dei co-chaperoni BAG1 e BAG3, il tasso di degradazione delle proteine cliente di HSP70 sarà diverso. In condizioni di stress, l'espressione di BAG3 aumenta. Pertanto, BAG3 potrebbe essere l'elemento chiave che modula l'attività di Hsc/Hsp70 e sostiene i livelli di alcune proteine cliente di HSP70, inclusi quei fattori che regolano il processo apoptotico, come IKK- γ (la subunità regolatoria del complesso IKK) che fosforila I κ B α . Infatti, in cellule di osteosarcoma e melanoma, BAG3 impedisce la degradazione proteosomale di IKK- γ , risultando nell'attivazione di NF- κ B e nella trascrizione di geni anti-apoptotici [23].

Un altro meccanismo che sottende all'effetto anti-apoptotico mediato da BAG3 è stato osservato nel glioblastoma. In queste cellule, il legame di BAG3 a Hsp70 promuove il legame della proteina pro-apoptotica BAX a Hsp70. Di conseguenza, BAX non si trasloca all'interno dei mitocondri, proteggendo così le cellule dall'apoptosi [24].

È anche plausibile pensare che il legame di BAG3 a Hsp70 possa influenzare il ripiegamento di altre proteine che regolano il processo apoptotico. Inoltre, il legame di BAG3 a Hsp70 potrebbe modulare l'abilità di Hsp70 di stabilizzare gli mRNA che presentano diversi motivi AU nelle regioni non tradotte 3' (a cui Hsp70 si lega), regolando l'espressione di un gran numero di proteine, come la proteina Bh3 solo anti-apoptotica Bim [25].

Infine, è stato ipotizzato che BAG3 possa esplicare il suo effetto anti-apoptotico mediante interazioni con altre proteine cliente mediate dai domini WW o PXXP e indipendenti da Hsp70. Queste interazioni potrebbero influenzare direttamente la stabilità, la localizzazione o l'attività di questi partner (figura 7). La disponibilità di diversi partner è anche probabile che sottenda ai diversi meccanismi attraverso i quali Bag3 esercita il suo effetto anti-apoptotico in diversi tipi di cellule [20] (figura 8).

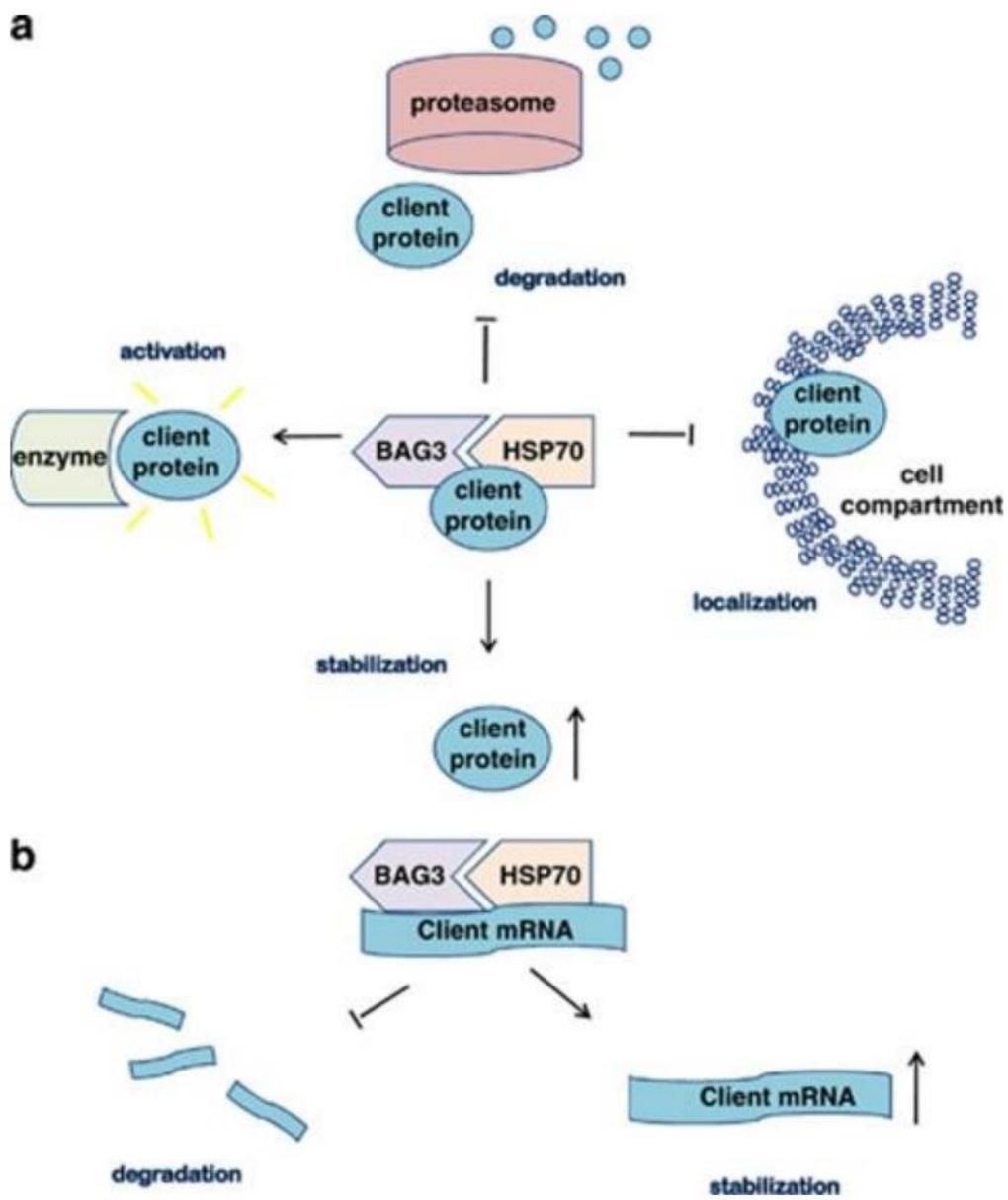


Figura 7: Influenza di BAG3 su (a) proteine bersaglio di HSP-70, (b) mRNA cliente.

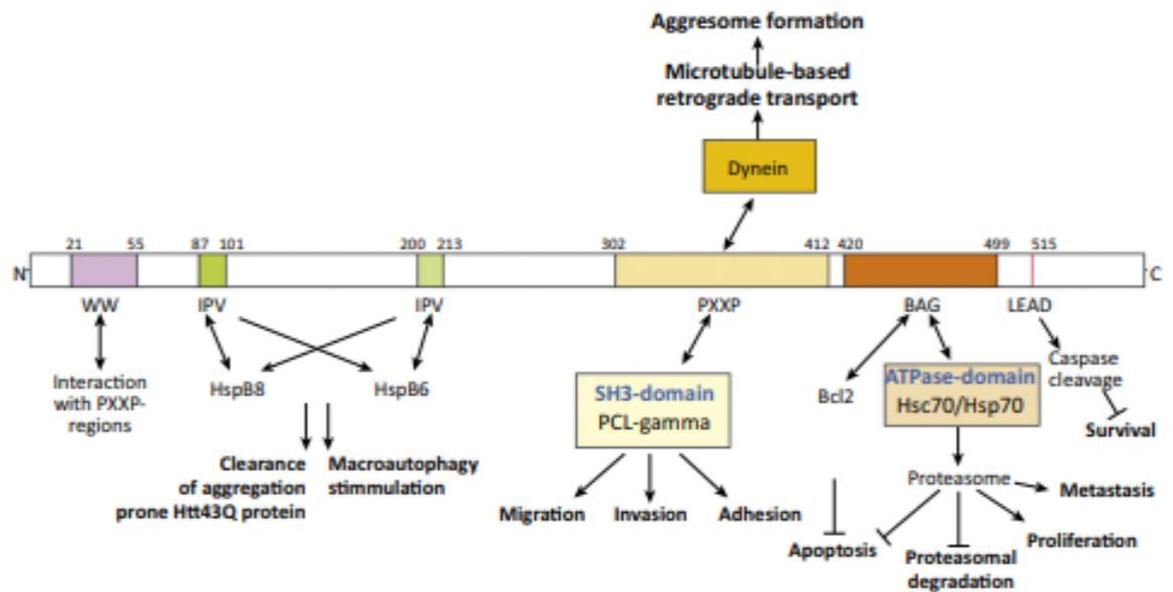


Figura 8: *Struttura proteica della proteina anti-apoptotica BAG3 [26].*

Numerosi studi scientifici hanno documentato un'ampia iperespressione del gene Bag3 in diverse forme di neoplasie, spaziando dai tumori solidi come melanoma, glioblastoma, carcinoma prostatico e colo-rettale, fino alle leucemie[1]. Questo aumento dell'espressione genica di BAG3 sembra rivestire un ruolo cruciale nell'asservire la sopravvivenza delle cellule tumorali in seguito a trattamenti chemioterapici, operando attraverso meccanismi complessi quali l'inibizione dell'apoptosi e l'induzione dell'autofagia. Tuttavia, va notato che la sovraespressione di Bag3 non solo promuove la resistenza alle terapie convenzionali, ma anche stimola attivamente la progressione del tumore, influenzando in modo significativo il microambiente circostante. Questa interazione dinamica tra Bag3 e il suo ambiente può manifestarsi attraverso molteplici vie, compresa la modulazione delle interazioni tra le cellule tumorali e le componenti stromali, come fibroblasti, macrofagi e cellule endoteliali. Di conseguenza, emerge la prospettiva che Bag3 possa costituire un promettente bersaglio terapeutico per una vasta gamma di condizioni tumorali, e l'inibizione mirata di Bag3

potrebbe rappresentare una strategia terapeutica efficace per contrastare la crescita tumorale e mitigare la sua diffusione metastatica.

2.3. Ruolo della proteina BAG3 nell'autofagia:

Il ruolo della proteina Bag3 nel rimodellamento del citoscheletro e nel traffico di membrana suggerisce che potrebbe essere coinvolta nei processi di autofagia, che sono fondamentali per mantenere la salute delle cellule. Questi processi, che comprendono la degradazione delle componenti cellulari non necessarie, sono come un sistema di riciclo interno della cellula.

Un tipo di autofagia, chiamato autofagia mediata da chaperone (CMA), coinvolge il chaperone della proteina Hsp70 che riconosce e trasferisce al lisosoma proteine specifiche. Poiché la proteina BAG3 lavora in stretta collaborazione con Hsp70, potrebbe essere coinvolta in questo tipo di autofagia.

Ci sono anche altre forme di autofagia, come la microautofagia e la macroautofagia. Nella macroautofagia, ad esempio, la cellula forma vescicole speciali chiamate autofagosomi che inglobano i materiali da degradare e li trasportano ai lisosomi. Questo processo diventa più attivo in situazioni di stress, quando la cellula deve affrontare situazioni come la carenza di nutrienti o l'infezione da patogeni.

Bag3 e HspB8 lavorano insieme per eliminare proteine danneggiate o mal ripiegate tramite la macroautofagia. Questo è particolarmente importante nel caso di proteine come la Htt43Q, coinvolta nella malattia di Huntington, che tendono a formare aggregati dannosi. Questa squadra di proteine non solo aiuta a eliminare le proteine danneggiate, ma stimola anche l'autofagia per mantenere la cellula sana [27].

Inoltre, BAG3 può legarsi ad altri chaperoni come HspB6/Hsp20, che hanno un ruolo importante nel proteggere il cuore e regolare la contrazione dei muscoli cardiaci. Questo dimostra quanto queste proteine siano versatili e cruciali per la salute cellulare [28].

CAPITOLO 3: BAG 3 E IL SUO RUOLO NELL ONCOGENESI (GENESI TUMORALI)

L'aumento dell'espressione proteica, caratteristica comune delle cellule tumorali, e le terapie anti-cancro inducono l'espressione di Hsp70. L'effetto citoprotettivo di Hsp70 è, almeno in parte, responsabile della progressione tumorale e della resistenza alla chemioterapia. Se Hsp70 è un oncogene, è logico supporre che tutti i suoi presunti regolatori positivi, come la famiglia Bag, possano essere oncogeni. Inoltre, la capacità delle proteine Bag di interagire con Bcl-2 e potenziare la sua attività anti-apoptotica supporta ulteriormente il ruolo oncogeno delle Bag.

Nonostante l'attenzione a lungo rivolta dalla comunità di ricerca sui disordini neurodegenerativi alle proteine Bag, in particolare per il loro coinvolgimento nella malattia di Alzheimer e di Parkinson, solo di recente la famiglia Bag è diventata oggetto di ricerca nel contesto del cancro. I membri più studiati, Bag1 e Bag3, sono segnalati come sovraespressi in diversi tumori, come leucemia, carcinoma polmonare, carcinoma mammario, carcinoma prostatico, carcinoma tiroideo, neuroblastoma e glioblastoma. Qui, le Bag sono coinvolte in vari processi biologici, tra cui apoptosi, autofagia, riorganizzazione del citoscheletro, angiogenesi aberrante e transizione epiteliale-mesenchimale (EMT). Come per la maggior parte degli oncogeni, l'up regulation delle Bag generalmente porta all'inibizione dell'apoptosi delle cellule tumorali; al contrario, la loro downregulation causa la riduzione della crescita tumorale.

Diversi studi hanno dimostrato che Bag3 è sovraespresso sia nei tumori solidi (come melanoma, glioblastoma, carcinoma prostatico e carcinoma del colon) che nelle leucemie. La sovraespressione oncogenica di Bag3 determina la sopravvivenza delle cellule tumorali dopo trattamenti chemioterapici attraverso l'inibizione dell'apoptosi e l'induzione dell'autofagia. Infatti, in cellule di melanoma e osteosarcoma, BAG3 promuove la sopravvivenza delle

cellule tumorali dopo il trattamento con etoposide inibendo il trasporto di proteine anti apoptotiche, come IKK γ , Mcl-1, Bcl-x e Bcl-2, al proteasoma [29,30].

Livelli elevati di proteina Bag3 sono anche associati al fallimento della terapia basata su cisplatino nel cancro ovarico e nel carcinoma polmonare a piccole cellule, con il vemurafenib nel melanoma e con gli antagonisti di Bcl-2 nel neuroblastoma e nel carcinoma prostatico. Bag3 è anche sovraespresso nella leucemia linfatica cronica (CLL), e livelli elevati di BAG3 sono strettamente legati a una prognosi sfavorevole in alcuni pazienti [31]. Inoltre, nei pazienti con melanoma di stadio III, la prognosi dei pazienti correla con l'espressione di Bag3 [32].

BAG3 promuove anche la progressione tumorale influenzando il microambiente tumorale e la sorveglianza immunitaria tumorale[31]. Infatti, nelle cellule del carcinoma duttale pancreatico (PDAC), BAG3 viene secreto attraverso UPS (unconventional pathways of secretion) e si lega ai recettori IFITM-2 sulle cellule macrofagiche associate al tumore (TAM), stimolando il rilascio di citochine e chemochine pro-tumorali. (figura 9) Non è noto se BAG3 agisca direttamente sulle macrofagi di tipo M2 o se promuova la differenziazione delle TAM in M2; tuttavia, l'inibizione dell'interazione BAG3-TAM attraverso un anticorpo specifico riduce chiaramente la crescita tumorale e il processo metastatico in tre diversi modelli murini [33].

Inoltre, BAG3 è in grado di modulare i fibroblasti associati al cancro (CAFs) nel PDAC, che svolgono un ruolo cruciale nella progressione e nell'invasione delle cellule tumorali: BAG3 attiva le TAM, che a loro volta rilasciano la serina proteasi fibroblast-attivante e diverse citochine, che contribuiscono all'attivazione dei CAFs. In alcuni studi murini, l'anticorpo anti-BAG3 ha ridotto l'espressione del marcatore di attivazione dei CAF α -SMA [34].

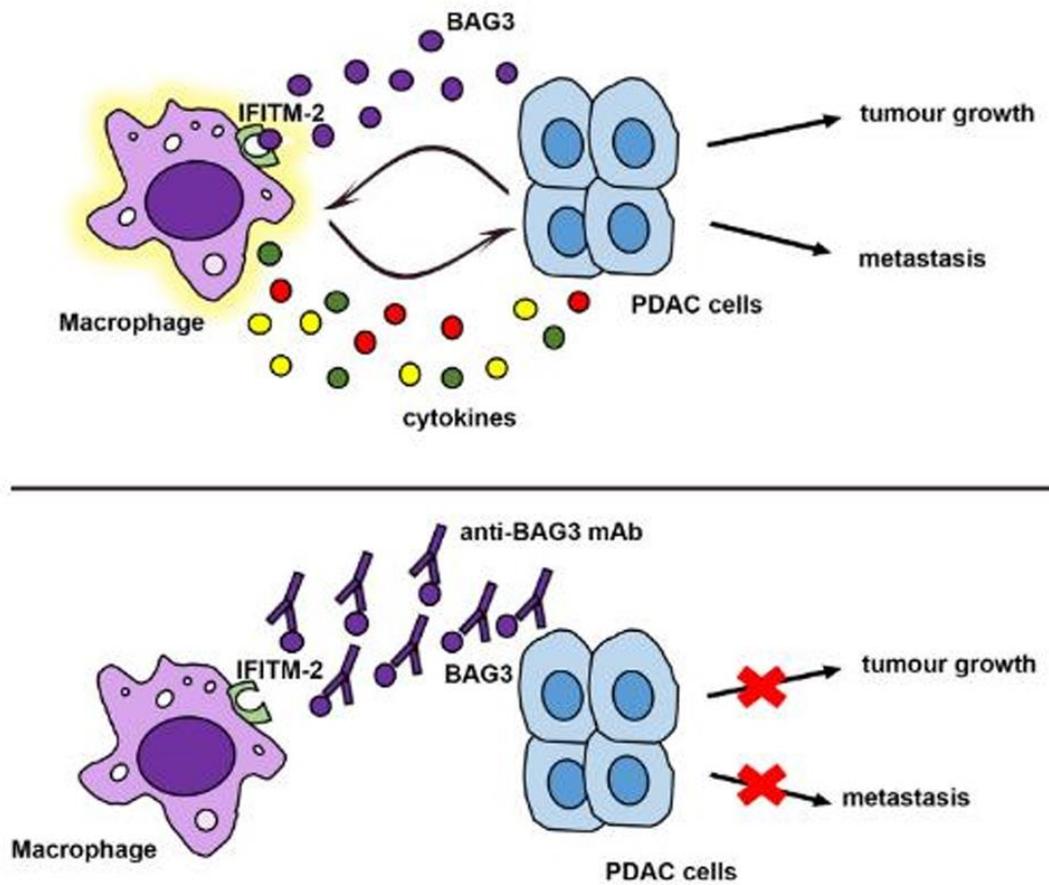


Figura 9: Ruolo di BAG3 nel microambiente delle cellule PDAC. BAG3 si lega ai recettori IFITM-2 stimolando il rilascio di citochine dai macrofagi e, quindi, la crescita del tumore e il processo metastatico. Un anticorpo anti-BAG3 previene l'interazione tra BAG3 e IFITM-2, riducendo così la proliferazione delle cellule tumorali e la formazione di metastasi.

CAPITOLO 4: GLI INIBITORI DI BAG

4.1. Inibitori allosterici di HSP70:

La modulazione delle funzioni di Bag potrebbe infatti essere ottenuta tramite inibitori allosterici di Hsp70. In questo contesto, è stato proposto il Mkt-077 (cloruro di piridinio di 1-etil-2-[[3-etil-5-(3-metilbenzotiazolin-2-iliden)]-4-oxotiazolidin-2-ilidene metil] (figura 10) [1], un rodocianina cationica sviluppata inizialmente come colorante e successivamente trovata avere un'attività antiproliferativa promettente contro numerose linee cellulari cancerose (Il Mkt-077 inibisce la crescita tumorale del carcinoma renale e del carcinoma prostatico in vivo [35], promuovendo questa molecola come un buon candidato per gli studi clinici. Tuttavia, nonostante risultati promettenti in vivo, lo studio clinico è stato interrotto presto a causa di importanti risultati tossicologici. Il Mkt-077 si lega sia all'HSP70 citoplasmatica che a quella mitocondriale. Il legame del Mkt-077 con l'Hsp70 mitocondriale interrompe l'interazione tra l'Hsp70 mitocondriale e p53, che quindi può svolgere la sua funzione come soppressore tumorale. Infatti, il Mkt-077 ha inibito la sopravvivenza delle cellule tumorali nel carcinoma midollare della tiroide, interferendo con l'attività mitocondriale [36,37].

Sostituendo la porzione piridinica cationica del Mkt-077 con una piridina neutra, hanno identificato il YM-08, un analogo neutro del Mkt-077, in grado di attraversare la barriera emato-encefalica (BBB). Come il composto principale, il YM-08 si lega all'Hsp70 in vitro e provoca la degradazione di proteine client particolarmente sensibili, come FoxM1 e Tau, nel cervello. I derivati della rodocianina superano anche la resistenza al tamoxifene nel cancro al seno. Anche un'altra derivato è YM-01, nel quale il gruppo etilico sul nitrogeno piridinico è stato modificato con un gruppo metilico. L'ultimo benzotriazolo-rodocianina, JG-98, interrompeva fortemente l'interazione tra Hsp70 e Bag1-3 in vitro, rispetto alla serie YM precedente (YM-01), ed è stato ben tollerato in vivo, sopprimendo con successo la crescita tumorale. (In JG-98 sono state apportate modifiche strutturali più importanti. Infatti, JG-98 mostra un'affinità 60 volte maggiore per l'HSP-70 rispetto a YM-01 ($KD \approx 86$ nM), e la sua attività antiproliferativa in diverse linee cellulari tumorali è da

3 a 20 volte maggiore) Pertanto, JG-98 è attualmente l'inibitore più promettente dell'interazione BAG–HSP70 appartenente alla classe dei benzotriazolo-rodocianine [37].

Complessivamente, i benzotriazolo-rodocianine sono buoni disgregatori di BAG–HSP70, ma il loro uso efficace in terapia è ostacolato da significative limitazioni (ad es. fotoreattività, scarsa solubilità). Attraverso lo screening ad alto rendimento, il derivato 2-amino tiazolo IT2-144 è stato identificato come un nuovo inibitore allosterico di Hsp70 che interferisce con l'interazione Bag–Hsp70, riducendo la proliferazione delle cellule tumorali nell'intervallo di micromoli. Tuttavia, questo studio è stato condotto su una singola linea cellulare tumorale e richiede ulteriori verifiche [38].

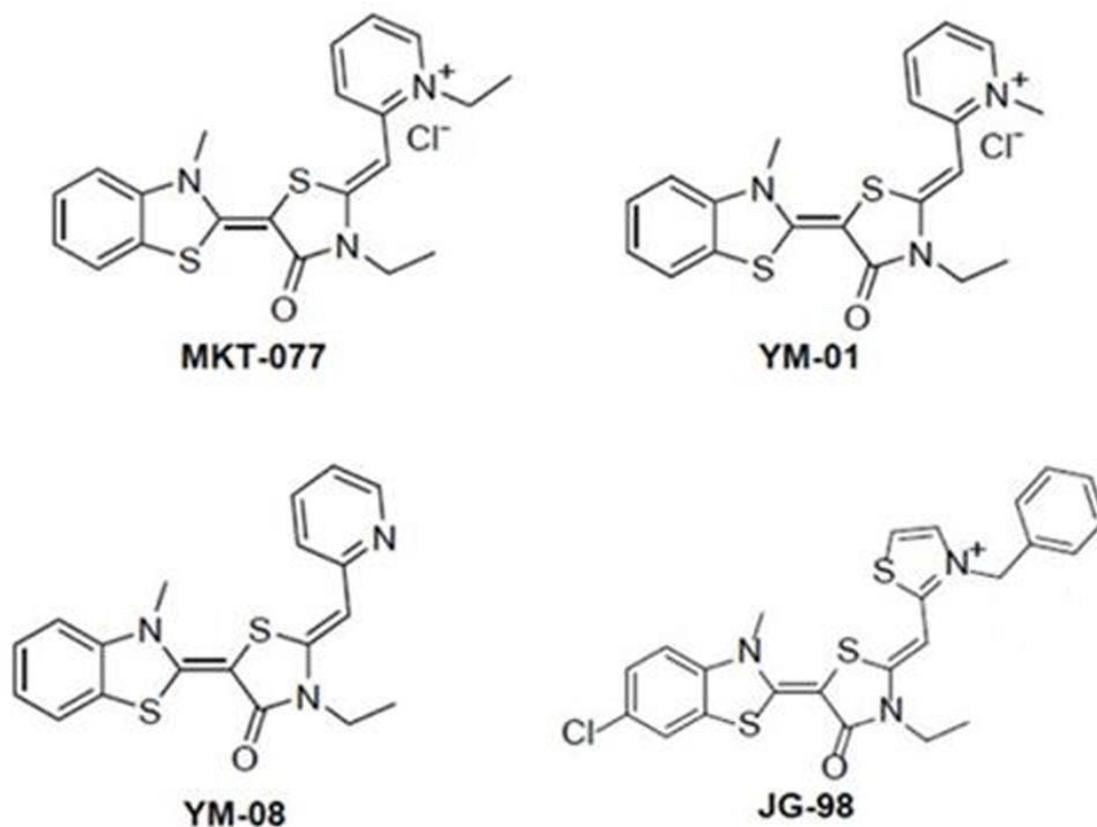


Figura 10: Strutture chimiche di MKT-077 e dei suoi derivati.

4.2. "Scoperta del Primo Modificatore Selettivo di BAG3: Il Derivato 2,4-Tiazolidinedione 28"

Non sono ancora stati segnalati modulatori selettivi di Bag3. Qui riportiamo il derivato 2,4-tiazolidinedione 28 come primo modulatore proteico di Bag3., Approfittando di una strategia basata su computer, abbiamo iniziato l'identificazione di modulatori inediti di Bag3. Abbiamo eseguito uno screening virtuale basato sulla struttura partendo da una vasta libreria di composti disponibili in commercio. La struttura proteica utilizzata per lo screening virtuale era correlata al dominio BAG murino di BAG3. (figura11) I 24 composti con il punteggio più alto sono stati testati per verificare la loro

capacità di legarsi fisicamente alla proteina bersaglio. Inoltre, due composti selezionati casualmente, che non hanno mostrato un legame promettente con il bersaglio, sono stati testati come controlli negativi. Un esperimento di risonanza plasmonica di superficie (SPR) è stato eseguito utilizzando BAG3 ricombinante per testare la capacità dei composti selezionati di legarsi alla proteina immobilizzata. Tre composti sono stati identificati come lead ad alta affinità per la proteina bersaglio con valori di KD (un parametro che indica l'affinità tra due molecole) molto bassi. Anche i due composti selezionati casualmente hanno mostrato una discreta affinità di legame. Per esplorare la selettività di queste molecole, abbiamo eseguito un'analisi SPR su altri membri della famiglia BAG, evidenziando la selettività dei composti per Bag3.

I risultati ottenuti hanno evidenziato il composto 28 come il più attraente candidato per ulteriori esplorazioni biologiche. Questo composto è stato testato su un piccolo pannello di linee cellulari tumorali e ha mostrato attività antiproliferativa, senza rilevare attività citotossica.

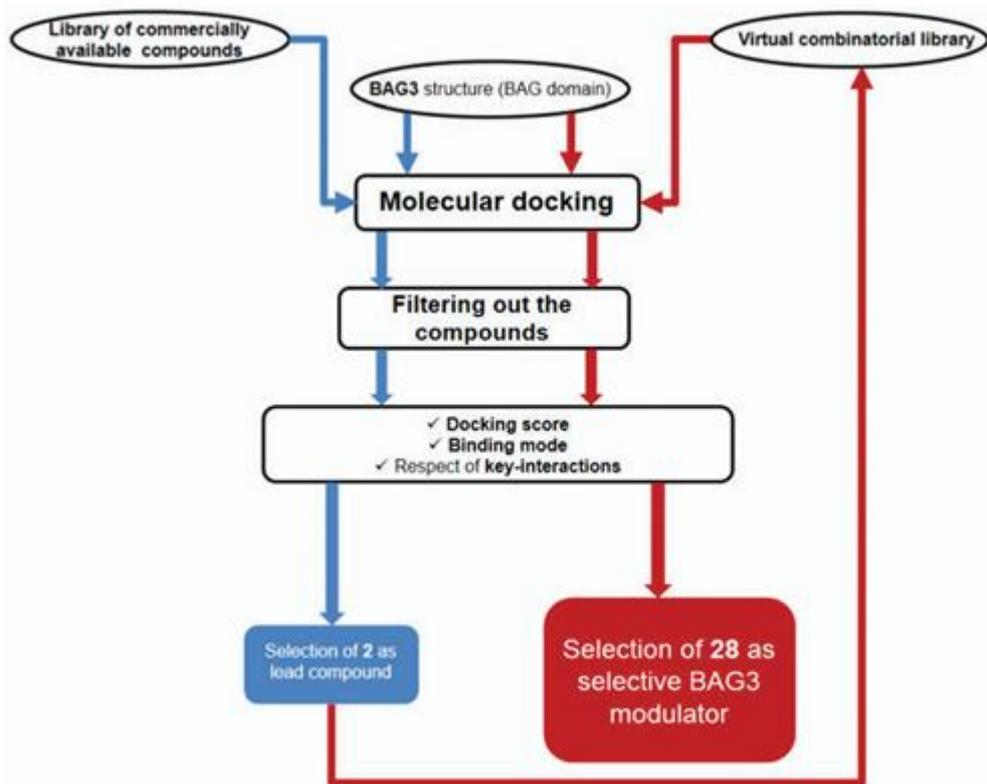


Figura 11: Il flusso di lavoro del virtual screening per l'identificazione dei ligandi di BAG3.

Abbiamo studiato il meccanismo d'azione di 28 per chiarire come l'attività di Bag3 fosse funzionalmente modulata. Analisi del ciclo cellulare tramite citometria a flusso hanno mostrato che 28 arresta le cellule in fase G2/M senza aumentare significativamente la frazione sub G1. (figura 12A) Inoltre, il trattamento delle cellule con 28 ha prodotto un aumento della morte cellulare in risposta alla privazione del siero o all'antibiotico proapoptotico staurosporina,(figura 12 B) confermando una down-modulazione mediata da 28 di Bag3 [39].

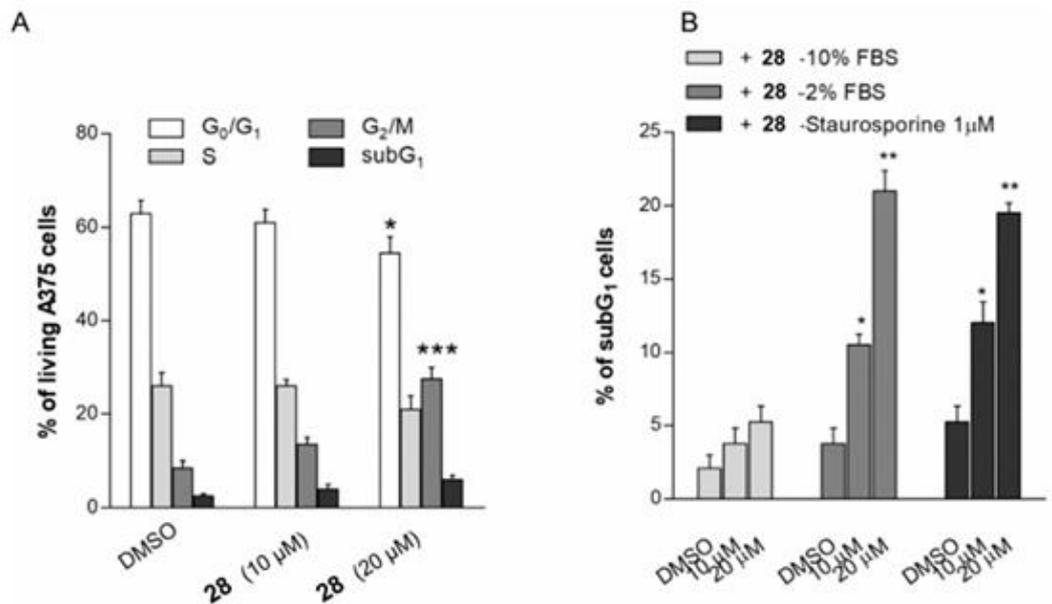


Figura 12: Analisi del ciclo cellulare del contenuto di DNA, con colorazione con ioduro di propidio, tramite valutazione citometria a flusso. (A) Le fasi del ciclo cellulare delle cellule A375 trattate con 28 (10 o 20 mM) o DMSO per 72 ore. (B) La percentuale di cellule A375 in sub-G1 dopo l'incubazione in un mezzo completo o in un mezzo povero (2% FBS) con il composto 28 (10 o 20 mM) o DMSO per 72 ore o in presenza di staurosporina (1 mM) per ulteriori 6 ore dopo il trattamento con il composto 28 nel mezzo completo. I risultati sono espressi come media \pm S.D. di tre esperimenti eseguiti in duplicato (** $P \leq 0.001$, ** $P \leq 0.005$, * $P \leq 0.05$).

Usando un approccio multidisciplinare, il nucleo chimico della 2,4-tiazolidinedione è stato identificato come una promettente piattaforma chimica in grado di legarsi selettivamente e inibire l'interazione proteina-proteina Bag3–Hsp70. Questi risultati sono estremamente rilevanti perché hanno portato alla scoperta del primo modulatore di Bag3 per lo sviluppo di una nuova classe di agenti terapeutici.

Abbiamo studiato il meccanismo d'azione di 28 (figura 13), verificando che influenzava la distribuzione del ciclo cellulare arrestando le cellule in G2/M e aumentando la morte cellulare in risposta alla privazione di siero o al trattamento con staurosporina. Questo ha confermato una modulazione negativa di Bag3 mediata da 28. Il trattamento delle cellule con 28 ha ridotto

l'interazione del complesso Bag3–Hsp70, confermando che 28 si lega a Bag3 BD interferendo con l'interazione Bag3–Hsp70.

Utilizzando un approccio multidisciplinare, il nucleo 2,4-tiazolidinedione è stato identificato come una piattaforma chimica promettente capace di legarsi selettivamente e inibire l'interazione proteina-proteina Bag3–Hsp70. Questi risultati sono estremamente rilevanti poiché hanno portato alla scoperta del primo modulatore di Bag3 per lo sviluppo di una nuova classe di agenti terapeutici [40].

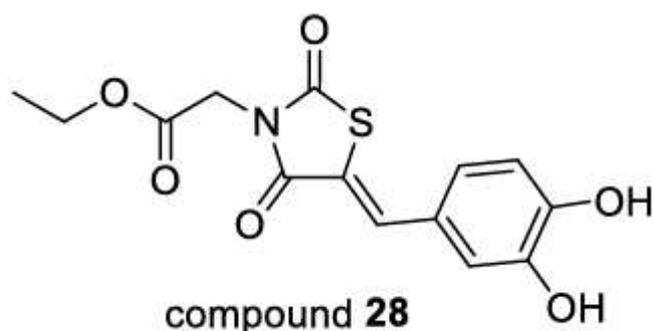


Figura 13: struttura chimica di composto 28 (2,4-tiazolidinedione).

4.3. "Sviluppo di Nuovi Inibitori di Bag3: Sintesi e Valutazione dei Derivati del 2,4-Tiazolidinedione"

La sintesi e la valutazione biologica di nuovi derivati della 2,4-tiazolidinedione in grado di colpire la proteina umana Bag3, nota per il suo ruolo oncogenico in diverse forme di cancro, tra cui la leucemia e il medulloblastoma. L'obiettivo principale dello studio era progettare e sintetizzare una serie di composti derivati dalla 2,4-tiazolidinedione per migliorare l'affinità di legame con la proteina Bag3 e la loro attività antiproliferativa contro linee cellulari tumorali.

Per raggiungere questi obiettivi, sono stati sintetizzati quarantaquattro nuovi composti modificando e ottimizzando un derivato precedentemente noto della 2,4-tiazolidinedione (composto 28)(figura 14). La proteina BAG3 è stata clonata e trasfettata in cellule HEK-293T, poi purificata utilizzando tecniche cromatografiche. Tramite risonanza plasmonica superficiale (SPR), è stato valutato il legame dei composti alla BAG3, evidenziando il composto FB49 come quello con la maggiore affinità ($K_d = 45 \pm 6 \mu\text{M}$). Sono state quindi testate l'attività antiproliferativa e la tossicità dei composti su tre linee cellulari tumorali umane e su cellule mononucleate periferiche umane sane.

I risultati hanno mostrato che il composto FB49 ha attività antiproliferativa nell'ordine dei micromolari su tre linee cellulari tumorali e nessuna tossicità su cellule sane. FB49 ha indotto un arresto del ciclo cellulare nella fase G1 e ha innescato l'apoptosi e l'autofagia nelle cellule di medulloblastoma HD-MB03. Inoltre, FB49 ha dimostrato un effetto sinergico quando combinato con un cocktail chemioterapico di Vincristina, Etoposide, Cisplatino e Ciclofosfamide (VECC). L'inibizione farmacologica di BAG3 con FB49 ha migliorato la risposta delle cellule di medulloblastoma alla chemioterapia, e il trattamento con FB49 ha causato l'arresto del ciclo cellulare e l'accumulo di cellule apoptotiche in maniera dipendente dal tempo.

In conclusione, FB49 si è rivelato un nuovo derivato in grado di legarsi alla Bag3 con alta affinità e potenzialmente utile come modulatore della Bag3 in tumori correlati all'iperespressione di questa proteina. Lo studio suggerisce che FB49 potrebbe essere utilizzato come base per ulteriori sviluppi terapeutici contro i tumori con alta espressione di Bag3. Questa ricerca evidenzia l'importanza della Bag3 come bersaglio terapeutico e fornisce una base promettente per la progettazione di nuovi trattamenti antitumorali.

Infine, l'efficacia di FB49 in combinazione con VECC è stata confermata dall'aumento del punteggio sinergico, suggerendo che l'inibizione della Bag3 potrebbe sensibilizzare le cellule tumorali alla chemioterapia standard. FB49

ha indotto l'autofagia, che potrebbe essere contrastata con inibitori come la cloroquina, aumentando ulteriormente l'apoptosi delle cellule trattate [41,42].

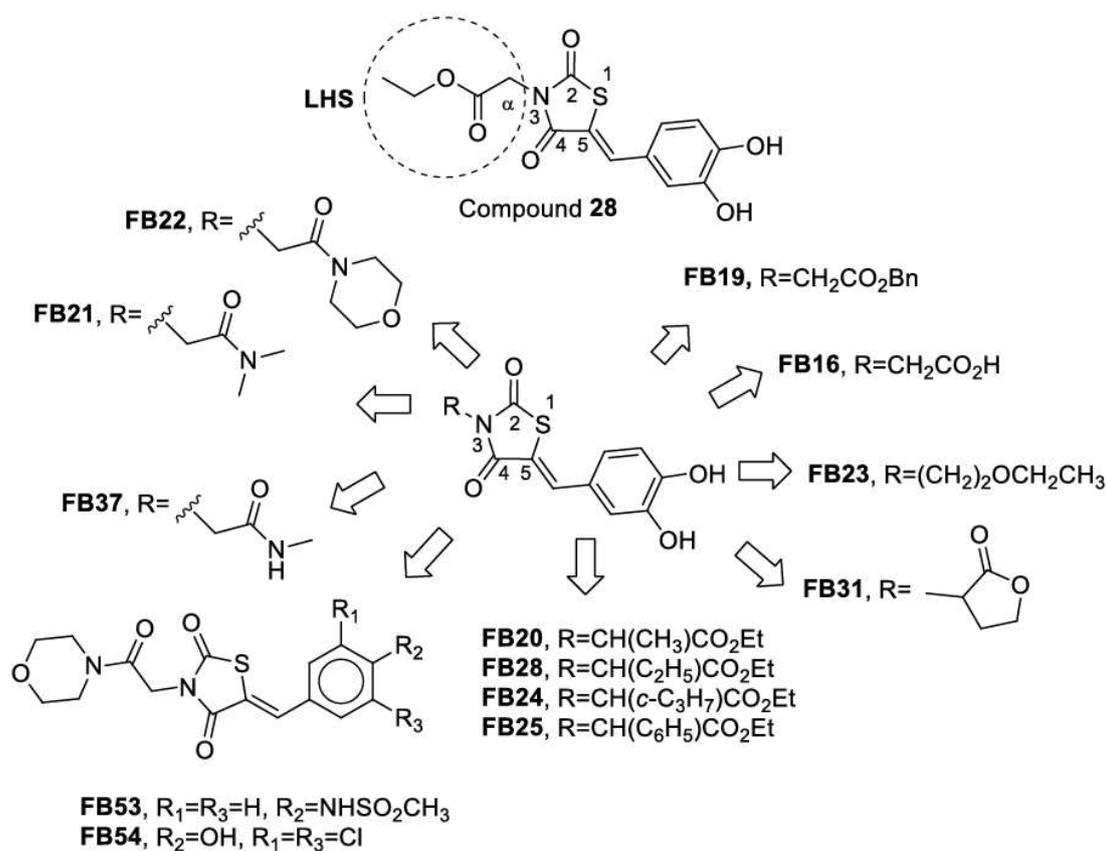


Figura 14: Derivati progettati per l'esplorazione SAR sul lato sinistro della serie delle tiazolidinedioni.

CONCLUSIONE

BAG3 è una proteina antiapoptotica appartenente alla famiglia BCL-2 associated athanogene (BAG). Infatti, la sua sovraespressione porta alla sopravvivenza delle cellule tumorali dopo i trattamenti chemioterapici in molti tipi di tumore.", La sua interazione con le proteine di shock termico Hsp70 non solo protegge le cellule malate dalla morte programmata, ma contribuisce anche alla resistenza del cancro alle terapie attuali.

Le recenti scoperte, inclusa la promettente ricerca su inibitori come il composto FB49 derivato dalla 2,4-tiazolidinedione, suggeriscono che mirare BAG3 potrebbe migliorare significativamente il trattamento del cancro, potenziando l'efficacia delle terapie esistenti. Questi sviluppi offrono una nuova speranza per i pazienti e le loro famiglie, aprendo la strada a terapie più mirate e promettenti.

Tuttavia, rimangono sfide da superare, come comprendere appieno i dettagli molecolari dell'interazione BAG3-Hsp70 e ottimizzare la sicurezza e l'efficacia degli inibitori. È essenziale continuare la ricerca per portare queste promettenti scoperte dalla banca dati scientifica al letto del paziente, migliorando così la qualità della vita e le possibilità di recupero per chi affronta questa malattia devastante.

In sintesi, la nostra comprensione di BAG3 sta aprendo nuove porte nella lotta contro il cancro, con l'obiettivo di trasformare la teoria scientifica in soluzioni concrete che possano fare la differenza nella vita delle persone colpite dal cancro in tutto il mondo.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Mariotto, E., Viola, G., Zanon, C. & Aveic, S. A BAG's life: Every connection matters in cancer. *Pharmacol. Ther.* 209, 107498 (2020).
- [2] Takayama, S. et al. Cloning and functional analysis of BAG-1: A novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity. *Cell* 80, 279–284 (1995).
- [3] Doong, H., Vrailas, A. & Kohn, E. C. What's in the 'BAG'? - A functional domain analysis of the BAG-family proteins. *Cancer Lett.* 188, 25–32 (2002).
- [4] Hishiya, A., Salman, M. N., Carra, S., Kampinga, H. H., & Takayama, S. BAG3 directly interacts with mutated alphaB-crystallin to suppress its aggregation and toxicity. *PLoS One* 6, e16828(2011)
- [5] Shimizu, S., Narita, M., & Tsujimoto, Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399, 483–487(1999)
- [6] Strasser, A., Harris, A. W., Bath, M. L., & Cory, S. Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. *Nature* 348, 331–333(1990).
- [7] Tsujimoto, Y. Stress-resistance conferred by high level of bcl-2 alpha protein in human B lymphoblastoid cell. *Oncogene* 4, 1331–1336(1989).
- [8] Takayama, S., Xie, Z., & Reed, J. C. An evolutionarily conserved family of Hsp70/ Hsc70 molecular chaperone regulators. *The Journal of Biological Chemistry* 274, 781–786. (1999)
- [9] Sondermann, H., Scheufler, C., Schneider, C., Hohfeld, J., Hartl, F. U., & Moarefi, I. Structure of a Bag/Hsc70 complex: Convergent functional evolution of Hsp70 nucleotide exchange factors. *Science* 291, 1553–1557(2001).
- [10] Bukau, B., & Horwich, A. L. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92, 351–366 (1998).
- [11] Labbadia, J., & Morimoto, R. I. The biology of proteostasis in aging and disease. *Annual Review of Biochemistry* 84, 435–464(2015).

- [12] Rosati, A., Ammirante, M., Gentilella, A., Basile, A., Festa, M., Pascale, M., ... Turco, M. C. Apoptosis inhibition in cancer cells: A novel molecular pathway that involves BAG3 protein39, 1337–1342(2007).
- [13] Bruno, A. P., Festa, M., Dal Piaz, F., Rosati, A., Turco, M. C., Giuditta, A., & Marzullo, L. Identification of a synaptosome-associated form of BAG3 protein. *Cell Cycle* 7, 3104–3105 (2008).
- [14] Cesaro E, Montano G, Rosati A, Crescitelli R, Izzo P, Turco MC, et al. WT1 protein is a transcriptional activator of the antiapoptotic bag3 gene. *Leukemia.*;24:1204–1206(2010).
- [15] Romano MF, Festa M, Pagliuca G, Lerosé R, Bisogni R, Chiurazzi F, et al. BAG3 protein controls B-chronic lymphocytic leukaemia cell apoptosis. *Cell Death Differ.*;10:383–385(2003).
- [16] Liu P, Xu B, Li J, Lu H. BAG3 gene silencing sensitizes leukemic cells to Bortezomib-induced apoptosis. *FEBS Lett.*;583:401–406 (2009).
- [17] Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.* 35, 495–516 (2007).
- [18] Du, Z. X., Meng, X., Zhang, H. Y., Guan, Y. & Wang, H. Q. Caspase-dependent cleavage of BAG3 in proteasome inhibitors-induced apoptosis in thyroid cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 369, 894–898 (2008).
- [19] Wang, H. Q. et al. Characterization of BAG3 cleavage during apoptosis of pancreatic cancer cells. *J. Cell. Physiol.* 224, 94–100 (2010).
- [20] Rosati, A., Graziano, V., De Laurenzi, V., Pascale, M. & Turco, M. C. BAG3: A multifaceted protein that regulates major cell pathways. *Cell Death Dis.* 2, (2011).
- [21] Doong, H. et al. 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, 28490–28500 (2003).
- [22] Lüders, J., Demand, J. & Höhfeld, J. The ubiquitin-related BAG-1 provides a link between the molecular chaperones Hsc70/Hsp70 and the proteasome. *J. Biol. Chem.* 275, 4613–4617 (2000).
- [23] Israël, A. The IKK complex, a central regulator of NF-kappaB activation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, 1–14 (2010).

- [24] Festa, M. et al. BAG3 protein is overexpressed in human glioblastoma and is a potential target for therapy. *Am. J. Pathol.* 178, 2504–2512 (2011).
- [25] Matsui, H., Asou, H. & Inaba, T. Cytokines Direct the Regulation of Bim mRNA Stability by HeatShock Cognate Protein 70. *Mol. Cell* 25, 99–112 (2007).
- [26] Behl, C. Breaking BAG: The Co-Chaperone BAG3 in Health and Disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 37, 672–688 (2016).
- [27] Fuchs M, Poirier DJ, Seguin SJ, Lambert H, Carra S, Charette SJ et al. Identification of the key structural motifs involved in HspB8/HspB6-Bag3 interaction. *Biochem J*; 425: 245–255(2009).
- [28] Fan GC, Chu G, Kranias EG. Hsp20 and its cardioprotection. *Trends Cardiovasc Med*; 15: 138–141(2005).
- [29] Ammirante, M. et al. IKK γ protein is a target of BAG3 regulatory activity in human tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 7497–7502 (2010).
- [30] De Marco, M., Turco, M. C. & Marzullo, L. BAG3 in Tumor Resistance to Therapy. *Trends in Cancer* xx, 3–6 (2020).
- [31] Zhu, H. et al. Overexpressed BAG3 is a potential therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia. *Ann. Hematol.* 93, 425–435 (2014).
- [32] Guerriero, L. et al. BAG3 protein expression in melanoma metastatic lymph nodes correlates with patients' survival. *Cell Death Dis.* 5, 2–3 (2014).
- [33] Rosati, A. et al. BAG3 promotes pancreatic ductal adenocarcinoma growth by activating stromal macrophages. *Nat. Commun.* 6, 1–11 (2015).
- [34] Iorio, V. et al. CAF-Derived IL6 and GM-CSF Cooperate to Induce M2-like TAMs—Letter. *Clin. Cancer Res.* 25, 892–893 (2019)
- [35] Koya, K. et al. MKT-077, a novel rhodacyanine dye in clinical trials, exhibits anticarcinoma activity in preclinical studies based on selective mitochondrial accumulation. *Cancer Res.* 56, 538–543 (1996).
- [36] Propper, D. J. et al. Original article chemo-resistant solid tumours. *Ann. Oncol.* 923–927 (1999)

- [37] Petit, T. et al. Activity of MKT 077, a rhodacyanine dye, against human tumor colony-forming units. *Anticancer. Drugs* 10, 309—315 (1999).
- [38] Li, X. et al. Validation of the Hsp70-Bag3 protein-protein interaction as a potential therapeutic target in cancer. *Mol. Cancer Ther.* 14, 642–648 (2015).
- [39] Taylor, I. R. et al. High-throughput screen for inhibitors of protein-protein interactions in a reconstituted heat shock protein 70 (Hsp70) complex. *J. Biol. Chem.* 293, 4014–4025 (2018).
- [40] Terracciano, Stefania, et al. “Discovery and Synthesis of the First Selective BAG Domain Modulator of BAG3 as an Attractive Candidate for the Development of a New Class of Chemotherapeutics.” *Chemical Communications*, vol. 54, no. 55, 2018, pp. 7613–16. (2018)
- [41] Budassi, F., Marchioro, C., Canton, M., Favaro, A., Sturlese, M., Urbinati, C., Rusnati, M., Romagnoli, R., Viola, G., & Mariotto, E.). Design, synthesis and biological evaluation of novel 2,4-thiazolidinedione derivatives able to target the human BAG3 protein. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 261, 115824(2023).
- [42] Ruggiero, D., Terracciano, S., Lauro, G., Pecoraro, M., Franceschelli, S., Bifulco, G., & Bruno, I. Structural Refinement of 2,4-Thiazolidinedione Derivatives as New Anticancer Agents Able to Modulate the BAG3 Protein. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(3), 665. (2022)