



La tua  
**Campania**  
cresce in  
**Europa**



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO  
Dipartimento di Farmacia

Dottorato di ricerca  
in **Biologia dei Sistemi**  
Ciclo XII Nuova serie — Anno di discussione 2014

Coordinatore: Chiar.mo Prof. *Antonietta Leone*

## ***L'influenza del rame sull'espressione e l'attività del fattore gastrointestinale TFF1***

Dottorando

Dott. *Roberta Esposito*

Tutore

Chiar.mo Prof. *Alessandra Tosco*

---

*“Credo di poter affermare che nella ricerca scientifica né il grado di intelligenza né la capacità di eseguire e portare a termine il compito intrapreso siano fattori essenziali per la riuscita e per la soddisfazione personale. Nell'uno e nell'altro contano maggiormente la totale dedizione e il chiudere gli occhi davanti alle difficoltà: in tal modo possiamo affrontare i problemi che altri, più critici e più acuti, non affronterebbero.”*

Rita Levi Montalcini (1909-2012)

Anche la lotta verso la cima basta a riempire il cuore di un uomo.  
Bisogna immaginare Sisifo felice.

Albert Camus, *Il mito di Sisifo*

---

---

## INDICE

<b>ABSTRACT</b>	pag I
<b>SOMMARIO</b>	pag III
<b>CAPITOLO 1 - INTRODUZIONE</b>	
<b>1.1 La famiglia dei peptidi trifoglio</b>	pag 1
1.1.1 Struttura dei peptidi trifoglio	pag 2
1.1.2 Struttura quaternaria dei peptidi trifoglio	pag 4
1.1.3 Siti di espressione dei TFF	pag 5
1.1.4 Ruoli funzionali dei TFF	pag 6
1.1.4-a Protezione e rigenerazione delle mucose gastriche	pag 6
1.1.4-b Attività motogenica	pag 8
1.1.4-c Attività anti-apoptotica e anti-proliferativa	pag 9
1.1.4- Attività pro-angiogenica	pag 9
1.1.5 Regolazione dell'espressione genica dei fattori trifoglio	pag 10
1.1.6 Ruolo dei peptidi trifoglio in patologie tumorali	pag 14
1.1.6-a I TFF e i tumori gastrici	pag 15
1.1.6-b TFF1 e il tumore al seno	pag 16
1.1.7 TFF1 e il rame	pag 17
1.1.7-a Il rame: aspetti generali	pag 17
1.1.7.-b Il coinvolgimento del rame nelle patologie	pag 23
1.1.7-c Il cuprocomplesso TFF1-rame	pag 24
<b>1.2 <i>Helicobacter pylori</i></b>	pag 26
<b>1.2 Caratteristiche generali</b>	pag 26
1.2.1 Epidemiologia dell'infezione	pag 26

---

<b>1.2.2 Fattori coinvolti nella colonizzazione, adesione e sopravvivenza</b>	pag 27
<b>1.2.3 Fattori di virulenza</b>	pag 30
<b>1.2.4 Effetti cronici di <i>H. pylori</i> nell'epitelio gastrico</b>	pag 30
<b>1.2.5 Strategie di eradicazione di <i>Helicobacter pylori</i></b>	pag 32
<b>1.2.6 <i>Helicobacter pylori</i> e TFF1</b>	pag 33
<b>SCOPO DELLA TESI</b>	pag 37
<b>CAPITOLO 2 - RISULTATI</b>	
<b>2.1 Studio strutturale dell'interazione tra rame e peptidi trifoglio</b>	pag 39
2.1.1 Analisi dell'interazione rame-peptidi trifoglio mediante ESI-MS	pag 39
2.1.2 Caratterizzazione termodinamica dell'interazione tra il rame e il peptide trifoglio TFF1	pag 41
<b>2.2 L'influenza del rame sulla secrezione e sulla localizzazione cellulare di TFF1</b>	pag 45
2.2.1 Timing della produzione e secrezione di TFF1	pag 45
2.2.2 L'influenza del rame sul processo di secrezione della proteina trifoglio	pag 46
2.2.3 Analisi della proteina nativa intracellulare e secreta nel surnatante	pag 48
<b>2.3 Analisi della localizzazione subcellulare di TFF1</b>	pag 51
2.3.1 Esperimenti di co-localizzazione cellulare tramite microscopia confocale	pag 51
2.3.2 Esperimenti di frazionamento cellulare	pag 53
<b>2.4 Esperimenti di internalizzazione delle proteine ricombinanti esogene</b>	pag 55
<b>2.5 Il coinvolgimento dell'estremità carbossiterminale di TFF1 nel legame con i lipopolisaccaridi di <i>H. pylori</i></b>	pag 56
<b>2.6 Esperimenti di colonizzazione <i>in vitro</i></b>	pag 58
<b>2.7 Caratterizzazione reologica del muco prodotto da cellule HT29-E12</b>	pag 60

---

<b>CAPITOLO 3 - DISCUSSIONE</b>	pag 67
<b>CAPITOLO 4 – MATERIALI E METODI</b>	
4.1 Analisi dell'interazione tra il rame e le proteine ricombinanti TFF1 e TFF3 mediante spettrometria di massa ESI	pag 71
4.2 Calorimetria isoterma di titolazione	pag 71
4.3 Colture cellulari	pag 73
4.4 Western blotting	pag 73
4.5 Analisi della produzione e secrezione di TFF1 nel clone AGS-AC1 al variare del tempo	pag 74
4.6 Verifica dell'influenza dei livelli di rame sulla secrezione di TFF1	pag 74
4.7 Analisi dello stato di ossidoriduzione della proteina nativa intracellulare e secreta nel surnatante	pag 75
4.8 Analisi della localizzazione intracellulare di TFF1	pag 75
4.8.1 Esperimenti di co-localizzazione cellulare utilizzando la microscopia confocale	pag 75
4.8.2 Frazionamento cellulare	pag 76
4.9 Coniugazione delle proteine ricombinanti con FITC ed esperimenti di internalizzazione	pag 77
4.10 Preparazione del dimero di peptidi sintetici rappresentativi dell'estremità carbossiterminale di TFF1	pag 77
4.11 Esperimenti di Risonanza Plasmonica di Superficie	pag 77
4.12 Ceppi batterici e condizioni di crescita	pag 78
4.13 Esperimenti di colonizzazione di <i>Helicobacter pylori</i> su AGS-AC1	pag 78
4.14 Esperimenti di colonizzazione di <i>Helicobacter pylori</i> su AGS-AC1 in presenza del peptide sintetico <i>wild-type</i>	pag 78
4.15 Preparazione campioni di muco da cellule HT29-E12	pag 79
4.16 Analisi reologiche	pag 79
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	pag I-VIII

---

**COLLABORAZIONI**

IX

**RINGRAZIAMENTI**

XI

## ABSTRACT

The gastrointestinal tract represents the interface between body and external environment. It is equipped with sophisticated mechanisms that regulate the function and implement effective strategies for its protection relying on consecutive defense lines characterized by specific factors involved in different roles. Among these elements, during the last 30 years, three small secreted proteins, TFF1, TFF2 and TFF3 that constitute the so-called family of " Trefoil factors" revealed their prominent role. These proteins share a compact and protease-resistant structure, characterized by the presence of a trefoil domain stabilized by three disulfide bridges. Each protein is able to form dimers and heterodimers through a fourth intermolecular disulfide bond involving a conserved cysteine residue present in the C-terminal tail. They are promptly induced in response to insults involving gastric epithelia, and show their activity in the epithelial "restitution", the important process of repair of the damaged epithelium. Along with their physiological expression and function, the aberrant presence of these peptides characterize pathological contexts such as inflammatory and neoplastic processes.

Our research group showed for the first time the ability of TFF1 monomers to bind copper through its C-terminal tail, and the ability of the metal to induce a conformational change in the protein structure that favors the formation of dimers, thus affecting its biological activity .

Following these findings, first aim of the investigation was the structural and functional study of the Cu- TFF1 complex. The characterization of the interaction of copper and the recombinant proteins hrTFF1 hrTFF3 in monomeric and dimeric forms was carried out, and both forms showed a selective binding with the metal cation. Characterization was extended to the evaluation of the thermodynamic parameters of the Cu-TFF1 complex by isothermal titration calorimetry.

Experiments were carried out in order to evaluate the influence of copper on secretion pathway and cellular localization of the protein. It was shown that copper overload results in a reduced secretion and increased intracellular localization, mainly into the trans-Golgi compartment. Furthermore, copper load increases the protein uptake of gastric cells. This evidence let us hypothesize the involvement of the protein in the mechanisms of metal homeostasis, although further investigations are needed to shed light on this uncharacterized role of the protein.

Interestingly, recent studies showed that TFF1 dimers are able to bind *H. pylori* lipopolysaccharides, thus mediating their binding to the gastric mucosa. Our more recent data indicate that copper causes an improved colonization of gastric cells hyper-expressing TFF1. In fact, we show that the TFF1 C-terminus is involved in the interaction with the pathogenic bacterium, as confirmed by SPR analysis and colonization assays of gastric cells.

TFF1 and mucins, both main components of the protective mucous layer, modulate its rheological properties, thus exerting an additional protective role. The pathogenic bacterium mainly localizes into the adherent mucus layer of the

gastrointestinal epithelia, and interacts with TFF1 and mucin MUC5AC. The results of our rheological analyses show that copper is able to harden the mucus produced and layered onto the surface of HT29-E12 intestinal goblet cell culture. Viscoelastic properties of the mucus could be affected by the balance of dimer production influenced by copper, thus favoring the interaction with mucin MUC5AC and increasing the number of docking sites for bacterial adhesion.

The results here presented provide further information for a better understanding of the role played by the TFF1 trefoil peptide in the physio-pathological processes of the gastrointestinal tract. In addition, the clear involvement of the copper-TFF1 complex in the processes of adhesion and colonization of the pathogenic bacterium *Helicobacter pylori* provides new useful molecular details of the host-pathogen interactions characterizing the colonization and survival of bacteria in the gastric tissue.

## SOMMARIO

Il tratto gastrointestinale rappresenta una interfaccia tra il corpo e l'ambiente esterno. È dotato di sofisticati meccanismi che ne regolano la funzionalità e attua efficaci strategie per la sua protezione affidandosi a successive linee di difesa caratterizzate da specifici fattori che intervengono a svolgere differenti funzioni. Tra questi elementi, negli ultimi 30 anni, hanno assunto un ruolo di rilievo tre piccole proteine secrete, TFF1, TFF2 e TFF3 che costituiscono la famiglia dei cosiddetti "fattori trifoglio". Tali proteine sono accumulate da una struttura compatta e resistente alle proteasi, caratterizzata dalla presenza di un dominio stabilizzato da tre ponti disolfuro. Ciascuna proteina è in grado di formare dimeri ed eterodimeri mediante un quarto legame disolfuro intermolecolare che coinvolge un residuo di cisteina conservato presente nel segmento C-terminale. La loro espressione è prontamente indotta in seguito ad insulti a carico degli epitelii gastrici e mostrano la loro attività biologica partecipando all'importante processo di riparazione degli epitelii danneggiati noto come "restituzione". Accanto alla loro espressione e funzionalità in condizioni fisiologiche, si assiste ad una aberrante presenza di tali peptidi in contesti patologici quali processi infiammatori e neoplastici.

Il gruppo di ricerca presso il quale è stato condotto il presente lavoro di tesi, ha messo per primo in luce la capacità della proteina monomerica TFF1 di legare il rame, mediante la sua coda C-terminale. Il metallo è in grado di indurre un cambiamento conformazionale nella struttura proteica tale da favorire la formazione del dimero e di conseguenza influenzare alcune attività note della proteina, quale quella motogenica. Alla luce di questi risultati, il presente progetto di ricerca ha avuto come obiettivo generale lo studio strutturale e funzionale dei complessi Cu-TFF1.

In particolare, è stata eseguita la caratterizzazione strutturale dell'interazione tra rame e proteine ricombinanti hrTFF1 e hrTFF3, rispettivamente in forma dimerica e monomerica. Entrambe hanno mostrato una selettività di legame per il catione metallico. Sono stati inoltre determinati i parametri termodinamici del complesso rame-TFF1 mediante calorimetria isoterma di titolazione.

È stata inoltre valutata la capacità del metallo di influenzare il *pathway* di secrezione della proteina trifoglio e la sua localizzazione intracellulare al variare dei livelli di rame. Da tale indagine è emerso che il sovraccarico di rame determina una ridotta secrezione della proteina ed un contemporaneo accumulo intracellulare, localizzato in particolare nel trans-Golgi. Inoltre, si è osservato che il metallo determina un maggior *up-take* della proteina esogena da parte di cellule gastriche. I dati ottenuti suggeriscono ipotesi sul coinvolgimento della proteina nei meccanismi di omeostasi del metallo, sebbene essa necessiti di ulteriori e approfondite verifiche.

Studi condotti negli ultimi anni hanno messo in luce un altro importante ruolo di TFF1: la forma dimerica del peptide trifoglio interagisce selettivamente con i lipopolisaccaridi del batterio patogeno *Helicobacter pylori*, determinandone l'adesione alle mucose gastriche. Dati recenti indicano che il rame determina un aumento dei

livelli di colonizzazione in cellule gastriche iper-esprimenti TFF1. L'ipotesi di un coinvolgimento dell'estremità carbossiterminale di TFF1 nel mediare l'interazione con il batterio patogeno è stata confermata da saggi di interazione SPR (Biacore3000) e esperimenti di infezione *in vitro* in cellule gastriche.

La forma dimerica di TFF1, in associazione con la MUC5AC, modula le proprietà reologiche dello strato mucoso, luogo di maggior accumulo batterico. È stato indagato, quindi, l'effetto del rame sulla strutturazione del gel mucoso *in vitro* eseguendo analisi reologiche su campioni di muco prelevati da cellule intestinali goblet HT29-E12 trattate con rame. Da tali analisi risulta che il materiale biologico che si accumula sulla superficie di cellule trattate con il metallo è più compatto rispetto a quello di cellule controllo. Il rame sarebbe quindi in grado di modulare le proprietà viscoelastiche del muco, probabilmente favorendo l'interazione del dimero del peptide trifoglio con la principale mucina secreta MUC5AC, determinando significative conseguenze sulla capacità di colonizzazione del batterio patogeno.

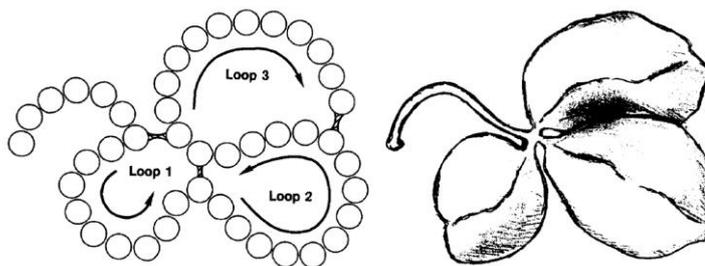
Il presente lavoro di ricerca rappresenta un ulteriore tassello nella comprensione del ruolo giocato dal peptide trifoglio TFF1 nei processi fisio-patologici che riguardano il tratto gastrointestinale. Inoltre, l'evidente coinvolgimento del complesso rame-TFF1 nei processi di adesione e colonizzazione del batterio patogeno *Helicobacter pylori* fornisce nuovi elementi utili all'ottenimento di un quadro più completo degli eventi che caratterizzano la colonizzazione e la sopravvivenza batterica nel tessuto gastrico.

## CAPITOLO 1

## INTRODUZIONE

**1.1 La famiglia dei peptidi trifoglio**

Nei primi anni Novanta si decise di classificare con il nome di “peptidi trifoglio”, tre fattori gastrointestinali, inizialmente denominati pS2, PSP, e ITF. Tali proteine, isolate e caratterizzate da gruppi di ricerca differenti, mostrarono di avere in comune un particolare dominio (C-X<sub>9-10</sub> -C-X<sub>9</sub> -C-X<sub>4</sub> -C-C-X<sub>10</sub> -C), definito “trifoglio” (o *P-domain*) a causa della sua caratteristica struttura, considerato quindi un marchio distintivo (figura 1.1). Fu in seguito assegnata a ciascun gene una nomenclatura omogenea, designandoli rispettivamente TFF1, TFF2 e TFF3 come acronimo di *Trefoil Folding Factor* (Thim *et al.*, 1989).



**Figura 1.1** Il dominio trifoglio, struttura comune ai membri della famiglia dei fattori trifoglio TFF1, TFF2 e TFF3.

I fattori trifoglio sono espressi e secreti dalle cellule epiteliali in associazione alle mucine, le principali componenti del gel mucoso.

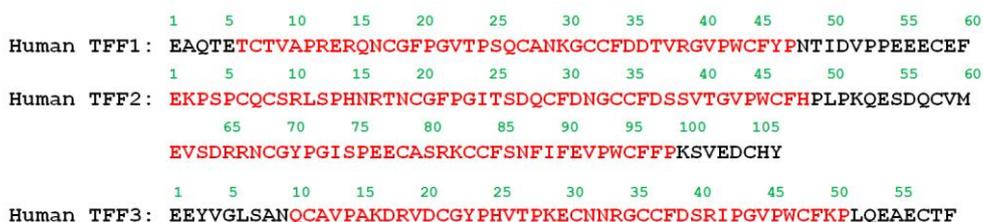
TFF2 è stato il primo membro della famiglia ad essere scoperto durante procedure di estrazione dell'insulina dal pancreas porcino, mostrando di avere attività di inibizione sulla motilità gastrica e sulla secrezione acida (Jorgensen *et al.*, 1982). Nel 1990 fu identificato il suo omologo umano con una percentuale di identità del 45% rispetto a quello porcino (Tomasetto *et al.*, 1990). Nel 1982 si scoprì un secondo peptide appartenente alla famiglia, TFF1, identificato come gene regolato da estrogeni nella linea cellulare di carcinoma mammario MCF-7 (Westley e Rocherfort, 1980; Masiakowsky *et al.*, 1982). Infine in cellule epiteliali di intestino di ratto, durante la ricerca di proteine implicate nella regolazione della proliferazione e differenziazione cellulare, fu identificato il peptide TFF3 (Suemori *et al.*, 1991).

### 1.1.1 Struttura dei peptidi trifoglio

Tra il 1982 e il 1991 le strutture primarie dei diversi TFF di mammifero furono determinate dapprima mediante predizione delle sequenze codificanti e quindi confermate mediante classiche tecniche di sequenziamento amminoacidico combinate ad analisi di spettrometria di massa (Mori *et al.*, 1990).

Tutti i TFF sono sintetizzati come pro-proteine contenenti una sequenza segnale di 21-27 residui amminoacidici. Tale sequenza, che guida la secrezione, viene rimossa mediante proteolisi durante il passaggio attraverso il reticolo endoplasmatico, portando alla forma matura dei peptidi.

Le proteine mature TFF1 (6674 Da) e TFF3 (6580 Da) sono caratterizzate da una sequenza amminoacidica rispettivamente di 60 e 59 residui ed entrambe presentano un unico dominio trifoglio di 42 residui amminoacidici (TFF1: da Thr6 a Pro47; TFF3: da Glu10 a Pro51). TFF2 (11989 Da) è costituito da 106 residui amminoacidici e due domini trifoglio, rispettivamente di 43 (Glu7-Pro48) e 42 (Glu57-Pro98) residui (figura 1.2).



**Figura 1.2.** Le sequenze amminoacidiche dei peptidi TFF. In rosso sono evidenziati i residui amminoacidici che compongono i domini trifoglio.

Oltre ai sei residui di cisteina, anche altri amminoacidi del dominio trifoglio sono conservati tra TFF1, TFF2 e TFF3: il residuo di arginina tra le prime due cisteine; la sequenza N/DCGF/YP-V/IT/S che circonda la seconda cisteina; la fenilalanina che segue il terzo e quarto residuo di cisteina e la sequenza VPWCF-P intorno al sesto residuo di cisteina all'estremità carbossiterminale del dominio trifoglio (figura 1.3). Questo indicherebbe che tali amminoacidi sono limitati da importanti vincoli strutturali o funzionali comuni a tutti i domini trifoglio (Thim & May, 2005).

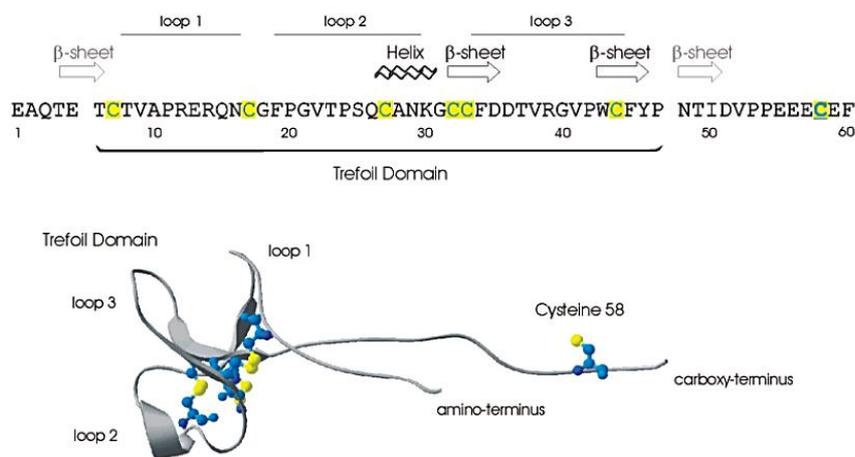
Alla fine degli anni Novanta sono state ottenute mediante cristallografia a raggi X e NMR le strutture secondarie e terziarie dei TFF (Carr *et al.*, 1994; Gajhede *et al.*, 1993; Polshakov *et al.*, 1997). È emerso che tutti e quattro i domini trifoglio presentano elementi comuni (figura 3): una corta  $\alpha$ -elica, che comprende il terzo residuo di cisteina, e due corti  $\beta$ -sheet antiparalleli, il primo dei quali separato dall' $\alpha$ -elica da un unico residuo.

Human TFF1	TC-TVAPRERQNCGFPGVTPSQCANKGCCFDDTVRGVPCFYF
Human TFF2 Domain 1	QCSRLSPHNR TNCGFPGITSDQCDFDNGCCFDSSVTGVPWCFHP
Human TFF2 Domain 2	QC-VMEVSDRRNCGYPGISPEECASRKCCFSNFIFEVPCFFP
Human TFF3	QC-AVPAKDRVDCGYPHVTPKECNRGCCFDSRIPGVPCFKP

|— α —|
|— β —|
|— β —|

**Figura 1.3** Allineamento tra le sequenze amminoacidiche dei domini trifoglio. In verde sono evidenziati i residui conservati.

Il dominio trifoglio assume una conformazione molto compatta: i suoi tre ponti disolfuro bloccano gli elementi della struttura secondaria in un *core* stabile dal quale sporgono i tre *loop*. Essi si dispongono al di fuori del piano con le facce parallele le une alle altre e con il terzo *loop* racchiuso tra il primo e il secondo (figura 1.4), consentendo ai TFF di restare strutturalmente e funzionalmente intatti in un ambiente aggressivo, come quello gastrointestinale, ricco di proteasi. È inoltre possibile osservare la presenza di un canale costituito da residui idrofobici conservati, sulla superficie dei loop 2 e 3, che sono accessibili al solvente e potrebbero rappresentare un potenziale sito di legame capace di accomodare un oligosaccaride o una catena laterale con residui aromatici (Gajhede *et al.*, 1993).



**Figura 1.4** Elementi della struttura secondaria e terziaria condivisi da tutti e quattro i domini trifoglio. In particolare, è mostrata la struttura del TFF1 umano. I residui di cisteina sono rappresentati come *ball-and-stick* e gli atomi di zolfo sono colorati in giallo.

La comparazione delle strutture indica una somiglianza sia negli elementi strutturali secondari sia nella struttura terziaria complessiva all'interno del dominio trifoglio ma questa è combinata ad una quasi totale assenza di analogie al di fuori del dominio. La divergenza tra le strutture contribuisce a spiegare le diverse caratteristiche chimico-fisiche delle tre molecole.

### 1.1.2 Struttura quaternaria dei peptidi trifoglio

Tutti i peptidi TFF contengono un settimo residuo di cisteina, al di fuori del dominio trifoglio, posizionato a tre amminoacidi dall'estremità carbossiterminale. Grazie a questo residuo tutte e tre le proteine trifoglio sono in grado di formare omo- ed eterodimeri. È stato dimostrato che la sua sostituzione isosterica con serina impedisce la formazione degli omodimeri dei peptidi trifoglio (Chadwick *et al.*, 1997), dimostratisi biologicamente più attivi.

La proteina TFF2 può essere considerata un dimero naturale, caratterizzato da un'unica sequenza peptidica. Le sue estremità N- e C- terminali sono collegate mediante il settimo legame disolfuro, il quale fissa l'orientamento relativo dei due domini trifoglio generando una struttura molto compatta.

La forma dimerica della proteina TFF3 è determinata dalla formazione di un ponte disolfuro mediato dal settimo residuo di cisteina (Cys57) extra-dominio ed è caratterizzata da una struttura ben definita e molto stabile che giustifica la presenza della proteina prevalentemente in tale forma (Muskett *et al.*, 2003).

La proteina TFF1 forma il suo dimero (figura 1.5) mediante un legame covalente tra due residui di cisteina (Cys58) presenti alle estremità carbossiterminali delle unità monomeriche. In forma dimerica, i due domini trifoglio sono ben separati e disposti da parti opposte di un *linker* flessibile. Le due unità monomeriche non hanno un orientamento fisso in relazione l'una all'altra e sono presenti in una miscela di conformazioni (Williams *et al.*, 2001).

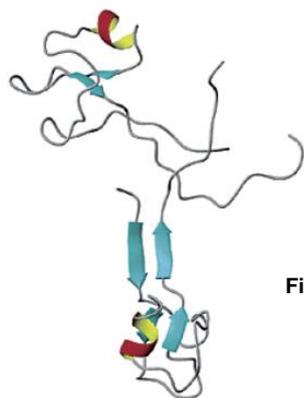


Figura 1.5 Struttura quaternaria del peptide trifoglio TFF1

La presenza di quattro residui di acido glutammico tra gli ultimi 6 residui amminoacidici di TFF1, comporta che nella forma dimerica vi siano dieci residui carichi negativamente, 8 di glutammato e 2 carbossili terminali delle fenilalanine, a breve distanza gli uni dagli altri, costituendo una regione molto acida che potrebbe contribuire all'ingombro sterico che determina la rigidità della struttura (Thim *et al.*, 2005).

È stato osservato che la forma dimerica di TFF1 ha una maggiore attività biologica ad esempio nello stimolare la migrazione cellulare e questo potrebbe essere dovuto ad una più stabile interazione di questa forma con un putativo recettore (Marchbanck *et al.*, 1998; Newton *et al.*, 2000). Inoltre in tale forma la proteina è in

grado di interagire con la principale mucina secreta MUC5AC e con il batterio patogeno *H. pylori*, come sarà descritto più dettagliatamente nei paragrafi successivi.

La maggior parte del TFF1 umano gastrico è presente in un complesso eterodimerico di 25 kDa (Newton *et al.*, 2000) che si ottiene mediante interazione della Cys58 con il residuo di Cys38 della proteina TFIZ1, conosciuta anche come gastrochina 2 (Westley *et al.*, 2005). Essa è una proteina secreta di 18,5 kDa, espressa nei normali tessuti gastrici, caratterizzata da un *brichos domain* (Menheniott *et al.*, 2012) (figura 1.6).

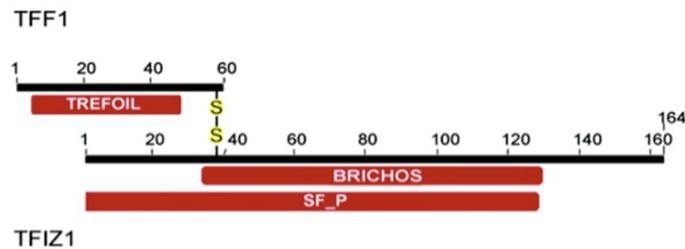


Figura 1.6 Eterodimero di TFF1-TFIZ1

La formazione dell'eterodimero TFF1:TFIZ1 sembra essere un evento critico per l'attività fisiologica di entrambe le proteine. Ad una minore espressione della proteina TFIZ1 corrisponde una maggiore espressione della proteina trifoglio come dimero e in tale forma TFF1 è noto stimolare la migrazione delle cellule tumorali. Alcune evidenze sperimentali suggeriscono che l'espressione di TFF1 in assenza del suo partner conferisca alle cellule tumorali un fenotipo maggiormente invasivo e che TFIZ1 potrebbe comportarsi essa stessa come soppressore tumorale: la perdita permanente della sua espressione in tumori gastrici umani supporta questa ipotesi (May *et al.*, 2009). Inoltre, è interessante notare che l'espressione di TFIZ1 è ridotta in seguito all'infezione da *H. pylori* (Resnick *et al.*, 2006) e ciò spiegherebbe il ruolo del batterio nella patogenesi tumorale. La perdita d'espressione della proteina, correlata alla prevalente formazione del dimero di TFF1, potrebbe inoltre facilitare la colonizzazione delle mucose gastriche da parte di *H. pylori* che utilizza come mediatore dell'adesione proprio la forma omodimerica della proteina trifoglio (Clyne *et al.*, 2004).

### 1.1.3 Siti di espressione dei TFF

Il sito deputato alla sintesi dei fattori trifoglio è rappresentato dalle cellule *goblet* che si ritrovano omogeneamente diffuse negli epitelii. Principale sito di espressione è il tratto gastrointestinale lungo il quale ciascun peptide trifoglio ha un caratteristico profilo di espressione. Lo stomaco è l'unico organo in cui sono presenti tutti i TFF: TFF1 e TFF3 si localizzano nelle cellule della mucosa gastrica superficiale, mentre TFF2 si ritrova essenzialmente nel duodeno prossimale (Hanby *et al.*, 1993; Kouznetsova *et al.*, 2004). TFF3 è inoltre espresso dalle cellule caliciformi dell'intestino tenue e crasso ed è stata riportata la presenza di TFF1 sui villi dell'ileo e del digiuno. I fattori trifoglio 1 e 3 sono anche espressi nelle vie aeree, soprattutto nel

primo tratto dell'albero respiratorio dalle cellule epiteliali della mucosa nasale umana (Lee *et al.*, 2001).

#### 1.1.4 Ruoli funzionali dei TFF

##### 1.1.4-a Protezione e rigenerazione delle mucose gastriche

Il tratto gastrointestinale deve costantemente confrontarsi con una variegata popolazione di agenti potenzialmente nocivi quali batteri, prodotti batterici, insulti meccanici e chimici che ne minano la stabilità. La barriera che protegge la mucosa gastrointestinale è costituita da un sistema dinamico multi-componente: i principali attuatori dei meccanismi di difesa sono rappresentati dall'aderente strato di gel mucoso e dall'epitelio gastrointestinale sottostante.

La prima linea di protezione è rappresentata dal gel mucoso, sostanza viscoelastica composta al 95% di acqua e al 3% di glicoproteine quali le mucine miscelate con circa il 2% di lipidi a basso peso molecolare, elettroliti, altre piccole molecole e proteine. Le mucine sono responsabili dell'idratazione, della viscoelasticità e delle proprietà muco-adesive e sono essenzialmente costituite da un dominio strutturale in cui il *core* proteico è ricco in treonina, serina e idrossiprolina rendendo possibile l'O-glicosilazione, una modifica post-traduzionale che le rende resistenti alla proteolisi e in grado di trattenere l'acqua, e quindi di formare un gel. Si distinguono mucine ancorate alla membrana (MUC1, MUC3, MUC4, MUC12, MUC13 e MUC17) che assumono un ruolo di recettori per le molecole che legano i carboidrati, e mucine secrete (MUC2, MUC5AC, MUC5B e MUC7) caratterizzate da regioni ricche in cisteina che partecipano alla formazione di legami intermolecolari generando una fitta rete di connessioni caratteristiche del gel mucoso (Johansson *et al.*, 2013). L'organizzazione dello strato di muco protettivo varia lungo tutto l'apparato digerente. La protezione dello stomaco rappresenta sicuramente una delle sfide più ardue per il muco, in quanto tale organo deve essere protetto dalle secrezioni acide, dagli enzimi digestivi, da farmaci e batteri quali *H. pylori*. Lo stomaco è dotato di un sistema di protezione che comprende due strati di muco: uno strato superficiale, meno stabile che viene rapidamente sostituito e potrebbe fungere da lubrificante ed uno più aderente costituito da una patina più spessa che funge da barriera protettiva relativamente più stabile (Atuma *et al.*, 2001) (figura 1.7).

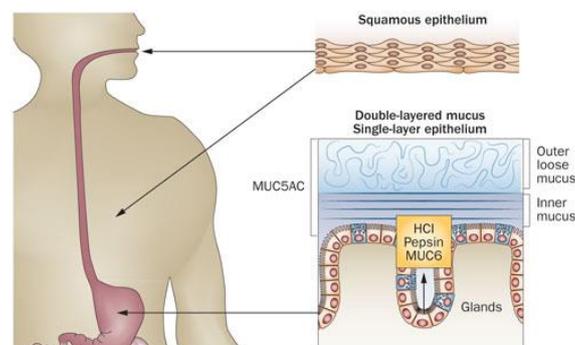


Figura 1.7. Schema dell'organizzazione dell'epitelio e del muco nello stomaco.

Per quel che riguarda la protezione dall'acidità intrinseca dell'ambiente, il muco agisce da punto di miscelazione tra l'eccesso di acido presente nel lume e il bicarbonato secreto dalla mucosa per proteggersi dal basso pH. Si crea quindi un gradiente stabile di pH da acido nel lume a quasi neutro in prossimità della superficie della mucosa.

Fattori primari nel determinare l'efficacia protettiva della barriera di muco sono lo spessore e le proprietà viscoelastiche dello strato di muco aderente. Mentre la compattezza del muco è il risultato di un equilibrio dinamico tra la sua secrezione e fenomeni di erosione meccanica e chimica, le proprietà viscoelastiche sono strettamente correlate alla qualità dei componenti del muco stesso.

È noto che i peptidi trifoglio sono co-espressi con le mucine e che in associazione ad esse conferiscono al gel mucoso tipiche proprietà chimico-fisiche: TFF2 ad esempio è coinvolto nella formazione di un muco molto viscoso e quindi ottimale per proteggere lo stomaco e il piccolo intestino; TFF3 collabora alla costituzione di un muco meno viscoso ma adatto alla rimozione di batteri e microparticelle nelle vie respiratorie e nell'intestino (Thim *et al.*, 2002). Probabilmente la peculiare espressione tissutale sia dei peptidi trifoglio che delle mucine dipende dalle caratteristiche di protezione di cui necessitano i diversi tratti dell'apparato gastrointestinale.

Parte integrante del muco dello stomaco è la mucina secreta MUC5AC che viene impacchettata nei granuli secretori con il peptide trifoglio TFF1 e con esso secreta sulla superficie mucosale. In un lavoro del 2005, si descrive la diretta interazione di tale mucina con la forma dimerica del peptide: il legame, non covalente, è influenzato positivamente dalla presenza di cationi divalenti, poiché entrambe le proteine presentano regioni ad elevata carica negativa (Ruchaud-Sparagano *et al.*, 2004). Numerose evidenze sperimentali provenienti sia da studi *in vitro* (Thim *et al.*, 2002) che in modelli animali (Lefbvre *et al.*, 1996) sostengono l'importante ruolo di TFF1 nella produzione e nella stabilizzazione delle mucine, nonché nel modulare le caratteristiche reologiche del gel mucoso, risultando quindi un elemento critico per il mantenimento dell'integrità del tratto gastrointestinale.

Al di sotto dello strato di muco vi è l'epitelio gastrointestinale, un singolo strato semi-permeabile di cellule, che rappresenta la seconda linea di difesa dell'apparato digerente. Nonostante la presenza di una valida prima barriera di protezione, essa va incontro a frequenti interruzioni della sua continuità che ne compromettono l'efficienza. Proprio il suo fondamentale ruolo protettivo, rende necessario un meccanismo di riparazione che sia rapido e coordinato qualora si producano condizioni che ne incrinino la stabilità.

Sono due i principali eventi che si manifestano in caso di perdita di continuità nella barriera epiteliale: il processo di **rigenerazione**, che comprende la proliferazione e la differenziazione delle cellule epiteliali, rifornendo l'epitelio degli elementi danneggiati, e il processo di **restituzione** che invece promuove la migrazione delle cellule epiteliali andando a colmare il sito della lesione a poche ore dall'insulto subito, limitando quindi i danni dovuti alla perdita di elettroliti e alla penetrazione di batteri e antigeni nei compartimenti sottostanti.

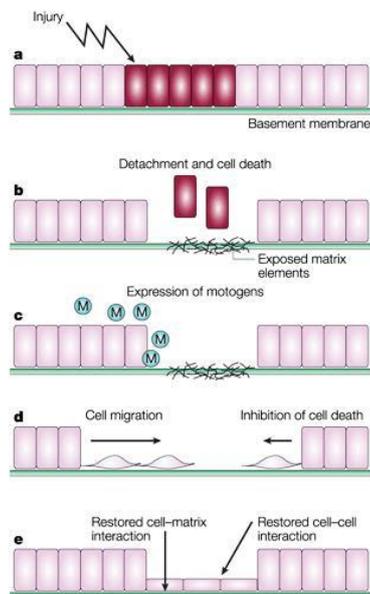
È proprio in tale contesto fisiologico che i peptidi trifoglio svolgono la loro azione biologica. Essi esercitano, infatti, una funzione di cosiddetta "sorveglianza luminale"

essendo secreti sulla superficie dell'epitelio gastrointestinale essi favoriscono il processo di restituzione. La loro struttura compatta, che li rende resistenti alle proteasi, consente loro di rimanere funzionali in un ambiente ostile come quello gastrico (Taupin & Poldosky, 2003).

Il processo di restituzione è costituito da step sequenziali: riduzione del contatto cellula-cellula e trasformazione della forma cellulare in un fenotipo migratorio; migrazione cellulare; re-polarizzazione e formazione di giunzioni basolaterali che determinano poi il ristabilirsi delle condizioni di normale continuità epiteliale attraverso la proliferazione cellulare e la ricostituzione di elementi specializzati (figura 1.8).

Il contributo dei TFF in tale processo è da attribuirsi alla loro capacità di modulare la migrazione cellulare, l'apoptosi e l'angiogenesi (Hoffman *et al.*, 2005).

I meccanismi mediante i quali i peptidi trifoglio attuano le loro funzioni nel processo di restituzione non sono ad oggi del tutto chiari. L'attività dei TFF si esplica sia a livello paracrino che autocrino. Per molti anni è stato ipotizzata la presenza di un recettore specifico per i TFF, in grado di mediarne l'attività. Ciononostante, ad oggi non sono stati identificati recettori canonici.



**Figura 1.8** Rappresentazione schematica del processo di restituzione in cui sono coinvolti i peptidi trifoglio.

#### 1.1.4-b Attività motogenica

La migrazione delle cellule epiteliali della mucosa è favorita da un'ampia gamma di citochine e fattori di crescita stromali ed epiteliali. Ad esempio, il fattore di crescita TGF- $\beta$  è un potente attivatore della chemiotassi, così come il fattore di crescita epatocitario HGF e il fattore di crescita dell'epidermide EGF sono potenti motogeni che esercitano i loro effetti su cellule normali e tumorali attraverso il legame al loro recettore. In tale contesto anche i peptidi trifoglio giocano un ruolo da protagonisti, avendo mostrato di velocizzare la migrazione delle cellule epiteliali in diversi modelli *in vitro* (Hoffman *et al.*, 2005), agendo sinergicamente con EGF.

In particolare, è stato dimostrato che la forma dimerica di TFF1 ha una maggiore attività motogenica paragonata al monomero (Dignass *et al.*, 1994) in cellule di carcinoma mammario MCF-7 (Prest *et al.*, 2002), ed in cellule epiteliali del colon HT29 (Marchbank *et al.*, 1998). Inoltre, somministrando a ratti con lesioni gastriche indotte da indometacina la forma omodimerica di TFF1 si è osservata una sensibile riduzione del danno (Marchbank *et al.*, 1998).

#### 1.1.4-c Attività anti-apoptotica e anti-proliferativa

La perdita di contatto cellulare, evento necessario per la migrazione cellulare, può causare un particolare tipo di morte cellulare programmata, definita *anoikis*. Un efficiente processo di riparazione che si attua mediante la migrazione cellulare deve quindi dar vita contemporaneamente ad un efficace meccanismo di sopravvivenza cellulare. Data la capacità dei TFF di stimolare la migrazione cellulare, è risultato logico attribuire ad essi anche un'attività di tipo anti-apoptotico. In particolare per TFF1 è emerso, da studi condotti su modelli cellulari, che è in grado di bloccare l'attività delle caspasi 3, 6, 8 e 9 (Bossenmeyer-Pourié *et al.*, 2002). Esse promuovono il rilascio del citocromo c dai mitocondri nel citoplasma, uno dei principali eventi che incrementa questo particolare tipo di apoptosi (Zhan *et al.*, 2004).

In contrasto con la sua attività anti-apoptotica, TFF1 ha mostrato di ridurre la proliferazione cellulare ritardando il passaggio dalla fase G<sub>1</sub> alla fase S del ciclo cellulare inducendo un aumento dei livelli di inibitori delle chinasi ciclina-dipendenti CDK (Bossenmeyer-Pourié *et al.*, 2002). Questa doppia e paradossale attività indica che TFF1 rappresenta un importante regolatore dell'equilibrio tra proliferazione cellulare, morte e differenziazione in un tessuto, come quello gastrointestinale, che ha un alto tasso di rinnovamento cellulare.

#### 1.1.4-d Attività pro-angiogenica

*In vitro* e *in vivo* i peptidi trifoglio hanno mostrato di partecipare ai processi di mantenimento dell'integrità della mucosa gastrointestinale. Agli importanti effetti descritti in precedenza, si aggiunge la loro capacità di comportarsi da fattori pro-angiogenici nelle normali cellule endoteliali, ad esempio durante lo sviluppo embrionale, per il quale la neo-vascolarizzazione è un evento cruciale (Rodrigues *et al.*, 2003).

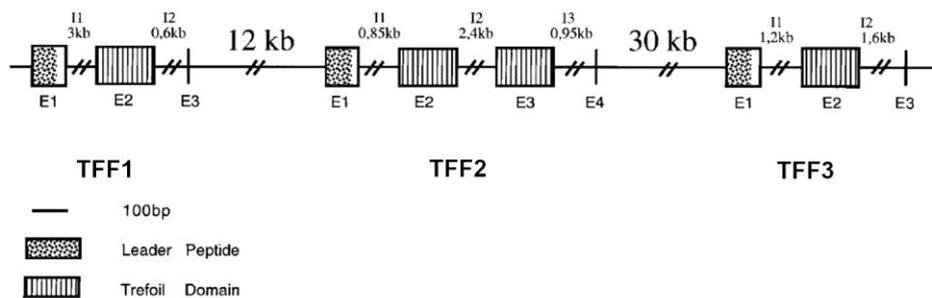
Quelli che possono considerarsi gli effetti benefici dei fattori trifoglio nella normale fisiologia del tratto gastrointestinale, si tramutano in effetti negativi in contesti patologici. Numerose evidenze sperimentali indicano una iper-espressione dei fattori trifoglio in patologie maligne a carico della mammella, della prostata, del pancreas e dello stomaco. In tale contesto, la capacità di promuovere la migrazione cellulare e la neo-vascolarizzazione favorirebbe la progressione neoplastica.

Durante i processi infiammatori cronici, l'angiogenesi e il rimodellamento vascolare sono controllati da numerosi attivatori angiogenici e mitogeni come i fattori di crescita vascolare endoteliali (VEGF), il fattore trasformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), la ciclo-ossigenasi di tipo 2 (COX-2) e agonisti del recettore del fattore di crescita dell'epidermide (EGF-R) come TGF- $\alpha$ . Dati sperimentali indicano che la cicloossigenasi 2 e il recettore EGF-R esercitano un ruolo critico nelle funzioni pro-

angiogeniche di TFF1 e questo sostiene l'ipotesi di un coinvolgimento di TFF1 nella progressione tumorale (Rodrigues *et al.*, 2003).

### 1.1.5 Regolazione dell'espressione genica dei fattori trifoglio

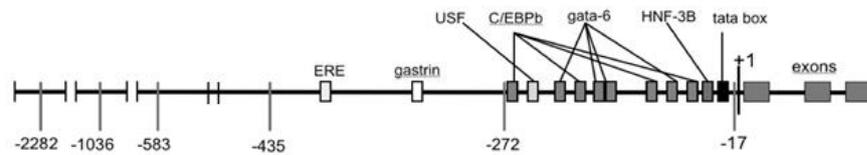
L'espressione dei fattori trifoglio è finemente regolata e consente una rapida risposta agli stimoli ambientali e ai danni a carico dell'apparato gastrointestinale. L'elevata somiglianza strutturale dei tre peptidi e l'alto grado di identità genica, lasciano ipotizzare che essi derivino da un unico gene ancestrale comune (Mashimo *et al.*, 1995). Questa ipotesi è avvalorata dal fatto che la sequenza genica dei tre peptidi trifoglio è localizzata sul cromosoma 21 umano (21q22.3) come unico *CONTIG* (Beck *et al.*, 1996) in una regione di 55 kb (figura 1.9).



**Figura 1.9** Regione del cromosoma umano 21q22.3 che codifica per i TFF umani. Le zone tratteggiate indicano le sequenze codificanti per il dominio trifoglio, mentre quelle a puntini le sequenze codificanti il peptide leader.

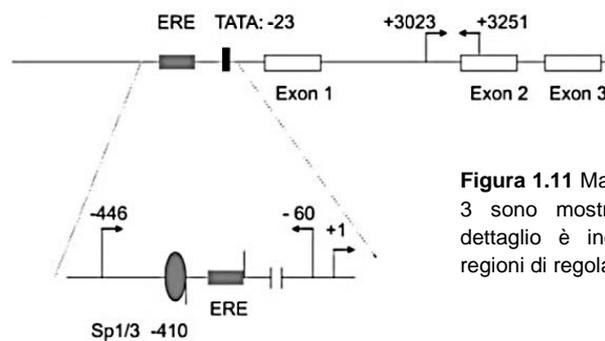
I regolatori dell'espressione dei fattori trifoglio, di origine sia chimica che proteica, sono numerosi. Innanzitutto gli stessi peptidi trifoglio sono in grado di modulare reciprocamente la loro espressione mediante fenomeni di **auto-induzione** e **induzione crociata** (Taupin *et al.*, 1999). Tale attività di induzione coinvolge i recettori del fattore di crescita dell'epidermide (EGF-R) ed è dipendente dalla via MAPK/Erk, portando all'attivazione della trascrizione attraverso il legame di elementi *in cis* presenti su ciascun promotore dei TFF (Giraud *et al.*, 2000).

Uno dei meccanismi di regolazione genica maggiormente caratterizzati riguarda il peptide trifoglio TFF1. Esso fu inizialmente individuato come gene sensibile agli estrogeni in cellule umane di carcinoma mammario MCF-7 (Masiakowsky *et al.*, 1982), suggerendo che l'attività del suo promotore potesse essere mediata da un elemento sensibile agli estrogeni (ERE). In seguito ad approfonditi studi è emerso che l'elemento ERE (figura 1.10) è presente sul promotore di TFF1 in una regione di 13 paia di basi (da -405 a -393) ed è caratterizzato da una sequenza palindromica imperfetta (5'-GGTCACGGTGGCC-3') che, discostandosi da quella consenso per un'unica mutazione puntiforme, è in grado di legare efficacemente il recettore degli estrogeni attivato e quindi stimolare la trascrizione genica (Berry *et al.*, 1989).



**Figura 1.10** Mappa del gene *tff1*. In evidenza sono mostrati gli elementi di regolazione della trascrizione a monte del sito di inizio della trascrizione (+1).

Studi recenti hanno inoltre identificato una sequenza di legame per Sp1 e Sp3 a monte dell'elemento ERE (figura 1.11) in cellule di carcinoma mammario MCF-7 (Sun *et al.*, 2005).



**Figura 1.11** Mappa del gene di *tff1*. Gli esoni 1-3 sono mostrati come rettangoli vuoti. In dettaglio è indicata la posizione di alcune regioni di regolazione.

Sp1 e Sp3 sono fattori di trascrizione espressi in tutte le cellule di mammifero in grado di promuovere o reprimere l'attività di promotori di geni coinvolti nel differenziamento, nella progressione del ciclo cellulare e nell'oncogenesi. Le sequenze di legame per Sp1 e Sp3 presentano più del 90% di omologia di sequenza quindi i due fattori di trascrizione riconoscono e legano il medesimo elemento, il sito di legame Sp1/3, con affinità paragonabile (Li *et al.*, 2010).

Alcune evidenze sperimentali indicano che mutazioni nel sito di legame a monte dell'elemento ERE impediscono il legame di Sp1 e Sp3 e riducono la capacità di risposta agli estrogeni. È stato dimostrato che il trattamento di cellule MCF-7 con estradiolo promuove l'associazione di uno di questi fattori, in prevalenza di Sp3, al suo sito di legame. Questo indica quindi che tali fattori di trascrizione contribuiscono alla risposta agli estrogeni del gene *tff1* (Li *et al.*, 2008).

Inoltre, da analisi condotte in assenza di stimolazione ormonale, è emerso che tali fattori di trascrizione sembrerebbero in grado di reclutare co-attivatori enzimatici, quali p300, e quindi, attraverso il rimodellamento della cromatina, contribuire al mantenimento del promotore di TFF1 in uno stato di disponibilità per rispondere prontamente agli eventi molecolari che si manifestano in seguito al legame degli estrogeni al loro recettore (Sun *et al.*, 2005).

Nonostante i recettori per gli estrogeni (ER  $\alpha$  e  $\beta$ ) siano espressi anche nello stomaco e nel duodeno, principali siti di espressione di TFF1, in tali distretti l'espressione del fattore trifoglio non è regolata dagli estrogeni.

Le citochine pro-infiammatorie rappresentano un altro importante elemento di regolazione. Studi *in vitro* hanno dimostrato che le citochine **IL-1 $\beta$**  e **IL-6** causano una

riduzione di espressione dei TFF e in particolare reprimono l'attività del promotore di TFF1 e la sua espressione in modo sinergico attraverso i fattori NF- $\kappa$ B e C/EBP $\beta$  (Dossinger *et al.*, 2002). Tali dati suggeriscono che l'aumento dell'infiammazione che accompagna le trasformazioni neoplastiche, e quindi l'elevata espressione di citochine pro-infiammatorie, potrebbe aggravare il danno alle mucose e indurre lo sviluppo di tumori gastrointestinali inibendo l'espressione dei TFF e di conseguenza diminuendo la loro attività di protezione delle mucose e di soppressori tumorali.

L'analisi dei geni dei fattori trifoglio ha consentito l'individuazione di sequenze consenso per il legame di numerosi fattori di trascrizione (Taupin&Podolsky, 2003). Tra questi, il fattore **HNF3** (Fattore nucleare epatico) essenziale per la formazione dell'endoderma dello stomaco che possiede una regione di legame sul promotore di tutti e tre i fattori trifoglio e in particolare ha mostrato di essere un forte attivatore della trascrizione di TFF1 (Beck *et al.*, 1999). La trascrizione dei peptidi trifoglio è inoltre indotta dalle proteine *zinc finger* appartenenti alla famiglia **GATA**, nello specifico GATA-6 e GATA-4, che esercitano il controllo sull'espressione dei geni dell'apparato gastrointestinale e respiratorio. È stato dimostrato l'effetto induttivo di GATA-6 nei confronti di TFF1 e TFF2 in linee cellulari tumorali gastriche (Al-Azzeh *et al.*, 2000). I promotori di tutti i fattori trifoglio presentano un sito di legame per i fattori **USF** (*Upstream Stimulatory Factor*) che, legandosi ad una regione sul promotore conosciuta come *E-box*, determinano un aumento della trascrizione dei TFF. Poiché questi fattori causano inibizione della crescita cellulare, l'attivazione di tali siti potrebbe contribuire all'effetto anti-proliferativo dei peptidi trifoglio (Bossenmeyer-Pourie *et al.*, 2002).

Altri importanti regolatori dell'espressione genica sono rappresentati dal **TGF- $\alpha$**  (ligando endogeno del recettore EGF) che determina induzione dell'espressione dei TFF nello stomaco e nel pancreas soprattutto nel corso di pancreatiti e durante i processi di rigenerazione delle mucose (Ebert *et al.*, 1999); la **gastrina**, l'ormone gastrico che controlla la secrezione di acido cloridrico (Khan *et al.*, 2003; Tu *et al.*, 2007) che attiva la trascrizione attraverso un meccanismo ERK-dipendente ma indipendente da EGF. È descritto che topi *knock-out* per la gastrina presentano bassi livelli di espressione per TFF1, e topi transgenici ipergastrinomici, al contrario, mostrano una regolazione positiva. Alcuni studi descrivono il coinvolgimento dei Peroxisome proliferator-activated receptor -  $\gamma$  nella regolazione trascrizionale di TFF1. **PPAR- $\gamma$**  è un importante fattore per la crescita e il differenziamento cellulare ed è coinvolto nella patogenesi di numerose malattie tra cui obesità, diabete, aterosclerosi e cancro (Shimada *et al.*, 2004). Inoltre, è stato dimostrato il coinvolgimento di alcuni neuropeptidi, quali la **somatostatina**, l'**acetilcolina** e i **VIP** (vasoactive intestinal polypeptide), nella regolazione dell'espressione di TFF1, indicando un possibile ruolo di TFF1 proprio come neuropeptide poiché si osserva la sua espressione in alcune zone del cervello e nelle cellule neuroendocrine gastrointestinali in associazione alla Cromogranina A (Ogata & Podolsky., 1997).

Lo **stress osmotico** causato dall'introduzione di cibo e acqua (Ludeking *et al.*, 1998) rappresenta un altro stimolo che induce l'espressione dei TFF.

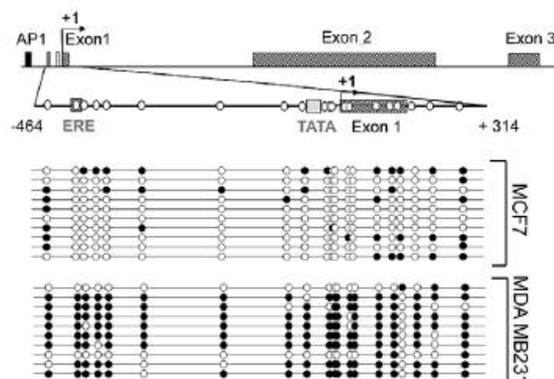
Inoltre, anche lo stato di **ipossia** dei tessuti altamente vascolarizzati dell'apparato gastrointestinale attraverso il fattore **HIF-1 $\alpha$** , i **raggi X**, l'**acido arachidonico**, gli **esteri del forbolo** e il **perossido di idrogeno** possono causare

alterazioni nell'espressione dei peptidi trifoglio (Emami *et al.*, 2004; Baus-Longar *et al.*, 2005).

Un altro importante meccanismo di regolazione dell'espressione genica che interessa i TFF è quello epigenetico. Sono considerate modifiche epigenetiche le modifiche istoniche e la metilazione delle cosiddette isole CpG presenti nella sequenza di DNA, che intervengono rendendo la cromatina più o meno accessibile. La metilazione del DNA nelle isole CpG rappresenta uno dei meccanismi di regolazione epigenetica più studiati poiché è coinvolto nella modulazione di numerosi geni nonché causa dello sviluppo di neoplasie.

I promotori dei geni dei TFF mostrano un profilo di metilazione tessuto-specifico che giustifica la loro differente espressione nel tratto gastro-intestinale in condizioni fisiologiche. In particolare, si osserva una totale (per TFF1 e TFF2) o parziale (per TFF3) demetilazione del promotore prossimale dei peptidi trifoglio nei tessuti in cui sono espressi; nei tessuti che invece non esprimono i TFF, i promotori di tali geni sono metilati (Ribieras *et al.*, 2001).

L'ipometilazione e l'ipermetilazione delle isole CpG è una caratteristica comune alle cellule cancerose, causando rispettivamente un'aberrante ed ectopica attivazione dell'espressione genica o il silenziamento. Come descritto in precedenza, il gene *tff1* è espresso nella linea di carcinoma mammario MCF-7 (ER $\alpha$  positive) e dall'analisi del suo promotore è emerso uno stato di ipometilazione dei dinucleotidi CpG (Martine *et al.*, 1997). Tali dinucleotidi risultano invece completamente metilati nella linea cellulare di carcinoma mammario MDA MB231 (ER $\alpha$  negative) provocando quindi il silenziamento del gene (figura 1.12). Queste osservazioni hanno spinto ad investigare la correlazione tra meccanismi di repressione genica mediati dalla metilazione e l'influenza della stimolazione ormonale su tali modifiche epigenetiche.



**Figura 1.12.** Profilo di metilazione dei siti CpG di *tff1* (sequenza da -464 a +314) nelle linee cellulari MCF-7 e MDA MB231. Questa regione contiene 20 dinucleotidi CpG, rappresentati da cerchi bianchi. È mostrato lo stato di metilazione di tali siti dedotto dall'analisi di sequenziamento con bisolfito di 10 cloni (ogni linea corrisponde ad una singola molecola di DNA stampo). I cerchi neri e bianchi rappresentano CpG rispettivamente metilate e non metilate.

È stata individuata una famiglia di proteine che (proteine MBD - *Methyl-CpG-binding domain protein*), legando i dinucleotidi CpG metilati, mediano il silenziamento

genico indotto da metilazione (Hendrich *et al.*, 1998). Da studi su cellule MCF-7 e MDA MB231, è emersa la relazione tra il recettore per gli estrogeni attivato ER $\alpha$  e la proteina MBD2. Quest'ultima si lega alla regione metilata in prossimità della TATA-box inducendo la repressione dell'espressione di *tff1*, lasciando libero il sito di legame sull'elemento ERE che può essere quindi occupato da ER $\alpha$  in cellule ad esso positive. Gli elevati livelli di ER $\alpha$ , dunque, sono in grado di superare, almeno parzialmente, il silenziamento genico indotto da MBD2 (Chatagnon *et al.*, 2010). Tali meccanismi di modulazione spiegano l'elevata espressione di TFF1 in cellule ER $\alpha$  positive anche in presenza di metilazione della regione in prossimità della TATA-box.

È interessante notare, inoltre, che nella regolazione trascrizionale mediata dagli estrogeni, si assiste ad un ciclico e dinamico cambio nello stato di metilazione/demetilazione del promotore, corrispondente ad un ciclico legame di attivatori e repressori, che consente la regolazione di *tff1* in cellule di carcinoma mammario (Kangaspeska *et al.*, 2008; Métivier *et al.*, 2010), indicando che la metilazione del DNA non è soltanto una modifica epigenetica stabile ma anche un componente integrale della trascrizione.

Dunque, in contesti patologici è possibile che si osservi un'alterazione dello schema di metilazione. Per quel che riguarda i peptidi trifoglio è stata osservata un'ipometilazione del promotore di TFF3 e TFF1 nel carcinoma epatocellulare e nel carcinoma dei dotti pancreatici (Vestergaard *et al.*, 2010), similmente a quanto accade a TFF2. Il fenomeno della carcinogenesi gastrica è invece accompagnato nella maggior parte dei casi da perdita dell'espressione di TFF1 causata in una elevata percentuale di casi dall'ipermetilazione *de novo* del suo promotore (Carvalho *et al.*, 2002). Recenti studi hanno inoltre dimostrato che anche l'infezione causata dal batterio *Helicobacter pylori* è in grado di indurre ipermetilazione del promotore di *tff1*, causando il silenziamento del gene. Da tali studi emerge però che l'ormone gastrina è in grado di ripristinare l'espressione di TFF1, inducendo modifiche epigenetiche, il che dimostra la reversibilità dell'effetto mediata dal batterio patogeno (Tomita *et al.*, 2011).

### 1.1.6 Ruolo dei peptidi trifoglio in patologie tumorali

Come sottolineato in precedenza, uno dei primi peptidi trifoglio caratterizzati, TFF1, fu individuato in un tessuto tumorale. Negli anni successivi la ricerca fu indirizzata alla comprensione della relazione tra peptidi trifoglio e tumori, evidenziando che la trasformazione neoplastica di diversi tessuti epiteliali è accompagnata da cambiamenti nell'espressione di tali peptidi. È stata osservata perdita di espressione di TFF1 in tumori gastrici accompagnata da perdita di differenziazione; lo stesso peptide risulta invece ectopicamente espresso nei tessuti tumorali di polmoni, pancreas, endometrio, ovaie, prostata, vescica ed esofago. In associazione a TFF3 è coinvolto nello sviluppo del carcinoma mucinoso della pelle e insieme a TFF2 è espresso nella metaplasia di Barret (Hanby *et al.*, 1994).

Nonostante le numerose prove a favore di una diretta correlazione tra sviluppo del cancro e alterata espressione dei peptidi trifoglio, il coinvolgimento di queste proteine nella tumorigenesi è rimasto poco chiaro per molto tempo. Nella letteratura corrente, i peptidi trifoglio sono presentati come geni soppressori tumorali e allo

stesso tempo come fattori di progressione neoplastica. Le ragioni di questa apparente contraddizione sono la conseguenza della complessa relazione tra le condizioni infiammatorie frequentemente osservate e l'attivazione oncogena di geni chiave coinvolti nella trasformazione cellulare e nella progressione tumorale.

#### 1.1.6-a / TFF e i tumori gastrici

Considerato il principale ruolo dei peptidi trifoglio nei processi di protezione e guarigione delle lesioni, è stato ovvio ipotizzare un loro coinvolgimento nei tumori maligni a carico dell'apparato gastrointestinale, poiché è noto che la mancata cicatrizzazione dei tessuti, quando conduce ad uno stato di infiammazione cronica, è un evento chiave nella tumorigenesi. In risposta ad insulti cronici a livello del tratto gastrointestinale, si assiste alla formazione di strutture ghiandolari denominate UACL (Ulcer Associated Cell Lineage) in cui si riscontra la produzione dei TFF nella regione superficiale dei dotti e della superficie cellulare.

La prima evidenza sperimentale riguardante il diretto coinvolgimento di un fattore trifoglio in una patologia neoplastica, fu prodotta dal gruppo di ricerca di Lefebvre il quale, mediante ricombinazione omologa, produsse un topo *knock-out* privo del gene codificante per TFF1 (*tff1* *-/-*) (Lefebvre *et al.*, 1996). I topi privati di tale gene mostrarono iperplasie dell'epitelio gastrico e, nel 30% dei casi, carcinomi intraepiteliali o intramucosali multifocali. L'assenza di TFF1 nei topi *tff1* *-/-* conduce ad una alterata espressione anche di TFF2 e TFF3 e questo si traduce in un anomalo differenziamento delle popolazioni cellulari che compongono la mucosa (Karam *et al.*, 2004), con conseguente alterata capacità di svolgere correttamente le funzioni specifiche del tessuto. Questi dati hanno consentito di identificare TFF1 come una proteina essenziale per il normale differenziamento della mucosa gastrica dell'antro e del piloro, e quindi di attribuire al peptide trifoglio il ruolo di *tumor-suppressor* specifico per il tessuto gastrico. È interessante notare che, nonostante l'elevata omologia di sequenza e la somiglianza strutturale, i topi *knock-out* per TFF2 e TFF3 non sviluppano cancro, indicando che tali peptidi non posseggono le caratteristiche di soppressori tumorali (Farell *et al.*, 2002; Mashimo *et al.*, 1996).

In seguito alla prima importante evidenza sperimentale, è stato scoperto che in circa il 16% dei tumori gastrici sono presenti mutazioni somatiche negli esoni 1 e 2 del gene *tff1*, tutte localizzate all'interno del dominio trifoglio, causando probabilmente una modifica strutturale che compromette la funzionalità della proteina come protettore della mucosa gastrica (Park *et al.*, 2000). A supporto di tali dati, quelli ottenuti negli anni successivi da pazienti con adenoma e carcinoma gastrici, indicano che le forme mutate di TFF1 conferiscono alle cellule gastriche proprietà a favore dello sviluppo tumorale (Yio *et al.*, 2006). Inoltre, la ridotta espressione di TFF1 in più del 50% dei tumori gastrici è causata dalla cosiddetta *loss of heterozygosity* (LOH), ossia perdita del secondo allele, e dalla metilazione del promotore di TFF1 (Carvalho *et al.*, 2002). A tal proposito, un'interessante punto di congiunzione tra il peptide TFF1 e il suo stato di metilazione è rappresentato dall'ormone gastrina, un regolatore positivo dell'espressione del peptide trifoglio.

È noto che topi iperesperimenti gastrina sono meno sensibili alla carcinogenesi indotta chimicamente mentre topi *knock-out* per la gastrina (GAS *-/-*) sviluppano tumori antrali probabilmente a seguito di ipocloridria e proliferazione batterica (Zavros

*et al.*, 2005). Alcuni suggeriscono che la tumorigenesi osservata potrebbe essere correlata alla repressione dell'espressione gastrica di TFF1, dovuta ad una sua mancata regolazione positiva da parte dell'ormone peptidico. Studi recenti indicano che la gastrina ha proprietà anti-tumorali, non solo perché media positivamente l'espressione della proteina trifoglio, ma anche perché reprime il silenziamento epigenetico del peptide che si manifesta nei processi tumorali (Tomita *et al.*, 2011).

#### 1.1.6-b TFF1 e il tumore al seno

Ogni anno più di 1,3 milioni di donne in tutto il mondo contrae il tumore al seno, rendendolo la seconda forma più comune di cancro, dopo il tumore ai polmoni.

Una sottoclasse di tumori al seno è rappresentata da quelli sensibili agli estrogeni. Per tali tipi di tumori, l'ablazione delle ghiandole endocrine provoca la remissione tumorale in circa il 30% delle donne in pre-menopausa e le terapie additive che prevedono l'utilizzo di anti-estrogeni e inibitori dell'aromatasi causano la remissione del tumore in 1/3 delle pazienti. La dipendenza dagli ormoni del cancro al seno ha indirizzato la ricerca verso l'individuazione dei geni regolati dagli estrogeni in cellule di carcinoma mammario, uno dei quali è proprio quello che codifica per la proteina TFF1 (Westley e Rocherfort, 1980; Masiakowsky *et al.*, 1982). Dalla sua scoperta ad oggi la funzione fisio-patologica di TFF1 nel contesto del tumore al seno, resta poco chiara, soprattutto a causa delle contrastanti evidenze sperimentali che non consentono di classificarlo come *tumor suppressor* o oncogene.

TFF1 è espresso nel 50% dei tumori al seno positivi al recettore degli estrogeni (ER+), una sottoclasse di tumori per i quali si ha una prognosi maggiormente positiva (Dunnwald *et al.*, 2007). È stato dimostrato che pazienti con ER<sup>+</sup>/TFF1<sup>+</sup> hanno una prognosi più favorevole rispetto ai pazienti con ER<sup>+</sup>/TFF1<sup>-</sup> (Rio *et al.*, 1987). La manipolazione genica, mediante test quali *gain of function* e *loss of function* effettuati su vari tipi cellulari di carcinoma mammario ER<sup>+</sup> e ER<sup>-</sup>, ha evidenziato che TFF1 non mostra attività pro-tumorale in tali linee cellulari e ha attività anti-tumorale in linee cellulari positive al recettore per gli estrogeni. Tali dati sono supportati da evidenze sperimentali ottenute da topi *knock-out* per TFF1 in cui, in seguito all'induzione del tumore con il carcinogeno DMBA, si osserva la formazione di tumori di dimensioni maggiori rispetto a topi controllo (Bauche *et al.*, 2011). Sebbene questi dati lascerebbero ipotizzare un effetto benefico di TFF1 nella progressione del carcinoma mammario Sebbene questi dati lascerebbero ipotizzare un effetto benefico di TFF1 nella progressione del carcinoma mammario in letteratura sono presenti altrettanti esempi di influenza negativa del peptide trifoglio nelle neoplasie.

Benché sia stata rivelata la presenza di TFF1 anche nelle cellule normali dei dotti mammari e nel latte umano (Madsen *et al.*, 2007; Vestergaard *et al.*, 2008), nei carcinomi mammari si osserva una sua iper-espressione, che ha suggerito una sua partecipazione alla progressione neoplastica. Questa idea è rafforzata dall'attività pro-invasiva e pro-angiogenica ampiamente caratterizzata della proteina trifoglio, nonostante non siano state chiarite del tutto le vie di trasduzione del segnale attivate da TFF1. Numerosi studi attribuiscono alla proteina trifoglio la capacità di promuovere la migrazione e la diffusione delle cellule tumorali, probabilmente attraverso un recettore non identificato presente sulla superficie cellulare, e gli attribuiscono proprietà chemiotattiche (Prest *et al.*, 2002; Amiry *et al.*, 2009). Inoltre, TFF1 è stato

associato al carcinoma mammario con metastasi ossee (Smid *et al.*, 2006). Questo implica che le cellule tumorali che esprimono TFF1 potrebbero avere un vantaggio selettivo a favore della loro diffusione ed invasione attraverso i tessuti circostanti. Tale vantaggio potrebbe spiegare la prevalenza di cellule tumorali che esprimono TFF1 rispetto alle cellule normali.

Il peptide trifoglio è stato proposto come *marker* per valutare la risposta endocrina nelle pazienti affette da tumore al seno, indicando quindi un suo coinvolgimento negli effetti che gli estrogeni hanno sulla progressione tumorale. L'efficacia della terapia anti-estrogenica potrebbe essere in parte dovuta alla riduzione dell'espressione di TFF1, a causa della sua mancata regolazione positiva da parte degli estrogeni, e quindi all'inibizione dell'attività di motogeno e agente pro-invasivo. Recentemente è stato proposto il potenziale utilizzo di molecole ad attività antagonista nei confronti di TFF1 come terapia adiuvante nel trattamento dei carcinomi mammari (Perry *et al.*, 2008).

Sebbene la rilevanza clinica dell'espressione di TFF1 nel tumore al seno, così come la sua regolazione da parte degli estrogeni, sia ormai nota, il suo significato biologico non è univoco. Pertanto, la sua funzione deve essere chiarita al fine di valutare i benefici e gli effetti collaterali derivanti da terapie che lo utilizzino come bersaglio farmacologico.

Nonostante gli importanti passi in avanti degli ultimi anni, molti aspetti della relazione tra cancro e TFF restano da chiarire. Alcuni sostengono fortemente il ruolo dei TFF come oncogeni a causa della loro capacità di promuovere la diffusione delle cellule tumorali gastriche e l'angiogenesi, di inibire l'apoptosi a favore della sopravvivenza delle cellule tumorali (Perry *et al.*, 2007) e, ad esempio, a causa di dati sperimentali che indicano che TFF1 agisce da promotore della tumorigenesi nel contesto di cancro del pancreas e della prostata consentendo alle lesioni precancerose di superare una barriera chiamata IOS (oncogene-induced senescence), un meccanismo di difesa il cui scopo è quello di limitare la proliferazione incontrollata (Radloff *et al.*, 2011).

Molto probabilmente sono in gioco delicati equilibri: i peptidi trifoglio sono coinvolti nella normale difesa mucosale e nella rapida risposta di riparazione contro i danni cellulari; tuttavia questa naturale funzione di sorveglianza potrebbe essere sovertita in seguito a fenomeni di iper-espressione dei peptidi trifoglio nelle cellule tumorali. Quindi, i peptidi potrebbero esercitare effetti benefici durante le prime fasi delle lesioni alle mucose e della conseguente infiammazione, ed effetti indesiderati nell'aggravarsi del processo infiammatorio e della progressione neoplastica.

### 1.1.7 TFF1 e il rame

#### 1.1.7-a *Il Rame: aspetti generali*

Il rame è un metallo di transizione essenziale per tutti gli organismi viventi. È necessario per la loro sopravvivenza e funge da cofattore catalitico per le proteine che intervengono in attività biologiche necessarie quali la respirazione, la protezione dallo stress ossidativo, la pigmentazione, la produzione di peptidi ormonali, la

coagulazione del sangue e la normale crescita cellulare (Puig *et al.*, 2002). È inoltre coinvolto nella funzionalità del sistema nervoso centrale.

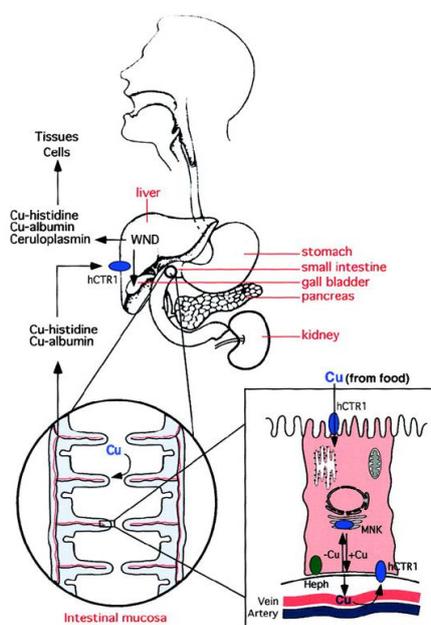
Il rame ha la possibilità di adottare due differenti stati redox: una forma ossidata ( $\text{Cu}^{2+}$ ) e una forma ridotta ( $\text{Cu}^{1+}$ ) e proprio questa capacità lo rende il cofattore ideale per l'ampio spettro di funzioni catalitiche svolte dai cuproenzimi. Le sue stesse potenzialità redox lo rendono, allo stesso tempo, nocivo per le cellule. Partecipa, infatti, alle reazioni che determinano la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), le quali possono avere effetti devastanti sulle cellule, a causa della loro capacità di danneggiare il DNA e ossidare proteine e lipidi (Halliwell *et al.*, 1990): la formazione delle specie ROS è uno dei fattori che maggiormente contribuisce allo sviluppo di diverse patologie quali cancro, disturbi del sistema nervoso centrale e invecchiamento. Per questo, le cellule hanno sviluppato specifici sistemi di acquisizione, deposito, trasporto e detossificazione del catione metallico e un sofisticato meccanismo che consente il corretto assemblamento delle metalloproteine. L'omeostasi del rame è coordinata da numerose proteine che assicurano il suo trasporto a specifici compartimenti subcellulari senza il rilascio di ioni di rame libero che potrebbero danneggiare le componenti cellulari.

Le proteine coinvolte nei meccanismi di omeostasi del rame posseggono caratteristiche peculiari dal punto di vista chimico consentendone l'interazione selettiva con il metallo. La preferenza dei metalli per specifici residui amminoacidici è guidata dalle regole generali della chimica di coordinazione dei metalli e può essere interpretata usando la teoria "hard and soft" degli acidi e delle basi: un atomo donatore "soft" preferirà il legame con uno ione metallico "soft", così come un donatore "hard" legherà con maggiore affinità un atomo di metallo "hard". Le caratteristiche hard/soft di uno ione metallico dipendono dal suo stato di ossidazione che quindi influenzerà la scelta del ligando. Nel caso specifico, il rame si ritrova coordinato con un'ampia gamma di ligandi tra cui lo zolfo, l'ossigeno e l'azoto e in alcuni casi il suo legame determina cambiamenti strutturali che possono modificare l'attività funzionale delle proteine. La chimica di coordinazione dei due ioni rame è diversa: lo ione rameoso  $\text{Cu}^{1+}$  preferisce come ligando lo zolfo che viene fornito da residui cisteinici e metioninici; mentre lo ione rameico  $\text{Cu}^{2+}$  lega preferenzialmente ligandi quali l'ossigeno o l'azoto, che possono essere forniti da residui di istidina, di glutammato ed aspartato (Bertini *et al.*, 2007). I complessi che ne derivano hanno un'elevata stabilità che dipende in parte dall'entropia favorevole che accompagna il rilascio di ligandi non chelanti, generalmente molecole di acqua, dalla sfera di coordinazione.

Le proteine che legano il rame possono essere suddivise in due grandi classi: quelle che utilizzano il metallo come cofattore e quelle che sono coinvolte nel traffico del metallo. Enzimi e proteine che utilizzano il rame come cofattore contengono siti ad alta affinità con un numero di coordinazione elevato che impedisce la perdita del metallo durante le reazioni redox. Le proteine che intervengono nel traffico cellulare del metallo, invece, dovendo promuovere il trasferimento del metallo da una proteina all'altra, hanno siti di legame a bassa affinità con un numero di coordinazione moderato, consentendogli quindi sia di legare il metallo sia di cederlo in condizioni appropriate (Rubino *et al.*, 2011).

In tale contesto, è importante considerare che la coordinazione può influenzare il potenziale di riduzione del metallo e questo è fondamentale soprattutto per i cuproenzimi poiché questa caratteristica è critica per la loro azione di catalizzatori in reazioni redox. Se l'ambiente di coordinazione è tale da rendere positivo il potenziale di riduzione, il metallo sarà presente nella forma  $\text{Cu}^{1+}$ ; viceversa un potenziale più negativo favorirà la forma  $\text{Cu}^{2+}$ . L'evento rischioso si verifica quando il centro metallico può essere ridotto da  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{1+}$  (ad esempio per intervento di acido ascorbico o glutazione) e poi ossidato a  $\text{Cu}^{2+}$  dall'ossigeno e dall'acqua ossigenata portando alla formazione di specie reattive dell'ossigeno, generando un ciclo di riduzione-ossidazione potenzialmente nocivo. I ligandi di coordinazione che favoriscono la forma  $\text{Cu}^{1+}$ , come i siti ricchi di zolfo ritrovati in molte proteine coinvolte nel traffico intracellulare del rame, possono quindi rendere più difficile l'ossidazione del loro centro metallico, proteggendo la cellula dall'instaurarsi di reazioni pericolose.

L'apporto giornaliero di rame introdotto con la dieta varia tra i 0,6 mg/die e i 1,6 mg/die, assumendo principalmente semi, cereali, legumi, frutta a guscio e carne. Il rame ingerito viene assorbito attraverso la mucosa delle cellule che rivestono lo stomaco, l'intestino tenue e principalmente da quelle del piccolo intestino. La regolazione dei livelli sistemici del rame ha luogo nel fegato che assorbe la maggior parte del rame che è entrato nel circolo portale ematico (figura 1.13).



**Figura 1.13** Schema rappresentativo dei meccanismi di assorbimento e distribuzione del rame nell'uomo.

Il rame incontra il primo trasportatore ad alta affinità la proteina hCtr1, sulla superficie apicale degli enterociti. Tutti i membri della famiglia delle *copper transport protein* sono caratterizzati da tre eliche transmembrana, una estremità amminotermine idrofila ricca in metionina, e da un certo numero di residui amminoacidici Cys/His all'estremità carbossiterminale rivolta verso il citoplasma.

hCtr1 lega preferenzialmente la forma ridotta del catione metallico ( $\text{Cu}^+$ ) e si pensa possa funzionare in modo coordinato con una reductasi, il cui compito è ridurre lo ione rameico in ione rameoso (Ohgami *et al.*, 2005). È nota la presenza di un secondo trasportatore non specifico localizzato sugli enterociti, la proteina DMT1 (*Divalent Metal transporter 1*) che oltre ad essere responsabile del trasporto ad alta affinità dello ione ferroso, può mediare l'ingresso del rame nella cellula (Gunshin *et al.*, 1997).

Attraversando gli enterociti, la maggior parte del rame è trasportato al trans-Golgi *network* (TGN), sito deputato alla formazione degli oloenzimi quali la tirosinasi, la lisil ossidasi e la ceruloplasmina.

Sulla base di studi termodinamici e cinetici condotti su proteine coinvolte nel traffico del rame, è stato ipotizzato che in condizioni fisiologiche, il rame in forma libera (cioè non complessato) non è tollerato dalla cellula. Diversi metallo-*chaperon* specifici traghettano il rame  $\text{Cu}^{1+}$  attraverso il citosol diretti verso specifiche proteine o compartimenti (Davis & O'Halloran, 2008). Gli *chaperon* conosciuti possono essere suddivisi in 3 gruppi: quelli che trasportano il rame alle ATPasi, quelli che consegnano il cofattore alla superossido dismutasi (SOD1) e quelli che lo traghettano ai mitocondri. Le proteine chaperone, che localizzano nel citosol e sulle membrane interne dei mitocondri, utilizzano principalmente il motivo CXXC per legare il rame.

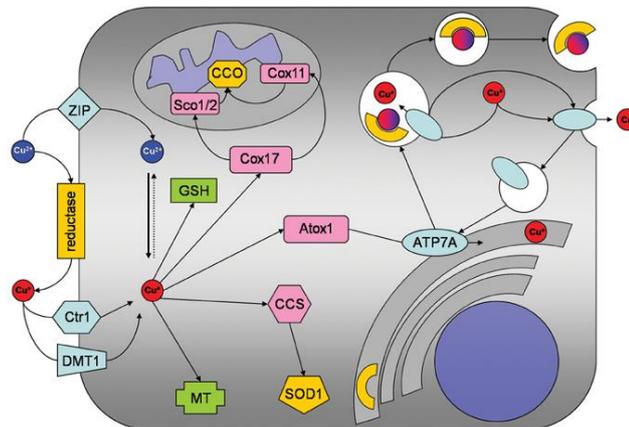
Il trasporto del rame dal citosol al *Trans Golgi Network* è mediato dallo *chaperon* Hah1/Atox1, una piccola proteina solubile che coordina un atomo di rame con la cisteina presente nel motivo conservato MxCxxC. Il rame è ceduto a due pompe ioniche transmembrana ATP7A E ATP7B, ATPasi di tipo P contenenti anch'esse più di un dominio di legame ai metalli (MBD) MxCxxC.

Il rame così trasportato nella via secretoria viene quindi incorporato nelle cuproproteine.

Non è noto il meccanismo con cui le proteine incorporano il metallo ma studi condotti sulla ceruloplasmina hanno permesso di acquisire informazioni mutate da altre proteine che legano il rame e che attraversano la via secretoria. La ceruloplasmina è una plasma-ferrossidasi che ha un ruolo essenziale nell'omeostasi del ferro nei mammiferi ed inoltre, raggiunto il sangue, rappresenta la maggior fonte di rame per gli altri tessuti. È sintetizzata negli epatociti e secreta nel plasma in seguito alla incorporazione di sei atomi di rame, processo che avviene nella via secretoria. Il rame non influenza la velocità di sintesi o di secrezione di questa ferrossidasi ma la mancata coordinazione con il metallo determina la formazione di un'apoproteina instabile e priva di attività enzimatica che sarà rapidamente degradata. È stato osservato che la ceruloplasmina è una proteina allosterica che attraversa la via secretoria in una conformazione già pronta per l'acquisizione del metallo che serve da modulatore omotropico facilitando la transizione della proteina verso la forma funzionale. Si ipotizza inoltre l'esistenza di un meccanismo indipendente dagli *chaperon* attraverso cui le proteine rame-dipendenti incorporano il metallo nella via secretoria (Hellman *et al.*, 2002).

Oltre a trasportare il metallo destinato all'incorporazione nei cuproenzimi, ATP7A e ATP7B regolano attentamente l'equilibrio tra l'assorbimento del rame e la sua escrezione. In risposta ad elevati livelli di rame intracellulare, le due ATPasi sono in grado di muoversi dalla membrana del TGN in prossimità della membrana

plasmatica o verso le vescicole simili ad endosomi (Mercer *et al.*, 2003). Gli ioni rameosi sono quindi allontanati dalla cellula direttamente attraverso la membrana plasmatica o mediante esocitosi (figura 1.14).



**Figura 1.14** Distribuzione del rame negli enterociti. Il rame entra nella cellula attraverso il trasportatore ad alta affinità hCtr1, localizzato sulla membrana basolaterale. Nel citosol il rame viene legato da chaperone e trasportatori che mediano il suo trasferimento ai diversi compartimenti

ATP7A media anche il trasporto del rame attraverso la membrana basolaterale degli enterociti nel sangue portale (e quindi agli altri tessuti), determinando quindi l'assorbimento del metallo nel corpo umano. L'ATP7B, invece, è responsabile della secrezione del metallo negli epatociti, ridistribuendosi nel compartimento citoplasmatico vescicolare localizzato in prossimità della membrana degli epatociti per eliminare il rame attraverso la bile.

Mutazioni o delezioni nel gene che codifica per la proteina ATP7A sono associate ad una malattia infantile letale, la malattia di Menkes, caratterizzata dall'accumulo di rame nelle cellule intestinali e dalla riduzione del rame trasportato al sangue ed agli altri tessuti: la mancanza di una efficiente distribuzione del metallo causa progressivo danneggiamento neurologico e morte. Le mutazioni a carico dell'altra pompa ionica di membrana, ATP7B, determinano la malattia autosomica recessiva di Wilson: si assiste ad un eccessivo accumulo di rame nel fegato corrispondente ad una sua ridotta secrezione biliare e ad una ridotta sintesi della olo-ceruloplasmina. È interessante notare che, mentre in un tessuto quale il cervelletto ATP7A e ATP7B possono compensarsi l'un l'altro, in altri distretti quali l'intestino, il cervello e i reni, all'inattivazione di ATP7A non corrisponde una maggiore attività di ATP7B anche quando i due trasportatori sono co-espressi nelle stesse cellule (Barnes *et al.*, 2009).

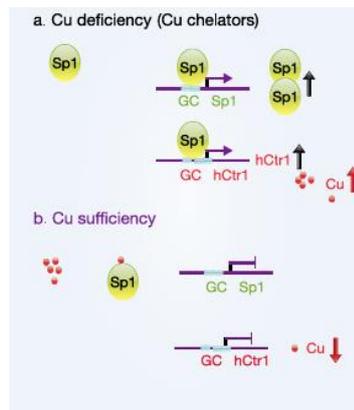
Le cellule eucariote utilizzano un secondo *chaperon*, denominato CCS, per il trasporto del cofattore metallico essenziale per l'attività della Cu/Zn superossido dismutasi (SOD1). Lo chaperon CCS è una proteina di 28 kDa comprendente 3 domini: il primo è considerato un omologo di Atx1 e contiene un motivo CXXC; il secondo ha elementi strutturali simili alla SOD1 e non è in grado di legare il rame; il

terzo dominio infine contiene un motivo CXC che è risultato essere critico per la sua attività. L'enzima è responsabile dell'importante processo di detossificazione dai radicali liberi e si localizza principalmente nel citosol e, una piccola porzione, sulla membrana mitocondriale interna. Normalmente l'espressione della Cu/Zn-SOD è costitutiva ma quando la disponibilità di rame si riduce e l'iperossia induce l'espressione di SOD, esso è uno dei primi enzimi a diventare inattivo (Levy *et al.*, 2001).

L'eccesso di rame cellulare può essere gestito attivando strategie diverse. Nella cellula la maggior parte del nuovo rame assorbito e quello in eccesso sono immediatamente legati al Glutatione (GSH) che può svolgere anche attività di chaperon molecolare veicolando il rame a Ctr1 sulla membrana plasmatica (Harris, 2000) oltre a cedere il metallo in eccesso alle metallothioneine. La metallothioneina è una piccola proteina di 53 amminoacidi contenente 20 residui di cisteina in grado di legare tra i 6 e gli 8 atomi di rame. È uno dei principali fattori coinvolti nei meccanismi di detossificazione da metalli pesanti e nel mantenimento dell'omeostasi del rame. Recentemente è stato ipotizzato che la metallothioneina ha la capacità di proteggere le cellule dall'esposizione ad agenti ossidanti ed elettrofili, che reagiscono prontamente con i gruppi sulfidrilici (Ruttkay-Nedecky *et al.*, 2013).

La complessità dei sistemi che intervengono nei processi di assorbimento, trasporto e secrezione del rame determina la necessità di disporre di un fine meccanismo di regolazione delle diverse componenti a livello trascrizionale e post-traduzionale.

Per quel che riguarda il principale trasportatore hCtr1 è stato recentemente dimostrato *in vitro* che la carenza di rame indotta dal trattamento cellulare con chelanti del metallo determina la regolazione positiva di hCtr1, mentre trattando le cellule con rame queste diminuiscono l'espressione della proteina endogena. Entrambi questi fenomeni sono regolati dal fattore di trascrizione Sp1 la cui espressione è a sua volta influenzata dai livelli di rame cellulari: si crea quindi un circolo di inter-regolazione che coinvolge il rame, Sp1 e hCtr1 (figura 1.15). La sensibilità ai livelli di rame del fattore di trascrizione Sp1 è da attribuirsi alla presenza di domini *zinc-finger* alla sua estremità carbossiterminale che è quindi usata come sensore (Kuo *et al.*, 2012). Sono stati descritti anche meccanismi di regolazione post-traduzionali: elevate concentrazioni di rame inducono lo spostamento di hCtr1 dalla membrana plasmatica agli endosomi o ai compartimenti lisosomiali, in cui hCtr1 può andare incontro a degradazione.



**Figura 1.15** Regolazione dell'espressione di hCtr1 e Sp1 mediata dalla disponibilità di rame. In carenza di rame si assiste ad un maggior legame di Sp1 al promotore del gene di hCtr1 e al proprio promotore (a); la presenza di rame impedisce il legame di Sp1 a quei promotori (b).

Altro importante meccanismo di regolazione coinvolge il fattore di trascrizione MTF-1 (*metal response element-binding transcription factor-1*), un modulatore dell'espressione delle metallotioneine e degli altri geni coinvolti nell'omeostasi dei metalli e nei meccanismi di risposta allo stress cellulare. L'attivazione delle metallotioneine promossa da MTF-1 è mediata da elementi di regolazione posti sul promotore del loro gene, denominati Elementi responsivi ai metalli (MRE). Tali elementi sono caratterizzati da corte sequenze nucleotidiche presenti in multipla copia nelle regioni del promotore di tutte le metallotioneine indotte da metalli (Selvaraj *et al.*, 2005).

#### 1.1.7-b Il coinvolgimento del rame nelle patologie

Il metabolismo del rame è alterato nel corso di infiammazioni, infezioni e tumori: si assiste ad un aumento dei livelli delle concentrazioni di rame e di ceruloplasmina. La sintesi della ceruloplasmina e la sua secrezione da parte degli epatociti sono stimolate dalle interleuchine IL-1 e IL-6. Il rame stesso è importante per la risposta immune, inclusa la produzione di IL-2 (Hopkins *et al.*, 1999).

I tessuti tumorali presentano concentrazioni di rame che sono spesso più elevate dei loro tessuti di origine, probabilmente perché lo ione metallico è essenziale nel processo di angiogenesi. Studi recenti dimostrano che limitando la disponibilità biologica di rame, utilizzando penicillamine e chelanti del rame quali tetratiomolibdato, la crescita tumorale rallenta probabilmente a causa dell'inibizione del processo di angiogenesi (Daniel *et al.*, 2005).

Un legame anormale dello ione rame alle proteine o perdita del controllo dei meccanismi di omeostasi possono causare importanti patologie, tra cui disordini neurodegenerativi.

Da molti anni è stata messa in luce la correlazione tra il rame e il morbo di Alzheimer, patologia invalidante caratterizzata dalla presenza di grovigli neurofibrillari, di placche senili e dalla deposizione di proteina  $\beta$ -amiloide, con perdita della funzionalità neuronale. In tale patologia sono stati evidenziati elevati livelli di rame, oltre che di zinco e di ferro. La proteina APP (precursore della proteina  $\beta$ -amiloide) contiene siti di legame per il rame ed è in grado di ridurre  $\text{Cu}^{2+}$  in  $\text{Cu}^{1+}$ . La successiva ri-ossidazione del rame in presenza di  $\text{H}_2\text{O}_2$  causa un danno ossidativo che porta alla

frammentazione di APP e potenzia l'aggregazione delle placche di proteina  $\beta$ -amiloide mediata dai radicali dell'ossigeno.

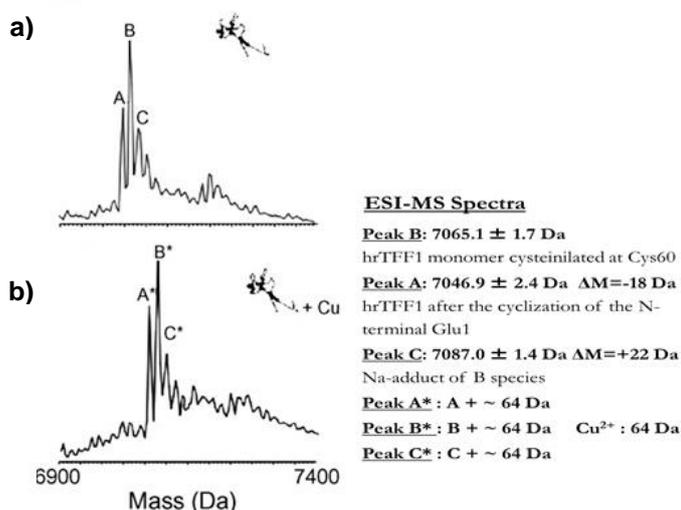
Recentemente è stato ipotizzato il coinvolgimento del rame anche nelle encefalopatie spongiformi. Le malattie dei prioni si generano dalla conversione conformazionale della proteina prionica di membrana (PrPC) in una isoforma patogena (PrPSc) che si accumula in particolare nelle sinapsi neuronali ed è resistente alla proteolisi. La PrPC ha attività di superossido dismutasi dipendente dal rame, con funzione neuro protettiva. Non è chiaro se l'interazione tra PrP e  $\text{Cu}^{2+}$  faciliti o inibisca la formazione dei prioni. Recenti ricerche suggeriscono che la perdita della normale funzione di PrPc potrebbe contribuire allo stress cellulare, aggravando la neurodegenerazione. Alcuni studi ipotizzano che carenze nutrizionali di rame comportino una maggiore espressione di questa proteina a livello cerebrale con conseguente aumentato rischio di sviluppare forme mutate della proteina (Gaggelli *et al.*, 2006).

Le basi molecolari di tutti i processi fin qui descritti sono comunque per alcuni aspetti poco chiare e la loro caratterizzazione necessita di ulteriori approfondimenti.

#### 1.1.7-c Il cuprocomplesso TFF1-rame

Il gruppo di ricerca presso il quale è stato volto il presente progetto di ricerca, effettuando studi sul metabolismo del rame in topi resi nutrizionalmente carenti (Marzullo *et al.*, 2004), ha evidenziato un'importante correlazione tra l'espressione di TFF1 e il metallo. Dagli studi di *gene-microarray* e *Real time-PCR* su tessuti intestinali di ratto Sprague-Dawley è emerso un incremento della trascrizione del gene codificante per il peptide trifoglio in risposta a bassi livelli di rame (Tosco *et al.*, 2010a). Data la prevalente localizzazione gastrointestinale del peptide TFF1, tale evidente regolazione positiva legata alla carenza di rame, non interpretabile per l'assenza di dati in letteratura, ha sollevato comprensibili interrogativi sul possibile ed inatteso coinvolgimento del TFF1 nel metabolismo del rame e/o, al contrario, dei livelli di rame sulle funzioni dei fattori trifoglio. Le informazioni strutturali disponibili sul peptide trifoglio hanno suggerito di studiare la possibile capacità di legame per il rame. La presenza altamente conservata di un gruppo di residui amminoacidici carichi negativamente, che circondano il residuo Cys58, all'estremità carbossiterminale (Glu-Glu-Glu-Cys-Glu-Phe), ha indotto ad ipotizzare il coinvolgimento di questa regione nella interazione con il rame.

Al fine di chiarire la possibile relazione tra TFF1 e il rame sono stati eseguiti esperimenti sia sulla proteina ricombinante in forma monomeric, prodotta in *Pichia pastoris*, sia sulla proteina nativa purificata da colture cellulari di carcinoma mammario MCF-7. I risultati ottenuti mediante tecniche cromatografiche quali l'IMAC, e tecniche di spettrometria di massa ESI-MS e SELDI, hanno permesso di verificare la selettività di legame del TFF1 *in vitro* per il rame e, in forma più ridotta, per gli ioni calcio (figura 1.16). Esperimenti di proteolisi limitata, supportati da studi di dicroismo circolare, hanno dimostrato che l'estremità carbossiterminale della proteina trifoglio è coinvolta nell'interazione con il rame (Tosco *et al.*, 2007). Da tali analisi è emerso inoltre che il rame induce cambiamenti conformazionali nella struttura terziaria della proteina, determinando una maggiore compattezza e una conseguente più elevata resistenza all'azione delle proteasi.



**Figura 1.16** Caratterizzazione dell'interazione tra rame e hrTFF1 mediante spettrometria di massa ESI-MS. Spettri deconvolti di hrTFF1 in assenza (a) e in presenza (b) di  $\text{Cu}^{2+}$ . Il pannello a) mostra il monomero di hrTFF1 con la Cys58 accoppiata ad una cisteina libera (picco B), hrTFF1 dopo la ciclizzazione del residuo di Glu1 all'N-terminale (picco A) e un addotto di hrTFF1 con il sodio (picco C). Il pannello b) mostra la presenza dei picchi A\*, B\* e C\* corrispondenti alle forme A, B e C con un incremento di circa 64 Da, indicando il legame con il rame.

Per confermare il coinvolgimento del cluster conservato di residui amminoacidici carichi negativamente presente all'estremità C-terminale della proteina, sono stati prodotti una serie di peptidi costituiti dagli ultimi 16 amminoacidi della coda terminale sintetizzati, mediante scansione con Alanina, con mutazioni puntiformi sui residui acidi e su Cys58. I dati ottenuti usando questi peptidi sintetici in esperimenti di quenching di fluorescenza, e l'analisi attraverso spettrometria di massa MALDI, hanno confermato che i residui di acido glutammico e il residuo di Cys58 sono essenziali per il legame al rame: per poter legare il metallo è necessaria e sufficiente la presenza della cisteina e di tre residui di acido glutammico, indipendentemente dalle loro posizioni (Tosco *et al.*, 2010b).

È stata inoltre valutata l'influenza esercitata dal rame sull'equilibrio tra forma monomeric e dimerica di TFF1 e come questo si ripercuota sull'attività motogenica della proteina, ben descritta in letteratura. Da studi eseguiti sia sui peptidi sintetici sia sulla proteina nativa, ottenuta dalla linea cellulare di cancro al seno MCF7 e dal clone di cellule goblet HT29-E12, selezionato dalla linea cellulare intestinale HT29, è emerso che il rame promuove la formazione della forma dimerica. Il rame inoltre influenza l'attività motogenica di TFF1, come mostrato da esperimenti di "wound healing" eseguiti sul clone cellulare inducibile AGS-AC1 proveniente da una linea cellulare di adenocarcinoma gastrico.

Altro interessante aspetto che negli ultimi anni ha catturato l'attenzione del gruppo di ricerca presso il quale ho svolto il mio lavoro di ricerca, riguarda l'influenza esercitata dal rame sull'interazione della proteina TFF1 in forma dimerica con il batterio patogeno *Helicobacter pylori*.

## 1.2 *Helicobacter pylori*

### 1.2 Caratteristiche generali

*Helicobacter pylori* è stato oggetto di una intensa indagine fin dalla sua cultura da una biopsia gastrica nel 1982. Fin dall'inizio, questo batterio gram-negativo ha suscitato l'interesse di microbiologi, gastroenterologi, epidemiologi, patologi e ricercatori farmaceutici. La possibilità che un batterio potesse causare gastriti, ulcera peptica, e, nel tempo, il cancro è stata un'ipotesi difficile da far accettare. Per convincere i colleghi e il pubblico, Barry Marshall bevve una sospensione del batterio e dimostrò, basandosi sui postulati di Koch, che *H. pylori* è l'agente eziologico di molte malattie gastriche. Tale coraggiosa dimostrazione gli valse l'assegnazione nel 2005 del Premio Nobel per la medicina, condiviso con il collega Warren, per le importanti conseguenze che la loro scoperta ha apportato in campo scientifico e clinico.

Il patologo italiano Giulio Bizzozero già nel 1892 aveva osservato per la prima volta la presenza di batteri spiraliformi nello stomaco di cani ma il batterio fu classificato correttamente nel genere *Helicobacter* soltanto nel 1989.

*Helicobacter pylori* è un batterio gram-negativo con forma ad S (da 1 a 3 giri), 0.5 x 5 µm di lunghezza, con un ciuffetto unipolare di flagelli (da 5 a 7) che conferisce una grande motilità. È un microaerofilo e la sua crescita in coltura richiede un mezzo arricchito, un'atmosfera povera di ossigeno e una temperatura ottimale di 37 °C. In comune con molti altri batteri spiraliformi, membri del genere *Helicobacter*, ha la caratteristica di formare cellule coccoidi man mano che invecchia. Dopo 7-8 giorni di coltura batterica le cellule coccoidi dominano, e questo è associato ad una diminuzione drammatica della coltivabilità.

#### 1.2.1 Epidemiologia dell'infezione

L'infezione da *H. pylori* è ubiquitaria e interessa sia gli uomini che le donne. Nonostante sia diffusa in tutto il mondo, la prevalenza dell'infezione varia largamente in base all'area geografica, l'età, la razza e le condizioni socio-economiche. In generale si assiste ad una maggiore diffusione dell'infezione in paesi in via di sviluppo: è durante l'infanzia che generalmente avviene la prima infezione.

Possibili vie di infezione includono sia la via orale-orale che oro-fecale, la diffusione iatrogena con l'uso accidentale di sonde gastriche non sterili ed endoscopi, e può essere inoltre facilitata dalle mosche. Il microorganismo è stato ritrovato in alcuni gatti domestici e nei primati non umani, ma le opportunità di interazione umana con quest'ultimo sono rare, rendendo l'infezione da questa fonte una possibilità improbabile. L'unico serbatoio significativo di infezione sembra essere l'uomo. La famiglia è l'unità centrale di trasmissione del batterio patogeno. Spesso i bambini sono infettati da un ceppo con un'impronta genetica identica a quella di uno dei genitori. Quindi, la trasmissione è probabile che sia più frequente all'interno della

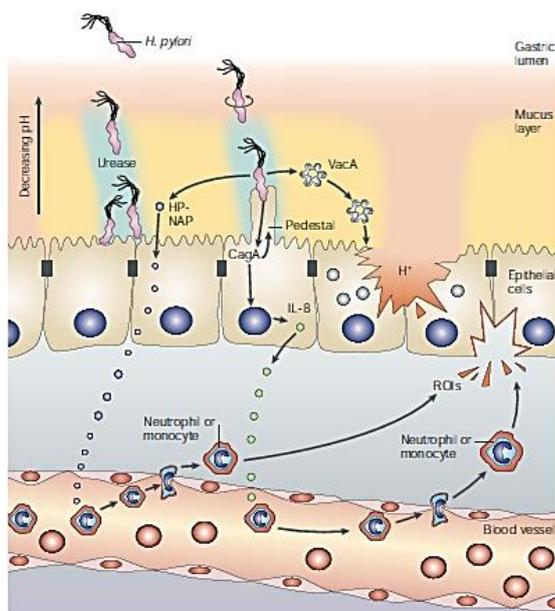
famiglia o tra bambini all'interno di una comunità. Una volta che l'infezione è stabilita, la successiva infezione da altri ceppi di *H. pylori* sembra essere rara (Covacci *et al.*, 1999).

Poiché il microorganismo ha la propensione ad acquisire una forma coccoide, questa può rappresentare una forma persistente in cui il batterio può resistere nell'ambiente in condizioni proibitive per il suo sviluppo ma deve ancora essere dimostrato che possa tornare ad una forma replicativa qual ora dovessero presentarsi condizioni permissive.

### 1.2.2 Fattori coinvolti nella colonizzazione, adesione e sopravvivenza

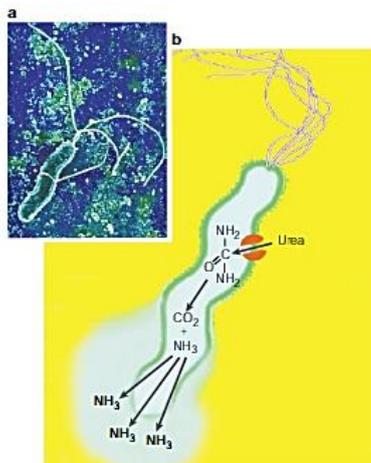
*Helicobacter pylori* è specializzato nella colonizzazione dello stomaco umano, una nicchia ecologica unica caratterizzata da un pH molto acido, una condizione letale per la maggior parte dei microbi. *H. pylori* si è così ben adattato a questo ambiente ostile che, avvenuta la prima infezione, che di solito si verifica nell'infanzia, stabilisce una infezione cronica che persiste per decenni se non per tutta la vita dell'individuo. La comparazione di ceppi di *H. pylori* isolati da pazienti di differenti origini etniche e geografiche lascia ipotizzare che *Helicobacter* abbia colonizzato lo stomaco dell'uomo già 100.000 anni fa, prima dell'inizio delle migrazioni umane e che si sia co-evoluto con esso (Covacci *et al.*, 1999).

La maggior parte delle persone infettate non presenta sintomi e l'infiammazione causata dal batterio è rilevabile solo in seguito a biopsie. Una minoranza di persone infettate (15-20%) durante la loro vita sviluppano importanti patologie gastroduodenali quali ulcere, adenocarcinomi e linfomi dello stomaco. Il differente progredire dell'infezione è determinato dalla risposta dell'organismo umano e da fattori ambientali (Go MF, 1997). Dal punto di vista del batterio patogeno esso riesce a colonizzare efficacemente lo stomaco umano utilizzando una combinazione di fattori che rispondo alle differenti sfide fornitegli dall'ambiente ostile (figura 1.17).



**Figura 1.17** Rappresentazione schematica della mucosa dello stomaco colonizzata da *H. pylori*. Sono mostrati i principali fattori di virulenza coinvolti nella colonizzazione e nelle malattie derivanti.

Innanzitutto per poter colonizzare il tratto gastroenterico, il batterio deve poter sopravvivere nel lume acido dello stomaco. *Helicobacter pylori* è fornito di numerosi geni, tra cui UreA e UreB, che codificano per l'ureasi, un enzima contenente  $\text{Ni}^{2+}$ , che idrolizza l'urea in ammoniaca e anidride carbonica. L'urea è assorbita dal batterio mediante un canale protonico, sensibile alle variazioni di pH dell'ambiente circostante, e l'ammoniaca che si genera dalla sua idrolisi serve a tamponare il citosol e il periplasma e creare uno strato a pH neutro intorno alla superficie del batterio (figura 1.18).



**Figura 1.18** *Helicobacter pylori*. a) Fotografia del batterio ottenuta con microscopio elettronico b) rappresentazione del batterio che mostra la forma, i flagelli polari, il canale per l'urea. La produzione di ammoniaca consente di neutralizzare l'ambiente acido (in giallo) creando un ambiente neutro (in azzurro) nei dintorni del batterio.

L'ammoniaca prodotta è potenzialmente tossica per le cellule ospiti ma la circolazione dei fluidi extracellulari determina la rapida diluizione della molecola prodotta creando un gradiente di concentrazione dalla superficie del batterio al fluido che circonda le cellule ospiti.

L'ureasi è un fattore di virulenza essenziale in quanto è stato dimostrato che batteri mutanti che non producono l'enzima non sono in grado di colonizzare lo stomaco (Eaton *et al.*, 1991).

Nonostante la capacità del batterio di modificare il pH dell'ambiente circostante, esso non è un batterio acidofilo e ha bisogno di lasciare il lume gastrico, anche per evitare di essere rimosso in direzione dell'intestino, in direzione dello strato di muco che ricopre gli epitelii gastrici.

In suo soccorso, intervengono i flagelli di cui è dotato, organelli di superficie lunghi fino a  $15 \mu\text{m}$ , che consentono al batterio di muoversi in direzione di ambienti permissivi per la crescita e la sopravvivenza. Il movimento dei flagelli richiede un dispendio di energia che è fornito, sotto forma di protoni, dall'idrolisi dell'urea operata dall'ureasi.

Il gel mucoso che ricopre gli epitelii è prodotto dalle cellule della mucosa che secernono granuli contenenti proteine altamente glicosilate, quali le mucine, che conferiscono al muco caratteristiche fisiche di fluido viscoelastico e idrogel. Come il batterio riesca ad attraversare la barriera mucosa non è del tutto noto. Opinione diffusa è che *H. pylori*, utilizzando i suoi flagelli, si faccia strada attraverso il gel mucoso come un cavatappi. (Montecucco *et al.*, 2001; Yoshijama *et al.*, 2000). In tal

modo il batterio penetra il muco e si posiziona in prossimità della membrana apicale delle cellule epiteliali dove è protetto dai movimenti peristaltici e dal *turn-over* dello strato di muco labile. Alcuni propongono che il batterio riesca ad attraversare lo strato mucoso modulandone le caratteristiche reologiche: l'aumento di pH, generato dall'ammoniaca, renderebbe il gel mucoso meno viscoso e quindi facilmente penetrabile (Bansil *et al.*, 2013).

È interessante notare che solo una parte del batterio colonizza direttamente le cellule epiteliali: la maggior parte vive nello strato di muco sulla superficie della mucosa gastrica dove è legato fortemente alle mucine glicosilate. È ormai noto che il batterio patogeno co-localizza e lega la principale mucina secreta MUC5AC (Van den Brinck *et al.*, 2000). Numerose evidenze sperimentali mostrano che, nel corso dell'infezione da *H. pylori*, nelle lesioni precancerose e nel cancro, si manifesta un cambiamento nell'espressione, nella glicosilazione e nella distribuzione spaziale delle mucine così come le mucine stesse sono in grado di variare l'espressione dei geni del batterio necessari per la colonizzazione e l'adesione, indicando una modulazione dinamica tra l'organismo ospite e il microorganismo (Skoog *et al.*, 2012).

Il batterio patogeno aderisce fortemente alle cellule gastriche e il legame è mediato da alcune proteine e glicolipidi. Sulla membrana esterna di *H. pylori* sono presenti alcune proteine in grado di mediare l'adesione alle cellule. Tra queste la proteina BabA che riconosce l'antigene di Lewis di tipo B, la proteina lectina che lega i residui di acido sialico della laminina e i lipopolisaccaridi. I lipopolisaccaridi sono uno dei principali componenti della membrana esterna dei batteri gram negativi e rappresentano un importante fattore di virulenza. Sono costituiti da tre parti: il lipide A che è incorporato nella membrana esterna, conosciuto anche come esotossina poiché è in grado di provocare violente risposte immunitarie nell'uomo; legato al lipide A vi è il core oligosaccaridico e infine l'antigene O rappresenta l'estrema regione degli LPS. Quest'ultima porzione contribuisce per molti aspetti alla virulenza del batterio poiché è in grado di incorporare l'antigene di Lewis mimando quindi le strutture di carboidrati presenti sulle cellule epiteliali umane e sui globuli rossi, apparendo come "self" al sistema immunitario. La quantità di antigene di Lewis e la sua collocazione sulla catena polisaccaridica variano al variare del ceppo di *H. pylori*: probabilmente questa variabilità consente un migliore adattamento del patogeno all'ospite, consentendo di stabilire un'infezione cronica (Hug *et al.*, 2010).

La più grande sfida per un batterio patogeno è proprio quella di evitare la sua eliminazione da parte del sistema immunitario. La persistenza nel tempo dell'infezione di *H. pylori* indica che il batterio ha sviluppato un ottimo meccanismo di difesa, sebbene vi siano casi documentati di colonizzazione transiente (Perez *et al.*, 2003). Innanzitutto il batterio sopravvive senza invadere i tessuti, risiedendo nel lume gastrico al di là della portata della maggior parte dei sistemi di ricognizione immunitaria. In ogni caso alcune cellule batteriche oltrepassano la barriera e attivano i sistemi di difesa innata e acquisita. Il sistema immune innato per i microorganismi coinvolge il recettore *Toll-like* (TLR) ma esso non è stimolato dai flagelli del batterio, così come accade per gli altri microorganismi, e non riconosce il DNA altamente metilato di *H. pylori*. Per quel che riguarda il sistema immunitario acquisito, *Helicobacter pylori* interferisce sia con l'*uptake* che con il processamento dell'antigene, probabilmente grazie a VacA (Blaser *et al.*, 2004).

Nonostante i sofisticati meccanismi messi in atto dal batterio patogeno, si genera comunque una sostanziale attivazione del sistema immunitario che si manifesta con una continua attivazione dei segnali per le citochine e con l'infiltrazione della mucosa di neutrofili, macrofagi e linfociti, eventi molto più pronunciati nella colonizzazione di ceppi *cagA*<sup>+</sup>. La risposta immunitaria acquisita è caratterizzata dalla produzione di anticorpi e cellule effettrici T che includono le componenti Th1 e Th2 con una prevalenza, nel caso specifico, di Th1. Tale particolare attivazione è insolita poiché i batteri patogeni attivano generalmente una risposta di tipo Th2. La maggiore presenza della componente Th1 genera una risposta maggiormente infiammatoria.

### 1.2.3 Fattori di virulenza

I batteri gram negativi hanno elaborato un sistema di secrezione di tossine che consente di iniettare direttamente le molecole batteriche nella cellula ospite. *Helicobacter pylori* dispone di un sistema di secrezione di tipo IV.

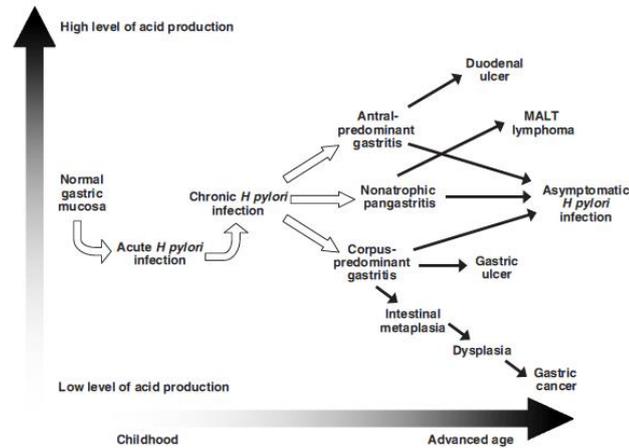
Nel 1989 fu identificato il gene *cagA* in uno specifico *strain* di *H. pylori* che aveva mostrato di conferire un maggior rischio per l'ospite di sviluppare ulcera peptica e cancro gastrico. *cagA* è un marker della cosiddetta "isola di patogenicità": tale isola contiene i geni che codificano per il sistema di secrezione di tipo IV che determina la formazione di una struttura simile ad un pilo che partendo dalla cellula batterica si inserisce come un ago nelle membrane degli enterociti, consentendo la secrezione della proteina CagA. La secrezione di questa proteina determina l'attivazione di una specifica via di trasduzione del segnale che influenza la migrazione, l'adesione delle cellule epiteliali e la loro proliferazione. È stato visto che in assenza dell'isola *cagA* il batterio ha una minore capacità di interagire con le cellule di adenocarcinoma gastrico AGS (Guillemin *et al.*, 2002) e inoltre tale isola promuove il *pathway* anti-apoptotico, determinando quindi un più lento turnover delle cellule sulle quali il batterio è adeso.

A differenza di CagA che non è presente in tutti i ceppi di *Helicobacter pylori*, la proteina VacA è conservata in tutti i ceppi, sebbene esistano numerosi polimorfismi. Essa è una proteina multimerica ad elevato peso molecolare in grado di formare pori nella cellula ospite causando una massiva vacuolizzazione. La formazione dei pori consente la fuoriuscita di anioni e urea. VacA inoltre induce l'allentamento delle giunzioni cellulari, consentendo ai nutrienti di attraversare la barriera mucosale. I ceppi di *H. pylori* hanno differenti forme di *vacA* e la persistenza di distinti polimorfismi nella popolazione umana implica che ciascuno di essi offre dei vantaggi per la sopravvivenza del batterio. Una particolare forma di VacA può potenzialmente indurre differenti livelli di interazione batterio-ospite.

### 1.2.4 Effetti cronici di *Helicobacter pylori* nell'epitelio gastrico

È oggi riconosciuto che *H. pylori* interviene nella patogenesi di gastriti, ulcere gastriche, adenocarcinoma gastrico e linfoma gastrico MALT-oma. Il batterio patogeno è presente nello stomaco di circa la metà della popolazione mondiale ma solo una piccola percentuale di individui infettati da *Helicobacter pylori* sviluppa malattie del tratto gastrointestinale, indicando che la presenza del batterio nello

stomaco umano di per sé non implica lo sviluppo di patologie ma è necessario il coinvolgimento di altri fattori (figura 1.19).



**Figura 1.19** Sviluppo delle principali patologie gastriche associate all'infezione da *H. pylori* in relazione alla produzione di secrezioni acide e all'età degli individui.

Gli effetti di *H. pylori* sulla fisiologia della mucosa gastrica sono complessi. La presenza del batterio induce una infiammazione cronica della mucosa tramite il rilascio di chemochine e citochine. Questa risposta immunitaria non è in grado di eradicare il batterio ma anzi aggrava lo stato infiammatorio causato dall'intensiva attivazione di neutrofili, linfociti e plasmacellule: il microorganismo sconvolge l'integrità della membrana danneggiando la mucosa gastrica.

Il batterio, inoltre, agisce elevando i livelli di gastrina, il peptide ormonale che regola fisiologicamente la secrezione acida gastrica, probabilmente in un meccanismo di regolazione che coinvolge un altro peptide, la somatostatina. Il ruolo della somatostatina è quello di funzionare da regolatore della secrezione di gastrina e nel contesto dell'infezione risulta up-regolata o poco espressa in base alla gravità e alla distribuzione dell'infezione (Makola *et al.*, 2008).

Tra le patologie correlate alla presenza di *Helicobacter pylori*, sicuramente quella più grave è rappresentata dal cancro gastrico, considerato uno dei tumori più letali per l'uomo.

Il cancro gastrico è una malattia ad eziologia multifattoriale che coinvolge elementi genetici, fattori alimentari e naturalmente l'infezione da *H. pylori*. In base alla cosiddetta "cascata di Correa", il meccanismo con cui si instaura il cancro prevede la lenta progressione del danno gastrico: da gastrite cronica superficiale a gastrite cronica atrofica attiva, da metaplasia intestinale a displasia. In alcuni individui il processo patologico continuerà a causa di ulteriori modifiche genomiche e fenotipiche, portando al conseguente cancro gastrico. *Helicobacter pylori* si colloca all'inizio di questa cascata di eventi (figura 1.20).

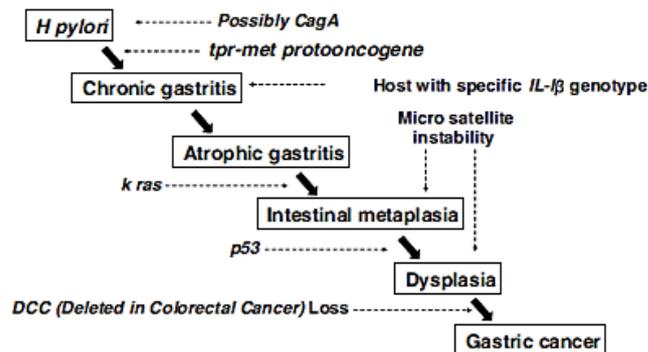


Figura 1.20 L'infezione da *H. pylori* e il cancro gastrico: la cascata di Correa.

La carcinogenesi gastrica indotta dal batterio patogeno diviene un evento più probabile quando l'interazione tra il microorganismo e il suo ospite è maggiormente attiva, quando l'infiammazione è più intensa e quando le cellule epiteliali risultano più danneggiate. Questo spiega come mai ceppi di *Helicobacter pylori* positivi per *cagA* inducano maggiore infiammazione (Peek *et al.*, 2002). Studi *in vitro* mostrano che alcuni geni presenti nell'isola di patogenicità sono richiesti per il rilascio indotto di citochine pro-infiammatorie quali IL-8. L'inattivazione di tali geni determina una diminuzione dell'attività di NF-κB e della via di trasduzione del segnale MAPK (Glocker *et al.*, 1998). Queste osservazioni *in vitro* rispecchiano gli eventi *in vivo*.

Inoltre, il fenomeno della carcinogenesi richiede il danneggiamento del DNA che può essere indotto dai prodotti di *H. pylori* in modo diretto, o indirettamente dal rilascio di radicali liberi causato dai neutrofili. L'acido ascorbico gastrico, in grado di neutralizzare i radicali liberi, è ridotto nello stomaco positivo al batterio patogeno ed inoltre *H. pylori* si è dimostrato in grado di interferire con i meccanismi di riparazione dei *mismatch* (Kim *et al.*, 2002).

A causa della grande varietà genetica di *Helicobacter pylori* e degli individui umani, è stato difficile definire i fattori che determinano il massimo grado di infezione e le conseguenti patologie. È disponibile una vasta quantità di informazioni riguardanti i fattori genetici e di virulenza, ma le relazioni tra essi non sono ancora tanto chiare da poter guidare i clinici verso la scelta della corretta terapia da seguire.

### 1.2.5 Strategie di eradicazione di *Helicobacter pylori*

L'infezione da *Helicobacter pylori* è una delle più comuni infezioni al mondo e il batterio, a causa del suo coinvolgimento nella progressione del tumore gastrico, è stato classificato come agente carcinogeno di tipo I. Per tali motivi si è ritenuto necessario sviluppare efficaci strategie di eradicazione del batterio patogeno. Un valido trattamento prevede l'utilizzo contemporaneo o sequenziale di 3-4 farmaci. Tra questi sono necessari: molecole in grado di inibire la secrezione gastrica quindi un inibitore della pompa protonica; antibiotici quali amoxicillina, claritromicina, tetracicline; chemioterapici quali metronidazolo; sali di bismuto. L'efficacia dei vari schemi di trattamento dipende dalla sensibilità dello specifico ceppo batterico, dalla

combinazione di farmaci prescelta, dalla durata del trattamento e naturalmente dall'aderenza del paziente al regime di trattamento raccomandato (Iwankzak *et al.*, 2012). Negli ultimi anni si assiste al crescente sviluppo di resistenza ai farmaci da parte del batterio patogeno, probabilmente dovuta all'elevata velocità di mutazione e l'elevata frequenza di ricombinazione di *H. pylori* (Bjorkholm *et al.*, 2001), rendendo necessaria la messa a punto di nuove strategie di eradicazione.

Una parte della comunità scientifica sostiene l'idea che la presenza di *Helicobacter pylori* nell'organismo umano possa rappresentare sotto molti aspetti un beneficio per la razza umana.

Innanzitutto la persistenza della colonizzazione di *Helicobacter pylori* nell'uomo implica la co-esistenza delle due specie, caratterizzata dall'instaurarsi di delicati equilibri. Indipendentemente dalle ragioni precise per le quali questo è accaduto, la capacità di *H. pylori* di sopravvivere per millenni nell'uomo implica che la selezione dei geni umani ha favorito la loro convivenza piuttosto che la guerra (Blaser, 1997).

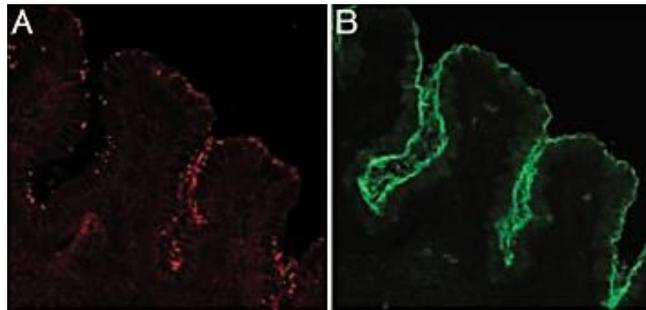
Crescenti evidenze sperimentali indicano un importante positivo coinvolgimento del microorganismo in alcune disfunzioni e patologie. Recentemente, è emerso che la colonizzazione di *H. pylori* influenza l'espressione della leptina e della grelina, ormoni che controllano l'appetito e la sazietà collegando tali dati all'aumento dell'obesità nei paesi sviluppati in cui la presenza di *Helicobacter pylori* è fortemente in calo.

Alcuni studi sostengono che particolari ceppi del batterio possono ridurre il rischio di sviluppare malattia da reflusso gastroesofageo (GERD) e le sue complicanze (Chow *et al.*, 1998). Inoltre, sta emergendo una forte connessione tra l'infezione del batterio patogeno, le malattie allergiche e l'asma. Come detto in precedenza, l'infezione causa una predominante attivazione delle cellule Th-1 con conseguente inibizione della risposta Th-2, principale responsabile dei fenomeni allergici e asmatici (Amedei *et al.*, 2010).

Considerato che l'uomo e il batterio si sono evoluti insieme e che i cambiamenti ambientali, lo sviluppo socio-economico, il prolungarsi della vita stanno determinando la progressiva scomparsa di *Helicobacter pylori* dalla nicchia ecologica rappresentata dall'uomo, potrebbe questo essere in parte responsabile delle malattie dei tempi moderni in costante aumento quali il reflusso esofageo, l'obesità, il diabete e l'asma?

### 1.2.6 *Helicobacter pylori* e TFF1

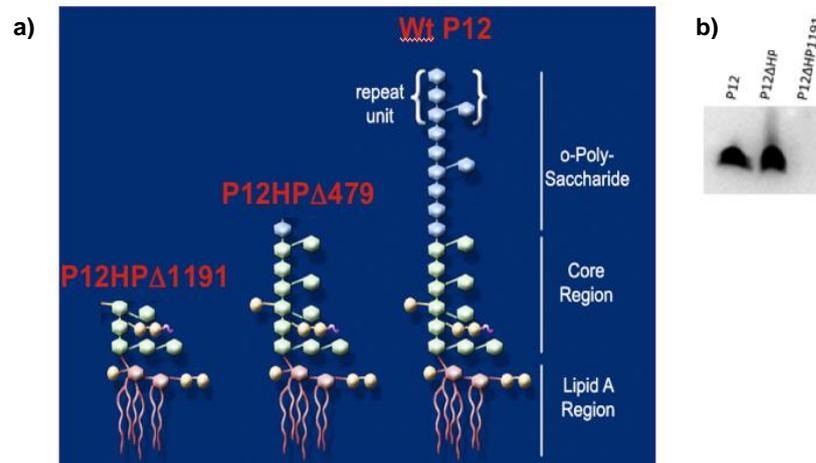
Il gruppo di ricerca della Prof.ssa Clyne dell'Università di Dublino, nel 2004, notò che la localizzazione di *Helicobacter pylori* rispecchiava l'espressione del peptide trifoglio TFF1 e della mucina MUC5AC, e ipotizzò che la preferenza del batterio patogeno per i tessuti gastrici potesse dipendere dalla interazione tra esso e il fattore gastrointestinale. Una prima conferma si ottenne da esperimenti di immunofluorescenza su biopsie gastriche umane positive ad *H. pylori* che indicarono la co-localizzazione tra il peptide trifoglio e il batterio (figura 1.21).



**Figura 1.21** Localizzazione di *H. pylori* e TFF1 nell'antro dello stomaco umano. L'immagine A mostra la colorazione per *H. pylori* mentre l'immagine B mostra, nello stesso campo, la presenza di TFF1 (in verde).

L'analisi dell'interazione tra il microorganismo e la proteina ricombinante TFF1 in forma monomeric e dimerica, mediante saggi di risonanza plasmonica di superficie, mostrò effettivamente uno specifico legame tra queste due componenti, avvalorando quindi la tesi sostenuta, e in particolare emerse che *H. pylori* lega selettivamente la forma dimerica di TFF1 (Clyne *et al.*, 2004). Tale scoperta può inoltre spiegare la localizzazione del batterio con la MUC5AC. Anche il dimero di TFF1, infatti, è associato con questa mucina attraverso il legame con domini ricchi di cisteine (von Willebrand factor C) presenti nella sequenza della glicoproteina ed è noto che i siti putativi di legame presenti nella forma dimerica del peptide si dispongono nello spazio ben separati l'uno dall'altro consentendo potenzialmente l'interazione con due diverse proteine: TFF1 potrebbe fungere quindi da ponte tra la MUC5AC e il batterio patogeno. In un lavoro del 2002 è inoltre mostrato che l'espressione di TFF1 aumenta in cellule di adenocarcinoma gastrico AGS in seguito all'infezione con *H. pylori*, un meccanismo probabilmente CagA dipendente, incrementando quindi la capacità del batterio di colonizzare la mucosa gastrica (Guillemin *et al.*, 2002).

I risultati ottenuti hanno spinto ad approfondire le caratteristiche dell'interazione tra il peptide trifoglio ed *Helicobacter pylori*. È stato possibile dimostrare che il core oligosaccaridico dei lipopolisaccaridi di *H. pylori* (la cosiddetta forma rugosa) è coinvolto nell'interazione con la proteina trifoglio e che in particolare sono i residui di glucosio e mannosio, ma non singolarmente, a consentire tale interazione (Reeves *et al.*, 2008). È stata inoltre valutata l'influenza del pH sul legame ed è emerso che il pH ottimale per l'interazione è compreso tra 5-6 e ciò è in accordo con i meccanismi di colonizzazione *in vivo* poiché il batterio patogeno, in modelli animali, si localizza in uno strato di muco di circa 25  $\mu\text{m}$  sopra la superficie cellulare e il pH in questa area ha un valore compreso tra 5-6. Per chiarire ulteriormente il ruolo giocato dai lipopolisaccaridi di *H. pylori* sono stati costruiti dei mutanti isogenici di *H. pylori* che producono forme tronche del core oligosaccaridico (figura 1.22).



**Figura 1.22** Rappresentazione schematica dei mutanti isogenici HPΔ479 e HPΔ1191 (a). Esperimenti di *immunoblotting* mostrano che soltanto il mutante HPΔ479 lega TFF1 analogamente a quanto avviene con il ceppo Wt P12 (b).

Il mutante P12HPΔ479 (HPΔ479) è privo del gene codificante per una D-glicero-D-manno-epitosiltransferasi, la quale è coinvolta in alcune modifiche della regione esterna del *core* oligosaccaridico. Il secondo mutante, P12HPΔ1191 (HPΔ1191), è privo di un gene codificante una L,D-epitosiltransferasi, coinvolta nella biosintesi della regione interna della porzione oligosaccaridica. Esperimenti di colonizzazione su cellule HT29-E12 con il ceppo HPΔ1191 mostrano una riduzione dei livelli di colonizzazione rispetto al ceppo *wild-type* e al ceppo mutato HPΔ479. Questi risultati hanno consentito di individuare le specifiche regioni coinvolte nell'interazione con TFF1 ed hanno dimostrato infine che l'interazione del peptide con *H. pylori*, nello strato mucoso, media il processo di colonizzazione (Dolan *et al.*, 2012).

La scoperta che il rame è in grado di influenzare l'espressione, l'attività biologica e la struttura del peptide trifoglio TFF1 ha spinto ad indagare l'effetto del rame sul processo di colonizzazione di *H. pylori* mediato da TFF1. Da esperimenti di infezione *in vitro* condotti su cellule epiteliali gastriche e sul clone HT29-E12 secernente muco è emerso che il complesso Cu-TFF1 promuove la colonizzazione cellulare (Montefusco *et al.*, 2013).

Benché i risultati più convincenti siano stati ottenuti valutando l'interazione tra il batterio patogeno e il peptide TFF1, anche gli altri due peptidi trifoglio hanno mostrato di essere coinvolti nell'infezione di *H. pylori*.

Il peptide trifoglio TFF3 in forma dimerica ha mostrato di legare il batterio patogeno e tale interazione è più forte a pH 7, deducendo quindi che le condizioni dello stomaco favoriscono il legame del microorganismo a TFF1. L'interazione con TFF3 vincolerebbe il batterio in prossimità del lume, con conseguente rimozione causata dal fisiologico *turnover* del muco (Reeves *et al.*, 2008).

Il peptide spasmolitico TFF2 è presente a livello dello stomaco in forma glicosilata e *in vitro* non ha mostrato di interagire con il batterio, ma non è da escludere la loro interazione *in vivo*. Le differenze strutturali tra TFF1 e TFF2 sono

probabilmente alla base del loro diverso comportamento, differenze che sono meno marcate tra TFF1 e TFF3.

Studi condotti per valutare l'influenza dell'infezione sull'espressione di TFF2 e la mucina ad esso associata MUC6 hanno mostrato significativi aumenti nei livelli di espressione e cambiamenti nella distribuzione delle due proteine. Tali effetti possono essere considerati una risposta protettiva dell'organismo umano ai danni indotti dall'infezione da *H. pylori* (Xia *et al.*, 2004). È stato infatti descritto il ruolo anti-infiammatorio di TFF2. In topi *tff2*<sup>-/-</sup> si osserva una deregolazione della risposta immune ed essi sono più sensibili alle coliti indotte da sodio destrano solfato e alle gastriti indotte da *Helicobacter felis*, sviluppando quindi patologie infiammatorie di grado più severo rispetto ai topi *wild-type*. Inoltre, tali topi TFF2-deficienti infettati da *H. pylori* sviluppano lesioni pre-cancerose, metaplasie e displasie, indicando un ruolo per la proteina trifoglio di protezione nei confronti della progressione neoplastica in seguito ad infiammazione cronica. È stato dimostrato che la perdita dell'espressione di TFF2 che si osserva nel cancro gastrico di tipo intestinale e in seguito ad infezione cronica con *H. pylori* di stomaci di topo, è dovuta a silenziamento genico causato da metilazione del promotore della proteina trifoglio. L'effetto sull'espressione di TFF2 non sembra essere una capacità diretta del batterio patogeno ma molto probabilmente deriva dall'attività delle citochine pro-infiammatorie, in particolare IL-1, che sono up-regolate durante l'infezione e causano la produzione di ossido nitrico: si osserva la stimolazione delle DNA metiltransferasi, determinando una iper-metilazione inadeguata e successivo silenziamento genico (Peterson *et al.*, 2010).

La mancata espressione di TFF2 ha conseguenze dirette anche sull'espressione di TFF1 che risulta meno espresso in topi *tff2*<sup>-/-</sup>. TFF2 è inoltre regolatore positivo dell'espressione della gastrochina-2, partner di TFF1 nel formare l'eterodimero, con conseguenze sulla funzionalità di entrambe le proteine. Anche l'espressione degli ormoni gastrina e somatostatina, richiesti per il normale sviluppo della mucosa gastrica, risulta completamente assente in topi *gp130<sup>FF</sup>-tff2*<sup>-/-</sup> e anche questo si riflette sull'espressione della proteina trifoglio TFF1 poiché la gastrina è un suo modulatore positivo. Inoltre, l'ormone gastrina si è rivelato capace di inibire la progressione della carcinogenesi antrale contrastando il fenomeno della metilazione del promotore di TFF1 in tale contesto e quindi comportandosi da modificatore epigenetico (Tomita *et al.*, 2010).

Le importanti scoperte degli ultimi anni riguardanti il coinvolgimento dei peptidi trifoglio nei meccanismi di infezione da *H. pylori* aprono la strada a nuovi interessanti interrogativi. Comprendere gli eventi in grado di influenzare la colonizzazione e la sopravvivenza del batterio patogeno e le conseguenze di tali eventi sullo sviluppo di processi infiammatori e neoplastici rappresenta l'obiettivo della ricerca per individuare nuovi target farmacologici e più efficaci terapie.

## SCOPO DELLA TESI

In continuità con le evidenze sperimentali ottenute sulla interazione tra il rame e il TFF1, il mio progetto di ricerca si colloca all'interno di un più ampio progetto finalizzato allo studio delle relazioni strutturali e funzionali tra il rame ed il fattore TFF1.

In particolare, il lavoro di ricerca è stato sviluppato analizzando l'interazione strutturale tra il catione metallico e le proteine ricombinanti hrTFF1 e hrTFF3 mediante studi di spettrometria di massa e calorimetria isoterma di titolazione.

È stata inoltre valutata l'influenza dei livelli di rame sulla localizzazione intracellulare della proteina e sul suo processo di secrezione e internalizzazione in linee cellulari tumorali.

Alla luce delle interessanti evidenze sulla correlazione tra TFF1 e il batterio *Helicobacter pylori*, l'analisi dell'influenza del complesso Cu-TFF1 nei processi di colonizzazione *in vitro* del batterio patogeno nonché il coinvolgimento della coda C-terminale del peptide TFF1 nei meccanismi di adesione batterica sono stati ulteriore argomento di studio. Ho condotto, infine, analisi reologiche sul muco prodotto da cellule intestinali *goblet* secernenti mucine e fattori trifoglio e valutato l'influenza del rame sulle proprietà di viscoelasticità del gel mucoso.



## CAPITOLO 2

## RISULTATI

## 2.1 Studio strutturale dell'interazione tra rame e peptidi trifoglio

## 2.1.1 Analisi dell'interazione rame – peptidi trifoglio mediante ESI-MS

Il nostro gruppo di ricerca ha per primo messo in luce la capacità della proteina trifoglio TFF1 di legare il rame (Tosco *et al.*, 2007), ed in particolare la capacità di interazione selettiva con il catione metallico attribuibile alla sua estremità carbossiterminale (Tosco *et al.*, 2010). Tale regione è caratterizzata dalla presenza di un residuo di cisteina (Cys58), circondato da quattro residui di acido glutammico (figura 2.1). Studi di Ala scanning hanno dimostrato che la Cys58 è essenziale per il legame, mentre la presenza di almeno tre residui di acido glutammico garantisce la stabilità dell'interazione.

Human TFF1:  
**EAQTETCTVAPRERQNCGFPGVTPSQANKGCCFDDTVRGVPWCFYPNTIDVPP****EEEE****CEF**

**Figura 2.1.** Sequenza amminoacidica della proteina umana TFF1. In rosso è evidenziato il residuo amminoacidico Cisteina (Cys58) contornato da 4 residui di Acido Glutammico (in verde).

Nella citata sperimentazione pregressa è stata sempre utilizzata la proteina monomerica in cui il residuo di cisteina era presente in forma ossidata come cistina (proteina ricombinante da *E. coli*), o legata ad una molecola di glutatione (proteina purificata dal surnatante di cellule eucariote). Poiché la forma “biologicamente” attiva è considerata quella dimerica, il primo obiettivo è stato quello di analizzare la capacità dell'omodimero di interagire specificamente con il catione metallico.

Inoltre, l'indagine strutturale è stata estesa ad un altro membro della famiglia dei peptidi trifoglio, il fattore TFF3, il quale presenta analogie strutturali e di sequenza con TFF1, come mostrato in figura 2.2. Infatti esso è in grado di formare omodimeri impegnando il residuo di cisteina Cys57 presente all'estremità carbossiterminale. Tali similitudini hanno suggerito la possibilità di una analoga capacità di interagire con il rame.

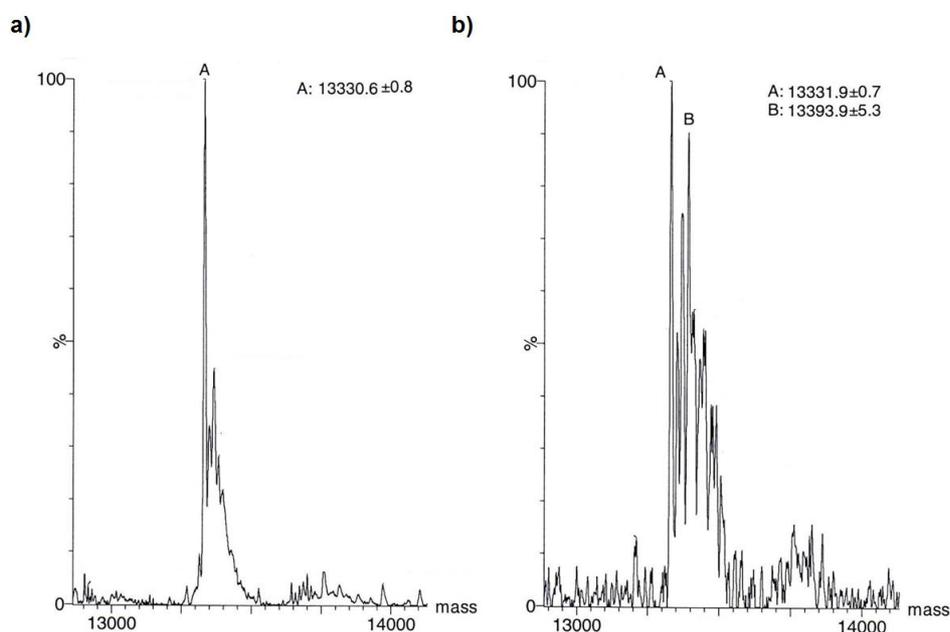
**TFF1**  
**CTVAPRERQNCGFPGVTPSQANKGCCFDDTVRGVPWCFYPNTIDVPP****EEEE****CEF**  
**TFF3 ++ + + + + +**  
**CAVPAKDRVDCGYPHVTPKECNNRGCCFDSRIPGVWCFKPLQ-----EA****ECTF**

**Figura 2.2** Allineamento delle sequenze amminoacidiche delle proteine TFF1 e TFF3. In rosso è evidenziato il residuo amminoacidico Cisteina, in verde i residui di Acido Glutammico e in azzurro i residui amminoacidici in comune tra le proteine, il segno “+” indica la presenza di residui amminoacidici simili.

È stata eseguita un'analisi del complesso rame-omodimero mediante spettrometria di massa ESI (electrospray ionization) in condizioni native (Heck *et al.*, 2009). Tale metodica consente l'analisi di complessi molecolari non-covalenti nel loro stato nativo. In breve, tutti i parametri strumentali sono stati ottimizzati per preservare l'integrità dei complessi macromolecolari durante la fase di ionizzazione: bassa temperatura della sorgente, assenza di gas di ionizzazione, flusso di iniezione, voltaggio del capillare e del cono minimizzati.

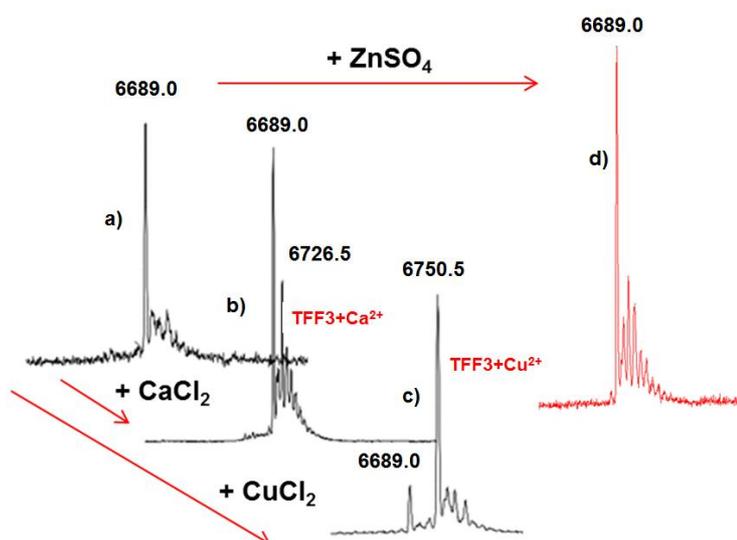
È stata innanzitutto verificata la capacità della proteina ricombinante hrTFF1 dimerica di legare il rame. In figura 2.3 è mostrata la deconvoluzione dello spettro di hrTFF1 in assenza di rame (a) e in presenza del catione metallico (b). Lo *shift* di ~ 64 Dalton osservato per il picco B ( $13393,9 \pm 5,3$ ) ci consente di identificare questo picco come corrispondente alla forma della proteina dimerica (picco A  $13330,6 \pm 0,8$ ) legata al rame. La presenza del picco A anche in quest'ultimo spettro è da attribuirsi all'intrinseca dissociazione del complesso Cu-TFF1 che si manifesta nel corso dell'analisi di spettrometria di massa. La presenza di altri picchi che rendono lo spettro più complesso è invece dovuta alla formazione di addotti salini aspecifici inevitabili in tale tipo di analisi.

Al fine di verificare la selettività del legame di TFF1 con il rame, la proteina ricombinante è stata incubata con diversi cationi metallici quali il calcio e lo zinco. I risultati ottenuti (non mostrati) confermano la sostanziale selettività di legame per lo ione rameico.



**Figura 2.3** Caratterizzazione del complesso hrTFF1 dimerico-Cu<sup>2+</sup> mediante analisi ESI-MS. Deconvoluzione degli spettri di hrTFF1 dimerico in assenza (a) e in presenza (b) di un eccesso 7,5 molare di CuCl<sub>2</sub>. Il pannello (b) mostra la presenza del picco B corrispondente ad un incremento di massa di circa 64 Da che indica la formazione del complesso Cu-dimero in rapporto 1:1.

Simili analisi sono state eseguite utilizzando la proteina ricombinante hrTFF3, con il fine ultimo di comparare lo spettro con quello della forma omodimerica di TFF1. Purtroppo la proteina commerciale dichiarata dalla casa produttrice dimerica in realtà si è rivelata un monomero, vanificando il proposito sperimentale. La figura 2.4 mostra che in seguito all'incubazione con il rame si ha la comparsa di un picco a 6750,5 Da (c) corrispondente ad un incremento di massa di circa 64 Dalton rispetto al picco a 6689,0 corrispondente a hrTFF3 libero (a), che indica la formazione di un complesso con il rame. Gli spettri deconvoluti indicano inoltre una debole interazione della proteina trifoglio anche con il calcio, come mostrato dal picco a 6726,5 Da (b); l'incubazione con lo zinco non ha prodotto invece la formazione di alcun tipo di complesso come mostrato dal picco (d) per il quale non si hanno variazioni di massa.



**Figura 2.4** Caratterizzazione del complesso hrTFF3 monomero-Cu<sup>2+</sup> mediante analisi ESI-MS. Deconvoluzione degli spettri di hrTFF3 monomero in assenza (a) e in presenza (c) di un eccesso molare x 7,5 di CuCl<sub>2</sub>. Il pannello (c) mostra la presenza del picco a 6750,5 Da corrispondente ad un incremento di massa di circa 64 Da che indica la formazione del complesso Cu-monomero in rapporto 1:1. La presenza del picco (b) a 6726,5 Da è da attribuirsi alla formazione di un complesso con lo ione calcio. Il picco (d) indica invece che non vi è interazione della proteina hrTFF3 con lo ione zinco.

I risultati ottenuti hanno consentito quindi di verificare la selettività di legame per lo ione rameico anche con la forma dimerica della proteina TFF1. Inoltre, la ulteriore evidenza che anche TFF3 condivide una simile capacità di legame selettivo per il catione rameico suscita altri interrogativi circa il significato biologico di tale interazione.

### 2.1.2 Caratterizzazione termodinamica dell'interazione tra il rame e il peptide trifoglio TFF1

La stima dell'affinità di legame tra il rame e il peptide trifoglio si rende necessaria per ipotizzare - o interpretare - un eventuale significato biologico di questa

interazione. La spettrometria di massa è in grado di fornire indicazioni di tipo qualitativo sui legami macromolecolari ma non consente di ottenere informazioni sui parametri termodinamici che caratterizzano la formazione di un complesso.

Gli studi già effettuati per confermare il coinvolgimento della regione C-terminale di TFF1 nell'interazione con il rame avevano utilizzato misure di *fluorescence quencing* su un peptide sintetico in forma monomerica di sequenza corrispondente agli ultimi 16 aa della proteina e contenente la sostituzione Phe60→Trp sull'ultimo residuo. Da tali studi è emerso il coinvolgimento di tale regione nel legame con il rame e si è ottenuta una indicazione circa l'affinità di legame per il metallo che è risultata essere dell'ordine nanomolare (Tosco *et al.*, 2010).

Per confermare tale risultato e verificare l'affinità di legame per il rame della forma dimerica della proteina, le misure sono state nuovamente effettuate mediante calorimetria isoterma di titolazione, al fine di ottenere più puntuali informazioni sulla costante di dissociazione ( $K_d$ ), la stechiometria ( $n$ ) e l'entalpia di interazione ( $\Delta H$ ) del complesso rame-TFF1. Analogamente a quanto già eseguito con gli esperimenti di fluorescenza, è stato utilizzato il peptide sintetico pTFF di sequenza nativa in forma dimerica, regione responsabile dell'interazione con il catione metallico. La formazione del dimero di pTFF è stata promossa incubando il peptide per una notte a temperatura ambiente. Le due forme sono state separate mediante HPLC e la conferma della massa molecolare è stata ottenuta mediante spettrometria di massa MALDI.

La fase di ottimizzazione dei parametri sperimentali in esperimenti di calorimetria di titolazione prevede l'individuazione di una concentrazione di molecole interagenti appropriata capace di produrre uno scambio di calore significativo ed apprezzabile nel *range* di sensibilità dello strumento. A tal fine, il calcolo del parametro adimensionale " $c$ " (Wiseman *et al.*, 1989), pari a:

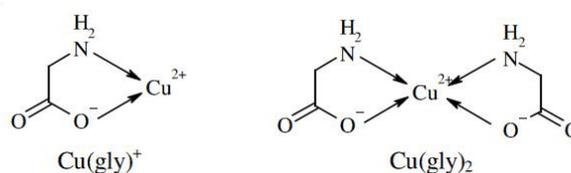
$$c = nK_a[M]_T$$

(dove  $K_a$  è la costante di legame,  $[M]_T$  è la concentrazione totale della macromolecola nella cella e  $n$  è la stechiometria di interazione) consente di stabilire un *range* di concentrazioni utili alle misure. Valori ottimali di  $c$  per una corretta stima dell'affinità di legame devono essere compresi tra 1 e 1000. Considerando costanti gli altri parametri, il valore di  $c$  può essere modulato variando la concentrazione della macromolecola.

Per costanti di legame molto elevate non si riesce ad ottenere misure utili ed attendibili per il calcolo, se non con accorgimenti capaci di attenuare l'affinità tra analita e titolante capaci di far rientrare le misure nell'intervallo di sensibilità dello strumento. A tal fine si utilizzano chelanti deboli che competano per il legame con il titolante.

Nel caso in esame, considerando l'indicazione ottenuta dagli esperimenti di *fluorescence quencing* ( $K_d = 1,3$  nM per il peptide monomerico) e facendo riferimento a numerosi esempi riportati in letteratura per la determinazione delle costanti di

legame di complessi rame-proteina, è stata utilizzata la glicina (figura 2.5) come chelante debole per il rame.

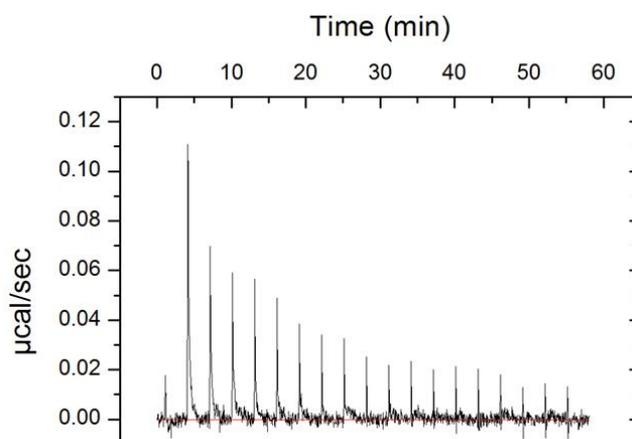


**Figura 2.5** Composti di coordinazione Rame-Glicina.

Ulteriore vantaggio che deriva dall'utilizzo di un chelante debole è che esso, utilizzato in eccesso rispetto al ligando, previene la precipitazione del catione metallico sotto forma di idrossidi.

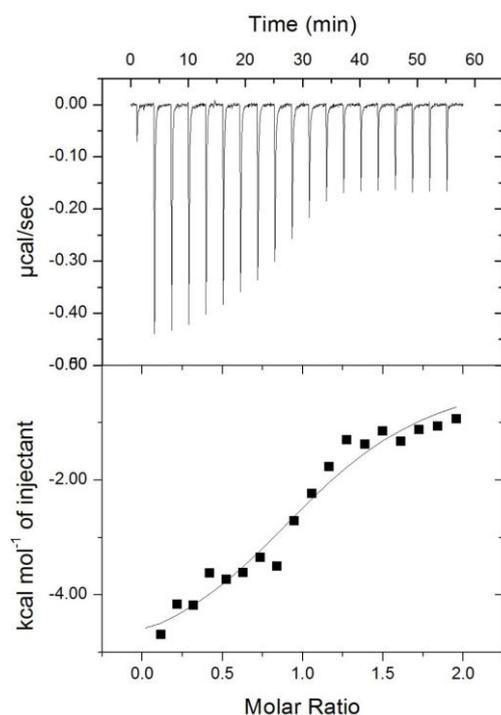
Le soluzioni di analita e di ligando sono state preparate così come descritto nel paragrafo 4.2 di Materiali e Metodi.

Prima di individuare le condizioni sperimentali che hanno consentito di ottenere gli esperimenti mostrati nelle figure 2.6 e 2.7, sono state condotte numerose prove variando la concentrazione di titolante, la concentrazione di titolato o la temperatura di analisi. In figura 2.6 è mostrata la titolazione del complesso rame-glicina nella cella contenente il solo tampone Hepes che consente di determinare il calore di diluizione dovuto alla dissociazione del complesso.



**Figura 2.6** Calorimetria isotermica di titolazione. Dati grezzi della dissociazione/associazione del complesso  $\text{Cu}^{2+}$ - $\text{Gly}_2$  corrispondenti a 19 iniezioni di 0,7 mM rame / 2,8 mM glicina in tampone Hepes 20 mM, NaCl 160 mM a pH 7,4 a 25 °C.

In figura 2.7, invece, è mostrata la titolazione del complesso rame-glicina nella cella contenente il peptide dimerico pTFF1.



**Figura 2.7** Calorimetria isoterma di titolazione. Nella parte alta del pannello sono mostrati i dati grezzi; in basso i dati integrati corrispondenti a 19 iniezioni di 0,7 mM rame / 2,8 mM glicina in una soluzione 70 µM peptide dimerico pTFF1. Gli esperimenti sono stati eseguiti in tampone Hepes 20 mM, NaCl 160 mM a pH 7,4 a 25 °C.

I dati sono stati analizzati utilizzando il *software* associato allo strumento (Origin 7.0), ottenendo così la costante apparente di associazione ( $K_{app}$ ), il numero di molecole di peptide legate al rame ( $n$ ) e la variazione di entalpia ( $\Delta H$ ). I valori ottenuti però non tengono conto degli equilibri che si instaurano in presenza della glicina e del tampone. La costante apparente di associazione deve quindi essere corretta considerando questi equilibri. Facendo riferimento al lavoro di Trapaidze *et al.*, 2012 è stata utilizzata l'equazione riportata nel paragrafo 4.2 di Materiali e Metodi, che ci ha consentito di ottenere il valore della costante di dissociazione reale, definita "condizionale" (Tabella 1).

**Tabella 1.** Variazione di entalpia e costanti di dissociazione del legame del rame al peptide sintetico dimerico pTFF1

$\Delta H$ (cal mol <sup>-1</sup> )	$^{app}K_d$ (M)	$^{cond}K_d$ (M)	Siti di legame (n)
-4145	$1,43 \times 10^{-5}$	$4,38 \times 10^{-9}$	1

Il valore della costante di dissociazione ottenuta è in accordo con i dati di *fluorescence quencing* del peptide in forma monomerica e ci consente di affermare che anche il peptide dimerico di TFF1, rappresentativo dell'estremità carbossiterminale della proteina, mostra una significativa affinità per il rame.

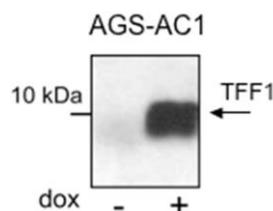
Analoghe misurazioni di ITC ancora non concluse, consentiranno di caratterizzare l'interazione tra il rame e le proteine ricombinanti hrTFF1 e hrTFF3.

## 2.2 L'influenza del rame sulla secrezione e la localizzazione cellulare di TFF1

TFF1 è una proteina secreta dalle cellule epiteliali che producono mucine e svolge la sua attività biologica agendo sia in modo paracrino che autocrino. La mancanza di informazioni di letteratura sul *pathway* di secrezione di TFF1, considerate le evidenze in nostro possesso sull'interazione tra rame e proteina, ha suggerito un approfondimento dello studio del traffico cellulare e della secrezione del fattore trifoglio, con particolare attenzione all'eventuale influenza del rame su tali processi.

### 2.2.1 Timing della produzione e secrezione di TFF1

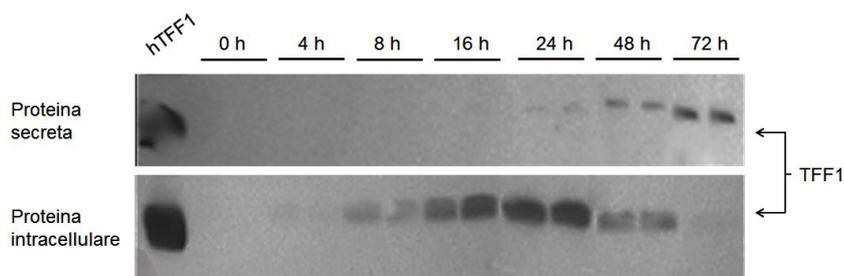
Allo scopo di monitorare la sintesi e la secrezione della proteina al variare dei livelli del metallo, è stato utilizzato un clone derivante dalla linea cellulare di adenocarcinoma gastrico AGS, che non esprime quantità di TFF1 rivelabili per immunoblotting. Il clone stabile AGS-AC1 è stato ottenuto per transfezione delle cellule AGS con un vettore di espressione per TFF1 dotato di un promotore inducibile da doxiciclina (figura 2.8) (Tosco *et al.* 2010). Il vettore utilizzato si integra stabilmente nel genoma e conferisce alle cellule la resistenza alla Neomicina, consentendo la selezione continua dei trasfettanti in mezzo supplementato con l'antibiotico. La scelta di tale modello cellulare inducibile consente di ottenere condizioni di espressione basale minima, controllabile, ed indipendente dalla regolazione trascrizionale.



**Figura 2.8** Analisi Western di surnatanti di AGS-AC1 in cellule indotte e non indotte con doxiciclina. Indicata dalla freccia, la proteina trifoglio rivelata mediante anticorpo anti-TFF1.

Esperimenti preliminari hanno consentito di studiare la cinetica di produzione e secrezione della proteina. A tal fine il *timing* dell'esperimento per il prelievo dei mezzi di coltura e delle cellule è stato riferito al tempo zero corrispondente all'aggiunta di doxiciclina al mezzo di coltura.

La figura 2.9 mostra che la presenza di TFF1 nel lisato cellulare diventa apprezzabile a partire da 4 ore dopo l'induzione, con un picco massimo di produzione a 24 ore ed un sensibile decremento a 48 ore, fino alla scomparsa di segnale intorno alle 72 ore.



**Figura 2.9** *Timing* della produzione di TFF1 in cellule AGS-AC1. Analisi western dei mezzi di coltura e dei lisati cellulari raccolti a diversi tempi dall'induzione con doxiciiclina.

L'analisi della secrezione della proteina (figura 2.9), come prevedibile, mostra il picco massimo di concentrazione proteica a 72 ore dall'induzione, a causa del progressivo accumulo della proteina nel mezzo di coltura.

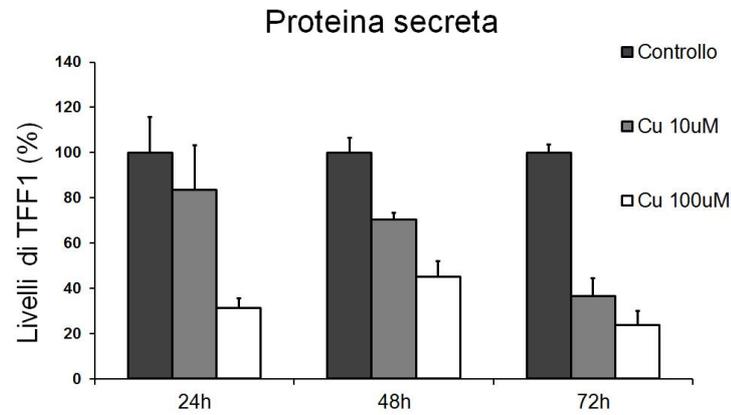
### 2.2.2 Influenza del rame sul processo di secrezione della proteina trifoglio

In base alle informazioni ottenute sul *timing* di produzione e secrezione, sono state messe a punto le condizioni sperimentali per lo studio della eventuale influenza dei livelli di rame sul traffico cellulare e secrezione della proteina.

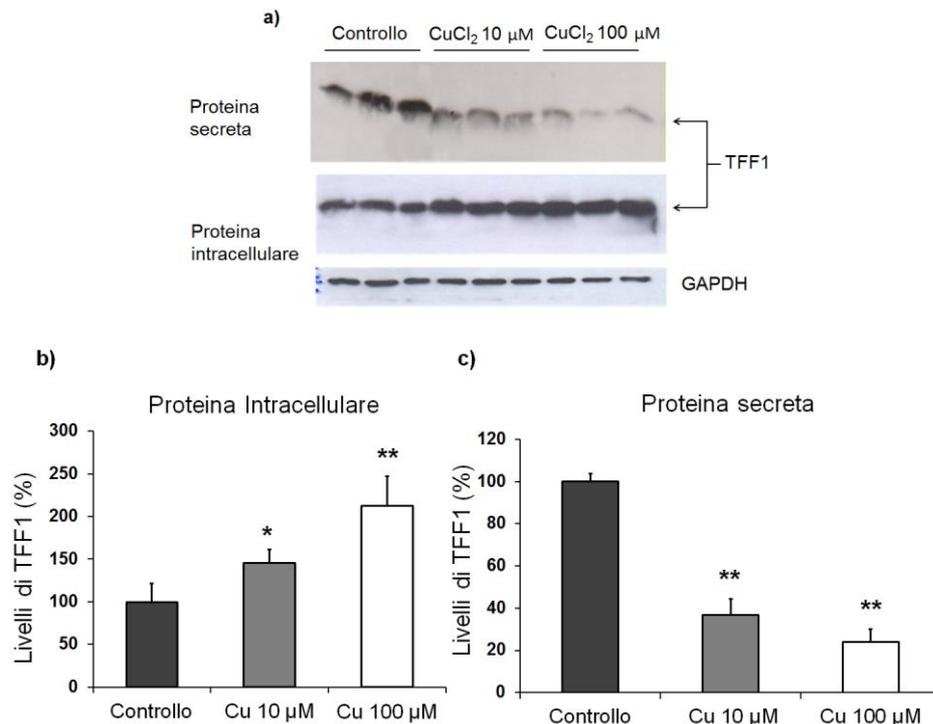
Le condizioni di trattamento comprendono due diverse concentrazioni di rame: una prima concentrazione 10  $\mu\text{M}$  di rame, paragonabile a quella presente nei fluidi biologici, e una seconda pari a 100  $\mu\text{M}$  al fine di riprodurre una condizione di sovraccarico di rame, capace di evidenziare maggiormente l'eventuale effetto del metallo sul sistema in esame.

I trattamenti sono stati inizialmente effettuati in mezzo privo di siero in cui la concentrazione di rame è approssimabile a zero, quindi parallelamente riprodotti in mezzo supplementato con siero, in cui il rame raggiunge la concentrazione 0,2  $\mu\text{M}$ . In tali condizioni è stato possibile verificare l'effettiva influenza del metallo sul processo di secrezione in condizioni meno stressanti per il sistema cellulare.

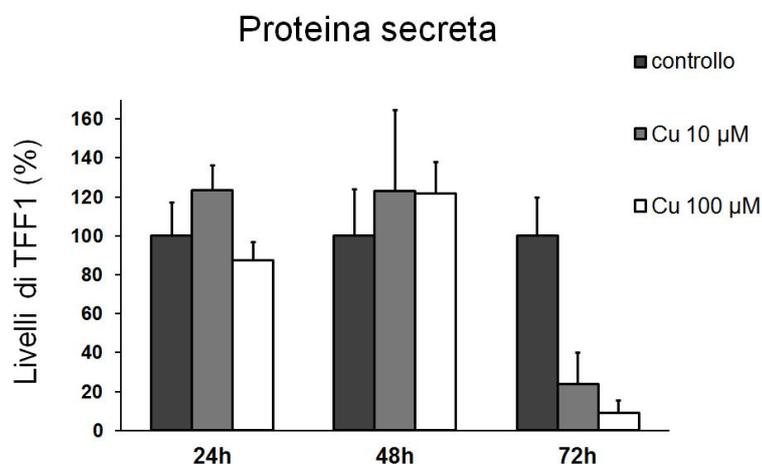
L'analisi Western della proteina secreta e della proteina intracellulare, mostra che i trattamenti con il rame sono in grado di influenzare il processo di secrezione della proteina TFF1. In condizioni di deprivazione di siero, in seguito al trattamento con entrambe le concentrazioni di rame, si evidenzia una marcata riduzione della quantità di proteina secreta (figura 2.10) ed un maggior accumulo intracellulare. Tale effetto è già visibile dopo 24 ore di trattamento e risulta più marcato a 72 ore (figura 2.11).



**Figura 2.10** Analisi densitometrica di Western blotting. Cellule AGS-AC1 sono state incubate con rame 10 e 100  $\mu\text{M}$ , in mezzo di crescita privo di siero, per 24, 48 e 72 ore. Al termine dei trattamenti, i surnatanti sono stati analizzati per misurare la quantità di TFF1 secreta. Si evince che il rame determina una ridotta secrezione della proteina già a 24 ore di trattamento. A 72 ore l'effetto diviene più marcato. I valori sono espressi in % rispetto al controllo.



**Figura 2.11** a) Analisi Western blotting. Il clone cellulare AGS-AC1 è stato incubato con rame 10 e 100  $\mu\text{M}$  per 72 ore in mezzo privo di siero. Al termine dei trattamenti, i surnatanti sono stati analizzati per misurare la quantità di TFF1 secreta e i livelli intracellulari di proteina. È seguita analisi densitometrica per valutare la variazione dei livelli di proteina intracellulare (b) e secreta (c) espressa come % rispetto ai controlli. (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ). A 72 ore in seguito al trattamento con il rame, si riduce la quantità di proteina secreta, accumulandosi all'interno della cellula. I valori sono espressi in % rispetto al controllo.

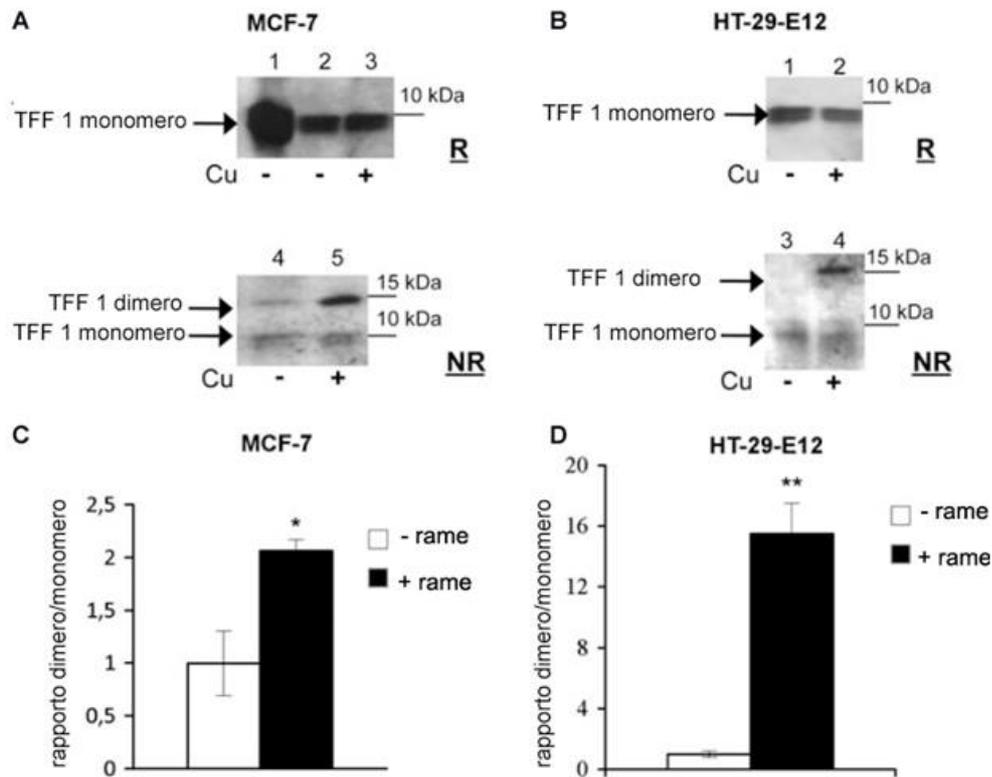


**Figura 2.12** Analisi densitometrica di Western blotting. Cellule AGS-AC1 sono state incubate con rame 10 e 100  $\mu\text{M}$ , in mezzo di crescita contenente siero, per 24, 48 e 72 ore. Al termine dei trattamenti, i surnatanti sono stati analizzati per misurare la quantità di TFF1 secreta. I valori sono espressi in % rispetto al controllo.

I trattamenti con il chelante del metallo batocuproina, utilizzati per riprodurre una condizione di deprivazione di rame, non influenzano la secrezione della proteina (dati non mostrati).

### 2.2.3 Analisi della proteina nativa intracellulare e secreta nel surnatante

Il dimero di TFF1 è la forma biologicamente più attiva della proteina, in quanto possiede attività mitogenica (Marchbank *et al.*, 1998), agisce da modulatore nello sviluppo di cellule tumorali gastriche (Calnan *et al.*, 1999) e media il legame con altri componenti delle mucose epiteliali quali ad esempio le mucine (Ruchaud-Sparagno *et al.*, 2004). Inoltre, da nostri studi pregressi (Tosco *et al.*, 2010) è emerso che il rame è in grado di favorire la dimerizzazione della proteina come mostrato in figura 2.13.

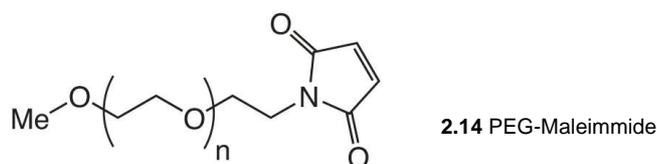


**Figura 2.13** Analisi Western blotting delle proteine secrete in condizioni riducenti (R) e non riducenti (NR). Le cellule sono state cresciute in mezzo privo di rame (- rame) o con aggiunta di  $\text{CuCl}_2$  100  $\mu\text{M}$  (+ rame). A) Cellule MCF-7 (linea 1: TFF1 ricombinante) B) cellule HT29-E12. Gli istogrammi rappresentano l'analisi densitometrica (media di triplicati biologici) degli esperimenti in cellule MCF-7 (C) e in cellule HT29-E12 (D). (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,005$ ). (Tosco *et al.*, 2010).

L'importanza di tale modulazione sulla funzionalità di TFF1 ci ha indotto ad approfondire il processo di maturazione dell'omodimero nel *pathway* di secrezione e l'influenza del rame su tale processo.

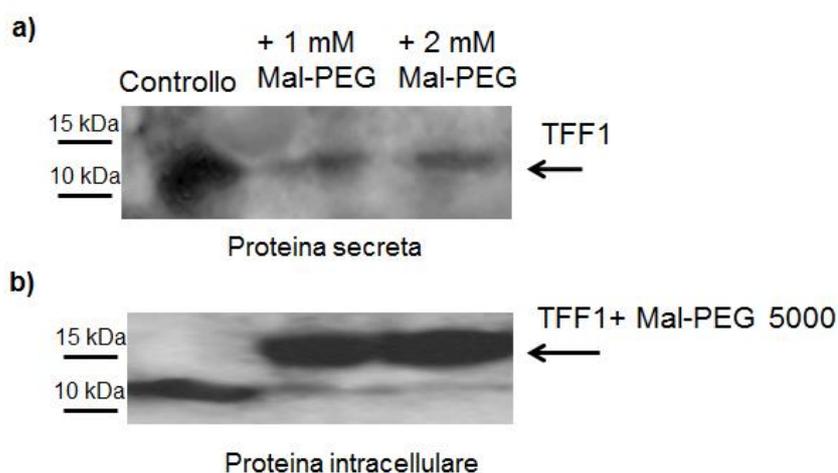
A tale scopo è stato messo a punto un esperimento per analizzare lo stato di ossidazione dei residui di cisteina di TFF1, all'interno ed all'esterno della cellula.

Un agente alchilante quale la maleimmide è in grado di reagire con i gruppi sulfidrilici, mediante attacco nucleofilo dell'anione tiolato su un carbonio del doppio legame, modificandoli quindi irreversibilmente. In particolare, per la reazione di modifica irreversibile delle cisteine libere è stato utilizzato il reagente nella sua forma coniugata a polietilenglicole ad alto peso molecolare (Mal-PEG 5000) (figura 2.14). La molecola, date le sue dimensioni, non è in grado di entrare nella cellula ma consente una immediata visualizzazione dell'avvenuto legame con il gruppo sulfidrilico della proteina in esame, causando uno *shift* del peso molecolare osservato mediante Western blot.



Anche questi esperimenti sono stati eseguiti sul clone inducibile AGS-AC1, che consente di distinguere la proteina neosintetizzata a seguito di induzione della espressione con doxiciclina..

L'analisi dei surnatanti di cellule indotte con doxiciclina ed incubate per 48h con PEG-maleimide non mostra alcuno *shift* di peso molecolare della banda di TFF1, lasciando dedurre l'assenza di cisteine libere nella proteina secreta, compresa la Cys58 responsabile della oligomerizzazione (Figura 2.15 a). Gli estratti intracellulari mostrano invece una banda a più alto peso molecolare (+ 5 kDa) in corrispondenza dei campioni trattati con PEG-maleimide 5000 (Figura 2.15 b), a dimostrazione della presenza di un gruppo sulfidrilico ridotto presente sulla proteina all'interno della cellula a 48 hr di induzione.



**Figura 2.15** Analisi Western blotting. Cellule AGS-AC1 sono state incubate con l'agente alchilante Mal-PEG 5000 per 48 h. Al termine dei trattamenti, i surnatanti (a) e i lisati cellulari (b), ottenuti lisando le cellule in presenza di Mal-PEG, sono stati analizzati per valutare la formazione del legame tra la proteina e l'agente alchilante.

È importante evidenziare che la mancata evidenza dello *shift* ad alto peso molecolare nei campioni di proteina secreta non è di per sé sufficiente ad escludere la secrezione della stessa in forma monomerica. Infatti, analisi pregresse di spettrometria di massa eseguite sulla proteina nativa secreta da cellule MCF-7 hanno mostrato, la presenza di altre due forme: il monomero con il residuo Cys58 impegnato in un legame con un altro residuo di cisteina libera, ed il monomero legato ad una molecola di glutazione (Tosco *et al.*, 2007).

I dati ottenuti dall'analisi della proteina intracellulare hanno restituito un risultato atteso, in quanto è prevedibile che la formazione del dimero avvenga all'interno della cellula. Per la maggior parte delle proteine destinate alla secrezione, il reticolo endoplasmatico non rappresenta soltanto il sito di sintesi ma anche quello in cui avviene, ove previsto, l'oligomerizzazione. In alcuni casi, però, l'interazione tra le unità monomeriche può avvenire nell'apparato di Golgi o in un compartimento intermedio (Ali *et al.*, 2005). L'apparato di Golgi è utilizzato dalla cellula, non solo come compartimento di smistamento delle proteine in arrivo dal reticolo endoplasmatico, ma anche come uno dei siti in cui le cuproproteine acquisiscono il catione metallico necessario per la loro strutturazione e funzionalità (Nittis and Gitlin, 2004; Hellman *et al.*, 2002).

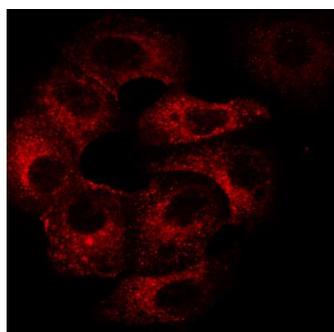
### 2.3 Analisi della localizzazione subcellulare di TFF1

Considerando la capacità di TFF1 di interagire con il rame e l'influenza che quest'ultimo ha sulla formazione del dimero, nonché sul processo di secrezione della proteina, un conseguente interesse ha diretto l'indagine verso lo studio legato alla localizzazione cellulare di TFF1.

#### 2.3.1 Esperimenti di co-localizzazione cellulare tramite microscopia confocale

L'esigenza di ottenere informazioni sul *pathway* di secrezione di TFF1 ha reso necessaria la messa a punto delle condizioni sperimentali adatte alla visualizzazione e localizzazione cellulare della proteina TFF1 e delle sue possibili variazioni legate ai livelli di rame mediante microscopia di immunofluorescenza. A tal fine sono stati preventivamente selezionati gli anticorpi commerciali più efficienti per la rivelazione intracellulare della proteina, per i quali non erano disponibili puntuali informazioni bibliografiche

Sono stati quindi esaminati diversi anticorpi anti-TFF1 e selezionato l'unico anticorpo efficace diretto contro l'intera sequenza nativa comprendente il peptide segnale (figura 2.16).

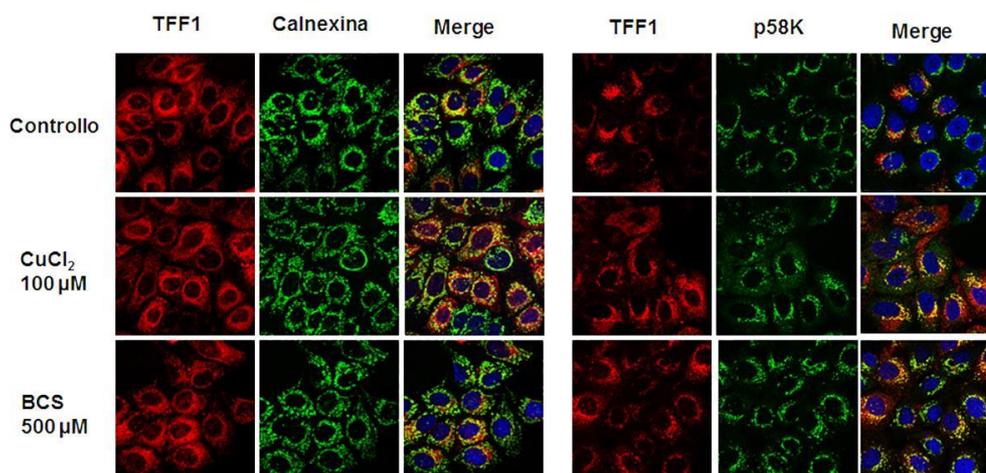


**Figura 2.16** Immunofluorescenze. In rosso il segnale per TFF1 in cellule MCF-7.

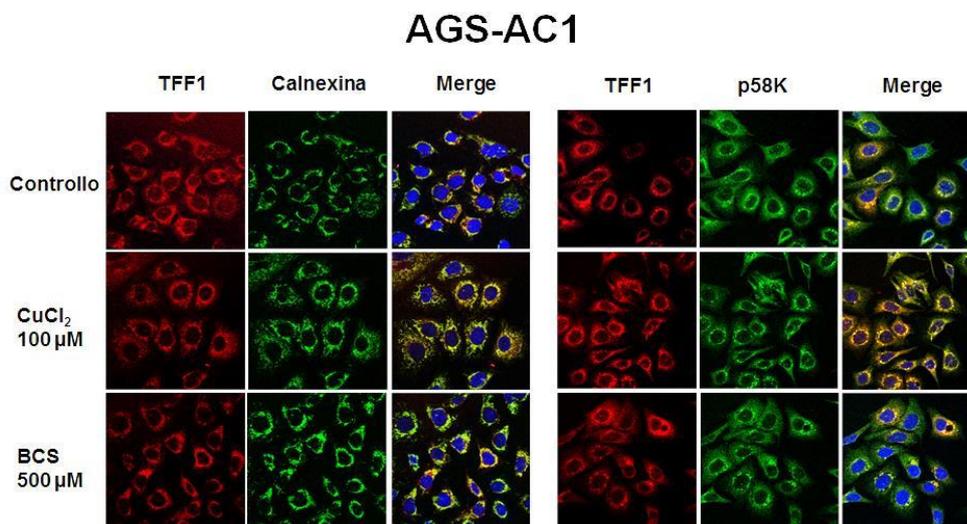
Si è proseguito nell'analisi della localizzazione cellulare scegliendo due modelli su cui condurre gli esperimenti: il clone inducibile AGS-AC1 e la linea di carcinoma mammario MCF-7, nota per esprimere in modo costitutivo elevate quantità di proteina (Prest *et al.*, 2002). Queste cellule, così come descritto nel paragrafo 4.8.1 di Materiali e Metodi, sono state trattate per determinare condizioni di sovraccarico e privazione di rame. La localizzazione di TFF1 all'interno della cellula è stata analizzata mediante microscopia confocale, utilizzando come *marker* dei compartimenti cellulari la proteina Calnexina, per il Reticolo Endoplasmatico, e la proteina p58K per il trans-Golgi. Le cellule, trattate per 48 ore con il rame o con il suo chelante, sono state opportunamente preparate per l'osservazione al microscopio.

Le immagini raccolte per le due linee cellulari AGS-AC1 ed MCF-7 (2.17 e 2.18) mostrano che la proteina TFF1 co-localizza sia con il *marker* del Reticolo Endoplasmatico che con quello del trans-Golgi. Tale risultato evidenzia un percorso della proteina che coinvolge i compartimenti principalmente interessati nei dinamici processi di secrezione delle proteine. Nelle cellule trattate con rame, si osserva una maggiore localizzazione della proteina trifoglio nel trans-Golgi, come indicato dall'intensa colorazione gialla che deriva dalla sovrapposizione delle due immagini di fluorescenza del campo in esame.

## MCF-7



**Figura 2.17** Immunofluorescenze. Cellule MCF-7 sono state piastrate su vetrini e trattate con CuCl<sub>2</sub> 100 μM e BCS 500 μM. In rosso: TFF1; in verde: Calnexina (a dx) o p58K (a sx); in blu: nuclei cellulari. Le immagini di *merge* mostrano la sovrapposizione tra i segnali rossi e verdi indicano la localizzazione di TFF1 nel Reticolo Endoplasmatico e nel trans-Golgi. Il trattamento con il rame determina una maggiore co-localizzazione di TFF1 con il marker del trans-Golgi.



**Figura 2.18** Immunofluorescenze. Cellule AGS-AC1 sono state piastrate su vetrini e trattate con  $\text{CuCl}_2$  100  $\mu\text{M}$  e BCS 500  $\mu\text{M}$ . In rosso: TFF1; in verde: Calnexina (a dx) o p58K (a sx); in blu: nuclei cellulari. Le immagini di *merge* mostrano la sovrapposizione tra i segnali rossi e verdi indicando la localizzazione di TFF1 nel Reticolo Endoplasmatico e nel trans-Golgi. Il trattamento con il rame determina una maggiore co-localizzazione di TFF1 con il marker del trans-Golgi.

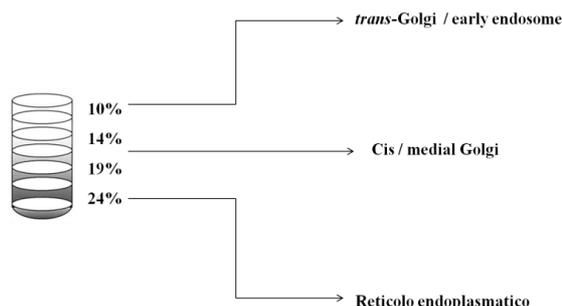
### 2.3.2 Esperimenti di frazionamento cellulare

I risultati ottenuti dalle immunofluorescenze sono da considerarsi informazioni indicative, infatti si sono resi necessari ulteriori approfondimenti al fine di chiarire non solo l'eventuale compartimento preferenziale in cui il fattore trifoglio può localizzare al variare dei livelli di rame ma anche caratterizzare la forma con la quale la proteina si ritrova in tali compartimenti. La verifica delle evidenze ottenute dall'analisi di immagine microscopica è stata eseguita mediante frazionamento cellulare ed immunoblotting.

Il frazionamento cellulare consente la separazione degli organelli cellulari mediante centrifugazione su gradiente di densità con separazione zonale di velocità o isodensità all'equilibrio. In letteratura sono descritti efficienti protocolli di frazionamento, e per gli scopi perseguiti è stata elaborata una procedura di frazionamento in gradiente di densità discontinuo utilizzando il Nycodenz®, un derivato dell'acido benzoico appartenente alla classe dei non-elettroliti iodati. Rispetto al più comune saccarosio, le soluzioni di Nycodenz® conferiscono ai mezzi di frazionamento, una densità adatta a coprire la maggior parte del *range* di densità degli organelli, pur mantenendo una bassa viscosità e osmolarità.

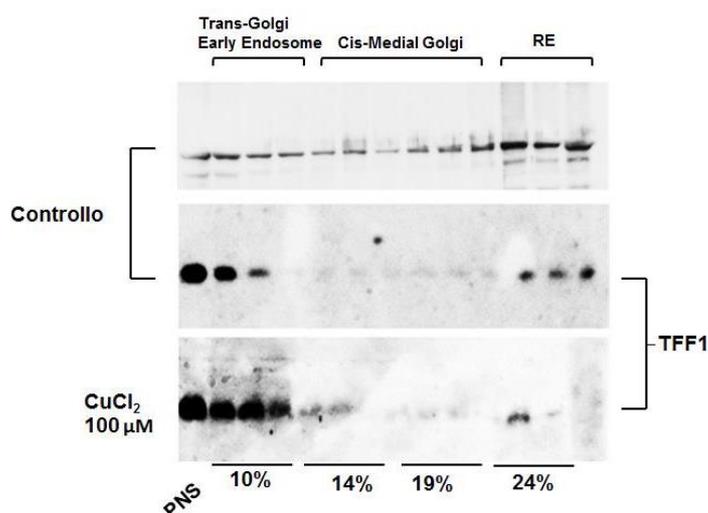
Il frazionamento è stato eseguito su omogenati cellulari di adenocarcinoma gastrico inducibile AGS-AC1, che ha consentito una più facile individuazione della proteina ottenibile in quantità tecnicamente rivelabili per Western blotting nelle diverse frazioni del gradiente. Le cellule, sono state indotte con doxiciclina e contemporaneamente trattate con rame 100  $\mu\text{M}$  per 48 h, al fine di valutare

l'influenza dei livelli di metallo sulla localizzazione sub-cellulare di TFF1. Come descritto nel paragrafo 4.8.2 di Materiali e Metodi, il *Post Nuclear Supernatant* (PNS) ottenuto è stato caricato su un gradiente pre-formato di Nycodenz® e ultracentrifugato, ottenendo la separazione dei diversi organelli cellulari così come riportato dallo schema in figura 2.19.

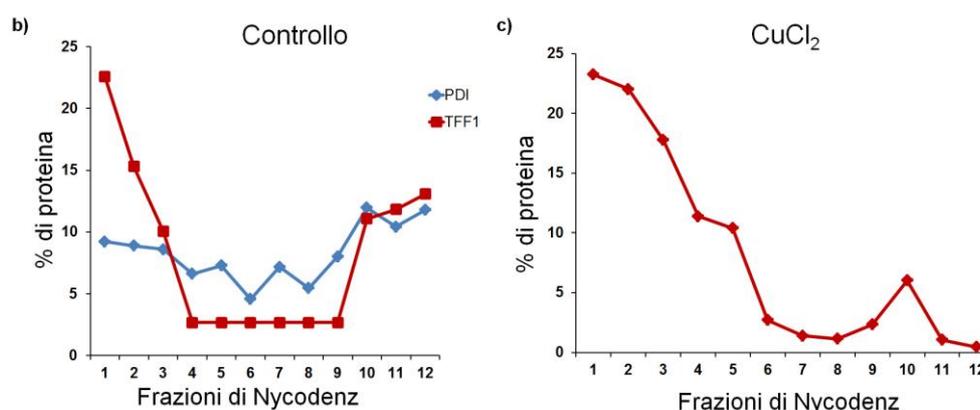


**Figura 2.19** Schematizzazione del frazionamento cellulare su gradiente discontinuo di Nycodenz®.

Le frazioni ottenute sono state analizzate per Western blotting. Per caratterizzare le frazioni sono stati utilizzati diversi anticorpi commerciali diretti contro proteine *marker* dei compartimenti cellulari, ma la scarsa e disomogenea efficienza di molti di loro ha costituito un impedimento per una più puntuale identificazione dei compartimenti. Dall'analisi Western appare evidente che TFF1 si accumula sia nelle frazioni al 10% che in quelle al 24%, che corrispondono rispettivamente al *trans*-Golgi e al Reticolo Endoplasmatico (Figura 2.20-a). Inoltre, dall'analisi densitometrica dei segnali ottenuti si osserva un maggior accumulo della proteina al livello del *trans*-Golgi in condizioni di sovraccarico di rame (Figura 2.21 b-c).



**Figura 2.21-a** Frazionamento cellulare. Analisi Western blotting delle frazioni ottenute mediante frazionamento cellulare su gradiente discontinuo di Nycodenz® effettuato su cellule di controllo e cellule trattate con CuCl<sub>2</sub> 100 µM per 48h.



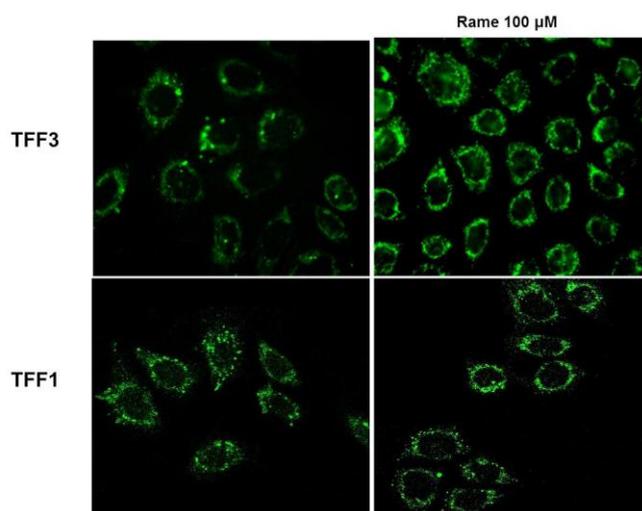
**Figura 2.21 b-c** Frazionamento cellulare. Analisi densitometrica dei segnali ottenuti in condizioni di controllo (b) e in seguito al trattamento con  $\text{CuCl}_2$  100  $\mu\text{M}$  (c). La proteina TFF1 si ritrova nelle frazioni corrispondenti al trans-Golgi e al Reticolo Endoplasmatico. In seguito al trattamento con il rame è evidente il suo accumulo nelle frazioni corrispondenti al trans-Golgi. I valori sono espressi in % rispetto alla quantità di proteina totale caricata sul gradiente.

Come accennato in precedenza, dati presenti in letteratura dimostrano che il trans-Golgi rappresenta uno dei principali siti di acquisizione del metallo da parte delle cupro-proteine. Vista la capacità di TFF1 di legare il rame tramite la sua estremità carbossi-terminale, è ragionevole pensare che l'ipotetico ruolo funzionale dei cuprocomplessi di TFF1 possa avere inizio con la sua sintesi o il suo accumulo nel trans-Golgi in condizioni di sovraccarico di rame.

#### 2.4 Esperimenti di internalizzazione delle proteine ricombinanti esogene

Le proteine trifoglio esplicano la loro attività biologica agendo sia in maniera paracrina che autocrina nell'ambiente cellulare (Taupin *et al.*, 2003). Ad oggi non è noto se tali azioni siano mediate dalla presenza di un recettore specifico per le proteine trifoglio, né se esse debbano essere internalizzate dalle cellule per svolgere la propria funzione. In tale contesto, sono stati eseguiti esperimenti di internalizzazione utilizzando le proteine ricombinanti hrTFF1 e hrTFF3 opportunamente marcate con la molecola fluorescente FITC. La marcatura con fluoroforo consente di osservare, mediante microscopia a fluorescenza, l'eventuale *uptake* cellulare della proteina, nella fattispecie delle proteine TFF da parte delle cellule di adenocarcinoma gastrico AGS, scelte come modello. Le proteine ottenute come descritto nel paragrafo 4.9 di Materiali e Metodi sono state incubate con cellule controllo e cellule pre-trattate per 24 ore con rame. Le cellule sono state quindi fissate sui vetrini ed analizzate al microscopio.

Le immagini raccolte mostrano che le proteine esogene vengono internalizzate dalle cellule, e che in seguito al trattamento con il rame tale processo diventa maggiormente evidente (Figura 2.22).

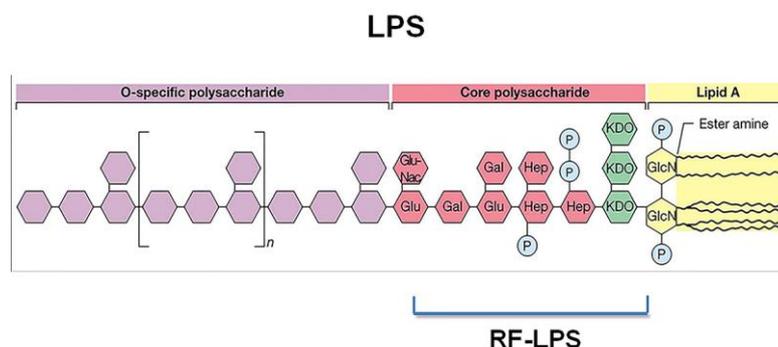


**Figura 2.22** Esperimenti di internalizzazione. Le proteine ricombinanti TFF1 e TFF3 marcate con FITC sono state incubate per 2h con cellule di adenocarcinoma gastrico AGS *wild-type* pretrattate per 24 ore con  $\text{CuCl}_2$  100  $\mu\text{M}$ . Si osserva l'internalizzazione delle proteine (in verde), maggiormente evidente in cellule trattate con rame.

I risultati ottenuti forniscono una indicazione sulle modalità attraverso le quali le proteine trifoglio possono svolgere la loro attività biologica e lasciano ipotizzare la presenza di un meccanismo che comprenda la loro internalizzazione che potrebbe coinvolgere un recettore specifico. Il rame sembra favorire il processo di internalizzazione, che potrebbe essere stimolato dal cambio conformazionale della proteina indotto dal metallo attraverso un putativo recettore di membrana. Tale ipotesi supportata dalle evidenze mostrate necessita di ulteriori approfondimenti per una più accurata individuazione delle componenti in gioco nel processo di *uptake* delle proteine trifoglio e del ruolo giocato dal metallo.

### **2.5 Il coinvolgimento dell'estremità carbossiterminale di TFF1 nel legame con i lipopolisaccaridi di *Helicobacter pylori***

È ormai noto che la proteina TFF1 ha un ruolo attivo nel mediare l'adesione del batterio patogeno *Helicobacter pylori* alle mucose gastriche (Clyne *et al.*, 2004). Studi più approfonditi (Reeves *et al.*, 2008) hanno consentito di identificare i dettagli molecolari dell'interazione con la forma dimerica della proteina trifoglio, ed è stato mostrato che TFF1 interagisce specificamente con le forme a basso peso molecolare dei lipopolisaccaridi (rough form RF-LPS) di *H. pylori* (figura 2.23).



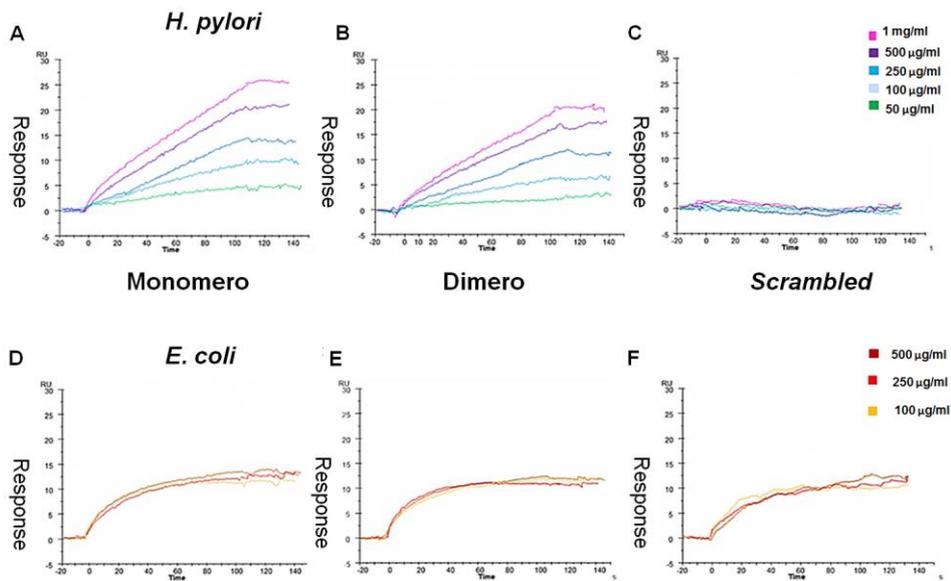
**Figura 2.23** Rappresentazione schematica dei lipopolisaccaridi di *H. pylori*. In evidenza la forma a basso peso molecolare (RF-LPS)

In seguito ad esperimenti di infezione *in vitro* condotti sul clone cellulare di adenocarcinoma gastrico AGS-AC1, è emerso che, in presenza di TFF1, i trattamenti con il rame incrementano i livelli di colonizzazione di *H. pylori* (Montefusco *et al.*, 2013). Tale evidenza, unitamente a quanto già riportato sulla attività del rame nella promozione della forma dimerica di TFF1 e sulla affinità di *H. pylori* per la stessa forma dimerica, ha suggerito un naturale sillogismo nel disegno sperimentale finalizzato ad evidenziare e chiarire l'eventuale ruolo del metallo nei meccanismi di adesione del batterio alla parete gastrica. Considerando che è l'estremità carbossiterminale del peptide trifoglio ad avere le caratteristiche adatte all'interazione con il metallo, è stato ipotizzato che proprio tale regione della proteina potesse essere coinvolta nel legame con gli LPS.

Per verificare la nostra ipotesi di lavoro, sono stati eseguiti saggi di risonanza plasmonica di superficie (*Biacore3000*) per caratterizzare l'interazione biomolecolare degli LPS con la regione C-terminale della proteina TFF1. A tal fine sono stati utilizzati peptidi sintetici biotinilati rappresentativi degli ultimi 16 amminoacidi della sequenza nativa della proteina. Il peptide con sequenza nativa ed il controllo con sequenza *scrambled* sono stati incubati con un eccesso di rame per promuovere la formazione della forma dimerica; le forme monomeriche e dimeriche ottenute sono state separate mediante HPLC ed analizzate mediante spettrometria di massa MALDI. La biotinilazione dei peptidi ha consentito la loro immobilizzazione sulla superficie di un sensor chip SA sul quale sono state fatte fluire le soluzioni di RF-LPS a concentrazioni crescenti.

Dall'analisi dei sensorgrammi ottenuti (figura 2.24) si osserva un aumento del legame degli LPS sulla superficie del chip derivatizzata con i peptidi nativi in forma monomeriche e dimeriche, proporzionale alla quantità di LPS iniettati. D'altra parte non si osserva legame sulla superficie derivatizzata con la forma *scrambled*, confermando quindi la specificità di interazione tra i lipopolisaccaridi di *H. pylori* e l'estremità carbossiterminale di TFF1. Come controllo negativo sono state utilizzate soluzioni a concentrazione crescente di LPS estratti da *Escherichia coli* e l'assenza di legame,

come mostrato dai sensorgrammi in figura 2.24, evidenzia la selettività di legame tra la sequenza di TFF1 e gli LPS di *H. pylori*.



**Figura 2.24** Esperimenti di risonanza plasmonica di superficie (SPR). Analisi dell'interazione delle forme di LPS a basso peso molecolare di *H.pylori* con il peptide sintetico biotinitato *wild-type* rappresentativo degli ultimi 16 amminoacidi di TFF1 in forma monomerica (A) dimerica (B) e con il peptide sintetico biotinitato *scrambled* (C) e interazione delle suddette forme (D,E,F) con gli LPS di *E.coli*.

Questo risultato consente di ipotizzare quantomeno un effetto sinergico TFF1/Cu per giustificare la maggiore colonizzazione di *H. pylori* osservata *in vitro* in presenza di rame e TFF1. Infatti il catione metallico promuovendo la formazione del dimero di TFF1 e causando un cambiamento conformazionale nella struttura della proteina potrebbe aumentare l'affinità di legame con i lipopolisaccaridi del batterio patogeno.

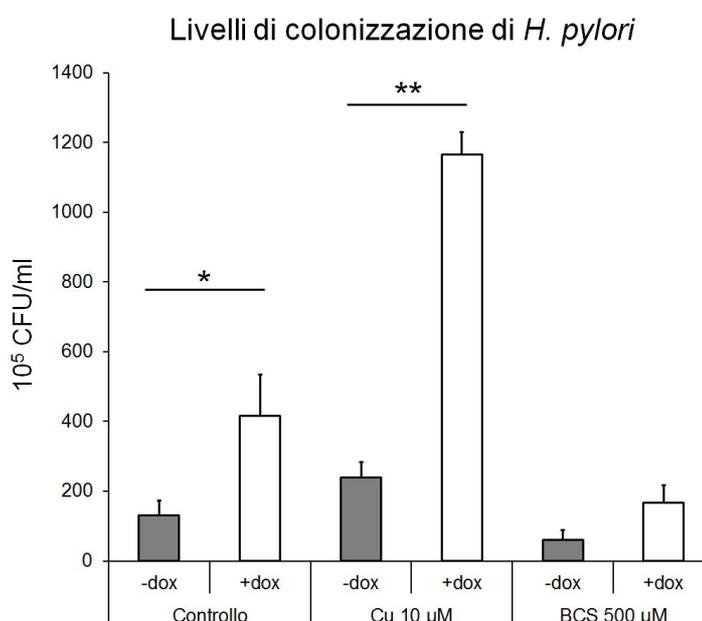
## 2.6 Esperimenti di colonizzazione di *H. pylori in vitro*

La capacità dell'estremità carbossiterminale di mediare l'interazione con i lipopolisaccaridi di *H. pylori* ha suggerito di estendere l'indagine sul suo ruolo nei meccanismi di infezione cellulare.

Innanzitutto è stato necessario mettere a punto le condizioni ottimali per la crescita del batterio, microorganismo microaerofilo, e le condizioni di colonizzazione di cellule eucariote. Ottimizzate tali condizioni, il primo obiettivo è stato quello di riprodurre gli esperimenti di infezione *in vitro* condotti dal Dott. Montefusco, presso il laboratorio di microbiologia della Prof.ssa Clyne dell'Università di Dublino, dai quali è

emerso che in presenza di TFF1, il batterio patogeno acquisisce una maggiore capacità di colonizzare cellule pre-trattate con rame (Montefusco *et al.*, 2013).

A tal fine, è stato utilizzato il clone cellulare di adenocarcinoma gastrico AGS-AC1. Cellule controllo e cellule indotte sono state pre-trattate con il rame o con il suo chelante. Dopo 48 ore di trattamento le cellule sono state infettate per due ore a 37 °C in ambiente microaerofilo con la sospensione batterica di *H. pylori*. Al termine, dopo accurato lavaggio ed allontanamento dei batteri non adesi, le cellule sono state trattate con tripsina al fine di provocare il rilascio e raccogliere i batteri adesi sulla superficie cellulare. I microorganismi raccolti sono stati quindi serialmente diluiti e seminati per la conta su terreno selettivo semisolido in agar ed incubati per 3-4 giorni a 37 °C. L'entità dell'infezione per ciascun trattamento è stata espressa come *Colony Forming Unit* (CFU) (Figura 2.25).



**Figura 2.25** Analisi dell'infezione di *H. pylori* in cellule AGS-AC1. Cellule indotte (+dox) e non indotte (-dox) ad esprimere TFF1 sono state trattate per 48 ore con  $\text{CuCl}_2$  10  $\mu\text{M}$  o BCS 500  $\mu\text{M}$  prima di essere infettate con il ceppo P12 di *Helicobacter pylori* per 2 ore a 37 °C. In presenza di TFF1, in seguito al trattamento con il rame, si assiste ad un aumento dei livelli di colonizzazione cellulare del batterio patogeno. t-test: \* p-value < 0.05 \*\* p-value < 0.01

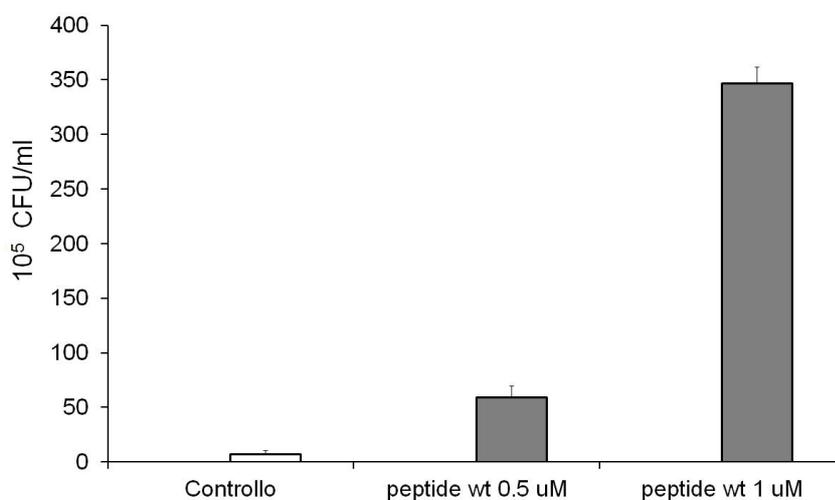
I dati ottenuti hanno confermato che il rame determina un aumento di colonizzazione del batterio patogeno dipendente dalla presenza di TFF1.

Al fine di confermare o escludere il coinvolgimento della regione C-terminale di TFF1 nei meccanismi di colonizzazione di *H. pylori*, la sospensione del batterio patogeno è stata pre-incubata con due differenti concentrazioni (0,5 e 1  $\mu\text{M}$ ) di una soluzione di peptide sintetico pTFF in forma dimerica. Tali miscele sono servite per

infettare secondo la procedura descritta il clone AGS-AC1 in assenza di induzione con doxiciclina.

Il risultato del conteggio delle colonie ha mostrato che in presenza del peptide sintetico *pTFF* alle diverse concentrazioni si ha un incremento scalare nei livelli di colonizzazione di *H. pylori* (figura 2.26), attribuendo in tal modo un ruolo positivo della regione C-terminale della proteina nei meccanismi di adesione.

Livelli di colonizzazione di *H. pylori*



**Figura 2.28** Analisi del ruolo dell'estremità carbossiterminale di TFF1 in esperimenti di infezione di *H. pylori* in cellule AGS-AC1. Cellule non indotte (-dox) ad esprimere TFF1 sono state infettate con una sospensione batterica del ceppo P12 di *Helicobacter pylori*, pre-incubata con soluzioni di peptide sintetico *wild-type* (0,5 e 1  $\mu$ M) rappresentativo dell'estremità carbossiterminale di TFF1. Si osserva un aumento dei livelli di colonizzazione del batterio patogeno incubato con il peptide rispetto a cellule controllo infettate con la sospensione batterica tal quale.

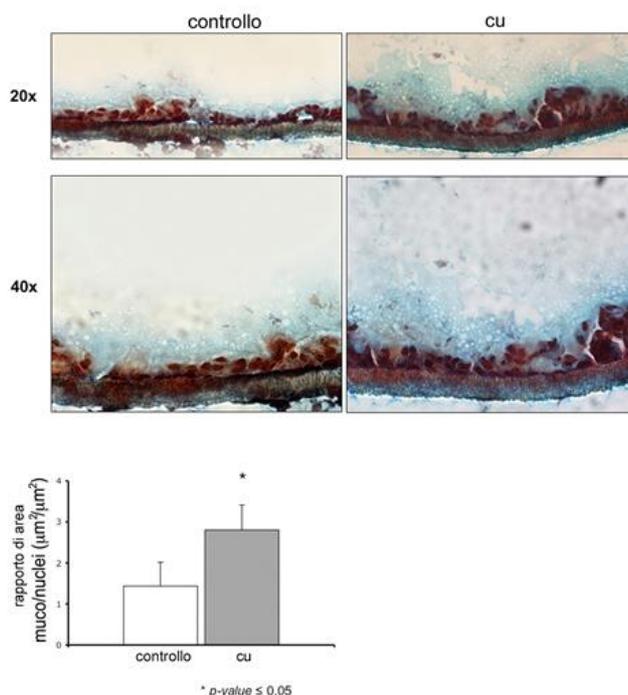
## 2.7 Caratterizzazione reologica del muco prodotto da cellule HT29- E12

Lo strato di gel mucoso, che ricopre la superficie degli epitelii gastrici dallo stomaco al colon, costituisce la prima linea di difesa contro agenti nocivi, microorganismi ed insulti meccanici che il tratto gastrointestinale subisce costantemente. Le qualità protettive del gel mucoso dipendono dalla sua stabilità e dalla sua composizione. TFF1, così come gli altri peptidi trifoglio, è uno dei costituenti del muco che riveste gli epitelii cellulari. È stato dimostrato che TFF1 è in grado di incrementare la viscoelasticità del gel mucoso, sostenendo quindi il suo ruolo di agente protettivo nella fisiologia del tratto gastrointestinale (Thim *et al.*, 2002). In particolare, è la forma dimerica della proteina che, in associazione ad una delle principali mucine secrete, MUC5AC, svolge tale compito (Ruchaud-Sparagano *et al.*, 2004).

Naturalmente le proprietà del gel mucoso influenzano la capacità di adesione dei microorganismi che entrano in contatto con l'apparato digerente. Tale influenza assume un particolare rilievo nei meccanismi di colonizzazione di *Helicobacter pylori*. È noto che il batterio patogeno co-localizza con la MUC5AC nello strato mucoso (Van Den Brink *et al.*, 2000) e che, come già riportato, è in grado di interagire con la forma dimerica di TFF1.

Un valido modello per lo studio dei meccanismi di infezione *in vitro*, che tiene conto anche della componente di mucine e fattori trifoglio, fondamentali nelle fasi di colonizzazione del batterio patogeno, è rappresentato dal clone di cellule intestinali goblet HT29-E12. Tale linea cellulare deriva dalle HT29, caratterizzate dal 95% di cellule indifferenziate e solo da una piccola percentuale di cellule deputate alla secrezione di mucine (Lesuffleur *et al.*, 1990). Trattando queste cellule con Metotressato è stata ottenuta una popolazione omogenea di cellule goblet (HT29-E12) deputata alla secrezione di mucine e fattori trifoglio (Lesuffleur *et al.*, 1993).

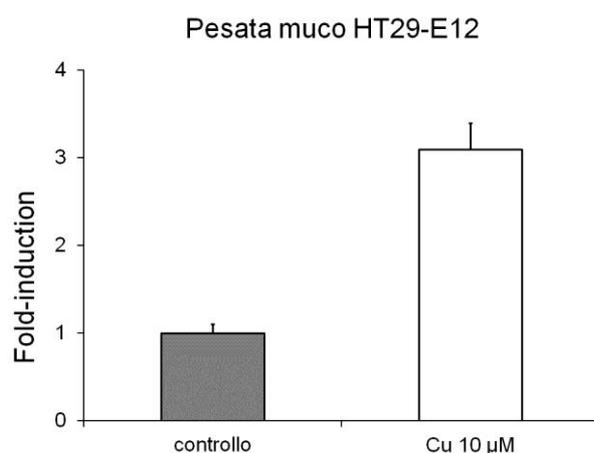
Questo modello cellulare ha reso possibile dimostrare che il trattamento con rame provoca un incremento di colonizzazione di *Helicobacter pylori* rispetto a cellule controllo ed un sensibile ispessimento dello strato mucoso (figura 2.29) che si accumula sulla superficie cellulare (Montefusco *et al.*, 2013), probabilmente determinando un incremento di siti di legame per il batterio sulle mucose.



**Figura 2.29** Colorazione Alcian Blu / Neutral Red. La colorazione evidenzia in blu le secrezioni mucose e in rosso lo strato di cellule goblet. Si osserva un incremento di spessore dello strato mucoso nei campioni trattati con il rame. Il grafico riporta il rapporto tra l'area delle secrezioni mucose ed i nuclei rispettivamente nel controllo e nei campioni trattati con rame. I valori si riferiscono alla media di tre differenti immagini (Montefusco *et al.*, 2013)

I dati in nostro possesso indicano che il rame ha un effetto positivo sui meccanismi di colonizzazione di *H. pylori*, probabilmente promuovendo la dimerizzazione della proteina trifoglio, che in tale forma non solo è in grado di interagire con il batterio ma anche di svolgere una attività di modulatrice delle caratteristiche reologiche del muco in associazione con la mucina MUC5AC.

Nostri dati preliminari indicano che il muco proveniente da cellule HT29-E12 trattate per 72 ore con rame appare, ad una prima osservazione visiva, più corposo e presente in quantità maggiori, rispetto ai campioni di controllo. Tale osservazione è stata confermata dai valori delle pesate (figura 2.30)

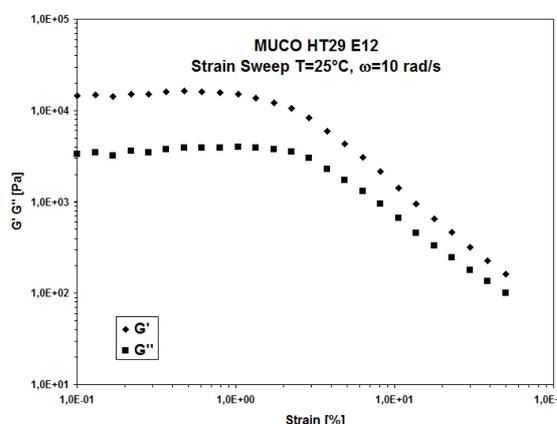


**Figura 2.30** Pesata dei campioni di muco provenienti dal clone cellulare HT29-E12. Il trattamento con il rame determina un aumento nella produzione di muco, che si accumula sulla superficie cellulare.

Considerata l'importanza di caratterizzare eventuali condizioni capaci di modificare le caratteristiche protettive del muco è stato eseguito uno studio dei parametri viscoelastici del gel mucoso prodotto *in vitro* da cellule HT29-E12 in relazione alle perturbazioni introdotte dal trattamento con rame e TFF1.

Le cellule HT29-E12 sono state coltivate in piastra per circa 30 giorni, dopo il raggiungimento della confluenza, per ottenere una sufficiente produzione e accumulo di muco sulla superficie cellulare. Il muco proveniente da 10 piastre è stato raccolto in PBS, centrifugato e dal pellet ottenuto è stata allontanata la soluzione salina per evitare che la sua presenza influenzasse le successive misure reologiche.

L'analisi reologica è stata condotta utilizzando il reometro rotazionale Physica MCR-301 (*Anton-Paar*). Per determinare il limite di viscoelasticità lineare ( $\gamma_c$ ) sono state eseguite misure al variare dell'ampiezza della deformazione ("Strain Sweep Tests") ad una fissata frequenza. Sono state, poi, eseguite misure al variare della frequenza ("Frequency Sweep Tests") utilizzando un valore per l'ampiezza della deformazione minore di  $\gamma_c$ , tale, cioè, da mantenere il campione esaminato in condizioni di viscoelasticità lineare. Mediante tali misure vengono determinati il modulo elastico ( $G'$ ), il modulo viscoso ( $G''$ ) e la viscosità complessa ( $\eta^*$ ) dei campioni esaminati. In Figura 2.31 è riportato l'andamento del modulo elastico ( $G'$ ) e viscoso ( $G''$ ) in funzione della deformazione alla frequenza di 10 rad/s ed alla temperatura di 25 °C per il campione di muco proveniente da cellule di controllo tenute in coltura per 30 giorni.

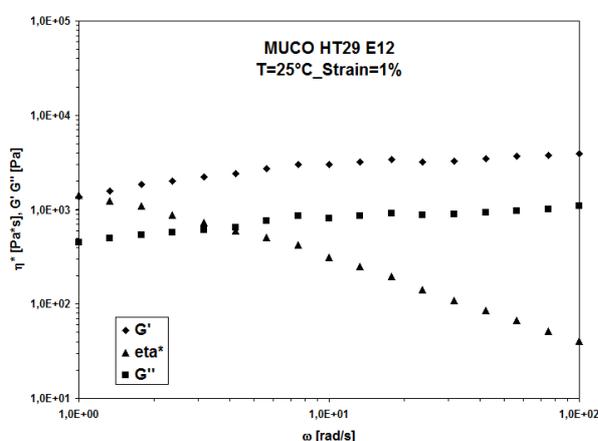


**Figura 2.31** Strain Sweep test.  $G'$  e  $G''$  del campione di muco prelevato dopo 30 giorni dal raggiungimento della confluenza, in funzione della deformazione applicata

Si osserva che i moduli  $G'$  e  $G''$  sono costanti fino ad un valore di deformazione critica  $\gamma_c \sim 2\%$ , che definisce appunto il limite di viscoelasticità lineare. Tale valore di  $\gamma_c$  è molto inferiore rispetto a quelli tipici dei polimeri flessibili, mentre risulta confrontabile con i valori di deformazione critica generalmente misurati per i gel e i sistemi strutturati.

Oltre tale valore di ampiezza della deformazione, i moduli  $G'$  e  $G''$  diminuiscono indicando un comportamento non lineare. Nelle successive misure effettuate al variare della frequenza si è scelto il valore di *strain* pari all'1%, garantendo, così, il comportamento di viscoelasticità lineare per il materiale in esame.

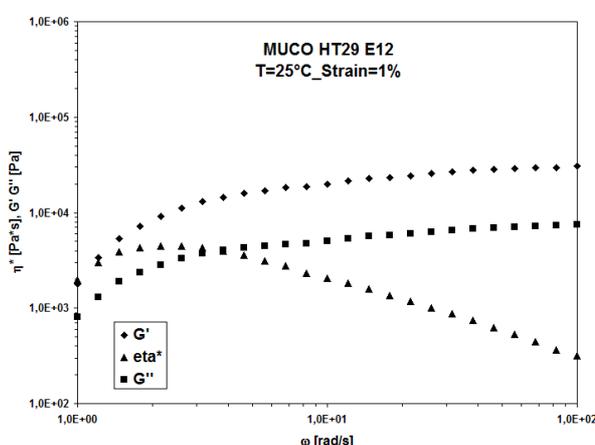
Utilizzando un'altra aliquota di campione, è stata, quindi, analizzata la risposta in frequenza del campione di muco di controllo. In Figura 2.32 sono riportati i valori dei moduli  $G'$  e  $G''$  al variare della frequenza dell'oscillazione applicata,  $\omega$ . I risultati ottenuti rivelano che il sistema analizzato è un gel. Infatti, i moduli  $G'$  e  $G''$  sono paralleli e quasi costanti al variare della frequenza. Si osserva, inoltre, che nell'intervallo di frequenza analizzato  $G'$  è molto maggiore di  $G''$ , ovvero il contributo elastico prevale sul contributo viscoso nel campo di frequenze applicate.



**Figura 2.32** Frequency sweep test.  $G'$  e  $G''$  per il campione di muco prelevato dopo 30 giorni dal raggiungimento della confluenza, in funzione della frequenza applicata

La viscosità complessa diminuisce all'aumentare di  $\omega$  in tutto il campo analizzato. Le caratteristiche appena illustrate permettono di affermare che i gel analizzati sono classificabili come *strong gels*.

Inoltre, è stata anche eseguita una misura al variare della frequenza sul primo campione sottoposto precedentemente alla storia di deformazione indicata in figura 2.31, che aveva subito deformazioni con ampiezze tali da indurre una risposta viscoelastica non lineare. I risultati, riportati in Fig. 2.33, rivelano che i valori dei moduli  $G'$  e  $G''$  aumentano sensibilmente all'aumentare della frequenza applicata nella prima zona della misura "Frequency Sweep". Tale comportamento può essere attribuito alla ricostituzione della struttura del gel, alterata dalla precedente misura di "Strain Sweep".



**Figura 2.33** Frequency sweep test.  $G'$  e  $G''$  per il campione di muco prelevato dopo 30 giorni dal raggiungimento della confluenza, in funzione della frequenza applicata. Il campione è stato precedentemente sottoposto alla misura in funzione della deformazione (fig.2.31).

Si è ottenuta quindi una prima caratterizzazione del materiale biologico che si è accumulato sulle cellule per circa 30 giorni dal raggiungimento della confluenza.

In seguito all'allontanamento di questa prima massiva produzione di muco, le cellule sono state trattate per 72 ore con una soluzione di rame  $10\ \mu\text{M}$  per valutare l'effetto del metallo sulla strutturazione del muco di nuova sintesi. Il muco è stato prelevato come precedentemente descritto e sottoposto ai medesimi test per caratterizzarne le proprietà viscoelastiche.

Il campione di controllo ("Controllo 72h") e quello trattato con rame ("Rame 72h") sottoposti allo *strain sweep test* hanno mostrato un comportamento di viscoelasticità lineare fino ad una deformazione, rispettivamente, di circa l'8% e il 10%, oltre tale valore i moduli diminuiscono indicando un comportamento non lineare (figura 2.34).

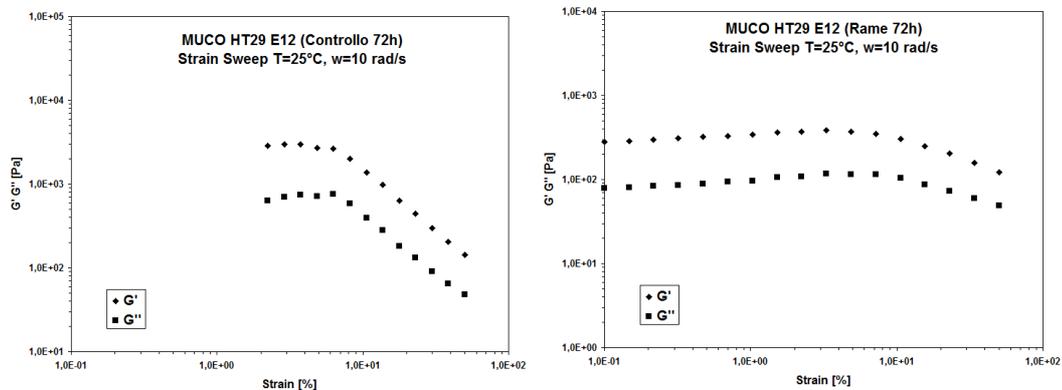
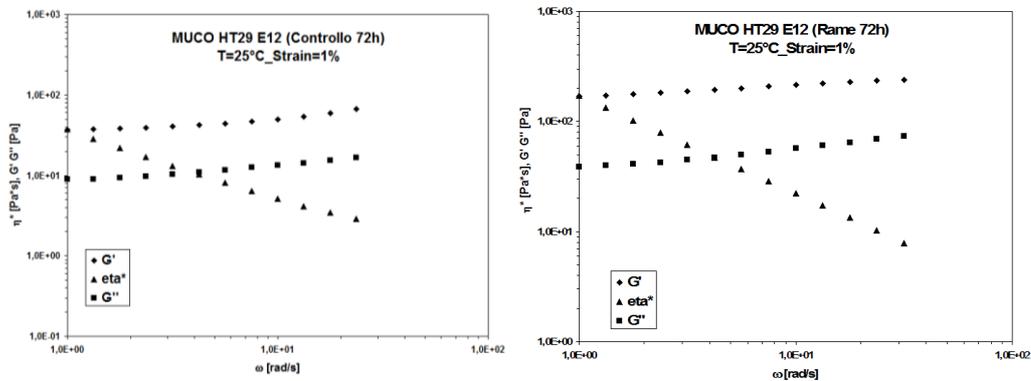


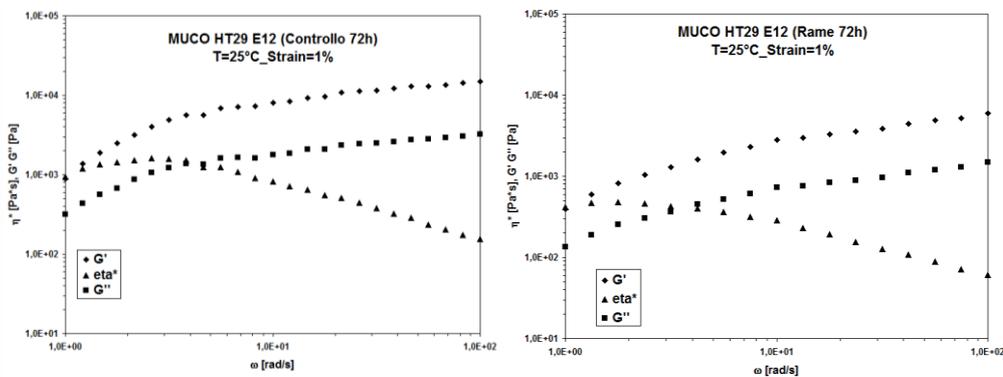
Figura 2.34 Strain Sweep test.  $G'$  e  $G''$  per i campioni di muco "Controllo 72h" e "Rame 72h"

Una nuova aliquota di ciascun campione è stata, quindi, sottoposta alla misura in variazione di frequenza utilizzando un'ampiezza della deformazione pari all'1%. L'andamento del modulo elastico,  $G'$ , e del modulo dissipativo,  $G''$ , in funzione della frequenza dell'oscillazione applicata, riportato in figura 2.35, rivela che anche questi sistemi analizzati sono un gel. Infatti, i moduli  $G'$  e  $G''$  sono paralleli e quasi costanti al variare della frequenza. La viscosità complessa diminuisce all'aumentare di  $\omega$  in tutto il campo analizzato. È stato osservato innanzitutto che tali campioni risultano differenti dal campione di muco proveniente dai 30 giorni di coltura. I valori di  $\gamma_c$ , misurati per i campioni di muco "Controllo 72h" e "Rame 72h" risultano, infatti, ben più elevati rispetto al valore del 2% del campione di muco prelevato dopo 30 giorni dal raggiungimento della confluenza,. Inoltre, i valori di  $G'$  e  $G''$  per i campioni provenienti dalle 72h di coltura sono di circa un ordine di grandezza inferiori rispetto ai valori misurati per il sistema precedente. I risultati ottenuti indicano, quindi, che i campioni provenienti dalle 72 ore sono un gel di struttura meno rigida rispetto al muco che era stato ottenuto dopo 30 giorni. Confrontando poi i valori dei moduli  $G'$  e  $G''$  del campione di controllo e di quello derivato dal trattamento con il rame, appare che il gel "Rame 72h" è caratterizzato da valori dei moduli più alti del corrispondente gel non trattato con il rame. Alla luce dei primi risultati ottenuti sembra, quindi, che il trattamento con il rame comporti la formazione di un gel più rigido del corrispondente gel non trattato con il rame.



**Figura 2.35** Frequency sweep test.  $G'$  e  $G''$  per i campioni di muco “Controllo 72h” e “Rame 72h” in funzione della frequenza applicata.

Anche in questo caso è stata eseguita una misura al variare della frequenza sugli stessi campioni che avevano subito deformazioni con ampiezze tali da indurre una risposta viscoelastica non lineare. I risultati (figura 2.36) rivelano che i valori dei moduli  $G'$  e  $G''$  aumentano sensibilmente all'aumentare della frequenza applicata nella prima zona della misura “*Frequency Sweep*”. Tale comportamento può essere attribuito alla ricostituzione della struttura del gel, alterata dalla precedente misura di “*Strain Sweep*”, analogamente a quanto discusso per il campione precedente.



**Figura 2.36** Frequency sweep test.  $G'$  e  $G''$  per i campioni di muco “Controllo 72 h” e “rame 72 h” in funzione della frequenza applicata. I campioni erano stati precedentemente sottoposto alla misura in funzione della deformazione (Fig.2.34).

I dati ottenuti indicano che il catione metallico *in vitro* è in grado di influenzare le caratteristiche reologiche del muco.

## CAPITOLO 3

### DISCUSSIONE

Il tratto gastrointestinale, data la sua natura di interfaccia con l'ambiente esterno spesso aggressivo, è continuamente sottoposto ad insulti sia chimici che meccanici che ne minano la stabilità e la funzionalità. Sebbene la presenza di un sistema immunitario in grado di rispondere selettivamente e specificamente sia fondamentale nella difesa del tratto gastrointestinale contro le potenziali minacce, tale sistema si attiva solo dopo che l'integrità della superficie mucosale è già stata compromessa. I meccanismi di protezione primaria che agiscono a monte del sistema immunitario, quindi, assumono un ruolo di particolare rilievo nel mantenimento della fisiologia dell'apparato gastrico. Numerosi studi hanno fornito una panoramica dei processi chiave che intervengono nella protezione della mucose gastriche ed è diventato chiaro che gli stessi fattori che proteggono la mucosa dalle lesioni, giocano un ruolo critico nel facilitare la riparazione dell'epitelio dopo il verificarsi delle stesse. In aggiunta alle caratteristiche strutturali delle cellule epiteliali, che fungono da barriera, è stata accertata la presenza di un compartimento pre-epiteliale rappresentato dallo strato di muco che ricopre gli epitelii e composto da prodotti secreti dall'epitelio stesso, quali glicoproteine e fattori di crescita che svolgono un ruolo essenziale nella protezione delle mucose gastriche. Tra i prodotti secreti ritroviamo il peptide trifoglio TFF1, appartenente ad una classe di fattori gastrointestinali che, in condizioni fisiologiche, intervengono attivamente nei meccanismi di protezione e rigenerazione delle mucose gastriche fungendo da elementi di "sorveglianza luminale".

Nonostante in questi ultimi anni siano stati dedicati numerosi studi alla caratterizzazione delle funzioni biologiche di TFF1 in contesti fisio-patologici, sono ancora molti i quesiti ai quali non è stato possibile dare una risposta.

La premessa del mio lavoro di tesi di dottorato è rappresentata dall'analisi della struttura del peptide trifoglio, che per prima suggerì una diretta interazione tra Cu e TFF1, a seguito della osservazione di una regolazione trascrizionale della proteina dipendente da carenze nutrizionali di rame. La capacità della proteina di legare il rame in una regione coinvolta nella formazione del dimero di TFF1 (Tosco *et al.*, 2010), forma responsabile delle attività biologiche più studiate della proteina, ha suggerito di indagare sulla capacità dell'omodimero di interagire specificamente con il catione metallico. Studi di spettrometria di massa in condizioni native ESI-MS, eseguiti sulla proteina ricombinante in forma dimerica incubata con un eccesso di rame e di altri cationi metallici, hanno consentito di confermare la selettività di legame anche tra il dimero di TFF1 e il metallo. Utilizzando la tecnica della calorimetria isoterma di titolazione è stato inoltre possibile ottenere indicazioni sui parametri termodinamici relativi alla formazione del complesso rame-dimero, focalizzando l'attenzione, con l'uso di un peptide sintetico dimerico, alla regione C-terminale della

proteina (16 aa). Il valore della costante di dissociazione ottenuto, di dimensione nanomolare, evidenzia una rilevante affinità del peptide per il catione metallico. Tale dato risulta significativo ed è preliminare alla estensione dell'analisi all'intera proteina e a sostenibili deduzioni di eventuali implicazioni funzionali. Inoltre, estendendo l'indagine ad un altro membro della famiglia dei fattori trifoglio, la proteina TFF3, è emerso che anche essa è in grado di legare selettivamente il rame. I dati ottenuti, confermano, quindi, la specificità di legame con il metallo e corroborano l'ipotesi di un coinvolgimento del rame nella biochimica dei fattori trifoglio.

Nella normale mucosa gastrica la forma prevalente di TFF1 è quella eterodimerica legata alla proteina TFIZ1 (Newton *et al.*, 2000). È quindi immaginabile che un fine equilibrio tra la forma monomerica, eterodimerica e omodimerica di TFF1 possa essere modulato in risposta a differenti stimoli. È noto che il rame è in grado di regolare alcuni dei molteplici fattori coinvolti nel processo di rimarginazione delle lesioni, favorendo la proliferazione cellulare e la formazione di nuovi vasi sanguigni e, alla luce del coinvolgimento del peptide trifoglio proprio in tali processi, l'equilibrio tra le diverse forme del peptide potrebbe essere modulato dal catione metallico. Studi pregressi indicano che il rame favorisce la formazione dell'omodimero di TFF1 in differenti linee cellulari (Tosco *et al.*, 2010). Il metallo, interagendo con la forma monomerica della proteina, potrebbe mediare l'avvicinamento di una seconda molecola, favorendo così la sua dimerizzazione..

Considerata l'importanza della modulazione delle forme oligomeriche sulla funzionalità di TFF1, il presente studio ha inoltre indagato sul processo di maturazione dell'omodimero nel *pathway* di secrezione, e sulla influenza del rame su questo processo. È emerso che la dimerizzazione è un evento che precede la secrezione della proteina, un dato non sorprendente considerando che i principali siti di formazione dei ponti disolfuro sono rappresentati dal reticolo endoplasmatico e, per alcune proteine, dal compartimento trans dell'apparato di Golgi, che rappresenta inoltre uno dei siti in cui le cuproproteine acquisiscono il catione metallico necessario per la loro strutturazione e funzionalità (Nittis and Gitlin, 2004; Hellman *et al.*, 2002). In base a tali considerazioni è stato analizzato il processo di secrezione della proteina trifoglio, anche in relazione ai livelli di rame disponibili. I risultati ottenuti indicano che il trattamento di cellule gastriche con il rame determina una ridotta secrezione della proteina trifoglio, che si ritrova accumulata all'interno della cellula. In seguito ad esperimenti di co-localizzazione e frazionamento cellulare è emerso che il principale sito di accumulo della proteina in condizioni di sovraccarico di rame è rappresentato dal trans-Golgi *network*. Ad oggi, non è nota la presenza di recettori cellulari specifici che siano coinvolti nell'attività biologica dei fattori trifoglio ma l'evidenza che la forma dimerica della proteina TFF1 sia quella maggiormente attiva, lascia ipotizzare che tale forma sia quella preferenzialmente coinvolta nell'interazione con un ipotetico recettore. Lo studio della internalizzazione *in vitro* eseguito utilizzando la proteina ricombinante in forma dimerica hrTFF1 e la proteina monomerica hrTFF3, marcate con la molecola fluorescente FITC, hanno consentito di osservare sia l'effettivo *uptake* cellulare delle proteine trifoglio sia l'effetto positivo del rame sulla internalizzazione.

Da misure di assorbimento atomico eseguite nel nostro laboratorio sul clone cellulare di adenocarcinoma gastrico indotto ad esprimere TFF1, è stato osservato

che la presenza della proteina riduce la velocità di escrezione del metallo, lasciando supporre un possibile effetto sequestrante di TFF1 ed una maggiore capacità cellulare nel mantenimento del metallo all'interno della cellula per tempi più lunghi. Nonostante siano necessari ulteriori approfondimenti, le evidenze sperimentali ottenute lasciano ipotizzare un coinvolgimento del peptide TFF1 nei meccanismi di omeostasi del metallo. L'elevata affinità della proteina trifoglio per il rame, potrebbe contribuire alla captazione del metallo in ambiente extracellulare, favorendo il suo *uptake* a seguito di interazione con sistemi di internalizzazione. Al contrario, la ritenzione del peptide all'interno della cellula potrebbe contribuire ai meccanismi di controllo dei livelli di metallo, in collaborazione con i noti fattori di regolazione dei livelli di rame, quali chaperon e trasportatori.

I nuovi interrogativi posti dalle evidenze fin qui ottenute e che sostanziano nuove ipotesi di studio, giustificano la determinazione per un approfondimento di indagine, che probabilmente consentirà di chiarire nuove funzioni di protezione cellulare, al momento solo intuibili, legate alla regolazione dei livelli dell'oligoelemento nel distretto gastrointestinale deputato all'assorbimento di nutrienti.

Altro interessante aspetto affrontato dal presente lavoro ha riguardato la interazione tra la forma dimerica di TFF1 e il batterio *Helicobacter pylori*, evidenziata per la prima volta nel 2004 dalla Prof.ssa Clyne dell'Università di Dublino. È stato osservato che la proteina dimerica interagisce selettivamente con la forma rugosa dei lipopolisaccaridi di *H. pylori* (Reeves *et al.*, 2008), mediando così la sua interazione con le mucose gastriche. Nostri dati pubblicati nel 2013, hanno mostrato un aumento dei livelli di colonizzazione da parte del batterio patogeno in cellule gastriche pre-trattate con il rame, in presenza di TFF1 (Montefusco *et al.*, 2013). La necessità di chiarire il ruolo giocato dal rame in tale processo, ha determinato l'ampliamento della nostra analisi alla interazione tra i lipopolisaccaridi a basso peso molecolare estratti dal batterio patogeno e l'estremità carbossiterminale di TFF1, dato il dimostrato interessamento di tale regione nel legame con il rame seguito da cambi conformazionali. I risultati ottenuti indicano che il peptide sintetico di sequenza nativa, rappresentativo della regione C-terminale di TFF1, è in grado di interagire con gli LPS di *H. pylori* e di mediare l'adesione batterica in un sistema di infezione *in vitro*, in assenza di proteina endogena. Ulteriori studi strutturali e funzionali saranno necessari per caratterizzare il complesso LPS/TFF1 e l'influenza del rame sulla sua attività. I dati ottenuti rappresentano comunque un primo passo verso la comprensione di un possibile meccanismo usato dal batterio per perseguire la sua strategia di colonizzazione, e potranno consentire lo sviluppo di strumenti più mirati e selettivi per prevenire la colonizzazione batterica.

La capacità di TFF1 di legare i lipopolisaccaridi del batterio rappresenta la prima dimostrazione che la proteina è in grado di interagire con i carboidrati attraverso la sua regione C-terminale. In prospettiva, tale evidenza consente di disegnare una sperimentazione più mirata ad evidenziare eventuali interazioni con proteine e/o recettori glicosilati di membrana, considerando al contempo l'importanza del rame nella modulazione strutturale della proteina e sull'eventuale effetto sulla sua affinità di legame

Il batterio patogeno, grazie alla presenza di TFF1 nelle mucose gastriche dello stomaco, localizza prevalentemente nello strato di muco che ricopre gli epitelii, e qui il

suo movimento è influenzato dalle caratteristiche di viscoelasticità del gel mucoso. Tali proprietà sono strettamente connesse alla specifica associazione di mucine e fattori trifoglio. In particolare, il dimero di TFF1 interagisce con la mucina secreta MUC5AC, catalizzando la formazione di complessi di mucine (Thim *et al.*, 2002) e conferendo quindi caratteristiche di maggiore stabilità al gel mucoso. Allo scopo di analizzare l'influenza del rame sulla strutturazione del gel mucoso, l'uso del clone intestinale di cellule goblet HT29-E12, capace di produrre fattori trifoglio e mucine, si è rivelato un ottimo modello di studio capace di mimare con migliore approssimazione la situazione fisiologica (Lesuffleur *et al.*, 1993). Dall'analisi reologica del muco raccolto sulla superficie di tali cellule è stato accertato che questo ha le caratteristiche tipiche di un gel, ed offre il vantaggio di essere un sistema decisamente più complesso e completo dell'utilizzo delle mucine purificate, che resta un sistema estremamente semplificato (Bansil *et al.*, 2013). Inoltre la possibilità di produrre *in vitro* un gel mucoso comporta comprensibili e non secondari vantaggi nel reperimento di quantità sufficienti di materiale biologico altrimenti disponibile solo con più complessi campionamenti endoscopici (Markesich *et al.*, 1995), sebbene permangano i consueti limiti di approssimazione connessi all'uso di modelli artificiali.

I risultati illustrati hanno evidenziato che il rame influenza le caratteristiche viscoelastiche del muco, determinando la formazione di un gel più compatto. Sebbene gli stessi non ci consentano di asserire che tale effetto sia mediato in via esclusiva dalla proteina TFF1, la nostra ipotesi si fonda sulla evidenza che il rame, influenzando sull'equilibrio di formazione della forma dimerica, possa favorire una maggiore interazione tra la proteina trifoglio e la mucina MUC5AC, legame rivelatosi necessario ai fini della strutturazione del gel mucoso.

In base a queste considerazioni, l'effetto del rame sulla strutturazione del gel mucoso potrebbe avere delle conseguenze anche sui meccanismi di colonizzazione del batterio patogeno *H. pylori*: la maggiore adesione batterica osservata nel modello cellulare HT29-E12 in presenza di rame potrebbe essere spiegata ipotizzando la formazione di maggior numero di siti di legame, rappresentati dalla forma dimerica del peptide trifoglio, sulla superficie mucosale.

Collocando i dati ottenuti in un discorso più ampio, i nostri risultati rappresentano innanzitutto un contributo alla caratterizzazione del modello cellulare HT29-E12 che soprattutto negli ultimi anni si è dimostrato un valido strumento per lo studio di infezioni batteriche *in vitro* (Dolan *et al.*, 2012).

In conclusione i risultati ottenuti confermano un importante coinvolgimento del peptide trifoglio negli eventi che determinano la colonizzazione del batterio patogeno. *Helicobacter pylori* co-evolvendosi con l'uomo ha dovuto sviluppare sofisticati sistemi di sopravvivenza: l'essere riuscito a sfruttare per la sua adesione fattori essenziali per l'integrità delle mucose gastriche, quali il peptide TFF1, conferma il delicato equilibrio che si è instaurato nel corso dei millenni tra microorganismo e ospite.

Tuttavia, le importanti conseguenze che si manifestano in alcuni individui a seguito dell'instaurarsi di meccanismi di infezione cronica causati dal batterio patogeno, rendono necessario lo sviluppo di efficaci strategie. I dati qui illustrati rappresentano un tassello che si aggiunge alla comprensione degli eventi che si manifestano nel corso dell'infezione batterica e rappresentano il punto di partenza per chiarire il ruolo giocato dal complesso rame-TFF1 nell'instaurarsi di tale infezione.

## CAPITOLO 4

### MATERIALI E METODI

#### 4.1 Analisi dell'interazione tra il rame e le proteine ricombinanti TFF1 e TFF3 mediante spettrometria di massa ESI

Una soluzione 1,5  $\mu\text{M}$  della proteina ricombinante in forma dimerica hrTFF1 (human recombinant TFF1 – *Raybiotech* 228-11489) e una soluzione 1,5  $\mu\text{M}$  della proteina ricombinante in forma monomerica hrTFF3 Human recombinant TFF3 – *PeptoTech* 300-61) in ammonio acetato 50 mM pH 6, sono state incubate in presenza di un eccesso molare di 7,5 volte di soluzioni di  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{ZnSO}_4$  o  $\text{CaCl}_2$  a 25 °C per 3'. Le miscele sono state poi analizzate mediante spettrometria di massa nativa utilizzando capillari in vetro borosilicato internamente rivestiti con uno strato d'oro del diametro di circa 5 mm, gentilmente forniti dal Prof. Albert Heck (Università di Utrecht – Olanda). Gli spettri sono stati acquisiti utilizzando uno strumento ibrido quadrupolo - tempo di volo (Q-ToF Premiere, *Waters*) modificato per operare ad alte masse in polarità positiva.

Per mantenere intatti i complessi proteici nelle condizioni di vuoto necessarie per condurre esperimenti di spettrometria di massa, gli ioni relativi sono stati introdotti in sorgente aumentando la pressione nella prima zona di vuoto dello spettrometro di massa. La pressione nella regione della sorgente è stata settata a 7,0 mbar riducendo la capacità di pompaggio della pompa rotativa (Monti MC *et al.*, 2011).

Inoltre, i voltaggi del capillare e del cono sono stati ottimizzati per favorire la trasmissione dei complessi proteici intatti e per una efficiente desolvatazione degli ioni stessi. Tutti gli spettri sono stati acquisiti dopo calibrazione dello spettrometro con una soluzione di mioglobina. I dati sono stati accumulati per 2 minuti, mediati e centrati, utilizzando le opzioni del software MassLynx 4.0 (*Waters*).

#### 4.2 Calorimetria isoterma di titolazione

La determinazione dei parametri termodinamici che caratterizzano l'interazione tra rame e proteine trifoglio sono stati ottenuti mediante calorimetria isoterma di titolazione.

Gli esperimenti sono stati eseguiti utilizzando un peptide di sequenza nativa rappresentativo dell'estremità carbossiterminale della proteina TFF1 (sequenza pTFF1: Ac-FYPNTIDVPPEEECEF-COOH). Per la diluizione dell'analita e del titolante è stato utilizzato un tampone Hepes 20 mM pH 7,4 contenente 160 mM NaCl.

Le titolazioni calorimetriche sono state eseguite utilizzando un microcalorimetro MicroCal ITC<sub>200</sub> (*GE Healthcare*). Tutte le soluzioni sono state filtrate e degassate prima dell'utilizzo. A seguito di accurata messa a punto delle condizioni sperimentali, è stata utilizzata una soluzione titolate  $\text{CuCl}_2$  0,7 mM/glicina 2,8 mM in tampone Hepes, e come analita il peptide pTFF1 70  $\mu\text{M}$  in tampone Hepes. Il titolante è stato iniettato nella cella contenente l'analita in aliquote di 2  $\mu\text{L}$ , con 180 secondi di intervallo tra una iniezione e la successiva, per un totale di 19 iniezioni. La soluzione

nella cella è stata miscelata a 1000 rpm e la titolazione è stata eseguita a 25 °C. Il valore del calore di dissoluzione del rame nelle condizioni di misura scelte è stato ottenuto eseguendo una titolazione di riferimento iniettando la soluzione di rame complessato alla glicina nella cella contenente solo il tampone Hepes.

I dati grezzi ottenuti sono stati elaborati utilizzando il software dedicato Origin 7.0. I risultati sono stati analizzati seguendo le indicazioni di Trapaidze *et al.* (2012).

In breve, la costante di dissociazione *apparente* ( $^{app}K_d$ ) ottenuta dall'elaborazione dei dati grezzi è definita come:

$$^{app}K_d^L = \frac{[L][M]}{[ML]} \left( 1 + \frac{[C]}{K_{d1}^C} + \frac{[C]^2}{K_{d1}^C K_{d2}^C} + \frac{[B]}{K_d^B} \right)$$

dove M: metallo, L: ligando, C: competitore debole e B: tampone

Poiché il tampone è in largo eccesso rispetto al metallo o al ligando si può approssimare  $[B] \approx [B]_0$ , e quando  $[C] \gg [M] \rightarrow [C] \approx [C]_0$  la precedente equazione può risciversi come:

$$^{app}K_d^L = \frac{[L][M]}{[ML]} \left( 1 + \frac{[C]_0}{K_{d1}^C} + \frac{[C]_0^2}{K_{d1}^C K_{d2}^C} + \frac{[B]_0}{K_d^B} \right)$$

L'espressione di  $^{app}K_d$  così ottenuta non tiene però conto di tutti gli equilibri che si instaurano nel corso della titolazione. Infatti, nella soluzione titolante i cationi  $\text{Cu}^{2+}$  sono stabilizzati dal legame con la glicina con stechiometria di legame di 1:2 ( $\text{Cu}^{2+}/\text{Gly}$ ). Il legame del catione metallico al peptide causa il rilascio della glicina e la sua protonazione da parte del tampone Hepes. Quindi nell'equilibrio totale devono essere considerati sia la protonazione della glicina che la ionizzazione del tampone.

La costante di dissociazione che descrive la formazione del complesso rame-peptide, che tiene conto di questi equilibri, è definita *condizionale* ( $^{cond}K_d$ ) secondo l'equazione:

$$^{app}K_d = ^{cond}K_d \times \left( 1 + \frac{[\text{Gly}]_0}{K_{d1}^{\text{Gly}}} \times \frac{1}{(1 + 10^{-pH+pK_a^{\text{Gly}}})} + \frac{[\text{Gly}]_0^2}{K_{d1}^{\text{Gly}} K_{d2}^{\text{Gly}}} \times \frac{1}{(1 + 10^{-pH+pK_a^{\text{Gly}}})^2} \right) + \frac{[\text{Hepes}]_0}{K_d^{\text{Hepes}} (1 + 10^{-pH+pK_a^{\text{Hepes}}})}$$

Nella fattispecie, i valori utilizzati per l'ottenimento dei parametri termodinamici del legame  $\text{pTFF1}:\text{Cu}^{+2}$  sono:  $[\text{Gly}]_0 = 0,028 \text{ M}$ ;  $[\text{Hepes}]_0 = 0,2 \text{ M}$ ;  $pK_a^{\text{Gly}} = 9,53$  ;  $pK_a^{\text{Hepes}} = 7,41$ ;  $K_a^{\text{Hepes}} = 10^{-3,22}$  ;  $K_{d1}^{\text{Gly}} = 10^{-8,2}$ ;  $K_{d2}^{\text{Gly}} = 10^{-6,9}$ .

### 4.3 Colture cellulari

Per gli esperimenti condotti in questa tesi sono state utilizzate le seguenti linee cellulari:

- MCF-7, linea di carcinoma mammario umano,;
- AGS, linea di adenocarcinoma gastrico umano;
- AGS-AC1, clone di cellule AGS stabilmente trasfettate con plasmide iperesprimente TFF1 in maniera inducibile, gentilmente fornito dalla Dr.ssa M.C. Rio (IGBMC - Institute de Genetique et de Biologie Moleculaire et Cellulaire, Strasburgo, Francia),
- HT29-E12, clone di cellule goblet derivanti dalla linea di carcinoma del colon HT29 mediante selezione con metotressato, gentilmente fornito dal Dr. Par Matsson (Università di Uppsala – Dipartimento di Farmacia, Svezia).

La linea cellulare AGS è stata mantenuta in coltura in mezzo HAM'S Nutrient Mixture F12 (Euroclone), supplementato con 10% di siero fetale bovino (FBS, Euroclone), 2 mM L-glutammina e una miscela di antibiotici Penicillina/ Streptomicina (100 U/ml di penicillina e 100 µg/ml di streptomicina, Euroclone).

Le altre linee cellulari sono state coltivate in mezzo DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium, Euroclone) supplementato con 10% di siero fetale bovino (FBS, Euroclone), 2 mM L-glutammina e una miscela di antibiotici Penicillina/ Streptomicina (100 U/ml di penicillina e 100 µg/ml di streptomicina, Euroclone).

Per il clone cellulare AGS-AC1 il mezzo di crescita è stato supplementato con Neomicina 600 µg/ml. L'espressione di TFF1 in tale linea cellulare è stata promossa aggiungendo Doxiciolina (1 ng/µl) al mezzo di crescita.

### 4.4 Western blotting

I campioni da analizzare sono stati trattati con SDS gel-loading buffer (50 mM Tris-Cl pH 6,8; 2% w/v SDS; 0,1% blu di bromofenolo; 10% (v/v) glicerolo) a cui è stato aggiunto, quando richiesto, l'agente riducente β-mercaptoetanol. I campioni così preparati sono stati incubati a 100 °C per 5', centrifugati a 10000g per 30 secondi e caricati su gel di poliacrilammide al 15%. Come riferimento è stata usata una miscela di standard di pesi molecolari PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10-170 kDa, *Fermentas*). La corsa elettroforetica è stata eseguita in Tris-Glicina-SDS (TGS 1x: Tris 25 mM; Glicina 192 mM e Sodio Dodecil Solfato 0,1 % p/v– *Biorad Laboratories*) ad un voltaggio costante pari a 200 V per un gel di 6x8 cm e spessore 1,5 mm. Al termine della corsa, è stato eseguito l'elettrotrasferimento su membrana di nitrocellulosa *Hybond-ECL* (*Amersham Biosciences*) in tampone TGS 1x con il 20% v/v di metanolo a 75 V costanti per 1h. La membrana è stata saturata per 1h con una soluzione al 5% p/v di latte privato della componente grassa (*no-fat dry milk-BioRad*) e poi incubata con l'anticorpo primario in una soluzione di latte al 5% p/v, per una notte a 4 °C. Dopo il lavaggio con TBS-TWEEN (NaCl 150 mM; KCl 3 mM; Tris-HCl 25 mM pH 8, 0,1% Tween 20), la membrana è stata incubata con l'anticorpo

secondario per 1h a temperatura ambiente. Dopo opportuni lavaggi, i segnali sono stati rivelati tramite chemiluminescenza, due soluzioni (A e B) vengono miscelate al momento dello sviluppo in rapporto 1:1 (Soluzione A: 250 mM Luminolo in DMSO; 90 mM Acido para-cumarico in DMSO; 10 mM Tris-Cl pH 8,5; Soluzione B: 100 mM Tris-Cl pH 8,5; 0,03% perossido di idrogeno). È stato utilizzato il sistema di acquisizione di immagini digitali Image Quant LAS4000 (*GE Healthcare*) e l'elaborazione dei dati è stata effettuata con il software di analisi ImageQuant TL.

Per i diversi esperimenti sono stati utilizzati anticorpi primari quali:

- GspAb-hTFF1 (GenScripts Corp), *rabbit polyclonal*, diluito 1:500
- Anti-GAPDH (*Santa Cruz*), *mouse monoclonal*, diluito 1:1000 Anti-PDI (*Santa Cruz*), *rabbit polyclonal*, diluito 1:1000

Gli anticorpi secondari utilizzati sono anti-*mouse* (*Santa Cruz*) e anti-*rabbit* (*Thermo Scientific*) diluiti 1:2000.

#### 4.5 Analisi della produzione e secrezione di TFF1 nel clone AGS-AC1 al variare del tempo

Il clone AGS-AC1 è stato ottenuto per transfezione stabile della linea AGS con un vettore di espressione per TFF1 contenente un promotore inducibile da doxiciolina (Tosco *et al.*, 2010). Per analizzare la sintesi e la secrezione della proteina TFF1 al variare del tempo, il clone è stato coltivato in piastra e al raggiungimento della subconfluenza è stata indotta l'espressione di TFF1 aggiungendo al mezzo di crescita doxiciolina (1 ng/ $\mu$ l). I surnatanti e delle cellule sono stati raccolti a 0, 4, 8, 16, 24, 48, 72 h dall'induzione. I surnatanti prelevati sono stati centrifugati a 10000g per allontanare eventuali cellule morte, mentre le cellule sono state lavate con PBS 1X, staccate dalla piastra con Tripsina-EDTA (200 mg/l EDTA; 500 mg/l tripsina) e centrifugate a 1000g per 5'. I pellet cellulari ottenuti sono stati risospesi in 4 volumi di buffer di lisi (PBS 1X /IGEPAL 0,1%) in presenza dell'inibitore di proteasi PMSF (polimetilsulfonilfluoruro) 1 mM, incubati in ghiaccio 30' e sonicati con un ampiezza delle vibrazioni del 30%, durata dell'impulso 9,9 sec e intervallo tra un impulso e il successivo di 9,9 secondi. È stata in seguito determinata la concentrazione proteica dei lisati cellulari ottenuti, utilizzando il metodo Bradford. Sono stati utilizzati per il Western blot 5  $\mu$ g di proteine totali e 20  $\mu$ l di surnatante per ciascun campione.

#### 4.6 Verifica dell'influenza dei livelli di rame sulla secrezione di TFF1

Il clone AGS-AC1 è stato seminato in *multi-well* da 24 pozzetti ad una densità di  $3,5 \times 10^4$  cellule/pozzetto, alternativamente, in mezzo supplementato di siero (FBS al 10%) e in mezzo privo di siero. A 24 h dalla semina le cellule sono state indotte con doxiciolina (1 ng/ $\mu$ l) e sottoposte a differenti trattamenti: incubate con due differenti concentrazioni di  $\text{CuCl}_2$  (10 e 100  $\mu$ M) o con BCS 500  $\mu$ M per 24, 48 e 72h. I trattamenti sono stati effettuati in triplicato e cellule indotte ad esprimere TFF1 ma non trattate con rame e BCS sono state usate come riferimento. I surnatanti prelevati sono stati centrifugati a 10000g per 15' e sono state allontanate eventuali cellule

morte e detriti cellulari. Un volume di 20  $\mu$ l è stato utilizzato per le successive analisi di Western blot. I lisati cellulari sono stati ottenuti come descritto nel paragrafo precedente.

#### 4.7 Analisi dello stato di ossidoriduzione della proteina nativa intracellulare e secreta nel surnatante

Il clone cellulare AGS-AC1 è stato coltivato come descritto in precedenza e seminato in *multiwell* da 6 pozzetti. Raggiunta la sub-confluenza, le cellule sono state trattate con doxiciclina per indurre l'espressione della proteina TFF1. Dopo circa 4 ore dall'induzione è iniziato il trattamento con concentrazioni finali di 1 mM e 2 mM PEG-Maleimide (Methoxypolyethylene glicol 5000 maleimide; Sigma) a partire da una soluzione stock 50 mM in PBS preparata al momento. Il trattamento è durato 48 ore a partire dall'induzione. La maleimide è un composto molto reattivo ma a causa della sua ridotta stabilità, i trattamenti sono stati rinfrescati ogni 24 ore. Al termine del trattamento, i surnatanti sono stati raccolti e centrifugati a 10000g per 15' per allontanare eventuali cellule morte rimaste in sospensione.

Le cellule sono state staccate con Tripsina-EDTA (200 mg/l EDTA; 500 mg/l tripsina) e raccolte con DMEM. A questo è seguito il lavaggio del pellet, ottenuto dopo centrifugazione a 12000g con PBS 1X. I pellet cellulari sono stati risospesi in quattro volumi di buffer di lisi a cui è stato aggiunto PEG-Maleimide ad una concentrazione finale di 1 mM o 2 mM. Dopo incubazione in ghiaccio per 30', le proteine intracellulari sono state recuperate attraverso centrifugazione (10000g per 10'). La concentrazione proteica dei campioni è stata ottenuta attraverso il metodo Bradford, utilizzando il reattivo Biorad. 20  $\mu$ l dei surnatanti e 5  $\mu$ g dei lisati cellulari sono stati utilizzati per l'analisi mediante western blot seguendo il procedimento descritto nel paragrafo 4.3.

#### 4.8 Analisi della localizzazione intracellulare di TFF1

##### 4.8.1 Esperimenti di co-localizzazione cellulare utilizzando la microscopia confocale

Cellule AGS-AC1 ( $4 \times 10^4$  cellule per pozzetto) sono state piastrate su vetrini, indotte con doxiciclina (1 ng/ $\mu$ l) e trattate con  $\text{CuCl}_2$  100  $\mu$ M e BCS 500  $\mu$ M per 48 ore. Sono state poi fissate con 4% formaldeide in PBS 1X per 10' e lavate tre volte con PBS. Al lavaggio è seguita una fase di permeabilizzazione con Triton™ X- 100 (Sigma) 0,5% v/v in PBS per 10', una fase di *blocking* con 20% v/v *Goat serum* in PBS 1X e l'incubazione con le diluzioni, in PBS 1X, degli anticorpi primari durata tutta la notte a 4 °C. Il giorno seguente, dopo 3 lavaggi con PBS 1X, sono state effettuate le incubazioni con gli anticorpi secondari per 2 ore a T.A. I vetrini così ottenuti sono stati montati su vetrini portaoggetto e fissati con una soluzione di Mowiol (*Mowiol*® 7,16x10<sup>-4</sup> M/Tris 0,2 M pH 8.5/ Glicerolo 1,30 M).

Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi primari:

- anti-TFF1 (*Life Span Biosciences*), *rabbit polyclonal*, diluito 1:500,
- anti-58K Golgi (*Abcam*), *mouse monoclonal*, diluito 1:100,
- anti-Calnexina (*Santa Cruz Biotechnology*), *mouse monoclonal*, diluito 1:500.

Per la rivelazione sono state utilizzate diluizioni 1:2000 in PBS 1X degli anticorpi coniugati DyLight 594 anti-rabbit and DyLight 488 anti-mouse (*Jackson Immuno Research*). Per la visualizzazione dei nuclei è stata utilizzata una soluzione di Hoechst 33342 (*BD Pharmingen*) 1 µg/ml.

Per l'acquisizione delle immagini in fluorescenza è stato utilizzato un microscopio confocale Zeiss LSM 510 Laser Scanning (*Carl Zeiss*) insieme al relativo software di analisi Zeiss ZEN Confocal Software (*Carl Zeiss*).

L'esperimento nelle medesime condizioni sperimentali è stato condotto anche utilizzando la linea cellulare di carcinoma mammario MCF-7.

#### 4.8.2 Frazionamento cellulare

Il clone cellulare AGS-AC1 è stato propagato in piastre da 100 mm (*Corning*) e trattato con doxiciolina per indurre l'espressione di TFF1 e, contemporaneamente, con CuCl<sub>2</sub> 100 µM. Una media di tre piastre per condizione è stata processata per ogni trattamento. Cellule non trattate con rame sono state utilizzate come controllo. Dopo 48 ore di trattamento, le cellule sono state lavate due volte con buffer di omogeneizzazione (10 mM Tris-Cl pH 7.4; 250 mM saccarosio, 5 mM EDTA e un cocktail di inibitori di proteasi) quindi raccolte in 1 ml del medesimo buffer. Le cellule sono state omogenizzate facendo passare la sospensione 10 volte attraverso un puntale blu da 1 ml e 10 volte attraverso un ago 22GA1 1/4 montato su siringa da 1 ml. L'omogenato ottenuto è stato centrifugato 10 minuti a 1500g, è stata determinata la concentrazione proteica del *post nuclear supernatant* così ottenuto e questo è stato caricato su un gradiente discontinuo di Nycodenz preformato.

Per creare il gradiente discontinuo sono state utilizzate quattro soluzioni (24%, 19,33%, 14,66% e 10%) di Nycodenz (*Histodenz™, Sigma*), preparate a partire da una soluzione madre al 27,6% (w/v) (d = 1,15 g/ml) diluita con un tampone contenente 0,75% NaCl in Tris 10 mM pH 7,4, KCl 3 mM, EDTA 1 mM. Dalla misura dell'indice di rifrazione (R<sub>i</sub>), effettuata utilizzando un rifrattometro di Abbe (Mod. 110 - *Gamma Strumenti*), è stato possibile verificare la concentrazione di ciascuna soluzione di Nycodenz. In particolare è stata calcolata la densità delle soluzioni utilizzando la formula seguente:

$$\% \frac{w}{v} = (607,75 \times R_i \text{ misurato}) - 810,13$$

e da questa è stata poi calcolata la concentrazione corrispondente. Successivamente le quattro diverse soluzioni di Nycodenz sono state stratificate in tubi per ultracentrifuga da 5 ml (*Ultra-clear™ Tubes*) partendo dalla più concentrata. I tubi sono stati lasciati in orizzontale per 45 minuti e poi centrifugati per 4 ore a 110000g a 15°C utilizzando un'ultracentrifuga con rotore SW 50.1 Ti (*Beckman*). Il *post nuclear supernatant* è stato caricato sul gradiente e centrifugato per 2 h a 110000g a 4 °C. Al termine della centrifugazione, sono state raccolte 12 frazioni dall'alto di ciascun tubo e ciascuna frazione è stata precipitata con una soluzione al 25% di acido tricloro acetico (TCA), risospesa in SDS-gel loading buffer + β-mercaptoetanolo e caricata su gel al 15% per l'analisi mediante Western blot come riportato nel paragrafo 4.4.

#### 4.9 Coniugazione delle proteine ricombinanti con FITC ed esperimenti di internalizzazione

Le proteine ricombinanti hrTFF1 (*Raybiotech*) in forma dimerica e hrTFF3 (*Peprotech*) in forma monomerica sono state marcate con la fluoresceina isotiocianato (FITC) usando il kit commerciale *Fluorotag FITC conjugation kit* (*Sigma*). In pratica, una soluzione appena preparata di FITC in buffer carbonato-bicarbonato pH 9 è stata addizionata alla soluzione di proteina e i campioni sono stati incubati per 2 h a temperatura ambiente in leggera agitazione, protetti dalla luce. Le proteine marcate sono state poi separate dalla fluoresceina non coniugata usando una colonna Sephadex G-25M. La qualità delle proteine coniugate ottenute è stata quindi determinata misurando l'assorbimento dei campioni a 280 nm e 450 nm. Il rapporto molare Fluoresceina/Protein (F/P) è stato determinato seguendo le indicazioni del fornitore.

Come modello è stata scelta la linea cellulare di adenocarcinoma gastrico AGS. Per l'esperimento di internalizzazione,  $4 \times 10^4$  cellule sono state seminate su vetrini e trattate per 24 ore con  $\text{CuCl}_2$  100  $\mu\text{M}$ . Le cellule così pre-trattate sono state incubate con le proteine ricombinanti coniugate hrTFF1 e hrTFF3 per 2 ore a 37 °C. Al termine, sono state lavate per due volte con PBS 1X, fissate con il 4% v/v PFA e i vetrini sono stati montati usando la soluzione di Mowiol. Le immagini sono state raccolte utilizzando il microscopio confocale LSM 510 Laser Scanning (*Carl Zeiss*).

#### 4.10 Preparazione del dimero di peptide sintetico rappresentativo dell'estremità carbossiterminale di TFF1

Per i saggi di interazione con gli LPS di *H. pylori* sono stati usati peptidi sintetici biotinilati rappresentativi degli ultimi 16 amminoacidi di TFF1 sia in forma *wild-type* (pTFFbt) che *scrambled* (pSCRbt), sintetizzati dal Dott. Luca D'Andrea dell'istituto IBB del CNR di Napoli (Montefusco *et al.*, 2013).

pTFF: bt – FYPNTIDVPPEEECEF-COOH  $MW_{\text{calcolato}} = 2268,5$

pSCR: bt – EPNCTPIFFEPEDYVE-COOH  $MW_{\text{calcolato}} = 2268,5$

I peptidi biotinilati sono stati incubati *over night* a 4 °C con un eccesso molare di 10 volte di  $\text{CuCl}_2$  per ottenere la forma dimerica. Le soluzioni monomeriche e dimeriche sono state poi purificate mediante HPLC utilizzando una colonna C18. La massa dei peptidi ottenuti è stata controllata attraverso analisi MALDI-MS.

#### 4.11 Esperimenti di Risonanza Plasmonica di Superficie

Gli esperimenti di risonanza plasmonica di superficie sono stati condotti utilizzando lo strumento Biacore3000 (*GE Healthcare*). Circa 500 RU dei peptidi biotinilati (in forma monomerica, dimerica e *scrambled*) sono stati immobilizzati sulla superficie di un *sensor chip* SA, derivatizzato con streptavidina, utilizzando il buffer HBS-P (10 mM Hepes pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,005% v/v Surfactante p20 – *GE Healthcare*) ad un flusso di 10  $\mu\text{l}/\text{min}$ . I saggi di interazione sono stati condotti a 25 °C e il segnale ottenuto dalla cella di flusso vuota è stato utilizzato come linea di base

per tutti gli esperimenti. I lipopolisaccaridi a basso peso molecolare (RF-LPS) estratti da *Helicobacter pylori* sono stati iniettati a 5 diverse concentrazioni crescenti (da 50 µg/ml a 1 mg/ml) ad un flusso di 30 µl/min per 2 minuti. Come controllo negativo sono stati usati LPS estratti da *Escherichia coli*.

#### 4.12 Ceppi batterici e condizioni di crescita

Il ceppo P12 di *H. pylori* è stato gentilmente fornito dalla Dr. Marguerite Clyne (School of Medicine & Medical Science – University College, Dublin). È stato inizialmente isolato da pazienti con ulcere duodenali (Moese *et al.* 2004; Selbach *et al.* 2002). Le cellule batteriche sono state seminate su piastre Columbia Blood Agar base (Oxoid) contenenti il 7% v/v di sangue laccato di cavallo (Oxoid). I batteri sono stati cresciuti a 37 °C in apposite giare (Oxoid) che hanno consentito di generare condizioni di crescita microaerofile attraverso l'utilizzo di sacchetti *CampyGen gas packs* (Oxoid).

#### 4.13 Esperimenti di colonizzazione di *H. pylori* su AGS-AC1

Il clone cellulare AGS-AC1 è stato seminato in *multi-well* da 12 pozzetti ad una densità di  $5 \times 10^4$  cellule per pozzetto in mezzo Ham's F12 supplementato con 600 µg/ml di Neomicina. 24 ore dopo la semina, il mezzo è stato sostituito con Ham's F12 privo di antibiotici e le cellule sono state indotte con doxiciclina 1 ng/µl e trattate con CuCl<sub>2</sub> 10 µM e Batocuproina (BCS) 500 µM per 48 ore. Come controllo sono state utilizzate cellule non indotte con doxiciclina e non trattate con rame e BCS. Al termine, le cellule sono state lavate tre volte con PBS 1X per rimuovere ogni traccia di doxiciclina ed in ogni pozzetto sono stati aggiunti 200 µl di Ham's F12 e 100 µl di sospensione batterica (OD<sub>600</sub> = 0,4). Le cellule infettate sono state incubate per 2 ore a 37 °C in ambiente microaerofilo. Al termine dell'infezione, le cellule sono state prima lavate con PBS per allontanare i batteri non adesi alla superficie cellulare, e poi raccolte con tripsina-EDTA (15 minuti a 37 °C). Di ogni campione sono state preparate due diluzioni seriali che sono state quindi piastrate su piastre preparate come descritto nel paragrafo 4.13. Le colonie formatesi su piastra sono state contate 3-4 giorni dopo la semina. L'analisi dei dati è stata effettuata contando il numero di CFU (*Colony Forming Unit*) ottenute per ogni trattamento e comparandolo con le condizioni di controllo. Ogni analisi è stata eseguita in triplicato e ripetuta almeno per tre volte in modo indipendente.

#### 4.14 Esperimenti di colonizzazione di *H. pylori* su AGS-AC1 in presenza del peptide sintetico *wild-type*

Le soluzioni in Ham's F12 di peptide sintetico *wild-type* (pTFF) a due differenti concentrazioni (0,5 µM e 1 µM finali) sono state incubate con la sospensione batterica di *H. pylori* (O.D<sub>600</sub> = 0,4) per 30 minuti a 37 °C in ambiente microaerofilo, per promuovere l'interazione con il batterio patogeno. Al termine, sono stati condotti esperimenti di colonizzazione su cellule AGS-AC1 non indotte ad esprimere TFF1, nelle modalità descritte nel paragrafo precedente. Tutti gli esperimenti sono stati riprodotti in triplicato.

#### 4.15 Preparazione dei campioni di muco da cellule HT29-E12

Il clone di cellule intestinali goblet HT29-E12 è stato coltivato in piastra per circa 30 giorni dal raggiungimento della confluenza al fine di ottenere una sufficiente quantità di muco da analizzare. Trascorso tale periodo di tempo, il muco accumulatosi è stato prelevato e le cellule sono state trattate con  $\text{CuCl}_2$  10  $\mu\text{M}$  per 72 ore. Cellule non trattate sono state usate come controllo. Al termine dei trattamenti, il mezzo di crescita è stato allontanato e il muco accumulatosi sullo strato di cellule è stato raccolto con PBS 1X.

#### Quantizzazione del muco

Per determinarne il peso, campioni di muco provenienti da 5 piastre di HT29-E12 per ogni trattamento sono stati raccolti come descritto, dopo aver centrifugato a 5000g per 10 min il PBS è stato allontanato quanto più possibile dal pellet di muco e i campioni sono stati sottoposti ad essiccamento in evaporatore sottovuoto (Concentrator® 5301 – Eppendorf) ed infine pesati.

#### 4.16 Analisi reologiche

Per analizzarne le proprietà reologiche, campioni di muco provenienti da 10 piastre di HT29-E12 per ogni trattamento sono stati raccolti come descritto, dopo aver centrifugato a 5000g per 10 min il PBS è stato allontanato quanto più possibile dal *pellet* di muco. L'analisi è stata condotta utilizzando il reometro rotazionale Physica MCR-301 (Anton-Paar). Tutte le misure sono state effettuate in regime oscillatorio in geometria piatto-piatto ( $\varnothing$  25mm, gap 0,8 mm) alla temperatura  $T=25^\circ\text{C}$ . Per determinare il limite di viscoelasticità lineare ( $g_c$ ) sono state eseguite misure al variare dell'ampiezza della deformazione ("Strain Sweep Tests") ad una fissata frequenza. Sono state, poi, eseguite misure al variare della frequenza ("Frequency Sweep Tests") utilizzando un valore per l'ampiezza della deformazione minore di  $g_c$ , tale, cioè, da mantenere il campione esaminato in condizioni di viscoelasticità lineare. Mediante tali misure sono stati determinati il modulo elastico ( $G'$ ), il modulo viscoso ( $G''$ ) e la viscosità complessa ( $h^*$ ) dei campioni esaminati.



## BIBLIOGRAFIA

- Al-zazeh ED, Fegert P, Blin N, Gött P. Transcription factor GATA-6 activates expression of gastroprotective trefoil genes TFF1 and TFF2. *Biochim Biophys Acta*. (2000) 1490(3):324-32.
- Ali MH, Imperiali B. Protein oligomerization: how and why. *Bioorg Med Chem*. (2005) 13(17):5013-20.
- Amedei A, Codolo G, Del Prete G, de Bernard M, D'Elisio MM. The effect of *Helicobacter pylori* on asthma and allergy. *J Asthma Allergy*. (2010) 3:139-47.
- Amiry N, Kong X, Muniraj N, Kannan N, Grandison PM, Lin J, Yang Y, Vouyovitch CM, Borges S, Perry JK, Mertani HC, Zhu T, Liu D, Lobie PE. Trefoil factor-1 (TFF1) enhances oncogenicity of mammary carcinoma cells. *Endocrinology* (2009) 150(10):4473-83.
- Atuma C, Strugala V, Allen A, Holm L. The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. (2001) 280(5):G922-9.
- Bansil R, Celli JP, Hardcastle JM, Turner BS. The Influence of Mucus Microstructure and Rheology in *Helicobacter pylori* Infection. *Front Immunol*. (2013) 4:310.
- Barnes N, Bartee MY, Braiterman L, Gupta A, Ustiyani V, Zuzel V, Kaplan JH, Hubbard AL, Lutsenko S. Cell-specific trafficking suggests a new role for renal ATP7B in the intracellular copper storage. *Traffic*. (2009) 10(6):767-79.
- Baus-Loncar M and Giraud A. Multiple regulatory pathways for trefoil factor (TFF) genes *Cell Mol Life Sci* (2005) 62:2921–2931.
- Beck S, Schmitt H, Shizuya H, Blin N, Gött P. Cloning of contiguous genomic fragments from human chromosome 21 harbouring three trefoil peptide genes. *Hum Genet*. (1996) 98(2):233-5.
- Berry M, Nunez AM, and Chambon P. Estrogen-responsive element of the human pS2 gene is an imperfectly palindromic sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* (1989) 86(4):1218-22.
- Bertini I, Felli IC, Luchinat C, Parigi G, Pierattelli R. Towards a protocol for solution structure determination of copper(II) proteins: the case of Cu(II)Zn(II) superoxide dismutase. *Chembiochem*. (2007) 8(12):1422-9.
- Blaser MJ. Ecology of *Helicobacter pylori* in the human stomach. *J Clin Invest*. (1997) 100(4):759-62.
- Blaser MJ, Atherton JC. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J Clin Invest*. (2004) 113(3):321-33.
- Bossenmeyer-Pourie C, Kannan R, Ribieras S, Wendling C, Stoll I, Thim L, Tomasetto C and Rio MC. The trefoil factor 1 participates in gastrointestinal cell differentiation by delaying G1-S phase transition and reducing apoptosis. *J Cell Biol* (2002) 157(5):761-70.
- Buache E, Etique N, Alpy F, Stoll I, Muckensturm M, Reina-San-Martin B, Chenard MP, Tomasetto C, Rio MC. Deficiency in trefoil factor 1 (TFF1) increases tumorigenicity of human breast cancer cells and mammary tumor development in TFF1-knockout mice. *Oncogene* (2011) 30(29):3261-73.
- Calnan DP, Westley BR, May FEB, Floyd DN, Marchbank T and Playford RJ. The trefoil peptide TFF1 inhibits the growth of the human gastric adenocarcinoma cell line AGS. *J Pathol* (1999) 188(3):312-7.
- Carr MD. 1H NMR-based determination of the secondary structure of porcine pancreatic spasmodic polypeptide: one of a new family of "trefoil" motif containing cell growth factors. *Biochemistry*. (1992) 31(7):1998-2004.

- Carvalho R, Kayademir T, Soares P, Canedo P, Sousa S, Oliveira C, Leistenschneider P, Seruca R, Gött P, Blin N, Carneiro F, Machado JC. Loss of heterozygosity and promoter methylation, but not mutation, may underlie loss of TFF1 in gastric carcinoma. *Lab Invest* (2002) 82(10):1319-26.
- Chadwick MP, Westley BR and May FE. *Homodimerization and hetero- oligomerization of the singledomain trefoil protein pNR-2/pS2 through cysteine* Biochem. J *Biochem J* (1997) 327 (Pt 1):117-23.
- Chatagnon A, Ballestar E, Esteller M, Dante R. A role for methyl-CpG binding domain protein 2 in the modulation of the estrogen response of pS2/TFF1 gene. *PLoS One*. (2010) 5(3):e9665.
- Chow WH, Blaser MJ, Blot WJ, Gammon MD, Vaughan TL, Risch HA, Perez-Perez GI, Schoenberg JB, Stanford JL, Rotterdam H, West AB, Fraumeni JF Jr. An inverse relation between cagA+ strains of *Helicobacter pylori* infection and risk of esophageal and gastric cardia adenocarcinoma. *Cancer Res.* (1998) 58(4):588-90.
- Clyne M, Dillon P, Daly S, O'Kennedy R, May FE, Westley BR, Drumm B. *Helicobacter pylori* interacts with the human single-domain trefoil protein TFF1. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2004) 101(19):7409-14.
- Covacci A, Telford JL, Del Giudice G, Parsonnet J, Rappuoli R. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science.* (1999) 284(5418):1328-33.
- Daniel KG, Chen D, Orlu S, Cui QC, Miller FR, Dou QP. Clioquinol and pyrrolidine dithiocarbamate complex with copper to form proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res.* (2005) 7(6):R897-908.
- Davis AV, O'Halloran TV. A place for thioether chemistry in cellular copper ion recognition and trafficking. *Nat Chem Biol.* (2008) 4(3):148-51.
- Dignass A, Lynch-Devaney K, Kindoh H, Thim L and Podolsky DK. Trefoil peptides promote epithelial migration through a transforming growth factor  $\beta$ -independent Pathway. *J Clin Invest* (1994) 94(1):376-8.
- Dolan B, Naughton J, Tegtmeyer N, May FE, Clyne M. The interaction of *Helicobacter pylori* with the adherent mucus gel layer secreted by polarized HT29-MTX-E12 cells. *PLoS One.* (2012) 7(10):e47300.
- Dossinger V, Kayademir T, Blin N, Gött P. Down-regulation of TFF expression in gastrointestinal cell lines by cytokines and nuclear factors. *Cell Physiol Biochem.* (2002) 12(4):197-206
- Dunnwald LK, Rossing MA, Li CI. Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* (2007) 9(1):R6.
- Eaton KA, Brooks CL, Morgan DR, Krakowka S. Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect Immun.* (1991) 59(7):2470-5.
- Ebert MPA, Hoffmann J, Haeckel C, Rutkowski K, Schmid RM, Wagner M, Adler G, Schulz HU, Roessner A, Hoffmann W and Malfertheiner P. Induction of TFF1 gene expression in pancreas overexpressing transforming growth factor alpha. *Gut* (1999) 45(1):105-11.
- Emami S, Rodrigues S, Rodrigue CM, Le Floch N, Rivat C, Attoub S, Bruyneel E and Gespach C. *Trefoil factor family (TFF) peptides and cancer progression.* *Peptides* (2004) 25(5):885-98.
- Farrell JJ, Taupin D, Koh TJ, Chen D, Zhao CM, Podolsky DK, Wang TC. TFF2/SP-deficient mice show decreased gastric proliferation, increased acid secretion, and increased susceptibility to NSAID injury. *J Clin Invest* (2002) 109:193–204.

- Gaggelli E, Kozłowski H, Valensin D, Valensin G. Copper homeostasis and neurodegenerative disorders (Alzheimer's, prion, and Parkinson's diseases and amyotrophic lateral sclerosis). *Chem Rev.* (2006) 106(6):1995-2044.
- Gajhede M, Petersen TN, Henriksen A, Petersen JF, Dauter Z, Wilson KS, Thim L. Pancreatic spasmolytic polypeptide: first three-dimensional structure of a member of the mammalian trefoil family of peptides. *Structure.* (1993) 1(4):253-62.
- Giraud AS. Trefoil peptide and EGF receptor/ligand transgenic mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* (2000) 278(4):G501-6.
- Glocker E, Lange C, Covacci A, Bereswill S, Kist M, Pahl HL. Proteins encoded by the cag pathogenicity island of *Helicobacter pylori* are required for NF-kappaB activation. *Infect Immun.* (1998) 66(5):2346-8.
- Go MF. What are the host factors that place an individual at risk for *Helicobacter pylori*-associated disease? *Gastroenterology.* (1997) 113(6 Suppl):S15-20.
- Guillemin K, Salama NR, Tompkins LS, Falkow S. Cag pathogenicity island-specific responses of gastric epithelial cells to *Helicobacter pylori* infection. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2002) 99(23):15136-41.
- Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL, Hediger MA. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* (1997) 388(6641):482-8.
- Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* (1990) 186:1-85.
- Hanby AM, Poulsom R, Singh S, Elia G, Jeffery RE, Wright NA. Spasmolytic polypeptide is a major antral peptide: distribution of the trefoil peptides human spasmolytic polypeptide and pS2 in the stomach. *Gastroenterology.* (1993) 105(4):1110-6.
- Hanby AM, Jankowski JA, Elia G, Poulsom R, Wright NA. Expression of the trefoil peptides pS2 and human spasmolytic polypeptide (hSP) in Barrett's metaplasia and the native oesophageal epithelium: delineation of epithelial phenotype. *J Pathol.* (1994) 173(3):213-9.
- Harris ED. Cellular copper transport and metabolism. *Annu Rev Nutr.* (2000) 20:291-310.
- Heck AJ. Native mass spectrometry: a bridge between interactomics and structural biology. *Nat Methods.* (2008) 5(11):927-33.
- Hellman NE, Kono S, Mancini GM, Hoogeboom AJ, De Jong GJ, Gitlin JD. Mechanisms of copper incorporation into human ceruloplasmin. *J Biol Chem.* (2002) 277(48):46632-8.
- Hendrich B, Bird A. Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol.* (1998) 18(11):6538-47.
- Hoffmann W. Trefoil factors TFF (trefoil factor family) peptide-triggered signals promoting mucosal restitution. *Cell Mol Life Sci* (2005) 62(24):2932-8.
- Hopkins RG, Failla ML. Transcriptional regulation of interleukin-2 gene expression is impaired by copper deficiency in Jurkat human T lymphocytes. *J Nutr.* (1999) 129(3):596-601.
- Hug I, Couturier MR, Rooker MM, Taylor DE, Stein M, Feldman MF. *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide is synthesized via a novel pathway with an evolutionary connection to protein N-glycosylation. *PLoS Pathog.* (2010) 6(3):e1000819.
- Iwańczak F, Iwańczak B. Treatment of *Helicobacter pylori* infection in the aspect of increasing antibiotic resistance. *Adv Clin Exp Med.* (2012) 21(5):671-80.
- Johansson ME, Sjövall H, Hansson GC. The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* (2013) 10(6):352-61
- Jorgensen KD, Diamant B, Jorgensen KH and Thim L. Pancreatic spasmolytic polypeptide (PSP): III. Pharmacology of a new porcine pancreatic polypeptide with spasmolytic and gastric acid secretion inhibitory effects. *Regul Pept* (1982) 3(3-4):231-43.

- Kangaspeska S, Stride B, Métivier R, Polycarpou-Schwarz M, Ibberson D, Carmouche RP, Benes V, Gannon F, Reid G. Transient cyclical methylation of promoter DNA. *Nature* (2008) 452(7183):112-5.
- Karam SM, Tomasetto C, Rio MC. Trefoil factor 1 is required for the commitment programme of mouse oxyntic epithelial progenitors. *Gut* (2004) 53(10):1408-15.
- Khan ZE, Wang TC, Cui G, Chi AL and Dimaline R. Transcriptional regulation of the human trefoil factor, TFF1, by gastrin. *Gastroenterology* (2003) 125(2):510-21.
- Kim JJ, Tao H, Carloni E, Leung WK, Graham DY, Sepulveda AR. *Helicobacter pylori* impairs DNA mismatch repair in gastric epithelial cells. *Gastroenterology*. (2002) 123(2):542-53.
- Kouznetsova I, Peitz U, Vieth M, Meyer F, Vestergaard EM, Malfertheiner P, Roessner A, et al. A gradient of TFF3 (trefoil factor family 3) peptide synthesis within the normal human gastric mucosa. *Cell Tissue Res* (2004) 316:155–165
- Kuo MT, Fu S, Savaraj N, Chen HH. Role of the human high-affinity copper transporter in copper homeostasis regulation and cisplatin sensitivity in cancer chemotherapy. *Cancer Res*. (2012) 72(18):4616-21.
- Lee SH, Lee SH, Oh BH, Lee HM, Choi JO, Jung KY. Expression of mRNA of trefoil factor peptides in human nasal mucosa. *Acta Otolaryngol*. (2001) 121(7):849-53.
- Lefebvre O, Chenard MP, Masson R, Linares J, Dierich A, LeMeur M, Wendling C, Tomasetto C, Chambon P, Rio MC. Gastric mucosa abnormalities and tumorigenesis in mice lacking the pS2 trefoil protein. *Science Lett* (1996) 274(5285):259-62.
- Lesuffleur T, Porchet N, Aubert JP, Swallow D, Gum JR, Kim YS, Real FX, Zweibaum A. Differential expression of the human mucin genes MUC1 to MUC5 in relation to growth and differentiation of different mucus-secreting HT-29 cell subpopulations. *J Cell Sci*. (1993) 106 ( Pt 3):771-83.
- Levy MA, Tsai YH, Reaume A, Bray TM. Cellular response of antioxidant metalloproteins in Cu/Zn SOD transgenic mice exposed to hyperoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. (2001) 281(1):L172-82.
- Li L, Davie JR. Association of Sp3 and estrogen receptor alpha with the transcriptionally active trefoil factor 1 promoter in MCF-7 breast cancer cells. *J Cell Biochem* (2008) 105(2):365-9.
- Li L, Davie JR. The role of Sp1 and Sp3 in normal and cancer cell biology. *Ann Anat*. (2010) 192(5):275-83.
- Ludeking A, Fegert P, Blin N and Gott P. Osmotic changes and ethanol modify TFF gene expression in gastrointestinal cell lines. *FEBS Lett* (1998) 439: 180–184.
- Madsen J, Nielsen O, Tornøe I, Thim L, Holmskov U. Tissue localization of human trefoil factors 1, 2, and 3. *J Histochem Cytochem*. (2007) 55(5):505-13.
- Maisakowski P, Breathnach R, Bloch J, Gannon F, Krust A, Chambon P. Cloning of cDNA sequences of hormone-regulated genes from the MCF-7 human breast cancer cell line. *Nucleic Acids Res* (1982) 10(24):7895-903.
- Makola D, Peura DA, Crow Sa. *Helicobacter pylori* infection and related gastrointestinal diseases. *J Clin Gastroenterol*. (2007) 41(6):548-58.
- Marchbank T, Westley BR, May FEB, Calnan DP and Playford RJ. Dimerization of human ps2 (tff1) plays a key role in its protective/healing effects. *J Pathol* (1998) 185(2):153-8.
- Markesich DC, Anand BS, Lew GM, Graham DY. *Helicobacter pylori* infection does not reduce the viscosity of human gastric mucus gel. *Gut*. (1995) 36(3):327-9.
- Martin V, Ribieras S, Song-Wang XG, Lasne Y, Frappart L, Rio MC, Dante R. Involvement of DNA methylation in the control of the expression of an estrogen-induced breast-cancer-associated protein (pS2) in human breast cancers. *J Cell Biochem*. (1997) 65(1):95-106.

- Marzullo L, Tosco A, Capone R, Andersen HS, Capasso A, Leone A. Identification of dietary copper- and iron-regulated genes in rat intestine. *Gene* (2004) 338(2):225-33.
- Mashimo H, Podolsky DK, Fishman MC. Structure and expression of murine intestinal trefoil factor: high evolutionary conservation and postnatalexpression. *Biochem Biophys Res Commun.* (1995) 210(1):31-7.
- Mashimo H, Wu D, Podolsky DK, Fishman MC. Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor. *Science* (1996) 274:262–265.
- May FE, Griffin SM, Westley BR. The trefoil factor interacting protein TFIZ1 binds the trefoil protein TFF1 preferentially in normal gastric mucosal cells but the co-expression of these proteins is deregulated in gastric cancer. *Int J Biochem Cell Biol.* (2009) 41(3):632-40.
- Menheniott TR, Kuklu B, Giraud AS. Gastrokines: stomach-specific proteins with putative homeostatic and tumor suppressor roles. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* (2013) 304(2):G109-21
- Mercer JF, Barnes N, Stevenson J, Strausak D, Llanos RM. Copper-induced trafficking of the cU-ATPases: a key mechanism for copper homeostasis. *Biometals.* (2003) 16(1):175-84.
- Métivier R, Gallais R, Tiffoche C, Le Péron C, Jurkowska RZ, Carmouche RP, Ibberson D, Barath P, Demay F, Reid G, Benes V, Jeltsch A, Gannon F, Salbert G. Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter. *Nature* (2010) 463(7279):384.
- Moese S, Selbach M, Kwok T, Brinkmann V, König W, Meyer TF, Backert S. *Helicobacter pylori* induces AGS cell motility and elongation via independent signaling pathways. *Infect Immun* (2004) 72(6):3646-9.
- Montecucco C, Rappuoli R. Living dangerously: how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. *Nat Rev Mol Cell Biol.* (2001) 2(6):457-66.
- Montefusco S, Esposito R, D'Andrea L, Monti MC, Dunne C, Dolan B, Tosco A, Marzullo L, Clyne M. Copper promotes TFF1-mediated *Helicobacter pylori* colonization. *PLoS One.* (2013) 8(11):e79455.
- Monti MC, Cohen SX, Fish A, Winterwerp HH, Barendregt A, Friedhoff P, Perrakis A, Heck AJ, Sixma TK, van den Heuvel RH, Lebbink JH. Native mass spectrometry provides direct evidence for DNA mismatch-induced regulation of asymmetric nucleotide binding in mismatch repair protein MutS. *Nucleic Acids Res.* (2011) 39(18):8052-64.
- Mori K, Fujii R, Kida N, Takahashi H, Ohkubo S, Fujino M, Ohta M, Hayashi K. Complete primary structure of the human estrogen-responsive gene (pS2) product. *J Biochem.* (1990) ;107(1):73-6.
- Muskett FW, May FE, Westley BR, Feeney J. Solution structure of the disulfide-linked dimer of human intestinal trefoil factor (TFF3): the intermolecular orientation and interactions are markedly different from those of other dimeric trefoil proteins. *Biochemistry.* (2003) 42(51):15139-47.
- Newton JL, Allen A, Westley BR, May FE. The human trefoil peptide, TFF1, is present in different molecular forms that are intimately associated with mucus in normal stomach. *Gut.* (2000) 46(3):312-20.
- Nittis T, Gitlin JD. Role of copper in the proteasome-mediated degradation of the multicopper oxidase hephaestin. *J Biol Chem.* (2004) 279(24):25696-702.
- Ogata H, Podolsky DK. Trefoil peptide expression and secretion is regulated by neuropeptides and acetylcholine. *Am J Physiol.* (1997) 273(2 Pt 1):G348-54.
- Ohgami RS, Campagna DR, McDonald A, Fleming MD. Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells. *Nat Genet* (2005) 37(11):1264-9.

- Park WS, Oh RR, Park JY, Lee JH, Shin MS, Kim HS, Lee HK, Kim YS, Kim SY, Lee SH, Yoo NJ, Lee JY. Somatic mutations of the trefoil factor family 1 gene in gastric cancer. *Gastroenterology* (2000) 119(3):691-8.
- Peek RM Jr. Clandestine intracellular delivery of *Helicobacter pylori* CagA: guess who's coming to dinner? *Gastroenterology*. (2004) 127(2):669-72.
- Pérez-Pérez GI, Sack RB, Reid R, Santosham M, Croll J, Blaser MJ. Transient and persistent *Helicobacter pylori* colonization in Native American children. *J Clin Microbiol*. (2003) 41(6):2401-7.
- Perry JK, Kannan N, Grandison PM, Mitchell MD, Lobie PE. Are trefoil factors oncogenic? *Trends Endocrinol Metab*. (2008) 19(2):74-81
- Peterson AJ, Menheniott TR, O'Connor L, Walduck AK, Fox JG, Kawakami K, Minamoto T, Ong EK, Wang TC, Judd LM, Giraud AS. *Helicobacter pylori* infection promotes methylation and silencing of trefoil factor 2, leading to gastric tumor development in mice and humans. *Gastroenterology*. (2010) 139(6):2005-17.
- Polshakov VI, Williams MA, Gargaro AR, Frenkiel TA, Westley BR, Chadwick MP, May FE, Feeney J. High-resolution solution structure of human pNR-2/pS2: a single trefoil motif protein. *J Mol Biol*. (1997) 267(2):418-32.
- Prest SJ, May FEB and Westley BR. *The estrogen regulated protein, TFF1, stimulates migration of human breast cancer cells*. *FASEB J* (2002) 16:592–594.
- Puig S, Thiele DJ. Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. *Curr Opin Chem Biol*. (2002) 6(2):171-80.
- Radloff DR, Wakeman TP, Feng J, Schilling S, Seto E, Wang XF. Trefoil factor 1 acts to suppress senescence induced by oncogene activation during the cellular transformation process. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2011) 108(16):6591-6.
- Reeves EP, Ali T, Leonard P, Hearty S, O'Kennedy R, May FE, Westley BR, Josenhans C, Rust M, Suerbaum S, Smith A, Drumm B, Clyne M. *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide interacts with TFF1 in a pH-dependent manner. *Gastroenterology* (2008) 135(6):2043-54, 2054.e1-2.
- Resnick MB, Sabo E, Meitner PA, Kim SS, Cho Y, Kim HK, et al. Global analysis of the human gastric epithelial transcriptome altered by *Helicobacter pylori* eradication in vivo. *Gut* (2006) 55:1717–24
- Ribieras S, Lefèbvre O, Tomasetto C, Rio MC. Mouse Trefoil factor genes: genomic organization, sequences and methylation analyses. *Gene* (2001) 266(1-2):67-75.
- Rio MC, Bellocq JP, Gairard B, Rasmussen UB, Krust A, Koehl C, Calderoli H, Schiff V, Renaud R, Chambon P. Specific expression of the pS2 gene in subclasses of breast cancers in comparison with expression of the estrogen and progesterone receptors and the oncogene ERBB2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (1987) 84(24):9243-7.
- Rodrigues S, Van Aken E, Van Bocxlaer S, Attoub S, Nguyen QD, Bruyneel E, Westley BR, May FE, Thim L, Mareel M, Gespach C, Emami S. Trefoil peptides as proangiogenic factors in vivo and in vitro: implication of cyclooxygenase 2 and EGF receptor signaling. *FASEB J*. (2003) 17:7-16.
- Rubino JT, Franz KJ. Coordination chemistry of copper proteins: how nature handles a toxic cargo for essential function. *J Inorg Biochem*. (2012) 107(1):129-43.
- Ruchaud-Sparagano MH, Westley BR, May FE. The trefoil protein TFF1 is bound to MUC5AC in human gastric mucosa. *Cell Mol Life Sci* (2004) 61(15):1946-5.
- Ruttkey-Nedecky B, Nejdil L, Gumulec J, Zitka O, Masarik M, Eckschlager T, Stiborova M, Adam V, Kizek R. The role of metallothionein in oxidative stress. *Int J Mol Sci*. (2013) 14(3):6044-66.
- Seib T, Blin N, Hilgert K, Seifert M, Theisinger B, Engel M, Dooley S, Zang KD and Welter C. The Three Human Trefoil Genes TFF1, TFF2, and TFF3 Are Located within a Region of 55 kb on Chromosome 21q22.3. *Genomics* (1997) 40:200–202.

- Selbach M, Moese S, Meyer TF, Backert S. Functional analysis of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island reveals both VirD4-CagA-dependent and VirD4-CagA-independent mechanisms. *Infect Immun* (2002) 70 (2):665-71.
- Selvaraj A, Balamurugan K, Yepiskoposyan H, Zhou H, Egli D, Georgiev O, Thiele DJ, and Schaffner W Metal-responsive transcription factor (MTF-1) handles both extremes, copper load and copper starvation, by activating different genes. *Genes Dev* (2005) 19:891–896.
- Shimada T, Koitabashi A, Fujii Y, Hashimoto T, Hosaka K, Tabei K, Namatame T, Yoneda M, Hiraishi H, Terano A. PPARgamma mediates NSAIDs-induced upregulation of TFF2 expression in gastric epithelial cells. *FEBS Lett* (2004) 558(1-3):33-8.
- Skoog EC, Sjöling Å, Navabi N, Holgersson J, Lundin SB, Lindén SK. Human gastric mucins differently regulate *Helicobacter pylori* proliferation, gene expression and interactions with host cells. *PLoS One*.(2012) 7(5):e36378.
- Smid M, Wang Y, Klijn JG, Sieuwerts AM, Zhang Y, Atkins D, Martens JW, Foekens JA. Genes associated with breast cancer metastatic to bone. *J Clin Oncol* (2006) 24(15):2261-7.
- Suemori S, Lynch-Devaney K and Podolsky DK. Identification and characterization of rat intestinal trefoil factor: tissue- and cell-specific member of the trefoil protein family. *Proc Natl Acad Sci USA* (1991) 88(24):11017-21.
- Sun J-M, Spencer VA, Li L, Chen HY, Yu J, Davie JR.. Estrogenregulation of trefoil factor 1 expression by estrogen receptor alpha and Sp proteins. *Exp Cell Res* (2005) 302:96–107.
- Taupin D, Wu DC, Jeon WK, Devaney K, Wang TC and Podolsky DK. The trefoil gene family are coordinately expressed immediate-early genes: EGF receptor-and MAP kinase-dependent interregulation. *J Clin Invest* (1999) 103(9):R31-8.
- Taupin D, Podolsky DK. Trefoil factors: initiators of mucosal healing. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2003) 4(10):819.
- Thim L, A new family of growth factor –like peptides. Trefoil disulphide loop structures as a common feature in breast cancer associated peptides (pS2), pancreatic spasmolytic polypeptide (PSP), and frog skin peptides (spasmolysins). *FEBS Lett*. (1989) 250(1):85-90.
- Thim L, Madsen F. and Poulsen SS. Effect of trefoil factors on the viscoelastic properties of mucus gels. *Eur J Clin Invest* (2002) 32(7):519-27.
- Thim L and May FEB. Structure of mammalian trefoil factors and functional insights. *Cell Mol Life Sci* (2005) 62(24):2956-73.
- Tomasetto C, Rio MC, Gautier C, Wolf C, Hareuveni M, Chambon P, Lathe R. hsp, the domain-duplicated homolog of pS2 protein, is co-expressed with pS2 in stomach but not in breast carcinoma. *EMBO J*. (1990) 9(2):407-14.
- Tomita H, Takaishi S, Menheniott TR, Yang X, Shibata W, Jin G, Betz KS, Kawakami K, Minamoto T, Tomasetto C, Rio MC, Lerkowit N, Varro A, Giraud AS, Wang TC. Inhibition of gastric carcinogenesis by the hormone gastrin is mediated by suppression of TFF1 epigenetic silencing. *Gastroenterology* (2011) 140(3):879-91.
- Tosco A, Monti MC, Fontanella B, Rio MC, Gomez-Paloma L, Leone A, Marzullo L. Copper-binding activity of Trefoil factor 1 (TFF1): a new perspective in the study of the multifunctional roles of TFFs. *Peptides* (2007) 28(7):1461-9.
- Tosco A, Fontanella B, Danise R, Cicatiello L, Grober OM, Ravo M, Weisz A, Marzullo L. Molecular bases of copper and iron deficiency-associated dyslipidemia: a microarray analysis of the rat intestinal transcriptome. *Genes Nutr* (2010) 5(1):1-8.
- Tosco A, Monti MC, Fontanella B, Montefusco S, D'Andrea L, Ziaco B, Baldantoni D, Rio MC, Marzullo L. Copper binds the carboxy-terminus of trefoil protein 1 (TFF1), favoring its homodimerization and motogenic activity. *Cell Mol Life Sci* (2010) 67(11):1943-55.
- Tu S, Chi AL, Lim S, Cui G, Dubeykovskaya Z, Ai W, Fleming W, Takaishi S, Wang TC. Gastrin regulates the TFF2 promoter through gastrin –responsive cis-acting elements and

- multiple signaling pathways. *Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol* (2007) 292(6):G1726-37.
- Trapaidze A, Hureau C, Bal W, Winterhalter M, Faller P. Thermodynamic study of Cu<sup>2+</sup> binding to the DAHK and GHK peptides by isothermal titration calorimetry (ITC) with the weaker competitor glycine. *J Biol Inorg Chem.* (2012) 17(1):37-47.
- Van den Brink GR, Tytgat KM, Van der Hulst RW, Van der Loos CM, Einerhand AW, Büller HA, Dekker J. *H. pylori* colocalises with MUC5AC in the human stomach. *Gut.* (2000) 46(5):601-7.
- Vestergaard EM, Nexø E, Tørring N, Borre M, Ørntoft TF, Sørensen KD. Promoter Hypomethylation and upregulation of trefoil factors in prostate cancer. *Int J Cancer* (2010) 127(8):1857-65.
- Westley B, Rochefort H. A secreted glycoprotein induced by estrogen in human breast cancer cell lines *Cell.* (1980) 20(2):353-62.
- Westley BR, Griffin SM, and May FE. Interaction between TFF1, a gastric tumor suppressor trefoil protein, and TFIZ1, a brichos domain-containing protein with homology to SP-C. *Biochemistry* (2005) 44 (22):7967-75.
- Williams MA, Westley BR, May FE, Feeney J. The solution structure of the disulphide-linked homodimer of the human trefoil protein TFF1. *FEBS Lett.* (2001) 493(2-3):70-4.
- Wirth PL, Linder MC. Distribution of copper among components of human serum. *J Natl Cancer Inst* (1985) 75(2):277-84.
- Xia HH, Yang Y, Lam SK, Wong WM, Leung SY, Yuen ST, Elia G, Wright NA, Wong BC. Aberrant epithelial expression of trefoil family factor 2 and mucin 6 in *Helicobacter pylori* infected gastric antrum, incisura, and body and its association with antralisation. *J Clin Pathol.* (2004) 57(8):861-6.
- Wiseman T, Williston S, Brandts JF, Lin LN. Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal Biochem.* (1989) 179(1):131-7.
- Yio X, Diamond M, Zhang JY, Weinstein H, Wang LH, Werther L, Itzkowitz S. *Trefoil factor family-1 mutations enhance gastric cancer cell invasion through distinct signaling pathways.* *Gastroenterology* (2006) 130(6):1696-706.
- Yoshiyama H, Nakazawa T. Unique mechanism of *Helicobacter pylori* for colonizing the gastric mucus. *Microbes Infect.* (2000) 2(1):55-60.
- Zavros Y, Eaton KA, Kang W, et al. Chronic gastritis in the hypochlorhydric gastrin-deficient mouse progresses to adenocarcinoma. *Oncogene* (2005) 24:2354–2366.
- Zhan M, Zhao H, Han ZC. Signalling mechanisms of anoikis. *Histol Histopathol.* (2004) 19(3):973-83.

## COLLABORAZIONI

Le analisi di spettrometria di massa sono state eseguite in collaborazione con la Dott.ssa Maria Chiara Monti del Dipartimento di Farmacia dell'Università di Salerno.

Gli esperimenti di infezione *in vitro* sono stati eseguiti in collaborazione con la Dott.ssa Amalia Porta del Dipartimento di Farmacia dell'Università di Salerno.

Le analisi reologiche sono state eseguite presso il Dipartimento di Ingegneria Industriale dell'Università di Salerno in collaborazione con la Prof.ssa Maria Rossella Nobile.

I peptidi sono stati sintetizzati dal Dott. Luca D'Andrea dell'Istituto di Biomolecole e Biostrutture del CNR di Napoli.



## **RINGRAZIAMENTI**

Il bianco di questa pagina finale si lascia facilmente colorare dalle emozioni degli ultimi tre anni. Il rosso della passione per la ricerca, il verde dell'ottimismo che non è (quasi!) mai mancato, il giallo dei momenti di spensieratezza ed allegria, il nero delle difficoltà, il marrone della cioccolata condivisa, il familiare azzurro del corridoio attraversato spesso di corsa. L'argento del banco e il blu del mio quaderno.

Ed è per questo turbinio di colori che voglio ringraziare le persone che mi sono state accanto in questa esperienza. Innanzitutto ringrazio la Prof.ssa Alessandra Tosco per aver creduto in me e avermi dato la possibilità di crescere giorno dopo giorno, spronandomi con nuove sfide ed obiettivi; per essere stata severa e comprensiva al momento giusto. Ringrazio il Prof. Liberato Marzullo per le conversazioni scientifiche e non, per avermi spinto a vedere le cose da diverse prospettive...e per avermi insegnato a "respirare"!

Ringrazio tutte le persone con cui ho condiviso la quotidianità della vita di laboratorio: Sandro con cui ho mosso i primi passi e che mi è vicino anche da lontano; Piera, Ale piccola, Sara, Elisa, Franci, Raffaella, Ale grande per essere state comprensive e attente nei momenti critici, per le chiacchiere, le confidenze, le risate che hanno alleggerito e reso indimenticabile il tempo trascorso insieme; Valentina per i preziosi consigli "immunofluo-filosofici"; Luigi e Chiaretta per essere stati il mio "secondo lab", fidati compagni di viaggio e preziosi confidenti nei momenti di frustrazione e sconforto, capaci di sorridere in ogni occasione.

Ringrazio i miei colleghi, oramai Ph.D (!!!): Vittoria con cui ho condiviso tutto, ben oltre la vita di laboratorio; Margot, Maria Caterina, Anna, Raffaella, Luana, Alessandra per le serate del mercoledì (ex-martedì); Gaetano per il bene che mi vuole e che ricambio; Giovanni per la compagnia e l'allegria.

Naturalmente ringrazio la mia famiglia perché è a casa che si torna dopo una giornata di laboratorio, per averla resa il luogo dove ricaricare le pile, per aver sopportato i miei silenzi e le parole di troppo. Ringrazio Raffaele che condivide i miei fardelli e che mi è stato accanto come solo lui sa fare.