

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.