



Unione Europea



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO

Dottorato di ricerca in
Biochimica e Patologia dell'Azione dei Farmaci
IX ciclo – nuova serie

Studio del ruolo funzionale e caratterizzazione strutturale del cuprocomplesso TFF1-Cu

Dottorando	Sandro Montefusco
Tutore	Ch.mo Prof. Liberato Marzullo
Co-Tutore	Ch.ma Prof.ssa Alessandra Tosco
Coordinatore	Ch.ma Prof.ssa Antonietta Leone

INDICE

ABSTRACT	<i>pag 5</i>
SOMMARIO	<i>pag 8</i>
CAPITOLO 1	
INTRODUZIONE	<i>pag 11</i>
1.1 Trefoil Factor 1	<i>pag 11</i>
1.1-1 Caratteri generali dei TREFOIL FACTORS	<i>pag 11</i>
1.1-2 Caratteristiche strutturali dei TFF	<i>pag 12</i>
1.1-2a <i>Le strutture di TFF1</i>	<i>pag 13</i>
1.1-3 I ruoli funzionali di TFF1	<i>pag 15</i>
1.1-3a <i>Protezione e rigenerazione delle mucose intestinali</i>	<i>pag 15</i>
1.1-3b <i>Attività anti-apoptotica e anti-proliferativa</i>	<i>pag 16</i>
1.1-3c <i>Attività motogenica</i>	<i>pag 18</i>
1.1-3d <i>Attività pro-angiogenica</i>	<i>pag 18</i>
1.1-4 Regolazione dell'espressione dei TFF	<i>pag 18</i>
1.1-4a <i>Regolazione dell'espressione di tff1</i>	<i>pag 19</i>
1.1-5 Dal topo <i>knock-out</i> allo studio dei tumori	<i>pag 21</i>
1.1-5a <i>Differenziamento della mucosa ossintica</i>	<i>pag 21</i>
1.1-5b <i>TFF1 e il tumore gastrico</i>	<i>pag 22</i>
1.1-5c <i>TFF1 e il tumore al seno</i>	<i>pag 24</i>
1.1-6 TFF1 e Rame	<i>pag 25</i>
1.1-6a <i>Il Rame: aspetti generali</i>	<i>pag 25</i>
1.1-6b <i>Rame e regolazione trascrizionale</i>	<i>pag 28</i>
1.1-6c <i>Cuprocomplesso TFF1-Cu</i>	<i>pag 30</i>
1.2 <i>Helicobacter pylori</i>	<i>pag 32</i>
1.2-1 Caratteri generali	<i>pag 32</i>
1.2-1a <i>Epidemiologia dell'infezione</i>	<i>pag 32</i>
1.2-1b <i>Trasmissione</i>	<i>pag 33</i>
1.2-1c <i>Fattori coinvolti nella colonizzazione, adesione e sopravvivenza</i>	<i>pag 33</i>
1.2-1d <i>Lipopolisaccaridi</i>	<i>pag 34</i>
1.2-2 Principali Fattori di virulenza	<i>pag 35</i>
1.2-2a <i>L'isola di patogenicità cagA di H. pylori</i>	<i>pag 35</i>
1.2-2b <i>La tossina VacA</i>	<i>pag 36</i>
1.2-2c <i>Le adesine: BabA e SabA</i>	<i>pag 36</i>
1.2-3 Patogenesi	<i>pag 37</i>
1.2-3a <i>Gastrite acuta</i>	<i>pag 37</i>
1.2-3b <i>Gastrite cronica</i>	<i>pag 37</i>
1.2-4c <i>Ulcera peptica</i>	<i>pag 38</i>
1.2-4d <i>Gastrite atrofica, metaplasma intestinale e cancro gastrico</i>	<i>pag 38</i>

1.3-4e Linfoma gastrico MALT-oma	pag 38
1.2-4 Helicobacter pylori – TFF	pag 39
1.2-4a Helicobacter pylori - TFF2	pag 39
1.2-4b Helicobacter pylori – TFF1	pag 39
1.3 Scopo della Tesi	pag 42
Capitolo 2	
Risultati	pag 43
2.1 Modulazione dell'espressione di <i>tff1</i> rame-dipendente	pag 43
2.1-1 Variazione dell'espressione di <i>tff1</i> in cellule di adenocarcinoma gastrico	pag 45
2.1-2 Identificazione di elementi sensibili alle concentrazioni di rame sul promotore di <i>tff1</i>	pag 45
2.1-3 Caratterizzazione di un sito putativo di legame per il fattore di trascrizione SP1	pag 46
2.2 Coinvolgimento del peptide TFF1 nell'omeostasi del rame	pag 49
2.2-1 Analisi di assorbimento atomico su topi <i>tff1</i> ^{-/-}	pag 50
2.2-2 Analisi di assorbimento atomico in modelli cellulari	pag 51
2.3 Il rame e l'attività motogena di TFF1	pag 53
2.4 Il rame e l'infezione di <i>H. pylori</i> mediata da TFF1	pag 56
2.4-1 Infezione di <i>Helicobacter pylori</i> in AGS-AC1	pag 58
2.4-2 Infezione di <i>Helicobacter pylori</i> in HT29-E12	pag 60
2.5 Il rame e le variazioni delle proprietà del muco protettivo in cellule gastrointestinali	pag 61
Capitolo 3	
Discussione	pag 64
Capitolo 4	
Materiali e Metodi	pag 68
4.1 Colture cellulari	pag 68
4.2 Saggi di vitalità cellulare con MTT	pag 68
4.3 Real-Time quantitativa RT-PCR	pag 69
4.4 Costruzione dei plasmidi	pag 69

4.5 Saggi di Luciferasi	<i>pag 70</i>
4.6 Analisi elettroforetica dello spostamento di mobilità (EMSA)	<i>pag 70</i>
4.7 Analisi della proteina secreta nel supernatante e in lisati cellulari	<i>pag 71</i>
4.8 Western blotting	<i>pag 72</i>
4.9 Analisi di assorbimento atomico in tessuti di topi <i>knock-out</i> tff1 -/-	<i>pag 72</i>
4.10 Analisi di assorbimento atomico su cellule AGS-AC1	<i>pag 73</i>
4.11 Saggi di migrazione cellulare (<i>wound healing assay</i>)	<i>pag 73</i>
4.12 Ceppi batterici e condizioni di crescita	<i>pag 73</i>
4.13 Saggi di vitalità per <i>H. pylori</i>	<i>pag 74</i>
4.14 Infezioni di <i>H. pylori</i> in colture cellulari	<i>pag 74</i>
4.15 Immunofluorescenze su AGS-AC1	<i>pag 74</i>
4.16 Analisi di CagA fosforilato in cellule infettate da <i>H. pylori</i>	<i>pag 75</i>
4.17 Esperimenti di colonizzazione su AGS-AC1	<i>pag 75</i>
4.18 Esperimenti di colonizzazione su HT29-E12	<i>pag 75</i>
4.19 Preparazione di cellule HT29-E12 per la microscopia	<i>pag 76</i>
4.20 Immunofluorescenze su HT29-E12	<i>pag 76</i>
4.21 Colorazione Alcian Blu / Neutral Red	<i>pag 76</i>

BIBLIOGRAFIA	<i>pag 77</i>
---------------------	---------------

ABSTRACT

The maintenance of gastrointestinal tissue integrity is physiologically essential in the presence of the persistent harassment of microbial flora and injurious agents. Even though the repair of the gastric epithelium may be modulated by several factors, the epithelial continuity also depends on a family of small peptides called trefoil factors (TFFs). The trefoil factors family comprises the gastric peptides pS2/TFF1, the spasmolytic peptide (SP)/TFF2 and the intestinal trefoil factor (ITF)/TFF3; they are characterized by a three looped domain, the "trefoil domain", stabilized by three disulphide bridges. TFF1 and TFF3 also have a seventh cysteine that allows the formation of homo- and/or hetero-dimers. On the other hand TFF2 presents only a monomeric form, containing two trefoil domains in the same polypeptide chain. TFFs are small protease-resistant proteins that are abundantly produced by mucus-secreting cells of the gastrointestinal tract onto the mucosal surface. TFFs are essential in the protection of the mucosal epithelia against a wide range of biological threats, thus contributing to the mucosal repair. The signaling events that mediate the cellular responses elicited by TFFs are only partially understood. Moreover there are convincing evidence that TFFs do play an important role in tumorigenesis, even though their specific roles in cancer are still unclear.

TFF1 expression is strongly induced after mucosal injury and it has been proposed that TFF1 functions as a gastric tumor suppressor gene. Several studies confirm that TFF1 expression is frequently lost in gastric cancer because of deletions, mutations or methylation of the TFF1 gene. Infection by *Helicobacter pylori*, a class 1 carcinogen according to WHO classification, is thought to promote stomach carcinogenesis through induction of aberrant DNA methylation. Samples from infected patients show lower expression of TFF1. Recent studies have also shown that there is a direct relationship between *Helicobacter pylori* and the dimeric form of the protein. In fact, it was demonstrated that the core oligosaccharide portion of *H. pylori* lipopolysaccharide (RF-LPS) is able to bind to TFF1.

It also seems that the loss of TFF1 is an important event in shaping the NF- κ B-mediated inflammatory response during the progression to gastric tumorigenesis, being TFF1 a negative regulator of NF- κ B signalling. It is thus emerging a clear correlation between loss of TFF1, the development of inflammatory disease and the neoplastic process.

Recent analyses made by our research group allowed us to point out the up-regulation of TFF1 gene expression in rats fed on copper deficient diets, and allowed us to find out the unexpected ability of TFF1 to bind copper ions. The presence of a cysteine surrounded by several negatively charged residues in the carboxy-terminus of the protein suggested the presence of a copper-binding site. Afterwards, it was shown that Cys58 and at least three Glu surrounding residues are essential to efficiently bind copper. Moreover, the incubation of the native peptide with copper salts increases the fraction of peptide omodimers produced by inter-molecular oxidation of Cys58 and disulphide bond formation.

The Ph.D. research project was aimed at characterising the structure-function relationship of the TFF1-Cu complex. Briefly, we studied the influence of copper on known TFF1 biological activities and on its gene regulation, then we investigated its involvement in the TFF1 mediated mechanisms of *Helicobacter pylori* virulence and infection.

ABSTRACT

A preliminary Real Time PCR quantitative analysis showed that copper deficiency positively modulates *tff1* expression in an adenocarcinoma cell line (AGS), thus confirming our previous data obtained *in vivo* in copper deficient rat intestine.

In order to map possible copper responsive elements in the proximal promoter sequence, we analysed the expression of a reporter gene (Luciferase) driven by deletion constructs of the *tff1* gene promoter. AGS cells transfected with the deletion constructs allowed us to identify the upstream 5' gene sequence -583/-435 as a promoter region sensitive to the changes of copper concentration. In fact, copper chelation treatments with bathocuproine disulfonate (BCS) were able to stimulate an increase of the promoter activity of the corresponding deletion construct. Following the sequence analysis (*Transfac* software) we focused our attention on a putative SP1 binding site identified in this region, whose binding ability was then confirmed by electrophoretic mobility shift assay (-561/-552).

In agreement with our *in vitro* results, it was also observed that copper favours the native TFF1 dimer formation in the culture medium of MCF-7 and HT29-MTX cells (a mucus-secreting clone obtained from the HT29 colon cancer cell line), thus confirming a possible role of the metal in the balance between the monomeric and the dimeric forms.

To evaluate the effect of copper-TFF1 interaction on the well known motogenic activity of the protein, we performed wound healing assays on an inducible clone of gastric cancer cells (AGS) able to overexpress the peptide (AGS-AC1). As expected, the overexpression of TFF1 stimulates an appreciable increase of cell migration, and copper chelation (BCS) undo the benefits of the increased peptide level.

Our previous results showed that copper treatments decreased the amount of secreted protein in culture medium. Further experiments demonstrated that induced AGS-AC1 cells are able to store intracellularly higher amount of copper if compared to uninduced AGS-AC1 cells. This evidence suggests that TFF1 levels may also play a role also in the uptake/traffic of copper in this *in vitro* model.

Finally, we studied the combined influence of TFF1 and copper in *Helicobacter pylori* infections. Our results demonstrate that Cu-TFF1 complex promotes *H. pylori* colonization of AGS cells. In fact, AGS-AC1 cells overexpressing TFF1 are more efficiently colonised by *H. pylori* wild-type (str. P12) if compared to uninduced cells. The presence of copper in a duplicate experiment further increases the colonization, as well as copper chelation by bathocuproine disulfonate (BCS) reduces the observed effect. The same result was obtained with *H. pylori* str. P12 Δ 479, an isogenic mutant expressing a truncated LPS core still able to bind to TFF1. On the other hand, *H. pylori* P12 Δ 1191, unable to bind TFF1, is not affected by copper levels in the culture medium. Parallel experiments were carried out on mucus secreting HT29-E12 goblet cells, to compare and/or confirm the results obtained in AGS-AC1. The results show that also in HT29-E12 cells the *H. pylori* colonization follows a similar trend, increasing when incubated in the presence of Cu and decreasing after BCS treatment.

The present work contributed interesting results in the field of the biochemistry of the epithelia, in the wake of the research in progress in our laboratory aimed at studying the biological activities of the newly identified metalloprotein Cu-TFF1, whose properties are still poorly characterized. On the basis of the previous structural pieces of evidence we observed that the protein level and the balance of its oligomeric forms can be affected and regulated by copper ions. In turn, this delicate equilibrium is able to affect the integrity and the rheological properties of the epithelial barrier, thus representing a fine tuner, or an Achilles's heel, through which pathogenic microorganisms and deregulated proliferation of neoplastic cells may take advantage

ABSTRACT

for their invasiveness. The role of copper in the TFFs biochemistry represents a new finding in the puzzling and versatile functions of this interesting peptide family, whose thorough comprehension still reserves many questions and surprises.

SOMMARIO

Il tratto gastrointestinale è continuamente sottoposto all'azione di fattori in grado di alterarne la struttura e di conseguenza la funzione biologica. È evidente che un sistema dedicato all'importante compito di assorbire sostanze utili all'organismo ed eliminare quelle di rifiuto debba disporre di un efficace sistema di protezione e riparo. Il muco protettivo che si forma sulla superficie luminale dell'epitelio e le secrezioni alcaline contenute nel suo interno, costituiscono una *barriera* che rappresenta la prima difesa fisica di protezione per la *mucosa gastrointestinale*. Tuttavia, il monostrato di cellule epiteliali presenta di frequente piccole ferite che richiedono un rapido intervento di ricostruzione che si realizza nei processi di *restituzione* e *rigenerazione*. Nella fase di restituzione viene promossa la migrazione delle cellule epiteliali che richiede la rapida destrutturazione delle giunzioni basolaterali e il dedifferenziamento cellulare. Successivamente, la fase di *rigenerazione* ristabilisce le condizioni di normale continuità epiteliale attraverso la proliferazione cellulare e la ricostituzione di elementi specializzati. La ricerca, in questi ultimi anni, ha dimostrato che i peptidi trifoglio (*trefoil factors* – TFF) svolgono un ruolo essenziale nei processi di ricostruzione e protezione degli epitelii, e nella rigenerazione della mucosa gastrica. Inoltre forti evidenze mostrano il coinvolgimento dei fattori trifoglio nei processi neoplastici, in particolare nelle prime fasi tumorigeniche in cui i processi infiammatori di un'ulcera possono degenerare in eventi pre-neoplastici (Regalo *et al.*, 2005).

La famiglia dei fattori trifoglio comprende un gruppo di piccole proteine: il peptide gastrico pS2 o TFF1, il peptide spasmolitico SP o TFF2 e il fattore trifoglio intestinale ITF o TFF3. La caratteristica comune di questi peptidi è un motivo strutturale, il dominio "trifoglio", caratterizzato da una sequenza di 38-39 amminoacidi contenenti sei residui di cisteine in grado di formare tre legami disolfuro. Nell'uomo i TFF sono espressi principalmente nei tessuti epiteliali gastrici dove avviene la formazione di granuli secernenti muco (Hoffmann *et al.*, 2005).

In questi ultimi anni studi clinici e sperimentali hanno dimostrato una funzione attiva dei peptidi trifoglio nella genesi dei processi neoplastici, anche se il ruolo biologico dei TFF in tali processi resta per molti aspetti ancora poco chiaro. TFF1 è principalmente associato al tumore al seno e al cancro gastrico, ma sono state descritte variazioni dei livelli di espressione anche nel cancro pancreatico, polmonare, prostatico e coloretale (Regalo *et al.*, 2005). Diversi studi confermano che l'espressione di TFF1 è assente o ridotta nel cancro gastrico a causa di delezioni o mutazioni della sequenza genica o metilazione nel suo promotore (Kato *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2006). Questi dati insieme agli studi condotti sui topi *knock-out* per TFF1, hanno consentito di ipotizzare una funzione di *tumor suppressor* nel cancro gastrico.

D'altra parte, si ritiene che l'infezione da *Helicobacter pylori* possa promuovere la carcinogenesi nello stomaco anche attraverso l'induzione di un'aberrante metilazione nel DNA, e pazienti positivi ai test di infezione mostrano una marcata riduzione dei livelli di espressione di TFF1. Inoltre, recenti ed interessanti studi mostrano una specifica interazione tra TFF1 e *Helicobacter pylori* (Clyne *et al.*, 2004). È stato dimostrato che il batterio lega la forma dimerica della proteina, e che in particolare le forme degli LPS di *H. pylori* a basso peso molecolare, mediano tale legame (Reeves *et al.*, 2008).

Precendenti studi effettuati dal nostro gruppo di ricerca, hanno permesso di identificare il peptide TFF1 come uno dei geni maggiormente indotti nell'intestino di ratti sottoposti ad una dieta carente del metallo. Studi successivi hanno dimostrato la

SOMMARIO

capacità di TFF1 di legare specificamente il rame (Tosco *et al.*, 2007), individuando nella sequenza carbossi-terminale il sito di legame per il metallo (Tosco *et al.*, 2010). Alla luce di questi risultati, il presente progetto di dottorato è stato finalizzato allo studio delle relazioni struttura-funzione del complesso TFF1-Cu

Mediante esperimenti di Real Time PCR effettuati su cellule di adenocarcinoma gastrico AGS, abbiamo confermato la regolazione positiva di *tff1* in condizioni di carenza di rame. Tali evidenze hanno consentito di avviare uno studio del promotore di *tff1* finalizzato alla individuazione delle regioni direttamente coinvolte nella regolazione dipendente dal rame. In particolare è stata identificata la presenza di specifici elementi sensibili alle variazioni di concentrazione del metallo nella regione -583/-435 non codificante del gene, capaci di regolarne positivamente l'espressione. L'analisi di sequenza ha quindi indirizzato la nostra attenzione su di una putativa sequenza di legame al fattore di trascrizione SP1(-559/-551). I successivi saggi di mobilità elettroforetica (EMSA) hanno confermato l'interazione specifica tra il putativo elemento regolatorio e le proteine nucleari, la cui effettiva funzionalità in relazione al metallo è in corso di accertamento.

Studi pregressi effettuati nel nostro laboratorio mostravano una ridotta secrezione di TFF1 in condizioni di sovraccarico di rame. Tale evidenza aveva sollevato comprensibili interrogativi sull'eventuale ruolo del peptide nella omeostasi del metallo. I risultati ottenuti dalla analisi di assorbimento atomico dimostrano che cellule che sovraesprimono TFF1 (AGS-AC1) accumulano quantità maggiori di rame in condizioni di carenza di metallo, suggerendo un ruolo di TFF1 nei processi di assorbimento del metallo, al momento oggetto di ulteriore e più accurata verifica.

Esperimenti su linee cellulari umane hanno mostrato che il sovraccarico di rame promuove la formazione dell'omodimero di TFF1, che ha maggiore attività mitogenica. Saggi di migrazione cellulare (*wound healing*) su cellule gastriche (AGS-AC1) sovraesprimenti TFF1 ci hanno consentito di confermare che il rame promuove l'attività mitogenica, probabilmente favorendo tale trasformazione strutturale della proteina..

Le indicazioni desunte dai risultati ottenuti, unitamente ai dati sulla elevata affinità del batterio per il dimero di TFF1, hanno infine consentito di ipotizzare un possibile coinvolgimento del rame e/o del cuprocomplesso sulla capacità infettiva di *Helicobacter pylori*. Al fine di verificare tale ipotesi abbiamo utilizzato il clone cellulare inducibile AGS-AC1. In questo modello cellulare l'induzione dell'espressione di TFF1 correla con livelli di colonizzazione maggiori rispetto alle cellule controllo in cui non è stata indotta l'espressione della proteina. La contemporanea presenza di rame provoca inoltre un ulteriore incremento della percentuale di cellule infettate in seguito alla induzione della espressione di TFF1. Risultati analoghi sono stati ottenuti utilizzando il mutante isogenico di *H. pylori* P12Δ479, capace di produrre LPS tronchi ma ancora in grado di legare TFF1. Viceversa, utilizzando il mutante di *H. pylori* P12Δ119, caratterizzato da LPS tronchi incapaci di legare TFF1, non è più possibile osservare un uguale incremento dei livelli di colonizzazione. Analoghi esperimenti effettuati su cellule goblet HT29-E12, in cui è presente una espressione costitutiva di TFF1, dimostrano che l'effetto del rame riproduce un andamento della capacità di infezione simile e coerente con quello osservato in cellule AGS-AC1. In questo ultimo modello cellulare è stato inoltre possibile osservare che il rame produce l'ispessimento dello strato superficiale di muco, probabilmente dovuto ad una sua diversa strutturazione dipendente, come noto, dalla interazione delle mucine con TFF1.

Il lavoro qui esposto ha fornito risultati interessanti nell'ambito della biochimica degli epitelii, in linea con gli obiettivi della ricerca in corso nel nostro laboratorio

SOMMARIO

finalizzata allo studio delle attività biologiche del complesso Cu-TFF1 recentemente identificato, ma ancora scarsamente caratterizzate. Sulla base delle evidenze strutturali precedentemente ottenute, abbiamo osservato che i livelli della proteina ed il rapporto delle sue forme oligomeriche possono essere influenzate e regolate da ioni rame. A sua volta, questo delicato equilibrio è in grado di influenzare l'integrità e le proprietà reologiche della barriera epiteliale, rappresentando quindi un fine regolatore, o un punto di vulnerabilità, dal quale possono trarre vantaggio le strategie invasive di microrganismi patogeni o la proliferazione delle cellule neoplastiche. Il ruolo del rame nella biochimica dei fattori TFF rappresenta una novità che si aggiunge all'intricato puzzle di funzioni attribuite a questa interessante famiglia di peptidi, la cui comprensione riserva ancora numerosi interrogativi e sorprese.

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

1.1 TREFOIL FACTOR 1

1.1-1 Caratteri generali dei TREFOIL FACTORS

La famiglia dei fattori trifoglio (TFF) umani comprende tre piccole proteine: il peptide gastrico TFF1 (pS2), il peptide spasmolitico TFF2 (SP) e il fattore trifoglio intestinale TFF3 (ITF). I fattori TFF sono proteine resistenti alle proteasi, abbondantemente secrete nel tratto gastrointestinale e coinvolte nei processi di protezione e riparazione delle mucose. Essi condividono un motivo strutturale, il dominio "trifoglio", caratterizzato da una sequenza di circa 40 amminoacidi contenente sei residui di cisteina in grado di formare tre legami disolfuro intracatena che danno origine a tre *loop* da cui deriva il nome del dominio (Figura 1.1).

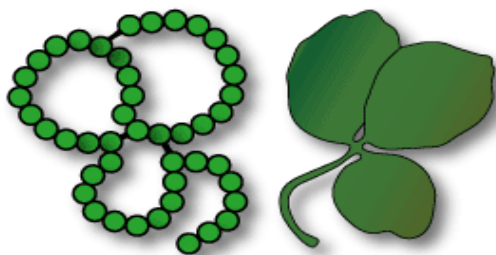


Figura 1.1: Rappresentazione schematica del dominio trifoglio.

TFF2 fu il primo membro della famiglia ad essere caratterizzato, circa trenta anni fa, e fu inizialmente denominato *spasmolytic polypeptide* (SP) per la sua capacità di inibire le contrazioni di tessuti intestinali (Jorgensen *et al.*, 1982; Thim *et al.*, 1982). Successivamente, fu identificato pS2/TFF1 come cDNA indotto da estrogeni nella linea cellulare di carcinoma mammario MCF-7 (Maisakowski *et al.*, 1982). Il terzo ed ultimo fattore, TFF3, fu identificato nel 1991 come cDNA da cellule epiteliali di villi intestinali di ratto (Sumeori *et al.*, 1991) e, in seguito, individuato anche come cDNA umano (Podolsky *et al.*, 1993). I geni che codificano i *trefoil factor* sono posizionati in tandem in una regione di circa 50 kb del braccio lungo del cromosoma 21 (21 q22.3), secondo l'ordine TFF1, TFF2 e TFF3 (Seib *et al.*, 1997).

Nell'uomo i TFF sono espressi principalmente nei tessuti epiteliali gastrici, caratterizzati dalla presenza di secrezioni mucose. Il muco protettivo che riveste gli epitelii è costituito essenzialmente da mucine, alle quali è correlata l'attività biologica dei fattori TFF (Hoffmann *et al.*, 2005). Numerosi studi hanno, infatti, dimostrato che i TFF sono secreti in modo coordinato con alcune specifiche mucine: TFF1 con MUC5AC, TFF2 con MUC6 e TFF3 con MUC2 (Sasaki *et al.*, 2007). Il principale sito di espressione per TFF1 è l'epitelio superficiale e foveolare dello stomaco, ma si riscontrano modesti livelli di espressione anche nelle ghiandole di Brunner (ghiandole deputate alla produzione di muco) e nel duodeno prossimale, dove invece è maggiore l'espressione di TFF2. Al di fuori del tratto gastrointestinale è stata osservata la presenza di TFF1 anche nell'epitelio respiratorio e nei dotti luminali di

cellule mammarie. Il distretto anatomico in cui si rilevano invece i maggiori livelli di TFF3 è l'intestino, in particolare nelle cellule *goblet*.

La presenza dei TFF è rilevabile anche nell'utero, nella mammella, in alcune regioni ipotalamiche, nell'ipofisi e nelle ghiandole salivari e lacrimali (Taupin and Podolsky, 2003).

1.1-2 Caratteristiche strutturali dei TFF

Le tre proteine TFF sono sintetizzate come pro-proteine contenenti una sequenza segnale di secrezione di 21-27 residui amminoacidici. Tale sequenza viene rimossa mediante proteolisi durante il passaggio attraverso il reticolo endoplasmatico, portando alla forma matura dei peptidi. Il primo componente di questa famiglia, TFF1 (6674 Da) è rappresentato da un pro-peptide di 84 amminoacidi dal quale matura un peptide di 60 amminoacidi contenente un singolo dominio trifoglio di 42 amminoacidi. Il secondo componente, TFF2 (11989 Da), è una proteina composta da 106 amminoacidi in una singola catena, con 7 ponti disolfuro e due domini trifoglio. L'ultimo fattore, TFF3, (6580 Da) è costituito da 59 amminoacidi ed un dominio trifoglio di 42 amminoacidi (Thim and May, 2005). Dalle analisi delle strutture secondarie e terziarie, ottenute mediante cristallografia a raggi X e NMR, emerge che tutti i domini trifoglio presentano elementi comuni: una corta α -elica, che comprende il terzo residuo di cisteina, e due corti β -sheet antiparalleli, il primo dei quali separato dall' α -elica da un unico residuo (Thim and May, 2005). Entrambi i foglietti beta includono motivi conservati: il primo contiene la sequenza CCF e il secondo la sequenza WCF-P (Figura 1.2).

```

Human TFF1          TC-TVAPRERQNCGFPGVTPSQCANKGCCFDDTVRGVVPWCFYP
Human TFF2 Domain 1 QCSRLSPHNRTNCGFPGITSDQCFDNGCCFDSSVTGVVPWCFHP
Human TFF2 Domain 2 QC-VMEVSDRRNCGYPGISPEECASRKCCFSNFIFEVVPWCFPP
Human TFF3          QC-AVPAKDRVDCGYPHVTPKECNNRGCCFD SRI PGVVPWCFKP

```

┌───┐
┌┐
┌┐

α
 β
 β

Figura 1.2: Allineamento tra le sequenze amminoacidiche dei domini trifoglio. In verde sono evidenziati i residui conservati (Thim and May, 2005).

Gli elementi di struttura secondaria nei domini trifoglio sono immobilizzati dai tre ponti disolfuro, che costituiscono il centro del *core* stabile dal quale sporgono i tre *loop* (Figura 1.3). La compattezza strutturale conferisce al dominio una particolare resistenza all'azione di enzimi proteolitici, una caratteristica utile e compatibile con la permanenza in ambiente extracellulare.

TFF1 e TFF3 presentano una settima cisteina che consente la formazione di un ulteriore legame disolfuro e quindi la formazione di omo- ed etero-dimeri. In TFF2, invece, due domini trifoglio coesistono nella unica forma monometrica.

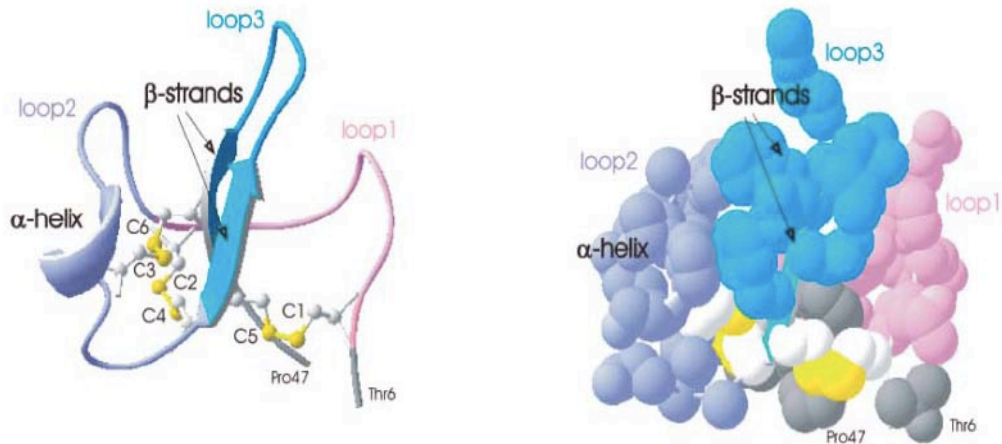


Figura 1.3 Elementi di struttura secondaria conservati nei domini trifoglio. In Figura la struttura del TFF1 umano. I residui di cisteina sono rappresentati come ball-and-stick (a sinistra) e gli atomi di zolfo sono colorati in giallo (Thim and May, 2005).

1.1-2a Le strutture di TFF1

Come descritto nel precedente paragrafo, TFF1 presenta un settimo residuo di cisteina extra-dominio (Cys58), all'estremità carbossi-terminale, che consente la formazione di omodimeri e di eterodimeri attraverso un legame disolfuro. L'omodimero (circa 14 kDa) si ottiene per formazione di un ponte disolfuro tra i residui Cys58 dei due monomeri (Chadwick *et al.*, 1997). Nell'omodimero i due domini trifoglio si dispongono in direzione opposta, non subiscono significative alterazioni strutturali, e sono legati da un linker flessibile (Figura 1.4). Inoltre, nel dimero si forma una regione fortemente acida dovuta all'avvicinamento di due regioni contenenti un acido aspartico e quattro residui di acido glutammico, presenti alle estremità carbossi-terminali di ciascun monomero.

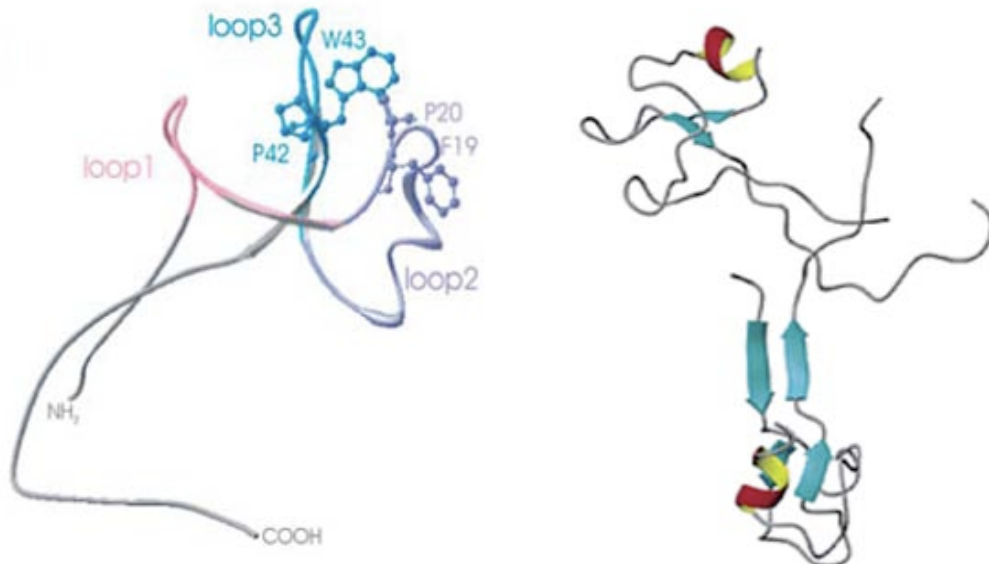
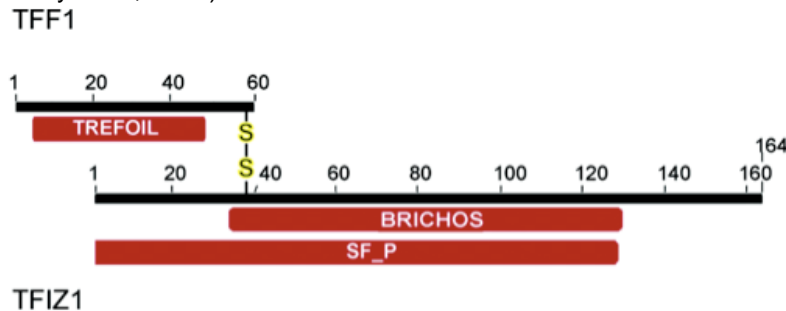


Figura 1.4: Monomero (sinistra) e dimero (destra), del peptide TFF1 (Thim and May, 2005).

La forma eterodimerica della proteina TFF1 è stata recentemente purificata dalla mucosa gastrica umana, nella quale è stata identificata la proteina partner TFIZ1 (trefoil factor interactions 1), conosciuta anche con i nomi GDDR, blottina o gastrochina 2. TFIZ è una proteina secreta di circa 18 kDa capace di legarsi a TFF1 attraverso un legame disolfuro che coinvolge il suo residuo Cys38 e Cys58 di TFF1 (Westley *et al.*, 2005) (Figura 1.5). Non sono state del tutto caratterizzate le funzioni biologiche di TFIZ1, ma sembra che esso sia coinvolto nella protezione della mucosa gastrica. L'eterodimero TFF1-TFIZ1 è la forma maggiormente presente nella normale mucosa gastrica (Westley *et al.*, 2009), suggerendo che la formazione dell'eterodimero influenzi il corretto svolgimento delle attività biologiche delle singole proteine, o determini l'insorgenza di attività biologiche alternative e/o modulabili. Alcuni studi condotti per valutare l'espressione di TFIZ1 in tumori gastrici indicano che variazioni dei livelli di espressione della proteina sono associati a processi tumorali. In particolare TFIZ1 è assente nei tumori gastrici, a differenza di TFF1 che è presente nelle metastasi tumorali. Questi dati suggeriscono che l'espressione di TFF1 in assenza di TFIZ1 conferisce alle cellule gastriche tumorali un fenotipo maggiormente invasivo. La proteina TFIZ1 potrebbe essere essa stessa un soppressore tumorale, oppure la formazione dell'eterodimero potrebbe essere essenziale per l'attività di oncosoppressore di TFF1. Inoltre, la mancata formazione dell'eterodimero potrebbe favorire la formazione di TFF1 omodimerico, che si è dimostrato un forte promotore della motilità e dell'invasione delle cellule tumorali gastriche (Westley *et al.*, 2009).



TFIZ1
Figura 1.5: Eterodimero di TFF1-TFIZ1 (Westley *et al.*, 2005).

1.1-3 I ruoli funzionali di TFF1

I TFF sono coinvolti nei processi di protezione e rigenerazione delle mucose gastrointestinali. Hanno, inoltre, un ruolo nella proliferazione, angiogenesi, apoptosi, migrazione cellulare e differenziamento. In questi ultimi anni diversi studi hanno associato ai fattori TFF importanti funzioni nell'insorgenza e sviluppo di processi neoplastici.

1.1-3a Protezione e rigenerazione delle mucose intestinali

Il tratto gastrointestinale è continuamente sottoposto all'azione di fattori in grado di alterarne la struttura e di conseguenza la funzione biologica. Tale distretto anatomico ha dunque dovuto evolvere un efficace ed efficiente sistema di protezione e riparazione, al fine di proteggere le delicate funzioni di assorbimento ed escrezione dalle sollecitazioni da parte di agenti biologici e meccanici potenzialmente pericolosi per la sua integrità. Il monostato cellulare dell'epitelio gastrointestinale che riveste il lato luminale del tubo digerente, insieme al muco gelatinoso protettivo che si forma

sulla sua superficie ed alle secrezioni alcaline, costituiscono una prima barriera di difesa fisica e chimica a protezione della mucosa gastrica.

Ruolo fondamentale del muco è quello di attenuare gli stress meccanici, lubrificare le superfici epiteliali e proteggere l'epitelio stesso. Le mucine, glicoproteine caratterizzate da uno scheletro proteico (apo-mucina) al quale sono legati oligosaccaridi *O-linked*, sono costituenti essenziali del muco. È possibile suddividere le mucine in due classi: mucine transmembrana e mucine secrete, a loro volta distinte in mucine secrete capaci di formare il muco e mucine che non lo formano. Le mucine secrete che formano il muco (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6 e MUC19) sono espresse da cellule goblet dell'intestino e da cellule delle mucose. Esse hanno la capacità di formare una rete di complessi multimeri, che conferisce al muco particolari caratteristiche reologiche, grazie alla presenza nella loro sequenza di un dominio ricco in cisteine che consente la formazione di legami disolfuro intra- e intermolecolari. Diversi studi mostrano che i TFF sono coinvolti nella strutturazione del gel mucoso, conferendo ad esso caratteristiche proprietà chimico-fisiche (viscosità, elasticità) utili a svolgere correttamente le funzioni di difesa da agenti fisici e biologici (Gouyer *et al.*, 2001). TFF2, ad esempio, è coinvolto nella formazione di un muco molto viscoso e quindi ottimale per proteggere lo stomaco e il piccolo intestino, continuamente esposti all'azione di enzimi digestivi. TFF3 e TFF1, viceversa, contribuiscono a rendere il muco meno viscoso rispetto a TFF2 ma funzionale alla rimozione di batteri e microparticelle nelle vie respiratorie e nell'intestino (Thim *et al.*, 2002). In particolare è stata dimostrata anche una diretta associazione tra TFF1 e la mucina MUC5AC (Ruchaud-Sparagano *et al.*, 2004).

Nonostante l'elaborato sistema di protezione, il monostrato di cellule rivestite da questo sottile gel mucoso presenta di frequente, in particolare nella zona luminale, piccole lacune che richiedono un veloce intervento di ricostruzione epiteliale attraverso meccanismi di rimodellamento, proliferazione e differenziamento cellulare, che si realizzano nei processi di restituzione e rigenerazione (Hoffmann W., 2005). Nella fase di restituzione viene promossa la migrazione delle cellule epiteliali per ricoprire e risaldare le lacune provocate da agenti nocivi. Tale processo richiede la rapida destrutturazione delle giunzioni basolaterali, il dedifferenziamento cellulare e la migrazione delle cellule superficiali. Il momento successivo, la rigenerazione, è la fase in cui si ristabiliscono le condizioni di normale continuità epiteliale attraverso la proliferazione cellulare e la ricostituzione di elementi specializzati (Figura 1.6).

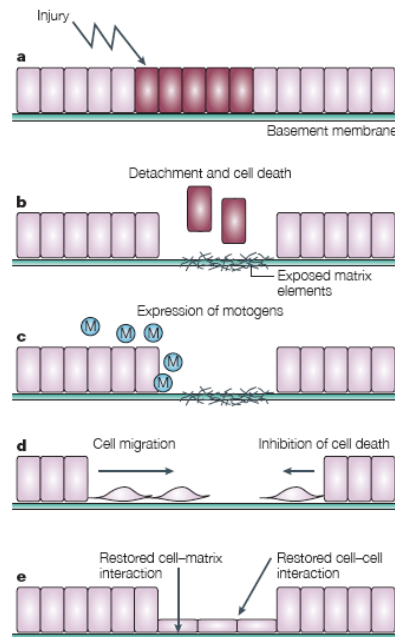


Figura 1.6. Rappresentazione schematica delle fasi della restituzione epiteliale (Taupin and Podolsky, 2003)

Sebbene nei processi di restituzione epiteliale abbiano un ruolo chiave il fattore di crescita epiteliale (EGF), il fattore di crescita degli epatociti (HGF) e il fattore di crescita alfa trasformante (TGF- α), la ricerca, in questi ultimi anni, ha rivolto la sua attenzione anche ai peptidi trifoglio in quanto essi sembrano essere coinvolti nelle differenti fasi della restituzione, modulando il contatto cellula-cellula, la migrazione cellulare, l'apoptosi e l'angiogenesi (Taupin and Podolsky, 2003).

1.1-3b Attività anti-apoptotica e anti-proliferativa

Uno degli eventi principali nel processo di restituzione epiteliale è la destrutturazione delle giunzioni basolaterali, a cui segue la perdita di contatto cellula-cellula e quindi la loro capacità di migrare verso l'area danneggiata. La perdita di contatto può provocare in queste cellule un tipo di morte cellulare programmata detta *anoikis*. In questo contesto risulta fondamentale il ruolo anti-apoptotico di TFF1. Studi effettuati su modelli cellulari indicano un effetto anti-apoptotico soltanto nei processi di morte programmata dipendenti dall'ancoraggio delle cellule. Questo tipo di morte cellulare causa il rilascio del *citocromo c* dai mitocondri ed è fortemente attivata dalle caspasi. È stato dimostrato che gli effetti anti-apoptotici di TFF1 sono dovuti alla sua capacità di bloccare parzialmente o completamente l'attività della caspasi 9 (Bossenmeyer-Pourie *et al.*, 2002).

In contrasto con quest'attività, è stata dimostrata la capacità di TFF1 di inibire la transizione del ciclo cellulare dalla fase G1 alla fase S e quindi la proliferazione cellulare. Tale evento è strettamente regolato in quanto esso determina la progressione della cellula nella fase di proliferazione. I due principali regolatori di questo processo sono pRb ed E2F che, rispettivamente, inibiscono e promuovono la transizione di fase. E2F guida il passaggio nella fase S attraverso l'attivazione di una serie di geni che rendono effettiva la transizione. pRb inibisce tale processo legandosi, nella sua forma non fosforilata, al fattore di trascrizione E2F, arrestando in questo modo la cellula nella fase G1. TFF1 provoca un aumento dell'attività di pRb e

quindi determina un decremento dell'attività di E2F. Tale diminuzione è mediata dall'incremento del livello degli inibitori di chinasi ciclina dipendenti, INK4 e CIP, indotto da TFF1. La ridotta fosforilazione di pRb mediata dalle chinasi ciclina dipendenti provoca un diminuito rilascio di E2F dal complesso con pRb ed una conseguente inibizione della attività trascrizionale (Figura 1.7) (Bossenmeyer *et al.*, 2002).

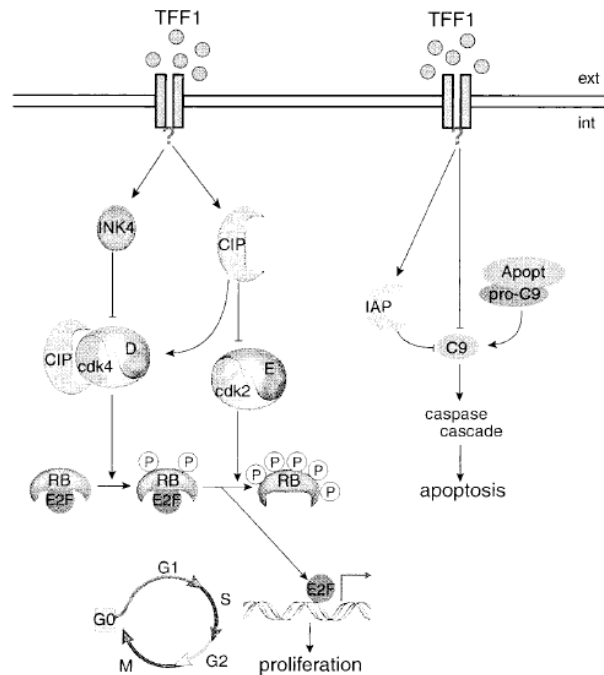


Figura 1.7: Rappresentazione schematica del meccanismo con il quale TFF1 modula la proliferazione cellulare (Bossenmeyer-Pourie *et al.*, 2002)

1.1-3c Attività motogenica

L'integrità della superficie epiteliale, nelle fasi successive ad un danno, è garantita da un rapido processo di restituzione in cui le cellule ai margini della ferita migrano verso la lacuna e successivamente differenziano. Sebbene il fattore di crescita trasformante TGF- β (un potente chemiotattico), il fattore di crescita epatocitario HGF e il fattore di crescita epidermico EGF abbiano un ruolo cruciale nelle fasi di restituzione, anche i peptidi della famiglia dei fattori trifoglio concorrono in maniera determinante alla promozione di tale processo. In particolare, studi condotti su cellule intestinali epiteliali di ratto (IEC) dimostrano che TFF1 è capace di promuovere la migrazione cellulare con un meccanismo indipendente da TGF- β . La forma omodimerica, inoltre, mostra una maggiore attività motogenica rispetto alla forma monomerica (Dignass *et al.*, 1994). Studi successivi, *in vivo* e *in vitro*, hanno confermato il coinvolgimento di TFF1 nelle fasi di restituzione epiteliale e la capacità di promuovere la migrazione anche in cellule tumorali MCF-7 da carcinoma mammario (Prest *et al.*, 2002), e in cellule epiteliali HT29 da colon retto (Marchbank *et al.*, 1998). Inoltre la somministrazione della forma omodimerica di TFF1 a ratti con danno gastrico indotto con indometacina, produce una sensibile riduzione delle lesioni (Marchbank *et al.*, 1998), fornendo così una ulteriore evidenza del ruolo dell'omodimero di TFF1 nei processi di riparo e protezione.

1.1-3d Attività pro-angiogenica

La formazione di nuovi vasi durante la progressione tumorale è un evento successivo alla proliferazione, migrazione e morfogenesi di cellule endoteliali, indotte da fattori proangiogenici e chemiotattici. Questi fattori sono prodotti localmente da cellule cancerose, cellule endoteliali e stromali e da cellule del sangue.

L'aumento di espressione di TFF1 è stato evidenziato in molti tumori solidi come cancro al seno, pancreas, prostata e stomaco suggerendo un sua possibile funzione nei processi di crescita tumorale. Infatti, alcuni studi descrivono per TFF1 un'importante attività proangiogenica. Esperimenti effettuati *in vitro* e *in vivo* dimostrano un'attività di TFF1 stimolatrice dell'angiogenesi, attraverso l'attivazione della ciclossigenasi COX-2 e del recettore del fattore di crescita epidermico EGF-R (Rodrigues *et al.*, 2003).

1.1-4 Regolazione dell'espressione genica dei TFF

Nell'uomo i tre fattori TFF sono codificati da un cluster genico di circa 55 kb localizzato sul cromosoma 21q22.3, orientati in tandem secondo l'ordine TFF1-TFF2-TFF3. Tale ordine è conservato nel topo, ed inoltre ricalca la distribuzione spaziale della loro espressione genica lungo il tratto gastrointestinale nel verso oro- anale. TFF1, infatti, è principalmente espresso nell'epitelio superficiale e foveolare dello stomaco, TFF2 è essenzialmente localizzato nelle cellule del collo dello stomaco e nelle ghiandole di Brunner del duodeno prossimale, e TFF3 nelle cellule *goblet* del piccolo e del grande intestino. La loro localizzazione e struttura genica suggerisce l'ipotesi dell'esistenza di un gene ancestrale comune. L'espressione dei TFF sembra essere molto variabile a seconda del tessuto in esame, del tipo di danno epiteliale, dei fattori che ne promuovono l'espressione e della finestra temporale del processo infiammatorio in cui sono coinvolti. In linee cellulari gastriche, basse concentrazioni dei fattori trifoglio possono stimolare la loro stessa espressione o quella di altri fattori della famiglia (Bulitta *et al.*, 2002). Anche esperimenti *in vivo* mostrano una riduzione dell'espressione di TFF1 e TFF2 in topi TFF3 *knock-out*, ed una analoga riduzione di TFF2 in topi TFF1 *knock-out* (Taupin *et al.*, 1999).

I promotori dei tre peptidi trifoglio presentano un sito di legame per i fattori **USF** (*Upstream Stimulatory Factor*) che, legandosi al sito riconosciuto sul promotore nella regione nota come *E-box*, determinano un aumento della trascrizione (Al-azzeah *et al.*, 2002). L'espressione dei peptidi trifoglio viene regolata anche da alcuni fattori di trascrizione *zinc-finger* appartenenti alla famiglia **GATA**. Queste proteine esercitano un controllo sull'espressione di geni dell'apparato gastrointestinale. In particolare sul promotore di TFF1 e TFF2 ritroviamo varie sequenze di legame per GATA-6 espresso notoriamente in alcune linee cellulari tumorali gastriche, intestinali e pancreatiche. È stata dimostrata, infatti, l'attivazione trascrizionale di *tff1* e *tff2* mediata da GATA-6, in linee cellulari di adenocarcinoma gastrico (Al-azzeah *et al.*, 2000).

Influiscono positivamente sull'espressione dei TFF: lo **stress osmotico** causato dall'introduzione di cibo e acqua (Ludeking *et al.*, 1998) e lo stato di **ipossia** dei tessuti altamente vascolarizzati dell'apparato gastrointestinale attraverso il fattore **HIF-1** (Hernández C *et al.*, 2009). Inoltre 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-Loncar *et al.*, 2005).

1.1-4a Regolazione dell'espressione di *tff1*

Uno dei processi meglio caratterizzati relativi al promotore di *tff1* è la regolazione positiva, mediata da estrogeni, in cellule di carcinoma mammario MCF-7 (Jeltsch *et al.*, 1987). Sul suo promotore è presente un'imperfetta sequenza palindromica sensibile agli estrogeni (ERE), posizionata circa 400 paia di basi a monte del sito di inizio della trascrizione del gene (Berry *et al.*, 1989). Recenti studi hanno inoltre evidenziato una relazione tra i fattori di trascrizione Sp, il recettore degli estrogeni ER α ed il promotore di *tff1*, in cellule di carcinoma mammario. I fattori di trascrizione SP1 e Sp3 sono ubiquitariamente espressi e agiscono in genere come attivatori. Sul promotore di *tff1*, accanto alla sequenza *consensus* per gli estrogeni (ERE), è presente un sito di legame per Sp. È stato dimostrato che il trattamento di cellule MCF-7 con estradiolo promuove l'associazione tra i fattori di trascrizione SP1 o Sp3 e il sito di legame vicino l'ERE. Mutazioni di tale sequenza riducono la risposta agli estrogeni, suggerendo che ER α e SP1 hanno un ruolo sinergico nell'attivazione trascrizionale di *tff1* (Li *et al.*, 2008).

Vicino alla sequenza ERE è stato identificato anche un sito di legame per fattori nucleari degli epatociti (HNF3). **HNF3** è un membro dei fattori di trascrizione *forkhead*, principalmente espressi nel fegato (Beck *et al.*, 1999).

L'aumento dell'infiammazione (e conseguente espressione di citochine pro-infiammatorie) accompagna la trasformazione neoplastica guidando la riduzione di espressione di *tumor-suppressor* come TFF1. Le citochine infiammatorie **IL-1 β** e **IL-6** sono importanti regolatori dell'espressione dei geni trifoglio. Entrambe possono reprimere la trascrizione di *tff1* attraverso CCAT/enhancer binding protein-beta (**C/EBP β**) (Baus-Loncar and Giraud, 2005; Sankpal *et al.*, 2005). Studi effettuati su tumori gastrici mostrano un'elevata espressione del fattore **C/EBP β** , il quale, legandosi a specifici siti presenti sul promotore di *tff1* (-241/-84), reprime la trascrizione del peptide trifoglio (Sankpal *et al.*, 2005).

Un ben descritto regolatore positivo per *tff1* è l'ormone gastrico **gastrina**. Topi *knock-out* per la gastrina presentano bassi livelli di espressione per TFF1, e topi transgenici ipergastrinemici, viceversa, mostrano una regolazione positiva. Elementi sensibili alla gastrina sono stati mappati sul promotore di *tff1* in una regione ricca in GC, 300 paia di basi a monte del sito di inizio di trascrizione (Khan *et al.*, 2003). La gastrina attiva la trascrizione attraverso un meccanismo ERK-dipendente ma indipendente da EGF (Figura 1.8).

TGF α , il principale ligando endogeno del recettore EGF nell'intestino, determina induzione della trascrizione dei *trefoil factors* nello stomaco e nel pancreas, soprattutto nel corso di pancreatiti e durante i processi di rigenerazione delle mucose (Ebert *et al.*, 1999). Alcuni studi riportano anche un ruolo dei **PPAR- γ** (Peroxisome proliferator-activated receptor- γ) nella regolazione trascrizionale di TFF1. PPAR- γ è coinvolto nella patogenesi di numerose malattie tra cui obesità, diabete, aterosclerosi e cancro. In particolare è espresso in cellule gastriche dove, oltre a regolare l'espressione di TFF1, è un importante fattore per la crescita e il differenziamento delle cellule (Shimada *et al.*, 2004).

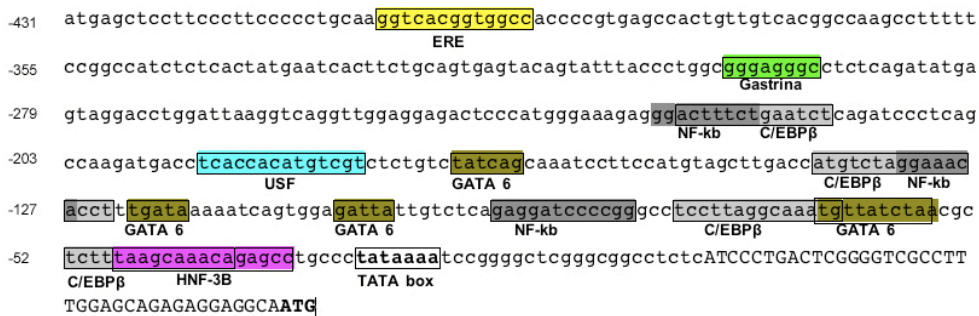


Figura 1.8 Promotore di *tff1* con le sequenze di riconoscimento per i principali fattori di trascrizione.

Come è noto, la regolazione trascrizionale di un gene non dipende soltanto dalla sequenza promotrice e dai numerosi fattori ad essa collegata, ma anche da importanti meccanismi epigenetici.

Sono considerate modifiche epigenetiche le modifiche istoniche e la metilazione delle cosiddette isole CpG del DNA, che intervengono rendendo la cromatina più o meno accessibile ai fattori trascrizionali. L'epigenetica si occupa delle informazioni aggiuntive, non direttamente riferibili alla sequenza di DNA, in grado di influenzare l'espressione dei geni in maniera ereditabile. La metilazione del DNA nelle isole CpG costituisce uno dei fenomeni dell'epigenetica più studiati poiché è coinvolta nella regolazione dell'espressione di molti geni e nella genesi di processi neoplastici. Nei tessuti e nelle linee cellulari tumorali, infatti, il silenziamento genico è spesso associato ad un'aberrante metilazione delle regioni promotrici.

I tre peptidi della famiglia trifoglio hanno differenti *pattern* di espressione lungo il tratto gastrointestinale. I dati di letteratura riportano che l'espressione tessuto-specifica dei vari peptidi, riflette lo stato di metilazione dei promotori. In particolare si osserva un'elevata espressione con promotore demetilato rispetto ed una assente o ridotta espressione dei peptidi nei tessuti in cui il promotore è metilato (Ribieras *et al.*, 2001).

Studi effettuati sul promotore di *tff1* hanno mostrato che una classe di proteine che si legano alle isole CpG metilate (MBD2), sono capaci di farlo in prossimità della TATA box e non in prossimità della regione sensibile agli estrogeni (ERE). Tale legame concorre alla regolazione trascrizionale negativa di *tff1*. Il legame di ER α all'elemento ERE è invece indipendente dallo stato di metilazione, dunque, il legame di MBD2 in prossimità della TATA-box riduce ma non abolisce la risposta di *tff1* a ER α . La relazione tra ER α e MBD2 nella regolazione trascrizionale del gene di *tff1*, indica che la parziale repressione trascrizionale mediata da MBD2 può essere contrastata dall'attività regolatoria positiva di ER α sugli ERE. Questo può spiegare anche i livelli di espressione di TFF1 in alcuni tumori con elevati livelli ER α in cui si osserva metilazione del promotore in prossimità della TATA-box (Chatagnon A *et al.*, 2010).

Nella regolazione trascrizionale mediata dagli estrogeni inoltre, si assiste ad un ciclico e dinamico cambio nello stato di metilazione/demetilazione del promotore, che consente la regolazione positiva di *tff1* in cellule di carcinoma mammario (Kangaspeska *et al.*, 2008; Métivier *et al.*, 2010)

Recenti pubblicazioni confermano anche un differente *pattern* di metilazione sul promotore di *tff1* nel tumore prostatico e in cellule di carcinoma mammario MCF-7

(Loss *et al.*, 2010). Analisi cliniche e studi effettuati su cellule prostatiche umane hanno mostrato che *tff1* e *tff3* sono epigeneticamente regolati nel cancro prostatico. In particolare, si osserva una iperespressione dei peptidi associata ad una demetilazione dei promotori (Vestergaard *et al.*, 2010).

Come già avviene per alcuni geni, un'analisi approfondita dell'epigenetica dei fattori trifoglio, e quindi dello stato di metilazione nei processi neoplastici, potrà facilitare la prevenzione e la diagnosi di malattie neoplastiche oltre a far luce sul coinvolgimento dei peptidi stessi nella carcinogenesi.

1.1-5 Dal topo *knock-out* allo studio dei tumori

La possibilità di generare topi geneticamente modificati in cui è soppressa, a scopo di studio, l'espressione di uno specifico gene, ha facilitato enormemente la comprensione di molti processi fisiopatologici e lo studio di singoli geni.

Nel 1996 Lefebvre e collaboratori hanno pubblicato sulla prestigiosa rivista *Science* la caratterizzazione anatomico-morfologica del topo *knock-out* privo del gene codificante per TFF1 (*tff1* *-/-*). Nella mucosa gastrica dell'antro e del piloro, gli autori descrivono varie anomalie come una marcata iperplasia e displasia. Tutti i topi mutanti omozigoti sviluppano, inoltre, adenoma antro-pilorico, ed il 30 % di essi presenta carcinoma multifocale intraepiteliale o intramucosale (Figura 1.9).

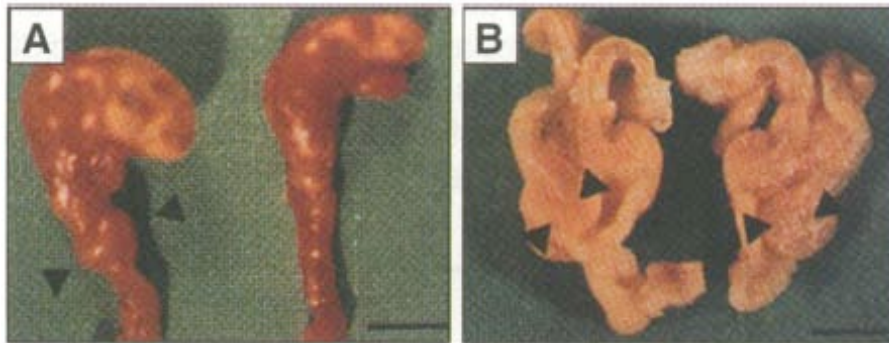


Figura 1.9: Analisi istologica dello stomaco e del duodeno in topi *tff1* *-/-* (sinistra) rispetto a topi wt (destra). (A) immagine macroscopica e (B) sezione dello stomaco e del duodeno. Le frecce indicano adenoma antropilorico (Lefebvre *et al.*, 1996).

Anche l'intestino tenue presenta delle anomalie, come i villi allargati e anomali infiltrati di cellule linfoidi. Questi dati hanno permesso di identificare TFF1 come una proteina essenziale per il normale differenziamento della mucosa gastrica dell'antro e del piloro, e quindi considerare *tff1* un gene *tumor-suppressor* specifico per il tessuto gastrico (Lefebvre *et al.*, 1996).

Successivi studi volti alla caratterizzazione molecolare delle fasi di differenziamento cellulare e dei processi che conducono all'insorgenza dei tumori, hanno chiarito ulteriormente le funzioni di TFF1 e la sua relazione con i processi neoplastici.

1.1-5a Differenziamento della mucosa ossintica

Nella mucosa ossintica le cellule si organizzano in piccole pliche formate da 3 regioni: l'istmo, il collo e la base. L'istmo è definito come la porzione che collega la parte ghiandolare con il resto della fossetta gastrica. Nell'istmo sono presenti importanti cellule staminali capaci di differenziarsi nei vari sottotipi cellulari che compongono la mucosa (Figura 1.10). L'alterazione di queste cellule progenitrici è un

evento fondamentale nell'insorgenza dei processi neoplastici. Proliferazione e differenziamento di queste cellule rappresentano eventi cruciali durante la rigenerazione e il mantenimento dell'integrità della mucosa. Esperimenti di immunolocalizzazione condotti sul modello murino rivelano che TFF1 è espresso precocemente durante le fasi di differenziamento della mucosa ossintica e tale espressione risulta costante nel tempo. L'assenza di TFF1 nei topi *tff1*^{-/-} conduce ad una alterata espressione anche per TFF2 e TFF3, e questo si traduce in un anomalo differenziamento delle popolazioni cellulari che compongono la mucosa ossintica (Karam *et al.*, 2004) con conseguente alterata capacità di svolgere correttamente le funzioni specifiche del tessuto.

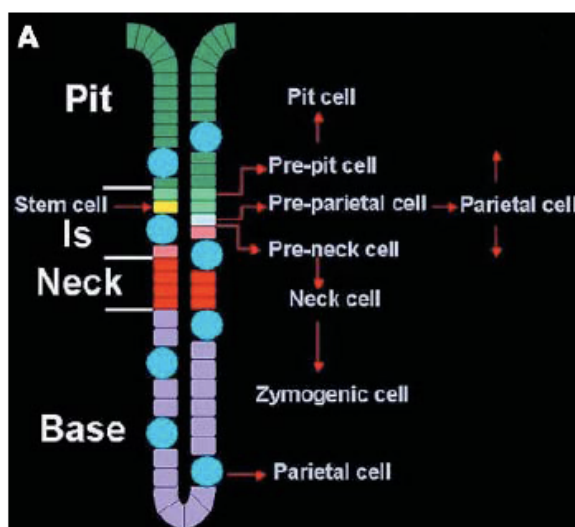


Figura 1.10: Rappresentazione schematica della mucosa ossintica (A). Le cellule formano piccole pliche in cui si distingue un istmo (Is), un collo (neck) ed una base (Karam *et al.*, 2004).

Il topo *knock-out tff1*^{-/-} è un buon modello per lo studio del tumore gastrico in quanto consente di ripercorrere le fasi caratteristiche dall'insorgenza allo sviluppo. Non sono chiari quali siano i principali fattori scatenanti, ma sicuramente la carcinogenesi può derivare da cellule staminali. Gli studi condotti su topi *tff1*^{-/-} hanno confermato questa ipotesi poiché nella regione antro-pilorica di questi animali, le cellule coinvolte nel precoce ispessimento della mucosa e nell'invasività submucosale con strutture simili a cisti, sono principalmente cellule progenitrici, e quindi cellule staminali indifferenziate (Karam *et al.*, 2008).

1.1-5b TFF1 e il tumore gastrico

Le proprietà dei peptidi trifoglio, essenziali per la rigenerazione dei tessuti epiteliali danneggiati (induzione della migrazione, angiogenesi, resistenza agli stimoli pro-apoptotici), possono rappresentare un vantaggio a favore dello sviluppo di cellule neoplastiche. Deve esserci quindi un fine equilibrio tra i desiderati effetti dei TFF nei processi di restituzione e il rischio che questi peptidi promuovano la trasformazione cellulare neoplastica nel corso di lesioni infiammatorie croniche. In questi ultimi anni studi clinici e di laboratorio hanno dimostrato un diretto coinvolgimento dei peptidi trifoglio nella genesi dei processi neoplastici. TFF1 è principalmente associato al tumore al seno e al cancro gastrico, ma sono state però descritte variazioni dei livelli di espressione anche nel cancro pancreatico, polmonare, prostatico e coloretale (Regalo *et al.*, 2005).

Gli esperimenti eseguiti sul topo *tff1*^{-/-} inducono ad ipotizzare che TFF1 possa essere considerato un *tumor-suppressor* specifico del tumore gastrico. A sostegno di questa ipotesi ci sono vari dati che associano mutazioni alleliche e alterazioni dello stato di metilazione del promotore con la insorgenza del cancro gastrico. Uno studio condotto in Corea su pazienti con adenoma o carcinoma gastrico, evidenzia che alterazioni geniche di TFF1 possono condurre a difetti della barriera mucosale gastrica e contribuire alla patogenesi del tumore. Sono state individuate mutazioni somatiche nel 5,5% degli adenomi e nel 16,3% dei carcinomi analizzati. Gli autori descrivono comunque una diminuzione dei livelli di TFF1 nel 44,2% dei casi, anche se non sempre è possibile correlare alterazione genica con ridotta espressione della proteina (Park *et al.*, 2000). Studi successivi hanno dimostrato che le forme mutate di TFF1 descritte nei pazienti con adenoma e carcinoma, effettivamente conferiscono proprietà pro-tumorali alle cellule gastriche (Yio *et al.*, 2006).

Le mutazioni, come già detto, non rappresentano l'unico fenomeno coinvolto nel silenziamento di TFF1 nei tumori gastrici. Uno studio condotto su 90 pazienti portoghesi con tumore gastrico ha evidenziato come nessuno dei pazienti mostrasse mutazioni nei tre esoni di TFF1, pur essendo presenti bassi livelli della proteina. Un'analisi più dettagliata ha mostrato che esiste una relazione tra diminuita espressione di TFF1 e perdita di eterozigosi (Carvalho *et al.*, 2002), peraltro già descritta da altri autori.

Recenti lavori hanno inoltre ulteriormente chiarito i rapporti di regolazione gastrina-TFF1 ed il loro coinvolgimento nell'insorgenza del cancro gastrico. La gastrina è un ormone peptidico fondamentale per la stimolazione delle secrezioni acide, per la regolazione della proliferazione di cellule epiteliali del fondo, nonché un regolatore positivo dell'espressione di TFF1 ed un agente con attività soppressiva della carcinogenesi gastrica antrale. Topi *knock-out* per la gastrina sviluppano naturalmente, in alcune condizioni sperimentali, tumore antrale mentre topi iperesprimenti gastrina sono meno sensibili alla carcinogenesi indotta chimicamente (Figura 1.11).

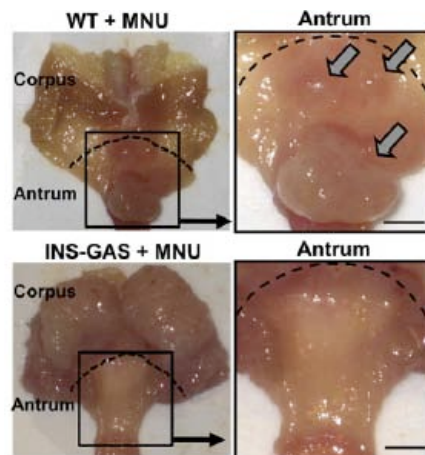


Figura 1.11: Nei topi *wt* il trattamento con *N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU) induce la formazione di masse tumorali nell'antra gastrico (in alto a destra). I topi iperesprimenti la gastrina (INS-GAS) non sviluppano anomalie antrali mostrando quindi una protezione al danno gastrico rispetto ai topi *wt* (Tomita *et al.*, 2011).

Questa propensione allo sviluppo del tumore gastrico può essere dovuta in parte proprio ad una mancata regolazione positiva di TFF1 indotta dalla gastrina

nell'antro. Recenti studi sembrano confermare questa ipotesi: la gastrina esplica un ruolo anti-tumorale regolando positivamente l'espressione di TFF1 e contrapponendosi anche ad eventi che ne promuovono la metilazione (Tomita *et al.*, 2011).

Analisi condotte *in vivo* e *in vitro* mostrano che la metilazione del promotore di *tff1*, e quindi il suo silenziamento, sono processi critici nella tumorigenesi e nelle infezioni da *Helicobacter pylori*.

Nonostante i sostanziali avanzamenti delle conoscenze degli ultimi anni, restano però molti aspetti da chiarire tra gli eventi che portano allo sviluppo di neoplastie dipendenti dalla ridotta espressione del fattore peptidico TFF1. Infatti, ad esempio, recenti lavori suggeriscono una diretta relazione tra TFF1, NF- κ B, i processi infiammatori e la carcinogenesi gastrica. NF- κ B è un fattore di trascrizione coinvolto in tutte le reazioni delle cellule sottoposte a stimoli da stress, citochine, radicali liberi, radiazioni UV, antigeni batterici o virali (Gilmore *et al.*, 1999). Un'analisi di microarray effettuata su topi *knock-out* per *tff1* ha mostrato una deregolazione di circa 76 geni coinvolti nel *pathway* di NF- κ B rispetto a topi controllo. Esperimenti successivi hanno poi evidenziano che la mancanza di TFF1 induce un'infiammazione mediata da NF- κ B in cellule gastriche. Altri studi su cellule primarie isolate da topi *tff1* *-/-* mostrano un aumento del segnale di NF- κ B nel nucleo (Figura 1.12) come evidenza di induzione di uno stato infiammatorio. Studi *in vivo* e *ex-vivo* confermano che TFF1 è in grado di inibire l'attivazione di NF- κ B mediata da TNF- α (Soutto M., *et al* 2011).

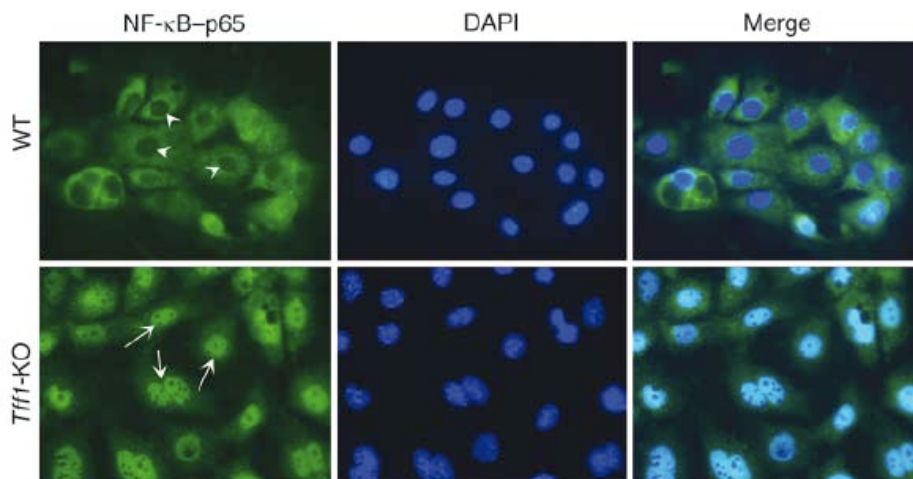


Figura 1.12: Immunofluorescenze effettuate su cellule primarie isolate dall'antro di topi *tff1* *-/-* e topi *wt*. Nei topi *tff1* *-/-* si osserva un forte aumento di NF- κ B-p65 nucleare (verde) (Soutto *et al.*, 2011).

Questi ultimi studi contribuiscono a chiarire ulteriormente molti aspetti critici riguardanti la relazione tra TFF1 e cancro gastrico, e l'individuazione dei meccanismi che regolano l'espressione di TFF1 e i *pathway* molecolari in cui la proteina svolge il suo ruolo di *tumor-supressor*, fa ben sperare per il futuro e per la caratterizzazione dettagliata del tumore gastrico, che colpisce purtroppo con drammatica incidenza.

1.1-5c TFF1 e il tumore al seno

A metà degli anni 80 diversi alcuni studi hanno riportato l'espressione di TFF1 in cellule di carcinoma mammario, regolata positivamente da estrogeni (Jakowlew *et al.*, 1984; Rio *et al.*, 1987). Pochi anni più tardi, alcuni studi clinici hanno mostrato che una classe di tumori al seno sensibili agli estrogeni, che presentano elevati livelli di

espressione di TFF1, correlano con una prognosi favorevole a seguito di trattamento ormonale (Foekens *et al.*, 1990; Schwartz *et al.*, 1991). Nonostante in questi ultimi venti anni siano state effettuate altre indagini per chiarire il significato biologico dell'espressione di TFF1 nel tumore al seno, molti aspetti risultano ancora poco chiari e la letteratura è spesso contraddittoria.

Nel tumore al seno TFF1 è sovraespresso rispetto al tessuto normale, dove è rilevabile soltanto una leggera espressione della proteina. Ciò suggerisce che nel tumore al seno gli elevati livelli di TFF1 possano correlare positivamente con l'insorgenza e la progressione tumorale, e che si possa quindi considerarlo come un oncogene. Infatti, in linee cellulari tumorali di rene e colon che sovraesprimono TFF1, il peptide attiva *pathway* coinvolti nella sopravvivenza cellulare, nella crescita indipendente dall'adesione, nell'invasione e nell'angiogenesi. Inoltre TFF1 è stato associato alle metastasi al tessuto osseo derivanti da tumore al seno (Smid *et al.*, 2006).

Recenti lavori mostrano che l'espressione di *tff1* aumenta significativamente l'oncogenicità di cellule di carcinoma mammario (Amiry *et al.*, 2009). La sua marcata espressione in queste cellule promuove un'alterata espressione di un vasto gruppo di geni coinvolti nella progressione tumorale. È stato anche dimostrato che la riduzione di attività di TFF1 mediante trattamento con RNAi e/o anticorpi policlonali, compromette la vitalità di cellule di carcinoma mammario sia *in vitro* che in modelli *xenograft* (Amiry *et al.*, 2009).

Altri studi invece riportano un ruolo protettivo di TFF1 nel tumore al seno. Buache e collaboratori, in un recentissimo lavoro pubblicato sulla rivista *Oncogene*, mostrano che la deprivazione di TFF1 aumenta la tumorigenicità di cellule di carcinoma mammario. L'induzione chimica di tumori nella ghiandola mammaria in topi *tff1*^{-/-} ha un'incidenza maggiore di sviluppo rispetto a topi controllo *wild-type*. Anche le dimensioni delle masse tumorali che si sviluppano in seguito al trattamento, sono maggiori nei topi deprivati di TFF1 rispetto ai controlli (Buache *et al.*, 2011).

Questi ultimi risultati sono in accordo con il dato clinico riportato frequentemente in cui l'espressione della proteina è associata a tumori ben differenziati la cui prognosi è favorevole (Corte *et al.*, 2006). *tff1* è un classico gene regolato positivamente dagli estrogeni con una canonica sequenza ERE nel suo promotore (Ribieras *et al.*, 1998). Tumori al seno sensibili agli estrogeni e con alti livelli di TFF1, rispondono in modo più efficiente ad un trattamento farmacologico con antiestrogeni. A conferma di ciò, alcuni autori descrivono una riduzione dei livelli di TFF1 proprio in seguito a trattamenti con antiestrogeni.

Pazienti con elevati livelli di TFF1 in tumori sensibili agli *estrogeni* hanno una prognosi migliore rispetto a pazienti con tumori che rispondono agli estrogeni ma privi di TFF1. Infatti il peptide è oggi utilizzato come un affidabile marker di tumori al seno ormone-dipendenti e per seguire il decorso del trattamento farmacologico ormonale (Chenard *et al.*, 2004).

Contrariamente a quanto detto per i tumori gastrici, dove i ridotti livelli di TFF1 sono associati ad evidenti effetti pro-tumoral, nel tumore al seno la sua regolazione positiva è ancora controversa. Tutto ciò fa ipotizzare per TFF1 un ruolo ambivalente nel cancro, dipendente dal tessuto in cui è espresso e dalla finestra temporale in cui si osservano variazioni di espressione rispetto a condizioni fisiologiche.

1.1-6 TFF1 e il Rame

1-1-6a Il Rame: aspetti generali

Il rame è un micronutriente essenziale per lo sviluppo e la crescita di molti

organismi, compreso l'uomo. Nei sistemi biologici il rame può esistere nei suoi due stati di ossidazione Cu(I) e Cu(II), e le sue proprietà redox consentono ai cuproenzimi di catalizzare reazioni di trasferimento elettronico (Hamza I. *et al.*, 2002). Il rame è quindi un cofattore essenziale per la funzionalità di metallo-enzimi ad azione ossidoriduttiva come, ad esempio, il complesso enzimatico citocromo c-ossidasi coinvolto nel trasferimento di elettroni nelle ultime fasi della respirazione cellulare, o la superossido dismutasi responsabile della conversione dell'anione superossido in acqua e ossigeno. Il rame è inoltre fondamentale anche per altre indispensabili funzioni, come la respirazione cellulare, la sintesi dei pigmenti, la biosintesi dei tessuti connettivi e il metabolismo cellulare del ferro (Uauy *et al.*, 1998).

La chimica di coordinazione dei due ioni rame è diversa: Cu(I) preferisce come ligando lo zolfo che può essere fornito da residui cisteinici o metioninici, mentre Cu(II) preferisce come ligandi l'ossigeno o l'azoto, che possono essere forniti da residui di istidina o di glutammato.

Il rame è un micronutriente assunto essenzialmente con la dieta ed assorbito nello stomaco e nel primo tratto dell'intestino. In particolare, il duodeno è deputato all'assorbimento del rame assunto con la dieta, mentre 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 (Wirth *et al.*, 1985). Dal fegato il rame viene indirizzato alla circolazione periferica o eliminato attraverso la bile (Kim *et al.*, 2008).

L'ingresso nelle cellule enterocitarie duodenali umane è mediato dalla proteina integrale di membrana hCTR1 (human Copper Transporter 1). Questa proteina è un trasportatore specifico per lo ione rameoso Cu(I) ed è localizzato sulla superficie apicale delle cellule duodenali. La recente identificazione, nelle cellule umane, di una famiglia di metalloreduttasi, le proteine STEAP, localizzate sulla membrana plasmatica e sulle membrane degli organelli intracellulari, ha suggerito la possibilità che hCTR1 possa funzionare di concerto con una reduttasi che riduce lo ione Cu(II) a ione Cu(I), il quale è poi trasportato all'interno della cellula (Ohgami *et al.*, 2005).

Il rame può entrare nelle cellule enterocitarie anche attraverso trasportatori non specifici, quali il DMT1 (Divalent Metal transporter 1), localizzato sugli enterociti e responsabile del trasporto ad alta affinità dello ione ferroso (Gunshin *et al.*, 1997).

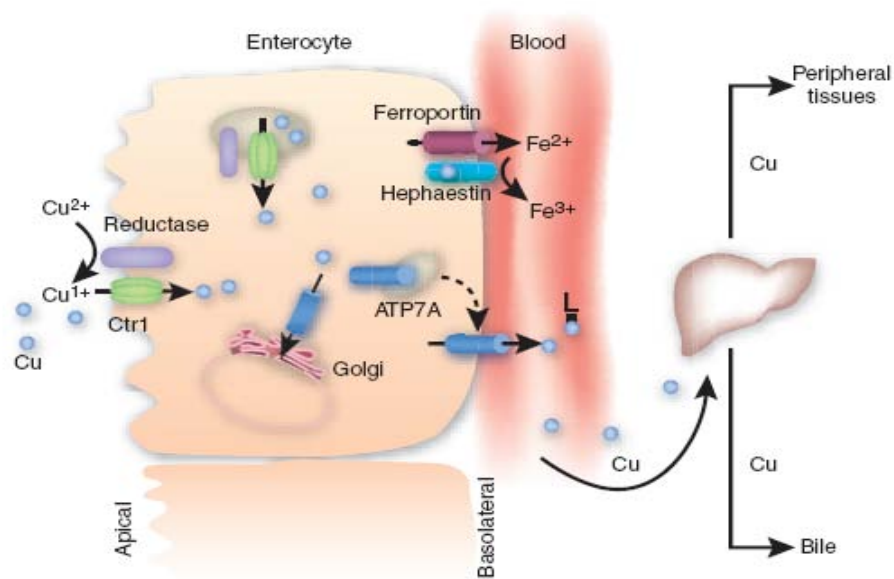


Figura 1.13 Modello per l'assorbimento e la distribuzione periferica del rame in cellule hIEC (human Intestinal Epithelial Cells) (Kim B.E. *et al.*, 2008).

Quando la concentrazione intracellulare di rame supera il livello soglia, esso viene escreto attraverso la membrana basolaterale da una P-ATPasi, nota come ATP7A, e viene poi trasportato al fegato, mediante il circolo portale ematico, complessato con uno o più ligandi non ancora identificati (Figura 1.13) (Kim *et al.*, 2008).

Il trasportatore ATP7A svolge un ruolo importante nella regolazione dei livelli intracellulari di rame. Infatti la perdita della sua funzionalità, dovuta ad una mutazione genica, porta ad un ridotto efflusso di rame dalle cellule intestinali causando un grave disordine sistemico infantile, la malattia di Menkes, caratterizzata da una fatale neurodegenerazione (Tümer *et al.*, 1998).

Il rame entra negli epatociti attraverso il trasportatore ad alta affinità hCTR1, localizzato nella membrana basolaterale. Nel citosol viene legato da *metallo-chaperone* che lo trasferiscono a diversi compartimenti cellulari (Figura 1.14). Gli *chaperone* identificati fin ora sono: CCS (*Copper Chaperone Superoxide Dismutase*), che trasferisce il rame all'enzima Zn/Cu Superossido Dismutasi nello spazio intermembrana mitocondriale; ATOX1 che trasferisce il rame ad una P-ATPasi, nota come ATP7B, il principale trasportatore del rame all'interno dell'epatocita; COX17, che trasporta il rame, all'interno della matrice mitocondriale, alle proteine Sco1 e SCO2, le quali cooperano nel processo di incorporazione del rame nell'enzima citocromo c ossidasi (Cobine *et al.*, 2006). In condizioni fisiologiche, il rame viene trasportato all'interno dell'apparato del Golgi dal trasportatore ATP7B e incorporato nella ceruloplasmina (Murata *et al.*, 1995). La forma attiva della ceruloplasmina, così sintetizzata, viene secreta in apposite vescicole nell'ambiente extracellulare. Una volta rilasciata nel circolo sistemico, essa rappresenta la principale risorsa di rame per tutti gli organi e compartimenti dell'organismo.

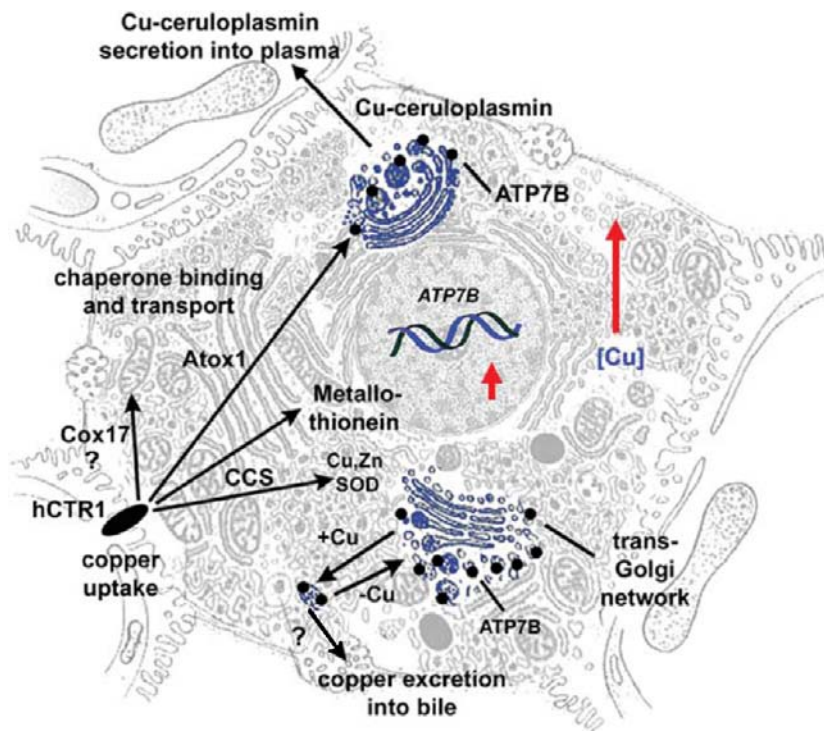


Figura 1.14: Distribuzione del rame nella cellula epatica. Il rame entra negli epatociti attraverso il trasportatore ad alta affinità hCTR1, localizzato nella membrana basolaterale. Nel citosol il rame viene legato da *metallo-chaperone* che lo trasferiscono a diversi compartimenti cellulari (Lutsenko S., 2007).

Diversamente dal trasportatore plasmatico del ferro, la transferrina, che viene endocitata all'interno della cellula, la ceruloplasmina rilascia il rame ai trasportatori localizzati sulla superficie cellulare deputati al suo trasporto all'interno della cellula (Percival *et al.*, 1990).

Il trasportatore ATP7B svolge una funzione importante nella regolazione dei livelli di rame all'interno della cellula epatica. Esso rilascia il rame alla ceruloplasmina e, quando i livelli intracellulari di rame aumentano oltre un valore soglia, trasporta il rame in vescicole secretorie localizzate nelle immediate vicinanze della porzione apicale della membrana (Figura 1.14). Queste vescicole esportano il rame all'esterno della cellula epatica attraverso un processo di fusione con la membrana cellulare. Il rame in eccesso viene così eliminato con la bile in una forma che non può essere poi riassorbita e viene quindi escreto con le feci. L'importanza della funzione di ATP7B nel metabolismo del rame è dimostrata dall'esistenza di un grave disordine sistemico, noto come Malattia di Wilson, causata da mutazioni geniche di ATP7B (Bull P.C. *et al.*, 1993).

1.1-6b Rame e regolazione trascrizionale

Le cellule eucariotiche hanno sviluppato un conservato sistema di regolazione per modulare le concentrazioni di rame ed evitare che eccessi del metallo possano provocare danni cellulari. Come già descritto, un elemento fondamentale per

l'omeostasi del rame è rappresentato dal trasportatore di membrana hCTR1. Molti studi sull'argomento sono stati effettuati in lievito. È noto, infatti, che l'espressione di due omologhi trasportatori in lievito, *yCtr1* e *yCtr3*, è regolata positivamente in risposta a deficienze di rame e negativamente in eccesso di metallo. In *Saccharomyces cerevisiae*, la risposta trascrizionale alla carenza di rame è mediata da MAC1, un fattore di trascrizione sensibile alle concentrazioni di rame. MAC1 attiva la trascrizione di geni coinvolti nell'*uptake* di rame ad alta affinità. Recenti studi mostrano che l'enzima rame-dipendente SOD1 (Cu/Zn superossido dismutasi) e il suo *chaperone* CCS1 sono fondamentali nell'attivazione di MAC1 nella risposta a deplezioni di rame (Wood and Thiele, 2009). MAC1 è costituito da un dominio legante il DNA e, nella regione carbossi-terminale, da due domini ricchi in istidine e cisteine capaci di legare 4 ioni rame (Jensen *et al.*, 1998). La deprivazione di rame aumenta il legame di MAC1 ad elementi sensibili al rame sul promotore dei geni target (Joshi *et al.*, 1999; Rutherford and Bird, 2004).

Dagli insetti ai mammiferi, i geni per le metallothioneine sono indotti in risposta ad eccesso di rame, mediante il fattore di trascrizione MTF-1 (*metal response element-binding transcription factor-1*), il quale lega piccole sequenze di DNA chiamate MRE (*metal responsive element*). La detossificazione da metalli è regolata quindi da MTF-1, una *zinc finger protein* che ha come principali *target* i geni codificanti per metallothioneine. Tuttavia, in *Drosophila melanogaster* anche il gene *dCtr1b*, codificante per un trasportatore del rame, è regolato da MTF-1, che lega MRE nel promotore di *dCtr1b* (Selvaraj *et al.*, 2005).

Anche nell'uomo *hCtr1* è regolato direttamente dalle concentrazioni di rame. Tale regolazione è mediata dal fattore di trascrizione SP1 il quale riconosce sul promotore di *hCtr1* sequenze di legame. La delezione o mutazione di queste sequenze rende l'espressione di *hCtr1* indipendente dalle concentrazioni del metallo. Risultato analogo si ottiene quando sono deleti i domini *zinc-finger* di SP1 (Song *et al.*, 2008). Gli autori ipotizzano che elevati livelli di rame causano una regolazione negativa di *hCtr1* in quanto il metallo in eccesso causerebbe avvelenamento (*poisoning*) di SP1. Viceversa c'è regolazione positiva quando diminuiscono i livelli di rame e ritorna disponibile SP1 (Song *et al.*, 2008).

Recenti studi mostrano come anche la proteina prionica possa essere regolata trascrizionalmente dal rame. La proteina prionica è un "agente patogeno" non convenzionale di natura proteica, ovvero un isomero conformazionale di una glicoproteina normalmente espressa. I prioni sono causa di una serie di malattie che coinvolgono il Sistema Nervoso Centrale in una varietà di mammiferi. È stato dimostrato che la proteina prionica nella sua fisiologica conformazione ha un ruolo critico nell'omeostasi del rame nel tessuto nervoso. La proteina prionica ha, infatti, due distinti domini che legano rame (Wadsworth *et al.*, 1999). Tali regioni hanno una notevole importanza in quanto sono altamente conservati in molti mammiferi, e inserzioni di una o più unità di legame al rame sono associate a forme familiari di malattia prionica nell'uomo (Perera *et al.*, 2001). Il rame, legato alla proteina prionica, induce un'endocitosi reversibile dalla superficie cellulare, e ciò suggerisce un ruolo nell'omeostasi del metallo. A conferma di questa ipotesi, topi *knock-out* per la proteina prionica presentano ridotti livelli di rame nel tessuto cerebellare (Brown *et al.*, 1997). Lo studio del promotore della proteina prionica ha permesso recentemente di individuare fattori di trascrizione che regolano l'espressione della proteina proprio al variare della concentrazione dell'oligoelemento. I fattori di trascrizione SP1 e MTF-1 aumentano sia i livelli di proteina prionica e sia l'espressione del suo gene *prnp* in condizioni di accumulo di rame. Contrariamente, riduzioni di livelli di SP1 e MTF-1 riducono i livelli della proteina e l'espressione del gene. La deplezione del metallo è correlata ad una drammatica riduzione della proteina. Questi dati suggeriscono che i

fattori di trascrizione SP1 e MTF-1 sono richiesti per una regolazione rame-dipendente in cui la proteina prionica stessa ha un ruolo nella regolazione dell'omeostasi del metallo (Bellingham *et al.*, 2009). È interessante notare come SP1 si comporti in maniera differente nella regolazione di *hCtr1* e in quella di *prnp*. Nella regolazione di hCTR1, alti livelli di rame riducono SP1 sul promotore del gene e si osserva una ridotta espressione del trasportatore. Viceversa si registra un aumento dell'espressione di *prnp* quando c'è un incremento della concentrazione del metallo.

Il rame, all'interno della cellula, è legato a piccole proteine *chaperon* citoplasmatiche in grado di trasferire lo ione ai trasportatori che ne regolano l'efflusso. ATOX1 è una di queste proteine citoplasmatiche che trasferisce il metallo ai trasportatori ATP7A e ATP7B per facilitarne l'escrezione. Per ATOX1 è stato proposto anche un nuovo ruolo di fattore trascrizionale nella sua forma complessata con il metallo, (Itoh *et al.*, 2008). ATOX1 rappresenta un nuovo fattore di trascrizione rame-dipendente coinvolto nella regolazione della proliferazione cellulare. In particolare, recenti studi mostrano una relazione tra ATOX1 e la regolazione del gene *Ccnd1* della ciclina D1 sul quale si lega ATOX1 nella sua forma omodimerica ad una perfetta sequenza ripetuta del suo promotore. (Muller *et al.*, 2009). Analisi statistiche mostrano che ATOX1 potrebbe regolare anche altri geni, in particolare due geni coinvolti nello sviluppo degli occhi e nella percezione visiva. A conferma di questa analisi esistono evidenze di difetti congeniti nello sviluppo dell'occhio e del sistema visivo in topi *knock-out* per *Atox1* (Hamza *et al.*, 2001; Muller *et al.*, 2009).

Nonostante le conoscenze sul ruolo del rame nella regolazione trascrizionale siano frammentate, appare evidente il suo chiaro coinvolgimento nell'espressione di importanti proteine che non solo regolano l'omeostasi del metallo ma, come visto per ATOX1, possono essere coinvolte in una moltitudine di processi, dallo sviluppo degli organi al ciclo cellulare.

1.1-6c Il cuprocomplesso TFF1-Cu

Analisi differenziali dell'espressione genica (gene-microarray, Real-Time PCR e analisi del proteoma) eseguita nel nostro laboratorio su intestino di ratti Sprague-Dawley, trattati con dieta capace di indurre carenza marginale di rame (Marzullo *et al.*, 2004), ha consentito di identificare *tff1* tra i geni maggiormente indotti a livello trascrizionale (Tosco *et al.*, 2010). Tale risultato, non dato confortato da altri riscontri disponibili in letteratura, costituiva un'evidenza meritevole di ulteriore approfondimento ed aperta ad interessanti ipotesi interpretative. Un'accurata analisi della sequenza amminoacidica di TFF1 ha suggerito, in prima istanza, una possibile interazione tra il rame e il peptide. Infatti, la presenza conservata di un gruppo di residui amminoacidici carichi negativamente all'estremità carbossi-terminale (Glu-Glu-Glu-Cys-Glu-Phe), intorno al residuo Cys58, ha permesso di ipotizzare il coinvolgimento di questa regione nell'interazione con il rame. Al fine di confermare questa ipotesi sono stati eseguiti esperimenti sia sulla proteina ricombinante umana TFF1, espressa in *Pichia pastoris*, sia sulla proteina nativa purificata da cellule MCF-7 di carcinoma mammario. Le analisi eseguite con tecniche cromatografiche e di spettrometria di massa hanno permesso di evidenziare *in vitro* una capacità di legame di TFF1 selettiva per il rame Cu^{2+} , oltre ad una affinità marginale per Ca^{2+} . Esperimenti di proteolisi limitata, supportati da studi di dicroismo circolare, hanno inoltre dimostrato che l'estremità carbossi-terminale è coinvolta nell'interazione con il rame (Tosco *et al.*, 2007). Per analizzare ulteriormente il coinvolgimento dei singoli amminoacidi del *cluster* conservato di residui acidi presente all'estremità carbossi-terminale nel legame con il metallo, sono stati analizzati una serie di peptidi sintetici,

rappresentativi degli ultimi 16 residui amminoacidici, mediante scansione con alanina (Figura 1.15 A). I dati ottenuti, usando questi peptidi in esperimenti di *quenching* di fluorescenza, e analisi di massa MALDI, hanno confermato che i residui di acido glutammico e il residuo di Cys58 sono essenziali per il legame al rame. La sostituzione contemporanea dei quattro residui di acido glutammico con alanina non pregiudica la formazione del dimer, ma sia i monomeri che i dimeri di peptidi non sono più capaci di legare il rame (Figura 1.15 B e C).

Inoltre è stata valutata l'influenza esercitata dal rame sull'equilibrio tra forma monomerica e forma dimerica di TFF1. Gli studi effettuati sia con i peptidi sintetici che con la proteina nativa, hanno evidenziato che il rame promuove la formazione dell'omodimero di TFF1.

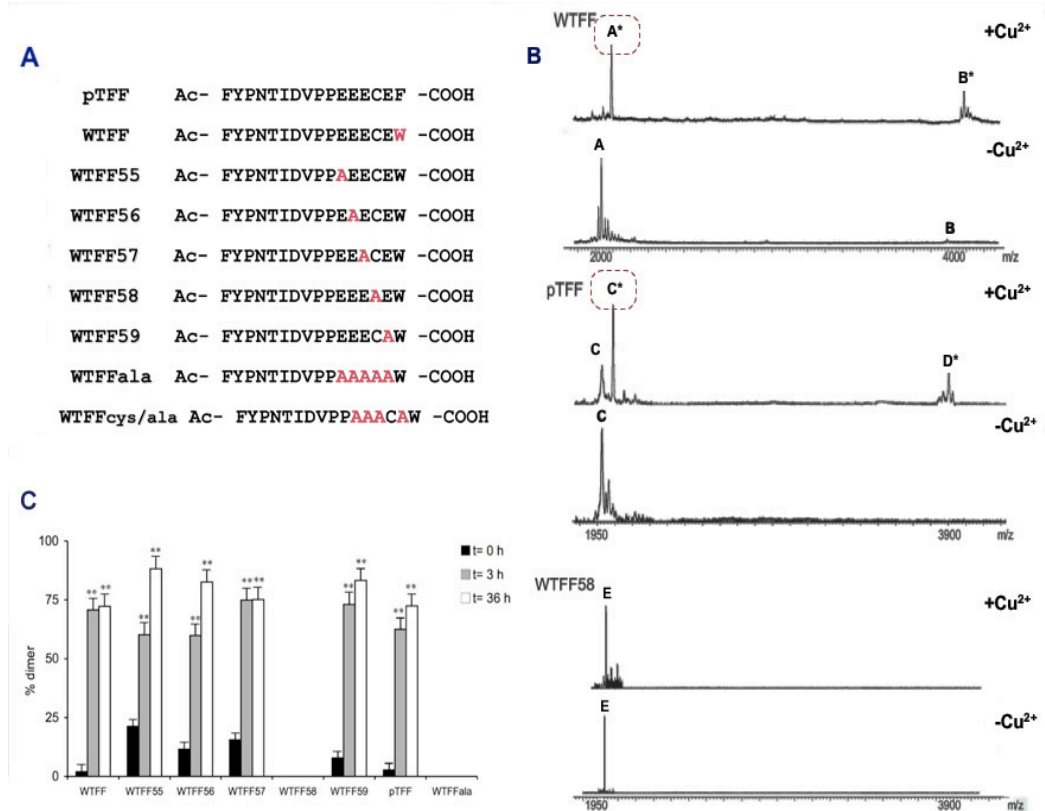


Figura 1.15 A: Peptidi sintetici rappresentativi degli ultimi 16 amminoacidi della proteina. Le "A" in rosso rappresentano le posizioni amminoacidiche sostituite con Alanina. Il peptide sintetico WTFF contiene un triptofano al fine di rendere più sensibile la sonda negli esperimenti di *quenching* di fluorescenza. Tale sostituzione è presente in tutti i peptidi eccetto il peptide con la sequenza nativa, pTFF. B: l'analisi MALDI-MS mostra che i peptidi WTFF e pTFF, dopo incubazione con rame, hanno uno spostamento del loro peso di circa ~64 Da (peak A* and C*). La presenza del rame induce anche la formazione dell'omodimero coinvolgendo la Cys58 (peak B* and D*). Non si registrano differenze quando si utilizzano i peptidi WTFF58, WTFFala, WTFFcys/ala. C: analisi quantitativa della percentuale di dimeri mediante tecniche nano-LC-MS and RP-HPLC-UV a diversi tempi di incubazione con il rame.

Gli incoraggianti risultati ottenuti e le conoscenze non definitive su TFF1 e sulla famiglia dei fattori trifoglio, lasciano spazio a nuove interessanti ipotesi riguardanti il ruolo del rame nell'espletamento delle funzioni biologiche di TFF1.

1.2 *Helicobacter pylori*

1.2 Caratteri Generali

L'infezione da *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) è la causa più comune della gastrite cronica ed è coinvolta nell'eziopatogenesi dell'ulcera peptica (gastrica e duodenale), nell'adenocarcinoma gastrico e nel maltoma (*Helicobacter pylori* di Pace e Vigneri).

Il batterio fu descritto per la prima volta nel 1892 quando Giulio Bizzozero, patologo dell'Università di Torino, studiando lo stomaco di alcuni animali riconobbe al loro interno batteri spiraliformi. Trascorse, però, oltre un secolo prima che due ricercatori australiani, Marshall e Warren, dimostrassero per la prima volta una correlazione tra questi bacilli ricurvi (dapprima classificati nel genere *Campylobacter*) e la patologia peptica gastrica. Il batterio fu classificato correttamente nel genere *Helicobacter* soltanto nel 1989. Nel 2005 i due ricercatori australiani hanno ricevuto il premio Nobel per la medicina per le importanti conseguenze che la loro scoperta ha apportato in ambito scientifico e clinico.

Il batterio Gram negativo di circa 6 x 0,35 micron (Figura 1.16), nelle colture fresche assume una forma a spirale che, a lunghi tempi di crescita, si trasforma in sferica (coccoide). Presenta multipli flagelli unipolari che terminano con un bulbo e una vivace motilità a spirale che gli permette di penetrare, attraverso il muco, entro le cripte ghiandolari gastriche. È microaerofilo e la sua crescita in coltura richiede un mezzo arricchito, un'atmosfera povera di ossigeno ed una temperatura ottimale di 37°C.



Figura 1.16: Immagine di *H. pylori* al microscopio elettronico

1.2-1a Epidemiologia dell'infezione

H. pylori infetta indistintamente maschi e femmine e la sua diffusione è ubiquitaria. Sebbene la sua presenza sia endemica, si possono osservare differenze significative nella prevalenza sia tra gruppi di individui nello stesso paese sia nei differenti paesi. In generale, è ormai dimostrata una maggiore prevalenza

dell'infezione nei soggetti appartenenti a livelli socioeconomici più bassi. Questa correlazione sembra imputabile alle scadenti condizioni igienico-sanitarie, al sovraffollamento ambientale ed alle gravi carenze alimentari che sembrano favorire il contagio. In particolare, l'acquisizione naturale dell'infezione avviene durante l'infanzia. Una volta stabilitosi nella mucosa, il batterio persiste per tutta la vita. Alcuni studi, tuttavia, suggeriscono che nell'infanzia, prima di un'infezione persistente, si verificano infezioni transienti. Contrastanti e ancora non del tutto chiare sono le ipotesi sul serbatoio dell'infezione, ma l'acqua e gli animali sono generalmente riconosciute come le principali fonti di contagio. È abbastanza chiaro invece che per la diffusione del batterio è fondamentale il contatto diretto con persone infette. Diversi studi hanno fatto ipotizzare che la trasmissione del batterio avvenga principalmente all'interno del contesto familiare. Il rischio relativo di un bambino di contrarre l'infezione da *H. pylori* rispetto alla norma è circa otto volte maggiore se la madre è infetta e circa quattro volte maggiore se il padre è infetto (Rothenbacher *et al.*, 1999).

1.2-1b Trasmissione

Le modalità con cui l'*H. pylori* si trasmette sono ancora oggi sconosciute e attualmente l'uomo è il principale serbatoio. La modalità di trasmissione più probabile è quella orale o gastro-orale. Nella trasmissione oro-orale l'evidenza epidemiologica suggerisce che la placca dentaria possa rappresentare un importante serbatoio. Le secrezioni gastriche, invece, possono verosimilmente rappresentare la fonte di *Helicobacter pylori* presente nello stomaco; diversi studi, infatti, mostrano come reflusso gastrico e vomito possano essere fonti di infezione. La propagazione oro-fecale potrebbe ricorrere direttamente da persone infette o che vivono in condizioni di sovraffollamento o in condizioni sanitarie scadenti, come i soggetti istituzionalizzati. Una trasmissione oro-fecale indiretta potrebbe dipendere dall'acqua o cibi contaminati.

1.2-1c Fattori coinvolti nella colonizzazione, adesione e sopravvivenza

Nello studio delle malattie batteriche, la ricerca si concentra sui fattori di virulenza che distinguono un vero agente patogeno da organismi innocui capaci di colonizzare molte superfici del corpo. Uno degli aspetti critici per *Helicobacter pylori*, tuttavia, non è la sua capacità di danneggiare i tessuti dell'ospite, ma piuttosto la capacità di persistere per molti anni all'interno dell'ospite. Gran parte della patogenesi nelle infezioni da *H. pylori* è dovuta, infatti, alla persistenza del batterio capace di eludere le difese immunitarie piuttosto che ad una significativa tossicità mediata dal batterio stesso.

Il processo di colonizzazione si sviluppa in quattro fasi: (i) la trasmissione ad un nuovo ospite, (ii) l'adesione batterica in una specifica nicchia all'interno dell'ospite, (iii) l'elusione, la sovversione o lo sfruttamento dei meccanismi di difesa dell'ospite, e (iv) l'acquisizione di sostanze nutritive con conseguente successo di replicazione. La differenza principale tra la colonizzazione e la patogenesi è che la colonizzazione da sola non può portare ad evidenti danni ai tessuti.

Sono stati identificati vari fattori di virulenza che conferiscono ad *H. pylori* la capacità di colonizzare i tessuti gastrici, di promuovere un danno tissutale e, logicamente, fattori in grado di garantire la sopravvivenza del batterio nell'ambiente gastrico. La sua morfologia ricurva e la motilità polare promossa dai **flagelli** conferiscono al batterio la capacità di penetrare nello strato mucoso. Tale efficienza è tanto maggiore quanto più è viscoso il mezzo, ed è dipendente dal pH, riducendosi a valori inferiori a 4.

L'**ureasi**, uno degli enzimi chiave nella patogenesi di *H. pylori*, appartiene alla classe delle idrolasi e catalizza l'idrolisi dell'urea in biossido di carbonio e

ammoniaca. L'ureasi è quindi necessaria per mantenere un microambiente a pH neutro intorno ai batteri, e permettere la sopravvivenza nell'ambiente acido dello stomaco. *H. pylori* aderisce al muco e lega specificamente cellule gastriche sia *in vivo* che *in vitro*. Probabilmente nelle fasi iniziali il batterio interagisce con i microvilli delle cellule epiteliali gastriche e penetra tra le giunzioni strette delle stesse.

H. pylori destruttura i microvilli, provoca riarrangiamenti al citoscheletro e promuove la polimerizzazione di actina nella porzione apicale della cellula. Tali processi sono garantiti da un efficiente sistema di **adesine** che riconoscono recettori cellulari rendendo stabile il legame con le strutture cellulari.

Le adesine sono proteine batteriche, glicoconiugate, che vengono coinvolte nelle fasi iniziali della colonizzazione al fine di mediare l'interazione tra il batterio e la superficie della cellula ospite. In tale senso le adesine sono generalmente considerate fattori di virulenza per il batterio. I recettori della cellula ospite sono lipidi, proteine, glicolipidi o glicoproteine. L'aderenza dei batteri innesca cambiamenti cellulari che includono cascate di trasduzione del segnale, con conseguente infiltrazione di cellule infiammatorie (neutrofili e monociti). Esempi di adesine sono la proteina esterna di membrana **BabA**, che lega l'antigene Lewis b, e **SabA** che lega antigene sialico-Lewis X.

H. pylori inoltre produce una **tossina, VacA**, la quale promuove la formazione di vacuoli nelle cellule gastriche associando la sua presenza ad alterazione dell'integrità mucosale e conseguenti ulcere. I **Lipopolisaccardi (LPS)** di *H. pylori* hanno una bassa attività immunogenica se comparati con LPS di altri batteri gram-negativi. Tale caratteristica è associata ad una diversa composizione della porzione lipidica degli LPS di *H. pylori*. Infine *H. pylori* può trasformarsi nella forma **coccoide** in condizioni di scarsa presenza di nutrienti o in presenza di inibitori della crescita (antibiotici, bismuto, inibitori di pompe protoniche). La forma coccoide può sopravvivere anche per diversi anni in acqua, risultando quindi critica nelle fasi di trasmissione oro-fecale.

1.2-1d I lipopolisaccaridi di *H. pylori*

I lipopolisaccaridi (LPS) sono dei componenti della parete esterna dei batteri gram negativi e ne rappresentano la parte antigenica. Sono essenziali per l'integrità fisica e funzionale della membrana esterna e, essendo i principali antigeni di superficie dei batteri gram negativi, giocano un ruolo importante nell'interazione dei batteri con l'ambiente in cui vivono e quindi nell'interazione con altre cellule. Gli LPS sono costituiti da tre regioni principali: una porzione glicolipidica, chiamata Lipide A (responsabile degli effetti tossici), un *core* oligosaccaridico e una *O-specific chain*, una catena polisaccaridica costituita da unità ripetute che generalmente possono contenere fino ad otto zuccheri. La porzione lipidica del lipide A gli permette di ancorarsi alla membrana esterna dei batteri, mentre la porzione polisaccaridica dell'LPS sporge all'esterno della membrana. Una caratteristica fondamentale per gli LPS di *H. pylori* è la loro estrema variabilità anche all'interno di uno stesso ceppo. Il sequenziamento del genoma di due ceppi di *H. pylori* ha identificato molti geni associati alla genesi e alla variabilità, degli LPS; in particolare geni codificanti per glicosiltransferasi. La loro bassa attività immunogenica può garantire un'infezione persistente rispetto ad un batterio più aggressivo ma con una vita più breve.

Le *O-specific chain* degli LPS di *H. pylori* sono biochimicamente associate alla classificazione dei gruppi sanguigni secondo Lewis (Le), che comprende antigeni tipo 1, LeB e LeA e antigeni di tipo 2, Lewis X e Lewis Y. Tale caratteristica conferisce agli LPS proprietà di "mimetismo molecolare" perché riconosciuti "self" dal sistema immunitario.

L'infezione può alterare la tolleranza ad epitopi comuni ed indurre autoanticorpi o, al contrario, aggirare la risposta immunitaria prevenendo la formazione di anticorpi

diretti contro gli epitopi condivisi da cellule ospiti e microrganismo, e favorendo in tal modo la persistenza dell'infezione (Appelmelk and Vandenbroucke-Grauls, 2001). È riportato, inoltre, che antigeni Lewis di *H. pylori* possono interagire con lectine di cellule epiteliali e quindi mediare adesione e colonizzazione (Valkone *et al.*, 1993).

1.2-2 Principali Fattori di virulenza

Numerosi sono i fattori che permettono al batterio di sopravvivere in un ambiente acido come quello gastrico, di raggiungere l'ambiente più neutrale dello strato di muco e di resistere alla risposta immunitaria umana, con conseguente persistenza. La maggior parte delle infezioni si verificano durante l'infanzia, e soltanto una piccola percentuale di queste infezioni evolvono in alterazioni organiche clinicamente significative. Tra i vari fattori di virulenza che caratterizzano i vari ceppi di *Helicobacter pylori*, hanno un ruolo chiave l'isola di patogenicità (*cagPAI island*), la tossina vacuolizzante VacA e le proteine BabA e SabA che mediano l'adesione con le cellule epiteliali.

1.2-2a L'isola di patogenicità *cag* di *H. pylori*

L'isola di patogenicità (*cagPAI*) è una regione genomica di circa 37 kb contenente una trentina di geni molti dei quali codificano componenti del sistema di secrezione di tipo IV (T4SS). Alcuni di questi geni sono anche coinvolti nella secrezione di IL-8 da parte delle cellule infettate (Fischer *et al.*, 2001). Il sistema T4SS stabilisce un collegamento tra il batterio e la cellula infettata in cui avviene il passaggio di proteine batteriche come CagA. Questa proteina viene fosforilata in tirosina da alcune chinasi della cellula epiteliale e attiva una serie di importanti fattori di segnale. Biopsie di pazienti con gravi malattie gastriche risultano positive alla presenza dell'isola di patogenicità in oltre il 90% dei casi analizzati. Questo dimostra l'importante ruolo che assume l'isola *cag* nell'insorgenza e sviluppo di processi patologici. Le sequenze riconosciute per la fosforilazione della tirosina (EPIYA), compaiono ripetute fino a 5 volte nella regione C-terminale di CagA. Sui geni, le sequenze codificanti per il motivo EPIYA sono fiancheggiate da un numero di sequenze ripetute di DNA coinvolte nei processi di ricombinazione. Questo può spiegare la variabilità del numero di motivi presenti nelle varianti di CagA e quindi la differente patogenicità tra differenti ceppi di *H. pylori*. La fosforilazione di CagA può avvenire ad opera di due chinasi: Src e Abl. Src è coinvolta nei processi di regolazione del citoscheletro, proliferazione cellulare, e differenziamento, e gioca un ruolo chiave anche nella cancerogenesi. Abl è invece coinvolta nei processi apoptotici e di divisione cellulare.

Gli eventi successivi alla fosforilazione di CagA conducono a riarrangiamenti del citoscheletro nella cellula. La proteina CagA innesca, inoltre, alterazioni nella cellula epiteliale anche con meccanismi indipendenti dalla fosforilazione in tirosina. È stato riportato che CagA interagisce con proteine coinvolte nelle giunzioni di adesione, nelle interazioni cellula-cellula e nella polarità cellulare. La conseguenza di tutti questi processi è la destabilizzazione dell'epitelio gastrico il quale contribuisce alla patogenesi di *H. pylori in vivo* (Backert and Selbach, 2008). Inoltre, alcuni dati di letteratura riportano un ruolo di CagA come attivatore di fattori di trascrizione pro-infiammatori come NF-κB (Brandt *et al.*, 2005) e attivatore della secrezione di metallo proteasi di tipo 1 (Pillinger *et al.*, 2007).

1.2-2b La Tossina VacA

A differenza di *cagPAI*, il gene *vacA* è presente in tutti i ceppi ma differenti polimorfismi nelle forme alleliche provocano differenti livelli di tossicità (Atherton *et al.*, 1997).

Molti dei ceppi di *H. pylori* isolati nell'uomo presentano ricorrenti forme alleliche di *vacA* suggerendo che alcune forme alleliche possono essere associate con un maggior rischio di malattie gastroduodenali rispetto ad altre varianti. La produzione della proteina VacA è quindi un evento importante per la colonizzazione e la persistenza di *H. pylori* nello stomaco dell'uomo. In modelli animali è stato dimostrato però che VacA non è comunque indispensabile per la colonizzazione (Salama *et al.*, 2001). Studi *in vitro* hanno mostrato che VacA ha delle proprietà immunosoppressive (Monack *et al.*, 2004). Questo sembra concordare con l'ipotesi che VacA non solo contribuisca alle fasi iniziali di colonizzazione ma svolga un ruolo cruciale nel garantire la persistenza di *H. pylori* negli individui infettati.

Il primo effetto attribuito a VacA è la sua capacità di indurre vacuoli all'interno delle cellule. Il modello ipotizzato vede l'interazione di VacA con la membrana cellulare. Dopo aver oligomerizzato sulla membrana, la proteina viene internalizzata e agisce come canale anionico selettivo sulla membrana di compartimenti endosomiali. Questo si traduce in un aumento del numero e del volume di vacuoli all'interno della cellula (Cover and Blande, 2005). È riportato che VacA induce alterazioni nei mitocondri, provocando la riduzione del potenziale transmembrana e il rilascio del citocromo c (Kimura *et al.*, 1999) (Figura 1.17). Inoltre, produce effetti anche sui linfociti T, infatti in cellule Jurkat (linea cellulare umana di linfoblasti T) incubate in presenza di VacA, è inibita la produzione di IL2 (fattore richiesto per la proliferazione e vitalità delle cellule T). Questo dato è in accordo con l'ipotesi che VacA regoli in maniera negativa geni coinvolti nella risposta immunitaria (Boncristiano *et al.*, 2003).

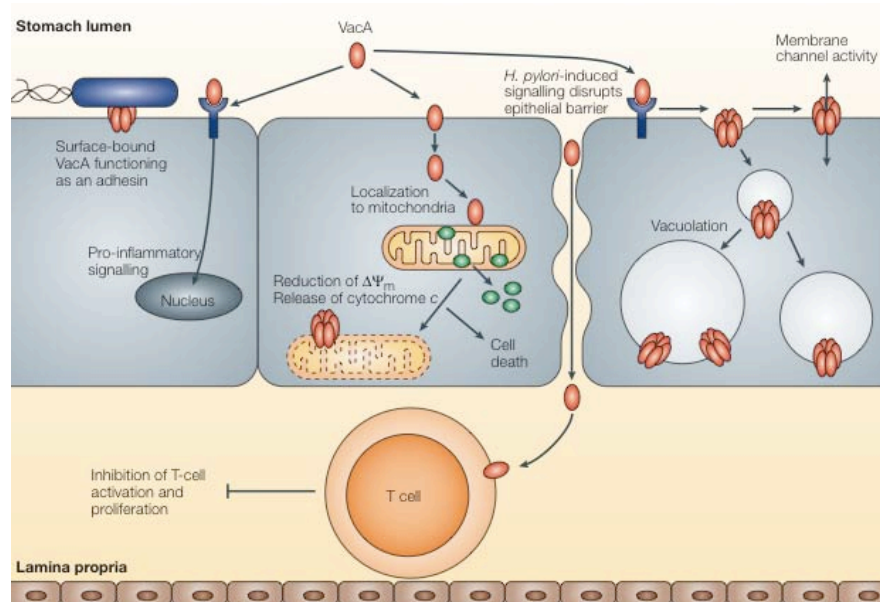


Figura 1.17 Rappresentazione schematica degli effetti di VacA su cellule epiteliali gastriche. VacA induce alterazioni nella permeabilità della membrana mitocondriale, aumento dei segnali pro-infiammatori e alterazioni nei compartimenti endosomiali (Cover and Blande, 2005).

1.2-2c Le adesine: BabA e SabA

Molti ceppi di *H. pylori* esprimono proteine che si legano a specifici recettori macromolecolari della cellula gastrica. In particolare, a causa di tali interazioni, due adesine possono essere considerate tra i fattori di virulenza: l'adesina BabA, che lega Lewis b (LEB), un antigene espresso sulle cellule epiteliali gastriche e l'adesina SabA capace di legare l'acido sialico. **BabA** è una proteina di membrana codificata dal gene *babA2*, il quale presenta differenti forme alleliche in funzione della regione geografica di provenienza. La maggiore incidenza si riscontra generalmente nei ceppi asiatici. BabA media il legame del batterio agli antigeni ABO del gruppo sanguigno Lewis b, espressi sulle cellule gastriche. I ceppi batterici che esprimono *babA2* sono maggiormente associati allo sviluppo di cancro gastrico e la presenza di *babA2* correla con la presenza di *cagPAI* e con *vacA*, anche se si trovano su *loci* diversi. Inoltre, la mucosa gastrica di pazienti infettati da ceppi BabA positivi presenta una maggiore densità di colonizzazione batterica ed elevati livelli di citochine pro-infiammatorie (Gerhard *et al.*, 1999).

Gli antigeni sialil-Lewis x/a (sLex e sLea) costituiscono ulteriori recettori funzionali per l'adesione di *H. pylori*; sLex and sLea vengono riconosciuti dalla proteina batterica **SabA**, che media anch'essa l'adesione del batterio alla cellula gastrica. L'infiammazione gastrica e il carcinoma gastrico, indotti da *H. pylori*, sono associati con l'aumento delle forme sialilate sLex and sLea normalmente poco presenti nella mucosa gastrica (Ota *et al.*, 1998). Questi dati suggeriscono che SabA svolge un ruolo importante nella patogenesi gastroduodenale, e la sua espressione è associata a gravi metaplasie intestinali, atrofie gastriche, e sviluppo di cancro gastrico (Sakamoto *et al.*, 1989).

1.2-3 Patogenesi

Come già detto in precedenza la colonizzazione da *H. pylori* non è una condizione di per se patologica, ma una condizione che fa aumentare il rischio di sviluppare diverse patologie del tratto gastrointestinale.

Appare fondamentale, quindi, effettuare una corretta diagnosi nei soggetti con patologie sospette, al fine di individuare correttamente i fattori che causano le alterazioni patologiche osservate e, nel caso di una infezione da *H. pylori*, elaborare una mirata azione terapeutica finalizzata alla eradicazione del batterio.

1.2-3a Gastrite acuta

In quasi tutti gli individui affetti, *H. pylori* induce una gastrite rilevabile all'analisi istologica, ma solo una minoranza sviluppa segni clinici evidenti. I dati relativi alla fase acuta sono scarsi e in gran parte provengono da segnalazioni di soggetti che hanno deliberatamente o involontariamente ingerito *H. pylori*, o infettati con materiale contaminato. In generale l'infezione da *Helicobacter* può essere associata a sintomi aspecifici transitori dispeptici, come pienezza, nausea e vomito, e con una notevole infiammazione sia della mucosa dello stomaco prossimale che distale. Questa fase è spesso associata a ipocloridria. Studi effettuati su gemelli eterozigoti ed omozigoti hanno permesso di affermare che in alcuni individui tale condizione può revertire spontaneamente.

1.2-3b Gastrite cronica

Quando la colonizzazione diventa persistente si instaurano altre condizioni che provocano lo sviluppo di una gastrite cronica. Il tipo di gastrite che si genera dipende dai livelli di acidità presenti nello stomaco. Nei soggetti con un'elevata secrezione acida, *H. pylori* colonizza l'antro gastrico e l'infezione degenera principalmente in

ulcera peptica. Viceversa la sua localizzazione nel corpo e fondo gastrico, determina riduzione dell'acidità e possibilità che si sviluppino alterazioni della mucosa gastrica ed aree di metaplasia. Addirittura, nei casi più eclatanti, si determina una pangastrite, e quindi una possibile evoluzione verso il cancro gastrico.

1.2-3c Ulcera peptica

L'ulcera peptica è un'ulcera circoscritta che colpisce la mucosa di una zona del tratto digerente superiore esposta all'azione del succo gastrico. A seconda dell'area di localizzazione, l'ulcera peptica viene definita duodenale o gastrica, ma entrambe sono fortemente correlate alla presenza di *H. pylori*. Se la produzione di acido è alta, l'infiammazione più grave di solito si osserva nello stomaco e nel duodeno distale prossimale (dove si osserva metaplasia gastrica), dando luogo a malattia ulcerosa iuxta-pilorica e duodenale.

1.2-3d Gastrite atrofica, metaplasia intestinale e cancro gastrico

L'infiammazione cronica indotta da *H. pylori* può portare alla perdita della normale struttura della mucosa gastrica, con la distruzione delle ghiandole gastriche, insorgenza di fibrosi e metaplasia intestinale. Questo processo di gastrite atrofica e metaplasia intestinale si osserva in molti dei pazienti infettati da *H. pylori*. La possibilità che si instauri una gastrite atrofica dipende da alcune caratteristiche del processo infiammatorio, in particolare, soggetti con ridotta secrezione acida, mostrano una più rapida progressione verso l'atrofia. Tali eventi sono determinanti per l'insorgenza e lo sviluppo del processo neoplastico, e la World Health Organization ha classificato *H. pylori* tra gli agenti cancerogeni di classe I. Il cancro gastrico compare al quarto posto dell'elenco delle tipologie di cancro più diffuse su scala globale, e l'incidenza di questa malattia rimane molto alta in vaste aree del mondo, in particolare nelle regioni dell'Asia orientale e in Sud America (Kusters *et al.*, 2006). Diversi studi hanno mostrato che l'eradicazione di *H. pylori* può arrestare la progressione di queste lesioni e, in qualche modo, anche indurre una regressione dell'atrofia (Kuipers *et al.*, 2004; Leung *et al.*, 2004). Ciò suggerisce che l'eradicazione di *H. pylori* è fondamentale in quei soggetti in condizioni cliniche precancerose, ma non in quegli individui dove i processi neoplastici sono degenerati oltre un punto di "non ritorno". Recenti studi hanno registrato un significativo effetto preventivo della eradicazione di *H. pylori* sullo sviluppo del cancro gastrico in pazienti con precedenti ulcere gastriche, ma non in pazienti con precedenti ulcere duodenali (Take *et al.*, 2005).

1.2-3e Linfoma gastrico MALT-oma

Il tessuto linfoide associato alla mucosa (MALT) è diffuso nelle mucose del tratto gastrointestinale, uro-genitale, della tiroide, dei polmoni, degli occhi e della pelle. Queste formazioni sono organizzate in noduli linfatici ma non costituiscono organi del sistema linfatico.

Come già detto in precedenza, il batterio può aggirare la risposta immunitaria grazie ad alcuni epitopi presenti sia nelle cellule infettate sia nel microrganismo. Tuttavia in alcuni casi, la presenza di *H. pylori* e di uno stato infiammatorio persistente, determinano una risposta immunologica sistemica e la produzione di anticorpi specifici contro *H. pylori*. Tale situazione trasforma lo stomaco in un sistema MALT dove il numero dei follicoli linfatici aumenta con l'aumentare del grado della gastrite. Il linfoma gastrico primitivo, associato al MALT (MALT-oma), è il più frequente tra quelli che insorgono al di fuori dei linfonodi (extranodali), ed è stato associato all'infezione da *H. pylori* (Kusters *et al.*, 2006). È stata documentata la

possibilità di regressione delle forme linfomatose, a basso grado di malignità, dopo eradicazione di *H. pylori* (Fischbach et al., 2004, Wotherspoon et al., 1993).

1.2-4 *Helicobacter pylori* – TFF

La scoperta, relativamente recente, della relazione tra patologie gastriche e infezione di *Helicobacter pylori* ha promosso in questi ultimi anni una serie di indagini finalizzate alla comprensione delle alterazioni morfologiche e molecolari conseguenti all'infezione del batterio. In particolare recenti studi hanno focalizzato la loro attenzione sulle modificazioni dei TFF conseguenti all'infezione da *Helicobacter pylori*.

1.2-4a *Helicobacter pylori* - TFF2

Nel 2002 Guo-Yong Hu e collaboratori descrissero per la prima volta alterazioni dei livelli di espressione di TFF2 a livello della mucosa gastrica dove era presente una infezione da *Helicobacter pylori*.

In particolare, l'espressione di TFF2 in gastriti croniche superficiali in presenza di *H. pylori* era maggiore che in assenza del batterio. Viceversa in gastriti atrofiche e metaplasie intestinali si registravano livelli più bassi di TFF2 in presenza del batterio. (Guo-Yong Hu et al., 2003). In contrasto con precedenti studi, analisi recenti mostrano una riduzione di TFF2 in biopsie gastriche di individui positivi per *H. pylori*. Tale riduzione è ancora più evidente quando l'infezione è promossa da ceppi CagA positivi (Michelis et al., 2009).

Per verificare il ruolo biologico di TFF2 nei processi patologici correlati all'infezione di *H. pylori* sono stati effettuati studi su topi *tff2* *-/-*. I topi sono stati infettati per via orale con particolari ceppi di *H. pylori*, e analizzati a 6 e 19 mesi dopo l'inoculazione. I topi *tff2* *-/-* mostravano delle marcate differenze rispetto ai topi *wild type* (difetti nella mucosa, atrofia, iperplasia, metaplasia, displasia). Anche i livelli di interferone gamma erano marcatamente elevati nella mucosa gastrica di topi mutanti rispetto ai topi controllo. Questi studi hanno messo in luce il ruolo citoprotettivo di TFF2 e/o l'effetto anti-infiammatorio nella progressione di lesioni pre-maligne (Fox et al., 2007).

Uno studio recente condotto sempre sul modello murino ha ulteriormente analizzato la relazione tra TFF2, infezioni da *H. pylori* e malattie gastriche. Gli autori hanno dimostrato come la regolazione negativa di TFF2, riportata frequentemente nelle neoplasie gastriche, sia associata ad alterazioni sul suo promotore. Infezioni di *H. pylori* promuovono infatti la metilazione del promotore e quindi il silenziamento di TFF2. Ciò si traduce in un'accelerazione del processo neoplastico dovuta ad una regolazione alterata del *turnover* di cellule epiteliali gastriche, marcata riduzione dei livelli di TFF1 e di due gastrochine (*Gkn1* e *Gkn2*) importanti modulatori dell'omeostasi gastrica. Alla luce di questi dati è evidente la relazione che si crea tra infezione di *H. pylori*, regolazione negativa di TFF2 e accelerazione del processo neoplastico (Peterson et al., 2010)

1.2-4b *Helicobacter pylori* – TFF1

Clyne e collaboratori, in un lavoro pubblicato dalla rivista PNAS (Proceedings of the National Academy of Science) nel 2004, hanno dimostrato per la prima volta l'esistenza di un'interazione tra *Helicobacter pylori* e TFF1 (Clyne et al., 2004). Mediante analisi immunostochimiche e di immunofluorescenza, effettuate su biopsie della mucosa gastrica di individui positivi per *H. pylori*, gli autori hanno mostrato una colocalizzazione del batterio con TFF1, ipotizzando quindi un'interazione tra la

proteina e *H. pylori*. Studi successivi hanno dimostrato che *H. pylori* interagisce selettivamente con TFF1, e che tale interazione non avviene con la forma monomerica ma soltanto con la forma dimerica (Reeves *et al.*, 2008).

Il legame tra il batterio e la proteina avviene nello strato della mucosa gastrica dove esiste un gradiente di pH che va da valori molto acidi del lume gastrico (circa pH 3,0) fino alla quasi neutralità quando ci si avvicina alla superficie epiteliale.

Esperimenti *in vitro* hanno assegnato per tale interazione un valore ottimale di pH compreso tra 5,0 e 6,0 (Reeves *et al.*, 2008). Infezioni in animali modello mostrano che *H. pylori* colonizza una zona della mucosa a circa 25 μm dalla superficie epiteliale, area nella quale è presumibile la presenza di valori di pH tra 5,0 e 6,0 (Schreiber *et al.*, 2004).

La forma a basso peso molecolare, detta forma "rugosa" degli LPS (RF-LPS) di *Helicobacter pylori*, è capace di mediare il legame con il peptide. Tale regione contiene la porzione oligosaccaridica centrale ed è priva della catena laterale *O-specific chain*. Queste analisi hanno permesso di individuare alcuni carboidrati come possibili interattori per TFF1 (Reeves *et al.*, 2008).

Studi recenti hanno identificato come modello per lo studio del legame tra il batterio e la proteina, un clone di cellule di colon-carcinoma (HT29-E12), in grado di produrre uno strato di muco. *H. pylori* e TFF1 colocalizzano nello strato mucoso e l'interazione media la colonizzazione del batterio. Per verificare l'effettivo ruolo di TFF1 nei processi che regolano l'infezione del batterio in questo clone cellulare, sono stati costruiti due mutanti isogenici di *H. pylori*, per geni coinvolti nella sintesi degli LPS. Il mutante P12HP Δ 479 (HP Δ 479) è privo del gene codificante per una D-glicero-

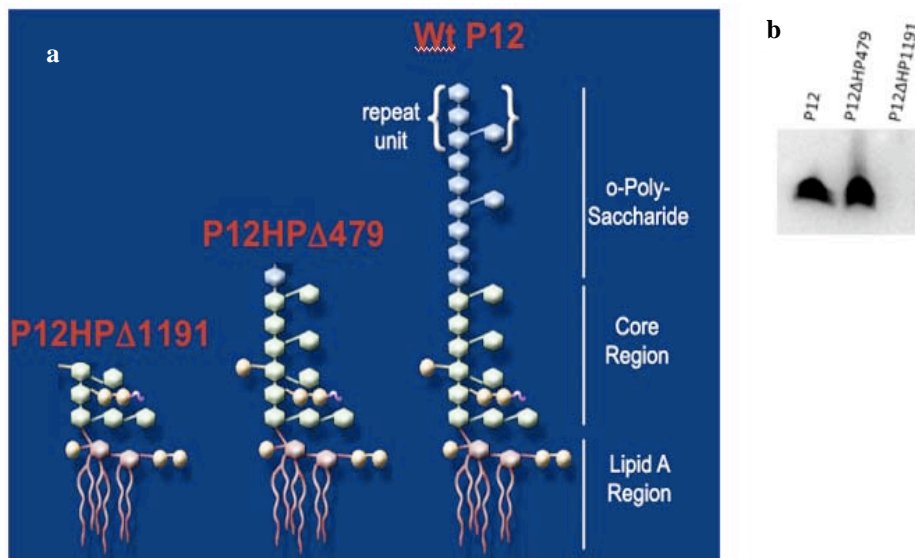


Figura 1.18 Rappresentazione schematica dei mutanti isogenici HP Δ 479 e HP Δ 1191 (a). Esperimenti di immunoblotting mostrano che soltanto il mutante HP Δ 479 lega TFF1 analogamente a quanto avviene con il ceppo Wt P12 (b).

D-manno-eptosiltransferasi, la quale è coinvolta in alcune modifiche della regione esterna del *core* oligosaccaridico. Il secondo mutante, P12HP Δ 1191 (HP Δ 1191), è privo di un gene codificante una L,D-eptosiltransferasi, coinvolta nella biosintesi della regione interna della porzione oligosaccaridica. I due mutanti, in definitiva, presentano LPS tronchi di differente lunghezza (Figura 1.18). Il mutante ~~HP Δ 479~~

presenta somiglianze con il ceppo *wild-type* nel legame con TFF1, mentre il mutante HP Δ 1191 non interagisce con il peptide. Esperimenti di colonizzazione su HT29-E12 con il ceppo HP Δ 1191 mostrano una riduzione dei livelli di colonizzazione rispetto al ceppo *wild-type* e al ceppo mutato HP79. 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.*, dati confidenziali, in stampa).

L'infezione di *H. pylori*, sia nel modello cellulare HT29-E12 (Dolan *et al.*, dati confidenziali, in stampa) che in biopsie umane dell'antro gastrico (Bovenkamp *et al.*, 2005; Tomita *et al.*, 2011) provoca una diminuzione dell'espressione di TFF1.

Nonostante negli ultimi anni diversi studi siano stati dedicati all'analisi dell'interazione tra il batterio e la proteina, molti aspetti risultano ancora poco chiari.

Assume, inoltre, una particolare rilevanza la definizione degli eventi che trasformano l'infezione del batterio in processo infiammatorio persistente capace di evolvere in diffuso processo neoplastico.

1.3 SCOPO DELLA TESI

In base alle evidenze sulla interazione tra il rame e TFF1 precedentemente ottenute, il presente progetto di dottorato è stato dedicato allo studio del ruolo del metallo nella regolazione della espressione di *tff1*, nella secrezione e nelle funzioni biologica della proteina.

In particolare lo studio è stato sviluppato perseguendo i seguenti obiettivi:

- i) valutare l'espressione di TFF1 in condizioni di carenza di rame in modelli cellulari;
- ii) individuare elementi sensibili alle concentrazioni di rame presenti nel promotore di *tff1*;
- iii) analizzare l'influenza del metallo sull'attività biologica e nei processi di secrezione della proteina;
- iv) valutare il ruolo di TFF1 nei meccanismi di omeostasi del metallo.

Inoltre, poichè recenti lavori pubblicati avevano dimostrato che il batterio *Helicobacter pylori* interagisce selettivamente con la forma dimerica della proteina (Clyne *et al.*, 2004; Dolan *et al.*, dati confidenziali, in stampa), ulteriore argomento di studio è stato l'analisi della funzione del cupro-complesso Cu-TFF1 nelle infezioni da *H. pylori* in modelli cellulari. Per tale sperimentazione è stata sviluppata una collaborazione con la Dr.ssa Marguerite Clyne della *School of Medicine & Medical Science del University College of Dublin*, presso la quale è stata eseguita l'ultima parte del lavoro qui descritto.

CAPITOLO 2

RISULTATI

2.1 Modulazione dell'espressione di *tff1* rame-dipendente

2.1-1 Variazione dell'espressione di *tff1* in cellule di adenocarcinoma gastrico AGS

Nostri dati pregressi, derivanti da un'analisi differenziale dell'espressione genica in intestino di ratto in carenza nutrizionale di rame, evidenziavano *tff1* come uno dei trascritti maggiormente indotti in tali condizioni. Studi successivi hanno in seguito dimostrato la capacità di TFF1 di legare specificamente il rame (Tosco *et al.*, 2007).

Gli studi effettuati sul modello animale *knock-out* per *tff1* hanno mostrato che lo stomaco di questi animali ha un alterato coefficiente mitotico e carcinoma gastrico. Ciò suggerisce che TFF1 agisca come un gene soppressore nel tumore dello stomaco (Lefebvre *et al.*, 1996). Il peptide è normalmente espresso nella mucosa gastrica e si ritrovano elevati livelli anche nel succo gastrico. Molti degli studi effettuati su TFF1, quindi, sono stati elaborati su cellule umane di adenocarcinoma gastrico (AGS). In particolare Calnan e collaboratori, attribuiscono a TFF1 un ruolo di modulatore per la crescita di cellule tumorali gastriche (Calnan *et al.*, 1999). Studi successivi mostrano anche una regolazione positiva di TFF1 nelle AGS mediata da TNF-alfa (Koike *et al.*, 2007) e dall'ormone gastrina (Khan *et al.*, 2003).

Pertanto, per analizzare in maniera più approfondita le variazioni di espressione del gene *tff1* in condizioni di carenza di rame, in un modello semplificato come quello cellulare, è stata utilizzata la linea di adenocarcinoma gastrico (AGS).

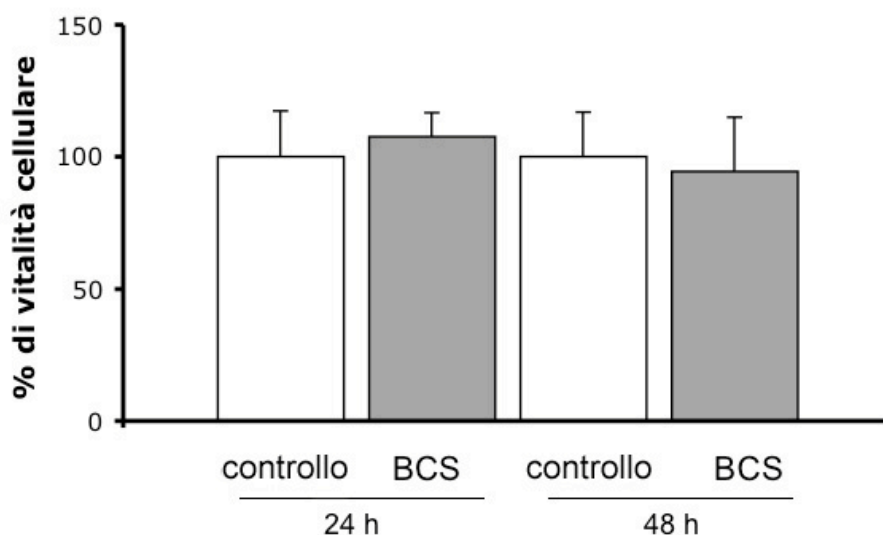


Figura 2.1: Saggi di vitalità cellulare dopo trattamento con BCS 500 µM per 24 e 48 ore.

Prima di procedere all'analisi trascrizionale è stato necessario verificare che i trattamenti effettuati non pregiudicassero la vitalità cellulare. Infatti, per stabilire le condizioni di trattamento in deprivazione di rame, le colture cellulari sono state incubate per 24 e 48 ore con Batocuproina solfato (BCS), un chelante specifico del rame. Nelle condizioni sperimentali utilizzate BCS non influenza la vitalità delle cellule AGS, come dimostrato dai risultati del saggio colorimetrico con MTT (un sale di tetrazolio metabolizzato solo dai mitocondri delle cellule vitali) mostrato in Figura 2.1.

L'espressione del trascritto di TFF1 è stata analizzata mediante *Real-Time PCR* in condizioni di deplezione dello ione metallico, ottenute utilizzando Batocuproina solfato (BCS) a due diverse concentrazioni (100 μM e 500 μM), ed incubando le colture cellulari per 24 e 48 ore.

Come mostrato in Figura 2.2, dopo 24 ore di trattamento con BCS 500 μM la chelazione induce un incremento apprezzabile ($p\text{-value} = 0,08$) dell'espressione del peptide TFF1 rispetto al controllo (cellule non trattate), mentre non si registrano differenze nei trattamenti con concentrazione più bassa di BCS. L'incremento diventa statisticamente significativo a 48 ore di trattamento con le due diverse concentrazioni di chelante, dimostrando una regolazione positiva di *tff1* in condizioni di deprivazione dello ione rame.

Tali evidenze hanno consentito di avviare uno studio del promotore del gene di

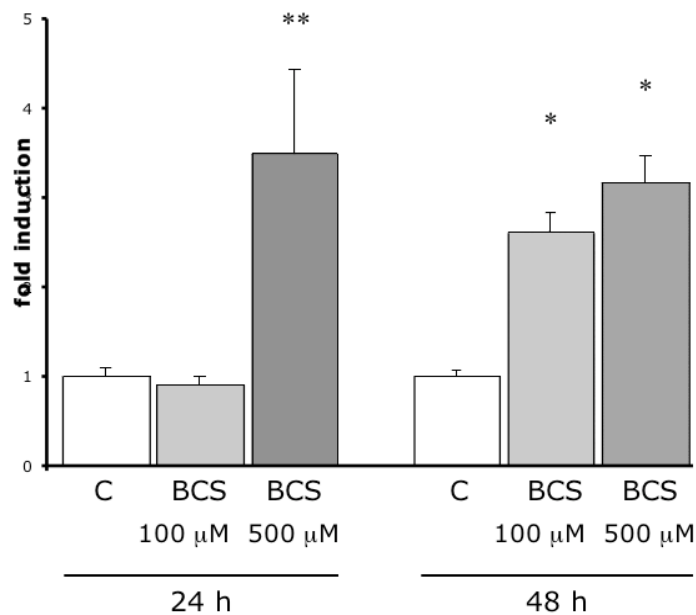


Figura 2.2: *Real-Time PCR*. L'analisi è stata eseguita su cellule di adenocarcinoma mammario (AGS) trattate con BCS 100 μM (barra grigio chiaro); 500 μM (barra grigio scuro). Gli istogrammi mostrano i risultati ottenuti a 24 e 48 ore di trattamento. In Figura sono riportati i valori di induzione del trascritto di TFF1 rispetto al controllo (C - barra bianca). Le barre di errore rappresentano le deviazioni standard. L'analisi statistica è stata effettuata mediante t-test: **p value = 0,08 * p value <0,05

tff1 al fine di individuare le regioni direttamente coinvolte nella regolazione stimolata dalla carenza di rame.

2.1-2 Identificazione di elementi sensibili alle concentrazioni di rame sul promotore di *tff1*

Sebbene siano stati individuati diversi motivi conservati che regolano positivamente e negativamente l'espressione del gene (vedi introduzione *par.* 1.1-4), ad oggi non esistono studi di mappatura funzionale sistematica degli elementi regolativi presenti sul promotore del peptide TFF1.

Al fine di identificare e caratterizzare gli eventuali elementi che regolano la dipendenza dell'espressione del fattore peptidico dai livelli di rame, è stata disegnata la segmentazione della regione regolatrice prossimale, ed il suo clonaggio in un plasmide a monte di un gene reporter. A tal fine è stato utilizzato il plasmide commerciale pGL3 (Promega) contenente il gene della luciferasi. La regione di 2 kb a monte del gene *tff1* è stata amplificata in 2 frammenti di circa 1 kb (1036bp) e 2 kb (2282bp), mediante PCR su DNA genomico estratto da cellule di carcinoma mammario (MCF-7). I frammenti ottenuti sono stati separatamente clonati nel vettore pGL3 (pGL3-**1kb**-Luc; pGL3-**2kb**-Luc). In seguito, sono stati ottenuti per delezione sequenziale mediante digestione con esonucleasi Bal31 i costrutti di delezione di pGL3-0,2kb-Luc, pGL3-0,4kb-Luc e pGL3-0,5kb-Luc (Figura 2.3)

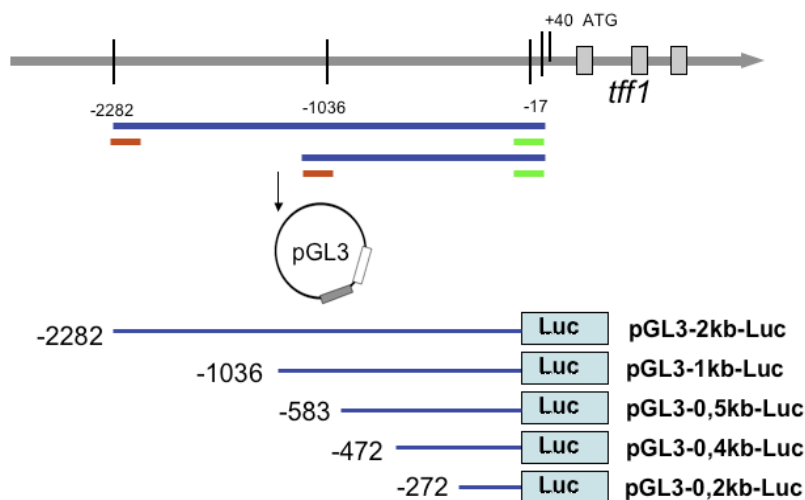


Figura 2.3: Costrutti analizzati per la mappatura del promotore di *tff1*.

Colture di cellule AGS sono state co-trasfettate con i costrutti sopra descritti e con un plasmide contenente il gene della β -galattosidasi, la cui espressione è stata utilizzata come parametro di normalizzazione dell'efficienza di trasfezione. Dopo sei ore dalla trasfezione, le cellule sono state incubate in presenza o assenza di 500 μ M Batocuproina solfato (BCS) al fine di determinare una condizione di deplezione dello ione metallico. Il saggio è stato effettuato dopo 48 ore dalla trasfezione. In Figura 2.4

sono riportati i dati di attività della luciferasi per le cellule trasfettate con i vari costrutti in presenza o assenza di BCS. I dati sono stati espressi in riferimento all'attività basale del costrutto contenente il frammento più piccolo del promotore (pGL3-0,2kb-Luc) che è stata posta uguale ad 1. La presenza di eventuali effetti aspecifici del chelante è stata verificata conducendo contemporaneamente l'analisi anche su cellule trasfettate con il plasmide contenente il gene della luciferasi sotto il controllo del promotore SV40, il quale non risponde alla chelazione del metallo.

Nei costrutti contenenti i frammenti di 583bp, ~1 kb e ~2 kb si osserva una induzione del gene della luciferasi in presenza di BCS. Tale aumento è assente con i costrutti di 435bp e 272bp. Tale differenza consente di ipotizzare l'esistenza, nella regione -583/-435 di specifici elementi sensibili alle variazioni di concentrazione del metallo, capaci di regolare positivamente l'espressione del gene in condizioni di deprivazione di rame.

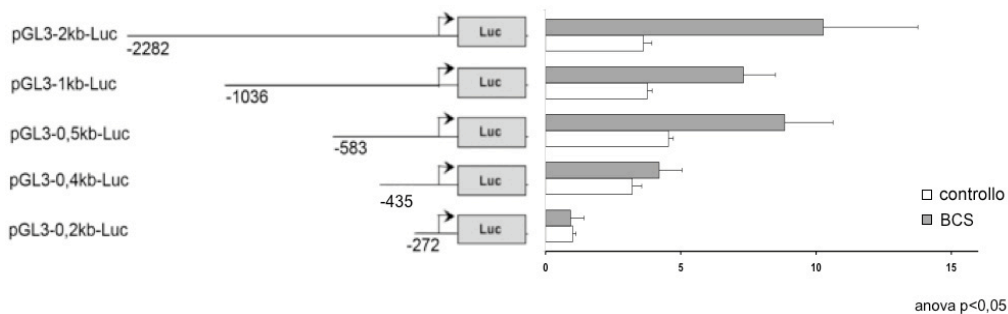


Figura 2.4: Analisi dei costrutti di delezione. Cellule di adenocarcinoma gastrico (AGS) trasfettate con i costrutti di delezione contenenti il gene reporter della luciferasi. La deplezione del metallo, ottenuta mediante chelazione con BCS (barre grigie), promuove l'espressione della luciferasi nei costrutti contenenti la regione -583/-435 (pGL3-2kb-Luc, pGL3-1kb-Luc, pGL3-0,5kb-Luc). Le barre indicano i valori di induzione rispetto al plasmide con il più piccolo frammento del promotore (pGL3-0,2kb-Luc).

2.1-3 Caratterizzazione di un putativo sito di legame per il fattore di trascrizione SP1.

I saggi effettuati con i costrutti di delezione ci hanno permesso di identificare una regione di circa 150 bp (-583/-435) che risponde al decremento dei livelli di rame ed è critica per la regolazione della espressione del peptide in condizioni di deplezione del metallo. L'analisi di sequenza della regione in esame con il software "Transfac" rivela la presenza di un sito SP1 tra le sequenze *consensus* con *score* più elevato. L'analisi riporta anche il fattore di trascrizione Ref-1 coinvolto nella riparazione del DNA (Xanthoudakis *et al.*, 1994); una proteina legante il gene della alfa fetoproteina, AFP-1 (Nakao *et al.*, 1989); il fattore di trascrizione LUN, una *ring finger protein* altamente espressa nel polmone e coinvolta nello sviluppo neoplastico (Chu *et al.*, 2001), e sequenze riconoscimento ai glucocorticoidi, GR-alfa (Hong *et al.*, 1999).

In prima istanza abbiamo concentrato la nostra attenzione sul sito di legame per il fattore SP1 in quanto dati di letteratura riportano un ruolo funzionale di SP1 nella

regolazione dell'espressione del trasportatore del rame hCrt1, e quindi un suo ruolo nella risposta omeostatica ai livelli di rame (Song *et al.*, 2008). Sono stati quindi eseguiti saggi EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) al fine di verificare inizialmente la capacità di legame di SP1 per la sequenza identificata sul promotore del gene *tff1*. A tal fine sono state disegnate due sonde sulla sequenza putativa di legame ad SP1 presente nel promotore di *tff1*: una contenente la sequenza nativa (sequenza putativa **pSP1**: ctgactttaagtgat**CCGcct**gctttggcc) e una contenente una sequenza mutata nel sito di riconoscimento (sequenza mutata **mSP1**: ctgactttaagtgat**TTTcct**gctttggcc). Come controllo positivo è stata utilizzata una sonda contenente la sequenza canonica di legame al fattore di trascrizione (sequenza canonica **cSP1**: ggctccaagag**gggcggg**aactcga), e come controllo negativo un oligonucleotide a doppio filamento di sequenza casuale per valutare i livelli di legame aspecifico (scr) (Figura 2.5).

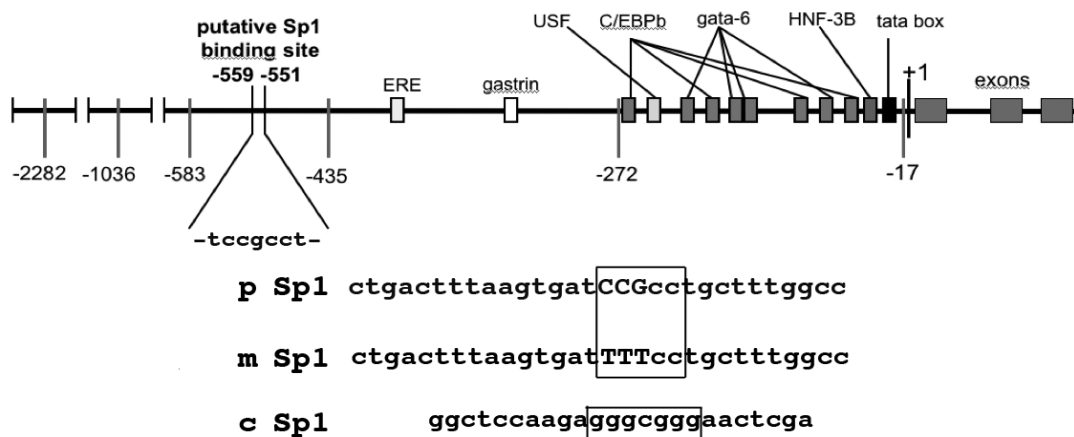


Figura 2.5: Rappresentazione schematica del promotore di *tff1*. Le sequenze indicano le sonde utilizzate per gli esperimenti di mobilità elettroforetica. **pSP1** : sequenza putativa presente sul promotore di *tff1*, **mSP1**: sequenza mutata nella regione di legame, **cSP1**: sequenza canonica.

Come mostrato in Figura 2.6 A risulta evidente la presenza di proteine nucleari che legano specificamente gli oligonucleotidi marcati rappresentativi della sequenza SP1 putativa (pSP1*, linea 1). Infatti, il legame di proteine nucleari alla sequenza pSP1* non viene spiazzato né dalla sonda mutata (mSP1, linea 4-5) né dall'oligo aspecifico (scr, linea 6-7). La situazione opposta si riscontra quando le proteine sono incubate con la sonda pSP1 non marcata (pSP1, linea 2-3). In questo caso la sonda non marcata spiazza il legame delle proteine nucleari con la sonda radioattiva in modo proporzionale alla concentrazione della sonda fredda.

Per verificare ulteriormente la specificità di interazione tra le proteine nucleari e il sito putativo di legame ad SP1, abbiamo anche utilizzato una sequenza canonica per SP1 (cSP1*). Come mostrato in Figura 2.6 B la sequenza del promotore di *tff1* (pSP1) compete con la sequenza canonica (linea 8-9-10) anche se in misura minore rispetto alla sonda canonica (cSP1, linea 2-3-4), mentre non si osserva nessuna

competizione quando le proteine nucleari vengono incubate con un oligo aspecifico (scr, linea 5-6-7).

In Figura 2.6 C viene mostrata la situazione opposta in cui la sonda marcata è quella relativa al promotore di *tff1* (pSP1*, linea 1) e la sonda canonica non marcata (cSP1, linea 8, 9, 10) è utilizzata per le competizioni. Anche in questo caso si ha un andamento simile alla Figura 2.6 B. Sia la sonda canonica che quella putativa inibiscono il legame tra proteine nucleari e sonda marcata mentre l'oligo aspecifico non altera il legame sonda-proteine. Successivamente, sono state effettuate anche analisi di *Supershift* ma, nelle nostre condizioni sperimentali, gli anticorpi commerciali anti-SP1 utilizzati, non hanno fornito alcun risultato, rivelandosi inefficaci anche sui controlli positivi.

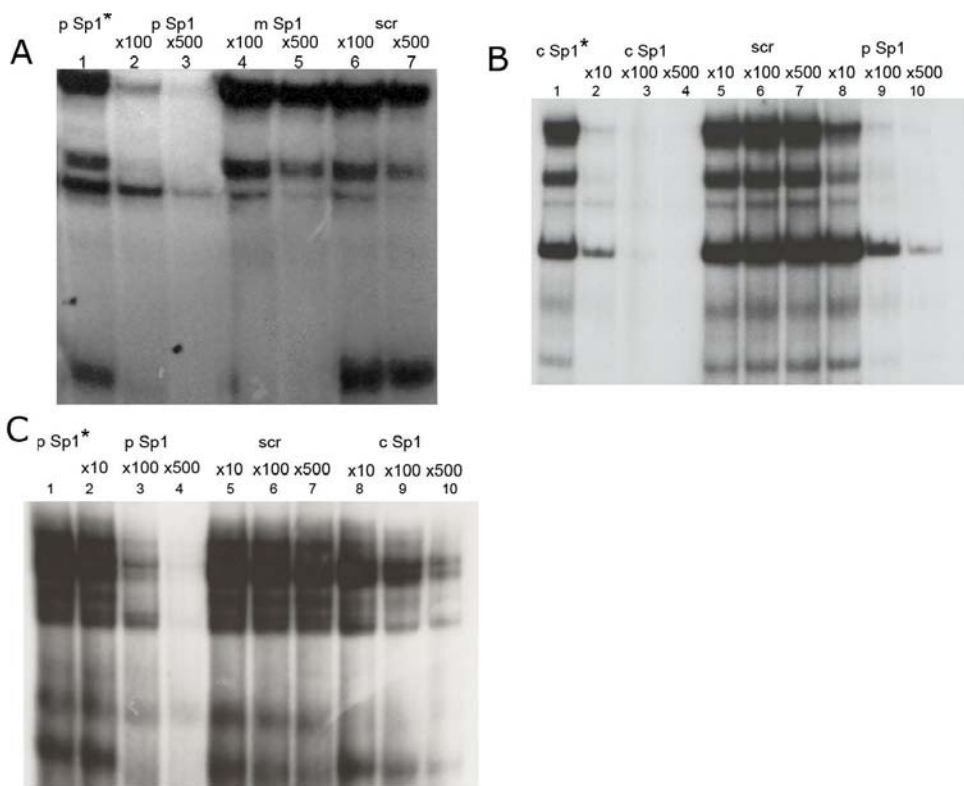


Figura 2.6: Saggi di mobilità elettroforetica. A) Sonda SP1 da promotore di *tff1* (pSP1*) incubata con proteine nucleari e saggiata per competizione con sonda aspecifica (scr) e sonda con sequenza mutata nel sito putativo di legame (mSP1). B) sonda con sequenza SP1 canonica (cSP1*) e competizione con la stessa sonda canonica (cSP1) fredda, con sonda aspecifica (scr), e con sonda pSP1. C) sonda con sequenza pSP1 (pSP1*) e competizioni con sonda aspecifica (scr) e sonda cSP1 canonica.

2.2 Coinvolgimento del peptide TFF1 nell'omeostasi del rame

Parallelemente all'analisi delle variazioni trascrizionali il nostro gruppo di ricerca si è occupato di analizzare le variazioni della secrezione della proteina in seguito a modulazione della concentrazione di rame. A tale scopo è stato utilizzato un clone di cellule di adenocarcinoma gastrico AGS-AC1 (AC1) esprime TFF1 in modo inducibile.

Le AGS sono cellule di adenocarcinoma gastrico umano che esprimono costitutivamente bassi livelli di TFF1, non rilevabili per Western blotting nelle condizioni sperimentali utilizzate. Il clone stabile AC1 (fornito dalla Prof.ssa. M.C. Rio; Department of Cancer Biology, CNRS - Strasburgo, Francia) è stato ottenuto per trasfezione delle cellule AGS con un vettore di espressione per TFF1 dotato di un promotore inducibile con Doxamicina. Il vettore utilizzato, in seguito alla trasfezione, 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 (Figura 2.7.)

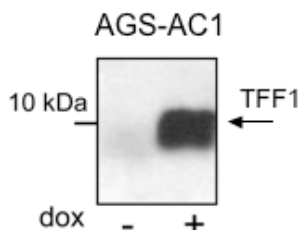


Figura 2.7 Analisi Western blotting di surnatanti di AGS-AC1 con anticorpo anti-TFF1 in cellule indotte e non indotte con doxamicina.

Dati ottenuti nel nostro laboratorio mostrano che il rame influenza la secrezione di TFF1. Colture di cellule gastriche AGS-AC1 sono state cresciute in mezzi privi di siero e trattate con due differenti concentrazioni di CuCl_2 (10 μM and 100 μM) per 24, 48 e 72 ore, in presenza di Doxamicina (1 ng/ μl) per indurre l'espressione di TFF1. Le cellule indotte non trattate con CuCl_2 sono state considerate la condizione controllo. Al termine dei trattamenti sono state eseguite analisi di western blotting sui surnatanti per determinare la quantità di TFF1 secreta.

In Figura 2.8 sono mostrati i risultati delle analisi densitometriche che evidenziano una riduzione della proteina secreta in condizioni di sovraccarico di rame.

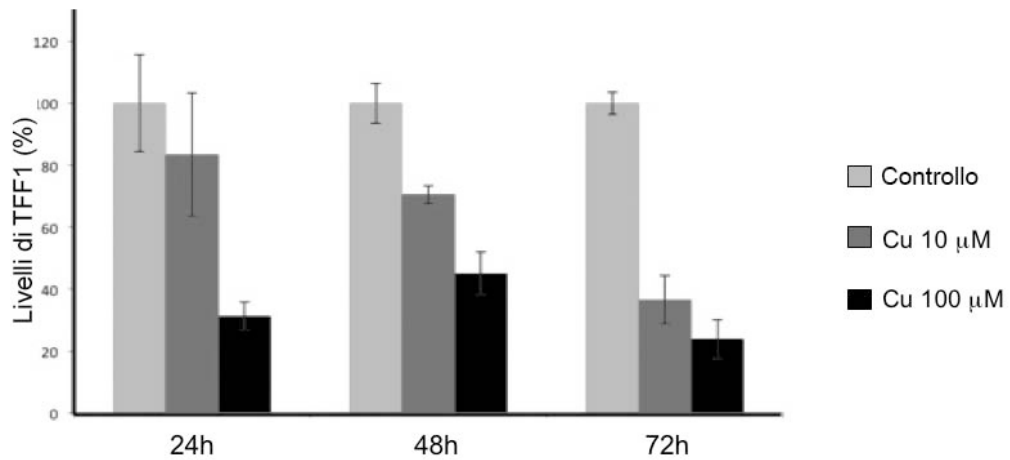


Figura 2.8: Analisi densitometrica di Western blotting. Cellule AGS-AC1 sono state incubate con rame 10 e 100 μM per 24, 48 e 72 ore. Al termine dei trattamenti, i surnatanti sono stati analizzati per misurare la quantità di TFF1 secreta.

Alla luce di questi risultati era ragionevole ipotizzare che variazioni dei livelli di rame potrebbero influenzare i processi di accumulo e secrezione della proteina al fine di regolare i processi di assorbimento del metallo stesso. Per approfondire il possibile ruolo di TFF1 nell'omeostasi del metallo, sono state eseguite analisi di assorbimento atomico su tessuti di topi *knock-out* per TFF1 e sul clone di cellule gastriche AGS-AC1.

2.2-1 Analisi di assorbimento atomico su topi *tff1*^{-/-}

Le analisi istologiche e molecolari effettuate sul topo (ceppo C57BL/6 J/129/Svj)

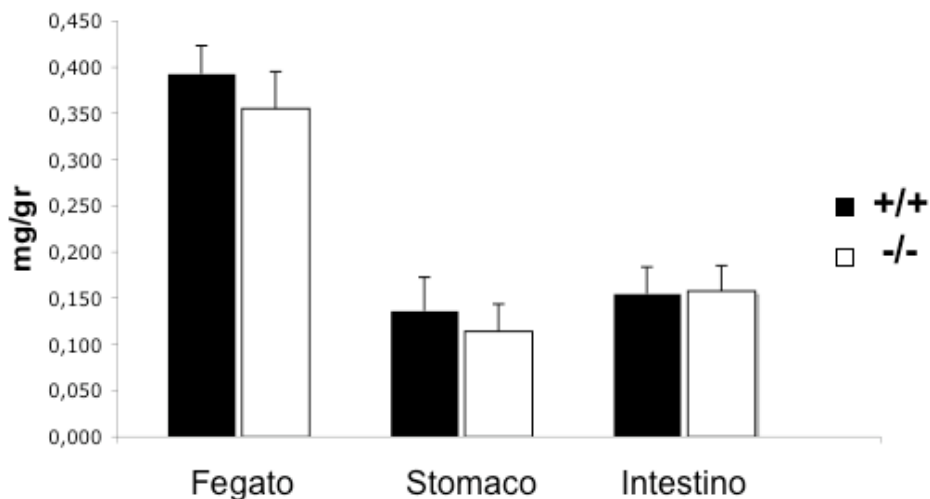


Figura 2.9: Determinazione, mediante assorbimento atomico, della concentrazione di rame in fegato, stomaco e intestino di topi *tff1*^{-/-} (barre bianche) e topi controllo (barre nere).

knock-out per *tff1* (*tff1*^{-/-}), come descritto in letteratura, mostrano una funzionalità gastrointestinale compromessa. Tali alterazioni sono correlate, intorno al quinto mese di vita, alla insorgenza di adenocarcinoma gastrico (Lefebvre *et al.*, 1996). Tuttavia, non sono descritte alterazioni sistemiche che possano far pensare ad un'alterata omeostasi dei metalli in genere o specificamente dello ione rame. Al fine di valutare un possibile ruolo di TFF1 nell'omeostasi del rame, è stata determinata, mediante analisi di assorbimento atomico, la concentrazione del metallo nello stomaco, nell'intestino e nel fegato di topi *tff1*^{-/-} (cortesemente forniti dal laboratorio della Prof.ssa M.C. Rio, Department of Cancer Biology, Università di Strasburgo, Francia). La scelta degli organi studiati è giustificata dalle loro specifiche funzioni di assorbimento ed accumulo del metallo. Le analisi effettuate non mostrano alterata concentrazione di rame negli organi di topi *knock-out* rispetto a topi controllo (Figura 2.9).

I risultati indicano, come ci si poteva attendere, che TFF1 non ha un ruolo fondamentale in quanto la sua assenza nei topi *knock-out*, non altera la concentrazione di rame in organi potenzialmente sensibili come fegato, stomaco e intestino. Non è però da escludere che TFF1 possa essere uno dei tanti fattori coinvolti nell'omeostasi del metallo e che quindi, in un sistema complesso e finemente regolato come l'omeostasi degli oligoelementi nei mammiferi, possano intervenire altri fattori ridondanti capaci di garantire un corretto equilibrio, anche in sua assenza.

2.2-2 Analisi di assorbimento atomico in modelli cellulari

A questo punto si è deciso di passare ad un modello semplificato come quello cellulare, utilizzando il clone AGS-AC1 in modo da poter correlare l'assorbimento di rame all'espressione della proteina.

A 24 ore dalla semina le cellule sono state lavate con PBS e incubate in mezzo minimo (senza l'aggiunta di siero), in presenza o assenza di doxyciclina. Dopo 24 ore le colture sono state incubate con CuCl₂ 10 µM per tempi diversi. Le cellule sono state quindi lisate mediante sonicazione ed è stata determinata la concentrazione proteica dei lisati con metodica Bradford. La concentrazione di rame nei vari campioni, normalizzata per il contenuto proteico, è stata misurata mediante spettroscopia di assorbimento atomico. I nostri risultati mostrano che le cellule indotte esprimenti TFF1 accumulano quantità maggiori di rame, se confrontate con le cellule di controllo non indotte (Figura 2.10 A). Questa differenza risulta più evidente a 80 e 320 min dall'aggiunta di CuCl₂. Inoltre, per stabilire se tale accumulo fosse dovuto ad un'aumentata velocità di ingresso o ad una diminuita velocità di efflusso del metallo, le cellule sono state incubate con mezzo ricco di rame per 24 ore, lavate con PBS e incubate con BCS per diversi tempi. Analogamente agli esperimenti precedenti, le cellule sono state raccolte e lisate ed è stata determinata la concentrazione di rame nei vari campioni, normalizzata per il contenuto proteico. Dai risultati ottenuti si può dedurre che le cellule in cui è stata indotta l'espressione di TFF1 trattengono il rame per tempi più lunghi (Figura 2.10 B). Le indicazioni desumibili suggeriscono che livelli di TFF1 possono avere un ruolo nei processi di assorbimento del rame nel modello cellulare utilizzato e sollevano ulteriori interrogativi sui meccanismi molecolari e sul ruolo funzionale della proteina in tale processo.

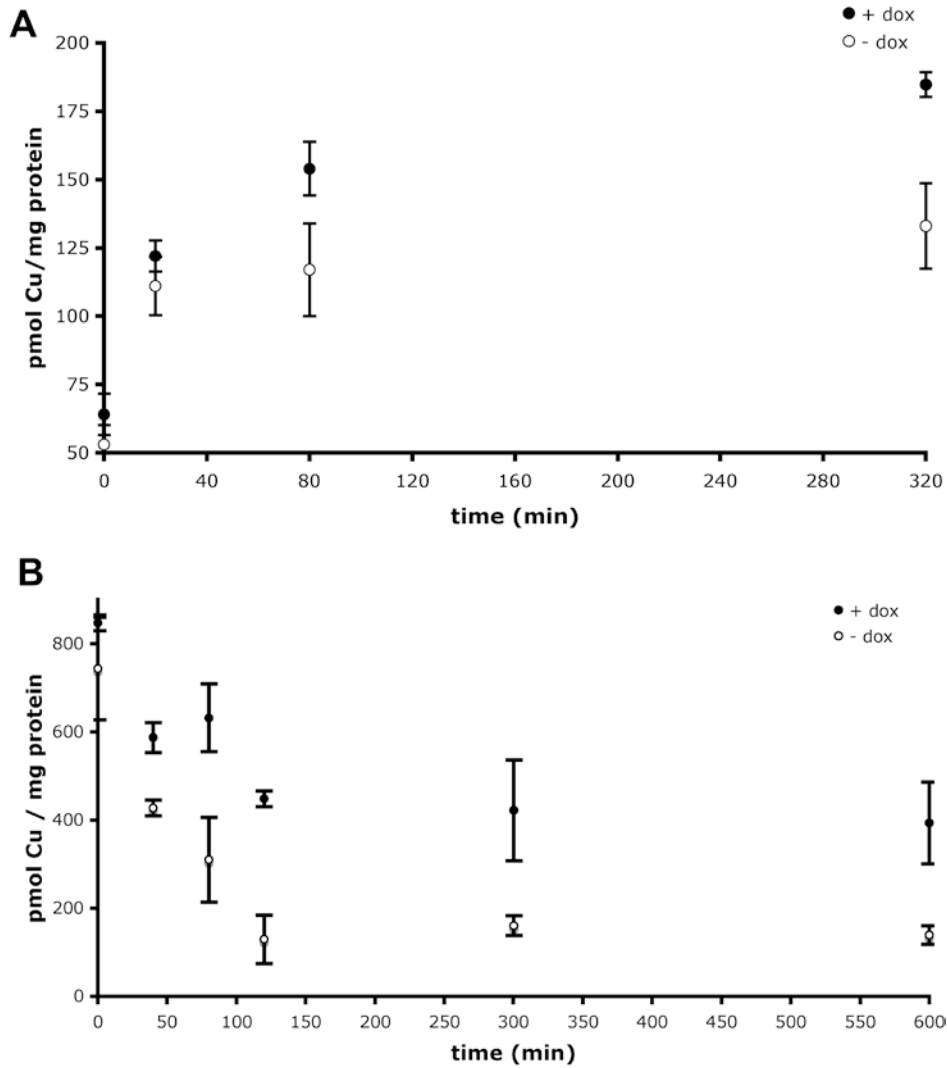


Figura 2.10: Analisi di assorbimento atomico: determinazione della concentrazione di rame in cellule AGS-AC1. **A:** Cellule indotte (● +dox) e non indotte (○ -dox) sono state incubate per 24 ore in mezzo privo di rame. Al tempo zero sono state incubate con CuCl_2 10 μM ed è stata determinata la concentrazione del metallo a 0, 20, 80 e 320 minuti dall'inizio del trattamento. **B:** Cellule indotte e non indotte sono state incubate per 24 ore con CuCl_2 10 μM , al tempo zero lavate con PBS e incubate con BCS 500 μM . Nei tempi successivi, le cellule sono state raccolte ed è stata determinata la concentrazione del metallo.

2.3 Il rame e l'attività motogenica di TFF1

Precedenti studi (Tosco *et al.*, 2007) hanno mostrato che lo ione rame induce un cambio di conformazione nella struttura terziaria di TFF1, suggerendo che tale ione potrebbe influenzare l'attività biologica del peptide nell'interazione con altri fattori o con putativi recettori.

Come descritto nell'introduzione, ulteriori indagini condotte su peptidi sintetici hanno consentito di dimostrare che il rame promuove la formazione del ponte disolfuro intracatena. Allo scopo di confermare questo risultato in modelli cellulari sono stati realizzati esperimenti di Western blotting sui supernatanti delle linee cellulari MCF-7 e HT29-E12. Il clone di cellule HT29-E12 deriva dalla linea cellulare di carcinoma del colon HT29 mediante selezione con metotressato. In questo modo, da una popolazione mista di enterociti e cellule goblet, è stata ottenuta una popolazione omogenea di cellule goblet, responsabili della produzione e secrezione di mucine (MUC1, MUC2, MUC3, MUC5AC) e dei tre i peptidi trifoglio (Behrens *et al.*, 2001).

Le cellule sono state incubate in presenza di rame 100 μ M per 48 ore e al termine dei trattamenti sono stati analizzati 100 μ l del mezzo di coltura in condizioni riducenti e non riducenti, in modo da rivelare la presenza di monomeri e dimeri di TFF1. Dai risultati ottenuti si osserva che le quantità di proteina rivelate dimostrano che il trattamento con il rame non influenza la quantità totale di proteina secreta (Figura 2.11: A) linea 2 e 3; b) linea 1 e 2). Mentre, in condizioni non riducenti, è evidente un aumento della forma omodimerica per i campioni trattati con rame 100 μ M. Nei mezzi prelevati da colture di MCF-7 osserviamo la forma dimerica in entrambi i campioni ma è evidente l'incremento dopo incubazione con rame (Figura 9a, linea 5). Per le colture di HT29-E12, l'analisi mostra la presenza dell'omodimero soltanto nei campioni trattati (Figura 2.11: B, linea 4). Dai risultati ottenuti appare comunque chiaro che il rame possa avere un ruolo nel processo di dimerizzazione della proteina (Figura 2.11).

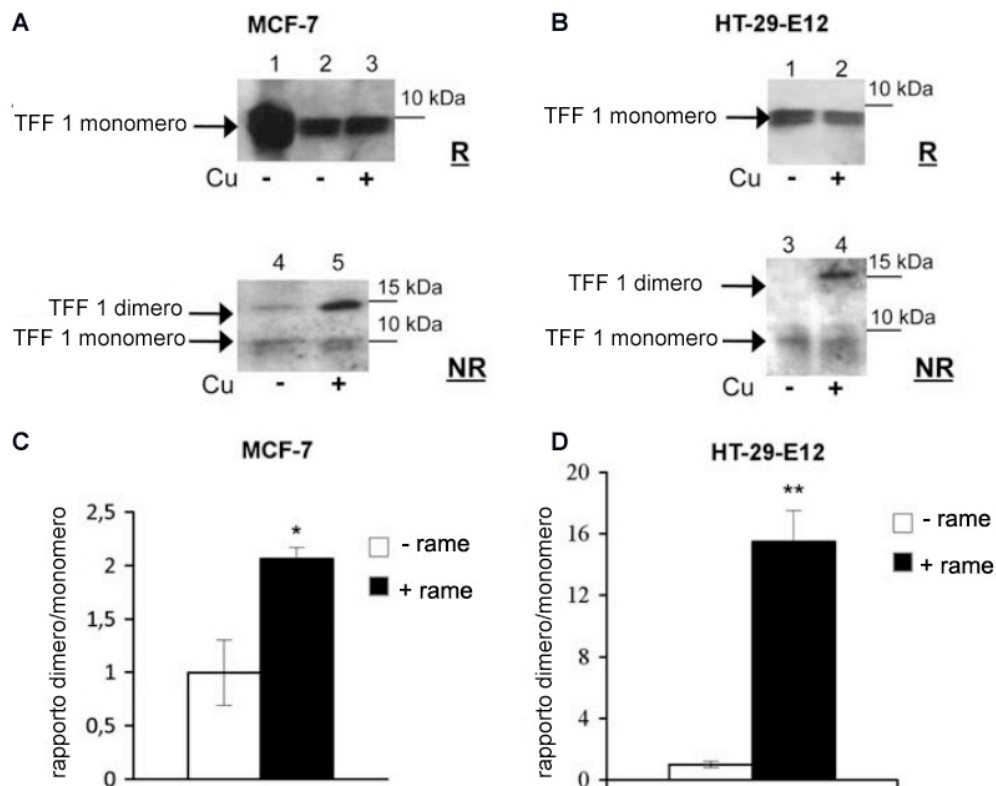


Figura 2.11 Analisi Western blotting delle proteine secrete in condizioni riducenti (R) e non riducenti (NR). Le cellule sono state cresciute in mezzo privo di rame (- rame) o con aggiunta di CuCl_2 100 μM (+ rame). A: cellule MCF-7 (linea 1: TFF1 ricombinante) B: cellule HT29-E12. Gli istogrammi rappresentano l'analisi densitometrica (media di triplicati biologici) degli esperimenti in cellule MCF-7 (C) e in cellule HT29-E12 (D). (* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$).

Uno degli obiettivi seguenti è stato quello di studiare l'influenza che il metallo potesse avere su una delle funzioni note e caratterizzate della proteina, nella fattispecie sull'attività motogena del peptide (Dignass *et al.*, 1994). È stato descritto infatti che, l'aggiunta della proteina ricombinante umana, su cellule epiteliali intestinali (IEC-6), promuove la migrazione cellulare in modelli *in vitro* di restituzione epiteliale e che la forma omodimerica è biologicamente più attiva per tale funzione (Marchbank *et al.*, 1998).

Al fine di verificare la capacità del cupro-complesso di influenzare la migrazione cellulare, sono stati messi a punto saggi di "wound healing". Quest'analisi prevede la produzione di un solco su una piastra di cellule a confluenza mediante ablazione meccanica superficiale, che mima la formazione di una lacuna dell'epitelio gastrointestinale; lo scopo dell'analisi è quello di valutare il tempo impiegato dalle cellule, che delimitano il solco, a ripopolare la ferita prodotta artificialmente. A tal fine sono state utilizzate colture del clone cellulare di adenocarcinoma gastrico AGS-AC1.

Analogamente a quanto detto per le MCF-7 e le cellule E12, anche per le AGS-AC1 l'incubazione con eccesso di rame promuove la formazione della forma dimerica del peptide (Figura 2.12).

Per gli esperimenti di *wound healing*, il clone è stato incubato in presenza e in assenza di BCS. L'induzione del peptide TFF1 con la doxiciclina e i trattamenti con batocuproina (BCS; 500 μ M) sono stati effettuati rispettivamente 36 e 24 ore prima di creare il *wound* nelle piastre (tempo zero). Dopo aver creato il *wound*, la migrazione delle cellule è stata seguita mediante l'utilizzo della stazione di video-microscopia *Time-Lapse ASF6000* (Leica). E' stato così possibile acquisire immagini ad intervalli di tempo regolari per tutto il processo di chiusura del *wound* (Figura 2.12 C). L'analisi dei dati è stata effettuata misurando la distanza percorsa dal fronte cellulare dal tempo zero fino alle 55 ore successive alla formazione del *wound*.

Dal grafico è evidente che, nelle colture in cui è stata indotta l'espressione del peptide TFF1 (non trattati, + dox), la distanza percorsa dalle cellule è maggiore rispetto alle colture di controllo (non trattati, - dox). Tale risultato è in accordo con la già nota capacità motogena della proteina. Il dato rilevante è che la deprivazione del rame, ottenuta con il trattamento dell'agente chelante BCS, riduce tale incremento (BCS + dox). Questo risultato suggerisce che la presenza dello ione rame possa essere critica nell'espletamento della funzione motogena di TFF1.

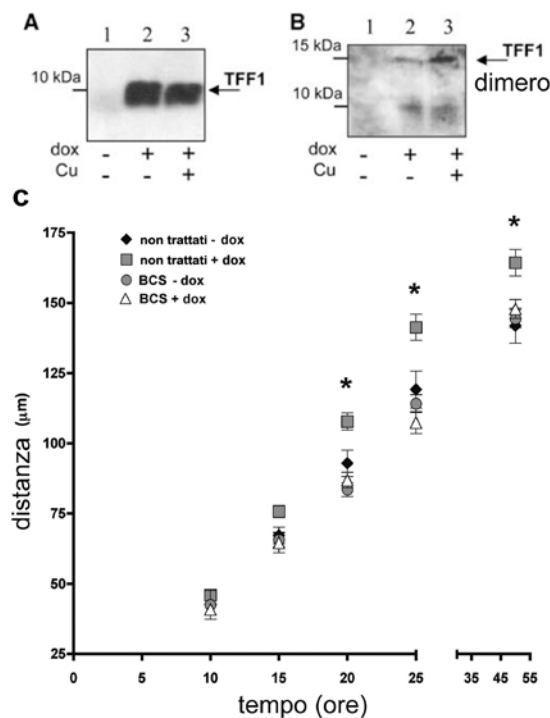


Figura 2.12: Analisi di migrazione cellulare. A: WB dei surnatanti di cellule AGS-AC1 indotte e non indotte con Doxiciclina (linea 1 e 2) e in presenza/assenza di rame (linea 2 e 3). B: WB in condizioni non riducenti dei surnatanti di cellule indotte e non indotte (linea 1 e 2) e trattate con eccesso di rame (linea 3). C: saggio di migrazione cellulare; sono riportate le distanze percorse dal fronte cellulare (μ m) in funzione del tempo di incubazione (ore). * *p* value < 0,05

2.4 Il rame e l'infezione di *H. pylori* mediata da TFF1

Come già descritto nel capitolo introduttivo (par. 1.2-4), in questi ultimi anni è cresciuto il numero di studi che mirano a chiarire il possibile coinvolgimento dei peptidi trifoglio nelle infezioni da *Helicobacter pylori* e nel cancro gastrico. In particolare sono stati pubblicati brillanti lavori su modello murino sulla relazione tra il batterio, i processi neoplastici e il fattore spasmolitico TFF2.

Di notevole interesse per i nostri studi sono stati i lavori pubblicati dal gruppo della dott.ssa Marguerite Clyne presso l'*University College of Dublin*, nei quali è stata dimostrata l'interazione specifica del batterio con la forma dimerica della proteina. Tale interazione è mediata da una forma dei lipopolisaccaridi del batterio, e nel modello cellulare HT29-E12 è stato evidenziato che il batterio e TFF1 colocalizzano nello strato di muco prodotto da questo particolare clone cellulare (Clyne *et al.*, 2004; Reeves *et al.*, 2008; Dolan *et al.*, dati confidenziali, in stampa).

I nostri recenti risultati circa l'influenza del rame sull'attività biologica del peptide e il ruolo del metallo nella sua regolazione trascrizionale, ci hanno indotto ad indagare sul coinvolgimento funzionale del rame e del cupro-complesso TFF1-Cu, nei meccanismi di virulenza di *H. pylori*.

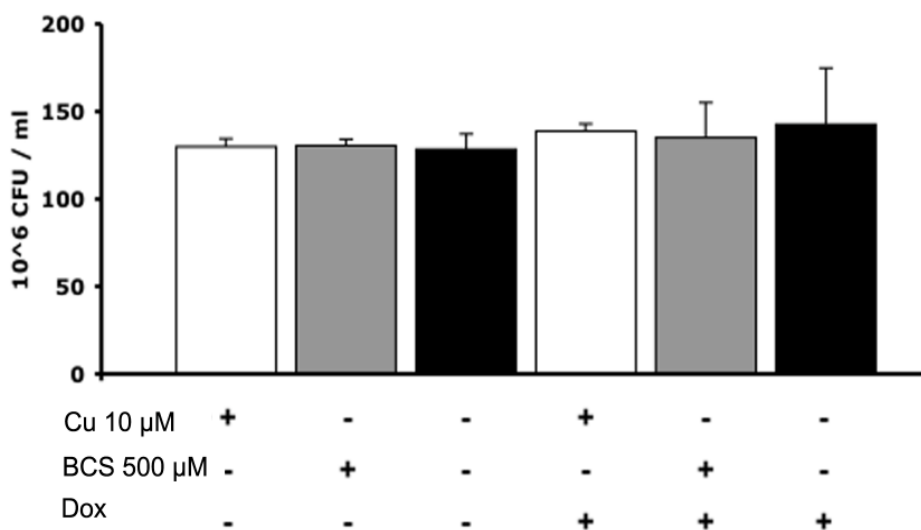


Figura 2.13 Saggi di vitalità per *H. pylori*. Le cellule batteriche sono state incubate con Cu, BCS e Dox alle concentrazioni utilizzate nei differenti esperimenti di infezione.

A tal fine ho trascorso un periodo del mio dottorato di ricerca presso l'Università di Dublino, dove sono stati ottenuti i risultati qui descritti.

Come necessaria premessa per l'impostazione dello studio è stata valutata l'influenza di TFF1 e del rame nelle infezioni di *H. pylori* in due diversi modelli cellulari: il clone di cellule goblet E12 selezionato dalla linea cellulare intestinale HT29, e il clone AGS-AC1 di cellule gastriche iperesprimenti in modo inducibile TFF1.

Prima di procedere con gli esperimenti di colonizzazione, abbiamo valutato la tossicità residua per i batteri, eventualmente ascrivibile ai trattamenti con doxiciclina (dox), batocuproina (BSC) e CuCl_2 (Cu) (Figura 2.13). I risultati illustrati dal grafico mostrano chiaramente che le condizioni di trattamento utilizzate non compromettono la vitalità del batterio.

Inoltre, attraverso analisi di immunofluorescenza è stato possibile verificare l'infezione del batterio nel modello cellulare AGS-AC1 (Figura 2.14), mentre, per il clone E12, le condizioni di infezioni erano già note da precedenti esperimenti (Dolan *et al.*, dati confidenziali, in *stampa*).

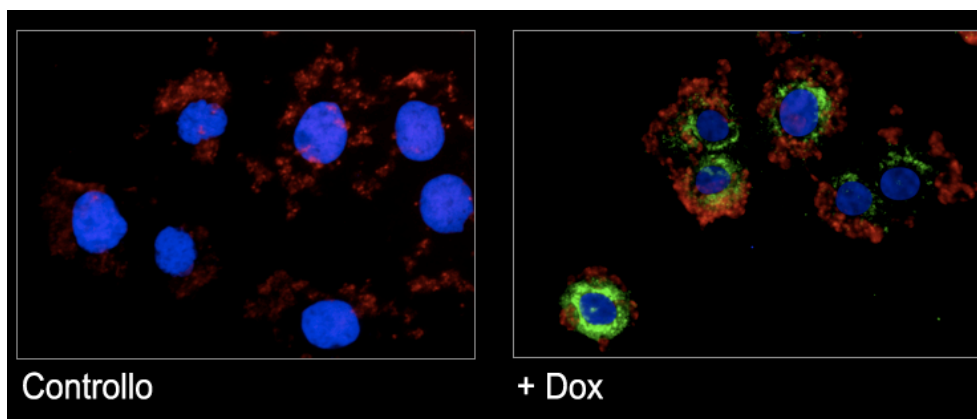


Figura 2.14: Immunofluorescenze di cellule AGS-AC1 infettate con *H. pylori*. Cellule indotte (dox) e non indotte (controllo). Blu: colorazione DAPI per i nuclei; Rosso: *H.pylori*; Verde: TFF1.

Infine, per valutare l'efficienza dell'infezione nel clone cellulare utilizzato, è stata analizzata l'espressione della proteina batterica CagA. Come detto in precedenza, CagA è un importante fattore di virulenza ed ha un ruolo fondamentale nei processi di infezione della cellula batterica nella cellula ospite. La proteina CagA è presente nel ceppo *wild-type* utilizzato per le infezioni, ma la sua fosforilazione avviene all'interno della cellula infettata. Cellule indotte e non indotte sono state quindi infettate con *Helicobacter pylori* e, al termine dell'infezione, i lisati cellulari sono stati analizzati mediante analisi *Western blot*. In Figura 2.15 è possibile osservare la fosforilazione della proteina batterica in lisati di cellule AGS-AC1 infettate con *H. pylori* (linea 3 e 4), a conferma dell'avvenuta infezione. Come controllo è stato utilizzato un lisato batterico per confrontare il peso molecolare della proteina fosforilata (linea 1). Inoltre il lisato batterico è stato incubato anche con l'anticorpo secondario anti-fosfotirosina (P-tyr) (linea 5).

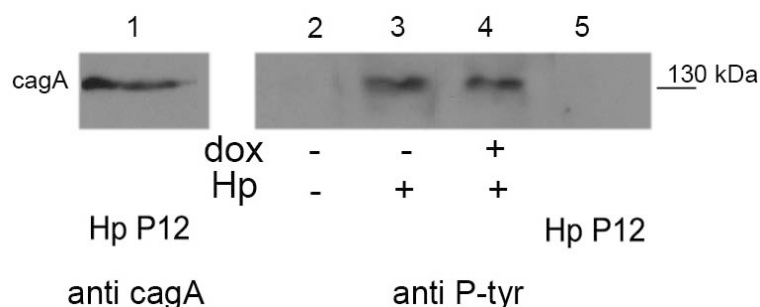


Figura 2.15: Analisi Western blotting della fosforilazione di CagA in cellule infettate con *H. pylori*. Lisati di cellule AGS-AC1 indotte (linea 4) e non indotte con doxiciclina (linea 3), infettati con *H. pylori* e ibridati con anti-fosfotirosina. Lisato di proteine batteriche (linea 1) ibridato con anticorpi anti-CagA e con anticorpi anti-fosfotirosina (anti P-tyr) (corsia 5).

2.4-1 Infezioni di *Helicobacter pylori* in AGS-AC1

Accertata l'assenza di tossicità dei trattamenti e verificata la capacità del batterio di infettare il clone di cellule gastriche, sono stati effettuati esperimenti per evidenziare l'eventuale ruolo di TFF1 e del rame nelle infezioni di *H. pylori*. A tal fine, cellule di adenocarcinoma gastrico, iperesprimenti in modo inducibile TFF1 (AGS-AC1), sono state seminate in piastre multi-pozzetto ad una confluenza di circa il 60%. Il giorno successivo alla semina, è stata indotta l'espressione di TFF1 con doxiciclina e sono stati eseguiti i diversi trattamenti per 24 ore. Le cellule sono state poi incubate con *Helicobacter pylori* per due ore e quindi lisate in modo da ottenere il rilascio dei batteri. I microrganismi infettanti sono stati quindi seminati su agar in piastra, ed incubati per 3-4 giorni a 37°C. Per ogni rispettivo trattamento sono state contate le *Colony Forming Unit* (CFU), ed i valori ottenuti sono stati normalizzati ed espressi rispetto ai valori ottenuti per il controllo (Figura 2.16). I risultati mostrano che le cellule in cui è stata promossa l'espressione di TFF1 hanno livelli di colonizzazione maggiori rispetto alle cellule controllo in cui non è stata indotta l'espressione del peptide (Figura 2.16 A). Inoltre l'incubazione con rame 10 µM provoca un ulteriore aumento di colonizzazione per le cellule esprimenti TFF1, ma non provoca alcuna variazione per le cellule non esprimenti TFF1. Viceversa, in presenza di BCS 500 µM, si osserva una significativa riduzione dell'effetto della doxiciclina (Figura 2.16 B). In particolare, è evidente la riduzione dei livelli di colonizzazione rispetto a cellule indotte ma non incubate con il chelante e, anche in questo caso, non si osservano variazioni dei livelli di colonizzazione per le cellule non indotte con doxiciclina. Questi risultati mostrano chiaramente che TFF1 svolge un ruolo significativo nelle infezioni di *Helicobacter pylori*, ma soprattutto che il rame, favorendo probabilmente la formazione del dimero, è un importante modulatore dell'infezione batterica.

Al fine di ottenere ulteriori informazioni sull'influenza di TFF1 e del rame sulle infezioni di *H. pylori*, abbiamo utilizzato due mutanti isogenici del batterio: HPΔ479 e HPΔ1191. Il mutante HPΔ479 è privo del gene codificante per una D-glicero-D-manno-epitosiltransferasi, la quale è coinvolta in alcune modifiche nella regione esterna del *core* oligosaccaridico. Il secondo mutante, HPΔ1191, è privo di un gene codificante una L,D-epitosiltransferasi coinvolta nella biosintesi della regione interna della porzione oligosaccaridica. I due mutanti, in definitiva, presentano LPS tronchi di differente lunghezza. Come già descritto nell'introduzione (*par.* 1.2-4), il mutante HPΔ479 si comporta in maniera simile al ceppo *wild-type* nell'interazione con TFF1.

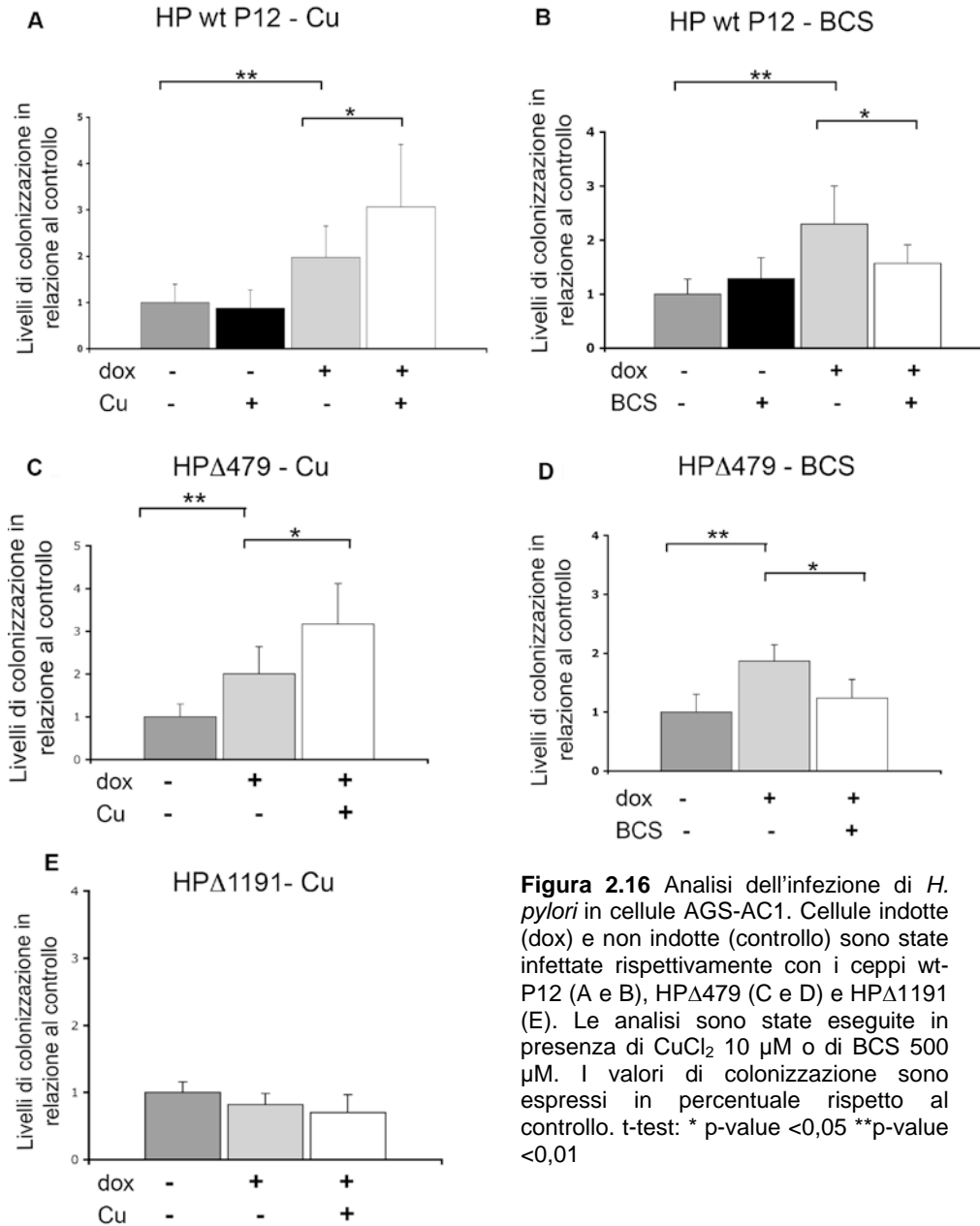


Figura 2.16 Analisi dell'infezione di *H. pylori* in cellule AGS-AC1. Cellule indotte (dox) e non indotte (controllo) sono state infettate rispettivamente con i ceppi wt-P12 (A e B), HPΔ479 (C e D) e HPΔ1191 (E). Le analisi sono state eseguite in presenza di CuCl₂ 10 μM o di BCS 500 μM. I valori di colonizzazione sono espressi in percentuale rispetto al controllo. t-test: * p-value <0,05 **p-value <0,01

Viceversa il ceppo HPΔ1191 non lega il peptide. L'uso di questi due mutanti ha consentito di indagare sulle modalità di interazione tra il cuprocomplesso TFF1-Cu e gli LPS. I risultati mostrano che per il mutante HPΔ479 si osserva un comportamento analogo al *wild-type* (Figura 2.16 C e D). L'induzione con doxiciclina provoca un aumento dei livelli di colonizzazione del batterio e l'incubazione con il rame ne aumenta ulteriormente il valore. Analogamente a quanto osservato per il ceppo *wild-*

type P12, anche per il mutante HP Δ 479 si osserva una marcata riduzione di colonizzazione in presenza di BCS. Non si riscontrano invece differenze quando le cellule sono state infettate con il ceppo HP Δ 1191 che, come è noto, è incapace di legare TFF1 (Figura 2.16 E). Questi risultati confermano i dati ottenuti sul ceppo *wild-type* e suggeriscono inoltre che anche l'incremento di infezione osservata con il rame possa essere dovuta all'interazione diretta con gli LPS della parete batterica.

2.4-2 Infezione di *Helicobacter pylori* in HT29-E12

Analogamente a quanto fatto sul clone cellulare iperesprimente TFF1 (AGS-AC1), è stato verificato il comportamento rispetto all'infezione anche in un modello cellulare in cui i livelli di proteina espressa costitutivamente sono apprezzabili. A tal fine abbiamo utilizzato il clone di cellule HT29-E12.

Studi recenti hanno mostrato la capacità di *Helicobacter pylori* di colonizzare il clone E12 e la colocalizzazione del batterio con il peptide proprio nello strato di muco prodotto dalle cellule goblet (Dolan *et al.*, dati confidenziali, in stampa).

Per la crescita del clone cellulare E12, è stato scelto un particolare tipo di piastra multi-pozzetto caratterizzata dalla presenza di un filtro in policarbonato sul quale far crescere le cellule. Dopo la semina, le cellule del clone E12 sono state mantenute in coltura per 21 giorni, in modo da ottenere una sufficiente produzione di mucine e fattori trifoglio (Gouyer *et al.*, 2001), per poi effettuare i trattamenti in condizioni di carenza e di eccesso di rame. A 24 ore dall'inizio dei trattamenti, viene eseguita l'infezione con *Helicobacter pylori* per le successive 24 ore, mantenendo le colture nello stesso mezzo di crescita. Analogamente a quanto descritto per le AGS-AC1, al termine dell'infezione le cellule vengono trattate in modo da avere il rilascio dei batteri, che vengono successivamente piastrati per 4 giorni in condizioni microaerofile a 37°C, e quindi contate le CFU. Come per i grafici precedenti, i valori ottenuti sono riportati in Figura 2.17 in percentuale relativa alle CFU delle colture di controllo.

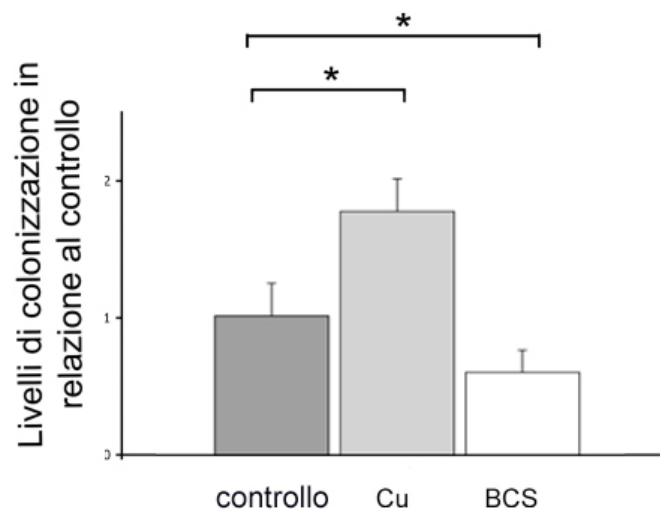


Figura 2.17 Analisi dell'infezione di *H. pylori* in cellule HT29-E12. t-test: * *p*-value <0,05

I risultati mostrano un aumento dei livelli di colonizzazione del batterio quando le infezioni vengono effettuate in presenza di rame 10 μ M. Viceversa, in presenza di

BCS 500 μM si osserva una riduzione significativa di circa il 30% rispetto al controllo. Il clone cellulare E12 è sicuramente un modello più complesso e in grado di mimare verosimilmente le condizioni fisiologiche.

Tale modello potrà essere utile per ulteriori indagini al fine di approfondire il ruolo del cuprocomplesso TFF1-Cu nei processi di adesione e colonizzazione del batterio.

2.5 Il rame e le variazioni delle proprietà del muco protettivo in cellule gastrointestinali

È noto che TFF1 è un costituente essenziale del gel mucoso dell'apparato gastrointestinale in associazione con le mucine. Una delle funzioni svolte dal peptide trifoglio è quella di influenzare le caratteristiche reologiche del muco, tramite l'associazione della sua forma omodimerica con la mucina MUC5AC (Ruchaud-Sparagano *et al.*, 2004). Considerando che il rame è in grado di promuovere l'omodimerizzazione della proteina, il nostro obiettivo è stato quello di valutare l'influenza che la variazione dei livelli di rame potrebbe avere sulla strutturazione del gel mucoso. Il muco che ricopre gli epiteli gastrointestinali è prodotto dalle cellule goblet. Tali cellule hanno una morfologia polarizzata, con il nucleo e gli organelli localizzati alla base con il resto del volume cellulare occupato da granuli secretori contenenti mucine (Figura 2.18).

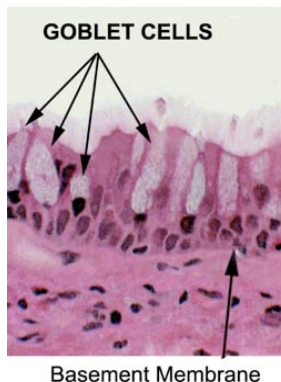


Figura 2.18 Cellule Goblet.

Il modello cellulare scelto per gli esperimenti *in vitro* è stato il clone cellulare E12. Come per gli esperimenti di infezione, anche per questa analisi le cellule sono state seminate e mantenute in coltura per 21 giorni su piastre *transwell*. Al termine dei 21 giorni le cellule sono state incubate in condizioni di eccesso e deprivazione di rame per 48 ore. In seguito, il filtro è stato prelevato ed analizzato mediante immunofluorescenza e colorazione con Alcian Blu / Neutral Red al fine di visualizzare le mucine ed il TFF1 presenti nel muco. Dalle immunofluorescenze ottenute (Figura 2.19) si osserva un'area più ampia di segnale sia per TFF1 che per la MUC5AC nei campioni incubati con rame per 48 ore.

Ancora più convincenti appaiono i risultati ottenuti mediante colorazioni con Alcian Blu / Neutral Red. Lo strato mucoso nei campioni trattati con il rame, risulta di

spessore maggiore rispetto alle sezioni controllo (non si osservano variazioni di spessore per i campioni trattati con BCS rispetto al controllo) (Figura 2.20).

Come evidenziato in precedenza, è noto che la forma dimerica di TFF1 è coinvolta nella strutturazione del gel mucoso grazie alla sua interazione con la mucina MUC5AC. La valutazione dei risultati ottenuti può quindi supportare l'ipotesi che l'aumento della forma omodimerica di TFF1, promosso dalla presenza di Cu, favorisca l'ispessimento dello strato mucoso e quindi una maggiore protezione della mucosa intestinale.

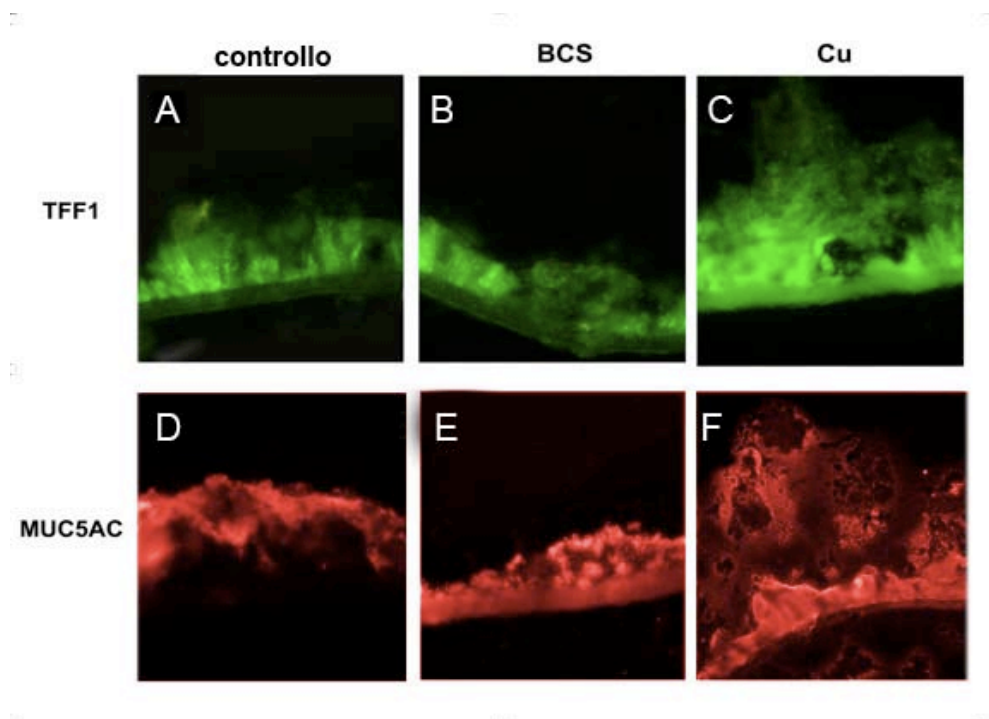


Figura 2.19 Sezioni longitudinali dai supporti *transwell* di coltura cellulare E12. Colorazione per immunofluorescenza: A, B, C= Ab anti-TFF1. D, E, F= Ab anti-MUC5AC.

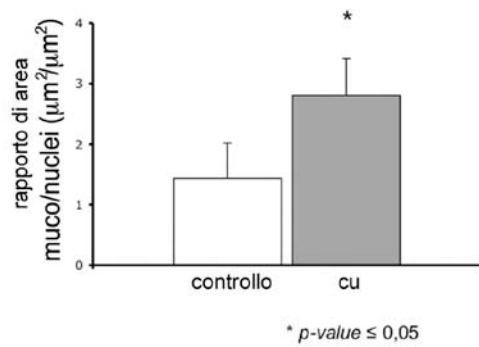
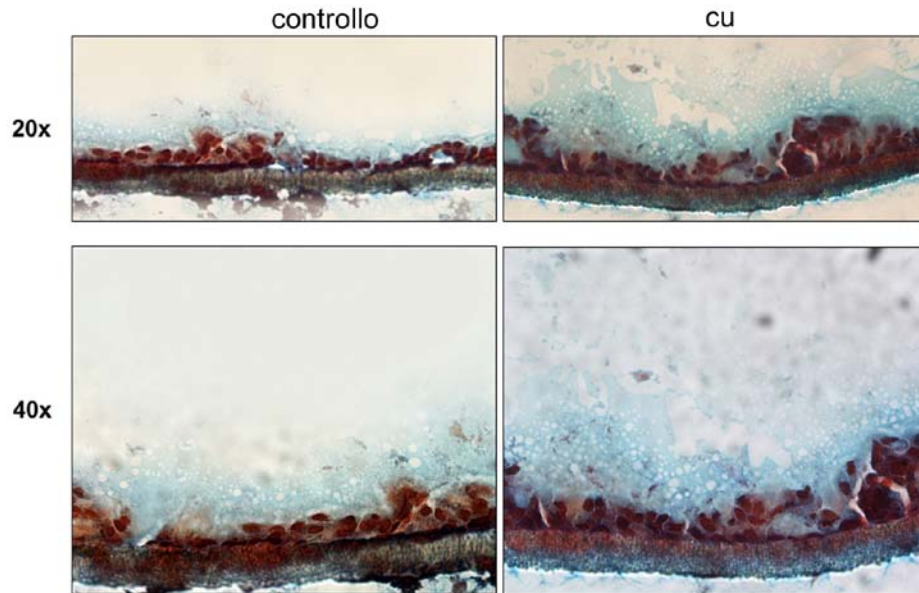


Figura 2.20 Colorazione Alcian Blu / Neutral Red. La colorazione evidenzia in blu le secrezioni mucose e in rosso lo strato di cellule goblet. Si osserva un incremento di spessore dello strato mucoso nei campioni trattati con il rame.

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.

CAPITOLO 3**DISCUSSIONE**

I risultati ottenuti in questo progetto di dottorato forniscono chiare prove a sostegno di una stretta relazione tra il rame e il fattore gastrointestinale TFF1. In condizioni fisiologiche il peptide ha un ruolo chiave nel mantenimento dell'integrità della mucosa gastrica. Esso interviene, in cooperazione con altri fattori come il fattore di crescita epatocitario HGF e il fattore di crescita epidermico EGF, nel processo della rimarginazione delle ferite, e agisce come stimolo alla migrazione cellulare nella regioni in cui si verifica un'interruzione della continuità della mucosa. Inoltre la deregolazione dell'espressione di TFF1 è strettamente collegata al ruolo di *tumor-suppressor* che gli viene attribuito nel processo carcinogenico. Recenti studi associano la perdita di TFF1 a processi infiammatori mediati da NF- κ B e quindi allo sviluppo di cancro gastrico sia nell'uomo che in modelli murini (Soutto *et al.*, 2011).

D'altra parte era già noto da tempo l'effetto del rame nella rimarginazione delle ferite e nei processi di rigenerazione degli epitelii. In particolare esso favorisce la proliferazione cellulare in corrispondenza delle lesioni ed un'accelerata guarigione accompagnata dall'aumento della espressione di VEGF (Sen *et al.*, 2002). Inoltre, è stato ampiamente dimostrato che il rame è necessario per l'angiogenesi (Ziche *et al.*, 1982) e, da diversi anni, alcuni promettenti studi su modelli animali perseguono un approccio terapeutico con chelanti del metallo al fine di limitare l'invasività della massa tumorale (Brewer *et al.*, 2000; Goodman *et al.*, 2004; Lowndes *et al.*, 2008).

Come già ampiamente illustrato il tratto gastrointestinale è la sede di principale produzione del TFF1. Tale fattore esplica nella mucosa un'azione stabilizzatrice del gel mucoso che riveste la mucosa gastrica ed intestinale, attraverso la nota associazione di TFF1 con la mucina MUC5AC (Ruchaud-Sparagano *et al.*, 2004). Oltre a svolgere un'azione lubrificante e facilitare i processi digestivi, il gel mucoso rappresenta un importante presidio di protezione della mucosa dall'ambiente acido, dall'azione proteolitica degli enzimi digestivi e da insulti di varia natura. Le mucine secrete compongono il muco e si associano tra loro covalentemente formando multimeri che a loro volta interagiscono in maniera non covalente determinando le caratteristiche reologiche del gel mucoso (Sellers *et al.*, 1988).

L'ambiente gastrico, per le sue caratteristiche chimico-fisiche come la sua marcata acidità, rappresenta un ambiente ostile ai microorganismi. Tuttavia il batterio Gram negativo *Helicobacter pylori* ha evoluto misure difensive che gli consentono di sopravvivere in tali condizioni, a colonizzare il tessuto gastrico ed a causare una serie di patologie capaci di degenerare in processi neoplastici. Il ruolo di *Helicobacter pylori*, tra i fattori che conducono all'evoluzione in cancro gastrico, è sottolineato dall'importanza assegnata ad esso dall'*International Agency for Research on Cancer* (IARC) che lo ha classificato come "carcinogeno di gruppo I". Recenti studi hanno mostrato una specifica interazione tra TFF1 ed *Helicobacter pylori* (Clyne *et al.*, 2004). In particolare la forma dimerica della proteina lega la forma a basso peso molecolare - detta forma "rugosa" - degli LPS (RF-LPS) del batterio, la quale media il legame con il peptide (Reeves *et al.*, 2008). Analisi effettuate su di un particolare clone di cellule di colon carcinoma (HT29-E12), caratterizzate dalla loro capacità di produrre uno strato stabile di muco sul monostrato cellulare polarizzato, hanno

mostrato che *H. pylori* e TFF1 colocalizzano nello strato mucoso e che la loro interazione media la colonizzazione del batterio (Dolan *et al.*, dati confidenziali, in stampa).

Nonostante in questi ultimi anni diversi studi siano stati dedicati alla caratterizzazione delle funzioni biologiche di TFF1, al suo ruolo nei processi fisiopatologici e alla interazione con *H. pylori*, non sono disponibili altri dati di letteratura che abbiano già riportato possibili correlazioni funzionali tra il fattore peptidico e il rame. Per questo motivo, le prime evidenze sperimentali da noi ottenute ci hanno stimolato e spinto ad approfondire tali aspetti con l'obiettivo di chiarire conoscenze preliminari e sommarie, e a favorire l'approfondimento di un nuovo argomento di ricerca.

Partendo dall'osservazione che *tff1* è risultato uno dei geni maggiormente indotti nell'intestino di ratti resi nutrizionalmente carenti di rame, la prima parte di questo lavoro di tesi è stata dedicata allo studio della regolazione trascrizionale. L'analisi differenziale della espressione genica mediante di *Real Time PCR* in cellule di adenocarcinoma gastrico (AGS) hanno permesso di confermare la regolazione positiva di *tff1* in condizioni di deprivazione dello ione rame, e l'analisi del promotore ha consentito di isolare una regione del promotore prossimale del gene (-583/-435) contenenti specifici elementi sensibili alle variazioni di concentrazione del metallo. Una prima caratterizzazione dei siti identificati mediante analisi di sequenza ha consentito di verificare la capacità di legame di un sito per il fattore di trascrizione SP1, la cui effettiva funzionalità attende un ulteriore approfondimento di analisi. D'altra parte, a sostegno della possibile funzionalità del sito, è noto dalla letteratura il coinvolgimento di SP1 nella regolazione trascrizionale dipendente dal rame di importanti proteine capaci di legare lo ione metallico; in particolare SP1 regola positivamente il trasportatore hCtr1 in condizioni di carenza di rame. Viceversa, in condizioni di sovraccarico di rame, SP1 modula positivamente l'espressione del gene *prnp* codificante la proteina prionica.

Altro obiettivo del lavoro svolto è stato lo studio del possibile significato funzionale correlato alle variazioni strutturali di TFF1 provocate dal legame o dalla interazione del peptide con il rame. Tale studio ci ha permesso di evidenziare un incremento della forma omodimerica del peptide in linee cellulari umane, correlato all'aumento delle sue note proprietà motogeniche. Alla forma omodimerica è infatti attribuita una marcata attività motogenica (Marchbank *et al.*, 1998) ed un importante ruolo come modulatore per la crescita di cellule tumorali gastriche (Calnan *et al.*, 1999). È inoltre riportato che in condizioni fisiologiche della mucosa gastrica, la forma prevalente di TFF1 è quella coinvolta nella formazione di un eterodimero con TFIZ1, e il disequilibrio tra la forma monomerica di TFF1 e l'eterodimero può favorire l'insorgenza di condizioni patologiche (Westley *et al.*, 2005). L'accertato coinvolgimento del rame nella strutturazione di TFF1, unitamente alla conosciuta influenza del metallo nella riparazione delle ferite e nell'angiogenesi, fornisce solidi indizi di una correlazione funzionale tra livelli di rame e le differenti forme del peptide nella complessa biologia dei tessuti epiteliali. A sostegno di tale ipotesi, gli esperimenti effettuati hanno confermato che il rame, in presenza di TFF1, produce in cellule tumorali gastriche un incremento della velocità di chiusura delle ferite che viene annullata dalla chelazione del metallo. Questo risultato suggerisce una possibile criticità della disponibilità dello ione rame per l'espletamento della funzione motogenica di TFF1 interpretabile sulla base di una probabile maggiore formazione dell'omodimero, non escludendo al contempo la non verificata possibilità di un

potenziamento della attività biologica a seguito del legame e della strutturazione del monomero intorno al metallo.

Ulteriore evidenza emersa dai risultati ottenuti ha mostrato che il sovraccario di rame induce nelle cellule una tendenza a trattenere TFF1 all'interno della cellula. D'altra parte, il dosaggio del metallo negli estratti cellulari mostra invece che la presenza di TFF1, in condizioni di carenza intracellulare di rame aumenta la velocità di ingresso del metallo, ed in condizione di sovraccarico di rame favorisce il trattenimento del metallo all'interno della cellula per tempi più lunghi. Nonostante siano necessari, nella fattispecie, ulteriori approfondimenti, non è ingiustificato ipotizzare una funzione attiva del peptide nei meccanismi di omeostasi del metallo, peraltro non ancora interamente chiariti. Infatti la capacità di legame del fattore peptidico potrebbe contribuire alla captazione del metallo in ambiente extracellulare, favorendo il trasporto all'interno della cellula a seguito di interazione con sistemi di internalizzazione. Al contrario, il trattenimento dello stesso peptide all'interno della cellula potrebbe contribuire al sequestro ed al controllo dei livelli di ioni metallici liberi, in cooperazione o in funzioni sconosciute e/o alternative a quelle note svolte dalle metallotioneine e dai *copper-chaperone*. Nonostante la attuale carenza di più solidi sostegni a tale ipotesi, le suggestioni suscitate dai dati ottenuti giustificano l'intenzione di un prossimo maggiore approfondimento di tale aspetto.

Infine, grande interesse suscitano i risultati ottenuti dalla sperimentazione su *Helicobacter pylori*, che hanno rivelato una critica relazione tra la virulenza del batterio ed i livelli del metallo in relazione alla capacità delle cellule ospite di esprimere e secernere TFF1. Tale correlazione è stata chiaramente dimostrata dalla analisi dei ceppi batterici mutanti e dalla loro rispettiva capacità invasiva legata alla espressione di lipopolisaccaridi integri coinvolti nel legame al peptide. La conferma della funzione di ancoraggio dell'omodimero del peptide e l'aumento della percentuale di cellule infettate in presenza di rame fornisce dettagli molecolari utili a comprendere i meccanismi di interazione del microorganismo con la cellula ospite e, al contempo, altrettanto utili informazioni per la elaborazione di nuove strategie farmacologiche per la eradicazione del microorganismo dall'ambiente gastrico.

Gli esperimenti di colonizzazione sul clone cellulare HT29-E12 ci hanno consentito di verificare i risultati ottenuti sulla linea cellulare gastrica anche in un modello che, sebbene non consenta di modulare l'espressione di TFF1, ha il vantaggio di riprodurre condizioni più simili alla mucosa gastrica dell'uomo. In tale linea cellulare è stato inoltre possibile evidenziare, mediante analisi di immunofluorescenza e colorazioni per le secrezioni mucose, che le cellule trattate con il rame presentano uno strato mucoso di spessore e consistenza maggiore rispetto alle cellule controllo. Il rame, quindi, promuovendo probabilmente la formazione dell'omodimero, costituente essenziale dello strato mucoso, svolge quindi un ulteriore ruolo critico nella formazione dello strato protettivo della mucosa intestinale.

Nelle fasi di colonizzazione della mucosa, il batterio, spinto dai suoi flagelli polari, avanza nel muco viscoso e aderisce alle cellule epiteliali gastriche. Solo una minima percentuale del totale della popolazione batterica aderisce all'epitelio gastrico, mentre la rimanente popolazione risiede nello strato mucoso (Hazell et al., 1986). I continui movimenti peristaltici che assicurano il movimento di residui di cibo e detriti di vario genere, ed il veloce turnover dell'epitelio gastrico e del muco, sono fattori che si contrappongono all'insediarsi del microorganismo all'interno della mucosa (Hayashi et al., 1997). È evidente, quindi, che il batterio ha dovuto adattarsi e selezionare meccanismi che gli consentono di colonizzare la mucosa gastrica

garantendo la permanenza stabile finalizzata al raggiungimento della superficie dell'epitelio. La interazione con le mucine, le molecole di adesione e i caratteristici LPS rappresentano sicuramente elementi fondamentali per una "colonizzazione di successo" (Traci *et al.*, 2001).

I risultati fin qui ottenuti aprono la possibilità di studiare nuovi aspetti della patogenesi di *Helicobacter pylori* e, in generale, dei processi infiammatori che in alcuni casi possono degenerare in sviluppi neoplastici. Ulteriori indagini saranno necessarie al fine di chiarire in che modo la concentrazione di rame modula l'azione di TFF1, influenza le proprietà chimico-fisiche e la strutturazione dello strato mucoso e interviene nei processi di adesione e colonizzazione del batterio.

CAPITOLO 4**MATERIALI E METODI****4.1 Colture cellulari**

Le linee cellulari umane utilizzate per gli esperimenti di questa tesi sono:

- linea di carcinoma mammario umano, MCF-7;
- linea di adenocarcinoma gastrico umano, AGS;
- clone AGS-AC1 con TFF1 inducibile (gentilmente fornito dalla Dr.ssa M.C. Rio, *Institute de Genetique et de Biologie Moleculaire et Cellulare* - IGBMC, Strasburgo, Francia. È una linea stabilmente trasfettata con vettore pUHD-hTFF1 di cellule di adenocarcinoma gastrico AGS);
- clone HT29-E12 (gentilmente fornito dal Dr. Per Artursson, Università di Uppsala, Svezia), linea di cellule goblet secernenti muco, selezionate con metotressato della linea di carcinoma del colon HT29.

Tutte le linee cellulari sono state mantenute in coltura in mezzo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma) supplementato con 10% di siero fetale bovino (FBS, Sigma), 2 mM L-glutamina e una miscela di antibiotici Penicillina/Streptomicina (100 U/ml Penicillina e 100µg/ml Streptomicina, Sigma). Soltanto la linea cellulare AGS è stata mantenuta in mezzo di coltura Ham's F12 (Nutrient Mixture F-12 Ham, Sigma).

Per la crescita del clone AC1 è stato utilizzato un supplemento di Neomicina 600 µg/µl. L'espressione di TFF1 è stata indotta con l'aggiunta di Doxyciclina alla concentrazione di 1 ng/µl nel mezzo di crescita.

Per il clone HT29-E12 sono stati aggiunti al mezzo di crescita 1% (vol/vol) amminoacidi non essenziali (Sigma) e 125 µg/ml Amphotericin B (Sigma). Le cellule, sono state seminate ad una concentrazione di 1×10^5 su filtri *Transwell* (Millipore, 12 mm diametro e porosità 0,4 µm). Il mezzo di crescita è stato sostituito ogni due giorni e le cellule sono state analizzate dopo 21 giorni dalla semina.

4.2 Saggi di vitalità cellulare con MTT

Per realizzare uno stato di deprivazione di rame è stato aggiunto al mezzo di coltura il suo chelante specifico, la Batocuproina, in concentrazione di 100 e 500 µM.

Per verificare che le concentrazioni della Batocuproina utilizzate, fossero compatibili con la vitalità cellulare, abbiamo eseguito un saggio con MTT (bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazolo-2-il)-2,5-difeniltetrazolio).

L'MTT è un sale di tetrazolio di colore giallo che viene ridotto ad un sale di formazano di colore viola e insolubile in acqua, dalla deidrogenasi mitocondriale delle cellule vitali.

Le linee cellulari MCF-7 ed AGS-AC1 sono state piastrate ad una densità di 5000 cellule/pozzetto in multiwell da 96. Alcuni pozzetti sono rimasti senza alcun trattamento, come controllo, altri sono stati incubati con Batocuproina Solfato (Sigma) ad una concentrazione di 500 µM. Ciascun trattamento è stato effettuato in quadruplicato per 24 e 48 ore.

Al termine dei trattamenti sono stati somministrati 10 μ l di MTT (5 mg/ml) in 100 μ l di mezzo di coltura per pozzetto, mantenendo per 1 ora le piastre in incubatore a 37°C. Il mezzo è stato quindi prelevato e sono stati aggiunti 100 μ l di DMSO ad ogni pozzetto. Dopo completa dissoluzione dei cristalli di formazano, sono state effettuate letture spettrofotometriche a 550 nm e sottratte con quelle ottenute a 620 nm. Infine, calcolando il rapporto tra OD di cellule trattate e non trattate, si ottiene la percentuale di vitalità

4.3 Real-Time PCR

L'RNA è stato estratto e purificato da cellule di adenocarcinoma gastrico AGS e purificato mediante l'utilizzo di TriZol Reagent (*Invitrogen*). Successivamente è stato trascritto in cDNA usando il kit SuperScript™ II Reverse Transcriptase (*Invitrogen*). La real-time PCR è stata preparata con DNA Master plus SYBR Green I (Roche) ed eseguita in Real Time PCR Light Cycler 480 Roche System © (Roche). Piastre di colture cellulari subconfluenti sono state trattate per 24 e 48 ore con l'agente chelante Batocuproina (BCS) 100 μ M or 500 μ M e comparate con cellule non trattate. Specifici oligonucleotidi sono stati disegnati per il gene *tff1*. Come gene di riferimento (*housekeeping*) è stato utilizzato il gene dell'rRNA 18S.

Sequenze degli oligo utilizzati:

Fw *tff1*: 5'-GGACGTCGATGGTATTAGGATA-3';

Rev *tff1*: 5'-AGGAGGTAATGG-CCACCATGGA-3';

Fw 18s: 5'-ACAGGTCTGTGATGCC-3';

Rev 18s: 5'-ATCGGTAGTAGCGACG-3'.

Analisi dati: I livelli di induzione sono stati determinati con il metodo. Brevemente, l'espressione relativa (Δ Ct) si calcola come differenza tra il Ct del gene target e quello dell'*housekeepin* (18S rRNA). Quindi si sceglie un campione calibratore che consente il confronto dell'espressione genica tra gli altri campioni. Si calcola poi il $\Delta\Delta$ Ct come la differenza tra il Δ Ct di ogni campione e quello del calibratore. I livelli di espressione dei campioni vengono espressi come $2^{-\Delta\Delta Ct}$, valore definito "fold induction", che valuta l'incremento rispetto al campione scelto come calibratore. *Analisi statistica*: La significatività dei differenti livelli di espressione è stata misurata utilizzando il test statistico Student's t-test.

4.4 Costruzione dei plasmidi

Mediante amplificazione del promotore di *tff1* e successivo clonaggio nel plasmide pGL3-basic (*Promega*), sono stati prodotti costrutti plasmidici per effettuare saggi di Luciferasi. Le sequenze del promotore di *tff1* di circa 1 kb (-973 bp/-17 bp) e 2 kb (-2003 bp/-17 bp) sono state amplificate mediante PCR su DNA genomico estratto da cellule di carcinoma mammario MCF-7.

Sequenze degli oligonucleotidi

Fw 1 kb 5'-GGCATGGTACAGGAGAGCAGGAG-3';

Fw 2 kb 5'-CAGGGACTTGAGCATTGTGGAT-3';

Rev 5'-AGAGCCTGCCCTATAAAATCCGG-3'.

Il prodotto ottenuto per PCR è stato subclonato in pGEM-T easy vector system (*Promega*). Usando il DNA clonato come stampo, frammenti di 1kb e 2kb sono stati amplificati con oligo contenenti siti di riconoscimento a enzimi di restrizione al fine di

facilitare il successivo clonaggio.

Sequenze primers

Fw 1 kb Xho I 5'-GTGgcgcacGAGTCCAGGGGACCAAC-3';

Fw 2kb Xho I 5'-GTGGCGCTCGAGAGGATGcacgtgGT-3';

Rev Hind III 5'-GCCTGCCCTATAAAATCCGgaagcttGCGGCC-3'

In carattere minuscolo sono riportate le sequenze di riconoscimento per gli enzimi di restrizione XhoI e HindIII). I prodotti di PCR ottenuti sono stati digeriti con gli appropriati enzimi di restrizione (Xho I and Hind III), purificati da gel di agarosio e clonati a monte del gene reporter della Luciferasi nel plasmide pGL3 Luciferase Report Vectors (*Promega*) (pGL3-1kb-Luc; pGL3-2kb-Luc).

Per l'ottenimento di costrutti di delezione di dimensioni inferiori ad 1 Kb, sono state effettuate idrolisi enzimatiche con DNasi Bal31. Il vettore, contenente il frammento di circa 1 kb, è stato linearizzato a monte della sequenza inserita e successivamente digerito con Bal31 (0,02 unità/μg) per 12, 15, 18 e 25 minuti a 30°C. I plasmidi ottenuti sono stati clonati e successivamente analizzati sia per restrizione che per sequenza al fine di verificare la lunghezza delle delezioni. Sono stati così ottenuti i costrutti di delezione di 216- (pGL3-0,2kb-Luc), 435- (pGL3-0,4kb-Luc) e 583 bp (pGL3-0,5kb-Luc).

4.5 Saggi di Luciferasi

Gli esperimenti di trasfezione transiente sono stati effettuati su cellule di adenocarcinoma gastrico, AGS, coltivate su multiwell da 24 pozzetti (12 mm di diametro). Le cellule sono state piastrate ad una confluenza pari al 70-80%, e trasfettate, dopo 24 ore dalla semina, con il reagente Transfectin Reagent (Bio-Rad). Le trasfezioni sono state effettuate con una soluzione di 100 μl di mezzo privo di siero con 0,2 μg dei rispettivi costrutti pGL3, 0,1 μg del plasmide contenente la β-galattosidasi e 0,3 μl di *Transfectin Reagent*.

Sei ore dopo la trasfezione, il mezzo è stato cambiato e le cellule incubate in presenza o assenza di BCS 500 μM. Dopo 48 ore dalla trasfezione, le cellule sono state lavate con PBS e lisate. L'attività della Luciferasi è stata misurata usando il Luciferase / beta-Galactosidase Luciferase Assay Kit, Dual-Light (Applied Biosystems). In ogni serie di esperimenti, le cellule controllo sono state trasfettate con il plasmide controllo pGL3-Promoter Vector, contenente il promotore *SV40* a monte del gene reporter della Luciferasi. L'analisi è stata eseguita in quadruplicato e i risultati sono stati riportati come rapporto tra l'attività *firefly luciferase* e *beta-galactosidase* (attività trascrizionale relativa). L'emissione di luce è stata misurata con Lumat LB9501 luminometer (Berthold, Wilbdab, Germany).

4.6 Analisi elettroforetica dello spostamento di mobilità (EMSA)

Annealing Primers: Uguali quantità dei due oligo complementari (20 μl di primers 100 μM) sono state miscelate in un buffer di ibridazione (Annealing Buffer: 100 mM Tris pH7.5, 500 mM NaCl, 10 mM EDTA) e incubate in un bagno di acqua a 90 - 95°C per 5 minuti. Successivamente la soluzione è stata fatta raffreddare lentamente a temperatura ambiente.

Marcatore dei Primers: 2 pmol della sonda oligonucleotidica sono state marcate

con 20 U di T4 polynucleotide kinase (Roche, Polynucleotide Kinase) usando 5 μ l [γ -³²P]ATP (Perkin Elmer, NEG502A250UC) in un volume di 20 μ l. La mix è stata incubata a 37°C per 30 minuti. Gli oligo marcati sono stati successivamente purificati per *gel filtration* con le colonnine MicroSpin G-25 Columns (GE Healthcare).

Reazione EMSA: 10 μ g di proteine nucleari sono state incubate con 0,02–0,04 pmol di sonda (10,000 c.p.m.) per 20 min a temperatura ambiente in 20 μ l di 12 mM HEPES (pH 7,9), 60 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 4 mM Tris pH 7,5, 0,08 mM DTT, 10% glycerol, 0,1 μ g/ μ l poly dl-dC, 100 μ g/ml BSA. Per gli esperimenti di competizione, la miscela di reazione è stata precedentemente incubata per 15 minuti con eccesso molare 10-, 100-, 500-volte di oligonucleotidi non marcati prima dell'aggiunta della sonda marcata.

Preparazione di proteine nucleari: I pellet cellulari (10⁶) sono stati risospesi in 100 μ l di buffer di lisi (10 mM HEPES pH 7.9, 1 mM EDTA pH 8,0, 60 mM KCl, 0,2% NP-40, 1mM DTT, 2mM PMSF, 1X protease cocktail inhibitor). Successivamente incubati in ghiaccio per 10 minuti, centrifugati a 450 g per 5 min a 4°C, rimosso il surnatante e aggiunto al pellet un volume di 100 μ l di buffer di lavaggio (stessa composizione del buffer di Lisi ma senza N-P40). I lavaggi sono stati ripetuti tre volte. I campioni sono stati centrifugati a 450 g per 5 min a 4°C and i pellet nucleari risospesi in 50 μ l di Buffer di lisi nucleare (250 mM Tris HCl pH 7,8, 60 mM KCl, 1 mM DTT, 2 mM PMSF, 20% glicerolo). I nuclei sono stati lisati con tre cicli termici di gelo-scongelo in ghiaccio secco e a 37°C. I campioni sono stati centrifugati a 9500 g for 15 min a 4°C. Infine i surnatanti sono stati aliquotati e conservati a -80°C.

Sequenze Oligonucleotidiche:

SP1 tff1 5'-CTGACTTTAAGTGATCCGCCTGCTTTGGCC-3';

SP1 tff1 Mut 5'-CTGACTTTAAGTGATTTTCCTGCTTTGGCC-3';

Scrambled tff1 5'-TTTGGCCT-CCCAAAGTGTGGGATTACAGG-3';

SP1 sequenza canonica 5'-TCGAGTTCCCGCCCTC-TTGGAGCC-3';

Scrambled SP1 5'-CGACGTGCTGCACCTGGAGCACAG-3'.

4.7 Analisi della proteina secreta nel supernatante e in lisati cellulari

Per l'analisi sulla secrezione di TFF1, il clone cellulare AGS-AC1 è stato propagato come descritto nel paragrafo 4.1 e piastrato in multiwell da 12 pozzetti (24 mm di diametro) ad una densità di 35.000 cellule per pozzetto in un mezzo di crescita privo di siero. Raggiunta la subconfluenza è stata indotta l'espressione di TFF1 doxyciclina 1 ng/ml. Nei pozzetti delle colture di controllo non è stata aggiunta la doxyciclina, altri sono stati trattati con CuCl₂ 10 μ M e 100 μ M. Ciascun trattamento è stato effettuato in triplicato e i supernatanti sono stati prelevati dopo 24, 48 e 72 ore dall'induzione con doxyciclina. Al termine dei trattamenti, i supernatanti sono stati raccolti e centrifugati a 10.000 g per 15 minuti. Un volume di 20 μ l è stato utilizzato per le successive analisi di *Western blot*.

Per l'analisi effettuata sui supernatanti di colture cellulari di MCF-7 e HT29-E12, le cellule sono state mantenute come descritto nel paragrafo 4.1. Le Cellule MCF-7 sono state incubate con mezzo privo di siero e trattate con CuCl₂ 100 μ M. Le Cellule HT29-E12 sono state mantenute in coltura per 9 giorni di post-confluenza e successivamente incubate con mezzo privo di siero e trattate con CuCl₂ 100 μ M. Dopo 48 ore di trattamenti, i supernatanti sono stati raccolti e chiarificati mediante centrifugazione a 10.000 g per 30 secondi al fine di rimuovere residui cellulari. Le

Proteine in 100 μ l di surnatante sono state precipitate con 9 volumi di acetone.

Per l'analisi dei lisati cellulari, le cellule sono state staccate dalla piastra con Tripsina-EDTA (200 mg/L EDTA; 500 mg/L Tripsina) e raccolte con DMEM. Dopo il lavaggio del pellet con PBS. I pellet cellulari sono stati risospesi in quattro volumi di soluzione di lisi (PBS; IGEPAL 0,1% vol/vol). Dopo incubazione in ghiaccio per 30 minuti le proteine intracellulari sono state recuperate dopo centrifugazione a 10.000 g per 10 minuti. La concentrazione proteica dei campioni è stata ottenuta determinata con metodo Bradford (Bio Rad).

4.8 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 bromo fenolo; 10% (v/v) glicerolo) e, quando richiesto, è stato aggiunto l'agente riducente β -mercaptoetanol. I campioni sono stati poi incubati a 100°C per 5 minuti, centrifugati a 10.000g per 30 secondi e caricati su gel di poliacrilammide SDS-PAGE. La corsa elettroforetica è stata eseguita in Tris-Glicina-SDS (TGS 1x *BioRad Laboratories*) ad una intensità di corrente costante pari a 30 mA per un gel di 6x8 cm e spessore 1,5 cm. Al termine della corsa, è stato eseguito l'elettrotrasferimento su membrana di nitrocellulosa *Hybond-ECL* (*Amersham Biosciences*) in tampone TGS 20% v/v metanolo a 75V costanti per 1 ora. La membrana dopo la fase di *blocking* (10% p/v di latte, *BioRad*), è stata lavata con TBS 1x (NaCl 150 mM; KCl 3 mM; Tris HCl 25 mM pH 8,0)/ 0,1% v/v TWEEN 20 e incubata per tutta la notte a 4°C in una soluzione al 10% p/v di latte a cui è stato aggiunto l'anticorpo primario Gsp Ab TFF1 diluito 1:1000. Il giorno successivo la membrana è stata lavata con PBS 0,1% v/v TWEEN 20 e successivamente incubata per 1 ora a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario Donkey anti-Rabbit (*Jackson*) coniugato con l'enzima perossidasi diluito 1:5000 dalla soluzione madre in commercio. Dopo ulteriori tre lavaggi, la membrana è stata immersa in 3 ml di soluzione di sviluppo composto da volumi uguali di Soluzione A (250 mM Luminolo; 90 mM Acido para-cumarico; 10 mM Tris-Cl pH 8,0) e di soluzione B (100 mM Tris Cl pH-8,5; 0,03% perossido di idrogeno) per 3 minuti. I segnali sono stati quindi rivelati esponendo una lastra autoradiografica a contatto con il filtro di nitrocellulosa (*High Performance Chemiluminescence Film, Amersham Biosciences*). Le misure densitometriche delle lastre fotografiche, sono state eseguite utilizzando la videocamera Gel-Doc 2000 ed il relativo programma di analisi densitometrica *Quantity One* (*BioRad Laboratories*).

4.9 Analisi di assorbimento atomico in tessuti di topi *knock-out tff1 -/-*

I campioni di tessuti (fegato, stomaco e intestino) sono stati disidratati in stufa a 75 °C, fino a peso costante, e sono stati pesati in tubi di teflon all'interno dei quali sono stati aggiunti 3 ml di acido nitrico 65%. Il processo di mineralizzazione è avvenuto in un forno a microonde (Milestone – Microwave laboratory sistem, Ethos touch control) con cicli di temperature e pressioni variabili (1' 250 watt; 1' 0; 5' 250; 4' 400; 4' 600; 5' 600; fase di ventilazione). Al termine della mineralizzazione i campioni sono stati portati ad un volume finale di 10 ml con acqua distillata. L'analisi quantitativa per il rame è stata effettuata mediante spettrometria ad assorbimento atomico (AAAnalyst

100, PerkinElmer, Wellesley, MA, USA), con atomizzazione in fornetto di grafite (AS 800, PerkinElmer).

4.10 Analisi di assorbimento atomico su cellule AGS-AC1

Per la misurazione delle concentrazioni di rame intracellulare, le cellule AGS-AC1 sono state piastrate ad una confluenza di circa il 70%, e a 24 ore dalla semina sono state lavate con PBS ed incubate per 24 ore con mezzo privo di siero (concentrazione di rame non rilevabile) in presenza o assenza di doxiciclina 1 ng/ml. Dopo incubazione, cellule indotte e non indotte sono state trattate con 10 μM CuCl_2 per 0, 20, 80 and 320 minuti. Al termine dei trattamenti i campioni sono stati raccolti con una soluzione salina (20 mM Na_3PO_4 , 10 mM NaCl) e lisati mediante sonicazione (*Sonics Vibra-Cell*; protocollo sonicazione: ampiezza delle vibrazioni 35%; 6 impulsi di durata 9,9 secondi; intervallati da 9,9 secondi). La concentrazione proteica dei lisati è stata determinata mediante metodica *Bradford*. La quantità di rame nei lisati cellulari è stata determinata con apparecchiatura *Analyst 100* (PerkinElmer, Wellesley, MA, USA), equipaggiato con un *AS 800 graphite atomizer apparatus* (PerkinElmer), e normalizzata rispetto le proteine totali.

Negli esperimenti di valutazione dell'efflusso del metallo il protocollo sperimentale è stato modificato. In particolare le cellule sono state incubate per 24 ore con 10 μM CuCl_2 in mezzo privo di siero. Al termine del trattamento, cellule indotte e non indotte sono state lavate con PBS e trattate con BCS 500 μM per 0-, 20-, 80-, 140-, 300- e 600 minuti. Al termine dei trattamenti la quantità di rame nei lisati cellulari è stata determinata come descritto in precedenza.

4.11 Saggi di migrazione cellulare (*wound healing assay*)

Il clone cellulare AGS-AC1 è stato seminato in una multiwell da 12 pozzetti (24 mm di diametro) (3×10^5 cellule per pozzetto). Dopo 12 ore dalla semina è stata indotta l'espressione di TFF1 in 6 pozzetti con 1 ng/ml di doxiciclina. Dopo 12 ore, tre pozzetti indotti e tre non indotti sono stati incubati con Batocuproina 500 μM (BCS, Sigma). Colture non trattate sono state utilizzate come controllo. Dopo 24 ore dal trattamento è stato prodotto un solco (*wound*) nel centro del monostrato cellulare con un puntale di plastica da 200 μl sterile. Le cellule sono state quindi incubate a 37°C nell'incubatore per piastre umidificato ed equilibrato [5% (v/v) CO_2] della stazione di video-microscopia "*Integrated Live Cell Workstation Leica AF6000 LX*". Le immagini sono state acquisite con un obiettivo a contrasto di fase 10x con la frequenza di una foto ogni 20 minuti. La velocità di migrazione del fronte cellulare è stata determinata facendo riferimento alle distanze tra i bordi delimitanti il solco (le misure sono state effettuate utilizzando la barra di misurazione del software Leica ASF). Per ogni *wound* le analisi sono state effettuate su tre differenti campi. Per ogni campo sono state raccolte 5 differenti misure tra i fronti cellulari.

4.12 Ceppi batterici e condizioni di crescita

Il ceppo P12 di *H pylori* è stato isolato da pazienti con ulcere duodenali ed è stato già descritto in letteratura (Moese *et al.*, 2004; Selbach *et al.*, 2002). Le cellule sono state seminate su piastre di Columbia Agar (Oxoid) contenente 7% (vol/vol) di

sangue di cavallo defibrinato. I mutanti isogenici di *H. pylori* sono stati mantenuti in terreno selettivo con kanamicina solfato 10 µg/ml (Fluka). Tutti i ceppi sono stati cresciuti a 37°C in alcuni contenitori (Oxoid; BBL) in cui è stato possibile generare condizioni microaerofile attraverso l'utilizzo di *CampyGen gas packs* (Oxoid).

Il ceppo *wild type* P12 (P12) e i mutanti isogenici P12ΔHP479 e P12ΔHP1191 sono stati gentilmente forniti Dr Marguerite Clyne, School of Medicine & Medical Science, University College Dublin, e descritti in Dolan *et al.* (in stampa, dati confidenziali).

4.13 Saggi di vitalità per *Helicobacter pylori*

100 µl di una sospensione batterica OD_{600nm}=1, è stata incubata per due ore in aliquote di 500 µl di mezzo di coltura rispettivamente trattato con: a) Cu 10 µM, b) BCS 500 µM, c) Doxyciclina 1ng/µl, d) Doxyciclina 1 ng/µl, Cu 10 µM, e) Doxyciclina 1ng/µl, BCS 500 µM. L'effetto dei rispetti trattamenti sulla vitalità batterica è stato valutato mediante conta delle colonie. Al termine delle due ore i batteri sono stati opportunamente diluiti e piastrati come descritto nel paragrafo 4.12.

4.14 Infezioni di *H. pylori* in colture cellulari

Le sospensioni batteriche di *H. pylori* P12 utilizzate per le infezioni sono state ottenute da colture su piastre contenenti Columbia Agar (*Oxoid*) e 7% (vol/vol) di sangue di cavallo defibrinato (*TSC biosciences LTD*) a 48 ore dalla semina. Le colonie batteriche vengono quindi riospese dalla piastra in 2 ml di mezzo RPMI-1640 (Sigma). Nelle analisi di immunofluorescenza e di colonizzazione sul clone AGS-AC1 sono state utilizzate rispettivamente 100 µl e 50 µl di una sospensione batterica OD_{600nm}=1. Per il clone HT29-E12 sono stati utilizzati 50 µl di sospensione batterica OD_{600nm}=0,4.

4.15 Immunofluorescenze su AGS-AC1

Le cellule AGS-AC1 sono state piastrate (2x10⁵ cellule/pozzetto) in *multiwell* da 6 pozzetti e portate ad una confluenza di circa 60%. L'induzione dell'espressione di TFF1 e le infezioni con *H. pylori* sono state effettuate rispettivamente 24 e 48 ore dalla semina. Le cellule sono state infettate con 50 µl di soluzione batterica OD_{600nm}=1 per 5 ore a 37°C in condizioni microaerofile. Al termine dell'infezione le colture cellulari sono state lavate tre volte con PBS, fissate con formaldeide al 2% per 10 minuti e permeabilizzate con 0,2% (wt/vol) saponina (Sigma) in PBS per 10 minuti. Le cellule sono state poi incubate per 1 ora in 1% (wt/vol) *Bovine Serum Albumin* (BSA; Sigma) e 10% (vol/vol) *goat-serum* in PBS. Al termine della fase di *blocking*, sono state incubate per due ore a temperatura ambiente con l'anticorpo primario contro TFF1 (Westley, Griffin, and May 2005) in 1% BSA 0,2% saponina, lavate con PBS ed incubate con l'anticorpo secondario (coniugato a *Alexafluor 488*, *Invitrogen*) per 1 ora. Dopo lavaggio con PBS, le cellule sono state incubate con l'anticorpo primario contro *H. pylori*, Lewis b blood group antigen (SPM194, Santa Cruz) per un ora ed incubate con l'anticorpo secondario (*anti-rabbit* coniugato a *Alexafluor 594*, *Invitrogen*). La seconda incubazione con anticorpo secondario è stata effettuata in

presenza di DAPI (*Invitrogen*) per la dei nuclei. Infine, i vetrini sono stati montati usando *Fluorescent Mounting Medium* (Dako) ed analizzati con un microscopio a fluorescenza.

4.16 Analisi di CagA fosforilato in cellule infettate da *Helicobacter pylori*

Le cellule AGS-AC1 sono state piastrate ed infettate con *H. pylori* come descritto nel paragrafo 4.15. Al termine delle infezioni le cellule sono state lisate in 100 μ l di una soluzione 1% Triton X-100, 2 mM Sodio Ortovanadato (*Sigma-Aldrich*) e cocktail di inibitori delle proteasi (*Sigma-Aldrich*) in PBS. Al termine della lisi è stata determinata la concentrazione proteica e i campioni sono stati analizzati per SDS-PAGE come descritto nel paragrafo 4.8. Sullo stesso gel sono stati analizzati lisati batterici e lisati di cellule AGS-AC1 infettate e non infettate con il batterio. I campioni sono stati elettrotrasferiti su membrana PVDF ed ibridati con anticorpo anti-CagA e anti-fosfotirosina come descritto nel paragrafo 4.8.

4.17 Esperimenti di colonizzazione su AGS-AC1

Le cellule AGS-AC1 sono state seminate (1×10^5 cellule/pozzetto) in *multiwell* da 24 pozzetti e portate ad una confluenza di circa 60%. L'espressione di TFF1 è stata indotta con doxiciclina 1 ng/ml a 24 ore dopo la semina. Induzione e trattamenti con il rame CuCl_2 10 μ M e il chelante BCS 500 μ M, con sono stati effettuati in 500 μ l di mezzo RPMI-1640 supplementato con FBS 10%. Le infezioni sono state effettuate con 50 μ l di soluzione batterica $\text{OD}_{600\text{nm}}=1$ per pozzetto. Le cellule infettate sono state incubate per due ore a 37°C in condizioni microaerofile e successivamente lavate con 500 μ l di PBS sterile.

Per raccogliere i batteri infettanti le cellule gastriche, le cellule sono state lavate in 100 μ l di saponina 0,1 % in PBS per pozzetto e incubate ulteriormente per 15 minuti a 37°C. Di ogni lisato sono state preparate 4 diluzioni seriali per ogni pozzetto che sono state quindi piastrate su agar. Le colonie sono state contate 3-4 giorni dopo la semina. L'analisi dati è stata effettuata contando il numero di CFU ottenute per ogni trattamento e comparandolo con le colture di controllo. Ogni analisi è stata eseguita in triplicato e ripetuta almeno per tre volte in modo indipendente.

4.18 Esperimenti di colonizzazione su HT29-E12

Le cellule HT29-E12 sono state seminate (1×10^5 cellule/pozzetto) su piastre Transwell (*Millipore*, 12 mm diametro e porosità 0,4 μ m) e tenute in coltura per 21 giorni come descritto nel paragrafo 4.1. Le cellule sono state quindi trattate con CuCl_2 10 μ M o BCS 500 μ M per 24 ore. Al termine delle 24 ore di trattamento il mezzo è stato sostituito con 100 μ l di BHI (*Brain Heart Infusion, Oxoid*) pH 5,0 (con i rispettivi trattamenti - CuCl_2 10 μ M o BCS 500 μ M) e le cellule sono state infettate per 24 ore con 50 μ l di sospensione batterica $\text{OD}_{600\text{nm}}=0,4$. Le cellule non trattate state utilizzate come controllo.

Al termine delle infezioni, le cellule sono state raccolte dopo incubazione a 37°C per 15 minuti con Tripsina/EDTA. Diluizioni seriali delle cellule raccolte in tripsina sono state seminate in piastre *Columbia blood agar* ed incubate a 37°C in condizioni

microaerofile. Le colonie sono state poi contate dopo 4-5 giorni. L'analisi dati è stata eseguita come precedentemente descritto nel paragrafo 4.14.

4.19 Preparazione di cellule HT29-E12 per la microscopia

Cellule HT29-E12 sono state seminate e cresciute come descritto nel paragrafo precedente. Dopo 21 giorni di crescita, le cellule sono state trattate per 48 ore con CuCl_2 10 μM o BCS 500 μM . Al termine dei trattamenti le cellule sono state delicatamente lavate con PBS sterile, ed il filtro è stato rimosso dal supporto di plastica delle *Transwell*. Il filtro è stato poi inserito tra due sezioni di fegato di pollo congelate. Il *sandwich* è stato poi montato in *Optical Cutting Temperature (OCT)* come descritto da Keely *et al.*, (Keely *et al.*, 2008). I filtri, inclusi in OCT e conservati a -20°C , sono stati tagliati (spessore 16 μm) con un criostato (Leica) e le sezioni trasversali sono state montate e conservate su vetrini polilisinati a -20°C .

4.20 Immunofluorescenze su HT29-E12

Le sezioni ottenute come precedentemten descritto al paragrafo 4.19, sono state fissate su vetrini con 2% formaldeide per 10 minuti e permeabilizzati con 0,2% (wt/vol) saponina (Sigma) in PBS per 10 minuti. Le preparazioni sono state quindi incubate per 1 ora in 1% (wt/vol) *Bovine Serum Albumin* (BSA; Sigma) e 10% (vol/vol) *Goat-serum* in PBS. Al termine sono state quindi incubate per una notte con anticorpi anti-TFF1 (Westley, Griffin, and May 2005) o anti-MUC5AC C-terminus (45M1, Sigma), a 4°C in atmosfera umidificata. Dopo lavaggio con PBS i vetrini sono stati incubati con anticorpi rispettivamente *anti-mouse* o *anti-rabbit* coniugati ad Alexafluor 488 (Invitrogen). La soluzione degli anticorpi secondari include anche DAPI 100ng/ml (Invitrogen) per la colorazione dei nuclei. Vetrini coprioggetto sono stati poi montati usando *Fluorescent Mounting Medium (Dako)*.

4.21 Colorazione Alcian Blu / Neutral Red

Per l'analisi delle secrezioni mucose, le sezioni delle colture cellulari HT29-E12 ottenute come precedentemente descritto al paragrafo 4.19, sono state colorate con Alcian Blu / Neutral Red. Le sezioni sono state incubate 5 minuti a temperatura ambiente con Alcian Blu (0,5% Alcian Blue 8GX, 3% acido acetic;) lavate per 5 minuti con acqua corrente, trattate per 30 secondi con Neutral Red (3,3 g/L in DPBS, Sigma) quindi lavate ulteriormente e montate con vetrini coprioggetto.

BIBLIOGRAFIA

Al-azzeah 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.

Al-azzeah E, Dittrich O, Vervoorts J, Blin N, Gött P, Lüscher B. Gastroprotective peptide trefoil factor family 2 gene is activated by upstream stimulating factor but not by c-Myc in gastrointestinal cancer cells. *Gut* (2002) 51(5):685-90.

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.

Appelmek BJ, Vandenbroucke-Grauls, Christina MJE. *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. Chapter 35 - Lipopolysaccharide Lewis Antigens. ASM Press; (2001) ISBN-10: 1-55581-213-9.

Atherton JC, Peek RM Jr, Tham KT, Cover TL, Blaser MJ. Clinical and pathological importance of heterogeneity in *vacA*, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* (1997) 112(1):92-9.

Backert S and Selbach M. Role of type secretion in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Cellular Microbiology* (2008) 10(8):1573-1581.

Baus-Loncar M and Giraud A. Multiple regulatory pathways for trefoil factor (TFF) genes *Cell Mol Life Sci* (2005) 62:2921–2931.

Beck S, Sommer P, dos Santos Silva E, Blin N, Gött P. Hepatocyte nuclear factor 3 (winged helix domain) activates trefoil factor gene TFF1 through a binding motif adjacent to the TATAA box DNA. *Cell Biol* (1999) 18(2):157-64.

Behrens I, Stenberg P, Artursson P, and Kissel T. Transport of lipophilic drug molecules in a new mucus-secreting cell culture model based on HT29-MTX cells. *Pharm Res* (2001) 18(8):1138-45.

Bellingham SA, Coleman LA, Masters CL, Camakaris J, Hill AF. Regulation of prion gene expression by transcription factors SP1 and metal transcription factor-1. *J Biol Chem* (2009) 284(2):1291-301.

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.

Boncrisiano M, Paccani SR, Barone S, Ulivieri C, Patrussi L, Ilver D, Amedei A, D'Elios MM, Telford JL, Baldari CT. The *Helicobacter pylori* vacuolating toxin inhibits T cell activation by two independent mechanisms. *J Exp Med* (2003) 198:

1887–1897.

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.

Bovenkamp H, Van de J H, Korteland-Van Male AM, Buller HA, Einerhand AW, and Dekker J. Infection with *Helicobacter pylori* affects all major secretory cell populations in the human antrum. *Dig Dis Sci* (2005) 50(6):1078-86.

Brandt S, Kwok T, Hartig R, Konig W, and Backert S. NF- κ B activation and potentiation of proinflammatory responses by the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Proc Natl Acad Sci USA* (2005) 102(26):9300-5.

Brewer GJ, Dick RD, Grover DK, LeClaire V, Tseng M, Wicha M, Pienta K, Redman BG, Jahan T, Sondak VK, Strawderman M, LeCarpentier G, Merajver SD. Treatment of metastatic cancer with tetrathiomolybdate, an anticopper, antiangiogenic agent: Phase I study. *Clin Cancer Res* (2000) 6(1):1-10.

Brown DR, Qin K, Herms JW, Madlung A, Manson J, Strome R, Fraser PE, Kruck T, von Bohlen A, Schulz-Schaeffer W, Giese A, Westaway D, Kretzschmar H. The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* (1997) 390(6661):684-7.

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.

Bulitta CJ, Fleming JV, Raychowdhury R, Taupin D, Rosenberg I and Wang TC. Autoinduction of the trefoil factor 2 (TFF2) promoter requires an upstream cis-acting element. *Biochem Biophys Res Commun* (2002) 293(1):366-74.

Bull PC, Thomas GR, Rommens JM, Forbes JR, Cox DW. The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene. *Nat Genet* (1993) 5(4):327-37.

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.

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* (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.

Chenard MP, Tomasetto C, Bellocq JP, Rio MC. Urinary pS2/ TFF1 levels in the management of hormonodependent breast carcinomas. *Peptides* (2004) 25(6) 737-743.

Chu D, Kakazu N, Gorrin-Rivas MJ, Lu HP, Kawata M, Abe T, Ueda K, Adachi Y. Cloning and characterization of LUN, a novel ring finger protein that is highly expressed in lung and specifically binds to a palindromic sequence. *J Biol Chem* (2001) 276(17):14004-13.

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.

Cobine PA, Pierrel F, Bestwick ML, Winge DR. Mitochondrial matrix copper complex used in metallation of cytochrome oxidase and superoxide dismutase. *J Biol Chem* (2006) 281(48):36552-9.

Cottet S, Corthesy-Theulaz I, Spertini F and Corthesy B. Microaerophilic conditions permit to mimic in vitro events occurring during in vivo *Helicobacter pylori* infection and to identify Rho/Ras-associated proteins in cellular signaling. *J Biol Chem* (2002) 277(37):33978-86.

Corte MD, Tamargo F, Alvarez A, Rodríguez JC, Va'zquez J, Sa'nchez R, Lamelas ML, Gonza'lez LO, Allende MT, Garc'ia-Mun'iz JL, Fueyo A, Vizoso F Cytosolic levels of TFF1/pS2 in breast cancer: their relationship with clinical-pathological parameters and their prognostic significance. *Breast Cancer Res Treat* (2006) 96(1):63-72.

Cover TL and Blande SR *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nat Rev Microbiol* (2005) 3(4):320-32.

Dignass A, Lynch-Devaney K, Kindoh H, Thim L and Podolsky DK. Trefoil peptides promote epithelial migration through a transforming growth factor β -independent Pathway. *J Clin Invest* (1994) 94(1):376-8.

Dolan B, Naughton J, Tegtmeyer N, May F.E.B. and Clyne M. TFF1 mediates colonization by *Helicobacter pylori* of the adherent mucus gel layer secreted by polarized HT29-MTX-E12 cells. *dati confidenziali, in stampa*

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 Gaspach C. *Trefoil factor family (TFF) peptides and cancer progression. Peptides* (2004) 25(5):885-98.

Fischbach W, Goebeler-Kolve ME, Dragosics B, Greiner A and Stolte M. Long term outcome of patients with gastric marginal zone B cell lymphoma of mucosa associated lymphoid tissue (MALT) following exclusive *Helicobacter pylori* eradication therapy: experience from a large prospective series. *Gut* (2004) 53(1):34-7.

Fischer W, Puls J, Buhrdorf R, Gebert B, Odenbreit S and Haas R. Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. *Mol Microbiol* (2001) 42(5):1337-48.

Foekens JA, Rio MC, Seguin P, van Putten WL, Fauque J, Nap M, Klijn JG, Chambon P. Prediction of relapse and survival in breast cancer patients by pS2 protein status. *Cancer Res* (1990) 50(13):3832-7.

Fox JG, Rogers AB, Whary MT, Ge Z, Ohtani M, Jones EK, Wang TC. Accelerated progression of gastritis to dysplasia in the *pyloric* antrum of TFF2 $-/-$ C57BL6 x Sv129 *Helicobacter pylori*-infected mice. *Am J Pathol.* (2007) 171(5):1520-8.

Gerhard M, Lehn N, Neumayer N, Borén T, Rad R, Schepp W, Miehke S, Classen M, Prinz C. Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1999) 96(22):12778-83.

Gilmore TD. The Rel/NF-kappaB signal transduction pathway: introduction. *Oncogene* (1999) 18(49):6842-4.

Goodman VL, Brewer GJ, Merajver SD. Copper deficiency as an anti-cancer strategy. *Endocr Relat Cancer* (2004) 11(2):255-63.

Gouyer V, Wiede A, Buisine MP, Dekeyser S, Moreau O, Lesuffleur T, Hoffmann W, Huet G. Specific secretion of gel-forming mucins and TFF peptides in HT29 cells of mucinsecreting phenotype. *Biochim Biophys Acta* (2001) 1539(1-2):71-84.

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.

Guo-Yong Hu, Bao-Ping Yu, Wei-Guo Dong, Mu-Qi Li, Jie-Ping Yu, He-Sheng Luo, Zong-Xue Rang. Expression of TFF2 and *Helicobacter pylori* infection in carcinogenesis of gastric mucosa. *World J Gastroenterol* (2003) 9(5):910-914.

Hamza I, Faisst A, Prohaska J, Chen J, Gruss P, Gitlin JD. The metallochaperone Atox1 plays a critical role in perinatal copper homeostasis.

Proc Natl Acad Sci USA (2001) 98(12):6848-52.

Hamza I and Gitlin JD Copper chaperones for cytochrome c oxidase and human disease. *J Bioenerg Biomembr* (2002) 34(5):381-8.

Hayashi S, Sugiyama T, Yachi A, Yokota K, Hirai Y, Oguma K, Fugii N. Effect of ecabet sodium on *Helicobacter pylori* adhesion to gastric epithelial cells. *J Gastroenterology* (1997) 32(5):593-7.

Hernández C, Santamatilde E, McCreath KJ, Cervera AM, Díez I, Ortiz-Masiá D, Martínez N, Calatayud S, Esplugues JV, Barrachina MD. Induction of trefoil factor (TFF)1, TFF2 and TFF3 by hypoxia is mediated by hypoxia inducible factor-1: implications for gastric mucosal healing. *Br J Pharmacol* (2009) 156(2):262-72.

Hoffmann W. Trefoil factors TFF (trefoil factor family) peptide-triggered signals promoting mucosal restitution. *Cell Mol Life Sci* (2005) 62(24):2932-8.

Hong H, Yang L, Stallcup MR. Hormone-independent transcriptional activation and coactivator binding by novel orphan nuclear receptor ERR3. *J Biol Chem* (1999) 274(32):22618-26.

Hazell SL, Lee A, Brady L, Hennessy W. *Campylobacter pyloridis* and gastritis: association with intracellular spaces and adaptation to an environment of mucus as important factors in colonization of the gastric epithelium. *J Infect Dis* (1986) 153(4):658-63.

Itoh S, Kim HW, Nakagawa O, Ozumi K, Lessner SM, Aoki H, Akram K, McKinney RD, Ushio-Fukai M, Fukai T. Novel role of antioxidant-1 (Atox1) as a copper-dependent transcription factor involved in cell proliferation. *J Biol Chem* (2008) 283(14):9157-67.

Jakowlew SB, Breathnach R, Jeltsch JM, Masiakowski P, Chambon P. Sequence of the pS2 mRNA induced by estrogen in the human breast cancer cell line MCF-7. *Nucleic Acids Res* (1984) 12(6):2861-78.

Jeltsch JM, Roberts M, Schatz C, Garnier JM, Brown AM, Chambon P. Structure of the human oestrogen-responsive gene pS2. *Nucleic Acids Res* (1987) 15(4):1401-14.

Jensen LT, and Winge DR. Identification of a copper-induced intramolecular interaction in the transcription factor Mac1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* (1998) 17(18):5400-8.

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.

Joshi A, Serpe M, and Kosman DJ. Evidence for (Mac1p)₂DNA ternary complex formation in Mac1p-dependent transactivation at the CTR1 promoter. *J Biol Chem* (1999) 274(1):218-26.

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. Amplification and invasiveness of epithelial progenitors during gastric carcinogenesis in trefoil factor 1 knockout mice. *Cell Prolif* (2008) 41(6):923-35.

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.

Keely S, Rawlinson LA, Haddleton DM, and Brayden DJ. A tertiary amino-containing polymethacrylate polymer protects mucus-covered intestinal epithelial monolayers against pathogenic challenge. *Pharm Res* (2008) 25(5):1193-201.

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 BE, Nevitt T, Thiele DJ. Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. *Nat Chem Biol* (2008) 4(3):176-85.

Kimura M, Goto S, Wada A, Yahiro K, Niidome T, Hatakeyama T, Aoyagi H, Hirayama T, Kondo T. Vacuolating cytotoxin purified from *Helicobacter pylori* causes mitochondrial damage in human gastric cells. *Microb Pathog* (1999) 274(1):218-26.

Koike T, Shimada T, Fujii Y, Chen G, Tabei K, Namatame T, Yamagata M, Tajima A, Yoneda M, Terano A, Hiraishi H. Up-regulation of TFF1 (pS2) expression by TNF-alpha in gastric epithelial cells. *J Gastroenterol Hepatol* (2007) 22(6):936-42.

Kuipers EJ, Nelis GF, Klinkenberg-Knol EC, Snel P, Goldfain D, Kolkman JJ, Festen HP, Dent J, Zeitoun P, Havu N, Lamm M, Walan A. Cure of *Helicobacter pylori* infection in patients with reflux oesophagitis treated with long-term omeprazole reverses gastritis without exacerbation of reflux disease: results of a randomised controlled trial. *Gut* (2004) 53(1):12-20.

Kusters JG, van Vliet AH, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev* (2006) 19(3):449-90.

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.

Leung WK, Lin SR, Ching JY, To KF, Ng EK, Chan FK, Lau JY, Sung JJ. Factors predicting progression of gastric intestinal metaplasia: results of a randomised trial on *Helicobacter pylori* eradication. *Gut* (2004) 53(9):1244-9.

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.

Loss LA, Sadanandam A, Durinck S, Nautiyal S, Flaucher D, Carlton VE, Moorhead M, Lu Y, Gray JW, Faham M, Spellman P, Parvin B. Prediction of epigenetically regulated genes in breast cancer cell lines. *BMC Bioinformatics* (2010) 11:305.

Lowndes SA, Adams A, Timms A, Fisher N, Smythe J, Watt SM, Joel S, Donate F, Hayward C, Reich S, Middleton M, Mazar A, Harris AL. Phase I study of copper-binding agent ATN-224 in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* (2008) 14(22):7526-34.

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.

Lutsenko S, Barnes NL, Bartee MY, Dmitriev OY. Function and regulation of human copper-transporting ATPases. *Physiol Rev* (2007) 87(3):1011-46.

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.

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.

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.

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.

Michelis R, Sela S, Sbeit W, Cohen HI, Reshef R. Decreased TFF2 expression in the gastric antrum in patients infected with CagA-positive *Helicobacter pylori*. *Isr Med Assoc J* (2009) 11(1):11-5.

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.

Monack DM, Mueller A, Falkow S. Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system. *Nat Rev Microbiol* (2004) 2(9):747-65.

Moran Anthony P. *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. Chapter 8 – Molecular Structure, Biosynthesis, and Pathogenic Roles of Lipopolysaccharides. ASM Press; (2001) ISBN-10: 1-55581-213-9.

Muller PA, Klomp LW. ATOX1: a novel copper-responsive transcription factor in mammals? *Int J Biochem Cell Biol* (2009) 41(6):1233-6.

Murata Y, Yamakawa E, Iizuka T, Kodama H, Abe T, Seki Y, Kodama M. Failure of copper incorporation into ceruloplasmin in the Golgi apparatus of LEC rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* (1995) 209(1):349-55 8.

Nakao K, Miyao Y, Ohe Y, Tamaoki T. Involvement of an AFP1-binding site in cell-specific transcription of the pre-S1 region of the human hepatitis B virus surface antigen gene. *Nucleic Acids Res* (1989) 17(23):9833-42.

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.

Ota H, Nakayama J, Momose M, Hayama M, Akamatsu T, Katsuyama T, Graham DY, Genta RM. Helicobacter pylori infection produces reversible glycosylation changes to gastric mucins. *Virchows Arch* (1998) 433(6):419–426.

Pace F and Vigneri S. Helicobacter pylori. *Springer-Verlag*, (1999) 88-470-0065-3.

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.

Percival SS, Harris ED. Copper transport from ceruloplasmin: characterization of the cellular uptake mechanism. *Am J Physiol* (1990) 258(1Pt 1):C140-6.

Perera WS, Hooper NM. Ablation of the metal ion-induced endocytosis of the prion protein by disease-associated mutation of the octarepeat region. *Curr Biol* (2001) 11(7):519-23.

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.

Pillinger MH, Marjanovic N, Kim SY, Lee YC, Scher JU, Roper J, Abeles AM, Izmirlly PI, Axelrod M, Pillinger MY, Tolani S, Dinsell V, Abramson SB, Blaser MJ.

Helicobacter pylori stimulates MMP-1 secretion via CagA-dependent and – independent ERK activation. *J Biol Chem* (2007) 282(26):18722-31.

Podolsky DK, Lynch-Devaney K, Stow JL, Oates P, Murgue B, DeBeaumont M, Sands BE, Mahida YR. Identification of human intestinal trefoil factor. Goblet cell-specific expression of a peptide targeted for apical secretion. *J Biol Chem* (1993) 268(16):12230.

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.

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.

Regalo G, Wright NA and Machado JC. *Trefoil factors: from ulceration to neoplasia.* *Cell Mol Life Sci* (2005) 62(24):2910-5.

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.

Ribieras S, Tomasetto C, Rio MC. The pS2/TFF1 trefoil factor, from basic research to clinical applications. *Biochim Biophys Acta* (1998) 1378(1):F61-77.

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.

Rothenbacher D, Bode G, Berg G, Knayer U, Gonser T, Adler G, Brenner H. *Helicobacter pylori* among preschool children and their parents: evidence of parent-child transmission. *J Infect Dis* (1999) 179(2):398-402.

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.

Rutherford JC and Bird AJ Metal-responsive transcription factors that regulate iron, zinc, and copper homeostasis in eukaryotic cells. *Eukaryot Cell* (2004) 3(6):1–13.

Sakamoto S, Watanabe T, Tokumaru T, Takagi H, Nakazato H, Lloyd KO. Expression of Lewisa, Lewisb, Lewisx, Lewisy, sialyl-Lewisa, and sialyl-Lewisx

blood group antigens in human gastric carcinoma and in normal gastric tissue. *Cancer Res* (1989) 49(3):745-52.

Salama NR, Otto G, Tompkins L and Falkow S. Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* plays a role during colonization in a mouse model of infection. *Infect. Immun.* (2001) 69:730–736.

Sankpal NV, Mayo MW and Powell SM. Transcriptional repression of TFF1 in gastric epithelial cells by CCAAT/enhancer binding protein-beta. *Biochim Biophys Acta* (2005) 1728(1-2):1-10.

Sasaki M, Ikeda H and Nakanuma Y. Expression profiles of MUC mucins and trefoil factor family (TFF) peptides in the intrahepatic biliary system: Physiological distribution and pathological significance. *Prog Histochem Cytochem* (2007) 42(2):61-110.

Schreiber S, Konradt M, Groll C, Scheid P, Hanauer G, Werling HO, Josenhans C, Suerbaum S. The spatial orientation of *Helicobacter pylori* in the gastric mucus. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2004) 101:5024 –5029.

Schwartz LH, Koerner FC, Edgerton SM, Sawicka JM, Rio MC, Bellocq JP, Chambon P, Thor AD. pS2 expression and response to hormonal therapy in patients with advanced breast cancer. *Cancer Res* (1991) 51(2):624-8.

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.

Sellers LA, Allen A, Morris E, Ross-Murphy SB, Mucus glycoprotein gels. Role of glycoprotein polymeric structure and carbohydrate side-chains in gel-formation. *Carbohydr Res* (1988) 178: 93–110.

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.

Sen CK, Khanna S, Venojarvi M, Trikha P, Ellison EC, Hunt TK, Roy S. Copper-induced vascular endothelial growth factor expression and wound healing. *Am. J. Physiol Heart Circ Physiol* (2002) 282: H1821–7.

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.

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.

Song IS, Chen HH, Aiba I, Hossain A, Liang ZD, Klomp LW, Kuo MT. Transcription factor SP1 plays an important role in the regulation of copper homeostasis in mammalian cells. *Mol Pharmacol* (2008) 74(3):705-13.

Soutto M, Belkhiri A, Piazzuelo MB, Schneider BG, Peng D, Jiang A, Washington MK, Kokoye Y, Crowe SE, Zaika A, Correa P, Peek RM Jr, El-Rifai W. Loss of TFF1 is associated with activation of NF- κ B-mediated inflammation and gastric neoplasia in mice and humans. *J Clin Invest* (2011) 121(5):1753-67.

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.

Take S, Mizuno M, Ishiki K, Nagahara Y, Yoshida T, Yokota K, Oguma K, Okada H, Shiratori Y. The effect of eradicating *Helicobacter pylori* on the development of gastric cancer in patients with peptic ulcer disease. *Am J Gastroenterology* (2005) 100(5):1037-42.

Taupin D, Podolsky DK. Trefoil factors: initiators of mucosal healing. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2003) 4(10):819.

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.

Thim L and May FEB. Structure of mammalian trefoil factors and functional insights. *Cell Mol Life Sci* (2005) 62(24):2956-73.

Thim L, Jorgensen KH and Jorgensen KD. Pancreatic spasmolytic polypeptide (PSP): II. Radioimmunological determination of PSP in porcine tissues, plasma and pancreatic juice. *Regul Peptides* (1982) 3(3-4):221-30.

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.

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, 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.

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, Siciliano RA, Cacace G, Mazzeo MF, Capone R, Malorni A, Leone A, Marzullo L. Dietary effects of copper and iron deficiency on rat intestine: a differential display proteome analysis. *J Proteome Res.* (2005) 4(5):17818.

Traci L. Testerman, David J. McGee, and Harry L. T. Mobley. Adherence and Colonization Chapter 34 - *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL, editors. Washington (DC) 2001: ASM Press.

Tümer Z, Horn N.: Menkes disease: underlying genetic defect and new diagnostic possibilities. *J Inherit Metab Dis* (1998) 21(5):604-12.

Uauy R, Olivares M, Gonzalez M. Essentiality of copper in humans. *Am J Clin Nutr* (1998) 67(5 Suppl): 952S-959S.

Valkone KH, Ringne M, Ljung Å, Wadström T. High affinity binding of laminin by *Helicobacter pylori*: evidence for a lectin-like interaction. *FEMS Immunol. Med Microbiol* (1993) 7(13):29-38.

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.

Wadsworth JD, Hill AF, Joiner S, Jackson GS, Clarke AR, Collinge J. Strain-specific prion-protein conformation determined by metal ions. *Nat Cell Biol* (1999) 1(1):55-9.

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.

Wirth PL, Linder MC. Distribution of copper among components of human serum. *J Natl Cancer Inst* (1985) 75(2):277-84.

Wotherspoon AC, Doglioni C, Diss TC, Pan L, Moschini A, de Boni M, Isaacson PG. Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet.* (1993) 342(8871):575-7.

BIBLIOGRAFIA

Wood LK and Thiele DJ Transcriptional Activation in Yeast in Response to Copper Deficiency Involves Copper-Zinc Superoxide Dismutase. *The Journal of Biological Chemistry* (2009) 284(1):404-423.

Xanthoudakis S, Miao GG, Curran T. The redox and DNA-repair activities of Ref-1 are encoded by nonoverlapping domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (1994) 91(1):23-7.

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.

Ziche M, Jones J, Gullino PM. Role of prostaglandin E and copper in angiogenesis. *J Natl Cancer Inst* (1982) 69(2):475-82.