



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO
Dipartimento di Farmacia

Dottorato di ricerca
in Biologia dei Sistemi

Ciclo XIV - Anno di discussione 2016

Coordinatore: Chiar.mo Prof. *Antonietta Leone*

***Regolazione epigenetica dell'espressione
del fattore peptidico gastrointestinale
TFF1***

settore scientifico disciplinare di afferenza: BIO/11

Dottorando
Dott.ssa
Piera Ferro

Tutore
Chiar.ma Prof.ssa
Alessandra Tosco

INDICE

	Pag.
ABSTRACT	1
SOMMARIO	2
CAPITOLO 1	
INTRODUZIONE	3
1.1 Epigenetica	3
1.1.1 Meccanismi di regolazione epigenetica	4
1.1.1.1 <i>Metilazione del DNA</i>	5
1.1.1.2 <i>Modifiche istoniche</i>	6
1.1.1.3 <i>RNA non codificanti</i>	7
1.1.2 Epigenetica negli stati patologici	7
1.1.2.1 <i>Neoplasie</i>	7
1.1.2.2 <i>Sindromi associate al ritardo mentale</i>	8
1.1.2.3 <i>Strategie terapeutiche</i>	8
1.1.3 Ambiente e dieta	9
1.1.4 Il codice epigenetico	10
1.2 TFF1	11
1.2.1 I fattori trifoglio	11
1.2.2 Il dominio trifoglio	11
1.2.3 Interazioni intra- e inter-molecolari	12
1.2.4 Regolazione trascrizionale di TFF1	13
1.2.5 Modifiche post-traduzionali	16
1.2.6 Localizzazione tissutale dei fattori trifoglio	16
1.2.7 Funzione fisiologica dei fattori trifoglio	17
1.2.8 TFF1 nei processi patologici	19
1.2.9 Il modello murino TFF1-KO	21
1.3 Rame	22
1.3.1 Ruolo biologico	22
1.3.2 Meccanismi di omeostasi	22
1.3.3 Rame e cancro	25
1.3.4 Rame e TFF1	25
1.4 <i>Helicobacter pylori</i>	27
1.4.1 Caratteristiche generali	27
1.4.2 Fattori di virulenza e patogenicità	27
1.4.3 Risposta della cellula eucariote e meccanismi patogenetici	29
1.4.4 <i>Helicobacter pylori</i> ed epigenetica	31
1.4.5 <i>Helicobacter pylori</i> e TFF1	32
SCOPO DELLA TESI	34

	Pag.
CAPITOLO 2	
RISULTATI	35
2.1 Il rame regola l'espressione di TFF1	35
2.2 Il fattore trascrizionale Sp1 è coinvolto nella regolazione trascrizionale di TFF1 mediata dal rame	35
2.3 Ottimizzazione e validazione di un metodo di <i>High Resolution Melting</i> per l'analisi del <i>pattern</i> di metilazione di TFF1	37
2.3.1 Principi generali del metodo	37
2.3.2 Ottimizzazione del metodo	38
2.3.3 Validazione del metodo	44
2.4 Analisi del <i>pattern</i> di metilazione del promotore di TFF1 al variare dei livelli di rame	46
2.5 Analisi della regione minima responsabile della regolazione di TFF1 tramite metilazione del DNA	47
2.5.1 Modifiche istoniche nella regolazione di TFF1	53
2.6 Le prime fasi dell'infezione con <i>H. pylori</i> in modelli cellulari con diversa espressione basale di TFF1	53
2.6.1 Ottimizzazione delle condizioni di crescita e di infezione batterica	54
2.6.2 Ruolo di TFF1 nell'infezione con <i>H. pylori</i>	56
2.6.3 <i>H. pylori</i> e fattori trifoglio	58
2.6.4 <i>H. pylori</i> ed infiammazione	59
2.6.5 <i>H. pylori</i> ed EMT	60
2.6.6 <i>H. pylori</i> e la metilazione globale del DNA	61
CAPITOLO 3	
CONCLUSIONI	64
CAPITOLO 4	
MATERIALI E METODI	66
4.1 Colture cellulari	66
4.1.1 Trattamenti cellulari	66
4.2 <i>Real-Time</i> PCR	67
4.3 Immunoprecipitazione della cromatina	67
4.4 <i>Real-Time</i> PCR	69
4.5 Validazione di un metodo di <i>High Resolution Melting</i> per lo studio della metilazione del DNA sul promotore di TFF1	69

	Pag.
4.5.1 Estrazione e conversione del DNA	69
4.5.2 Disegno dei <i>primer</i>	70
4.5.3 Messa a punto del metodo di HRM	70
4.6 Infezioni <i>in vitro</i> con <i>Helicobacter pylori</i>	71
4.6.1 Condizioni di crescita batterica	71
4.6.2 Condizioni di infezione <i>in vitro</i>	71
4.7 Western Blotting	71
4.8 Analisi di metilazione tramite <i>Microarray</i>	72
4.9 <i>The Cancer Genome Atlas</i>	72
4.10 Clonaggio e sequenziamento con bisolfito	73
BIBLIOGRAFIA	74

ABSTRACT

TFF1 is a protein expressed in the gastrointestinal tract, belonging to the trefoil folding factor family, characterized by a conserved “trefoil domain” containing six cysteine residues that form a cloverleaf disulfide structure. TFF1 is able to bind copper *in vitro*, favoring its homodimerization. TFF1 plays a key role in the correct formation of the mucous layer, promotes the epithelial restitution after injury and protects the integrity of the epithelial barrier. Its expression is regulated by epigenetic mechanisms such as histone modifications and DNA methylation. Altered gene expression in different pathologies is often associated with an altered DNA methylation pattern of TFF1 promoter, while histone modifications are essential in activating TFF1 transcription mediated by estrogen stimulation. Furthermore, TFF1 secreted in the gastric mucus layer may act as docking site for *H. pylori* adhesion on mucosal surface and it was demonstrated that the infection induces aberrant methylation correlated with gastric cancer risk.

This project is aimed at investigating the role of the epigenetic control on the TFF1 gene promoter, particularly DNA methylation. The conditions of high resolution melting method were optimized in order to evaluate the differential state of methylation of several CGs on the promoter region of *tff1* in different experimental conditions. The study was mainly focused on the involvement of TFF1 in neoplastic processes and inflammatory diseases, as gastric cancer and *H. pylori* infection, in order to gain insight into the pathogenic mechanisms and provide useful tools to interfere and slowing down the disease progression.

Moreover, further attention is dedicated to the ongoing study regarding the effects of copper on transcriptional regulation of TFF1 and epigenetic modifications. It was demonstrated that TFF1 expression is regulated by copper and that the transcription factor Sp1 is involved in this metal-mediated regulation of transcription. Copper is not able to affect TFF1 promoter methylation in copper overload conditions. This was demonstrated with a method of High Resolution Melting which was assessed on TFF1 promoter and validated. Deep analysis on TFF1 promoter methylation status let us find out a minimum region responsible for TFF1 expression regulation by DNA methylation.

Concerning *H. pylori*, we focused on the early step of the infection to study the role of TFF1 using two cell models with different features and TFF1 expression: we lighted up alterations of TFFs, inflammatory cytokines and EMT markers, that were differentially induced or repressed in the two different cell lines. Furthermore an altered methylation of TFF1 and genes involved in Wnt pathway emerged.

SOMMARIO

TFF1 è un peptide gastrointestinale appartenente alla famiglia dei fattori trifoglio a cui appartengono anche TFF2 e TFF3. Si tratta di piccole proteine caratterizzate dalla presenza di residui di cisteina che formano ponti disolfuro dando origine ad una struttura tridimensionale simile ad un trifoglio. TFF1 svolge numerose funzioni: stimola il processo di restituzione epiteliale, insieme alle mucine contribuisce a proteggere la mucosa gastrica, possiede attività pro-angiogenica, anti-apoptotica e anti-proliferativa. Tali proprietà sono essenziali per la rigenerazione dei tessuti danneggiati ma possono rappresentare un vantaggio a favore dello sviluppo di cellule neoplastiche. L'espressione di TFF1 è finemente regolata dalla metilazione del suo promotore: analisi dettagliate hanno consentito di stabilire che gli eventi di metilazione e demetilazione sono ciclici e si susseguono con una periodicità precisa. È stato osservato che il promotore di TFF1 è ipermetilato nei tumori gastrici, causando una ridotta espressione del peptide; d'altra parte è stato riscontrato un aumento dell'espressione di TFF1 in più del 50% dei casi di carcinoma mammario.

Un'espressione alterata dei peptidi trifoglio è stata osservata anche nell'infezione da *H. pylori*, il principale fattore di rischio per lo sviluppo di tumore gastrico. TFF1 e il batterio colocalizzano nello strato mucoso della parete gastrica ed è stato dimostrato che il batterio interagisce selettivamente con la forma dimerica di TFF1. Inoltre, il batterio patogeno *H. pylori* è in grado di influenzare l'espressione di TFF1 e di altri geni tramite modifiche epigenetiche che avvengono a seguito dell'infezione.

Il coinvolgimento del peptide nei processi fisiopatologici del tratto gastrointestinale e di altri distretti suggerisce la necessità di un approfondito studio del suo promotore per comprendere le modalità di regolazione dell'espressione genica mediata da fattori trascrizionali e da meccanismi epigenetici.

Il presente lavoro di tesi di dottorato è stato focalizzato sull'analisi di metilazione del promotore di TFF1 in diverse condizioni patologiche. Dal momento che TFF1 lega specificamente il rame e lo utilizza per la sua attività motogenica e la sua interazione con il batterio *H. pylori*, in una prima fase è stata caratterizzata la variazione dell'espressione del peptide in seguito a variazione dei livelli di rame ed è stato dimostrato il coinvolgimento del fattore trascrizionale Sp1 in tale modulazione. Esperimenti di HRM e di sequenziamento ci hanno consentito di dimostrare che la metilazione del promotore non è coinvolta in tale meccanismo di regolazione.

Grazie all'utilizzo di tali metodiche e all'analisi di database di metilazione, è stata individuata una regione minima responsabile del silenziamento dell'espressione del fattore correlata con lo sviluppo di cancro gastrico.

L'analisi delle prime fasi dell'infezione da *H. pylori* su due diversi modelli cellulari, ha rivelato un aumento dell'espressione di TFF1 tanto più evidente quanto più bassi erano i livelli basali del fattore gastrointestinale, ed una variazione dei livelli di TFF2 e TFF3 strettamente correlata all'espressione di TFF1.

Infine un'analisi della metilazione globale in queste prime fasi di infezione ha evidenziato una generale ipometilazione del genoma e di alcuni *pathway* di segnale, tra cui quello di Wnt, noto per il suo coinvolgimento nella progressione del tumore gastrico.

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

1.1 Epigenetica

Nella visione classica della genetica, il genoma è un insieme di geni codificanti per proteine che vengono ereditati dalla progenie e ne determinano il fenotipo. Il termine epigenetica si riferisce a meccanismi di regolazione trascrizionale che inducono cambiamenti ereditabili nell'espressione genica senza apportare modifiche alla sequenza del DNA: un cambiamento del fenotipo senza un cambiamento del genotipo. Il prefisso "epi" implica caratteristiche che sono "al di sopra" o "in aggiunta" alla genetica; l'epigenetica comprende quindi meccanismi che vanno oltre la concezione tradizionale dell'ereditarietà ed è la base per comprendere la relazione tra organismo e ambiente. Su fenomeni epigenetici si basa la maggior parte dei processi di differenziamento cellulare. Tutte le cellule di un organismo pluricellulare derivano da una singola cellula, lo zigote, perciò possiedono lo stesso patrimonio genetico. Tuttavia esse si sviluppano in maniera diversa e si differenziano, ad esempio nell'uomo, in più di 100 diversi tipi cellulari. Durante la morfogenesi, cellule staminali totipotenti diventano le varie linee cellulari pluripotenti dell'embrione, che a loro volta diventano cellule altamente differenziate, grazie all'attivazione o repressione dell'espressione di specifici set di geni.

Conrad Waddington nel 1942 fu il primo a descrivere l'epigenetica come "la branca della biologia che studia le interazioni causali tra i geni e i loro prodotti, che danno origine al fenotipo". Egli usò l'espressione "*epigenetic landscape*" come metafora per lo sviluppo biologico. Waddington infatti postulò che il destino cellulare è stabilito in fase di sviluppo e le cellule sono come biglie che raggiungono il punto più basso rotolando in maniera casuale nelle valli separate dalle creste (Figura 1.1). Tale visione implica la casualità e l'irreversibilità del processo di differenziamento cellulare. Nel corso degli anni, con la rapida crescita della genetica, il significato della parola si è progressivamente evoluto. L'epigenetica è stata definita come "lo studio di qualsiasi diversità fenotipica che non sia correlata a differenze genotipiche, ovvero programmi di espressione genica che possono essere trasmessi attraverso le divisioni cellulari ma che non sono direttamente attribuibili alla sequenza di DNA" (Holliday, 2006).

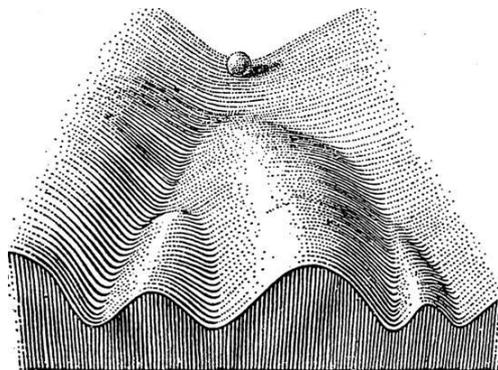


Figura 1.1 "*Epigenetic landscape*" proposto da Conrad Waddington nel 1957.

Attualmente l'epigenetica viene definita come "lo studio di cambiamenti ereditabili mitoticamente e/o meioticamente nella funzione del gene che non possono essere spiegati da cambiamenti nella sequenza di DNA" (Dupont *et al.*, 2009). Negli ultimi decenni le conoscenze riguardanti l'epigenetica si sono notevolmente ampliate tuttavia molti aspetti rimangono ancora da studiare ed approfondire. L'interesse per le modifiche epigenetiche è accresciuto dal fatto che esse sembrano avere un ruolo rilevante, se non fondamentale, nella patogenesi di numerose e diffuse patologie come il diabete di tipo II, disordini neurodegenerativi, malattie autoimmuni e cancro.

1.1.1 Meccanismi di regolazione epigenetica

La cromatina è il complesso di DNA e proteine istoniche associate che può regolare l'espressione genica, modulando l'accesso ai fattori di trascrizione e al macchinario trascrizionale.

Tra i meccanismi di regolazione epigenetica vengono annoverati la metilazione del DNA, le modifiche istoniche e l'incorporazione di varianti istoniche, i meccanismi di regolazione basati sugli RNA (ncRNA, sRNA, miRNA, etc.) e le proteine prioniche che agiscono spesso in modo sinergico per modulare l'attività trascrizionale del genoma (Figura 1.2) (Jaenisch *et al.*, 2003).

Per quanto riguarda le modifiche chimiche del DNA o degli istoni, sono state definite le categorie di *writer*, *reader* ed *eraser*. Le molecole *writer* catalizzano l'aggiunta di un gruppo chimico sugli istoni o sul DNA; le *reader* sono le molecole effettrici che riconoscono specifiche modifiche epigenetiche; le *eraser* rimuovono le modifiche per invertirne l'influenza sull'espressione genica. L'informazione proveniente dalla combinazione di molteplici modifiche epigenetiche è interpretata da proteine che interagiscono con esse determinando attivazione o repressione genica oppure ulteriori modifiche epigenetiche.

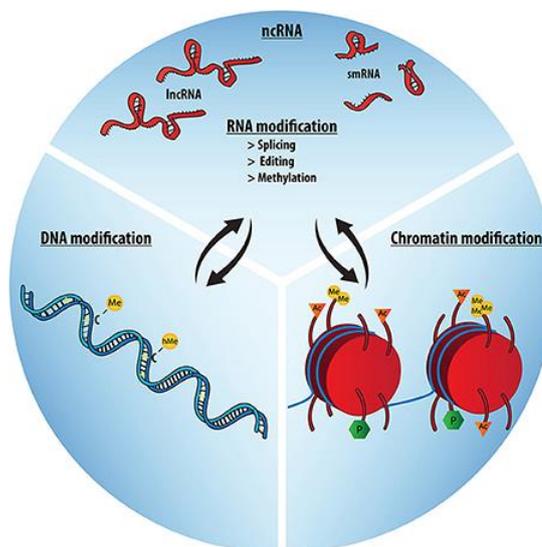


Figura 1.2 Rappresentazione schematica dei principali meccanismi di regolazione epigenetica.

1.1.1.1 Metilazione del DNA

La metilazione del DNA, osservata per la prima volta nel 1948, è il meccanismo epigenetico più studiato e di cui attualmente si ha un'ampia, seppur non completa, conoscenza. È un processo che induce silenziamento genico e formazione di eterocromatina ed è coinvolto nella regolazione dell'espressione genica, nell'imprinting genomico, nell'inattivazione del cromosoma X e nel silenziamento delle regioni centromeriche. Tale meccanismo è implicato anche nel meccanismo di difesa dell'ospite dal momento che silenzia DNA di origine esogena e nel preservare l'integrità del genoma contro l'azione di trasposoni e retrovirus.

La modifica consiste nel legame covalente di un gruppo metilico sul carbonio in posizione 5 dei residui di citosina con formazione di 5-metilcitosina (Adams, 1990). La reazione è catalizzata da una classe di enzimi che prendono il nome di DNA metiltransferasi (DNMT) le quali utilizzano il cofattore S-adenosil-metionina come donatore del gruppo metilico. Nei mammiferi la metilazione avviene sulle citosine dei dinucleotidi CpG, abbondanti nelle regioni dei promotori dei geni nelle cosiddette isole CpG, regioni genomiche lunghe più di 500 bp ricche di siti metilabili (Jones e Baylin, 2002). La distribuzione di DNA metilato nel genoma mostra un aumento nelle regioni non codificanti e nei trasposoni (LTR, LINE, SINE), ma non nelle isole CpG dei geni attivi.

Le DNMT condividono due domini: un multidominio all'estremità N-terminale con funzioni regolatorie e un dominio catalitico all'estremità C-terminale. Mentre la porzione N-terminale indirizza gli enzimi verso il nucleo e media le interazioni con proteine, DNA e cromatina, la porzione C-terminale è responsabile del legame del cofattore e della catalisi.

Nei mammiferi esistono due classi di DNMT, DNMT1 e DNMT3. La DNMT1 svolge il ruolo di metiltransferasi di mantenimento e trasmette il *pattern* di metilazione dalla cellula madre alle cellule figlie. Essa si localizza a livello della forca replicativa durante la sintesi di DNA e mostra preferenza per il DNA emimetilato che si forma in seguito alla replicazione del DNA, costituito da un filamento parentale ed uno di neosintesi. DNMT1 è espressa ubiquitariamente nelle cellule somatiche, ad alti livelli nelle cellule in attiva proliferazione, in maniera ciclo-dipendente, raggiungendo il massimo nella fase S. DNMT1 è un enzima altamente processivo in grado di metilare estesi tratti di DNA senza dissociarsi (Leonhardt *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1998). La famiglia delle DNMT3 nei mammiferi è composta da tre membri: DNMT3a, DNMT3b e DNMT3L. Le DNMT3a e DNMT3b non mostrano preferenza tra DNA metilato e DNA non metilato. Esse stabiliscono i *pattern* di metilazione nelle prime fasi di sviluppo embrionale e nelle cellule germinali per questo vengono definite DNMT *de novo*, ma hanno anche un ruolo nel mantenimento della metilazione del DNA nelle regioni eterocromatiche. Le DNMT3a e DNMT3b sono espresse nei tessuti embrionali e nelle cellule staminali embrionali non differenziate, mentre la loro espressione è down-regolata nelle cellule differenziate (Okano *et al.*, 1999). Il terzo membro della famiglia è DNMT3L, un enzima inattivo che funziona come fattore di regolazione nelle cellule germinali dove è espresso durante la gametogenesi e gli stadi embrionali. L'aggiunta di un gruppo metilico non causa modifiche nell'appaiamento delle basi né nella struttura tridimensionale della molecola di DNA dal momento che si colloca nel solco maggiore della doppia elica. Qui le proteine che legano il DNA sono in grado di interagire con le citosine metilate che sono riconosciute da due domini, il *methyl-binding domain* (MBD), presente nelle proteine *methyl-CpG-binding*, e il dominio zinc finger (Sansom *et al.*, 2007). Le proteine che possiedono questi domini sono in grado di reclutare istone deacetilasi, istone metilasi e complessi di rimodellamento della

cromatina, determinando repressione trascrizionale e formazione di eterocromatina. Al contrario, esistono fattori di trascrizione in grado di legare solo il DNA non metilato quindi in questo caso la metilazione del DNA ne inibisce il legame e, di conseguenza, la trascrizione (Jones *et al.*, 1998; Nan *et al.*, 1998; Harikrishnan *et al.*, 2005).

Recentemente è stato scoperto l'enzima TET1 in grado di catalizzare la reazione di ossidazione di un residuo di 5-metilcitosina a 5-idrossimetilcitosina. Essa potrebbe essere un intermedio nella fase di rimozione del gruppo metilico oppure potrebbe rappresentare una nuova modifica epigenetica (Tahiliani *et al.*, 2009).

1.1.1.2 Modifiche istoniche

L'unità fondamentale della cromatina è il nucleosoma, un ottamero composto da due eterodimeri di istoni H2A e H2B e un tetramero H3-H4 attorno al quale si avvolge il DNA (Luger *et al.*, 1997). Gli istoni sono proteine altamente basiche e sono costituiti da una porzione globulare chiamata core istonico e dalle code istoniche che protrudono dal nucleosoma. Le code istoniche, in particolare quelle di H3 e H4, sono soggette a numerose modifiche post-traduzionali, che assicurano la variabilità cromatinica, come la metilazione, l'acetilazione, la fosforilazione, l'ubiquitinazione, la biotinilazione, la sumoilazione. Le modifiche istoniche più comuni e conosciute sono l'acetilazione e la metilazione.

L'acetilazione degli istoni consiste nel trasferimento di un gruppo acetilico sull' ϵ -ammino-gruppo di un residuo di lisina ad opera dell'istone acetiltransferasi (HAT) e può essere revertita ad opera delle istone deacetilasi (HDAC) (Gershey *et al.*, 1968). Questi enzimi fanno parte di grandi complessi multiproteici con diversa attività biologica. Un particolare dominio proteico chiamato bromodominio lega specificamente le lisine acetilate ed è presente in molte HAT, nei complessi di rimodellamento della cromatina e in alcuni fattori trascrizionali. L'acetilazione istonica neutralizza le cariche positive delle lisine e riduce la forza di legame degli istoni, che sono altamente basici, o delle code istoniche al DNA che è carico negativamente, alterando la carica superficiale dei nucleosomi e causando cambiamenti nell'organizzazione strutturale della cromatina e decompattamento dei nucleosomi. L'acetilazione apre la struttura cromatinica favorendo il legame dei fattori necessari per la trascrizione genica: l'iperacetilazione è associata ad uno stato di trascrizione attiva, l'ipoacetilazione è correlata alla repressione trascrizionale. Le HAT sono reclutate da attivatori della trascrizione che si legano a specifiche sequenze attivatrici causando acetilazione degli istoni; le HDAC sono reclutate da repressori che si legano a sequenze specifiche e provocano deacetilazione istonica. Le modifiche inducono alterazioni strutturali della cromatina che si traducono rispettivamente in *up-* e *down-*regolazione dell'espressione genica.

La metilazione istonica può avvenire a livello dei residui di lisina e di arginina. La metilazione delle lisine è catalizzata dalle lisina metiltransferasi (KMT) e le lisine possono essere mono-, di- e trimetilate. Tutte le KMT possiedono un dominio SET che contiene il sito catalitico e il sito per il legame del cofattore S-adenosilmetionina, donatore del gruppo metilico. Sono state identificate specifiche proteine in grado di riconoscere i sei siti di metilazione caratterizzati che possiedono un dominio di riconoscimento della metil-lisina come il cromodominio, il tudor o il plant homeodomain (PHD). La metilazione delle arginine è catalizzata dalle protein-arginina metiltransferasi (PRMT). Le arginine possono essere monometilate, dimetilate asimmetricamente o simmetricamente. Ogni metilazione istonica ha un diverso ruolo nella regolazione della trascrizione e nella conformazione della

cromatina e la conseguenza può essere l'attivazione o la repressione trascrizionale, a seconda della posizione del residuo metilato. La reazione di metilazione può essere revertita tramite molteplici meccanismi. La metilazione delle arginine è revertita indirettamente dall'azione delle peptidilarginina deiminasi che convertono la monometil-arginina in citrullina. La metil-lisina è chimicamente più stabile: la demetilazione della lisina metilata avviene ad opera di demetilasi lisina-specifica, diossigenasi e idrossilasi.

È stata ipotizzata l'esistenza di un codice istonico che metta in relazione una specifica modifica istonica con un unico processo, ad esempio attivazione o repressione genica. In realtà la situazione è più complessa e non è possibile identificare un codice istonico preciso, piuttosto si può dire che le modifiche istoniche sono riconosciute da una serie di proteine in grado di interagire con gli istoni modificati grazie alla presenza di domini di legame.

1.1.1.3 RNA non codificanti

I ncRNA sono trascritti genici che non vanno incontro a traduzione (Derrien *et al.*, 2012). Si tratta di sequenze di DNA che generano trascritti di RNA che vengono processati da complessi proteici in piccoli RNA. Alcuni di questi entrano nel nucleo e richiamano complessi di modificazione della cromatina iniziando così la formazione di zone eterocromatiche. Tale meccanismo è coinvolto insieme ad altri, nell'inattivazione del cromosoma X. I microRNA (miRNA) sono RNA non codificanti con una lunghezza variabile da 17 a 25 nucleotidi e regolano una grande varietà di funzioni biologiche. Sembra che circa il 60% di geni umani codificanti per proteine siano regolati da miRNA. Molti di essi sono a loro volta regolati epigeneticamente: circa il 50% dei geni di miRNA presentano un promotore contenente isole CpG e l'espressione può essere repressa dalla metilazione del DNA.

1.1.2 Epigenetica negli stati patologici

L'alterazione dei meccanismi di regolazione epigenetica può essere fisiologica o associata a processi patologici come neoplasie, patologie associate al ritardo mentale, malattie del sistema immunitario, disturbi neuropsichiatrici.

1.1.2.1 Neoplasie

Le prime indicazioni che la metilazione del DNA potesse essere coinvolta nel cancro sono venute dalla scoperta di una ipometilazione globale nei tumori (Riggs e Jones, 1983). Da allora è stato dimostrato che, sebbene il genoma nel suo complesso è ipometilato nel cancro, molte isole CpG sono ipermetilate (Jones e Baylin, 2007). Esistono tre modi in cui la metilazione del DNA può contribuire allo sviluppo neoplastico: ipometilazione dei proto-oncogeni che vengono attivati in oncogeni, ipermetilazione dei geni oncosoppressori con conseguente perdita di funzionalità e mutagenesi diretta. Gli oncogeni favoriscono la divisione cellulare e bloccano l'apoptosi, gli oncosoppressori inattivati non sono più in grado di mettere freno a tali processi.

Inoltre la 5-metilcitosina è un hot-spot di mutazione, dunque può contribuire direttamente alla carcinogenesi: essa può essere convertita in timina attraverso una

reazione di deaminazione causando una transizione del dinucleotide CpG in TpG. Diversamente, le citosine non metilate sono convertite in uracile che essendo un componente non naturale del DNA viene riconosciuto dai meccanismi di riparazione che agiscono in maniera più efficiente nel riparare il mismatch U/G ad opera delle uracil glicosilasi. Un accumulo di errori genetici ed epigenetici può trasformare una cellula normale in una cellula tumorale invasiva o metastatica.

Inoltre, il *pattern* di metilazione del DNA può alterare l'espressione di geni associati al cancro, pertanto le modifiche epigenetiche possono essere usate come marcatori per la diagnosi precoce. In alcuni tumori, come la leucemia mieloide cronica e la leucemia promielocitica acuta, eventi di traslocazione genica causano la formazione di proteine di fusione le quali reclutano le HDAC causando silenziamento genico anomalo che contribuisce allo sviluppo della malattia.

1.1.2.2 Sindromi associate al ritardo mentale

I meccanismi epigenetici sono responsabili di sindromi associate ad alterazioni in geni e regioni cromosomiche che determinano alterazioni dello sviluppo fisico e neurologico. Le sindromi di Prader-Willi e Angelman sono causate da una delezione sul cromosoma 15 ereditata dal padre o dalla madre, rispettivamente. Lo stesso gene sul cromosoma corrispondente non può compensare la delezione in quanto è stato silenziato per imprinting dalla metilazione. I sintomi si presentano dalla prima infanzia e sono dovuti principalmente a scompensi ormonali.

La sindrome di Rett, invece, è dovuta a mutazioni del gene che codifica per il fattore MECP2, una proteina *methyl-CpG-binding* che mappa sul cromosoma X, determinando un *pattern* di espressione genica anormale con ridotto sviluppo cerebrale e profonde disabilità mentali. La sindrome colpisce le donne eterozigoti le quali presentano un'espressione a mosaico dovuta all'inattivazione casuale dell'X; gli individui maschi sono emizigoti per le mutazioni e non sopravvivono.

Analogamente, la sindrome ATR-X (α -talassemia/sindrome da ritardo mentale, legato all'X) è caratterizzata da gravi difetti di sviluppo a causa della perdita di ATRX, una proteina coinvolta nel mantenimento dello stato condensato inattivo del DNA. Nella sindrome ICF (immunodeficienza, instabilità centromerica e anomalie facciali) è mutato il gene che codifica per DNMT3B.

Studi recenti hanno mostrato una correlazione tra le metiltransferasi istoniche e numerose malattie congenite umane con difetti nello sviluppo del sistema nervoso e cardiaco come la sindrome di Sotos e la sindrome di Wolf-Hirschhorn dovute a mutazioni o delezioni in regioni critiche del DNA. Mutazioni dei geni che codificano per fattori che modificano la cromatina causano disordini dello sviluppo e alcuni tipi di tumore. La sindrome di Rubinstein-Taybi è causata da una mutazione che sopprime l'attività acetil-transferasica di p300/CBP (Petrij *et al.*, 1995).

Un'anomala metilazione del DNA è associata con numerose altre patologie umane come disordini psichiatrici e del sistema immunitario.

1.1.2.3 Strategie terapeutiche

Le modifiche epigenetiche sono reversibili quindi è possibile modulare gli stati epigenetici tramite l'utilizzo di farmaci nella terapia di alcune patologie, come il cancro. La zebularina, la 5-azacitidina e la 5-aza-2'-deossicitidina sono analoghi nucleosidici e agenti intercalanti e sono farmaci ad azione demetilante utilizzati nella

terapia della sindrome mielodisplastica, una condizione che precede la leucemia. Una volta incorporati nel DNA, interagiscono con le metil-transferasi e inibiscono la metilazione delle citosine. L'utilizzo di analoghi nucleosidici è limitato a causa della loro tossicità. Inibitori della metilazione non intercalanti presenterebbero meno effetti collaterali ma ad oggi non sono ancora state individuate molecole con tali proprietà. Inoltre alcuni analoghi nucleosidici sono inibitori non specifici e inibiscono la metilazione del DNA in tutto il genoma causando una possibile attivazione di geni che normalmente in un certo tessuto non sono espressi.

Recentemente gli inibitori delle istone deacetilasi hanno interessato la comunità scientifica. L'acido valproico e l'acido fenilbutirrico inibiscono tutti gli enzimi ad attività deacetilasi; molecole come il SAHA, il butirrato, il depsipeptide e la tricostatina A sono inibitori delle istone deacetilasi (Richon *et al.*, 1998; Candido *et al.*, 1978; Yoshida *et al.*, 1990). Esistono anche molecole che hanno come target le HAT e possono essere inibitori o attivatori. Molecole come l'acido anacardico e la curcumina sono inibitori naturali dell'attività istone acetiltransferasica ma sono stati sviluppati anche farmaci come la spermidina-CoA in grado di inibire le HAT e aumentare la sensibilità ai farmaci utilizzati di norma nelle terapie antitumorali (Wiech *et al.*, 2009). Nuovi trial clinici sono basati sull'uso contemporaneo di inibitori della metilazione del DNA e delle istone deacetilasi in modo da utilizzare dosi minori di entrambe le classi di farmaci, ottenendo un forte effetto sinergico.

1.1.3 Ambiente e dieta

Le modifiche epigenetiche possono essere influenzate da diversi fattori individuali come l'età e lo stato di salute, come pure da fattori ambientali come lo stile di vita e la dieta. Essi possono indurre alterazioni stabili degli stati epigenetici, causando effetti biologici a lungo termine. È noto che la dieta ha un ruolo preventivo nei confronti dei processi neoplastici; inoltre è stato osservato che gli alimenti alterano la regolazione epigenetica di ratti alimentati con diete diverse. Alcuni componenti alimentari, come il folato e i polifenoli, aumentano i livelli di p53 e degli enzimi di riparazione del DNA MGMT e MLH1, alterandone la metilazione dei promotori (Bishop *et al.*, 2015). Altri componenti alimentari con proprietà antiossidanti, come i flavonoidi della soia e le antocianine, possono ridurre il danno al DNA. Il danno al DNA può anche causare cambiamenti epigenetici. Agenti chimici che danneggiano il DNA come benzene, stirene, tetracloruro di carbonio e tricloroetilene, causano notevole ipometilazione del DNA, alcuni attraverso l'attivazione di vie di stress ossidativo. In particolare, una rottura del doppio filamento del DNA può avviare silenziamento genico tramite meccanismi epigenetici sia provocando la metilazione del DNA, nonché promuovendo modifiche istoniche che silenziano il gene in seguito a rimodellamento della cromatina. La flora batterica intestinale è in grado di produrre butirrato, inibitore delle HDAC, dalla fermentazione della fibra alimentare: elevati livelli di espressione delle HDAC rappresentano un fattore per lo sviluppo del carcinoma gastrico e del colon (Zhu *et al.*, 2004). Il resveratrolo e i polifenoli associati presenti nella frutta secca e nel vino sono inibitori delle sirtuine, una classe di HDAC. Anche lo stile di vita influenza le modifiche epigenetiche: è stata osservata una riduzione dell'attività delle HDAC in pazienti fumatori (Ito *et al.*, 2005). Tali studi devono essere ulteriormente approfonditi per comprendere pienamente il modo in cui l'ambiente influenza gli stati epigenetici.

1.1.4 Il codice epigenetico

La derivazione dalla parola "genetica" ha fatto in modo che molti termini riferiti alla genetica siano stati adattati all'epigenetica. Il termine "epigenoma", in parallelo alla parola "genoma", si riferisce allo stato epigenetico complessivo di una cellula ed "epigenomica" si riferisce allo studio globale dei cambiamenti epigenetici in tutto il genoma. Anche l'espressione "codice genetico" è stata adattata in "codice epigenetico" ed è utilizzata per descrivere l'insieme delle caratteristiche epigenetiche che determinano fenotipi diversi in cellule diverse. Portato agli estremi, il "codice epigenetico" potrebbe rappresentare lo stato totale della cellula in una mappa epigenomica, una rappresentazione schematica dell'espressione genica, la metilazione del DNA e le modifiche istoniche di una particolare regione genomica.

1.2 TFF1

1.2.1 I fattori trifoglio

La famiglia dei fattori trifoglio (*Trefoil Factors Family* - TFF) comprende tre piccole proteine con un peso molecolare che va da 7 a 12 kDa: il peptide gastrico TFF1 o pS2, TFF2 o SP (Spasmolytic Peptide) e il peptide intestinale TFF3 o ITF (Intestinal Trefoil Factor). Nel 1982 Masiakowski e il suo gruppo di ricerca isolarono il gene pS2 (poi TFF1) che in cellule umane MCF-7 di carcinoma della mammella veniva regolato positivamente in presenza di estrogeni; il prodotto genico venne individuato più tardi (Nunez *et al.*, 1987). TFF2 fu scoperto durante una procedura di purificazione dell'insulina da cellule di pancreas suino ed inizialmente denominato fattore spasmolitico (pancreatic spasmolytic polypeptide - PSP) in quanto i primi studi mostrarono che esso era in grado di inibire la motilità gastrointestinale e la secrezione acida gastrica; in seguito fu identificata la proteina omologa nell'uomo (Jorgensen *et al.*, 1982a; Jorgensen *et al.*, 1982b; Tomasetto *et al.*, 1990). Durante la ricerca di proteine coinvolte nella regolazione della differenziazione e della proliferazione delle cellule dell'epitelio intestinale fu identificato il TFF3, inizialmente denominato fattore trifoglio intestinale (intestinal trefoil factor - ITF), perché espresso dalle cellule calciformi dell'intestino di ratto (Figura 1.3) (Suemori *et al.*, 1991).

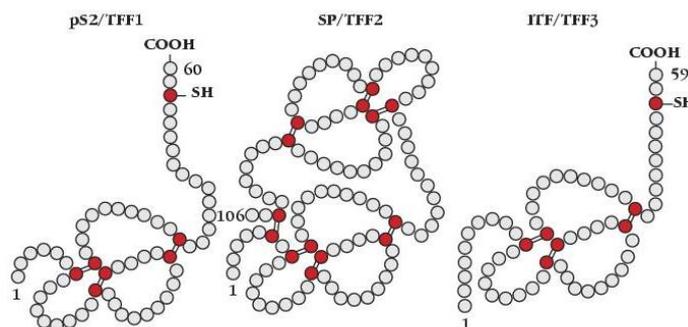


Figura 1.3 I tre peptidi trifoglio.

1.2.2 Il dominio trifoglio

I fattori trifoglio sono caratterizzati dalla presenza di un dominio comune di circa 40 aminoacidi che si ripiega a formare tre *loop* dando origine alla forma di un trifoglio, da cui ha origine il nome. TFF2 è l'unico dei fattori trifoglio a possedere due domini duplicati in tandem. La struttura del trifoglio è stata risolta tramite cristallografia a raggi X e risonanza magnetica nucleare confermando l'ipotesi precedentemente postulata secondo cui la struttura a tre *loop* è dovuta alla formazione di ponti disolfuro intramolecolari nella configurazione 1-5, 2-4 e 3-6 tra sei residui di cisteina in posizioni conservate (Figura 1.4) (Carr *et al.*, 1994; De *et al.*, 1994; Gajhede *et al.*, 1993; Thim, 1989). Tramite questi studi è stato inoltre osservato che il dominio trifoglio (o dominio P) presenta elementi strutturali comuni dovuti alla presenza di altri residui, oltre alle cisteine, che rimangono conservati tra i peptidi della famiglia e tra specie diverse suggerendo che essi giocano un ruolo fondamentale nel mantenimento della geometria, nella stabilità della struttura terziaria e nel mediare le funzioni biologiche.

Ad esempio, tra il secondo e il terzo *loop* si forma una tasca idrofobica costituita da aminoacidi conservati tra le specie che potrebbe rappresentare un sito di legame con un recettore o un ligando come un oligosaccaride o una parte di una catena polisaccaridica. La tasca ha una grandezza variabile tra i diversi TFF spiegando la diversa specificità di substrato (Gajhede *et al.*, 1993). La presenza del dominio trifoglio conferisce ai TFF una struttura compatta che li rende resistenti a proteasi come tripsina e chimotripsina (Jorgensen *et al.*, 1982a).

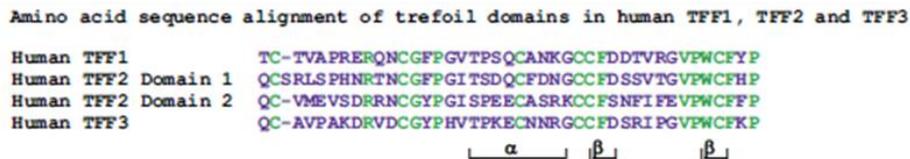


Figura 1.4 Allineamento delle sequenze dei domini trifoglio dei TFF umani: in evidenza i residui conservati.

Oltre ai TFF, sono state isolate altre proteine contenenti il dominio trifoglio nello stomaco di *Xenopus Laevis*, xP1 contenente un dominio trifoglio ed omologo di TFF1 e xP4 contenente 4 domini trifoglio disposti in tandem che sembrerebbe essere la forma duplicata dei peptidi spasmolitici (Hauser *et al.*, 1991). Inoltre nella rana sono state identificate la spasmolisina I e II contenenti un dominio trifoglio e la proteina xP2 contenente due domini trifoglio espresse nella cute, e non nel tratto gastrointestinale (Hauser *et al.*, 1992). Altre proteine contenenti un dominio simile al dominio in questione sono il complesso enzimatico saccarasi-isomaltasi espresso sulla membrana dell'orletto a spazzola delle cellule intestinali e l' α -glucosidasi lisosomiale (Tomasetto *et al.*, 1990).

Inoltre il dominio trifoglio sembra essere simile al "*kringle domain*" presente in molti fattori coinvolti nella coagulazione del sangue e nella fibrinolisi (Baker, 1988). Il dominio P è stato trovato anche in una proteina che potrebbe avere un ruolo nella formazione della matrice della zona pellucida dell'ocita di coniglio (Bork, 1993). Recentemente è stata osservata nel topo una proteina contenente un dominio trifoglio, TMEM190, che sembra essere coinvolta nella fusione tra oocita e spermatozoo (Nishimura *et al.*, 2011).

1.2.3 Interazioni intra- e inter-molecolari

TFF1 e TFF3 presentano, all'estremità C-terminale in una regione molto acida, un settimo residuo di cisteina grazie al quale TFF1 forma omo- ed etero-dimeri tramite ponti disolfuro intermolecolari (Thim *et al.*, 2005). Sono state isolate dalla mucosa gastrica tre forme di TFF1: una monomeric di 6,5 kDa, una omodimerica di 13 kDa e una eterodimerica di 25 kDa (Newton *et al.*, 2000). Il partner di TFF1 è stato identificato e chiamato Trefoil Factor Interactions(Z) 1 (TFIZ1), attualmente conosciuto come gastrochina-2 (GKN2). È una proteina secreta di 164 aminoacidi con un peso molecolare di 18,3 kDa e lega la Cys58 di TFF1 tramite una Cys38 che si trova all'interno di un dominio "*brichos*" considerato avere funzione di *chaperone* molecolare (Westley *et al.*, 2005; Willander *et al.*, 2011).

TFF2, invece, può essere considerato un dimero naturale grazie alla presenza del ponte disolfuro intramolecolare tra la Cys5 e la Cys104 (Thim *et al.*, 2005).

A differenza di TFF1, TFF3 non forma eterodimeri ma è presente come monomero e omodimero grazie alla formazione di un ponte disolfuro intermolecolare

tra i settimi residui di cisteina che si trovano all'estremità C-terminale, come accade in TFF1 (Figura 1.5).

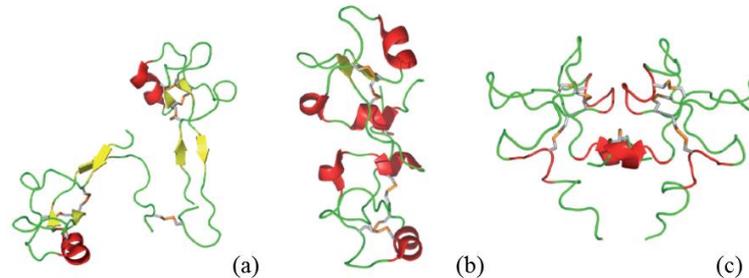


Figura 1.5 Le forme dimeriche dei TFF. (a) Forma omodimerica di TFF1. (b) TFF2 come dimerico naturale. (c) Forma omodimerica di TFF3.

1.2.4 Regolazione trascrizionale di TFF1

I tre TFF umani sono codificati da tre geni diversi localizzati sul cromosoma 21 in una regione di circa 55 kb (Figura 1.6): questa disposizione, oltre alla somiglianza strutturale, avvalorata l'ipotesi di una possibile evoluzione da un gene ancestrale comune tramite duplicazione (Mashimo *et al.*, 1995; Seib *et al.*, 1997). 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). I tre peptidi della famiglia trifoglio hanno differenti *pattern* di espressione lungo il tratto gastrointestinale e l'espressione tessuto-specifica dei vari peptidi riflette lo stato di metilazione dei promotori.

È stato osservato che nei tessuti dove TFF1 è fisiologicamente espresso, il suo promotore prossimale è ipometilato; al contrario, negli organi dove non è espresso, il promotore è ipermetilato. Esso risulta infatti ipometilato nello stomaco, parzialmente metilato nell'intestino, nel pancreas e nel colon e quasi completamente metilato nei tessuti non gastrointestinali (Ribieras *et al.*, 2001).

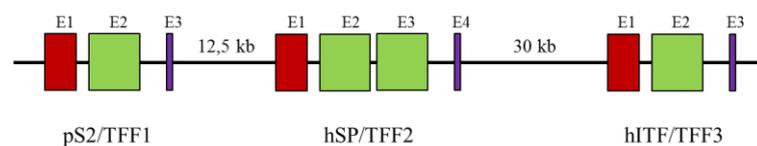


Figura 1.6 Disposizione dei geni dei fattori trifoglio sul cromosoma 21 umano. I quadrati rappresentano gli esoni: in rosso l'estremità N-terminale, in verde il dominio trifoglio, in viola l'estremità C-terminale.

L'espressione di TFF1 è regolata da diversi fattori di trascrizione coinvolti in diversi *pathway* cellulari, ma è diventato soprattutto un modello per lo studio della regolazione trascrizionale mediata da estrogeni in cui intervengono meccanismi epigenetici. Esso possiede un'unica sequenza consenso responsiva agli estrogeni che si trova circa 400 basi a monte del sito di inizio della trascrizione (TSS - *Transcription Start Site*), due nucleosomi chiamati nuCT e nuCE contenenti rispettivamente la TATA box e l'ERE (*Estrogen-Responsive Element*) e diversi

dinucleotidi CG (Figura 7) (Berry *et al.*, 1989). L'organizzazione del promotore presenta due vantaggi: innanzitutto lo stimolo estrogenico è sentito da una regione limitata di circa 700 bp intorno al sito di inizio della trascrizione, inoltre è possibile sincronizzare le cellule per ottenere una risposta contemporanea.

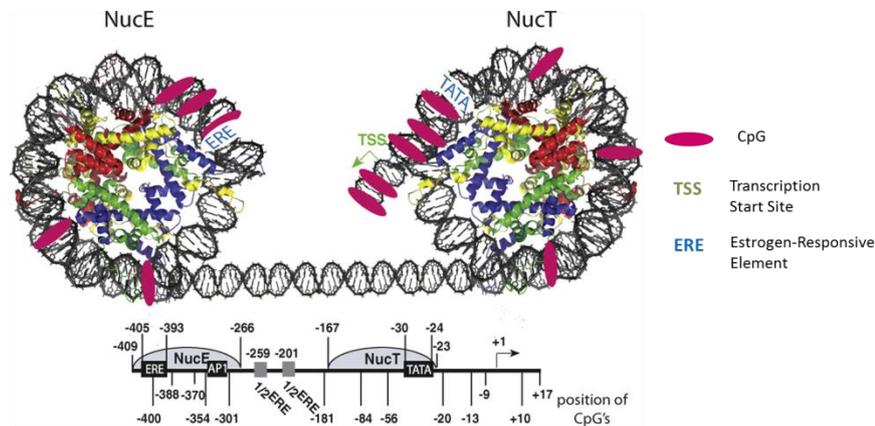


Figura 1.7 Rappresentazione del promotore di TFF1.

Nella regolazione trascrizionale mediata dagli estrogeni in cellule di carcinoma mammario si assiste ad un ciclico e dinamico cambio nello stato di metilazione del promotore, che regola finemente l'espressione di TFF1 (Kangaspeka *et al.*, 2008; Métivier *et al.*, 2008). Da una approfondita analisi dello stato di metilazione, si è stabilito che gli eventi di metilazione e demetilazione ciclici avvengono con una frequenza precisa (Reid *et al.*, 2008).

In una linea cellulare di tumore della mammella esprime TFF1 (MCF-7) è stato riscontrato un ridotto livello di metilazione in quasi tutti i dinucleotidi CpG del promotore; in un'altra linea cellulare di tumore della mammella non esprime TFF1 (BT20) i dinucleotidi CpG erano tutti metilati tranne uno che è metilato nel 50% dei campioni. Il diverso grado di metilazione del promotore indica che solo alcune CpG sono correlate con l'espressione del gene (Martin *et al.*, 1995). Studi effettuati sul promotore di TFF1 hanno rivelato l'esistenza di una classe di proteine chiamate MBD (*methyl-CpG-binding domain protein*) che legano i dinucleotidi CpG metilati e inducono il silenziamento genico in seguito al reclutamento di diversi enzimi come istone deacetilasi (HDAC) e istone metiltransferasi (HMT) (Hendrich *et al.*, 1998). In particolare sul promotore di TFF1 è stato osservato che MBD2, un membro della famiglia di proteine contenenti il dominio *methyl-CpG-binding*, è capace di legarsi alle CpG metilate in prossimità della TATA box e non in prossimità della regione sensibile agli estrogeni, concorrendo ad una regolazione negativa di TFF1. Il legame di ER α all'ERE è indipendente dallo stato di metilazione, di conseguenza il legame di MBD2 in prossimità della TATA-box riduce ma non abolisce la risposta di TFF1 a ER α . Si deduce che ER α e MBD2 hanno un ruolo opposto nella regolazione trascrizionale di TFF1: la parziale repressione mediata da MBD2 può essere revertita dall'attività regolatoria positiva di ER α , spiegando anche i livelli di espressione di TFF1 in alcuni tumori che mostrano elevati livelli ER α e contemporanea metilazione del promotore in prossimità della TATA-box (Chatagnon *et al.*, 2010).

Un altro meccanismo epigenetico in grado di regolare l'espressione di TFF1 sono le modifiche istoniche. È stato dimostrato che in cellule di carcinoma mammario dipendente dagli estrogeni, in presenza di estradiolo, il recettore degli estrogeni α

(*Estrogen Receptor α* - ER α) si associa alla sua sequenza di riconoscimento e stimola il reclutamento di un complesso di rimodellamento della cromatina e di istone acetiltransferasi e metiltransferasi. In particolare è interessante la monometilazione della lisina 20 dell'istone H4, presente sia nella fase di inizio della trascrizione che nella fase di elongazione. Tale modifica è catalizzata esclusivamente dalla lisina metiltransferasi PR-Set7, un enzima che è in grado di interagire con il recettore degli estrogeni e con l'RNA polimerasi II: il suo coinvolgimento nelle due fasi della trascrizione è stato spiegato ipotizzando che nella fase di inizio della trascrizione l'enzima è reclutato sul promotore da ER α il quale in seguito lo rilascia alla polimerasi II nella fase di elongazione.

Da studi recenti è emerso che esiste un particolare tipo di ncRNA il miRNA-423-5p (microRNA), capace di regolare negativamente l'espressione di TFF1. In particolare il miRNA-423-5p si lega alla regione 3' non tradotta (3'UTR- *Untranslated region*) sull'mRNA di TFF1 partecipando ai processi di proliferazione e/o invasione TFF-dipendenti, in cellule di cancro gastrico (Liu *et al.*, 2014).

Oltre che da meccanismi epigenetici, l'espressione di TFF1 è regolata da fattori trascrizionali. A monte dell'ERE è presente un sito di legame per Sp1 e Sp3, fattori di trascrizione espressi ubiquitariamente che in genere agiscono come attivatori, ed è stato dimostrato che ER α e Sp1 hanno un ruolo sinergico nell'attivazione di TFF1 (Li *et al.*, 2008). In questa regione è presente anche un sito in grado di legame per HNF3 (*Hepatocyte Nuclear Factor*), un fattore di trascrizione attivato durante la risposta di fase acuta che induce la trascrizione di TFF1 in linee cellulari di tumore pancreatico e gastrico (Beck *et al.*, 1999; Lacroix *et al.*, 2004). 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 *et al.*, 2009). TFF1 è regolato anche da GATA-6, fattore che appartiene ad una famiglia di proteine contenenti un dominio 'zinc-finger', che induce la trascrizione di TFF1 e TFF2 in cellule di tumore gastrico (Al-azzeq *et al.*, 2002).

Nel tratto digerente il fattore di crescita epidermico EGF (*Epidermal Growth Factor*) è il principale fattore che regola l'espressione di TFF1 (Wright *et al.*, 1990); d'altra parte è stato dimostrato che TFF1 attiva il recettore per l'EGF causandone un aumento dell'espressione (Liu *et al.*, 1997). TGF α (*Transforming Growth Factor*) è il principale ligando dell'EGFR e regola positivamente l'espressione di TFF1 (Ebert *et al.*, 1999).

I TFF sono in grado di potenziare la loro espressione tramite auto-induzione ed induzione incrociata con un meccanismo che coinvolge la fosforilazione di EGFR e il *pathway* Ras/MEK/MAPK (Taupin *et al.*, 1999). I promotori dei tre fattori trifoglio contengono un sito di legame per le USF (Upstream Stimulating Factor) in una regione chiamata E-box che attiva la trascrizione, tali fattori sono associati con l'inibizione della crescita cellulare (Qyang *et al.*, 1999).

È stato dimostrato che le citochine proinfiammatorie IL-1 β e IL-6 reprimono l'attività del promotore di TFF1 e la sua espressione tramite l'inibizione di NF-kB e C/EBP β suggerendo che l'aumento dell'infiammazione che accompagna la trasformazione neoplastica causa una riduzione dei livelli di TFF1 (Dossinger *et al.*, 2002). Un recente lavoro ha mostrato come la regolazione reciproca tra NF-kB e TFF1 impedisce la progressione da uno stato infiammatorio avanzato ad uno stato canceroso (Soutto *et al.*, 2011).

È stato dimostrato inoltre, che l'espressione di TFF1 può essere stimolata anche dalla gastrina, un ormone prodotto dalla mucosa dello stomaco che stimola la secrezione di enzimi digestivi e acido cloridrico, suggerendo che tale peptide possa

avere un ruolo nella protezione della mucosa gastrica (Khan *et al.*, 2003).

Un altro fattore di trascrizione che induce l'espressione di TFF1 è PPAR- γ , un membro della famiglia dei *Peroxisome Proliferator-Activated Receptors* coinvolto nella patogenesi di obesità, diabete, aterosclerosi e cancro (Shimada *et al.*, 2003).

In figura 1.8 sono riportati alcuni fattori di trascrizione che regolano l'espressione di TFF1, come descritto in questo paragrafo.

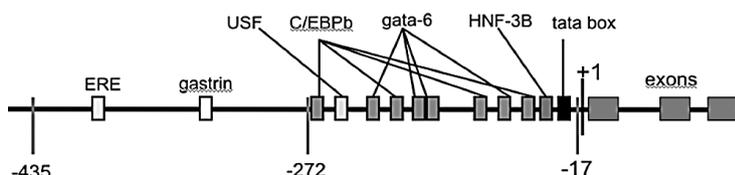


Figura 1.8 Rappresentazione schematica del promotore di TFF1 e alcuni fattori di trascrizione che ne regolano l'espressione.

1.2.5 Modifiche post-traduzionali

I TFF neo-sintetizzati contengono una sequenza di circa 21-27 aminoacidi che contiene il segnale per la secrezione e che viene rimossa tramite proteolisi durante il passaggio nel reticolo endoplasmatico, portando alla forma matura dei peptidi. TFF1 viene prodotto come pro-peptide di 84 aminoacidi dal quale origina la forma matura del peptide di 60 aminoacidi contenente un singolo dominio trifoglio di 42 aminoacidi. Il secondo peptide TFF2 è una proteina composta da 106 aminoacidi in una singola catena, con 7 ponti disolfuro e due domini trifoglio. Nell'uomo TFF2 è glicosilato tramite un legame N-glicosilico, presumibilmente sul residuo di asparagina in posizione 15 che fa parte del sito consenso per l'N-glicosilazione (May *et al.*, 2000). L'ultimo fattore trifoglio TFF3 è costituito da 59 aminoacidi ed un dominio trifoglio di 42 aminoacidi (Thim e May, 2005).

1.2.6 Localizzazione tissutale dei fattori trifoglio

Nell'uomo i TFF sono espressi principalmente lungo il tratto gastrointestinale, in particolare TFF1 dalle cellule epiteliali dello stomaco, TFF2 dalle cellule mucosali dello stomaco e dalle ghiandole di Brunner duodenali, TFF3 dalle cellule caliciformi mature dell'intestino e sulla superficie della mucosa intestinale. Mentre TFF2 è localizzato solo nello stomaco e nell'intestino, TFF1 e TFF3 sono espressi anche dalle cellule sierose delle ghiandole salivari e dai dotti biliari e pancreatici (Figura 1.9) (Madsen *et al.*, 2007).

Al di fuori dell'apparato digerente e degli organi associati, i peptidi si ritrovano in piccole quantità anche nel cervello (Jagla *et al.* 2000; Hinz *et al.* 2004). TFF1 è localizzato nei dotti della ghiandola mammaria e TFF3 nelle ghiandole mucosali della vagina. Inoltre TFF1 e TFF3 sono localizzati nelle vie aeree superiori (Lee *et al.* 2001) e nella congiuntiva dell'occhio (Langer *et al.*, 1999). La presenza dei TFF è rilevabile anche nell'utero, nella mammella, in alcune regioni ipotalamiche, nell'ipofisi e nelle ghiandole salivari e lacrimali (Taupin e Podolsky, 2003).

In conclusione si può affermare che i TFF sono molecole secrete in tessuti 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). TFF1 e TFF3 sono strutturalmente simili e spesso colocalizzano sulle superfici mucose.

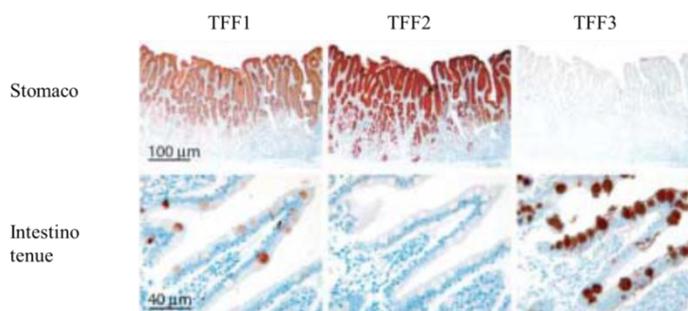


Figura 1.9 Immagini di immunistochemica che mostrano la localizzazione tissutale di TFF1, TFF2 e TFF3 nello stomaco e nell'intestino tenue.

1.2.7 Funzione fisiologica dei fattori trifoglio

Come descritto in precedenza, i fattori trifoglio costituiscono, insieme alle mucine, uno strato di muco che contribuisce a proteggere le mucose da danni causati da agenti a cui il tratto gastrointestinale è costantemente esposto quali microrganismi, tossine, fattori immunogenici e sostanze chimiche dannose contenute negli alimenti o che si liberano da essi tramite la digestione. Anche gli stessi enzimi digestivi secreti nel lume dello stomaco e dell'intestino o l'acidità gastrica possono causare un danno chimico e meccanico a carico della mucosa gastrointestinale. La funzione dello strato mucoso è quella di lubrificare la superficie ed impedire il contatto diretto tra le cellule e l'ambiente esterno.

Il suo principale costituente sono le mucine, glicoproteine caratterizzate da un core proteico chiamato apo-mucina su cui sono legati oligosaccaridi *O-linked*. Le mucine che formano il muco sono secrete dalle cellule a calice intestinali e dalle cellule delle mucose (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6 e MUC19) e formano una fitta rete di complessi polimeri grazie alla presenza di un dominio ricco di cisteine in grado di formare ponti disolfuro intra- ed intermolecolari che conferiscono al muco particolari caratteristiche reologiche di elasticità, viscosità e viscoelasticità.

Ogni peptide trifoglio viene secreto con una mucina specifica con cui interagisce tramite i domini vWFC (von Willebrand Factor C) delle mucine stesse, ricchi di cisteine e localizzati all'estremità C-terminale (Tomasetto *et al.*, 2000). Il legame dei peptidi trifoglio con le mucine modifica le proprietà reologiche del muco, in particolare TFF2 rende il muco più viscoso mentre TFF1 e TFF3 lo rendono meno viscoso. Tale differenza e la localizzazione specifica dei peptidi trifoglio e delle mucine riflettono il diverso tipo di protezione di cui necessitano i diversi tratti del tubo digerente: nello stomaco e nel duodeno il muco viscoso protegge dall'azione degli acidi gastrici e degli enzimi digestivi; nell'intestino il muco meno viscoso è utile per rimuovere batteri e microparticelle senza inibire l'assorbimento dei nutrienti (Thim *et al.*, 2002).

Nello stomaco e nel colon sono presenti due strati di muco: uno strato esterno "lasso", che si allontana facilmente e uno strato mucoso interno "compatto" attaccato all'epitelio cellulare. Nello stomaco lo strato di muco agisce come una barriera di diffusione per l'acido cloridrico: le cellule epiteliali producono bicarbonato, creando un

gradiente di pH, più acido nel lume e neutro a contatto con lo strato cellulare. Lo strato di muco interno esclude i batteri ed è costituito principalmente da MUC5AC, con cui TFF1 colocalizza ed interagisce (Atuma *et al.*, 2001; Ruchaud-Sparagano *et al.*, 2004).

Malgrado l'esistenza di questo sistema di protezione, l'epitelio gastrointestinale può perdere la sua integrità attivando immediatamente il processo di restituzione per riparare la lesione che avviene in tempi molto brevi. Immediatamente dopo il danno, si osserva la migrazione di cellule dalle zone circostanti verso la sede del danno per coprire la mucosa danneggiata; in un secondo momento le cellule vanno incontro a proliferazione, maturazione e differenziazione ripristinando così la normale attività dell'epitelio mucosale (Figura 1.10). In questo processo sono coinvolti molti fattori di crescita e citochine tra cui EGF, VEGF, IL-1 e IL-2 che favoriscono il processo di restituzione epiteliale attraverso un *pathway* dipendente dal TGF- β , al contrario i TFF stimolano tale processo in associazione con le mucine tramite un meccanismo indipendente dal TGF- β (Sturm *et al.*, 2008; Dignass *et al.*, 1994).

I fattori trifoglio infatti sembrano essere coinvolti nelle differenti fasi della restituzione, modulando il contatto cellula-cellula, la migrazione cellulare, l'apoptosi e l'angiogenesi (Taupin e Podolsky, 2003). Essi promuovono la migrazione cellulare riducendo le interazioni cellula-cellula e cellula-matrice. È stato osservato che TFF1 stimola la migrazione di cellule MCF-7 di carcinoma mammario e la sua forma dimerica è più potente di quella monomerica. Questo risultato suggerisce che TFF1 possa agire tramite un recettore di superficie come molti ormoni e fattori di crescita. Inoltre TFF1 induce la riorganizzazione del citoscheletro tramite la via di segnalazione di RhoA, funzionando come un chemoattrattante (Prest *et al.*, 2002; Emami *et al.*, 2004). È stato inoltre dimostrato che TFF1 protegge le cellule dall'apoptosi che può avvenire in seguito a danno epiteliale, in particolare bloccando parzialmente o completamente l'attività della caspasi 9, a monte della cascata di caspasi (Bossenmeyer-Pourie *et al.*, 2002). Contrariamente all'effetto anti-apoptotico, TFF1 è anche capace di inibire la proliferazione cellulare modulando la transizione del ciclo cellulare dalla fase G1 alla fase S. Tale evento è strettamente regolato in quanto esso determina la progressione della cellula nella fase di proliferazione. TFF1 riduce la progressione cellulare dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare, inibendo così la proliferazione. Tale transizione è finemente regolata e i principali attori sono il fattore di trascrizione E2F e l'oncosoppressore pRb: pRb lega la forma non fosforilata di E2F arrestando la cellula in fase G1; quando è fosforilato, E2F attiva la trascrizione genica e promuove il passaggio alla fase S del ciclo cellulare. TFF1 causa un aumento di pRb e di conseguenza una diminuzione dell'attività di E2F. Oltre ad aumentare pRb, TFF1 fa aumentare i livelli di inibitori delle chinasi ciclina-dipendenti (Cdk) appartenenti alle famiglie INK4 e CIP causando così una ridotta fosforilazione di E2F con un effetto anti-proliferativo.

Un'altra fase fondamentale nel processo di restituzione epiteliale e in altri processi fisiologici e patologici è la formazione di vasi sanguigni a cui TFF1 contribuisce attraverso l'attivazione della ciclossigenasi COX-2 e del recettore del fattore di crescita epidermico EGF-R. In generale è stato dimostrato che i TFF possiedono attività pro-angiogenica paragonabile a quella indotta dal VEGF e dal TGF- β (Rodrigues *et al.*, 2003).

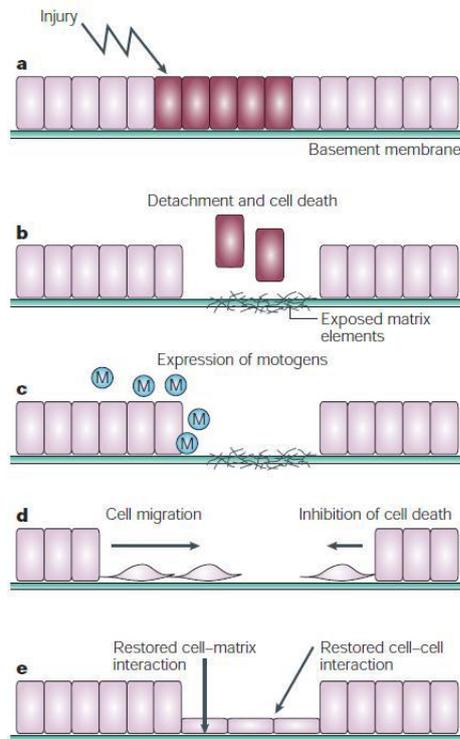


Figura 1.10 Rappresentazione schematica della restituzione epiteliale.

1.2.8 TFF1 nei processi patologici

Un'espressione aberrante di TFF1 è riportata in molte malattie infiammatorie gastrointestinali e nello sviluppo di diverse neoplasie. L'espressione di TFF1 è notevolmente indotta in seguito a lesioni della mucosa, in particolare nel processo infiammatorio i TFF sono espressi ectopicamente dalle UACL (*Ulcer-Associated Cell Lineage*). Tali cellule sono state identificate nelle aree di ulcerazione cronica delle cripte intestinali, dove assumono una struttura granulare e sono deputate alla secrezione di TFF e di EGF (*Epidermal growth factor*) entrambi coinvolti nel processo di riparazione del danno (Wright *et al.*, 1990). Un'alterazione dell'espressione dei TFF è stata osservata anche in altre condizioni infiammatorie quali pancreatiti (Ebert *et al.*, 1999), sindrome da reflusso gastro esofageo (GERD) (Peitz *et al.*, 2004), esofagite di Barrett (van Baal *et al.*, 2008), morbo celiaco (Vannay *et al.*, 2010), infezione da *H. pylori* e molte neoplasie.

Le proprietà dei peptidi trifoglio sono essenziali per la rigenerazione dei tessuti epiteliali ma 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. Il loro coinvolgimento nella genesi dei processi neoplastici infatti, è ascrivibile all'interferenza con processi biologici cruciali per la vita della cellula come proliferazione cellulare, differenziamento, apoptosi e angiogenesi.

TFF1 è principalmente associato al carcinoma mammario e al cancro gastrico, ma sono state descritte alterazioni anche nel tumore della prostata, del pancreas, dell'esofago, del colon-retto e del polmone (Regalo *et al.*, 2005).

Non è completamente chiaro il ruolo di TFF1 nel tessuto mammario anche se alcune evidenze suggeriscono che sia coinvolto nell'ontogenesi della ghiandola mammaria e nel rimodellamento del tessuto normale (Andrew and Ewald, 2010). Nei tessuti mammari normali è stata osservata una scarsa o nulla espressione di TFF1 rispetto ai tessuti neoplastici in cui si riscontra un'elevata percentuale del peptide (Poulsom *et al.*, 1997). È stato riscontrato un aumento dell'espressione di TFF1 in più del 50% dei casi di carcinoma mammario rispetto al tessuto normale, con una marcata relazione con l'espressione del recettore per gli estrogeni (ER) e prognosi positiva (Rio *et al.*, 1987). In questo tessuto l'espressione di TFF1 è regolata da meccanismi epigenetici e dalla stimolazione ormonale estrogenica. In generale carcinomi della mammella sensibili agli estrogeni, presentano elevati livelli di espressione di TFF1 e correlano con una prognosi favorevole perché rispondono in modo più efficiente ad un trattamento ormonale con antiestrogeni (Foekens *et al.*, 1990; Schwartz *et al.*, 1991). Dunque l'espressione della proteina è associata a tumori ben differenziati la cui prognosi è favorevole (Corte *et al.*, 2006). 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).

Recentemente è stato condotto uno studio utilizzando cellule normali e tumorali ER-positivo ed ER-negativo per chiarire il ruolo di TFF1 nel carcinoma mammario: è stato osservato che TFF1 da solo non è in grado di indurre un fenotipo tumorale, al contrario la sua presenza riduce la progressione tumorale (Buache *et al.*, 2011). Nella linea di carcinoma mammario MCF-7 ER-positivo il promotore di TFF1 è ipometilato e la proteina viene espressa sotto il controllo estrogenico. La linea di carcinoma mammario MDA-MB-231 ER-negativa non esprime TFF1 ed il promotore è completamente metilato. Una situazione intermedia si osserva nella linea HeLa di cancro della cervice uterina in cui le CpG sono mediamente metilate (Martin *et al.*, 1997; Brown *et al.*, 1984; Chatagnon *et al.*, 2010). Nonostante nel corso degli anni siano state effettuate numerose 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.

Al contrario, nella maggior parte dei tumori gastrici si osserva una riduzione di TFF1, fino alla perdita, spesso associata ad ipermetilazione del promotore. In molti tumori gastrici e metaplasie intestinali il promotore di TFF1 è ipermetilato indicando che tale meccanismo potrebbe avere un ruolo nelle prime fasi della cancerogenesi nello stomaco (Fujimoto *et al.*, 2000). Oltre alla metilazione del DNA, la perdita di TFF1 nel cancro gastrico è comunemente dovuta a perdita del secondo allele (LOH - *Loss of Heterozygosity*), delezione della regione cromosomica in cui si trova TFF1, e, in alcuni rari casi, mutazioni somatiche (Carvalho *et al.*, 2002). In particolare sono state descritte cinque mutazioni puntiformi frequenti nei tumori gastrici umani che ricadono nella regione che codifica per il dominio trifoglio. Probabilmente tali mutazioni modificano la struttura di TFF1 compromettendone il funzionamento, riducendo il potere protettivo nei confronti delle mucose e aumentando la possibilità di sviluppare un carcinoma gastrico a causa della perdita di eterozigosi. (Park *et al.*, 2000).

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. La gastrina esplica un ruolo anti-tumorale regolando positivamente l'espressione di TFF1 e contrapponendosi anche ad eventi che promuovono la metilazione del suo promotore (Tomita *et al.*, 2011).

Recenti pubblicazioni confermano anche un differente *pattern* di metilazione sul promotore di TFF1 nel tumore prostatico (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 ipometilazione dei promotori (Vestergaard *et al.*, 2010).

1.2.9 Il modello murino TFF1-KO

Uno strumento utile per lo studio e la comprensione dei processi fisiopatologici in cui TFF1 è coinvolto è stato il modello murino geneticamente modificato (*knock-out*) in cui la sua espressione è soppressa (*tff1^{-/-}*). La caratterizzazione anatomico-morfologica dei topi ha evidenziato varie anomalie, come una marcata iperplasia e displasia della mucosa gastrica dell'antra e del piloro dopo 5 mesi di vita. Tutti i topi sviluppano, inoltre, adenoma antropilorico ed il 30% di essi presenta un carcinoma intraepiteliale o intramucosale (Figura 1.11). Anche l'intestino tenue presentava 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'antra e del piloro (Lefebvre *et al.*, 1996).

Il modello di topo TFF1-*knockout* ha dimostrato che la sua presenza è fondamentale per il corretto differenziamento della mucosa gastrointestinale e ha fornito la prima prova a sostegno del ruolo di TFF1 come oncosoppressore gastro-specifico.

Nonostante i sostanziali avanzamenti delle conoscenze degli ultimi anni, restano però molti aspetti da chiarire tra gli eventi che portano allo sviluppo di neoplasie dipendenti dalla ridotta espressione del fattore peptidico TFF1.

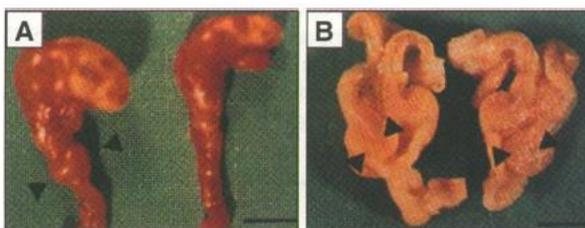


Figura 1.11 Analisi istologica dello stomaco e del duodeno in topi TFF1^{-/-} (sinistra) rispetto a topi WT (destra). (A) immagine macroscopica e (B) sezione dello stomaco e del duodeno. Le frecce indicano adenoma antropilorico.

1.3 Rame

1.3.1 Ruolo biologico

Il rame è un micronutriente essenziale presente in due stati di ossidazione Cu(I) e Cu(II). Nei sistemi biologici è cofattore di diversi enzimi che prendono il nome di cuproproteine o cuproenzimi che generalmente, sfruttando le proprietà ossidoriduttive del metallo, catalizzano reazioni di trasferimento elettronico (Hamza e Gitlin, 2002). Essi sono presenti in processi ossidoriduttivi come la respirazione mitocondriale, la detossificazione da radicali superossido, la sintesi del tessuto connettivo, la biosintesi di neurotrasmettitori e pigmenti melaninici, il metabolismo del ferro. In generale le proteine che legano il rame (enzimi e trasportatori) sono caratterizzate dalla presenza di domini MBS (*Metal Binding Sequence*) contenenti residui di cisteina, metionina o istidina in grado di coordinare il metallo. Un esempio di cuproenzima è la citocromo-c ossidasi che si trova alla fine della catena di trasporto degli elettroni ed ossida l'ossigeno molecolare ad acqua. La ceruloplasmina, invece è un trasportatore del rame ed è un'ossidasi che trasforma lo ione ferroso in ione ferrico che può essere trasportato dalla transferrina. Un'altra cuproproteina degna di nota è la superossido dismutasi che catalizza la conversione dello ione superossido ad acqua e ossigeno, prevenendo i danni causati dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS). Inoltre il rame regola l'espressione delle metallothioneine, una famiglia di proteine caratterizzate da un ricco contenuto in cisteine. Esse sono coinvolte nella regolazione dei metalli essenziali e nella protezione contro la tossicità dei metalli pesanti e lo stress ossidativo. La loro produzione dipende a sua volta dalla disponibilità di elementi essenziali.

Il rame dunque, regola l'espressione delle proteine coinvolte nel suo metabolismo. Esso entra nel nucleo e si lega a proteine regolatorie, per esempio fattori di trascrizione che diventano così in grado di interagire con elementi responsivi ai metalli (MRE), sequenze nucleotidiche specifiche che si trovano a monte dei geni regolati dalla presenza di metalli. Oltre agli MRE, nei mammiferi sono presenti altri elementi regolatori come Sp1 e AP-2 che probabilmente interagiscono per formare un complesso di trascrizione funzionale per l'espressione dei geni (Uauy *et al.*, 1998).

1.3.2 Meccanismi di omeostasi

Il metabolismo del rame è finemente controllato a causa dell'alta reattività della coppia redox $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^{3+}$ che può causare la produzione di radicali liberi dell'ossigeno, estremamente dannosi per le cellule: i processi di assorbimento, distribuzione ed utilizzo del rame sono finemente regolati e coordinati da pompe ATPasiche, trasportatori di membrana e *chaperone* molecolari (Peña *et al.*, 1999). Il rame è assorbito principalmente a livello gastrico e duodenale dove gli enterociti esprimono sulla porzione apicale una proteina integrale di membrana hCTR1 (human Copper TRansporter) costituita da tre subunità che formano un canale selettivo ad alta affinità per lo ione rameoso. Il trasportatore è associato ad una metalloreduttasi che consente l'ingresso del ione rameico nella cellula dopo averlo ridotto a ione rameoso (Figura 1.12) (Nose *et al.*, 2006; Ohgami *et al.*, 2006). L'espressione di hCTR1 è regolata dal fattore trascrizionale Sp1 che aumenta in condizioni di carenza di rame, hCTR1 a sua volta controlla i livelli di rame intracellulare e di Sp1 (Song *et al.*, 2008; Liang *et al.*, 2012).

Il rame infine, può essere assorbito anche tramite un trasportatore di cationi bivalenti DMT1 (Divalent Metal Transporter 1) che non è specifico ed è anche responsabile del trasporto ad alta affinità dello ione ferroso (Gunshin *et al.*, 1997).

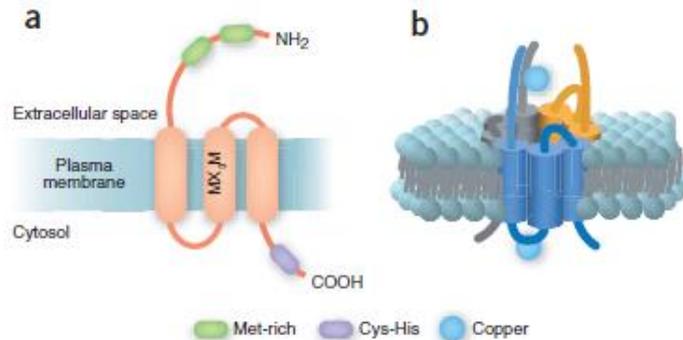


Figura 1.12 Struttura del trasportatore hCTR1.

Il rame si accumula nell'enterocita e viene escreto attraverso l'ATPasi ATP7A presente sulla porzione basolaterale (Kim *et al.*, 2008). Nella malattia di Menkes il gene è mutato e produce una proteina difettosa che determina un ridotto efflusso di rame dalle cellule intestinali, causando un grave disordine sistemico infantile caratterizzato da neurodegenerazione (Tümer *et al.*, 1998). Una volta escreto dagli enterociti, il metallo entra nel circolo sanguigno e, tramite il sistema portale, raggiunge il fegato, la sede principale di accumulo che ne regola i livelli ematici, lo distribuisce ai tessuti o lo elimina nella bile (Figura 1.13) (Wirth *et al.*, 1985; Kim *et al.*, 2008).

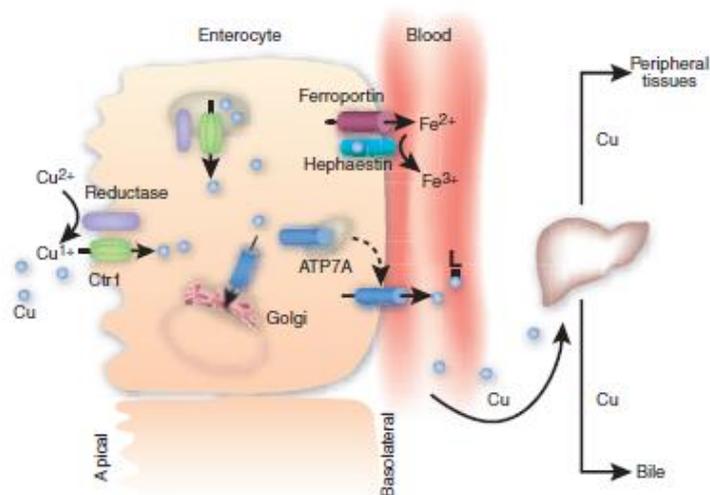


Figura 1.13 Modello per l'assorbimento intestinale del rame.

Il rame entra negli epatociti attraverso hCTR1 e nel citosol si lega a *chaperone* che lo trasferiscono ai diversi compartimenti cellulari. Il metallo viene trasportato nell'apparato di Golgi dal trasportatore ATP7A e incorporato nella ceruloplasmina che viene secreta tramite vescicole ed entra nel circolo sistemico rappresentando la principale fonte di rame per tutti gli organi del sistema animale. La ceruloplasmina è

una ferrosidasi rame-dipendente che trasporta il 90% del rame sierico ed è importante per la distribuzione sistemica del ferro, catalizzando la sua ossidazione per favorirne il legame alla transferrina. Nelle cellule dei tessuti periferici il rame viene incorporato nelle proteine che devono essere secrete come cuproenzimi. In situazioni di eccesso di rame all'interno dell'epatocita, ATP7B lo elimina nella bile in una forma non più assorbibile e in seguito viene escreto con le feci (Figura 1.14). Mutazioni geniche di ATP7B causano la malattia di Wilson che determina accumulo di rame nei tessuti epatici e cerebrali con conseguenti danni epatici e neuropsichiatrici (Bull *et al.*, 1993).

In figura 1.15 è riportato uno schema riassuntivo della distribuzione del rame nei vari organi e tessuti.

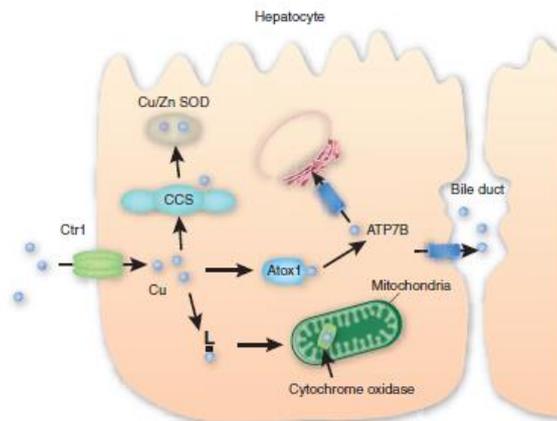


Figura 1.14 *Metabolismo epatico del rame.*

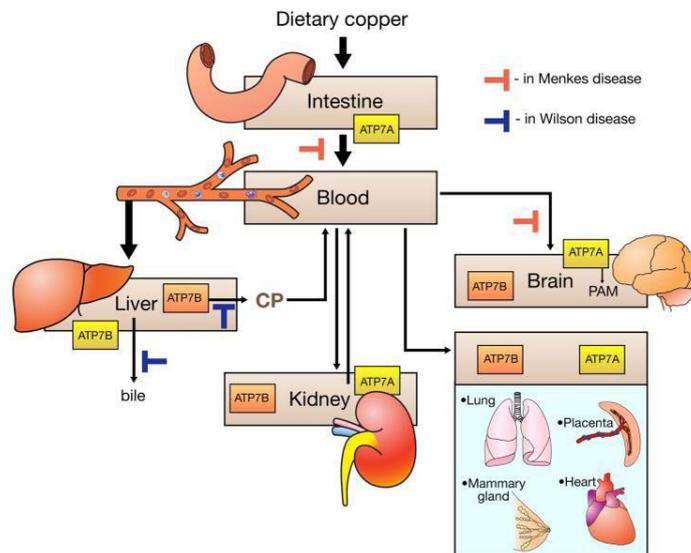


Figura 1.15 *Schema semplificato della distribuzione del rame nel corpo.*

1.3.3 Rame e cancro

Il rame rappresenta un marker diagnostico per molti tumori in quanto è presente in quantità elevate nel siero e nelle cellule tumorali, sia nei tumori solidi che nei tumori del sangue. Inoltre, l'aumento del rame è fondamentale nella progressione tumorale per la crescita tumorale e la formazione di metastasi. Questi processi dipendono dall'angiogenesi in cui il rame svolge un ruolo fondamentale: stimola la proliferazione e la migrazione delle cellule endoteliali inducendo la produzione di mediatori dell'angiogenesi, come il fattore di crescita vasoendoteliale VEGF, il fattore di crescita basico dei fibroblasti (bFGF), l'interleuchina 1 (IL-1) e l'interleuchina 8 IL-8. Il rame è necessario per l'attivazione del fattore inducibile dall'ipossia HIF-1, il principale fattore di trascrizione che regola l'espressione di VEGF (Pan *et al.*, 2002). Il metallo è indispensabile per l'interazione di HIF-1 con la sequenza responsiva all'ipossia e consente la formazione del complesso trascrizionale contenente HIF-1, attivando la trascrizione dei geni target (Xie *et al.*, 2009).

Data l'importanza dell'angiogenesi e del rame per lo sviluppo tumorale, l'uso di chelanti del rame per la terapia anti-angiogenica è emerso come un concetto interessante in terapie anti-tumorali. Composti in grado di chelare il rame, sviluppati per il trattamento della malattia di Wilson, mostrano un effetto anti-angiogenico e si sono rivelati essere una strategia anti-tumorale promettente. Il chelante del rame più studiato è il tetratiomolibdato che è stato osservato essere in grado di ridurre i mediatori proangiogenici e inibire l'angiogenesi *in vitro*: sembra che ci sia inibizione di VEGF e altre citochine, ma il meccanismo molecolare tramite cui la carenza di rame regola questi processi rimane ancora da capire (Hassouneh *et al.*, 2007).

È inoltre in fase di sperimentazione l'uso del rame al posto del platino presente nei chemioterapici più comuni. Questi complessi di coordinazione sembrano essere più potenti e meno tossici verso le cellule non tumorali e potrebbero potenzialmente eludere la chemioresistenza associata con il trattamento regolare con platino. Inoltre le cellule tumorali possono adattare i meccanismi di omeostasi del rame per acquisire resistenza ai farmaci a base di platino e alcuni complessi di coordinazione del rame possono risensibilizzare le cellule tumorali a questi farmaci (Denoyer *et al.*, 2015).

1.3.4 Rame e TFF1

Recentemente è stata evidenziata un'interessante correlazione strutturale e funzionale tra il TFF1 e il rame, in seguito all'osservazione di un aumento dell'espressione del fattore in topi alimentati con diete carenti del metallo (Tosco *et al.*, 2010a). È stato in seguito dimostrato che la proteina è in grado di legare il rame con un rapporto stechiometrico 1:1 tramite la sua estremità C-terminale dove è presente un cluster conservato di residui di glutammato carichi negativamente che si dispongono intorno alla Cys58. La selettività del legame sta nel fatto che TFF1 non interagisce con altri cationi bivalenti, fatta eccezione per il calcio per cui mostra una ridotta affinità. Il legame con il rame sembra favorire alcune proprietà del fattore trifoglio: aumenta la resistenza alle proteasi e la stabilità della proteina in quanto conferisce una maggiore compattezza alla coda C-terminale, promuove l'omodimerizzazione di TFF1 e aumenta la sua attività motogenica (Tosco *et al.*, 2007; Tosco *et al.*, 2010b). La forma omodimerica di TFF1 è anch'essa capace di legare il rame grazie alla formazione di una regione fortemente acida dovuta all'avvicinamento delle due estremità C-terminali. Tra i fattori trifoglio, TFF3 è quello che con TFF1 condivide un'elevata similarità di sequenza e di struttura infatti, può

formare omodimeri e possiede due residui di acido glutammico intorno al settimo residuo di cisteina all'estremità C-terminale (Figura 1.16). È stato dimostrato che la forma monomerica di TFF3 presenta un comportamento del tutto analogo a TFF1 in quanto lega il rame in un rapporto stechiometrico 1:1 e lega il calcio in misura inferiore (Esposito *et al.*, 2015).



Figura 1.16 Allineamento tra le sequenze di TFF1 e TFF3. In azzurro gli aminoacidi identici, in rosso le cisteine, in verde i residui di acido glutammico all'estremità C-terminale coinvolti nell'interazione con il rame.

Oltre che a livello strutturale, il rame ha un effetto anche sulla secrezione di TFF1. In presenza del metallo, il fattore trifoglio viene trattenuto all'interno della cellula e ne viene secreto di meno: probabilmente la proteina intracellulare chela il rame proteggendo la cellula dalla tossicità del metallo. In particolare è stato osservato un accumulo della proteina nel Trans-Golgi Network, un compartimento fondamentale per l'omeostasi cellulare del rame. Analogamente, la presenza di TFF1 all'interno della cellula determina un accumulo intracellulare di rame. La presenza di rame, oltre a favorire l'aumento della forma omodimerica di TFF1 coinvolta nella strutturazione del gel mucoso grazie alla sua interazione con la mucina MUC5AC, determina l'ispessimento dello strato mucoso e quindi conferisce una maggiore protezione della mucosa intestinale. In conclusione l'interazione con il rame influenza l'attività di TFF1, inoltre lo stesso fattore trifoglio sembra avere un ruolo nella regolazione dell'omeostasi del metallo.

1.4 *Helicobacter pylori*

1.4.1 Caratteristiche generali

H. pylori è un batterio Gram negativo di forma elicoidale caratterizzato da flagelli multipli unipolari che gli conferiscono una discreta motilità e capacità di permeazione. Esso colonizza specificamente la mucosa gastrica umana ed è presente nello stomaco della metà della popolazione mondiale. In condizioni ambientali favorevoli il batterio si presenta in forma bacillare mentre in condizioni di stress si innescano meccanismi di resistenza e si trasforma in coccoide. Inizialmente il batterio fu classificato nel genere *Campylobacter*, solo nel 1989 fu assegnato al genere *Helicobacter*. *H. pylori* fu osservato per la prima volta nello stomaco di alcuni animali nel 1892 da Giulio Bizzozero, patologo dell'Università di Torino. Negli anni Ottanta del secolo successivo Warren e Marshall, due ricercatori australiani, correlarono l'infezione con l'ulcera peptica e la gastrite cronica, affermando che queste patologie possono avere eziologia di tipo infettivo. Nel 2005 Warren e Marshall hanno ricevuto il premio Nobel per la medicina per l'importanza della loro scoperta e le conseguenze in ambito scientifico e clinico. L'infezione costituisce un fattore di rischio per lo sviluppo di carcinoma gastrico, il quarto tipo di cancro più comune e la seconda causa mondiale di morte dovuta a tumori, motivo per cui *H. pylori* è stato il primo batterio ad essere classificato nel 1994 come carcinogeno di tipo I dalla IARC (*International Agency for Research on Cancer*).

La prevalenza dell'infezione è variabile tra differenti aree geografiche e gruppi etnici, in generale è maggiore in soggetti appartenenti a livelli socioeconomici più bassi, probabilmente a causa delle scadenti condizioni igienico-sanitarie, del sovraffollamento ambientale e delle gravi carenze alimentari che sembrano favorire il contagio. Il primo contagio di solito avviene durante l'infanzia, momento in cui il batterio colonizza la mucosa persistendovi tutta la vita. La colonizzazione non implica necessariamente l'inizio di una patologia ma semplicemente la positività al batterio. In seguito alla trasmissione, il primo evento è la produzione di ureasi da parte di *H. pylori* per garantirsi la sopravvivenza nell'ambiente acido dello stomaco: l'enzima idrolizza l'urea in anidride carbonica e ammoniaca la quale tampona l'acidità gastrica generando un microambiente neutro. La sua morfologia e la sua motilità consentono al batterio di penetrare attraverso lo strato mucoso che ricopre la superficie gastrica, fino a raggiungere le cellule epiteliali a cui *H. pylori* aderisce tramite delle proteine di membrana chiamate adesine: BabA lega l'antigene Lewis b, SabA lega l'antigene sialico (Ilver *et al.*, 1998). L'adesione del batterio alle cellule gastriche è una fase fondamentale per il successo della colonizzazione in quanto protegge il batterio dalle contrazioni peristaltiche e dal ricambio di muco.

1.4.2 Fattori di virulenza e patogenicità

Il successo della colonizzazione di *H. pylori* dipende dai fattori di virulenza che possono essere presenti o assenti in diversi ceppi batterici determinandone il diverso livello di patogenicità. Il più importante fra questi è l'isola di patogenicità cag-PAI (*cytotoxin-associated gene-PAthogenicity Island*), una regione genomica di 35-40 kb contenente circa 29 geni, tra cui cagA (*cytotoxin-associated gene A*) e il sistema di secrezione di tipo IV (*Type IV Secretion System* – T4SS). Le proteine del T4SS formano un canale tra *H. pylori* e la cellula eucariote attraverso il quale avviene il passaggio di proteine batteriche all'interno della cellula ospite, determinando

un'alterazione dell'omeostasi e inducendo una risposta infiammatoria (Figura 1.17). Ad esempio *cagA*, una volta entrata nella cellula, viene fosforilata su residui di tirosina all'estremità C-terminale dove sono presenti motivi ripetuti Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA): la fosforilazione di *cagA* determina l'attivazione di *pathway* intracellulari che inducono riorganizzazione del citoscheletro, distruzione delle giunzioni cellula-cellula, risposte pro-infiammatorie e mitogeniche, secrezione di chemochine e citochine proinfiammatorie (tra cui IL-8) (Morales-Guerrero *et al.*, 2012; Fischer *et al.*, 2001). Ceppi *cagA*-positivi sono associati con patologie gastriche gravi da cui si può dedurre che la virulenza del batterio dipende dalla positività a *cagA*.

Un altro importante fattore di virulenza è la citotossina vacuolizzante A (*VacA*) il cui gene, a differenza di *cagPAI*, è presente in tutti i ceppi con differenti polimorfismi nelle forme alleliche che provocano differenti livelli di tossicità (Atherton *et al.*, 1997). Tuttavia, solo il 55% di questi esprime una tossina vacuolizzante funzionale, la cui espressione è correlata alla presenza di *cagA*. Il ceppo di tipo I, contenente l'isola di patogenicità *cagPAI* e secernente la tossina vacuolizzante attiva, è quello responsabile delle patologie gastriche più serie come ulcera peptica e cancro gastrico (Ricci *et al.*, 2011). La citotossina *VacA* forma un canale nella membrana della porzione apicale delle cellule epiteliali determinando la fuoriuscita di bicarbonato ed anioni organici; inoltre altera le giunzioni cellulari mediante un meccanismo non ancora chiarito, in tal modo il batterio può sfruttare la via paracellulare per ottenere ulteriori nutrienti essenziali per la sua crescita (Figura 1.17). Dopo aver oligomerizzato sulla membrana, la proteina viene internalizzata e agisce come canale anionico selettivo sulla membrana di compartimenti endosomiali determinando un aumento del numero e del volume dei vacuoli all'interno della cellula (Cover e Blande, 2005). Tutto ciò altera l'integrità della mucosa gastrointestinale ed inibisce la sintesi delle mucine (Beil *et al.*, 2000). In più, la citotossina si associa ai mitocondri e promuove il rilascio del citocromo c, inducendo l'apoptosi (Kimura *et al.*, 1999).

H. pylori, come tutti i batteri Gram-negativi, possiede una membrana esterna il cui layer esterno è costituito da lipopolisaccaridi (LPS) che rappresentano i principali antigeni di superficie di questi batteri. Gli LPS di *H. pylori* hanno una bassa attività immunogenica rispetto ad altri batteri Gram-negativi a causa di una diversa composizione della porzione lipidica degli LPS che potrebbe garantire un'infezione persistente rispetto ad un batterio più aggressivo ma con una vita più breve. La composizione biochimica degli LPS di *H. pylori* è simile agli antigeni Lewis: tale caratteristica conferisce agli LPS proprietà di mimetismo molecolare perché riconosciuti componente *self* dal sistema immunitario. Inoltre gli LPS insieme con le adesine mediano l'adesione tra il batterio e la cellula ospite, a seguito della quale si innescano il riarrangiamento del citoscheletro e il reclutamento di cellule infiammatorie, soprattutto neutrofili e monociti (Figura 1.17) (Segal *et al.*, 1996; Valkone *et al.*, 1993).

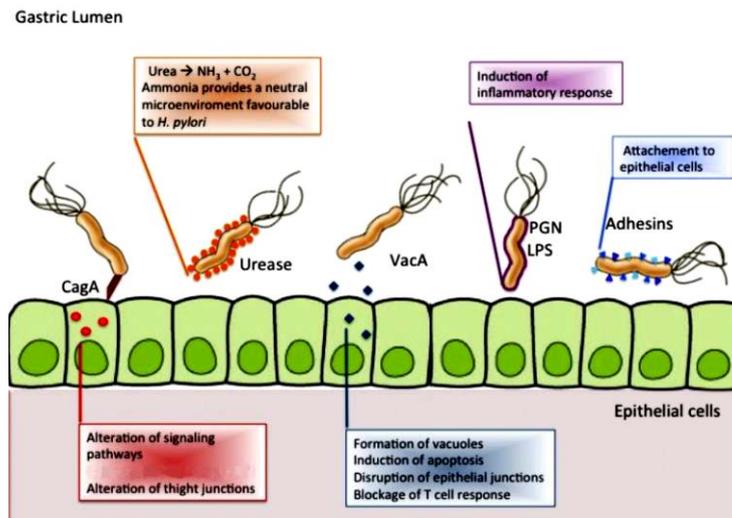


Figura 1.17 Meccanismi di virulenza di *Helicobacter pylori*.

1.4.3 Risposta della cellula eucariote e meccanismi patogenetici

In seguito all'infezione da *H. pylori*, nell'organismo ospite si innescano meccanismi patogenetici che con il passare degli anni possono portare allo sviluppo di tumori come il cancro gastrico o il linfoma. L'evento iniziale è l'alterazione dello strato di muco che non è più in grado di proteggere la mucosa gastrica favorendo la formazione di lesioni dell'epitelio gastrico mucosale e sottomucosale. Per questa fase di gastrite acuta non si hanno molte informazioni in quanto i sintomi non sono sempre evidenti e spesso sono transitori. La persistenza del batterio determina lo sviluppo di una gastrite cronica che determina alterazioni della mucosa gastrica e può degenerare in ulcera peptica. L'ulcera peptica colpisce la mucosa di una zona del tratto digerente esposta all'azione del succo gastrico, può essere duodenale o gastrica, secondo l'area di localizzazione, ed è fortemente correlata alla presenza di *H. pylori*.

L'infiammazione cronica può sfociare in metaplasia intestinale e gastrite atrofica con perdita della normale struttura della mucosa gastrica, distruzione delle ghiandole gastriche e rischio di insorgenza di fibrosi. Tali alterazioni si osservano in molti pazienti infettati da *H. pylori* e sono determinanti per l'insorgenza e lo sviluppo del processo neoplastico. Diversi studi hanno mostrato che l'eradicazione di *H. pylori* può arrestare la progressione delle lesioni descritte e, a volte, può anche indurre una regressione (Kuipers *et al.*, 2004; Leung *et al.*, 2004). Tuttavia l'eradicazione sembra utile solo in soggetti in condizioni cliniche precancerose, ma non in quelli che presentano lesioni in stadio già avanzato. Anche se *H. pylori* ha sviluppato dei sistemi per aggirare il sistema immunitario, in alcuni casi la sua presenza e lo stato infiammatorio persistente determinano una risposta immunitaria con conseguente aumento del numero dei follicoli linfatici nel tessuto linfoide associato alla mucosa (MALT) e rischio di sviluppare il linfoma gastrico di tipo MALT, associato all'infezione da *H. pylori* (Figura 1.18) (Kusters *et al.*, 2006).

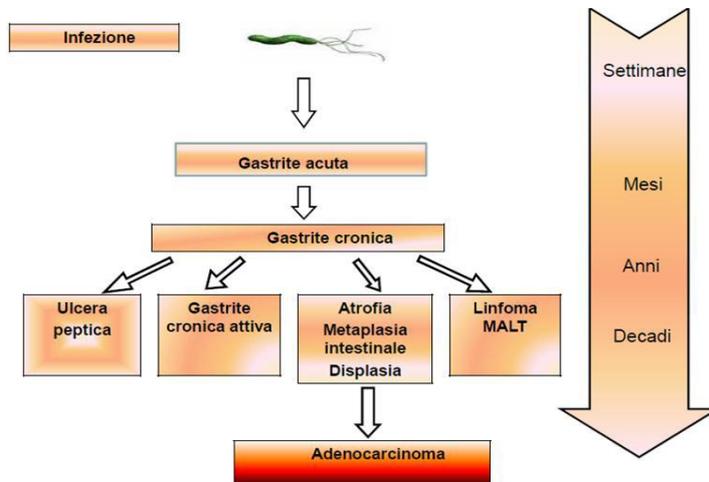


Figura 1.18 Spettro delle manifestazioni cliniche associate all'infezione da *H. pylori*

Le risposte della cellula ospite in seguito all'iniezione della proteina CagA includono maggiore motilità cellulare, perturbazione del complesso giunzionale epiteliale apicale, proliferazione epiteliale e risposte pro-infiammatorie che possono svilupparsi in gastrite cronica e cancro gastrico. In particolare, le risposte proinfiammatorie e le alterazioni fenotipiche che si osservano, ricordano la transizione epitelio-mesenchimale (EMT). Oltre a causare stress infiammatorio e uno squilibrio del ciclo cellulare e della polarità cellulare, *H. pylori* attiva molteplici pathway importanti nella promozione dell'oncogenesi gastrica, come PI3K/AKT/GSK3 β , STAT3, β -catenina, MAPK, NF- κ B e AP-1. Il pathway PI3K/AKT/GSK3 β regola diverse funzioni cellulari, tra cui la crescita cellulare, la proliferazione, la differenziazione e la motilità ed è attivato in maniera aberrante in vari tipi di tumori. STAT3 regola la crescita cellulare, l'apoptosi e la differenziazione; insieme a citochine infiammatorie e fattori di crescita, come IL-6, interferone e EGF, è coinvolto nel processo di carcinogenesi (Figura 1.19) (Ding *et al.*, 2010b).

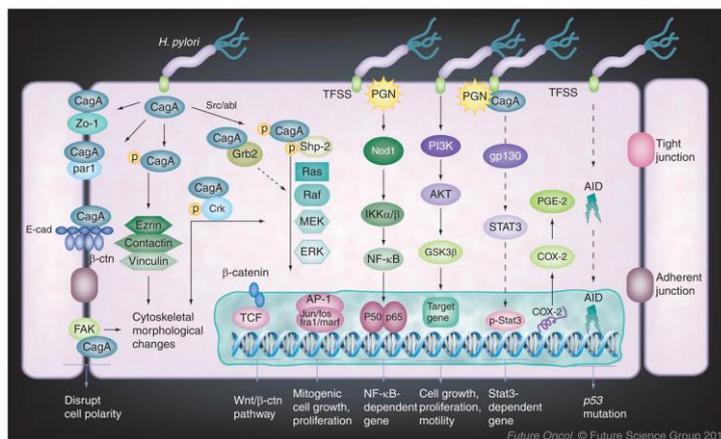


Figura 1.19 Pathway intracellulari attivati in seguito all'infezione.

1.4.4 *Helicobacter pylori* ed epigenetica

Il cancro gastrico è una malattia ad eziologia multifattoriale che coinvolge fattori genetici e ambientali quali la dieta e l'infezione da *H. pylori*. *H. pylori* favorisce indirettamente la patogenicità inducendo infiammazione cronica. Essa generalmente comporta l'accumulo di danno molecolare attraverso una varietà di meccanismi, come ad esempio danni al DNA da radicali liberi. Inoltre, l'infiammazione cronica indotta dal batterio induce alterazioni nelle modifiche epigenetiche che trasformano l'infezione in processo infiammatorio persistente capace di evolvere in diffuso processo neoplastico.

La relazione tra infezione da *H. pylori*, cancro gastrico e cambiamenti epigenetici è stata osservata solo negli ultimi anni, e molte domande senza risposta rimangono da esplorare, compreso il ruolo dei fattori di virulenza di *H. pylori* e i loro effetti. Il meccanismo di carcinogenesi gastrica indotta dall'infezione da *H. pylori* non è ancora ben caratterizzata. Si ipotizza che il batterio a contatto con le cellule epiteliali gastriche avvii una riprogrammazione epigenetica della cellula ospite che può favorire la tumorigenesi: infatti sempre più spesso viene riportato che l'infezione da *H. pylori* influenza l'espressione di oncogeni e/o geni oncosoppressori. È stata descritta un'alterazione dello stato di metilazione del DNA correlabile ad infezione da *H. pylori* di molti geni, compresi quelli coinvolti nel controllo della crescita cellulare (p16, p14 e APC), nella riparazione del DNA (hMLH, BRCA1, MGMT), il gene per l'adesione cellulare E-caderina (CDH1), geni come LOX, FLNC, HRASLS, Hand1, THBD e p41ARC che sono metilati in tumori gastrici. La metilazione genica è alterata in individui con infezione da *H. pylori* e torna a livelli normali dopo l'eradicazione dei batteri, suggerendo che gli effetti sono indotti dall'infezione batterica.

Relativamente poche informazioni sono disponibili riguardo gli effetti di infezione da *H. pylori* su modifiche istoniche (Ding *et al.*, 2010a). L'infezione da *H. pylori* in cellule epiteliali gastriche induce la defosforilazione di H3S10 e determina una riduzione dell'acetilazione di H3K23, ma non ha effetti su altre modifiche specifiche (Ding *et al.*, 2010b). Nelle mucose gastriche di volontari sani con infezione da *H. pylori* è stata osservata aberrante metilazione in molte CGI a livelli significativamente elevati (Maekita *et al.*, 2006).

Il batterio contribuisce alla progressione del cancro gastrico mediante l'attivazione di alcuni fattori di trascrizione coinvolti nei processi infiammatori, come il fattore nucleare NF- κ B e la ciclossigenasi COX-2. L'aumento di NF- κ B determina un aumento dell'espressione dell'interleuchina 8 (IL-8), responsabile del danno gastrico dovuto al reclutamento di neutrofili che aumentano l'infiltrato infiammatorio (Sharma *et al.*, 1998). È stato recentemente dimostrato che modifiche della cromatina e della metilazione del DNA avvengono insieme all'attivazione della COX-2 indotta da *H. pylori* in cellule epiteliali gastriche e all'attivazione di IL-8 indotta da LPS in cellule epiteliali intestinali umane (Angrisano *et al.*, 2012). L'aberrante metilazione del promotore, indotta da *H. pylori*, ed il successivo silenziamento del gene che codifica per la COX-2 è un evento importante per la progressione ad uno stato canceroso a livello del tratto gastrointestinale (Akhtar *et al.*, 2001). Altri lavori riportano un aumento della COX-2 in seguito ad infezione da *H. pylori* e tumore gastrico in cui è coinvolta nell'angiogenesi, nell'inibizione dell'apoptosi e nell'invasività (Fu *et al.*, 1999; Saukkonen *et al.*, 2003). È stato suggerito che l'espressione di COX-2 può essere regolata da meccanismi epigenetici, in particolare si osserva ipometilazione di COX-2 che correla con la sua iper-espressione e prognosi infausta.

Una delle principali citochine up-regolate in seguito all'infezione da *H. pylori* è l'interleuchina-1 β (IL-1 β), che ha un ruolo fondamentale nell'iniziare e amplificare la

risposta infiammatoria contro l'invasione batterica. *H. pylori* induce metilazione del promotore di E-caderina come conseguenza della produzione di ossido nitrico attivata dall'IL-1 β nelle cellule tumorali gastriche (Huang *et al.*, 2012). L'E-caderina fa parte di una classe di glicoproteine di rivestimento delle cellule epiteliali gastriche, che mediano l'adesione cellulare in maniera calcio dipendente. La metilazione del promotore dell'E-caderina è un evento precoce nella carcinogenesi gastrica ed è iniziata da *H. pylori* (Chan *et al.*, 2003).

La produzione di ossido nitrico avviene ad opera di iNOS che viene attivata tramite modifiche della cromatina tra cui riduzione della metilazione di H3K9 e aumento dell'acetilazione di H3 e della metilazione di H3K4, rilascio selettivo di MeCP2 dal promotore di iNOS. Uno studio recente indica che un cambiamento dello stato di fosforilazione di H3S10 sul promotore di IL-6 è legato all'infezione da *H. pylori* attraverso il *pathway* NF κ B/ERK/p38.

È importante sottolineare che le informazioni riguardanti l'effetto di *H. pylori* sulla regolazione epigenetica sono spesso contrastanti, probabilmente tale variabilità è riconducibile alla diversità dei sistemi sperimentali e dell'epoca dell'infezione.

1.4.5 *Helicobacter pylori* e TFF1

Recentemente è stata osservata una relazione tra infezione da *H. pylori* e fattori trifoglio. Per la prima volta nel 2003 furono descritte alterazioni dell'espressione di TFF2 a livello della mucosa gastrica positiva all'infezione da *H. pylori* (Hu *et al.*, 2003). In seguito è stato osservato che l'infezione di *H. pylori* provoca una diminuzione dell'espressione di TFF1 in biopsie gastriche umane (Van De Bovenkamp *et al.*, 2005; Tomita *et al.*, 2011). Altri studi riportano un'ipermetilazione del promotore di TFF1 in biopsie da pazienti positivi ad *H. pylori*, determinando la riduzione dell'espressione che può trasformare lesioni precancerose in cancerose. In questo contesto l'espressione di TFF1 è sotto il controllo dell'ormone gastrina, in grado di bloccare il silenziamento epigenetico e quindi la progressione tumorale (Tomita *et al.*, 2011). TFF2 regola negativamente la progressione neoplastica del tumore gastrico, un ruolo che è sovvertito dalla metilazione del promotore durante l'infezione da *H. pylori*. L'infezione da *H. pylori* promuove la metilazione del promotore e quindi il silenziamento di TFF2. L'infiammazione causata dall'infezione determina il rilascio di citochine pro-infiammatorie come IL-1 β la cui espressione è inversamente correlata con quella 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). In più del 50% dei tumori allo stomaco si osserva un aumento dell'espressione di MUC1 ma il suo ruolo nella carcinogenesi rimane da definire. Anche *in vitro* si osserva una diminuzione della metilazione del promotore di MUC1 con aumento della quantità di trascritto e di proteina rispetto alle cellule non infettate (Guang *et al.*, 2014).

Alla luce di questi dati la comunità scientifica ha cominciato a dedicarsi allo studio della relazione tra il batterio e la proteina. È stato dimostrato che TFF1 e *H. pylori* colocalizzano nello strato mucoso e che il batterio interagisce con la forma dimerica di TFF1 mediando il legame con le mucine gastriche. Il legame tra il peptide e il batterio è rapido e specifico suggerendo che TFF1 potrebbe avere la funzione di recettore o ligando per *H. pylori*, mediandone la colonizzazione *in vivo*. Questa

interazione specifica potrebbe chiarire il motivo del tropismo del batterio per lo stomaco e la sua co-localizzazione con la MUC5AC. TFF1 mantiene la sua capacità di legare le mucine quando interagisce con il batterio quindi, probabilmente, il peptide trifoglio lega *H. pylori* ad un sito diverso dal sito di legame delle mucine (Clyne *et al.*, 2004; Dolan *et al.*, 2012). In un altro lavoro è stato evidenziato che TFF1 interagisce specificamente con la porzione oligosaccaridica dei lipopolisaccaridi di *H. pylori* in maniera dipendente dal pH (Reeves *et al.*, 2008). Recentemente è stato dimostrato che la porzione C-terminale di TFF1 media il legame con i lipopolisaccaridi di *H. pylori*. Vista l'importanza della forma omodimerica di TFF1 e la capacità del rame di promuovere tale forma, si è ipotizzato un possibile ruolo del rame nell'ambito dell'infezione: è stato dimostrato che il metallo è in grado di modulare positivamente *in vitro* l'infezione di *H. pylori* mediata da TFF1 (Montefusco *et al.*, 2013).

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 e meritevoli di approfondimento.

SCOPO DELLA TESI

Proseguendo gli studi relativi all'interazione tra rame e TFF1 di cui si occupa il nostro gruppo, il primo obiettivo di questo lavoro di tesi è stato quello di analizzare l'effetto del rame sull'espressione di TFF1 e i relativi meccanismi regolatori, compresi quelli epigenetici.

Dal momento che l'espressione di TFF1 è finemente regolata da meccanismi epigenetici ed una sua aberrante espressione è stata osservata in numerose condizioni patologiche, l'obiettivo principale di questo progetto di dottorato è stato quello di approfondire lo studio dei meccanismi di regolazione epigenetica sul promotore di TFF1 in particolari condizioni patologiche come l'infezione da *H. pylori* e lo sviluppo del cancro gastrico.

In particolare è stato condotto uno studio su due modelli cellulari che esprimono differenti livelli di TFF1 ed analizzata la loro risposta all'infezione batterica, analizzando i livelli di espressione di citochine infiammatorie, di geni relativi alla transizione epitelio-mesenchimale e i livelli globali di metilazione del DNA.

CAPITOLO 2

RISULTATI

2.1 Il rame regola l'espressione di TFF1

Questo progetto di dottorato si inserisce all'interno di un studio che il nostro gruppo porta avanti da tempo circa la relazione tra rame e TFF1 da cui è emerso che tra i due vi è un legame specifico e che tale interazione altera alcune caratteristiche e funzionalità del peptide. Dunque, in una prima fase gli esperimenti sono stati focalizzati sull'influenza del rame sull'espressione di TFF1 e i relativi meccanismi regolatori. In passato il nostro gruppo ha osservato un'alterata espressione di TFF1 nell'intestino di topi alimentati con diete carenti di rame, per cui è stata studiata la regolazione trascrizionale in modelli cellulari per comprenderne il significato biologico. La scelta dei modelli cellulari da utilizzare nello studio del fattore TFF1 non è cosa semplice, in quanto pochissime linee cellulari in commercio lo esprimono a livelli rilevabili. Due di queste sono le MCF-7 e HT29-E12. Le MCF-7, una linea cellulare di tumore della mammella estrogeno-dipendente, esprime costitutivamente elevati livelli di mRNA e proteina. La linea HT29-E12 è un clone di cellule *goblet* selezionato con metrotressato dalla linea di adenocarcinoma del colon HT29. In questo modo, da una popolazione mista di enterociti e cellule *goblet*, è stata ottenuta una popolazione omogenea di cellule *goblet* che, dopo 21 giorni dalla confluenza, secerne uno strato di muco contenente mucine e fattori di trifoglio. Le linee cellulari sono state trattate per 48 ore con due concentrazioni di rame (CuCl_2 10 μM e 100 μM) per creare condizioni di sovraccarico del metallo. L'RNA estratto è stato retrotrascritto a cDNA ed analizzato tramite Real Time PCR: in entrambe le linee cellulari l'espressione di TFF1 si riduce, nelle MCF-7 in maniera significativa solo alla concentrazione più alta di rame. Nella linea HT29-E12 secernente i tre fattori trifoglio è stata analizzata anche l'espressione di TFF3 che si riduce solo alla concentrazione più alta del metallo (Figura 2.1).

2.2 Il fattore trascrizionale Sp1 è coinvolto nella regolazione trascrizionale di TFF1 mediata dal rame

Per comprendere i meccanismi alla base della regolazione di TFF1 mediata dal rame, il promotore di *tff1* è stato analizzato alla ricerca di siti di legame per fattori di trascrizione sensibili al metallo come MTF-1 (Selvaraj *et al.*, 2005) e Sp1 (Liang *et al.*, 2012). Non è stata individuata nessuna sequenza in grado di legare MTF-1, mentre sono stati individuati due siti di legame per Sp1, uno in prossimità dell'ERE, a -420 bp (CCCTTCCCC), già descritto in letteratura (che indichiamo come Sp1) e il secondo situato più a monte a -559 bp (TCCGCCT), (che indichiamo come Sp1*) la cui capacità di legare il fattore *in vitro* è stata confermata da saggi EMSA condotti precedentemente dal nostro gruppo (Figura 2.2.A) (Esposito *et al.*, 2015).

Sp1 è un fattore di trascrizione sensibile ai livelli di rame, fondamentale nella regolazione dell'omeostasi del metallo, in particolare del trasportatore ad alta affinità hCtr1 la cui espressione viene indotta, insieme ad Sp1 in condizioni di carenza di rame. Tramite esperimenti di immunoprecipitazione della cromatina condotti sulla linea cellulare HT29-E12 è stato possibile evidenziare, in condizioni di sovraccarico

di rame, una riduzione della quantità di fattore Sp1 su entrambi i siti presenti sul promotore di TFF1 (Figura 2.2.B). È stato inoltre dimostrato, nella stessa linea cellulare, che un eccesso del metallo determina una riduzione dell'espressione dello stesso fattore Sp1 e del trasportatore del rame hCtr1, confermando in questo modo il ruolo di Sp1 nella regolazione dell'espressione di TFF1 mediata dal rame (Figura 2.2.C).

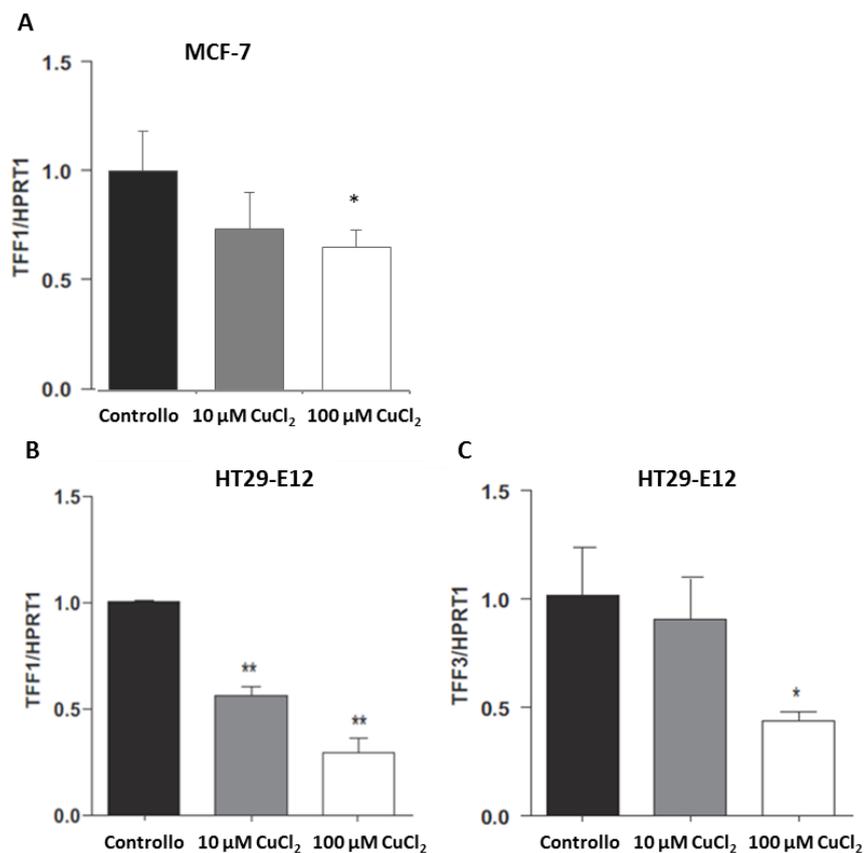


Figura 2.1 Variazioni dell'espressione di TFF1 al variare della quantità di rame. Le cellule sono state trattate per 48 ore con CuCl₂ 10 μM e 100 μM. L'espressione di TFF1 in MCF-7 (A) e di TFF1 (B) e TFF3 in HT29-E12 (C) è stata normalizzata rispetto ad HPRT1.

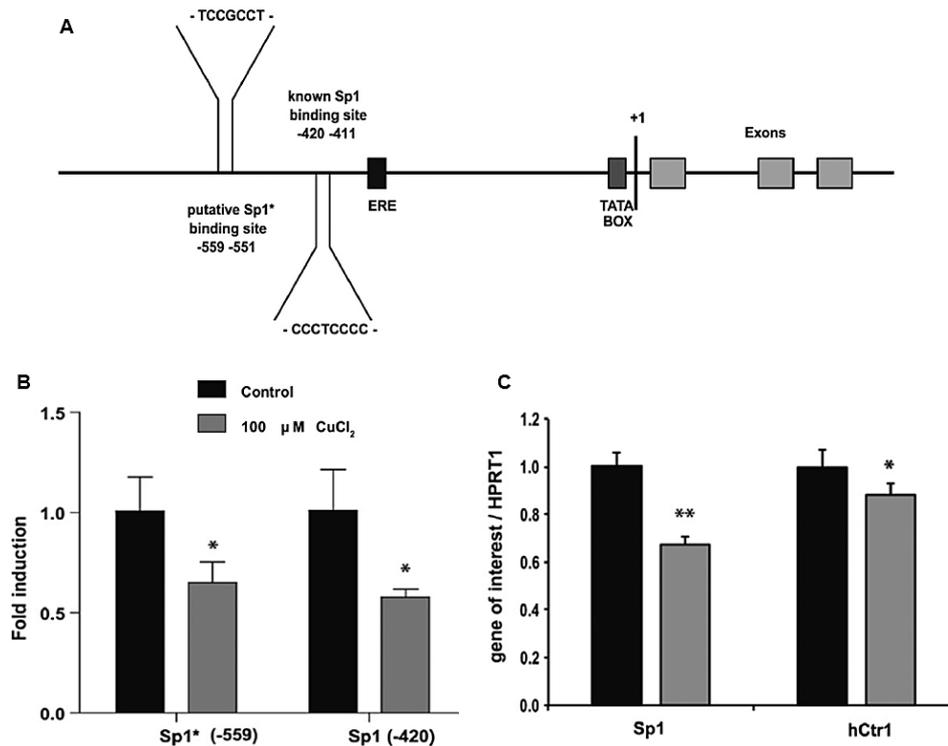


Figura 2.2 La presenza di rame determina una riduzione della quantità di Sp1 legato al promotore di TFF1 e una riduzione dell'espressione di Sp1 e hCtr1. **A** - Schema del promotore di TFF1, sono evidenziati i due siti di legame per Sp1. **B** - Analisi tramite Real Time PCR dell'immunoprecipitato con anticorpo anti-Sp1. Su HT29-E12 trattate o meno con 100 μM CuCl₂. **C** - Analisi tramite Real Time PCR del cDNA di HT29-E12 trattate o meno con 100 μM CuCl₂. L'espressione è stata normalizzata rispetto ad HPRT1.

2.3 Ottimizzazione e validazione di un metodo di *High Resolution Melting* per l'analisi del *pattern* di metilazione di TFF1

2.3.1 Principi generali del metodo

Negli ultimi anni è cresciuto sempre di più l'interesse nei confronti dei meccanismi di regolazione epigenetica che, insieme ai fattori di trascrizione, dirigono l'espressione genica all'interno di ogni cellula. Numerosi studi ne hanno descritto l'importante funzione nei processi fisiologici ma anche nell'eziologia di alcune patologie molto diffuse, prima fra tutte il cancro. Come già ampiamente descritto in precedenza, l'espressione di TFF1 è finemente regolata dalla metilazione del suo promotore e risulta alterata in diverse patologie come il tumore gastrico, mammario e l'infezione da *H. pylori*. Allo scopo di analizzare il *pattern* di metilazione di TFF1 in diverse condizioni sperimentali, è stato messo a punto un metodo di *High Resolution Melting*, un'analisi post-PCR nata inizialmente per l'identificazione di mutazioni e polimorfismi (Reed *et al.*, 2007).

Dopo aver amplificato la regione di interesse, l'amplicone ottenuto viene denaturato aumentando gradualmente la temperatura da 65°C fino a 95°C. Questo

processo viene monitorato in tempo reale grazie all'utilizzo di una molecola che emette fluorescenza quando si intercala tra le coppie di basi appaiate nel doppio filamento di DNA e può essere utilizzata ad elevate concentrazioni per saturare il DNA senza inibire la reazione di PCR. In questo modo è possibile rilevare anche piccole variazioni di temperatura dovute a mutazioni puntiformi grazie all'elevata risoluzione del metodo (Figura 2.3.A). Il DNA viene trattato con bisolfito che converte le citosine non metilate in uracile, lasciando immutate le citosine metilate, per cui il DNA non metilato avrà una temperatura di *melting* più bassa rispetto al DNA metilato dal momento che l'appaiamento A-T che avviene tramite due legami idrogeno richiede meno energia per essere denaturato rispetto all'appaiamento C-G che avviene tramite tre legami idrogeno (Figura 2.3B). I vantaggi di questo metodo sono molteplici: è semplice, rapido, preciso ed economico in quanto consente l'analisi di molti campioni contemporaneamente e non richiede strumentazioni particolari o reagenti costosi.

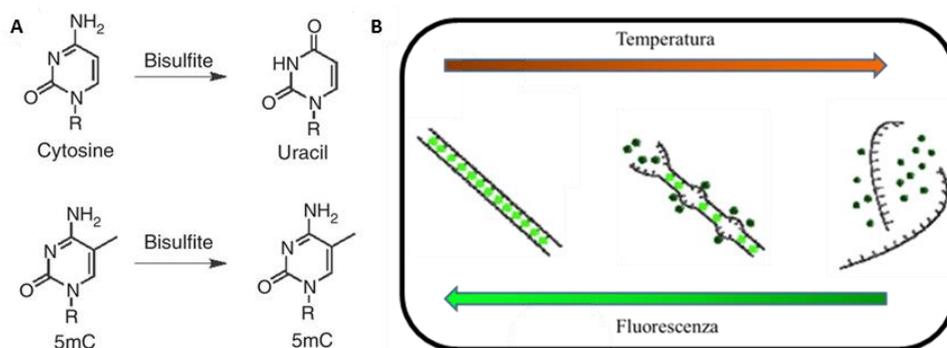


Figura 2.3 Principi generali del metodo di High Resolution Melting. **A** - Il bisolfito converte le citosine non metilate in uracile, lasciando immutate le citosine metilate, rendendo possibile la discriminazione tra campioni di DNA con una diversa percentuale di metilazione in base alla loro diversa temperatura di *melting*. **B** - In seguito all'amplificazione la temperatura aumenta gradualmente determinando la denaturazione dei due filamenti di DNA e il distacco del *dye* con conseguente riduzione della fluorescenza.

2.3.2 Ottimizzazione del metodo

Una fase fondamentale per la messa a punto del metodo è stato il disegno dei *primer* distribuiti in modo da coprire tutte le CpG in una regione di circa 1kb intorno al sito di inizio della trascrizione sul promotore di TFF1 (Figura 2.4). È stato assunto che tutte le citosine siano state modificate in uracile e quindi trattate come timine, inoltre i *primer* non contengono nella loro sequenza siti CpG che potrebbero essere potenzialmente metilati nello stampo, in modo tale da amplificare il DNA a prescindere dallo stato di metilazione. È possibile disegnare *primer* contenenti siti CpG che amplificano in maniera specifica DNA metilato e consentono di apprezzare differenze di metilazione fino allo 0,1%, partendo da bassi livelli di metilazione, ma non consentono di rilevare differenze tra livelli di metilazione più elevati. Dunque in questa fase ricognitiva non sarebbero stati utili.

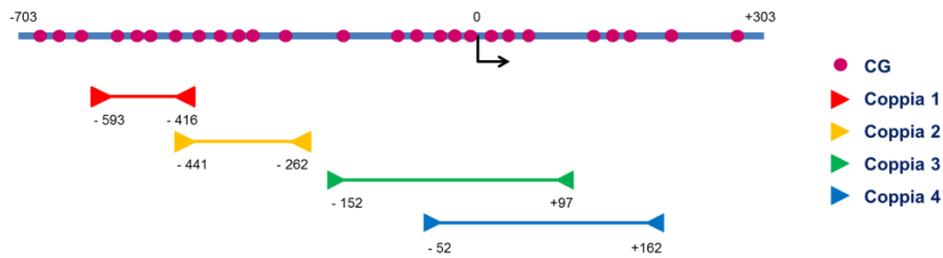


Figura 2.4 Disegno schematico del promotore di *TFF1* intorno al sito di inizio della trascrizione (TSS) con i dinucleotidi CpG e le coppie di primer.

Il DNA è stato amplificato tramite PCR classica per scegliere la temperatura o il *range* di temperatura da utilizzare in un secondo momento per HRM. Le coppie sono state testate per HRM utilizzando campioni con percentuale di metilazione nota ottenuti miscelando opportunamente DNA di MCF-7 come 0% e DNA commerciale metilato enzimaticamente come 100%, per ottenere le seguenti percentuali: 0, 25, 50, 75, 90, 100%.

Per alcune coppie è stato utilizzato un protocollo in *touchdown*, in cui la temperatura di *annealing* è variabile in modo da ridurre l'amplificazione non specifica. Dall'elaborazione delle curve di amplificazione si ottengono i profili di *melting* in cui si osserva uno *shift* della temperatura di *melting* e una variazione dell'altezza del picco al variare della percentuale di metilazione. Tramite ulteriore elaborazione con *LightCycler® 480 Gene Scanning Software*, che prevede la normalizzazione delle curve, si ottengono i *difference plot* in cui l'altezza delle curve aumenta rispetto ad una basale, in maniera proporzionale alla percentuale di metilazione. Di seguito sono riportati i grafici e i commenti per ciascuna coppia testata.

Coppia 1 (Figura 2.5): il frammento di DNA amplificato con questa coppia di *primer* presenta una metilazione piuttosto eterogenea come si può dedurre dalla presenza di più picchi nelle curve di fusione. La scalarità tra le curve di campioni con differente percentuale di metilazione è meglio evidente nel *difference plot*.

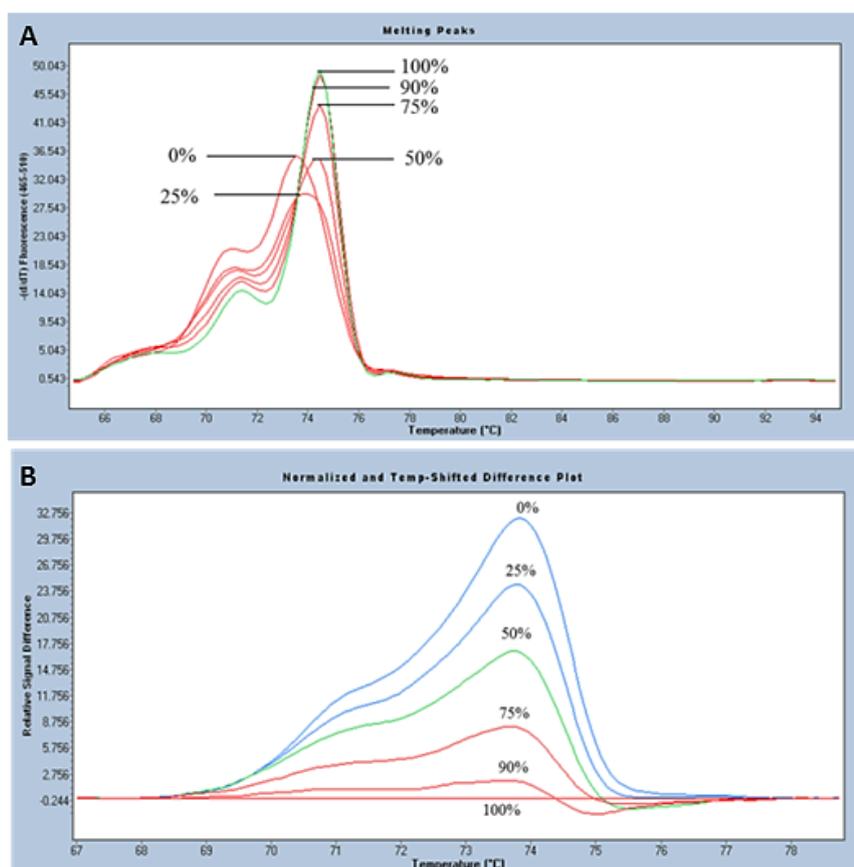


Figura 2.5 Profili di melting (A) e difference plot (B) della coppia 1.

Coppia 2 (Figura 2.6): con questa coppia di *primer* si ottiene un buon amplificato, seppur con una metilazione eterogenea. Si osserva una perdita di scalarità fra i campioni, con una parziale inversione di tendenza.

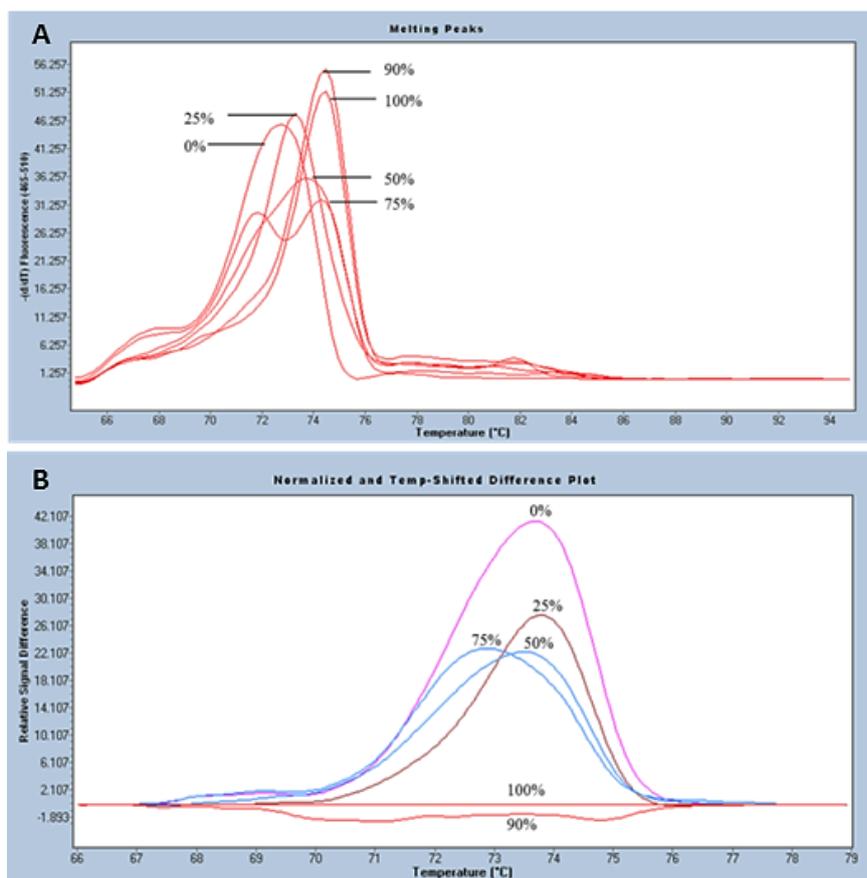


Figura 2.6 Profili di melting (A) e difference plot (B) della coppia 2.

Coppia 3 (Figura 2.7): la regione del promotore amplificata con questa coppia di *primer* presenta un picco con una temperatura di *melting* bassa che è trascurabile perché non varia al variare della percentuale di metilazione. La scalarità è buona sia nei profili di *melting* sia nel *difference plot*.

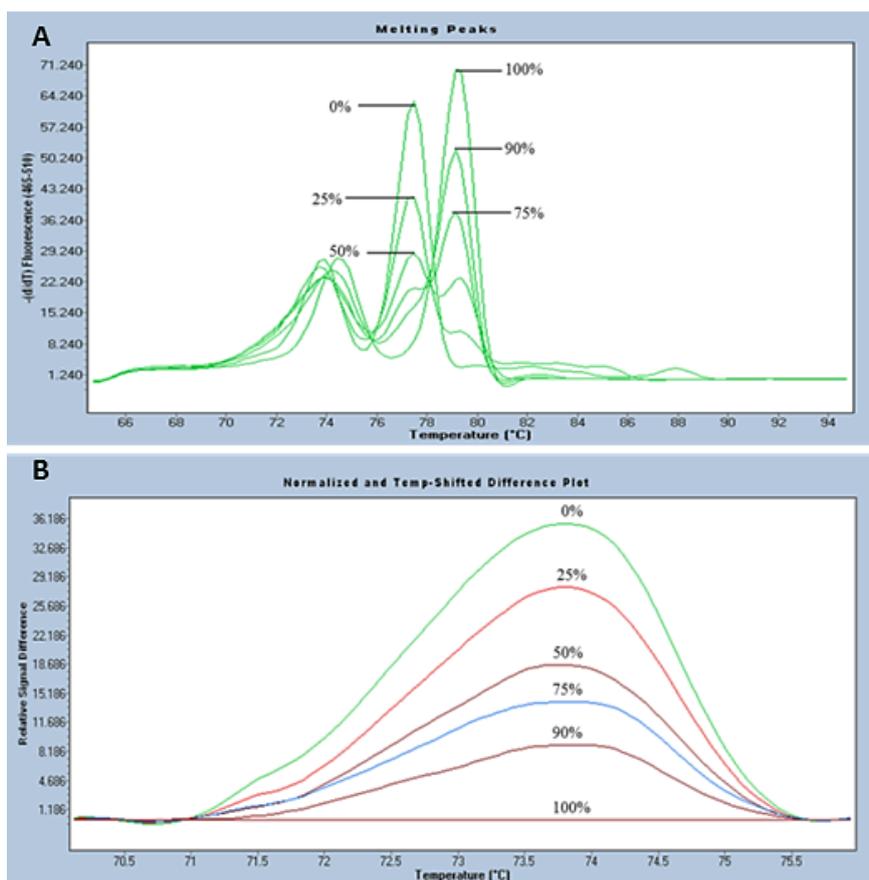


Figura 2.7 Profili di melting (A) e difference plot (B) della coppia 3.

Coppia 4 (Figura 2.8): questa coppia è la migliore in quanto i picchi sono stretti e *sharp*, non presenta eterogeneità di metilazione o picchi secondari, presenta un'ottima scalarità fra i campioni nei profili di *melting* e nel *difference plot*.

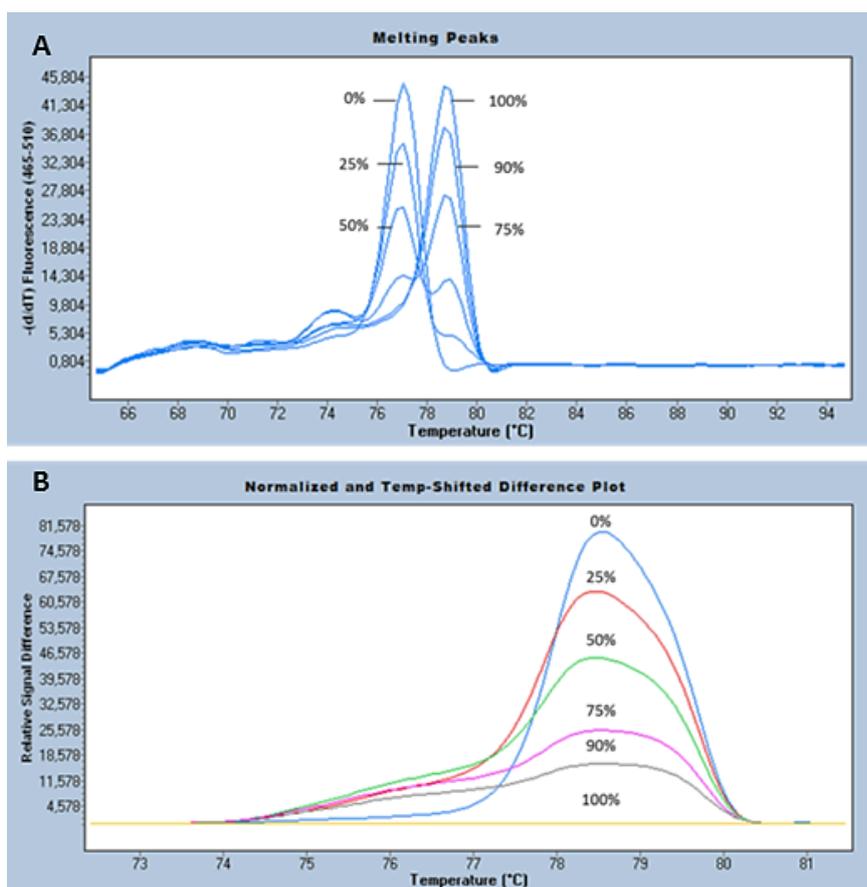


Figura 2.8 Profili di melting (A) e difference plot (B) della coppia 4.

2.3.3 Validazione del metodo

Dalla letteratura è noto che l'espressione e la metilazione di TFF1 possono variare in linee cellulari diverse perciò per validare il metodo di HRM sono stati esaminati i profili di metilazione di alcune linee cellulari di cui sono presenti informazioni in letteratura circa il *pattern* di metilazione del promotore di TFF1 o i livelli di espressione.

Tramite *Western Blot* è stato osservato che TFF1 è espresso costitutivamente in HT29-E12 e MCF-7 mentre in MDA-MB-231, AGS e HeLa la proteina non è rilevabile, in accordo con i dati riportati in letteratura (Figura 2.9).

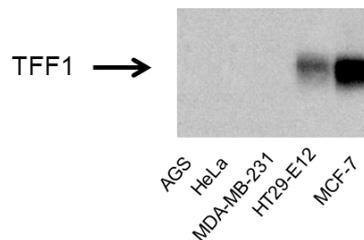


Figura 2.9 Differente espressione di TFF1 in linee cellulari.

È stato quindi esaminato tramite HRM il profilo di *melting* di ogni linea cellulare che è stato confrontato con i profili di *melting* di campioni a metilazione nota. È stata generata una retta di taratura con gli *standard* a metilazione nota da cui per interpolazione è stata ricavata la percentuale di metilazione delle linee cellulari, utilizzando come parametro l'altezza delle curve nel *difference plot* (Lorente *et al.*, 2008). Come esempio, sono riportati i *difference plot* ottenuti con la coppia 4, la migliore tra quelle testate e la più significativa in termini di regolazione trascrizionale in quanto amplifica una regione a cavallo del TSS.

Le HT29-E12 mostrano elevati livelli di espressione di TFF1 come le MCF-7 e scarsa metilazione del promotore. MDA, AGS e HeLa, che non esprimono livelli rilevabili di proteina, presentano una percentuale di metilazione significativamente più alta. I risultati ottenuti concordano con i dati di letteratura e con i nostri dati di espressione ottenuti tramite *Western Blot* (Figura 2.10). Un ulteriore dato che ha consentito di confermare la validità del metodo è l'effetto del trattamento con 5-aza-2'-deossicitidina, un inibitore delle DNA metiltransferasi, che determina una riduzione della percentuale di metilazione nelle cellule HeLa trattate rispetto al controllo. Le cellule sono state trattate per 48 ore con diverse concentrazioni di 5-aza-2'-deossicitidina tra cui è stata scelta la concentrazione 5 μ M dopo aver verificato per Real Time PCR l'aumento dell'espressione di TFF1 in tale condizione (dati non mostrati). Analizzando i dati di HRM è stato inoltre osservato che è necessaria una percentuale di metilazione del 26%, in questa regione, per silenziare il gene di TFF1 (Tabella 2.1).

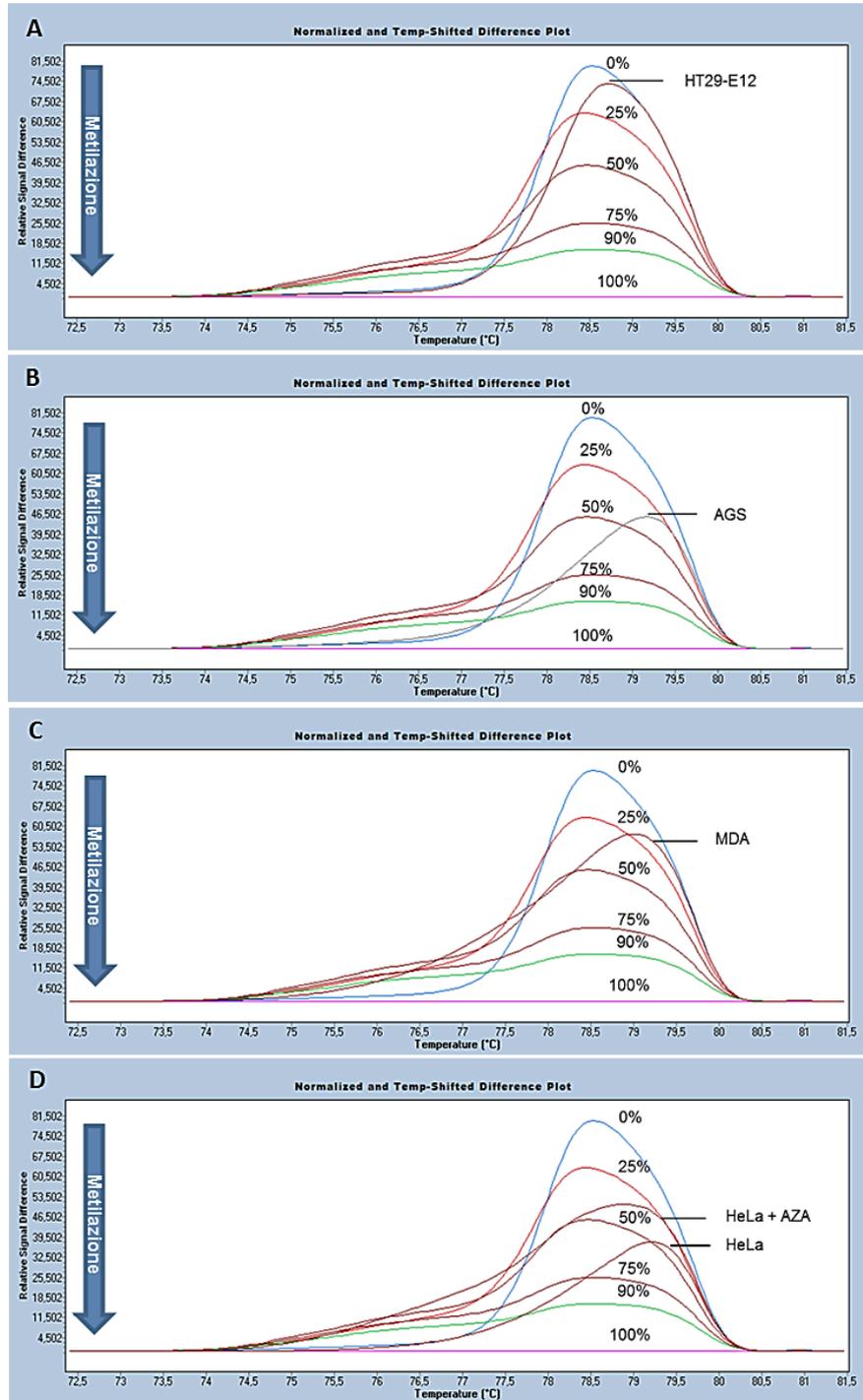


Figura 2.10 Validazione del metodo di HRM in linee cellulari con differente espressione di TFF1.

Linea cellulare	% metilazione
DNA metilato	100
HeLa	53
AGS	37
HeLa+AZA	29
MDA	26
HT29-E12	10
MCF7	0

Tabella 2.1 Differente espressione di TFF1 in linee cellulari.

2.4 Analisi del *pattern* di metilazione del promotore di TFF1 al variare dei livelli di rame

È ampiamente noto che i metalli possono regolare l'espressione genica tramite meccanismi epigenetici per cui una volta validato il metodo di HRM, è stato utilizzato per verificare se la riduzione dell'espressione di TFF1 in condizioni di sovraccarico di rame fosse dovuta ad un aumento della metilazione del suo promotore (Cheng *et al.*, 2012). Dopo aver estratto il DNA dalle cellule trattate con CuCl_2 100 μM per 48 ore, è stato modificato con bisolfito ed amplificato per HRM. Anche in questo caso sono mostrati i risultati della coppia 4 da cui, in seguito all'elaborazione con *LightCycler® 480 Gene Scanning Software*, emerge che il rame non influenza il *pattern* di metilazione di TFF1 nelle due linee cellulari analizzate (Figura 2.11). La metilazione del DNA non sembra essere un meccanismo coinvolto nella regolazione dell'espressione di TFF1 mediata dal rame.

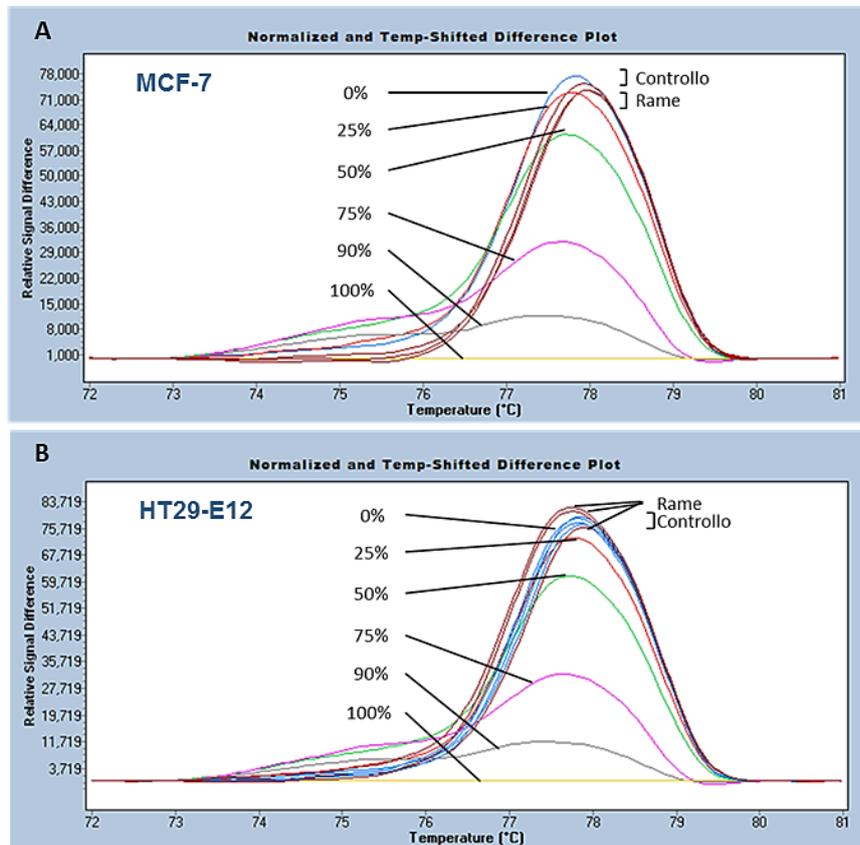


Figura 2.11 HRM. Difference plot della linea cellulare MCF-7 (A) e HT29-E12 (B). In entrambe le linee cellulari, il rame non influenza il *pattern* di metilazione di TFF1.

2.5 Analisi della regione minima responsabile della regolazione di TFF1 tramite metilazione del DNA

Lo studio dei meccanismi epigenetici che regolano l'espressione di TFF1 è continuato con l'analisi del promotore di alcune linee cellulari tumorali, principalmente di tumore gastrico. Infatti è noto che in linee cellulari di tumore della mammella il livello di metilazione di alcune specifiche CpG è correlato con l'espressione di TFF1, ma non ci sono informazioni in merito nel tumore gastrico, l'analisi di una o poche CpG è spesso un utile e semplice marker diagnostico.

Una regione del promotore di TFF1 è stata esplorata tramite sequenziamento con bisolfito e, in parallelo, è stato analizzato il livello di espressione basale di TFF1 in tutte le linee cellulari tramite RT-PCR (Figure 2.12 e 2.13). L'espressione di TFF1 è proporzionale al livello di metilazione del suo promotore nella regione analizzata tramite sequenziamento, confermando il ruolo fondamentale di tale meccanismo nella regolazione trascrizionale di TFF1 (Figura 2.14.A).

Per approfondire e individuare CpG critiche per l'espressione di TFF1, in ogni linea cellulare è stata calcolata la percentuale di metilazione delle singole CpG sequenziate (Figura 2.14.B). La correlazione tra il livello di espressione di TFF1 in ogni linea cellulare e la percentuale di metilazione delle singole CpG ottenuta tramite sequenziamento con bisolfito ha permesso di individuare una regione che va da -85

a +20 in cui l'espressione è strettamente correlata allo stato di metilazione delle singole CpG.

Lo studio è stato ampliato analizzando lo stato di metilazione di TFF1 e la sua espressione in biopsie gastriche. A tale scopo sono state utilizzate le informazioni raccolte dal *database* The Cancer Genome Atlas (TCGA) che raccoglie i profili genomici di 11000 pazienti e di tutti i tipi e sottotipi tumorali, tra cui sono stati selezionati quelli relativi al carcinoma gastrico. Dal *database* sono stati esaminati i dati di RNAseq da cui sono stati estrapolati i livelli di espressione di TFF1 ed è stato possibile correlarli con la presenza di tumore e la stadiazione tumorale grazie alla descrizione delle caratteristiche del tessuto e alle informazioni del paziente da cui è stato prelevato.

Su alcuni dei campioni sono stati effettuati *microarray* di metilazione per cui nel *database* sono disponibili anche i dati di metilazione. Per quanto riguarda TFF1 sono disponibili i dati di 9 CpG da cui, per i nostri studi, ne sono state escluse 2, cg24606807 e cg18729973, rispettivamente al 3'UTR e nel corpo del gene, allo scopo di analizzare le CpG intorno al TSS e del promotore prossimale e distale (Tabella 2.2). Il livello di metilazione di ogni CpG, con valori da 0 a 1, è stato confrontato con il livello di espressione di TFF1 allo scopo di individuare CpG in cui vi fosse correlazione tra metilazione ed espressione. Dall'elaborazione di questi dati è stato osservato che anche nelle biopsie gastriche l'espressione di TFF1 è strettamente correlata con la metilazione delle CpG presenti nella regione individuata nelle linee cellulari (Figura 2.15.A).

Inoltre l'analisi dei dati TCGA ci ha permesso di evidenziare una correlazione tra l'avanzamento della stadiazione tumorale e la riduzione dell'espressione di TFF1, separando i livelli di espressione di TFF1 in base allo stadio del tumore (Figura 2.15.B). Contemporaneamente è stato osservato l'aumento della metilazione delle CpG presenti nella regione descritta in precedenza, anche in questo caso per ogni CpG è stato creato un grafico in cui le percentuali di metilazione sono state separate in base allo stadio tumorale (Figura 2.15.C). Tali osservazioni confermano l'importanza della regione individuata in precedenza sul promotore di TFF1 nella regolazione della sua espressione tramite metilazione del DNA.

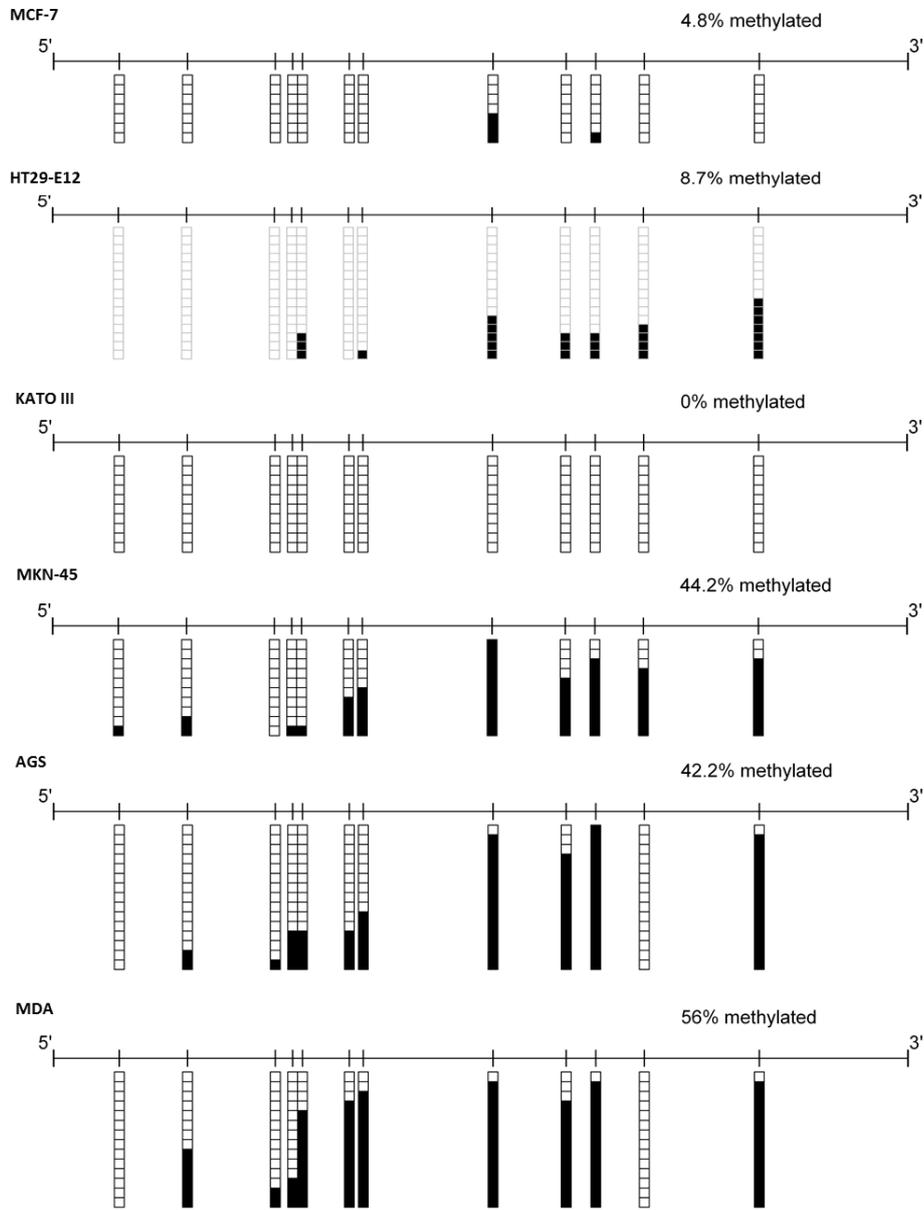


Figura 2.12 Sequenziamento con bisolfito di una regione del promotore di TFF1.

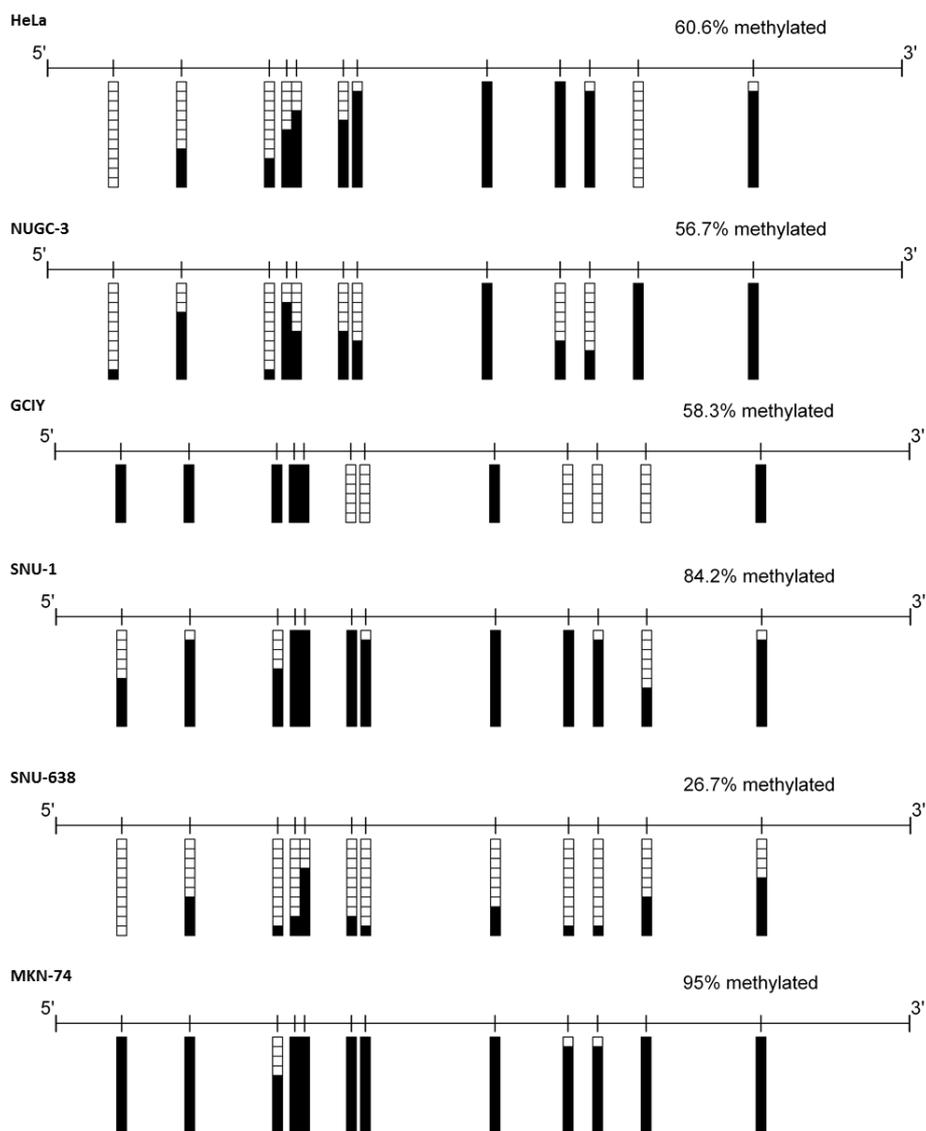


Figura 2.13 Sequenziamento con bisolfito di una regione del promotore di TFF1.

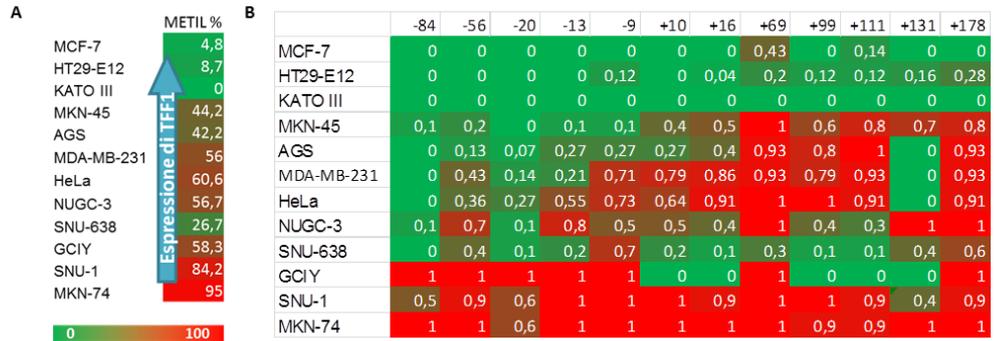


Figura 2.14 Sequenziamento con bisolfito di una regione del promotore di *TFF1*. **A** - La percentuale di metilazione di *TFF1* nelle linee sequenziate correla con l'espressione di *TFF1* ottenuta tramite RT-PCR. **B** - Percentuale di metilazione delle singole CpG sequenziate in linee cellulari.

TargetID	MAPINFO	Localizzazione	Dal TSS
cg01442565	43787747	TSS1500	-1104
cg01886855	43786997	TSS1500	-354
cg27405706	43786824	TSS200	-181
cg19247032	43786727	TSS200	-84
cg02643667	43786699	TSS200	-56
cg22438247	43786663	TSS200	-20
cg06099014	43786627	1stExon; 5UTR	+16

Tabella 2.2 Dati relativi alle CpG presenti nel database TCGA.

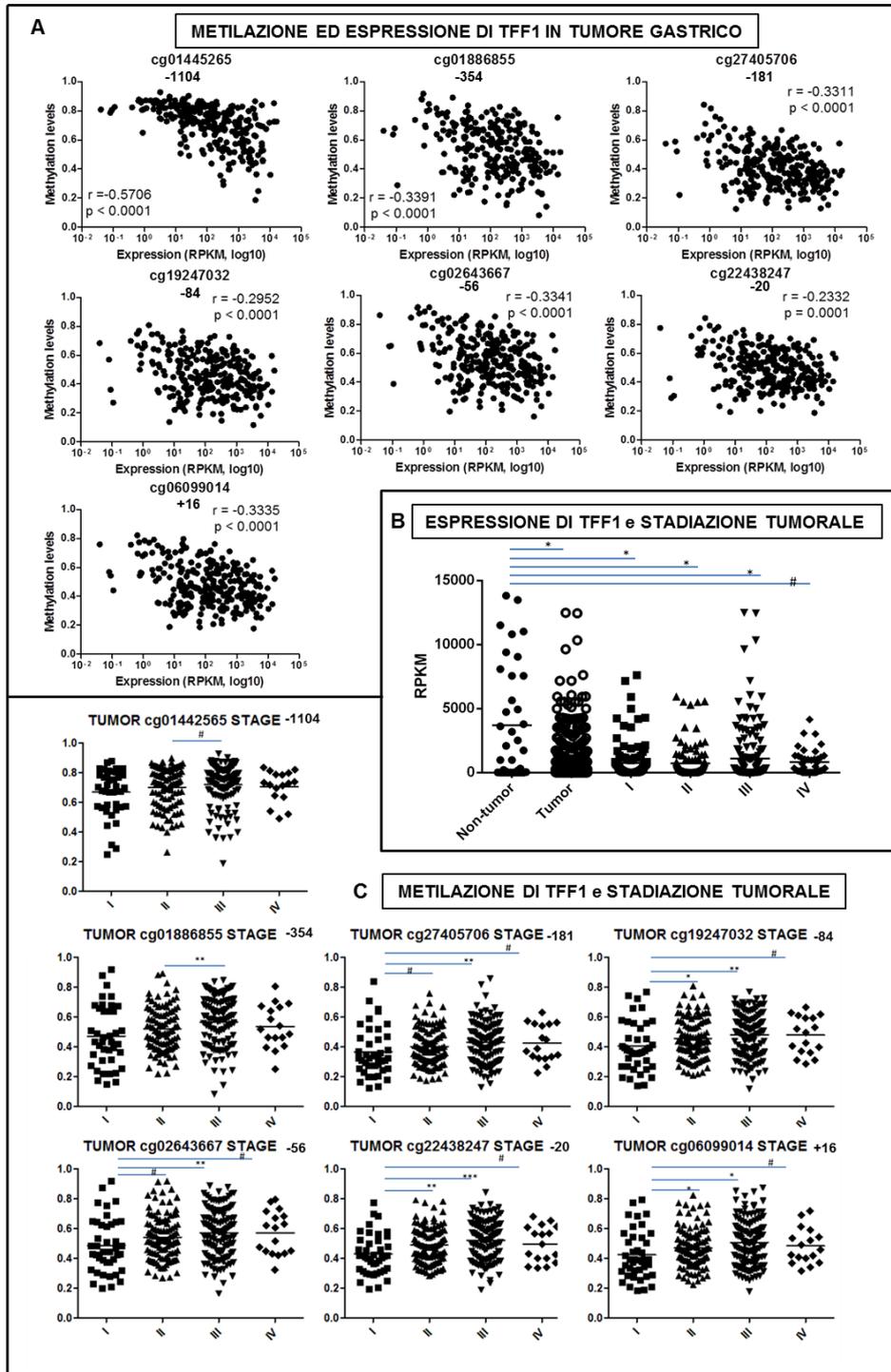


Figura 2.15 Elaborazione dei dati TCGA di espressione e metilazione di TFF1. A - Grafici di correlazione tra l'espressione di TFF1 e la metilazione delle singole CpG. L'espressione di TFF1 si riduce (B) e la metilazione del CpG aumenta (C) all'avanzare della stadiazione tumorale.

2.5.1 Modifiche istoniche nella regolazione di TFF1

Dal sequenziamento delle linee cellulari è emerso che le SNU-638, che non esprimono TFF1, presentano una percentuale di metilazione del 26,7%, più bassa rispetto alle altre che ugualmente non esprimono la proteina a livelli rivelabili per western blot, ma hanno una percentuale di metilazione che va dal 44 al 95%. Inoltre tramite gli esperimenti di HRM era stato verificato che il 26% è un valore soglia di metilazione al di sopra del quale TFF1 non si esprime.

Dunque abbiamo scelto questa linea cellulare che presenta un valore soglia di metilazione per investigare il possibile ruolo delle modifiche istoniche nella regolazione trascrizionale di TFF1. In particolare, è stata investigata la presenza di modifiche istoniche *marker* di attivazione o repressione trascrizionale sul promotore di TFF1 tramite immunoprecipitazione della cromatina sulla linea SNU-638 e altre due linee di carcinoma gastrico con percentuali di metilazione agli estremi, le KATO III con una metilazione dello 0% e le SNU-1 con una percentuale dell'84%. Nella regione del promotore di TFF1 analizzata tramite sequenziamento nella linea SNU-638 è stato osservato un notevole arricchimento di modifiche istoniche repressive come H3K9me3 e H3K27me3, sia rispetto alla linea KATO III che esprime TFF1, che rispetto alla linea SNU-1 che non esprime TFF1 ma presenta una percentuale di metilazione molto più elevata. Tali risultati dimostrano l'importanza delle modifiche istoniche come meccanismo epigenetico, aggiuntivo rispetto alla metilazione del DNA, nella regolazione trascrizionale di TFF1 (Figura 2.16). Sembra che una percentuale di metilazione non troppo elevata si accompagni a modifiche istoniche repressive per assicurare lo spegnimento dell'espressione genica.

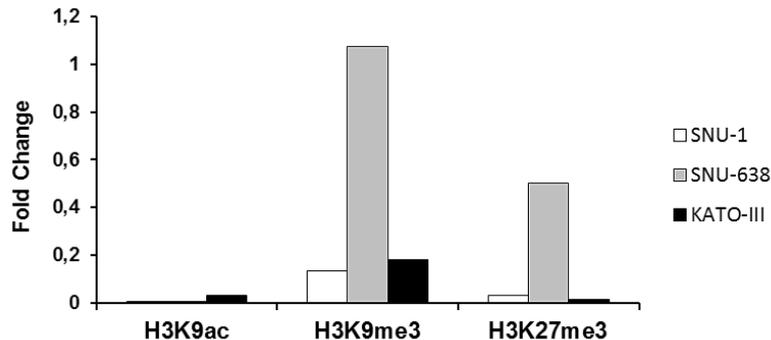


Figura 2.16 Immunoprecipitazione della cromatina su tre linee cellulari di carcinoma gastrico in cui si evidenzia l'aumento di modifiche repressive in SNU-638 (H3K9me3 e H3K27me3).

2.6 Le prime fasi dell'infezione con *H. pylori* in modelli cellulari con diversa espressione basale di TFF1

H. pylori è un fattore di rischio di classe I per lo sviluppo di tumore gastrico. La sua patogenicità è dovuta principalmente all'iniezione della citotossina cagA nelle cellule epiteliali gastriche, responsabile dell'innescare di una risposta pro-infiammatoria che a lungo andare può dar luogo a gastrite cronica e cancro gastrico.

TFF1 ed *H. pylori* colocalizzano nello strato mucoso della parete gastrica ed interagiscono tramite gli LPS del batterio; è stato inoltre dimostrato che *H. pylori* induce l'espressione di TFF1 *in vitro* (Dolan *et al.*, 2012; Montefusco *et al.*, 2013; Matsuda *et al.*, 2008).

È noto che l'infezione batterica altera la metilazione del DNA di oncogeni ed oncosoppressori aumentando il rischio di sviluppare tumore gastrico: alcuni studi riportano un'ipermetilazione del promotore di TFF1 in biopsie da pazienti con tumore gastrico positivi ad *H. pylori*, che ne determina la riduzione dell'espressione (Van De Bovenkamp *et al.*, 2005; Tomita *et al.*, 2011).

Tale dato è stato confermato dall'elaborazione delle informazioni del *database* TCGA che sono state utili per avere un numero molto grande di dati da biopsie gastriche da esaminare. I dati di espressione di TFF1 sono stati separati in due gruppi, negativi e positivi ad *H. pylori*, considerando solo i pazienti di cui erano presenti tali informazioni: è emersa una riduzione dell'espressione di TFF1 in tessuti gastrici positivi al batterio rispetto ai negativi (Figura 2.17).

Nel tentativo di fare chiarezza su tale apparente discordanza nell'espressione di TFF1 nei due sistemi (induzione dell'espressione in sistemi cellulari e riduzione in tessuti da pazienti con infezione cronica) e comprendere meglio il suo ruolo nelle prime fasi dell'infezione, sono attualmente in corso studi *in vivo* in modelli murini e sono stati condotti esperimenti di infezione *in vitro* di cui descriverò di seguito i risultati ottenuti.

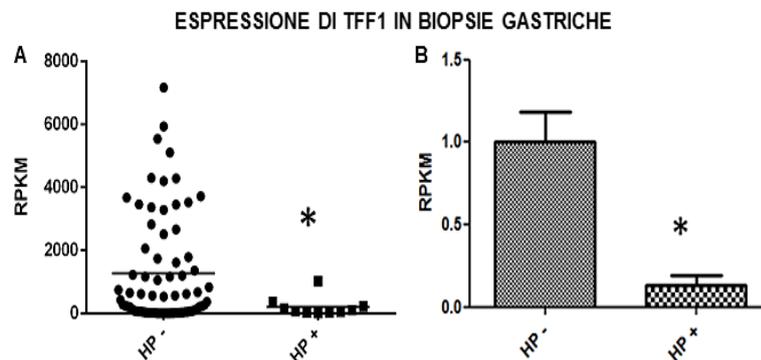


Figura 2.17 Elaborazione dei dati TCGA di espressione di TFF1 in relazione all'infezione con *H. pylori*. Livelli di espressione di TFF1 in valore assoluto di RPKM (A) e in rapporto ai campioni negativi al batterio (B).

2.6.1 Ottimizzazione delle condizioni di crescita e di infezione batterica

H. pylori è un batterio molto esigente che cresce su terreno solido ricco di nutrienti e supplementato con sangue defibrinato di cavallo. È descritto come un microrganismo microaerofilo, per cui inizialmente le piastre sono state messe in una giara a chiusura ermetica in cui l'atmosfera era costituita da 5% O₂ e 10% CO₂ grazie all'utilizzo di sacchetti che generano tale atmosfera assorbendo l'ossigeno e producendo anidride carbonica.

Park e il suo gruppo hanno recentemente suggerito che *H. pylori* sia un microrganismo capnofilo, perlomeno ad elevata densità si comporta come un microrganismo aerobico che necessita di anidride carbonica, per cui l'ossigeno non è

dannoso ma è necessario, insieme all'anidride carbonica, per la crescita del batterio (Park *et al.*, 2011). Seguendo tali osservazioni *H. pylori* è stato cresciuto in un'atmosfera costituita dal 20% O₂ e 10% CO₂: in queste condizioni è stata ottenuta una crescita rapida, predominanza della forma allungata rispetto alla coccoide ed elevata motilità del batterio, senza l'uso dei costosi sacchetti per la microaerofilia.

Per gli esperimenti di infezione *in vitro* sono state scelte due linee cellulari di carcinoma gastrico con una diversa espressione basale di TFF1 e caratteristiche differenti: la linea cellulare AGS è un tumore primario altamente differenziato e non esprime TFF1, le KATO III sono state isolate da un sito metastatico, sono poco differenziate ed esprimono elevati livelli di TFF1 (Tabella 2.3).

Le AGS hanno una morfologia epiteliale e sono un modello cellulare ampiamente utilizzato in letteratura per le infezioni *in vitro* con *H. pylori*. Le KATO III hanno una morfologia sferica e crescono sia in aderenza che in sospensione, ma per gli esperimenti di infezione le cellule sono state mantenute in coltura in modo da raggiungere una confluenza totale per avere uno strato di cellule adese da infettare, allontanando quelle in sospensione.

Linea	Origine	Differenziazione	Morfologia	TFF1
AGS	Adenocarcinoma gastrico	Molto differenziato	Epiteliale 	- 
KATO III	Carcinoma gastrico, sito metastatico	Scarsamente differenziato	Sferica 	+++ 

Tabella 2.3 Caratteristiche delle linee cellulari scelte per lo studio dell'infezione con *H. pylori*.

Le cellule sono state infettate per 36 e 72 ore con diverse molteplicità di infezione (MOI) (1:30, 1:100, 1:1000) e, tramite Real Time PCR, è stata analizzata l'espressione di IL-8, la citochina maggiormente indotta a seguito dell'infezione che è stata utilizzata come *marker* di infezione, e di TFF1 (Figura 2.18). È stato deciso di utilizzare la MOI 1:30 e in quanto in entrambe le linee cellulari i livelli di IL-8 e di TFF1 aumentano, le altre due MOI 1:100 e 1:1000 sono state scartate perché TFF1 non mostrava livelli di induzione più elevati rispetto alla MOI 1:30. Inoltre entrambe le linee cellulari mostravano segni di sofferenza a 72 ore, per cui è stato deciso di interrompere l'infezione a 36 ore, senza somministrare una seconda dose di batteri. Riassumendo, le condizioni scelte per i successivi esperimenti sono 36 ore di infezione con una MOI di 1:30.

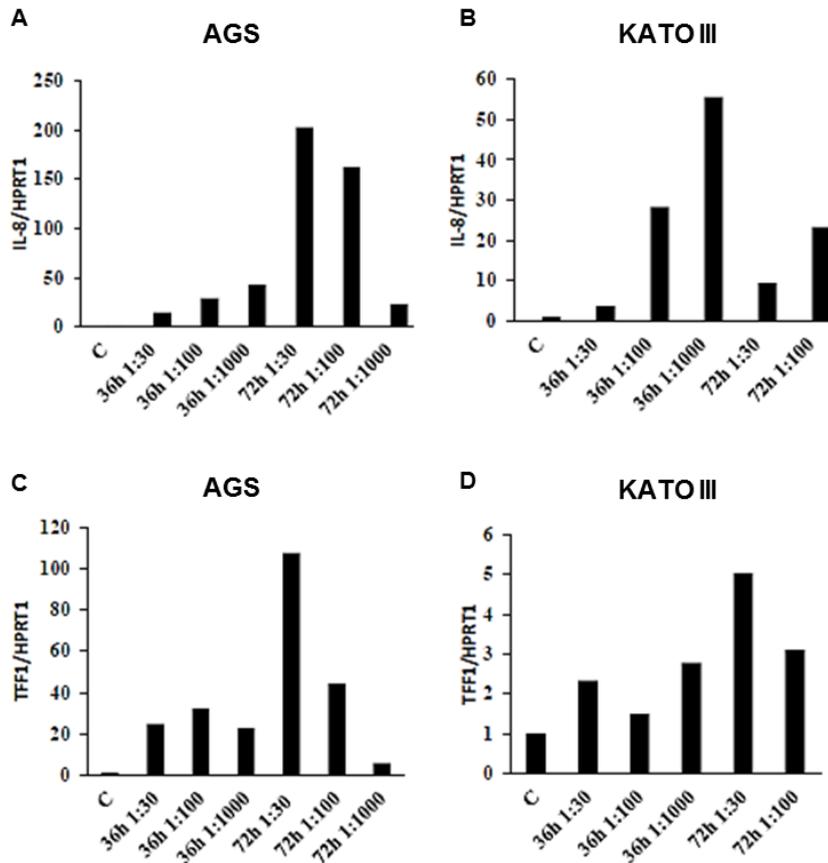


Figura 2.18 Analisi dell'espressione di TFF1 e IL-8 nelle due linee cellulari in seguito ad infezione con diverse MOI (1:30, 1:100, 1:1000) e a diversi tempi di infezione (36h e 72h).

2.6.2 Ruolo di TFF1 nell'infezione con *H. pylori*

In seguito all'infezione *in vitro* per 36 ore con una molteplicità di infezione di 1:30, si osserva una forte induzione di TFF1 in entrambe le linee cellulari, maggiore per la linea cellulare AGS che ha bassi livelli di espressione basale di TFF1. In questa linea addirittura si osservano elevate quantità di proteina tramite Western Blot in seguito all'infezione, mentre in condizioni di controllo non è possibile rilevarne il segnale (Figura 2.19).

L'induzione di TFF1 nelle prime ore successive all'infezione con *H. pylori* è probabilmente necessaria per proteggere la mucosa dal danno causato dal batterio e favorire il processo di riparazione epiteliale. D'altro canto, il batterio stesso potrebbe indurre l'espressione di TFF1 per favorire la sua adesione alla mucosa gastrica, mediante interazione con il peptide. La nostra ipotesi è che a lungo andare, con la persistenza dell'infezione e la cronicizzazione dell'infiammazione, i livelli elevati di specifiche citochine potrebbero indurre la riduzione dell'espressione di TFF1, la qual cosa spiegherebbe i dati delle biopsie gastriche in cui è presente una situazione infiammatoria avanzata o tumore gastrico.

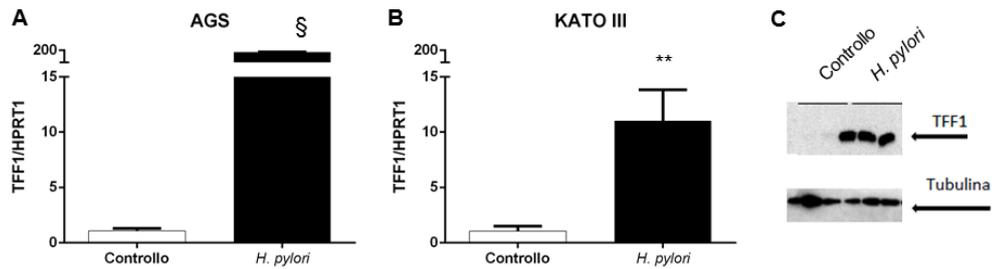


Figura 2.19 Effetti dell'infezione con *H. pylori*. Induzione dell'espressione di TFF1 misurata tramite RT-PCR in AGS (A) e KATO III (B). Western blot su AGS in cui è possibile vedere la proteina solo in seguito all'infezione.

In biopsie di paziente con tumore gastrico positive ad *H. pylori* è stata osservata un'aberrante metilazione di alcuni geni, tra cui anche TFF1. Dunque abbiamo deciso di analizzare la possibilità che l'espressione di TFF1, in seguito all'infezione *in vitro* nel nostro sistema cellulare, potesse essere modulata da metilazione del DNA.

Tramite metodica HRM, è stato analizzato il *pattern* di metilazione del promotore di TFF1: dal momento che si osserva un'induzione dell'espressione di TFF1 in seguito all'infezione, si dovrebbe osservare una riduzione della percentuale di metilazione per cui l'analisi è stata eseguita solo sulla linea cellulare AGS e non sulle KATO III che hanno già una percentuale di metilazione pari a 0%.

I nostri esperimenti dimostrano che in seguito all'infezione la percentuale di metilazione sul promotore di TFF1 nella linea cellulare AGS si riduce dal 50% al 40% (Figura 2.20.A-B). L'ipometilazione di TFF1 in AGS in seguito all'infezione è stata confermata tramite sequenziamento con bisolfito (Figura 2.20.C-D). La regione del promotore di TFF1 sequenziata contiene 3 CpG in più (-84, -56, +178) rispetto alla regione analizzata tramite HRM. Il vantaggio del sequenziamento è di poter ottenere informazioni sul livello di metilazione delle singole CpG, in particolare si evidenzia una notevole riduzione del livello di metilazione delle CpG a monte del sito di inizio della trascrizione (da -84 a -13) in seguito all'infezione rispetto alle altre CpG sequenziate la cui percentuale di metilazione non varia sensibilmente.

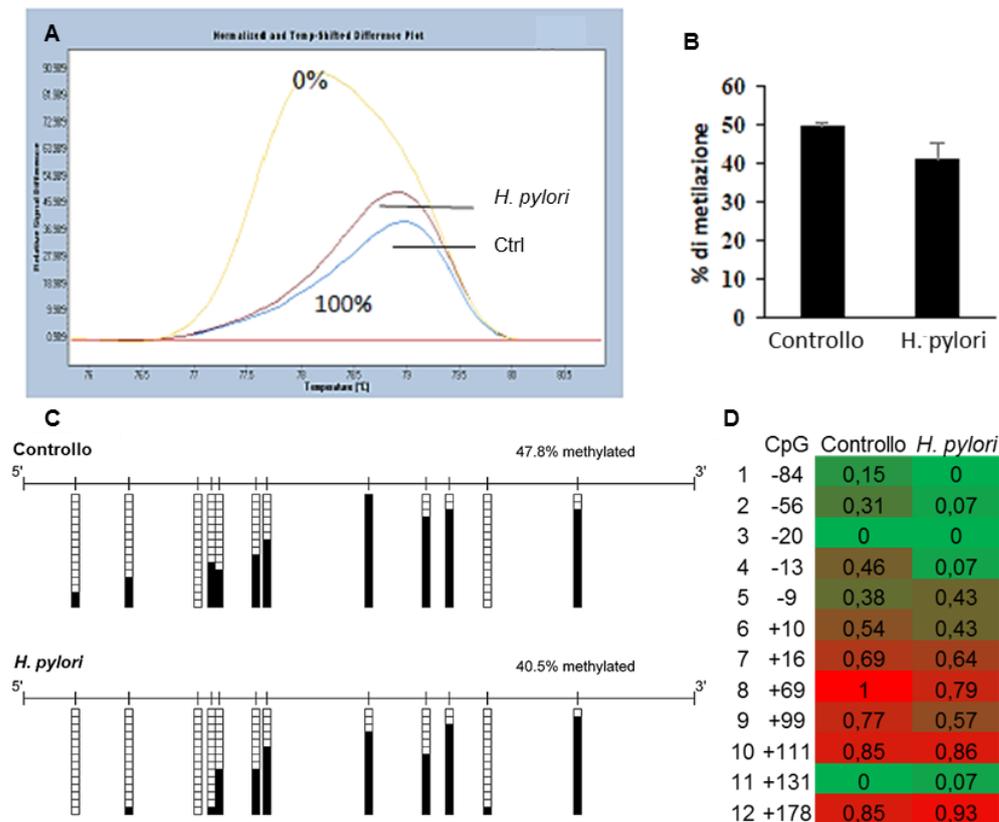


Figura 2.20 Effetti dell'infezione con *H. pylori*. Riduzione della percentuale di metilazione di TFF1 in AGS osservata tramite HRM (A-B) e sequenziamento con bisolfito (C-D).

2.6.3 *H. pylori* e fattori trifoglio

Allo scopo di caratterizzare gli eventi biologici che hanno luogo nelle prime fasi successive all'infezione e comprendere meglio il ruolo di TFF1 in questo processo, sono state studiate alcune alterazioni che avvengono in seguito all'infezione.

In prima istanza è stato analizzato il comportamento degli altri membri della famiglia dei fattori trifoglio, TFF2 e TFF3. Pur avendo una diversa localizzazione lungo il tratto gastrointestinale, è stato osservato che in linee cellulari gastriche, i fattori trifoglio possono stimolare la loro stessa espressione o quella di altri fattori della famiglia.

TFF2 e TFF1 sono spesso co-regolati e la loro espressione è indotta in seguito a danno tissutale (Leung *et al.*, 2002). Inoltre è noto che *H. pylori* induce metilazione del promotore di TFF2 (Peterson *et al.*, 2010).

L'aumento dell'espressione di TFF2 che si osserva in seguito all'infezione *in vitro* in AGS e KATO III potrebbe essere una risposta acuta in cui la produzione di TFF2 rappresenta un meccanismo protettivo in seguito a danno della mucosa gastrica. Inoltre l'espressione di TFF2 viene maggiormente indotta in KATO III che esprimono TFF1 costitutivamente rispetto alle AGS che non esprimono TFF1: tale risposta sembra essere dipendente dai livelli di espressione di TFF1, confermando la relazione tra i due peptidi (Figura 2.21).

A differenza di TFF1 e TFF2, in condizioni fisiologiche TFF3 non è espresso dalla mucosa gastrica e una sua aberrante espressione è stata osservata nei tumori gastrici in cui è presente metaplasia intestinale. TFF3 aumenta solo nella linea tumorale isolata da metastasi (KATO III) mentre diminuisce in quella di adenocarcinoma primario (Figura 2.21). L'espressione di TFF3 ha un andamento opposto nelle due linee cellulari con differente espressione basale di TFF1 che sono anche due tipi cellulari diversi: una maggiore espressione di TFF3 potrebbe favorire meccanismi di invasione tumorale.

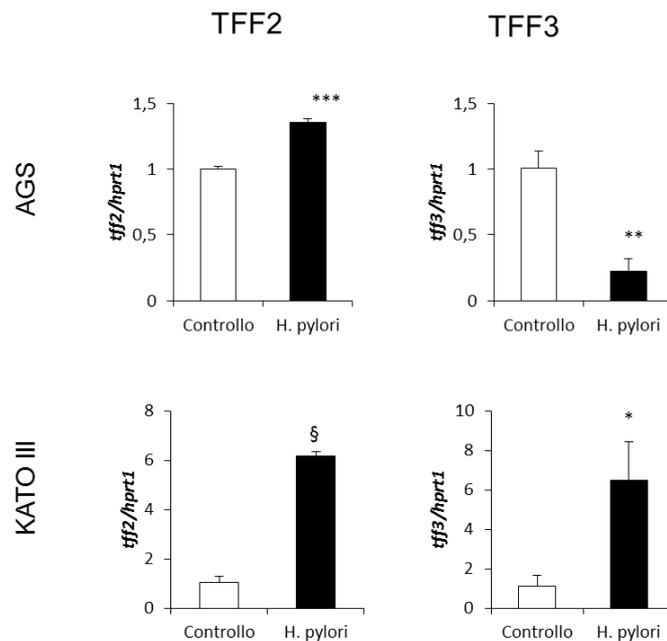


Figura 2.21 Effetti dell'infezione con *H. pylori*. Alterazione dell'espressione di TFF2 e TFF3 in AGS e KATO III.

2.6.4 *H. pylori* ed infiammazione

L'infezione induce l'espressione di numerose citochine pro-infiammatorie che determinano l'innescò di una risposta acuta che nel tempo può cronicizzare se il batterio non viene eradicato favorendo lo sviluppo di ulcera, gastrite e tumore gastrico. La produzione di citochine pro-infiammatorie causa il reclutamento di neutrofili e macrofagi e attiva la risposta immunitaria.

Tra le citochine analizzate, l'interleuchina-8 (IL-8) è quella maggiormente indotta (Figura 2.22). La sua espressione viene indotta in seguito all'iniezione della citotossina CagA nelle cellule epiteliali gastriche che determina una serie di risposte cellulari come il riarrangiamento cellulare e l'attivazione di *pathway* intracellulari in seguito all'innescò di una cascata fosforilativa. IL-8 viene indotta in seguito all'attivazione di NF- κ B che a sua volta si attiva in seguito a fosforilazione di IKK.

La produzione di IL-1 β in seguito all'infezione attiva geni dell'infiammazione tramite meccanismi di regolazione che coinvolgono NF- κ B e STAT-1; è stato dimostrato che IL-1 β favorisce la carcinogenesi gastrica in modelli murini. Alcuni studi dimostrano che TGF- β viene indotto per favorire l'adesione e la colonizzazione

di *H. pylori* nelle cellule ospiti e che TGF- β favorisce l'infiammazione della mucosa e la gastrite. L'attivazione della via di segnalazione TGF- β /SMAD induce transizione epitelio-mesenchimale che favorisce l'invasività tumorale e la metastasi.

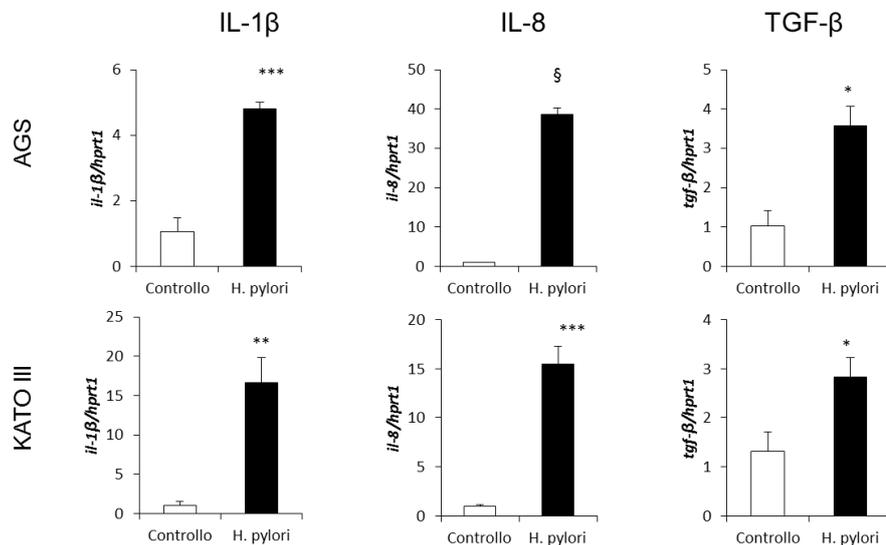


Figura 2.22 Effetti dell'infezione con *H. pylori*. Induzione di citochine pro-infiammatorie in AGS e KATO III.

2.6.5 *H. pylori* ed EMT

La transizione epitelio-mesenchimale (EMT) è un processo attraverso cui le cellule epiteliali perdono le loro caratteristiche di cellule epiteliali, la loro polarità e le giunzioni cellulari, assumendo un fenotipo mesenchimale caratterizzato da proprietà migratorie ed invasive. EMT è un processo fisiologico nello sviluppo embrionale e nella riparazione tissutale ma può assumere caratteristiche patologiche ad esempio nel processo di formazione di metastasi nella progressione tumorale.

Le cellule esprimono dei *marker* molecolari che sono caratteristici di una cellula di tipo epiteliale (E-caderina (E-CAD), catenine, claudine, occludine, ZO-1) o di tipo mesenchimale (N-caderina (N-CAD), ZEB1, SNAIL, TWIST, vimentina, fibronectina, α -SMA), questi comprendono proteine di membrana, proteine coinvolte nella formazione delle giunzioni cellulari e fattori di trascrizione che ne regolano l'espressione.

Recenti studi dimostrano che *H. pylori* promuove la EMT alterando l'espressione di alcuni marcatori mesenchimali o epiteliali. In pazienti con tumore gastrico positivo al batterio si osserva una riduzione dell'espressione del marcatore epiteliale E-CAD e un aumento della metilazione del promotore. Le stesse osservazioni sono state fatte in pazienti con lesioni premaligne, come ulcera o gastrite, rivelando che la metilazione di E-CAD è un evento precoce in seguito all'infezione con *H. pylori*.

È stata analizzata l'espressione di alcuni *marker* mesenchimali (N-caderina, vimentina, TWIST, SNAIL) e di un *marker* epiteliale (E-CAD) (Figura 2.23). Come atteso, l'espressione dei *marker* mesenchimali aumenta, tranne quella di vimentina

che si riduce. Una riduzione dell'espressione di vimentina si osserva in tumori gastrici di tipo intestinale (Moinova *et al.*, 2012). Inaspettatamente l'espressione del marker epiteliale E-CAD aumenta, in contrasto con i dati di letteratura in cui è riportata una riduzione dell'espressione dovuta ad ipermetilazione del promotore in pazienti con tumore gastrico e lesioni premaligne, positivi all'infezione da *H. pylori* (Chan *et al.*, 2003). Le linee cellulari AGS e KATO III non esprimono E-CAD perciò il comportamento che si osserva in questi modelli cellulari potrebbe essere molto interessante per comprendere ciò che avviene nelle prime fasi e sarà sicuramente da approfondire il ruolo di E-CAD, magari analizzando i meccanismi epigenetici che regolano la sua espressione nelle fasi precoci dell'infezione.

Ulteriori studi saranno necessari per comprendere la relazione degli eventi descritti fino a qui con TFF1 e l'importanza di tali processi nell'infezione.

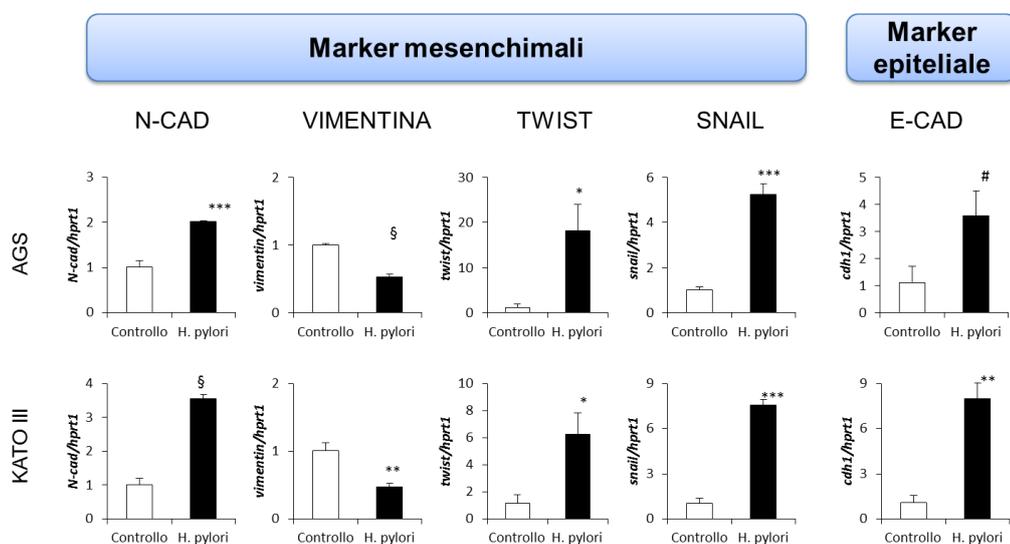


Figura 2.23 Effetti dell'infezione con *H. pylori*. Alterazione di marker epiteliali e mesenchimali in AGS e KATO III.

2.6.6 *H. pylori* e la metilazione globale del DNA

Come è stato già ampiamente descritto, *H. pylori* altera il *pattern* di metilazione di oncogeni ed oncosoppressori per cui è stata condotta un'analisi di *microarray* per ottenere informazioni circa le possibili alterazioni dello stato di metilazione globale nella linea cellulare AGS in seguito all'infezione. Partendo da 485577 CpG che vengono analizzate sul *chip* del *microarray*, sono state individuate 469993 CpG valide, dopo aver escluso i polimorfismi e le CpG localizzate sui cromosomi sessuali.

È stata calcolata la differenza tra il livello di metilazione in seguito all'infezione e in condizioni di controllo (in una scala da 0 a 1) e sono state selezionate 1398 CpG con una differenza del livello di metilazione maggiore di 0,1 nelle due condizioni sperimentali. Tra queste, la maggior parte sono ipometilate in seguito all'infezione (1308/1398 - 93,6%), il resto sono ipermetilate (90/1398 - 6,4%). Da questa prima analisi sembra che *H. pylori*, nelle prime fasi dell'infezione, induca attivazione trascrizionale.

Successivamente sono stati individuati i 946 geni differentemente metilati in seguito all'infezione e sono stati analizzati tramite Gene Ontology (Figura 2.24). Dall'analisi sono stati individuati alcuni *pathway* cellulari che risultano alterati in seguito all'infezione, in particolare ha attirato la nostra attenzione il *pathway* di segnalazione Wnt.

È noto infatti che questo *pathway* oncogenico viene attivato in numerosi tumori, ma soprattutto in seguito ad infezione con *H. pylori*, tuttavia non era ancora stato dimostrato un ruolo della metilazione del DNA in tale processo. Il *pathway* di Wnt induce EMT ed è associato con il *pathway* di segnalazione della E-caderina che, come emerge dai risultati del *microarray*, viene attivato in seguito all'infezione. Questo potrebbe in parte spiegare l'aumento dell'espressione che è stato osservato in precedenza tramite RT-PCR e confermerebbe un ruolo della metilazione del DNA nella regolazione della E-caderina, anche se il comportamento è opposto rispetto a ciò che si osserva nelle biopsie gastriche tumorali. Dato il ruolo centrale del *pathway* di segnalazione Wnt nella progressione del cancro gastrico (Chiurillo, 2015), tali osservazioni meritano successivi approfondimenti.

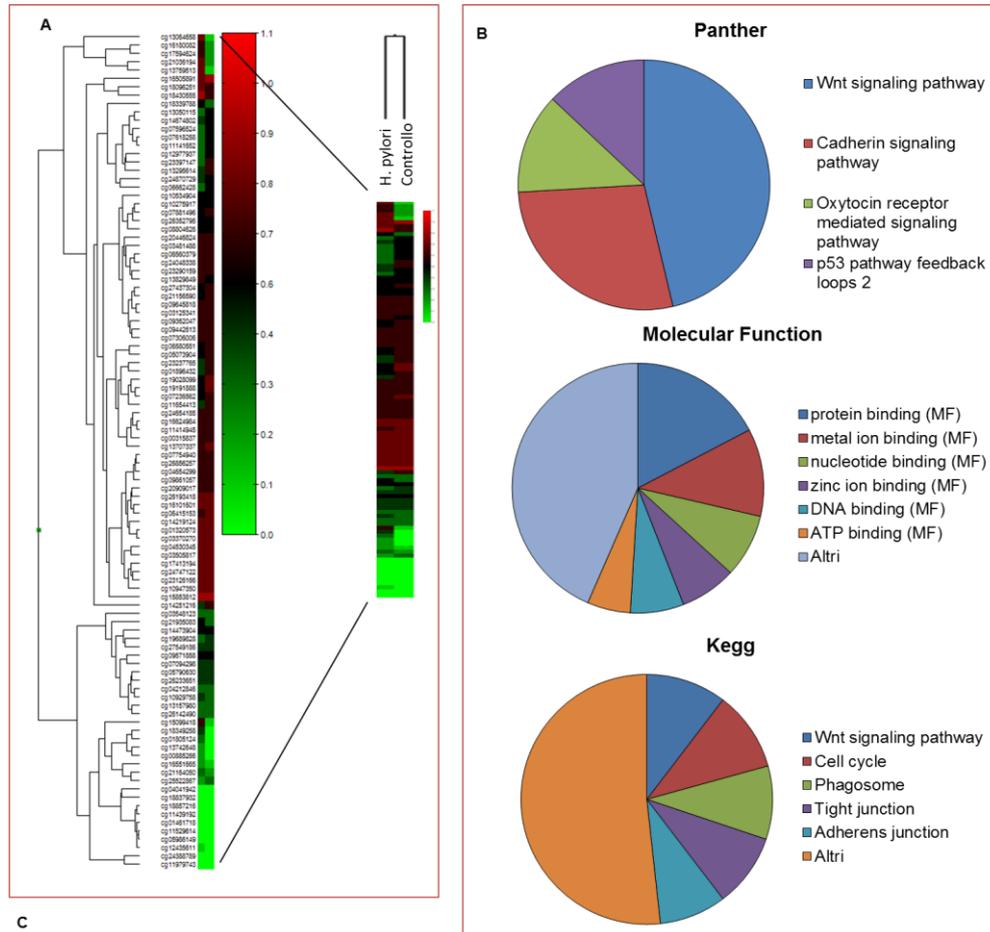


Figura 2.24 Analisi di microarray su cellule AGS in seguito ad infezione con H. pylori. **A** - Heatmap ottenuta dal microarray che riporta i livelli di metilazione nelle due condizioni sperimentali. **B** - Risultati di Gene Ontology in cui sono riportati alcuni dei pathway alterati in seguito all'infezione. **C** - I due pathway più significativi e i geni coinvolti.

CAPITOLO 3

CONCLUSIONI

In questa tesi di dottorato sono stati approfonditi i meccanismi che regolano l'espressione del fattore gastrointestinale TFF1, in particolare i meccanismi epigenetici.

Nella prima parte l'attenzione è stata dedicata allo studio del ruolo del rame nella regolazione dell'espressione di TFF1. TFF1 insieme alle mucine svolge un ruolo chiave nella protezione e nel mantenimento dell'integrità della mucosa gastrica.

In seguito a danno tissutale, i fattori trifoglio stimolano il processo di restituzione epiteliale caratterizzato da produzione di fattori di crescita e citochine, migrazione cellulare, proliferazione e differenziamento cellulare. In questo processo è coinvolto anche il rame che favorisce proliferazione cellulare e angiogenesi. In passato è stato dimostrato che il rame interagisce con il fattore trifoglio favorendone le funzioni biologiche; inoltre è stato osservato che TFF1 è coinvolto nella regolazione dell'omeostasi del rame. Queste evidenze sperimentali hanno aperto la strada a nuove interessanti prospettive di studio sull'influenza che tale interazione può avere nella regolazione trascrizionale di TFF1.

A tale scopo sono state scelte due linee cellulari che esprimono TFF1 a livelli rilevabili tramite *western blot*, MCF-7 e HT29-E12. TFF1 è espresso in tumori della mammella positivi al recettore degli estrogeni, come le MCF-7, e in associazione con la MUC5AC, prodotta insieme ad altre mucine e ai fattori trifoglio che formano lo strato di muco nelle HT29-E12. Il rame determina una riduzione dell'espressione di TFF1 in condizioni di sovraccarico (un comportamento analogo si osserva per TFF3 in HT29-E12). L'espressione di TFF1 è regolata da molti fattori di trascrizione, tra cui il recettore degli estrogeni, i fattori GATA, le proteine Sp, NF- κ B, TNF α , il fattore inducibile dell'ipossia HIF-1 α .

Tra questi Sp1 è stato recentemente descritto come un fattore di trascrizione sensibile al rame, fondamentale nella regolazione della sua omeostasi che, come è emerso dai risultati descritti in questa tesi, è coinvolto anche nella regolazione dell'espressione di TFF1 mediata dal rame. Sul suo promotore sono presenti due siti di legame per Sp1, uno già descritto in letteratura ed uno individuato dal nostro gruppo. Il principale meccanismo tramite cui Sp1 regola l'omeostasi del rame è la modulazione dell'espressione del trasportatore ad alta affinità hCtr1: una presenza massiccia di rame impedisce al fattore Sp1 di legarsi alle sequenze consenso sul suo promotore e su quello di hCtr1, determinando la riduzione dell'espressione di Sp1 e hCtr1. Tramite esperimenti di ChIP è stato dimostrato che livelli elevati di rame riducono anche il legame di Sp1 al promotore di TFF1.

È noto dalla letteratura che l'espressione di TFF1 è regolata anche da meccanismi epigenetici, che risultano alterati in condizioni patologiche. Per approfondire le modalità tramite cui il rame influenza l'espressione di TFF1 è stato analizzato il *pattern* di metilazione sul promotore di TFF1 in condizioni di sovraccarico del metallo. L'utilizzo di un metodo di HRM, validato per l'analisi della metilazione del promotore di TFF1, ha consentito di osservare che il rame non altera la percentuale di metilazione.

Un'analisi dettagliata della metilazione delle singole CpG sul DNA di linee cellulari, unita ai dati su tessuti di tumore gastrico prelevati dal database TCGA, ci ha consentito di individuare una regione minima responsabile (compresa tra -85 e +20) della regolazione dell'espressione TFF1. Dal momento che la metilazione di TFF1 è

un evento determinante in una elevata percentuale di tumori gastrici, l'individuazione di una regione minima potrebbe essere un utile strumento diagnostico.

Recentemente è emersa una relazione tra TFF1 e l'infezione da *H. pylori*, il maggior fattore di rischio per lo sviluppo del tumore gastrico, presente nello stomaco di più della metà della popolazione mondiale. TFF1 e *H. pylori* colocalizzano nello strato mucoso della parete gastrica ed interagiscono tramite gli LPS del batterio. Tale interazione tra *H. pylori* e TFF1 favorisce la colonizzazione del muco, la qual cosa potrebbe spiegare il tropismo selettivo del batterio per la mucosa gastrica. Queste evidenze ci hanno indotto ad approfondire il ruolo di TFF1 nel processo di colonizzazione batterica e nelle prime fasi dell'infezione.

L'utilizzo di due linee cellulari con diverso grado di differenziamento e con un'espressione basale di TFF1 differente, ci ha consentito di osservare un'induzione dell'espressione del fattore gastrointestinale tanto più elevata quanto più erano bassi i livelli basali. Inoltre, nella linea cellulare AGS che presenta una elevata metilazione del promotore e non esprime TFF1, è stata osservata una riduzione della metilazione in seguito ad infezione da *H. pylori*, suggerendo che tale meccanismo è coinvolto nel processo di infezione.

In realtà nelle biopsie gastriche da paziente la situazione è opposta, ossia si osserva una riduzione dell'espressione di TFF1 e un aumento della metilazione del suo promotore. La nostra ipotesi è che nelle prime fasi dell'infezione, un aumento dell'espressione di TFF1 potrebbe essere una risposta dell'ospite che tenta di proteggersi dai danni provocati dallo stato infiammatorio, ma anche un interesse del batterio che utilizzerebbe TFF1 per ancorarsi alla mucosa gastrica. Nelle biopsie da paziente invece, si osserva una situazione cronica, in cui nel tempo è andata aumentando la metilazione del promotore e, di conseguenza, diminuendo l'espressione del fattore TFF1, probabilmente proprio a causa di una persistente presenza di specifiche citochine infiammatorie. Per chiarire tale aspetto sono al momento in corso studi su modelli animali.

Inoltre, al fine di chiarire i meccanismi patogenetici in cui sono coinvolti il batterio patogeno e TFF1, nelle due linee cellulari di carcinoma gastrico AGS e KATO III è stata analizzata l'espressione dei fattori trifoglio, di alcune citochine pro-infiammatorie e di geni coinvolti nell'EMT da cui sono emerse evidenti alterazioni in seguito all'infezione. Ulteriori esperimenti saranno necessari per approfondire la correlazione con TFF1 e con i meccanismi di regolazione epigenetica.

Un primo passo in tale direzione è stato fatto con un esperimento di microarray che ha permesso di analizzare lo stato di metilazione globale in seguito all'infezione nella linea cellulare AGS. È emersa una ridotta metilazione, e quindi l'attivazione, di geni coinvolti in diversi *pathway*, tra cui quello oncogenico di Wnt, attivato in molte neoplasie e in seguito all'infezione con *H. pylori*, e per la prima volta è stata dimostrata l'alterazione del *pattern* di metilazione dei geni coinvolti. Sarà estremamente interessante utilizzare questi dati come punto di partenza per approfondire il ruolo di questi geni nei processi patogenetici che si innescano in seguito all'infezione.

CAPITOLO 4

MATERIALI E METODI

4.1 Colture cellulari

Le linee cellulari umane utilizzate per gli esperimenti di questa tesi sono descritti in Tabella 4.1. Tutti i mezzi di crescita sono stati supplementati con 10% di siero fetale bovino (FBS, Euroclone) e una miscela di antibiotici penicillina/streptomicina (100 U/ml Penicillina e 100 µg/ml Streptomina, Euroclone). Tutte le linee cellulari sono state mantenute in incubatore ad una temperatura di 37°C in atmosfera al 5% di CO₂.

Per alcuni esperimenti i campioni di RNA, DNA o proteine sono stati gentilmente forniti dal gruppo di epigenetica del cancro diretto dal Prof. Manel Esteller (IDIBELL, Spagna).

Linea cellulare	Origine	Morfologia	Altro	Mezzo di crescita
AGS	Adenocarcinoma gastrico, tipo intestinale	Epiteliale in aderenza	Molto differenziate	Ham's F-12 Nutrient Mixture
HT29-E12	Adenocarcinoma del colon, clone di cellule <i>goblet</i> selezionate con metotressato da HT29	Epiteliale in aderenza	Produzione di uno strato mucoso dopo 21 giorni dalla confluenza	Dulbecco's Modified Eagle Medium
KATO III	Adenocarcinoma gastrico, metastasi di tipo diffuso	Sferica in aderenza e sospensione	Scarsamente differenziate	RPMI Medium 1640
MCF-7	Carcinoma mammario, metastasi	Epiteliale in aderenza	Positività al recettore degli estrogeni	Dulbecco's Modified Eagle Medium
SNU-1	Carcinoma gastrico	Epiteliale in sospensione	Scarsamente differenziate	RPMI Medium 1640
SNU-638	Adenocarcinoma gastrico, metastasi	Epiteliale in aderenza	Scarsamente differenziate	RPMI Medium 1640

Tabella 4.1 Descrizione delle linee cellulari umane utilizzate per gli esperimenti e mezzi di crescita.

4.1.1 Trattamenti cellulari

Per indurre condizioni di sovraccarico di rame, le cellule MCF-7 e HT29-E12 sono state trattate per 48 ore con 10 e 100 µM CuCl₂. Le cellule HT29-E12 sono state trattate dopo 21 giorni dalla confluenza per consentire la produzione dello strato di muco contenente i fattori trifoglio.

Per la validazione del metodo di HRM le cellule HeLa sono state trattate con diverse concentrazioni di 5-aza-2'-deossicitidina per 48 ore (0,5; 1; 2,5; 5; 10 µM).

4.2 Real-Time PCR

L'RNA è stato estratto e purificato mediante l'utilizzo di *TriPure Isolation Reagent*® (Sigma), quantizzato con lo strumento NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) e la sua integrità è stata controllata tramite elettroforesi su gel di agarosio all'1,3% in TAE 1x. Successivamente 1 µg di RNA è stato retrotrascritto a cDNA usando la trascrittasi inversa M-MLV *Reverse Transcriptase* (Sigma). L'espressione genica è stata analizzata tramite *Real-Time PCR* sullo strumento *Light Cycler 480 II*; le reazioni sono state preparate con *LightCycler*® 480 *Probes Master* per TFF1, TFF3 e HPRT1 e con *LightCycler*® 480 *SYBR Green I Master* per gli altri geni (Roche). TFF1, TFF3 e HPRT1 sono stati amplificati con i *Real Time Ready Catalog Assay* (Roche) completi di primer di amplificazione e sonde Taqman (*Universal ProbeLibrary*, Assay Id 137113, Id 144860 e Id 102079, rispettivamente). In Tabella 4.2 sono riportate le sequenze degli *primer* utilizzati per gli altri geni analizzati con Sybr Green. Il valore di "*fold induction*" che esprime la variazione di espressione nelle condizioni sperimentali è stato calcolato come $2^{-\Delta\Delta Ct}$, in cui $\Delta\Delta Ct$ è la differenza tra il ΔCt di ogni campione e il ΔCt delle condizioni di controllo e il ΔCt è la differenza tra il Ct del gene target e HPRT1 che è il gene di riferimento. La significatività dei differenti livelli di espressione è stata misurata utilizzando il test statistico *Student's t-test*.

Gene	Forward	Reverse	T (°C)
TFF2	CCAGTGCCTCCAGGCTGAG	AACCAGCCTCTCTTAGTAATGG	60
hCtr1	TGCCCAACTAAACCCAGAAC	GCCAGACTGGTCTCGAACTC	60
Sp1	TGCAGCAGAATTGAGTCACC	TTGGTACTGCTGCCACTCTG	60
IL-8	ATGACTTCCAAGCTGGCCGTGGCT	TCTCAGCCCTCTTAAACTTCTC	60
IL-1β	AATCTGTACCTGCCTGCGTGTT	TGGGTAATTTTGGGATCTACACTCT	60
TGF-β	GAGGAGCTTGCTGCAGAGT	ATCAGCAGAGTAGCTGCGGT	60
TWIST	GCCAGGTACATCGACTTCCTCT	TCCATCCTCCAGACCGAGAAGG	56
SNAIL	TGCCCTCAAGATGCACATCCGA	GGGACAGGAGAAGGGCTTCTC	60
VIMENTINA	CTCCGGGAGAAATTGCAGGA	TTCAAGGTCAAGACGTGCCA	60
N-CADERINA	TGTTTGACTATGAAGGCAGTGG	TCAGTCATCACCTCCACCAT	60
E-CADERINA	TTCCCAACTCCTCTCTG	AAACCTTGCCTTCTTTGTC	58
HPRT1	GACCAGTCAACAGGGACAT	CCTGACCAAGGAAAGCAAAG	60

Tabella 4.2 Sequenze dei primer utilizzati per RT-PCR.

4.3 Immunoprecipitazione della cromatina

L'immunoprecipitazione della cromatina (ChIP) consente di analizzare l'interazione tra DNA e proteine, in particolare è utilizzata per analizzare la presenza di fattori di trascrizione o di particolari modifiche istoniche in specifiche regioni genomiche.

Nel primo *step* si aggiunge formaldeide ad una concentrazione finale di 0,8% nel mezzo di coltura per ottenere il *cross-linking* tra il DNA e le proteine. Dopo 6 min in agitazione si aggiunge glicina 125 mM per 5 min per bloccare la reazione. Le cellule vengono staccate in PBS contenente inibitori di proteasi (*Protease Inhibitor*

Cocktail, Sigma) con l'aiuto di uno *scraper*. Il campione è centrifugato a 188g per 3 min a 4°C e il surnatante è eliminato.

Si risospende il *pellet* in 4 volumi di Buffer A (10 mM Hepes pH 7,9; 1 mM EDTA pH 8; 60 mM KCl; 0,2% Igepal; IP 1X), si incuba in ghiaccio per 10 min e si centrifugano i nuclei a 660g per 5 min a 4°C. Si lava il *pellet* 2 volte con 250 µl di Buffer B (10 mM Hepes pH 7,9; 1 mM EDTA pH 8; 60 mM KCl), si centrifuga a 660g per 5 min a 4°C. Si risospende il *pellet* in 1 ml di Lysis Buffer (50 mM Tris HCl pH 8; 10 mM EDTA; 1% SDS; 1mM PMSF; IP 1X) e si incubano i campioni in ghiaccio per 10 min. Il DNA viene frammentato tramite sonicazione per 50 sec (10 sec *pulse on*, 5 sec *pulse off*) (Vibra-Cell, Sonics). 20 µl del campione sono diluiti in 180 µl di *Dilution Buffer* (1% Triton X-100; 2 mM EDTA; 150 mM NaCl; 20 mM Tris HCl pH 8) contenente 10 µl di proteinasi K 10 mg/ml (*Proteinase K from Engyodontium album*, Sigma) e incubati *overnight* (ON) a 65°C in agitazione. Il restante campione viene conservato a 4°C.

Il giorno successivo si procede con l'estrazione del DNA dai campioni incubati ON aggiungendo 200 µl di una miscela di fenolo:cloroformio:alcol isoamilico (25:24:1) e centrifugando a 11000g per 5 min a TA. Si recupera la fase superiore e si precipita il DNA con 1/10 di 3M sodio acetato pH 5,2 e 3 volumi di etanolo 100%, si agita e si incuba 30 min a -80°C. Il campione è centrifugato a 12000g per 30 min a 4°C, il *pellet* lavato con 70% v/v etanolo e centrifugato a 12000g per 10 min a 4°C. Il *pellet* è asciugato facendo evaporare l'etanolo a 37°C per qualche minuto e poi risospeso in 20 µl di acqua. Per verificare il grado di frammentazione della cromatina si caricano 10 µl di campione su gel di agarosio all'1% in TAE 1X: lo *smear* più intenso deve trovarsi intorno alle 500 bp altrimenti si ripete la sonicazione e l'estrazione. Il DNA è stato quantizzato spettrofotometricamente tramite NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).

I campioni che erano stati conservati a 4°C sono centrifugati a 12000 g per 30 min a 4°C e il surnatante viene trasferito in nuove eppendorf. A questo punto si procede con l'immunoprecipitazione della cromatina che è stata effettuata, a seconda dell'esperimento, con i seguenti anticorpi: H3K27me3 (pAb-195-050, Diagenode), anti-Sp1, anti-H3K9ac, anti-H3K9me3 e anti-H3 come controllo positivo (rispettivamente ab13370, ab47915, ab8898, ab1791, Abcam), IgG come controllo negativo. Per ogni anticorpo sono stati utilizzati 50 µg di DNA diluiti 10 volte in *Dilution Buffer* contenente inibitori di proteasi (*Protease Inhibitor Cocktail*, Sigma) e 30 µl di *beads*. Le *beads* sono state preparate risospendendo la proteina A (*Protein A-Sepharose from Staphylococcus aureus*, Sigma) in PBS. La soluzione è stata in agitazione su ruota per 1 ora a temperatura ambiente, centrifugata a 188g per 3 min, il surnatante è stato allontanato e la resina è stata risospesa in ugual volume di PBS. La soluzione è stata equilibrata con *salmon testes DNA* (Sigma) 1 µg/ml e BSA 0,5 mg/ml e lasciata in agitazione su ruota per 2 ore a 4°C. La miscela contenente il campione e le *beads* è stata centrifugata a 188g per 3 min a 4°C, è stata messa in agitazione su ruota per 2 ore a 4°C e di nuovo centrifugata a 188g per 3 min a 4°C. Il surnatante è stato diviso in un numero di aliquote pari al numero di anticorpi a cui sono stati aggiunti 3 µg di ogni anticorpo. Il campione è agitato su ruota ON a 4°C. Il giorno successivo si aggiungono 30 µl di *beads* per ogni campione e si lasciano su ruota per 2 ore a 4°C. Si centrifuga a 188g per 3 min a 4°C e si elimina il surnatante tranne gli ultimi 500 µl in cui si risospende la resina. Il campione così risospeso è trasferito in eppendorf e centrifugato a 425g per 3 min a 4°C. Il surnatante è allontanato, le *beads* lavate in 500 µl di TSE I (20 mM Tris HCl pH 8; 0,1% SDS; 2mM EDTA; 1% Triton X-100; 150 mM NaCl) e centrifugate a 425g per 3 min a 4°C. Il lavaggio è ripetuto 3 volte. Il campione si risospende in 500 µl di TSE II (20 mM Tris

HCl pH 8; 0,1% SDS; 2mM EDTA; 1% Triton X-100; 500 mM NaCl), si centrifuga a 425g per 3 min a 4°C e si allontana il surnatante.

Le *beads* sono risospese in 250 µl di *Elution Buffer* (1% SDS; 0,1M NaHCO₃), lasciate in agitazione per 30 min su ruota a TA e centrifugate a 1300g per 5 min a TA. Il surnatante viene trasferito in eppendorf. L'eluizione è ripetuta e il surnatante è unito a quello ottenuto dalla prima eluizione. Ad ogni campione si aggiungono 20 µl di 5 M NaCl e si incuba a 65°C ON in agitazione per revertire i *crosslink* tra proteine e DNA. Il giorno successivo si aggiungono 2 µl di Proteinasi K 10 mg/ml, 10 µl di EDTA 500 mM, 20 µl di Tris HCl 1 M pH 6,5 e si incuba per 3 ore a 45°C. Al campione si aggiunge un volume di fenolo-cloroformio e si centrifuga a 12000g per 5 min a TA. Si trasferisce la fase superiore in una nuova eppendorf e si aggiungono 1,25 µl di glicogeno, 1/10 di sodio acetato 3 M pH 5,2 e 3 volumi di 100% etanolo. Si incuba 30 min a -80°C e si centrifuga a 12000g per 30 min a TA. Si allontana il surnatante, si risospese il *pellet* in 70% etanolo e si centrifuga di nuovo a 12000g per 10 min a 4°C. Il *pellet* viene asciugato facendo evaporare l'etanolo a 37°C e risospeso in TE (10 mM Tris-HCl pH 8,1; 1mM EDTA). Il campione è incubato per 3 min a 37°C.

4.4 Real-Time PCR

I frammenti di DNA precipitati con la ChIP sono stati analizzati tramite PCR quantitativa (q-PCR) con lo strumento *Light Cycler 480 II*. Per ogni campione sono stati amplificati 5 µl di DNA con *LightCycler® 480 SYBR Green I Master* utilizzando i primer in Tabella 4.3. Per analizzare la quantità di Sp1 legato sul promotore di TFF1 in condizioni di sovraccarico di rame nella linea cellulare HT29-E12, è stata amplificata la regione contenente il sito canonico con i *primer* Sp1 e il sito individuato dal nostro gruppo con i *primer* Sp1*. Per verificare la presenza di modifiche istoniche sul promotore di TFF1 in tre linee cellulari di tumore gastrico, è stata utilizzata la coppia TFF1. I campioni sono stati normalizzati rispetto al controllo positivo H3.

Gene	Forward	Reverse
Sp1	GACGGAATGGGCTTCATGAGC	GCGTTAGATAACATTTGCCTAAGGAGG
Sp1*	GTTGGCCAGGCTAGTCTCAAATC	GTAGGCCTGGCGAGTGGCTC
TFF1	CCATGGGAAAGAGGGACTTT	TGGTCAAGCTACATGGAAGG

Tabella 4.3 Sequenze dei primer utilizzati per q-PCR.

4.5 Validazione di un metodo di *High Resolution Melting* per lo studio della metilazione del DNA sul promotore di TFF1

4.5.1 Estrazione e conversione del DNA

Il DNA è stato estratto dalle cellule con *NucleoSpin® Tissue kit* (Macherey Nagel) e la concentrazione è stata determinata mediante lettura spettrofotometrica con lo strumento NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). Una quantità pari a 500 ng di DNA è stata modificata con bisolfito con *EZ DNA Methylation™ kit* (Zymo Research).

4.5.2 Disegno dei *primer*

La fase più importante per la messa a punto del metodo è stata la progettazione dei *primer*. Essi sono stati disegnati in una regione di circa 1kb (da -703 a +303) intorno al sito di inizio della trascrizione sul promotore di TFF1 in modo che ogni *primer* avesse una lunghezza di 18-25 bp e l'amplificato contenesse 3-6 CpG in una regione di circa 200 bp. È stato assunto che tutte le citosine fossero state convertite in uracile in seguito al trattamento con bisolfito, per cui sono state trattate come adenine che appaiano con timina. Inoltre non sono stati inclusi dinucleotidi CpG potenzialmente metilati nella sequenza dei *primer* in modo da amplificare la regione di interesse in maniera indipendente dallo stato di metilazione.

In seguito sono stati valutati i parametri classici come la formazione di strutture secondarie e/o dimeri di *primer* tramite il *tool* bioinformatico *OligoAnalyzer* 3.1 (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>).

I *primer* sono stati testati tramite PCR classica con un *range* di temperatura da 48 a 58°C per scegliere la temperatura più adatta; successivamente sono stati testati per HRM (Tabella 4.4).

4.5.3 Messa a punto del metodo di HRM

Per testare le coppie tramite HRM sono stati confrontati i profili di metilazione di campioni di DNA a percentuale nota di metilazione (0, 25, 50, 75, 90, 100), ottenuti miscelando opportunamente DNA di MCF-7 come 0% e *CpG Genome™ Universal Methylated DNA* (Millipore) come 100% dopo essere stati modificati con bisolfito. L'amplificazione e l'analisi di *melting* sono state effettuate con lo strumento Light Cycler 480 II. Le reazioni sono state preparate con *LightCycler® 480 High Resolution Melting Master kit* (Roche) miscelando: Master Mix 1x, 2 mM MgCl₂ (contenente *FastStart Taq DNA polymerase*, *buffer* di reazione, dNTP, *High Resolution Melting Dye*), 400 nM di ogni *primer*, 1 µl di DNA modificato con bisolfito (concentrazione teorica 25 ng/µl).

L'amplificazione prevede una fase di 10 min a 95°C, seguita da 45 cicli di 10 sec a 95°C, 10 sec alla temperatura di *annealing* e 15 sec a 72°C. Le analisi di *high resolution melting* sono state condotte a temperatura crescente da 65 a 95°C con un incremento di 0,02°C/s. Le curve di *melting* sono state normalizzate con *LightCycler® 480 Gene Scanning Software*.

Coppia	Primer	Sequenza	CpG	T _a (°C)
1	Forward	GTGATTTTTTTGATTTAATTTTTAGAGTAG	3	57-50*
	Reverse	AAAATCAAAAATTTAAACTAACCTAACCC		
2	Forward	GGTTAGGTTAGTTTTAAATTTTTGATTTT	3	60-50*
	Reverse	AAAAAAAAAACTCATAAAACCCATT		
3	Forward	AATGGGTTTTATGAGTTTTTTTTTTT	5	60-50*
	Reverse	AACCTTAATCCAAATCCTACTCATATC		
4	Forward	GATTTTTTAGTTAAGATGATTTTATTATATG	3	52
	Reverse	ATTTTATAAAACAAACTCTATTTACTTAAAA		
5	Forward	GTAGTTTGATTATGTTTAGGAAATTTTTTGA	8	60-50*
	Reverse	AACCAACATAAACACCAAACCAA		
6	Forward	TTTTAAGTAAATAGAGTTTGTTTTATAAAAT	9	58-50*
	Reverse	ACTATAACCCACAAAACAAAAA		
7	Forward	TTTTTTTTGTTTTGTGGGGTTATAGT	2	57-50*
	Reverse	CCACCCTAAATTACTCTCCACCTA		

Tabella 4.4 Sequenze dei primer utilizzati per HRM.

4.6 Infezioni *in vitro* con *Helicobacter pylori*

4.6.1 Condizioni di crescita batterica

Per gli esperimenti di infezione *in vitro* è stato utilizzato il ceppo P12 di *H. pylori*, isolato da pazienti con ulcere duodenali, ampiamente descritto ed utilizzato in letteratura, gentilmente fornito dalla Dott.ssa Marguerite Clyne (School of Medicine & Medical Science University College, Dublin). I batteri sono stati seminati su piastre di Columbia Blood Agar base (Oxoid) con il 7% v/v di sangue defibrinato di cavallo (Oxoid), rese selettive per la crescita del batterio con l'aggiunta di una miscela di antibiotici (DENT, Oxoid). In un primo momento i batteri sono stati cresciuti in condizioni microaerofile in apposite giare a chiusura ermetica attraverso l'utilizzo di *CampyGen gas packs* (Oxoid); in seguito si è deciso di crescere il batterio in condizioni capnofiliche (10% di CO₂) a 37°C dal momento che mostrava una crescita altrettanto buona.

4.6.2 Condizioni di infezione *in vitro*

I batteri vengono raccolti dopo 72 ore dalla semina in RPMI-1640 (Euroclone) supplementato con 10% FBS (senza l'aggiunta di antibiotici) e la concentrazione della sospensione batterica è determinata spettrofotometricamente considerando che 1 OD₆₀₀ = 1x10⁸ batteri/ml. Prima di utilizzarli per le infezioni vengono osservati al microscopio per verificare che non ci sia più del 10% in forma coccoide e che presentino buona motilità.

Per la messa a punto dell'infezione sulle cellule eucariotiche AGS e KATO III sono state provate diverse molteplicità di infezione (MOI 1:30, 1:100 e 1:1000). Prima dell'infezione in piastra, le cellule sono state lavate con PBS per allontanare residui del mezzo contenente la miscela di antibiotici penicillina/streptomycin ed è stato

aggiunto il mezzo di infezione RPMI-1640 (Euroclone) supplementato con 10% FBS contenente i batteri. Dopo 36 ore i batteri sono stati allontanati e metà delle piastre sono state raccolte. Sulle piastre rimanenti si è proceduto con il secondo *step* di infezione e sono state raccolte dopo ulteriori 36 ore, per un totale di 72 ore. L'analisi morfologica e molecolare dell'infezione, ci ha consentito di selezionare la MOI 1:30 per le successive infezioni. Dalle cellule infettate sono stati estratti RNA, DNA e proteine.

4.7 Western Blotting

Le cellule sono state raccolte e il *pellet* è stato risospeso in buffer di lisi (PBS-Igepal 0,1% v/v) e sonicato per 1 minuto (10 sec *pulse on*, 10 sec *pulse off*) (Vibra-Cell, Sonics). Il lisato intracellulare è stato recuperato dopo centrifugazione a 10000g per 10 min e la concentrazione proteica è stata determinata mediante il metodo Bradford. I campioni sono stati preparati con SDS *gel-loading buffer* (50 mM Tris-Cl pH 6,8; 2% w/v SDS; 0,1% blu di bromofenolo; 10% (v/v) glicerolo) a cui è stato aggiunto l'agente riducente β -mercaptoetanolo e sono stati caricati su gel di poliacrilammide al 15%. Per seguire la migrazione dei campioni, è stata usata come riferimento una miscela di standard di pesi molecolari *Protein Marker VI Applichem* (12-245 kDa). La corsa elettroforetica è stata eseguita in un tampone Tris-Glicina-SDS (TGS 1x, BioRad).

Le proteine sono state trasferite su membrana di nitrocellulosa Hybond-ECL (Amersham Biosciences) in tampone TGS 1x con il 20% v/v di metanolo a 75 V costanti per 1 ora; al termine la membrana è stata colorata con una soluzione di Rosso Ponceau (0,1% Ponceau w/v in 5% Acido Acetico v/v) per valutare l'efficienza del trasferimento. La membrana è stata incubata per 1 ora in una soluzione di *blocking* contenente latte privato della componente grassa 5% p/v (*Blotting Grade Blocker Non Fat Dry Milk*, BioRad) e poi incubata tutta la notte a 4 °C con l'anticorpo primario in una soluzione di latte 5% p/v (anti-TFF1, policlonale sviluppato in coniglio dalla Genscript dietro ordinazione; anti-tubulina, Sigma). Il giorno successivo la membrana è stata lavata con TBS-TWEEN 20 0,1% v/v e successivamente incubata per 1 ora a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario in latte 5% p/v (anti-mouse, Santa Cruz; anti-rabbit, Thermo Scientific). La membrana è stata ulteriormente lavata con TBS-TWEEN 20 0,1% v/v e incubata con *Chemiluminescent Substrate for Western Blotting* (Cyanagen) per rivelare i segnali di chemiluminescenza che sono stati acquisiti con il sistema di acquisizione di immagini digitali Image Quant LAS4000 (GE Healthcare) e l'elaborazione dei dati è stata effettuata con il software di analisi *ImageQuant TL*.

4.8 Analisi di metilazione tramite *Microarray*

Per ottenere informazioni circa le variazioni di metilazione globale in eseguito ad infezione *in vitro* sulla linea AGS con *H. pylori*, è stato condotto un esperimento di *microarray* con *Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip Kit* (Illumina). L'analisi è stata fatta secondo il protocollo standard fornito da Illumina: il DNA è stato modificato con bisolfito con *EZ DNA Methylation™ kit* (Zymo Research), i segnali dei *Beadchip* sono stati rilevati e digitalizzati con uno scanner Illumina. Sui dati grezzi è stato eseguito un controllo della qualità, la normalizzazione dei dati e la sottrazione del fondo. Dalla quantità iniziale di 485577 dati di β -values sono stati scartati i

polimorfismi, le CpG con *P-value* inferiore a 0,01 e le CpG localizzate sui cromosomi, raggiungendo un numero di 469993 CpG valide. Quindi è stata calcolata la differenza tra il livello di metilazione in seguito all'infezione e in condizioni di controllo (in una scala da 0 a 1) e sono state selezionate 1398 CpG con una differenza del livello di metilazione maggiore di 0,1 nelle due condizioni sperimentali. I 946 geni diversamente metilati sono stati analizzati tramite *GO Enrichment Analysis*, un *tool* di *Gene Ontology*, alla ricerca di possibili *pathway* cellulari comuni (<http://geneontology.org/page/go-enrichment-analysis>).

4.9 The Cancer Genome Atlas

The Cancer Genome Atlas (TCGA) è un database pubblico che raccoglie i profili genomici di tutti i tipi e sottotipi tumorali provenienti da un elevato numero di pazienti (<https://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/tcgaHome2.jsp>). Sono presenti set di dati relativi ai livelli di espressione genica nel tessuto tumorale e nei tessuti normali (ottenuti tramite RNAseq); profili di espressione di miRNA (ottenuti tramite miRNAseq); alterazioni della sequenza del DNA come inserzioni, delezioni, frequenza di mutazioni, CNV, SNP, infezioni virali; profili della metilazione globale del DNA. Per i nostri studi sono stati selezionati i dati relativi al carcinoma gastrico.

4.10 Clonaggio e sequenziamento con bisolfito

Il DNA modificato con bisolfito è stato amplificato con *primer* disegnati con *Methyl Primer Express Software* (Applied Biosystems), assumendo che le citosine siano state convertite in uracile, inoltre non contengono siti CpG. I *primer* (Forward, TGGAGATTATTGTTTTAGAGGATT; Reverse, AAACAACACCTAACACAAAACA) amplificano una regione di 350bp che va da -150 a +200 sul promotore di TFF1 (Figura 4.1).

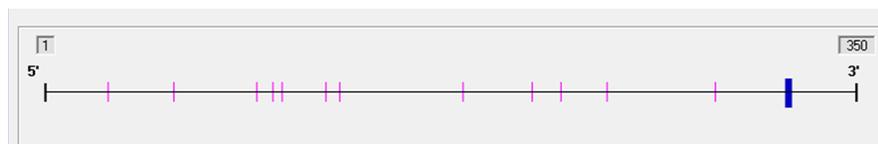


Figura 4.1 Immagine schematica dell'amplificato di TFF1 per il sequenziamento. In rosa i siti CpG che saranno analizzati, in blu gli esoni.

In seguito alla PCR, le reazioni sono corse su gel di agarosio, la banda specifica dell'amplificato viene tagliata e il DNA estratto con il kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel).

Sono allestite le reazioni di ligazione in cui il frammento di DNA viene inserito in un vettore pGEM®-T (2 µL del prodotto di PCR purificato, 4 µL di *buffer* di ligazione, 1 µL di ligasi T4 e 1 µL di plasmide) (pGEM®-TEasy Vector System kit, Promega). Dopo incubazione per 3 ore a temperatura ambiente o *overnight* a 4°C avviene la trasformazione del plasmide in cellule batteriche competenti: i batteri sono aggiunti alle reazioni di ligazione e incubato in ghiaccio per 30 min, si effettua l'*heat-shock* a 42°C per 1 min, si incuba in ghiaccio per 3 min e poi a 37°C per 1 ora in agitazione dopo aver aggiunto Luria Broth (LB, 10 g/l tryptone, 5 g/l yeast extract, 10 g/l NaCl). I

batteri sono piastrati su piastre LB/ampicillina/IPTG/X-Gal e incubati *overnight* a 37°C.

Il giorno successivo almeno 12 colonie bianche per ogni condizione sperimentale sono state inoculate in LB con 1ml/l ampicillina e il DNA plasmidico ricombinante è stato estratto seguendo le istruzioni del kit *NucleoSpin® 96 Plasmid* (Macherey-Nagel). Infine si allestiscono le reazioni di PCR di sequenziamento utilizzando BigDye® XTerminator™ Purification Kit (Applied Biosystems) e il DNA ricombinante plasmidico come stampo (3 µl di DNA; 1,3 µl di *buffer* di reazione; 0,7 µl di mix BD; 1,5 µl di *primer* T7 (10 µM); 1,5 µl di acqua PCR-grade). Al termine della reazione, ad ogni tubo sono stati aggiunti SAM e X-terminator e lasciati in agitazione per 30 min. Il sequenziamento è stato effettuato con un sequenziatore ABI Prism 3130XL (Applied Biosystems) e l'analisi dei dati è stato effettuata con il *software* *BioEdit Sequence Alignment Editor* e *BMap_R*.

BIBLIOGRAFIA

- Adams RLP. DNA methylation-The effect of minor bases on DNA-protein interactions. *Biochem J.* 265: 309-320. (1990)
- Akhtar M, Cheng Y, Magno RM, Ashktorab H, Smoot DT, Meltzer SJ, Wilson KT. Promoter methylation regulates *Helicobacter pylori* stimulated cyclooxygenase-2 expression in gastric epithelial cells. *Cancer Res.* 61:2399-403. (2001)
- 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.* 1490(3):324-32. (2000)
- Andrew DJ, Ewald AJ. Morphogenesis of epithelial tubes: Insights into tube formation, elongation, and elaboration. *Dev Biol.* 341(1):34-55. (2010)
- Angrisano T, Lembo F, Peluso S, Keller S, Chiariotti L, Pero R. *Helicobacter pylori* regulates iNOS promoter by histone modifications in human gastric epithelial cells. *Med Microbiol Immunol.* 201(3):249-57. (2012)
- 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.* 112(1):92-9. (1997)
- Atuma C, Strugala V, Allen A, Holm L. The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state *in vivo*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 280(5):G922-9. (2001)
- Baker ME. Oestrogen-induced pS2 protein is similar to pancreatic spasmodic polypeptide and the kringle domain. *Biochem J.* 253(1):307-9. (1988)
- 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* 18(2):157-64. (1999)
- Beil W, Enss M.L, Müller S, Obst B, Sewing K.F, Wagner S. Role of *vacA* and *cagA* in *Helicobacter pylori* inhibition of mucin synthesis in gastric mucous cells. *J Clin Microbiol.* 38(6):2215-8. (2000)
- Berry M, Nunez AM, Chambon P. Estrogen-responsive element of the human pS2 gene is an imperfectly palindromic sequence. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86(4):1218-22. (1989)
- Bishop KS, Ferguson LR. The interaction between epigenetics, nutrition and the development of cancer. *Nutrients.* 30;7(2):922-47. (2015)
- Bork P. A trefoil domain in the major rabbit zona pellucida protein. *Protein Sci.* 2(4):669-70. (1993)
- Bossenmeyer-Pourie C, Kannan R, Ribieras S, Wendling C, Stoll I, Thim L, Tomasetto C, Rio MC. The trefoil factor 1 participates in gastrointestinal cell differentiation by delaying G1-S phase transition and reducing apoptosis. *J Cell Biol* 157(5):761-70. (2002)
- Brown AM, Jeltsch J.M, Roberts M, Chambon P. Activation of pS2 gene transcription is a primary response to estrogen in the human breast cancer cell line MCF-7. *Proc Natl Acad Sci USA,* 81(20):6344-8 (1984)
- 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* 30(29):3261-73. (2011)

Bibliografia

- 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* 293(1):366-74. (2002)
- 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* 5(4):327-37. (1993)
- Candido EP, Reeves R, Davie JR. Sodium butyrate inhibits histone deacetylation in cultured cells. *Cell* 14: 105-113. (1978)
- Carr MD, Bauer CJ, Gradwell MJ, Feeney J. Solution structure of a trefoil-motif-containing cell growth factor, porcine spasmodic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91(6):2206-10. (1994)
- Carvalho R, Kayademiir 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* 82(10):1319-26. (2002)
- Chan AO, Lam SK, Wong BC, Wong WM, Yuen MF, Yeung YH, Hui WM, Rashid A, Kwong YL. Promoter methylation of E-cadherin gene in gastric mucosa associated with *Helicobacter pylori* infection and in gastric cancer. *Gut*. 52(4):502-6. (2003)
- 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*. 5(3):e9665. (2010)
- Chenard MP, Tomasetto C, Bellocq JP, Rio MC. Urinary pS2/TFF1 levels in the management of hormonodependent breast carcinomas. *Peptides* 25(6) 737-743. (2004)
- Cheng TF, Choudhuri S, Muldoon-Jacobs K. Epigenetic targets of some toxicologically relevant metals: a review of the literature. *J Appl Toxicol*. 32(9):643-53. (2012)
- Chiurillo MA. Role of the Wnt/ β -catenin pathway in gastric cancer: An in-depth literature review. *World J Exp Med*. 5(2):84-102. (2015)
- 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* 101(19):7409-14. (2004)
- Corte MD, Tamargo F, Alvarez A, Rodríguez JC, Vázquez J, Sánchez R, Lamelas ML, González LO, Allende MT, García-Muñiz 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* 96(1):63-72. (2006)
- Cover TL, Blande SR. *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nat Rev Microbiol* 3(4):320-32. (2005)
- De A, Brown DG, Gorman MA, Carr M, Sanderson MR, Freemont PS. Crystal structure of a disulfide-linked "trefoil" motif found in a large family of putative growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91(3):1084-8. (1994)
- Denoyer D, Masaldan S, La Fontaine S, Cater MA. Targeting copper in cancer therapy: 'Copper That Cancer'. *Metallomics*. 7(11):1459-76. (2015)
- Derrien T, Johnson R, Bussotti G, Tanzer A, Djebali S, Tilgner H, Guernec G, Martin D, Merkel A, Knowles DG, Lagarde J, Veeravalli L, Ruan X, Ruan Y, Lassmann T, Carninci P, Brown JB, Lipovich L, Gonzalez JM, Thomas M, Davis CA, Shiekhatter R, Gingeras TR, Hubbard TJ, Notredame C, Harrow J, Guigó R. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res*, 22(9):1775-89. (2012)

Bibliografia

- Dignass A, Lynch-Devaney K, Kindoh H, Thim L, Podolsky DK. Trefoil peptides promote epithelial migration through a transforming growth factor β -independent Pathway. *J Clin Invest* 94(1):376-8. (1994)
- Ding SZ, Fischer W, Kaparakis-Liaskos M, Liechti G, Merrell DS, Grant PA, Ferrero RL, Crowe SE, Haas R, Hatakeyama M, Goldberg JB. *Helicobacter pylori*-induced histone modification, associated gene expression in gastric epithelial cells, and its implication in pathogenesis. *PLoS One*. 5(4):e9875. (2010b)
- Ding SZ, Goldberg JB, Hatakeyama M. *Helicobacter pylori* infection, oncogenic pathways and epigenetic mechanisms in gastric carcinogenesis. *Future Oncol*. (5):851-62. (2010a)
- Dolan B, Naughton J, Tegtmeyer N, May FE, Clyne M. The interaction of *Helicobacter pylori* with the adherent mucus gel layer secreted by polarized HT29-MTX-E12 cells. *PLoS One*.7(10):e47300. (2012)
- Dossinger V, Kayademir T, Blin N, Gött P. Down-regulation of TFF expression in gastrointestinal cell lines by cytokines and nuclear factors. *Cell Physiol Biochem*. 12(4):197-206. (2002)
- Dupont C, Armant D.R, Brenner CA. Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. *Semin Reprod Med* 27(5):351-7. (2009)
- Ebert MPA, Hoffmann J, Haeckel C, Rutkowski K, Schmid RM, Wagner M, Adler G, Schulz HU, Roessner A, Hoffmann W, Malfertheiner P. Induction of TFF1 gene expression in pancreas overexpressing transforming growth factor alpha. *Gut* 45(1):105-11. (1999)
- Emami S, Rodrigues S, Rodrigue CM, Le Floch N, Rivat C, Attoub S, Bruyneel E, Gespach C. *Trefoil factor family (TFF) peptides and cancer progression*. *Peptides* 25(5):885-98. (2004)
- Esposito R, Montefusco S, Ferro P, Monti MC, Baldantoni D, Tosco A, Marzullo L. Trefoil Factor 1 is involved in gastric cell copper homeostasis. *Int J Biochem Cell Biol*. 59:30-40. (2015)
- Fischer W, Puls J, Buhrdorf R, Gebert B, Odenbreit S, 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*. 42(5):1337-48. (2001)
- 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* 50(13):3832-7. (1990)
- Fu S, Ramanujam KS, Wong A, Fantry GT, Drachenberg CB, James SP, Meltzer SJ, Wilson KT. Increased expression and cellular localization of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase 2 in *Helicobacter pylori* gastritis. *Gastroenterology*. 116(6):1319-29. (1999)
- Fujimoto J, Yasui W, Tahara H, Tahara E, Kudo Y, Yokozaki H, Tahara E. DNA hypermethylation at the pS2 promoter region is associated with early stage of stomach carcinogenesis. *Cancer Lett*. 149(1-2):125-34. (2000)
- Gajhede M, Petersen TN, Henriksen A, Petersen JF, Dauter Z, Wilson KS, Thim L. Pancreatic spasmodic polypeptide: first three-dimensional structure of a member of the mammalian trefoil family of peptides. *Structure*. 1(4):253-62. (1993)
- Gershely EL, Vidali G, Allfrey VG. Chemical studies of histone acetylation. The occurrence of epsilon-N-acetyllysine in the f2a1 histone. *J Biol Chem* 243:5018–5022. (1968)
- Guang W, Czinn SJ, Blanchard TG, Kim K.C, Lillehoj EP. Genetic regulation of MUC1 expression by *Helicobacter pylori* in gastric cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 445(1):145-50. (2014)
- 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*. 388(6641):482-8. (1997)

Bibliografia

- Hamza I, Gitlin JD. Copper chaperones for cytochrome c oxidase and human disease. *J Bioenerg Biomembr.* 34(5):381-8. (2002)
- Harikrishnan KN, Chow MZ, Bakev EK, Pal S, Bassal S, Brasacchio D, Wang L, Craig JM, Jones PL, Sif S, El-Osta A. Brahma links the SWI/SNF chromatin-remodeling complex with MeCP2-dependent transcriptional silencing. *Nat Genet.* 37:254–264. (2005)
- Hassouneh B, Islam M, Nagel T, Pan Q, Merajver SD, Teknos TN. Tetrathiomolybdate promotes tumor necrosis and prevents distant metastases by suppressing angiogenesis in head and neck cancer. *Mol Cancer Ther.* 6(3):1039-45. (2007)
- Hauser F, Hoffmann W. xP1 and xP4. P-domain peptides expressed in *Xenopus laevis* stomach mucosa. *J Biol Chem.* 266(31):21306-9. (1991)
- Hauser F, Roeben C, Hoffmann W. xP2, a new member of the P-domain peptide family of potential growth factors, is synthesized in *Xenopus laevis* skin. *J Biol Chem.* 267(20):14451-5. (1992)
- Hendrich B, Bird A. Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol.* 18(11):6538-47. (1998)
- 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* 156(2):262-72. (2009)
- Hinz M, Schwegler H, Chwieralski CE, Laube G, Linke R, Pohle W, Hoffmann W. Trefoil factor family (TFF) expression in the mouse brain and pituitary: changes in the developing cerebellum. *Peptides.* 25(5):827-32. (2004)
- Hoffmann W. Trefoil factors TFF (trefoil factor family) peptide-triggered signals promoting mucosal restitution. *Cell Mol Life Sci.* 62(24):2932-8. (2005)
- Holliday R1. Epigenetics: a historical overview. *Epigenetics.* 1(2):76-80. (2006)
- Hu GY, Yu BP, Dong WG, Li MQ, Yu JP, Luo HS, Rang ZX. Expression of TFF2 and *Helicobacter pylori* infection in carcinogenesis of gastric mucosa. *World J Gastroenterol.* 9(5):910-914. (2003)
- Huang FY, Chan AO, Rashid A, Wong DK, Cho CH, Yuen MF. *Helicobacter pylori* induces promoter methylation of E-cadherin via interleukin-1 β activation of nitric oxide production in gastric cancer cells. *Cancer.* 118(20):4969-80. (2012)
- Ilver D, Arnqvist A, Ogren J, Frick IM, Kersulyte D, Incecik ET, Berg DE, Covacci A, Engstrand L, Borén T. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science.* 279(5349):373-7. (1998)
- Ito K, Ito M, Elliott WM, Cosio B, Caramori G, Kon OM, Barczyk A, Hayashi S, Adcock IM, Hogg JC, Barnes PJ. Decreased histone deacetylase activity in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med.* 352:1967–1976. (2005)
- Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet.* 33 Suppl:245-54. (2003)
- Jagla W, Wiede A, Dietzmann K, Rutkowski K, Hoffmann W. Co-localization of TFF3 peptide and oxytocin in the human hypothalamus. *FASEB J.* 14(9):1126-31. (2000)
- Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell.* 128:683–692. (2007)
- Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet.* 3(6):415-28. (2002)

Bibliografia

- Jones PC, Veenstra GJ, Wade PJ, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, Wolffe AP. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylases to repress transcription. *Nat Genet.* 19:187–191. (1998)
- Jorgensen KD, Diamant B, Jorgensen KH, Thim L. Pancreatic spasmolytic polypeptide (PSP): III. Pharmacology of a new porcine pancreatic polypeptide with spasmolytic and gastric acid secretion inhibitory effects. *Regul Pept.* 3(3-4):231-43. (1982b)
- Jorgensen KH, Thim L, Jacobsen HE. Pancreatic spasmolytic polypeptide (PSP): I. Preparation and initial chemical characterization of a new polypeptide from porcine pancreas. *Regul Pept.* 3(3-4):207-19. (1982a)
- 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.* 452(7183):112-5. (2008)
- Khan ZE, Wang TC, Cui G, Chi AL, Dimaline R. Transcriptional regulation of the human trefoil factor, TFF1, by gastrin. *Gastroenterology.* 125(2):510-21. (2003)
- Kim BE, Nevitt T, Thiele DJ. Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. *Nat Chem Biol.* 4(3):176-85. (2008)
- 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.* 274(1):218-26. (1999)
- 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.* 53(1):12-20. (2004)
- Kusters JG, van Vliet AH, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev.* 19(3):449-90. (2006)
- Lacroix M, Leclercq G. About GATA3, HNF3A, and XBP1, three genes co-expressed with the oestrogen receptor-alpha gene (ESR1) in breast cancer. *Mol Cell Endocrinol.* 219(1-2):1-7. (2004)
- Langer G, Jagla W, Behrens-Baumann W, Walter S, Hoffmann W. Secretory peptides TFF1 and TFF3 synthesized in human conjunctival goblet cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 40(10):2220-4. (1999)
- Lee SH, Lee SH, Oh BH, Lee HM, Choi JO, Jung KY. Expression of mRNA of trefoil factor peptides in human nasal mucosa. *Acta Otolaryngol.* 121(7):849-53. (2001)
- 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.* 274(5285):259-62. (1996)
- Leonhardt H, Page AW, Weier H-U, Bestor TH. A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell.* 71:865–873. (1992)
- 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.* 53(9):1244-9. (2004)
- Leung WK, Yu J, Chan FK, To KF, Chan MW, Ebert MP, Ng EK, Chung SC, Malfertheiner P, Sung JJ. Expression of trefoil peptides (TFF1, TFF2, and TFF3) in gastric carcinomas, intestinal metaplasia, and non-neoplastic gastric tissues. *J Pathol.* 197(5):582-8. (2002)
- 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.* 105(2):365-9. (2008)

Bibliografia

- Liang ZD, Tsai WB, Lee MY, Savaraj N, Kuo MT. Specificity protein 1 (sp1) oscillation is involved in copper homeostasis maintenance by regulating human high-affinity copper transporter 1 expression. *Mol Pharmacol.* 81(3):455-64. (2012)
- Liu D, el-Hariry I, Karayiannakis AJ, Wilding J, Chinery R, Kmriot W, McCrea PD, Gullick WJ, Pignatelli M. Phosphorylation of beta-catenin and epidermal growth factor receptor by intestinal trefoil factor. *Lab Invest.* 77(6):557-63. (1997)
- Liu J, Wang X, Yang X, Liu Y, Shi Y, Ren J, Guleng B. miRNA423-5p regulates cell proliferation and invasion by targeting trefoil factor 1 in gastric cancer cells. *Cancer Lett.* 347(1):98-104. (2014)
- Liu Y, Oakeley EJ, Sun L, Jost J-P. Multiple domains are involved in the targeting of the mouse DNA methyltransferase to the DNA replication foci. *Nucleic Acids Res.* 26:1038-1045. (1998)
- Lorente A, Mueller W, Urdangarín E, Lázcoz P, von Deimling A, Castresana JS. Detection of methylation in promoter sequences by melting curve analysis-based semiquantitative real time PCR. *BMC Cancer.* 25;8:61. (2008)
- 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.* 11:305. (2010)
- Ludeking A, Fegert P, Blin N, Gott P. Osmotic changes and ethanol modify TFF gene expression in gastrointestinal cell lines. *FEBS Lett.* 439: 180-184. (1998)
- Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature.* 389(6648):251-60. (1997)
- Madsen J, Nielsen O, Tornøe I, Thim L, Holmskov U. Tissue localization of human trefoil factors 1, 2, and 3. *J Histochem Cytochem.* 55(5):505-13. (2007)
- Maekita T, Nakazawa K, Mihara M, Nakajima T, Yanaoka K, Iguchi M, Arie K, Kaneda A, Tsukamoto T, Tatematsu M, Tamura G, Saito D, Sugimura T, Ichinose M, Ushijima T. High levels of aberrant DNA methylation in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosae and its possible association with gastric cancer risk. *Clin Cancer Res.* 12(3 Pt 1):989-95. (2006)
- Martin V, Ribieras S, Song-Wang X, Rio MC, Dante R. Genomic sequencing indicates a correlation between DNA hypomethylation in the 5' region of the pS2 gene and its expression in human breast cancer cell lines. *Gene.* 157(1-2):261-4. (1995)
- Martin V, Ribieras S, Song-Wang X.G, Lasne Y, Frappart L, Rio M.C, Dante R. Involvement of DNA methylation in the control of the expression of an estrogen-induced breast-cancer-associated protein (pS2) in human breast cancers. *J Cell Biochem.* 65(1):95-106. (1997)
- Mashimo H, Podolsky DK, Fishman MC. Structure and expression of murine intestinal trefoil factor: high evolutionary conservation and postnatal expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 210(1):31-7. (1995)
- Masiakowski 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.* 10(24):7895-903. (1982)
- Matsuda K, Yamauchi K, Matsumoto T, Sano K, Yamaoka Y, Ota H. Quantitative analysis of the effect of *Helicobacter pylori* on the expressions of SOX2, CDX2, MUC2, MUC5AC, MUC6, TFF1, TFF2, and TFF3 mRNAs in human gastric carcinoma cells. *Scand J Gastroenterol.* 43(1):25-33. (2008)
- May FE, Semple JI, Newton JL, Westley BR. The human two domain trefoil protein, TFF2, is glycosylated in vivo in the stomach. *Gut.* 46(4):454-9. (2000)

Bibliografía

- 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*. 463(7279):384. (2008)
- Moinova H, Leidner RS, Ravi L, Lutterbaugh J, Barnholtz-Sloan JS, Chen Y, Chak A, Markowitz SD, Willis JE. Aberrant vimentin methylation is characteristic of upper gastrointestinal pathologies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 21(4):594-600. (2012)
- Montefusco S, Esposito R, D'Andrea L, Monti M.C, Dunne C, Dolan B, Tosco A, Marzullo L, Clyne M. Copper promotes TFF1-mediated *Helicobacter pylori* colonization. *PLoS One*. 8(11):e79455. (2013)
- Morales-Guerrero SE, Mucito-Varela E, Aguilar-Gutiérrez GR, Lopez-Vida Y, Castillo-Rojas G. The Role of CagA Protein Signaling in Gastric Carcinogenesis — CagA Signaling in Gastric Carcinogenesis, in *Current Topics in Gastritis*. Gyula Mozsik Ed, InTech. pp. 202-222. (2012)
- Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*. 393:386–389. (1998)
- Newton JL, Allen A, Westley BR, May FE. The human trefoil peptide, TFF1, is present in different molecular forms that are intimately associated with mucus in normal stomach. *Gut*. 46(3):312-20. (2000)
- Nishimura H, Gupta S, Myles DG, Primakoff P. Characterization of mouse sperm TMEM190, a small transmembrane protein with the trefoil domain: evidence for co-localization with IZUMO1 and complex formation with other sperm proteins. *Reproduction*. 141(4):437-51. (2011)
- Nose Y, Rees EM, Thiele DJ. Structure of the Ctr1 copper transporter reveals novel architecture. *Trends Biochem Sci*. 31(11):604-7. (2006)
- Nunez AM, Jakowlev S, Briand JP, Gaire M, Krust A, Rio MC, Chambon P. Characterization of the estrogen-induced pS2 protein secreted by the human breast cancer cell line MCF-7. *Endocrinology*. 121(5):1759-65. (1987)
- Ohgami RS, Campagna DR, McDonald A, Fleming MD. The Steap proteins are metalloreductases. *Blood*. 108(4):1388-94. (2006)
- Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*. 99(3):247-57. (1999)
- Pan Q, Kleer CG, van Golen KL, Irani J, Bottema KM, Bias C, De Carvalho M, Mesri EA, Robins DM, Dick RD, Brewer GJ, Merajver SD. Copper deficiency induced by tetrathiomolybdate suppresses tumor growth and angiogenesis. *Cancer Res*. 62(17):4854-9. (2002)
- Park SA, Ko A, Lee NG. Stimulation of growth of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori* by atmospheric level of oxygen under high carbon dioxide tension. *BMC Microbiol*. 11;11:96. (2011)
- 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*. 119(3):691-8. (2000)
- Peitz U, Kouznetsova I, Wex T, Gebert I, Vieth M, Roessner A, Hoffmann W, Malfertheiner P. TFF3 expression at the esophagogastric junction is increased in gastro-esophageal reflux disease (GERD). *Peptides*. 25(5):771-7. (2004)
- Peña MM, Lee J, Thiele DJ. A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution. *J Nutr*. 129(7):1251-60. (1999)

Bibliografia

- 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*. 139(6):2005-17. (2010)
- Petrij F, Giles RH, Dauwerse HG, Saris JJ, Hennekam RC, Masuno M, Tommerup N, van Ommen GJ, Goodman RH, Peters DJ, et al. Rubinstein-Taybi syndrome caused by mutations in the transcriptional co-activator CBP. *Nature*. 376(6538):348-51. (1995)
- Poulsom R, Hanby A.M, Lalani E.N, Hauser F, Hoffmann W, Stamp G.W. Intestinal trefoil factor (TFF 3) and pS2 (TFF 1), but not spasmolytic polypeptide (TFF 2) mRNAs are co-expressed in normal, hyperplastic, and neoplastic human breast epithelium. *J Pathol*. 183(1):30-8. (1997)
- Prest SJ, May FE, Westley BR. The estrogen-regulated protein, TFF1, stimulates migration of human breast cancer cells. *FASEB J*. 16(6):592-4. (2002)
- Qyang Y, Luo X, Lu T, Ismail PM, Krylov D, Vinson C, Sawadogo M. Cell-type-dependent activity of the ubiquitous transcription factor USF in cellular proliferation and transcriptional activation. *Mol Cell Biol*. 19(2):1508-17. (1999)
- Reed GH, Kent JO, Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics*. 8(6):597-608. (2007)
- 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*. 135(6):2043-54. (2008)
- Regalo G, Wright NA, Machado JC. Trefoil factors: from ulceration to neoplasia. *Cell Mol Life Sci*. 62(24):2910-5. (2005)
- Ribieras S, Lefèbvre O, Tomasetto C, Rio MC. Mouse Trefoil factor genes: genomic organization, sequences and methylation analyses. *Gene*. 266(1-2):67-75. (2001)
- Ricci V, Romano M, Boquet P. Molecular cross-talk between *Helicobacter pylori* and human gastric mucosa. *World J Gastroenterol*. 17(11):1383-1399. (2011)
- Richon VM1, Emiliani S, Verdin E, Webb Y, Breslow R, Rifkind RA, Marks PA. A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95:3003-3007. (1998)
- Riggs AD, Jones PA. 5-Methylcytosine, gene regulation, and cancer. *Adv Cancer Res* 40:1-30. (1983)
- 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*. 84(24):9243-7. (1987)
- 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*. 17(1):7-16. (2003)
- Ruchaud-Sparagano MH, Westley BR, May FE. The trefoil protein TFF1 is bound to MUC5AC in human gastric mucosa. *Cell Mol Life Sci*. 61(15):1946-54. (2004)
- Sansom OJ, Maddison K, Clarke AR. Mechanisms of disease: Methyl-binding domain proteins as potential therapeutic targets in cancer. *Nat Clin Pract Oncol*. 4:305-315. (2007)

Bibliografia

- Sasaki M, Ikeda H, 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.* 42(2):61-110. (2007)
- Saukkonen K1, Tomasetto C, Narko K, Rio MC, Ristimäki A. Cyclooxygenase-2 expression and effect of celecoxib in gastric adenomas of trefoil factor 1-deficient mice. *Cancer Res.* 63(12):3032-6. (2003)
- 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.* 51(2):624-8. (1991)
- Segal ED, Falkow S, Tompkins LS, *Helicobacter pylori* attachment to gastric cells induces cytoskeletal rearrangements and tyrosine phosphorylation of host cell proteins, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(3):1259-64. (1996)
- Seib T, Blin N, Hilgert K, Seifert M, Theisinger B, Engel M, Dooley S, Zang KD, Welter C. The three human trefoil genes TFF1, TFF2, and TFF3 are located within a region of 55 kb on chromosome 21q22.3. *Genomics.* 40(1):200-2. (1997)
- Sharma SA, Tummuru MK, Blaser MJ, Kerr LD, Activation of IL-8 gene expression by *Helicobacter pylori* is regulated by transcription factor nuclear factor-kappa B in gastric epithelial cells. *J Immunol.* 160(5):2401-7. (1998)
- Shimada T, Koitabashi A, Kuniyoshi T, Hashimoto T, Yoshiura K, Yoneda M, Hiraishi H, Terano A. Up-regulation of TFF expression by PPARgamma ligands in gastric epithelial cells. *Aliment Pharmacol Ther.* 18 Suppl 1:119-25. (2003)
- 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.* 74(3):705-13. (2008)
- Soutto M, Belkhir A, Piazuolo 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-kB-mediated inflammation and gastric neoplasia in mice and humans. *J Clin Invest.* 121(5):1753-67. (2011)
- Sturm A, Dignass AU. Epithelial restitution and wound healing in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 14(3):348-53. (2008)
- Suemori S, Lynch-Devaney K, Podolsky DK. Identification and characterization of rat intestinal trefoil factor: tissue- and cell-specific member of the trefoil protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(24):11017-21. (1991)
- Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer LM, Liu DR, Aravind L, Rao A. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science.* 324(5929):930-5. (2009)
- Taupin D, Podolsky DK. Trefoil factors: initiators of mucosal healing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4: 721-732. (2003)
- Taupin D, Wu DC, Jeon WK, Devaney K, Wang TC, Podolsky DK. The trefoil gene family are coordinately expressed immediate-early genes: EGF receptor- and MAP kinase-dependent interregulation. *J Clin Invest.* 103(9):R31-8. (1999)
- Thim L, Madsen F, Poulsen SS. Effect of trefoil factors on the viscoelastic properties of mucus gels. *Eur J Clin Invest.* 32(7):519-27. (2002)

Bibliografia

- Thim L, May FE. Structure of mammalian trefoil factors and functional insights. *Cell Mol Life Sci.* 62(24):2956-73. (2005)
- Thim L. A new family of growth factor-like peptides. 'Trefoil' disulphide loop structures as a common feature in breast cancer associated peptide (pS2), pancreatic spasmodic polypeptide (PSP), and frog skin peptides (spasmodicins). *FEBS Lett.* 250(1):85-90. (1989)
- Tomasetto C, Masson R, Linares JL, Wendling C, Lefebvre O, Chenard MP, Rio MC. pS2/TFF1 interacts directly with the VWFC cysteine-rich domains of mucins. *Gastroenterology.* 118(1):70-80. (2000)
- Tomasetto C, Rio MC, Gautier C, Wolf C, Hareuveni M, Chambon P, Lathe R. hSP, the domain-duplicated homolog of pS2 protein, is co-expressed with pS2 in stomach but not in breast carcinoma. *EMBO J.* 9(2):407-14. (1990)
- 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.* 140(3):879-91. (2011)
- 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.* 5(1):1-8. (2010a)
- 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.* 67(11):1943-55. (2010b)
- 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.* 28(7):1461-9. (2007)
- Tümer Z, Horn N. Menkes disease: underlying genetic defect and new diagnostic possibilities. *J Inherit Metab Dis.* 21(5):604-12. (1998)
- Uauy R, Olivares M, Gonzalez M. Essentiality of copper in humans. *Am J Clin Nutr.* 67(5 Suppl):952S-959S. (1998)
- 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.* 7(13):29-38. (1993)
- van Baal JW, Rygiel AM, Milano F, Anderson M, Bergman JJ, Spek CA, Wang KK, Peppelenbosch MP, Krishnadath KK. Gene expression profile comparison of Barrett's esophagus epithelial cell cultures and biopsies. *Dis Esophagus.* 21(7):628-33. (2008)
- Van De Bovenkamp JH, Korteland-Van Male AM, Büller HA, Einerhand AW, Dekker J. Infection with *Helicobacter pylori* affects all major secretory cell populations in the human antrum. *Dig Dis Sci.* 50(6):1078-86. (2005)
- Vannay A, Sziksz E, Prókai A, Veres G, Molnár K, Szakál DN, Onódy A, Korponay-Szabó IR, Szabó A, Tulassay T, Arató A, Szebeni B. Increased expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in coeliac disease. *Pediatr Res.* 68(2):118-22 (2010)
- 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.* 127(8):1857-65. (2010)
- Westley BR, Griffin SM, May FE. Interaction between TFF1, a gastric tumor suppressor trefoil protein, and TFI1, a brichos domain-containing protein with homology to SP-C. *Biochemistry.* 44(22):7967-75. (2005)

Bibliografia

Wiech NL1, Fisher JF, Helquist P, Wiest O. Inhibition of histone deacetylases: a pharmacological approach to the treatment of non-cancer disorders. *Curr Top Med Chem.* 9(3):257-71. (2009)

Willander H, Hermansson E, Johansson J, Presto J. BRICHOS domain associated with lung fibrosis, dementia and cancer--a chaperone that prevents amyloid fibril formation? *FEBS J.* 278(20):3893-904 (2011)

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

Wright NA, Poulosom R, Stamp GW, Hall PA, Jeffery RE, Longcroft JM, Rio MC, Tomasetto C, Chambon P. Epidermal growth factor (EGF/URO) induces expression of regulatory peptides in damaged human gastrointestinal tissues. *J Pathol.* 162(4):279-84. (1990)

Xie H, Kang YJ. Role of copper in angiogenesis and its medicinal implications. *Curr Med Chem.* 16(10):1304-14. (2009)

Yoshida M, Kijima M, Akita M, Beppu T. Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both *in vivo* and *in vitro* by trichostatin A. *J Biol Chem.* 265: 17174–17179. (1990)

Zhu P, Martin E, Mengwasser J, Schlag P, Janssen KP, Gottlicher M. Induction of HDAC2 expression upon loss of APC in colorectal tumorigenesis. *Cancer Cell.* 5:455–463. (2004)