

**LA MODULAZIONE DEI LIVELLI DI GLUTATIONE COME STRATEGIA DI ATTACCO  
NELLE INTERAZIONI OSPITE-PARASSITA**

*Alfonso Pompella,<sup>1</sup> Antonio Masi,<sup>2</sup> Francesco Pennacchio<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>Laboratorio di Patologia Redox, Dipartimento di Ricerca Traslazionale NTMC, Scuola Medica dell'Università di Pisa, Italia; <sup>2</sup>Dipartimento di Agronomia, Nutrizione, Risorse Naturali, Animali ed Ambiente, Università di Padova, Italia; <sup>3</sup>Laboratorio di Entomologia "E. Tremblay", Dipartimento di Agricoltura, Univesità di Napoli Federico II, Italia

**Abstract.** Insect studies, dealing with parasitism of aphids, have shown that the disruption of host glutathione (GSH) pool and metabolisms significantly contributes to its physiological regulation and castration. The parasitic wasp *Aphidius ervi* injects into host aphids a venom containing large amounts of a gamma-glutamyltransferase (Ae-GGT) enzyme, which causes a depletion of GSH primarily involving ovarian tissue. Injected Ae-GGT in fact consumes substrate GSH, which ultimately triggers apoptosis. Studies on virulence factors of microorganisms have documented that the invasion strategies of selected pathogenic bacteria also target host GSH metabolism. Indeed, it has been shown that GGT activity of *Helicobacter pylori* and *H. suis*, the agents responsible of peptic ulcer, can exert antiproliferative and pro-apoptotic effects in gastric epithelial cells. By confocal microscopy, *H. suis* outer membrane vesicles (OMV) – submicroscopic structures 20-50 nm in diameter, budding from the cell surface – were identified as carriers of *H. suis* GGT, capable of delivering the enzyme to the deeper mucosal layers. In association with such membranous structures, active GGT from *H. suis* in fact translocates across the epithelial layers and can access lymphocytes residing in the gastric mucosa, resulting in the inhibition of lymphocyte proliferation, *i.e.*, a perturbation of host immunity and a facilitation of bacterial infection. Cellular GSH appears, thus, to represent a conserved target for parasitic (micro)organisms which aim at altering host redox homeostasis to weaken its immune defenses, using GGT as a key-element of a virulence strategy. Taking into account the "parasitic" behavior exhibited by malignant cells spreading across tissues and organs of the patient (the "host"). GGT activity is in fact expressed in a number of malignant tumors, and expression levels often increase along with progression to more invasive phenotypes. Now, active GGT can be released from cells, including cancer cells, in association with submicroscopic vesicles resembling exosomes. The similarity of such structures with GGT-rich OMV particles of *H. pylori* and *H. suis* is indeed obvious. GGT activity of cancer cells can affect intracellular redox equilibrium, and produces in addition significant extracellular effects, *e.g.* on the redox status and ligand binding affinity of cell surface receptors related with cell survival/apoptosis balance. Thus, GGT-rich exosomes shed by cancer cells can produce in host's surrounding tissues effects comparable to those reported for Ae-GGT or *Helicobacter* GGT, possibly resulting in facilitation of malignant cells survival and diffusion.

**Key words:** Host-parasite interactions, glutathione, gamma-glutamyltransferase, tumor metastases

I parassiti instaurano uno stato di simbiosi con individui di diverse specie – definiti "ospite" – in modo da accedere alle risorse metaboliche necessarie per sopravvivere e riprodursi. Queste associazioni di tipo antagonistico si caratterizzano per la presenza di complessi "dialoghi molecolari ospite-parassita," selezionatisi durante l'evoluzione per lo più al fine di rendere i tessuti dell'ospite più accessibili alla colonizzazione e sfruttamento da parte del parassita [1]. In un gran numero di esempi, l'azione del parassita non soltanto ostacola la fisiologia e la riproduzione dell'ospite, ma può addirittura culminare nella morte di quest'ultimo e/o la consumazione completa dei suoi tessuti. Questa è la norma con gli insetti, che comprendono il numero più elevato di specie con abi-

tudini di vita parassitarie, e sono caratterizzati da sottili strategie di virulenza che spesso condividono con organismi appartenenti a gruppi filogeneticamente distanti [2]. L'incredibile diversità, e le inattese somiglianze con esseri viventi tassonomicamente non correlati, offrono l'opportunità di interessanti paragoni tra le strategie di virulenza che prendono di mira vie molecolari specifiche e conservate, come risultato di schemi evolutivisti convergenti. In questa sede ci occuperemo dell'analisi comparativa di una peculiare strategia per la regolazione fisiologica dell'ospite, diretta al controllo dell'omeostasi redox, che sembra capace di modulare le interazioni parassitarie sia a livello cellulare che di organismo *in toto*.

Studi condotti sugli insetti, in particolare sulle paras-

*Correspondence to:*

Alfonso Pompella

Laboratorio di Patologia Redox, Dipartimento di Ricerca Traslazionale NTMC,

Scuola Medica dell'Università di Pisa

via Savi 10, 56126 Pisa, Italia

E-mail: alfonso.pompella@med.unipi.it

sitosi da afidi, hanno mostrato che l'alterazione nell'ospite delle riserve e del metabolismo del glutatione (GSH) può contribuire significativamente al controllo fisiologico e la castrazione dell'ospite [3]. La vespa parassita *Aphidius arvi* al momento di deporre le uova è capace di iniettare negli afidi-ospiti un veleno contenente grandi quantità dell'enzima gamma-glutamyl transferasi (Ae-GGT), il che innesca l'apoptosi nella parte superiore degli ovaroli dell'afide, bloccando in questo modo l'oogenesi [4]. Come questa azione specifica resti limitata agli ovaroli, e come sia modulata a livello molecolare, resta da scoprire; tuttavia, dati preliminari indicano che nell'afide-ospite parassitato si verifica una deplezione del GSH, che interessa innanzitutto i tessuti ovarici (Masi e Pennacchio, risultati non pubblicati). Non richiede particolare fantasia immaginare che la Ae-GGT iniettata possa competere con la GGT endogena per il substrato GSH, in tal modo interferendo con il regolare riciclo del GSH ed esponendo le cellule dell'ospite, così deprivate di GSH, ad uno stress ossidativo che in ultimo scatena il processo di apoptosi.

Ad ogni modo, è ugualmente ragionevole supporre che gli effetti pro-ossidanti della GGT, dovuti all'azione metallo-riducente del metabolito cisteinil-glicina ed alla produzione in sede extracellulare di specie reattive dell'ossigeno (ROS) [5]; possano esitare in alterazioni del bilancio cellulare apoptosi/sopravvivenza. La presenza di una GGT anche nel genoma di un entomopoxvirus associato alla vespa parassita *Diachasmimorpha longicaudata* [6], inoculato con la deposizione delle uova e usato come un sistema di rilascio di fattori di virulenza, indica che questo enzima possa avere altre azioni regolatorie sulla fisiologia dell'ospite, per ora sconosciute. E' certamente plausibile l'ipotesi di effetti negativi sulle difese immunitarie dell'ospite [7]. Studi sui fattori di virulenza dei microrganismi hanno documentato che le strategie di invasione di alcuni batteri patogeni sono anch'esse dirette a colpire il metabolismo del GSH dell'ospite. E' stato infatti riportato che l'attività GGT di *Helicobacter pylori* e *H. suis*, i patogeni responsabili delle ulcere peptiche, può avere effetti antiproliferativi/proapoptotici sulle cellule epiteliali gastriche [8-10]. Tali effetti vengono innescati dal metabolismo GGT-dipendente del GSH e dalla conseguente produzione di  $H_2O_2$ , con conseguente attivazione del fattore NF-kB, aumentata espressione di interleukina-8 ed aumentato danno ossidativo al DNA [9,10]. Paradossalmente, l'aggiunta di glutatione alle cellule trattate con *H. pylori* aumentava marcatamente gli effetti [11,12]. Mediante microscopia confocale, è stato accertato che la GGT di *H. suis* si associa alle *outer membrane vesicles* (OMV), strutture submicroscopiche del diametro di ca. 20-50 nm che gemmano dalla superficie cellulare. Le OMV risultano capaci di veicolare l'enzima negli strati profondi della mucosa [12]. Trasportato da queste strutture vescicolari, l'enzima GGT di *H. suis* può attraversare in forma attiva gli strati epiteliali e può raggiungere i linfociti situati nella lamina propria della mucosa gastrica. Il risultato

di questo curioso processo sembra essere un'inibizione della proliferazione linfocitaria, ossia un'alterazione delle difese immunitarie dell'ospite e una facilitazione dell'infezione batterica [13].

Gli studi futuri permetteranno probabilmente di osservare altri esempi di interazioni ospite-parassita basate sul GSH, come forse nel caso dell'attività proapoptotica della GGT rilasciata da *Campylobacter jejunii* [14]. Il GSH sembra dunque rappresentare un bersaglio conservato per i (micro)organismi parassiti che mirano ad alterare l'omeostasi redox dell'ospite per indebolire le sue difese immunitarie, e la GGT emerge come fattore-chiave di questa strategia di virulenza. Si può ulteriormente ragionare su questo concetto spostandosi nel campo della biologia dei tumori e prendendo in considerazione il comportamento "parassitario" che viene adottato dalle cellule maligne che si diffondono nei tessuti ed organi del paziente (in questo caso, l'"ospite"). L'attività GGT viene espressa infatti in un gran numero di neoplasie maligne, ed i livelli di espressione spesso aumentano durante la progressione della malattia e con la comparsa di fenotipi più invasivi (come rassegna, v. Pompella et al., 2006)[15]. A questo proposito, studi recenti hanno dimostrato che GGT attiva può venir liberata dalle cellule, comprese quelle tumorali [16], associata a vescicole sub-microscopiche del diametro di 20-40 nm, simili ad esosomi [17]. In effetti è evidente la somiglianza di queste strutture con le vescicole OMV ricche di GGT rilasciate da *H. suis*. L'attività GGT delle cellule tumorali può alterare gli equilibri redox intracellulari [18], e produce inoltre effetti significativi anche a livello extracellulare, sullo stato di S-tiolazione di proteine esterne alla cellula [19], e persino sullo stato redox e l'affinità di legame di recettori della superficie cellulare collegati al bilancio cellulare apoptosi/sopravvivenza [20]. Sorge pertanto spontanea la domanda, se gli esosomi ricchi di GGT dispersi dalle cellule tumorali non possano produrre sui tessuti circostanti dell'ospite effetti paragonabili a quelli descritti per la AeGGT o la GGT di *Helicobacter*. Tali effetti potrebbero risultare nella facilitazione della sopravvivenza e diffusione delle cellule tumorali nel corpo dell'ospite.

Nel loro insieme questi processi GSH/GGT-dipendenti, osservabili in organismi evolutivamente distanti e popolazioni cellulari diverse, rinforzano ulteriormente la notevole importanza che riveste l'omeostasi redox nella modulazione degli stati di salute e malattia. Far luce sugli aspetti regolatori di queste strategie parassitarie convergenti permetterà probabilmente di identificare nuovi potenziali bersagli terapeutici.

## BIBLIOGRAFIA

1. Hébert FO, Aubin-Horth N. Ecological genomics of host behavior manipulation by parasites. *Adv Exp Med Biol* 2014;781:169-90.
2. Pennacchio F, Strand MR. Evolution of developmental strategies in parasitic Hymenoptera. *Annu Rev Entomol* 2006;51:233-58.

3. Pennacchio F, Mancini D. Aphid parasitoid venom and its role in host regulation. In: Beckage N, Drezen JM, eds. *Parasitoid viruses: symbionts and pathogens*. Amsterdam: Elsevier; 2012. pp 247-254.
4. Falabella P, Riviello L, Caccialupi P, et al. A gamma-glutamyl transpeptidase of *Aphidius ervi* venom induces apoptosis in the ovaries of host aphids. *Insect Biochem Mol Biol* 2007;37:453-65.
5. Paolicchi A, Dominici S, Pieri L, et al. Glutathione catabolism as a signaling mechanism. *Biochem Pharmacol* 2002;64:1027-35.
6. Hashimoto Y, Lawrence PO. Comparative analysis of selected genes from *Diachasmimorpha longicaudata* entomopoxvirus and other poxviruses. *J Insect Physiol* 2005;51:207-20.
7. Clark KD, Lu Z, Strand MR. Regulation of melanization by glutathione in the moth *Pseudaletia includens*. *Insect Biochem Mol Biol* 2010;40:460-7.
8. Schmees C, Prinz C, Treptau T, et al. Inhibition of T-cell proliferation by *Helicobacter pylori* gamma-glutamyl transpeptidase. *Gastroenterology* 2007;132:1820-33.
9. Gong M, Ling SS, Lui SY, et al. *Helicobacter pylori* gamma-glutamyl transpeptidase is a pathogenic factor in the development of peptic ulcer disease. *Gastroenterology* 2010;139:564-73.
10. Ricci V, Giannouli M, Romano M, Zarrilli R. *Helicobacter pylori* gamma-glutamyltranspeptidase and its pathogenic role. *World J Gastroenterol* 2014;20:630-8.
11. Flahou B, Haesebrouck F, Chiers K, et al. Gastric epithelial cell death caused by *Helicobacter suis* and *Helicobacter pylori* gamma-glutamyl transpeptidase is mainly glutathione degradation dependent. *Cell Microbiol* 2011;13:1933-55.
12. Zhang G, Ducatelle R, Pasmans F, et al. Effects of *Helicobacter suis* gamma-glutamyl transpeptidase on lymphocytes: modulation by glutamine and glutathione supplementation and outer membrane vesicles as a putative delivery route of the enzyme. *PLoS One* 2013;8:e77966.
13. Oertli M, Noben M, Engler DB, et al. *Helicobacter pylori* gamma-glutamyl transpeptidase and vacuolating cytotoxin promote gastric persistence and immune tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110:3047-52.
14. Barnes IH, Bagnall MC, Browning DD, et al. Gamma-glutamyl transpeptidase has a role in the persistent colonization of the avian gut by *Campylobacter jejuni*. *Microb Pathog* 2007;43:198-207.
15. Pompella A, De Tata V, Paolicchi A, Zunino F. Expression of gamma-glutamyltransferase in cancer cells and its significance in drug resistance. *Biochem Pharmacol* 2006;71:231-8.
16. Franzini M, Corti A, Fornaciari I, et al. Cultured human cells release soluble gamma-glutamyltransferase complexes corresponding to the plasma b-GGT. *Biomarkers* 2009;14:486-92.
17. Fornaciari I, Fierabracci V, Corti A, et al. Gamma-glutamyltransferase fractions in human plasma and bile: characteristic and biogenesis. *PLoS One* 2014;9:e88532.
18. Pompella A, Corti A, Paolicchi A, et al. Gamma-glutamyltransferase, redox regulation and drug resistance. *Curr Opin Pharmacol* 2007;7:360-6.
19. Corti A, Paolicchi A, Franzini M, et al. The S-thiolating activity of membrane gamma-glutamyltransferase: formation of cysteinyl-glycine mixed disulfides with cellular proteins and in the cell microenvironment. *Antioxid Redox Signal* 2015;7:911-8.
20. Dominici S, Pieri L, Paolicchi A, et al. Endogenous oxidative stress induces distinct redox forms of tumor necrosis factor receptor-1 in melanoma cells. *Ann NY Acad Sci* 2004;1030:62-8.