

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
“FEDERICO II”**



DIPARTIMENTO DI AGRARIA

**DOTTORATO INTERNAZIONALE DI RICERCA
“INSECT SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY”**

XXVIII CICLO

TESI DI DOTTORATO

**Analisi funzionale delle
 γ -glutammil transpeptidasi di insetto.**

Coordinatore

Chiar.mo Prof.

Francesco PENNACCHIO

Tutor

Chiar.ma Dott.ssa

Silvia GIGLIOTTI

Candidata

Sabrina SANNINO

Anno accademico 2015-2016

Alla mia famiglia

Indice

| | |
|---|----|
| Abstract | 6 |
| Riassunto | 9 |
| 1. Introduzione | 12 |
| 1.1 γ -glutammina transpeptidasi (GGT): generalità | 12 |
| 1.2 Attività catalitica delle GGT e ciclo del γ -glutammina | 14 |
| 1.3 Funzioni del glutammina..... | 18 |
| 1.4 Azione antiossidante delle GGT | 23 |
| 1.5 Azione pro-ossidante delle GGT..... | 24 |
| 1.6 GGT di batteri patogeni: <i>Helicobacter pylori</i> e <i>Helicobacter suis</i> | 27 |
| 1.7 Le GGT di <i>Drosophila melanogaster</i> | 32 |
| 1.8 Insetti entomofagi: i Parassitoidi..... | 36 |
| 1.9 Il sistema ospite-parassitoide <i>Aphidius ervi</i> - <i>Acyrtosiphon pisum</i> | 40 |
| 1.9.1 Regolazione dell'ospite da parte di <i>Aphidius ervi</i> | 41 |
| 1.9.2 <i>AeGGT1</i> , una forma specializzata di γ -glutammina transpeptidasi di <i>A. ervi</i> | 43 |
| 2. Materiali e Metodi | 45 |
| 2.1 Terreno di coltura per l'allevamento di <i>Drosophila melanogaster</i> | 45 |
| 2.2 Mantenimento dei ceppi di <i>Drosophila melanogaster</i> | 45 |
| 2.3 Ceppi di <i>Drosophila melanogaster</i> | 46 |
| 2.4 Ceppi batterici | 47 |
| 2.5 Plasmidi..... | 48 |
| 2.6 Strategie di clonaggio..... | 50 |
| 2.7 Digestione di DNA mediante enzimi di restrizione | 52 |
| 2.8 Polymerase Chain Reaction (PCR) | 52 |
| 2.9 Purificazione di DNA separato mediante elettroforesi su gel di agarosio | 55 |
| 2.10 Reazioni di fosforilazione, defosforilazione e ligazione di DNA | 56 |
| 2.11 Trasformazione di cellule batteriche | 57 |

| | |
|---|----|
| 2.12 PLASMID MINI PREPS: preparazione di DNA plasmidico su piccola scala | 58 |
| 2.13 PLASMID MEDIUM PREPS: preparazione di DNA plasmidico su media scala..... | 59 |
| 2.14 Estrazione di RNA totale da <i>Drosophila melanogaster</i> | 60 |
| 2.15 Reazione di RetroTrascrittasi inversa-PCR (RT-PCR)..... | 61 |
| 2.16 Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) | 63 |
| 2.17 Preparazione di estratti proteici da <i>Drosophila melanogaster</i> | 64 |
| 2.18 Raccolta di emolinfa da femmine adulte di <i>Drosophila melanogaster</i> | 65 |
| 2.19 Western Blot..... | 65 |
| 2.20 Dosaggio di attività enzimatica γ -glutammina transpeptidasi | 67 |
| 2.21 Creazione di ceppi transgenici di <i>Drosophila melanogaster</i> | 68 |
| 2.22 Induzione dell'espressione di transgeni mediante il sistema binario Gal4-UAS..... | 70 |
| 2.23 Test di fecondità..... | 71 |
| 2.24 Test di vitalità durante lo sviluppo..... | 72 |
| 2.25 Test di resistenza allo <i>stress</i> ossidativo..... | 72 |
| 2.26 Colorazione delle ovaie di <i>Drosophila melanogaster</i> con il DAPI | 73 |
| 2.27 Immunofluorescenza su ovaie di <i>Drosophila melanogaster</i> | 73 |
| 2.28 Analisi statistiche | 74 |
| 3. Risultati | 75 |
| 3.1 Creazione di costrutti ricombinanti e generazione di linee transgeniche per l'espressione eterologa della proteina <i>AeGGT1</i> in <i>Drosophila melanogaster</i> : | 75 |
| 3.2 Induzione dei transgeni <i>AeGGT1-V5His</i> e <i>AeGGT1-MLGPI</i> e analisi dell'espressione:..... | 78 |
| 3.2.1 I transgeni <i>AeGGT1-V5His</i> e <i>AeGGT1-MLGPI</i> sono abbondantemente trascritti in seguito ad induzione: | 79 |
| 3.2.2 Le proteine <i>AeGGT1-V5His</i> e <i>AeGGT1-MLGPI</i> sono correttamente tradotte e localizzate a livello subcellulare:..... | 81 |
| 3.2.3 La proteina ricombinante solubile <i>AeGGT1-V5His</i> è secreta nell'emolinfa: | 83 |
| 3.3 Analisi dell'impatto della proteina eterologa <i>AeGGT1</i> in <i>Drosophila melanogaster</i> :..... | 86 |

| | |
|--|-----|
| 3.3.1 L'espressione della proteina <i>AeGGT1</i> non provoca riduzione della fecondità in <i>Drosophila</i> : | 87 |
| 3.3.2 L'espressione della proteina <i>AeGGT1</i> non altera lo sviluppo delle camere ovariche in <i>Drosophila</i> : | 89 |
| 3.3.3 Lo sviluppo di <i>Drosophila</i> non è alterato in presenza della proteina <i>AeGGT1</i> :..... | 90 |
| 3.3.4 L'espressione della proteina <i>AeGGT1</i> aumenta la resistenza della <i>Drosophila</i> allo <i>stress</i> ossidativo:..... | 92 |
| 3.3.5 L'attività γ -glutammina transpeptidasi è ridotta nelle <i>Drosophila</i> esprimenti la proteina <i>AeGGT1</i> :..... | 93 |
| 3.3.6 Il silenziamento del gene <i>DmGGT1</i> aumenta la resistenza allo <i>stress</i> ossidativo:..... | 95 |
| 4. Discussione | 99 |
| 5. Bibliografia | 109 |
| Ringraziamenti | 127 |

Abstract

My PhD project was aimed at characterizing the mode of action of *AeGGT1*, a γ -glutamyl transpeptidase component of the venom of the parasitoid wasp *Aphidius ervi*, by using *Drosophila melanogaster* as heterologous expression system.

γ -glutamyl transpeptidases (GGTs) are key enzymes in the metabolism of glutathione (GSH), a major cellular antioxidant. Their involvement in multiple aspects of human physiopathology fostered intense research in mammalian systems. On the contrary, very limited information is available on GGT functions in insects.

AeGGT1 is a secreted, heterodimeric protein. It originates by autocatalytic processing from a single precursor chain and is injected by the ovopositing female of *Aphidius ervi* into the body of the aphid *Acyrtosiphon pisum*. In the host, it targets the ovaries and exerts a major impact on reproduction by triggering apoptosis of germ cells and early embryos.

In order to express the *AeGGT1* protein in *Drosophila*, I designed and generated two different types of recombinant genes. Each gene encodes for a distinct extracellular version of the parasitoid protein, tagged at the C-terminus of the small subunit with a specific, antibody-recognizable epitope. One protein, named *AeGGT1V5His* was, in principle, soluble, the other, named *AeGGT1MLGPI*, GPI-linked.

The two recombinant genes were cloned into the *pUAS^{PattB}* *Drosophila melanogaster* transformation vector, downstream of a yeast upstream activating sequence (UAS) that allows for inducible expression, and inserted into the fly genome by microinjection into suitable embryos, followed by ϕ C31 integrase-mediated site-specific recombination. Transgenic flies were selected and used to establish homozygous stocks, which were first analysed to assess the expression of the *AeGGT1* transgenes, upon induction by means of the Gal4-UAS binary system. RT-PCR, western blot and immunofluorescence experiments confirmed that both genes were transcribed and both proteins were produced and correctly localized in the heterologous system. Specifically, the *AeGGT1V5His* protein was

secreted by cells and found into the haemolymph, thus mimicking in *Drosophila* a condition that, in the aphid, is established by parasitoid injection of the natural protein. On the other hand, the *AeGGT1*MLGPI protein decorated, as planned, the external surface of the plasma membrane, where eukaryotic GGT enzymes are usually located.

The physiological impact of *AeGGT1* expression in the fly was investigated by phenotypic analyses. Fecundity tests, as well as morphological studies performed on transgenic females expressing *AeGGT1* either in all body cells or in germ line/somatic ovarian cells did not show any evident defects in egg chamber development/survival, thus indicating that, in the tested conditions, *AeGGT1* cannot reproduce in the fly the dramatic effects triggered in the ovaries of its natural host. This might be simply due to insufficient amounts, not reaching a critical threshold. Alternatively, *AeGGT1* might be unable to affect metabolic and/or developmental processes in the fly germline, due to relevant physiological differences between *Drosophila* and aphid germ cells.

I also tested if the heterologous protein might have detrimental effects on fly development. To this aim, I evaluated the rate of *AeGGT1* expressing embryos that give rise to adult flies, but did not find any difference compared with control, isogenic embryos.

Therefore, *AeGGT1* does not seem to affect fly viability of fertility, at least in normal culture conditions. However, when resistance to oxidative stress was evaluated by exposing flies to a lethal dose of hydrogen peroxide, transgenic females that exhibited ubiquitous *AeGGT1* expression performed better than isogenic controls and displayed enhanced survival time. Interestingly, GGT activity, as measured by using a specific colorimetric assay, was significantly reduced in *AeGGT1* expressing flies. Finally, down-regulation of the major *Drosophila melanogaster* GGT gene (*DmGGT1*), which is responsible for 80% of the GGT activity scored in the fly, also resulted in increased resistance to hydrogen peroxide-induced oxidative stress.

Taken together, these results suggest that *AeGGT1* inhibits the activity of fly endogenous gamma glutamyl transpeptidases, leading to extracellular accumulation of GSH, which, in turn, confers protection from oxidative stress by ingested hydrogen peroxide. Therefore, the heterologous expression system I

generated to investigate the mode of action of the *AeGGT1* protein will likely be suitable also for addressing more general issues concerning GGT functions in insects.

In the light of these findings, I propose that the deleterious effects produced by *AeGGT1* on aphid ovaries may be explained by an altered GSH balance. In particular, by reducing host GGT activity, as observed in transgenic flies, *AeGGT1* would decrease the intracellular supply of cysteine, which serves as essential substrate for GSH synthesis. Reduced levels of intracellular GSH might then be critical for the rapidly dividing cells of the aphid ovaries and trigger apoptosis. Indeed, GSH depletion is a common feature of apoptotic cell death and proliferating cells are more sensitive to oxidative stress-induced apoptosis than non-dividing cells.

Riassunto

L'obiettivo del mio progetto di dottorato è stato la caratterizzazione dei meccanismi molecolari utilizzati dalla proteina *AeGGT1*, una γ -glutammina transpeptidasi presente nel veleno del parassitoide *Aphidius ervi*, per svolgere le proprie funzioni. Quest'obiettivo è stato perseguito attraverso la messa a punto e l'analisi di un sistema di espressione eterologa nell'insetto modello *Drosophila melanogaster*.

Le γ -glutammina transpeptidasi (GGT) sono enzimi chiave nel metabolismo del glutatione (GSH), un importante antiossidante cellulare. Il loro coinvolgimento in molteplici aspetti della fisiopatologia umana ha promosso un'intensa attività di ricerca nei mammiferi. Al contrario, le informazioni disponibili sulle funzioni delle GGT negli insetti sono molto limitate.

La proteina *AeGGT1* è una proteina eterodimerica secreta. Essa si origina mediante scissione autocatalitica da un singolo precursore e viene iniettata dalla femmina del parassitoide *Aphidius ervi* nel corpo dell'afide *Acyrtosiphon pisum* al momento dell'ovideposizione. Organo bersaglio di questa proteina, capace di produrre effetti devastanti sulle attività riproduttive dell'insetto ospite, sono gli ovari, all'interno dei quali essa provoca fenomeni apoptotici che interessano sia le cellule germinali, sia gli embrioni in via di sviluppo.

Per allestire un sistema di espressione della proteina *AeGGT1* in *Drosophila*, ho disegnato e costruito due diversi tipi di geni ricombinanti. Ciascun gene codifica per una proteina di fusione destinata a raggiungere l'ambiente extracellulare. Una di esse, la proteina *AeGGT1V5His*, è stata progettata come proteina solubile, mentre l'altra proteina, *AeGGT1MLGPI*, è stata fornita dei segnali necessari per ricevere l'aggiunta di un'ancora di glicosilfosfatidilinositolo durante il passaggio attraverso le cisterne del Golgi. Entrambe le proteine possono essere riconosciute da uno specifico anticorpo diretto contro un epitopo inserito all'estremità C-terminale della subunità minore.

I geni ricombinanti sono stati clonati nel vettore di trasformazione *pUAS ϕ PattB* di *Drosophila melanogaster*, a valle dell'elemento regolativo *UAS* (*Upstream Activating Sequence*), e dunque inseriti nel genoma del moscerino mediante ricombinazione sito-specifica diretta dall'integrasi ϕ C31, a seguito di microiniezione in embrioni. Gli individui transgenici sono stati poi selezionati e utilizzati per stabilire ceppi omozigoti che sono stati analizzati per verificare, innanzitutto, che l'espressione dei transgeni *AeGGT1* venisse indotta con il sistema binario Gal4-UAS. Esperimenti di RT-PCR, di western blot e di immunofluorescenza hanno effettivamente confermato che entrambi i transgeni sono trascritti ed entrambe le proteine sono prodotte e correttamente localizzate nel sistema eterologo. La proteina *AeGGT1V5His* viene infatti secreta dalle cellule di *Drosophila* nell'emolinfa, mimando l'immissione della proteina naturale nell'emocele dell'afide all'atto dell'ovideposizione del parassitoide. La proteina *AeGGT1MLGPI* disegna i contorni cellulari, legandosi alla superficie extracellulare della membrana plasmatica, dove gli enzimi GGT sono generalmente localizzati negli eucarioti.

L'impatto fisiologico dell'espressione della proteina *AeGGT1* è stato dunque studiato attraverso analisi fenotipiche. Le femmine transgeniche che esprimono la proteina eterologa *AeGGT1* in tutte le cellule del corpo, o solo in una delle due componenti, somatica e germinale, delle ovaie, non hanno rivelato evidenti difetti nello sviluppo delle camere ovariche, come dimostrato sia da un test di fecondità, sia da studi morfologici. Ciò indica che, nelle condizioni saggiate, la proteina *AeGGT1* non è capace di riprodurre nel moscerino gli effetti apoptotici prodotti nelle ovaie del suo ospite naturale. Questo potrebbe essere semplicemente dovuto ad un insufficiente livello di espressione delle proteine ricombinanti o potrebbe riflettere l'esistenza di importanti differenze fisiologiche tra le cellule germinali di *Drosophila* e quelle dell'afide. Ho anche verificato se la proteina *AeGGT1* potesse alterare i processi di sviluppo del moscerino, ma non ho rilevato differenze significative nelle percentuali di embrioni capaci di svilupparsi in adulti in presenza o in assenza di questa proteina.

Sembra dunque che, in condizioni di allevamento normali, la proteina *AeGGT1* non influenzi né la fertilità né la vitalità dei moscerini. Tuttavia, quando è stata

valutata la resistenza allo *stress* ossidativo esponendo le *Drosophila* ad una dose letale di perossido di idrogeno, le femmine transgeniche, che esprimevano la proteina *AeGGT1* in tutti i tessuti, hanno mostrato un tempo di sopravvivenza più lungo rispetto a femmine di controllo isogeniche. L'attività GGT, misurata utilizzando uno specifico saggio colorimetrico, è risultata significativamente ridotta nei moscerini transgenici che esprimono la proteina *AeGGT1*. Infine, ho dimostrato che il silenziamento del principale gene GGT di *Drosophila melanogaster* (*DmGGT1*), responsabile dell'80% dell'attività GGT del moscerino, produce a sua volta aumento di resistenza allo *stress* ossidativo indotto dalla somministrazione orale di perossido di idrogeno.

Nell'insieme, questi risultati suggeriscono che la proteina *AeGGT1* inibisce l'attività γ -glutammina transpeptidasi endogena del moscerino, provocando accumulo extracellulare di GSH, che, a sua volta, potrebbe conferire protezione dallo *stress* ossidativo causato dal perossido di idrogeno ingerito. Ne consegue che il sistema di espressione eterologa da me generato per studiare l'azione della proteina *AeGGT1* può essere utile per investigare anche aspetti di natura più generale sulle funzioni delle GGT degli insetti.

Alla luce dei dati ottenuti, posso infine ipotizzare che gli effetti deleteri prodotti dalla proteina *AeGGT1* negli ovari degli afidi parasitizzati dipendano da un'alterazione dell'omeostasi del GSH. Infatti, riducendo l'attività delle GGT endogene, così come accade nelle *Drosophila* transgeniche, la proteina *AeGGT1* rallenterebbe l'ingresso di cisteina nelle cellule dell'ovario. Poiché la cisteina funge da substrato essenziale per la sintesi del GSH, ciò si tradurrebbe in un abbassamento della concentrazione intracellulare di questo importante composto antiossidante. Tale condizione potrebbe essere critica per un tipo di cellule, come quelle delle ovaie degli afidi, che si dividono rapidamente e che potrebbero rispondere a questo sbilanciamento innescando fenomeni apoptotici.

1. Introduzione

1.1 γ -glutammil transpeptidasi (GGT): generalità

Le γ -glutammil transpeptidasi (GGT) sono enzimi che catalizzano la scissione del legame γ -glutammilico presente tra il gruppo carbossile in posizione γ dell'acido glutammico e un'ammina. (Verma, et al., 2015). Esse appartengono alla superfamiglia delle cosiddette idrolasi "nucleofilo N-terminale" (*idrolasi NTN*) (Suzuki and Kumagai, 2002), i cui membri presentano una comune architettura del sito attivo (due foglietti β antiparalleli racchiusi fra due α eliche antiparallele), contengono all'estremità N-terminale un residuo nucleofilo che catalizza l'idrolisi di un legame ammidico e vengono attivati mediante processamento autocatalitico (Oinonen and Rouvinen, 2000). Nel caso delle GGT, da una molecola precursore a singola catena ha origine, in seguito a scissione autocatalitica, un eterodimero composto da due subunità, una grande (L) e una piccola (S), tenute assieme da legami non covalenti (Tate and Meister, 1981; Suzuki and Kumagai, 2002).

Le GGT sono proteine altamente conservate in tutti gli esseri viventi, procarioti, eucarioti ed Archaea. Dal confronto delle sequenze amminoacidiche è infatti emerso che questi enzimi hanno un'identità maggiore del 25% ed in particolare la subunità piccola è risultata più conservata della subunità grande (Boanca et al., 2006).

Se le GGT batteriche hanno struttura primaria e caratteristiche enzimatiche simili alle GGT dei mammiferi, esistono comunque due importanti differenze. Innanzitutto, il precursore delle GGT batteriche presenta all'estremità N-terminale un peptide segnale e dunque la proteina viene esportata nello spazio periplasmatico o secreta nell'ambiente extracellulare dove esplica la sua azione in forma solubile (Castellano et al., 2012). Nella porzione N-terminale della catena pesante delle GGT dei mammiferi è invece presente un dominio idrofobico che ne permette l'inserzione nella membrana plasmatica; il dominio intracellulare è costituito da solo quattro amminoacidi, mentre il resto della proteina è esposto nell'ambiente extracellulare e quindi agisce su substrati presenti all'esterno della cellula (Finidori et al., 1984) (Figura 1). Inoltre, a differenza delle GGT batteriche, le GGT dei mammiferi sono fortemente glicosilate (Castellano et al.,

2012). Processi di glicosilazione, di entità variabile da specie a specie, avvengono anche a carico delle GGT delle piante, che presentano tutti i residui amminoacidici necessari per l'attività catalitica identificati nelle GGT dei mammiferi (Martin and Slovin., 2000; Storozhenko et al., 2002). Nelle piante, inoltre, le GGT possono essere localizzate nei vacuoli, dove cooperano con l'enzima carbossipeptidasi alla degradazione dei GSH-coniugati (Grzam et al., 2007), oppure possono essere enzimi apoplastici, associati alla parete cellulare o alla membrana plasmatica (Martin et al., 2007; Ohkama-Ohtsu et al., 2007).

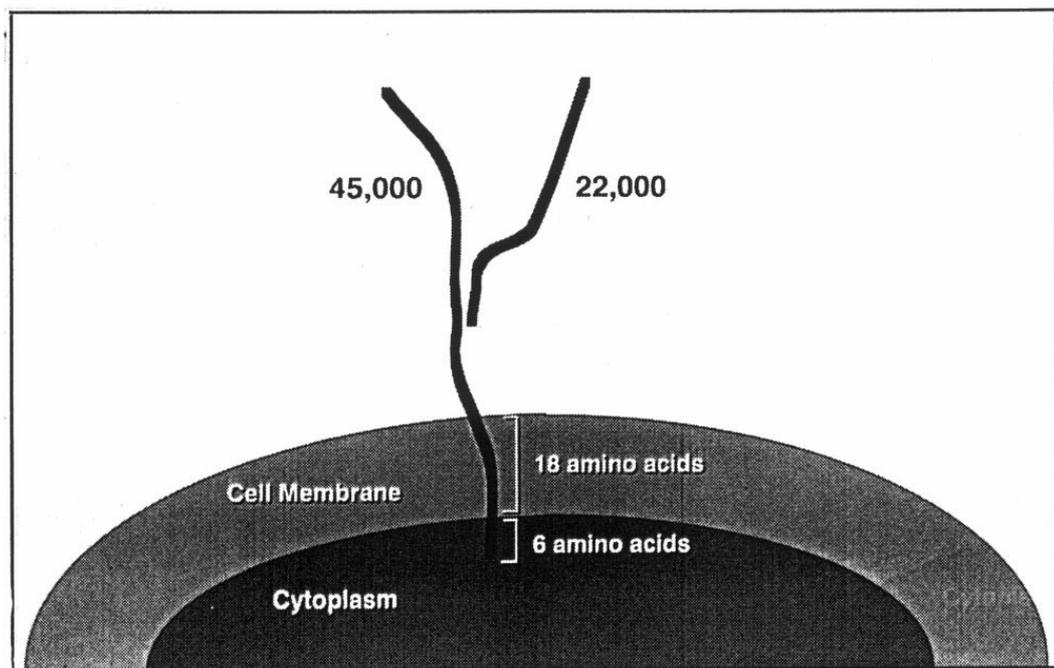


Figura 1: Rappresentazione schematica della GGT di mammifero. Il sito catalitico dell'enzima è situato all'esterno della cellula (da: Hanigan, 1998).

In tutte le GGT una treonina rigorosamente conservata situata all'estremità N-terminale della subunità piccola catalizza mediante attacco nucleofilo sia la reazione di autoprocessamento, sia la scissione dei legami γ -glutammilici dei substrati dell'enzima (Castellano and Merlino, 2012).

In dettaglio, il meccanismo di autoprocessamento proposto per le GGT prevede, che, in un primo passaggio, il gruppo ossidrilico della catena laterale della treonina conservata del precursore inattivo attacchi il gruppo carbonilico del

precedente residuo di glutammina, formando un intermedio di reazione tetraedrico. La scissione del legame C-N attraverso protonazione del gruppo amminico della treonina produrrebbe poi un intermedio estere, che verrebbe infine idrolizzato da una molecola di acqua per dar luogo alla formazione delle due subunità distinte, con la treonina conservata come residuo N-terminale della subunità piccola (Castellano and Merlino, 2012; Pica et al., 2015) (Figura 2).

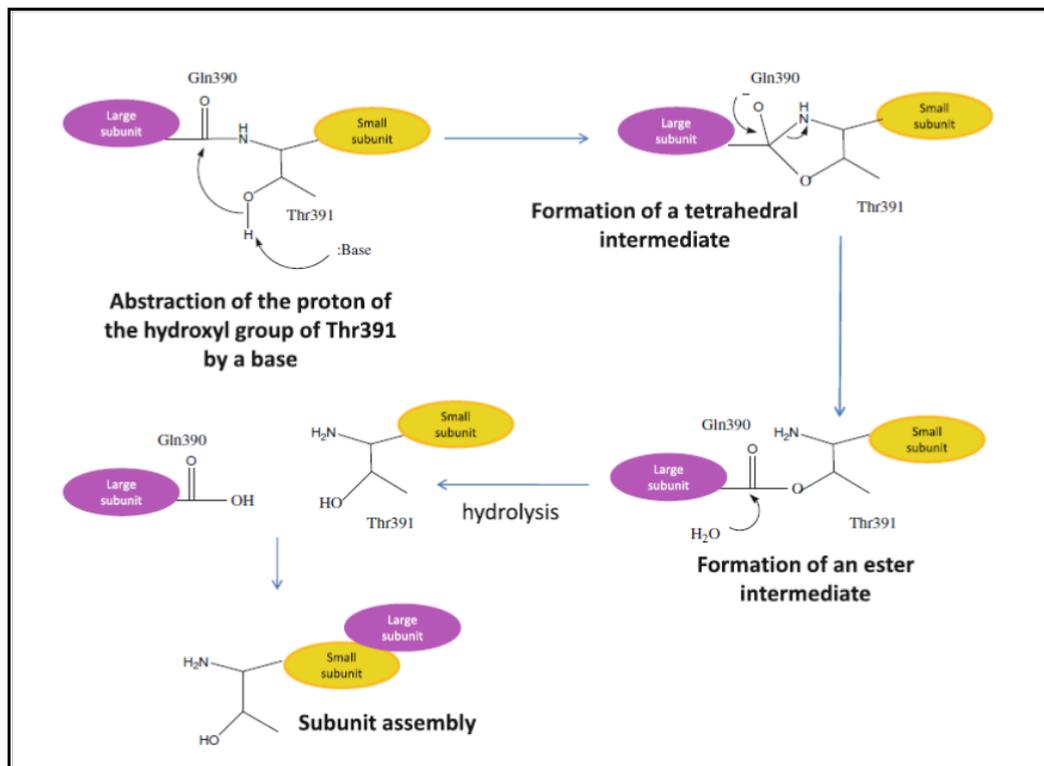


Figura 2: Meccanismo proposto per il processamento auto-catalitico delle GGT. La treonina 391 è il residuo catalitico della GGT di *E. coli* (da: Castellano et al., 2012).

1.2 Attività catalitica delle GGT e ciclo del γ -glutammile

Il sito catalitico delle proteine GGT sembra essere costituito da due tasche consecutive, indicate come sito donatore e sito accettore. Il primo lega il substrato donatore del gruppo γ -glutammilico, ed è stato estesamente caratterizzato fino ad oggi, mentre poche sono le informazioni relative al sito accettore che lega la molecola cui il gruppo γ -glutammilico viene trasferito (Verma et al., 2015). Alcuni membri della famiglia delle GGT possiedono poi una regione destrutturata

e flessibile, nota come *lid-loop*, che nell'enzima maturo va a disporsi al di sopra del sito di legame del substrato. Il ruolo di questa regione non è stato in realtà ancora chiarito, ma è stato ipotizzato che essa possa influenzare la reazione di legame e di rilascio del substrato (Okada et al., 2006; Okada et al., 2007; Pica et al., 2015; Verma et al., 2015).

Sebbene le GGT siano in grado di utilizzare un'ampia varietà di composti γ -glutammilici, il più importante substrato fisiologico di questi enzimi è il glutatione (GSH), un tripeptide tiolico presente in tutti gli organismi viventi (Franzini et al., 2009). Composto da acido glutammico, cisteina e glicina (γ -glutammil-cisteinilglicina), esso possiede la particolare caratteristica di avere i residui di cisteina e di acido glutammico uniti da un legame γ -glutammilico invece che da un normale legame peptidico (Figura 3).

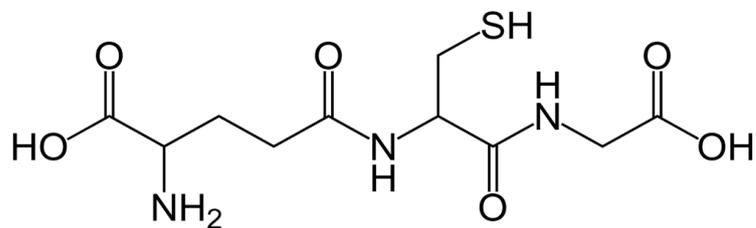


Figura 3: Struttura del glutatione ridotto (GSH). Il legame γ -glutammilico si forma tra il gruppo γ -carbossilico del glutammato ed il gruppo amminico della cisteina.

Le GGT catalizzano specificamente il primo passaggio del processo di degradazione di questo tripeptide tiolico, rendendo possibile la successiva captazione degli amminoacidi che lo compongono da parte della cellula. In particolare, questi enzimi idrolizzano il legame γ -glutammilico presente tra acido glutammico e cisteina, promuovendo il trasferimento del gruppo γ -glutammilico su di un accettore (Castellano et al., 2012). I principali accettori del gruppo γ -glutammilico sono L-amminoacidi come Cis, Met, Gln, Glu o, preferenzialmente, dipeptidi, quali CisGly, MetGly, GlnGly, CysGly, GlyGly (Franzini et al., 2009).

L'attività catalitica si esplica attraverso quattro fasi (Verma et al., 2015). Nella prima fase il gruppo ossidrilico della treonina N-terminale della catena leggera della GGT attacca il gruppo carbonilico del glutatione. La seconda fase porta alla formazione di uno stato di transizione. La terza fase prevede il rilascio di cisteinil-glicina dal glutatione, con formazione di un complesso intermedio γ -glutammil-GGT. Questo complesso intermedio è stabilizzato attraverso legami idrogeno che si formano fra il substrato e due glicine conservate dell'enzima GGT. La fase finale di questo meccanismo comporta il trasferimento del gruppo γ -glutammilico alla molecola accettrice attraverso una reazione di transpeptidazione e dunque formazione di un γ -glutammil-amminoacido o un γ -glutammil-dipeptide da una parte, e cisteinil-glicina dall'altra. In assenza di un accettore, l'intermedio acil-enzima può reagire anche con una molecola di acqua (reazione di idrolisi), liberando acido glutammico.

I γ -glutammil-amminoacidi e γ -glutammil-dipeptidi prodotti dalla reazione di transpeptidazione catalizzata dalle GGT vengono trasportati all'interno della cellula dove diventano substrato dell'enzima γ -glutammil-ciclo-transferasi che li scinde nei corrispettivi amminoacidi ed in 5-oxoprolina: quest'ultima può essere convertita ad acido glutammico dall'enzima 5-oxoprolinasi in una reazione energia-dipendente e quindi essere usata nella sintesi di glutatione. L'altro prodotto della reazione catalizzata dalle GGT, la cisteinil-glicina, è invece idrolizzata dalle dipeptidasi di membrana con formazione di cisteina e glicina che, trasportate all'interno della cellula, possono a loro volta partecipare alla sintesi di glutatione. Questa si realizza attraverso due passaggi ATP-dipendenti (Lu, 1999). Nel primo passaggio, catalizzato dall'enzima γ -Glutammil Cisteina Sintetasi (Reazione 1), viene sintetizzato l'intermedio γ -glutammil-cisteina a partire da glutammato e cisteina (Reazione 1)

Reazione 1:

L-Glutammato + L-Cisteina



Nel secondo passaggio, la glicina viene aggiunta all'estremità C-terminale della γ -glutammina-cisteina mediante l'azione dell'enzima Glutazione Sintetasi (Reazione 2).

Reazione 2:

L- γ -glutammina-L-cisteina



L'insieme delle reazioni collegate all'attività della GGT e quelle che portano alla sintesi ed all'efflusso del glutazione costituiscono quello che è stato definito il “ciclo del γ -glutammina” (Lieberman et al., 1995; Franzini et al., 2009) (Figura 4)

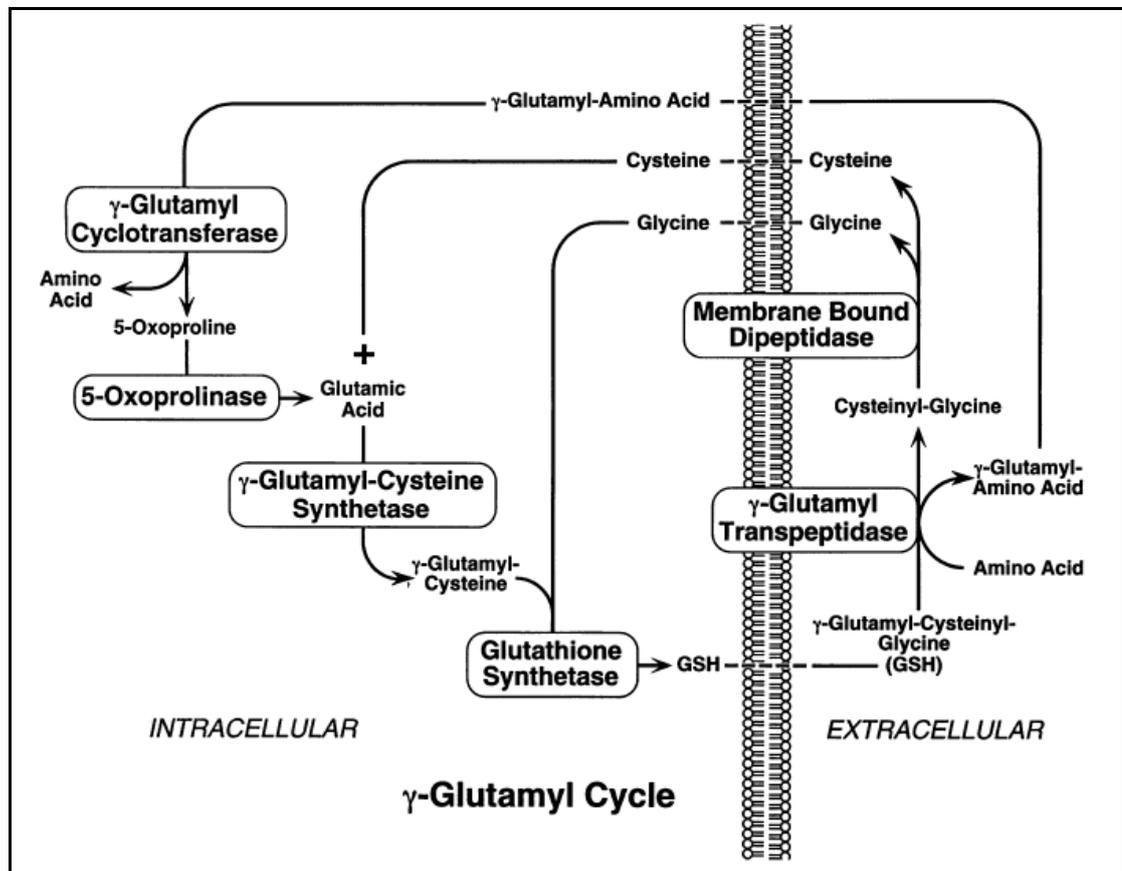


Figura 4: Ciclo del γ -glutammina: degradazione extracellulare e risintesi intracellulare di GSH. (da: Lieberman et al., 1995)

1.3 Funzioni del glutatione

Il glutatione svolge varie funzioni di importanza vitale per la cellula, in particolare: 1) azione detossificante, attraverso la coniugazione di composti tossici elettrofili, 2) il mantenimento del normale stato *redox* dell'ambiente intracellulare, prevenendo l'ossidazione dei gruppi tiolici delle proteine, riducendo i ponti disolfuro indotti da agenti ossidanti e provvedendo all'eliminazione dei radicali liberi, 3) la costituzione di una riserva intracellulare di cisteina, 4) la regolazione del ciclo cellulare e dell'apoptosi (Lu, 2013). Infine, il glutatione modula l'attività delle proteine mediante modificazioni post-traduzionali che prendono il nome di S-glutationilazione (Pompella et al., 2003) (Figura 5).

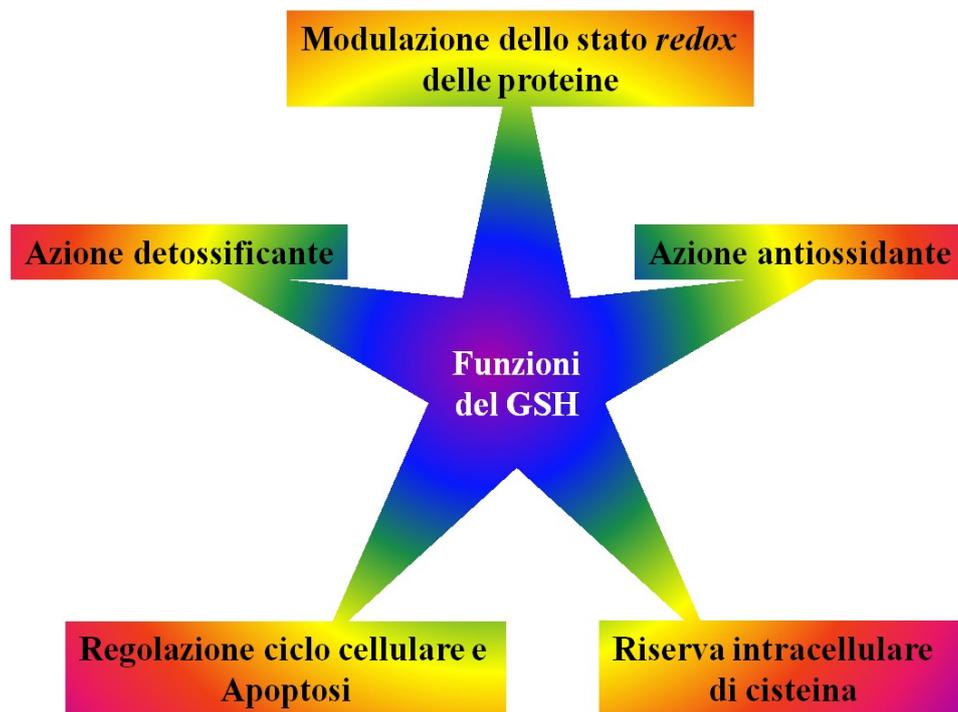


Figura 5: Principali funzioni del GSH.

Tutte queste funzioni del glutatione sono condizionate dall'equilibrio esistente all'interno della cellula tra la sua forma ridotta (GSH) e la sua forma ossidata (GSSG), che deriva dall'unione di due molecole di GSH mediante un ponte disolfuro (Figura 6).

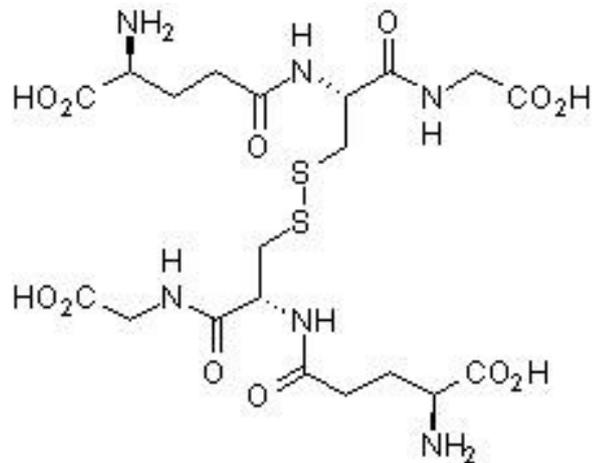


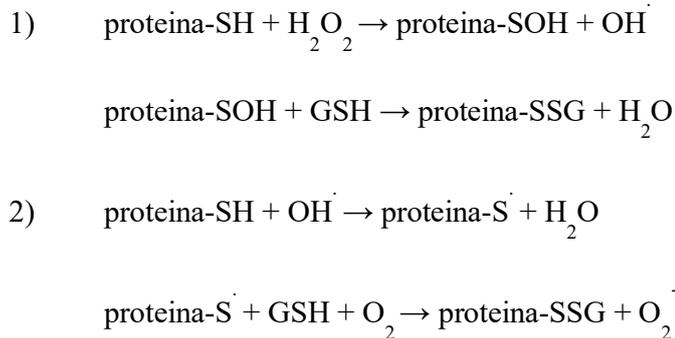
Figura 6: Forma ossidata del glutathione (GSSG).

In condizioni fisiologiche normali, la forma ridotta è ampiamente predominante all'interno della cellula, ed il rapporto GSSG:GSH è nell'ordine di 1:10/1:100 (Meister and Anderson, 1983; Lu, 1999). A mano a mano infatti che, nello svolgimento delle sue funzioni antiossidanti, il GSH viene ossidato a GSSG, questo viene nuovamente ridotto a GSH dall'enzima glutathione reduttasi (GR) in una reazione che utilizza NADPH:

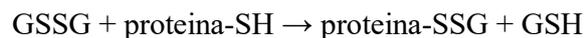


L'azione detossificante viene esplicata dal GSH nei confronti delle sostanze xenobiotiche, estranee all'organismo. Si tratta di composti elettrofili cui il GSH viene coniugato spontaneamente o mediante reazioni enzimatiche catalizzate dalle glutathione-S trasferasi (Lu, 2009). I coniugati vengono successivamente metabolizzati attraverso una serie di reazioni, la prima delle quali è catalizzata dalle GGT che scindono il gruppo γ -glutammile, con formazione di un coniugato cisteinil-glicina. Questo viene tagliato da una dipeptidasi e il coniugato cisteinilico viene sottoposto a N-acetilazione risultando nella sintesi di acido mercaptourico. Oltre ai composti di origine esogena, anche sostanze endogene seguono una simile via metabolica.

Durante lo *stress* ossidativo, i gruppi SH delle proteine possono essere ossidati ad acido sulfenico o possono formare radicali tioli. L'uno e gli altri possono reagire con il GSH per formare disolfuri misti (proteina-non proteina):



Questi meccanismi di glutationilazione servono a proteggere i gruppi tiolici delle proteine da processi di ossidazione irreversibile e possono anche essere utilizzati per prevenire perdita di glutatione in condizioni di *stress* ossidativo. Può accadere infatti che lo *stress* ossidativo a cui è sottoposta una cellula superi le sue capacità di ridurre il GSSG a GSH, portando ad un accumulo di GSSG. Allo scopo allora di prevenire l'alterazione dell'equilibrio *redox* il GSSG può essere trasportato attivamente all'esterno della cellula oppure può reagire con i gruppi sulfidrilici delle proteine in una reazione di scambio tiolo-disolfuro:



I disolfuri misti possono poi essere ridotti in una reazione inversa, catalizzata dalle glutaredoxine (Grx), che porta a ricostituire i gruppi SH delle proteine.

La glutationilazione serve poi a modulare la funzione delle proteine e rappresenta quindi una componente fondamentale di meccanismi di segnalazione dipendenti dallo stato *redox* della cellula (Dalle-Donne et al., 2009). Attraverso il legame reversibile del glutatione ai gruppi SH dei residui di cisteina, è infatti possibile attivare o inattivare enzimi, fattori di trascrizione, molecole regolatrici, con importanti conseguenze su diverse funzioni biologiche.

Le funzioni antiossidanti del GSH si compiono essenzialmente attraverso reazioni catalizzate dalle glutatione perossidasi (GPx) che riducono perossido di idrogeno e perossidi lipidici ossidando il GSH a GSSG. Quest'ultimo viene poi nuovamente ridotto a GSH in una reazione catalizzata, come visto sopra, dall'enzima GR a

spese del NADPH, fomando un ciclo *redox* (Lu, 1999). La GPx può anche ridurre, assieme alla glutatione S-trasferasi, perossidi organici. La presenza del GSH è particolarmente critica nei mitocondri che sono privi di catalasi, altri enzimi preposti, come le perossidasi, alla riduzione del perossido di idrogeno.

La funzione di riserva di cisteina svolta dal GSH è particolarmente importante perché la cisteina è estremamente instabile nell'ambiente extracellulare e rapidamente si auto-ossida a cistina in un processo che genera radicali liberi dell'ossigeno tossici (Meister, 1988). Attraverso il ciclo del γ -glutammile, il GSH funge dunque da fonte continua di cisteina.

In molte cellule, sia normali, sia tumorali, un incremento dei livelli di GSH è associato ad un una risposta proliferativa ed è essenziale per la progressione del ciclo cellulare (Lu, 2013). Un aspetto importante dei meccanismi alla base di questi fenomeni è senz'altro rappresentato dal ruolo svolto dal GSH nel mantenimento dello stato ridotto di glutaredossina e tioredossina, necessarie per l'attività della ribonucleotide riduttasi, l'enzima che catalizza la tappa che limita la velocità della reazione di sintesi del DNA (Holmgren, 1981). Lo stato *redox* del GSH potrebbe inoltre influenzare l'espressione e l'attività di fattori importanti per la progressione del ciclo cellulare. Di particolare interesse è in questo contesto l'osservazione che il GSH si localizza nel nucleo all'inizio dei processi di proliferazione cellulare e dunque potrebbe modulare, mediante alterazione degli equilibri *redox*, l'attività di proteine nucleari compresi gli istoni ed è stato infatti dimostrato che la progressione del ciclo cellulare richiede condizioni riducenti (Pallardò et al., 2009; Vivancos et al., 2010).

Il GSH modula anche la morte cellulare, nelle sue due possibili forme di apoptosi e necrosi (Lu, 2013). I livelli di GSH decrescono durante l'apoptosi in vari tipi cellulari e questo è dovuto ad una serie di concause, quali la produzione di specie reattive dell'ossigeno, l'aumento di efflusso di GSH e la riduzione di attività della glutatione cisteina ligasi (Franklin et al., 2002; Circu and Aw, 2012). E' stato inoltre dimostrato che, per diversi tipi cellulari, l'efflusso di GSH è essenziale perché possa avvenire l'apoptosi (Lu, 2013). I livelli di GSH influenzano infatti l'espressione o l'attività delle caspasi e di altre molecole di segnalazione coinvolte nei meccanismi di morte cellulare (Lu, 2013).

Nelle piante, il glutatione ha un ruolo importante nella regolazione del metabolismo cellulare, incluso l'accumulo e il trasporto a lunga distanza dello zolfo ridotto, la tolleranza a *stress* abiotici e biotici, la detossificazione di *xenobiotici* come erbicidi e pesticidi, metalli pesanti e altri inquinanti presenti nell'ambiente (Noctor et al., 2012). In generale, quindi, si può affermare che il glutatione svolge una funzione fondamentale nella protezione delle piante dai danni ossidativi che si originano in conseguenza a *stress* esogeni. Nei tessuti vegetali la concentrazione del glutatione, tenendo conto sia dell'ambiente interno alle cellule che degli spazi intercellulari (apoplasto), dipende da tutt'un insieme di processi e interazioni. Questi processi includono l'assimilazione di zolfo e azoto che forniscono i precursori metabolici del glutatione, la regolazione dei meccanismi di biosintesi e degradazione, l'entrata e l'uscita di glutatione da floema e xilema, e il suo *turnover* cellulare per la produzione di derivati del glutatione (Noctor et al., 2012).

Per quanto riguarda i batteri, le funzioni del GSH sono state studiate in minore misura rispetto a quanto è stato fatto per gli eucarioti. In questi organismi, il GSH è essenziale nella difesa contro i composti del cloro, il metil gliossale, alcuni antibiotici e i metalli pesanti (Smirnova et al., 2012). E' stato inoltre dimostrato che esso controlla lo stato di attivazione di due importanti proteine regolatrici, OxyR e FNR, attraverso la modulazione dello stato *redox* di specifici gruppi SH. Mutanti di *E. coli* privi di glutatione sono poi risultati particolarmente sensibili a diversi tipi di *stress* (Smirnova et al., 2012).

Più di 20 anni fa era stato osservato che *E. coli* e *S. typhimurium* accumulano glutatione ridotto nel mezzo di coltura durante la fase di crescita esponenziale e lo idrolizzano mediante l'attività GGT nella fase stazionaria. Ciò aveva suggerito che la funzione dell'esporto di GSH fosse quella di proteggere le cellule da composti esogeni potenzialmente tossici. Un recente studio ha di fatto dimostrato che l'esposizione di cellule di *E. coli* a specie reattive dell'ossigeno stimola reversibilmente l'efflusso di GSH dalla cellula (Smirnova et al., 2015).

1.4 Azione antiossidante delle GGT:

Un efflusso continuo di glutatione è effettuato da molti tipi cellulari mediante specifici trasportatori (Bachhawat et al., 2013). Favorendo, attraverso il catabolismo del GSH extracellulare, il recupero degli amminoacidi costituenti di modo che essi possano essere utilizzati nuovamente per la sintesi intracellulare, le GGT vengono generalmente considerate membri dei sistemi antiossidanti della cellula (Hanigan, 2014).

Vari studi, condotti in diversi tipi cellulari, hanno indicato che le GGT sono maggiormente espresse in seguito ad esposizione a *stress* ossidativo acuto, a sostegno dell'ipotesi che la loro attività abbia una funzione protettiva nei confronti dei possibili danni intracellulari prodotti dalle specie reattive dell'ossigeno (Kugelman et al., 1994; Kinickelbein et al., 1996; Liu et al., 1998). L'elevata espressione delle GGT in diversi tipi di tumore è stata a sua volta interpretata come uno dei fattori coinvolti nella resistenza delle cellule cancerose al danno ossidativo prodotto dalle terapie antitumorali farmacologiche e dalla radioterapie (Hanigan et al., 1999a). Studi effettuati sia *in vitro* che *in vivo* hanno poi dimostrato che cellule che sovraesprimono la GGT sono capaci di utilizzare il GSH extracellulare come fonte di cisteina in maniera più efficiente, il che si traduce in un vantaggio nelle capacità di crescita (Rajpert-De Meyts et al., 1992; Hanigan, 1995; Hanigan et al., 1999a, Franzini et al., 2006). Inoltre, cellule con elevati livelli di espressione della GGT sono effettivamente risultate più resistenti al trattamento con perossido di idrogeno e chemioterapici (Lewis et al., 1988; Godwin et al., 1992; Shi et al., 1993; Hanigan et al. 1999b; Franzini et al., 2006). In alcuni di questi studi si è anche visto che è il trattamento stesso a stimolare l'espressione della GGT, il che è stato interpretato come indicazione dell'esistenza di una correlazione diretta fra attività GGT e adattamento delle cellule alle condizioni di *stress*. Ed infatti, questa capacità di adattamento viene persa, in cellule polmonari di ratto, effettuando un pre-trattamento con un inibitore delle GGT (Liu et al., 1996). In maniera analoga, deplezione di GSH e inibizione della GGT determinano un significativo incremento degli effetti citotossici prodotti da condizioni di *stress* ossidativo in cellule di melanoma (Benlloch et al., 2005).

Esperimenti di *knockout* della GGT condotti in topo hanno rivelato il ruolo essenziale svolto da questo enzima nella regolazione dei livelli di cisteina circolante (Lieberman et al, 1996). La concentrazione di cisteina nel plasma di questi topi è infatti solo il 20% di quella registrata nei topi *wild-type*: questo *deficit* causa seri problemi di accrescimento e conduce alla morte, che avviene a 10-12 settimane dalla nascita. Durante la loro breve vita, i topi privi di attività GGT presentano cataratte, danno polmonare indotto dall'ossigeno e accumulo di danni al DNA, tutti sintomi legati alla riduzione del GSH intracellulare e al conseguente *stress* ossidativo (Hanigan, 2014).

1.5 Azione pro-ossidante delle GGT:

Le GGT hanno in un certo senso una “doppia faccia”: la loro attività da un lato permette un efficiente utilizzo degli amminoacidi necessari per la sintesi del GSH, dunque questi enzimi possono essere visti come strumenti ancillari dei sistemi antiossidanti basati su questo tripeptide tiolico, ma dall'altra promuove la formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) nell'ambiente extracellulare. Ciò avviene in presenza di ioni metallici quali il ferro Fe^{3+} e il rame Cu^{2+} dalla cui disponibilità dipende dunque l'equilibrio tra la funzione anti-ossidante e quella pro-ossidante dell'enzima GGT (Stark et al., 1993). Il gruppo tiolico (-SH) della cisteinil-glicina prodotta dalla reazione di idrolisi del GSH catalizzata dalla GGT è presente a pH fisiologico sotto forma di anione tiolato (S^-), il quale riduce il Fe^{3+} a Fe^{2+} , generando il radicale tiile (S^{\cdot}). Il Fe^{2+} , a sua volta, riduce l'ossigeno molecolare a ione superossido ($O_2^{\cdot-}$) che viene poi convertito in perossido di idrogeno (H_2O_2) per azione dell'enzima superossido dismutasi (Figura 8).

La produzione di specie reattive dell'ossigeno a seguito della reazione di riduzione del ferro indotta dal catabolismo del GSH mediato dalla GGT è stata dimostrata da più studi (Dominici et al., 2003). In particolare, fornendo il GSH, assieme al suo co-substrato glicilglicina, a cellule esprimenti la GGT è stata osservata la formazione di H_2O_2 (Dominici et al., 1999). La reazione avviene nell'ambiente extracellulare, e infatti viene abolita fornendo al sistema la catalasi, che non può penetrare all'interno delle cellule. Inoltre, la produzione di H_2O_2 è

soppressa in presenza di inibitori specifici della GGT, nonché a seguito di aggiunta di un chelante del ferro, a conferma del coinvolgimento di ioni ferro presenti nell'ambiente extracellulare. Infine, la reazione è stata riprodotta anche *in vitro*, semplicemente aggiungendo alla miscela di reazione l'enzima purificato o direttamente la cisteinilglicina.

L' H_2O_2 e l'anione superossido, prodotti a seguito del catabolismo del GSH ad opera della GGT, formano, in presenza di Fe^{3+} (Figura 7, reazione di Fenton e reazione di Haber Weiss), radicali ossidrilici che insieme al radicale tiile danno inizio ad una serie di reazioni a catena che causano perossidazione lipidica, con conseguente perdita della struttura e della stabilità della membrana cellulare, nonché delle sue funzioni (Stark et al., 1993; Pompella et al., 1996; Paolicchi et al., 1997) (Figura 8).

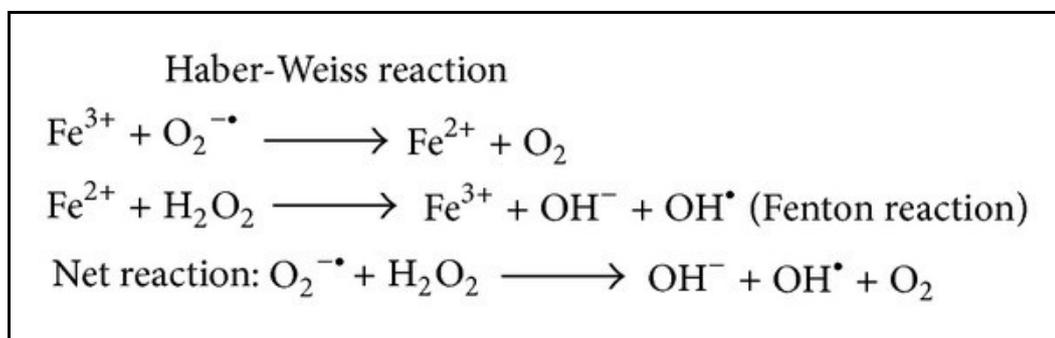


Figura 7: Reazioni di Fenton e Haber Weiss che portano alla formazione di radicali ossidrilici.

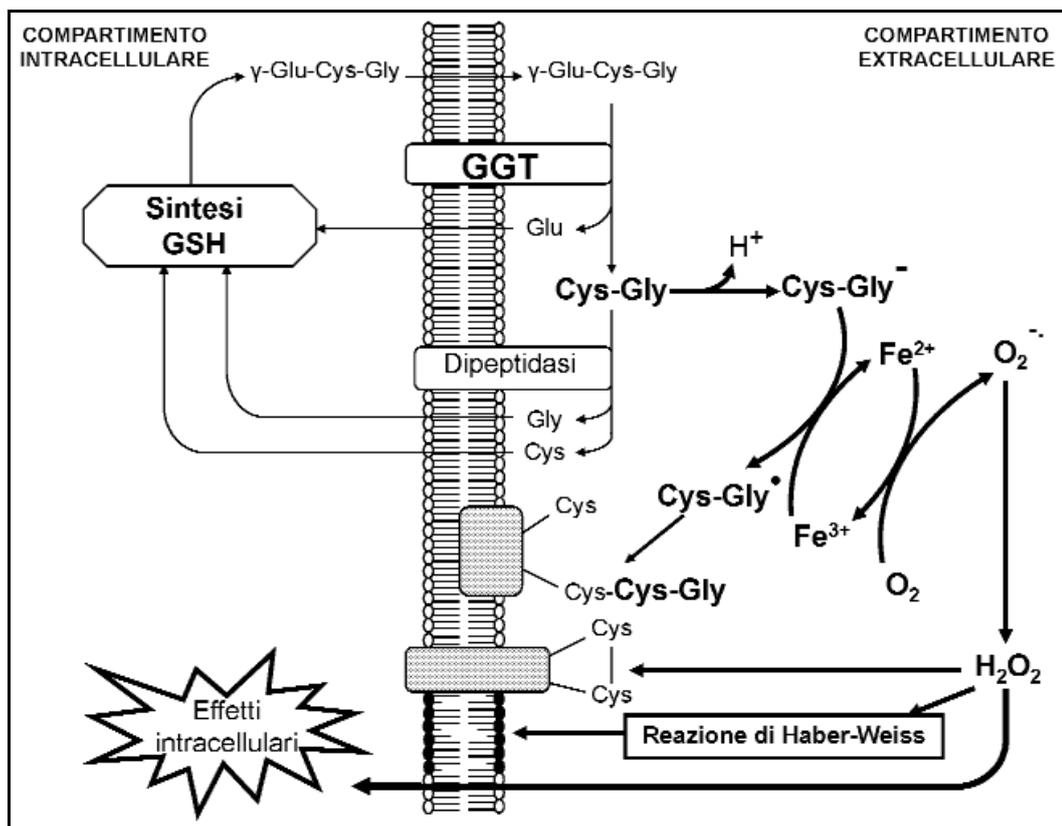


Figura 8: Attività pro-ossidante della GGT in presenza di Fe³⁺ nell'ambiente extracellulare. Il radicale tiile del composto Cys-Gly e le specie reattive dell'ossigeno prodotte in conseguenza dell'azione catalitica della GGT provocano alterazioni di molecole della superficie cellulare (fenomeni di ossidazione e tiolazione delle proteine, perossidazione dei lipidi di membrana) e di proteine intracellulari sensibili allo stato *redox* della cellula.

Il compiersi di processi di perossidazione lipidica a carico della membrana plasmatica in conseguenza del catabolismo del GSH ad opera della GGT è stato dimostrato mediante esperimenti condotti *in vitro* sia su acido linoleico e su lipoproteine LDL isolate sia su cellule esprimenti l'attività enzimatica (Stark, 1993; Pompella et al., 1996; Paolicchi et al., 1997, Paolicchi et al., 1999).

D'altro canto, bisogna considerare che, se presenti a basse concentrazioni, le specie reattive dell'ossigeno svolgono funzioni di secondi messaggeri andando a modulare vari aspetti del metabolismo cellulare. Per quanto concerne le GGT, è stato dimostrato che il perossido di idrogeno e il radicale tiile della Cys-Gly prodotti in conseguenza dell'attività di questo enzima provocano ossidazione dei tioli esposti sulla superficie della cellula portando, rispettivamente, alla

formazione di ponti disolfuro e S-cisteinilglicilazione (Dominici et al., 2003). Ciò può rappresentare uno stimolo pro-apoptotico o anti-apoptotico, a seconda del tipo cellulare considerato (Dominici et al., 2003). Un primo specifico bersaglio di quest'azione pro-ossidante della GGT è stato identificato nel recettore TNFR1: la modulazione dello stato *redox* dei domini ricchi di cisteina di questa proteina può senz'altro influenzare l'interazione con il ligando e/o i processi di trasduzione del segnale (Dominici et al., 2004).

L'abilità della GGT di influenzare, attraverso il catabolismo del GSH, lo stato *redox* dei tioli delle proteine di membrana si traduce inoltre, a livello intracellulare, in una serie di eventi che coinvolgono, tra l'altro, i fattori di trascrizione NF-kB e AP1, la cui capacità di legare il DNA viene opportunamente modulata, le fosfatasi Tyr che vengono attivate e le fosfatasi Ser/Thr che vengono invece inibite (Maellaro et al., 2000; Paolicchi et al., 2002; Pieri et al., 2003).

1.6 GGT di batteri patogeni: *Helicobacter pylori* e *Helicobacter suis*

Helicobacter pylori e *Helicobacter suis* sono batteri infettivi che causano gastrite, ulcera gastrica e duodenale, adenocarcinoma gastrico e linfoma del tessuto linfoide associato alla mucosa (Axon et al., 1999; Ernst et al., 2000; Van den Bulck et al., 2005). Nel caso di *Helicobacter pylori*, per il quale sono disponibili maggiori informazioni, è stato ampiamente dimostrato il ruolo centrale svolto da un enzima GGT nei meccanismi di patogenesi e in particolare nella colonizzazione della mucosa gastrica (Chevalier et al., 1999), nell'induzione di apoptosi delle cellule epiteliali gastriche (Shibayama et al, 2003 e 2007) nonché nella inibizione della proliferazione delle cellule T e nel differenziamento delle cellule dendritiche (Schmees et al., 2007; Oertli et al. 2013). La capacità di provocare apoptosi è stata confermata anche nel caso della GGT di *Helicobacter suis* (Flahou et al., 2011).

Anche le GGT di questi batteri patogeni vengono dapprima sintetizzate come molecola precursore e successivamente processate, e in particolare il proenzima GGT di *H. pylori* ha un peso molecolare di 60 kDa, mentre l'enzima attivo è

costituito da una subunità grande di 40 kDa ed una piccola di 20 kDa (Chevalier et al., 1999). Esso è stato isolato da due diversi gruppi di ricerca come proteina secreta (Bumann et al., 2002; Busiello et al., 2004; Gerhard et al., 2005; Schmees et al., 2007), mentre altri autori lo hanno identificato nel periplasma, ritenendo dunque che sia associato alla membrana plasmatica mediante legami ionici (Shibayama et al., 2003; Shibayama et al., 2007). L'enzima svolge un ruolo chiave nel metabolismo extracellulare di L-glutamina e GSH (Shibayama et al., 2007). La GGT di *Helicobacter pylori* idrolizza infatti il glutatione in glutammato e cisteinil-glicina e la glutamina in glutammato e ammoniaca. Il glutammato prodotto è trasportato all'interno della cellula batterica dove viene incorporato nel ciclo dell'acido tricarbossilico (TCA) o utilizzato per la sintesi di glutamina (Shibayama et al., 2007).

Poiché il batterio è incapace di internalizzare direttamente la glutamina e il glutatione presenti nell'ambiente extracellulare, il principale ruolo fisiologico della GGT di *H. pylori* è dunque quello di permettere al batterio di utilizzare questi composti come fonte di glutammato. L'ammoniaca prodotta dall'attività della GGT potrebbe poi essere utilizzata dal batterio come fonte di azoto e per resistere all'acidità dell'ambiente gastrico.

Il consumo di GSH extracellulare da parte della GGT di *H. pylori* potrebbe invece alterare l'equilibrio *redox* delle cellule della mucosa gastrica e rendere l'ospite più sensibile agli effetti tossici di sostanze ossidanti, dando luogo ad apoptosi e danni al DNA (Shibayama et al., 2007). Inoltre, l'aumento del tasso di degradazione del GSH provocato dall'attività della GGT di *H. pylori* pone le cellule della mucosa gastrica nelle condizioni di doverne incrementare la sintesi e poiché si tratta di un processo dipendente da ATP, il consumo energetico da parte di queste cellule verrebbe necessariamente ad aumentare, il che avrebbe un ulteriore impatto negativo su vitalità cellulare e capacità proliferative (Figura 9).

È stato inoltre dimostrato che la glutamina è essenziale per mantenere l'omeostasi e la normale integrità della mucosa gastrointestinale. La rimozione della glutamina extracellulare, ad opera della GGT di *H. pylori*, potrebbe dunque avere conseguenza negative sulle cellule epiteliali dello stomaco nonché alterare le funzioni immunitarie di linfociti T e macrofagi richiamati al sito di

infezione, per i quali la glutammina rappresenta un'importante fonte energetica (Shibayama et al., 2007).

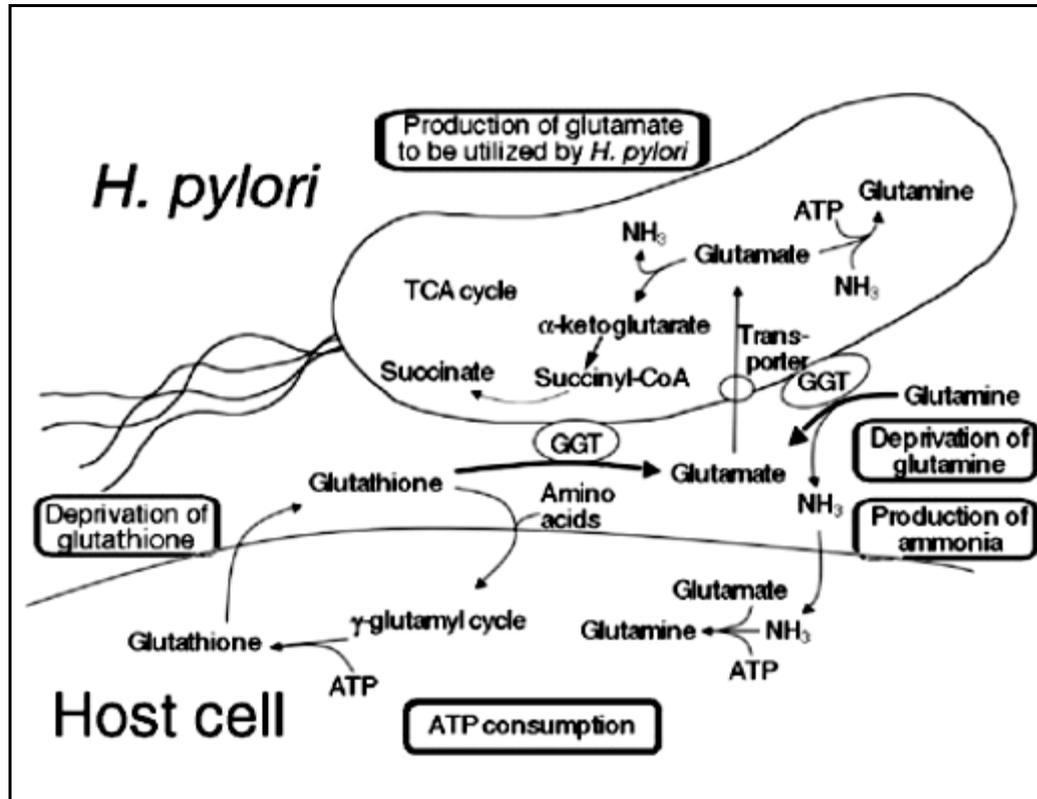


Figura 9: Modello del ruolo fisiopatologico della GGT di *H. pylori*. La GGT di *H. pylori* è richiesta per la produzione di glutammato da fonti extracellulari di glutammina o glutatione. Il glutammato viene poi internalizzato e utilizzato nel citoplasma di *H. pylori*. La GGT di *H. pylori* causerebbe un consumo esaustivo di glutammina e glutatione extracellulare con produzione di ammoniaca, comportando un eccessivo dispendio di ATP nelle cellule ospiti (da: Shibayama et al., 2007).

Infine, non si deve dimenticare che l'ammoniaca, che viene prodotta dall'idrolisi della glutammina catalizzata dalla GGT di *H. pylori*, è altamente tossica per le cellule umane (Sommi et al., 1996).

In vitro, la GGT di *H. pylori* induce apoptosi in maniera dose-dipendente e la sua attività pro-apoptotica è strettamente dipendente dall'attività enzimatica in quanto viene bloccata in presenza di analoghi della glutammina, capaci di legare ed inibire l'enzima (Shibayama et al., 2003). Il meccanismo apoptotico innescato è di

tipo “intrinseco”, mediato cioè dai mitocondri, e procede attraverso il rilascio di citocromo c nel citoplasma e l’attivazione delle caspasi 9 e 3, cui è associato un aumento di espressione della proteina pro-apoptotica Bax e una diminuzione di espressione delle proteine anti-apoptotiche Bcl-2 e Bcl-xL (Kim et al., 2007).

E’ stato inoltre dimostrato che la GGT di *Helicobacter pylori* causa arresto del ciclo cellulare alla transizione fra fase G1 e fase S. Questo effetto è risultato associato ad alterata espressione di alcune proteine regolatrici ed in particolare alla diminuzione dell’espressione di ciclina E, ciclina A, chinasi 4 e chinasi 6 ciclina-dipendente (Cdk4 e Cdk6) e aumento dell’espressione di due inibitori delle chinasi ciclina-dipendenti, p27 e p21. E’ stato dunque ipotizzato che questa interferenza con le normali funzioni di alcuni componenti del ciclo cellulare possa contribuire all’innescamento di apoptosi (Kim et al., 2010).

Sulla base di dati più recenti, è stata proposta una nuova chiave interpretativa degli effetti pro-apoptotici della GGT di *H. pylori* (Flahou et al., 2011) (Figura 10). E’ stato infatti osservato che l’aggiunta di glutatione a cellule trattate *in vitro* con questo enzima accresce il tasso di morte cellulare, che avviene per necrosi anziché apoptosi. Quest’effetto è preceduto da un aumento delle concentrazioni extracellulari di H₂O₂, e conseguente perossidazione lipidica. Come descritto nel precedente paragrafo, il catabolismo del glutatione mediato dalle GGT produce infatti ROS, quindi H₂O₂, attraverso un meccanismo innescato dalla riduzione del Fe³⁺ da parte del gruppo tiolico della cisteinilglicina (Gong et al., 2010). Il tipo di morte cellulare scatenato dipenderebbe dalle quantità di GSH extracellulare disponibile come substrato dell’enzima (Flahou et al., 2011).

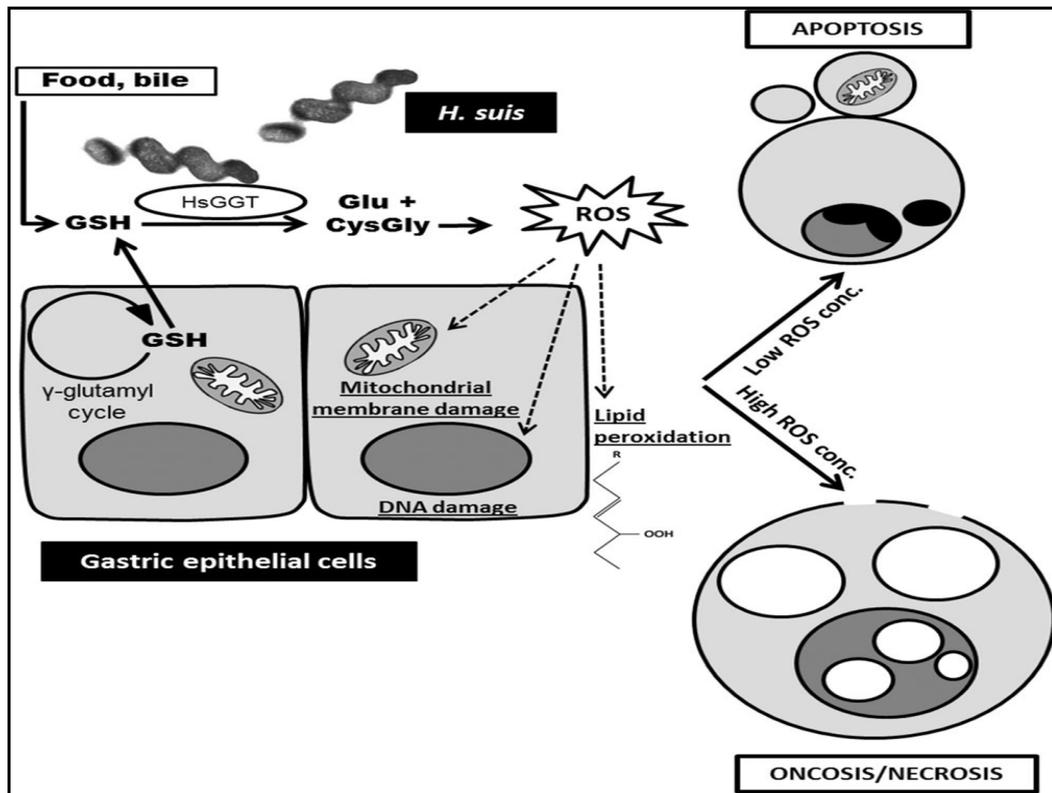


Figura 10: Modello del meccanismo di azione della GGT di *Helicobacter suis* sulle cellule gastriche. La reazione di degradazione del glutatione catalizzata da questo enzima determina la produzione di ROS nell'ambiente extracellulare con conseguente induzione di diversi danni cellulari. La morte avviene per apoptosi o necrosi, a seconda delle quantità di ROS prodotte (da: Flahou et al., 2011).

E' stato dimostrato che gli effetti della GGT di *H. pylori* non si limitano alle cellule della mucosa gastrica, ma questo enzima è anche capace di modulare la risposta immunitaria mediata dalle cellule T, contribuendo alla capacità di questo batterio di evadere le risposte di difesa del proprio ospite. Innanzitutto la GGT induce arresto del ciclo cellulare nella fase G1 e sopprime la proliferazione delle cellule T, mediante alterazione della via di segnalazione del segnale di Ras. (Schmees et al., 2007). E' stato inoltre riportato che la GGT di *H. pylori* regola positivamente nei linfociti l'espressione del micro-RNA miR-155 e della proteina Foxp3, uno dei principali fattori regolatori delle cellule T, attraverso una via dipendente da AMP ciclico (Fassi Fehri et al., 2010).

La GGT di *H. pylori* può alterare l'attività delle cellule T anche in maniera indiretta, riprogrammando le cellule dendritiche in modo da renderle

immuno-tolleranti e capaci di promuovere il differenziamento delle cellule T “naive” in cellule T regolative piuttosto che in cellule T effettrici (Oertli et al., 2013).

Per poter spiegare le proprie funzioni immunosoppressive, la GGT batterica potrebbe attraversare gli strati epiteliali della mucosa gastrica e raggiungere i linfociti risiedenti nella lamina propria. La GGT di *H. suis* è stata infatti trovata associata a piccole vescicole del diametro di 20-200 nm che si formano per gemmazione dalla superficie del batterio. Queste vescicole potrebbero essere proprio utilizzate per trasportare l’enzima a distanza (Zhang et al., 2013).

1.7 Le GGT di *Drosophila melanogaster*

Nel genoma di *Drosophila melanogaster* sono stati identificati quattro geni (CG6461, CG17636, CG1492, CG4829) codificanti per putative γ -glutammil transpeptidasi, ma le poche informazioni disponibili in letteratura riguardano solo il primo di essi, indicato anche come *GGT1*. Il pro-enzima sintetizzato da questo gene ha un peso molecolare predetto di 62kDa ed è provvisto di un peptide segnale all’estremità N-terminale che viene scisso, a livello del legame Gly30-Leu31, per generare una γ -glutammil transpeptidasi solubile secreta nell’ambiente extracellulare, così come dimostrato dalla identificazione di sequenze peptidiche ad essa corrispondenti in un’analisi proteomica del fluido seminale prodotto dalle ghiandole accessorie del maschio (Figura 11) (Walker et al., 2006).

```

Human GGT : --MARGYGATVSLVLLGLGDAVAVVAVVLSRHQAPCGPQA-FAHAAVAADSKVSDIGRAITLQQQGSFVDAITLALVCTSVVNVQSMGLGGGV : 92
Dm GGT : MRIVNSKKL--LFWLLAANMWTAPTLGLVFGLNKRD-TLYIS---GAVVSNIGIGCAAVGGEMLDGSSAVDAATLTLCEGLLHSHMGIGGGF : 89
-----↑

Human GGT : IFTIYNVTGKVEVINARETVFASHAFSLDQCAQALPLGTGAQWIGVPGELRGYABAHRHRGRLPWAQLFQPTIALLRGGHVAVPVSRLIHS : 187
Dm GGT : VATIYTRSSKVEVVIARESAFAAHKDMFVGV---ETSIITGAKSGAVPGEILGYWEMHRRMGLPWKRLPEPSIKLAREGHVVSRYLAALIQSK : 180

Human GGT : ILRPSLQASTLRQLFNCTEPLRPO--DPLPWPALATLEETVATEGVEVFTG--RLGQMLVEDIAREGSOITLQDLAKFQPEVVDALVDP---LGD : 277
Dm GGT : LDN-IKADPGLSAVFLNAGDPHLEGGYMKRPAADLLEIRIAENGAKEFYDGETGRKFEVDIQRKGGIIEQDLRDYTVRWEEDGHVSAHVSCT : 274

Human GGT : YFLYSPFPAGSALLSFLNVIRGFNFSTESMARPEGRVNVHELVEITKFRGQRWRLGDPSSH---KIQNASRDLLGETLALQILTRQIIDGR : 368
Dm GGT : VFLYSTRSSKVEVVIARESAFAAHKDMFVGV---ETSIITGAKSGAVPGEILGYWEMHRRMGLPWKRLPEPSIKLAREGHVVSRYLAALIQSK : 361

Human GGT : GDHQLSHYSIAE-AWGHGTGTSHTVSLGSDGSAVAATSTINTPFCAMVYSPRTGIIILNNEILLDCERCPCWGSSTTSPVSGDRVGGAPGRCWPPV : 462
Dm GGT : STSEDIYRGNFTVEEDHGTAHNVLAINGDAVSTSTINNYFGSKVASTQTGIIILNDEMDDFSTPGVINGFVQASPVANVY----- : 445
↓
★

Human GGT : PCERSPSSMVPSILLINKAQGSKLVIGGAGGELTHSAVAQAIMSKMLWLPDLRAATAAP-ILFVNSKGVVEYEPNFSQEQRGLODRGQNTQRF : 556
Dm GGT : PCRRPMSMSPCLIVDQEGNVRLLVGAGGTTRITTSVAIVIMKLLRKESLAAVAVNGRLHEQLAPMRVSYEQEVDSSVTDYLRQVGHMVEEYV : 540

Human GGT : F--LNVVQAVSQEGACVYAVSILRKSCEAAGY----- : 586
Dm GGT : GSSFAAVTALGALE-QPEFFYRRRIGSALTAKTNKMQH : 579

```

Figura 11: Allineamento della proteina GGT1 (CG6461) di *Drosophila melanogaster* con la proteina GGT1 umana. La linea tratteggiata indica la sequenza del peptide segnale; la freccia nera mostra il sito di taglio del peptide segnale; la freccia bianca indica il sito di autoprocessamento; l'asterisco nero evidenzia la treonina catalitica; le sequenze sottolineate corrispondono ai peptidi triptici identificati nel fluido seminale mediante spettrometria di massa (da: Walker et al., 2006)

Dall'analisi dei dati ottenuti mediante sequenziamento dell'intero trascrittoma di *Drosophila* è emerso che il gene *GGT1* è abbondantemente espresso oltre che nelle ghiandole accessorie maschili anche negli ovari (Flybase.org/reports/FBgn0030932.html), suggerendo che la proteina GGT1 abbia un ruolo importante nel controllo dell'equilibrio *redox* nell'ambito della riproduzione, per il corretto sviluppo dei gameti e/o per la corretta funzione delle cellule germinali (Figura 12). La sua presenza nel fluido seminale è stata inoltre correlata ai livelli relativamente alti di acido glutammico libero misurati nelle secrezioni delle ghiandole accessorie maschili (Walker et al., 2006). Non sono stati però effettuati studi funzionali mirati a saggiare direttamente se e come l'attività della proteina GGT1 possa influenzare le risposte di *Drosophila* a condizioni di *stress* ossidativo.

| Linear, scaled to High expression | |
|---------------------------------------|------------------------|
| Tissue | Expression Level |
| imaginal disc, larvae L3 wandering | 3 |
| central nervous system, larvae L3 | 0 |
| central nervous system, pupae P8 | 1 |
| head, virgin 1-day female | 3 |
| head, virgin 4-day female | 4 |
| head, virgin 20-day female | 7 |
| head, mated 1-day female | 4 |
| head, mated 4-day female | 4 |
| head, mated 20-day female | 5 |
| head, mated 1-day male | 4 |
| head, mated 4-day male | 5 |
| head, mated 20-day male | 8 |
| salivary gland, larvae L3 wandering | 1 |
| salivary gland, white prepupae | 0 |
| digestive system, larvae L3 wandering | 35 |
| digestive system, 1-day adult | 22 |
| digestive system, 4-day adult | 21 |
| digestive system, 20-day adult | 27 |
| fat body, larvae L3 wandering | 6 |
| fat body, white prepupae | 1 |
| fat body, pupae P8 | 4 |
| carcass, larvae L3 wandering | 2 |
| carcass, 1-day adult | 7 |
| carcass, 4-day adult | 10 |
| carcass, 20-day adult | 13 |
| ovary, virgin 4-day female | (122) |
| ovary, mated 4-day female | 95 |
| testis, mated 4-day male | 25 |
| accessory gland, mated 4-day male | (199) |
| Expression Level Scale | Very low |
| | Low |
| | Moderate |
| | Moderately high |
| | High |
| | Very high |

Figura 12: Profilo di espressione della proteina GGT1 di *Drosophila melanogaster* (<http://flybase.org/reports/FBgn0030932.html>).

Infatti, l'unico studio funzionale condotto a tutt'oggi su questo gene riguarda il suo ruolo nella soppressione della risposta delle larve di *Drosophila* ad un particolare tipo di stimolo luminoso. Regolando la concentrazione di glutammato nel cervello, la proteina GGT1 agisce infatti indirettamente sui livelli del neurotrasmettitore GABA, sintetizzato a partire dal glutammato in una reazione catalizzata dall'enzima GAD (*acido glutammico decarbossilasi 1*) (Liu et al., 2014).

Infine, estrapolando i dati relativi alla proteina GGT1 da una dettagliata mappa di interazioni proteiche ottenuta mediante l'analisi sperimentale dell'intero proteoma di *Drosophila*, si ricava un quadro in cui la proteina GGT1 rappresenta il nodo centrale di un'ipotetica rete cui prendono parte altre 9 proteine (Figura 13).

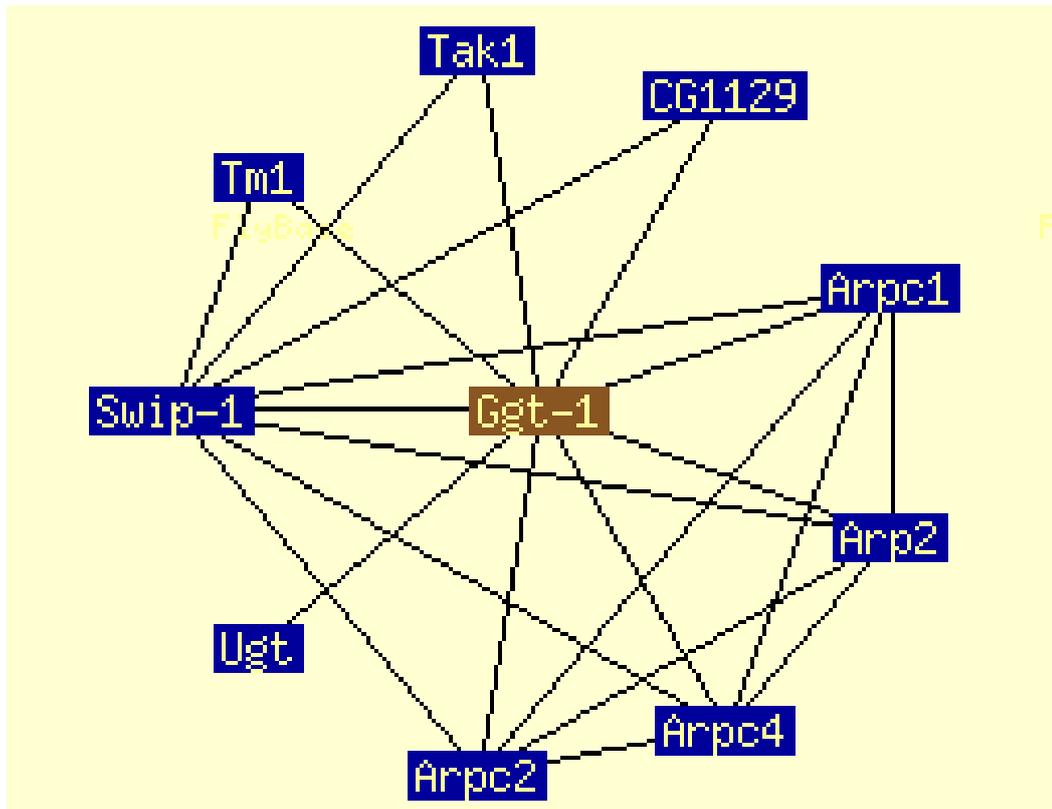


Figura 13: Potenziali interattori della proteina GGT1 di *Drosophila melanogaster* (<http://flybase.org/reports/FBgn0030932.html>).

Quattro di queste proteine, Arpc1, Arpc4, Arpc2 e Arp2, sono coinvolte nel rimodellamento del citoscheletro e mediano i processi di nucleazione dei filamenti di actina. La proteina Ugt è una UDP-glucosio-glicoproteina-glicosil trasferasi. Swip-1 è una proteina che lega il calcio, importante messaggero intracellulare che trasmette segnali di attivazione a numerosi componenti intracitoplasmatiche. Tm1 è una proteina che lega l'actina mentre Tak1 è una MAP-chinasi chinasi coinvolta in diverse vie di trasduzione del segnale. Infine, la proteina CG1129 è una mannosio-1-fosfato-guanililtrasferasi. Sebbene l'interazione con ciascuna di queste proteine debba ancora essere validata, è ragionevole ritenere che la proteina GGT1 di *Drosophila* possa svolgere diverse funzioni.

1.8 Insetti entomofagi: i Parassitoidi

Gli insetti entomofagi sono insetti nemici di altri insetti e possono appartenere alla categoria dei predatori o a quella dei parassitoidi. I primi, in genere caratterizzati da una spiccata motilità, cacciano la loro preda per ucciderla immediatamente e si alimentano di più prede nel corso della loro vita. I parassitoidi fanno invece un'unica vittima e questo si verifica in un arco temporale circoscritto, quello del loro sviluppo: diventati adulti, essi si nutrono infatti di sostanze vegetali.

La femmina adulta di una specie parassitoide depone una o più uova sulla superficie o all'interno del corpo di un'altra specie di insetto (soprattutto farfalle, afidi, api e vespe solitarie, insetti lignivori). Dopo la schiusa, le larve del parassitoide non uccidono il proprio ospite, ma lo divorano lentamente dall'esterno (ectoparassitoidi) o dall'interno e la morte sopraggiunge solo quando le larve del parassitoide sono pronte per impuparsi (endoparassitoidi). Dalla pupa emergerà quindi l'adulto, che conduce vita libera: le femmine deporranno le proprie uova su più individui della specie ospite, causandone indirettamente la morte. Risulta dunque evidente il ruolo fondamentale svolto dai parassitoidi nel controllo delle popolazioni di insetti nocivi all'agricoltura.

Specie parassitoidi esistono in diversi ordini di insetti (Ditteri, Coleotteri, Lepidotteri, Tricotteri, Neurotteri, Strepsitteri), ma sono specialmente diffuse nell'ordine degli Imenotteri (Pennacchio and Strand, 2006). Al loro interno, si può osservare una notevole diversificazione di stili di vita. Esistono infatti specie le cui larve si comportano come endofaghe nelle prime fasi di accrescimento, per divenire successivamente ectofaghe, e, per quanto meno comunemente, anche viceversa. L'endofagia può interessare solo il primo stadio larvale, ovvero estendersi fino alle soglie dell'ultima età quando la larva fuoriesce, passando così da una fase trofica plasmofaga ad una sarcofaga distruttiva, per completare lo sviluppo sull'ospite oramai soccombente (Godfray, 1994). Il rapporto che si instaura fra ospite e parassitoide può essere prolungato e particolarmente complesso dal punto di vista funzionale, ma si conclude inevitabilmente con la morte della specie vittima. Per questo motivo i parassitoidi possono essere considerati una sorta di predatori specializzati, la cui definizione di carnivoroidi si deve a Flanders nel 1973 (Minelli, 2002; Tobias, 2007).

In base alla strategia di predazione, gli imenotteri parassitoidi vengono divisi in idiobionti e coinobionti, a seconda se permettano o meno all'ospite di proseguire lo sviluppo o di metamorfosare dopo l'attacco. La strategia più primitiva è quella idiobionte. In particolare, gli idiobionti possono svilupparsi come ectoparassitoidi su ospiti allo stadio larvale, paralizzandoli al momento dell'ovideposizione, o come endoparassitoidi all'interno di uova e pupe (Pennacchio and Strand, 2006). L'ovideposizione da parte della femmina determina l'arresto dello sviluppo dell'ospite, il quale costituirà una risorsa nutrizionale per la larva del parassitoide in maturazione (Vinson, 1980). I coinobionti, al contrario, consentono l'accrescimento e lo sviluppo del proprio ospite, almeno per un certo lasso di tempo (Alphen et al., 1996). La maggioranza dei coinobionti si comporta da endoparassitoide su ospiti nello stadio larvale, ma non mancano casi di ectoparassitismo.

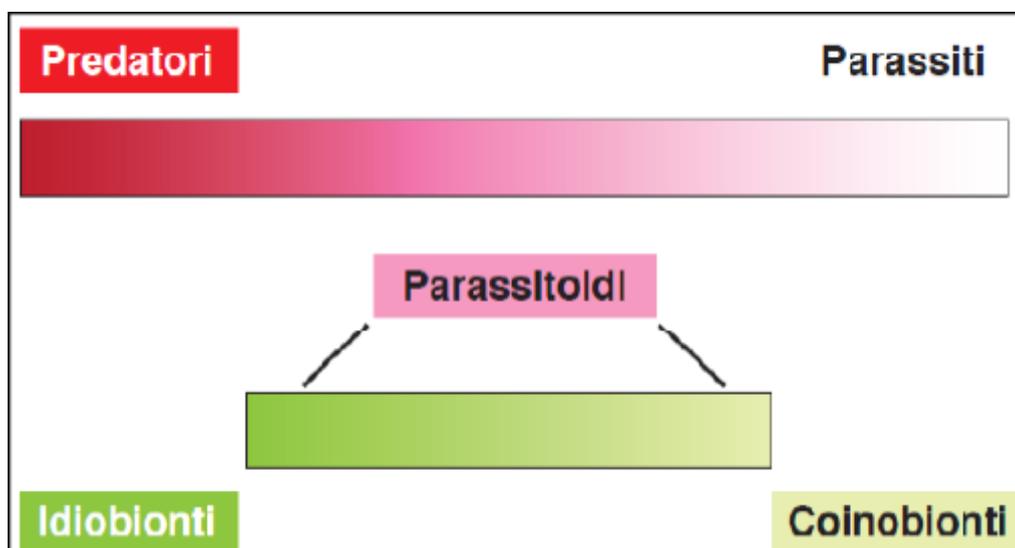


Figura 14: Zoofagia: predatori, parassiti e parassitoidi (da: Pennacchio and Mancini, 2012).

L'ovipositore, insieme alla complessa miscela di veleno e secrezioni ovariche che viene iniettata attraverso di esso, ha conferito agli imenotteri parassitoidi la capacità unica di modulare finemente l'ambiente destinato ad ospitare la propria progenie e rappresenta uno dei più importanti adattamenti morfologici da cui questi insetti sono caratterizzati (Quicke, 1997; Pennacchio and Strand, 2006).

Quando depone le uova, la femmina del parassitoide introduce infatti nel corpo della vittima anche una combinazione di molecole capaci di instaurare condizioni idonee per lo sviluppo del parassitoide. Queste molecole di origine materna (veleno e proteine ovariche), agiscono di concerto con fattori di origine embrionale o larvale (teratociti, secrezioni salivari), realizzando una serie di alterazioni biochimiche e fisiologiche che nel loro complesso costituiscono la cosiddetta “*regolazione dell’ospite*” (Vinson e Iwansch, 1980; Asgari, 2011).

Il veleno degli insetti parassitoidi è una miscela di componenti proteici e non. Nonostante vari studi mirati a definire il profilo proteico del veleno di diverse specie di ectoparassitoidi ed endoparassitoidi abbiano identificato alcune proteine conservate, si può dire che, in generale, le funzioni del veleno siano diverse nei due gruppi di parassitoidi (Moreau and Asgari, 2015). I componenti del veleno degli ectoparassitoidi sono infatti coinvolti soprattutto nella paralisi dell’ospite, mentre i componenti del veleno degli endoparassitoidi servono a facilitare la parassitizzazione, interferendo con il sistema immunitario e lo sviluppo dell’ospite, anche coadiuvando l’azione di alcuni virus simbiotici immunosoppressivi iniettati assieme all’uovo (Stoltz et al., 1988; Kaeslin et al., 2010). Ad ogni modo, il numero di proteine del veleno identificate a tutt’oggi è davvero esiguo in confronto all’enorme diversità di specie di parassitoidi esistenti in natura (Tabella 1).

| Biological Functions | Wasp | Parasitism | Host |
|-----------------------------------|------------------------------|-------------------|--------------------------------|
| <i>Paralysis</i> | | | |
| pimplin | <i>Pimpla hypochondriaca</i> | Endo | <i>Lacanobia oleracea</i> |
| philanthotoxins | <i>Philanthus triangulum</i> | Ecto | <i>Schistocerca gregaria</i> |
| Brh-I & -II | <i>Bracon hebetor</i> | Ecto | <i>Diaprepes abbreviatus</i> |
| GABA, β -alanine, taurine | <i>Ampulex compressa</i> | Ecto | <i>Periplaneta americana</i> |
| <i>Hemocyte inactivation</i> | | | |
| VPr1 | <i>Pimpla hypochondriaca</i> | Endo | <i>L. oleracea</i> |
| VPr3 | <i>Pimpla hypochondriaca</i> | Endo | <i>L. oleracea</i> |
| Vn.11 | <i>Pteromalus puparum</i> | Endo | <i>Pieris rapae</i> |
| VP P4, RhoGAP | <i>Leptopilina bouleardi</i> | Endo | <i>Drosophila melanogaster</i> |
| calreticulin | <i>Cotesia rubecula</i> | Endo | <i>P. rapae</i> |
| | <i>Pteromalus puparum</i> | Endo | <i>P. rapae</i> |
| SERCA * | <i>Ganaspis sp.1</i> | Endo | <i>D. melanogaster</i> |
| <i>Inhibition of melanization</i> | | | |
| LbSPNy | <i>Leptopilina bouleardi</i> | Endo | <i>D. melanogaster</i> |
| Vn50 | <i>Cotesia rubecula</i> | Endo | <i>P. rapae</i> |
| <i>Interrupting development</i> | | | |
| Reprolysin | <i>Eulophus pennicornis</i> | Ecto | <i>L. oleracea</i> |
| <i>Enhancing PDVs</i> | | | |
| Vn1.5 | <i>Cotesia rubecula</i> | Endo | <i>P. rapae</i> |
| <i>Castration</i> | | | |
| γ -glutamyl transpeptidase | <i>Aphidius ervi</i> | Endo | <i>Acyrtosiphon pisum</i> |
| <i>Anti-microbial</i> | | | |
| PP13, PP102, PP113 | <i>Pteromalus puparum</i> | Endo | <i>P. rapae</i> |

Tabella 1: Proteine del veleno identificate nelle diverse specie di parassitoidi presenti in natura.

1.9 Il sistema ospite-parassitoide *Aphidius ervi* - *Acyrtosiphon pisum*

Aphidius ervi (Hymenoptera: Aphidiinae) è un endoparassitoide coinobionte polifago di afidi, appartenente alla famiglia dei Braconidi. E' una specie di origine Palearctica in grado di adattarsi a differenti condizioni climatiche, dall'Europa continentale ad ambienti costieri e desertici (González et al., 1978).

Nello stadio adulto *Aphidius ervi* misura 4-5 mm ed ha un corpo nerastro con le antenne lunghe tipiche della famiglia cui appartiene. Le femmine sono dotate di una elevata capacità di ricerca dei siti d'insediamento degli afidi, nei quali depongono le uova con rapidi movimenti dell'addome. L'afide così parassitizzato viene lentamente divorato dall'interno per infine rigonfiarsi assumendo il caratteristico aspetto di "mummia" di colore bruno (Gonzalez et al., 1978; Pennacchio et al., 1990).



Figura 15: Parassitizzazione di *A. pisum* da parte del parassitoide coinobionte *A. ervi*.

In agricoltura, il parassitoide *Aphidius ervi* viene utilizzato per il controllo biologico di *Acyrtosiphon pisum*, l'afide verde del pisello per il quale mostra una spiccata preferenza di attacco (Libbrecht et al., 2007).

Acyrtosiphon pisum è un insetto fitofago, di colore verde più o meno scuro, in grado di danneggiare piante di pisello. E' un grosso afide, con forme alate e attere di dimensioni piuttosto contenute, sempre però visibili ad occhio nudo (5-7 mm allo stadio adulto), ha un esoscheletro molle e vive in colonie numerose. Nei climi più freddi presenta un olociclo (ciclo completo) che si svolge a carico di un solo ospite (monoico). Il ciclo riproduttivo contempla una fase sessuale che darà luogo all'uovo d'inverno e a diverse generazioni partenogenetiche. Il ciclo può essere facilmente completato sulla pianta ospite in condizioni di laboratorio, caratteristica che ha contribuito a rendere questo tipo di afide un'ottima specie modello (Gonzalez et al., 1978).

L'interazione *Aphidius ervi* - *Acyrtosiphon pisum* rappresenta uno dei sistemi ospite-parassitoide più studiati. Su questo sistema modello sono state infatti condotte diverse ricerche di respiro ecologico (Sequeira and Mackauer, 1992), comportamentale (Guerrieri et al., 1993, 1997; Battaglia et al., 2000; He and Wang, 2006) e fisiologico (Pennacchio et al., 1995; Tremblay et al., 1998; Digilio et al., 2000; Giordana et al., 2003; Caccia et al., 2012).

1.9.1 Regolazione dell'ospite da parte di *Aphidius ervi*

Aphidius ervi regola lo sviluppo e il metabolismo del suo ospite e, probabilmente, ne elude o sopprime la risposta immunitaria. In questo parassitoide, la principale fonte di fattori di regolazione di origine materna è rappresentata dal veleno, che ha un impatto negativo sull'attività riproduttiva degli afidi parassitizzati (Tremblay et al., 1998; Digilio et al., 2000). Tra i fattori di regolazione di origine embrionale e larvale, i più importanti sono invece i teratociti (Beckage and Gelman, 2004). Si tratta di cellule, derivanti dalla dissociazione delle membrane extraembrionali in seguito alla schiusa dell'uovo del parassitoide, che presentano una funzione secretoria, in quanto rilasciano nell'emolinfa dell'ospite proteine di importanza nutrizionale e regolativa (Falabella et al., 2000; Beckage and Gelman, 2004; Falabella et al., 2005; Falabella et al., 2009; Caccia et al., 2012;).

Una volta introdotto nella vittima, il veleno di *Aphidius ervi* va ad agire in maniera specifica sulle cellule dei germari, parti apicali degli ovaroli dell'ospite, innescando un processo di morte cellulare che danneggia irreversibilmente l'apparato riproduttivo dell'afide parassitizzato (Polaszek, 1986), senza causare alterazioni rilevabili in altri distretti tissutali (Digilio et al., 2000). Questo processo spiegherebbe la ridotta, e in alcuni casi l'assenza, di attività riproduttiva negli ospiti parassitizzati durante i vari stadi di sviluppo (He et al., 2005).

E' stato osservato che, mentre la differenziazione degli oociti dell'afide risulta bloccata, continua la produzione di amminoacidi da parte dei batteri simbiotici; questi amminoacidi si accumulano nell'emolinfa e verranno utilizzati dai teratociti per la produzione di proteine, necessarie per lo sviluppo del parassitoide (Tremblay et al., 1998; Pennacchio et al., 1999; Falabella et al., 2000).

Nell'emolinfa del primo stadio di neanide di ospiti parassitizzati, oltre alle alterazioni dei tessuti riproduttivi è stata osservata una ridotta concentrazione di ecdisteroidi. Una delle principali cause di questo fenomeno è la degenerazione delle ghiandole protoraciche, deputate alla produzione di ecdisone (Pennacchio et al., 1995). L'ipotesi corrente sarebbe che la strategia della "castrazione" messa in atto dal parassitoide determinerebbe un ri-direzionamento del flusso di nutrienti a suo vantaggio sottraendolo, così, al naturale impiego nel ciclo vitale dell'afide. Tale speculazione sarebbe confermata dall'aumento del titolo di proteine, amminoacidi e acilgliceroli nell'emolinfa dell'ospite nelle fasi finali dello sviluppo della larva del parassitoide (Pennacchio et al., 1995; Falabella et al., 2007).

La prima componente del veleno identificata in *A. ervi* è stata una γ -glutammina transpeptidasi, chiamata *AeGGT1* (vedi paragrafo successivo) (Falabella et al., 2007). Più recentemente, il veleno di questo parassitoide è stato analizzato utilizzando un approccio combinato di trascrittomica e di proteomica, consentendo l'acquisizione di informazioni molto dettagliate sulle proteine in esso contenute (Colinet et al., 2014).

Lo studio trascrittomico è stato eseguito su di un ceppo di *A. ervi* francese ed uno italiano, utilizzando delle librerie di cDNA dell'apparato velenifero (ghiandole e serbatoi associati). L'analisi combinata dei dati corrispondenti ai due diversi ceppi

ha dimostrato che le principali proteine del veleno di *A. ervi* sono condivise da diverse popolazioni di parassitoidi. A 12 delle 16 sequenze identificate è stata attribuita una funzione putativa. Le proteine più abbondanti sono risultate essere: tre GGT, una SPH (*Serine protease homologue*), una LRR (*Leucine-rich repeat domain-containing protein*), una serpina (*serine protease inhibitor*), e una endoplasmina. Le due proteine meno abbondanti sono state identificate con un fattore di elongazione e una proteina NEP-like (*Nepriylisin-like*) (Colinet et al., 2014).

Per quanto riguarda le tre GGT, una corrisponde alla proteina *AeGGT1* già identificata in precedenza (Falabella et al., 2007). Una seconda GGT, che chiamerò *AeGGT2*, è risultata espressa in misura maggiore nelle ghiandole del veleno del ceppo francese rispetto alla *AeGGT1*, mentre nel ceppo italiano accade esattamente il contrario. Ciò ha suggerito che *AeGGT1* e *AeGGT2* possano essere in realtà due forme alleliche dello stesso gene, la cui frequenza potrebbe variare tra le popolazioni di *Aphidius ervi*. In alternativa, si tratterebbe di due geni distinti, differenzialmente espressi nel ceppo francese e in quello italiano (Colinet et al., 2014). Per quanto riguarda la terza GGT, che chiamerò *AeGGT3*, gli autori hanno suggerito che potrebbe trattarsi di una proteina non funzionale, in quanto presenta due mutazioni che causano forte diminuzione di attività nel caso della GGT umana (Colinet et al., 2014).

In definitiva, questo studio ha confermato che le proteine *AeGGT* sono in assoluto le componenti più abbondanti del veleno di *A. ervi*, sostenendo quindi l'idea che esse svolgano un ruolo chiave nel successo del parassitismo. (Colinet et al., 2014).

1.9.2 *AeGGT1*, una forma specializzata di γ -glutammil transpeptidasi di *A. ervi*

La proteina *AeGGT1* è stata identificata nell'ambito di uno studio volto a definire le basi molecolari delle interazioni ospite-parassitoide nel sistema modello *A. pisum* - *A. ervi*, (Falabella et al., 2007). In risposta al parassitismo da parte di *A. ervi*, le cellule del germario degli ovaroli di *A. pisum* mostrano chiari segni di degenerazione: lo stesso effetto è stato osservato quando il veleno estratto dal parassitoide o alcune delle sue frazioni cromatografiche, sono state iniettate

nell'afide non-parassitizzato, dimostrando anche che tale effetto è dovuto ad apoptosi. Le frazioni utilizzate in questi esperimenti contenevano essenzialmente le due proteine più abbondanti del veleno, rispettivamente di 18 (p18) e di 36 kDa (p36). Entrambe le componenti bioattive sono state interamente sequenziate e nel confronto con le sequenze di una libreria di cDNA delle ghiandole del veleno è stato identificato il trascritto corrispondente, derivante da un gene costituito da sei esoni e cinque introni, espresso nelle femmine di *A. ervi* a livelli più elevati rispetto ai maschi. Tale gene codifica per una proteina di 541 amminoacidi con un peso molecolare pari a 56,9 kDa che contiene le sequenze amminoacidiche determinate sperimentalmente sia per p18 che per p36 ed ha significativa identità di sequenza con le γ -glutamminil transpeptidasi. L'espressione del cDNA in cellule di insetto ha prodotto l'eterodimero atteso, dimostrando che anche la proteina *Ae*-GGT1 viene generata mediante autoprocessamento di una molecola precursore e che, a differenza di altre GGT, questa proteina è secreta nell'ambiente extracellulare (Falabella et al., 2007).

E' stato ipotizzato che la proteina *Ae*GGT1 induca apoptosi negli ovaroli dell'ospite esponendo le cellule a *stress* ossidativo attraverso l'alterazione del metabolismo del GSH (Falabella et al., 2007). Tuttavia, resta ancora da dimostrare se e come ciò accada. Ad oggi non sono infatti ancora noti i meccanismi molecolari che sono alla base dei processi apoptotici scatenati dalla proteina *Ae*-GGT1, perché il bergaglio sia proprio l'apparato riproduttivo, né tantomeno se l'enzima, una volta nell'ospite, sia in grado di agire in forma solubile oppure debba associarsi alla membrana delle cellule dell'ovario dell'afide (ad esempio attraverso il legame con un recettore) per svolgere le sue funzioni. Lo scopo del mio lavoro sperimentale è stato dunque quello di cercare di chiarire il meccanismo di azione di questa proteina utilizzando la *Drosophila melanogaster* come sistema di espressione eterologo.

2. Materiali e Metodi

2.1 Terreno di coltura per l'allevamento di *Drosophila melanogaster*

I ceppi di *Drosophila melanogaster* sono stati allevati su un terreno a base di farina di mais, zucchero e lievito. Il terreno è stato preparato sciogliendo 200 g di zucchero e 200 g di lievito in 2,2 litri di acqua, a cui sono stati aggiunti, a freddo, 40 ml di nipagina al 10%, un antimicotico precedentemente sciolto in alcool etilico 100%, e lasciato cuocere per 10 minuti. Sono quindi stati aggiunti 150 g di farina di mais e 8 g di agar e lasciato bollire per altri 20 minuti a fuoco moderato. Il terreno è stato poi versato in appositi barattoli cilindrici e lasciato raffreddare e asciugare all'aria. Infine i barattoli sono stati tappati con del cotone idrofobo da batteriologia (Figura 1).



Figura 1: Contenitori per il mantenimento in laboratorio di *Drosophila melanogaster*.

2.2 Mantenimento dei ceppi di *Drosophila melanogaster*

I ceppi sono stati mantenuti, in celle termoregolate, ad una temperatura di 25°C e con un ciclo luce/buio di 12 ore. Tali ceppi sono stati trasferiti su terreno fresco ogni 10-20 giorni. Il trasferimento è stato operato previa analisi al microscopio del fenotipo dei moscerini per accertarsi che nessun individuo con caratteristiche differenti da quelle corrispondenti al ceppo in esame fosse presente nel barattolo. Una trentina di individui di ciascun sesso sono stati quindi selezionati e trasferiti

in un nuovo barattolo. Il numero di individui da trasferire non è fisso, ma dipende dal genotipo dei moscerini e un numero maggiore può essere richiesto se essi sono caratterizzati da bassa fertilità. Per il trasferimento e l'osservazione dei ceppi allo stereomicroscopio, i moscerini sono anestetizzati con CO₂.

2.3 Ceppi di *Drosophila melanogaster*

- *60000 w^[1118]*: ceppo appartenente alla collezione VDRC - Vienna *Drosophila RNAi Center*. E' stato utilizzato come ceppo di riferimento in esperimenti di silenziamento genico in cui mi sono servita della linea transgenica *18545/GD GGTRNAi* di questa collezione, con cui condivide lo stesso *background* genetico.
- *18545/GD GGTRNAi*: ceppo appartenente alla collezione VDRC - Vienna *Drosophila RNAi Center*. Esso contiene un transgene che produce, sotto il controllo di una sequenza *UAS*, un dsRNA diretto contro il gene *DmGGT1* di *Drosophila*.
- *y, w; attP40*: ceppo contenente, sul secondo cromosoma, in posizione 25C7, la sequenza attP. E' stato utilizzato per la creazione dei trasformanti *AeGGT1-V5His* e *AeGGT1-MLGPI*.
- *(D27)AeGGT1-V5His*: linea omozigote per il transgene *AeGGT1-V5HIS*.
- *(A9)AeGGT1-MLGPI*: linea omozigote per il transgene *AeGGT1-MLGPI*.
- *C^w (D27)*: ceppo controllo per il ceppo trasformante *(D27)AeGGT1-V5HIS*, avente il medesimo *background* genetico del ceppo trasformante a meno del transgene.
- *C^w (A9)*: ceppo controllo per il ceppo trasformante *(A9)AeGGT1-MLGPI*, avente il medesimo *background* genetico del ceppo trasformante a meno del transgene .

Tutti gli altri ceppi utilizzati nel mio progetto di dottorato sono stati reperiti al “*Bloomington Drosophila Stock Center*”:

- *linea driver 4442 nos-Gal4: y[1] w[*]; P{w[+mC]=GAL4-nos.NGT}40*

Ceppo nel quale la sequenza *Gal4* è controllata da un promotore che determina l'espressione nella linea germinale.

- *linea driver w, TF⁺/CyO Bam Gal4*: ceppo nel quale la sequenza *Gal4* è controllata da un promotore che determina l'espressione nella linea germinale.
- *linea 31777 triple maternal driver: P{otu-GAL4::VP16.R}1 , w**; *P{GAL4-nos.NGT}40 ; P{GAL4::VP16-nos.UTR}CG6325MVD1*

Il ceppo contiene l'inserzione di tre diversi costrutti che insieme forniscono una forte espressione della proteina Gal4 nella linea germinale durante tutti gli stadi dell'ovogenesi.

- *linea driver 5138 tub-Gal4: y[1] w[*]*; *P{w[+mC]=tubP-GAL4}LL7/TM3, Sb[1] Ser[1]*

Ceppo nel quale la sequenza *Gal4* è controllata dal promotore tubulina, ed è quindi espressa ubiquitariamente in tutte le cellule dell'organismo.

- *linea driver da-Gal4: w[*]*; *P{w[+mW.hs]=GAL4-da.G32}UHI*

Ceppo nel quale la sequenza *Gal4* è controllata da un promotore che determina l'espressione ubiquitaria in tutti gli stadi di sviluppo e in tutti i tessuti.

- *linea driver 3733: P{w[+mW.hs]=GawB}Nup205[179Y], w[1118]*
- Ceppo nel quale la sequenza *Gal4* è controllata da un promotore che determina l'espressione nelle cellule follicolari.
- *linea driver 5076: P{w[+mW.hs]=GawB}T155*

Ceppo nel quale la sequenza *Gal4* è controllata da un promotore che determina l'espressione nelle cellule follicolari a partire dallo stadio 9.

- *linea driver 3751: w[1118]*; *P{w[+mW.hs]=GawB}c204/TM3, Ser[1]*

Ceppo nel quale la sequenza *Gal4* è controllata da un promotore che determina l'espressione nelle cellule follicolari dallo stadio 8 allo stadio 14.

2.4 Ceppi batterici

In questo lavoro di tesi sono state utilizzate colture batteriche *E. coli* dei ceppi:

- JM109 Genotipo: endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (rk⁻, mk⁺), relA1, supE44, Δ(lac-proAB), [F' traD36, proAB, laqIqZΔM15].

- TOP10 Genotipo: F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (araleu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG

Le colture batteriche sono state fatte crescere a 37°C in agitazione in terreno liquido Luria Bertani (NaCl 1% (p/v) (Sigma), Bacto-Peptone 1% (p/v) (Merck), Bacto-Yeast extract 0,5% (p/v) (Becton-Dickinson), oppure a 37°C in terreno solido Luria Bertani contenente Bacto-agar 1,5% (p/v) (Becton-Dickinson). In base alle necessità, il terreno di crescita è stato addizionato di ampicillina (Sigma) alla concentrazione finale di 100 µg/ml.

2.5 Plasmidi

I plasmidi utilizzati in questo lavoro di tesi sono stati i seguenti:

- ***pCR II-TOPO***: Il plasmide, lungo 4.0Kb, permette il clonaggio *one-step* di frammenti di PCR ottenuti mediante l'utilizzo della Taq polimerasi. Questo enzima è dotato di attività 3' transferasica, aggiunge, cioè, delle singole adenine all'estremità 3' dei frammenti sintetizzati. Queste vengono sfruttate per il clonaggio, in quanto si appaiano alle timine presenti alle estremità terminali del vettore linearizzato, prodotto dalla Invitrogen. L'attività ligasica tra inserto e vettore è garantita dalla *Topoisomerasi I*, legata covalentemente al vettore. Il plasmide contiene un'origine di replicazione fagica, fl ori, ed una batterica, pUC ori ed i geni per la resistenza all'ampicillina e alla kanamicina per la selezione dei cloni batterici trasformati.

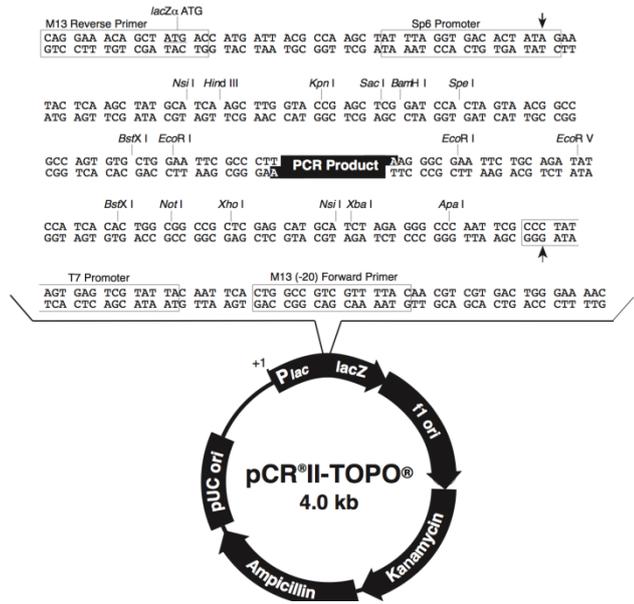


Figura 2: Rappresentazione grafica del vettore *pCR II-TOPO*.

- *pBluescript II KS+*: Il plasmide, lungo 3.0Kb, contiene un'origine di replicazione fagica, f1 ori, ed una batterica, pUC ori, una regione *polylinker* con siti di riconoscimento per diversi enzimi di restrizione ed il gene per la resistenza all'ampicillina per la selezione dei cloni batterici trasformati.

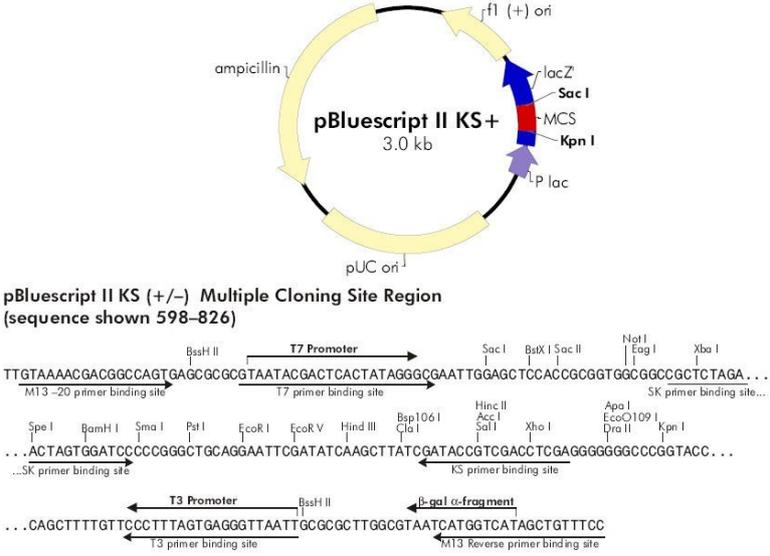


Figura 3: Rappresentazione grafica del plasmide *pBluescript II KS+*.

- ***pUASPattB***: Vettore di trasformazione di *Drosophila melanogaster*, lungo 10.314bp. Esso contiene un sito *attB* che permette l'integrazione del costrutto in esso clonato nel genoma di moscerini contenenti un sito *attP*, utilizzato per la ricombinazione sito-specifica mediata dalla ricombinasi phiC31; l'allele selvatico del gene *white* (*w+*) che funge da marcatore fenotipico, conferendo una colorazione rossa agli occhi di individui transgenici, in un *background* mutato per questo gene; la sequenza *UAS* che permette la regolazione dell'espressione del transgene inserito mediante l'utilizzo del sistema binario Gal4-UAS.

2.6 Strategie di clonaggio

Al fine di ottenere i plasmidi *AeGGT1-V5His-pUASPattB* e *AeGGT1-MLGPI-pUASPattB*, con cui sono stati generati i moscerini transgenici, sono stati effettuati successivi passaggi di sottoclonaggio, utilizzando come vettore il plasmide *pBlueScript II KS+*.

Costruzione del gene di fusione *AeGGT1-V5His*

- **Clonaggio del frammento *V5His* nel vettore *pBlueScript II KS+*:**

Per ottenere il plasmide *V5His-pBlueScript II KS+*, il frammento *V5-His*, amplificato e fosforilato (vedi paragrafo Polymerase Chain Reaction), è stato clonato nel vettore *pBlueScript II KS+* digerito con l'enzima di restrizione *SmaI* e defosforilato.

- **Clonaggio del frammento *AeGGT1-V5His* in *pBlueScript II KS+*:**

Per ottenere il plasmide *AeGGT1-V5His-pBlueScript II KS+*, un plasmide contenente il cDNA del gene *AeGGT1* inserito in *pcR II-TOPO* è stato digerito con gli enzimi di restrizione *BamHI* e *NotI* e il frammento ottenuto, lungo 1.6Kb e corrispondente all'intera sequenza codificante per la proteina *AeGGT1*, è stato clonato nel plasmide, *V5His-pBlueScript II KS+* digerito con gli stessi enzimi di restrizione. Ciò ha consentito di ottenere la fusione *in frame* dell'intera sequenza codificante per la proteina *AeGGT1* di *Aphidius ervi* con la sequenza codificante per un epitopo *V5* ed un *tag* di poli-istidine.

- **Clonaggio del frammento *AeGGT1-V5His* nel vettore *pUASPattB*:**

L'intero frammento *AeGGT1-V5His*, lungo 1.76Kb, è stato escisso dal plasmide *AeGGT1-V5His-pBlueScript II KS+* mediante digestione con l'enzima di restrizione *XbaI* e clonato nel vettore *pUASPattB* anch'esso digerito con l'enzima di restrizione *XbaI* e defosforilato.

Costruzione del gene di fusione *AeGGT1-MLGPI*

- **Clonaggio del frammento *MLGPI* nel vettore *pBlueScript II KS+*:**

Per ottenere il plasmide *MLGPI-pBlueScript II KS+*, il frammento *MLGPI* amplificato e fosforilato (vedi paragrafo Polymerase Chain Reaction), è stato clonato nel vettore *pBlueScript II KS+* digerito con l'enzima di restrizione *SmaI* e defosforilato.

- **Clonaggio del frammento *AeGGT1-MLGPI* in *pBlueScript II KS+*:**

Per ottenere il plasmide *AeGGT1-MLGPI-pBlueScript II KS+*, un plasmide contenente il cDNA del gene *AeGGT1* inserito in *pcR II-TOPO* è stato digerito con gli enzimi di restrizione *BamHI* e *NotI* e il frammento ottenuto, lungo 1.6Kb e corrispondente all'intera sequenza codificante per la proteina *AeGGT1*, è stato clonato nel plasmide *MLGPI-pBlueScript II KS+* digerito con gli stessi enzimi di restrizione. Ciò ha consentito di ottenere la fusione *in frame* dell'intera sequenza codificante per la proteina *AeGGT1* di *Aphidius ervi* con la sequenza codificante per un *linker (ML)* contenente un epitopo c-myc e una sequenza segnale per l'aggiunta di una *GPI anchor*.

- **Clonaggio del frammento *AeGGT1-MLGPI* nel vettore *pUASPattB*:**

L'intero frammento *AeGGT1-MLGPI*, lungo 1.77Kb, è stato escisso dal plasmide *AeGGT1-MLGPI-pBlueScript II KS+* mediante digestione con l'enzima di restrizione *XbaI* e clonato nel vettore *pUASPattB* anch'esso digerito con l'enzima di restrizione *XbaI* e defosforilato.

Al termine della preparazione, ciascun costruito chimerico è stato inviato al servizio di sequenziamento del DNA della Primm di Milano che ha fornito i file con cromatogramma e sequenza in formato abi, leggibili con il software *Chromas*,

la cui analisi ha permesso di verificare che i frammenti, rispettivamente *V5His* e *MLGPI*, fossero di fatto *in frame* con la sequenza *AeGGT1*. E' stato inoltre verificato che l'intera sequenza del gene di fusione si fosse inserita all'interno del vettore di trasformazione nel corretto orientamento.

2.7 Digestione di DNA mediante enzimi di restrizione

Le reazioni di digestione del DNA con enzimi di restrizione sono state condotte utilizzando gli opportuni enzimi, prodotti della casa Biolabs New England, nei rispettivi tamponi di reazione. Le miscele di reazione sono state incubate alla temperatura ottimale dell'enzima, in genere a 37°C, per il tempo richiesto dalla quantità di acido nucleico da digerire e dalla quantità di enzima utilizzato. Al termine della digestione, i campioni sono stati analizzati mediante migrazione elettroforetica in gel di agarosio in presenza degli opportuni marcatori di peso molecolare noto, quali SharpMassTM 1 e/o SharpMassTM100 - DNA ladder della Euroclone.

2.8 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Per l'amplificazione dei frammenti di DNA di interesse è stata utilizzata la tecnica di amplificazione a catena della polimerasi (PCR). In genere sono stati effettuati 25-35 cicli di amplificazione in termociclatore (Mastercycler, Eppendorf). L'enzima utilizzato è la polimerasi *Pfu* che ha una alta fedeltà di sintesi, grazie alla sua attività di *proof-reading* (3'-5' esonucleasi).

Le reazioni di PCR sono state allestite utilizzando come stampo plasmidi o prodotti di retro-trascrizione. Tali DNA sono stati miscelati ai componenti di reazione riportati qui di seguito, alle indicate concentrazioni finali:

Oligonucleotidi di innesco 0,4 µM ciascuno

dNTP 200 µM ciascuno

MgCl₂ 2 mM

Tampone di reazione PCR 1X

Pfu DNA Polimerasi 0.05 U/µl

- **Reazioni PCR per la produzione dei frammenti *V5His* e *MLGPI*:**

Queste reazioni di PCR sono state condotte allo scopo di produrre frammenti di DNA codificanti per epitopi riconoscibili da anticorpi specifici e, nel caso del frammento *MLGPI*, anche una sequenza segnale per l'aggiunta di un'ancora GPI. Tali frammenti sono stati successivamente fusi all'estremità 3' della sequenza del cDNA *AeGGT1* di *Aphidius ervi*, per dare luogo a due distinte forme ricombinanti del gene *AeGGT1* (vedi paragrafo strategie di clonaggio).

La sequenza codificante per un epitopo V5 ed un *tag* di poli-istidine, presente nel vettore pcDNA3.1, è stata amplificata mediante l'utilizzo dei seguenti oligonucleotidi:

Oligo *V5His forw*: CGC**GGATCC**AATGGTAAGCCTATCCCT

In rosso è indicato il sito di taglio dell'enzima di restrizione BamHI, corrispondente al penultimo e terz'ultimo codone della sequenza *AeGGT1*.

In verde è indicato l'ultimo codone della sequenza *AeGGT1*.

In azzurro sono indicate le basi codificanti per i primi 5 amminoacidi del *tag* V5.

Oligo *V5His rev*: GG**GGTACCTCTAGAACAGTCGAGGCTGAT**

In rosso è indicato il sito di taglio dell'enzima di restrizione KpnI.

In verde è indicato il sito di riconoscimento dell'enzima di restrizione XbaI.

In azzurro sono indicate le basi corrispondenti ad una sequenza del plasmide *pcDNA 3.1/V5His* situata al 3' della sequenza codificante per il *tag* His.

La reazione di PCR è stata allestita in un volume finale di 25µl.

Il profilo termico della reazione di PCR è stato il seguente:

- | | |
|---------|------------|
| 1) 95°C | 5 minuti |
| 2) 94°C | 30 secondi |
| 3) 58°C | 30 secondi |
| 4) 72°C | 30 secondi |
| 5) 94°C | 30 secondi |
| 6) 80°C | 30 secondi |
| 7) 72°C | 30 secondi |

- | | |
|---------|-----------|
| 8) 72°C | 10 minuti |
| 9) 8°C | end |

I punti dal 2 al 4 sono stati ripetuti 5 volte, quelli dal 5 al 7, 25 volte. Il prodotto di reazione è stato un frammento di DNA di 127 bp.

Allo stesso modo, la sequenza codificante per un *linker* contenente un epitopo c-myc ed un'ancora GPI, presente in un costrutto ottenuto da M. Nitabach (Choi et al., 2009), è stata amplificata mediante l'utilizzo dei seguenti oligonucleotidi:

Oligo *MLGPI forw*: CGC**GGATCC**AATGGAAACGAACAGAAGCT

In rosso è indicato il sito di taglio dell'enzima di restrizione BamHI, corrispondente al penultimo e terz'ultimo codone della sequenza *AeGGTI*.

In verde è indicato l'ultimo codone della sequenza *AeGGTI*.

In azzurro sono indicate le basi codificanti per i primi amminoacidi del *linker* ML.

Oligo *MLGPI rev*: CGGGGTACCT**CTAGATTATAGCAGAGACCAGA**

In rosso è indicato il sito di taglio dell'enzima di restrizione XbaI.

In azzurro sono indicate le basi codificanti per gli ultimi amminoacidi della sequenza segnale per l'aggiunta dell'ancora GPI, fino al codone di stop, adiacente al sito di riconoscimento per l'enzima di restrizione XbaI.

La reazione di PCR è stata allestita in un volume finale di 25µl.

Il profilo termico della reazione di PCR è stato il seguente:

- | | |
|---------|------------|
| 1) 95°C | 5 minuti |
| 2) 94°C | 15 secondi |
| 3) 60°C | 30 secondi |
| 4) 72°C | 15 secondi |
| 5) 94°C | 15 secondi |
| 6) 78°C | 30 secondi |
| 7) 72°C | 15 secondi |

- | | |
|---------|-----------|
| 8) 72°C | 10 minuti |
| 9) 4°C | end |

I punti dal 2 al 4 sono stati ripetuti 5 volte, quelli dal 5 al 7 25 volte. Il prodotto di reazione è stato un frammento di DNA di 144 bp.

Al termine delle reazioni di PCR, i campioni sono stati analizzati mediante migrazione elettroforetica su gel di agarosio all'1,8% in tampone di corsa Tris Borato-EDTA (TBE) 1X (0.09M Tris Base, 0,09 M Acidi Borico, 2 mM EDTA pH 8.0) ed in presenza del marcatore di peso molecolare SharpMassTM100 - DNA ladder della Euroclone, al fine di verificare le corrette dimensioni dei frammenti ottenuti.

2.9 Purificazione di DNA separato mediante elettroforesi su gel di agarosio

La purificazione dei frammenti di DNA, separati mediante elettroforesi su gel di agarosio, ad una percentuale che varia dallo 0,6% all'1,8% in base alle dimensioni dei frammenti stessi, è stata effettuata mediante l'utilizzo del GenElute Gel Extraction Kit (Sigma). Una volta individuata la banda di DNA di interesse, con l'ausilio di una lampada ad UV, il blocchetto di agarosio che la conteneva è stato tagliato con l'aiuto di un bisturi, cercando di eliminare il gel in eccesso, ed è stato pesato. Esso è stato poi posto in una provetta Eppendorf a cui sono stati aggiunti 300µl di *Gel Solubilization Solution* per ogni 100mg di gel. A questo punto il campione è stato incubato per 10 minuti a 60°C, agitandolo vigorosamente ogni 2-3 minuti per favorire lo scioglimento dell'agarosio. Nel frattempo è stata preparata la colonnina di legame (*GenElute Binding Column G*) fornita dal kit, aggiungendo ad essa 500µl della *Column Preparation Solution*. La colonnina di legame è stata quindi centrifugata a 12,000xg per un minuto e la soluzione eluita è stata eliminata. Una volta che il blocchetto di agarosio si è dissolto, sono stati aggiunti ad esso 100µl di isopropanolo per ogni 100mg di gel e la soluzione ottenuta è stata agitata e trasferita sulla colonnina. Le colonnine del kit presentano infatti una speciale membrana cui il DNA presente nella soluzione va a legarsi. La colonnina è stata centrifugata per un minuto a 12,000xg e la soluzione eluita è stata

eliminata; la colonnina è stata quindi lavata con 700µl di tampone di lavaggio miscelato con etanolo, allo scopo di eliminare ogni traccia di agarosio e la miscela di lavaggio è stata eliminata mediante centrifugazione a 12,000xg per un minuto. La colonnina è stata infine posta in una nuova provetta Eppendorf, sono stati aggiunti 50-100µl di tampone di eluizione (10mM Tris-HCl, pH 9.0) e dopo incubazione di un minuto è stata centrifugata per un minuto a 12,000xg. Quest'ultima operazione consente al DNA legato alla membrana di staccarsi e passare in soluzione. La concentrazione del DNA recuperato è stata stimata mediante lettura allo spettrofotometro, ad una lunghezza d'onda di 260nm.

2.10 Reazioni di fosforilazione, defosforilazione e ligazione di DNA

- **Reazione di fosforilazione**

I frammenti di DNA, amplificati e purificati, sono stati sottoposti ad una reazione di fosforilazione. Nel dettaglio, il DNA è stato riscaldato a 70 °C per 5 minuti e raffreddato immediatamente in ghiaccio. Sono stati poi aggiunti il tampone di reazione in concentrazione finale 1X, ATP in concentrazione finale 1mM e 10 Unità dell'enzima T4 Polinucleotide chinasi (Roche). La miscela di reazione (20 µl) è stata incubata per 1 ora a 37°C ed al termine è stata effettuata un'estrazione con fenolo cloroformio alcool isoamilico (25:24:1). Il DNA è stato infine precipitato in Na acetato 0,3M e due volumi di Etanolo 100%, centrifugato per 15 minuti a 12,000xg, asciugato e risospeso in H₂O.

- **Reazione di defosforilazione**

I plasmidi digeriti con enzimi di restrizione, anch'essi purificati come indicato nel precedente paragrafo, sono stati sottoposti ad una reazione di defosforilazione. Nel dettaglio, 2 µg di plasmide digerito e purificato sono stati riscaldati per 10 minuti a 65°C e raffreddati immediatamente in ghiaccio. È stata poi aggiunta 1U di fosfatasi alcalina (Roche) e la miscela di reazione (20 µl) è stata incubata per 15 minuti a 37°C e poi per 15 minuti a 56°C. È stata quindi aggiunta una seconda aliquota di fosfatasi alcalina ed è stata ripetuta l'incubazione alle due temperature

indicate. Al termine sono state effettuate due estrazione con fenolo cloroformio alcool isoamilico (25:24:1). Il DNA è stato infine precipitato in Na acetato 0,3M e due volumi di Etanolo 100%, centrifugato per 15 minuti a 12,000xg, asciugato e risospeso in H₂O.

- **Reazione di ligazione**

Il frammento di DNA fosforilato è stato mescolato con il plasmide defosforilato in rapporto molare 2:1 o 3:1 a seconda delle esigenze sperimentali, in una miscela di reazione (10µl) contenente il tampone di ligazione in concentrazione finale 1X, ATP in concentrazione finale 1mM e 10 Unità dell'enzima T4 DNA ligasi (Roche). Questa miscela reazione è stata quindi incubata per almeno 12 ore a 16°C.

2.11 Trasformazione di cellule batteriche

Ceppo JM109:

3 µl di prodotto di ligazione (circa 100ng di DNA) sono stati aggiunti a un'aliquota di 100µl di cellule di *E. coli* JM109 chimicamente competenti, preparate in laboratorio. Le provette Eppendorf contenenti la miscela batteri-DNA sono stati incubati per 30 minuti in ghiaccio, per procedere poi con lo *shock* termico, effettuato a 42°C per 90 secondi. Dopo il repentino trasferimento in ghiaccio ed incubazione per 5 minuti, sono stati aggiunti 900µl di mezzo di coltura liquido LB (Luria Bertani Broth) a temperatura ambiente. Le cellule sono state quindi trasferite in una provetta Falcon da 15 ml per favorire una maggiore presenza di ossigeno e sono state incubate, in lieve agitazione, a 37°C per circa un'ora, mantenendo la provetta Falcon in posizione orizzontale. A questo punto le cellule sono state piastrate su terreno solido LB (Tryptone 10g/l; Estratto di lievito 5g/l; NaCl 10g/l; Agar 15g/l; pH 7) addizionato con ampicillina (50µg/ml) per la selezione dei cloni trasformati.

Ceppo TOP10:

2µl di prodotto di ligazione.(circa 80ng) sono stati aggiunti ad un'aliquota di 50µl di cellule competenti TOP10 chimicamente competenti (Invitrogen). Le provette

contenenti la miscela batteri-DNA sono stati incubati per 30 minuti in ghiaccio prima di procedere allo *shock* termico, effettuato a 42°C per 45 secondi. Dopo il trasferimento immediato in ghiaccio e incubazione per 2 minuti, sono stati aggiunti 250µl di SOC Medium (2% triptone, 0.5% estratto di lievito, 10mM cloruro di sodio, 2.5mM cloruro di potassio, 10mM cloruro di magnesio, 10mM solfato di magnesio, 20mM glucosio) a temperatura ambiente. Anche in questo caso le cellule sono state trasferite in tibo Falcon da 15 ml ed incubate, in lieve agitazione, a 37°C per un'ora circa, mantenendo la provetta Falcon in orizzontale. A questo punto le cellule sono state piastrate su terreno solido LB (vedi sopra) supplementato con ampicillina (50µg/ml) per la selezione dei cloni trasformati.

2.12 PLASMID MINI PREPS: preparazione di DNA plasmidico su piccola scala

Un inoculo di batteri recanti il plasmide di interesse è stato incubato tutta la notte in 5ml di terreno liquido LB contenente ampicillina 100µg/ml. Il mattino seguente 1,5ml di coltura sono stati trasferiti in una provetta Eppendorf e sono stati centrifugati per 1 minuto a 13,000rpm a temperatura ambiente. Il terreno di coltura è stato eliminato ed il pellet batterico è stato risospeso in 1ml di TE 1X (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0). Dopo una nuova centrifugazione di 1 minuto a 13,000rpm il pellet è stato risospeso in 100µl di *SOL I* (50mM glucosio, 10mM Na-EDTA, 25mM Tris-HCl, pH 8.0) supplementata con liozima in concentrazione finale 0,4%. Il campione è stato quindi incubato 5 minuti in ghiaccio, poi, sono stati aggiunti 200µl di *SOL II* (0.2M NaOH, 1% SDS, preparata fresca). E' stato agitato delicatamente ed è stato incubato altri 5 minuti in ghiaccio. Successivamente sono stati aggiunti 150µl di *SOL III* (3M Potassio Acetato, 11.5% acido acetico glaciale), il campione è stato quindi agitato e incubato in ghiaccio 5 minuti. Dopo centrifugazione per 10 minuti a 13,000rpm a 4°C, sono stati prelevati 400µl di sovrantante e trasferiti in una nuova provetta Eppendorf cui sono stati aggiunti 400µl di fenolo-cloroformio alcol isoamilico (25:24:1); il campione è stato agitato e poi centrifugato per 5 minuti a 13,000rpm. E' stata prelevata, dunque, la fase acquosa ed è stata trasferita in una nuova provetta Eppendorf a cui è stato aggiunto 1ml di etanolo 95% in H₂O. Il campione

è stato lasciato a temperatura ambiente per 10 minuti in modo da far precipitare il DNA plasmidico, dopo di che è stato centrifugato per 10 minuti a 13,000rpm. Il pellet è stato lavato due volte con 1ml di etanolo 70%, è stato lasciato ad asciugare ed infine risospeso in 50µl di H₂O sterile.

2.13 PLASMID MEDIUM PREPS: preparazione di DNA plasmidico su media scala

Questa tecnica è stata eseguita utilizzando il QIAGEN Plasmid Midi Kit. Una singola colonia batterica è stata inoculata in 100ml di LB contenente ampicillina 100µg/ml e incubata tutta la notte a 37 °C, in agitazione. Il giorno seguente sono 50ml di coltura stati trasferiti in una provetta di plastica da centrifuga e sono stati centrifugati per 15 minuti a 6,000xg a 4°C. Eliminato il sovrnatante, il pellet è stato risospeso in 4ml di *Resuspension/RNaseA Solution* (100 µg/ml). Le cellule risospese sono state lisate aggiungendo 4ml di *Lysis Solution*. Immediatamente, la soluzione è stata mescolata invertendo delicatamente il la provetta 6-8 volte. Il lisato è stato lasciato per 5 minuti a temperatura ambiente finchè non è divenuto chiaro e viscoso. Sono stati quindi aggiunti, 4ml di *Neutralization Solution* pre-raffreddata e la miscela è stata mescolata e incubata in ghiaccio per 15 minuti. Il campione è stato poi nuovamente mescolato e centrifugato a 20,000xg per 30 minuti a 4°C. Il sovrnatante contenente il DNA plasmidico è stato prontamente recuperato e centrifugato a 20,000xg per 15 minuti a 4°C. Nel frattempo è stata effettuata la fase di preparazione della colonna Qiagen-tip 100 in dotazione del kit. Essa è stata equilibrata con 4ml della *Column Equilibration Solution* che è stata lasciata fluire per gravità,. Il sovrnatante contenente il DNA plasmidico è stato prontamente recuperato dopo centrifugazione e caricato velocemente sulla colonna. Una volta che il campione è stato filtrato attraverso la colonna per gravità, permettendo il legame del DNA, sono stati effettuati due lavaggi con 10 ml di *Wash Solution*, scartando l'eluato. La colonna è stata quindi trasferita in una provetta Falcon e addizionata con 5ml di *Elution Solution*. Il DNA plasmidico contenuto nell'eluato è stato precipitato aggiungendo 0.7 volumi di isopropanolo e centrifugato a 15,000xg per 30 minuti a 4°C. Dopo aver scartato il sovrnatante, il pellet è stato lavato con 2ml di etanolo 70% ed il campione è stato centrifugato a

15,000xg per 10 minuti. A questo punto il pellet è stato lasciato asciugare all'aria per 5-10 minuti e poi risospeso in TE 1X.

2.14 Estrazione di RNA totale da *Drosophila melanogaster*

L'estrazione di RNA totale da larve ed adulti di *Drosophila* è stata eseguita mediante l'uso del TRI REAGENT della Sigma. I campioni sono stati omogeneizzati in 1ml di TRI REAGENT per ogni 50-100mg di peso del materiale biologico. L'omogenato è stato centrifugato a 12,000xg per 10 minuti a 4°C al fine di rimuovere il materiale insolubile e il sovrnatante è stato trasferito in una nuova provetta Eppendorf ed incubato per 5 minuti a temperatura ambiente. Sono stati poi aggiunti 0,2ml di cloroformio per ogni ml di TRI REAGENT usato e, dopo essere stati agitati vigorosamente per 15 secondi, i campioni sono stati incubati per 15 minuti a temperatura ambiente. La miscela è stata centrifugata a 12,000xg per 15 minuti a 4°C: la fase acquosa è stata prelevata e trasferita in una nuova provetta Eppendorf, cui stati aggiunti 0,5ml di isopropanolo per ogni ml di TRI REAGENT usato. Dopo un'incubazione di 10 minuti a temperatura ambiente, la miscela è stata centrifugata a 12,000xg per 10 minuti a 4°C. Una volta rimosso il sovrnatante, il pellet di RNA è stato lavato con 1ml di etanolo 75% per ogni ml di TRI REAGENT usato e i campioni sono stati centrifugati a 7,500xg per 5 minuti a 4°C. Il pellet è stato lasciato asciugare all'aria e risospeso in un appropriato volume di H₂O trattata con 0,1%, dietilpirocarbonato (*DEPC*) e autoclavata..

Le preparazioni di RNA totale sono state sottoposte a trattamento con DNAsi I bovina ingegnerizzata (*Turbo DNase Ambion*), al fine di digerire eventuali residui di DNA ivi presenti. La miscela di reazione è stata assemblata aggiungendo a 10 µg di RNA totale in un volume di 44 µl di H₂O trattata con DEPC 5 µl di tampone di reazione 10X e 1µl (2 Unità) di *Turbo DNase*. I campioni sono stati incubati a 37°C per 30 minuti e sottoposti ad estrazione con fenolo cloroformio alcool isoamilico (25:24:1). Dopo centrifugazione a 12,000xg per 10 minuti a 4°C, è stata prelevata la fase acquosa e l'RNA è stato sottoposto a precipitazione portando la soluzione ad una concentrazione finale di 0.3 M sodio acetato pH 5.2 ed aggiungendo 3 volumi di etanolo 100%. I campioni sono stati trasferiti in un

bagnetto di ghiaccio secco ed alcool denaturato per 15-30 minuti o in alternativa a -20°C per due ore. Successivamente, sono stati centrifugati a 12,000xg per 15 minuti a 4°C, i pellet ottenuti sono stati lavati con 1ml di etanolo al 70% e, dopo un'ulteriore centrifugazione a 12,000xg, sono stati lasciati asciugare all'aria per poi essere risospesi in un appropriato volume di H₂O trattata con DEPC. La concentrazione dell'RNA estratto è stata determinata mediante lettura allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 260nm ed inoltre sono stati controllati i rapporti di lettura 260/280 e 260/230, per valutare la purezza della preparazioni. Infine, l'integrità dell'RNA estratto è stata verificata mediante migrazione elettroforetica su gel di agarosio all'1% in tampone di corsa TBE 1X,. I campioni sono stati infine conservati a -80°C.

2.15 Reazione di RetroTrascrittasi inversa-PCR (RT-PCR)

Le reazioni di retrotrascrizione sono state allestite aggiungendo a 4µg di RNA totale 2 µl di una soluzione 50µM di *random primers* e H₂O trattata con DEPC, fino ad un volume finale di 24µl. I campioni sono stati centrifugati brevemente a 12,000xg, incubati per 3 minuti ad una temperatura di 85°C e posti subito in ghiaccio. Sono state quindi aggiunte le altre componenti:, 2 µl di *First Strand Synthesis Buffer* 10X, 2 µl di una miscela di dNTP con concentrazione 5mM, 1 µl di un inibitore delle RNasi con concentrazione di 40U/µl (Ambion) e 1 µl dell'enzima M-MLV Reverse Transcriptase con concentrazione di 100U/µl, (Ambion). La miscela di reazione è stata incubata a 42°C per un'ora. La trascrittasi inversa è stata infine inattivata mediante incubazione a 92°C per 10 minuti.

I cDNA così ottenuti sono stati utilizzati per l'analisi dei trascritti *AeGGT1-V5His* e *AeGGT1-MLGPI*, mediante reazioni di PCR eseguite con oligonucleotidi specifici per ciascun transgene.

Per l'analisi del trascritto *AeGGT1-V5His* è stata utilizzata la seguente coppia di oligonucleotidi:

a) Oligo *GGT1forw*: AAATCCAGGTAAACTTTGT

Quest'oligonucleotide riconosce la sequenza *AeGGT1* del transgene *AeGGT1-V5His*

b) Oligo V5Hisrev1: TCTAGAACAGTCGAGGCT

Quest'oligonucleotide riconosce la sequenza sintetica del transgene *AeGGT1-V5His* .

Per l'analisi del trascritto *AeGGT1-MLGPI* è stata utilizzata la seguente coppia di primer:

a) Oligo GGT1forw: AAATCCAGGTAAACTTTGT

Quest'oligonucleotide è lo stesso riportato sopra

c) Oligo MLGPIrev1: TCTAGATTATAGCAGAGACC

Quest'oligonucleotide riconosce la sequenza sintetica del transgene *AeGGT1-MLGPI* .

Le reazioni di PCR sono state allestite in un volume finale di 25µl. Il profilo termico delle reazioni di PCR è stato il seguente:

- 1) 95°C 5 minuti
- 2) 94°C 30 secondi
- 3) 52°C 30 secondi
- 4) 72°C 1 minuto
- 5) 72°C 10 minuti
- 6) 8°C *end*

I punti dal 2 al 4 sono stati ripetuti 35 volte.

Al termine delle reazioni di PCR, i campioni sono stati analizzati mediante migrazione elettroforetica su gel di agarosio all'1% in tampone di corsa TBE 1X, in presenza degli opportuni marcatori di peso molecolare.

2.16 Quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

Gli esperimenti di qRT-PCR sono stati eseguiti su preparazioni di RNA totale estratto da femmine di 2-3 giorni di vita. Per ciascun genotipo sono state analizzate tre repliche. La misura dell'espressione genica è avvenuta mediante un'analisi quantitativa relativa utilizzando come controllo interno il gene endogeno α -tubulina, che è trascritto in maniera costante in tutti i tessuti. I livelli trascrizionali del gene bersaglio (*DmGGT1*) sono stati determinati sulla base del valore del ciclo soglia (Ct), che rappresenta il numero di cicli necessari per generare un segnale fluorescente al di sopra di una soglia predefinita ed è quindi inversamente proporzionale alla concentrazione iniziale del trascritto. Le coppie di oligonucleotidi utilizzate sono state disegnate con il *software* Primer Express, versione 3.0 (Life Technologies), seguendo la procedura *standard*, e sono riportate di seguito in tabella:

| Gene | Sequenza | Frammento (bp) |
|--------------------|-----------------------------------|----------------|
| <i>DmGGT1</i> | (F) 5'-GCCGGCCAACTACATTTATCC-3' | 65 |
| | (R) 5'-CAACAATAATGCACGGACTCATC-3' | |
| α -tubulina | (F)GTGAAACACTTCCAATAAAAACTCAATATG | 90 |
| | (R) CCAGCAGGCGTTTCCAAT | |

Tabella 1: Coppie di oligonucleotidi utilizzate nelle reazioni di qRT-PCR.

Le reazioni di qRT-PCR sono state condotte con il sistema StepOne™ Real Time PCR utilizzando il Power SYBR Green RNA-to-Ct 1-Step kit secondo il protocollo consigliato dal produttore (Life Technologies).

Il ciclo termico adottato è stato il seguente:

| | | |
|--------------------|----------|---------------------|
| 1) 48°C 30 minuti | 1 ciclo | } Retrotrascrizione |
| 2) 95°C 10 minuti | 1 ciclo | |
| 3) 95°C 15 secondi | 40 cicli | } Amplificazione |
| 4) 60°C 1 minuto | 40 cicli | |
| 5) 95°C 15 secondi | 1 ciclo | } Curva di melting |
| 6) 60°C 1 minuto | 1 ciclo | |
| 7) 95°C 15 secondi | 1 ciclo | |

In ogni esperimento sono stati inclusi un controllo negativo (H₂O) e un controllo positivo.

Per la quantizzazione relativa è stato utilizzato il metodo $\Delta\Delta CT$, che prevede una normalizzazione dei valori di Ct (*Cycle threshold*) del gene bersaglio (*DmGGTI*) con quelli del controllo interno (*α -tubulina*), utilizzando la seguente formula:

$$\Delta CT = Ct_{(DmGGTI)} - Ct_{(\alpha-tubulina)}$$

Il valore ΔCt di ciascun campione è relativo ad un calibratore che rappresenta il wild-type. Utilizzando la formula:

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{campione}) - \Delta CT (\text{calibratore})$$

e la formula $2(-\Delta\Delta Ct)$ (Livak e Schmittgen, 2001), è stato possibile quindi calcolare l'espressione relativa di *DmGGTI*. Il metodo comparativo ΔCT è stato validato mostrando che l'efficienza di amplificazione di *DmGGTI* e dell' *α -tubulina* sono approssimativamente uguali.

2.17 Preparazione di estratti proteici da *Drosophila melanogaster*

20 femmine sono state omogeneizzate a freddo, utilizzando pestelli sterili, in 100 μ l di tampone di estrazione (MgSO₄ 6mM, CaCl₂ 2mM, KCl 13mM, Nacitrato 2mM, KH₂PO₄ 12mM, Saccarosio 425mM, Hepes 10mM, Tris-base 5,9mM, pH 6.4) supplementato con inibitori di proteasi (aprotinina 10 μ g/ml,

pepstatina 10µg/ml, leupeptina 10µg/ml, PMFS 1mM). L'omogenato è stato sonicato a freddo, mediante l'utilizzo del sonicatore Branson Digital Sonifer, dotato di una piccola sonda che è stata immersa nel liquido, secondo il seguente programma:

- 15 secondi *ON* (tempo totale di esposizione 1 minuto)
- 30 secondi *OFF*
- 20% Ampiezza

I campioni sonicati sono stati centrifugati a 15,000 xg per 10 minuti a 4°C ed il sovrnatante è stato prelevato, suddiviso in aliquote e immediatamente conservato a -80°C. La concentrazione proteica è stata determinata mediante il metodo Bradford, utilizzando il reagente Biorad Protein Assay e seguendo il protocollo di microsaggio consigliato dalla ditta produttrice.

2.18 Raccolta di emolinfa da femmine adulte di *Drosophila melanogaster*

L' emolinfa è stata estratta da 100 femmine. Il capo di ciascun moscerino è stato punto con l'aiuto di un sottilissimo ago e l'emolinfa è stata prelevata per capillarità e posta in una provetta Eppendorf contenente PBS 1X freddo. L'emolinfa è stata poi centrifugata a 12,000xg per 10 minuti a 4°C ed è stata prontamente conservata a -80°C in un ugual volume di *Laemmli buffer 2X* (Tris-HCl 125mM pH 6.8, SDS 4%, Glicerolo 20%, Blu di bromofenolo (BBF) 0,2% e 2-β-mercaptoetanol diluito 1:20).

2.19 Western Blot

Campioni contenenti 50µg di proteine totali estratte da femmine adulte o larve e campioni di emolinfa estratta da 100 femmine sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti (SDS-PAGE).

- **Preparazione del gel e corsa elettroforetica**

Il *separating* gel è stato preparato al 15%. Sono stati miscelati 3.54ml di H₂O distillata, 3.75ml di una soluzione al 40% di Acrilammide-Bis Acrilammide 29:1, 2.5ml di Tris-HCl 1.5M pH 8.8, 100µl di SDS 10%, per un volume totale di 10ml. Per dare inizio alla reazione di polimerizzazione sono stati aggiunti 100µl di Ammonio Persolfato al 10% (APS) e 4µl di TEMED (N,N,N,N'-tetrametiletilendiammina). Terminata la polimerizzazione del *separating* gel, è stato preparato lo *stacking* gel al 5%: sono stati miscelati 2.92ml di H₂O distillata, 0.5ml della soluzione al 40% di Acrilammide-Bis Acrilammide 29:1, 0.5ml di Tris-HCl 1M pH 6.8, 40µl di SDS 10%, 40µl di APS, 4µl di TEMED per un volume finale di 4ml. I campioni sono stati preparati per il caricamento aggiungendo ad essi un volume di *Laemmli Buffer* 2X (125 mM Tris pH 6.8, 4% SDS, 20% Glicerolo, 0,2% BBF e 2-β-mercaptoetanolo diluito 1:20). Essi sono stato quindi riscaldati per 5 minuti a 95°C e sono stati caricati nei pozzetti del gel insieme ad un marcatore di pesi molecolari. L'elettroforesi è stata eseguita a 30 mA. in un tampone Tris-Glicina-SDS (25mM Tris-base, 200 mM Glicina, 0.1% SDS).

- **Trasferimento su membrana, incubazione con anticorpi e rivelazione**

Al termine della corsa elettroforetica, il gel è stato lavato per 15 minuti con il tampone di trasferimento (tampone Tris-glicina senza SDS, 20% metanolo) per eliminare l'SDS. Per il trasferimento è stata usata una membrana di PVDF (polivinildifluoruro, GE Healthcare) che è stata prima attivata in metanolo per pochi secondi, poi lavata in H₂O distillata per 5 minuti, e infine equilibrata in tampone di trasferimento. Le proteine sono state trasferite dal gel alla membrana di PVDF in tampone di trasferimento, mediante passaggio di corrente a 10V costanti a 4°C per tutta la notte ed un'ora, a 100V costanti, il giorno seguente.

Al termine del trasferimento la membrana è stata posta nella soluzione di *blocking* preparata dissolvendo latte liofilizzato al 5% in TBS-T (Tris Buffered Saline: 20ml di Tris-HCl 1M pH 7.6 e 8g NaCl in 1 litro di H₂O + 0.1% Tween-20). Dopo un'incubazione di un'ora, in agitazione a temperatura ambiente, la membrana è stata incubata per tutta la notte a 4°C nella stessa soluzione cui è stato aggiunto un anticorpo anti-V5 della Life Technologies, diluito 1:4000. La

mattina successiva, la membrana è stata risciacquata velocemente e poi lavata a temperatura ambiente 6 volte in abbondante TBS-T, per 5 minuti a volta. La membrana è stata quindi incubata per due ore a temperatura ambiente con un anticorpo secondario anti-mouse coniugato con la Horseradish Peroxidase,(GE Healthcare), diluito 1:100.000 in TBS-T e latte liofilizzato disciolto al 5%. Sono stati poi effettuati 2 brevi risciacqui e 6 lavaggi in TBS-T, per 5 minuti a volta. Infine, la membrana è stata trattata per 5 minuti con una soluzione di rivelazione (ECL Plus-GE Healthcare). La perossidasi legata all'anticorpo secondario ossida il luminolo contenuto nella soluzione di rivelazione, con produzione di luce. La luce emessa è stata rivelata esponendo la membrana ad una lastra fotografica per tempi variabili in funzione dell'intensità del segnale luminoso emesso.

- **Rimozione degli anticorpi dalla membrana (*Stripping*)**

La membrana è stata immersa in una soluzione di *stripping* (2- β -Mercaptoetanololo100mM, SDS 2%, Tris-HCl 62.5mM, pH 6.7) a 50°C per 30 minuti in agitazione. Dopo essere stata lavata 2 volte per 10 minuti in TBS-T a temperatura ambiente è stata incubata nella soluzione di *blocking* per un'ora in agitazione a temperatura ambiente. A questo punto, è stata incubata a 4°C, per tutta la notte, in TBS-T contenente una diluizione 1:2000 di un anticorpo anti α -tubulina, lavata ed incubata con un anticorpo secondario fino ad arrivare alla rivelazione, seguendo gli stessi passaggi già descritti.

2.20 Dosaggio di attività enzimatica γ -glutamnil transpeptidasi

E' stato utilizzato un saggio colorimetrico (γ -Glutamyltransferase Activity Colorimetric Assay Kit, Sigma-Aldrich) in cui è stata registrata la produzione del composto cromogenico p-nitroanilide (pNA). Questo composto viene liberato in una reazione catalizzata dalla GGT che trasferisce ad un accettore il gruppo γ - glutammilico del substrato sintetico L- γ -Glutamyl p-nitroanilide. La quantità di pNA prodotta in questo saggio è dunque proporzionale alla GGT presente nel campione analizzato. Il rilascio di pNA nel tempo è stato seguito a 37°C mediante lettura spettrofotometrica a 418nm.

30 femmine di 2-3 giorni di vita sono state omogeneizzate a freddo con pestelli sterili in 200µl di GGT *Assay Buffer*. L'omogenato è stato centrifugato a 13,000 xg per 10 minuti a 4°C per rimuovere il materiale insolubile; il sovranatante è stato prelevato e suddiviso in aliquote che sono state conservate a -80°C. Una volta determinata la concentrazione proteica di ciascun estratto mediante saggio Bradford, sono state eseguite, partendo da una stessa quantità di proteine per ciascun campione, diluizioni seriali in GGT *Assay Buffer*. E' stata quindi allestita una piastra ponendo nei pozzetti 10µl di ciascuna diluizione dei campione da analizzare, cui sono stati aggiunti 90µl di GGT *Substrate Solution*. In altri pozzetti sono stati posti 100 µl di GGT *Assay Buffer* contenenti quantità note di pNA, da utilizzare come *standards* per la rivelazione colorimetrica. E' stato allestito inoltre un pozzetto con 10µl di un controllo positivo, cui sono stati aggiunti 90µl di GGT *Substrate Solution*. La piastra è stata incubata a 37°C al buio. Dopo 3 minuti è stata eseguita la prima lettura e poi le letture si sono susseguite a distanza di 5 minuti l'una dall'altra.

E' stata costruita una curva *standard* e sulla base di questa è stata calcolata la quantità di pNA generata da ciascun campione fra il tempo iniziale ed un tempo finale definito nella parte lineare della curva dello standard. L'attività della GGT di ciascun campione è stata quindi determinata applicando l'equazione:

$$\text{attività GGT} = (B \times \text{Fattore di diluizione del campione}) / (\text{tempo di reazione} \times V)$$

B = quantità (nmole) di pNA generato tra T_{iniziale} e T_{finale} .

Tempo di Reazione = $T_{\text{finale}} - T_{\text{iniziale}}$ (minuto)

V = volume del campione (mL) aggiunto al pozzetto

L'attività GGT è espressa come nmole/min/ml = milliunità/ml

Sono stati eseguiti tre esperimenti indipendenti.

2.21 Creazione di ceppi transgenici di *Drosophila melanogaster*

I due costrutti, *AeGGT1-V5His-pUASPattB* e *AeGGT1-MLGPI-pUASPattB*, sono stati inviati all'azienda *Genetic Services, Inc.* per essere microiniettati in embrioni

precoci di un appropriato ceppo accettore. L'inserzione del transgene nel genoma di *Drosophila melanogaster* è stata ottenuta mediante integrazione sito-specifica diretta dall'integrasi ϕ C31, che media la reazione di ricombinazione tra una sequenza *attB*, presente sul plasmide che porta il transgene, e una sequenza *attP*, detta anche sito di "atterraggio", situata su di uno specifico cromosoma del ceppo accettore (Figura 5). Nello specifico, i nostri transgeni sono stati inseriti sul secondo cromosoma, in posizione 25C7.

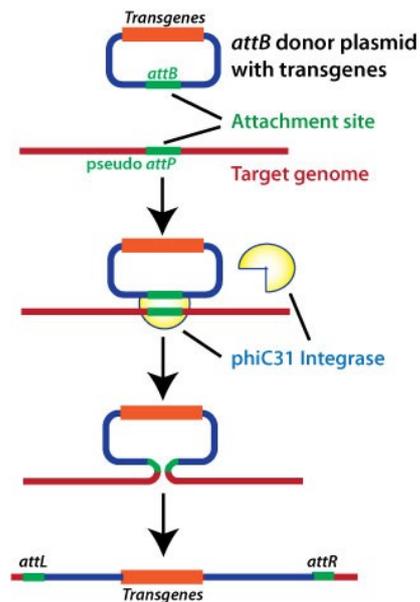


Figura 4: Rappresentazione grafica dell'inserzione di una sequenza di DNA nel genoma di *Drosophila melanogaster* mediante la ricombinazione sito-specifica mediata dalla integrasi ϕ C31.

Ogni singolo adulto sviluppatosi dagli embrioni microiniettati è stato incrociato con individui appartenenti al ceppo w^{1118} . Questi presentano un fenotipo "occhio bianco", in quanto portatori di una mutazione nel gene *white* che partecipa alla formazione dei pigmenti che conferiscono all'occhio della *Drosophila* il suo normale colore rosso. La selezione degli individui transgenici è stata effettuata osservando la pigmentazione dell'occhio nella progenie degli incroci: grazie alla presenza di una copia selvatica del gene *white* nel vettore di trasformazione pUAS*attB* gli individui transgenici sono infatti dotati di una colorazione dell'occhio arancione-rossa. Questi individui sono stati incrociati tra di loro in

modo da ottenere linee indipendenti di moscerini transgenici, ciascuna derivata da un singolo evento di trasformazione.

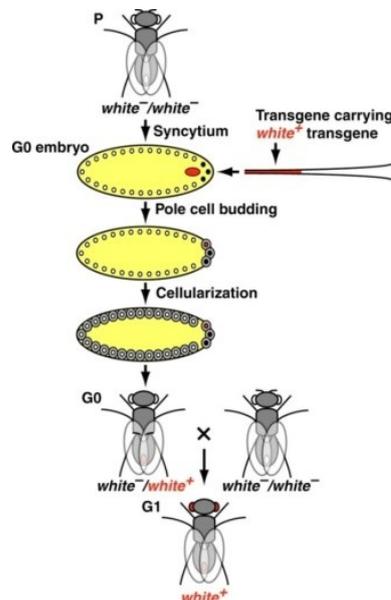


Figura 5: Gli individui transgenici che portano il costrutto ricombinante sono fenotipicamente riconoscibili, poiché dotati di un occhio la cui colorazione è arancione-rossa.

2.22 Induzione dell'espressione di transgeni mediante il sistema binario Gal4-UAS

Per promuovere l'espressione dei transgeni nelle linee di moscerini trasformati è stato utilizzato il sistema di espressione inducibile Gal4-UAS. Il gene *Gal4* codifica per una proteina di 881 amminoacidi, identificata nel lievito *Saccharomyces cerevisiae* come un potente attivatore della trascrizione di geni indotti dal galattosio (Laughon and Gesteland, 1984). La proteina *Gal4* regola la trascrizione di questi geni attraverso il legame diretto a quattro siti di 17 bp ciascuno, localizzati fra questi geni (Giniger et al., 1985). Questi siti definiscono l'elemento *UAS* (*Upstream Activating Sequence*), analogo funzionale degli elementi *enhancer* trovati negli eucarioti superiori. Nel 1988 Fischer et al., dimostrarono che l'espressione della proteina *Gal4* è capace di stimolare la trascrizione di un gene *reporter* situato a valle dell'elemento *UAS* in *Drosophila*. Nel 1993, Brand e Perrimon descrissero un sistema in cui l'espressione di un gene

d'interesse, il gene *responder*, posto sotto il controllo di una sequenza *UAS*, può essere controllata in maniera tessuto-specifica. Nelle linee *responder* il gene di interesse è silente. Per attivarne la trascrizione, le linee *responder* vengono incrociate con altre linee, dette *driver*, in cui è presente il gene *Gal4* ed è controllato da specifiche regioni regolative. Così, la progenie di questi incroci, esprime il gene *responder* secondo un profilo spazio-temporale che riflette quello della linea *driver* utilizzata.

GAL4/UAS: sovraespressione di TRANSGENI tessuto/tempo specifica

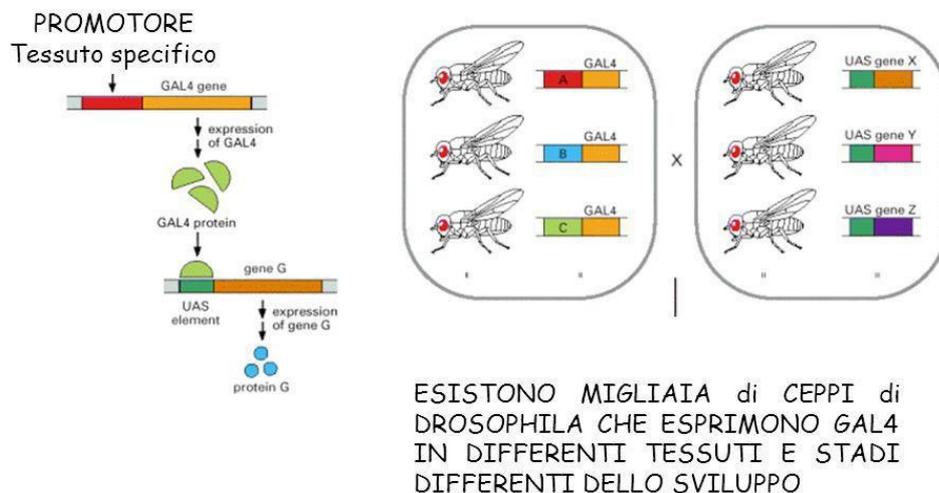


Figura 6: Espressione inducibile di geni in *Drosophila* mediante il sistema binario Gal4/UAS. Si può generare un transgene che sia trascritto dalla proteina Gal4, clonandolo a valle delle sequenze *UAS*, riconosciute da questo attivatore trascrizionale. Il gene di interesse rimane silente in assenza della proteina Gal4. Perché esso sia attivato in una particolare cellula o tessuto, il moscerino transgenico per il gene in questione (*UAS-Gene G*) dovrà essere incrociato con un moscerino che esprima la proteina Gal4 in quella particolare cellula o tessuto.

2.23 Test di fecondità

Femmine della linea *driver w; P(Gal4-da; G32)UHI* sono state incrociate con maschi trasformanti *AeGGT1-V5His* e *AeGGT1-MLGPI*. Maschi e femmine, nati

dai due incroci in uno stesso arco di tempo di 24 ore, sono stati raccolti e posti in barattolini con dieta *standard* supplementata con lievito. Il giorno successivo, sono stati trasferiti in un nuovo barattolino, anch'esso contenente la dieta supplementata con il lievito, ed il giorno ancora successivo 10 femmine di ciascun genotipo sono state prelevate dalla popolazione e poste ciascuna in un barattolino con tre maschi. I barattolini sono stati cambiati ad intervalli di 24 ore e le uova deposte da ciascuna femmina sono state contate per cinque giorni consecutivi.

2.24 Test di vitalità durante lo sviluppo

E' stato calcolato il numero di individui adulti generati a partire da un numero prestabilito di uova deposte da femmine del ceppo "driver" *da-Gal4* incrociate con maschi delle linee transgeniche *AeGGT1* o con maschi isogenici di controllo.

2.25 Test di resistenza allo stress ossidativo

60 femmine adulte, di 2-3 giorni di vita, sono state suddivise in tre gruppi da 20 e sottoposte a carenza di nutrienti (*starvation*) per 6 ore in barattolini di plastica contenenti sul fondo un dischetto di carta da filtro 3MM, dello stesso diametro del barattolino, imbevuto di 150µl di PBS 1X. Al termine del periodo di *starvation*, i moscerini sono stati trasferiti in nuovi barattolini contenenti un nuovo dischetto di carta da filtro 3MM, questa volta, imbevuto di 150µl di una soluzione di saccarosio e H₂O₂ (perossido di idrogeno) al 5% in PBS 1X. La registrazione dei decessi è stata effettuata ogni 12 ore ed il trattamento con H₂O₂ è stato ripetuto ogni 24 ore, cambiando quotidianamente il barattolino. Ogni esperimento è stato ripetuto tre volte. Sono state testate 180 femmine transgeniche *AeGGT1V5His*; *da-Gal4*, 180 femmine *AeGGT1MLGPI*; *da-Gal4* e 180 femmine isogeniche di controllo. Per quanto riguarda gli esperimenti di silenziamento del gene *DmGGT1*, sono state analizzate 140 femmine *DmGGT1RNAi*; *da-Gal4* e 140 femmine isogeniche di controllo *w¹¹¹⁸*; *da-Gal4*.

2.26 Colorazione delle ovaie di *Drosophila melanogaster* con il DAPI

Femmine mature (20 giorni di età), sono state dissezionate manualmente in PBS 1X freddo e sono state fissate in 200µl di PAF 4%, 10µl DMSO, 600µl EPTANO per 15 minuti in agitazione a temperatura ambiente. La soluzione di fissazione è stata sostituita e la fissazione è stata protratta per altri 15 minuti. Le ovaie sono state lavate 5 volte in 1ml di PBS 1X, per 5 minuti a volta. Al termine dei lavaggi, sono state incubate con DAPI (1µg/ml di PBS 1X) al buio per 30 minuti, sempre in agitazione a temperatura ambiente. Sono stati poi eseguiti 4 lavaggi con PBS 1X ed infine le ovaie sono state poste in 200µl di glicerolo 50% in PBS 1X e conservate a 4°C per tutta la notte. Il giorno successivo, sono state montate su di un vetrino portaoggetto con una goccia di *Aqua Poly Mount* (Polysciences, Inc.) e vetrino coprioggetto. Le osservazioni sono state effettuate al microscopio ottico a fluorescenza.

2.27 Immunofluorescenza su ovaie di *Drosophila melanogaster*

Per effettuare le analisi di immunofluorescenza sulle ovaie, il giorno precedente alla dissezione le femmine di *Drosophila* (7-9 giorni di età), sono state trasferite, assieme ai maschi, in barattolini con dieta arricchita di lievito, in modo da stimolare l'ovideposizione. Il giorno successivo, i moscerini sono stati anestetizzati con etere e le ovaie sono state dissezionate in PBS 1X freddo (NaCl 130mM, Na₂HPO₄ 7mM, NaH₂PO₄ 3mM, pH 7.4) e poste in provette Eppendorf mantenute in ghiaccio contenenti PBS 1X. Circa 10 coppie di ovaie per campione sono state quindi fissate in una soluzione contenente 200µl di paraformaldeide al 4% in PBS (preparata fresca), 10µl di DMSO (dimetilsulfossido) e 600 µl di eptano, per 15 minuti in agitazione a temperatura ambiente; la soluzione è stata quindi sostituita, continuando la fissazione per altri 15 minuti, sempre in agitazione. Le ovaie sono state poi sottoposte a cinque lavaggi da 10 minuti in 1ml di PBT (0.1% Triton-X 100 in PBS 1X). A termine dei lavaggi, sono state incubate per tutta la notte a 4°C, in agitazione, con 1ml di soluzione di permeabilizzazione (PBS 1X, 1% Triton-X 100, 3% Fetal Bovine Serum). Il

giorno dopo, le ovaie sono state lavate tre volte, per un totale di 30 minuti, in 1ml di PBT, in agitazione a temperatura ambiente. A seguire, sono state incubate in 1ml di soluzione di *blocking* (3% FBS, 0,1% Triton in PBS 1X), per 1 ora in agitazione a temperatura ambiente. Al termine dell'incubazione, le ovaie sono state incubate per tutta la notte con 200 µl di soluzione di *blocking* contenente un anticorpo primario, in agitazione a 4°C. Gli anticorpi primari utilizzati sono stati un anticorpo anti-V5, della Life Technologies (diluizione 1:400) e l'anticorpo anti-c-myc sc-789 della Santa Cruz Biotechnology, Inc. (diluizione 1:100). Il giorno successivo, le ovaie sono state lavate 4 volte con 1 ml di PBT, per 15 minuti a volta, in agitazione a temperatura ambiente e sono state poi incubate per 3 ore, protette dalla luce, con 200µl di soluzione di *blocking* contenente un anticorpo secondario *anti-rabbit* coniugato con *texas red* della Molecular Probes (concentrazione 1:400). Nell'ultima mezz'ora di incubazione è stato aggiunto il DAPI (1µg/ml in PBS 1X) per la colorazione dei nuclei. Dopo 4 lavaggi da 20 minuti ciascuno in 1ml di PBT 1X, sempre in agitazione a temperatura ambiente e sempre protette dalla luce, la soluzione dell'ultimo lavaggio è stata eliminata, e alle ovaie sono stati aggiunti 100µl di glicerolo 50% in PBS 1X. Trascorse 12- 24 ore al buio a 4°C, le ovaie sono state infine montate su di un vetrino, aggiungendo una goccia di *Aqua Poly Mount* (Polysciences, Inc.) e un vetrino coprioggetto. L'osservazione dei preparati è stata effettuata mediante l'utilizzo del microscopio ottico a fluorescenza Zeiss Axioskop 2 equipaggiato con una telecamera Zeiss AxioCam HRc controllata dal software Axiovision 3.1.

2.28 Analisi statistiche

I risultati del test di fecondità, sono stati analizzati mediante unpaired two tailed *Student t*-test. I dati del test di sopravvivenza durante lo sviluppo sono stati analizzati mediante il test del chi-quadro (χ^2). I risultati degli esperimenti di *stress* ossidativo con H₂O₂ sono stati analizzati con il *software* GraphPad Prism 6.0 ed il *p-value* è stato calcolato mediante il log-rank test. I dati dei saggi di attività enzimatica sono stati analizzati mediante il test ANOVA ad una via. I risultati delle reazioni di qRT-PCR sono stati analizzati con lo *Student t*-test.

3. Risultati

3.1 Creazione di costrutti ricombinanti e generazione di linee transgeniche per l'espressione eterologa della proteina *AeGGT1* in *Drosophila melanogaster*:

La proteina *AeGGT1* viene sintetizzata dalle cellule secretorie delle ghiandole del veleno di *Aphidius ervi* sotto forma di precursore costituito da 541 aminoacidi, provvisto nella regione N-terminale di una sequenza di 29 aminoacidi in prevalenza idrofobici, con caratteristiche tipiche di peptide segnale. Il precursore è sottoposto a una serie di modifiche post-traduzionali, incluso l'autoprocessamento, con formazione di una proteina eterodimerica composta da due subunità di diversa grandezza, che viene riversata nell'ambiente extracellulare e quindi nel lume ghiandolare (Falabella et al., 2007).

Quando il parassitoide, al momento dell'ovideposizione, inietta nell'ospite il veleno, la proteina *AeGGT1* è presumibilmente capace di diffondere liberamente nell'emolinfa che bagna l'emocele dell'afide *Acyrtosiphon pisum*, e quindi di raggiungere gli ovari, ove scatena fenomeni apoptotici. Al momento, non è chiaro se le cellule ovariche siano particolarmente suscettibili a stimoli pro-apoptotici e dunque la proteina *AeGGT1* svolga la propria funzione attraverso semplice contatto/prossimità con queste cellule o se invece essa si associ in maniera selettiva alle membrane delle cellule ovariche, attraverso il legame con una molecola che funga da "recettore". Nell'allestire il mio approccio di espressione eterologa in *Drosophila melanogaster* ho dunque dovuto tenere conto di queste due alternative e di conseguenza generare due diverse forme ricombinanti del gene *AeGGT1*.

Sulla base della prima ipotesi, ho costruito un gene chimerico codificante per una proteina di fusione solubile e secreta, che accumulandosi nell'emolinfa riproducesse nel moscerino una condizione analoga a quella che si stabilisce nell'afide attraverso l'iniezione del veleno da parte del parassitoide. Questo gene chimerico, chiamato *AeGGT1-V5His*, è stato ottenuto mediante fusione dell'intera sequenza codificante del cDNA della proteina *AeGGT1* di *A. ervi*,

precedentemente clonato nel nostro laboratorio (Falabella et al., 2007), con una sequenza codificante per un epitopo V5 e un *tag* di poli-istidine (Figura 1a).

Nell'ipotesi che la proteina *AeGGT1* si associ alla membrana plasmatica delle cellule ovariche e che tale associazione sia necessaria per svolgere le sue funzioni, ho costruito un secondo gene chimerico, codificante per una proteina di fusione dotata di un'ancora GPI, allo scopo di mimare il legame della proteina del parassitoide alla superficie delle cellule bersaglio. Va notato che, per la maggior parte, le γ -glutamminil transpeptidasi eucariotiche sono proteine transmembrana e dunque esercitano la propria azione legate alla membrana plasmatica. Questo secondo gene chimerico, chiamato *AeGGT1-MLGPI*, consta dell'intera sequenza codificante del cDNA *AeGGT1*, a meno del codone di stop, sostituito da una sequenza composta, traducibile in un *linker* amminoacidico contenente un epitopo Myc, seguito da una sequenza detta "GPI targeting". Si tratta di un motivo che funge da segnale per l'aggiunta di glicosil-fosfatidil-inositolo durante il passaggio di una proteina attraverso il reticolo endoplasmatico, mediante formazione di un legame covalente in posizione carbossi-terminale. Tale sequenza è stata disegnata per permettere l'inserimento della proteina di fusione *AeGGT1-MLGPI* sul lato extracellulare della membrana plasmatica (Figura 1b).

I due geni ricombinanti sono stati clonati nel vettore di trasformazione *pUAS^{PattB}* di *Drosophila melanogaster*. Tale vettore contiene: 1) un sito *attB*, necessario per l'integrazione nel genoma di un appropriato ceppo recipiente di *Drosophila*, attraverso un evento di ricombinazione sito specifica mediata dell'integrasi ϕ C31; 2) l'allele selvatico del gene *white* (*w+*), che funge da marcatore fenotipico per lo screening e l'identificazione degli individui transgenici e 3) una sequenza di regolazione trascrizionale di *Saccharomyces cerevisiae* (*Upstream activating sequence, UAS*), che permette il controllo inducibile dell'espressione del transgene inserito mediante l'utilizzo del sistema binario Gal4-UAS (vedi materiali e metodi).

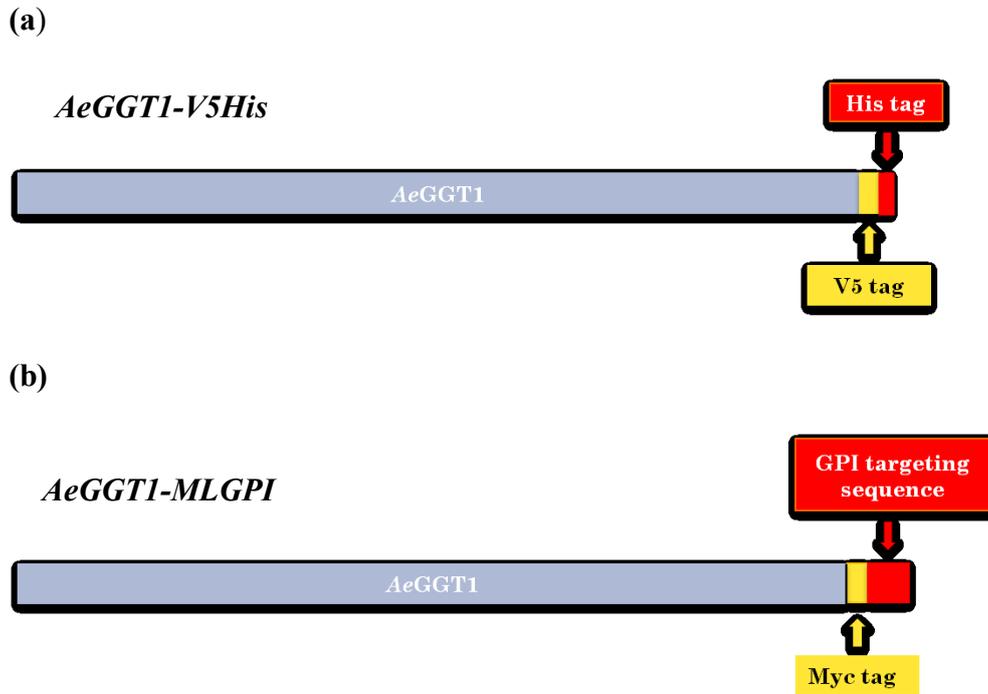


Figura 1: Rappresentazione schematica delle forme ricombinanti del gene *AeGGT1*. (a) Transgene *AeGGT1-V5His* costituito dall'intera sequenza codificante per la proteina *AeGGT1* di *A. ervi* fusa in *frame* al 3' con la sequenza codificante per un epitopo V5 (evidenziato in giallo) e un *tag* di poli-istidine (evidenziato in rosso). (b) Transgene *AeGGT1-MLGPI* costituito dall'intera sequenza codificante per la proteina *AeGGT1* di *A. ervi* fusa in *frame* al 3' con la sequenza codificante per un *linker* (evidenziato in viola), contenente un epitopo c-myc (evidenziato in giallo), e una sequenza segnale per l'aggiunta di una *GPI-anchor* in fase di maturazione post-traduzionale (evidenziata in rosso).

I costrutti ricombinanti *AeGGT1* sono stati microiniettati in embrioni precoci di *Drosophila melanogaster* e integrati nel genoma del moscerino mediante ricombinazione sito-specifica diretta dall'integrasi ϕ C31 (vedi materiali e metodi). Gli individui trasformanti, identificati in base alla pigmentazione dell'occhio (vedi materiali e metodi), sono stati utilizzati per fondare linee transgeniche indipendenti, otto per *AeGGT1-V5His* e cinque per *AeGGT1-MLGPI*, ciascuna contenente il transgene, in omozigosi sul secondo cromosoma, nella posizione 25C7 della mappa dei cromosomi politenici.

3.2 Induzione dei transgeni *AeGGT1-V5His* e *AeGGT1-MLGPI* e analisi dell'espressione:

Ho iniziato la caratterizzazione delle linee transgeniche *AeGGT1* verificando innanzitutto la capacità di esprimere i rispettivi transgeni, in seguito ad induzione mediante utilizzo del sistema binario Gal4-UAS.

Il sistema binario Gal4-UAS è stato sviluppato in *Drosophila* come strumento di analisi delle funzioni geniche, in quanto permette di attivare un dato gene in maniera condizionale, in specifici tessuti e/o in specifici intervalli temporali. I due elementi chiave di tale sistema, un transgene codificante per l'attivatore trascrizionale di lievito Gal4 e un gene bersaglio, posto sotto il controllo della sequenza di legame al DNA dell'attivatore stesso, la cosiddetta *Upstream Activating Sequence (UAS)*, sono inizialmente separati in due distinte linee di *Drosophila*. Quando le due linee vengono incrociate, la presenza contemporanea del transgene attivatore e del gene bersaglio porta all'espressione di quest'ultimo nella progenie. La disponibilità di una vasta collezione di linee transgeniche Gal4, ciascuna dotata di uno specifico profilo di espressione di quest'attivatore trascrizionale, rende il sistema binario Gal4-UAS estremamente versatile.

Per indurre dunque l'espressione dei transgeni *AeGGT1-V5His* e *AeGGT1-MLGPI* in tutti gli stadi di sviluppo e in tutti i tessuti, individui della rispettiva linea transgenica sono stati incrociati con individui del ceppo *w; P(Gal4-da; G32)UHI*, in cui è presente un costrutto che esprime ubiquitariamente la proteina Gal4 (Figura 2).

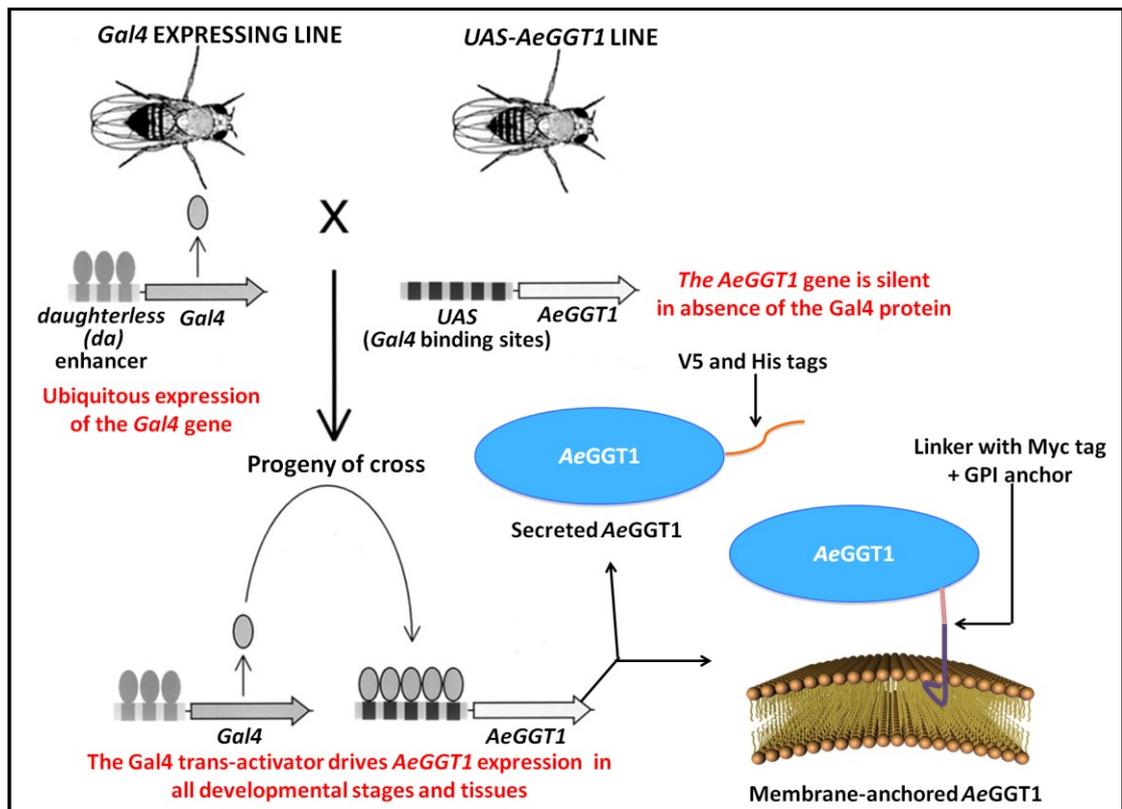


Figura 2: Rappresentazione schematica della strategia utilizzata per indurre l'espressione delle proteine ricombinanti *AeGGT1-V5His* e *AeGGT1-MLGPI* nelle *Drosophila* transgeniche. La strategia sfrutta il sistema Gal4-UAS, costituito da due elementi: il gene Gal4, codificante per una proteina attivatrice della trascrizione, e la sequenza *UAS* (*Upstream Activating Sequence*), cui la proteina Gal4 si lega per svolgere la sua azione di controllo trascrizionale.

3.2.1 I transgeni *AeGGT1-V5His* e *AeGGT1-MLGPI* sono abbondantemente trascritti in seguito ad induzione:

La progenie dell'incrocio fra i ceppi transgenici *AeGGT1* e il ceppo "driver" esprime l'attivatore Gal4 è stata analizzata per verificare che i transgeni *AeGGT1* fossero effettivamente trascritti. In seguito ad estrazione di RNA da larve mature di terzo stadio, si è proceduto con una reazione di RT-PCR. In una prima fase, quindi, l'RNA è stato retro-trascritto ed il cDNA ottenuto è stato utilizzato come stampo per amplificare la sequenza di interesse mediante l'uso di oligonucleotidi specifici (vedi materiali e metodi). Come mostrato in Figura 3, in cui sono riportati i risultati dell'analisi di RT-PCR, i trascritti *AeGGT1-V5His* (lane 4) e *AeGGT1-MLGPI* (lane 7), identificati da frammenti di cDNA

amplificato di dimensioni attese, si accumulano abbondantemente in seguito ad induzione.

L'esperimento di RT-PCR è stato poi ripetuto utilizzando RNA estratto da mosche adulte ed ha confermato la presenza dei trascritti dei due transgeni (dati non mostrati).

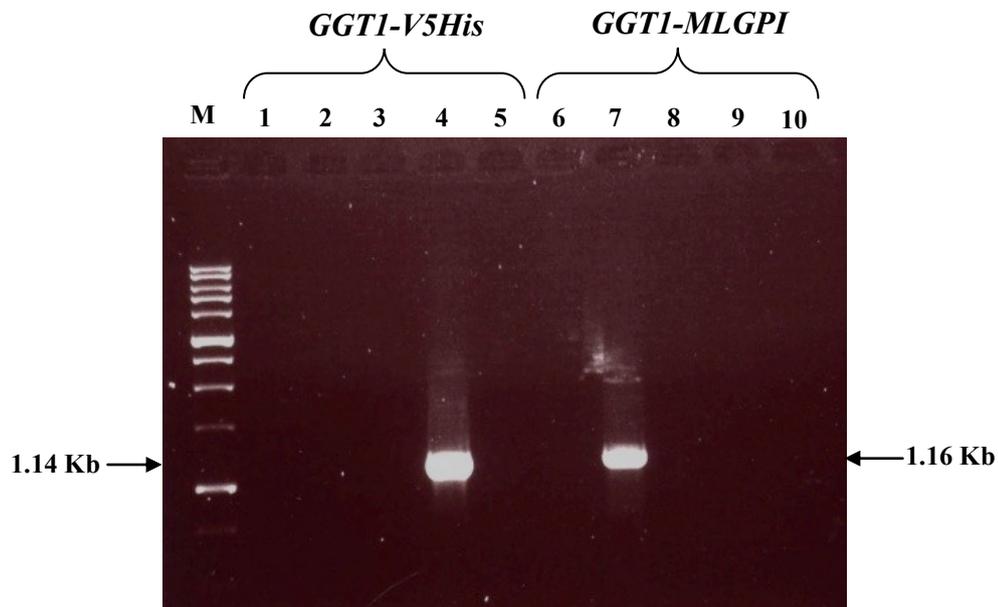


Figura 3: RT-PCR su RNA totale. I campioni sono stati estratti da larve di terzo stadio portatrici del transgene *AeGGT1-V5His* o *AeGGT1-MLGPI* sotto il controllo della sequenza UAS, in combinazione con un secondo transgene codificante per il trans-attivatore Gal4, espresso in maniera ubiquitaria (*GAL4-da.G32*, indicato in forma abbreviata come *da-Gal4*). Sono state utilizzate coppie di oligo specifiche per il trascritto *AeGGT1-V5His* (lanes 1-5) e per il trascritto *AeGGT1-MLGPI* (lanes 6-10). **M**: marcatore di peso molecolare; **lanes 1 e 6**: controllo negativo, reazione di PCR eseguita in assenza di DNA stampo; **lanes 2 e 7**: reazione di RT-PCR completa su *AeGGT1-MLGPI*; *da-Gal4*; **lanes 3 e 8**: reazione di RT-PCR eseguita su *AeGGT1-MLGPI*; *da-Gal4* in presenza di tutti i componenti, tranne l'enzima trascrittasi inversa; **lanes 4 e 9**: reazione di RT-PCR completa su *AeGGT1-V5His*; *da-Gal4*; **lanes 5 e 10**: reazione di RT-PCR eseguita su *AeGGT1-V5His*; *da-Gal4* in presenza di tutti i componenti, tranne l'enzima trascrittasi inversa.

3.2.2 Le proteine *AeGGT1-V5His* e *AeGGT1-MLGPI* sono correttamente tradotte e localizzate a livello subcellulare:

Avendo dimostrato che i transgeni *AeGGT1* sono intensamente attivati dalla proteina Gal4 e dunque la strategia di controllo dell'espressione genica Gal4-UAS funziona correttamente nel mio sistema, sono passata a verificare che i trascritti *AeGGT1* fossero tradotti in maniera appropriata.

Per visualizzare l'espressione delle proteine ricombinanti e al contempo definire la loro localizzazione cellulare, ho condotto esperimenti di immunofluorescenza sugli ovari delle mosche transgeniche già utilizzate per le analisi di RT-PCR, dunque portatrici dei transgeni *AeGGT1* in combinazione con il transgene *da-Gal4*. Come controllo, ho utilizzato mosche derivanti dall'incrocio fra la linea "driver" *da-Gal4* e il ceppo che era servito per stabilire le linee transgeniche, il ceppo *w¹¹⁸* (vedi materiali e metodi). La scelta dell'ovario quale organo su cui effettuare gli esperimenti di immunolocalizzazione non è stata ovviamente casuale, ma dettata dal fatto che quest'organo è specifico bersaglio dell'attività della proteina *AeGGT1* nell'afide parassitizzato da *Aphidius ervi*.

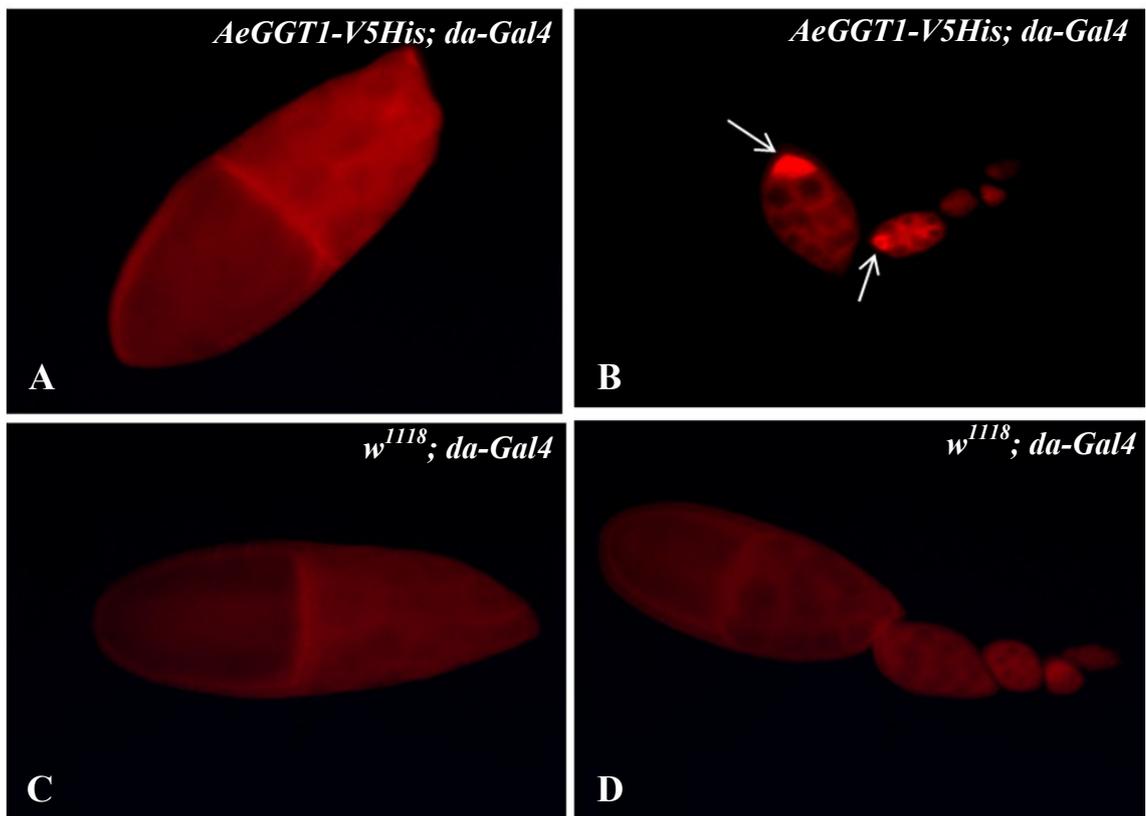
Ciascun ovario di *Drosophila* si compone di 16 ovariole, strutture che ricordano un filo di perle in cui ciascuna perla è una camera ovarica, un'unità funzionale che si origina da cellule staminali situate all'apice dell'ovariole e contiene 16 cellule germinali, un'ovocita e 15 cellule nutrici, circondate da uno strato epiteliale di cellule somatiche.

Come si osserva nella Figura 4 in cui sono mostrate immagini di camere ovariche ottenute al microscopio ottico a fluorescenza, entrambe le proteine di fusione sono sintetizzate nel sistema eterologo.

La proteina *AeGGT1-V5His*, riconosciuta da anticorpi diretti contro il tag V5 presente all'estremità carbossi-terminale, è uniformemente distribuita all'interno delle cellule somatiche e germinali (Figura 4A, che presenta una camera ovarica di stadio 10B). Questa localizzazione citoplasmatica diffusa è particolarmente abbondante all'interno dell'ovocita di camere ovariche in stadio di sviluppo 7-9, suggerendo che la proteina ricombinante viene attivamente trasportata dalle cellule nutrici (Figura 4B).

La proteina ricombinante *AeGGT1-MLGPI*, riconosciuta da anticorpi diretti contro l'epitopo Myc situato all'estremità carbossi-terminale, è invece principalmente localizzata a livello della membrana plasmatica e infatti decora il contorno delle cellule nutrici, sia in stadi di sviluppo avanzato (Figura 4E, che mostra una camera ovarica di stadio 10B), sia in stadi più precoci (Figura 4F) ed è inoltre visibile, seppur in maniera meno evidente, anche sulla superficie delle cellule follicolari che formano l'epitelio colonnare attorno all'oozita. Questa localizzazione è esattamente quella che ci si attendeva per la proteina *AeGGT1-MLGPI*, progettata per legarsi alla membrana extracellulare mediante un'ancora GPI.

Anti-V5 Ab



Anti-myc Ab

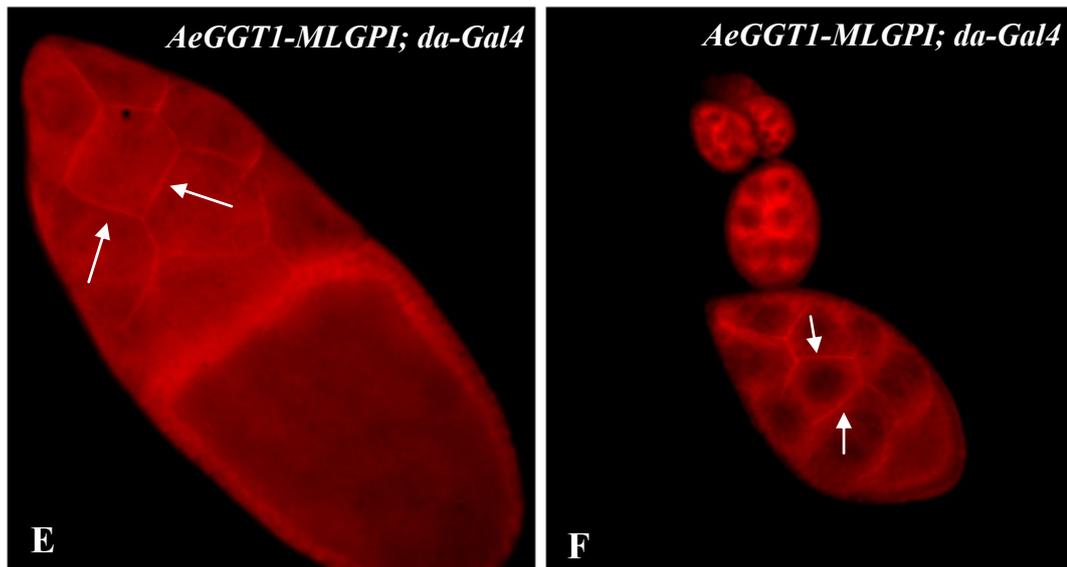


Figura 4: Immunofluorescenza su camere ovariche di *Drosophila* esprimenti i transgeni *AeGGT1* sotto il controllo del trans-attivatore *da-Gal4*. Le proteine di fusione sono state evidenziate mediante anticorpi diretti contro specifici *tags*, così come indicato. **A)** camera ovarica di stadio 10B: la proteina *AeGGT1-V5His* si localizza nel citoplasma di tutte le cellule; **B)** ovariole contenente camere ovariche in stadio di sviluppo precoce: la proteina *AeGGT1-V5His* si accumula principalmente nell’oocita (indicato dalle frecce); **C)** camera ovarica di stadio 10B e **D)** ovariole di controllo, derivanti da individui privi del transgene *AeGGT1*; **E)** camera ovarica di stadio 10B e **F)** porzione di un ovariole contenente diversi stadi di sviluppo della camera ovarica, da 5 a 8: la proteina ricombinante *AeGGT1-MLGPI* si localizza a livello della membrana cellulare delle cellule nutrici, come indicato dalle frecce ed è visibile anche alla periferia delle cellule follicolari. I pannelli A-D hanno lo stesso ingrandimento, diverso da quello, maggiore, dei pannelli E e F.

3.2.3 La proteina ricombinante solubile *AeGGT1-V5His* è secreta nell’emolinfa:

Gli esperimenti di immunolocalizzazione mi hanno permesso di dimostrare che i geni ricombinanti *AeGGT1* da me generati vengono tradotti correttamente in *Drosophila* e che, una volta prodotta, la proteina di fusione *AeGGT1-MLGPI* segue una via di traffico intracellulare che la porta alla membrana plasmatica. L’ultimo passo di questa prima parte di lavoro sperimentale, che è di fatto consistita nell’allestimento e validazione del mio sistema di espressione eterologa della proteina *AeGGT1*, è stato quello di verificare che la proteina di fusione *AeGGT1-V5His* fosse secreta nello spazio extracellulare in maniera analoga alla

proteina naturale da cui è derivata. Nel parassitoide *A. ervi*, questa si accumula nel lume delle ghiandole del veleno per essere trasferita, durante l’ovideposizione, nell’emolinfa di *A. pisum*. L’induzione dell’espressione della proteina ricombinante in tutte le cellule della *Drosophila*, seguita da corretta secrezione, doveva riprodurre nel moscerino proprio quella condizione di “invasione” dell’emocele da parte della proteina estranea, che si verifica nell’afide. Ho condotto quindi un’analisi western blot su estratti proteici totali e su emolinfa prelevata da moscerini *AeGGT1-V5His; da-Gal4* e da individui di controllo *w¹¹¹⁸; da-Gal4*, utilizzando, per riconoscere la proteina di fusione, lo stesso anticorpo anti-V5 utilizzato per gli esperimenti d’immunofluorescenza. Come si può osservare nella Figura 5, questo anticorpo identifica nei campioni derivanti da individui *AeGGT1-V5His; da-Gal4* (*lanes 2 e 4*) una proteina, che è invece assente nei campioni di controllo *w¹¹¹⁸; daGal4* (*lanes 1 e 3*). Il peso molecolare di questa proteina, circa 21KDa, corrisponde a quello atteso per la subunità piccola della proteina *AeGGT1-V5His*. La proteina *AeGGT1* è infatti un eterodimero composto da due subunità tenute assieme da interazioni elettrostatiche, che si forma in seguito a scissione auto-proteolitica di una singola molecola precursore. Le condizioni denaturanti della corsa elettroforetica SDS-PAGE determinano la separazione delle due subunità ma l’anticorpo utilizzato consente di rivelare solo la subunità piccola, cui è fuso il *tag V5*. Poiché questa subunità deriva dalla porzione carbossi-terminale del precursore, la sua presenza nell’estratto proteico totale degli individui transgenici (*lane 4*) non solo conferma che la proteina ricombinante è sintetizzata nell’ambiente eterologo, come indicato dai dati di immunofluorescenza, ma dimostra, seppur in maniera indiretta, che il precursore è correttamente processato. La proteina *AeGGT1-V5His* è poi secreta nell’ambiente extracellulare: l’anticorpo anti-V5 reagisce infatti positivamente con l’emolinfa delle mosche transgeniche (*lane 2*). Ciò non è dovuto ad accidentale contaminazione con materiale cellulare avvenuta durante l’estrazione, in quanto la purezza del campione è stata dimostrata re-incubando la membrana del western blot con un anticorpo che riconosce un’abbondante proteina cellulare, l’ α -tubulina, e constatando l’assenza di segnale in questo stesso campione, così come nel campione di emolinfa estratta da moscerini di controllo (pannello in basso in Figura 5, rispettivamente *lanes 2 e 1*). Ovviamente, l’anticorpo anti- α -

tubulina riconosce una banda di appropriato peso molecolare nei campioni contenenti l'estratto cellulare totale (pannello in basso in Figura 5, *lanes* 3 e 4).

La banda proteica evidenziata nell'emolinfa presenta una leggera differenza di migrazione rispetto a quella che si osserva nell'estratto totale, il che potrebbe indicare un maggior peso molecolare, attribuibile a modifiche *post*-traduzionali, probabilmente glicosilazione, cui la proteina potrebbe andare incontro prima di essere rilasciata nello spazio extracellulare.

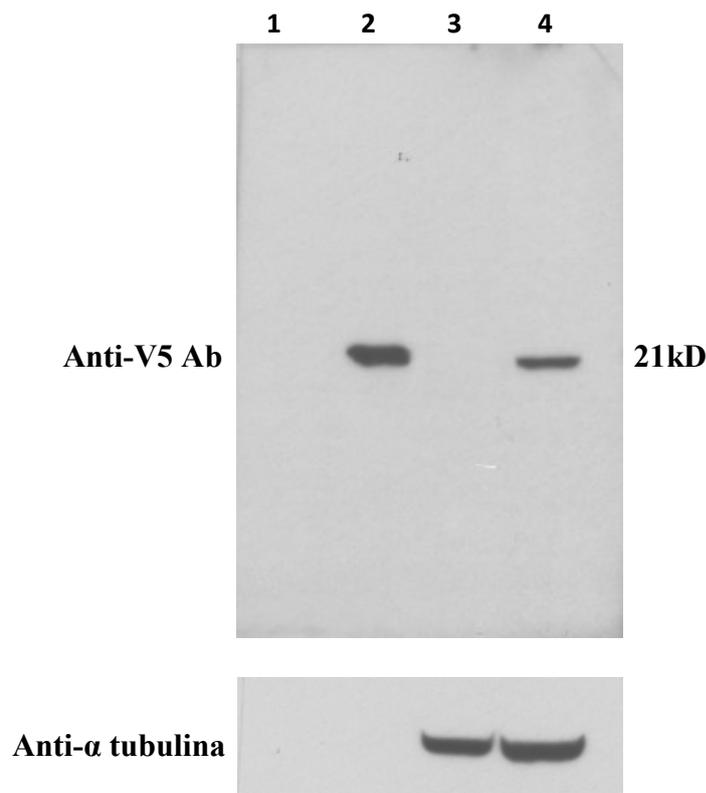


Figura 5: Western blot su estratti proteici di *Drosophila* transgeniche esperimenti ubiquitariamente il transgene *AeGGT1-V5His*. La membrana è stata incubata con un anticorpo anti-V5 (pannello in alto) e, successivamente, con un anticorpo anti- α -tubulina (pannello in basso). **lane 1:** emolinfa di femmine adulte di controllo w^{1118} ; *da-Gal4*; **lane 2:** emolinfa di femmine adulte *AeGGT1-V5His*; *da-Gal4*: è presente una proteina di circa 21kDa, corrispondente alla subunità piccola della proteina *AeGGT1-V5His* che contiene il *tag* riconosciuto dall'anticorpo utilizzato. La proteina ricombinante *AeGGT1-V5His* è dunque secreta nell'ambiente extracellulare; **lane 3:** estratto proteico totale di femmine adulte di controllo w^{1118} ; *da-Gal4*; **lane 4:** estratto proteico totale di femmine adulte *AeGGT1-V5His*; *da-Gal4*.

3.3 Analisi dell’impatto della proteina eterologa *AeGGT1* in *Drosophila melanogaster*:

L’introduzione della proteina *AeGGT1* di *A. ervi* nel suo ospite naturale, l’afide *A. pisum* induce un drammatico effetto apoptotico nelle cellule degli ovari e negli embrioni, con conseguente induzione di sterilità. Quando ho intrapreso l’analisi fenotipica delle *Drosophila* esprimenti la proteina *AeGGT1*, la prima cosa che mi sono dunque chiesta è se questa fosse in grado di produrre evidenti alterazioni delle capacità riproduttive del moscerino. A tale scopo, individui transgenici portatori delle due diverse forme di transgene *AeGGT1* sono stati incrociati con varie linee “driver” Gal4, ciascuna caratterizzata da uno specifico profilo di espressione del transattivatore. Oltre al “driver” *da-Gal4*, già sfruttato per le analisi di espressione descritte nei precedenti paragrafi, ho utilizzato un secondo “driver” con espressione ubiquitaria (*tub-Gal4*) e diversi “drivers” espressi specificamente all’interno delle ovaie, nella linea germinale o nella linea somatica (vedi materiali e metodi). Per quanto riguarda la linea germinale, ho in particolare utilizzato i “drivers” *Bam-Gal4*, con espressione nei cistoblasti e il “triple maternal driver”, una combinazione di tre costrutti Gal4 che permette di dirigere l’espressione del gene bersaglio durante tutti gli stadi dell’ovogenesi. In nessun caso l’espressione dei transgeni *AeGGT1* ha avuto un impatto sulla fertilità rilevabile a livello di popolazione. Al contrario, le colture di moscerini portatori di una copia del transgene *AeGGT1* e una copia del transgene “driver” hanno prodotto abbondante progenie, al pari delle colture di controllo, costituite da individui in cui era presente unicamente una copia del “driver”. Inoltre, analisi morfologiche di ovaie dissezionate, fissate e colorate con DAPI per evidenziare i nuclei, non hanno fornito prove evidenti di processi degenerativi in atto (vedi paragrafo successivo). Nel loro complesso questi dati indicavano che la proteina *AeGGT1* non è capace di riprodurre nel moscerino le condizioni di castrazione funzionale che si osservano nell’afide, suo bersaglio naturale.

Per tutte le successive analisi funzionali ho utilizzato esclusivamente il “driver” *da-Gal4*. Ciò mi ha consentito di analizzare l’impatto della proteina *AeGGT1* sia su singoli tessuti, sia sull’organismo *in toto*.

Dovendo da questo momento in poi eseguire analisi quantitative mirate a evidenziare anche effetti di piccola entità, era essenziale disporre di controlli isogenici, che avessero cioè la stessa costituzione genetica delle *Drosophila* esprimenti la proteina *AeGGT1*. Ho dunque sottoposto i ceppi *AeGGT1* a una serie di re-incroci con il ceppo *w¹¹¹⁸*, selezionando a ogni generazione gli individui transgenici, per un totale di 10 generazioni. La progenie dell'ultimo re-incrocio è stata infine utilizzata per stabilire una linea omozigote per il transgene e la relativa linea isogenica di controllo, semplicemente incrociando fra loro maschi e femmine, portatori del transgene in un caso o privi di esso, nell'altro.

Lo stesso schema di re-incroci è stato inoltre eseguito anche per il ceppo “driver” *da-Gal4*.

3.3.1 L'espressione della proteina *AeGGT1* non provoca riduzione della fecondità in *Drosophila*:

Ho intrapreso la caratterizzazione fenotipica delle *Drosophila* esprimenti la proteina *AeGGT1* saggiando la fecondità di singole femmine all'interno di un campione casuale della popolazione. Questo tipo di analisi consente, infatti, di mettere in evidenza anche effetti di portata limitata, che non possono essere rilevati osservando l'intera popolazione.

L'esperimento è stato condotto su un totale di 10 femmine per ciascuna linea transgenica esprime in maniera ubiquitaria la proteina eterologa *AeGGT1* e per la relativa linea di controllo, ovviamente incrociata con la stessa linea “driver” *da-Gal4*. Per ciascuna femmina è stata analizzata la capacità di deporre le uova, effettuando una conta ad intervalli di 24 ore per 5 giorni consecutivi. I risultati ottenuti, mostrati nella Figura 6, non hanno messo in evidenza differenze statisticamente significative tra le femmine *AeGGT1-V5His; da-Gal4* (pannello A) e le femmine *AeGGT1-MLGPI; da-Gal4* (pannello B) rispetto al relativo controllo.

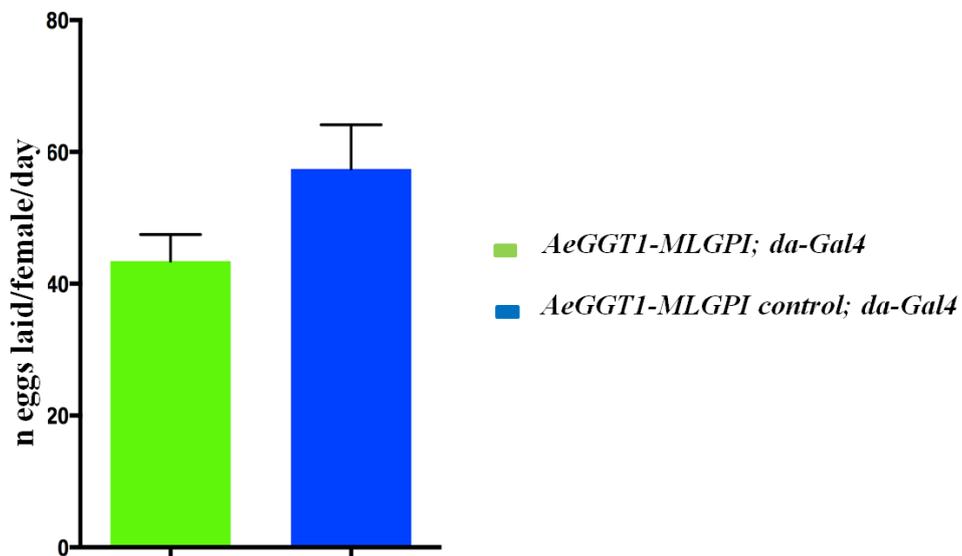
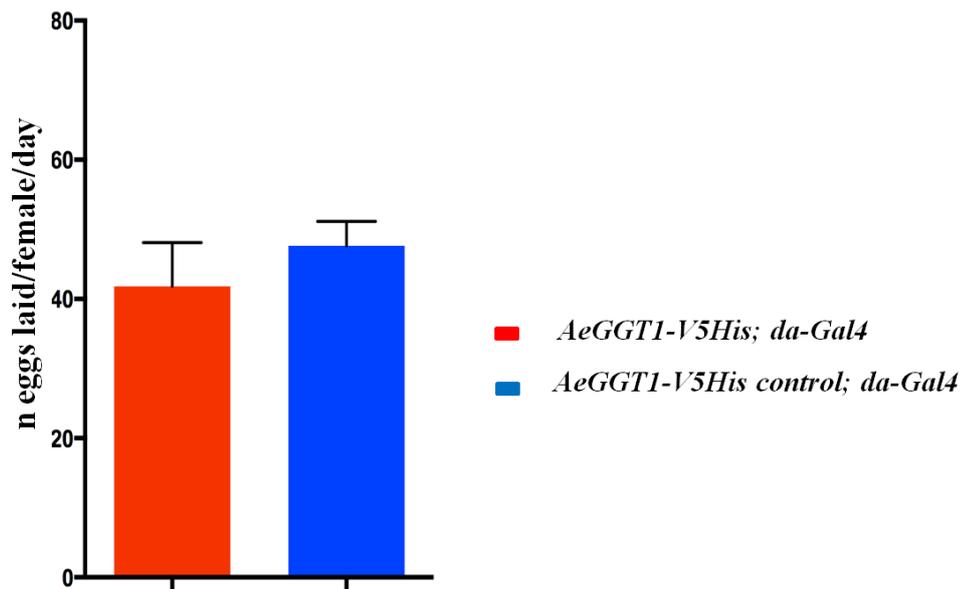
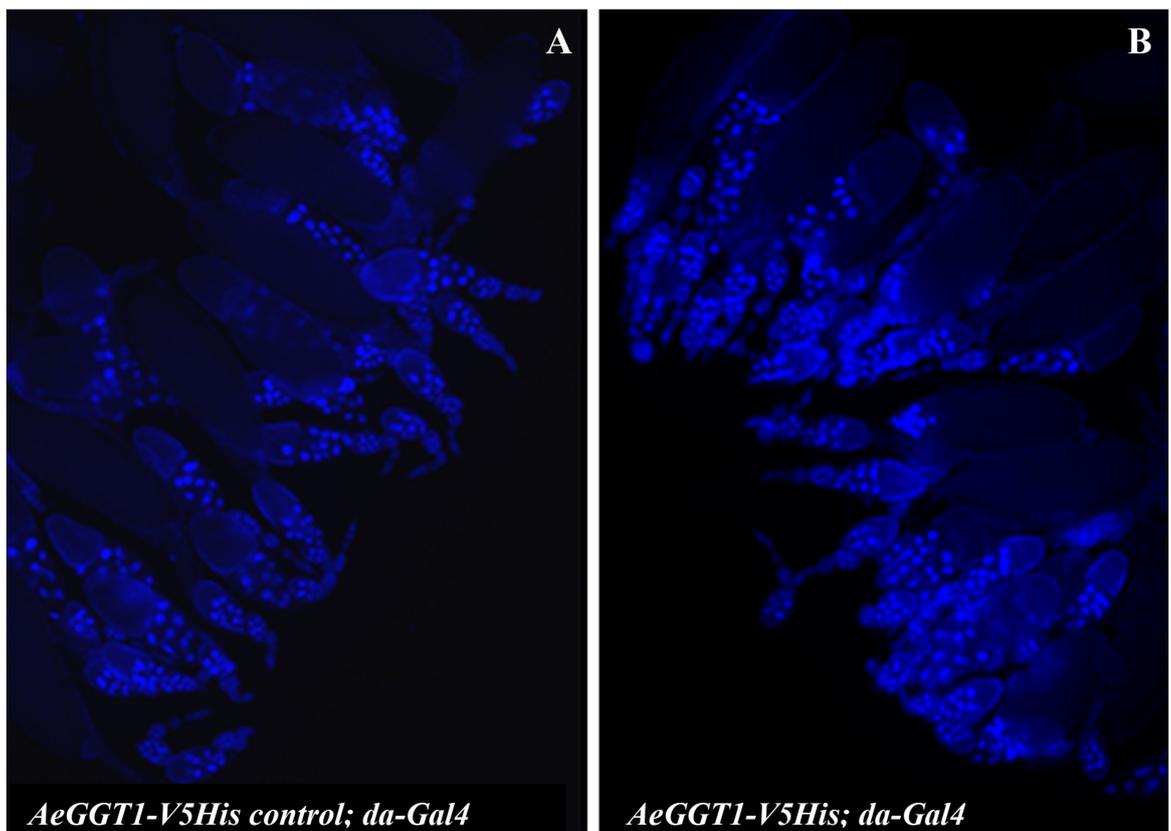


Figura 6: Test di fecondità su *Drosophila* esprimenti la proteina eterologa *AeGGT1* sotto il controllo del “driver” *da-Gal4*. (A) barra rossa: femmine *AeGGT1-V5His; da-Gal4*; barra blu: femmine di controllo. n=10. Unpaired two tailed t-test: p=0,43; t=0,8073; df=18. (B) barra verde: femmine *AeGGT1-MLGPI; da-Gal4*; barra blu: femmine di controllo. n=10. Unpaired two tailed t-test: p=0,0862; t=1,822; df=17.

3.3.2 L'espressione della proteina *AeGGT1* non altera lo sviluppo delle camere ovariche in *Drosophila*:

A completamento dell'analisi descritta nel paragrafo precedente, ho eseguito un esame morfologico delle ovaie dissezionate dalle femmine transgeniche esprimenti la proteina *AeGGT1*, fissate e colorate con DAPI per evidenziare i nuclei.

Come mostrato nella Figura 7, la presenza della proteina *AeGGT1-V5His* sia nelle cellule della linea somatica che in quelle della linea germinale (vedi Figura 4, pannelli A e B), da cui vengono presumibilmente secrete (vedi Figura 5), non altera la struttura degli ovaroli (Figura 7B). Questi contengono camere ovariche in vario grado di maturazione la cui integrità è dimostrata dalla normale morfologia dei nuclei delle cellule nutrici, che non presentano differenze rispetto al controllo (Figura 7A). Analogamente, il legame della proteina *AeGGT1-MLGPI* alle membrane cellulari (vedi Figura 4, pannelli E e F) non interferisce con lo sviluppo delle camere ovariche (Figura 7, pannello D), che producono uova mature in maniera indistinguibile dal controllo (Figura 7C).



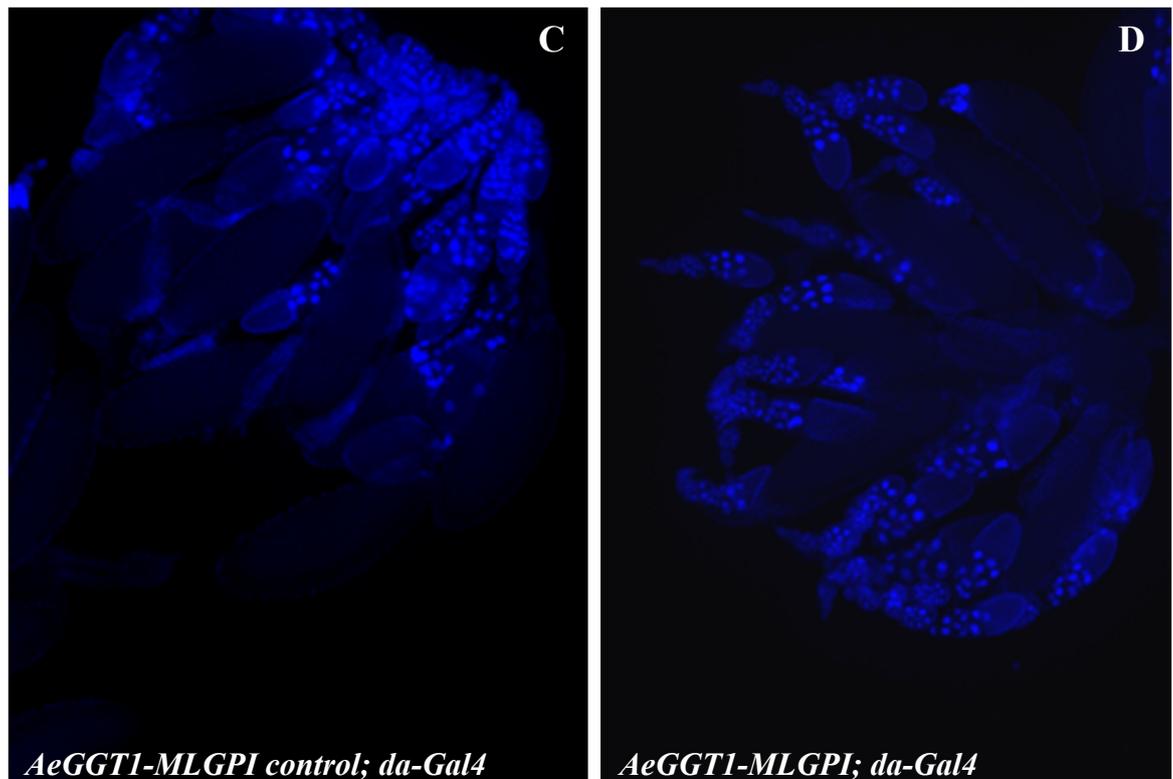


Figura 7: Ovaie di *Drosophila melanogaster* colorate con DAPI ed osservate al microscopio ottico a fluorescenza. Le ovaie delle femmine *AeGGT1-V5His; da-Gal4* (B) e *AeGGT1-MLGPI; da-Gal4* (D) presentano un normale sviluppo delle camere ovariche.

Nel loro complesso, questi dati indicano che, nelle condizioni saggiate, la proteina *AeGGT1* non ha effetto sulle capacità riproduttive della mosca (vedi discussione). Allo stato attuale, non sono tuttavia in grado di escludere che negli ovari delle femmine *AeGGT1; da-Gal4*, possano verificarsi occasionali eventi apoptotici, che non avrei potuto mettere in evidenza con le analisi descritte, ma che potranno essere rivelati mediante l'utilizzo di tecniche più specifiche e dotate di elevato grado di risoluzione.

3.3.3 Lo sviluppo di *Drosophila* non è alterato in presenza della proteina *AeGGT1*:

Come passo successivo nella caratterizzazione fenotipica delle *Drosophila* esprimenti la proteina *AeGGT1* sotto il controllo del “driver” *da-Gal4*, ho valutato il grado di successo con cui queste portano a termine il proprio sviluppo. A tale

scopo, ho calcolato il numero di individui adulti generati a partire da un numero prestabilito di uova deposte da femmine del ceppo “driver” *da-Gal4* incrociate con maschi delle linee transgeniche *AeGGT1* o con maschi di controllo. Come riportato in tabella 1, da un totale di 200 uova *AeGGT1-V5His; da-Gal4* raccolte sono nati 190 moscerini. Di questi, 84 erano femmine e 106 maschi. Confrontando questi dati con quelli del relativo controllo in cui da uno stesso numero di uova sono nati 175 moscerini, 80 femmine e 95 maschi, non si osservano differenze statisticamente significative. Analogamente, il numero di 181 moscerini, di cui 91 femmine e 90 maschi, generati da 200 uova *AeGGT1-MLGPI; da-Gal4* è paragonabile a quello ottenuto per il controllo, pari a 167 moscerini, 79 femmine e 88 maschi.

| Incroci | ♂ <i>AeGGT1-V5His</i> | ♂ <i>AeGGT1-V5His control</i> | ♂ <i>AeGGT1-MLGPI</i> | ♂ <i>AeGGT1-MLGPI control</i> |
|---------|-----------------------|-------------------------------|-----------------------|-------------------------------|
| | x | x | x | x |
| | ♀ <i>da-Gal4</i> | ♀ <i>da-Gal4</i> | ♀ <i>da-Gal4</i> | ♀ <i>da-Gal4</i> |
| N | 190 | 175 | 181 | 167 |
| % | 95 | 87,5 | 87 | 83,5 |

Tabella 1: Analisi di sopravvivenza durante l'intero sviluppo pre-imaginale. N: Mosche adulte nate da un numero fisso di 200 uova deposte, raccolte nell'arco di quattro giorni, in gruppi di 50 al giorno; %: Percentuale di uova che si sono sviluppate in adulti. Test del chi-quadro: $p > 0,01$.

I risultati ottenuti dimostrano che le Drosophile che esprimono la proteina *AeGGT1* sotto il controllo del “driver” *da-Gal4* si sviluppano normalmente.

In sintesi, questa prima serie di analisi fenotipiche ha indicato che, nelle normali condizioni di allevamento, la proteina eterologa *AeGGT1* non influisce nè sulla vitalità nè sulla fertilità dei moscerini *AeGGT1; da-Gal4*. Tuttavia, poiché gli enzimi γ -glutamyl transpeptidasi sono coinvolti nella regolazione dell'equilibrio *redox*, sia all'interno della cellula, sia a livello della membrana cellulare, rimaneva

aperta la possibilità che l'espressione della proteina *AeGGT1* avesse un impatto sulle risposte cellulari della *Drosophila* a condizioni di *stress*.

3.3.4 L'espressione della proteina *AeGGT1* aumenta la resistenza della *Drosophila* allo *stress* ossidativo:

Visto il ruolo antiossidante attribuito da molteplici dati di letteratura alle γ -glutamyl transpeptidasi in quanto enzimi chiave nel metabolismo del glutatione, ho saggiato l'ipotesi che la proteina *AeGGT1* potesse influenzare le risposte della *Drosophila* a condizioni di *stress* ossidativo. A tale scopo, ho sottoposto i moscerini, esprimenti questa proteina, a somministrazione orale di perossido d'idrogeno e analizzato gli effetti del trattamento a livello di intero organismo, andando a valutare la sopravvivenza degli individui trattati. L'esperimento è stato condotto a 25°C in condizioni di umidità controllate, registrando il numero di individui morti, ad intervalli regolari di 12 ore. I risultati ottenuti sono riportati nella Figura 8 che presenta le curve di sopravvivenza ottenute cumulando i dati di tre esperimenti indipendenti. Queste curve dimostrano che, in condizioni di uno *stress* ossidativo acuto che provoca mortalità, le femmine *AeGGT1-V5His*, *da-Gal4* e *AeGGT1-MLGPI; da-Gal4* rimangono in vita più a lungo dei relativi controlli isogenici.

Le differenze che si osservano fra le curve di sopravvivenza delle femmine *AeGGT1-V5His*, *da-Gal4* o *AeGGT1-MLGPI; da-Gal4*, e quelle dei rispettivi controlli sono altamente significative ($p < 0,0005$). Non vi è invece differenza fra le curve di sopravvivenza delle femmine che esprimono i due diversi tipi di proteine *AeGGT1*, quella solubile secreta e quella legata a membrana. L'assenza di differenza fra le curve dei due controlli funge da controllo interno dell'esperimento.

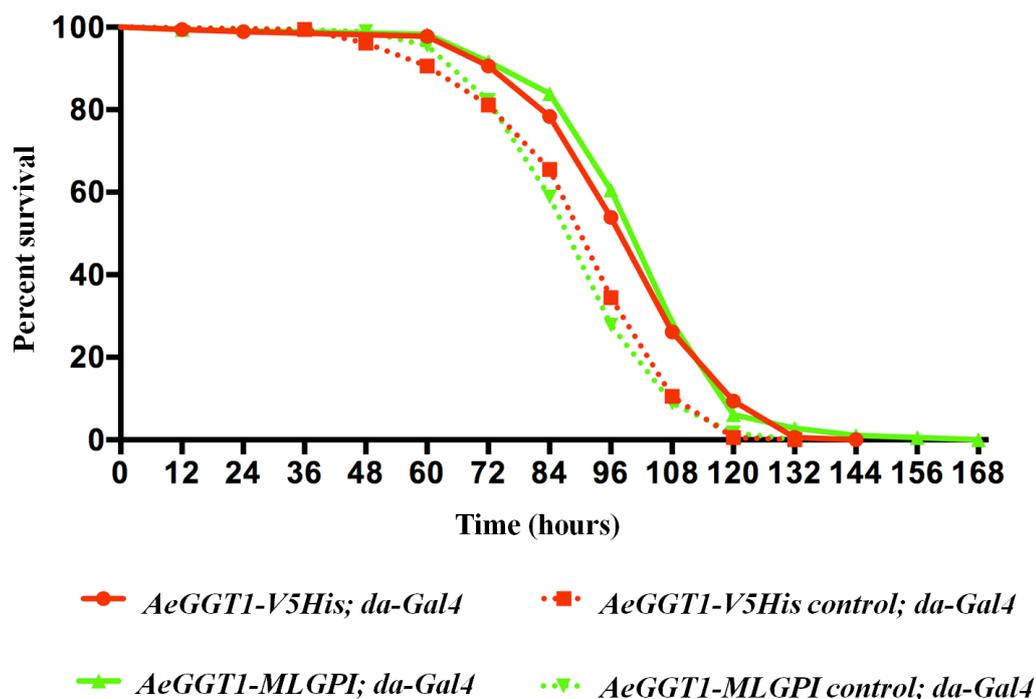


Figura 8: Sopravvivenza di *Drosophile* transgeniche esprimenti la proteina *AeGGT1*, in seguito a somministrazione di una dose letale di perossido di idrogeno. **linea rossa continua:** femmine esprimenti la forma secreta *AeGGT1-V5His* (n=180); **linea rossa tratteggiata:** femmine di controllo per *AeGGT1-V5His* (n=180); **linea verde continua:** femmine esprimenti la forma ancorata a membrana *AeGGT1-MLGPI* (n=180); **linea verde tratteggiata:** femmine di controllo per *AeGGT1-MLGPI* (n=180). I moscerini che esprimono la proteina *AeGGT1* sono più resistenti allo *stress* ossidativo rispetto ai controlli (logrank test: $p < 0,0005$).

Questi dati dimostrano che la proteina *AeGGT1*, indipendentemente dalla forma in cui è presente nell'ambiente extracellulare, libera o associata alla membrana plasmatica, conferisce resistenza allo *stress* ossidativo.

3.3.5 L'attività γ -glutammina transpeptidasi è ridotta nelle *Drosophile* esprimenti la proteina *AeGGT1*:

I dati ottenuti sottoponendo a *stress* ossidativo le *Drosophile* esprimenti la proteina *AeGGT1* erano piuttosto inattesi. Il fatto che questa proteina svolga una funzione protettiva nei confronti di una specie ossidante, il perossido di idrogeno, appariva infatti in antitesi con il ruolo pro-apoptotico osservato nei tessuti ovarici

dell'afide che, al contrario, suggerisce un meccanismo di azione favorente lo *stress* ossidativo. Per formulare un'ipotesi che permettesse di riconciliare questi dati a prima vista contrastanti era necessario acquisire un'informazione essenziale, definire cioè se e come variano i livelli di attività γ -glutammina transpeptidasi nelle *Drosophila* esprimenti la proteina *AeGGT1*.

L'attività γ -glutammina transpeptidasi è stata dunque misurata in estratti proteici totali di femmine transgeniche *AeGGT1-V5His; da-Gal4* e *AeGGT1-MLGPI; da-Gal4* e femmine di controllo, mediante un saggio enzimatico colorimetrico che utilizza il substrato sintetico L- γ -Glutammina-p-nitroanilide. Il rilascio di un prodotto di reazione colorato, il p-nitroanilide, è stato monitorato nel tempo mediante lettura spettrofotometrica a 418 nm. L'esperimento è stato ripetuto tre volte su campioni indipendenti e i risultati ottenuti, riportati nella Figura 9, mostrano che l'attività γ -glutammina transpeptidasi è ridotta nei moscerini che esprimono ubiquitariamente la proteina *AeGGT1*. Le differenze fra l'attività osservata nelle femmine *AeGGT1-V5His, da-Gal4* o *AeGGT1-MLGPI; da-Gal4* e quella misurata nelle femmine di controllo sono altamente significative ($p < 0,005$). Non vi è invece differenza di attività γ -glutammina transpeptidasi fra i campioni derivanti da femmine che esprimono i due diversi tipi di proteine *AeGGT1*, quella solubile secreta e quella legata a membrana.

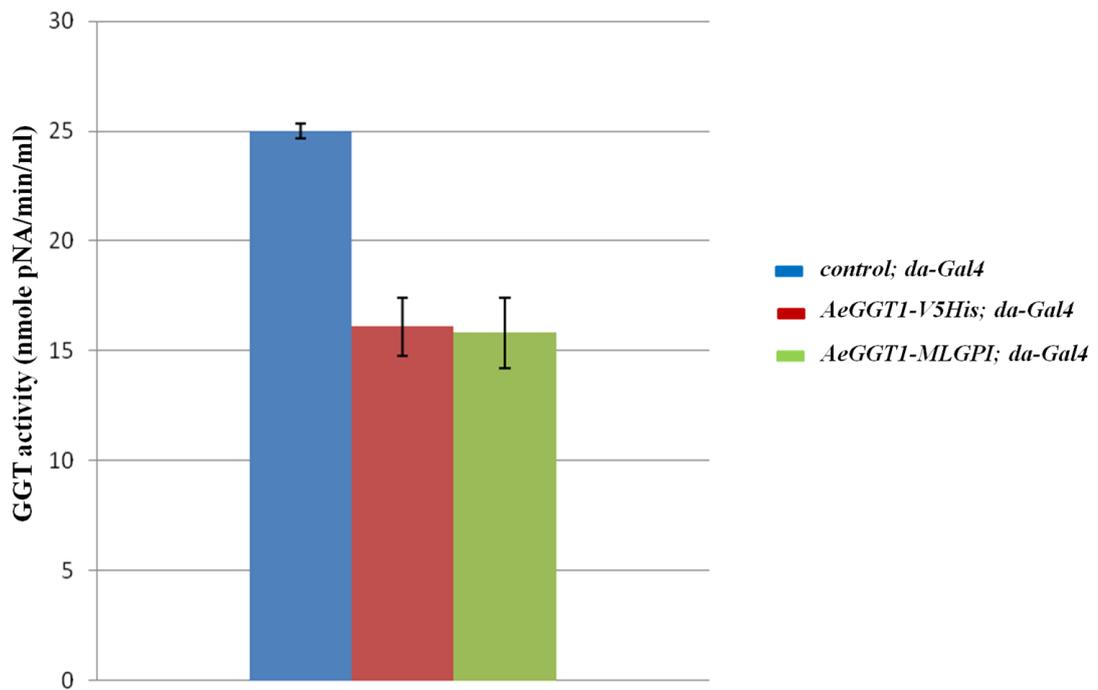


Figura 9: Attività catalitica γ -glutammina transpeptidasi in estratti proteici crudi di Drosophila transgeniche esprimenti la proteina *AeGGT1*. Ciascuna barra (rossa: femmine esprimenti la forma secreta *AeGGT1-V5His*; verde: femmine esprimenti la forma ancorata a membrana *AeGGT1-MLGPI*; blu: femmine di controllo) rappresenta la media \pm SEM (Errore Standard Medio) di tre esperimenti indipendenti. I moscerini che esprimono la proteina *AeGGT1* hanno un'attività γ -glutammina transpeptidasi inferiore rispetto al controllo. (test Anova a una via: $p < 0,005$).

Questi dati suggerivano che la proteina *AeGGT1* possa essere un enzima cataliticamente inattivo o scarsamente efficiente che interferisce con l'attività delle γ -glutammina transpeptidasi endogene di *Drosophila*.

3.3.6 Il silenziamento del gene *DmGGT1* aumenta la resistenza allo stress ossidativo:

Nel genoma di *Drosophila* sono presenti 4 geni codificanti per γ -glutammina transpeptidasi. *DmGGT1*, la più abbondante di queste proteine, è responsabile dell'80% circa dell'attività γ -glutammina transpeptidasi misurata (Liu et al., 2014).

Se la riduzione dell'attività γ -glutammina transpeptidasi da me evidenziata nelle *Drosophila* che esprimono la proteina *AeGGT1* è dovuta ad interferenza di questa

proteina con i corrispondenti enzimi endogeni, regolando negativamente l'attività del gene codificante per la proteina *DmGGT1*, si dovrebbe indurre un aumento di resistenza allo *stress* ossidativo, analogo a quello osservato nelle *Drosophila* esprimenti la proteina *AeGGT1*.

Per verificare la mia ipotesi ho dunque silenziato il gene *DmGGT1*. Per far ciò, mi sono servita ancora una volta del sistema binario Gal4-UAS, utilizzando un ceppo di *Drosophila* in cui è presente un transgene che, trascritto sotto il controllo delle sequenze regolatrici *UAS*, produce un RNA a doppio filamento diretto contro il gene *DmGGT1*. Questo ceppo è stato incrociato con il ceppo "driver" *da-Gal4* e la progenie ottenuta è stata analizzata per accertare, innanzitutto, che il gene *DmGGT1* fosse effettivamente silenziato. In Figura 10 sono mostrati i risultati degli esperimenti di qRT-PCR eseguiti a questo scopo. Essi dimostrano che il livello di accumulo del trascritto *DmGGT1* è significativamente ridotto nelle femmine adulte in cui il gene è sottoposto ad interferenza, raggiungendo un valore che è meno di un quarto di quello che si osserva nelle femmine di controllo ($p < 0,005$).

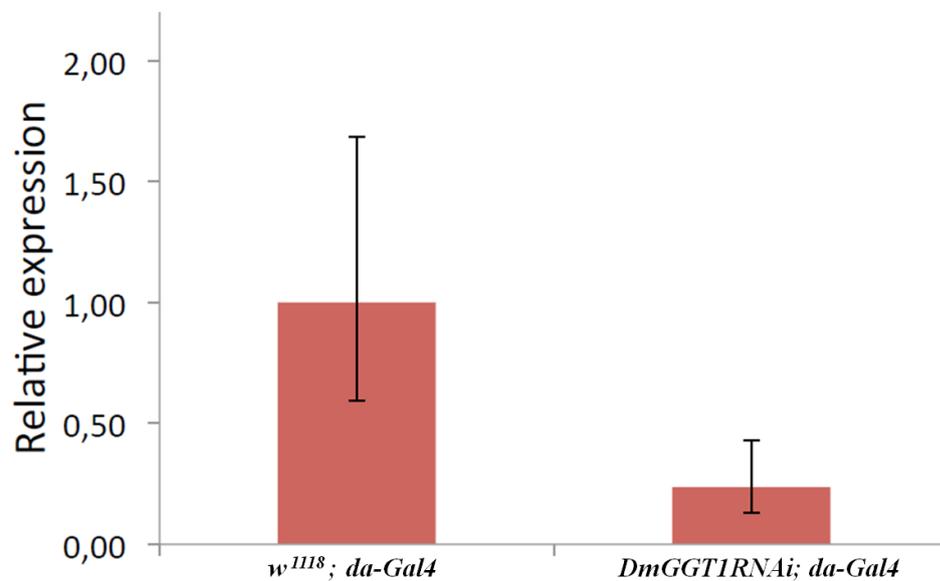


Figura 10: Analisi di espressione del gene *DmGGT1* mediante qRT-PCR. I livelli del trascritto sono significativamente più bassi nelle femmine che producono uno specifico dsRNA diretto contro il gene *DmGGT1* (*DmGGT1RNAi; da-Gal4*) rispetto a femmine di controllo (*w¹¹¹⁸; da-Gal4*). (student t-test: $t = - 9,360$; $p < 0,005$).

Il silenziamento del gene *DmGGT1* non ha prodotto evidenti alterazioni di sviluppo, fertilità o sopravvivenza nelle normali condizioni di allevamento delle *Drosophile*. Quando però le femmine sono state esposte al perossido di idrogeno mediante somministrazione per via orale, esse hanno manifestato una maggiore resistenza al trattamento rispetto a femmine di controllo. I risultati ottenuti sono riportati nella Figura 11 che mostra le curve di sopravvivenza ottenute cumulando i dati di tre esperimenti indipendenti. Anche in questo caso, gli esperimenti sono stati condotti a 25°C in condizioni di umidità controllate, registrando il numero di individui morti, ad intervalli regolari di 12 ore. Le femmine in cui l'attività γ -glutamyl transpeptidasi è stata ridotta mediante silenziamento del gene *DmGGT1* soccombono più lentamente al trattamento con il composto ossidante rispetto a femmine di controllo, comportandosi dunque in maniera analoga alle femmine che esprimono la proteina *AeGGT1*. Le differenze che si osservano fra le relative curve di sopravvivenza sono, anche in questo caso, altamente significative ($p < 0,0005$).

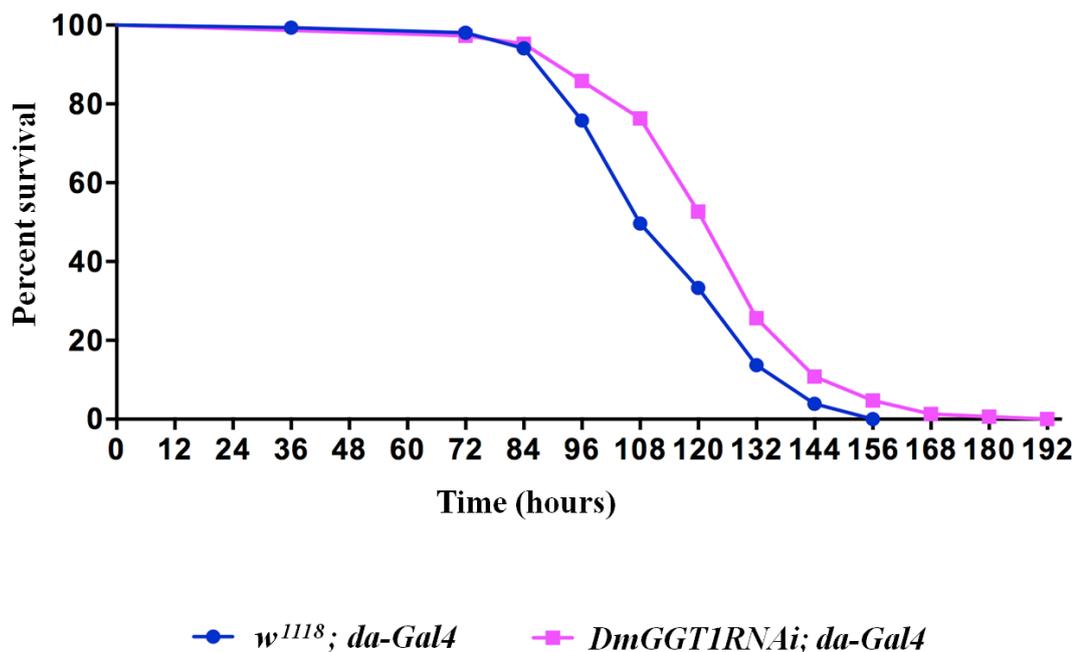


Figura 11: Sopravvivenza di *Drosophile* sottoposte a silenziamento del gene *DmGGT1* e trattate con una dose letale di perossido di idrogeno. linea rosa: femmine *DmGGT1RNAi; da-Gal4*, esprimenti un dsRNA diretto contro il gene *DmGGT1* (n=180) linea blu: femmine di

controllo *w¹¹⁸*; *da-Gal4* (n=140). I moscerini in cui il gene *DmGGT1* è silenziato sono più resistenti allo *stress* ossidativo rispetto al controllo (logrank test: $p < 0,0005$).

In definitiva, questi risultati identificano una chiara relazione causale fra diminuzione dell'attività γ -glutammil transpeptidasi ed aumento della resistenza al trattamento con un composto che induce *stress* ossidativo, fornendo al contempo valido supporto all'ipotesi che la proteina eterologa *AeGGT1* possa inibire l'attività delle γ -glutammil transpeptidasi endogene.

4. Discussione

Le γ -glutamminil transpeptidasi sono proteine altamente conservate in tutti gli organismi viventi, sia procarioti che eucarioti (Castellano et al., 2012). Sebbene l'importanza rivestita da questi enzimi nel metabolismo del glutatione e nel trasporto degli amminoacidi sia nota da lungo tempo, la maggior parte delle conoscenze relative ad essi deriva da studi condotti nei mammiferi, mentre veramente poche sono le informazioni disponibili sul loro ruolo fisiologico negli insetti.

Gli studi funzionali condotti in precedenza sulla proteina *AeGGT1* del parassitoide *Aphidius ervi* avevano dimostrato la sua capacità di provocare apoptosi negli ovari dell'afide ospite, bloccando l'ovogenesi (Falabella et al., 2007). Ciò aveva suggerito che, così come nei mammiferi (Del Bello et al., 1999), anche negli insetti l'attività delle γ -glutamminil transpeptidasi abbia un significativo impatto sul delicato equilibrio esistente fra i meccanismi che promuovono la sopravvivenza e quelli contrari che invece inducono morte cellulare, ma le modalità di azione della proteina *AeGGT1* non erano state specificamente affrontate (Falabella et al., 2007)

Il sistema di espressione eterologa della proteina *AeGGT1* che ho allestito in *Drosophila melanogaster* mi ha permesso di investigare quest'aspetto in maniera mirata e di formulare, sulla base dei risultati ottenuti, un modello che potrà in futuro essere verificato negli afidi parassitizzati.

Le analisi fenotipiche eseguite sulle linee transgeniche non hanno in realtà messo in evidenza alterazioni della fecondità o dei processi di sviluppo della *Drosophila*, indipendentemente dalla localizzazione cellulare della proteina di fusione eterologa. Nelle condizioni sperimentali da me utilizzate per indurre l'espressione, né la forma secreta, né quella ancorata alla membrana cellulare hanno innescato in *Drosophila* quei drammatici fenomeni apoptotici che la proteina naturale provoca negli afidi parassitizzati colpendo sia le cellule germinali sia gli embrioni che in questi insetti si sviluppano all'interno del corpo della madre.

Non è al momento possibile escludere che l'apparente assenza di alterazioni di fertilità nelle *Drosophila* esprimenti la proteina *AeGGT1* sia in realtà dovuta a un

insufficiente livello di espressione delle proteine ricombinanti.

La quantità di proteina *AeGGT1* purificata, utilizzata negli esperimenti con cui si è dimostrata la sua capacità di indurre apoptosi negli ovari dell'afide, corrispondeva a circa un quinto di quella contenuta nel veleno di un'intera femmina, una quantità davvero enorme (Falabella et al., 2007).

Bisogna inoltre tener presente che nel veleno di *Aphidius ervi* sono presenti, oltre alla proteina *AeGGT1*, anche altre due γ -glutammina transpeptidasi che potrebbero svolgere una funzione analoga, contribuendo all'induzione di apoptosi. Sulla base di dati riportati di recente, ottenuti con un approccio combinato di trascrittomica e proteomica, è possibile avere un'idea dell'abbondanza delle tre proteine *AeGGT* rispetto alle altre proteine del veleno (Colinet et al., 2014). L'analisi trascrittomica ha infatti identificato 539 sequenze EST per le proteine *AeGGT* e 169 EST per tutte le altre proteine del veleno, corrispondenti rispettivamente a 177 e 132 peptidi identificati mediante analisi proteomica. E' dunque possibile stimare che le proteine *AeGGT* costituiscano almeno un terzo dell'intero contenuto proteico del veleno.

E' stato, infine, dimostrato in un altro studio che una femmina di *Aphidius ervi* inietta all'atto dell'ovideposizione ben quattro nanogrammi della/e proteine *AeGGT* in ciascun afide (Nguyen et al., 2013). Una rapida successione di punture, frequentemente osservata nel caso di questo parassitoide, può poi ulteriormente incrementare la concentrazione delle proteine *AeGGT*, così come quella delle altre componenti del veleno, nell'emolinfa dell'afide, con conseguente aumento di efficienza dell'effetto di castrazione.

Sulla base di queste osservazioni, è ragionevole ritenere che la degenerazione dei tessuti ovarici che si osserva negli afidi parassitizzati è il risultato dell'azione di una grossa quantità di proteina *AeGGT1* che, molto probabilmente, funziona di concerto con le altre due isoforme. Nelle condizioni sperimentali da me utilizzate per l'espressione eterologa in *Drosophila*, la quantità di proteina *AeGGT1* prodotta potrebbe invece non raggiungere una soglia critica, necessaria a scatenare l'apoptosi.

E' però anche possibile che le cellule germinali dell'afide e della *Drosophila* abbiano diverse caratteristiche fisiologiche che le rendono diversamente suscettibili ad alterazioni dell'omeostasi del GSH legate all'azione della proteina

AeGGT1. Di fatto, le due specie di insetti hanno modalità riproduttive molto diverse, basti pensare che mentre la *Drosophila* si riproduce per via sessuale, l'afide *A. pisum* si riproduce essenzialmente per via partenogenetica, anche se, al variare del fotoperiodo, diviene in grado di formare gameti aploidi.

Va anche rilevato che le riserve di GSH intra- ed extra-cellulare variano da organismo a organismo, da cellula a cellula, e, all'interno della stessa cellula, tra i vari compartimenti citoplasmatici, determinando una diversa sensibilità di ciascun tipo cellulare a fattori di *stress*, sia endogeni che esogeni. In virtù di tali differenze, le cellule germinali di *Drosophila* potrebbero rispondere ad un potenziale squilibrio indotto dalla proteina *AeGGT1* in maniera diversa rispetto a quelle dell'afide. In queste ultime, anche alterazioni limitate dell'omeostasi del GSH potrebbero tradursi in effetti drammatici sulla sopravvivenza cellulare. Ciò potrebbe tra l'altro aver fatto sì che questo tripeptide, ed il suo metabolismo, diventassero bersagli molto sensibili, utilizzati dal parassitoide per distruggere la fisiologia del suo ospite.

Un approccio da mettere in atto per cercare di aumentare l'espressione dei transgeni, e quindi produrre una quantità maggiore della proteina eterologa *AeGGT1*, consiste nel generare individui in cui sono presenti due copie del transgene *AeGGT1*. Potrebbe inoltre essere utile combinare due o più costrutti "drivers" che esprimono il trans-attivatore Gal4. E' infatti noto che con il sistema binario Gal4-UAS ed in particolare con il "driver" *da-Gal4* i livelli di espressione dei transgeni bersaglio non sono uguali nell'ambito di uno stesso tipo cellulare, ma possono essere anche molto diversi da cellula a cellula.

Se la proteina *AeGGT1* dovesse comunque avere un impatto limitato sulla fertilità della *Drosophila*, eventuali alterazioni delle cellule germinali potranno essere messe in evidenza solo facendo ricorso a metodologie di analisi particolarmente sensibili. La colorazione DAPI, ampiamente utilizzata per visualizzare camere ovariche in apoptosi nelle ovaie di *Drosophila*, non permette infatti di rivelare eventi che si verificano con bassa frequenza a livello di singole cellule staminali/cistoblasti o in singole cellule follicolari. Per raggiungere dunque un maggior grado di risoluzione mi accingo ad impiegare la tecnica TUNEL (Sarkissian et al., 2014).

Indipendentemente dal fatto se, in condizioni fisiologiche normali, la proteina *AeGGT1* sia o meno in grado di influenzare i processi metabolici e/o di sviluppo della *Drosophila*, la sua espressione ubiquitaria ha senz'altro un impatto significativo sulla risposta del moscerino a condizioni di *stress* ossidativo. I dati ottenuti hanno infatti dimostrato che la proteina esogena sortisce un effetto "benefico", determinando un aumento del tasso di sopravvivenza in seguito a esposizione al perossido di idrogeno. Il risultato era inatteso, considerati gli effetti apoptotici indotti dalla proteina *AeGGT1* negli afidi. Ad ogni modo, abbiamo inizialmente ipotizzato che le mosche transgeniche mostrassero una maggiore resistenza allo *stress* ossidativo grazie ad un accumulo intracellulare di GSH, dovuto al sommarsi dell'attività γ -glutammina transpeptidasi della proteina eterologa con quella degli enzimi endogeni della *Drosophila*. E' infatti noto che cellule neoplastiche umane che sovraesprimono una γ -glutammina transpeptidasi sulla superficie cellulare sono più resistenti a trattamenti chemio-terapici. L'espressione della GGT fornisce a queste cellule accesso a fonti aggiuntive di cisteina e cistina derivanti da GSH e GSSG presenti nel fluido interstiziale, permettendo loro di mantenere alti livelli di glutatione intracellulare e quindi preservare il proprio equilibrio *redox* durante l'attacco di specie reattive dell'ossigeno generate dalle terapie antitumorali pro-ossidanti (Hanigan, 2014). Ne consegue che queste cellule non vanno incontro a morte per apoptosi o necrosi. E' stato inoltre dimostrato che i livelli di espressione della GGT correlano con la resistenza allo *stress* ossidativo anche in cellule normali. Ad esempio, si è osservato che attività GGT e sintesi intracellulare del GSH aumentano in cellule polmonari di ratto sottoposte a trattamento con dosi subletali di una sostanza tossica che induce la formazione di specie reattive dell'ossigeno. Queste cellule sono capaci di adattarsi allo *stress* ossidativo, ma perdono questa capacità di adattamento se vengono pre-trattate con acivicina, un inibitore della GGT (Liu et al., 1996).

Invece, nelle nostre mosche transgeniche esprimenti la proteina *AeGGT1*, l'accresciuta resistenza allo *stress* ossidativo indotto dal perossido di idrogeno non corrisponde ad un aumento complessivo di attività γ -glutammina transpeptidasi. Al contrario, questa attività è risultata ridotta rispetto ai controlli. Ciò suggerisce che

la proteina *AeGGT1* è un enzima cataliticamente inattivo o scarsamente efficiente che interferisce con l'attività degli enzimi GGT endogeni di *Drosophila*.

Un primo elemento a sostegno di questo modello emerge dal confronto della sequenza amminoacidica della proteina *AeGGT1* con quelle di altre GGT funzionali di organismi eucarioti e procarioti. Ho infatti riscontrato che l'enzima del veleno di *Aphidius ervi* manca di un residuo di treonina conservato, ritenuto essenziale per l'attività catalitica (Figura 1) (Castellano et al., 2012). Studi di mutagenesi condotti sulla GGT di *H. pylori* hanno dimostrato che sostituendo questa treonina, situata in posizione 398, con una alanina, l'attività catalitica viene azzerata, mentre la sua sostituzione con una serina determina una riduzione dell'efficienza catalitica dell'enzima di un fattore 10 rispetto all'enzima non mutato. E' stato dunque ipotizzato che questo residuo di treonina formi una diade catalitica con un'altra treonina situata in posizione 380, identificata in precedenza come residuo nucleofilo che svolge la catalisi nella reazione di idrolisi del legame γ -glutamminico (Boanca et al., 2007). Nella proteina *AeGGT1*, in posizione corrispondente alla treonina 398 di *H. pylori* è presente proprio una serina, il che è in perfetto accordo con i dati ottenuti in *Drosophila*. Infatti, dato che la treonina 398 è necessaria solo per l'attivazione della treonina catalitica, ma non per il legame del glutatione, la proteina *AeGGT1* potrebbe competere con le GGT endogene di *Drosophila* per il legame al substrato, ma non essere poi in grado di portare avanti la reazione di catalisi con la stessa velocità. Questo modello spiega tra l'altro la perfetta equivalenza delle due diverse forme ricombinanti della proteina *AeGGT1* che ho espresso in *Drosophila*, il cui comportamento si è rivelato del tutto sovrapponibile, sia nei saggi di resistenza allo *stress* ossidativo, sia in quelli di attività. Un meccanismo di azione di tipo competitivo si adatta infatti ugualmente bene alla proteina eterologa *AeGGT1* legata alla membrana plasmatica e a quella libera nell'ambiente extracellulare.

E' importante rilevare che le altre due GGT del veleno di *Aphidius ervi* presentano la stessa sostituzione treonina-serina che ho riscontrato nella proteina *AeGGT1*, a sostegno dell'ipotesi che esse possano condividere lo stesso meccanismo di azione e dunque agire in maniera additiva. Tra l'altro, una di esse, la proteina *AeGGT3*, presenta due sostituzioni amminoacidiche aggiuntive in residui ritenuti essenziali

per l'attività catalitica (Colinet et al., 2014). *AeGGT1* e *AeGGT2* presentano poi un'altra caratteristica strutturale che le differenzia dagli enzimi funzionali degli altri organismi, l'assenza di una regione denominata *lid loop*. Sebbene il suo ruolo non sia stato ancora stato chiarito, l'identificazione di questa breve sequenza non solo negli enzimi eucarioti ma anche nella proteina *HpGGT1* di *Helicobacter pylori* che si sa essere molto attiva, suggerisce che essa possa avere un'importanza funzionale (Shibayama et al., 2003; Castellano et al., 2012).

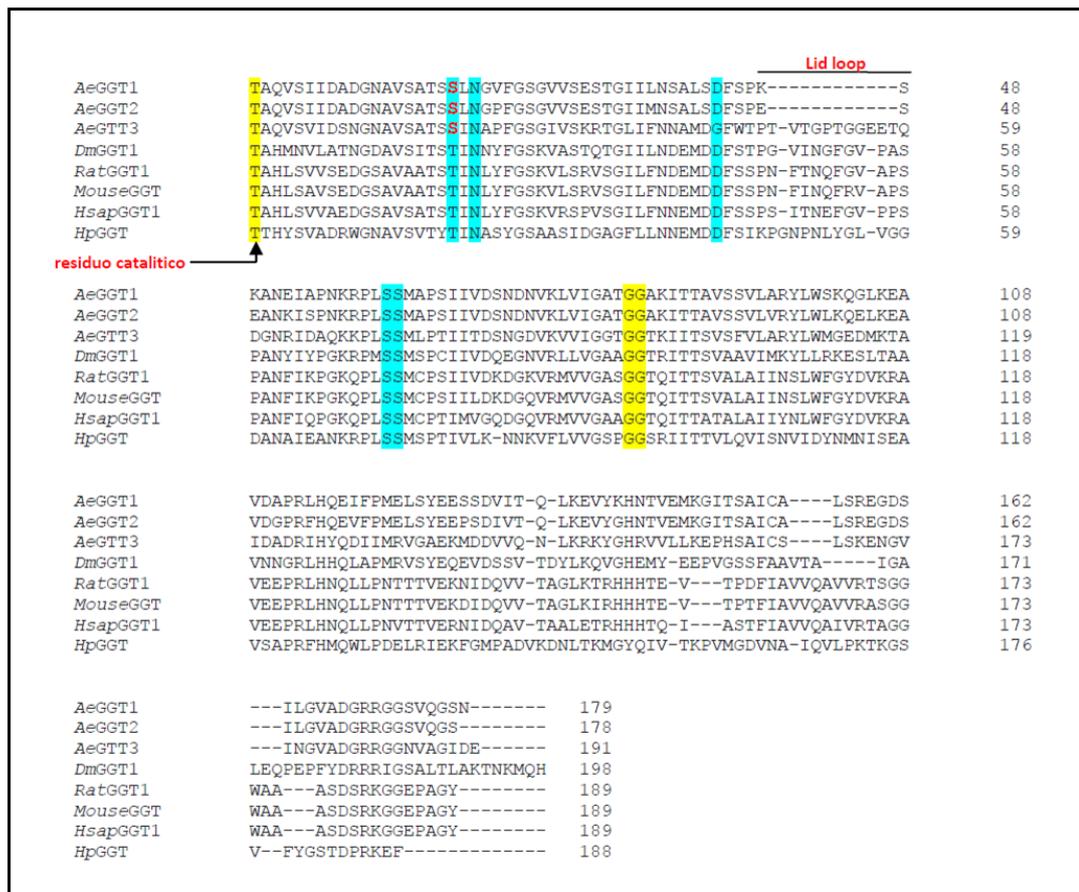


Figura 1: Allineamento multiplo delle sequenze amminoacidiche della subunità piccola delle GGT derivanti da diversi organismi. Sono incluse le proteine *AeGGT1*, *AeGGT2*, *AeGGT3* del veleno di *Aphidius ervi*; la proteina *DmGGT1* di *Drosophila melanogaster*; la GGT1 di ratto; la GGT di topo; la GGT1 umana; la *HpGGT* di *Helicobacter pylori*. L'allineamento è stato eseguito utilizzando il metodo Clustal Omega (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/). In giallo sono evidenziati il residuo di treonina conservato (T), responsabile dell'autoprocessamento e dell'attività catalitica dell'enzim e due residui di glicina (G) altamente conservati coinvolti nel legame con il gruppo γ -glutammile. Gli altri residui che partecipano al legame con il substrato e all'attività catalitica sono evidenziati in ciano. Il *lid loop*, che si estende verso la zona del sito attivo ed è assente in *AeGGT1* e *AeGGT2*, è indicato da una linea nera. In rosso è infine marcato il

residuo di serina che in tutte e tre le GGT del veleno di *Aphidius ervi* sostituisce una seconda treonina conservata. Quest'ultima forma con la prima treonina una diade catalitica (Boanca et al., 2007).

Nei moscerini che esprimono un *dsRNA* diretto contro il gene *DmGGT1* di *Drosophila* ho osservato un incremento della resistenza allo *stress* ossidativo, così come nei moscerini che esprimono la proteina *AeGGT1*. Questo risultato avvalorava ulteriormente, seppur in maniera indiretta, un meccanismo d'azione di questa proteina basato sull'interferenza con l'attività delle GGT endogene.

La proteina *DmGGT1* è la più abbondante GGT funzionale di *Drosophila*: in un mutante nullo è stata infatti misurata un'attività GGT pari al 20% circa di quella presente nei moscerini di controllo (Liu et al., 2014). Sulla base di questa stima e considerando l'entità del silenziamento ottenuto nei miei esperimenti (Figura 10), negli individui in cui il gene *DmGGT1* è stato sottoposto ad interferenza l'attività GGT dovrebbe essere inferiore a quella registrata nelle *Drosophila* esprimenti la proteina *AeGGT1*. L'incremento di resistenza allo *stress* ossidativo è invece maggiore: la differenza fra le mediane di sopravvivenza degli individui esprimenti la proteina *AeGGT1* e i relativi controlli è pari a 12 ore, mentre nel caso degli individui sottoposti ad interferenza del gene *DmGGT1* questa differenza è di 24 ore.

Ma come interpretare la risposta delle *Drosophila* con ridotti livelli di attività GGT allo *stress* ossidativo indotto dalla somministrazione orale di perossido di idrogeno? Una possibile spiegazione è che, diminuendo il tasso di idrolisi del glutatione, questo si accumuli extracellularmente. Un aumento di concentrazione di glutatione a ridosso delle membrane cellulari potrebbe a sua volta proteggere le cellule di *Drosophila*, in particolare quelle dell'intestino, dallo *stress* ossidativo esogeno. Questo modello trova supporto in svariati dati di letteratura. È stato dimostrato mediante esperimenti condotti *in vivo* nel topo che l'inibizione sistemica della GGT porta ad un aumento dei livelli plasmatici di glutatione; analogamente, esperimenti effettuati *in vitro* su cellule linfoidi umane esprimenti diversi livelli di GGT legata alla membrana plasmatica hanno evidenziato come il glutatione si accumuli nel mezzo stesso se e solo se l'attività GGT è molto bassa o

inibita in maniera sostanziale; infine, l'analisi fenotipica di topi mutanti completamente privi di attività GGT, ottenuti mediante *knockout* del corrispondente gene, hanno confermato che la deficienza di attività γ -glutammina transpeptidasi porta ad un aumento dei livelli extracellulari di GSH: l'incremento osservato è risultato pari a 6 volte nel plasma ed addirittura 2500 volte nelle urine (Griffith and Meister, 1979; Griffith et al., 1979; Lieberman et al., 1996).

Nei mammiferi, il GSH presente nei fluidi extracellulari funge da schermo protettivo antiossidante, così come dimostrato dall'aumento della sua concentrazione in seguito a *stress* ossidativo (Cantin et al., 1987). Oltre a neutralizzare le sostanze tossiche mediante reazioni di coniugazione, il glutatione extracellulare svolge le proprie funzioni protettive coadiuvando l'attività di un particolare tipo di perossidasi, detta eGPx, localizzata proprio nell'ambiente extracellulare (Tham et al., 1998; Comhair et al., 2001). In qualità di enzimi deputati alla rimozione del perossido di idrogeno, le perossidasi possono utilizzare come donatori di elettroni la tioredossina o, come la eGPx, proprio il glutatione. Questa perossidasi extracellulare dei mammiferi viene secreta sulla superficie degli epitelii che sono a contatto con l'ambiente esterno, in particolare gli epitelii respiratori e gastrointestinali, che essendo direttamente esposti a sostanze inquinanti/tossiche presenti nell'aria e nei cibi ingeriti sono particolarmente suscettibili allo *stress* ossidativo. La perossidasi extracellulare rappresenta dunque una prima, importante linea di difesa contro le specie reattive dell'ossigeno di natura esogena.

Esiste poi un secondo tipo di perossidasi secreta, la perossiredossina 4 (Prx 4), dotata di attività glutatione-dipendente, in aggiunta a quella tioredossina-dipendente propria di tutte le perossiredossine, e capace anch'essa di svolgere funzioni protettive nei confronti dello *stress* ossidativo generato nell'ambiente extracellulare (Okado-Matsumoto et al., 2000).

Una proteina omologa alla Prx 4 dei mammiferi è stata identificata in *Drosophila melanogaster* e anch'essa viene secreta. (Radyuk et al., 2001; Radyuk et al., 2013). Questa proteina, o una glutatione perossidasi extracellulare analoga a quella presente nei mammiferi, potrebbe dunque essere direttamente coinvolta

nella protezione dell'epitelio intestinale dal perossido di idrogeno somministrato per via orale.

In conclusione, il modello di azione della proteina *AeGGT1* da me formulato sulla base dei dati ottenuti mediante espressione eterologa in *Drosophila* prevede che, interferendo con l'attività di enzimi γ -glutammina transpeptidasi endogeni, questa proteina vada ad alterare, in *Drosophila* così come nell'afide, il delicato equilibrio di distribuzione del GSH fra gli ambienti intra- ed extra-cellulare. In *Drosophila*, questo non si traduce in effetti negativi sulla fertilità, per motivi legati ad una diversa fisiologia delle sue cellule germinali rispetto a quelle dell'afide, e/o ad insufficienti livelli di espressione della proteina eterologa. In condizioni di *stress* ossidativo esogeno, viene al contrario favorita una condizione di temporanea protezione, verosimilmente dovuta ad accumulo extracellulare di GSH. Nell'afide, invece, lo squilibrio generato dalla proteina *AeGGT1* è deleterio per le cellule germinali, probabilmente perché le rende suscettibili a fenomeni ossidativi intracellulari che finiscono per innescare apoptosi. Infatti, la deplezione intracellulare di GSH è una caratteristica che accomuna tutte le cellule che vanno incontro a morte cellulare per apoptosi (Franco and Cidlowski, 2009; Circu and Aw, 2012). Inoltre, le cellule in rapida divisione, quali sono quelle delle ovaie degli afidi che hanno un ritmo riproduttivo estremamente veloce, sono più sensibili all'apoptosi indotta da *stress* ossidativo rispetto alle cellule che non si dividono (Naderi et al, 2003).

Il modello da me proposto potrà essere opportunamente verificato, sia nelle *Drosophila* esprimenti la proteina *AeGGT1*, sia negli afidi parassitizzati, andando a valutare come variano i livelli di GSH intracellulare ed extracellulare.

Fenomeni di apoptosi dovuti a una GGT di origine parassitaria sono stati dimostrati anche nel caso delle cellule intestinali umane infettate da *Helicobacter pylori* e *Helicobacter suis* (Shibaiama et al., 2003; Flahou et al., 2011). Queste GGT batteriche sono caratterizzate da alta affinità per il substrato e alta velocità di reazione ed è stato dimostrato che la loro capacità di causare apoptosi dipende dalla formazione extracellulare di prodotti di degradazione del glutatione ad azione pro-ossidante, responsabili dell'innescare di processi di perossidazione dei lipidi, con conseguente alterazione dell'integrità delle membrane. E' importante

sottolineare che tutti questi effetti vengono potenziati dall'aggiunta di GSH extracellulare (Boonyanugomol et al., 2012).

Sembra dunque che sia le GGT di *Helicobacter* sia quella di *Aphidius ervi* siano capaci di esporre la cellula a *stress* ossidativo interferendo con la delicata omeostasi del GSH, ma con modalità diametralmente opposte. Le prime determinando un'incremento complessivo dell'attività γ -glutammina transpeptidasi sulla superficie delle cellule bersaglio, l'altra riducendo tale attività. Se ne deduce come, in generale, una fine regolazione delle GGT sia essenziale per mantenere la corretta omeostasi del GSH e garantire un'adeguata risposta cellulare a condizioni ambientali che possano minare tale omeostasi, sia negli insetti che nei mammiferi. Questi aspetti potranno essere senz'altro approfonditi traendo vantaggio dalle enormi potenzialità offerte dalla *Drosophila melanogaster*, versatile sistema modello in cui sono stati sviluppati preziosi strumenti di analisi genetica e molecolare. In particolare, diversi mutanti in geni coinvolti nel metabolismo del glutatione, nelle risposte cellulari allo *stress* ossidativo e nella regolazione dell'apoptosi, disponibili in questo sistema, potranno essere sfruttati in combinazione con il sistema di espressione eterologa della proteina *AeGGT1* da me allestito, non solo per approfondire ulteriormente il ruolo funzionale di questa proteina ma anche, più in generale, per studiare come l'attività degli enzimi GGT influenzi la fisiologia degli insetti.

5. Bibliografia

Alphen J. V., Jervis M. A., Jervis M., and Kidd N. (1996). Foraging behaviour. *Insect Natural Enemies: Practical Approaches to Their Study and Evaluation*. 1-62.

Asgari S. and Rivers D.B. (2011). Venom proteins from endoparasitoid wasps and their role in host-parasite interactions. *Annual Review of Entomology* 56: 313-335.

Axon A. T. (1999). Are all helicobacters equal? Mechanisms of gastroduodenal pathology and their clinical implications. *Gut* 45 Suppl 1: I1-4.

Bachhawat A. K., Thakur A., Kaur J., Zulkifli M. (2013). Glutathione transporters. *Biochim Biophys Acta*. 1830 (5): 3154-64.

Battaglia D., Poppy G., Powell W., Romano A., Tranfaglia A. and Pennacchio F. (2000). Physical and chemical cues influencing the oviposition behaviour of *Aphidius ervi*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* 94: 219-227.

Beckage N. E. and Gelman D. B. (2004). Wasp parasitoid disruption of host development: implications for new biologically based strategies for insect control. *The Annual Review of Entomology* 49, 299-330.

Benlloch M., Ortega A., Ferrer P., Segarra R., Obrador E., Asensi M., Carretero J. and Estrela J. M. (2005). Acceleration of glutathione efflux and inhibition of gamma-glutamyltranspeptidase sensitize metastatic B16 melanoma cells to endotheliuminduced cytotoxicity. *J Biol Chem* 280: 6950-6959.

Boanca G., Sand A., Barycki J. J. (2006). Uncoupling the enzymatic and autoprocesing activities of *Helicobacter pylori* gamma-glutamyltranspeptidase. *J*

Biol Chem; 281(28): 19029-37.

Boanca G., Sand A., Okada T., Suzuki H., Kumagai H., Fukuyama K., et al. (2007). Autoprocessing of *Helicobacter pylori* γ -Glutamyltranspeptidase leads to the formation of a threonine-threonine catalytic dyad. J Biol Chem. 282 (1): 534–41.

Boonyanugomol W., Chomvarin C., Song J-Y, Kim K-M, Kim J-M, Cho M-J, Lee W-K, Kang H-L, Rhee K-H, Sripa B., Hahnvajanawong C., Baik S-C. (2102). Effects of *Helicobacter pylori* γ -Glutamyltranspeptidase on Apoptosis and Inflammation in Human Biliary Cells. Dig Dis Sci. 57: 2615–2624.

Brand A. H., Perrimon N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. Development; 118: 401-15.

Bumann D., Aksu S.,Wendland M., Janek K., Zimny-Arndt U., Sabarth N., et al. (2002). Proteome analysis of secreted proteins of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Infect Immun 70: 3396–3403.

Busiello I., Acquaviva R., Di Popolo A., Blanchard T. G., Ricci V., Romano M., Zarrilli R. (2004). *Helicobacter pylori* gammaglutamyltranspeptidase upregulates COX-2 and EGF-related peptide expression in human gastric cells. Cell Microbiol 6: 255-267.

Caccia S., Grimaldi A., Casartelli M., Falabella P., de Eguileor M., Pennacchio F. and Giordana B. (2012). Functional analysis of a fatty acid binding protein produced by *Aphidius ervi* teratocytes. Journal of Insect Physiology 58: 621-627.

Cantin A. M., North S. L., Hubbard R. C., Crystal R. G. (1987). Normal alveolar epithelial lining fluid contains high levels of glutathione. J Appl Physiol 63:152-7.

Castellano I., Merlino A. (2012). γ -Glutamyltranspeptidases: Sequence, structure, biochemical properties, and biotechnological applications. *Cell Mol Life Sci.* 69 (20): 3381-94.

Chevalier C., Thiberge J. M., Ferrero R. L., Labigne A. (1999). Essential role of *Helicobacter pylori* gamma-glutamyltranspeptidase for the colonization of the gastric mucosa of mice. *Mol Microbiol.* 31(5):1359-72.

Choi C., Fortin J. P., McCarthy E., Oksman L., Kopin A. S., Nitabach M. N. (2009). Cellular dissection of circadian peptide signals with genetically encoded membrane-tethered ligands. *Curr Biol*; 19(14): 1167-75.

Circu M. L., Aw T. Y. (2012). Glutathione and modulation of cell apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* 1823:1767-77.

Colinet D., Caroline C., Deleury E., Mancini D., Poulain J., Azéma-Dossat C., Belghazi M., Tares S., Pennacchio F., Poirié M. and Jean-Luc Gatti. (2014). Identification of the main venom protein components of *Aphidius ervi*, a parasitoid wasp of the aphid model *Acyrtosiphon pisum*. Colinet et al. *BMC Genomics* 15: 342.

Comhair S. A., Bhatena P. R., Farver C., Thunnissen F. B., Erzurum S. C. (2001). Extracellular glutathione peroxidase induction in asthmatic lungs: evidence for redox regulation of expression in human airway epithelial cells. *FASEB J.* 15:70-78.

Corti A., Paolicchi A., Franzini M., Dominici S., Casini A. F., Pompella A. (2005). 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.* 7 (7-8): 911-8.

Dalle-Donne I., Rossi R., Colombo G., Giustarini D., Milzani A. (2009). Protein S-glutathionylation: a regulatory device from bacteria to humans. *Trends Biochem*

Sci. 34(2):85-96.

Del Bello B., Paolicchi A., Comporti M., Pompella A., Maellaro E. (1999). Hydrogen peroxide produced during gamma-glutamyl transpeptidase activity is involved in prevention of apoptosis and maintenance of proliferation in U937 cells. *FASEB J.* 13:69-79.

Digilio M.C., Isidoro N., Tremblay E. and Pennacchio F. (2000). Host castration by *Aphidius ervi* venom proteins. *Journal of Insect Physiology* 46: 1041-1050.

Dominici S., Valentini M., Maellaro E., Del Bello, B. Paolicchi A., Lorenzini E., Tongiani R., Comporti M. and Pompella A. (1999). Redox modulation of cell surface protein thiols in U937 lymphoma cells: the role of γ -glutamyl transpeptidase-dependent H_2O_2 production and S-thiolation, *Free Rad. Biol. Med.* 27, 623–635.

Dominici S., Paolicchi A., Lorenzini E., Maellaro E., Comporti M., Pieri L., Minotti G., Pompella A. (2003). Gamma-glutamyltransferase-dependent prooxidant reactions: a factor in multiple processes. *Biofactors.*; 17 (1-4): 187-98.

Dominici S., Pieri L., Paolicchi A., De Tata V., Zunino F., Pompella A. (2004). Endogenous oxidative stress induces distinct redox forms of tumor necrosis factor receptor-1 in melanoma cells. *Ann N Y Acad Sci.* 1030: 62-8.

Ernst P. B., Gold BD (2000). The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. *Annu Rev Microbiol* 54: 615-640.

Falabella P., Riviello L., De Stradis M. L., Stigliano C., Varricchio P., Grimaldi A., De Eguileor M., Graziani F., Gigliotti S. and Pennacchio F. (2009). *Aphidius ervi* teratocytes release an extracellular enolase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 39, 801-813.

Falabella P., Riviello L., Caccialupi P., Rossodivita T., Teresa Valente M., Luisa De Stradis M., Tranfaglia A., Varricchio P., Gigliotti S., Graziani F. et al. (2007). A gamma-glutamyl transpeptidase of *Aphidius ervi* venom induces apoptosis in the ovaries of host aphids. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37: 453-465.

Falabella P., Perugino G., Caccialupi P., Riviello L., Varricchio P., Tranfaglia A., Rossi M., Malva C., Graziani, F., Moracci M. and Pennacchio F. (2005). A novel fatty acid binding protein produced by teratocytes of the aphid parasitoid *Aphidius ervi*. *Insect Molecular Biology* 14, 195-205.

Falabella P., Tremblay, E. and Pennacchio, F. (2000). Host regulation by the aphid parasitoid *Aphidius ervi*: the role of teratocytes. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 97: 1-9.

Fassi Fehri L., Koch M., Belogolova E., Khalil H., Bolz C., Kalali B., Mollenkopf H.J., Beigier-Bompadre M., Karlas A., Schneider T., Churin Y., Gerhard M., Meyer T.F. (2010). *Helicobacter pylori* induces miR-155 in T cells in a cAMP-Foxp3-dependent manner. *PLoS One* 5(3): e9500.

Finidori J., Laperche Y., Haguenaer-Tsapis R., Barouki R., Guellaen G., Hanoune J. (1984). In vitro biosynthesis and membrane insertion of gamma-glutamyl transpeptidase. *J Biol Chem.* 259 (8): 4687-90.

Fischer J. A., Giniger E., Maniatis T., Ptashne M. (1988). Gal4 activates transcription in *Drosophila*. *Nature.*; 332:853-6.

Flahou B., Haesebrouck F, Chiers K, Van Deun K, De Smet L, Devreese B, Vandenberghe I, Favoreel H, Smet A, Pasmans F, D'Herde K, Ducatelle R. (2011). Gastric epithelial cell death caused by *Helicobacter suis* and *Helicobacter pylori* γ -glutamyl transpeptidase is mainly glutathione degradation-dependent. *Cell Microbiol* 13: 1933-1955.

Franco R. and Cidlowski J. A. (2009). Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant Cell Death Diff 16:1303-1314.

Franklin C. C., Krejsa C. M., Pierce R. H., White C. C., Fausto N., Kavanagh T. J. (2002). Caspase-3-dependent cleavage of the glutamate-L-cysteine ligase catalytic subunit during apoptotic cell death. Am J Pathol. 160: 1887–1894.

Franzini M., Corti A., Mammini C. (2009). γ -Glutamyltransferasi: biochimica clinica e fisiopatologia umana. Biochimica clinica 33, n.1.

Franzini M., Corti A., Lorenzini E., Paolicchi A., Pompella A., DeCesare M., Perego P., Gatti L., Leone R., Apostoli P. and Zunino F. (2006). Modulation of cell growth and cisplatin sensitivity by membrane gamma-glutamyltransferase in melanoma cells. EurJ Cancer 42 (15): 2623-2630.

Gerhard M., Schmees C., Volland P., Endres N., Sander M., Reindl W., Rad R., Oelsner M., Decker T., Mempel M., Hengst L., Prinz C. (2005). A secreted low-molecular-weight protein from *Helicobacter pylori* induces cell-cycle arrest of T cells. Gastroenterology. 128 (5): 1327-39.

Giniger E., Varnum S.M. and Ptashne M. (1985). Specific DNA binding of Gal4, a positive regulatory protein of yeast. Cell.; 40: 767-774.

Giordana B., Milani, A., Grimaldi A., Farneti R., Casartelli M., Ambrosecchio M.R., Digilio M.C., Leonardi M.G., de Eguileor M. and Pennacchio F. (2003). Absorption of sugars and aminoacids by the epidermis of *Aphidius ervi* larvae. Journal of Insect Physiology 49: 1115-1124.

Godfray H. J. C. (1994). Parasitoids: Behavioural and Evolutionary Ecology. Princeton: Princeton University Press.

Godwin A. K., Meister A, O'Dwyer PJ, Huang CS, Hamilton TC and Anderson ME (1992). High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines is associated with marked increase of glutathione synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(7): 3070-3074.

Gong M., Ling S. S., Lui S. Y., Yeoh K. G., Ho B. (2010). *Helicobacter pylori* gamma-glutamyl transpeptidase is a pathogenic factor in the development of peptic ulcer disease. *Gastroenterology*. 139(2): 564-73.

Gonzalez D., White W., Hall J. and Dickson R.C. (1978). Geographical distribution of Aphidiidae (Hym.) imported to California for biological control of *Acyrtosiphon kondoi* and *Acyrtosiphon pisum* (Hom.: Aphididae). *Entomophaga* 23: 239-248.

Griffith O. W., Novogrodsky A., and Meister A. (1979). Translocation of glutathione from lymphoid cells that have markedly different gamma-glutamyl transpeptidase activities *Proc Natl Acad Sci U S A*. 76: 2249–2252.

Griffith O. W., Meister A. (1979). Glutathione: interorgan translocation, turnover, and metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 76(11):5606-10.

Grzam A., Martin M. N., Hell R., Meyer A. J., (2007). γ -Glutamyl transpeptidase GGT4 initiates vacuolar degradation of glutathione S-conjugates in *Arabidopsis*. *FEBS Letters* 581: 3131-3138.

Guerrieri E., Pennacchio F. and Tremblay E. (1997). Effect of Adult Experience on in-Flight Orientation to Plant and Plant. Host Complex Volatiles in *Aphidius ervi* (Haliday) (Hymenoptera, Braconidae). *Biological Control* 10: 159-165.

Guerrieri E., Pennacchio F. and Tremblay E. (1993). Flight behaviour of the aphid parasitoid *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae) in response to plant and host volatiles. *European Journal of Entomology* 90: 415-415.

Hannigan M. H. (2014). Gamma-Glutamyl Transpeptidase: Redox Regulation and

Drug Resistance. *Adv Cancer Res.* 122: 103-141.

Hanigan M. H., Frierson H. F. Jr, Swanson P. E., De Young B. R. (1999a). Altered expression of gamma-glutamyl transpeptidase in human tumors. *Hum Pathol.* 30 (3): 300-305.

Hanigan M. H., Gallagher B. C., Townsend D. M. and Gabarra V. (1999b). Gamma-glutamyl transpeptidase accelerates tumor growth and increases the resistance of tumors to cisplatin in vivo. *Carcinogenesis* 20(4): 553-559.

Hanigan M. H. (1998). γ -Glutamyl transpeptidase, a glutathionase: its expression and function in carcinogenesis. *Chemico-Biological Interactions* 111-112; 333-342.

Hanigan M. H., Frierson H. F. Jr. (1996). Immunohistochemical detection of gamma-glutamyl transpeptidase in normal human tissue. *J Histochem Cytochem.* 44 (10): 1101–1108.

Hanigan M. H. (1995). Expression of gamma-glutamyl transpeptidase provides tumor cells with a selective growth advantage at physiologic concentrations of cyst(e)ine. *Carcinogenesis* 16: 181-185.

Hanigan M. H., Ricketts W. A. (1993). Extracellular glutathione is a source of cysteine for cells that express gamma-glutamyl transpeptidase. *Biochemistry.*32 (24): 6302-306.

He X. Z. and Wang Q. (2006). Host age preference in *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Aphidiidae). *New Zealand Plant Protection* 59: 195.

He X. Z., Wang Q. and Teulon D. A. J. (2005). The effect of parasitism by *Aphidius ervi* on development and reproduction of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *New Zealand Plant Protection* 58, 202.

Holmgren A. (1981). Regulation of ribonucleotide reductase. *Current Topics in Cell Reg.* 19:47–76.

Kugelman A., Choy H.A., Liu R., Shi M.M., Gozal E. and Forman H.J. (1994). Gamma-glutamyl transpeptidase is increased by oxidative stress in rat alveolar L2 epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 11: 586-592.

Knickelbein R.G., Ingbar D.H., Seres T., Snow K., Johnston R.B. Jr, Fayemi O., Gumkowski F., Jamieson J.D. and Warshaw J.B. (1996). Hyperoxia enhances expression of gamma-glutamyl transpeptidase and increases protein S-glutathiolation in rat lung. *Am J Physiol* 270: L115-L122.

Kaeslin M., Reinhard M., Bühler D., Roth, T., Pfister-Wilhelm R. and Lanzrein B. (2010). Venom of the egg-larval parasitoid *Chelonus inanitus* is a complex mixture and has multiple biological effects. *Journal of Insect Physiology* 56: 686-694.

Kim K. M., Lee S. G., Kim J. M., Kim D. S., Song J. Y., Kang H. L., Lee W. K., Cho M. J., Rhee K. H., Youn H. S., Baik S. C. (2010). *Helicobacter pylori* gamma-glutamyltranspeptidase induces cell cycle arrest at the G1-S phase transition. *J Microbiol* 48: 372-377.

Kim K. M., Lee S. G., Park M. G., Song J. Y., Kang H. L., Lee W. K., Cho M. J., Rhee K. H., Youn H. S., Baik S. C. (2007). Gamma-glutamyltranspeptidase of *Helicobacter pylori* induces mitochondria-mediated apoptosis in AGS cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 355(2): 562-7.

Launghon A. and Gersteland R.F. (1984). Primary structure of the *Saccaromyces cerevisiae* *GAL4* gene. *Mol. Cell Biol.*; 4: 260-267.

Lewis A. L., Hayes J. D. and Wolf C. R. (1988). Glutathione and glutathionedependent enzymes in ovarian adenocarcinoma cell lines derived from

a patient before and after the onset of drug resistance: intrinsic differences and cell cycle effects. *Carcinogenesis* 9: 1283-1287.

Libbrecht R., Gwynn D. M., and Fellowes M. D. E. (2007). *Aphidius ervi* Preferentially Attacks the Green Morph of the Pea Aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Journal of Insect Behavior*, Vol. 20, N°1.

Lieberman M. W., Wiseman A. L., Shi Z. Z., Carter B. Z., Barrios R., Ou C. N., et al. (1996). Growth retardation and cysteine deficiency in gamma-glutamyl transpeptidase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*; 93 (15): 7923-7926.

Lieberman M. W., Barrios R., Carter B. Z., Habib G. M., Lebovitz R. M., Rajagopalan S., Sepulveda A. R., Shi Z. Z., Wan D. F. (1995). gamma-Glutamyl transpeptidase. What does the organization and expression of a multipromoter gene tell us about its functions? *Am J Pathol.* 147 (5): 1175-85.

Liu R.M., Shi M.M., Giulivi C. and Forman H.J. (1998). Quinones increase gamma-glutamyl transpeptidase expression by multiple mechanisms in rat lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 274: 330-336.

Liu R. M., H. Hu, T. W. Robinson and H. J. Forman. (1996). Increased gamma-glutamylcysteine synthetase and gamma-glutamyl transpeptidase activities enhance resistance of rat lung epithelial L2 cells to quinone toxicity. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, Vol. 14, N°2.

Liu J., Gong Z., Liu L. (2014). γ -glutamyl transpeptidase 1 specifically suppresses green-light avoidance via GABAA receptors in *Drosophila*. *J Neurochem.* 130 (3): 408-18.

Lu S. C. (2013). Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta.* 1830 (5): 3143-53.

Lu S.C. (2009) Regulation of Glutathione Synthesis. *Molecular Aspects of Medicine* 30 42–59.

Lu S. C. (1999). Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB J.* 13(10):1169-83.

Maellaro E., Dominici S., Del Bello B., Valentini M.A., Pieri L., Perego P., Supino R., Zunino F., Lorenzini E., Paolicchi A., Comporti M. and Pompella A. (2000). Membrane gamma-glutamyl transpeptidase activity of melanoma cells: effects on cellular H₂O₂ production, cell surface protein thiol oxidation and NF- κ B activation status. *J. Cell Sci.* 113:2671–2678.

Martin M. N., Saladores P. H., Lambert E., Hudson A. O., Leustek T., (2007). Localization of members of the γ -Glutamyl transpeptidase family identifies sites glutathione and glutathione S-coniugates hydrolysis. *Plant Physiology* 144: 1715-1732.

Martin M. N., Slovin J. P., (2000). Purified γ -Glutamyl transpeptidase from tomato exhibit high affinity for glutathione and glutathione S-coniugates. *Plant Physiology* 122: 1417-1426.

Meister A., Anderson M. E. (1983). Glutathione. *Annu Rev Biochem.*; 52: 711-60.

Meister A. (1988). Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem.* 263(33):17205-8.

Minelli A. (2002). *La fauna in Italia.* Touring editore. Pag. 108.

Moreau S. J. and Asgari S. (2015). Venom Proteins from Parasitoid Wasps and Their Biological Functions. *Toxins* 7: 2385-412.

Naderi J., Hung M., Pandey S. (2003). Oxidative stress-induced apoptosis in dividing fibroblasts involves activation of p38 MAP kinase and over-expression of Bax: resistance of quiescent cells to oxidative stress. *Apoptosis* 8: 91-100.

Nguyen T. T., Magnoli I., Cloutier C., Michaud D., Muratori F., Hance T. (2013) Early presence of an enolase in the oviposition injecta of the aphid parasitoid *Aphidius ervi* analyzed with chitosan beads as artificial hosts. *Journal of Insect Physiology* 59:11–18.

Noctor G., Mhamdi A., Chaouch S., Han Y., Neukermans J., Marquez-Garcia B., Queval G. and Foyer C.H.. (2012) Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant, Cell and Environment* 35: 454-484.

Oertli M., Noben M., Engler D. B., Semper R. P., Reuter S., Max-einer J., Gerhard M., Taube C., Müller A. (2013). *Helicobacter pylori* γ -glutamyl transpeptidase and vacuolating cytotoxin promote gastric persistence and immune tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 3047-3052.

Ohkama-Ohtsu N., Radwan S., Peterson A., Zhao P., Badr A., Xiang C., Oliver D., (2007b). Characterization of the extracellular γ -Glutamyl transpeptidase, GGT1 and GGT2, in Arabidopsis. *Plant Journal* 49: 865-877.

Oinonen C., Rouvinen J. (2000). Structural comparison of Ntn Hydrolases. *Protein Sci.* 9(12): 2329-37.

Okada T., Suzuki H., Wada K., Kumagai H., Fukuyama K. (2007). Crystal structure of the gamma-glutamyltranspeptidase precursor protein from *Escherichia coli*. Structural changes upon autocatalytic processing and implications for the maturation mechanism. *J Biol Chem.* 282 (4): 2433-9.

Okada T., Suzuki H., Wada K., Kumagai H., Fukuyama K. (2006). Crystal

structures of gamma-glutamyltranspeptidase from *Escherichia coli*, a key enzyme in glutathione metabolism, and its reaction intermediate. Proc Natl Acad Sci USA. 103(17): 6471-6476.

Okado-Matsumoto A., Matsumoto A, Fujii J., Taniguchi N. (2000). Peroxiredoxin IV is a secretable protein with heparin-binding properties under reduced conditions. J Biochem. 127: 493-501.

Pallardó F.V., Markovic J., García J.L., Viña J. (2009). Role of nuclear glutathione as a key regulator of cell proliferation. Mol Asp Med. 30: 77–85.

Paolicchi A., Dominici S., Pieri L., Maellaro E. and Pompella A. (2002). Glutathione catabolism as a signaling mechanism. Biochemical Pharmacology 64: 1027-1035.

Paolicchi A., Minotti G., Tonarelli P., Tongiani R., De Cesare D., Mezzetti A., Dominici S., Comporti M., Pompella A. (1999). Gamma-glutamyl transpeptidase-dependent iron reduction and LDL oxidation, a potential mechanism in atherosclerosis. J Investig Med. Mar; 47 (3): 151-60.

Paolicchi A., Tongiani R., Tonarelli P., Comporti M., Pompella A. (1997). gamma-Glutamyl transpeptidase-dependent lipid peroxidation in isolated hepatocytes and HepG2 hepatoma cells. Free Radic Biol Med. 22 (5): 853-60.

Pennacchio F., Masi A., and Pompella A. (2104). Glutathione levels modulation as a strategy in host-parasite interactions-insights for biology of cancer. Frontiers in Pharmacology. Volume 5. Article 180.

Pennacchio F., and Mancini D. (2012). Chapter 20 - Aphid Parasitoid Venom and its Role in Host Regulation. In Parasitoid Viruses, Nancy E. Beckage, and Jean-Michel Drezen, eds. (San Diego: Academic Press), pp. 247–254.

Pennacchio F., and Strand M. R. (2006). Evolution of developmental strategies in parasitic hymenoptera. *Annu. Rev. Entomol.* 51, 233-258.

Pennacchio F., Digilio M.C. and Tremblay E. (2005). Biochemical and metabolic alterations in *Acyrtosiphon pisum* parasitized by *Aphidius ervi*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 30, 351-367.

Pennacchio F., and Digilio M.C. (1990). Morphology and development of larval instars of *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae). *Bollettino Del Laboratorio Di Entomologia Agraria 'Filippo Silvestri* 46, 163-174.

Pica A., Chi M. C., Chen Y. Y., d'Ischia M., Lin L. L., Merlino A. (2015). The maturation mechanism of γ -glutamyl transpeptidases: Insights from the crystal structure of a precursor mimic of the enzyme from *Bacillus licheniformis* and from site-directed mutagenesis studies. *Biochimica et Biophysica Acta* 1864; 195-203.

Pieri L., Dominici S., Del Bello B., Maellaro E., Comporti M., Paolicchi A., Pompella A. (2003). Redox modulation of protein kinase/phosphatase balance in melanoma cells: the role of endogenous and gamma-glutamyltransferase-dependent H₂O₂ production. *Biochim Biophys Acta.* 1621(1): 76-83.

Polaszek A. (1986). The effects of two species of hymenopterous parasitoid on the reproductive system of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* 40, 285-292.

Pompella A., Visvikis A., Paolicchi A., De Tata V. and Casini A. F. (2003). The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochemical Pharmacology* 66, 1499-1503.

Pompella A., Paolicchi A., Dominici S., Comporti M., Tongiani R. (1996). Selective colocalization of lipid peroxidation and protein thiol loss in chemically

induced hepatic preneoplastic lesions: the role of gamma-glutamyltranspeptidase activity. *Histochem Cell Biol.* 106 (3): 275-82.

Quicke D. L. J., Van Achterberg K. and Godfray H.C.J. (1997). Comparative morphology of the venom gland and reservoir in opiine and alysiine braconid wasps (Insecta, Hymenoptera, Braconidae). *Zoologica Scripta* 26, 23-50.

Radyuk S. N., Klichko V. I., Michalak K., Orr W. C. (2013). The effect of peroxiredoxin 4 on fly physiology is a complex interplay of antioxidant and signaling functions. *FASEB J.* 27(4):1426-38.

Radyuk S. N., Klichko V. I., Spinola B., Sohal R. S., Orr W. C. (2001). The peroxiredoxin gene family in *Drosophila melanogaster*. *Free Radic Biol Med.* 31(9):1090-100.

Rajpert-De Meyts E., Shi M., Chang M., Robison T. W., Groffen J., Heisterkamp N. and Forman H.J. (1992). Transfection with gammaglutamyl transpeptidase enhances recovery from glutathione depletion using extracellular glutathione. *Toxicol Appl Pharmacol* 114(1): 56-62.

Sarkissian T., Timmons A., Arya R., Abdelwahid E., White K. (2014). Detecting apoptosis in *Drosophila* tissues and cells. *Methods.* 15: 89-96.

Schmees C., Prinz C., Treptau T. Rad R., Hengst L., Voland P., Bauer S., Brenner L., Schmid R. M. and Gerhard M. (2007). Inhibition of T-Cell Proliferation by *Helicobacter pylori* γ -Glutamyl Transpeptidase. *Gastroenterology* 132:1820-1833.

Sequeira R. and Mackauer M. (1992). Nutritional ecology of an insect Host-Parasitoid association: The Pea Aphid-*Aphidius ervi* system. *Ecology* 73, 183-189.

Shi M., Gozal E., Choy H. A. and Forman H. J. (1993). Extracellular glutathione and gamma-glutamyl transpeptidase prevent H₂O₂-induced injury by 2,3-

dimethoxy-1,4-naphthoquinone. *Free Rad Biol Med* 15: 57-67.

Shibayama K., Wachino J., Arakawa Y., Saidijam M., Rutherford N. G., and Henderson, J. F. (2007). Metabolism of glutamine and glutathione via γ -glutamyltranspeptidase and glutamate transport in *Helicobacter pylori*: possible significance in the pathophysiology of the organism. *Mol Microbiol* 64: 396–406.

Shibayama K., Kamachi K., Nagata N., Yagi T., Nada T., Doi Y., et al. (2003). A novel apoptosis-inducing protein from *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 47: 443–451.

Smirnova G. V., Nadezda G. Muzyka, Vadim Y. Ushakov, Aleksey V. Tyulenev Oleg N. Oktyabrsky. (2015). Extracellular superoxide provokes glutathione efflux from *Escherichia coli* cells. *Research in Microbiology* 166 609-617.

Smirnova G. V., Muzyka Nadezda, Oktyabrsky Oleg. (2012). Transmembrane glutathione cycling in growing *Escherichia coli* cells. *Microbiological Research* 167. 166-172.

Sommi P., Ricci V., Fiocca R., Romano M., Ivey K. J., Cova E., Solcia E., Ventura U. (1996). Significance of ammonia in the genesis of gastric epithelial lesions induced by *Helicobacter pylori*: an in vitro study with different bacterial strains and urea concentrations. *Digestion*: 57(5): 299-304.

Stark A. A., Zeiger E., Pagano D. A. (1993). Glutathione metabolism by γ -glutamyltranspeptidase leads to lipid peroxidation: characterization of the system and relevance to hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*. 14: 183-9.

Stoltz D. B., Guzo D., Belland E. R., Lucarotti C. J. and MacKinnon, E. A. (1988). Venom promotes uncoating in vitro and persistence in vivo of a braconid polydnavirus. *Journal of General Virology* 69, 903-907.

Storozhenko S., Belles-Boix E., Babiychuk E., Hérouart D., Davey M. W., Slooten L., Van montagu M., Inzé D., Kushnir S., (2002). γ -Glutamyl transpeptidase in transgenic tobacco plants. Cellular localization, processing, and biochemical properties. *Plant Physiology* 128: 1109-1119.

Suzuki H., Kumagai H. J. (2002). Autocatalytic processing of gamma-glutamyltranspeptidase. *Biol. Chem.* 277: 43536-43543.

Tham D. M., Whitin J. C., Kim K. K., Zhu S. X., Cohen H. J. (1998). Expression of extracellular glutathione peroxidase in human and mouse gastrointestinal tract. *Am J Physiol.* 275: G1463-71.

Tobias V. I. (2007). On some synonymical terms in the parasitology of entomophagous insects and on the terms parasitoid and carnivoroid. *Entomol. Rev.* 87, 273-278.

Tremblay E., Pennacchio F. and Digilio M. C. (1998). Host regulation effects of ovary fluid and venom of *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae). *Journal of Insect Physiology* 44, 779-784.

Van den Bulck K., Decostere A., Baele M., Driessen A., Debongnie J.C., Burette A., et al. (2005). Identification of non-*Helicobacter pylori* spiral organisms in gastric samples from humans, dogs and cats. *J Clin Microbiol* 43: 2256– 2260.

Verma V. V., Gupta R. and Goel M. (2015). Phylogenetic and evolutionary analysis of functional divergence among Gamma glutamyl transpeptidase (GGT) subfamilies. *Verma et al. Biology Direct.* 10: 49.

Vinson S. B. (1980). Host suitability for insect Parasitoids. *Ann. Rev. Entomol.* 1980 25: 397-419.

Vinson S. B., Iwantsch G. F. 1980: Host regulation by insect parasitoids. Quarterly review of biology 55 : 143-165.

Vivancos P. D., Wolff T., Markovic J., Pallardó F. V., Foyer C. H. (2010). A nuclear glutathione cycle within the cell cycle. Biochem J. 431:169–178.

Walker M. J., Rylett C. M., Keen J. N., Audsley N., Sajid M., Shirras A. D., Isaac R. E. (2006). Proteomic identification of *Drosophila melanogaster* male accessory gland proteins, including a pro-cathepsin and a soluble gamma-glutamyl transpeptidase. Proteome Sci. 4: 9.

Zhang G., Ducatelle R., Pasmans F., D’Herde K., Huang L., et al. (2013). Effects of *Helicobacter suis* γ -Glutamyl Transpeptidase on Lymphocytes: Modulation by Glutamine and Glutathione Supplementation and Outer Membrane Vesicles as a Putative Delivery Route of the Enzyme. PLoS ONE 8 (10): e77.

Ringraziamenti

*Desidero innanzitutto ringraziare il coordinatore di dottorato, il **Prof.re Francesco Pennacchio**, per avermi dato l'opportunità di affrontare con entusiasmo un progetto di ricerca stimolante.*

*Ringrazio la **Dott.ssa Silvia Gigliotti** che mi ha saputo introdurre nell'affascinante mondo della *Drosophila*, per la pazienza e la professionalità con le quali mi ha seguito nella parte sperimentale del progetto e nella stesura della tesi di dottorato.*

*Un grazie alla **Dott.ssa Silvia Andone** per il supporto tecnico e soprattutto umano, mi ha sostenuto nei momenti di crisi e consigliato in questi 3 anni.*

*Ringrazio il **Dott.re Davide Andrenacci** per aver condiviso la sua esperienza nell'ambito sperimentale.*

*Grazie al **Dott.re Gennaro Di Prisco** per la disponibilità ed il supporto tecnico datomi in alcune fasi del progetto di ricerca.*

*Grazie alla **Dott.ssa Ilaria di Lelio**, per i preziosi suggerimenti nell'ambito delle analisi statistiche.*

*Ringrazio la **Dott.ssa Paola Varricchio** il cui appoggio e collaborazione uniti ad uno spirito amichevole hanno contribuito alla realizzazione del mio progetto.*

Grazie alle mie "Lab Ladies" che hanno condiviso con me tutti questi anni di gioie e sacrifici, la vostra amicizia è preziosa.

Un ringraziamento va ai miei amici di sempre che mi hanno costantemente supportato e sopportato nei momenti difficili affrontati durante questo percorso, vi voglio bene.

Infine, ringrazio la mia famiglia per tutto ciò che non mi viene in mente perché scontato ma che, però, esiste e mi ha consentito di arrivare a questo traguardo; in particolare, un grazie a mamma e papà perché ogni giorno trascorso con voi è un giorno felice.