

Forme molecolari della γ -glutammitransferasi: caratteristiche e biogenesi

Irene Fornaciari¹, Aldo Clerico^{2,3}, Michele Emdin², Aldo Paolicchi^{1,2}, Maria Franzini^{2,3}

¹Dipartimento di Patologia Sperimentale e Patologia Clinica, Università di Pisa

²Dipartimento di Medicina Cardiovascolare, Fondazione G. Monasterio, Centro Nazionale delle Ricerche, Pisa

³Istituto di Scienze per la Vita, Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa

Questo lavoro è stato in parte presentato al 43° Congresso Nazionale SIBioC, 15-18 Novembre 2011, Parma, sotto forma di poster, ricevendo, nella persona del suo primo autore (M. Franzini), il premio SIBioC destinato ai 4 migliori poster presentati.

ABSTRACT

γ -Glutamyltransferase (GGT) fractions: characteristics and biogenesis. Four GGT fractions (b-, m-, s- and f-GGT) have been described in plasma. The aim of this study was to characterize their molecular nature in human plasma and bile. Plasma was obtained from healthy volunteers and primary bile was collected from patients undergoing liver transplant. For each GGT fraction we determined MW, density, sedimentation conditions in centrifugation assays, and the sensitivity to detergent [deoxycholic acid (DOC)] and protease (papain). A partial purification of b-GGT for immunogold analysis was obtained by ultracentrifugation. Plasma b-GGT showed a MW of 2000 kDa and a density between 1.063-1.210 g/mL. Treatment with 1% DOC converted b-GGT into s-GGT fraction, while b-GGT was not sensible to papain treatment. Plasma m-GGT and s-GGT showed a MW of 1000 and 200 kDa, and their densities were between 1.006-1.063 g/mL and 1.063-1.210 g/mL, respectively. Both fractions were unaffected by DOC treatment, while GGT activity was completely recovered in f-GGT peak after their incubation with papain. Plasma f-GGT showed a MW of 70 kDa and a density >1.21 g/mL. In human hepatic bile we identified two peaks showing the same characteristics of plasma b- and f-GGT fractions. Collected data showed that b-GGT is constituted by membrane microvesicles both in bile and plasma, as confirmed by immunogold; m-GGT and s-GGT might be constituted by bile-acid micelles, while f-GGT represents the free-soluble form of the enzyme. The understanding of the nature and properties of plasma GGT fractions may allow a better clinical utilization of GGT as a clinical biomarker.

INTRODUZIONE

La γ -glutammitransferasi (GGT) è una glicoproteina di membrana di tipo II, costituita da una subunità pesante e una leggera unite da legami non covalenti. L'enzima è inserito nella membrana cellulare attraverso un dominio transmembrana posto all'estremità N-terminale della catena pesante; il resto della proteina è completamente esposto nell'ambiente extracellulare (1), dove catalizza l'idrolisi del legame γ -glutammitico presente nel glutatione (2), nei suoi coniugati (3) e nel leucotriene C4 (4).

Nei mammiferi, la GGT è preferenzialmente localizzata nei tessuti epiteliali con attività secretorie e di assorbimento; nel fegato adulto, in particolare, la GGT è localizzata sul polo biliare degli epatociti e sulla membrana dei colangiociti ed è secreta nella bile (3, 5). Si pensa che il fegato rappresenti la principale fonte

di GGT plasmatica; tuttavia, il meccanismo di rilascio in circolo non è ancora conosciuto, così come non sono stati identificati i suoi trasportatori (6, 7). Infatti, è noto che la GGT plasmatica è costituita da un insieme eterogeneo di complessi, distinguibili per dimensione, densità e carica, ma questi non sono ancora stati caratterizzati nella struttura e nel significato clinico (8, 9).

L'aumento della GGT, oltre il limite superiore di riferimento (uomini: 54 U/L; donne: 34 U/L) (10), è un indice di disfunzione epatobiliare o di abuso di alcool; inoltre, studi condotti negli ultimi dieci anni hanno dimostrato che la GGT plasmatica, già per valori considerati fisiologici (uomini >28 U/L; donne >19 U/L) (11), è positivamente associata con il rischio di eventi cardiovascolari (12, 13), d'ipertensione (14), d'insorgenza di diabete di tipo 2 (14, 15) e di sindrome metabolica (16). Sfortunatamente, il saggio per la

Corrispondenza a: Maria Franzini, c/o Fondazione Toscana G. Monasterio - CNR, Via G. Moruzzi 1, 56124 Pisa. Tel. 0503153309, Fax 0503152166, E-mail franzinimaria@gmail.com; m.franzini@sssup.it

Ricevuto: 29.01.2012

Revisionato: 26.02.2012

Accettato: 27.02.2012

misurazione della GGT correntemente usato non permette di discriminare tra le diverse cause che determinano un aumento del valore della GGT plasmatica, riducendo così il valore clinico e la specificità di questo biomarcatore.

Recentemente è stato messo a punto un metodo sensibile e riproducibile, che ha permesso di identificare in tutti i soggetti apparentemente sani 4 frazioni di GGT con diverso PM, denominate big-GGT (b-GGT), medium-GGT (m-GGT), small-GGT (s-GGT) e free-GGT (f-GGT), con PM di 2000, 1000, 250 e 70 kDa, rispettivamente (17). La frazione f-GGT è la più abbondante nei soggetti sani adulti (18), mentre nei pazienti con malattie epatiche si osserva un incremento delle concentrazioni delle 3 frazioni ad alto PM (b-, m- e s-GGT). Un primo studio sulla specificità diagnostica delle GGT ha dimostrato che i pazienti con steatosi epatica non alcolica (NAFLD) o con epatite C cronica mostrano un differente profilo delle frazioni di GGT, nonostante un simile valore di GGT totale (19). Tra tutte le frazioni, b-GGT presenta la migliore specificità e sensibilità per la diagnosi di NAFLD, analogamente a s-GGT per l'epatite C cronica (19). La frazione b-GGT è stata individuata anche all'interno di placche aterosclerotiche umane (20), suggerendo quindi che solo b-GGT, piuttosto che la GGT totale, sia responsabile dell'associazione tra GGT circolante e malattie cardiovascolari e metaboliche dimostrata in numerosi studi epidemiologici.

Lo scopo di questo studio è stato quello di caratterizzare la natura dei complessi molecolari che trasportano l'enzima GGT in circolo e se questo è completo o meno del peptide idrofobico N-terminale, dominio attraverso il quale si pensa che la GGT interagisca con i trasportatori plasmatici. A tal fine sono state studiate le proprietà fisiche (dimensione, densità) e la sensibilità di ogni frazione al trattamento con detergente (acido desossicolico) e proteasi (papaina). Parallelamente è stata studiata la GGT presente nella bile epatica, che potrebbe contribuire alla presenza dell'attività GGT nel plasma.

MATERIALI E METODI

Campioni di plasma e bile

Il laboratorio di analisi chimico-cliniche della Fondazione Toscana G. Monasterio, al termine delle procedure di routine, ha fornito i campioni di plasma EDTA, resi opportunamente anonimi, necessari allo studio. I campioni sono stati analizzati singolarmente o miscelati per ottenere pool del volume necessario.

I campioni di bile primaria umana sono stati ottenuti da pazienti sottoposti a trapianto di fegato nei quali, durante la procedura chirurgica, è posizionato un drenaggio a livello del dotto biliare comune. Questi pazienti erano ricoverati presso l'U.O. di Chirurgia Epatica e Trapianto di Fegato del Dipartimento di Oncologia, dei trapianti e delle nuove tecnologie dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana.

Separazione e quantificazione delle forme molecolari di GGT

La separazione e la quantificazione delle frazioni di GGT è stata condotta su campioni di plasma (volume iniettato V_i : 0,02 mL), lipoproteine plasmatiche (V_i : 0,05 mL), bile (V_i : 0,02 mL), microparticelle (V_i : 0,05 mL) ed esosomi (V_i : 0,05 mL) separati dal plasma e dalla bile. Prima di eseguire l'analisi cromatografica tutti i campioni sono stati centrifugati a 3.000 g per 3 min, a 4 °C e il sopranatante è stato filtrato con un filtro in polivinilidenefluoruro (PVDF) da 0,45 μ m. L'analisi è stata effettuata con un sistema FPLC ("fast protein liquid chromatography"; AKTA purifier UPC 10, GE Healthcare Europa), utilizzando una colonna per cromatografia a esclusione molecolare (Superose 6 HR 10/300 GL, GE Healthcare Europa), come descritto in precedenza (17, 18). L'eluizione isocratica è realizzata alla velocità di flusso di 0,5 mL/min, con una fase mobile costituita da tampone sodio fosfato 0,1 mol/L (pH 7,4), contenente NaCl 0,2 mol/L, EDTA 0,1 mmol/L e glicilglicina (GlyGly) 5,4 mmol/L. La colonna è stata calibrata con una miscela di proteine standard aventi PM noto (GE Healthcare).

L'attività della GGT è stata quantificata tramite l'iniezione post-colonna (0,1 mL/min) di un substrato fluorescente specifico per l'enzima, γ -glutammina-7-amido-4-metilcumarina (gGluAMC, Nova Chimica). La reazione enzimatica, in presenza di gGluAMC 0,030 mmol/L e GlyGly 4,5 mmol/L, procede per ~4 min in una spirale di reazione mantenuta alla temperatura costante di 37 °C. Il prodotto di reazione AMC è rilevato da un fluorimetro (Jasco FP-2020, Jasco Europe) in linea, operante alle lunghezze d'onda di emissione/eccitazione di 440/380 nm. L'area sottesa ai picchi è proporzionale all'attività di GGT ed è calcolata con l'aiuto del "software" MATLAB (Version 7 MathWorks, Inc.). Il programma permette di descrivere ogni picco con una curva gaussiana modificata esponenzialmente; per ogni curva sono stati definiti gli intervalli di variazione dell'altezza, della larghezza a metà altezza, della posizione e dell'asimmetria. L'area è stata calcolata utilizzando un algoritmo non lineare di minimizzazione dei minimi quadrati; la somma delle 4 curve così ottenute corrisponde al cromatogramma registrato (18).

La soluzione madre del substrato gGlu-AMC è stata preparata in etanolo 40% vol/vol, contenente NaOH 0,01 N alla concentrazione di 4,5 mmol/L; questa soluzione è stata conservata a -20 °C e diluita 25 volte con tampone Tris-HCl 0,25 M pH 8,5 al momento dell'utilizzo.

Determinazione cromatografica del colesterolo

Il profilo di eluizione del colesterolo totale in campioni di plasma (V_i : 0,05 mL) e di lipoproteine (V_i : 0,05 mL) è stato ottenuto con lo stesso sistema FPLC e nelle medesime condizioni cromatografiche descritte per la separazione delle forme molecolari della GGT. In questo caso è stato utilizzato, come miscela di reazione post-colonna, un reagente per la determinazione del colesterolo totale (Giesse-Diagnostic); il prodotto di reazione è stato rilevato monitorando l'assorbanza a 510 nm.

Separazione delle lipoproteine plasmatiche

Le lipoproteine plasmatiche sono state separate per ultracentrifugazione, su gradiente discontinuo di densità (21), usando un'ultracentrifuga Beckman con rotore ad angolo fisso type-40. Con questa procedura è stato possibile separare VLDL, ($d < 1,006$ g/mL), LDL ($1,006$ g/mL $< d < 1,063$ g/mL) e HDL ($1,063$ g/mL $< d < 1,21$ g/mL). Per ottenere le VLDL, al campione di partenza (5 mL) è stata aggiunta una soluzione di NaCl (1 mL) con densità pari a $1,006$ g/mL ($11,42$ g/L). Il campione è stato ultracentrifugato a 100.000 g per 24 ore a 20 °C, quindi sono stati recuperati $0,5$ mL di sopranatante. Le LDL sono state ottenute aggiungendo al plasma privo delle VLDL prima NaCl ($0,5$ mL) con densità $1,006$ g/mL, poi una soluzione di NaBr (1 mL) con densità $1,3199$ ($434,8$ g/L) per ottenere una densità pari a $1,063$ g/mL. Quindi il campione è stato centrifugato a 100.000 g per 24 ore a 20 °C e successivamente è stato recuperato il sopranatante contenente le LDL ($0,85$ mL). Al plasma rimanente sono stati aggiunti NaBr ($0,85$ mL) con densità $1,063$ g/mL ($85,01$ g/L), poi NaBr (3 mL) con densità $1,4705$ g/mL ($644,97$ g/L) per ottenere una densità finale di $1,21$ g/mL. Il campione così preparato è stato centrifugato a 100.000 g per 24 ore a 20 °C; infine, è stata recuperata la frazione sopranatante ($0,79$ mL) contenente le HDL.

Trattamento del plasma e della bile con papaina e acido desossicolico

La proteasi papaina (Sigma-Aldrich) è stata attivata incubandola 3 min a temperatura ambiente con una soluzione acida di cisteina (Cys-HCl, concentrazione finale nella miscela 25 mmol/L). I campioni di plasma e di bile sono stati miscelati con la papaina attivata (20 U) e lasciati in incubazione a temperatura ambiente per 24 ore in vivace agitazione.

Il trattamento con acido desossicolico (DOC) è stato eseguito incubando i campioni di plasma e di bile con DOC (10 g/L, concentrazione finale) per 1 ora a temperatura ambiente in vivace agitazione.

Recupero delle microparticelle e degli esosomi dal plasma e dalla bile

Per recuperare gli esosomi e le microparticelle dal plasma (22, 23) e dalla bile (24) è stato utilizzato un protocollo basato su una serie di centrifugazioni differenziali. Ai campioni di plasma e bile (1 mL) è stato aggiunto 1 mL di tampone sodio-fosfato di Dulbecco (PBS) prima di essere centrifugati a 2000 g per 15 min a 4 °C. Il sopranatante è stato portato al volume di 7 mL con PBS e centrifugato a 10.000 g per 45 min a 4 °C, ottenendo così un "pellet" contenente le microparticelle, che è stato poi risospeso in $0,2$ mL di PBS. Il sopranatante è stato ultracentrifugato a 100.000 g per 2 ore a 4 °C. Infine, è stato recuperato il "pellet" contenente gli esosomi, che è stato poi risospeso in $0,2$ mL di PBS, e il sopranatante privo di microvescicole di membrana.

Preparazione degli esosomi per la microscopia elettronica

Il campione di plasma (100 mL) è stato diluito con pari volume di PBS, centrifugato a 2000 g 15 min a 15 °C; il sopranatante è stato poi ulteriormente centrifugato a 15.000 g 45 min a 15 °C. Il sopranatante ottenuto è stato filtrato ($0,22$ μ m) per eliminare gli aggregati lipidici presenti e quindi centrifugato a 100.000 g per 2 ore a 15 °C. Il "pellet" formatosi è stato lavato con PBS (100.000 g, 90 min a 15 °C), risospeso in 40 mL di NaCl $0,15$ mol/L. La sospensione di esosomi è stata stratificata su 4 mL di una soluzione di saccarosio 30% w/v in NaCl $0,15$ mol/L e il tutto ultracentrifugato a 100.000 g per 90 min a 4 °C. Dal fondo della provetta sono stati recuperati 4 mL di soluzione, diluiti con 15 vol di NaCl $0,15$ mol/L e nuovamente centrifugati a 100.000 g per 90 min a 4 °C. Il "pellet" ottenuto è stato fissato in paraformaldeide 1%.

Al campione di bile (120 mL) è stato aggiunto pari volume di PBS, quindi è stato centrifugato a 2000 g per 30 min a 4 °C; il sopranatante è stato ulteriormente centrifugato a 15.000 g per 30 min a 4 °C. Il sopranatante così ottenuto è stato ultracentrifugato a 100.000 g per 2 ore a 4 °C. Il "pellet" finale è stato lavato con PBS (100.000 g 90 min a 4 °C) e successivamente fissato in paraformaldeide al 2%.

Immunogold e colorazione negativa

Sia per la preparazione di esosomi dal plasma che dalla bile, 5 μ L di campione sono stati depositati sul retino di rame ricoperto con una membrana di collodio/acetato di amile dopo essere stato sottoposto alla procedura di scarica a bagliore ("glow discharge"), che permette di caricare elettricamente il retino per migliorare l'adesione con la membrana di collodio. I gruppi aldeidici liberi sono stati saturati con una soluzione di NH_4Cl 50 mmol/L in PBS (5 min, temperatura ambiente). Dopo la successiva incubazione con la soluzione di bloccaggio [siero fetale bovino (FCS) 10%, 20 min a temperatura ambiente], i campioni sono stati incubati per un'ora a temperatura ambiente con un anticorpo primario per il peptide C-terminale della catena pesante della GGT (antisiero 1:250 in FCS 5%). La reazione antigene-anticorpo è stata rivelata con l'ausilio di un anticorpo secondario coniugato con una particella d'oro delle dimensioni di 15 nm (Emsdium) (1:40 in FCS 0,5%, 60 min a temperatura ambiente). Al termine della procedura dell'immunogold i campioni sono stati fissati con glutaraldeide 0,5% in NaCl $0,15$ mol/L (10 min a temperatura ambiente) e colorati negativamente con acetato di uranile. I campioni sono stati osservati con un microscopio elettronico a trasmissione (Philips 410).

RISULTATI

Dimensione e densità delle frazioni di GGT

Il confronto del profilo di eluizione dell'attività di GGT e del colesterolo totale, condotta su uno stesso campione di plasma, ha evidenziato che le frazioni b-

GGT e m-GGT co-eluiscono con i picchi di colesterolo corrispondenti alle VLDL (volume di eluizione: 11,3 mL; raggio di Stokes: 30-80 nm) e alle LDL (15,0 mL; 18-25 nm), rispettivamente (Figura 1A). I picchi delle frazioni s-GGT e f-GGT (volumi di eluizione: 19,0 mL e 21,0 mL, rispettivamente) sono invece parzialmente sovrapposti a quello delle HDL (20,0 mL; 8-11 nm) (Figura 1A).

Mediante ultracentrifugazione in gradiente discontinuo di densità sono state separate e raccolte le VLDL (densità 0,950-1,006 g/mL), le LDL (densità 1,006-1,063 g/mL) e le HDL (densità 1,063-1,21 g/mL) e analizzate per valutare il recupero delle frazioni di GGT. L'attività di GGT associata alla frazione b-GGT era recuperata principalmente con le HDL (Figura 1D) e solo in minima parte con le VLDL (Figura 1B); le frazioni m-GGT e s-GGT erano presenti solo nel campione di LDL e HDL, rispettivamente (Figura 1C e 1D), mentre non era possibile separare per densità la frazione f-GGT, che rimaneva nel plasma privo di lipoproteine (dato non mostrato).

Sensibilità delle forme di GGT alla papaina e all'acido desossicolico

Per verificare se nella proteina GGT associata alle frazioni plasmatiche sia presente il peptide N-terminale della catena pesante, abbiamo trattato campioni di plasma con l'enzima papaina, una cistein-proteasi che agisce sulla proteina GGT causando il rilascio in

soluzione di una forma enzimaticamente attiva, ma priva dei 30 amminoacidi N-terminali della catena pesante (2). In seguito al trattamento con papaina, la frazione b-GGT risultava inalterata sia in attività che in dimensione, mentre l'attività di m-GGT e s-GGT non era più rilevabile ed era recuperata completamente in f-GGT (Figura 2 A). Il picco f-GGT ottenuto dopo l'incubazione con la papaina manteneva il volume di eluizione, mentre l'area era pari alla somma dell'area dei picchi m-, s- e f-GGT presenti nel plasma non trattato.

Il trattamento del plasma con DOC, un detergente anionico fisiologicamente presente nella bile, causava la riduzione dell'attività di b-GGT con un corrispondente aumento della frazione s-GGT, che manteneva il volume di eluizione del plasma non trattato. Le frazioni m-GGT e f-GGT non subivano alterazioni (Figura 2B). Con la successiva aggiunta di papaina, tutta l'attività enzimatica era recuperata nella frazione f-GGT, come già descritto (Figura 2B).

Nella bile umana è presente un'elevata attività di GGT, quando confrontata con il plasma [mediana: 112,5 U/L, 25°-75° percentile: 73,9-183,1 U/L, min-max 55,8 - 218,8 U/L, n=7]. Circa il 90% dell'attività è presente in una forma ad alto PM corrispondente alla frazione plasmatica b-GGT, mentre la restante parte corrisponde alla frazione plasmatica f-GGT (Figura 3). Inoltre, il picco b-GGT presenta un'asimmetria sul lato sinistro, suggerendo la presenza di un complesso molecolare di

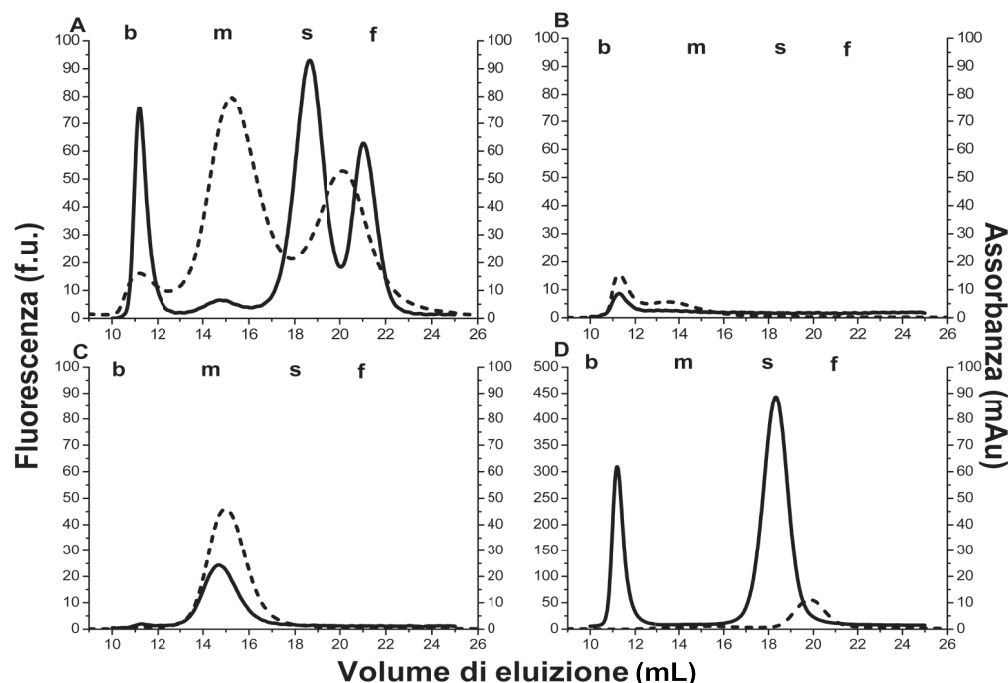


Figura 1

Profilo di eluizione dell'attività di γ -glutammina transferasi (GGT) (linea continua) e del colesterolo totale (linea tratteggiata) in un campione rappresentativo di plasma e nelle lipoproteine separate da esso. A) plasma completo, B) VLDL (volume di eluizione: 11,3 mL; densità: 0,95-1,006 g/mL; raggio di Stokes: 30-80 nm), C) LDL (15,0 mL; 1,006-1,063 g/mL; 18-25 nm), D) HDL (20,0 mL; 1,063-1,21 g/mL; 8-11 nm). Le lipoproteine sono state separate tramite ultracentrifugazione in gradiente discontinuo di densità. I profili di eluizione sono stati ottenuti mediante cromatografia per esclusione molecolare associata a una reazione post-colonna specifica per la GGT o per il colesterolo.

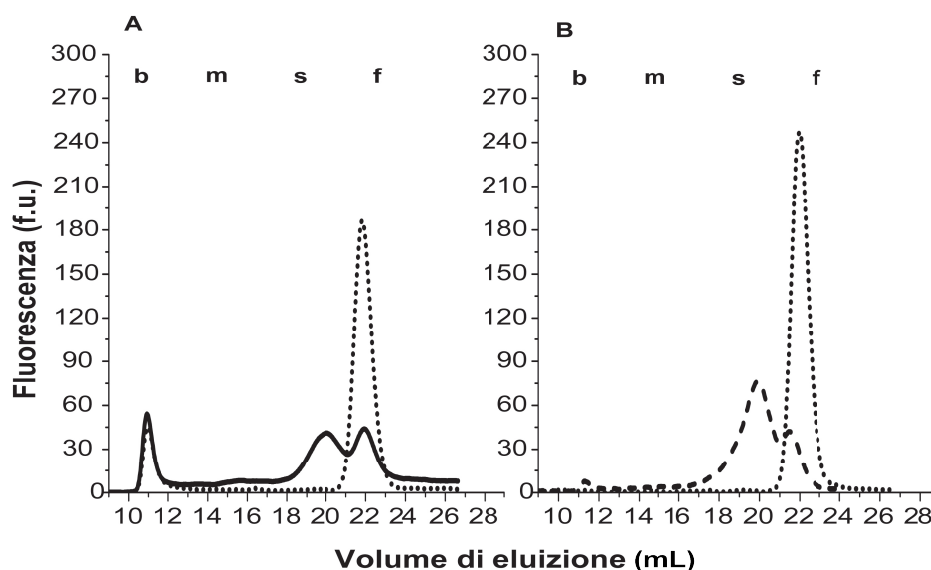


Figura 2

Effetto del trattamento con papaina e acido desossicolico (DOC) sull'attività delle frazioni di GGT di un campione rappresentativo di plasma. A) Profilo di eluzione dell'attività di GGT nel campione non trattato [linea continua; attività GGT (U/L): totale=38,8; b-GGT=8,9; m-GGT=3,1; s-GGT=14,1; f-GGT=12,6] e dopo incubazione con papaina [linea punteggiata; attività GGT (U/L): totale=49,8; b-GGT=7,5; m-GGT=non determinabile; s-GGT=non determinabile; f-GGT=42,3]. B) Profilo di eluzione dell'attività di GGT dopo incubazione con DOC [linea tratteggiata; attività GGT (U/L): totale=45,0; b-GGT=1,3; m-GGT=2,4; s-GGT=31,2; f-GGT=10,1] e dopo trattamento con DOC e papaina [linea punteggiata; attività GGT (U/L): totale=57; b-GGT=non determinabile; m-GGT=non determinabile; s-GGT=non determinabile; f-GGT=57 U/L].

maggiori dimensioni rispetto a quello che costituisce il picco principale.

Il trattamento della bile con papaina provocava la parziale riduzione del picco b-GGT e il corrispondente aumento del picco f-GGT (Figura 3). Il pre-trattamento con DOC permetteva il completo recupero dell'attività originariamente presente nel picco b-GGT in f-GGT (Figura 3). Sia nel caso del plasma che della bile, dopo il trattamento con sola papaina oppure con DOC e papaina si osservava un aumento dell'attività totale di GGT.

Recupero di microparticelle ed esosomi dal plasma e dalla bile

Nel campione corrispondente alle microparticelle separate dal plasma, si osservava un picco di attività di GGT, che eluiva prima della frazione b-GGT (Figura 4), ovvero a 10,1 mL anziché a 10,9 mL, mostrando quindi un PM maggiore. Nel "pellet" contenente gli esosomi recuperati dal plasma era presente un picco di attività che eluiva a 10,9 mL (Figura 4), corrispondente alla frazione b-GGT, che era infatti assente nel corrispondente sopranatante. In quest'ultimo rimanevano invece le frazioni m-, s- e f-GGT. Anche nel caso della bile, tutta l'attività della frazione b-GGT era recuperata nel "pellet" contenente gli esosomi, mentre f-GGT rimaneva nel sopranatante (dato non mostrato).

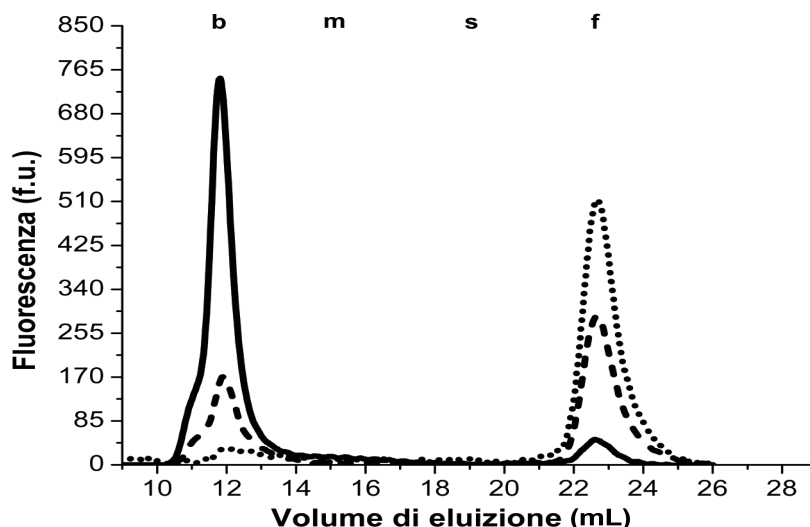
Microscopia elettronica degli esosomi purificati dal plasma e dalla bile

L'osservazione al microscopio elettronico della

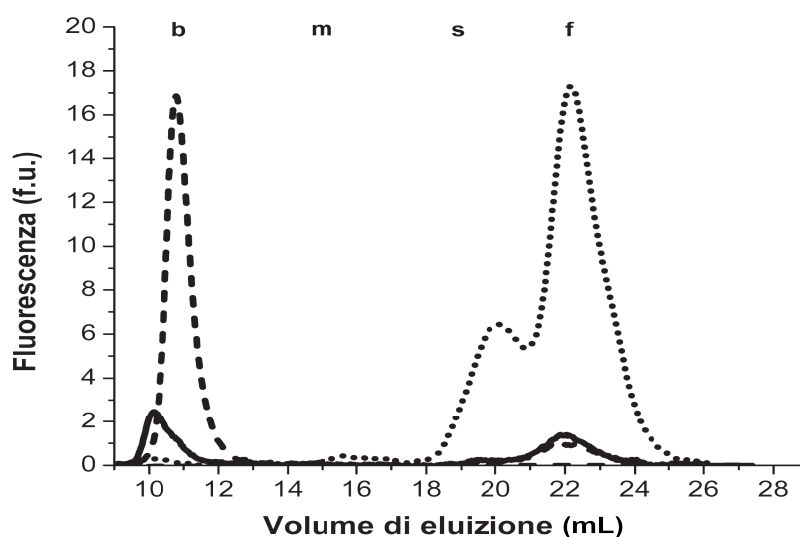
preparazione di esosomi ottenuti dal plasma e dalla bile ha permesso di verificare l'effettiva presenza, in entrambi i campioni, di microvescicole di membrana con dimensione compresa tra 20 e 50 nm, tipica degli esosomi. La presenza della proteina GGT su parte di essi è stata confermata mediante immunogold (Figura 5).

DISCUSSIONE

I risultati ottenuti in questo studio hanno rivelato un'inaspettata complessità. Infatti, sebbene ognuna delle procedure di separazione utilizzate (cromatografia per esclusione molecolare, ultracentrifugazione) abbia dimostrato un discreto grado di analogia tra il comportamento delle frazioni di GGT con maggior PM (b-GGT, m-GGT, s-GGT) e le lipoproteine circolanti VLDL, LDL e HDL, nessuna delle 3 frazioni ha dimostrato un comportamento esattamente identico a quello delle corrispondenti lipoproteine, simili per PM. Questi risultati mettono in dubbio quanto finora accettato, e cioè che le lipoproteine circolanti siano i veicoli per la GGT, proteina troppo lipofila per circolare in forma libera (25). Del resto tale interpretazione è contraddetta, oltre che dalla mancata omologia di comportamento tra frazioni di GGT e lipoproteine, dalla semplice osservazione che la frazione f-GGT ha un PM corrispondente alla sola proteina GGT e non sembra quindi circolare in associazione con nessun trasportatore plasmatico, tantomeno con l'albumina, come invece affermato da Pompili et al. (26). Questi Autori avevano però separato le frazioni di GGT tramite elettroforesi su acetato di cellulosa, una tecnica nella quale PM e carica

**Figura 3**

Effetto del trattamento con papaina e acido desossicolico (DOC) sull'attività di GGT in un campione rappresentativo di bile primaria umana. Campione non trattato, linea continua [attività GGT (U/L): totale=127,5; b-GGT=106,2; f-GGT=21,3]; dopo incubazione con papaina, linea tratteggiata [attività GGT (U/L): totale=171,2; b-GGT=62,1; f-GGT=109,1] e dopo trattamento con DOC e papaina, linea punteggiata [attività GGT (U/L): totale=217,6; b-GGT=19,6; f-GGT=198,0].

**Figura 4**

Profilo di eluizione dell'attività di GGT nel "pellet" contenente le microparticelle (linea continua), gli esosomi (linea tratteggiata) e nel plasma privo di entrambe le classi di microvescicole (linea punteggiata). I cromatogrammi presentati sono rappresentativi di un campione di plasma.

superficiale influenzano contemporaneamente la mobilità delle proteine. Tutte queste discrepanze dimostrano che le frazioni della GGT plasmatica non sono un semplice riflesso della lipofilia di questo enzima e quindi della sua capacità di adsorbirsi sulle lipoproteine circolanti: se si esclude, ma solo in parte, la frazione s-GGT, le frazioni di GGT hanno caratteristiche distintive rispetto alle lipoproteine e possono essere separate da esse con mezzi fisici.

I dati raccolti in questo studio indicano che la frazione plasmatica b-GGT è costituita da microvescicole di membrana (microparticelle e esosomi); infatti, la dimensione e la densità di b-GGT (30-80 nm; 1,06-1,21 g/mL) sono compatibili con quelle delle microvescicole di membrana (40-100 nm; 1,15-1,27 g/mL) (27). Tale frazione è sensibile all'azione del DOC, detergente in grado di disgregare le microvescicole di membrana (28); infine, tramite immunogold abbiamo dimostrato

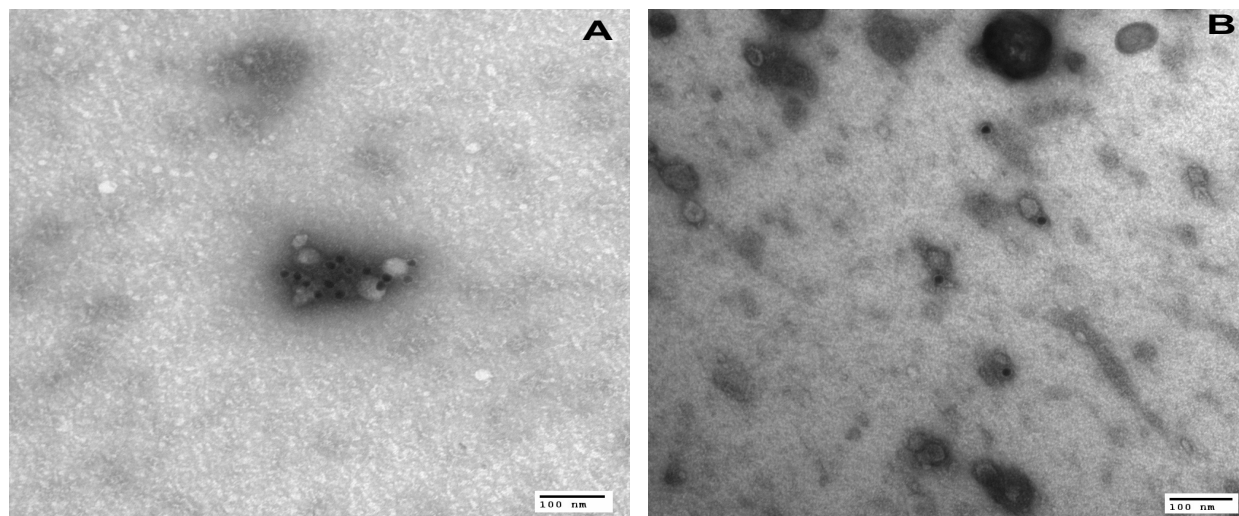


Figura 5

Immagini di microscopia elettronica della preparazione di esosomi ottenuta dal plasma (A) e dalla bile (B). I preparati sono stati incubati con un anticorpo primario specifico per la GGT e quindi con un secondario coniugato con una particella d'oro delle dimensioni di 15 nm. Dopo fissazione con glutaraldeide 0,5%, i preparati sono stati colorati negativamente con acetato di uranile.

l'inequivocabile associazione tra la proteina GGT e gli esosomi.

Le microvescicole di membrana secrete nell'ambiente extracellulare sono particolarmente arricchite in "raft" di colesterolo, particolari domini della membrana plasmatica coinvolti anche nei processi di eso- ed endocitosi (27, 28). A livello della membrana plasmatica, la GGT è specificamente localizzata nei "raft" in associazione con la tetraspanina CD81 (29), che è normalmente presente anche negli esosomi e nelle microparticelle (30). La particolare localizzazione della GGT a livello della membrana plasmatica spiega perché possa essere secreta con le microvescicole di membrana. La presenza del doppio strato fosfolipidico potrebbe nascondere il sito di taglio alla papaina, spiegando perché la frazione b-GGT non sia sensibile alla papaina in mancanza del pre-trattamento con DOC. Si potrebbe anche pensare che la GGT associata alle 4 frazioni abbia una diversa sequenza amminoacidica, ma questa ipotesi è meno probabile poiché solo il gene GGT1 è trascritto e tradotto nella proteina completa e funzionale e, a oggi, per la GGT non sono stati identificati veri e propri isoenzimi (3).

Il fatto che DOC sia in grado di disgregare la frazione b-GGT e di includere la proteina GGT in micelle delle dimensioni di s-GGT suggerisce che la frazione s-GGT sia costituita da micelle di acidi biliari e che possa derivare per conversione della frazione b-GGT dopo che questa è stata secreta. In base alla sensibilità alla papaina ma non al DOC, si può ipotizzare che anche m-GGT sia costituita da micelle di acidi biliari di dimensione maggiore rispetto a s-GGT. Infine, f-GGT è costituita da GGT solubile priva del peptide N-terminale, presente invece nella GGT delle altre 3 frazioni, e potrebbe derivare a sua volta dalle frazioni m-GGT e s-GGT. Sono tuttavia necessari ulteriori studi per determinare la

composizione di tali micelle e per capire in quale compartimento si generino queste frazioni, così come deve essere identificata la proteasi responsabile della formazione di f-GGT.

Sulla base dell'ipotesi che le frazioni m-GGT e s-GGT siano costituite da micelle di acidi biliari e GGT, è stato analizzato il profilo di eluizione delle frazioni di GGT in campioni di bile umana per poterla confrontare con quella plasmatica e stabilire il contributo del fegato all'enzima plasmatico. Contrariamente all'atteso, il profilo di eluizione dell'attività biliare di GGT ha evidenziato la presenza solo di due forme corrispondenti alle frazioni plasmatiche b-GGT e f-GGT. Questo potrebbe dipendere dal fatto che nella bile epatica la concentrazione di acidi biliari è circa 10 volte inferiore rispetto alla quantità di DOC utilizzata in questo studio per osservare la conversione della frazione plasmatica b-GGT in s-GGT. Per questo motivo sarà necessario analizzare anche il profilo di eluizione dell'attività di GGT nella bile colecistica, i cui soluti presentano una concentrazione 5-10 volte superiore rispetto alla bile epatica.

Così come nel plasma, la frazione f-GGT biliare è costituita da proteina solubile e b-GGT da esosomi, ma i dati raccolti indicano che nella frazione b-GGT biliare è presente un altro complesso molecolare, con dimensione simile agli esosomi, ma con una struttura diversa, tale da rendere accessibile alla papaina il sito di taglio presente sulla GGT. Una possibilità è che la porzione della b-GGT biliare sensibile all'azione proteolitica sia costituita da micelle di acidi biliari. Infatti, circa 80% dell'attività di GGT biliare può essere recuperata nella frazione con densità di 1,123 g/mL, che risulta anche la più ricca in proteine (55% del totale) e acidi biliari (35%), ma con il minor contenuto di fosfolipidi (17%) e addirittura priva di colesterolo (31).

Studi recenti hanno dimostrato che sia gli epatociti che i colangiociti possono rilasciare esosomi nella bile (24); inoltre, è stato dimostrato che gli esosomi rilasciati dagli epatociti interagiscono con le ciglia primarie dei colangiociti regolandone i meccanismi intracellulari e la proliferazione (24). Ciò conferma l'importanza degli esosomi come meccanismo di segnalazione intercellulare.

Nella bile, dopo trattamento con papaina, sia in assenza che in presenza di DOC, si osservava la formazione di un picco di f-GGT con attività maggiore dell'atteso, fenomeno che non è stato osservato nel plasma. Probabilmente il contesto molecolare in cui è inserita la GGT biliare altera le caratteristiche cinetiche dell'enzima (in senso inibente), ad esempio influenzando l'accessibilità del substrato al sito attivo dell'enzima. Perciò la proteina in f-GGT apparirebbe avere una cinetica enzimatica più veloce.

Alla luce di questi risultati appare chiaro che il problema della natura fisica delle forme molecolari della GGT plasmatica è fondamentale per capire il ruolo patogenetico della GGT nelle malattie associate a un suo incremento e non può essere separato da quello del suo valore diagnostico e predittivo. In uno studio *in vitro*, realizzato nel nostro laboratorio, abbiamo dimostrato che tutte le linee cellulari che esprimono GGT sulla membrana rilasciano nel mezzo di coltura attività enzimatica sotto forma di b-GGT (32). *In vivo* perciò, tutti i tessuti che esprimono GGT sulla membrana potrebbero contribuire alla frazione b-GGT. Poiché alle microvescicole di membrana sono associate proteine specifiche del tessuto di origine, l'identificazione di marcatori specifici delle cellule di origine nella frazione b-GGT permetterebbe di avere una sorta di fotografia dei tipi cellulari contribuenti alla GGT plasmatica nelle varie condizioni patologiche associate a un suo aumento.

RINGRAZIAMENTI

Gli autori ringraziano la Prof.ssa Clara Franzini-Armstrong per la realizzazione degli esperimenti di microscopia elettronica e per aver messo loro a disposizione la sua preziosa esperienza.

BIBLIOGRAFIA

- Finidori J, Laperche Y, Haguenaue-Tsapis R, et al. *In vitro* biosynthesis and membrane insertion of gamma-glutamyl transpeptidase. *J Biol Chem* 1984;259:4687-90.
- Meister A. Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem* 1988;263:17205-8.
- Whitfield JB. Gamma glutamyl transferase. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2001;38:263-355.
- Anderson ME, Allison RD, Meister A. Interconversion of leukotrienes catalyzed by purified gamma-glutamyl transpeptidase: concomitant formation of leukotriene D4 and gamma-glutamyl amino acids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:1088-91.
- Hanigan MH, Frierson HF Jr. Immunohistochemical detection of gamma-glutamyl transpeptidase in normal human tissue. *J Histochem Cytochem* 1996;44:1101-8.
- Shaw LM, London JW, Petersen LE. Isolation of gamma-glutamyltransferase from human liver, and comparison with the enzyme from human kidney. *Clin Chem* 1978;24:905-15.
- Wenham PR, Horn DB, Smith AF. *In vitro* studies upon the release of gamma-glutamyltransferase from human liver. *Clin Chim Acta* 1986;160:223-33.
- Huseby NE. Multiple form of gamma-glutamyltransferases: Biochemical characterization. *Adv Biochem Pharmacol* 1982;3:47-54.
- Huseby NE. Hydrophilic form of γ -glutamyltransferase: proteolytic formation in liver homogenates and its estimation in serum. *Clin Chim Acta* 1982;124:113-21.
- Grossi E, Colombo R, Cavuto S, et al. The REALAB project: a new method for the formulation of reference intervals based on current data. *Clin Chem* 2005;51:1232-40.
- Franzini M, Corti A, Mammini C. γ -Glutamyltransferasi: biochimica clinica e fisiopatologia umana. *Biochim Clin* 2009;33:9-38.
- Emdin M, Passino C, Michelassi C, et al. Prognostic value of serum gamma-glutamyl transferase activity after myocardial infarction. *Eur Heart J* 2001;22:1802-7.
- Fraser A, Harris R, Sattar N, et al. Gamma-glutamyltransferase is associated with incident vascular events independently of alcohol intake: analysis of the British Women's Heart and Health Study and Meta-Analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:2729-35.
- Lee DH, Jacobs DR Jr, Gross M, et al. Gamma-glutamyltransferase is a predictor of incident diabetes and hypertension: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) Study. *Clin Chem* 2003;49:1358-66.
- Fraser A, Harris R, Sattar N, et al. Alanine aminotransferase, gamma-glutamyltransferase, and incident diabetes: the British Women's Heart and Health Study and meta-analysis. *Diabetes Care* 2009;32:741-50.
- Lee DS, Evans JC, Robins SJ, et al. Gamma glutamyl transferase and metabolic syndrome, cardiovascular disease, and mortality risk: the Framingham Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:127-33.
- Franzini M, Bramanti E, Ottaviano V, et al. A high performance gel filtration chromatography method for gamma-glutamyltransferase fraction analysis. *Anal Biochem* 2008;374:1-6.
- Franzini M, Ottaviano V, Fierabracci V, et al. Fractions of plasma gamma-glutamyltransferase in healthy individuals: reference values. *Clin Chim Acta* 2008;395:188-9.
- Franzini M, Fornaciari I, Fierabracci V, et al. Accuracy of b-GGT fraction for the diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2011; doi:10.1111/j.1478-3231.2011.02673.x.
- Franzini M, Corti A, Martinelli B, et al. Gamma-glutamyltransferase activity in human atherosclerotic plaques-biochemical similarities with the circulating enzyme. *Atherosclerosis* 2009;202:119-27.
- Chapman MJ, Goldstein S, Lagrange D, et al. A density gradient ultracentrifugal procedure for the isolation of the major lipoprotein classes from human serum. *J Lipid Res* 1981;22:339-58.
- Li J, Sherman-Baust CA, Tsai-Turton M, et al. Claudin-containing exosomes in the peripheral circulation of women with ovarian cancer. *BMC Cancer* 2009;9:244-54.
- Logozzi M, De Milito A, Lugini L, et al. High levels of exosomes expressing CD63 and Caveolin-1 in plasma of melanoma patients. *PLoS One* 2009;4:5219-28.
- Masyuk AI, Huang BQ, Ward CJ, et al. Biliary exosomes influence cholangiocyte regulatory mechanisms and proliferation through interaction with primary cilia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010;299:G990-9.

25. Huseby NE. Multiple forms of γ -glutamyltransferase. Association of the enzyme with lipoproteins. *Clin Chim Acta* 1982;124:103-12.
26. Pompili M, Addolorato G, Pignataro G, et al. Evaluation of the albumin-gamma-glutamyltransferase isoenzyme as a diagnostic marker of hepatocellular carcinoma-complicating liver cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:288-95.
27. Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol* 2009;19:43-51.
28. Hanzal-Bayer MF, Hancock JF. Lipid rafts and membrane traffic. *FEBS Lett* 2007;581:2098-104.
29. Nichols TC, Guthridge JM, Karp DR, et al. Gamma-glutamyl transpeptidase, an ecto-enzyme regulator of intracellular redox potential, is a component of TM4 signal transduction complexes. *Eur J Immunol* 1998;28:4123-9.
30. Simpson RJ, Lim JW, Moritz RL, et al. Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential. *Expert Rev Proteomics* 2009;6:267-83.
31. Accatino L, Pizarro M, Solís N, et al. Association of canalicular membrane enzymes with bile acid micelles and lipid aggregates in human and rat bile. *Biochim Biophys Acta* 1995;1243:33-42.
32. Franzini M, Corti A, Fornaciari I, et al. Cultured human cells release soluble gamma-glutamyltransferase complexes corresponding to the plasma b-GGT. *Biomarkers* 2009;14:486-92.