

LA COLINESTERASI IN *DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM*: DALLA RICERCA DI BASE ALL'INDAGINE ECO-TOSSICOLOGICAA. AMAROLI

amaroli@dipteris.unige.it

Laboratorio Protistologia, DIP.TE.RIS., C.so Europa, 26, 16132 Genova

La cellula protozoo, da un punto di vista ecologico, è un'unità più comparabile a un organismo animale che a una delle cellule di cui tale organismo è costituito (T. FENCHEL, *Ecology of Protozoa*, 1987). Infatti, i protozoi sono in grado d'interagire sia con l'ambiente che li circonda sia con gli altri organismi, della stessa specie o di specie diverse, comportandosi al pari dei metazoi come unità di selezione. Nell'ambito dei fenomeni di comunicazione tra i protozoi, le interazioni cellulari che avvengono nel ciclo di sviluppo di *Dictyostelium discoideum*, hanno da tempo focalizzato l'attenzione degli studiosi. *Dictyostelium*, presenta un ciclo di sviluppo costituito da una fase di moltiplicazione di cellule singole, a cui seguono una fase di aggregazione e una fase di differenziamento delle cellule aggregate in due tipi cellulari: le cellule stelo, somatiche, destinate a morire e le cellule spore, generative, che conservano la capacità riproduttiva. Tali fasi, presentano alcune caratteristiche in comune con il processo di embriogenesi animale, compresi i processi di regolazione delle adesioni cellula-cellula (J.C. COATES & A.J. HARWOOD, *J. Cell Sci.*, 2001). Il ruolo dell'attività di colinesterasi (ChE) durante lo sviluppo embrionale è conosciuto da tempo. In particolare, numerosi studi hanno evidenziato come tale ruolo può essere di tipo "classico", intervenendo nel processo di neurotrasmissione colinergica o di tipo "non-classico", giocando un ruolo non-colinergico, nei processi di differenziamento e adesione cellulare o nella crescita del neurite (L.E. PARAOANU *et al.*, *J Mol Neurosci*, 2006). Muovendo da tali premesse, mediante tecniche di: immunocitochimica, citochimica, spettrofotometria ed elettroforesi, abbiamo indagato la presenza di enzimi ChE in *D. discoideum*. Dai risultati ottenuti, si evidenzia come *D. discoideum* presenta una proteina con epitopi riconosciuti dall'anticorpo anti-BChE (N-15) umana, di peso molecolare apparente di 81 kDa, che presenta un'elevata affinità al substrato ioduro di propionil-tiocolina rispetto ai substrati ioduro di acetil- o butirril-tiocolina e pertanto denominata propionilcolinesterasi (PrChE). Tale risultato è sostenuto dall'individuazione in *D. discoideum*, avvenuta dopo il sequenziamento del suo genoma (L. EICHINGER *et al.*, *Nature*, 2005), di una sequenza putativa con similarità verso l'enzima butirrilcolinesterasi. La presenza di molecole deputate alla neurotrasmissione in un organismo unicellulare privo di sistema nervoso, sostiene quanto affermato da McMAHON (*Science*, 1974) secondo cui queste molecole insieme ai nucleotidi ciclici, siano da sempre utilizzate nelle comunicazioni cellula-cellula dapprima relativamente lente come in questi eucarioti "pre-

nervosi” (G.A. BUZNIKOV, *Physiol. Gen. Biol.*, 1990) poi rapide in seguito all’evoluzione nei metazoi di strutture sinaptiche specializzate. Inoltre, in organismi primitivi quali *Murex*, è stata avanzata l’ipotesi che la ChE capace di idrolizzare la propionilcolina sia una forma primitiva, capace anche di idrolizzare butirrilcolina, acetilcolina e forse altri esteri aspecifici della colina (V. TALESA *et al.*, *Comp. Biochem. Physiol.*, 1990). In base a questa ipotesi, la ChE primitiva presenterebbe un sito attivo a più ampio spettro, mentre il sito più ristretto dell’acetilcolinesterasi dei vertebrati discriminerebbe tra i diversi substrati quello specifico. La successiva caratterizzazione dell’attività di PrChE di *Dictyostelium* da noi eseguita al variare di pH e temperatura e mediante l’esposizione a inibitori specifici dell’attività di ChE, evidenzia un comportamento di tale attività enzimatica molto simile a quello delle ChE dei vertebrati mostrando un’elevata sensibilità all’iso-OMPA inibitore classico delle attività di pseudocolinesterasi e a un ampio *range* di pesticidi organofosfati e carbammati, conosciuti per la loro specifica azione inibitoria su questi enzimi. L’identificazione di un enzima funzionalmente correlato alle pseudocolinesterasi che è in grado di rispondere alla presenza di pesticidi al pari delle ChE dei macroinvertebrati e vertebrati, fornisce un nuovo approccio all’uso dei protozoi come indicatori “ecologici” nel biomonitoraggio. In virtù di questi risultati nell’ambito delle strategie 3Rs (*Reducing, Refining and Replacing tests on vertebrate organisms in toxicological studies*) *D. discoideum* e, in particolare, il suo enzima PrChE, sono stati da noi utilizzati rispettivamente come bioassay e biomarker alternativi all’uso di macroinvertebrati e vertebrati, in studi: ecotossicologici, inerenti sia la qualità delle acque estuariali in zone agricole della Liguria che l’effetto dei cambiamenti climatici e l’uso di pesticidi nei suoli agricoli; tossicologici, inerenti sia l’individuazione di pesticidi negli alimenti destinati all’infanzia che gli effetti dell’esposizione a *Olive Oil Waste Water*; d’inquinamento ambientale, inerenti gli effetti di campi elettromagnetici a bassa intensità e frequenza.