

## DIPARTIMENTO DI BIOTECNOLOGIE AGRARIE

### PROGETTO

***Possibile ruolo dei cianobatteri produttori di aminoacidi neurotossici nell'insorgenza della SLA.***

**RESPONSABILE SCIENTIFICO:** Prof. Mario Tredici

**COLLABORATORI:** N. Biondi, R Taiuti, G. Stipa

I cianobatteri, un gruppo di eubatteri Gram negativi capaci di svolgere la fotosintesi ossigenica, sono da tempo noti come produttori di tossine (citotossine, epatotossine e neurotossine). Le fioriture di cianobatteri tossici, che stanno diventando un grave problema sanitario in molti paesi soprattutto in seguito al cambiamento del clima, possono essere causa di tossicosi sia in animali che nell'uomo.

La Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) è una patologia degenerativa rara (0.6-2.6 casi su 100.000 abitanti) che colpisce i motoneuroni del sistema nervoso centrale. Recentemente, è stata evidenziata nei calciatori italiani un'incidenza della SLA oltre 10 volte superiore a quella della popolazione generale (Beretta et al., 2003). Una variante particolare della SLA è il cosiddetto "complesso SLA-Parkinson-Demenza" (SLA-PDC) di Guam, un'isola dell'Oceano Pacifico sotto giurisdizione USA. Questa malattia è stata messa in relazione con il consumo da parte dei nativi di due specie di pipistrello (le volpi volanti, *Pteropus tokudae* e *P. mariannus*) che si alimentano di semi e foglie di *Cycas micronesica*, contenenti un aminoacido neurotossico, la  $\beta$ -N-metilamino-L-alanina (BMAA). Cox et al. (2003) hanno messo in evidenza come la BMAA sia prodotta da cianobatteri del genere *Nostoc* che si trovano come simbionti nelle radici coralloidi delle *Cycas*. Da qui la tossina viene biomagnificata attraverso i semi della pianta fino alle volpi volanti, dove raggiunge concentrazioni 10.000 volte superiori a quelle nell'organismo produttore. Murch et al. (2004) hanno riscontrato la BMAA in cervelli di pazienti affetti da SLA-PDC e da Alzheimer; dato non confermato da Montine et al. (2005) in altri pazienti affetti dalle stesse patologie.

Gli studi sulla SLA-PDC di Guam hanno aperto la strada a successive indagini riguardo i cianobatteri e la BMAA, che hanno portato alla scoperta che questa

molecola viene prodotta da cianobatteri appartenenti a tutte le sottosezioni (Cox et al., 2005). Sebbene i ceppi testati siano pochi (30), la percentuale di ceppi produttori è elevatissima (97%).

Visto il crescente problema delle fioriture cianobatteriche e la sorprendente frequenza con cui la BMAA è stata riscontrata nei cianobatteri e la contraddittorietà dei dati medici sulla presenza di BMAA nei tessuti cerebrali dei pazienti affetti da patologie neurodegenerative, riteniamo di grande interesse: 1) analizzare estratti di biomasse cianobatteriche di ceppi appartenenti alla collezione del Dipartimento di Biotecnologie Agrarie, per verificare i dati sulla frequenza della produzione di BMAA in questo gruppo microbico; 2) analizzare i liquidi biologici (liquor, siero e urine) di pazienti affetti da SLA, per verificare la presenza di BMAA o del suo derivato biologicamente attivo, la BMAA-carbammato e poter così contribuire alla chiarificazione del ruolo di questa molecola e dei cianobatteri nell'insorgenza della patologia (Stipa et al., 2006). La determinazione della BMAA e dei suoi derivati sarà effettuata presso il CISM utilizzando la HPLC-ESI-MS-MS.

1. Beretta S, Carri MT, Beghi E, Chiò A, Ferrarese C (2003) *Lancet Neurol*, 2(11): 656-657.
2. Cox PA, Banack SA, Murch SJ (2003) *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(23): 13380-13383.
3. Cox PA, Banack SA, Murch SJ, Rasmussen U, Tien G, Bidigare RR, Metcalf JS, Morrison LF, Codd GA, Bergman B (2005) *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(14): 5074-5078.
4. Murch SJ, Cox PA, Banack SA, Steele JC, Sacks OW (2004) *Acta Neurol Scand*, 110(4): 267-269.
5. Montine TJ, Li K, Perl DP, Galasko D (2005) *Neurology*, 65(5): 768-769.
6. Stipa G., de Scisciolo G., Lolli F., Arnetoli G., Tredici M., Biondi N., Pinto F., Taiuti R. (2006) *Sclerosi Laterale Amiotrofica: epidemiologia di una malattia infettiva? Riunione annuale sezione Tosco-Umbra della SIN, Prato, 17-18/03/06.*

## *Cianobatteri e SLA*



Eutrofizzazione: sviluppo abnorme di biomassa fotosintetica in seguito all'apporto di nutrienti



(b)

A Sinistra: un lago eutrofico (lago Mendota) nel Wisconsin (USA) con sviluppo di alghe, cianobatteri e macrofite conseguenza del massiccio uso di fertilizzanti nelle zone agricole adiacenti al bacino

## La sclerosi laterale amiotrofica (SLA) e il complesso SLA/Demenza-Parkinson di Guam (SLA-PD)

1. La SLA si manifesta con debolezza generale che progredisce fino a completa paralisi delle braccia, le gambe ed il tronco. I pazienti muoiono dopo 2-6 anni dai primi sintomi per incapacità a deglutire e/o respirare. L'autopsia del midollo e del tessuto cerebrale rivela la morte dei neuroni motori
2. Colpisce gli adulti (prevalentemente l'uomo)
3. Ultimamente si è riscontrato un aumento di incidenza di SLA (oltre 20 volte rispetto alla popolazione) tra i calciatori italiani
4. E' spesso associata ad ambiente rurale e traumi

### Quali le cause?

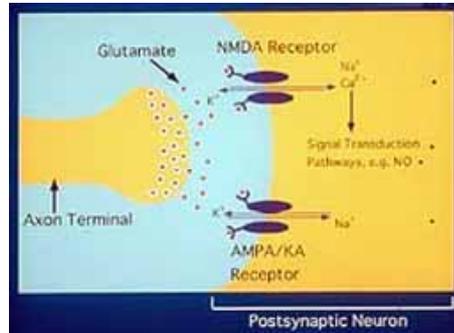
	Diagnosis	Nationality	Age at death (Yr)	BMAA (ug/g) Frontal Cortex	BMAA (ug/g) Temporal Cortex
University of Miami Brain Endowment Bank(I)	ALS	USA	55	71±7	.....
	ALS	USA	66	102±7	.....
	ALS	USA	67	86±5	.....
	ALS	USA	70	256±37	.....
	ALS	USA	70	.....	.....
	ALS	USA	74	78±3	.....
	ALS	USA	77	182±11	.....
	ALS	USA	79	89±7	.....
	ALS	USA	83	115±8	.....
	ALS	USA	83	.....	.....
	AD	USA	84	.....	122±11
	AD	USA	80	.....	157±3
	AD	USA	90	.....	46±6
	Control	USA	81	.....	89±1
Control	USA	83	.....	ND	
Control	USA	46	.....	ND	
Control	USA	54	.....	ND	
Control	USA	68	.....	ND	
Control	USA	78	.....	ND	
Previously reported cases	ALS <sup>1</sup>	Chamorro	68	610	.....
	PDC <sup>1</sup>	Chamorro	60	1190	.....
	PDC <sup>1</sup>	Chamorro	69	644	.....
	PDC <sup>1</sup>	Chamorro	77	736	.....
	PDC <sup>1</sup>	Chamorro	60	149	.....
	PDC <sup>1</sup>	Chamorro	67	433	.....
	AD <sup>1</sup>	Canadian	-	220	.....
	AD <sup>1</sup>	Canadian	-	264	.....
	AD <sup>1</sup>	Canadian	-	25.9	.....
	AD <sup>2</sup>	Canadian	-	41.2	33.7
	AD <sup>2</sup>	Canadian	-	ND	53.1
	AD <sup>2</sup>	Canadian	-	ND	170.8
	AD <sup>2</sup>	Canadian	-	ND	ND
	AD <sup>2</sup>	Canadian	-	45.7	.....
Control <sup>1</sup>	Chamorro	41	82	.....	
Control <sup>1</sup>	Chamorro	61	ND	.....	
Control <sup>2</sup>	Canadian	-	ND	ND	

**Concentrazione di BMAA nelle regioni frontale e temporale del cervello di pazienti morti di SLA, Alzheimer o SLA/PD**

## La BMAA ( $\beta$ -N-metilammino-L-alanina)



La BMAA è un aminoacido non proteico con azione neurotossica (agonista del glutamato)



## La SLA-Demenza-Parkinson di Guam

Cox et al. PNAS (2003)

### Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam

Paul Alan Cox<sup>1\*</sup>, Sandra Anne Blusack<sup>2,3</sup>, and Susan J. March<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Institute for Microbiology, National Tropical Botanical Garden, Kalaheo, HI 96741, and <sup>2</sup>Department of Biological Sciences, California State University, Fullerton, CA 92831

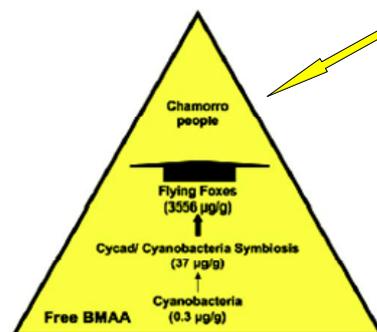


Fig. 1. Biomagnification of cyanobacterial BMAA in Guam. The widths of the arrows are proportional to the concentration of free BMAA delivered to the next higher trophic level.

- Nel tessuto cerebrale di indigeni Chamorro morti di SLA-PD si ritrova la BMAA (in media 6,6 µg/g)
- La popolazione Chamorro si nutre di volpi volanti (*Pteropus*) le quali cibandosi dei semi delle *Cycas* ne concentrano le tossine.
- La fonte della tossina nelle *Cycas*: un cianobatterio del genere *Nostoc*, simbiote nelle radici.
- Nel cianobatterio libero la concentrazione di BMAA è 0,3 µg/g, nelle radici delle *cycas* è di 37 µg/g, nelle volpi volanti arriva a 3,6 mg/g.

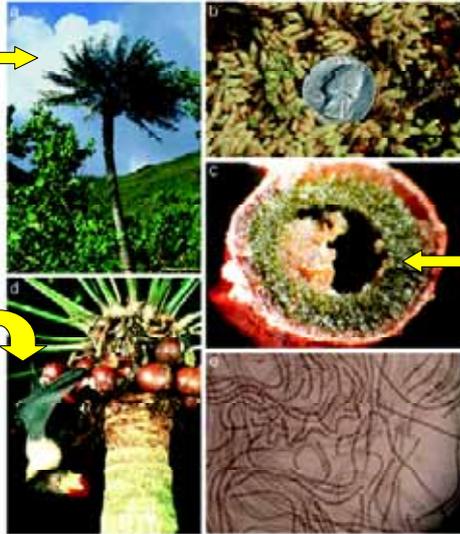
Cox et al. PNAS (2003)

(Cox et al., PNAS, 2003)

Anche le foglie contengono BMAA (sapore amaro deterrente contro erbivori?)

Le volpi volanti si nutrono dei semi di cicas che contengono BMAA.

Sono al loro volta cibo dei Chamorro che le mangiano, in occasione di festività, bollite in latte di cocco.



I nostoc vivono in simbiosi nelle radici coralloidi. Le radici coralloidi contengono la BMAA.

Le radici non colonizzate non hanno BMAA.

Fig. 2. *C. mitronevica* Hill. (a) Habit in South Guam as a 4-m-tall unbranched tree. (b) Positively geotropic coralloid roots with tips cut to show zone of cyanobacterial invasion. (c) Cross section of coralloid root showing green ring of cyanobacterial growth. (d) *P. maxillaris* feeding on fleshy sarcolemma of seed siphon (courtesy of Merlin Furttle, Bat Conservation International). (e) Cyanobacteria of the genus *Nostoc* cultured from the coralloid roots.

(Cox et al., PNAS, 2005)

Tutti i cianobatteri (non solo i simbionti) possono produrre BMAA

PNAS  
 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America  
 Journal List > Proc Natl Acad Sci U S A > Articles With Immediate Free Access  
 Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 April 5; 102(14): 5074-5078.  
 doi: 10.1073/pnas.0501526102. Published online 2005 April 4.  
 Copyright © 2005, The National Academy of Sciences

Ecology

**Diverse taxa of cyanobacteria produce  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid**

Paul Alan Cox,<sup>1\*</sup> Sandra Anne Banack,<sup>2</sup> Susan J. Murch,<sup>3</sup> Ulla Rasmussen,<sup>5</sup> Georgia Tien,<sup>4</sup> Robert Richard Bidigare,<sup>1</sup> James S. Metcalf,<sup>6</sup> Louise F. Morrison,<sup>7</sup> Geoffrey A. Codd,<sup>8</sup> and Birgitta Bergman<sup>5</sup>

Fig. 3. Cyanobacterial strains that produce BMAA representing different morphological sections. (a) The filamentous, filamentous, and colony-forming *Nitzschium thiebautii* (section BB). (Scale bar: 100  $\mu$ m.) (b) The unicellular *Spirulococcus* PCC 6305 (section D). (Scale bar: 1  $\mu$ m.) (c) The filamentous *Synedra* PCC 8002 (section BB). (Scale bar: 10  $\mu$ m.) (d) The filamentous, nonbranching, and heterocystous P4 *Nostoc* PCC 7387 (section F10). (Scale bar: 10  $\mu$ m.) (e) The filamentous, heterocystous (H) and branching (G) *Fischerella* PCC 7521 (section V). (Scale bar: 15  $\mu$ m.)

29 ceppi positivi su 30 testati

Table 2. BMAA in free-living cyanobacteria

Cyanobacterial species/strain	Section*	Habitat	Origin	Free BMAA, $\mu\text{g/g}$	Protein BMAA, $\mu\text{g/g}$
<i>Microcystis</i> PCC 7806	I	Freshwater	The Netherlands	4	6
<i>Microcystis</i> PCC 7820	I	Freshwater	Scotland	6	12
→ <i>Prochlorococcus marinus</i> CCMP1377	I	Marine	Sargasso Sea	32*	57*
<i>Synechococcus</i> PCC 6308	I	Freshwater	U.S.A.	ND	ND
<i>Synechococcus</i> PCC 6301	I	Freshwater	U.S.A.	25	ND
<i>Chroococcoidopsis indica</i> GQ2-7	II	Marine coral	Unknown	435	76
<i>Chroococcoidopsis indica</i> GT-3-26	II	Marine rock	Unknown	1,306	5,415
<i>Myosarcina burmensis</i> GB-9-4	II	Marine coral	Marshall Islands	79	1,943
<i>Myosarcina concinna</i> GT-7-6	II	Marine coral	Unknown	1,501	960
<i>Lyngbya majuscula</i>	III	Marine	Zanzibar	32	4
<i>Planktothrix agardhii</i> NIES 595	III	Freshwater	Northern Ireland	318	30
<i>Plectonema</i> PCC 73110	III	Unknown	Unknown	155	150
<i>Phormidium</i>	III	Unknown	Unknown	11	270
<i>Symphoca</i> PCC 8002	III	Marine, intertidal	U.K.	3	262
→ <i>Trichodesmium thiebautii</i>	III	Marine	Caribbean	145	8
→ <i>Trichodesmium</i> CCMP1985	III	Marine, coastal	North Carolina	13*	17*
<i>Anabaena</i> PCC 7120	IV	Unknown	U.S.A.	32	ND
<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	IV	Freshwater	U.S.A.	35	ND
→ <i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	IV	Marine	Baltic sea	ND	866
<i>Cylindrocapsa raciborskii</i> CR3	IV	Freshwater	Australia	6,478	14
<i>Nodularia spumigena</i>	IV	Brackish water	Baltic sea	16*	50*
<i>Nodularia harveyana</i> CCAP 1452/1	IV	Marine	Unknown	20	11
→ <i>Nostoc</i> 268	IV	Brackish Water	Baltic sea	34	274
→ <i>Nostoc</i> PCC 6310	IV	Freshwater	Israel	42	ND
→ <i>Nostoc</i> PCC 7107	IV	Freshwater	U.S.A.	27	1,772
→ <i>Nostoc</i> sp. CMMED 01	IV	Marine	Hawaiian Islands	1,243	1,070
<i>Calothrix</i> PCC 7103	IV	Unknown	Unknown	13*	92*
<i>Chlorogloeopsis</i> PCC 6912	V	soil	India	758	ND
<i>Fischerella</i> PCC 7521	V	Yellowstone, hot spring	U.S.A.	44	175
<i>Scytonema</i> PCC 7110	V	Limestone cave	Bermuda	ND	1,733

ND, not detected.

\*Morphological groupings are as defined in ref.1. Section I, unicellular cyanobacteria that reproduce by binary fission or budding; section II, unicellular cyanobacteria that reproduce by multiple fission or by both multiple fission and binary fission; section III, filamentous, nonheterocystous cyanobacteria that divide in one plane; section IV, filamentous, heterocystous cyanobacteria that divide in only one plane; section V, heterocystous, filamentous cyanobacteria that divide in more than one plane.

\*Estimate of concentration based on <1 mg dry weight of sample.

\*BMAA was not detected in all samples of this isolate.

Cox et al. PNAS, 2005

Blooms di cianobatteri sono sempre più frequenti ed estesi:

1. Il riscaldamento della terra favorisce i cianobatteri, più termofili delle microalghe
2. Le tempeste di sabbia "iron laden dust" fertilizzano gli oceani

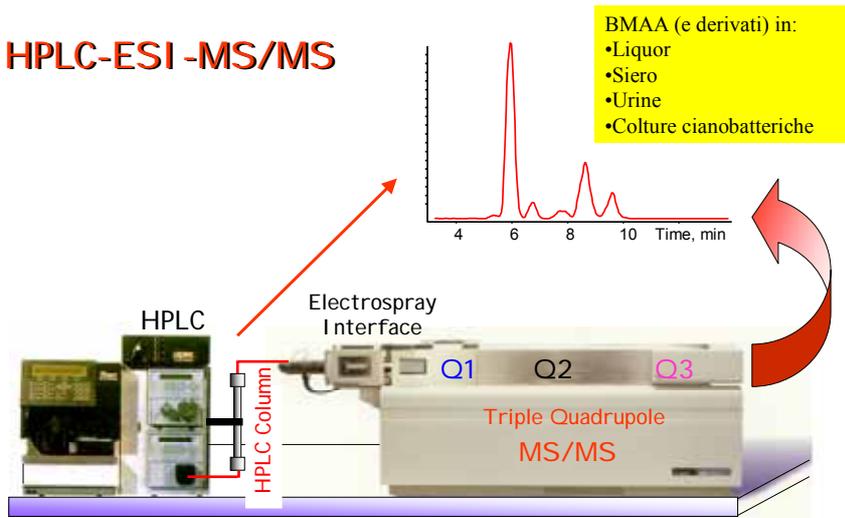


Tempesta di sabbia



Bloom in Atlantico (ad ovest l' Argentina)

## HPLC-ESI-MS/MS



- Dipartimento di Biotecnologie Agrarie
- Dipartimento di Scienze Neurologiche e Psichiatriche
- CISM