

# FUNZIONE NATURALE, MODIFICAZIONI STRUTTURALI E PROPRIETÀ FARMACOLOGICHE DEL CLIMACOSTOLO

Federico Buonanno, Claudio Ortenzi

Dipartimento di Scienze della Formazione, dei Beni Culturali e del Turismo,  
Università degli Studi di Macerata, Macerata

## Introduzione

Gli organismi acquatici vivono in ambienti eccezionalmente ricchi di specie in reciproca competizione e per questo motivo per sopravvivere e riprodursi hanno sviluppato un gran numero di strategie adattative che nei microbi unicellulari eucariotici (protisti) appaiono particolarmente ben rappresentati.

Ad esempio, i metaboliti secondari prodotti dai ciliati includono sostanze tossiche immagazzinate nel citoplasma cellulare o all'interno di organelli eiettabili (noti come estrusomi) che sono ancorati al *cortex* cellulare prima di essere eventualmente utilizzati nelle interazioni predatore-preda (1). Questi metaboliti secondari sono sintetizzati attraverso diverse vie biogenetiche e sono stati, spesso definiti sulla base dei nomi tassonomici dei loro organismi di origine (1).

Il climacostolo (5 - [(2Z) -non-2-en-1-yl] benzene-1,3-diolo) (Figura 1) è un metabolita secondario tossico fisiologicamente prodotto dal *Climacostomum virens*, protista ciliato di acqua dolce e utilizzato per la difesa chimica contro predatori unicellulari e multicellulari (2).

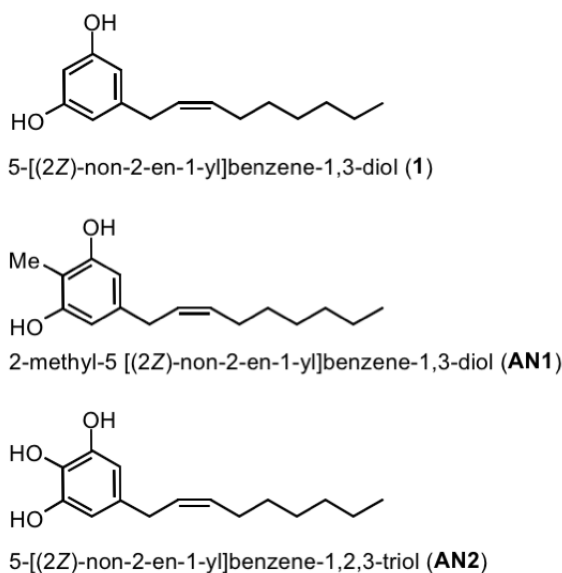


Figura 1. Formule di struttura del climacostolo (1) e dei due analoghi (AN1 e AN2)

Questa molecola è formata da uno scheletro fenolico e da una lunga catena idrocarburica alifatica insatura legata alla struttura ad anello, e appartiene alla classe dei lipidi resorcinolici (o alchenilresorcinoli), un gruppo di composti anfifilici naturali rilevati sia nei procarioti che negli eucarioti. I 5-alchenilresorcinoli hanno solitamente un doppio legame isolato nella porzione della catena della molecola, mentre gli esempi con un doppio legame coniugato con anello aromatico sono rari (3). Il climacostolo è stato anche sintetizzato chimicamente nella configurazione *Z* naturale e più bioattiva per mezzo di una sintesi semplice ed efficiente che ha permesso ai ricercatori di studiarne meglio gli effetti su diversi sistemi biologici (4).

## Climacostolo come antimicrobico

Dopo aver studiato la citotossicità del climacostolo e alcuni suoi derivativi (ottenuti sostituendo il doppio legame con uno singolo o triplo in posizione C8) su altri protisti ciliati (5), le molecole sono state testate anche su alcuni batteri patogeni Gram-positivi e Gram-negativi e sul fungo *Candida albicans* (6). I risultati hanno mostrato la presenza di un'attività antimicrobica apprezzabile e comparabile dei tre composti, che erano efficaci contro batteri Gram-positivi e *C. albicans* con concentrazioni inibitorie minime (*Minimal Inhibitory Concentration*, MIC) e concentrazioni battericide minime (*Minimum Bactericidal Concentration*, MBC) comprese tra 8 e 32 mg L<sup>-1</sup>. Al contrario, non è stata osservata alcuna tossicità significativa contro le specie Gram-negative (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) (6). Gli Autori hanno ipotizzato che questo effetto limitato osservato sulle specie Gram-negative possa essere spiegato dalla particolare struttura della parete cellulare batterica. La membrana esterna di questi batteri è infatti una barriera selettiva alla penetrazione di diversi composti, a causa della natura idrofila della superficie esposta all'ambiente e alla selettività delle proteine della membrana esterna. I risultati ottenuti suggeriscono che il tasso di saturazione della catena laterale del climacostolo non influisce sulla sua attività antimicrobica, pertanto è probabile che la struttura generale delle due frazioni di climacostolo, cioè il gruppo di-idrossifenile e le catene alcheniliche, contribuisca all'azione antibiotica nel suo complesso.

## Climacostolo come antitumorale

Il climacostolo riduce la progressione del tumore tramite apoptosi dipendente da p53. Sulla base dell'attività antitumorale mostrata da un certo numero di altri lipidi resorcinolici, gli effetti del climacostolo sono stati studiati *in vitro* su alcune linee cellulari tumorali umane e di ratto (7).

In particolare, esperimenti condotti su cellule tumorali di carcinoma squamoso umano A431 e cellule leucemiche promielocitiche umane HL60 hanno dimostrato che il climacostolo esercita la sua azione inibendo la crescita cellulare e innescando un programma apoptotico dipendente dai mitocondri. Successivi *screening in vitro* e *in vivo* hanno confermato le precedenti osservazioni (3).

Per quanto riguarda il meccanismo d'azione del climacostolo, è stato dimostrato che esso può innescare l'apoptosi legandosi al *DeoxyriboNucleic Acid* (DNA) nucleare e mitocondriale e promuovendone la scissione successivamente alla generazione di specie reattive dell'ossigeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS) in presenza di Cu (II) (8). D'altro canto è noto che l'induzione di un danno a livello del DNA nucleare potrebbe essere efficace nel trattamento del cancro, e molti farmaci antitumorali attualmente impiegati, ad esempio alcuni composti del platino, funzionano per mezzo di questo meccanismo (9).

In effetti, recenti indagini sul meccanismo d'azione del climacostolo hanno permesso di osservare che la molecola riduce la vitalità/proliferazione delle cellule di melanoma, provocando un rapido danno al DNA, inducendo anche la via intrinseca apoptotica caratterizzata dalla dissipazione del potenziale della membrana mitocondriale, la traslocazione di Bax ai mitocondri, il rilascio del citocromo C dai mitocondri e l'attivazione della scissione della caspasi 3 dipendente dalla caspasi 9 (9, 10).

In ulteriori studi è stata ottenuta una persistente inibizione della crescita di allotrapianti di melanoma, nonché una riduzione del numero di cellule tumorali vitali e proliferanti, per mezzo di iniezioni intratumorali della tossina (10). È stata anche suggerita l'idea che il climacostolo possa indurre una diminuzione della microvascolarizzazione che contribuisce all'inibizione della crescita del melanoma (10).

È stato anche osservato un significativo miglioramento della sopravvivenza dei topi trapiantati, insieme a una diminuzione della massa tumorale e una riduzione del numero di cellule vitali all'interno del tumore (10). Apparentemente, la cascata di eventi innescati dal climacostolo che porta all'innescio della morte cellulare programmata dipende dall'attivazione della proteina antitumorale 53 (p53) e dei suoi target pro-apoptotici Noxa e Puma.

## **Climacostolo come induttore dell'autofagia disfunzionale nelle cellule tumorali**

In tutte le cellule eucariotiche, un ruolo fondamentale per il mantenimento dell'omeostasi è svolto dall'autofagia, il processo altamente conservato che opera attraverso la degradazione di organelli citoplasmatici, proteine e macromolecole e il riciclaggio dei prodotti di degradazione. Poiché l'autofagia supporta la sopravvivenza cellulare o attiva le vie della morte programmata, può rappresentare un potenziale bersaglio per la libreria disponibile di sostanze antitumorali e per lo sviluppo di nuove molecole. Alcuni di noi hanno recentemente riferito di come il climacostolo interferisca con l'autofagia per mezzo dell'attivazione di meccanismi dipendenti dalla p53 (11).

In sostanza, i nostri dati hanno indicato che la tossina protozoaria altera in modo potente e selettivo l'autofagia, determinando un accumulo marcato e prolungato di autofagosomi nelle cellule tumorali che sono destinate a morire per apoptosi.

Degne di nota sono le indicazioni che suggeriscono che gli effetti del climacostolo sull'autofagia e l'apoptosi sono in realtà due eventi separati che possono agire indipendentemente sulle decisioni di sopravvivenza o morte della cellula.

## **Climacostolo come antivirale**

Il nuovo scenario epidemiologico si è finora concentrato sulla circolazione nell'ambiente dei patogeni virali umani. A causa degli effetti collaterali dei disinfettanti chimici, c'è un bisogno crescente di conoscenze sull'uso dei composti virucidi, con particolare riguardo a quelli di origine naturale.

In aggiunta all'attività antibatterica del climacostolo è stata esplorata di recente anche la possibile attività antivirale. Per valutare questa attività, è stato scelto l'adenovirus umano (HAdV), conducendo esperimenti con il sierotipo 5 HAdV, il cui titolo è stato determinato infettando colture cellulari HeLa (12). I risultati ottenuti hanno confermato che HAdV5 è effettivamente sensibile al climacostolo a una concentrazione di 0,0002 mg/mL, con una

riduzione di circa 3 Log<sub>10</sub> quando il titolo iniziale di HAdV5 era approssimativamente del valore di 10<sup>4</sup> e 10<sup>3</sup> come *Median Tissue Culture Infectious Dose*, TCID<sub>50</sub>/mL (12).

Questi risultati preliminari potrebbero essere un importante punto di partenza per ulteriori ricerche volte a migliorare la caratterizzazione dell'attività del climacostolo in differenti condizioni sperimentali e contro vari virus, compresi quelli con involucro (coronavirus). La produzione di climacostolo da parte di un protista che vive in acqua dolce potrebbe inoltre suggerire un possibile utilizzo del protozoo nei fanghi attivi degli impianti di depurazione.

## Analoghi sintetici del climacostolo

I risultati degli studi effettuati sull'attività biologica del climacostolo, uniti alla conoscenza delle proprietà strutturali di altri lipidi resorcinolici, ci hanno consentito di progettare e sintetizzare nuovi analoghi della tossina protozoaria per far luce sulle basi chimiche del suo meccanismo di azione. I due analoghi sintetizzati, metil-5 [(2Z)-non-2-en-1-il] benzene-1,3-diolo (AN1) e 5-[(2Z)-non-2-en-1-il] benzene-1,2,3-triolo (AN2), che si differenziano rispettivamente dal climacostolo per un gruppo metile aggiuntivo e per un ulteriore gruppo idrossile nell'anello aromatico, sono stati analizzati per la loro attività biologica (13).

La scelta di introdurre i nuovi gruppi chimici nell'anello aromatico del climacostolo è stata suggerita dall'osservazione che modifiche simili eseguite su alcuni polifenoli e lipidi fenolici ha determinato un significativo miglioramento della loro attività citotossica e antimicrobica. Gli effetti di AN1 e AN2 sono stati studiati su cellule di mammifero, microbi patogeni e protisti ciliati a vita libera, con lo scopo principale di identificare i tratti strutturali del climacostolo principalmente coinvolti nella sua attività citotossica.

### Attività antitumorale

Le caratteristiche proapoptotiche di AN1 e AN2 su linee cellulari immortalizzate di origine tumorale (B16-F10, GL261, SK-N-BE e CT26) e non tumorale (C2C12) è stata analizzata e confrontata con quella del climacostolo. I risultati hanno indicato che la sopravvivenza cellulare è stata influenzata negativamente dai due analoghi con una efficacia comparabile a quella del climacostolo (13). Inoltre, come nel caso di varie cellule tumorali esposte al climacostolo (3, 9, 10), le tecniche di immunocolorazione hanno rivelato che le cellule di melanoma B16-F10 esprimevano alti livelli di caspasi 3 attiva dopo il trattamento con AN1 e AN2, dimostrando così l'attivazione di una via apoptotica indotta da entrambi gli analoghi (13).

### Attività antimicrobica

AN1 e AN2 sono stati studiati anche con esperimenti dose-risposta eseguiti per confrontare il loro potenziale citotossico contro un pannello di microrganismi comprendente patogeni batterici e fungini e protozoi ciliati d'acqua dolce. I dati raccolti hanno confermato che sia AN1 che AN2 mostrano un'apprezzabile citotossicità su tutti i microrganismi esposti a diverse concentrazioni dei due analoghi, a eccezione di *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* che si sono dimostrati immuni alle tossine (13). AN1 è risultato il composto più tossico contro agenti patogeni e protozoi ciliati, mentre gli effetti di AN2 sono risultati paragonabili o peggiori di quelli ottenuti col climacostolo. In particolare, AN1 ha mostrato valori MIC e MBC di 8 g/mL contro *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*, e un valore di 4 g/mL contro *Candida albicans* (13). Per quanto riguarda il meccanismo d'azione delle tossine sintetiche, la loro citotossicità su

alcune specie di ciliati è apparsa mediata da un processo necrotico, lo stesso descritto per il climacostolo sui protozoi a vita libera (2, 3, 5). Un'eccezione è stata rappresentata dall'analogo AN2 che si è dimostrato capace di attivare morte cellulare programmata nel ciliato *Euplotes aediculatus*. Infatti, il test di fluorescenza TUNEL (*Nick-End Labelling*) effettuato su campioni di *Euplotes* esposti ad AN2 ha rivelato la sequenza tipica di eventi associati all'apoptosi canonica (13).

Per riassumere, mentre effetti simili sono stati sostanzialmente osservati per il climacostolo e suoi analoghi su cellule di mammifero, il gruppo metilico di AN1 si è rivelato fondamentale per potenziarne l'attività contro patogeni batterici, fungini e contro i protisti. Nel caso di AN2, il gruppo idrossile aggiunto al climacostolo sembra essere il tratto strutturale fondamentale che ha trasformato la tossina protozoaria in un composto capace di indurre l'apoptosi negli eucarioti unicellulari. I risultati complessivi ottenuti con AN1 e AN2 supportano così ulteriori futuri tentativi di progettare e sintetizzare nuovi analoghi del climacostolo che possano aumentarne o ottimizzarne le proprietà farmacologiche.

## Conclusioni

Le sostanze naturali possiedono un'enorme diversità strutturale e funzionale che non ha rivali in eventuali librerie sintetiche. In particolare, le piccole molecole organiche naturali hanno mostrato un grande potenziale di attività (1, 3) poiché gli organismi viventi hanno una spiccata capacità di sintetizzare una ricca varietà di strutture molecolari complesse con proprietà biologiche definite.

Il climacostolo è un tipico esempio di queste piccole molecole, tuttavia, la possibilità di purificare questo composto naturale direttamente da colture cellulari è in realtà limitata a quantità molto piccole. Per risolvere questo problema, molti sforzi sono stati diretti verso la preparazione del climacostolo sintetico e di alcuni suoi analoghi, attraverso strategie in grado di realizzare quantità apprezzabili dei composti di interesse in modo economico e rapido.

In conclusione, sembra che gli analoghi sintetici di piccole molecole organiche di origine naturale che presentino potenza e selettività ottimali possano effettivamente giocare un ruolo fondamentale nella comprensione del meccanismo biochimico alla base del loro effetto a livello cellulare e nella valutazione di eventuali effetti terapeutici.

In questo panorama, il climacostolo sembra essere un promettente composto di partenza per l'ulteriore sviluppo di approcci chimici sintetici e indagini biotecnologiche, che possa in definitiva meritare anche attenzione da parte dei farmacologi.

## Bibliografia

1. Buonanno F, Ortenzi C. Predator-prey interactions in ciliated protists. In: *Extremophilic Microbes and Metabolites diversity, bioprospecting and biotechnological applications*. 1st ed. London: InTechOpen; 2018.
2. Miyake A, Buonanno F, Saltalamacchia P, Masaki ME, Iio H. Chemical defence by means of extrusive cortical granules in the heterotrich ciliate *Climacostomum virens*. *Eur J Protistol* 2003;39:25-36.
3. Buonanno F, Catalani E, Cervia D, Cimarelli C, Marcantoni E, Ortenzi C. Natural function and structural modification of climacostol, a ciliate secondary metabolite. *Microorganisms* 2020;8(6):809.
4. Fiorini D, Giuli S, Marcantoni E, Quassinti L, Bramucci M, Amantini C, Santoni G, Buonanno F, Ortenzi C. A Straightforward diastereoselective synthesis and evaluation of climacostol, a natural product with anticancer activities. *Synthesis* 2010;9:1550-6.

5. Buonanno F, Ortenzi C. The protozoan toxin climacostol and its derivatives: Cytotoxicity studies on 10 species of free-living ciliates. *Biologia* 2010;65:675-80.
6. Petrelli D, Buonanno F, Vitali LA, Ortenzi C. Antimicrobial activity of the protozoan toxin climacostol and its derivatives. *Biologia* 2012;67:525-9.
7. Buonanno F, Quassinti L, Bramucci M, Amantini C, Lucciarini R, Santoni G, Iio H, Ortenzi C. The protozoan toxin climacostol inhibits growth and induces apoptosis of human tumor cell lines. *Chem Biol Interact* 2008;176:151-64.
8. Quassinti L, Ortenzi F, Marcantoni E, Ricciutelli M, Lupidi G, Ortenzi C, Buonanno F, Bramucci M. DNA binding and oxidative DNA damage induced by climacostol-copper(II) complexes: Implications for anticancer properties. *Chem Biol Interact* 2013;206:109-16.
9. Catalani E, Proietti Serafini F, Zecchini S, Picchiatti S, Fausto AM, Marcantoni E, Buonanno F, Ortenzi C, Perrotta C, Cervia D. Natural products from aquatic eukaryotic microorganisms for cancer therapy: Perspectives on anti-tumour properties of ciliate bioactive molecules. *Pharmacol Res* 2016;113:409-20.
10. Perrotta C, Buonanno F, Zecchini S, Giavazzi A, Proietti Serafini F, Catalani E, Guerra L, Belardinelli MC, Picchiatti S, Fausto AM, Giorgi S, Marcantoni E, Clementi E, Ortenzi C, Cervia D. Climacostol reduces tumour progression in a mouse model of melanoma via the p53-dependent intrinsic apoptotic programme. *Sci Rep* 2016;6:27281.
11. Zecchini S, Proietti Serafini F, Catalani E, Giovarelli M, Cozzoli M, Di Renzo I., De Palma C, Perrotta C, Clementi E, Buonanno F, Ortenzi C, Marcantoni E, Taddei AR, Picchiatti S, Fausto AM, Cervia D. Dysfunctional autophagy induced by the pro-apoptotic natural compound climacostol in tumour cells. *Cell Death Dis* 2019;10:10.
12. Verani M, Di Giuseppe G, Federigi I, Buonanno F, Ortenzi C, Carducci A. Preliminary data related to the effect of climacostol produced by the freshwater ciliate *Climacostomum virens* on human adenovirus. *Viruses* 2020;12:658.
13. Buonanno F, Catalani E, Cervia D, Proietti Serafini F, Picchiatti S, Fausto AM, Giorgi S, Lupidi G, Rossi FV, Marcantoni E, Petrelli D, Ortenzi C. Bioactivity and structural properties of novel synthetic analogues of the protozoan toxin climacostol. *Toxins* 2019;11:42.