

Heat shock protein 90 ATP-binding site as a target of retinoids

Background scientifico

Negli ultimi 20 anni è aumentata notevolmente l'incidenza delle infezioni fungine invasive (IFI).

Nella prospettiva globale, *Candida spp.* e *Aspergillus spp.* rappresentano le infezioni micotiche più diffuse con eventuale coinvolgimento sistemico. Ma non sono le sole, soprattutto a seguito di nuovi casi di infezioni fungine da parte di miceti ambientali, considerati precedentemente non patogeni.

Oltre a *Cryptococcus neoformans*, una delle principali cause di morbilità e mortalità infettiva, con una stima di 600.000 decessi all'anno, si possono incontrare un'ampia gamma di patogeni appartenenti all'ordine dei Mucorales (es. *Rhizopus spp*), quali ialoifomiceti (es. *Fusarium* e *Scedosporium spp*) o feoifomiceti (es. *Alternaria spp* e *Cladophialophora bantiana*). Le micosi causate da questi organismi, soprattutto le forme rino-cerebrali, sono spesso difficili da trattare e richiedono una consulenza specialistica (1).

L'aumento delle IFI, ma anche di infezioni micotiche non invasive, è dovuto all'aumentata prevalenza di soggetti immunocompromessi, soprattutto da cause iatrogene, quali chemioterapie oncologiche, o terapie nelle malattie autoimmuni, oltre che per i soggetti affetti da AIDS nelle nazioni con difficile accesso alle cure. Si hanno inoltre, per mezzo del miglioramento nella gestione chirurgica e dell'introduzione di farmaci immunosoppressori selettivi, i soggetti sottoposti a trapianto d'organo, solido o di midollo osseo, che vanno incontro a neutropenia, uno dei principali fattori di rischio per lo sviluppo di infezioni fungine. Altri fattori predisponenti sono rappresentati dall'aumentato impiego di dispositivi intravenosi, la prolungata degenza nelle unità di cura intensiva e la somministrazione di terapie antibatteriche, che alterano il normale microbiota umano. Il GAFFI (Global action fund for fungal infections) ha calcolato che ogni ora nel mondo muoiano almeno 150 pazienti a causa di IFI, pari a 1.350.000 anno. Basti pensare che alcuni pazienti oncologici neutropenici devono essere sottoposti in 1/3 dei casi ad una terapia antifungina quando

non rispondono a terapie con antibiotici a largo spettro, perché predisposti ad IFI (2).

Tra le infezioni fungine invasive l'aspergillosi polmonare invasiva (IPA) e le infezioni sistemiche sostenute da funghi appartenenti al genere *Candida* sono quelle di più frequente riscontro in ambito clinico. In particolare, l'IPA rappresenta la più comune infezione micotica fra quelle invasive nel mondo, difficile da diagnosticare precocemente. Il fungo responsabile, *Aspergillus fumigatus*, un fungo ubiquitario diffuso nell'ambiente, può causare un ampio spettro di malattie quali broncopolmoniti, malattie allergiche, sinusiti, aspergilloma e polmoniti. Il polmone rappresenta il focolaio da cui l'infezione può diffondere a molti altri organi in pazienti suscettibili, trasformandosi in una malattia sistemica rapidamente progressiva con esito spesso letale. Durante il recente congresso internazionale della Società Europea delle malattie respiratorie si è affermato che il problema aspergillosi è sottostimato, nonostante vi siano circa 300000 casi all'anno e 240000 nella sola Europa. Un'importante minaccia per la salute dei pazienti a rischio, dunque, con un tasso di mortalità, se non curata, che supera il 90%. Anche quando è curata, tuttavia, il tasso di mortalità si attesta al 50% nei pazienti immunodepressi. Le linee guida per il trattamento dell'IPA riportano l'utilizzo di farmaci antimicotici della classe degli azoli, anche se purtroppo, non mancano i casi di resistenza. Oltre all'aspergillosi, anche le infezioni micotiche causate dal genere *Candida* sono di frequente riscontro negli ultimi anni nei pazienti immunocompromessi. Lo spettro di infezioni causate da microrganismi del genere *Candida* include malattie localizzate della cute e delle unghie, malattie che colpiscono le superfici mucose della bocca, quali il mugghetto o della vagina e le candidosi sistemiche potenzialmente letali che disseminano attraverso il torrente ematico coinvolgendo molti organi quali il sistema nervoso centrale, cuore, reni, fegato, ossa, muscoli, articolazioni, milza, occhi. Le specie che più frequentemente sono responsabili di candidosi comprendono *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida kefyr*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* e *Candida parapsilosis* (3). In particolare negli ultimi anni stanno emergendo ceppi di *C. glabrata* e *C. krusei* resistenti ai farmaci antifungini comunemente utilizzati. Recentemente la

Candida auris rappresenta una vera minaccia globale per la salute, responsabile delle più frequenti infezioni nosocomiali acquisite da soggetti indeboliti da altre malattie, sottoposti a interventi chirurgici o immunocompromessi. La *Candida auris* ha attirato una maggiore attenzione clinica e sollevato allarme a causa della sua resistenza ai più comuni farmaci antimicotici quali gli azoli, le echinocandine e l'amfotericina B. Questo livello di resistenza non era mai stato notato in infezioni da altre specie di *Candida* ed è particolarmente preoccupante in quanto limita gravemente le opzioni di trattamento disponibili per i pazienti con infezioni invasive di *Candida auris*. Il trattamento delle candidosi da *Candida auris* è anche complicato dal fatto che tale specie non viene facilmente riconosciuta con i test diagnostici standard di laboratorio, confondendola in particolare con altre specie quali *C. haemulonii*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii* e *C. parapsilosis*. Lo sviluppo di ceppi farmaco-resistenti, l'elevata tossicità dei farmaci antifungini tradizionali, soprattutto nel caso di prolungato e massivo utilizzo, ha rafforzato sempre più l'esigenza di trovare nuove e più efficaci strategie terapeutiche. In particolare, la ricerca di nuovi agenti ad attività antifungina si prefigge come obiettivo l'individuazione di molecole con una maggiore selettività, minore citotossicità e minore possibilità di sviluppare fenomeni di resistenza. Vi è pertanto la necessità di trovare nuove terapie nell'ambito delle infezioni micotiche, che siano efficaci, sicure per i pazienti e di facile accesso e gestione clinica.

Il 15 maggio 2003 viene pubblicato, sulla rivista *Leukemia*, uno studio condotto dai ricercatori del dipartimento di ematologia della Sapienza dal titolo *Infectious complications in patients with acute promyelocytic leukaemia treated with the AIDA regimen*. Ben al di là dei risultati riportati, salta all'occhio un dato degno di nota: i pazienti affetti da leucemia promielocitica, trattati con regime di acido all-trans retinoico (ATRA) hanno incidenze significativamente minori di infezioni fungine, da *Candida spp.* e *Aspergillus spp.* (4). Da questa osservazione, di Evidence-based Medicine, è nata l'ipotesi dell'effetto preventivo dell'uso dell'ATRA nelle infezioni fungine. Ma ben prima di poter giungere ad una definizione certa di effetto preventivo, è necessario valutare l'ipotesi, *in vitro* e

successivamente *in vivo*.

Dal 2016, i risultati di ricerca in modelli sperimentali sia *in vitro* che *in vivo*, in un modello preclinico di aspergillosi polmonare invasiva, hanno dimostrato che ATRA esercita un'azione fungistatica *in vitro* nei confronti di *Aspergillus fumigatus* e *Candida albicans*, bloccando la germinazione e la replicazione di tali funghi; dosi sub-ottimali di ATRA e antifungini convenzionali quali Anfotericina B o Posaconazolo sinergizzano *in vitro* nel contrastare la germinazione dei conidi aspergillari (5). Tale effetto sinergico consente di ridurre il dosaggio dei farmaci antifungini, limitando l'esposizione agli effetti tossici correlati all'uso prolungato e massiccio di tali farmaci; In un modello di aspergillosi polmonare invasiva nel ratto, ATRA somministrata in profilassi aumenta in maniera statisticamente significativa la sopravvivenza degli animali, rispetto al gruppo di controllo non trattato (60% vs 20% dopo 12 giorni dall'infezione). L'efficacia protettiva di ATRA è risultata, inoltre, del tutto sovrapponibile a quella ottenuta con il posaconazolo, uno dei farmaci antifungini comunemente utilizzato nel trattamento dell'IPA; Studi di mimetismo molecolare hanno suggerito che ATRA possa interferire con la germinazione dei conidi aspergillari competendo con l'ATP nel sito di legame della proteina HSP90, una chaperonina coinvolta nella virulenza e patogenicità fungina; Il trattamento con ATRA dei conidi aspergillari down-regola l'espressione del gene che codifica per HSP90 e riduce l'espressione dei livelli di mRNA di *AbaA*, *CrzA* and *WetA*, geni coinvolti nel processo di germinazione conidiale; Il pretrattamento *in vitro* con ATRA potenzia la fagocitosi dei conidi di *Aspergillus* da parte dei macrofagi di una linea cellulare macrofagica U-937 (5).

Complessivamente, dagli studi sperimentali si evince che l'effetto protettivo di ATRA nei confronti delle infezioni fungine possa essere correlato ad un effetto fungistatico diretto e, al tempo stesso, all'azione immunoadiuvante di tale molecola, potenziando la risposta immunitaria innata. ATRA potrebbe, quindi, rappresentare una molecola pleiotropica utilizzabile in monoterapia o in combinazione con farmaci antifungini convenzionali, per lo sviluppo di nuove strategie

terapeutiche, finalizzate a contrastare la diffusione del fenomeno della farmaco-resistenza nei patogeni fungini.

Obiettivo

Lo sviluppo del progetto prevede un primo livello di modelling e docking molecolare, grazie alla collaborazione Interdipartimentale con il gruppo di ricerca di Biologia strutturale, nello specifico per mezzo della bioinformatica strutturale. Con suddette metodiche sarà possibile progettare modelli *in silico* e rappresentazione tridimensionale delle diverse molecole studiate e l'interazioni con gli enzimi di potenziale interesse in *Candida spp.* e *Aspergillus spp.*, Nello specifico, sarà valutata l'interazione tra HSP90 e i retinoidi dalla prima alla quarta generazione.

References

1. Cornely OA, Hoenigl M, Lass-Flörl C, et al. Defining breakthrough invasive fungal infection- Position paper of the mycoses study group education and research consortium and the European Confederation of Medical Mycology. *Mycoses*. 2019;62(9):716-729. doi:10.1111/myc.12960
2. Bongomin F, Gago S, Oladele RO, Denning DW. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases-Estimate Precision. *J Fungi (Basel)*. 2017;3(4):57. Published 2017 Oct 18. doi:10.3390/jof3040057
3. Turner SA, Butler G. The *Candida* pathogenic species complex. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014;4(9):a019778. Published 2014 Sep 2. doi:10.1101/cshperspect.a019778
4. Girmenia C, Lo Coco F, Breccia M, et al. Infectious complications in patients with acute promyelocytic leukaemia treated with the AIDA regimen. *Leukemia*. 2003;17(5):925-930. doi:10.1038/sj.leu.2402899
5. Campione E, Gaziano R, Doldo E, et al. Antifungal Effect of All-*trans* Retinoic Acid against *Aspergillus fumigatus* *In Vitro* and in a Pulmonary Aspergillosis *In Vivo* Model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2021;65(3):e01874-20. Published 2021 Feb 17. doi:10.1128/AAC.01874-20
6. Cosio T, Di Prete M, Gaziano R, et al. Trifarotene: A Current Review and Perspectives in Dermatology. *Biomedicines*. 2021;9(3):237. Published 2021 Feb 26. doi:10.3390/biomedicines9030237

7. Campione E, Cosio T, Lanna C, et al. Predictive role of vitamin A serum concentration in psoriatic patients treated with IL-17 inhibitors to prevent skin and systemic fungal infections. *J Pharmacol Sci.* 2020;144(1):52-56. doi:10.1016/j.jphs.2020.06.003
8. Cavalheiro M, Teixeira MC. *Candida* Biofilms: Threats, Challenges, and Promising Strategies. *Front Med (Lausanne).* 2018;5:28. Published 2018 Feb 13. doi:10.3389/fmed.2018.00028

Publicazioni inerenti il Progetto

Campione, Elena et al. "Antifungal Effect of All-*trans* Retinoic Acid against *Aspergillus fumigatus* *In Vitro* and in a Pulmonary Aspergillosis *In Vivo* Model." *Antimicrobial agents and chemotherapy* vol. 65,3 e01874-20. 17 Feb. 2021, doi:10.1128/AAC.01874-20

Svolgimento

Tempistica

La tempistica di svolgimento della tesi sarà autonoma e richiesta entro dicembre 2022 da parte del candidato

Luoghi

Il candidato è libero di lavorare secondo sue comodità, con possibilità di accesso presso il dipartimento di Microbiologia della Facoltà di Medicina al fine di valutare di persona il riscontro *in vitro* dei modelli computazionali.

Team di Ricerca

Terenzio Cosio^{a,b}, Elena Campione^a, Roberta Gaziano^b, Mattia Falconi^c, Federico Iacovelli^c

a Dermatologic Unit, Department of Systems Medicine, University of Rome Tor Vergata, Rome, Italy

b Department of Experimental Medicine, University of Rome Tor Vergata, Rome, Italy

c Department of Biology, University of Rome Tor Vergata, Rome, Italy