



Ministero dell'Università e della Ricerca

Direzione generale della ricerca

FONDO INTEGRATIVO SPECIALE PER LA RICERCA (FISR)

FONDO INTEGRATIVO SPECIALE PER LA RICERCA (FISR)

CODICE PROGETTO	FISR2020IP_04901
AREA	Life Sciences
TITOLO DEL PROGETTO	Studio del ruolo dell'autofagia nella risposta cellulare a SARS-CoV-2
ACRONIMO	AutoCoRe
SOGGETTI PROPONENTI	Università degli Studi di ROMA "Tor Vergata"
	Università degli Studi di PADOVA
IMPORTO AGEVOLAZIONE	56.518,4 €
BREVE DESCRIZIONE	<p>L'obiettivo principale del progetto AutoCoRe è definire il contributo di alcuni processi molecolari alla risposta cellulare indotta da infezione <i>SARS-CoV-2</i>.</p> <p>In particolare, variazioni nel flusso autofagico (un processo catabolico estremamente conservato grazie al quale il materiale citosolico viene convogliato ai lisosomi per la degradazione) e nelle dinamiche mitocondriali (ossia i processi che modulano la struttura dei mitocondri e l'interazione di questi ultimi con altri compartimenti subcellulari) possono partecipare alla risposta cellulare ospite-patogeno in due modi diversi: supportando la replicazione del virus, oppure inibendola. Ad oggi, non è chiaro come questi due processi fondamentali per la fisiologia cellulare contribuiscano alla risposta a <i>SARS-CoV-2</i>, ma è chiaro che comprendere questo aspetto risulta fondamentale per promuovere lo sviluppo di nuovi approcci farmacologici, atti a contrastare la sindrome respiratoria acuta grave causata dal coronavirus <i>SARS-CoV-2</i>.</p> <p>Il gruppo di lavoro AutoCoRe si compone di due unità operative: (i) l'Università di Roma Tor Vergata, responsabile dell'analisi dell'autofagia; (ii) l'Università degli studi di Padova, responsabile dello studio delle dinamiche mitocondriali.</p> <p>Per raggiungere l'obiettivo proposto, AutoCoRe si è avvalso di un approccio multidisciplinare, basato su tecniche di biologia molecolare e cellulare, di biochimica, di microscopia elettronica e a fluorescenza. Come modello, si è scelto di utilizzare una linea cellulare umana (IMR90) trattata con peptidi derivati da proteine chiave per l'infezione da <i>SARS-CoV-2</i>, ossia Spike, ORF8, ORF9B.</p>

RISULTATI RAGGIUNTI

Nella fase iniziale del progetto (1-6 mesi), sono stati utilizzati sei tipi diversi di peptidi e frammenti proteici derivanti da proteine *SARS-CoV-2*. In particolare, abbiamo utilizzato i seguenti peptidi, derivati da proteine importanti nel processo di infezione virale e/o in grado di innescare una risposta anticorpale: proteina Spike, full lenght; dominio RBD (receptor binding domain), derivato dalla proteina Spike stessa; POOL 8, un mix di 28 peptidi derivati dalla proteina ORF8 (open reading frame 8); POOL 9B, un mix di 22 peptidi derivati ORF 9B; PEPT 8, corrispondente alla porzione C-terminale della proteina ORF8; PROT8 (corrispondente alla forma ORF8 full lenght).

Dapprima abbiamo analizzato la vitalità cellulare marcando il nucleo (con le sonde fluorescenti Hoechst e Propidio ioduro) di fibroblasti derivanti da epitelio polmonare (IMR-90) trattati con diverse concentrazioni di peptidi (da 1nM a 10 μ M) e diversi tempi di incubazione (24-48-72 ore). Abbiamo quantificato il numero di cellule morte in seguito ad apoptosi in presenza di diverse quantità dei diversi polipeptidi (Fig. 1; test t di Student, # $p < 0,05$; ## $p < 0,001$; ### $p < 0,0001$, $n = 8$ wells).

Le curve dose-risposta ottenute ci hanno permesso di individuare le seguenti dosi subletali:

RBD: 10nM (24-48h)

Spike: 1nM (24-48h)

POOL 8: 1nM (24-48h)

POOL 9B: 1nM (24-48h)

PEPT 8: 10nM (24-48h)

PROT 8: 1nM (24-48h)

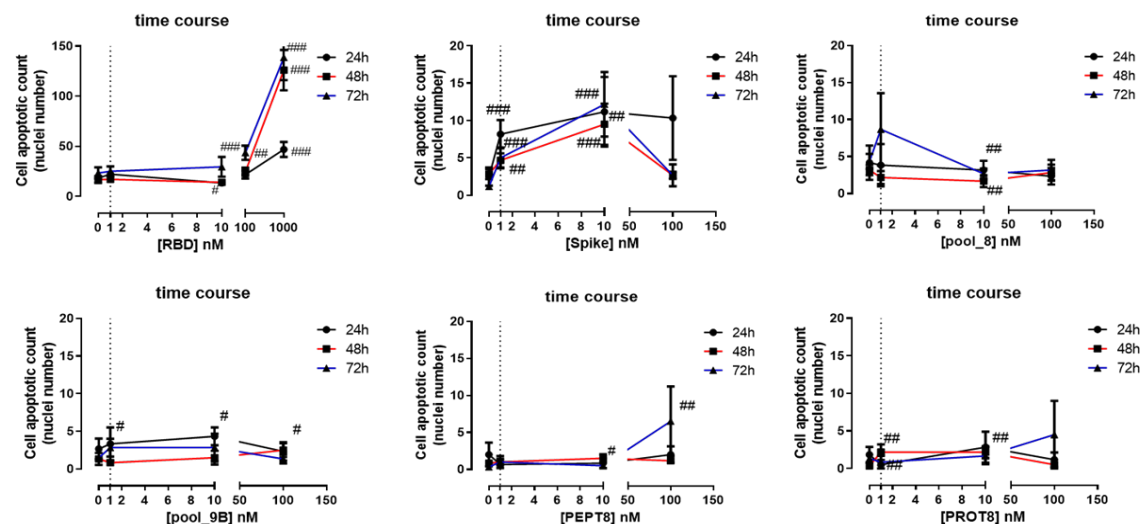


Fig. 1

Fig. 2A

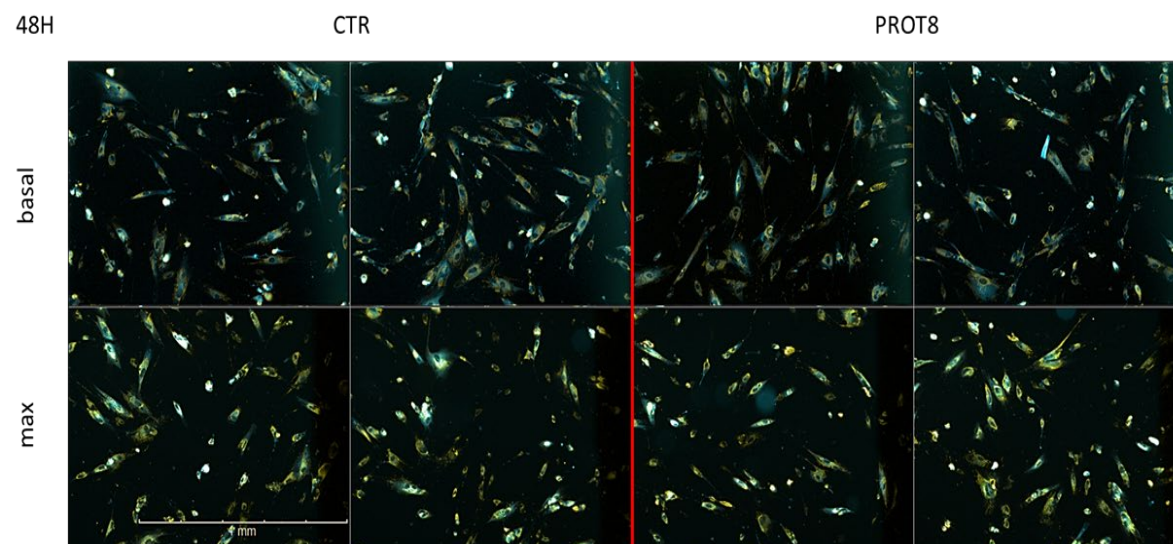
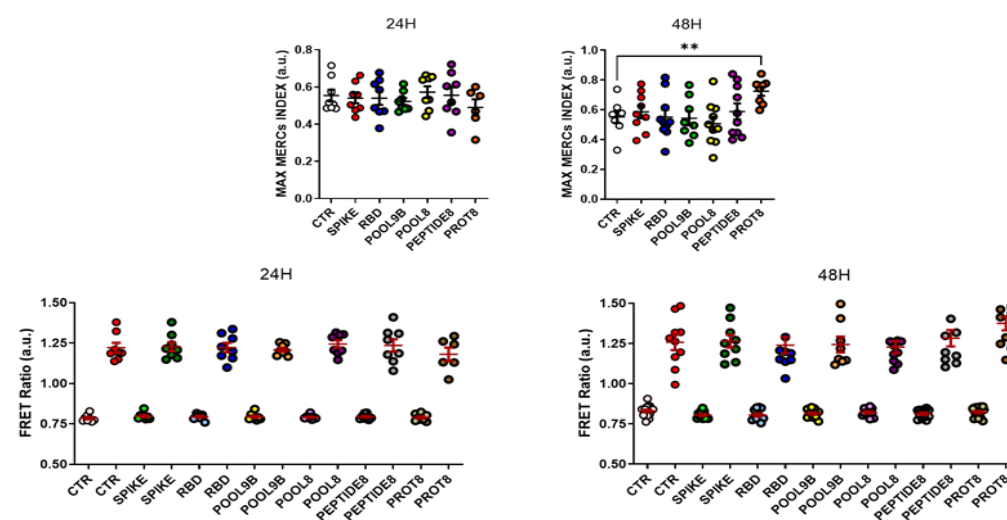


Fig. 2B



Successivamente abbiamo misurato le alterazioni della morfologia mitocondriale indotte dal trattamento con i peptidi sopra descritti dopo marcatura con MitoTracker Green.

I risultati ottenuti dimostrano che il trattamento con il pool di peptidi derivati da ORF9B e la proteina Spike aumentano in modo significativo la frammentazione mitocondriale, ad una concentrazione di $1\mu\text{M}$, per 24 e 48 ore. Al contrario, le cellule trattate con la proteina ricombinante PROT8 (ORF8) sono caratterizzate da una maggiore area mitocondriale alla stessa concentrazione ($1\mu\text{M}$, per 24 e 48 ore).

La morfologia mitocondriale osservata grazie all'acquisizione di immagini di microscopia elettronica di cellule IMR-90 trattate con i peptidi suddetti ha confermato quanto osservato tramite microscopia a fluorescenza.

Questi risultati suggeriscono che *SARS-CoV-2* può influenzare la fisiologia cellulare alterando la morfologia e, di conseguenza, la funzione, dei mitocondri. Nella fase di follow up del progetto, ci proponiamo di analizzare in modo specifico l'attività mitocondriale.

Abbiamo poi analizzato l'interazione tra mitocondri e Reticolo Endoplasmatico grazie ad un saggio FRET precedentemente sviluppato. In breve, questo saggio si basa su una sonda FRET in cui ciascuno dei due fluorofori (CFP e YFP) è localizzato sulla superficie di uno dei due organelli: CFP sulla superficie del RE, YFP sulla membrana mitocondriale esterna, affacciata al citosol (Fig.2A). Le due parti della sonda contengono ciascuna uno dei due domini in grado di legare la Rapamicina (sistema di dimerizzazione FRB-FKBP): l'aggiunta di questa sostanza, quindi, permette l'interazione dei due domini ed il conseguente aumento del segnale FRET fino a raggiungere un valore massimo (max). Eventuali variazioni del segnale basale e massimale (indicati in figura rispettivamente con i termini basal/max) di FRET sono quindi proporzionali a cambiamenti nella distanza tra i due organelli (per maggiori dettagli, vedere). E' interessante notare come, rispetto al controllo (CTR, assenza di proteine derivate da *SARS-CoV-2*), solo il trattamento con la proteina ORF8 (PROT8), ma non con Spike, il dominio RBD di Spike o il pool di peptidi specifico derivato da ORF9B, alteri in modo significativo la prossimità tra gli organelli (Fig.2B; test t di Student, * $p<0,05$; ** $p<0,001$; *** $p<0,0001$, $n=4$).

In conclusione, l'approccio sperimentale del progetto AutoCoRe ha permesso di effettuare un'analisi sistematica della morfologia dei mitocondri e della loro interazione con il Reticolo Endoplasmatico in cellule da epitelio polmonare trattate con peptidi derivati da SARS-CoV-2. I nostri risultati hanno rivelato per la prima volta come la risposta cellulare a SARS-CoV-2 comporti un'alterazione delle dinamiche mitocondriali: in particolare, della loro morfologia e dell'interazione con altri organelli.

Questo risultato è interessante se si considera il ruolo fondamentale di questi organelli per mantenere la corretta fisiologia cellulare: nella seconda fase del progetto chiariremo se è possibile "prevenire" la mortalità cellulare indotta da questi peptidi trattando le cellule con composti in grado di modulare da un lato la morfologia dei mitocondri, dall'altro la loro vicinanza con il Reticolo Endoplasmatico.

Nella fase di follow-up del progetto AutoCoRe, ci proponiamo di utilizzare questi composti per ripristinare il fenotipo cellulare indotto dal trattamento con SARS-CoV-2. I composti in grado di prevenire le alterazioni mitocondriali osservate, nonché la morte cellulare misurata in seguito a trattamento con i peptidi potranno fungere da lead compound per la generazione di eventuali farmaci contro l'infezione da SARS-CoV-2.

IMPATTI	<p>L'impatto del progetto AutoCoRe avrà un carattere internazionale sia dal punto di vista tecnico scientifico che socio- economico, sia nel medio che nel lungo termine.</p> <p>In primis, AutoCoRe genererà nuova conoscenza scientifica nell'ambito della ricerca biomedica descrivendo meccanismi subcellulari coinvolti nella patogenesi da SARS-CoV-2 fino ad ora non noti. Peraltro, i risultati ottenuti potrebbero venire estesi nell'ambito di altre patologie di origine virale: ad oggi, infatti, non è noto se e come il processo di infezione mediato da virus a RNA alteri le dinamiche mitocondriali all'interno delle cellule, né se questi effetti a livello subcellulare possano partecipare allo sviluppo di sindromi post-virali quali, ad esempio, il cosiddetto "long-COVID".</p> <p>In secondo luogo, la valorizzazione dei risultati di AutoCoRe avrà nel breve termine un grande impatto applicativo, velocizzando il processo di ricerca e sviluppo di nuovi farmaci grazie all'identificazione di nuovi target farmacologici di SARS- CoV-2, e di conseguenza (più a lungo termine) anche un impatto sia in termini economici diretti che in termini di competizione internazionale.</p>
---------	--