

**MECCANISMI MOLECOLARI E RUOLO DEL SISTEMA UBIQUITINA-
PROTEASOMA SULL'ANTAGONISMO DELL'IMMUNITÀ INNATA DA
PARTE DELLE PROTEINE DI SARS-CoV-2.**

RESPONSABILE SCIENTIFICO DEL PROGETTO:

Dr. Gianni Gori Savellini, Ph.D., Università di Siena, Dipartimento di Biotecnologie Mediche,
Policlinico Santa Maria alle Scotte, Siena.

e-mail: gianni.gori@unisi.it

GRUPPO DI RICERCA:

Prof.ssa Maria Grazia Cusi, Ph.D. (Università di Siena; mariagrazia.cusi@unisi.it)

Dr. Gabriele Anichini (Università di Siena; gabriele.anichini@student.unisi.it)

Dr.ssa Claudia Gandolfo, Ph.D. (Università di Siena; claudia.gandolfo@unisi.it)

Dr.ssa Chiara Terrosi (Università di Siena; chiara.terrosi@unisi.it)

Dr. Shibily Prathyumnan (Università di Siena; shibilyps@gmail.com)

Scopo del progetto

Identificare il meccanismo molecolare delle proteine di SARS-CoV-2 ed il coinvolgimento del sistema ubiquitina/proteasoma nel controllo dell'immunità innata da parte del virus. Verrà rivolta attenzione anche alla proteina "ubiquitin-like" FAT10, recentemente identificata come mediatore della risposta immunitaria, infiammatoria e antivirale. Inoltre, verrà stabilito l'effetto della molecola MLN4924, efficace sull'attivazione di FAT10 e sul processo di ubiquitinazione, sulla replicazione del SARS-CoV-2 e sull'attività antagonista dell'immunità innata delle sue proteine.

Basi scientifiche

La risposta immunitaria mediata dall'interferone di tipo I (IFN- α/β) rappresenta la prima linea di difesa dell'ospite contro le infezioni virali. Le molecole di mRNA e dsRNA virale prodotte durante l'infezione/replicazione del virus sono riconosciute dai recettori cellulari RIG-I e MDA-5^{1,2}. Di conseguenza, si innesca una via di segnalazione a cascata che ha come scopo ultimo l'espressione di IFN- β ³. Molti virus, tra cui SARS-CoV e MERS-CoV, hanno sviluppato meccanismi per sopprimere l'immunità innata dell'ospite producendo proteine antagoniste su uno o più punti della via di segnalazione dell'IFN- β ^{4,5,6,7,8}. Anche l'emergente virus SARS-CoV-2 presenta proprietà simili, come dimostrato da uno studio in cui è stata evidenziata la proprietà antagonista delle sue proteine N, ORF6, nsp13 e nsp14^{9,10}. Anche l'ubiquitinazione riveste un ruolo molto importante nell'immunità innata. Infatti, come accade per RIG-I, l'attività di proteine coinvolte nella trasduzione del segnale deve essere strettamente controllata e limitata nel tempo. In questo contesto, un noto meccanismo di regolazione di RIG-I è la sua ubiquitinazione da parte della proteina TRIM25¹¹. Un altro meccanismo di controllo dell'attività di proteine cellulari è rappresentato dalla proteina FAT10 (HLA-F adjacent transcription 10) la quale presenta caratteristiche simili all'ubiquitina: il suo legame ad un substrato proteico ne determina la degradazione da parte del proteasoma 26S^{12,13,14}. Mentre l'ubiquitina è espressa da tutti i tessuti, la produzione di FAT10 è in parte limitata ai tessuti del sistema immunitario come il timo, i linfonodi e la milza^{15,16,17}. Tuttavia, in seguito a stimolazione con citochine pro-infiammatorie (IFN- γ e TNF- α) o infezione virale, FAT10 è fortemente indotta in tutti i tessuti^{18,19,20}. Un esempio ben caratterizzato è l'infezione da influenza A (IA) durante la quale FAT10 aumenta a livello citoplasmatico tramite l'attivazione della via di segnalazione RIG-I/NF- κ B e agisce con meccanismo di "feedback" negativo andando a limitare una esacerbata risposta infiammatoria^{20,21}, cosa che invece non accade in pazienti COVID-19. Sulla base della letteratura presente, il sistema dell'ubiquitina e la proteina FAT10 potrebbero essere validi bersagli terapeutici nelle infezioni virali. In particolare, la molecola MLN4924, inizialmente classificata come agente antitumorale, è attualmente in fase clinica I per patologie oncologiche e di altra natura. Recentemente, MLN4924 ha dimostrato avere anche una notevole efficacia nella regolazione del sistema immunitario, come agente antinfiammatorio e antivirale^{22,23,24}. Pertanto, potrebbe avere la capacità di alterare la replicazione di SARS-CoV-2 e la risposta infiammatoria/immunitaria durante l'infezione. In parallelo, è necessaria una conoscenza più dettagliata dei meccanismi molecolari alla base dell'inibizione del sistema immunitario (innato e adattativo) dell'ospite da parte di SARS-CoV-2 in modo da stabilire nuovi possibili bersagli terapeutici.

Metodologia

L'attività antagonista sul sistema dell'immunità innata delle proteine di SARS-CoV-2 verrà valutata, in seguito alla loro espressione transiente in cellule umane Lenti-X 293, tramite "luciferase reporter assay" in cui l'espressione della firefly luciferasi (Luc) è controllata dal promotore dell'IFN- β , o di sue porzioni. Questo test sarà utilizzato anche per valutare l'effetto di inibitori dell'ubiquitinazione e di FAT10 (MG-132, MLN4924) sia nei confronti delle singole proteine virali sia sul virus dopo infezione di cellule Calu-3, Vero E6 e Huh7.5 mediante titolazione virale. Mediante co-immunoprecipitazione (CoIP) verrà determinata l'eventuale interazione delle proteine virali e quelle regolatrici dell'immunità innata, mentre il "pull down" denaturante e

l'immunoblotting verranno applicati per valutare lo stato di ubiquitinazione delle proteine di interesse.

Risultati attesi e sviluppi applicativi

Sulla base di dati precedenti è stato dimostrato che SARS-CoV-2 esprime proteine capaci di eludere l'immunità innata dell'ospite^{9,10}. Ciò nonostante, il complesso meccanismo molecolare che determina il blocco dell'IFN- β da parte del SARS-CoV-2 non è ancora del tutto chiaro. Per questo, ci prefiggiamo di analizzare diversi aspetti dell'attività antagonista delle proteine virali N, ORF3, ORF6 e ORF8. Nel dettaglio, vorremmo indagare l'effetto della proteina N sull'attivazione di RIG-I da parte della ubiquitina E3 ligasi TRIM25, fenomeno che è stato descritto per SARS-CoV. Questo meccanismo inibitorio potrebbe essere associato ad un'interazione diretta tra la proteina virale e le alcune componenti della via di segnalazione, determinandone una diminuzione o un mascheramento con il conseguente blocco della trasduzione del segnale. Contestualmente, analizzare alterazioni nell'attivazione/inibizione di RIG-I tramite la sua ubiquitinazione o legame a FAT10 potrebbe aprire nuovi scenari per bersagli terapeutici a base di inibitori del proteasoma (MG-132) o del sistema di ubiquitinazione (MLN4924). Inoltre, vorremmo valutare in cellule Calu-3 l'espressione della proteina FAT10 in seguito ad infezione con SARS-CoV-2. Come osservato per altri virus^{20,21}, l'espressione di questa proteina blocca la produzione di INF- β , la risposta infiammatoria innescata dalla via di segnalazione RIG-I-NF- κ B e l'instaurazione della risposta immunitaria adattativa, come l'attivazione di cellule dendritiche (DC). Di conseguenza, l'esposizione di cellule infettate agli inibitori MG-132 o MLN4924 potrebbe ripristinare un bilanciamento nella produzione di INF- β e di citochine infiammatorie (IL-6, IL-8, IL-1 β) coinvolte nella maturazione delle cellule DC e nel riconoscimento del virus da parte del sistema immunitario.

Bibliografia

1. Reikine S. *et al.*, *Frontiers in immunology* 5 (2014): 342.
2. Rehwinkel J. *et al.*, *Nat Rev Immunol.* (2020) 3: 1-15.
3. Sato M. *et al.*, *Immunity* 13 (2000): 539-548.
4. Lee JY *et al.*, *J Microbiol.* 57 (2019): 803-811.
5. Lu X *et al.*, *Virus Genes* 42 (2011): 37-45.
6. Siu KL *et al.*, *Cell Mol Immunol.* 11 (2014): 141-149.
7. Hu Y *et al.*, *J Virol.* 91 (2017): e02143-16.
8. Siu KL *et al.*, *J. Biol. Chem.* 284 (2009): 16202-16209.
9. Yuen CK *et al.*, *Emerg Microbes Infect.* 9 (2020): 1418-1428.
10. Mu J *et al.*, *Cell Discov.* 6 (2020):65.
11. Gack MU *et al.*, *Nature* 446 (2007): 916-920.
12. Aichele *et al.*, *J of Cell Sci* 125 (2012): 4576-4585.
13. Raasi *et al.*, *J Biol Chem* 276 (2001): 35334-35343.
14. Schmidtke *et al.*, *Biochim Biophys Acta.* 1843 (2014): 97-102.
15. Lee *et al.*, *Oncogene* 22 (2003): 2592-2603.
16. Lukasiak *et al.*, *Oncogene* 27 (2008): 6068-6074.
17. Canaan *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 26 (2006): 5180-5189.
18. Raasi *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 29 (1999): 4030-036.
19. Liu *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999): 4313-4318.
20. Zhang *et al.*, *J Immunol* 197 (2016): 824-833.
21. de Jong *et al.*, *Nat Med* 12 (2006): 1203-1207.
22. Song *et al.*, *J Immunol.* 196 (2016): 3117-3123.
23. Godbersen *et al.*, *Leuk. Lymphoma* 56 (2015): 1566-1569.
24. Mathewson *et al.*, *Blood*, 122 (2013): 2062-2073.

Siena, 17 Dicembre 2020

In fede

Dr. Gianni Gori Savellini

