

L'infezione da SARS-CoV-2: la serratura e la chiave

Barbara Illi

Istituto di Biologia e Patologia Molecolari, Consiglio Nazionale delle Ricerche (IBPM-CNR), c/o Dipartimento di Biologia e Biotecnologie "Charles Darwin", Sapienza Università di Roma.

Note: evidenziate in corsivo sono riportate informazioni per "non biologi".

Introduzione

Tutte le infezioni virali richiedono l'interazione tra particelle virali e la superficie della cellula ospite. Dobbiamo immaginare che le nostre cellule posseggano, sulla loro superficie una serie di "serrature", detti recettori, ognuna adatta, di solito, ad una "chiave" specifica, detta ligando, una proteina che può essere solubile o presente sulla superficie di cellule limitrofe. Quando la chiave entra nella serratura, altre proteine vengono attivate all'interno

Figure 1

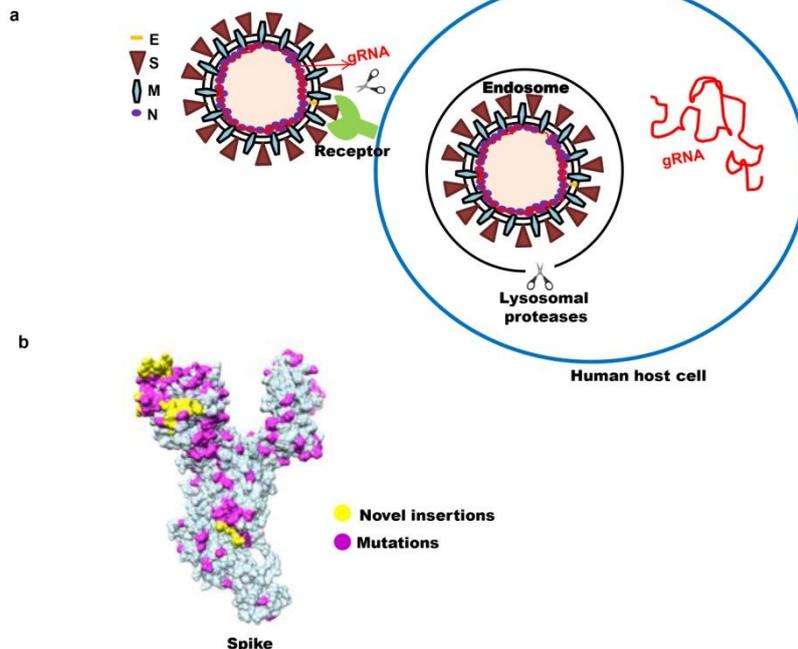


Figure 1. a) Meccanismo di ingresso dei Coronavirus, tramite endocitosi e degradazione lisosomiale. b) Struttura della proteina Spike dei Coronavirus. Nuove inserzioni e mutazioni nella proteina Spike di CoV-2 sono mostrate in giallo e violetto, rispettivamente. Abbreviazioni: E=Envelope; S=Spike; M=Membrane; N=nucleocapsid; gRNA= genomic RNA. (Adattato da Shang et al., PNAS, 2020; Guzzi et al., J Clin Med, 2020).

della cellula, lavorando in sequenza in una cascata di eventi che termina al nucleo. Questa cascata di eventi culmina in un cambiamento nell'espressione di geni, che devono essere appropriati allo stimolo ricevuto. Per rendere le cose più chiare possibili, è come l'accensione del motore di un'automobile, dove l'automobile è la cellula

e il motore è il nucleo, che governa i comportamenti della cellula. Un esempio è la risposta a proteine (ad esempio, fattori di crescita)

che impartiscono alla cellula l'ordine di proliferare e dividersi in 2 cellule figlie. I virus evolvono continuamente proteine della loro superficie per usare queste serrature ed

entrare nelle cellule, in modo da rendere l'interazione serratura-chiave più forte. Questo è anche il caso della proteina Spike di CoV-2 (la chiave) e del recettore umano Angiotensin Converting Enzyme 2 (hACE2; la serratura). I Coronavirus usano, praticamente, lo stesso meccanismo per entrare nelle cellule ospiti, che inizia con l'attacco della superficie virale alla membrana della cellula, seguito dall'ingresso negli endosomi ed eventualmente nei lisosomi, dove vengono degradate le proteine virali e rilasciato l'RNA (figura 1a).

La chiave di CoV-2: Spike e i suoi siti di taglio

La proteina Spike (d'ora in poi CoV-2-S) di CoV-2 è un trimero, ossia è formata da 3 unità identiche, chiamate protomeri. Conferisce al virus la classica forma a corona, da cui è stato coniato il nome Coronavirus. La struttura di CoV-2-S è praticamente identica a quella delle spikes di SARS-CoV e MERS-CoV, ma differisce da queste per un certo numero di

Figure 2

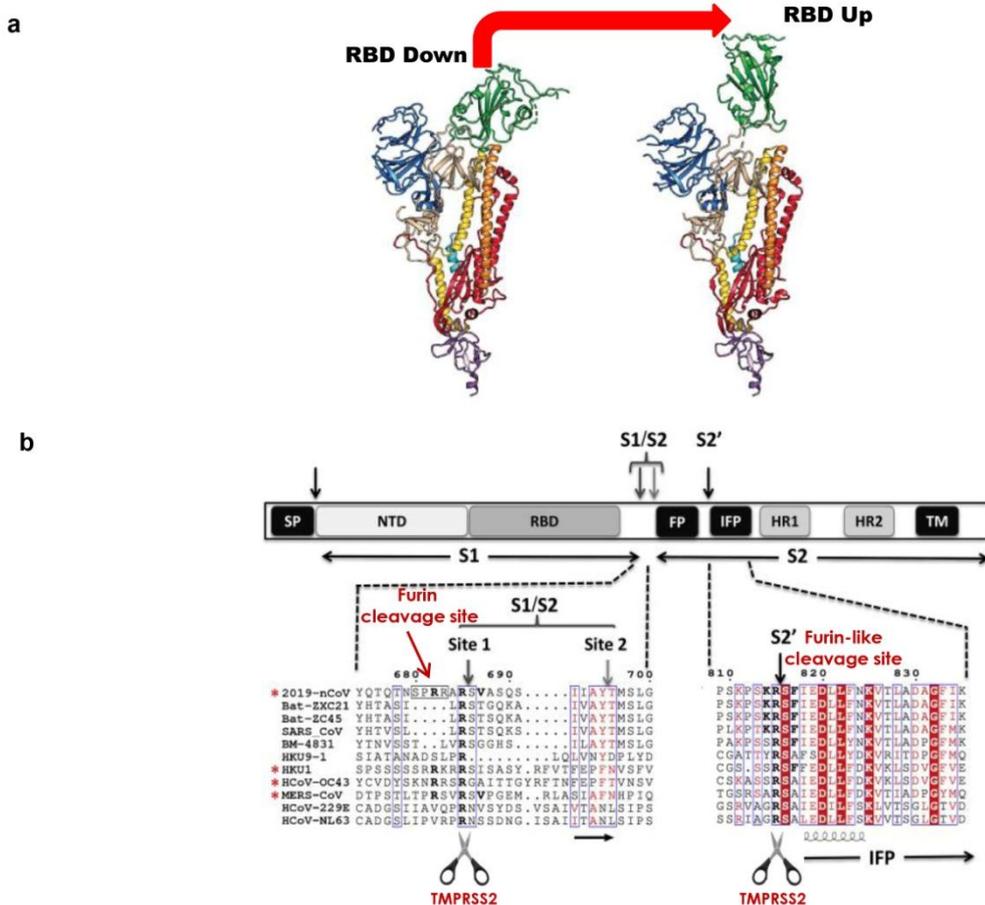


Figure 2. a) Struttura del protomero di CoV-2-S, che nasconde o espone l'RBD, nelle conformazioni "down" e "up", rispettivamente. b) Struttura schematica di CoV-2-S, con i siti di taglio indicati da frecce. Al di sotto dello schema, è mostrato un allineamento con altri RBD di altri coronavirus di pipistrello e uomo. Gli asterischi rossi indicano dei siti putativi di taglio per la furina. Abbreviazioni: SP=peptide segnale; NTD= dominio amino (N)-terminale; RBD= dominio di legame al recettore; FP=peptide di fusione; IFP= peptide di fusione interno; HR1=ripetizione di 7* - 1; HR2= ripetizione di 7- 2; TM= dominio transmembrana.

*una ripetizione di 7 (heptad repeat, HR) è una sequenza di 7 aminoacidi, che nei virus si trova di frequente adiacente a domini di fusione idrofobici. (Adattato da Wrapp et al., Science 2020; Coutard et al., Antiviral Res, 2020),

mutazioni e inserzioni (figura 1b). CoV-2-S esiste in 2 differenti conformazioni, definite “down” (giù) o “up” (su)¹ (figura 2a). Nella conformazione “down”, CoV-2-S non può mediare la fusione del virus con la cellula ospite. Per fare questo, deve subire un cambiamento conformazionale che le assicuri di acquisire la conformazione “up”. Questo fenomeno accade non appena CoV-2-S interagisce con ACE2 attraverso il suo dominio di superficie 1 (S1), che contiene il dominio di legame al recettore, receptor binding domain, RBD), dopo che CoV-2-S è stata tagliata da proteasi cellulari, *proteine che ne tagliano altre in prossimità di specifiche sequenze di aminoacidi, peculiari per ogni classe di proteasi*. Questo processo, che avviene al sito di taglio S1/S2 (figura 2b), genera un dominio di superficie esterno S1, che interagisce con ACE2, ed un dominio di superficie 2 (S2), che media l'ingresso del virus nella cellula, in particolare dopo un ulteriore taglio ad un altro sito, detto S2', che precede il peptide di fusione interno (internal fusion peptide, IFP; figura 2b). Una delle proteasi cellulari coinvolte in questo processo è la serin-proteasi transmembrana 2 (trans membrane serine protease 2, TMPRSS2)², che media anche l'ingresso nelle cellule di SARS-CoV. Infatti, l'inibizione di TMPRSS2 impedisce l'ingresso di CoV-2 nelle cellule (figura 3a)². L'allineamento delle sequenze aminoacidiche di CoV-2-S e altre spike di betacoronavirus mostra un alto grado di somiglianza. Molto di recente, è stato dimostrato che CoV-2-S e la proteina spike di un coronavirus di pangolino sono identiche al 91%, suggerendoo i pangolini come ospiti intermedi e origine più prossima di CoV-2³. Tuttavia, rispetto a SARS-CoV e Pangolin-CoV, CoV-2-S presenta un sito unico di taglio, costituito da aminoacidi basici, *cioè a carica positiva*, bersaglio della proteasi furina^{4,5}. La furina è una cosiddetta convertasi, che attiva molte proteine, tra cui ormoni e molecole di adesione⁶. Un sito simile è presente anche in MERS-CoV, altri CoVs umani e in ceppi di virus influenzali altamente patogenici⁷. E' stato dimostrato di recente che anche la furina è essenziale per l'ingresso di CoV-2 nella cellula ospite (figura 3b). Inoltre anche la cathepsinaD, una proteasi dei lisosomi, è importante per l'infezione da CoV-2. Tutte queste proteasi cooperano all'ingresso di CoV-2 nelle cellule ospiti, mentre ciò non accade per SARS-CoV, che manca del sito di taglio per la furina⁸.

La serratura sulle cellule umane: ACE2 e la sua struttura cristallografica in complesso con Spike

ACE2 è uno dei membri del sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAAS), che assicura l'omeostasi della pressione del sangue, il bilancio degli elettroliti, la risposta infiammatoria, ed è richiesto per il corretto funzionamento di reni, cuore, vasi sanguigni e

Figure 3

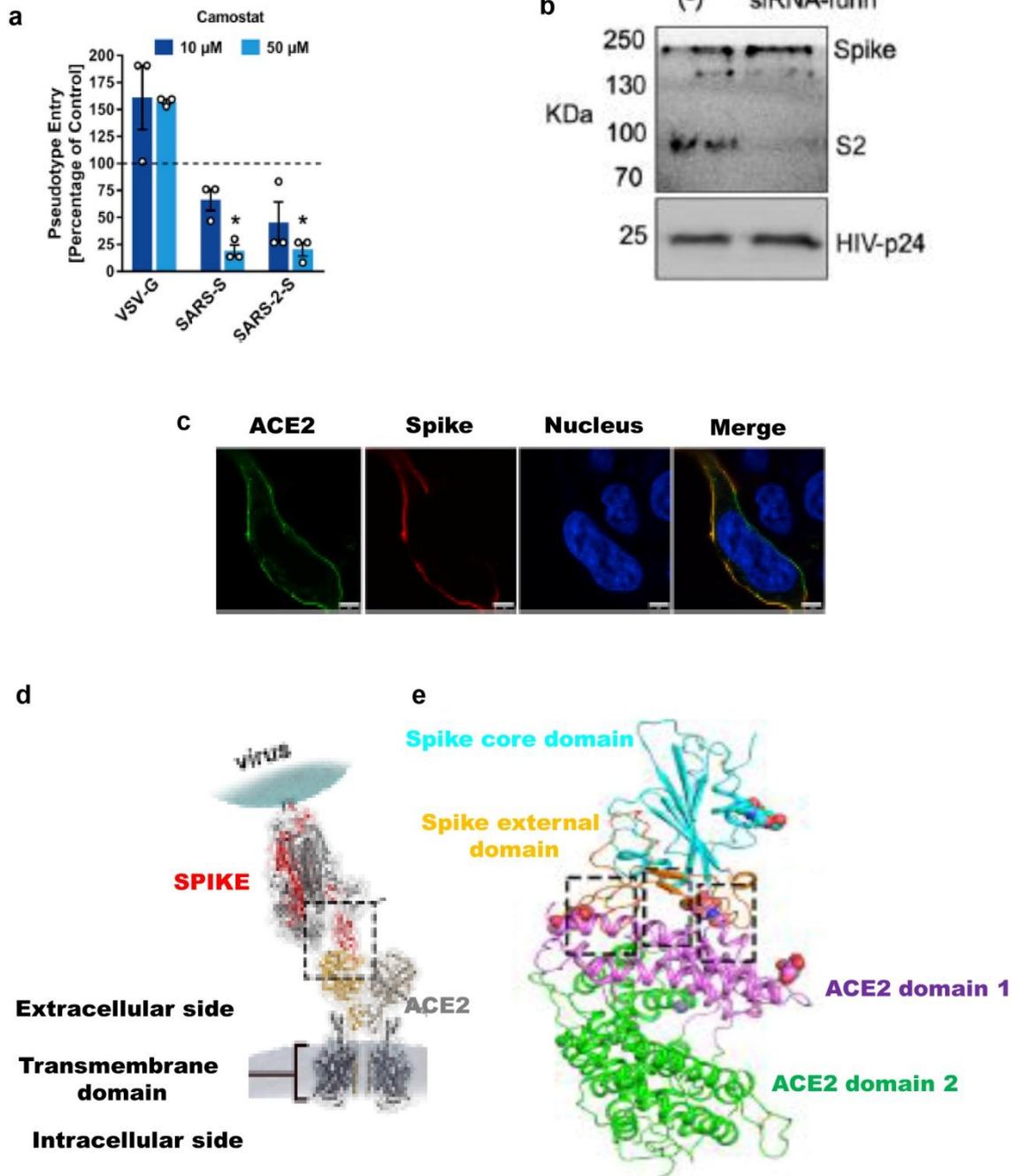


Figure 3. a) L'istogramma mostra il mancato ingresso di SARS-CoV-S e CoV-2-S in presenza di un inibitore di TMPRSS2 (Camostat) a 2 differenti concentrazioni. b) Analisi in western blot* che mostra come un RNA interferente per la furina (cioè, uno strumento molecolare che inibisce la produzione di furina), impedisca il taglio di CoV-2-S. c) Immunofluorescenza** che mostra la co-localizzazione di ACE2 (verde) e CoV-2-S (rossa) sulla superficie della cellula ospite. La sovrapposizione (merge) di ACE2 e CoV-2-S appare come una linea gialla che circonda la cellula. I nuclei sono mostrati in blu, dopo colorazione specifica del DNA. d) Rappresentazione schematica dell'interazione tra ACE2 e CoV-2-S sulla superficie cellulare. I domini di interazione sono evidenziati da una linea tratteggiata. e) Ingrandimento delle interazioni tra ACE2 e CoV-2-S. Contatti specifici sono evidenziati da linee tratteggiate. I punti rossi rappresentano amino-glicani***. Abbreviazioni: VSV-G= glicoproteina del virus della stomatite vescicolare; siRNA= piccolo RNA interferente (small interfering RNA).

*Il western blot è una tecnica che consente la visualizzazione, su lastra autoradiografica o strumento digitale, di una proteina di interesse, tramite il riconoscimento con un anticorpo specifico e un sistema di rilevazione luminescente. **L'immunofluorescenza è una tecnica che consente la visualizzazione al microscopio di proteine all'interno di specifici compartimenti cellulari, grazie al riconoscimento di anticorpi marcati con colori diversi (in questo caso, rosso e verde) ***Gli amino-glicani sono polisaccaridi.

(Adattato da: Hoffmann et al., Cell, 2020; Wang et al., Cell, 2020).

polmoni, idrolizzando l'angiotensina 2 e convertendola in molecole vasodilatatorie e cardioprotettive. In relazione all'infiammazione polmonare, dovuta a infezioni virali, ACE2 esercita un duplice ruolo. Primo, dopo l'ingresso del virus, l'espressione di ACE2 si riduce; secondo, a seguito di questa diminuzione aumenta il livello di angiotensina 2 solubile, che potenzia la permeabilità vascolare e l'infiammazione⁹. ACE2 e CoV-2-S co-localizzano sulla membrana cellulare (figura 3c). Recentemente, la struttura cristallografica di ACE2 complessato all'RBD di CoV-2-S è stata risolta, evidenziando differenze importanti con l'interazione dell' RBD di SARS-CoV-S. Infatti, dei 24 aminoacidi di ACE2 che sono impegnati nell'interazione col virus, 15 formano più contatti con CoV-2-S rispetto a SARS-CoV-S. Inoltre, l'interfaccia tra CoV-2-S e ACE2 presenta più aminoacidi direttamente in contatto rispetto all'interfaccia SARS-CoV-S/ACE2 (21 contro 17). E ancora, alcuni cambiamenti nella sequenza aminoacidica di CoV-2-S-RBD rendono più forte l'interazione con ACE2, grazie alla creazione di più legami di van der waals (*legami deboli che dipendono da fluttuazioni nella distribuzione delle cariche elettriche degli aminoacidi*) e ponti salini (*una combinazione tra legami idrogeno ed elettrostatici*)⁹. La forza dell'interazione tra CoV-S e ACE2 dipende anche dalla maggiore rigidità delle interazioni che stabilisce l'RBD di CoV-2-S con ACE2 rispetto alle interazioni dell'RBD di SARS-CoV-S, più flessibile e instabile¹¹.

Serrature alternative putative: le integrine e CD147

Un'altra caratteristica interessante di CoV-2-S è la presenza, sempre nell'RBD ma a monte del dominio di interazione con ACE2, di uno stretch di aminoacidi specifici, detto motivo RGD (R=arginina; G=glicina; D=acido aspartico), riconosciuto da un'altra classe di recettori, le integrine (figura 4a)¹². Le integrine sono eterodimeri ubiquitari, espressi sulla superficie cellulare, che mediano l'adesione cellulare a la migrazione e attivano vie di segnalazione intracellulari. Nella conformazione up, il motivo RGD di CoV-2-S è esposto sulla superficie, mentre nella conformazione down è nascosto (figura 4b). Questo motivo RGD è unico in CoV-2 tra i betacoronavirus, mentre è presente negli adenovirus e nello metapneumovirus umani, che usano le integrine come vie di ingresso nelle cellule. Questa sequenza potrebbe essersi evoluta come meccanismo alternativo di ingresso del virus o per ampliare il suo tropismo. Inoltre, è stato dimostrato che anche CD147, usato da SARS-CoV come recettore di ingresso alternativo, potrebbe essere usato da CoV-2, poiché un anticorpo diretto contro CD147 impedisce l'ingresso di CoV-2 nelle cellule¹³

Figure 4

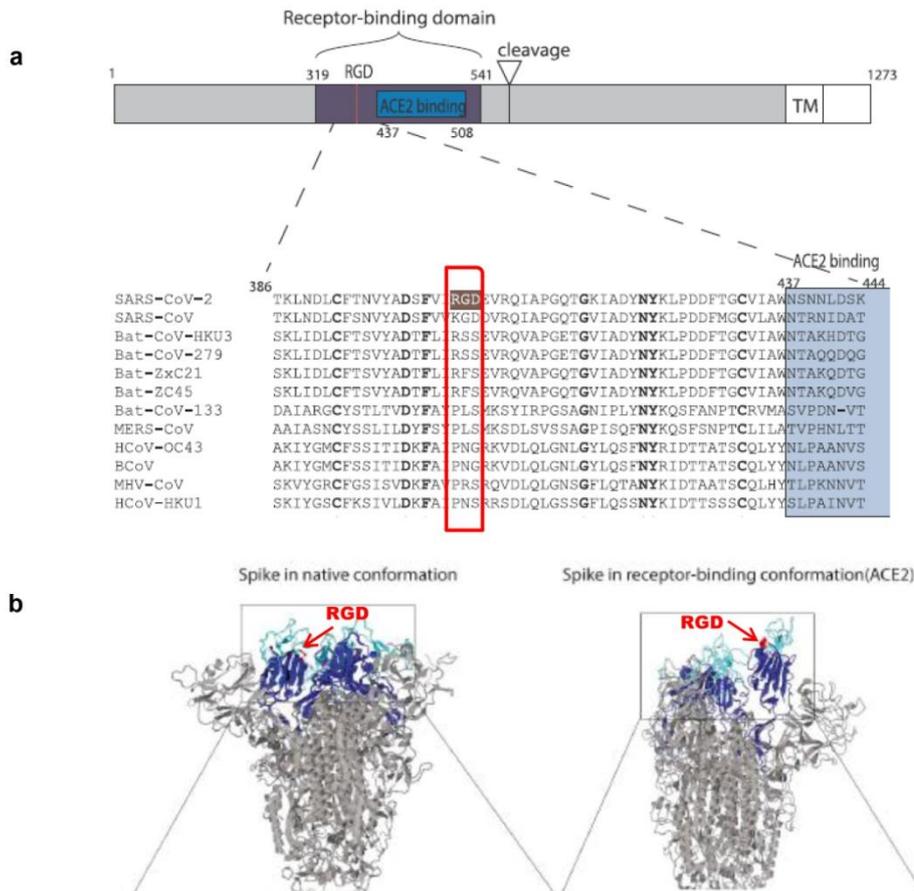


Figure 4. a) La sequenza RGD è a monte del dominio di legame di ACE2 e l'allineamento delle sequenze di CoV-2-S con altre proteine spike di altri coronavirus indica questa sequenza come specifica di CoV-2. b) Struttura di CoV-2-S nella conformazione down (sinistra) o up (destra): la sequenza RGD (in rosso) è nascosta quando S non può legare ACE2 ed esposta quando lo lega. (Adattato da Sigrist et al., Antiviral Res, 2020).

ACE2 e il sistema cardiovascolare: al cuore di uno dei maggiori problemi clinici?

L'espressione di ACE2 nelle cellule polmonari e bronchiali è stata ben documentata. Le malattie cardiovascolari rappresentano una delle condizioni di co-morbidità che rendono sfavorevole la prognosi di Covid-19. In aggiunta alla tempesta di citochine, che attacca tutti gli organi, in particolare cuore e polmoni, elevati livelli di Troponina T e creatinasi (CK), che di solito si riscontrano nelle malattie cardiovascolari, sono stati associati a casi gravi di Covid-19 e ad un più alto tasso di mortalità. Una possibile infezione dei cardiomiociti da CoV-2, e conseguente miocardite, è stata postulata, ma non ancora rilevata da biopsie o autopsie¹⁴. Tuttavia, di recente, un'elevata espressione di ACE2 è stata dimostrata nel cuore (anche più alta che nei polmoni; figura 5a) e, specificamente, nei periciti¹⁵ (figura 5b), molto importanti per il corretto funzionamento dei vasi sanguigni e che potrebbero essere bersagli diretti di CoV-2¹⁴. Questo potrebbe impedire la corretta

Figure 5

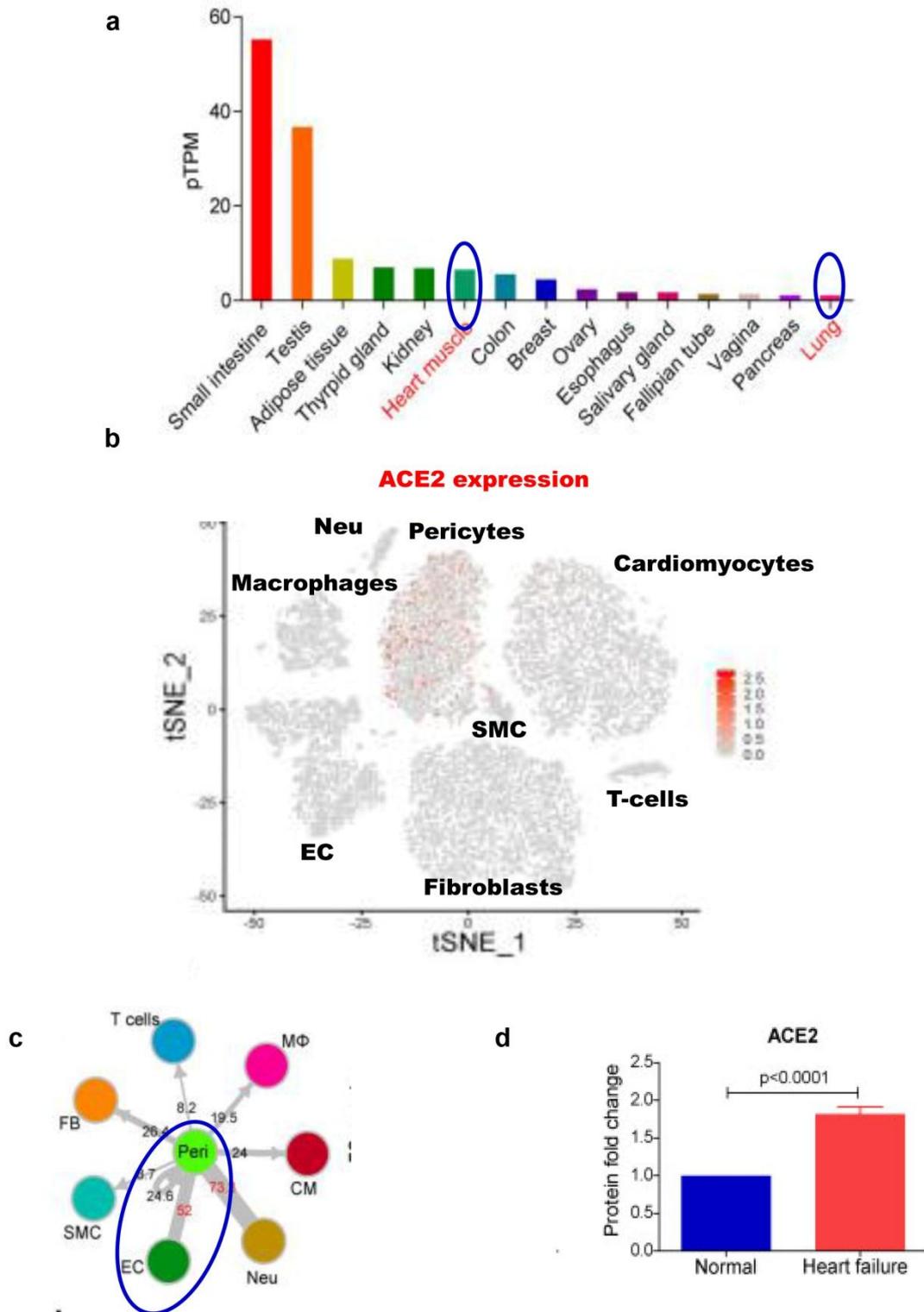


Figure 5. a) Espressione dell'mRNA di ACE2 in vari tessuti. Cuore e polmoni sono evidenziati da cerchi blu. b) Rappresentazione grafica di differenti tipi cellulari nel cuore umano e della distribuzione dei livelli di ACE2 (indicati da una gradazione di colore dal grigio al rosso) c) Comunicazione tra periciti e altri tipi cellulari residenti nel cuore. Lo spessore delle barre grigie rappresenta la forza dell'interazione cellula-cellula. I periciti interagiscono fortemente con l'endotelio e con cellule simili ai neuroni. d) Espressione della proteina ACE2 in cuori normale and compromessi. Abbreviazioni: mRNA= RNA messaggero; t-SNE: t-distributed stochastic neighbor embedding (t-SNE) plot, un algoritmo che prende oggetti simili all'interno di una moltitudine e definisce la probabilità simile di distribuzione, di solito mostrando dei gruppi in una mappa a 2 o 3 dimensioni. T cells= linfociti T; MΦ=macrofagi; CM=cardiomiociti; Neu= cellule simil-neuronali; EC=cellule endoteliali; SMC=cellule muscolari lisce (smooth muscle cells); FB=fibroblasti. (Adattato da Chen et al., Cardiovascular Res, 2020).

interazione dei periciti con l'endotelio (figura 5c) e causare una disfunzione della microcircolazione, spiegando gli elevati livelli di CK, indipendentemente dalla presenza o meno della tempesta di citochine. Inoltre, pazienti con malattia cardiovascolare pregressa mostrano più alti livelli di ACE2 (figura 5d)¹⁵. Ciò potrebbe supportare la più alta suscettibilità all'infezione da CoV-2 dei pazienti con malattie cardiovascolari, la severità della malattia e il più elevato tasso di mortalità.

Conclusioni

Da questo breve excursus sugli attori (Spike, ACE2, integrine, CD147, proteasi cellulari), sui meccanismi di ingresso di CoV-2 nelle cellule e sul tropismo cellulare, risulta chiaro che questo virus ha evoluto un certo numero di strategie per aumentare la sua fitness. In particolare, l'uso di recettori alternativi amplia lo spettro di cellule che CoV-2 può attaccare. ACE2 e TMPRSS2 co-localizzano in cellule bronchiali, mentre la furina, una convertasi ubiquitaria, rende più efficiente l'ingresso del virus ed espande il suo tropismo. Il sito di taglio per la furina, assente in SARS-CoV, BatCoV RaTG13 e Pangolin-CoV, i virus più prossimi a CoV-2, potrebbe essersi evoluto nell'uomo, dopo il salto dai pangolini, che sono riportati come il più probabile anello mancante tra pipistrello e uomo, almeno finora. La comparsa di questo sito polibasico rema anche contro la possibilità che CoV-2 sia il risultato di un adattamento del virus a ripetuti passaggi in coltura. L'acquisizione di siti di taglio di questo genere è stata mai per altri Coronavirus (HKU1, HCoV-OC43 e MERS-CoV), per i virus dell'influenza aviaria ad alta e bassa patogenicità, per questi ultimi dopo numerosissimi passaggi in coltura e anche "in vivo". Inoltre, un virus progenitore, con elevata somiglianza genetica, avrebbe dovuto essere isolato, coltivato e avrebbe dovuto acquisire il sito polibasico, dopo ripetuti passaggi in coltura in cellule esprimenti ACE2. Questa catena di eventi è molto improbabile che sia avvenuta. Il meccanismo di ingresso tramite endosoma-lisosoma è stato dimostrato essere utilizzato anche da CoV-2¹⁶. L'RBD di COV-2-S forma più forti interazioni con ACE2 che l'RBD di SARS-CoV⁸. Tuttavia, l'intera proteina Spike di CoV-2 forma interazioni simili o più deboli rispetto all'intera proteina Spike di SARS-CoV. Ciò potrebbe dipendere dal fatto che, mentre l'RBD di SARS-CoV-S è sempre nella conformazione esposta, quello di CoV-2-S è quasi sempre nella conformazione nascosta. L'RBD della proteina Spike è la porzione più immunogenica di questi virus e il fatto che quello di CoV-2 sia quasi sempre nella conformazione nascosta potrebbe spiegare, almeno parzialmente, l'evasione di CoV-2 dalla sorveglianza del sistema immunitario. Perciò, nonostante il sistema di ingresso di CoV-2 nelle cellule

ospiti rappresenti una sfida e sia molto complesso, esso potrebbe anche suggerire strategie multiple per impedire l'infezione.

Referenze

1. Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh CL, Abiona O, Graham BS, McLellan JS. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*. 2020 Mar 13;367(6483):1260-1263. doi: 10.1126/science.abb2507.
2. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, Schiergens TS, Herrler G, Wu NH, Nitsche A, Müller MA, Drosten C, Pöhlmann S. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*. 2020 Apr 16;181(2):271-280.e8. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.052.
3. Xiao K, Zhai J, Feng Y, Zhou N, Zhang X, Zou JJ, Li N, Guo Y, Li X, Shen X, Zhang Z, Shu F, Huang W, Li Y, Zhang Z, Chen RA, Wu YJ, Peng SM, Huang M, Xie WJ, Cai QH, Hou FH, Chen W, Xiao L, Shen Y. Isolation of SARS-CoV-2-related coronavirus from Malayan pangolins. *Nature*. 2020 May 7. doi: 10.1038/s41586-020-2313-x.
4. Coutard B, Valle C, de Lamballerie X, Canard B, Seidah NG, Decroly E. The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. *Antiviral Res*. 2020 Apr;176:104742. doi: 10.1016/j.antiviral.2020.104742.
5. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Pöhlmann S. A Multibasic Cleavage Site in the Spike Protein of SARS-CoV-2 Is Essential for Infection of Human Lung Cells. *Mol Cell*. 2020 Apr 28. pii: S1097-2765(20)30264-1. doi: 10.1016/j.molcel.2020.04.022.
6. Braun E, Sauter D. Furin-mediated protein processing in infectious diseases and cancer. *Clin Transl Immunology*. 2019 Aug 5;8(8):e1073. doi: 10.1002/cti2.1073.
7. Kido, H., Okumura, Y., Takahashi, E., Pan, H.Y., Wang, S., Yao, D., Yao, M., Chida, J., Yano, M., 2012. Role of host cellular proteases in the pathogenesis of influenza and influenza-induced multiple organ failure. *Biochim. Biophys. Acta Protein Proteomics*. 2012; 1824:186-94. doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.07.001.

8. Shang J, Wan Y, Luo C, Ye G, Geng Q, Auerbach A, Li F. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020 May 6. pii: 202003138. doi: 10.1073/pnas.2003138117.
9. Jia H. Pulmonary Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2) and Inflammatory Lung Disease. *Shock*. 2016 Sep;46(3):239-48. doi: 10.1097/SHK.0000000000000633.
10. Wang Q, Zhang Y, Wu L, Niu S, Song C, Zhang Z, Lu G, Qiao C, Hu Y, Yuen KY, Wang Q, Zhou H, Yan J, Qi J. Structural and Functional Basis of SARS-CoV-2 Entry by Using Human ACE2. *Cell*. 2020 Apr 7. pii: S0092-8674(20)30338-X. doi: 10.1016/j.cell.2020.03.045.
11. Brielle ES, Schneidman-Duhovny D, Linial M. The SARS-CoV 2 Exerts a Distinctive Strategy for Interacting with the ACE2 Human Receptor. *Viruses*. 2020 Apr 30;12(5). pii: E497. doi: 10.3390/v12050497.
12. Sigrist CJ, Bridge A, Le Mercier P. A potential role for integrins in host cell entry by SARS-CoV-2. *Antiviral Res*. 2020 May;177:104759. doi: 10.1016/j.antiviral.2020.104759.
13. Wang, K., Chen, W., Zhou, Y. S., et al. (2020). SARS-CoV-2 invades host cells via a novel route: CD147-spike protein. *BioRxiv preprint*. <https://doi.org/10.1101/2020.03.14.988345>.
14. Groß S, Jahn C, Cushman S, Bär C, Thum T. SARS-CoV-2 receptor ACE2-dependent implications on the cardiovascular system: From basic science to clinical implications. *J Mol Cell Cardiol*. 2020 Apr 30. pii: S0022-2828(20)30121-8. doi: 10.1016/j.yjmcc.2020.04.031.
15. Chen L, Li X, Chen M, Feng Y, Xiong C. The ACE2 expression in human heart indicates new potential mechanism of heart injury among patients infected with SARS-CoV-2. *Cardiovasc Res*. 2020 May 1;116(6):1097-1100. doi: 10.1093/cvr/cvaa078.
16. Ou X, Liu Y, Lei X, Li P, Mi D, Ren L, Guo L, Guo R, Chen T, Hu J, Xiang Z, Mu Z, Chen X, Chen J, Hu K, Jin Q, Wang J, Qian Z. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat Commun*. 2020 Mar 27;11(1):1620. doi: 10.1038/s41467-020-15562-9.