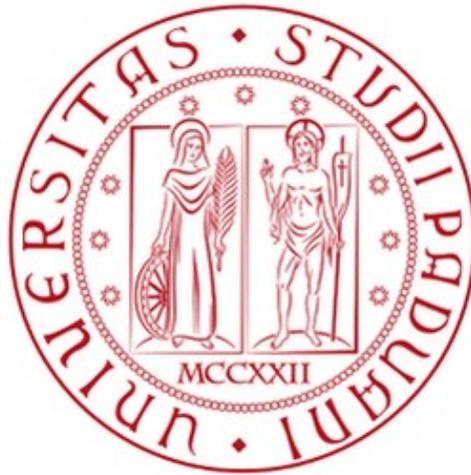


Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Biologia

Corso di Laurea Magistrale in Biotecnologie Industriali



Effetto delle proteine accessorie di SARS-COV-2 3a e 9b sul citoscheletro

Relatore: Prof. Laura Cendron

Dipartimento di Biologia

Correlatore: Dr. Maria Montoya

Dipartimento di Viral Immunology (CIB)

Controrelatore: Prof. Valentina Gandin

Dipartimento di scienze farmaceutiche e farmacologiche

Laureando: Federico Gattini

Anno Accademico 2023/2024

INDICE

Introduzione	pag 3
Ingresso del Virus	pag 5
Espressione delle proteine non strutturali	pag 6
Interazione SARS-CoV-2-sistema immunitario	pag 7
Toll-like Receptor	pag 8
Inflamosoma	pag 10
Proteine strutturali, non strutturali e accessorie	pag 14
Proteina ORF 3a	pag 18
Proteina ORF 9b	pag 21
Organizzazione citoscheletro e coinvolgimento nella risposta immunitaria	pag 23
Tubulina	pag 25
Actina	pag 29
Citoscheletro e risposta immunitaria	pag 33
Immunità innata	pag 33
Cellule B	pag 36
Cellule T	pag 38
Scopo della tesi	pag 41
Materiali e metodi	pag 42
Culture cellulari	pag 42
Trasfezione per l'espressione stabile con lentivirus	pag 45

Descrizione dei vettori virali	pag 47
Basi teoriche dell'Immunofluorescenza	pag 49
Protocollo di immunofluorescenza	pag 53
Razionale sull'uso dei reagenti di immunofluorescenza	pag 55
Natura dei fluorofori utilizzati	pag 56
Teoria del Western Blotting	pag 60
Retta di taratura	pag 62
Protocollo Western Blotting	pag 65
Basi teoriche della Citometria a flusso	pag 68
Risultati e discussione	pag 67
Fine tuning del protocollo di immunofluorescenza	pag 67
Immunofluorescenza con protocollo adattato	pag 70
Valutazione dell'espressione con citometria	pag 78
Gel di Western Blotting	pag 80
Conclusioni	pag 82
Bibliografia	pag 83

INTRODUZIONE

I coronavirus sono una famiglia di virus a RNA a singolo filamento, a senso positivo, con envelope, che infettano specie di mammiferi e uccelli. I virus a RNA a singolo filamento positivo (5'-3') hanno un genoma a RNA che può essere tradotto direttamente nelle proteine virali, e che quindi può essere considerato l'mRNA virale. Tale mRNA può, quindi, essere usato direttamente per sintetizzare proteine, senza l'ausilio di un RNA complementare. Grazie a ciò, questi virus non necessitano di avere una RNA polimerasi compresa nel virione, che sarà una delle prime proteine ad essere prodotte dalla cellula ospite, necessaria affinché il genoma del virus si replichi.

Negli esseri umani, sono noti quattro coronavirus a circolazione stagionale: il coronavirus umano (HCoV) 229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 e HCoV-HKU1, che solitamente causano sintomi lievi simili al raffreddore comune. Il coronavirus della sindrome respiratoria acuta grave (SARS-CoV), il coronavirus della sindrome respiratoria del Medio Oriente (MERS-CoV) e il SARS-CoV-2 sono emersi negli esseri umani rispettivamente nel 2002, 2012 e 2019, da un serbatoio animale; questi possono causare malattie respiratorie più gravi che possono essere letali. Fanno parte della famiglia Coronaviridae, che appartiene all'ordine Nidovirales. I coronavirus mostrano una vasta diversità genetica negli esseri umani e nelle specie serbatoio, come i pipistrelli, comprendendo numerosi ceppi, varianti e lignaggi all'interno delle diverse specie di coronavirus. A differenza del SARS-CoV e del MERS-CoV, che hanno causato o continuano a causare focolai limitati, il SARS-CoV-2 si è rapidamente diffuso a livello globale ed è stato dichiarato pandemia dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) nel marzo 2020. A giugno 2023, il SARS-CoV-2 aveva causato oltre 768 milioni di infezioni confermate con oltre 6,9 milioni di decessi attribuiti.

L'RNA genomico (gRNA) di SARS-CoV-2 è lungo circa 29,9 kb, con un'estremità 5' presentante il cap e un'estremità 3' poliadenilata. I frame di lettura aperti (ORF) ORF1a e ORF1b coprono i due terzi a livello del 5' del genoma virale. Essi vengono tradotti direttamente dal gRNA e codificano per 16 proteine non strutturali che facilitano la sintesi dell'RNA virale e sono coinvolte nelle interazioni virus-ospite all'interno della cellula ospite. Il rimanente terzo a livello del 3' del gRNA codifica per quattro proteine strutturali, che sono intervallate da una serie di geni che codificano per proteine accessorie. A

differenza di ORF1a e ORF1b, le proteine strutturali e accessorie vengono tradotte da un insieme di RNA messaggeri subgenomici (sg-mRNA).

Un RNA subgenomico, o mRNA subgenomico, è un RNA messaggero risultante dalla trascrizione di una frazione più grande o più piccola di un filamento di DNA o RNA antisenso. La trascrizione inizia all'estremità 3' del genoma, continua con un numero maggiore o minore di nucleotidi, quindi "salta" verso l'estremità 5' per terminare la trascrizione. Questo meccanismo produce RNA messaggeri aventi un'estremità 5' più o meno costante, a seconda della lunghezza del segmento trascritto prima di procedere con la trascrizione dell'estremità 3'. Questi RNA subgenomici formano insieme con sequenze definite annidate, che fornisce un modo per codificare più proteine sullo stesso genoma. (Miller and Koev 2000)

Le proteine strutturali di SARS-CoV-2 includono la glicoproteina spike (S) legata alla membrana, la proteina envelope (E), la proteina membrana (M) e la proteina nucleocapside (N) legante l'RNA. La glicoproteina S media l'ingresso virale, mentre le altre proteine orchestrano l'impacchettamento, l'assemblaggio e la gemmazione di nuovi virioni. Le proteine accessorie svolgono funzioni ausiliarie nel ciclo vitale del virus e sono generalmente dispensabili per la replicazione virale in coltura cellulare. Esse sono notevolmente eterogenee sia nella composizione che nella sequenza tra i vari generi e sottogeneri di coronavirus, e talvolta anche tra specie diverse. Analisi genomica comparative (Jungreis, Sealfon, and Kellis 2021) hanno suggerito che ORF3a, ORF3c, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8 e ORF9b di SARS-CoV-2 codificano per proteine accessorie, denominate secondo una nomenclatura basata sull'omologia. Sebbene le funzioni delle proteine accessorie debbano ancora essere completamente caratterizzate, molte sono state collegate all'evasione immunitaria virale.

Oltre alla sua capacità di codificare proteine, il gRNA di SARS-CoV-2 contiene strutture RNA di ordine superiore complesse che funzionano come elementi cis-agenti, regolando il ciclo vitale virale. Le regioni non tradotte (UTR) 5' e 3', che fiancheggiano la sezione codificante del gRNA, contengono un insieme di strutture RNA che si sono dimostrate importanti per la replicazione del genoma, la traduzione delle proteine virali, la trascrizione degli sg-mRNA e la formazione del nucleocapside.

Nelle regioni codificanti del gRNA di SARS-CoV-2, la struttura RNA più studiata è l'elemento di frameshift che induce uno frameshift programmato del ribosoma (PRF) alla giunzione tra ORF1a e ORF1b, essenziale per la traduzione del coronavirus.

Ingresso del Virus

L'ingresso del virus nella cellula è deputato ad una proteina strutturale, la glicoproteina S di SARS-CoV-2. Essa è incorporata nella superficie del virione come un omotrimerico e l'ingresso nella cellula ospite è garantito legandosi all'enzima di conversione dell'angiotensina 2 (ACE2), il recettore per l'ingresso nell'ospite per SARS-CoV-2. La distribuzione specifica dei recettori nei tessuti e nei tipi cellulari è quindi il principale determinante del tropismo cellulare dell'ospite. La proteina S di SARS-CoV-2 (che è composta da 1.273 aminoacidi) è organizzata in due domini principali, S1 e S2, con un sito di clivaggio polibasico alla loro giunzione. S1 comprende 4 domini. Un dominio N-terminale (NTD), il dominio di legame al recettore (RBD) e due domini C-terminali (CTD1 e CTD2). S2 contiene un ulteriore sito di clivaggio S2', che, quando attivato, espone un peptide di fusione che ancora il virus nella cellula ospite. Inoltre, in S2 si trovano due ripetizioni di eptadi (è un esempio di motif strutturale che consiste nella ripetizione di pattern di sette aminoacidi) e un dominio transmembrana che, a seguito di cambiamenti conformazionali, portano alla fusione della membrana virale con quella dell'ospite e al successivo rilascio dell'RNA virale nel citoplasma. La presenza di un motivo di sequenza polibasica PRRAR (pro-arg-arg-ala-pro) alla giunzione S1-S2 è unica per SARS-CoV-2. Può essere clivata dalla proteasi furina durante la maturazione del virione.

Dopo il legame con la cellula ospite e l'interazione con il recettore di ingresso, la proteina S di SARS-CoV-2 richiede inoltre il clivaggio proteolitico di attivazione a S2' da parte della proteasi serina transmembrana di tipo II TMPRSS2 o della cisteina proteasi endosomale-lisosomale catepsina L o catepsina B, per esporre il peptide di fusione e catalizzare la fusione delle membrane. L'attivazione di S2' tramite TMPRSS2 è associata all'ingresso sulla superficie cellulare (via di ingresso precoce), mentre l'attivazione tramite catepsina L o catepsina B è collegata all'ingresso virale endosomale e richiede l'acidificazione endosomale (via di ingresso tardiva) per la fusione delle membrane. Ad ogni modo entrambe le vie di ingresso dipendono dal tipo di cellula e dall'espressione della proteasi, determinando così il tropismo di SARS-CoV-2. Ad esempio, TMPRSS2 è altamente espresso nelle cellule epiteliali del tratto respiratorio, mentre la catepsina L ha bassi livelli di espressione negli endosomi respiratori. L'ingresso efficiente di SARS-CoV-2 si traduce nella fusione delle membrane e nel rilascio del genoma di SARS-CoV-2 nel citoplasma. Riagganciandoci alle strutture necessarie per l'ingresso del virus nella cellula è interessante sapere che l'RBD contiene il motivo di legame al recettore (RBM) che, insieme al

NTD, è il principale bersaglio degli anticorpi neutralizzanti ed entrambi sono soggetti a mutazioni che eludono il sistema immunitario. Infatti, l'evoluzione continua di SARS-CoV-2 è stata caratterizzata dall'emergere di varianti che contengono mutazioni principalmente nel NTD e nell'RBD, il che comporta cambiamenti nel legame con ACE2, nell'elusione del sistema immunitario, nella specificità della specie e potenzialmente nel tropismo degli organi alterati.

Espressione delle proteine non strutturali

L'RNA genomico (gRNA) con cappuccio e poliadenilato viene utilizzato per la traduzione dipendente dal cappuccio degli ORF1a e ORF1b. Questo passaggio comporta prima la generazione di due grandi poliproteine, pp1a e pp1ab, che vengono poi processate proteoliticamente per liberare un totale di 16 proteine non strutturali. Sebbene la traduzione di ORF1a solitamente termini al codone di stop di ORF1a, uno "slittamento" programmato del ribosoma (PRF) di -1 nella regione di sovrapposizione tra ORF1a e ORF1b. Questo consente la sintesi sia di pp1a, codificata solo da ORF1a, sia di pp1ab, grazie a un PRF riuscito e alla traduzione combinata di ORF1a e ORF1b. Le poliproteine risultanti, pp1a e pp1ab, vengono autoproteoliticamente processate in 16 proteine non strutturali da due proteasi virali a cisteina codificate dal virus. Questo comporta il rilascio delle Non-structural proteins (Una proteina codificata da un virus ma che non fa parte della particella virale) da nsp1 a nsp11 da pp1a, mentre pp1ab viene processata da nsp12 a nsp16. Dopo la scissione mediata da PLpro al confine tra nsp1 e nsp2, nsp1 viene rapidamente rilasciato nel citoplasma e interferisce con la traduzione dell'ospite e le risposte immunitarie innate. Le Nsp da 2 a 16 stabiliscono i complessi di replicazione e trascrizione virale. Le funzioni enzimatiche necessarie per la replicazione, la trascrizione, la correzione e la modifica dell'RNA virale sono contenute in nsp12, nsp13, nsp14 e nsp16. Le restanti proteine non strutturali forniscono le funzioni necessarie a supportare l'RTC (replication and transcription complexes), modulano le risposte dell'ospite e rimodellano il sistema endomembranoso dell'ospite per formare strutture a doppia membrana che fungono da organelli di replicazione per la sintesi dell'RNA virale (Steiner et al. 2024).

Dopo aver fatto una panoramica che descrive la biologia del virus ci addentreremo brevemente nella descrizione dell'interazione SARS-CoV-2-sistema immunitario.

Interazione SARS-CoV-2-sistema immunitario

Mentre la maggior parte delle infezioni è lieve, alcuni pazienti sperimentano infiammazione sistemica grave e potenzialmente fatale, danni ai tessuti, tempesta di citochine e sindrome da distress respiratorio acuto. Il sistema immunitario innato agisce come prima linea di difesa, riconoscendo il virus attraverso e attivando vie infiammatorie che favoriscono l'eliminazione del virus. Le risposte immunitarie innate limitano l'ingresso del virus, la traduzione, la replicazione e l'assemblaggio, aiutano a identificare e rimuovere le cellule infette e coordinano e accelerano lo sviluppo dell'immunità adattativa. I recettori, PRR (pattern recognition receptors) presenti sulla superficie cellulare, nell'endosoma e nel citosol rispondono ai modelli molecolari associati ai patogeni (PAMP, pathogen-associated molecular patterns) per scatenare risposte infiammatorie e morte cellulare programmata che limitano l'infezione virale e promuovono la sua eliminazione. Tuttavia, un'eccessiva attivazione immunitaria può portare a infiammazione sistemica e malattia grave. In risposta ai meccanismi di eliminazione virale dipendenti dal sistema immunitario innato, i coronavirus (CoV) hanno sviluppato strategie di evasione per limitare il controllo dell'ospite e migliorare la replicazione e la trasmissione.

Alcuni step, come l'ingresso e la replicazione virale presentano diverse opportunità per il sistema immunitario innato di rilevare i componenti virali. Ad esempio, le proteine S, E e M del virione sono esposte ai sensori della superficie cellulare dell'ospite durante lo step di legame e i "sensori" citoplasmatici dell'ospite potrebbero rilevare le proteine e gli acidi nucleici virali prima della loro compartimentalizzazione da parte delle NSP. Questi passaggi di rilevamento facilitano l'attivazione delle vie di segnalazione infiammatoria, la produzione di citochine e la morte cellulare. Le cellule immunitarie innate, compresi i macrofagi, i monociti, le cellule dendritiche, i neutrofili e le cellule linfoidi innate (ILC) come le cellule natural killer (NK), sono dotate di un arsenale di PRR che riconoscono i PAMP o i pattern molecolari associati al danno (DAMP, damage-associated molecular patterns) per indurre vie di segnalazione infiammatoria e risposte immunitarie. Le cinque principali famiglie di PRR includono i recettori Toll-like (TLR retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-like receptors (RLRs), nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors (NLRs), C-type lectin receptors and absent in melanoma 2 (AIM2)-like receptors.

La segnalazione attraverso questi recettori nelle cellule immunitarie innate porta alla produzione di citochine e chemiochine infiammatorie, così come all'induzione della morte cellulare per eliminare le cellule infette. Ad oggi, diversi PRR, in particolare TLR, RLR e NLR e i inflammasomi, sono stati dimostrati attivare le loro vie di segnalazione in risposta a SARS-CoV-2.

Toll-like Receptor

Molti virus attivano il sistema immunitario innato attraverso la segnalazione dei TLR (Fig. 3). I TLR sono espressi in tutto il tratto respiratorio umano ma mostrano espressioni eterogenee tra le popolazioni di cellule immunitarie innate; ad esempio, il TLR3 è più abbondante nelle cellule NK, mentre il TLR4 è più comune nei macrofagi. I TLR generalmente trasmettono segnali attraverso due molecole adattatrici chiave, MyD88 e TRIF. La maggior parte dei TLR utilizza MyD88 per scatenare la produzione di citochine infiammatorie; il TLR3 è un'eccezione e segnala esclusivamente attraverso TRIF. Il TLR4 è unico in quanto può legarsi e segnalare attraverso MyD88 o TRIF. A valle di MyD88, il fattore nucleare (NF)- κ B, le chinasi attivate da mitogeni (MAPK) e i fattori regolatori dell'interferone (IRF) vengono attivati. La traslocazione nucleare di queste molecole porta all'attivazione trascrizionale di diverse citochine pro-infiammatorie, tra cui il fattore di necrosi tumorale (TNF), IL-6 e IL-1, insieme alla trascrizione di geni che codificano altri sensori immunitari innati, come NLRP3, e alla produzione di IFN e geni stimolati dall'IFN. Anche il recettore TLR2 **sembra** rilevare la proteina E per avviare risposte infiammatorie. Inoltre anche il ruolo di TLR3 nell'infezione da SARS-CoV-2 rimane non del tutto chiarita.

È anche necessaria una conferma per determinare se TLR1, TLR4 o TLR6 possano rilevare direttamente la proteina S e, in generale, sono necessarie ulteriori indagini per corroborare i ruoli di questi e altri TLR nella risposta all'infezione da SARS-CoV-2.

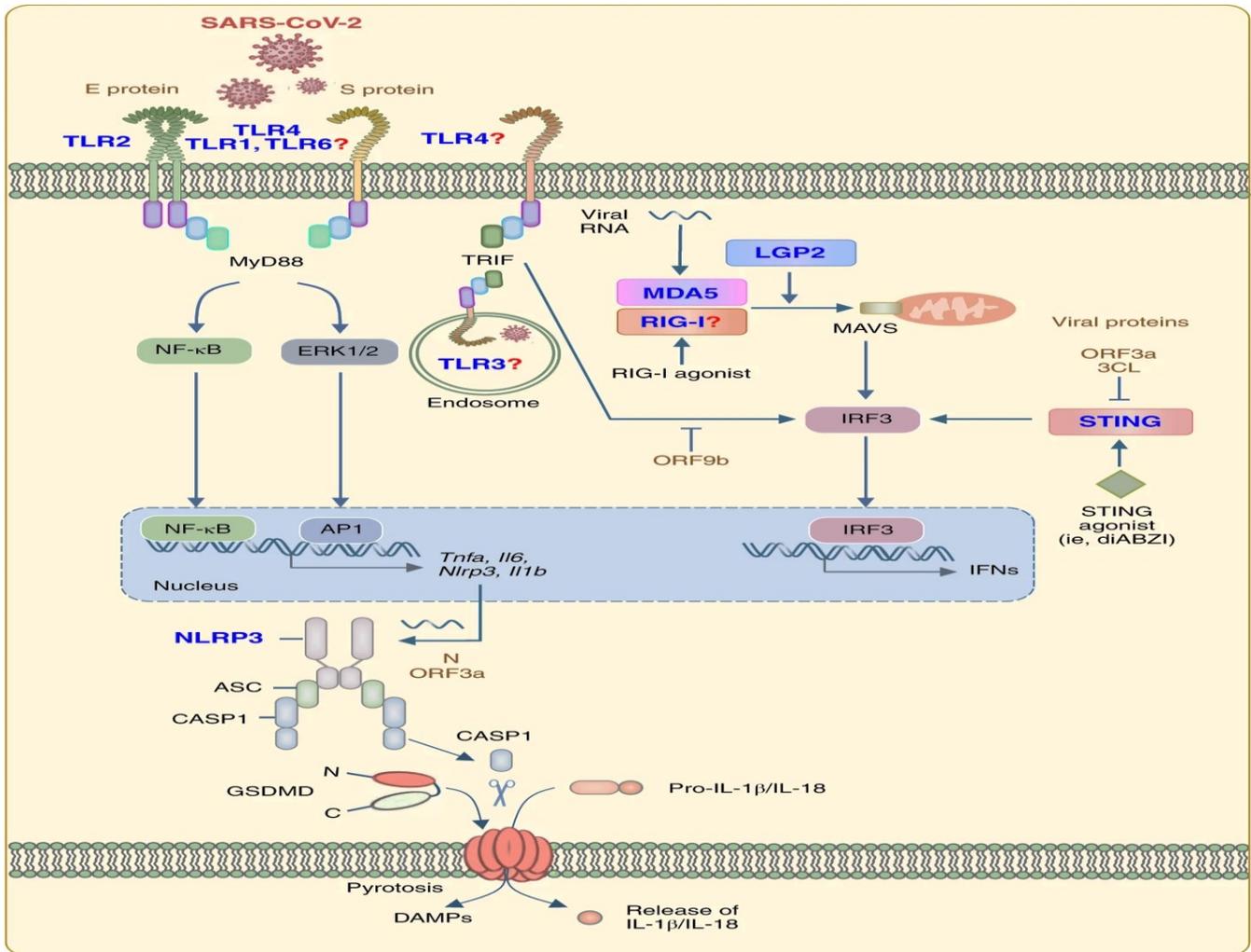


Figura 1: I recettori per il riconoscimento dei pattern (PRR) sulla superficie cellulare e sulle membrane endosomiali, così come nel citosol, possono rispondere ai PAMP di SARS-CoV-2 per attivare le vie di segnalazione dell'immunità innata. TLR1, TLR2, TLR4 e TLR6 possono segnalare attraverso MyD88 per attivare le vie di segnalazione NF-κB e MAPK, inducendo la trascrizione di geni che codificano per citochine pro-infiammatorie. TLR3 e TLR4 possono segnalare attraverso TRIF per attivare IRF3 e indurre l'espressione degli IFN di tipo I e III. Forti evidenze sperimentali supportano l'attivazione di TLR2 mediata da SARS-CoV-2, mentre l'attivazione di TLR1, TLR3, TLR4 e TLR6 è stata suggerita bioinformaticamente e attraverso studi associativi. La segnalazione attraverso RIG-I, MDA5 e STING attiva anche IRF3 e la produzione di IFN di tipo I e III. I dati riguardanti l'attivazione di RIG-I durante l'infezione da SARS-CoV-2 sono ancora contrastanti. La formazione dell'inflammasoma NLRP3 può anche avvenire in risposta all'infezione da SARS-CoV-2, portando alla scissione di GSDMD per formare pori di membrana e rilasciare IL-1β e IL-18, inducendo così la piroptosi. I punti interrogativi indicano sensori che ci si aspetta siano coinvolti nella rilevazione di SARS-CoV-2 ma che non sono stati ancora validati sperimentalmente fino ad oggi. CASP, caspasi. Diamond, M.S., Kanneganti, TD. Innate immunity: the first line of defense against SARS-CoV-2. *Nat Immunol* **23**, 165–176 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41590-021-01091-0>

L' RNA a singolo filamento derivato da intermedi genomici, può essere rilevato anche dagli RLR intracellulari, che includono MDA5, RIG-I e LGP2. RIG-I e MDA5 sono i RLR più studiati e forniscono una regolazione chiave delle vie di segnalazione dell'IFN, in particolare IFN di tipo I (IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ , IFN- ω e IFN- κ) e III (IFN- γ e IFN-1). La produzione e il successivo rilascio di IFN stimolano la segnalazione a valle attraverso i recettori di IFN in modo autocrino e paracrino per produrre centinaia di ISG (IFN-stimulated genes) con varie funzioni antivirali. Dal punto di vista immunologico, l'IFN-I ha tre funzioni principali: attivare lo stato antivirale dell'infezione e delle cellule adiacenti, limitando la diffusione dell'infezione; regolare le risposte immunitarie innate, come la presentazione dell'antigene e la funzione delle cellule NK, limitando la via infiammatoria; attivare il sistema immunitario adattativo per sviluppare risposte specifiche dei linfociti T e B agli antigeni ad alta affinità.

Un altro aspetto importante che deve essere preso in esame brevemente è la formazione del complesso dell'inflammasoma.

Inflammasoma

Si riporta che anche i NLR rispondono all'infezione da SARS-CoV-2 e inducono la produzione di IFN di tipo I e di citochine pro-infiammatorie. NLRP3, uno dei sensori dell'inflammasoma meglio caratterizzati, viene attivato in risposta ai PAMP e ai DAMP, portando all'attivazione della caspasi-1, alla produzione e al rilascio di IL-1 β e IL-18 bioattivi e alla scissione della gasdermina (GSDM) D, che forma pori nella membrana plasmatica per provocare la rottura della membrana e la morte cellulare pirototica. Aumenti nei livelli di IL-1 β e IL-18 nel plasma sono correlati alla gravità della malattia e alla mortalità nei pazienti con COVID-19.

Diversi PAMP di SARS-CoV-2 sono implicati nell'assemblaggio dell'inflammasoma NLRP3 e nel rilascio successivo di citochine. L'RNA a singolo filamento ricco di GU derivato dal genoma di SARS-CoV-2 attiva l'inflammasoma NLRP3 e il rilascio di citochine nei macrofagi. Inoltre l'ORF3a (di cui poi seguirà un approfondimento) di SARS-CoV-2, noto anche come viroporina, e la proteina N scatenano anche l'attivazione dell'inflammasoma NLRP3 in linee cellulari umane. Nonostante la sua capacità di indurre l'attivazione dell'inflammasoma NLRP3, la proteina N è stata anche associata all'inibizione di blocco

della piroptosi. A monte, la proteina E di SARS-CoV-2 scatena la segnalazione di TLR2, che upregola l'espressione di mRNA di Nlrp3 e Il1b nei macrofagi.

Il segnale PRR attivato da SARS-CoV-2 induce il rilascio simultaneo sia di IFN sia di altre citochine pro-infiammatorie. L'espressione di numerose citochine pro-infiammatorie e IFN è elevata nei pazienti con COVID-19, inclusi IL-1 β , IL-6, TNF, IL-12, IFN- β , IFN- γ , IL-17 e altre. Queste citochine aiutano a eliminare le infezioni ma mantengono anche l'omeostasi cellulare. Tuttavia, il rilascio deregolato di citochine pro-infiammatorie contribuisce alla tempesta di citochine, definita come una condizione potenzialmente letale causata dalla produzione eccessiva di citochine mediata dalla morte cellulare infiammatoria (PANoptosi). Ad esempio la via dell'IL-6, quando attivata dall'infezione da SARS-CoV-2, può indurre il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF), il fibrinogeno e il fattore VII, contribuendo allo stato di ipercoagulabilità. Tornando al contesto precedente l'esempio dell'IL-6, la combinazione di TNF e IFN- γ contribuisce alla patogenesi della malattia in modo cooperativo e inducendo la morte cellulare infiammatoria (PANoptosi). La PANoptosi è una via di morte cellulare programmata infiammatoria del sistema immunitario innato, dipendente dai PANoptosomi, complessi contenenti caspasi con o senza componenti dell'inflammasoma e proteine contenenti RHIM. La PANoptosi indotta dal sinergismo di TNF e IFN- γ dipende dal segnale del trasduttore e attivatore della trascrizione (STAT)1 e dalla segnalazione di IRF1 e porta all'attivazione della caspasi-8 per guidare la morte cellulare. Complessivamente, si può ritenere che esista un ciclo di feedback positivo, in cui la secrezione di citochine causa PANoptosi che porta a un ulteriore rilascio di citochine, culminando in una tempesta di citochine che causa danni potenzialmente letali ai tessuti e agli organi dell'ospite.

Patogeni, PAMP, DAMP e perturbazioni omeostatiche possono tutti innescare la PANoptosi, che potrebbe iniziare questo ciclo di feedback e promuovere l'infiammazione e la progressione della malattia. Il legame tra l'eccessiva segnalazione di citochine e la morte cellulare infiammatoria potrebbe spiegare il danno multiorgano osservato in alcuni pazienti con COVID-19. Ad esempio, il danno polmonare e la sindrome da distress respiratorio acuto si verificano in molti pazienti con COVID-19 grave. Prove crescenti suggeriscono che il danno strutturale alle membrane delle cellule endoteliali e la conseguente perdita vascolare contribuiscano all'inizio e alla propagazione della sindrome da distress respiratorio acuto durante l'infezione da SARS-CoV-2. Inoltre, il danno vascolare, incluso il danno ai vasi cardiaci, è una caratteristica chiave di un cluster senza precedenti di sindromi da shock iper-

infiammatorio. Inoltre, le vie anticoagulanti associate alle cellule endoteliali possono essere compromesse dalle citochine pro-infiammatorie, il che potrebbe spiegare alcune delle complicazioni tromboemboliche riportate durante il COVID-19 grave, fornendo un ulteriore meccanismo patogenetico per le citochine nel danno tissutale.

Un'altra caratteristica del COVID-19 è la deplezione dei centri germinali nella milza e nei linfonodi, che può essere dovuta alla morte delle cellule linfoidi promossa dal segnale di TNF e IFN- γ . Lo shock da TNF e IFN- γ può causare linfopenia e immunosoppressione (Diamond and Kanneganti 2022) (Steiner et al. 2024).

Per riassumere le cellule immunitarie innate sembrano essere responsabili dell'ambiente infiammatorio nei polmoni. Le tempeste di citochine sono una rete complessa di interazioni tra molecole immunologicamente importanti e eventi molecolari espressi nel fenotipo clinico di infiammazione sistemica, insufficienza multiorgano e aumento del potassio nel sangue. Questo quadro rilascia grandi quantità di citochine pro-infiammatorie, come nel COVID-19, tra cui IL-6, TNF, IL-1 β , IL-12, IL-17, IL-18, IP-10, IFN- γ , CCL2 e CCL5. Oltre a stimolare ulteriormente la tempesta di citochine, SARS-CoV-2 è in grado di infettare le cellule dendritiche (DC) e limitare la loro maturazione, sopprimendo così le risposte dei linfociti T. I macrofagi alveolari FABP4+ (fatty acid binding protein 4) predominano nei polmoni gravemente danneggiati. Il macrofago alveolare FABP4+ induce infiammazione virale perché produce alti livelli di IFN e chemiochine.

Per ciò che concerne le cellule dendritiche il loro ruolo non è ancora stato del tutto definito. Per quanto riguarda le cellule NK esse hanno di esercitare la loro citotossicità. Inoltre, le cellule NK mostrano un fenotipo attivato e ciclico nell'infezione acuta da SARS-CoV-2. Oltre a manipolare le citochine, il CoV controlla anche altri processi immunitari, inclusa la presentazione dell'antigene. Inoltre, in ultima analisi, anche il sistema del complemento sembra essere implicato.

I pazienti con polmonite da SARS-CoV-2 hanno una maggiore propensione agli eventi trombotici. Questa condizione può essere attribuita all'attivazione del sistema del complemento, in particolare attraverso le vie alternative e della lectina, che sono meccanismi effettori chiave dell'immunità innata. Questa attivazione può portare alla ARDS (sindrome da distress respiratorio acuto) e a uno stato potenziale di ipercoagulabilità. Una forte attivazione del complemento può, a sua volta, attivare il sistema di coagulazione, provocando eventi trombotici nei vasi endoteliali.

Per quanto riguarda l'eziologia polmonare, la sovrapproduzione di citochine dopo l'infezione da SARS-CoV-2 aumenta la permeabilità della membrana della parete capillare attorno agli alveoli infetti, causando edema polmonare, dispnea e ipossiemia. L'essudazione plasmatica e la perdita di elasticità alveolare dovute alla ridotta produzione di surfattante a causa dell'infezione da SARS-CoV-2 delle cellule polmonari di tipo 2 inducono ARDS nei pazienti con COVID-19. A seguito delle tempeste di citochine, questi disturbi immunitari indotti da SARS-CoV-2 possono portare ad aumentate infezioni microbiche, shock settico e grave insufficienza multiorgano (Silva et al. 2022).

Brevemente verrà anche valutata l'interazione del virus con due dei componenti principali dell'immunità adattativa, ovvero le cellule B e T.

Per quanto concerne la risposta mediata da cellule B e la formazione della memoria immunologica sono, in generale, richieste due fasi. L'esposizione iniziale a un patogeno virale, che provoca una risposta delle plasmacellule per indurre cellule B specifiche per l'antigene a bassa affinità. Successivamente, le cellule T helper follicolari CD4+ (Tfh) e le cellule B nei tessuti linfoidei secondari facilitano la maturazione dell'affinità degli anticorpi e il cambio di isotipo in un processo complesso che genera una protezione immunitaria a lungo termine. Le risposte delle IgG sieriche al SARS-CoV-2 si verificano circa contemporaneamente alle IgM e IgA sieriche, solitamente entro 7-10 giorni dall'infezione.

Inoltre SARS-CoV-2 innesca la stimolazione e il reclutamento delle cellule T CD4+ e CD8+, che possono controllare i patogeni intracellulari ed eliminare i virioni. Le cellule T mirano principalmente alla proteina S, alla proteina M, alla proteina N, alle proteine non strutturali (inclusi NSP3 e NSP4) e alla proteina ORF3a. Le cellule T CD4+ specifiche per il SARS-CoV-2 solitamente si differenziano in una serie di cellule helper ed effettrici, tra cui le cellule T helper di tipo 1 (Th1), Th17, le cellule T helper follicolari (Tfh), e le cellule T regolatorie (Treg), che possono essere rilevate 2-4 giorni dopo l'inizio della malattia. Le cellule T citotossiche CD8+ precoci solitamente compaiono entro 7 giorni e successivamente eliminano le cellule infette.

In generale poi si può osservare una differenza nell'espressione delle cellule T CD4+ e delle cellule T CD8+ tra pazienti gravi e lievi. I livelli di IFN- γ e TNF- α nelle cellule T CD4+ sono inferiori nel gruppo grave rispetto al gruppo lieve, mentre i livelli di granzima B e perforina nelle cellule T CD8+ sono più alti nel gruppo grave rispetto al gruppo lieve, il che implica che l'infezione da SARS-CoV-2 può compromettere le cellule T CD4+ e sovra-attivare le cellule T CD8+ in base al diverso stato del COVID-

19. La sovrastimolazione combinata delle cellule CD8+ T, Th1, Th17 e NK induce anche ulteriori citochine che bersagliano le cellule infette dal virus, causando danni ai tessuti (Shen et al. 2023).

PROTEINE STRUTTURALI, ACCESSORIE e NON STRUTTURALI

Brevemente verrà preso in esame l'eventuale funzione delle proteine di SARS-Cov-2 per poi focalizzarci nello specifico sulle proteine accessorie 3a e 9b. Per quanto riguarda le proteine strutturali:

- Spike:

Media l'ingresso nella cellula ospite, il legame al recettore e la fusione della membrana; Interferisce con i sensori dell'ospite inducendo la degradazione di IRF3 (interferon regulatory factor) e blocca la segnalazione dell'interferone prevenendo l'interazione tra STAT1 e JAK1.

- Envelope:

Responsabile dell'imballaggio del virione, E e M trattengono S nei siti di assemblaggio del virione; manipolazione delle vie secretorie dell'ospite e si sospetta svolga anche l'azione di Viroporina che forma canali ionici selettivi per il calcio.

- Membrane:

Imballaggio del virione; interagisce con N per guidare l'incorporazione del nucleocapside e interagisce con E per regolare il traffico intracellulare di S, promuovendo l'assemblaggio del virione. Interferisce con la segnalazione dell'IFN-I interagendo con MDA5 (melanoma differentiation-associated protein 5), TRAF3 (TNF receptor-associated factor 3), IKK ϵ , degradando TBK1 (TANK-binding kinase 1) e inibendo la fosforilazione di STAT1. Compromette l'attivazione di MAVS (mitochondrial antiviral signalling protein) e blocca la traslocazione nucleare di IRF3.

- Nucleocapsid:

Assemblaggio del virione, si lega all'RNA virale e forma il nucleocapside. Interrompe la formazione di granuli di stress sequestrando G3BP1 (Ras GTPase-activating protein-binding protein 1). Compromette l'attivazione di RIG-I (retinoic acid-inducible gene I) e inibisce l'attivazione di MAVS e IRF3. Antagonizza la traslocazione nucleare di STAT1 e STAT2

Per quanto riguarda le proteine non strutturali (Da Nsp1 a Nsp16):

- nsp1:

Si lega al ribosoma per bloccare il canale di ingresso dell'mRNA, causando l'interruzione della traduzione e la degradazione degli mRNA dell'ospite privi della sequenza leader 5' virale. Previene la produzione di interferoni e ISG (interferon-stimulated gene). Compromette l'esportazione dell'mRNA nucleare interagendo con il complesso NXF1–NXT1 (nuclear RNA export factor 1, nuclear transport factor 2-like export factor 1).

- nsp2:

Ostacola l'espressione di IFN β interagendo con i repressori della traduzione EIF4E2 e GIGYF2 (eukaryotic translation initiation factor 4E family member 2 e GRB10 interacting GYF protein 2)

- nsp3:

Processamento della poliproteina da parte di PLpro (papain-like cysteine protease). Formazione di organelli di replicazione, componente del complesso poro-DMV (double-membrane vesicle). Attività di mono-ADP-ribosilidrolasi. Interferisce con i sensori dell'ospite, scinde IRF3 e ISG15.

- nsp4:

Formazione di organelli di replicazione, componente del complesso poro DMV.

- nsp5:

processamento della poliproteina da parte di Mpro (main protease). Interferisce con i sensori dell'ospite, scinde IRF3 e RIG-I, promuove la degradazione di MAVS, previene l'attivazione di NF- κ B scindendo TAB1 e NLRP12. Scinde il fattore dell'ospite RNF20 (ring finger protein 20), migliorando la replicazione virale. Interrompe la formazione di granuli di stress sequestrando G3BP1 (Ras GTPase-activating protein-binding protein 1).

- nsp6:

Collega gli organelli di replicazione al reticolo endoplasmatico (ER), organizza i cluster di DMV, collega i DMV alle gocce lipidiche. Ostacola la segnalazione dell'interferone prevenendo la fosforilazione di STAT1 e STAT2. Interferisce con i sensori dell'ospite interagendo con TBK1.

- nsp7:

Cofattore per nsp12 RdRp (RNA-dependent RNA polymerase). Ostacola la segnalazione di IFN α .

- nsp8

Cofattore per nsp12 RdRp. Interrompe il traffico proteico.

- nsp9

Agisce come substrato NiRAN (nidovirus RdRP-associated nucleotidyltransferase) per l'RNAilazione durante il processo di capping dell'RNA, adattatore per nsp14 e nsp16 durante il capping. Target di NMPilazione (nucleotidyl-monophosphate transfer) per il dominio NiRAN, coinvolto nella priming della sintesi dell'RNA. Si lega al complesso della particella di riconoscimento del segnale e interrompe il traffico proteico.

- nsp10

Cofattore per nsp14 e nsp16.

- nsp11

Presumibilmente una proteina incline all'aggregazione con potenziali effetti citotossici sulle cellule dei mammiferi.

- nsp12

Sintesi dell'RNA virale tramite il dominio RdRp. Capping dell'RNA virale.

- nsp13

Elicasi dell'RNA virale. Attività di RNA 5'-fosfatasi coinvolta nel capping dell'RNA virale. Facilita il backtracking durante la sintesi dell'RNA. Compromette i sensori dell'ospite e la segnalazione dell'interferone, inibisce la fosforilazione di STAT1, STAT2, IRF3 e TBK1.

- nsp14

Attività di proofreading esonucleasica 3'–5'. Attività di N7-metiltransferasi coinvolta nel capping dell'RNA virale. Inibisce la traduzione dell'ospite insieme a nsp1. Ostacola la segnalazione dell'interferone indirizzando il recettore dell'interferone IFNAR1 per la degradazione lisosomiale e previene la localizzazione nucleare di IRF3.

- nsp15

L'Attività endoribonucleasica riduce i PAMPs scindendo 5'-poliuridine dal filamento negativo degli RNA virali. interferisce con la segnalazione dell'interferone bloccando la localizzazione di IRF3 nel nucleo.

- Nsp16:

Attività di 2O-metiltransferasi coinvolta nel capping dell'RNA virale; sopprime lo splicing legandosi ai domini di riconoscimento dell'mRNA delle componenti U1 e U2 dello spliceosoma.

Per le proteine accessorie invece (senza al momento approfondire 3a e 9b):

- Proteina ORF3c

Si localizza nella membrana mitocondriale interna e inibisce la segnalazione di IFN β .

- Proteina ORF6

Interferisce con il trasporto nucleare legandosi a Nup98 e contribuisce all'inibizione dell'esportazione dell'mRNA nucleare. Blocca la traslocazione di STAT1/2 nel nucleo, riducendo l'attività dei promotori ISRE e ISG56.

- Proteina ORF7a

Mira alla segnalazione dell'interferone bloccando la fosforilazione di STAT1 e STAT2. Dirotta il sistema dell'ubiquitina dell'ospite per contrastare le risposte degli interferoni di tipo I. Riduce l'espressione di MHC-I sulla superficie interferendo con l'esportazione di MHC-I dal reticolo endoplasmatico (ER).

- Proteina ORF7b

Interferisce con i sensori dell'ospite bloccando la segnalazione di RIG-I e MDA5. Mira alla segnalazione dell'interferone bloccando la fosforilazione di STAT1 e STAT2.

- Proteina ORF8

Causa interferenze epigenetiche nella capacità dell'ospite di controllare l'espressione dei propri geni.

Provoca la downregolazione di MHC-I.

(Steiner et al. 2024)

Alcune di queste informazioni derivano da studi di infezione da SARS-CoV-2 in vitro e in vivo. Altri derivano da studi di interazione proteica interazione proteica, sovraespressione, trasfezione e altri ancora “solamente” da studi strutturali e in silico. In particolar modo per le proteine strutturali il loro ruolo e funzione non deriva da studi di valutazione in vivo o in vitro, per cui non i ruoli che ad oggi vengono attribuite a tali proteine derivano da studi con una solidità limitata e per cui la funzione di tali proteine rimane, a mio avviso, da confermare.

Proteina ORF 3a:

La risposta infiammatoria aumentata è una caratteristica prominente della malattia grave da COVID-19. la viroporina ORF3a di SARS-CoV-2 attiva l'inflammasoma NLRP3. L'espressione ectopica di ORF3a innesca l'espressione di IL-1 β tramite NF κ B. È significativo che ORF3a attivi l'inflammasoma NLRP3 sia attraverso modalità dipendenti da ASC (Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) che indipendenti da ASC. Questa attivazione dell'inflammasoma richiede l'efflusso di ioni di potassio e l'oligomerizzazione tra la chinasi NEK7 e NLRP3. Queste viroporine sono proteine codificate dai virus considerate fattori di virulenza. Sebbene tipicamente non essenziali per la replicazione del virus in sé, alcune di queste proteine idrofobiche possono formare pori che facilitano il trasporto degli ioni attraverso le membrane cellulari, e facendo ciò, garantiscono il rilascio del virus con la potenziale attivazione coincidente dell'inflammasoma (componente del sistema immunitario innato).(H. Xu et al. 2022).

SARS-CoV-2 inoltre utilizza il sistema endolisosomiale dell'ospite per l'ingresso, la replicazione e l'uscita dalla cellula. Il fattore di virulenza ORF3a di SARS-CoV-2 interagisce con il complesso HOPS, un fattore di ancoraggio lisosomiale, bloccando la fusione tra endosomi e autofagosomi con i lisosomi mediata da HOPS. L'infezione da SARS-CoV-2 porta anche ad una iperattivazione della piccola proteina GTP-legante Rab7 degli endosomi e dei lisosomi, che dipende dall'espressione di ORF3a. l'iperattivazione di Rab7 mediata da ORF3a svolge una molteplicità di funzioni, tra cui il blocco della formazione dell'endolisosoma, l'interruzione del trasporto delle idrolasi lisosomiali e la promozione dell'uscita virale. L'ORF3a di SARS-CoV-2 promuove diversi passaggi coinvolti nell'esocitosi lisosomiale e tale esocitosi lisosomiale è potenziata dall'infezione. La fusione dei lisosomi con la membrana plasmatica, che permette l'uscita del virus dalla cellula, richiede un elevato livello di Ca²⁺ citosolico, che può

derivare dall'afflusso di Ca^{2+} extracellulare o dal rilascio localizzato di Ca^{2+} dai lisosomi e l'espressione di ORF3a aumenta la concentrazione di Ca^{2+} citosolico e il rilascio localizzato di Ca^{2+} dai lisosomi.

ORF3a è una proteina di 275 aminoacidi che possiede tre eliche transmembrana e un dominio citosolico con più β -foglietti in ciascuna catena. ORF3a può formare dimeri, tetrameri e oligomeri di alto ordine tramite ponti disolfuro intramolecolari. A causa del suo coinvolgimento potenziale in varie fasi del ciclo vitale del virus, ORF3a di SARS-CoV-2 sembra essere un fattore di virulenza essenziale che guida la patogenesi virale complessiva (Chen et al. 2021).

Inoltre, per la proteina accessoria 3a è stato anche preso in esame la correlazione fra la sua espressione e l'apoptosi. L'apoptosi è un tipo predominante di morte cellulare programmata ed è stata riconosciuta come un importante meccanismo di difesa antivirale dell'ospite che controlla l'infezione virale e regola la risposta infiammatoria. È stato visto che la proteina accessoria ORF3a codificata da SARS-CoV (ORF3a di SARS-CoV-2 condivide il 73% di omologia degli amminoacidi con la sua controparte in SARS-CoV) può indurre l'apoptosi nelle cellule, sollevando la questione se anche ORF3a di SARS-CoV-2 abbia attività pro-apoptotica.

Valutando se ORF3a di SARS-CoV-2 possa indurre l'apoptosi mediante una tecnica che sfrutta una doppia colorazione annessina V-fluoresceina isotiocianato (FITC)/ioduro di propidio (PI) in cellule coltivate HEK293T, HepG2 e Vero E6 è stato riscontrato che la colorazione con annessina V e PI era significativamente aumentata nelle cellule che esprimono ORF3a di SARS-CoV-2 rispetto a quelle delle cellule di controllo confermando l'attività pro-apoptotica di ORF3a in diverse linee cellulari, dove la percentuale di cellule con caspasi-3 attivata era significativamente elevata in presenza di ORF3a.

L'annexina V-FITC consente il rilevamento per fluorescenza dell'annexina V legata alle cellule apoptotiche e la determinazione quantitativa tramite citometria a flusso. Tale strategia che si basa sull'annexina V-FITC usa l'annexina V coniugata con isotiocianato di fluoresceina (FITC) per marcare i siti della fosfatidilserina sulla superficie della membrana. Lo ioduro di propidio (PI) è utilizzato per marcare il DNA cellulare nelle cellule necrotiche, in cui la membrana cellulare è stata totalmente compromessa. Questa combinazione consente di differenziare le cellule in fase apoptotica iniziale (positive all'annexina V, negative al PI), le cellule necrotiche (positive all'annexina V, positive al PI) e le cellule vitali (negative all'annexina V, negative al PI).

Il meccanismo attraverso il quale ORF3a di SARS-CoV-2 induce l'apoptosi è stata indagata con l'uso di staurosporina, un induttore di apoptosi, che fungeva come controllo positivo. ORF3a di SARS-CoV-2 ha indotto il clivaggio/attivazione della caspasi-8, mentre i livelli di espressione di Bcl-2 non sono stati influenzati. Il clivaggio/attivazione della caspasi-8 è riconosciuto come un marcatore della via apoptotica estrinseca, mentre Bcl-2 svolge un ruolo importante nell'inizio della via intrinseca.

Inoltre, i livelli di caspasi-9 clivata e citocromo-c erano elevati in presenza di ORF3a di SARS-CoV-2. Pertanto, si ha un suggerimento del fatto che ORF3a di SARS-CoV-2 possa indurre l'apoptosi tramite la via estrinseca, in cui la caspasi-8 attivata cliva Bid a tBid e a sua volta induce il rilascio di citocromo c mitocondriale, portando alla formazione dell'apoptosoma e al clivaggio/attivazione della caspasi-9. Comunque è stato evidenziato che l'ORF3a di SARS-CoV-2 ha un'attività pro-apoptotica più debole rispetto a ORF3a di SARS-CoV. Le differenze nel meccanismo pro-apoptotico e nella forza relativa probabilmente contribuiscono alle differenze nella patogenicità tra questi due coronavirus. Infatti, SARS-CoV-2 è generalmente ritenuto meno virulento di SARS-CoV, e la diminuita attività pro-apoptotica di ORF3a di SARS-CoV-2 è probabilmente associata a una ridotta difesa antivirale mediata dall'apoptosi nelle cellule infette. Queste caratteristiche potrebbero conferire probabilmente a SARS-CoV-2 alcuni vantaggi, poiché l'infezione può essere relativamente lieve o addirittura asintomatica nelle prime fasi, consentendo così al virus di diffondersi più ampiamente (Ren et al. 2020).

per la fosforilazione e traslocazione nucleare di STAT1 compromettendo così il successo di legame del complesso STAT1/STAT2/IRF9, complesso responsabile del legame al promotore ISRE (IFN-I stimulated response elements) al fine di attivare i geni deputati alla produzione di IFN (ISG, IFN-stimulated gene) (Xia et al. 2020).

Proteina ORF 9b

SARS-CoV-2 ORF9b inibisce la produzione di interferoni di tipo I e III, che sono fondamentali nella risposta immunitaria antivirale. ORF9b agisce su vari componenti dei pathway di segnalazione antivirale che coinvolgono il rilevamento dell'RNA citosolico. In particolare, inibisce l'attivazione delle proteine RIG-I, MDA-5, MAVS, TBK1 e IKKε, tutte coinvolte nella segnalazione antivirale. ORF9b impedisce la fosforilazione e la traslocazione nucleare di IRF3, un fattore di trascrizione che, una volta attivato,

induce l'espressione di geni antivirali, inclusi gli interferoni. L'analisi meccanicistica ha rivelato che ORF9b interagisce direttamente con RIG-I, MDA-5, MAVS, TRIF, STING e TBK1, inibendo così l'attivazione delle vie di segnalazione che portano alla produzione di IFN. La proteina ORF9b di SARS-CoV-2, quindi, gioca un ruolo chiave nel modulare la risposta immunitaria innata, sopprimendo la produzione di interferoni di tipo I e III e favorendo così la replicazione del virus (Han et al. 2021).

Tutti questi attori hanno un ruolo all'interno della cascata del segnale che ha come goal finale la produzione di interferon:

- RIG-I (retinoic acid-inducible gene I) è un recettore di riconoscimento dei pattern (PRR) citosolico che può mediare l'induzione di una risposta di interferone di tipo I (IFN-I). RIG-I è una molecola essenziale nel sistema immunitario innato per il riconoscimento delle cellule infettate da un virus. RIG-I è una elicasi RNA dipendente dall'ATP che viene attivata da RNA immunostimolatori provenienti da virus così come da RNA di altre origini. RIG-I riconosce brevi RNA a doppio filamento (dsRNA) nel citosol con un'estremità 5' tri- o di-fosfato o un cappuccio 5' 7-metilguanosina (m7G). Questi RNA sono spesso generati durante un'infezione virale, ma possono anche essere derivati dall'ospite. Una volta attivato dal dsRNA, il dominio di attivazione e reclutamento della caspasi (CARDs) dell'N-terminale migra e si lega ai CARDs associati alla proteina di segnalazione antivirale mitocondriale (MAVS) per attivare la via di segnalazione per IFN-I (Kell and Gale 2015).
- MDA5 (melanoma differentiation-associated protein 5) è un'enzima elicasi dsRNA simile a RIG-I. MDA5 funziona come PRR in grado di rilevare i virus. Generalmente MDA5 riconosce l'RNA a doppio filamento (dsRNA) e viene anche ulteriormente attivato da RNA a singolo filamento (ssRNA). Le vie di segnalazione in MDA5 legate, anche in questo caso, alla presenza del dominio CARD. MDA5 attivato interagisce con le proteine di segnalazione antivirale mitocondriali (MAVS) attraverso i suoi domini di attivazione e reclutamento della caspasi (CARD) presenti all'estremità N-terminale. I MAVS poi lavorano come un complesso multiproteico per reclutare sia l'inibitore della subunità epsilon del fattore nucleare kappa-B chinasi (IKK ϵ) che la chinasi 1 serina/treonina (TBK1). Questo causa la fosforilazione e il trasporto dei fattori regolatori dell'interferone (IRF3 e IRF7) nel nucleo della cellula. Una volta nel nucleo, i fattori regolatori inducono la trascrizione dei geni dell'interferone di tipo I, IFN- β e IFN- α (Takeuchi and Akira 2008)

■ La proteina di segnalazione antivirale mitocondriale (MAVS) è essenziale per l'immunità innata. MAVS si trova nella membrana esterna dei mitocondri, nei perossisomi e nella membrana del reticolo endoplasmatico associato ai mitocondri (MAM). In seguito a un'infezione virale, un gruppo di proteine citosoliche rileva la presenza del virus e si lega a MAVS, attivandolo. L'attivazione di MAVS porta a un aumento dei livelli di citochine pro-infiammatorie attraverso l'attivazione dei fattori di trascrizione, il fattore nucleare κB (NF- κB), il fattore regolatorio dell'interferone 1 (IRF1) e il fattore regolatorio 3 dell'interferone (IRF3). NF- κB , IRF1 e IRF3 sono fattori di trascrizione e svolgono ruoli cruciali nella produzione di citochine. In condizioni di riposo della cellula, una proteina chiamata mitofusina 2 (MFN2) è nota per interagire con MAVS, impedendo a MAVS di legarsi alle proteine citosoliche, come RIG-I e MDA5. Al riconoscimento del virus nel citosol, le membrane del reticolo endoplasmatico associate ai mitocondri (MAM) e i mitocondri vengono fisicamente connessi da MFN2 e RIG-I si lega a una seconda proteina RIG-I per formare un complesso proteico. Questo complesso si lega a TRIM25 e ad un chaperone molecolare per formare un complesso chiamato "translocon". Il translocon si sposta verso i mitocondri dove si lega alla regione CARD di MAVS, portando all'attivazione di MAVS. Successivamente, le proteine MAVS si legano tra loro. Il complesso di segnalazione MAVS interagisce con la chinasi TANK-binding 1 e/o con IKKB (IKBKB), portando alla fosforilazione e alla traslocazione nucleare di IRF3. Sebbene la trasduzione e la regolazione del segnale MAVS non siano completamente comprese, le proteine MAVS attivate nei mitocondri, nel reticolo endoplasmatico e nei perossisomi sono necessarie per massimizzare la risposta immunitaria innata antivirale. La proteina MAVS, inoltre, induce l'apoptosi nelle cellule infette da virus, interagendo con una proteasi chiamata caspasi 8 (Jacobs and Coyne 2013)

■ La molecola adattatrice contenente dominio TIR 1 (TICAM1; precedentemente conosciuta come adattatrice contenente dominio TIR-inducente interferone- β o TRIF) è un adapter (Le proteine adattatrici contengono una varietà di moduli di legame proteico che collegano tra loro partner proteici e facilitano la creazione di complessi di segnalazione più ampi) che risponde all'attivazione dei recettori toll-like (TLR). Essa media la cascata di segnalazione di due vie di segnalazione associate ai TLR. Tutti i TLR possiedono un dominio TIR che avvia la cascata di segnalazione che conduce l'attivazione di NF- κB , un fattore di trascrizione (anche attivato dal dominio carbossiterminale di TICAM1) che guida l'upregulation di citochine e molecole co-stimolatorie (Kawai and Akira 2005)

- Stimolatore dei geni dell'interferone (STING) svolge un ruolo importante nell'immunità innata. STING induce la produzione di interferone di tipo I quando le cellule sono infettate da patogeni intracellulari. STING funziona sia come sensore diretto del DNA citosolico (CDS) che come proteina adattatrice nella segnalazione dell'interferone di tipo I attraverso diversi meccanismi molecolari. All'attivazione, STING stimola l'attività di TBK1 per fosforilare IRF3 o STAT6. Gli IRF3 e STAT6 fosforilati si dimerizzano e così entrano nel nucleo per stimolare l'espressione di geni coinvolti nella risposta immunitaria dell'ospite, come IFN β , CCL2 e CCL20 (Ahn and Barber 2019)
- TBK1 (TANK-binding kinase 1) è un enzima con attività chinasi, nello specifico, è una proteica chinasi serina/treonina. Questa chinasi è principalmente nota per il suo ruolo nella risposta antivirale dell'immunità innata. TBK1 è coinvolto in molti percorsi di segnalazione e costituisce un nodo tra di essi. Per questo motivo, è necessaria una regolazione del suo coinvolgimento nei singoli percorsi di segnalazione. Questo è garantito da proteine adattatrici che interagiscono con il dominio di dimerizzazione di TBK1. A seconda della localizzazione cellulare dei complessi proteici (che vede il TANK come uno degli attori coinvolti) l'esito della risposta cellulare può differire. Il legame con TANK che porta alla localizzazione nella regione perinucleare conduce alla successiva produzione di interferoni di tipo I. Al contrario, il legame con NAP1 e SINTBAD porta alla localizzazione nel citoplasma e al coinvolgimento nell'autofagia. Dopo aver attivato la segnalazione antivirale attraverso i PRR, TBK1 viene attivato. Successivamente, fosforila il fattore di trascrizione IRF3, che viene traslocato nel nucleo e promuove la produzione di IFN-I (Louis, Burns, and Wicks 2018)

Organizzazione citoscheletro e coinvolgimento nella risposta immunitaria

Al fine di meglio comprendere la successiva parte sperimentale è necessario capire le basi teoriche della strutturazione della rete complessa del citoscheletro e valutare con quali attori, soprattutto quelli derivanti dall'attivazione di meccanismi che afferiscono alla parte immunologica, essi interagiscono. Successivamente sarà anche interessante esaminare lo stato dell'arte per quanto riguarda l'interazione diretta o indiretta fra le proteine, in particolar modo quelle accessorie, di SARS-Cov-2 e le proteine citoscheletriche.

Il citoscheletro è una rete complessa e dinamica di filamenti proteici interconnessi presente nel citoplasma di tutte le cellule, comprese quelle di batteri e archea. Negli eucarioti, gli unici che verranno

qui trattati, si estende dal nucleo della cellula fino alla membrana cellulare ed è composto da proteine simili nei vari organismi. È costituito da tre componenti principali: microfilamenti, filamenti intermedi (non presi in esame) e microtubuli, tutti capaci di una rapida crescita o disassemblaggio a seconda delle esigenze della cellula.

Nonostante il termine "scheletro" possa suggerire una struttura fissa, il citoscheletro non è una struttura statica il cui funzionamento può essere compreso isolatamente. Piuttosto, è una struttura dinamica e adattiva, i cui polimeri costituenti e le proteine regolatrici sono in costante flusso.

Come sopra accennato le principali componenti del citoscheletro sono i filamenti di actina, microtubuli e un gruppo di polimeri noti collettivamente come filamenti intermedi. Tutti e tre sono organizzati in reti che resistono alla deformazione ma possono riorganizzarsi in risposta a forze esterne applicate. L'architettura delle reti formate dai polimeri citoscheletrici è controllata da diverse classi di proteine regolatrici: 1) fattori che promuovono la nucleazione, che iniziano la formazione dei filamenti; 2) proteine di capping, che terminano la crescita dei filamenti; 3) polimerasi, che promuovono una crescita dei filamenti più rapida o più sostenuta; 4) fattori di depolimerizzazione e di taglio, che disassemblano i filamenti; e 5) crosslinkers e proteine stabilizzanti, che organizzano e rinforzano le strutture della rete di ordine superiore. Le forze meccaniche provenienti dall'interno o dall'esterno della cellula possono influenzare l'attività di questi fattori regolatori e, a loro volta, l'organizzazione locale dei filamenti nelle reti. Le differenze più importanti tra i tre principali polimeri citoscheletrici sono la loro rigidità meccanica, la dinamica della loro assemblaggio, la loro polarità e il tipo di motori molecolari con cui si associano

Sia i filamenti di actina che i microtubuli sono polimeri polarizzati, il che significa che le loro subunità sono strutturalmente asimmetriche a livello molecolare. Come risultato di questa polarità strutturale entrambi i tipi di polimero funzionano come binari per "motori" molecolari che si muovono preferenzialmente in una direzione. Per i microtubuli, i motori sono membri delle famiglie delle dineine o delle chinesine, mentre per i filamenti di actina, sono membri della grande famiglia delle proteine miosine. Questi motori molecolari hanno ruoli essenziali nell'organizzazione dei citoscheletri di microtubuli e actina. I motori associati ai microtubuli sono cruciali per l'assemblaggio dell'array di microtubuli durante l'interfase e per il fuso mitotico. Questi motori trasportano anche carichi tra compartimenti intracellulari lungo i traccianti dei microtubuli. Alcune reti di actina, come quelle

ramificate che si trovano al margine anteriore delle cellule motili, sembrano assemblarsi senza l'aiuto delle proteine motrici, mentre altre, inclusa la rete contrattile nella parte posteriore di una cellula motile, richiedono l'attività motoria delle miosine per la loro formazione e funzione. I motori miosinici agiscono anche sui fasci di filamenti di actina allineati nelle fibre di stress, permettendo alle cellule di contrarsi e di percepire l'ambiente esterno. (Fletcher and Mullins 2010).

Ora entreremo maggiormente nel dettaglio sulle caratteristiche e funzionamento di actina e microtubuli.

Tubulina

I microtubuli sono polimeri proteici essenziali e multifunzionali che servono come elementi strutturali nella maggior parte delle cellule eucariotiche. Sono dinamici, e la loro dinamica è controllata per aiutare a organizzare il citoscheletro e generare forze su altri componenti cellulari. Strutturalmente, sono tubuli cavi di 25 nm, una caratteristica che li rende più rigidi rispetto ad altri filamenti del citoscheletro e consente loro di estendersi per l'intera lunghezza delle cellule eucariotiche, formando array lunghi fino a decine di micrometri. I microtubuli sono composti dalla proteina tubulina, disposta in filamenti lineari chiamati protofilamenti. La maggior parte dei microtubuli contiene 13 protofilamenti, ciascuno dei quali è assemblato da un'organizzazione testa-coda di eterodimeri α/β -tubulina. Questa organizzazione rende i microtubuli polari, il che significa, come sopra già accennato, che hanno una direzionalità lungo tutta la loro lunghezza e le loro due estremità sono diverse. La polarità è essenziale per molte funzioni dei microtubuli, poiché consente i movimenti direzionali delle proteine motorie sulla superficie dei microtubuli. La polarità è anche la radice delle differenze nella cinetica di aggiunta e perdita delle subunità alle due estremità dei microtubuli. L'estremità che cresce più velocemente è chiamata 'estremità positiva' e l'estremità che cresce più lentamente è chiamata 'estremità negativa'.

La maggior parte dei microtubuli cellulari non è statica; mostrando invece cicli di crescita, accorciamento e ricrescita. Questo processo energetico, denominato instabilità dinamica, è essenziale per la fisiologia cellulare normale. Di conseguenza, è strettamente regolato durante il ciclo cellulare da numerose proteine e modifiche post-traduzionali. L'instabilità dinamica consente alle punte dei microtubuli di esplorare il volume di una cellula, cercando continuamente e legandosi a strutture intracellulari.

L'instabilità dinamica dei microtubuli è anche (oltre alle fasi di mitosi e interfase) necessaria per l'interazione tra tubulina e actina. Le proteine leganti l'estremità (proteine EB) si associano alle punte dei microtubuli in crescita e creano una piattaforma che recluta proteine adattatrici e regolatrici, molte delle quali possono interagire direttamente con l'actina. I microtubuli dinamici possono anche generare forze di spinta e trazione. Le forze di spinta sviluppate durante la dinamica dei microtubuli sono state anche implicate nelle deformazioni della membrana plasmatica e nel mantenimento della forma cellulare sotto forze compressive. Inoltre, i microtubuli dinamici che interagiscono con le membrane possono generare forze di trazione attraverso il legame delle proteine associate all'estremità dei microtubuli, con componenti della membrana stessa, suggerendo un ruolo per la dinamica dei microtubuli nella modellazione dei compartimenti membranosi.

La dinamicità dei microtubuli prevede come requisito di GTP per la polimerizzazione dei microtubuli e l'idrolisi post-polimerizzazione del GTP legato alla tubulina, associata all'instabilità dinamica. Tuttavia, vi è un suggerimento che la struttura della punta del microtubulo è altrettanto critica per il processo di instabilità dinamica.

L'esistenza dell'instabilità dinamica pone la questione di come i microtubuli possano ottenere cambiamenti rapidi nel comportamento di polimerizzazione. Sembra esservi un modello, definito "del cappuccio di GTP", che offre la seguente spiegazione biochimica. I microtubuli sono assemblati da tubulina-GTP solubile. La polimerizzazione attiva l'attività GTPasi della tubulina, così i nucleotidi legati alla tubulina nel reticolo del microtubulo vengono idrolizzati a GDP poco dopo la loro incorporazione. Di conseguenza, la maggior parte di un microtubulo in crescita è costituita da dimero di tubulina legato a GDP (tubulina GDP) con solo una relativamente piccola regione alla punta contenente tubuline GTP appena incorporate; queste tubuline-GTP stabiliscono un cappuccio che è stato proposto per stabilizzare l'intero polimero (modello del cappuccio di GTP). Tuttavia, il reticolo di tubulina GDP è intrinsecamente instabile a concentrazioni fisiologiche di tubulina. Se, per caso, un numero critico di GTP viene perso dalla punta del microtubulo, a causa della dissociazione stocastica della tubulina dal cappuccio o per idrolisi di GTP all'interno del cappuccio, ciò innesca una transizione dalla crescita alla riduzione, che è chiamata "catastrofe". La riduzione del microtubulo procede fino a quando l'intero microtubulo si disassembla o un nuovo cappuccio di GTP viene ricostituito stocasticamente, causando un "salvataggio".

Vi sono prove a favore del modello del cappuccio di GTP. Primo, il GTP o i suoi analoghi, come il GMPCPP, sono necessari per la polimerizzazione dei microtubuli. Secondo, rimuovere la punta del microtubulo con raggi UV o mediante microneedle destabilizza l'intero microtubulo. Terzo, uno strato singolo di GMPCPP è sufficiente per salvare la crescita dei microtubuli dalla depolimerizzazione. Quarto, quando la concentrazione di tubulina è rapidamente diluita verso lo zero, i microtubuli non passano a una veloce depolimerizzazione fino a quando una piccola regione, alla punta del microtubulo, è lentamente depolimerizzata nel corso di alcuni secondi. Questo aspetto della dinamica di depolimerizzazione è facilmente interpretato come una fase iniziale in cui la tubulina-GTP si dissocia, seguita da una riduzione più rapida non appena la punta del microtubulo raggiunge la regione di tubulina GDP. Infine, mutazioni nella tubulina al sito di idrolisi di GTP inducono microtubuli eccessivamente stabili e regioni estese di legame della proteina EB vicino alle punte dei microtubuli in vitro. Complessivamente, questi risultati suggeriscono la presenza di un cappuccio di GTP.

Aspetti ben consolidati di questa comprensione sono che sia l'idrolisi del GTP sia le strutture multi-protofilamento delle punte dei microtubuli sono determinanti importanti del comportamento della polimerizzazione. Queste caratteristiche sono alla base della regolazione dei microtubuli da parte di varie proteine associate e delle forze meccaniche sperimentate dai microtubuli durante la loro attività. Rimarrebbero molte altre considerazioni da effettuare per quanto concerne gli aspetti teorici nel campo dei microtubuli, come ad esempio, comprensione della cinetica delle interazioni dei singoli dimeri di tubulina alle punte in crescita dei microtubuli, collegare la meccanica e la biochimica della tubulina, le grandezze delle costanti di velocità di associazione e dissociazione della tubulina all'estremità in crescita (plus end), le grandezze relative delle energie libere dei legami laterali e longitudinali che stabilizzano la tubulina nel reticolo, la forma precisa della punta in crescita del microtubulo e infine l'influenza delle diverse modifiche post traduzionali che queste proteine possono ospitare (Gudimchuk and McIntosh 2021).

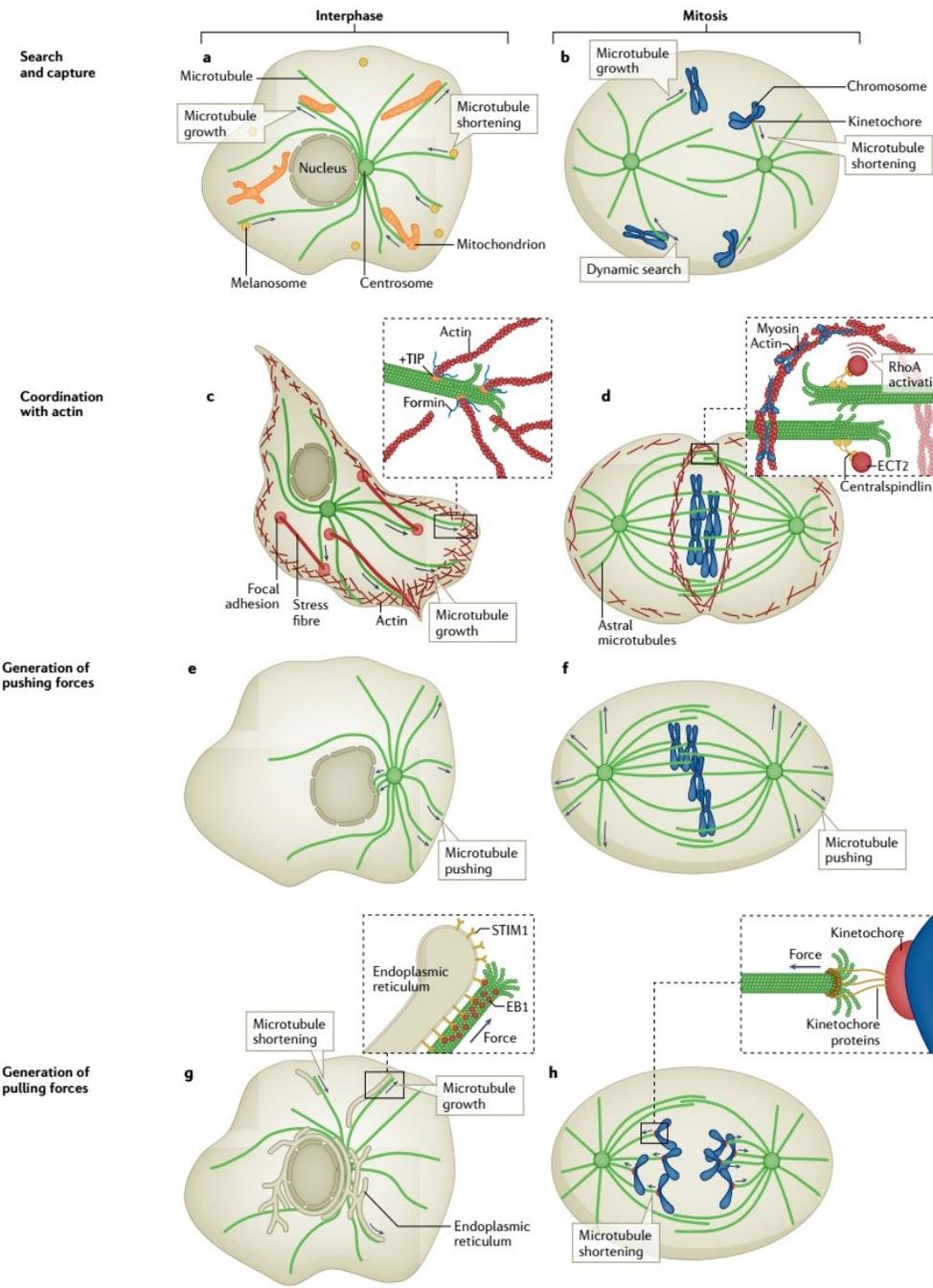


Figura 2: a | I microtubuli dinamici cercano e catturano gli organelli legati alla membrana.

b | I microtubuli dinamici cercano e catturano i cromosomi durante la mitosi.

c | I microtubuli in crescita bersagliano le adesioni focali. Le estremità allungate creano un hub che recluta leganti dell'actina e regolatori dell'actina tramite proteine interagenti con le punte positive (+TIPs). Insetto: estremità dei microtubuli che hanno reclutato formins per catalizzare la crescita dei microfilamenti.

d | Le estremità dei microtubuli definiscono la posizione dell'anello contrattile di actomiosina attraverso l'attività del complesso centralspindlin, che include kinesina 6 e la proteina attivatrice della GTPasi della famiglia Rho. Centralspindlin recluta il regolatore RhoA ECT2. Il RhoA quindi guida la formazione di un anello di actomiosina in prossimità delle punte dei microtubuli dal fuso centrale. Insetto: vista ingrandita delle punte dei microtubuli del fuso antiparallelo sovrapposte. Queste reclutano il complesso centralspindlin, che promuove la formazione dell'anello di actomiosina.

e | I microtubuli in crescita sviluppano forze di spinta che aiutano a posizionare il nucleo.

f | Le forze di spinta o trazione dei microtubuli guidano il centraggio del fuso mitotico.

g | Le estremità dei microtubuli in accorciamento generano forze di trazione per rimodellare le membrane, come il reticolo endoplasmatico. Insetto: vista ingrandita di un microtubulo che tira sul reticolo endoplasmatico.

h | Le punte dinamiche dei microtubuli si associano ai cinetocori e generano forze per

guidare i movimenti dei cromosomi necessari per la divisione cellulare. Insetto: vista ingrandita di un'estremità di microtubulo che tira su un cromosoma.

Actina

Il polipeptide di actina eucariotica, composto da 375 residui, si ripiega in una proteina piatta con una profonda fessura mediale che lega l'ATP. L'actina è come composta da quattro sottodomini. Il polipeptide si avvolge dal amminotermianle del sottodominio 1 ai sottodomini 2, 3 e 4, per poi tornare al sottodominio 1 al carbossiterminale. L'ATP si lega in una profonda fessura, interagendo più fortemente con i sottodomini 3 e 4, ma anche con i residui nei sottodomini 1 e 2. Diverse proteine si legano in un prominente solco tra i sottodomini 1 e 3 e, pertanto, è definito "solco di legame bersaglio".

Le due metà della proteina che fiancheggiano la fessura di legame del nucleotide hanno ripiegamenti simili ma nessuna somiglianza nella sequenza.

I primi studi strutturali hanno rivelato che i filamenti di actina consistono in due filamenti di subunità in eliche destrorse sfalsate di metà della lunghezza di un monomero di actina (2,7 nm). Esistono delle estremità di tipologie differenti definite "barbute" e "appuntite". Il solco di legame bersaglio si trova all'estremità barbata, e la fessura di legame del nucleotide si trova all'estremità appuntita della subunità di actina.

I monomeri di actina (chiamati anche "actina globulare" o "G-actina") polimerizzano spontaneamente in actina filamentosa (F-actina) in condizioni fisiologiche di salinità. A causa delle costanti di velocità per l'associazione e la dissociazione dei monomeri di actina alle due estremità di un filamento di actina, i filamenti di actina crescono più rapidamente dall'estremità cosiddetta "barbata" rispetto all'estremità "appuntita" e l'allungamento del filamento è prevalentemente guidato dai monomeri di actina-ATP. Quando i monomeri di actina si assemblano in filamenti, subiscono un cambiamento conformazionale verso una struttura più piatta, e questo attiva l'attività ATPasica della proteina. L'idrolisi del nucleotide relativamente rapida (scala temporale dei secondi) nel filamento di actina è seguita da un rilascio lento (scala temporale dei minuti) di fosfato inorganico (Pi). Se è disponibile un eccesso di ATP per rigenerare il pool di monomeri di actina-ATP, in una reazione di scambio nucleotidico, allo stato stazionario, il filamento di actina dimostrerà il "treadmilling", con l'aggiunta di monomeri di actina-ATP all'estremità barbata, mentre i monomeri di actina-ADP si dissociano dall'estremità appuntita allo stesso ritmo. Questo porta a una lunghezza costante del filamento.

Nelle cellule, l'actina produce forza per diversi processi motori e morfogenetici, come la migrazione, la

morfogenesi, l'endocitosi, la dinamica degli organelli e la divisione cellulare. L'actina contribuisce alla produzione di forza cellulare attraverso almeno due meccanismi fondamentali differenti. In primo luogo, i filamenti di actina funzionano come "tracce" per le proteine motrici miosine, che utilizzano l'energia derivata dall'idrolisi dell'ATP per muoversi lungo i filamenti di actina. Gli esempi più studiati di produzione di forza dipendente dalla miosina sono la contrazione muscolare, la citochinesi, l'adesione e la meccanosensazione. Inoltre, i filamenti di actina generano forze di spinta autonomamente polimerizzandosi contro la membrana plasmatica o contro gli organelli cellulari. In questo caso, i filamenti di actina sono spesso organizzati in reti ramificate per ottimizzare la produzione di forza per i processi cellulari che coinvolgono la dinamica della membrana plasmatica o degli organelli.

Nelle cellule inoltre, un'ampia gamma di proteine che legano l'actina, le quali accelerano e regolano i diversi passaggi del ciclo di turnover dell'actina, sono fondamentali per una dinamicità dell'actina. Le proteine leganti l'actina sono responsabili degli aspetti dell'assemblaggio dell'actina. Collettivamente, queste proteine mantengono un ampio pool di monomeri di actina disponibili per la polimerizzazione, consentono l'assemblaggio di nuovi filamenti, promuovono l'allungamento, bloccano le estremità barbed o pointed per terminare l'allungamento, tagliano i filamenti e li collegano tra loro.

La maggior parte delle proteine leganti l'actina sono rappresentate da miosina, cofilina, profilina e dal complesso Arp2/3, le quali hanno meccanismi d'azione sottili che contribuiscono alla dinamica del sistema dell'actina nelle cellule. La piccola proteina (13-14 kDa) legante i monomeri di actina, la profilina, presenta affinità per i monomeri di actina legati ad ATP (anche se la profilina ha un'affinità molto più alta per le estremità barbed dei filamenti di actina legati ad ADP) e la maggior parte dell'actina non polimerizzata nel citoplasma è legata alla profilina. La profilina legata all'estremità barbed di un monomero di actina, inoltre, inibisce stericamente la nucleazione e l'allungamento all'estremità pointed, ma non l'allungamento all'estremità barbed. Vi sono altre attività della profilina essenziali, la profilina legata riduce l'affinità dei monomeri di actina per ATP o ADP, catalizzando così lo scambio nucleotidico dissociando rapidamente l'ADP dai monomeri di actina appena depolimerizzati e permettendo l'aggancio dell'ATP. La profilina si lega anche a sequenze di poliprolina in un sito fisicamente separato dal sito di legame per l'actina e questa interazione permette alla profilina di trasportare l'actina alle sequenze di poliprolina nei fattori di allungamento, come formina ed Ena/VASP, e di promuovere l'allungamento delle estremità barbed.

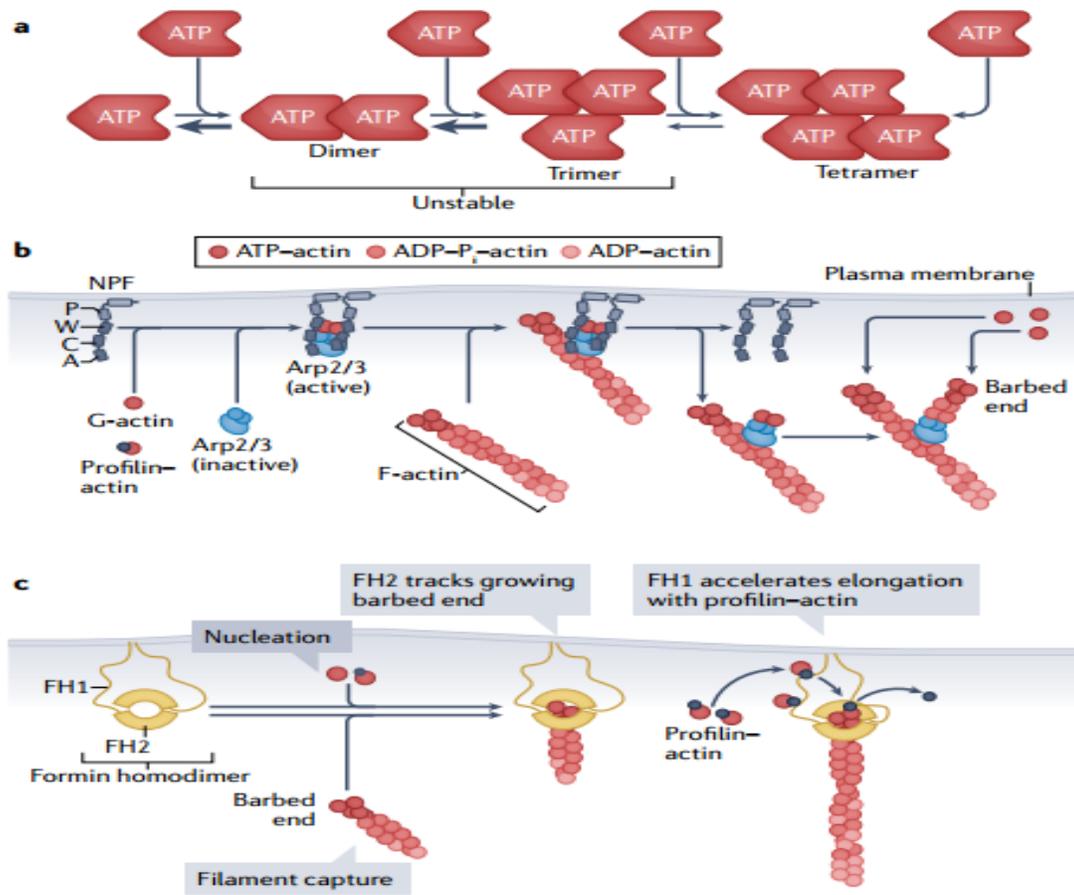


Figura 3: a | I monomeri di actina si assemblano spontaneamente in condizioni fisiologiche di salinità per formare dimeri e trimeri, che si pensa siano altamente instabili. Tuttavia, questa visione di dimeri e trimeri "instabili" è stata recentemente messa in discussione da studi che hanno fornito evidenze che la nucleazione dei filamenti richiede un cambiamento conformazionale di un monomero di actina "in arrivo" da una conformazione "simile a un monomero" attorcigliata a una conformazione "simile a un filamento" appiattita, e che questo rallenterebbe la formazione di dimeri e trimeri di actina. La forma tetramerică è stabile e l'associazione di monomeri alle sue due estremità è comparabile a quella osservata alle estremità appuntite e barbute dei filamenti.

b | Formazione di reti di actina ramificate. I fattori di promozione della nucleazione (NPFs) ancorati alla membrana possiedono quattro domini caratteristici al loro terminus carbossilico: i domini poli-prolina (P), WH2 (W), centrale (C) e acido (A) (vedi il testo principale). Due NPF reclutano e attivano un complesso Arp2/3 legando i monomeri di actina con i loro domini W, mentre legano le subunità Arp2 e Arp3 con i loro domini C e A. L'Arp2/3 attivato può legarsi al lato di un filamento di actina per indurre la crescita di un filamento figlio ramificato, una volta che i NPF si sono staccati dall'Arp2/3.

c | Le formins sono proteine omodimeriche, i cui domini attivi sono i domini di omologia forminica 1 (FH1) e FH2. I domini FH2 possono legarsi alle estremità barbute dei filamenti di actina e seguirli processivamente mentre si allungano. I domini FH1 contengono uno o più ripetizioni di sequenze poli-prolina, che interagiscono con il complesso profilina-actina per accelerare l'allungamento dell'estremità barbata dei filamenti di actina.

F-actina, actina filamentosa; G-actina, actina globulare; Pi, fosfato inorganico.

Un altro interattore è rappresentato dalla timosina-β4, un peptide di 43 residui legante i monomeri di actina che è particolarmente abbondante in alcune cellule, come leucociti e piastrine. La timosina-β4 è implicata nel sequestro di un ampio pool di monomeri di actina, impedendo loro di partecipare a

qualsiasi delle reazioni di polimerizzazione a causa dell'interferenza sterica con tutte le interazioni necessarie per la polimerizzazione. La profilina compete con la timosina- β 4 per il legame con i monomeri di actina, offrendo la possibilità ai monomeri di actina, sequestrati dalla timosina- β 4, di partecipare all'allungamento.

Altro interattore citato è appartenente ad una famiglia di proteine che taglia i filamenti di actina, la cofilina di 15 kDa. La maggior parte degli eucarioti esprime alte concentrazioni di cofilina, una piccola proteina che si lega al solco dell'estremità barbed dei monomeri di actina e ai filamenti di actina. La funzione principale della cofilina è quella di tagliare i filamenti di actina. Essa si lega in modo cooperativo ai lati dei filamenti di actina, con un'affinità maggiore per le subunità di actina legate ad ADP rispetto a quelle legate ad ATP o ADP-Pi. La cofilina ha mostrato di rendere i filamenti più flessibili. I processi cellulari dipendenti dal taglio dei filamenti di actina da parte della cofilina includono la motilità e la citodieresi.

Dato che la nucleazione dei filamenti di actina è intrinsecamente sfavorevole e viene soppressa dalla profilina e dalla timosina- β 4, le cellule dipendono da proteine regolatrici per avviare la polimerizzazione dei filamenti di actina in modo controllato. Il complesso Arp2/3 è una struttura composta da sette subunità, tra cui Arp2 e Arp3. Il complesso è intrinsecamente inattivo perché le altre subunità tengono separati i due elementi Arp. Quando il complesso Arp2/3 si lega al lato di un filamento di actina, Arp2 e Arp3 si avvicinano e formano la base per la crescita di un ramo. L'estremità libera del filamento figlio si allunga, mentre il complesso Arp2/3 ancora l'estremità appuntita del filamento rigidamente al lato del filamento madre.

Una varietà di fattori promotori della nucleazione attivano il complesso Arp2/3, ciascuno in un contesto cellulare specifico, al fine di promuovere o meno la ramificazione dei filamenti di actina.

Inoltre, solo per citarle per completezza dell'argomento actina vi sono anche altre importanti classi di proteine che interagiscono con l'actina come quelle che stabilizzano le connessioni fisiche fra i filamenti di actina, denominate cross-linking proteins. In ultima analisi anche le proteine denominate capping protein sono di interesse al fine di mantenere il pool di monomeri di actina (Pollard 2016).

(Lappalainen et al. 2022)

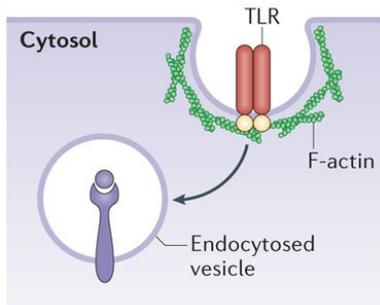
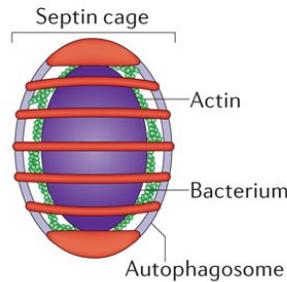
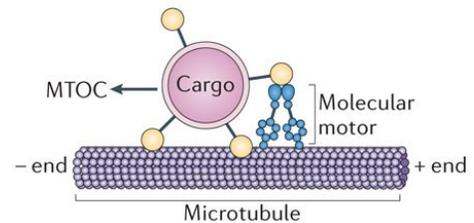
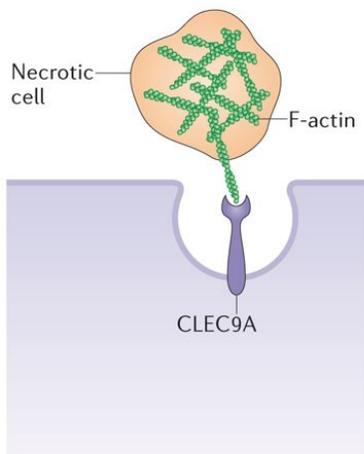
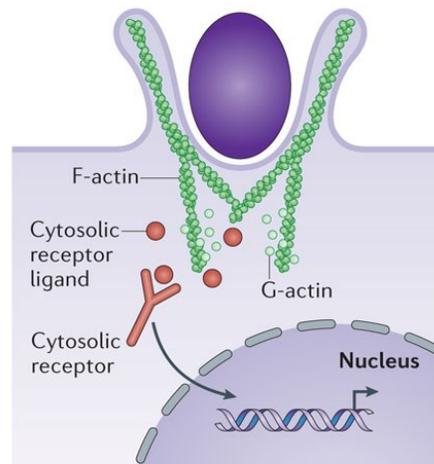
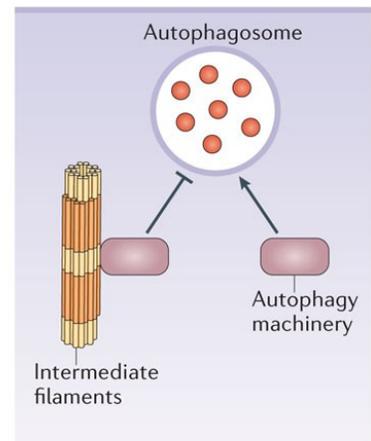
CITOSCHELETRO E RISPOSTA IMMUNITARIA

Immunità Innata:

La cell-autonomous immunity, definita come la capacità di una cellula ospite di eliminare un agente infettivo invasivo, rappresenta la prima linea di difesa contro i patogeni microbici. Essa si basa su proteine antimicrobiche, compartimenti degradativi specializzati e morte programmata della cellula ospite. Questa immunità è mediata da reti di segnalazione immunitaria innata a più livelli, che rilevano i patogeni microbici e stimolano programmi di eliminazione dei patogeni. Studi recenti sulle interazioni ospite-microorganismo hanno dimostrato che i componenti del citoscheletro della cellula ospite sono fondamentali per la rilevazione dei patogeni batterici e per la mobilitazione delle risposte antibatteriche. Per rilevare i batteri, le cellule ospiti monitorano gli spazi extracellulari, vacuolari e citosolici utilizzando proteine sensori specializzate che innescano risposte trascrizionali e post-traduzionali. Sulla base della conservazione delle sequenze, queste proteine sensori sono ampiamente classificate come recettori simili a Toll (TLR), recettori simili a RIG-I (RLR), proteine contenenti dominio di legame ai nucleotidi e oligomerizzazione (NOD) e ricche di leucina (NLR), recettori simili ad AIM2 (ALR), recettori della lectina di tipo C (CLR) e recettori simili a sequestosoma 1 (SLR). I cambiamenti trascrizionali sono tra le risposte più importanti a valle di TLR, RLR e ALR, e sono mediati tramite le vie del fattore nucleare κ B (NF- κ B), della chinasi attivata da mitogeni (MAPK) o del fattore regolatore dell'interferone (IRF). A loro volta, i geni recentemente trascritti, inclusi i geni stimolati dall'interferone e quelli che codificano per citochine pro-infiammatorie, hanno ruoli cruciali nel controllo intrinseco cellulare dei patogeni batterici e nell'attivazione dell'immunità adattativa. La pirina e alcune NLR e ALR rilevano l'infezione batterica e assemblano impalcature di segnalazione chiamate inflamosomi, che portano all'attivazione delle caspasi e condurre a tipologie di morte cellulare come l'innescamento della piroptosi, una forma litica di morte cellulare dell'ospite che è emersa come un meccanismo cell-autonomous per prevenire l'instaurarsi e la diffusione dell'infezione eliminando le cellule infettate.

I patogeni batterici hanno evoluto vari meccanismi per manipolare le proteine del citoscheletro dell'ospite, al fine di promuovere la loro replicazione intracellulare e sopravvivenza. Per promuovere l'immunità, i sensori immunitari innati riconoscono le modificazioni del citoscheletro dell'ospite indotte dai batteri. Inoltre, è necessaria una compartimentalizzazione dei segnali dipendente dal citoscheletro così come la rilevazione di F-actina extracellulare come "segnale di pericolo".

Diversi patogeni batterici intracellulari modificano la dinamica dell'actina per invadere cellule non fagocitiche. Ad esempio, **Listeria monocytogenes**, **Yersinia pestis** e **Yersinia pseudotuberculosis** utilizzano il meccanismo di invasione a "zipper". Questo avviene quando le proteine di superficie batteriche si legano ai recettori della cellula ospite, inducendo così un rimodellamento della membrana dipendente dall'actina che si adatta strettamente attorno al batterio invasore. Altri batteri invasivi, come **Shigella flexneri** e **Salmonella enterica** serotipo Typhimurium, utilizzano il meccanismo di invasione a "trigger". Questo meccanismo si verifica quando il patogeno inietta proteine effettori del sistema di secrezione di tipo III (T3SS) attraverso la membrana dell'ospite, inducendo la formazione di pieghe della membrana ricche di actina che mediano la macropinosi per inglobare il batterio. I patogeni aderenti alla superficie, come **Escherichia coli** enteropatogena (EPEC) o enterorragica (EHEC), usano il loro T3SS per secernere un recettore transmembrana nella membrana dell'ospite per stimolare la polimerizzazione dell'actina e generare estensioni cellulari chiamate "pedestal". La formazione del "pedestal" avviene quando l'actina viene polimerizzata sotto la membrana della cellula ospite a cui il batterio è attaccato, spingendo il batterio attaccato verso l'alto. Altri batteri extracellulari, come i **Clostridium spp.**, rilasciano tossine che disorganizzano l'actina per ridurre la migrazione delle cellule immunitarie e rompere le barriere delle cellule epiteliali. In tutti i casi, i batteri modificano la dinamica dell'actina dell'ospite manipolando le GTPasi RHO, come RHO, RAC1 e CDC42. Le GTPasi RHO agiscono come interruttori molecolari nel controllo della dinamica dell'actina regolando il complesso ARP2/3. Inoltre, vari batteri modulano il ciclo delle GTPasi di proteine coinvolte nel traffico di membrane e vescicole, ad esempio, quelle appartenenti alle famiglie RAS-related proteins in brain (RAB) e ADP ribosylation factor (ARF), usando effettori o tossine per modificare l'attività dei regolatori dell'ospite. La polimerizzazione dell'actina è manipolata da diversi patogeni citosolici, come **L. monocytogenes**, **S. flexneri**, **Rickettsia spp.** del gruppo della febbre maculata (**R. conorii** e **R. parkeri**), **Burkholderia spp.** (**B. thailandensis**, **B. pseudomallei** e **B. mallei**) e **Mycobacterium marinum** che sfuggono dal fagosoma e usano code di actina per muoversi all'interno e tra le cellule. Successivamente le cellule autonome nella difesa attuano una serie di risposte che vedono il coinvolgimento e il rimodellamento del citoscheletro, messo in atto dai patogeni, come segnale per attuare una risposta difensiva. Tale trattazione non verrà presa in esame (Mostowy and Shenoy 2015).

a Receptor endocytosis**b Pathogen compartmentalization****c Vesicle trafficking and fusion****d Danger signals****e Innate immune activators****f Scaffolding roles**

Nature Reviews | Immunology

Figura 4 L'actina, i microtubuli, i filamenti intermedi e le septine hanno ruoli chiave nella rilevazione dei patogeni batterici e nella mobilitazione delle risposte antibatteriche.

a | Le strutture di actina alla membrana plasmatica forniscono rigidità alla cellula, fungono da impalcatura per trattenere le proteine legate alla membrana (ad esempio, i recettori) e permettono l'endocitosi dei recettori, come i recettori Toll-like (TLR)

b | I batteri citoplasmatici che polimerizzano l'actina, tra cui *Shigella flexneri* e *Mycobacterium marinum*, possono essere intrappolati in gabbie di septine, che hanno dimostrato di limitare la motilità basata sull'actina e la disseminazione batterica

c | I microtubuli e i motori dei microtubuli trasportano carichi, come gli autofagosomi, all'interno della cellula. Esistono diversi tipi di motori dei microtubuli: i motori che si muovono verso l'estremità positiva (+) e quelli che si muovono verso l'estremità negativa (-) sono classificati in base alla direzione in cui viaggiano lungo i microtubuli. Gli autofagosomi si spostano dalle posizioni periferiche della cellula verso il centro di organizzazione dei microtubuli (MTOC), un importante sito di nucleazione dei microtubuli, dove i lisosomi sono concentrati per la fusione autofagosoma-lisosoma.

d | L'F-actina extracellulare nelle cellule necrotiche può agire come un segnale di pericolo^{67,68}. La necrosi porta alla perdita dell'integrità della membrana, esponendo il citoscheletro di actina, e l'F-actina esposta agisce come un ligando per il membro A della famiglia del dominio lectinico di tipo C9 (CLEC9A).

e | I riarrangiamenti del citoscheletro causati dall'invasione batterica o dalle tossine sono riconosciuti da sensori, come i recettori citosolici contenenti il dominio di oligomerizzazione NOD1 e pyrin, che portano all'attivazione delle vie di segnalazione dell'immunità innata.

f | Il citoscheletro può funzionare come un'impalcatura per l'inibizione dell'autofagia; i filamenti intermedi sopprimono l'autofagia formando un complesso con proteine cruciali per l'inizio dell'autofagia (ad esempio, beclin 1).

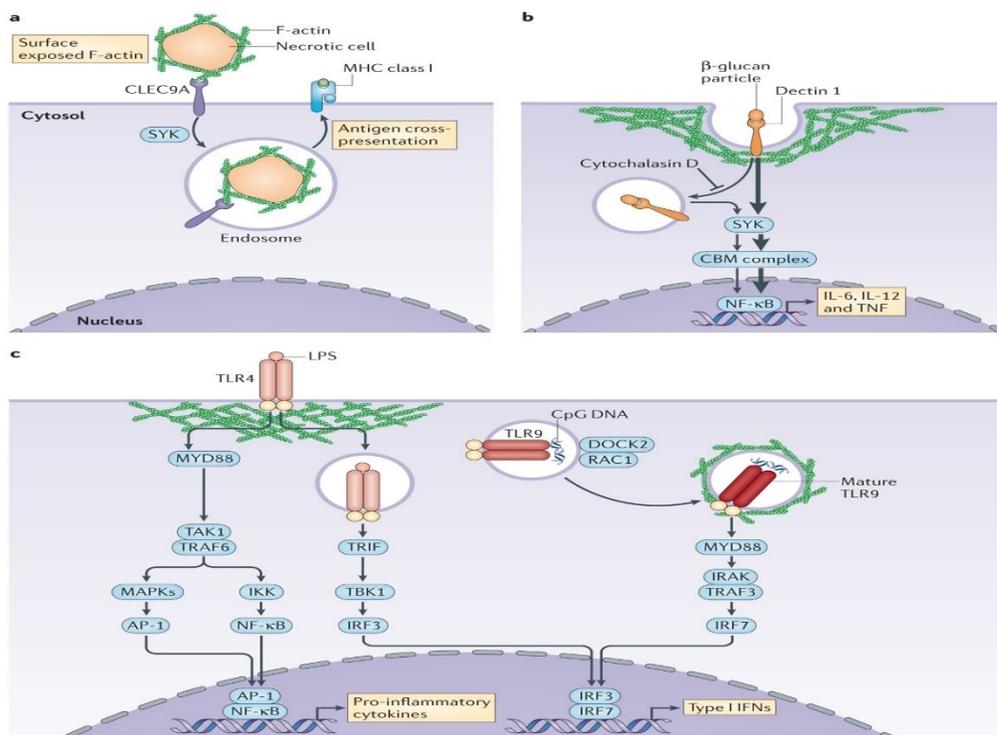


Figura 5:

a | L'F-actina funziona come un segnale di pericolo. L'actina esposta sulla superficie delle cellule necrotiche viene rilevata dalle cellule dendritiche (DCs) CD8α+ che presentano antigeni. Sottoinsiemi specifici di DC esprimono il membro A della famiglia del dominio lectinico di tipo C 9 (CLEC9A), che è un recettore per l'actina. La segnalazione tramite la tirosina chinasi della milza (SYK) promuove la cross-presentazione dell'antigene senza attivare risposte trascrizionali.

b | Segnalazione e fagocitosi mediate da dectina 1. La segnalazione tramite dectina 1, ad esempio, durante la rilevazione di particelle di β-glucano attiva l'espressione genica pro-infiammatoria dipendente da SYK e dal complesso contenente CARD9, BCL-10 e MALT1 (complesso CBM). L'inibizione della dinamica dell'actina tramite la ciclosporina D provoca una fagocitosi frustrata e un aumento della

segnalazione pro-infiammatoria (indicato da frecce più spesse).

c | Il ruolo del citoscheletro nell'endocitosi del recettore Toll-like 4 (TLR4) e nella maturazione degli endosomi contenenti TLR9. L'endocitosi di TLR4 determina la segnalazione tramite la proteina di risposta primaria della differenziazione mieloide 88 (MYD88) sulla membrana plasmatica e tramite la proteina adattatrice contenente il dominio TIR che induce IFNβ (TRIF) sugli endosomi. Le due proteine adattatrici MYD88 e TRIF inducono programmi trascrizionali diversi, come illustrato. Le dinamiche dell'actina controllano la maturazione degli endosomi contenenti TLR9 in vescicole simili a lisosomi competenti per la segnalazione. Deducendo di citochinesi 2 (DOCK2) e la GTPasi RAC1 sono coinvolti nella modulazione dell'actina per promuovere il traffico dei recettori e l'induzione di interferoni di tipo I (IFNs) dipendente da TLR9.

AP-1, proteina attivatrice 1; IKK, chinasi IκB; IRAK, chinasi associata al recettore dell'interleuchina-1; IRF, fattore regolatore degli IFN; MAPK, chinasi attivata da mitogeni; NF-κB, fattore nucleare κB; TAK1, chinasi 1 attivata dal TGFβ; TBK1, chinasi 1 legante TANK; TNF, fattore di necrosi tumorale; TRAF6, fattore associato al recettore TNF6.

B-cell:

le dinamiche del citoscheletro siano strettamente intrecciate sia con la regolazione positiva che con quella negativa dell'attivazione delle cellule B. Su una scala temporale a livello del sub-secondo, che è più breve della durata di vita dei singoli filamenti di actina, il citoscheletro modula le reazioni enzimatiche alterando la diffusione delle proteine di membrana e la loro disponibilità per legarsi ai loro partner. Questa modulazione influisce sia sullo stato basale, di riposo, delle cellule B, sia sulle reazioni di segnalazione indotte dall'antigene. Su una scala temporale leggermente più lunga, nell'ordine di diversi secondi, il riarrangiamento del citoscheletro raggruppa le proteine, le separa o induce cambiamenti nella loro conformazione e attività. Questo riarrangiamento è particolarmente rilevante per l'organizzazione della membrana plasmatica, il movimento cellulare e la trasduzione di segnali e materiale nei contatti indotti dall'antigene che le cellule B formano con altre cellule immunitarie. Su una scala temporale ancora più lunga, nell'ordine di diversi minuti, il citoscheletro trasporta molecole e organelli verso diverse regioni o compartimenti della cellula. Questa segregazione isola le reazioni biochimiche e ha un impatto sulla polarità delle cellule B e sui punti decisionali che determinano se la cellula prolifera o si differenzia in una cellula effettrice. Sebbene gli elementi fondamentali del citoscheletro di actina siano presenti in tutte le cellule, la loro regolazione da parte delle vie di segnalazione a monte è specifica per ciascun tipo cellulare e responsabile di funzioni specializzate, incluse quelle delle cellule immunitarie. Nelle cellule B, il citoscheletro è un bersaglio principale delle vie di segnalazione del recettore delle cellule B (BCR). Anche nelle cellule B a riposo, la struttura del citoscheletro corticale dipende dalla presenza di componenti della segnalazione del BCR, il che suggerisce che esiste un'influenza costante della segnalazione tonica del BCR sulla dinamica dell'actina. Il legame dell'antigene al BCR innesca un notevole rimodellamento del citoscheletro corticale, che induce l'espansione della cellula, la formazione della sinapsi immunitaria e il raggruppamento dell'antigene per l'endocitosi. Studi biochimici e genetici dimostrano che questo rimodellamento è mediato attraverso tutte le principali vie della dinamica dell'actina, inclusa la nucleazione di filamenti di actina ramificati e lineari, il taglio dei filamenti e la contrattilità della miosina.

Immediatamente dopo il riconoscimento dell'antigene su una cellula presentante l'antigene (APC), il BCR innesca la depolimerizzazione locale dell'actina e la disattivazione di ezrina, seguita dalla generazione di un gran numero di nuovi filamenti di actina che si propagano simmetricamente verso

l'esterno dal punto di contatto iniziale. Le protrusioni della membrana guidano l'espansione delle cellule B; questo processo dipende dal reclutamento mediato da BLNK e CD19 delle proteine VAV e dall'attivazione di RAC2, il che implica che sia guidato dall'attivazione del complesso ARP2/3 da parte delle proteine WAS e WAVE attraverso un meccanismo simile alla generazione di lamellipodi. L'espansione delle cellule B promuove il legame dell'antigene e il clustering del BCR, aumentando così l'attivazione delle cellule B. Durante l'espansione, la segnalazione del BCR attiva anche le integrine LFA1 (noto anche come integrina α L β 2) e VLA4 (noto anche come integrina α 4 β 1), che interagiscono con i loro ligandi sulle APC e promuovono l'adesione della cellula B. La polimerizzazione dell'actina nella periferia della sinapsi genera un flusso centripeto di actina che raccoglie l'antigene verso il centro della sinapsi per l'endocitosi. Oltre al complesso ARP2/3, anche le formine polimerizzano l'actina nella periferia della sinapsi in espansione, contribuendo al trasporto centripeto del recettore delle cellule T (TCR). I filamenti di actina lineari generati dalle formine crescono perpendicolarmente alla membrana e si estendono centripetamente oltre la rete di actina ramificata, dove vengono piegati e collegati dalla miosina in anelli concentrici. La contrazione di questi anelli, dipendente dalla miosina, trasporta i cluster di antigene verso il centro della sinapsi. Non è stato riportato un ruolo delle formine nella formazione della sinapsi delle cellule B, ma la miosina contribuisce al movimento centripeto dei microcluster di BCR, suggerendo che un meccanismo simile possa esistere nelle sinapsi delle cellule B. Inoltre, i microcluster di BCR interagiscono con i microtubuli tramite la proteina motrice del citoscheletro dineina, contribuendo alla compattazione dei cluster di antigene nel centro della sinapsi e alla riorientazione del centro di organizzazione dei microtubuli (MTOC) verso la sinapsi (Tolar 2017)

T-Cell:

Le cellule T hanno un ruolo centrale nell'immunità acquisita, potenziando o sopprimendo le risposte immunitarie tramite la secrezione di citochine o distruggendo le cellule che presentano antigeni. Tuttavia, per svolgere queste funzioni specializzate, le cellule T devono prima interagire e comunicare con le cellule presentanti l'antigene (APC), traducendo i segnali esterni, attraverso vie di segnalazione intracellulare strettamente regolate, in risposte effettrici specifiche delle cellule T. Pertanto, diversi processi cellulari, tra cui l'adesione mediata dalle integrine, la formazione della sinapsi immunitaria, l'instaurazione della polarità cellulare per il rilascio diretto di citochine o granuli litici e la segnalazione, sono necessari per avviare e sostenere l'attivazione delle cellule T, e dipendono tutti dal citoscheletro

dei linfociti. Il citoscheletro delle cellule T è composto da filamenti di actina, microtubuli e filamenti intermedi. Ciascuno di questi componenti fornisce un aspetto unico della regolazione cellulare. I filamenti di actina (F-actina) controllano la morfologia e la plasticità della cellula e forniscono la forza meccanica necessaria per la motilità. L'F-actina subisce una dinamica polimerizzazione e depolimerizzazione durante l'attivazione cellulare attraverso l'attività di proteine che tagliano, bloccano, regolano e nucleano l'actina. Si ritiene che il sistema dei microtubuli regoli la secrezione polarizzata di molecole effettrici da parte delle cellule T e possa contribuire all'endocitosi dei recettori, oltre a mantenere le strutture dipendenti dall'F-actina. Una struttura citoscheletrica strettamente regolata fornisce una piattaforma per il reclutamento di molecole che regolano l'adesione o trasducono segnali necessari per lo sviluppo, l'attivazione e la proliferazione delle cellule T. Questo porta a cambiamenti morfologici e all'instaurazione della polarizzazione cellulare, cruciale per processi come la migrazione, l'endocitosi e il rilascio diretto di citochine e granuli citotossici. Nel giro di pochi minuti dal riconoscimento di un APC da parte delle cellule T, i segnali provenienti dal recettore delle cellule T (TCR) portano a una rapida polarizzazione del citoscheletro, che coinvolge la polimerizzazione dell'F-actina, la riorientazione del centro di organizzazione dei microtubuli (MTOC) verso la regione di interazione cellula-cellula e la formazione di una struttura ricca di actina nota come complesso del polo distale sul lato opposto della cellula. Questa ristrutturazione del citoscheletro è essenziale per la funzione delle cellule T poiché consente la redistribuzione dei recettori cellulari e l'assemblaggio di complessi di segnalazione, il che porta infine alla formazione della sinapsi immunologica "matura". È stato evidenziato come la distruzione dell'F-actina o la deplezione di regolatori del citoscheletro compromettono la formazione della sinapsi immunologica e l'attivazione delle cellule T. Inoltre, l'attivazione delle integrine al SMAC (supramolecular activation cluster), che media la formazione stabile dei coniugati cellula T-cellula APC, dipende dal citoscheletro. Pertanto, la polarizzazione del citoscheletro è un requisito importante per il riconoscimento produttivo delle APC, che porta alla formazione della sinapsi immunologica e alla successiva attivazione delle cellule T.

Dopo la ligazione del recettore delle cellule T (TCR), la tirosina chinasi specifica per i linfociti (LCK) e la proteina associata alla catena ζ di 70 kDa (ZAP70) vengono attivate. LAT (linker per l'attivazione delle cellule T) viene successivamente fosforilato da ZAP70, e la proteina leucocitaria contenente dominio SH2 di 76 kDa (SLP76) viene reclutata da LAT. LAT e SLP76 fungono da impalcatura per le proteine regolatorie dell'actina, tra cui PLC γ 1 (fosfolipasi γ 1), la regione non catalitica della tirosina chinasi

(NCK), la chinasi T-cellulare indotta da interleuchina-2 (ITK) e VAV1, quest'ultima reclutata da ITK. L'attività di PLC γ 1 porta alla mobilitazione del calcio, fondamentale per il rimodellamento dell'F-actina nelle cellule T. VAV1 facilita lo scambio di GDP con GTP sulle piccole GTPasi RHO CDC42 e RAC1, attivandole. VAV1 potrebbe richiedere un'interazione con la metiltransferasi EZH2 (enhancer of zeste homologue-2) per regolare queste GTPasi e la polimerizzazione dell'F-actina. CDC42 legato al GTP attiva la proteina Wiskott–Aldrich syndrome (WASP), che è reclutata da NCK e associata costitutivamente alla WASP-interacting protein (WIP). Il legame di CDC42 a WASP rimuove la sua auto-inibizione, permettendo a WASP di polimerizzare l'F-actina attraverso la sua associazione con il complesso ARP2/3 (actin-related protein 2/3). Inoltre RAC1 legato al GTP interagisce con il complesso WASP-family verprolin-homologous protein-2 (WAVE2), e si pensa che localizzi o medi l'attivazione del complesso ARP2/3 mediata da WAVE2. Inoltre, attraverso un'interazione con VAV1, dynamin-2 (DNM2) si localizza alla sinapsi immunologica, dove contribuisce alla regolazione della riorganizzazione dell'F-actina e probabilmente influenza la dinamica della membrana e il reclutamento di ulteriori regolatori dell'actina. Un ulteriore attore, Haematopoietic-cell-specific protein-1 (HS1), viene fosforilato dalle chinasi prossimali al TCR e stabilizza i nuovi filamenti di actina. La cofilina, infine, gioca un ruolo nella dinamica dell'actina nelle cellule T attraverso la sua attività di scissione e depolimerizzazione dell'F-actina (Billadeau, Nolz, and Gomez 2007).

SCOPO DELLA TESI

Lo scopo di tale tesi è quella di esplorare l'effetto che le proteine accessorie di SARS-CoV-2 hanno su cellule epiteliali di polmone le A549. Lo scopo è quello, in particolare, di evidenziare le possibili interazioni a carico delle modifiche subite dall'apparato citoscheletrico in seguito all'interazione con le proteine accessorie di tale virus, essendo verosimile che si possa avere una modifica citoscheletrica a seguito dell'ingresso del virus nella cellula ospite. Scoprire sempre nuove informazioni sul meccanismo di funzionamento di un nuovo agente eziologico è un'opportunità in almeno due sensi. Il primo è la possibilità di cercare nuove terapie non di stampo vaccinale al fine di trattare le infezioni responsabili del Covid-19. Il secondo è che avere una chance in più di esplorare e indagare la biologia di un nuovo agente virale ci facilita la strada e pone una base per cercare di conoscere in modo più rapido eventuali nuovi agenti virali evolutivamente consessi al SARS-Cov-2, oltre che alla possibilità di sfruttare, per scopi tecnologici, nuove conoscenze derivanti dalla ricerca di base.

MATERIALI E METODI

COLTURE CELLULARI

In questo elaborato di tesi è stata utilizzata la linea cellulare A549, cellule cancerogene di epitelio polmonare (ottenuta dalla ATCC).

Le cellule A549 sono state coltivate in terreno di coltura DMEM, medium di Eagle modificato secondo Dulbecco (BioWhittaker, Lonza), contenente aminoacidi (tutti gli essenziali ed alcuni non essenziali), vitamine, glucosio alla concentrazione di 1g/L, sali inorganici, tra cui bicarbonato di sodio, e il rosso fenolo, un indicatore di pH. Alla composizione di base del DMEM sono stati aggiunti antibiotici in modo da ottenere una concentrazione finale del 1% di penicillina e streptomina. Inoltre sono stati aggiunti anfotericina B (antimicotico), ad una concentrazione finale del 1%, ed eventualmente puromicina utile alla selezione delle cellule trasfettate, ad una concentrazione di 2µg/ml. Infine il terreno è stato addizionato con siero fetale bovino (FBS) ad una concentrazione del 5 %. L'FBS contiene minerali, vitamine, ormoni, lipidi, proteine quali albumina, la quale veicola vitamine, lipidi e ormoni, e la transferrina necessaria per il trasporto di ferro; soprattutto il siero fornisce fattori di crescita che promuovono la proliferazione cellulare (Yang and Xiong 2012). Le cellule sono state mantenute in incubatore alla temperatura di 37 °C e al 5% di CO₂. Nel nostro laboratorio diverse popolazioni cellulari sono conservate in azoto liquido sospese nel freezing medium, FBS contenente il 10% di dimetilsolfossido (DMSO), un crioprotettore (Pegg 2007).

La provetta Cryovial™ contenente cellule A549 viene scongelata in un bagnetto termostato a 37 °C e successivamente centrifugata per cinque minuti a 1100 RPM, in modo da separare le cellule, che andranno a costituire il pellet, dal terreno contenente il DMSO. Il sovrantante viene quindi aspirato in sterilità e le cellule vengono risospese in terreno di coltura completo. Arrivate allo stato di sub confluenza, le colture cellulari subiscono i “passaggi” che hanno la finalità di espandere la popolazione in vista degli esperimenti. Per i passaggi, visto che le cellule A549 crescono aderenti alla superficie della piastra di coltura, è necessario l'utilizzo di un enzima proteolitico, quale la tripsina, per risospesione delle cellule idrolizzando le proteine di adesione. La tripsina è un'endopeptidasi prodotta dal pancreas dei mammiferi ed ha un optimum alla temperatura di 37 °C e a un pH di 8. La soluzione in cui è disciolta la

tripsina contiene inoltre EDTA (Acido etilendiamminotetraacetico), un agente chelante cationi in grado di legare gli ioni calcio, stabilizzatori delle molecole di adesione.

Per effettuare il passaggio viene aspirato il medium di coltura, eseguito un lavaggio con 10 mL di soluzione salina con tampone fosfato (PBS, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCL, 10 mM Na₂HPO₄ e 1.8 mM KH₂PO₄) e, infine, aggiunto 1 mL di soluzione tripsina-EDTA. La piastra viene poi incubata a 37°C per qualche minuto al fine di staccare le cellule dalla plastica. Una volta che le cellule sono in sospensione, viene aggiunto terreno di coltura DMEM fresco, le cellule vengono risospese ed un'aliquota corrispondente al numero di cellule desiderato è trasferita in una nuova fiaschetta contenente un volume di terreno corretto, a seconda della grandezza della fiaschetta utilizzata. Dallo scongelamento le cellule sono state utilizzate per non più di 20 passaggi. Prima di ogni passaggio veniva valutata la confluenza e un'eventuale contaminazione mediante un microscopio ottico. Raggiunta la confluenza, se necessario, veniva ripristinata la provetta Cryovial™ precedentemente utilizzata. Si procede nel tripsinizzare le cellule, spostarle all'interno di una falcon e centrifugandole a 1100 RPM per cinque minuti al fine di separare le cellule dal terreno colturale. Successivamente si aspira il supernatante e si risospende il pellet con il freezing medium. La sospensione cellulare viene poi distribuita nelle Cryovial™ indicando il tipo cellulare, la data, il numero del passaggio cellulare e il passaggio cellulare da cui quelle cellule derivavano. Le vial venivano poi successivamente conservate a -80 °C all'interno di un contenitore riempito con isopropanolo e dopo 24 ore spostate all'interno di tank contenenti azoto liquido.

Un'altra line cellulare utilizzata è stata THP1, cellule monocitarie che crescono in sospensione. Per la coltivazione di questa linea cellulare veniva utilizzato il terreno colturale RPMI. Il terreno colturale RPMI (Roswell Park Memorial Institute) contiene l'agente riducente glutatione e alte concentrazioni di vitamine, biotina, vitamina B12 e PABA glucosio alla concentrazione di 2g/L, sali inorganici, tra cui bicarbonato di sodio 2g/L, e il rosso fenolo, un indicatore di pH. Alla composizione di base del RPMI sono stati aggiunti antibiotici, i medesimi e nelle stesse concentrazioni del terreno colturale RPMI. Infine il terreno è stato addizionato con siero fetale bovino (FBS) ad una concentrazione del 10 %. Al fine del mantenimento in coltura della linea cellulare THP1 e del conteggio corretto di cellule da prelevare per ripristinare lo stock veniva usato un contacellule automatico, T10™ automated cell counter (BIORAD). Per Procedere al conteggio delle cellule veniva usata un multi well da 96 pozzetti per la preparazione di

una diluzione 1:1 delle cellule con un composto colorante, il Trypan blue. Si procede aggiungendo 10 μ l di Trypan blue al pozzetto assieme a 10 μ l di sospensione cellulare, precedentemente bene risospesa mediante l'uso di un pipettatore automatico munito di siringa. Successivamente 10 μ l del mix veniva prelevato e messo in slide per la conta automatica. Il Valore selezionato e tenuto in considerazione era quello della concentrazione delle cellule vive. Il trypan blue è un colorante azoico usato per la colorazione delle cellule morte, poiché tale colorante non è in grado di superare la membrana intatta delle cellule vive, ma penetra all'interno delle cellule morte (non distinguendo fra cellule apoptotiche e necrotiche). La concentrazione ottimale per le cellule THP1, per il mantenimento in coltura, è in un range compreso fra $2 \cdot 10^5$ e $8 \cdot 10^5$ cellule/ml. Tale valore è ottenibile usando l'equazione $C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f$, dove l'incognita è rappresentata dal volume iniziale di cellula da prelevare. Mentre per ripristinare lo stock la concentrazione adeguata di cellule da congelare è in un range di $6 \cdot 10^6$ cellule/ml.

TRASFEZIONE PER L'ESPRESSIONE STABILE CON LENTIVIRUS:

Le linee cellulari THP1 e A549 sono state usate come modello cellulare per testare l'effetto biologico delle proteine accessorie di SARS-COV2. Al fine di valutare l'effetto di tali proteine è stato utilizzato una procedura di espressione stabile (il transgene si integra e forma un nuovo locus che verrà trasmesso ai discendenti del clone cellulare) mediante trasfezione, nella fattispecie utilizzando come inserimento del transgene un lentivirus. I lentivirus usati a tale scopo sono strumenti affidabili per il trasferimento stabile di geni in una vasta gamma di cellule di mammiferi. I lentivirus possiedono alcune caratteristiche che li rendono interessanti per l'utilizzo nella produzione di linee cellulari stabili: efficiente trasferimento genico alle cellule non in divisione in vitro e in vivo; facilità di manipolazione genetica, e una capacità di ospitare un ampio range di grandezza di geni di interesse (GOI), potenzialmente fino a 8-9 kb di sequenza. Di seguito verrà poi spiegato brevemente la modalità di ottenimento di vettori retrovirali e una panoramica sulle principali componenti che possono essere inserite all'interno del costrutto per la regolazione dell'espressione genica del GOI (gene of interest). Caratteristico di tutti i retrovirus, il genoma del lentivirus contiene i tre geni: gag, pol ed env e sequenze LTR e Ψ : gag codifica per le proteine strutturali del core, pol codifica per la componente enzimatica trascrittasi

inversa/integrasi/proteasi, env codifica per le glicoproteine dell'envelope, LTR (long terminal repeat), comprendono promotore/enhancers e sequenze necessarie per l'integrazione e sequenze Ψ per il packaging. Inoltre, i lentivirus hanno un certo numero di piccoli open reading frame unici che codificano sei proteine accessorie e regolatorie: vif, vpr, vpu, tat, rev e nef. Questi sono associati al controllo dell'espressione genica, alla maturazione, alla gemmazione, all'infettività e alla patogenesi del lentivirus. In generale i vettori lentivirali più comunemente utilizzati, basati prevalentemente sul virus dell'immunodeficienza umana di tipo 1 (HIV-1), sono vettori i cui geni delle proteine accessorie sono assenti e nei quali i geni delle proteine strutturali e il gene rev sono codificati in trans da plasmidi separati. In generale la sequenza dell'HIV-1 viene suddivisa in quattro plasmidi: (1) plasmide vettore, (2) plasmide di packaging gag-pol, (3) espressione Rev e (4) espressione dell'envelope (eventualmente anche eterologo). Insieme, questi quattro plasmidi, quando co-trasfettati, generano un virus deficitario nella replicazione contenente l'RNA del transgene di interesse, che verrà consegnato alle cellule target, retrotrascritto e integrato nel genoma della cellula. Per quanto riguarda i differenti plasmidi, solitamente prodotti sfruttando sistemi cellulari di *E. coli*. Il plasmide vettore (1) è il vettore trasducente (contenente il GOI), che contiene la sequenza minima dell'HIV-1 ed esclude tutti i geni delle proteine strutturali e accessorie virali. Sebbene includa una ripetizione terminale lunga (LTR) 5' e 3' del provirus originale per permettere una efficiente integrazione nella cellula ospite. Inoltre, il vettore contiene il segnale di packaging (Ψ). Questo è una sequenza cis-acting necessaria affinché l'RNA venga catturato nella particella virale. La maggior parte della sequenza del gene env è stata eliminata, ad eccezione dell'elemento di risposta Rev (RRE), un elemento importante che permette l'esportazione nucleare dell'RNA del vettore e probabilmente ha effetti di potenziamento sulla traduzione e l'incapsidazione. Il plasmide di packaging gag-pol (2) è progettato per fornire le proteine strutturali dell'HIV Gag, che codifica le proteine del core e la proteina del nucleocapside, e Pol, che codifica gli enzimi necessari per la replicazione. Queste due innovazioni riducono nuovamente l'omologia tra i plasmidi. Il segnale di packaging (Ψ) è stato anch'esso eliminato; pertanto, i trascritti non possono essere impacchettati nelle particelle del vettore. L'espressione di Rev (3) fornisce la proteina Rev, che si legherà all'RRE nell'RNA del vettore. Regola il trasporto e lo splicing dell'RNA virale.

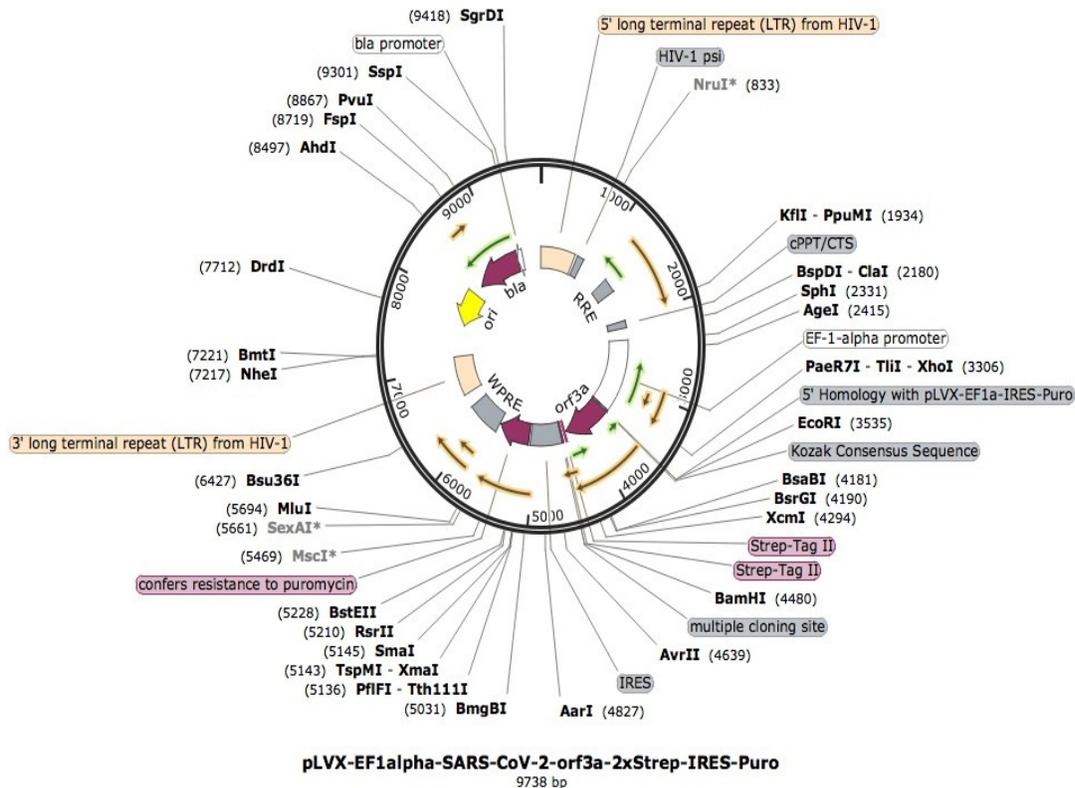
In sintesi, per riassumere, si mira a produrre vettori retrovirali deficitari nella replicazione, sostituendo parte o tutte le sequenze codificanti del retrovirus con quelle che si desidera trasferire. Le funzioni richieste per l'infezione iniziale del vettore sono generalmente fornite da una linea cellulare di

"packaging", che consente la produzione di virus infettante ma incapace di replicarsi. Quindi per la produzione dei retrovirus ricombinanti vengono usate cellule "impacchettatrici" del retrovirus, linea cellulare contenente un provirus integrato con tutti i suoi geni intatti, ma che manca della sequenza in cis (Ψ) riconosciuta dall'apparato di impacchettamento e inoltre contenente un vettore avente le sole sequenze LTR, la sequenza (Ψ) e il GOI. Lo svantaggio potrebbe essere che talune volte si possa ottenere la riformazione di particelle virali wild-type, generate in seguito a eventi di ricombinazione tra il provirus integrato ed il vettore. Come spiegato sopra, nelle nuove linee cellulari si è cercato di minimizzare questo problema inserendo il DNA

provirale su più loci cromosomici, in modo tale che l'eventuale formazione di un virus wild-type richiederebbe la contemporanea realizzazione di 2 o 3 eventi di crossing-over indipendenti. Perciò diventa praticamente impossibile l'emergere di un virus ricombinante competente per la replicazione senza l'incorporazione di sequenze esogene. Quando si utilizzano cellule target trasdotte con il vettore virale HIV-1, solo l'RNA del plasmide vettore sarà trascritto inversamente e integrato nel DNA genomico dell'ospite. Tutte le proteine strutturali e qualsiasi proteina Rev trasferita nella particella rimarranno nel citoplasma della cellula e verranno degradate dagli endolisosomi cellulari (Zhang et al., n.d.).

DESCRIZIONE DEI VETTORI VIRALI:

Di seguito verranno mostrate le mappe dei vettori virali integrati all'interno delle cellule usate come modello per lo studio delle proteine accessorie di SARS-COV-2 e prodotte all'interno dei laboratori del CNIC (Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III) in particolare delle ORF 3a e 9b.



Per semplicità verrà mostrata la sola mappa dell'ORF 3a e solamente nella versione in cui quest'ultima è coniugata con il strep-tag. Sono stati usati anche cellule in cui le proteine accessorie avevano come partner di fusione la Green fluorescente protein (GFP).

Di rilevante all'interno di questa mappa si possono notare differenti elementi:

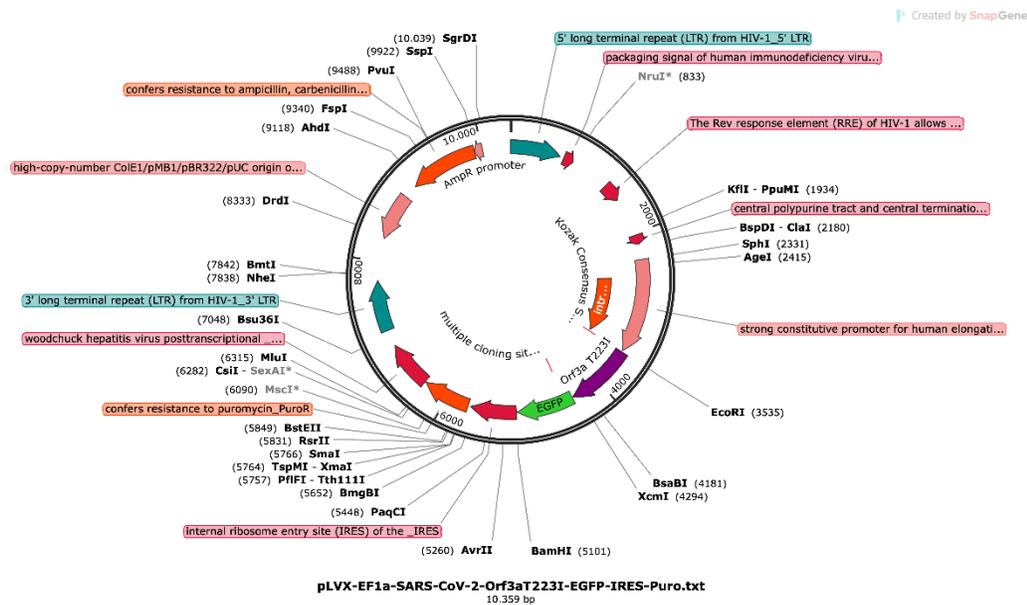
- Elementi LTR, precedentemente affrontati;
- EF-1 α promoter: Il fattore di elongazione umano-1 alfa (EF-1 alfa) è un promotore costitutivo di origine umana che può essere utilizzato per guidare l'espressione genica ectopica, essendo il promotore di un gene espresso in modo ubiquitario.
- Kozak consensus sequence: La sequenza consenso (basi maggiormente conservate e maggiormente rappresentative all'interno della popolazione degli mRNA valutati per definirla) di Kozak è un motif genico che funge da sito di inizio della traduzione proteica, mediando l'assemblaggio del ribosoma e l'inizio della traduzione. La sequenza consenso è così strutturata: 5'-(gcc)gccRccAUGG-3'. La

sequenza sottolineata rappresenta il codone di inizio codificante la metionina; le lettere in maiuscolo sono quelle maggiormente conservate; la R indica la presenza di una purina (A/G) presente nella quasi totalità dei casi (facendo riferimento alla totalità degli mRNA analizzati per definire la sequenza di kozak); le lettere minuscole denotano la base più comune in quella posizione dove la base può tuttavia variare (Kozak, n.d.).

- Strep-tag: il Strep-tag è una sequenza peptidica minimale di otto residui (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys) che presenta un'affinità intrinseca verso la streptavidina (proteina espressa dal batterio *Streptomyces avidinii* da cui ne deriva il nome) e può essere fusa a proteine ricombinanti in vari modi;
- IRES: Internal ribosome entry site (IRES) viene utilizzato per collegare l'espressione di più geni. Il posizionamento del gene marker di selezione a valle del gene di interesse garantisce che l'espressione del marker di selezione dipenda dalla trascrizione riuscita del gene di interesse (GOI);
- Il gene di resistenza alla puromicina: La puromicina è un antibiotico che inibisce la sintesi proteica e causa la terminazione prematura della catena durante la traduzione. È utilizzata in biologia cellulare come agente selettivo nei sistemi di coltura cellulare, dove la resistenza alla puromicina, conferita dal gene *pac* (puromicina N-acetil-transferasi), consente la selezione delle cellule che hanno integrato il vettore all'interno del genoma.
- Bla promoter: è un promotore debole di un gene che conferisce resistenza all'ampicillina (beta lattamasi) solitamente usato per produzione del vettore all'interno di *E.coli*.
- Ori: Rappresenta l'inizio della replicazione del vettore funzionale al mantenimento all'interno del genoma.
- Multiple cloning site: Anche chiamato polylinker è un segmento di DNA che contiene diversi siti riconosciuti dagli enzimi di restrizione, al fine di creare delle discontinuità all'interno del vettore per poterlo successivamente manipolare ed inserire all'interno di questo sito multipolo di clonaggio frammenti di nostro interesse;
- L'elemento regolatore post-trascrizionale del virus dell'epatite della marmotta (WPRE) previene il readthrough del sito di poliadenilazione (poly(A)), promuove il processamento e la maturazione dell'RNA e aumenta l'esportazione nucleare dell'RNA (Xu et al. 2003);
- cPPT/CTS: Una sequenza centrale di polipurina/sequenza di terminazione centrale crea un "flap di DNA" che aumenta l'importazione nucleare del genoma virale durante l'infezione delle cellule

target. L'elemento cPPT/CTS migliora l'integrazione del vettore e l'efficienza di trasduzione (Zennou et al. 2000)

Di seguito, per completezza verrà riportata anche la mappa del vettore che prevede la GFP come proteina di fusione di una proteina accessoria ed eventualmente sottolineate le differenze all'interno del vettore.



Basi teoriche dell'Immunofluorescenza:

Una volta ottenuta la linea cellulare trasfettata in modo stabile, mediante il sistema appena descritto (non verrà approfondito la parte sperimentale che permette al vettore virale di entrare all'interno delle cellule), verranno prese in esame alcune tecniche di indagine dell'effetto di queste proteine accessorie sulle linee cellulari utilizzate. In particolare ci focalizzeremo sull'indagine dell'influenza delle proteine accessorie 3a e 9b sull'organizzazione del citoscheletro. Per esplorare questo aspetto è stata utilizzata una tecnica di immunofluorescenza. Prima di descrivere la parte puramente sperimentale verranno affrontate le basi teoriche sui cui queste tecniche si basano.

L'immunofluorescenza (IF) trova applicazione nella valutazione di cellule in sospensione, cellule coltivate, tessuti, sfere e microarray per il rilevamento di proteine specifiche. Le tecniche di IF possono essere utilizzate su campioni freschi e fissati (come nel nostro caso)

Nelle tecniche di IF, gli anticorpi sono chimicamente coniugati a coloranti fluorescenti come

isotiocianato di fluoresceina (FITC) o isotiocianato di tetrametilrodamina (TRITC). Questi anticorpi marcati si legano (direttamente o indirettamente) all'antigene di interesse, permettendo il rilevamento dell'antigene attraverso tecniche di fluorescenza. La fluorescenza può essere quindi visualizzata utilizzando la microscopia a fluorescenza.

I due principali metodi di marcatura immunofluorescente sono la fluorescenza diretta e indiretta. Meno frequentemente utilizzata è la fluorescenza diretta, in cui l'anticorpo contro la molecola di interesse è chimicamente coniugato a un colorante fluorescente. Nell'immunofluorescenza indiretta, l'anticorpo specifico per la molecola di interesse (chiamato anticorpo primario) non è marcato, e un secondo anticorpo, anti-immunoglobulina, diretto verso la porzione costante (Fc) del primo anticorpo (chiamato anticorpo secondario) è chimicamente legato con il colorante fluorescente.

I vantaggi della fluorescenza diretta includono i tempi di colorazione del campione più brevi ed eventuali procedure di marcatura doppia e tripla più semplici. Gli svantaggi della fluorescenza diretta risiedono in un segnale più basso, generalmente un costo più elevato, minore flessibilità e difficoltà nella procedura di marcatura quando i coniugati diretti marcati commercialmente non sono disponibili. I vantaggi della fluorescenza indiretta, invece, includono una maggiore sensibilità rispetto alla fluorescenza diretta; si ha un'amplificazione del segnale poiché più di un anticorpo secondario può attaccarsi a ciascun anticorpo primario. Gli anticorpi secondari prodotti commercialmente sono relativamente economici, disponibili in una gamma di colori e controllati per la qualità. Gli svantaggi dell'immunofluorescenza indiretta includono il potenziale di reattività crociata (per cui sono solitamente necessari incubazione del solo anticorpo secondario per la valutazione della cross reattività) e la necessità di trovare anticorpi primari che non siano prodotti nella stessa specie o di isotipi diversi quando si eseguono esperimenti di marcatura multipla. L'immunofluorescenza si basa per l'appunto sulla rilevazione del fenomeno della fluorescenza.

La fluorescenza, così come anche la fosforescenza, sono entrambi tipi di luminescenza. Quando le molecole assorbono la luce, emettono luce di una lunghezza d'onda diversa. Con la fluorescenza, l'emissione di luce avviene estremamente rapidamente dopo l'assorbimento della luce di (eccitazione della fluorescenza), mentre con la fosforescenza l'emissione continua per millisecondi fino a minuti dopo che la fonte di energia è stata rimossa. I materiali fluorescenti emettono luce a causa della loro struttura atomica. Gli elettroni sono disposti in livelli di energia discreti che circondano il nucleo

dell'atomo, ciascuno con una quantità di energia predeterminata. Quando un elettrone assorbe l'energia di un fotone di luce, diventa "eccitato" e salta a un livello di energia superiore, meno stabile. Lo stato eccitato non dura a lungo. La durata dello stato eccitato è generalmente inferiore a 10^{-8} secondi. L'elettrone, al fine di tornare in una condizione di equilibrio, perde una piccola quantità di energia sotto forma di calore e l'energia extra rimanente viene emessa sotto forma di un fotone. La fluorescenza emessa ha un'energia inferiore rispetto alla luce assorbita, quindi la lunghezza d'onda della luce emessa (emissione della fluorescenza) è maggiore della lunghezza d'onda di eccitazione. Una gamma di lunghezze d'onda di luce può eccitare gli elettroni di un fluorocromo. Solitamente le molecole fluorescenti fluorescono quando colpite da luce con un range di lunghezza d'onda. Tuttavia, più la lunghezza d'onda di eccitazione è vicina ad un valore ottimale, maggiore sarà la fluorescenza prodotta. Questa lunghezza d'onda ottimale è chiamata picco di eccitazione, il punto massimo all'interno dello spettro di assorbimento di una data sostanza. Allo stesso modo, la luce prodotta dai fluorocromi ha una gamma di lunghezze d'onda con un picco di emissione. Il fenomeno per cui si ha lo spostamento di lunghezza d'onda da corta a lunga durante la fluorescenza è chiamato "shift di Stokes".

In generale ogni fluorocromo viene eccitato con efficienza diversa e, quindi, l'emissione risultante sarà di intensità diversa per concentrazioni equivalenti di fluorocromo. Conoscere le proprietà di eccitazione e emissione dei composti fluorescenti rende possibile selezionare appropriate combinazioni di fluorocromi. Inoltre affinché il fluorocromo sia appropriato dovrebbe possedere alcune caratteristiche:

- Un picco di assorbimento a una lunghezza d'onda di eccitazione disponibile sullo strumento di rilevamento della fluorescenza (alto coefficiente di estinzione molare alla lunghezza d'onda di eccitazione)
- Fluorescenza intensa (alta resa quantica), rapporto fra il numero di fotoni emessi e il numero di fotoni assorbiti (da 0 a 1)
- Uno spettro di emissione stretto che rientra in una delle bande di rilevamento dello strumento
- Buona fotostabilità
- Proprietà di fluorescenza che non sono significativamente alterate dalla coniugazione a un anticorpo o dall'ambiente locale del campione

Come per la maggior parte delle tecniche di fluorescenza, un problema significativo con

l'immunofluorescenza è il fotobleaching. Il fotobleaching è la distruzione fotochimica di un fluoroforo dovuta alla generazione di specie reattive dell'ossigeno nel campione. Tale fenomeno può essere minimizzato mediante la riduzione della luce di eccitazione sia in intensità che in durata.

L'autofluorescenza biologica nelle cellule dei mammiferi dovuta ai coenzimi flavinici (FAD e FMN: assorbimento, 450 nm; emissione, 515 nm) e ai nucleotidi piridinici ridotti (NADH: assorbimento, 340 nm; emissione, 460 nm) può essere problematica nel rilevamento delle sonde fluorescenti. I problemi dovuti all'autofluorescenza possono essere minimizzati selezionando sonde e filtri ottici che massimizzano il segnale di fluorescenza rispetto all'autofluorescenza.

Altri fattori che limitano l'IF includono le prestazioni dello strumento di rilevamento (cioè quanto bene è calibrato e impostato il microscopio), la specificità degli anticorpi e la preparazione del campione. Inoltre uno dei problemi da affrontare quando si misura la fluorescenza di più colori è la possibilità che i segnali di emissione si sovrappongano (overlapping), rendendo necessario rimuovere il segnale sovrapposto o questo darà un livello falso per uno o più probe (Sanderson et al. 2014; Robinson, Bs, and Kumar, n.d.).

PROTOCOLLO DI IMMUNOFLUORESCENZA:

Come accennato sopra è stato utilizzato un protocollo di immunofluorescenza, al fine di marcare le proteine citoscheletriche quali actina e tubulina, presentante il seguente assetto sperimentale.

Prima dell'inizio dell'intero protocollo è necessario procedere con la preparazione dei reagenti da utilizzare durante la procedura di fissazione e le diluizioni dei diversi fluorofori utilizzati.

Reagenti utilizzati:

- PEMP formato dal tampone PEM (0.1M pipes, 2mM MgCl₂, EGTA 0.38% a pH 6.8) a cui è stato aggiunto 4% di PEG (polietilenglicole);
- PEMPT formato da PEM con aggiunta di 0.5% di TritonX-100;
- Soluzione di fissazione composta da 6.75 ml PEM, 75 µl DMSO (dimetilsolfossido) e 0.8 ml di Formaledeide concentrata al 37%;

- Soluzione di bloccaggio con un 3% di BSA risospesa in PBS 1x
- Diluizione dell'anticorpo primario murino DM1A (targhettante la tubulina) diluito in rapporto 1/3000 nella soluzione di bloccaggio;
- Diluizione 1/1000 in PBS 1x di anticorpo secondario (diretto contro la porzione Fc del primario) di capra coniugato con un fluoroforo denominato Alexa 488;
- Diluizione 1/400 in PBS 1x di Phalloidin texas red selettivo per la proteina actina;
- Diluizione 1/1000 in PBS 1x del colorante DAPI

Il giorno prima della messa in atto del protocollo le cellule (in questo caso le A549) sono state distaccate dalla fiaschetta, mediante tripsinizzazione, contate e seminate in concentrazione di 60.000 cellule per pozzetto (cristallo) su dei cristalli del diametro di 14mm all'interno di un multiwell da 24 pozzetti e incubate over night per a 37 °C, in presenza di DMEM, al fine di farle aderire sul cristallo.

Successivamente, dopo l'incubazione overnight:

1. Veniva aspirato il medium (non necessariamente in sterilità) e aggiunti 500 µl di PEMP e incubato a temperatura ambiente (RT) per 5 minuti;
2. Aspirazione del PEMP e aggiunta di 500 µl di PEMPT e incubazione per un massimo di 2 minuti a RT;
3. Aspirazione del PEMP e aggiunta di 500 µl di soluzione di fissazione con un'incubazione di 30 minuti a RT;
4. Lavaggio per tre volte con soluzione PBS 1x;
5. Dopo aver aspirato la soluzione di lavaggio aggiungere 200 µl di soluzione di bloccaggio ed incubare a 37 °C per 30 minuti;
6. Aggiunta, dopo aspirazione, di 200 µl di soluzione dell'anticorpo primario e incubazione a 37 °C per un'ora;
7. Lavaggio di tre volte con PBS 1x;
8. Aggiunta di 200 µl della diluizione di anticorpo secondario e incubazione a 37°C per un'ora;
9. Lavaggio per tre volte con PBS 1x;
10. Aggiunta di 200 µl della diluizione Phalloidin e incubazione per un'ora a RT;
11. Lavaggio per due volte con PBS 1x;
12. Incubazione con 200 µl della diluizione contenete DAPI per 15 minuti a RT;
13. Due lavaggi con PBS 1x seguito da un ultimo lavaggio con incubazione del PBS 1x per 5 minuti a RT.

Successivamente, senza procedere con l'aspirazione del PBS, prelevare i cristalli a livello del bordo e disporli, a faccia in giù, su di una goccia di tampone di montaggio (FluorSave™) in un vetrino porta oggetti.

Razionale sull'uso dei reagenti di immunofluorescenza:

Di interesse è approfondire la finalità che i reagenti e alcuni passaggi hanno all'interno del protocollo.

Il PEM, contenente pipes (Acido 1,4-piperazinadietansolfonico) il quale conferisce a questo tampone di avere alcune caratteristiche pKa medio, massima solubilità in acqua e minima solubilità in tutti gli altri solventi, minimi effetti dei sali, minima variazione del pKa con la temperatura, stabilità chimica ed enzimatica, minimo assorbimento nel range visibile o spettrale UV. Poiché il suo pKa a 37 °C si avvicina al pH fisiologico, il PIPES trova applicazione nelle colture cellulari. Soprattutto utile nel minimizzare la perdita dei lipidi e la perdita della morfologia cellulare quando viene usato come fissante la glutaraldeide (Good et al. 1966).

Invece il reagente contenente il TritonX-100 ha lo scopo di permeabilizzare la cellula consente l'accesso a antigeni intracellulari o intraorganellari (Rosas-Arellano et al. 2016).

Per quanto riguarda il rationale alla base dell'uso del polietilenglicole all'interno del protocollo di immunofluorescenza non è stata trovata in letteratura alcuna notizia in merito.

Un'altra importante tappa è rappresentata dalla soluzione di fissazione. L'obiettivo è ottenere una buona preservazione morfologica mantenendo al contempo l'antigenicità. Inoltre, la fissazione aiuta a prevenire un'artefatta diffusione dei componenti cellulari, arresta l'attività enzimatica e evita la decomposizione. Il processo di fissazione contribuisce a preservare il campione inibendo la crescita batterica e fungina e inibendo gli enzimi lisosomiali la cui attività potrebbe portare all'autolisi. Il fissativo più ampiamente usato per l'immunostaining è la formaldeide, da sola o in combinazione con un solvente come il metanolo. Quest'ultimo viene spesso aggiunto alle preparazioni commerciali per stabilizzare la formaldeide, anche se, in questo caso, veniva riportato sul protocollo utilizzato che il metanolo avrebbe potuto interferire con la polimerizzazione delle fibre di actina. I fissativi a base di

formaldeide stabilizzano i tessuti reagendo principalmente con gli amminoacidi basici per formare legami incrociati metilenici ed il numero di ponti metilenici formati dipende dalla concentrazione di formaldeide, dalla temperatura, dal pH e dal tempo di esposizione (Walker, n.d.).

Dopo aver valutato lo scopo dei primi reagenti adesso verrà fatta una panoramica sugli aspetti più salienti relativo all'uso dei fluorofori utilizzati, focalizzandoci sul rationale nell'utilizzarli all'interno di questo protocollo.

Innanzitutto prima di partire con l'aggiunta dei fluorofori è necessario effettuare un'incubazione con una cosiddetta soluzione di bloccaggio. Tale soluzione è necessaria al fine di prevenire il legame non specifico degli anticorpi. Altrimenti, gli anticorpi o altri reagenti di rilevamento si legheranno a qualsiasi sito disponibile.

Natura dei fluorofori utilizzati

Un altro approfondimento è dedicato alla comprensione su cui si può basare l'affinità dei fluorofori DAPI e Phalloidin texas red rispettivamente per il DNA e per i filamenti dell'actina. Mentre per gli anticorpi è più noto il meccanismo che conduce questi ad avere affinità con l'epitopo lo è meno per la parte di probe "chimici".

Il DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindolo) è un comune marker fluorescente per il DNA. Viene ampiamente utilizzato come sonda fluorescente per il solco minore, dando origine al cosiddetto "effetto interruttore della luce". Questo comportamento di interruttore della luce si riferisce all'aumento drastico dell'emissione fluorescente (circa 20 volte maggiore rispetto allo stato non legato) al legarsi selettivamente al solco minore nelle regioni ricche di AT del DNA a doppio filamento (dsDNA). È anche riportato che DAPI forma complessi intercalanti con le sequenze GC del dsDNA, DNA a singolo filamento e RNA, ma in quel caso si osserva una variazione molto più limitata della fluorescenza emessa (Biancardi et al. 2013). Il motivo del legame, secondo uno studio strutturale, è attribuibile all'azoto dell'indolo che forma un legame idrogeno con gli atomi di ossigeno O2 della timina. Analogamente al comportamento che alcuni farmaci, come la netropsina e l'Hoechst 33258, hanno si può dedurre il motivo del legame fra DAPI e DNA. La preferenza di tutti e tre questi farmaci per le regioni AT del B-DNA è una conseguenza

di tre fattori: (1) Il solco minore intrinsecamente più stretto nelle regioni AT rispetto alle regioni GC del B-DNA, che porta a un adattamento perfetto degli anelli aromatici piatti dei farmaci tra le pareti del solco, (2) Il potenziale elettrostatico più negativo all'interno del solco minore nelle regioni AT, attribuibile in parte all'assenza di gruppi -NH₂ elettropositivi lungo il pavimento del solco, e (3) Il vantaggio sterico dell'assenza degli stessi gruppi -NH₂ della guanina, permettendo così alla molecola del farmaco di affondare più profondamente nel solco (Larsen et al. 1989)

Altro attore importante usato al fine di evidenziare poi la struttura del citoscheletro è stata la falloidina, opportunamente coniugata con un fluoroforo che in un questo caso era il TexasRed. La Falloidina è una tossina fungina, sottoforma di eptapeptide biciclico contenente aminoacidi non comuni, la cui attività tossica è legato al suo legame per la proteina citoscheletrica actina. La falloidina, utilizzata abitualmente per stabilizzare e marcare i filamenti di actina, sospende i cambiamenti strutturali nell'actina, influenzando probabilmente la sua interazione con le proteine leganti l'actina. La falloidina si lega non covalentemente ad un sito costituito da tre subunità di actina provenienti da entrambi i filamenti e stabilizzano il filamento mediante ampie interazioni idrofobiche e probabilmente è ritenuto che ulteriori legami idrogeno stabilizzino l'interazione con la falloidina. Nella fattispecie è verosimile che partecipino al legame con la falloidina i residui Asp179, Gly197, Ser199 ed Glu205 contribuiscano al legame idrogeno con la falloidina. Inoltre, è possibile la presenza di legami idrogeno anche tra la falloidina e Glu72 e Arg290. Per ampliare brevemente la falloidina quindi previene la depolimerizzazione dei filamenti dell'actina "intrappolando" diversi stati conformazionali a seconda del momento in cui viene aggiunta all'actina (Pospich, Merino, and Raunser 2020) e ciò è verosimile ne influenzi poi l'aspetto macroscopico (punto che verrà ripreso durante il paragrafo risultati e discussione)

Un ultimo breve approfondimento è dedicato alle classi di fluorofori che marcano le molecole che sono funzionali nel legame alle proteine di interesse (actina e tubulina) che nella fattispecie sono i fluorofori delle classi Alexa e Texas, rispettivamente coniugate all'Ab secondario e alla falloidina.

Il derivato clorosulfonilico del fluoroforo a emissione rossa, sulforodamina 101, o texas red, inizialmente è stato sintetizzato per fornire un reagente per l'accoppiamento ai gruppi amminici su proteine e altri composti. I coniugati di Texas Red con anticorpi e altre proteine mantengono le loro attività biologiche e sono risultati fortemente fluorescenti. In genere è stato trovato vantaggioso l'utilizzo di questo composto in quanto gli spettri di eccitazione e emissione dei coniugati di Texas Red

sono ampiamente separati da quelli delle molecole marcate, ad esempio, con isotiocianato di fluoresceina (Titus et al. 1982).

Per quanto riguarda i coloranti della famiglia Alexa, quindi Alexa 350, Alexa 430, Alexa 488, Alexa 532, Alexa 546, Alexa 568 e Alexa 594, rappresentano una nuova serie di coloranti fluorescenti con spettri di emissione/eccitazione simili a quelli di AMCA, Lucifer Yellow, fluoresceina, rodamina 6G, tetrametilrodamina o Cy3, lissamina rodamina B e Texas Red, rispettivamente. I numeri nei nomi Alexa indicano la lunghezza d'onda massima di eccitazione approssimativa in nm. Tutti i coloranti Alexa e i loro coniugati sono più fluorescenti e più fotostabili rispetto ai loro analoghi spettrali comunemente usati sopra elencati. Inoltre, i coloranti Alexa sono insensibili al pH nel range 4-10. È stato notato come il coniugato di GAM (goat anti-mouse IgG) con il colorante Alexa 488 è più fluorescente rispetto al coniugato GAM di fluoresceina (FITC) al grado ottimale di labeling. Ciò è stato dedotto da curve di intensità della fluorescenza rispetto al grado di labeling, le quali, nel composto con FITC, mostrano tipicamente prima un ampio picco e successivamente uno smorzamento della fluorescenza del coniugato dopo aver raggiunto il grado ottimale di etichettatura. Tuttavia, Alexa 488–GAM è ancora molto luminoso anche con un alto numero di molecole di colorante per molecola di anticorpo, mentre, appunto, la fluorescenza di fluoresceina–GAM è generalmente più debole e smorzata quando si superano le 8 molecole di colorante per GAM. Inoltre, un altro aspetto che ha reso interessante l'uso dei fluorofori Alexa risiede in una minor precipitazione, durante la coniugazione con i coloranti Alexa, delle proteine rispetto ai coloranti con proprietà spettrali analoghe (Panchuk-Voloshina et al. 1999).

Per completezza di seguito viene riportato lo spettro di eccitazione/emissione della fluorescenza dei fluorofori utilizzati. I valori di eccitazione ed emissione di DAPI, Alexa488 e di TexasRed sono rispettivamente 358/457; 500/520; 595/613

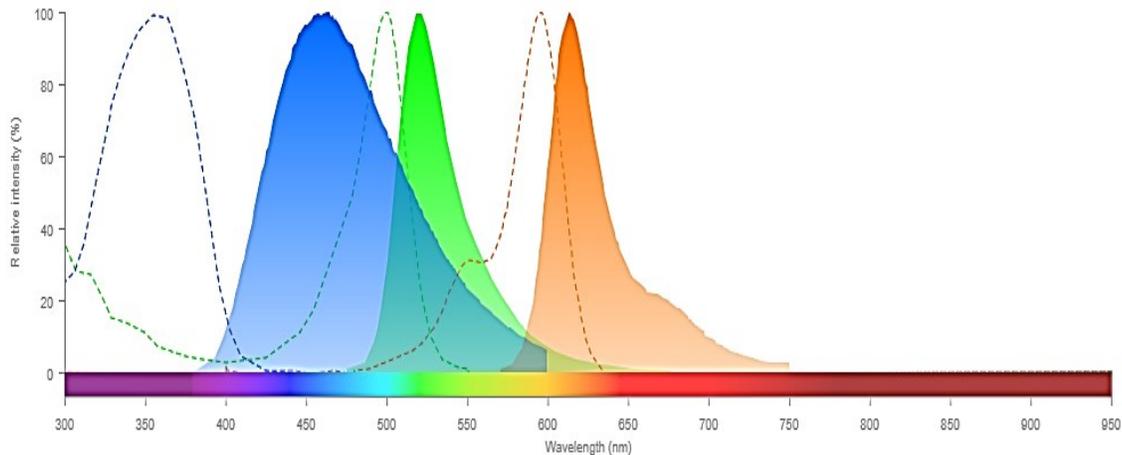


Figura 6: Con le linee tratteggiate vengono visualizzati gli spettri di eccitazione della fluorescenza. Le curve piene rappresentano gli spettri di emissione della fluorescenza. In blu è rappresentato lo spettro del DAPI, in verde è stato rappresentato lo spettro del fluoroforo Alexa488 e in rosso è rappresentato lo spettro del fluoroforo TexasRed.

Successivamente, dopo aver lasciato asciugare i campioni essi sono stati visualizzati mediante il microscopio a fluorescenza. I parametri importanti da tenere in considerazione durante la visione erano il binning, l'exposure time e il livello di luce bianca che illuminava il campione.

Per quanto riguarda il binning, nel contesto dell'elaborazione delle immagini, è la procedura di combinare gruppi di pixel adiacenti in tutta l'immagine in singoli pixel. Ad esempio, nel binning 2x2, un insieme di 4 pixel diventa un singolo pixel più grande, riducendo il numero di pixel a 1/4 e dimezzando la risoluzione dell'immagine in ciascuna dimensione. Il risultato può essere la somma, la media, il valore mediano, minimo o massimo del gruppo. Questa aggregazione, sebbene associata a una perdita di informazioni, riduce la quantità di dati da elaborare, facilitando l'analisi. L'immagine binned ha una risoluzione inferiore, ma il livello relativo di rumore in ciascun pixel è generalmente ridotto. Durante la visualizzazione al microscopio elettronico il sistema di binning non è stato utilizzato.

Un altro parametro importante risiede nella gestione del valore di exposure time.

Il tempo di esposizione è la durata durante la quale la fotocamera raccoglie la luce dal campione, più lungo è il tempo di esposizione, più fotoni riceverà il rilevatore, risultando in una maggiore intensità dei pixel e un'immagine più "luminosa" e ciò contribuisce all'intensità del segnale. Ci sono in genere compromessi tra il tempo di esposizione, la luminosità dell'immagine e la fototossicità, compromesso da verificare momento per momento in base alla "qualità" del campione o della zona analizzata, che

sarà dipendente dal protocollo utilizzato e dalle modalità operative durante la fase di sperimentazione. Essendo quella effettuata solamente una valutazione qualitativa delle immagini è stato accettabile definire l'exposure time al fine di raccogliere immagini più definite. Alternativamente, per metodologie che prevedono la quantificazione, sarebbe stato opportuno non cambiare il valore di exposure time fra i differenti campioni, ma settarlo in base al campione che ha il segnale più luminoso previsto, senza saturare nessuno dei pixel. Se l'obiettivo dovesse essere di tipo quantitativo è opportuno scattare immagini sia per i campioni di controllo che per quelli trattati (nel nostro caso sarebbe stato cellule WT confrontate con quelle esprimenti le proteine accessorie) utilizzando lo stesso tempo di esposizione, altrimenti non sarà possibile confrontare le loro intensità durante successive analisi (www.thermofisher.com)

Successivamente, dopo la valutazione del citoscheletro mediante immunofluorescenza sono state presi in considerazione due esperimenti condotti con due metodologie differenti per accertarsi che le cellule esprimessero realmente le proteine accessorie. Essendo stata notata una non differenza fra i campioni esprimenti le proteine e i campioni WT durante le analisi di microscopia ed essendo tali differenze attese si è deciso di verificarne l'espressione.

Le tecniche utilizzate sono state il citometro a flusso e il western blotting.

Teoria del Western Blotting:

Il western blotting è una tecnica che coinvolge la separazione delle proteine tramite elettroforesi su gel, il loro trasferimento su una membrana e il rilevamento selettivo di un antigene immobilizzato. Questo metodo dipende dalla specificità dell'interazione antigene-anticorpo, ed è utile per l'identificazione, qualitativa o semiquantitativa, di proteine specifiche e del loro peso molecolare da una miscela complessa. Il western blotting o immunoblotting si riferisce alla separazione delle proteine tramite elettroforesi su gel di poliacrilammide (PAGE), basata sulla loro dimensione, il loro successivo trasferimento e immobilizzazione su un supporto membranoso e la loro rilevazione selettiva utilizzando un sistema reporter mediato da anticorpi. Il primo passo è la preparazione del campione che richiede la solubilizzazione delle proteine in un buffer di lisi, spesso contenente inibitori delle proteasi e detergenti. È poi necessario, al fine di caricare la medesima quantità di proteina, la determinazione della concentrazione proteica, ad esempio, utilizzando saggi colorimetrici, basati sui valori di assorbanza, come Bradford. Ciò è inoltre importante poiché i gel di poliacrilammide hanno una capacità

di carico proteico limitata per ottenere una separazione adeguata dei pesi molecolari. Il campione proteico solubile è diluito con un buffer di caricamento del campione che contiene un colorante indicatore come il blu di bromofenolo, il detergente anionico denaturante, come il sodio dodecil solfato (SDS) e glicerolo. Il campione di caricamento può quindi essere denaturato riscaldandolo per 5-10 min tra 70 e 100 °C. Questo processo comporta la perdita delle strutture conformazionali secondarie delle proteine e le circonda con molecole di SDS, che impartiscono una carica negativa in modo che tutte le proteine migrino verso il polo positivo durante la corsa elettroforetica. Prima della denaturazione termica, un agente riducente chimico, come il ditiotreitolo (DTT) o 2-mercaptoetanololo, può essere aggiunto al campione per distruggere i legami disolfuro intra e inter-molecolari, "srotolando" ulteriormente le strutture proteiche secondarie e terziarie. Altro aspetto da valutare all'interno di esperimenti di western blotting è la percentuale di poliacrilammide utilizzata nel gel che, assieme al sistema buffer, influenzerà la mobilità delle proteine attraverso il gel, dove è la dimensione attesa della proteina target che è utilizzata per selezionare il miglior sistema gel/buffer per ottenere una separazione ottimale. I campioni proteici preparati sono caricati nei pozzetti del gel, dove il colorante fornisce un'indicazione del fatto che il campione venga posizionato correttamente all'interno del pozzetto, azione aiutata dalla presenza del glicerolo che favorisce la sedimentazione del campione sul fondo del pozzetto, evitando che materiale venga perso nel buffer di corsa o che contaminino altri pozzetti contenenti differenti campioni. Una volta caricati si procede con l'applicazione di un voltaggio e le proteine migrano attraverso il gel, separandosi per carica e dimensione. Uno standard proteico composto da un pool di proteine di pesi molecolari noti è incluso in un pozzetto al fine di aiutare nella determinazione della proteina di interesse. In genere gli standard proteici sono colorati e questo è di aiuto poiché si separano visivamente nel gel durante l'elettroforesi e forniscono una misura della distanza percorsa, il grado di separazione e una successiva valutazione dell'efficacia di trasferimento delle proteine alla membrana. Successivamente le proteine separate nel gel vengono trasferite e immobilizzate su una membrana di nitrocellulosa o di fluoruro di polivinilidene (PVDF). Le membrane vengono bloccate lavate, e incubate con un anticorpo primario specifico per l'analita.

Il "bloccaggio" della membrana di nylon ha lo scopo di evitare ibridazioni aspecifiche fra l'anticorpo e la membrana di nylon. Viene utilizzata proteina in genere albumine del siero bovino per le quali l'anticorpo non avrà interazione. Ciò è seguito per evitare falsi positivi. Invece i lavaggi hanno lo scopo di eliminare tutto ciò che non si è legato fortemente alla membrana, anche qui per evitare falsi positivi.

Due sono i più comuni: l'uso di un anticorpo primario etichettato direttamente con un reporter o l'uso di un anticorpo secondario etichettato con un reporter diretto contro l'anticorpo primario. Il reporter coniugato all'anticorpo può variare, come un enzima che produce un prodotto di reazione colorata o un segnale luminescente nel sito di legame antigene-anticorpo quando esposto a un substrato, o un segnale fluorescente diretto che viene generato dall'eccitazione a una specifica lunghezza d'onda (Hnasko, n.d.)

Retta di taratura:

Prima di procedere con il western blotting è stato necessario conoscere la concentrazione proteica dei campioni. Ciò è stato ottenuto mediante l'ottenimento di una curva di calibrazione la cui equazione è stata ottenuta mediante l'interpolazione di valori di concentrazione crescenti di BSA e il valore di assorbanza. L'equazione della retta di taratura è stata poi utilizzata per verificare, mediante il solo valore di assorbanza del campione, la concentrazione.

Per la determinazione della retta di taratura è stata utilizzata una multiwell da 96 pozzetti che sono stati caricati con:

BSA ug/well	0	1	2	3	4	5	6
STOCK BSA (1mg/mL) ul	-	2	4	6	8	10	12
Lysis buffer (ul)	2	2	2	2	2	2	2
Water (ul)	18	16	14	12	10	8	6
BCA reagent (50 parts A: 1 parts B) ul	200	200	200	200	200	200	200

In ordine: nella prima lane c'è il valore di concentrazione finale in ogni singolo pozzetto di BSA; nella seconda lane è presentato il valore di BSA caricato; nella terza lane è indicato il volume di lysis buffer aggiunto, essendo esso presente nel campione è opportuna la sua aggiunta anche durante la preparazione della curva standard. Per ultimo sono stati aggiunti acqua (per raggiungere un volume finale, senza reagente BCA, di 20 µl) e 200 µl di reagente BCA che permette di rilevare l'assorbanza dopo reazione colorimetrica, reazione che viene fatta venire in incubatore a 37 °C per 30 minuti.

Per la preparazione del campione vengono prelevati 2 μl di campione e aggiunti 18 μl di acqua e solo successivamente 200 μl di reagente BCA. Il campione è stato preparato in triplicato e la curva standard in duplicato.

Solitamente il reagente BCA è ottenuto miscelando 50 parti di reagente A e una parte di reagente B, quindi, nel nostro caso, $200 \mu\text{l}/51=3.92 \mu\text{l}$. $3.92 \mu\text{l} \cdot 50$ nel caso del reagente A e $3.92 \mu\text{l} \cdot 1$ nel caso del reagente B.

Il saggio proteico BCA è un metodo per la rilevazione colorimetrica e la quantificazione delle proteine totali. I saggi proteici BCA di Pierce combinano la ben nota riduzione di Cu^{2+} a Cu^{+} da parte delle proteine, in particolare i residui che contribuiscono alla riduzione di Cu^{2+} includono cisteina, cistina, triptofano, tirosina e legami peptidici in un ambiente alcalino (nota anche come reazione del biuretto) con la rilevazione colorimetrica altamente sensibile e selettiva dell'ossido rameoso (Cu^{+}) da parte dell'acido bicinconinico (BCA). I due reagenti sono così composti:

Reagente A: 1 g di bicinchoninato di sodio, 2 g di Na_2CO_3 , 0.16 g di tartrato di sodio, 0.4 g di NaOH e 0.95 g di NaHCO_3 , portati a 100 ml e il pH regolato a 11.25 con NaOH solido o concentrato.

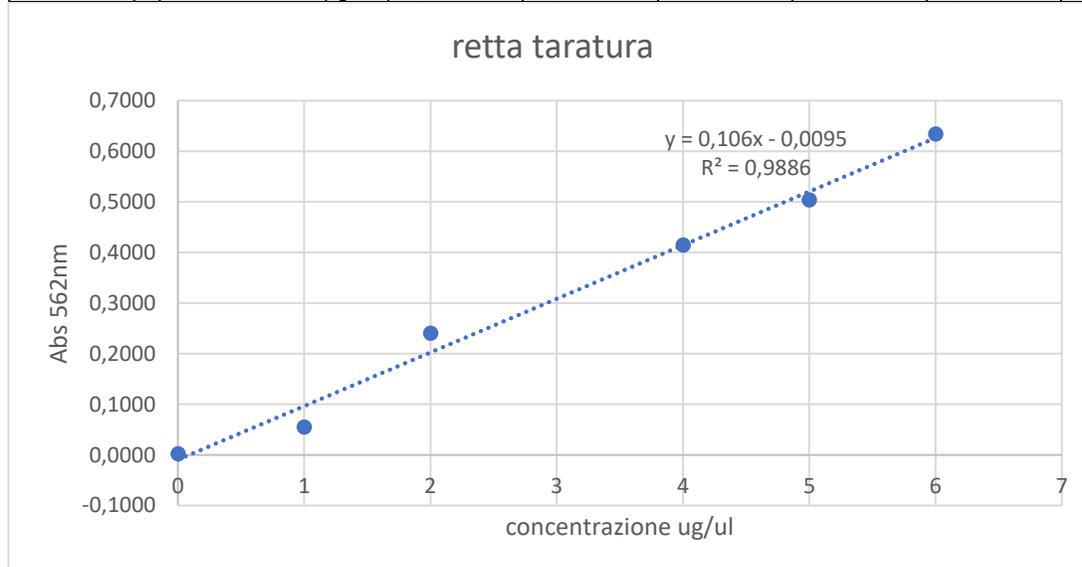
Reagente B: 0.4 g di $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ disciolti in 10 ml di acqua.

Durante l'incubazione ciò che avviene è la chelazione del rame con la proteina in un ambiente alcalino per formare un complesso colorato blu. In questa reazione i peptidi formano un complesso chelato colorato con ioni cuprici in un ambiente alcalino contenente tartrato di potassio e sodio. Gli amminoacidi singoli e i dipeptidi non sono influenzati nella reazione del biuretto, ma i tripeptidi e i polipeptidi più grandi o le proteine reagiranno per produrre il complesso da blu chiaro a viola che assorbe la luce a 540 nm. Uno ione cuprico forma un complesso di coordinazione colorato con quattro-sei legami peptidici vicini. L'intensità del colore prodotto è proporzionale al numero di legami peptidici che partecipano alla reazione. In un secondo momento, l'acido bicinconinico, un reagente di rilevazione colorimetrica altamente sensibile e selettivo, reagisce con il catione cuproso (Cu^{+}) che si è formato nel primo passo e produce un colore viola. Il complesso BCA-rame è solubile in acqua e presenta una forte assorbanza a 562 nm che ha un andamento lineare con l'aumento delle concentrazioni proteiche (Noble and Bailey 2009).

Successivamente è stata ottenuta, in ordine temporale, l'assorbanza della sospensione contenente BSA,

la retta di taratura, il valore di assorbanza delle proteine presenti nei campioni (WT, GFP ana, GFP old, 3aGFP, 9bGFP, GFP fede), la concentrazione dei campioni e infine il volume da caricare all'interno dei pozzetti per ottenere 20 µg di proteine. Per ottenere la retta di taratura è stata valutata la media dei valori di assorbanza dei pozzetti contenete la BSA, sottratti del valore del bianco (pozzetto contenete tutte le componenti, per determinare il loro valore di assorbanza, escluso la proteina BSA). Successivamente l'equazione della retta di taratura è stata utilizzata, mediante il valore dell'assorbanza del campione, per trovare la concentrazione del campione.

	Standard curve							Blank1
MEDIA abs BSA	0,1031	0,1557	0,3412	0,4656	0,5152	0,6048	0,7348	0,1007
MEDIA abs BSA-bianco	0,0024	0,0551	0,2405	0,3650	0,4145	0,5041	0,6341	
Concentrazione BSA (µg/ul)	0	1	2		4	5	6	0
CAMPIONI	WT	GFP ana	GFP old	3aGFP	9bGFP	GFP fede		
MEDIA abs proteine ignote	0,3354	0,4968	0,2363	0,3702	0,4623	0,4886		
Abs proteine - bianco	0,2347	0,3962	0,1357	0,2695	0,3617	0,3880		
valore di conc. µg/ul	2,303931	3,827201	1,369654	2,632233	3,501415	3,749528		
µg caricati								
Volume in µl per caricare 20 µg	8,680816	5,225751	14,60223	7,598112	5,711976	5,334004		



Questa è la retta di taratura ottenuta mediante la BSA. Di questa retta si sfruttano i valori del coefficiente angolare e il valore dell'intercetta (rispettivamente 0.106 e -0.0095). Il valore noto è quello dell'assorbanza, ovvero il valore della y e la nostra incognita è la x, il valore di concentrazione che riusciamo a ricavare applicando la seguente formula: $(y-m)/q$.

I valori di assorbanza sia della curva di taratura che del campione sono stati ottenuti mediante la lettura del valore di assorbanza a 562 nm con l'uso del Multiskan SkyHigh Microplate Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific).

Protocollo Western Blotting:

Per meglio far avvenire la corsa elettroforetica è stato necessario preparare due tipologie differenti di gel, uno definito Stacking, che ha lo scopo di far correre al medesimo livello tutte le proteine, e un altro definito running che effettivamente separerà le proteine in base al peso molecolare.

Il running gel utilizzato era al 12.50% di Acril/Bisacrilammide (30%) ed è così composto:

- H₂O (ml) 2.91
- 1 MtrisHCL pH 8.8 (ml) 2.25
- Acril/Bisacrilammide (30%) (ml) 3.75
- SDS (20%) (μl) 45
- PSA (10%) (μl) 33.75
- TEMED (μl) 11.25

Stacking gel utilizzato era al 3% di Acril/Bisacrilammide (30%) ed è così composto:

- H₂O (ml) 1.905
- 1 MtrisHCL pH 6.8 (ml) 0.75
- Acril/Bisacrilammide (30%) (μl) 300
- SDS (20%) (μl) 27
- PSA (10%) (μl) 22.5
- TEMED (μl) 75

Qui il temed e l'aps permettono la polimerizzazione dell'acrilammide.

Viene quindi prelevato il corretto volume di campione e trasferito in una nuova eppendorf inserendo

anche il tampone di carica e H₂O per un volume finale di 25 µl. L'eppendorf è successivamente messa in un termoblocco a 95 °C per un totale di 5 minuti e successivamente in ghiaccio per altri 5 minuti spinnarli e caricarli all'interno dei pozzetti. Assieme ai campioni viene fatto correre anche il marcatore molecolare prelevandone 5 µl (Precision Plus Protein standard Dual color BIO RAD). Il gel è fatto poi correre, immerso nel Running Buffer, a 110 V per 1h e 30 minuti approssimativamente.

Il Running Buffer 10x (da diluire poi all'1x) è così composto:

- 30 g TRIS HCl;
- 144 g Glicina;
- 10 g SDS;
- H₂O a volume di 1 litro.

A pH neutro, la glicina forma prevalentemente la forma zwitterionica, mentre a pH alto (running gel) la glicina perde cariche positive e diventa prevalentemente anionica. Nel gel di raccolta (stacking), i più piccoli ioni cloruro, carichi negativamente, migrano davanti alle proteine (come ioni definiti di guida) e i leggermente più grandi ioni glicinati, carichi negativamente e parzialmente positivamente, migrano dietro le proteine (come ioni iniziali di scia), mentre nel gel di separazione, relativamente basico, entrambi gli ioni migrano davanti alle proteine. Il gradiente di pH tra i buffer del gel di stacking e del gel di separazione porta a un effetto di stacking al confine tra il gel di stacking e il gel di separazione, poiché il glicinato perde parzialmente le sue cariche positive rallentanti con l'aumento del pH e poi, come ione di scia, supera le proteine e diventa uno ione di guida, il che fa sì che le bande delle diverse proteine diventino più strette e più nitide (Kurien and Scoo Eld Editors, n.d.).

Successivo alla corsa elettroforetica si procede con il trasferimento delle bande (proteine) e del marcatore sulla membrana di PVDF (polivinilidenefluoruro). La membrana deve essere prima attivata in metanolo (poiché tale membrana è altamente repellente all'acqua) per un tempo di 30-60 secondi e successivamente lavata con acqua milliQ. Ora saà necessario assemblare il cosiddetto sandwich, formato da filtro di carta, membrana, gel, filtro di carta e il tutto assemblato in un contenitore che permetta l'aderenza fra tutti i componenti. La corsa è stata condotta a 100 V per 1 ora. Tale corsa è stata effettuata in transfer buffer, il quale è così composto:

- 100 ml Tis-glicina;
- 200 ml metanolo;
- H₂O per arrivare a volume di 1 litro.

Il metanolo, è tipicamente presente nel buffer di trasferimento e aiuta a rimuovere l' SDS dalle proteine trasferite dai gel di poliacrilammide contenenti SDS denaturante. Inoltre stabilizza la geometria del gel durante il processo di trasferimento e tende ad aumentare la capacità di legame della membrana per le proteine (Kurien Biji T. and Scofield 2009).

Finita la fase di trasferimento sulla membrana essa va bloccata mediante l'uso di una soluzione di bloccaggio, che è così composta:

- 50 ml TBS 10x;
 - 450 H₂O;
 - 500 µl Tween20;
 - 5 % di BSA
- } Tamopone TTBS

La soluzione di bloccaggio è permasta sulla membrana in agitazione per un'ora a RT.

La successiva operazione prevede l'aggiunta di anticorpo primario in diluizione 1/1000 per l'anticorpo diretto contro la GFP (poiché sono state utilizzate cellule che ponevano come partner di fusione la GFP, più facile da detectare essendo più grande di un semplice ST tag) e una diluizione 1/5000 per il presunto gene housekeeping tubulina. Entrambe sono state risospese nello stesso buffer usato per il bloccaggio. Per entrambi sono stati utilizzati come volume finale, il minimo necessario per coprire pienamente la membrana, di 10 ml e aggiunti 10 µl di anticorpo anti-GFP (Rabbit) e 2 µl di anticorpo anti-tubulina (mouse). La soluzione anticorpale è stata incubata overnight a 4 °C.

Successivamente, per eliminare la possibilità di falsi positivi, sono stati rimossi gli Ab legati con poca stringenza mediante tre lavaggi da cinque minuti ciascuno con il tampone TTBS.

Infine devono essere aggiunti gli anticorpi secondari, anti-mouse per rivelare la tubulina e anti-rabbit per la rivelazione della GFP. Gli anticorpi secondari vengono entrambi usati nella diluizione 1/5000, quindi 2 µl di Ab 2° in TTBS. L'incubazione è effettuata per 45 minuti a RT.

Seguono poi quattro lavaggi da cinque minuti di incubazione ciascuno. L'ultimo step è la rivelazione

delle bande mediante l'uso dello strumento Chemidoc e un substrato che è in grado di fornire chemiluminescenza, sfruttando la reazione di trasformazione di una sostanza mediata da un enzima, nella fattispecie una perossidasi di rafano.

Un'ultima tecnica utilizzata per la valutazione dell'espressione proteica, delle cellule esponente le ORF 3a e 9b in fusione con la GFP, è stata la citometria a flusso. Operativamente quello che è stato necessario, essendo le GFP in possesso di auto fluorescenza, è stato semplicemente raccogliere 200.000 cellule, centrifugarle, in modo da eliminare il medium culturale, e lavarle in PBS 1x. Successivamente, dopo un'ulteriore centrifugazione, sono state risospese in PBS 1x e l'espressione è stata valutata mediante citometria.

Basi teoriche della Citometria a flusso:

La citometria a flusso è una tecnica per valutare l'espressione proteica e il fenotipo delle cellule vive. In generale il profilo di espressione proteico (combinazioni proteiche) conferiscono alle cellule il loro fenotipo unico, contro cui, eventualmente, vengono sviluppati e utilizzati anticorpi specifici per identificare le popolazioni di cellule che esprimono queste proteine. Oltre a identificare le cellule, le popolazioni miste di cellule vive, eventualmente esprimenti diversi valori di POI (protein of interest), devono essere separate, o ordinate, in base al fenotipo. La citometria a flusso è composta da tre componenti essenziali: strumentazione, anticorpi monoclonali e fluorocromi.

I citometri a flusso, basati su sistemi fluidici, sono composti da un sistema fluidico progettato per muovere le cellule attraverso lo strumento, uno o più laser per eccitare i fluorocromi, un sistema ottico per rilevare la luce emessa dai fluorocromi eccitati e un software per tradurre i dati raccolti in un output di facile lettura per l'utente. Un ulteriore aspetto rilevante è la disponibilità di anticorpi robusti, specifici e sensibili. A differenza degli anticorpi necessari per il Western blot, che rilevano epitopi lineari completamente denaturati, gli anticorpi per la citometria a flusso devono rilevare proteine in una conformazione naturale, completamente ripiegata, su cellule vive o fissate. Inoltre la citometria a flusso non sarebbe possibile senza un gran numero di coloranti fluorescenti coniugati agli anticorpi, che permettono anche il multiplexing degli esperimenti.

Per entrare più nello specifico, la citometria a flusso è la misura o quantificazione delle cellule sospese in una fase fluida. Le cellule vengono etichettate con anticorpi accoppiati a fluorocromi specifici per un

marcatore cellulare di interesse. La camera fluidica assicura che le cellule passino singolarmente attraverso un raggio laser, che eccita il fluorocromo. La luce emessa viene rilevata da un rilevatore (fotomoltiplicatore) e il segnale viene tradotto elettronicamente su un computer per l'analisi. Grazie alla sua natura a singola cellula, la citometria a flusso consente l'analisi dell'espressione proteica su base per cellula, rendendola quantificabile con risultati espressi come un conteggio o numero di eventi. La tecnica permette di valutare e quantificare tipi cellulari specifici all'interno di una popolazione eterogenea, consentendo l'analisi di piccoli numeri di cellule o sottogruppi rari in una popolazione mista. La citometria a flusso distingue tra tutte le cellule che esprimono un basso livello di proteina e un sottogruppo di cellule che esprime un alto livello di proteina.

Inoltre vi sono alcune operazioni che consentono di distinguere e selezionare la sola popolazione di interesse e di valutare il livello di fluorescenza di solo quel gruppo. Tali strumenti sono il Gating, il Forward Scatter (FSC) e il Side Scatter.

La citometria a flusso utilizza le dimensioni e la granularità (complessità) delle cellule per aiutare a definire le caratteristiche di una popolazione cellulare. La dimensione delle cellule viene misurata tramite FSC (Forward Scatter), mentre la complessità delle cellule viene misurata tramite SSC (Side Scatter). In particolare, FSC misura la luce dispersa in avanti e intorno alla cellula. Oltre a misurare le dimensioni delle cellule, FSC tiene conto anche del rapporto nucleo-citoplasma, della topografia della membrana e di altre caratteristiche cellulari. SSC misura la luce dispersa perpendicolarmente al raggio laser e le particelle all'interno della cellula. SSC misura la complessità e la granularità delle cellule; la granularità si riferisce a quanti piccoli particolati o granuli sono presenti all'interno della cellula.

FSC e SSC misurano la dispersione della luce, non la fluorescenza, e vengono utilizzati per creare un gate sulla popolazione cellulare di interesse. Le cellule grandi hanno valori alti per FSC e SSC, e si trovano nella parte superiore destra del grafico FSC/SSC. Al contrario, le cellule piccole hanno valori bassi di FSC. un gating restrittivo può essere fuorviante per l'espressione proteica a valle (Bonnevier Jodyand Hammerbeck 2018). Il termine "gating" è comunemente usato nella citometria a flusso per riferirsi alla selezione di una particolare regione di dati da analizzare, che solitamente coincide con una determinata popolazione cellulare. Esistono quattro principali tipi di gate: gate poligonali, gate di forma libera, gate sugli istogrammi (fluorescenza degli anticorpi sull'asse x e il numero di cellule sull'asse y) e così via.

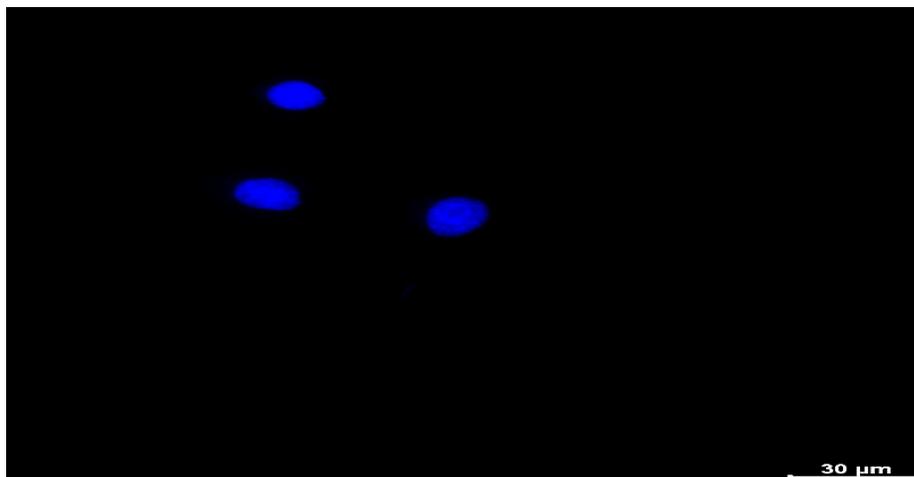
Ciascuno di questi può essere utilizzato per selezionare popolazioni cellulari di interesse. La tipologia di gate da noi utilizzata prevede la forma libera selezionando le cellule ad alto valore di FSC e SSC e successivamente è stato ottenuto un grafico mettendo in relazione il valore di fluorescenza FITC (Laser usato anche per eccitare la proteina GFP) con il numero di conte, ovvero il numero di eventi individuati dallo strumento che rispondessero positivamente all'eccitazione da parte del laser alla lunghezza d'onda del FITC.

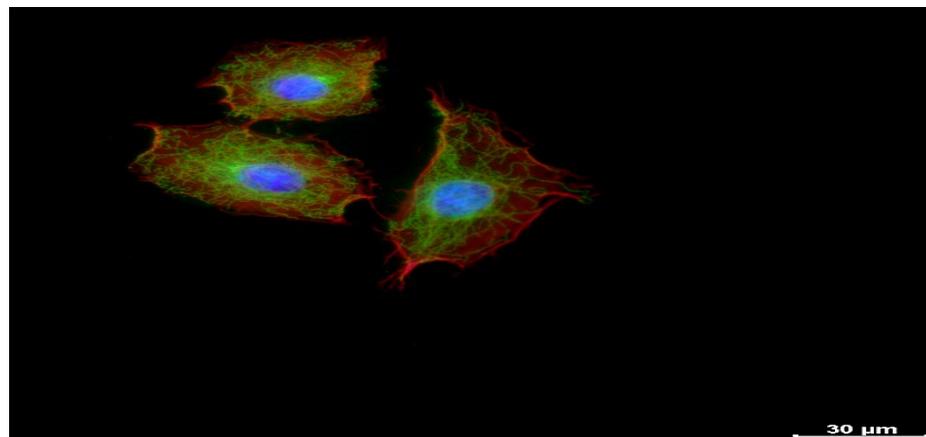
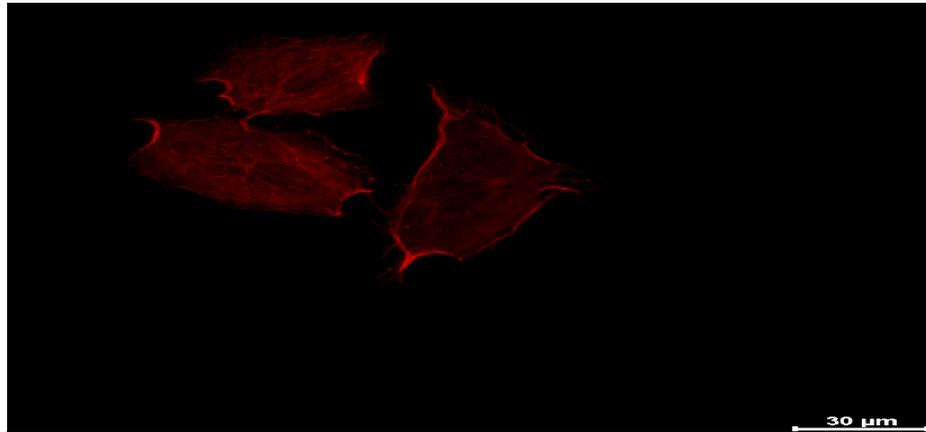
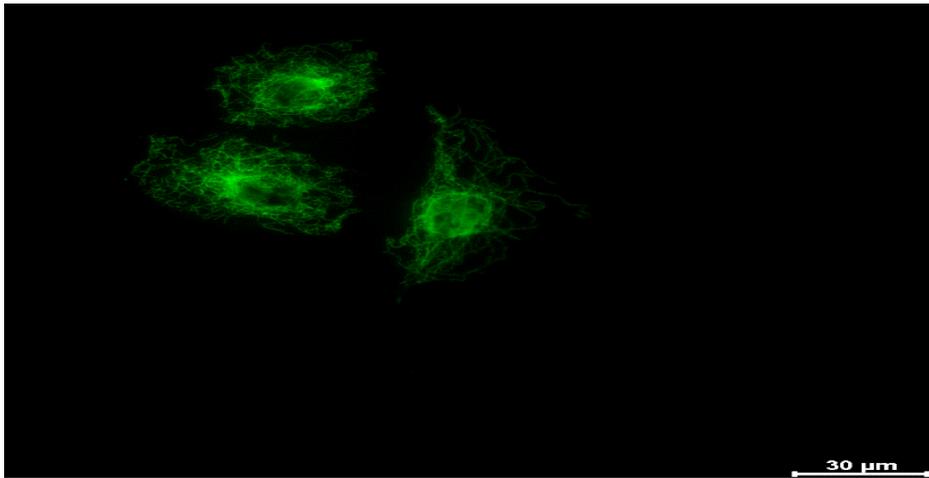
RISULTATI E DISCUSSIONE

FINE TUNING DEL PROTOCOLLO DI IMMUNOFLUORESCENZA

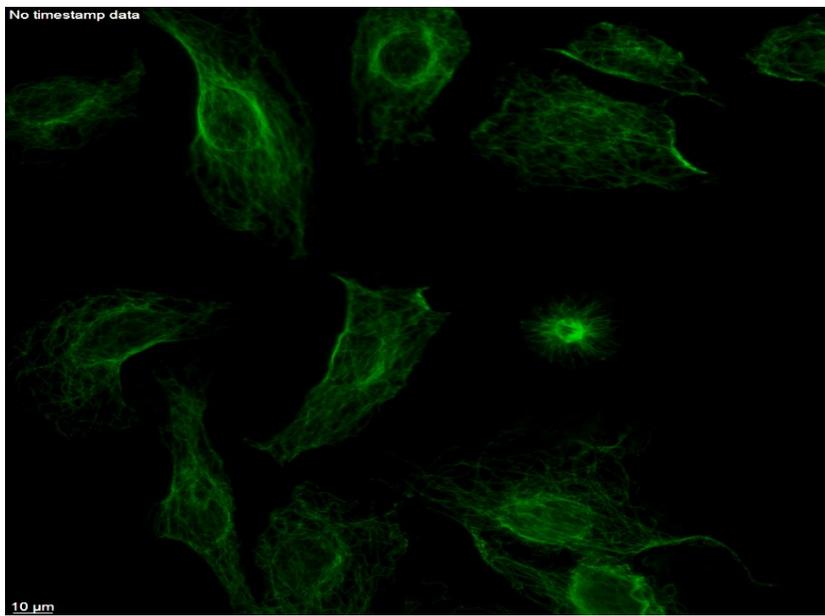
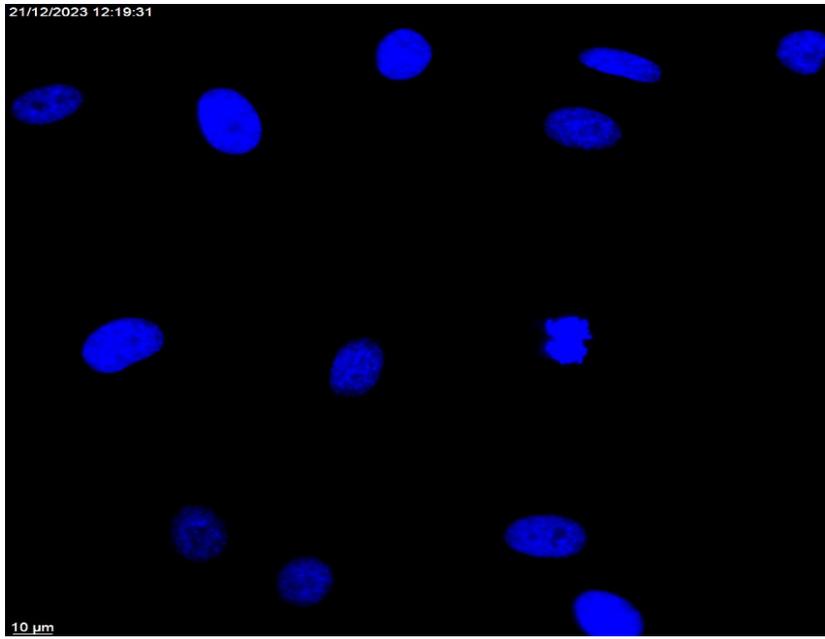
Sono state effettuate preliminarmente varie prove, utilizzando il protocollo di immunofluorescenza sopra descritto, al fine di ottimizzare le quantità di fluorofori e anticorpi utilizzati. Per il trial sono state utilizzate solamente le cellule controllo che esprimevano solamente Strep-tag.

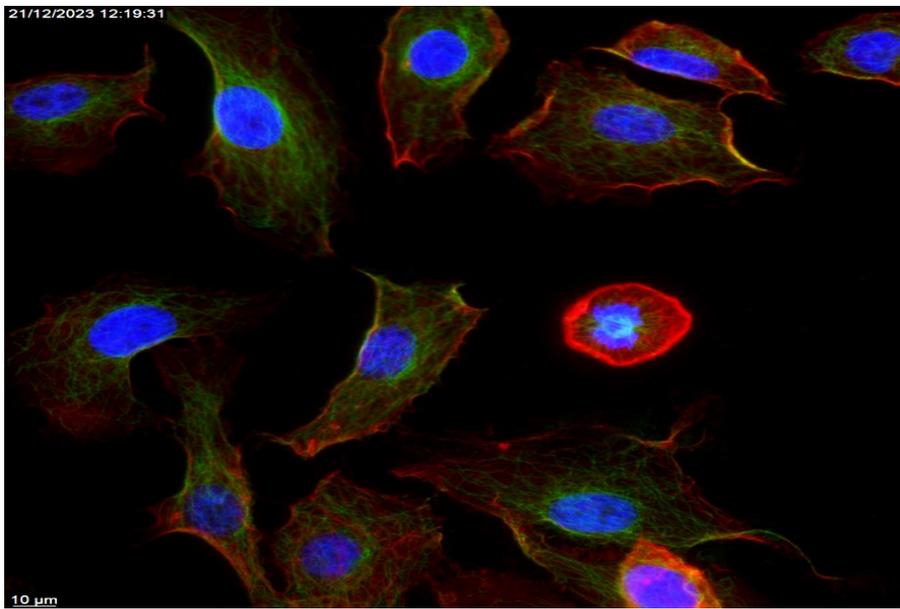
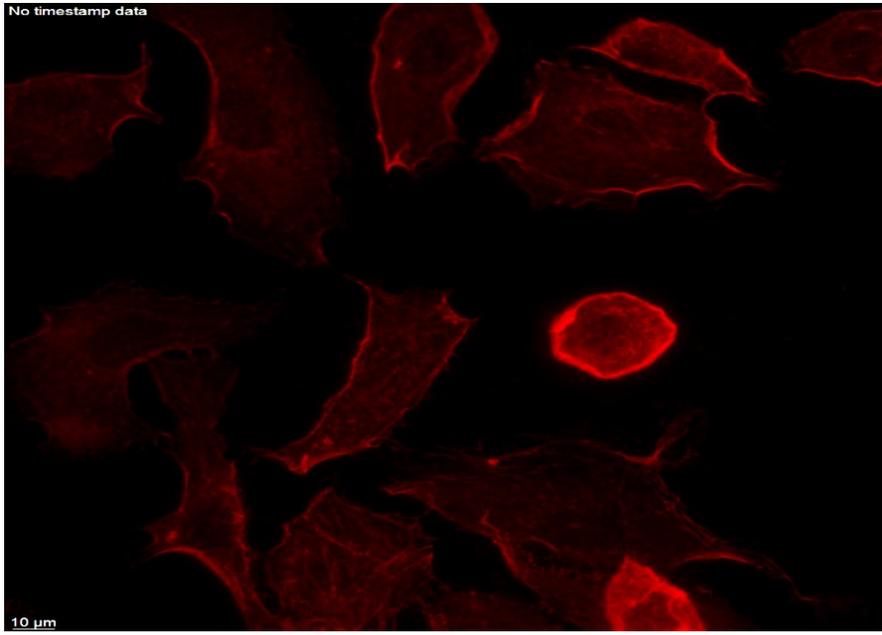
In figura, in blu è evidenziato il nucleo, in rosso l'actina e in verde i filamenti di tubulina oltre all'immagine in figura dove viene anche inserita la risultante che rappresenta la sovrapposizione dei differenti canali.





Queste costituiscono le immagini rappresentative degli esperimenti di prova in cui sono stati usati volumi ottimizzati (100 μ l) di fluorofori e probe (coloranti).



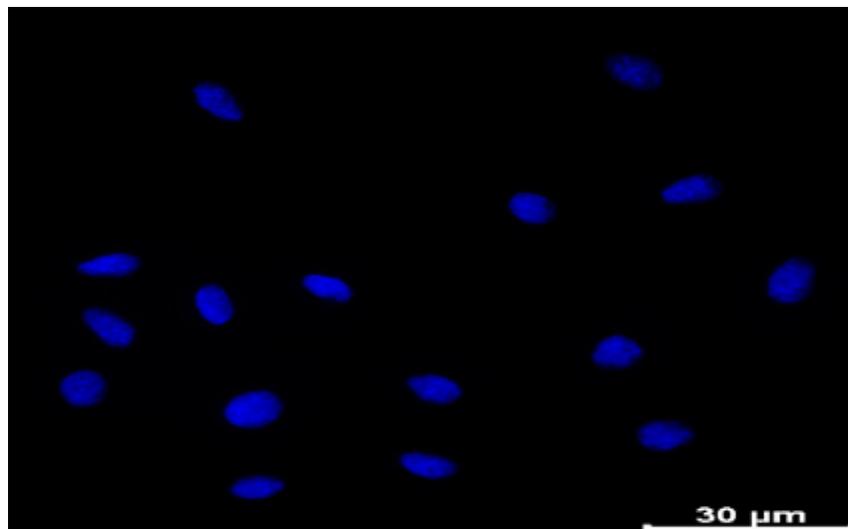


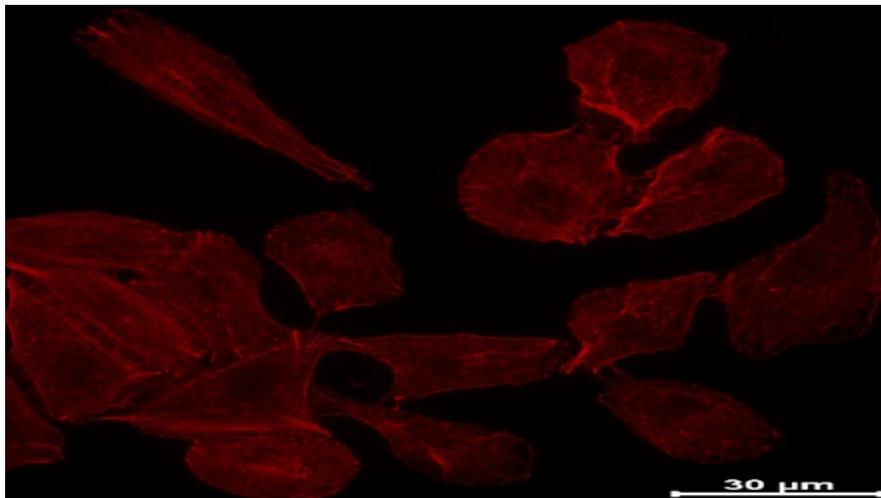
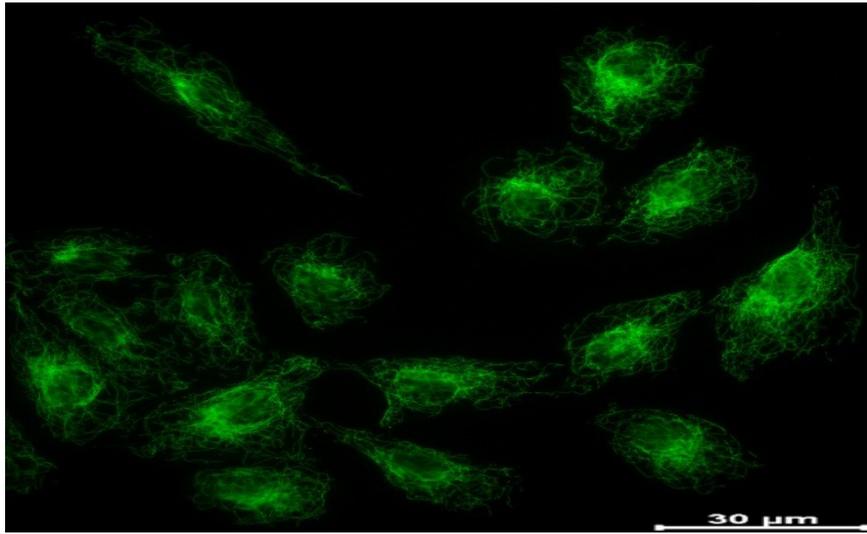
Queste foto sono relative all'uso standard di coloranti utilizzati nel protocollo, quindi 200 μ l.

Per la tipologia di analisi condotte non è stato possibile rilevare nessuna differenza, in quanto la sola valutazione effettuata è stata di tipo qualitativo, senza uso di quantificazione e successive analisi statistiche.

IMMUNOFLUORESCENZA CON PROTOCOLLO ADATTATO:

Successivamente alla fase di ottimizzazione del protocollo sono stati eseguiti esperimenti per valutare qualitativamente l'organizzazione del citoscheletro; di seguito verranno riportate foto rappresentative di un esperimento con la versione del protocollo ottimizzato. Le cellule prese in esame sono sempre A549 e verranno presentate nell'ordine seguente: wild type (WT), strep-tag (ST), e quelle esprimenti le proteine accessorie 3a e per ultime le cellule esprimenti la proteina accessoria 9b.





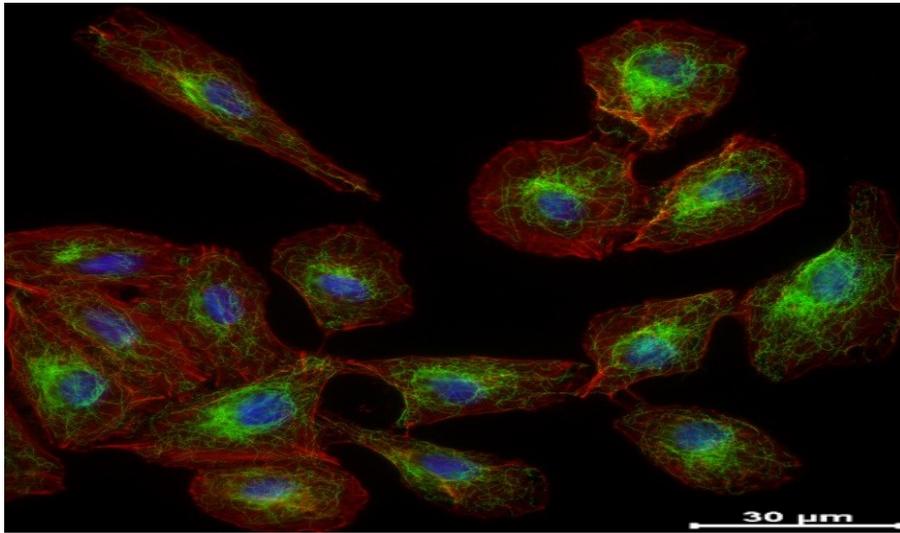
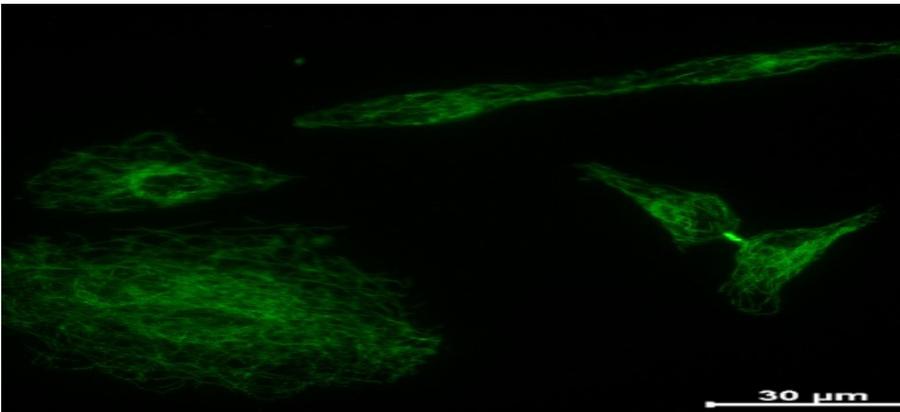
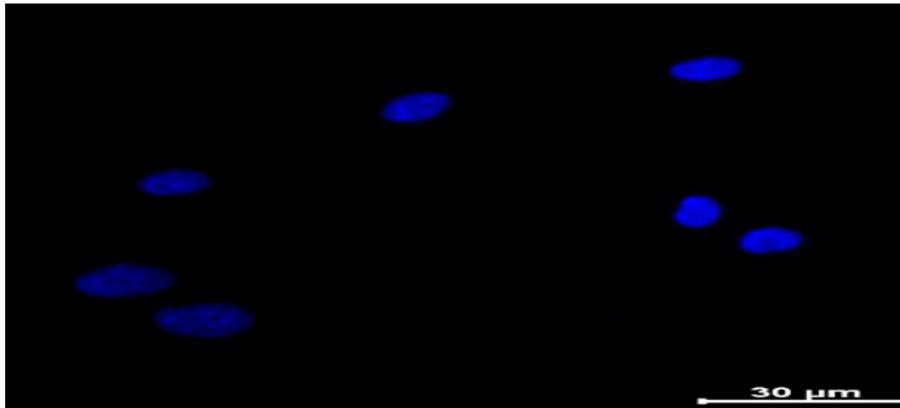


Figura 7 A549 WT



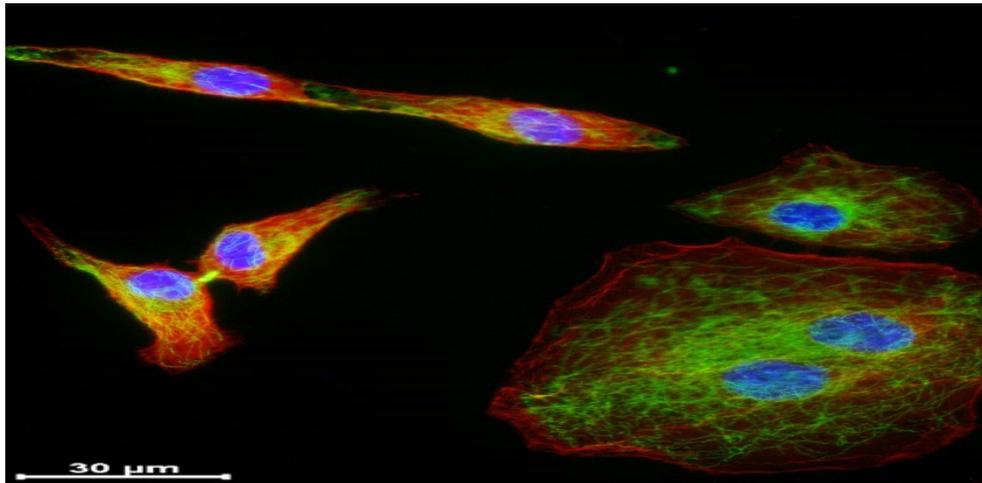
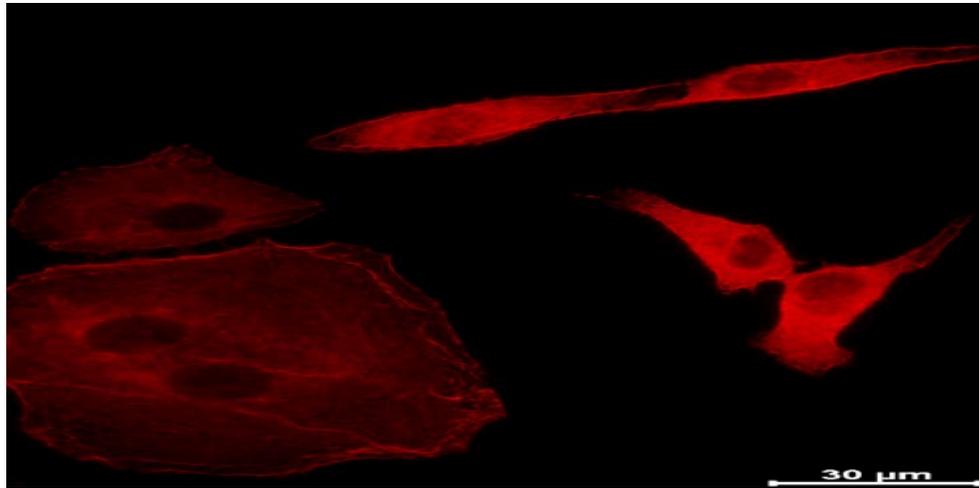
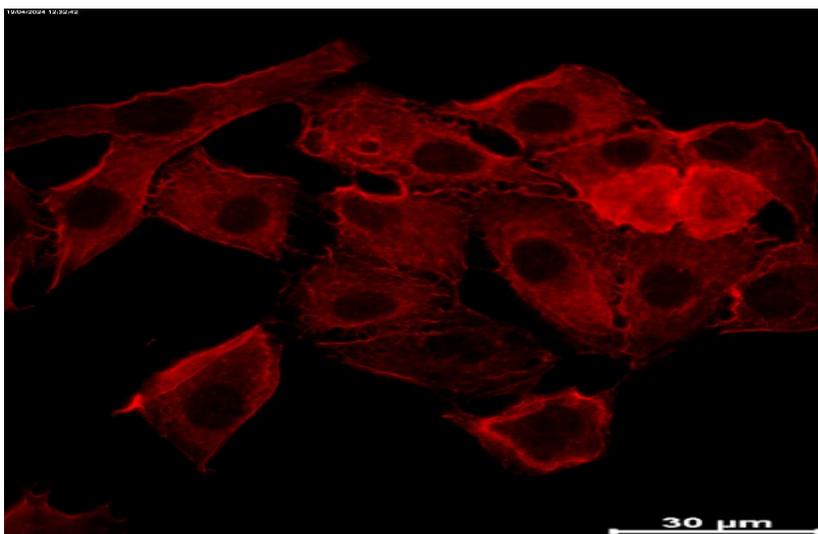
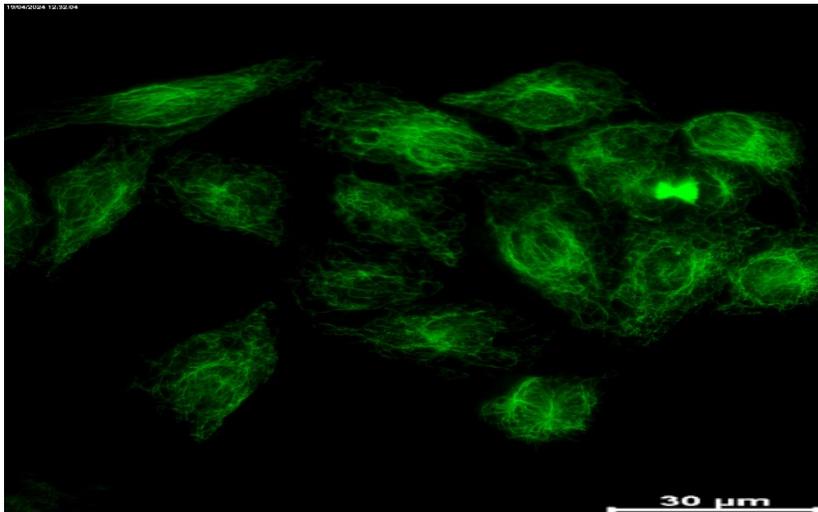
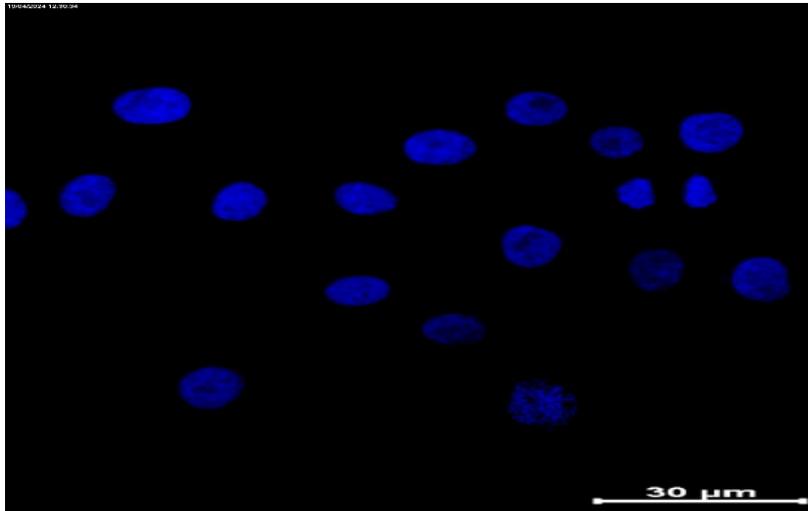


Figura 8 A549 strep-tag



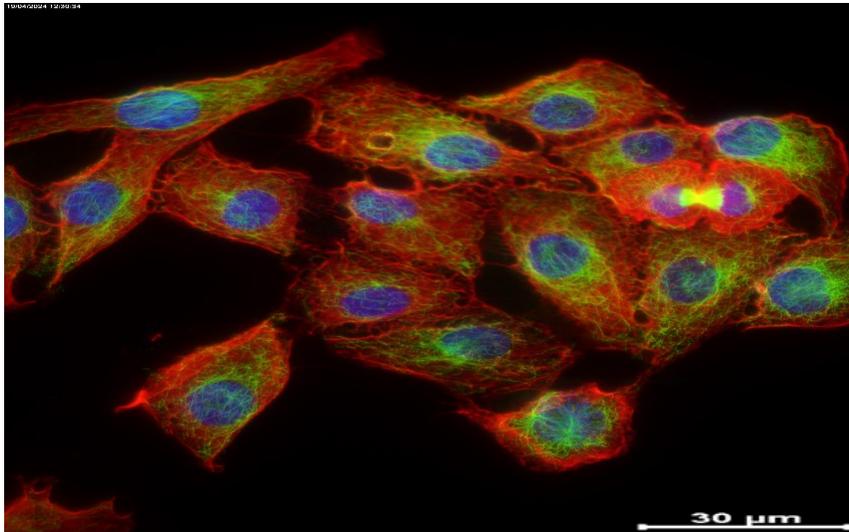
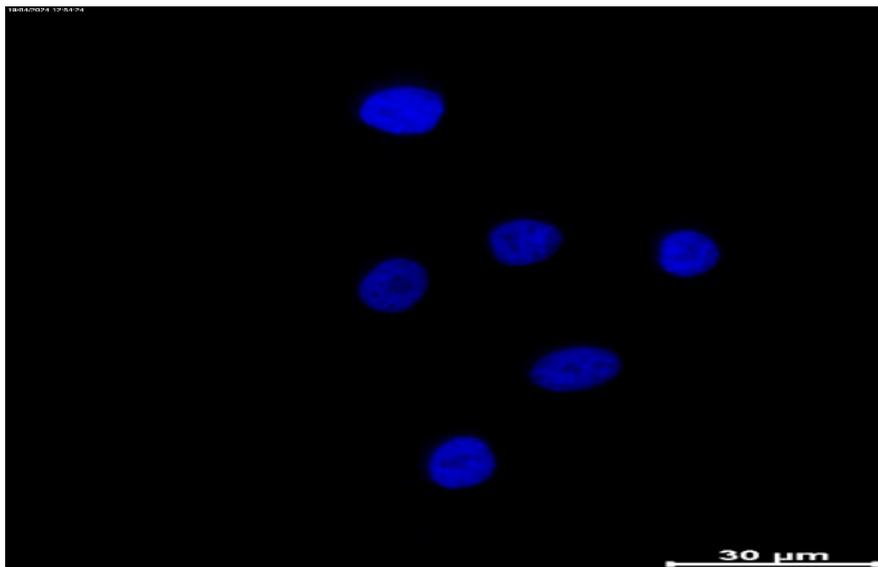
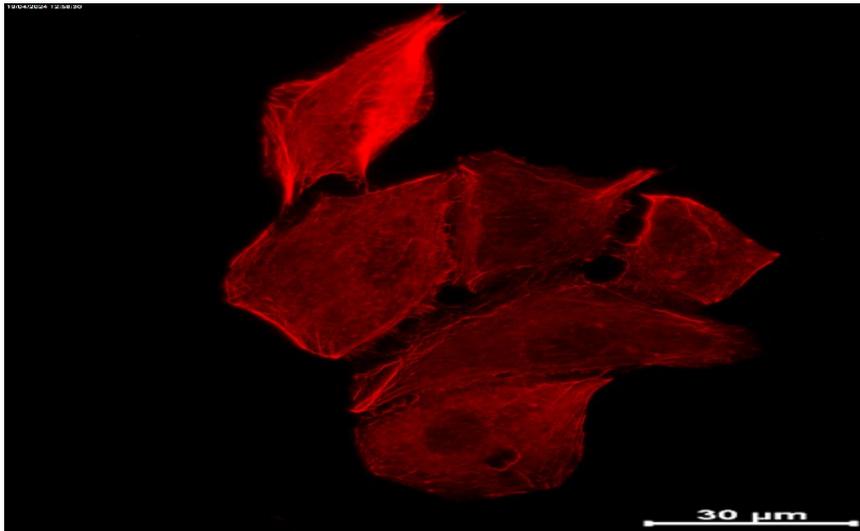
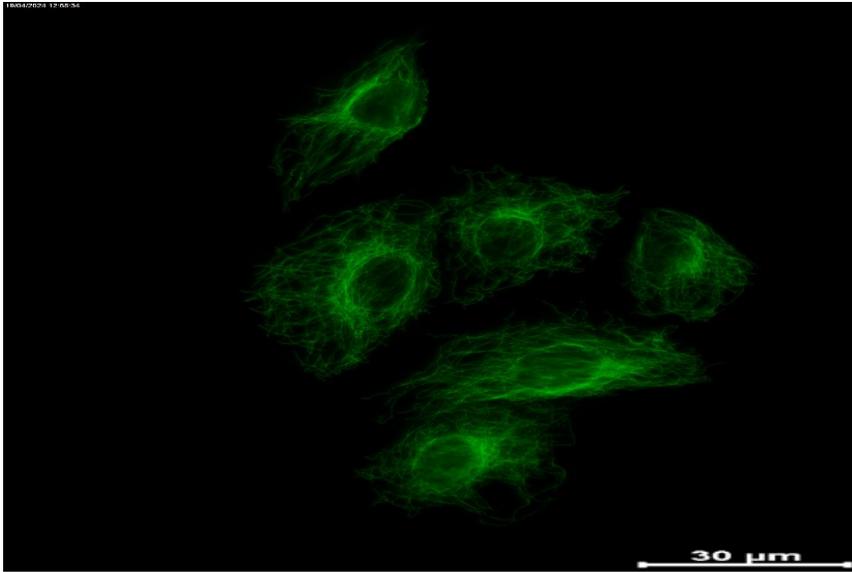


Figura 9 A549 3a





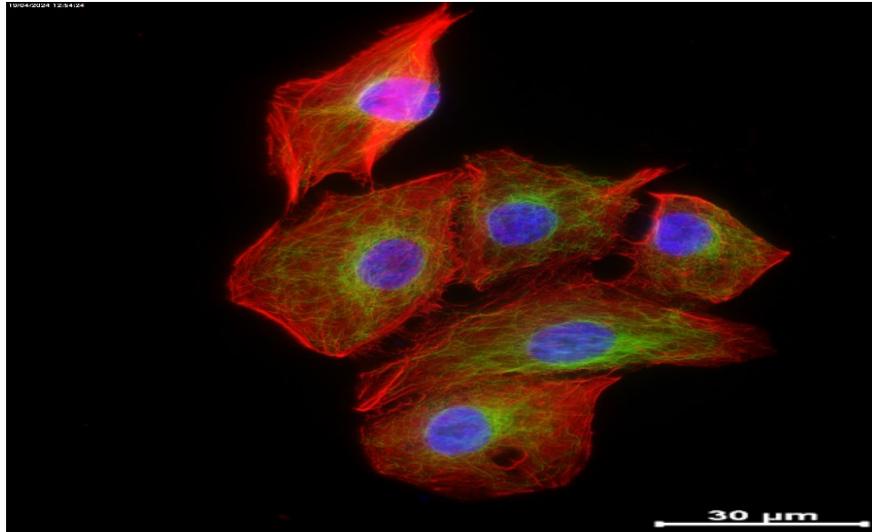
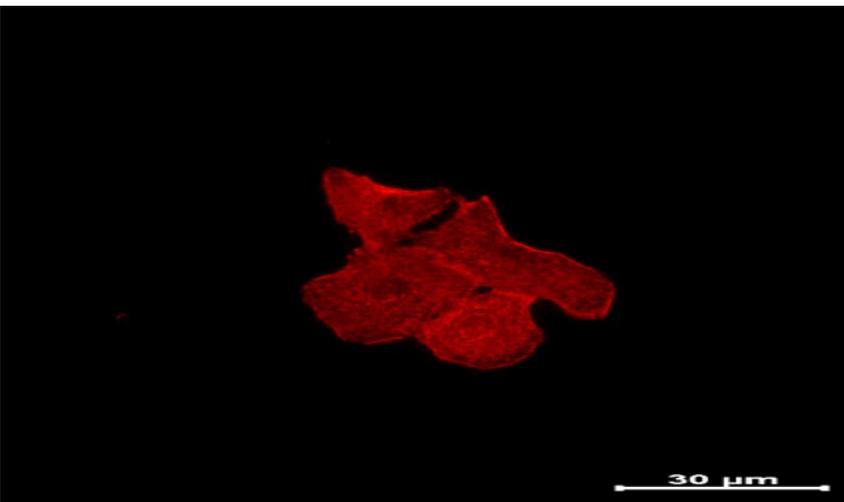
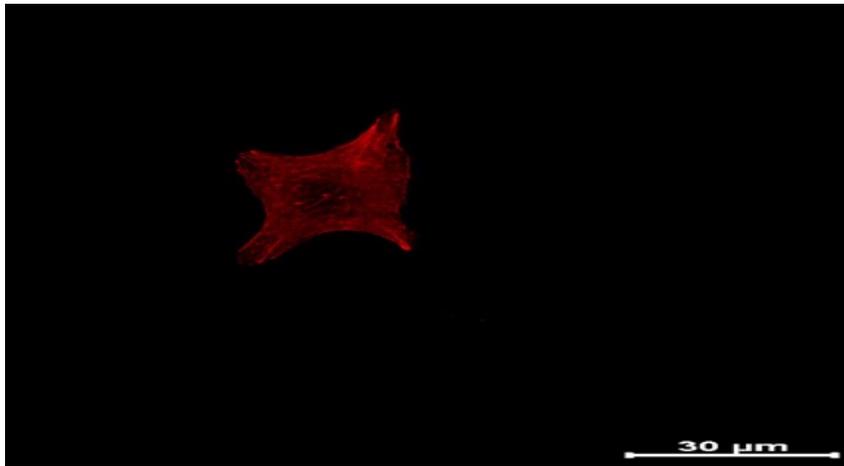
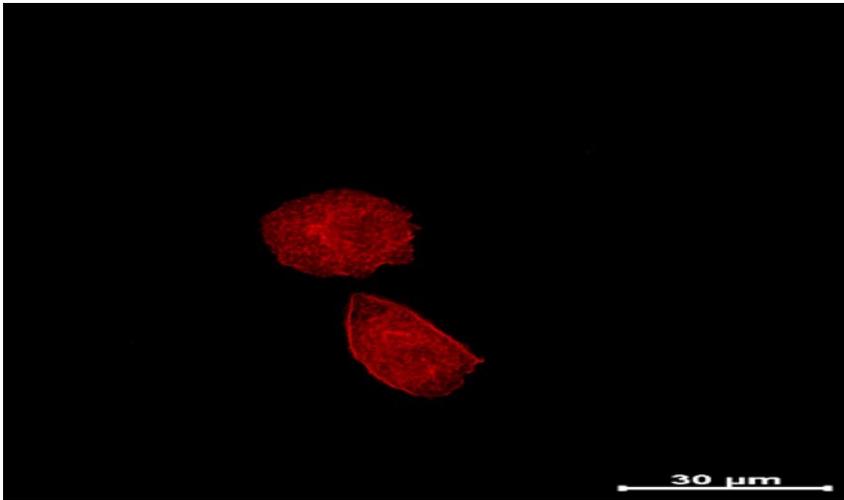
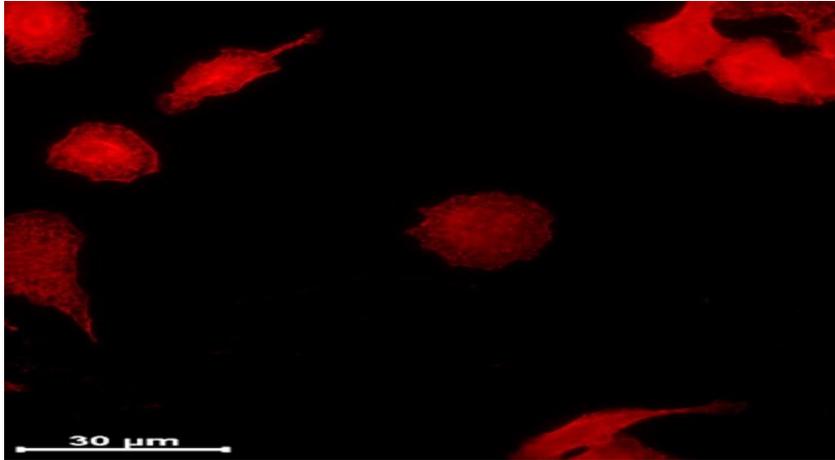


Figura 10 A549 9b

Da una serie di primi esperimenti, in cui è stata ripetuta la valutazione citoscheletrica mediante l'uso della metodologia di immunofluorescenza valutata mediante microscopio, a livello puramente qualitativo è stata evidenziata una piccola differenza fenotipica a livello dell'actina nelle cellule esperimenti la proteina accessoria 3a. Al fine di meglio valutare la comparsa di tale fenotipo è stato allestito un esperimento in cieco, l'analisi mediante microscopio di fluorescenza è stata condotta senza sapere che tipologia di A549 si stesse esaminando. Questa tipologia di esperimento è stata utile al fine di eliminare eventuali bias di conferma che si potevano proporre

e durante la visualizzazione delle cellule esperimenti la proteina 3a, poiché ci si sarebbe aspettato, una volta notato tale fenotipo in queste cellule, una maggiore presenza di queste alterazioni, sovrastimando tale presenza nelle cellule 3a e sottostimando, o non prendendo in assoluto in considerazione, la presenza di tale fenotipo in altre cellule non esperimenti la proteina 3a. Successivamente, dopo la raccolta di un numero sufficientemente elevato di foto al microscopio, è stata fatta un analisi statistica ANOVA per valutare se la presenza di tale fenotipo fosse differente o uguale fra i diversi gruppi. Prima di procedere con la presentazione dei dati e delle foto di tale esperimento in cieco viene presentato a livello visivo un esempio bene chiaro di una foto che sia rappresentativa di un fenotipo definito alterato.

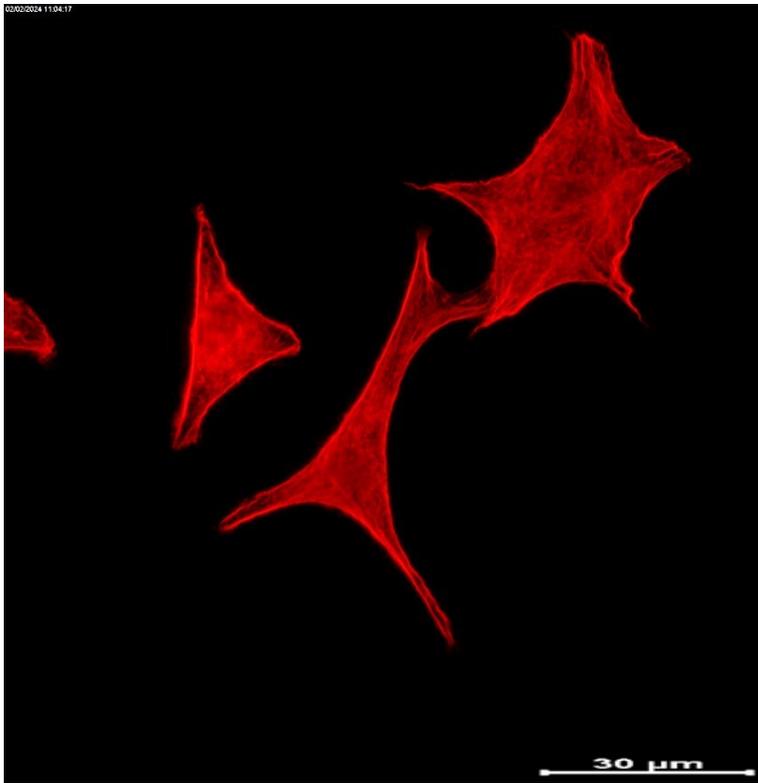
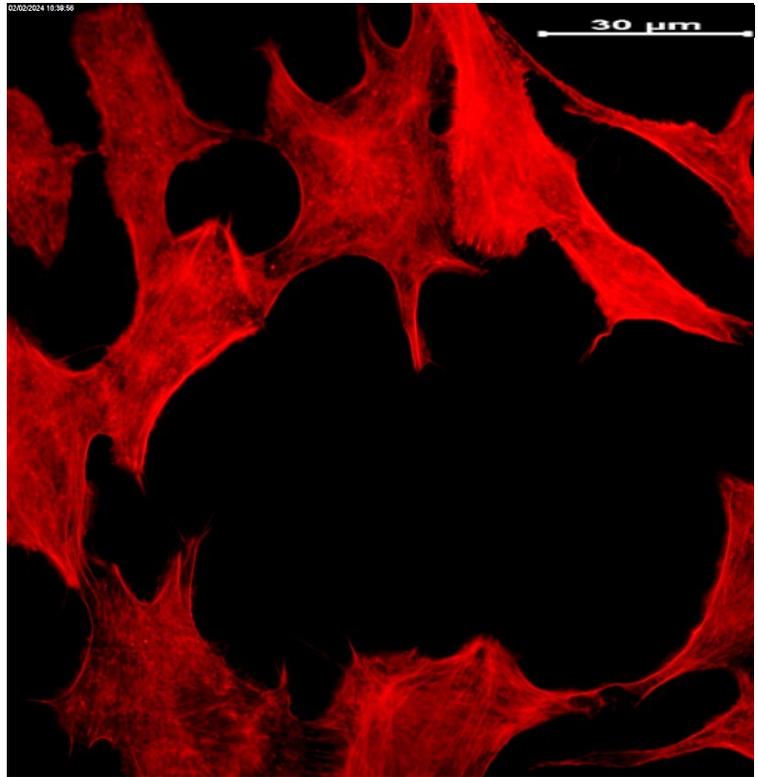


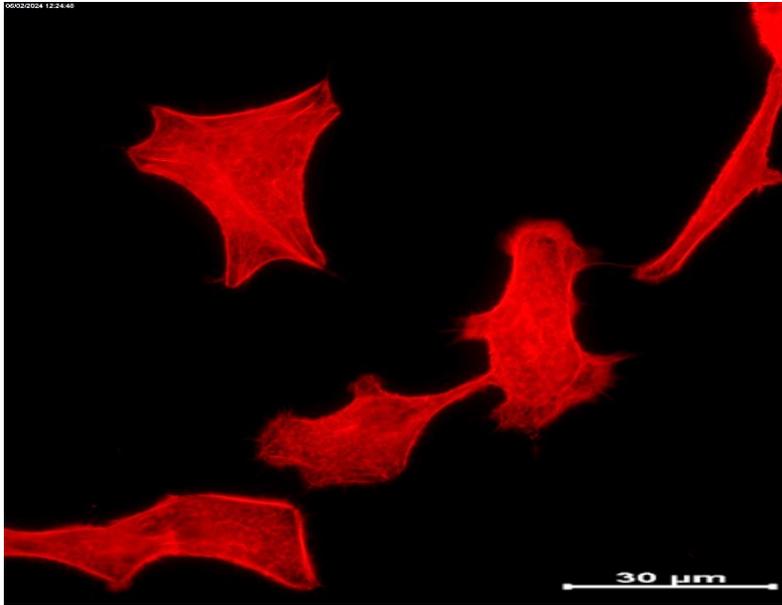


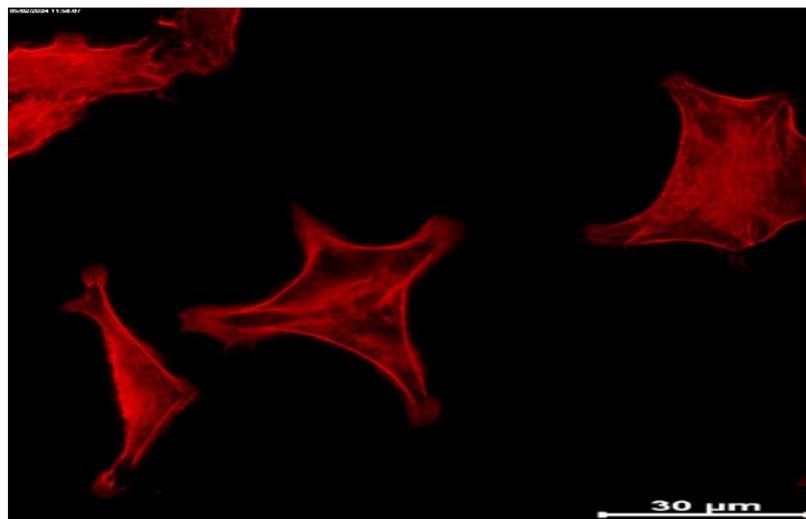
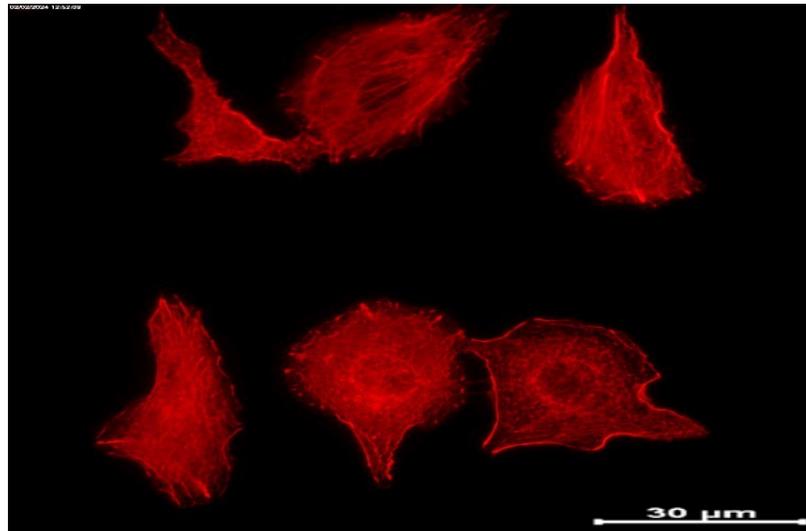
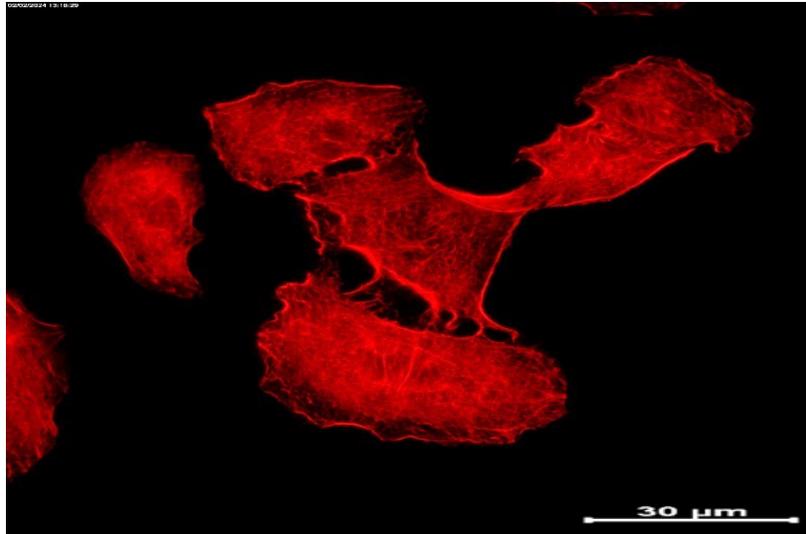
Quello ho potuto osservare è la presenza di una sorta di discontinuità all'interno dei filamenti di actina, come se fossero depolimerizzati.

Successivamente, per condurre l'analisi statistica sull'esperimento condotto in cieco, in ogni singola immagine sono state contate, mediante l'individuazione del nucleo con la colorazione data dal DAPI, il numero totale di cellule e poi contate quante possedevano il fenotipo considerato alterato. Lo stesso procedimento è stato ripetuto per tutte le cellule analizzate, ovvero WT, ST, 3a e 9b, di cui, come detto sopra, durante il conteggio, la natura di espressione (o meno) era sconosciuta.

Di seguito vengono riportate le foto (WT in doppio, ST, 9b in doppio, 3a e un controllo, che non presentava l'anticorpo primario, al fine di valutare la cross reattività dell'anticorpo secondario, procedura eseguita in ogni esperimento).







Il lavoro, effettuato mediante excel per effettuare l'analisi statistica ANOVA, è stato eseguito preliminarmente con la preparazione di una tabella per ricavare i dati che poi sono stati utilizzati durante l'analisi. La prima colonna prevedeva l'inserimento del nome del file di salvataggio dopo la cattura delle immagini al microscopio. La seconda colonna fa riferimento a quale overlay si stava considerando. Le altre colonne fanno riferimento rispettivamente al numero di cellule trovate nella singola foto, al numero di cellule che presentano un fenotipo alterato (valutazione che rimane soggettiva), alla frequenza delle cellule con fenotipo alterato, in modo che si avesse un numero che tenesse traccia del totale delle cellule presenti nella foto.

file name	numeber of OV	TOT cell	tot of positive	frequenza
A1	OV1	3	0	0
	OV2	8	2	0,25
	OV3	10	0	0
	OV4	5	0	0
	OV5	7	1	0,142857143
	OV6	6	0	0
	OV7	8	0	0
	OV8	10	3	0,3
	OV9	5	4	0,8
	OV10	3	0	0

Successivamente, è stata fatta la media delle frequenze e sottratto al singolo valore delle frequenze la media ed elevato al quadrato. Tale dato è necessario al fine di applicare correttamente l'ANOVA test.

Dopo aver verificato l'omoschedasticità delle varianze si è proceduto ad applicare il test statistico ANOVA. Sono quindi stati confrontati i valori di F tabulati e F calcolati. Le due ipotesi formulate in questo test sono quelle per cui le medie all'interno del gruppo siano uguali a quelle fra i gruppi, ipotesi H0. L'altra ipotesi, ipotesi H1, prevede che la media all'interno dei gruppi sia differente dalla media fra i gruppi. In questo caso essendo $F_{CALCOLATO} < F_{TABULATO}$ si accetta l'ipotesi H0. Quindi è risultato che la media all'interno del gruppo era uguale alla media fra i gruppi, ovvero che le differenze fra i

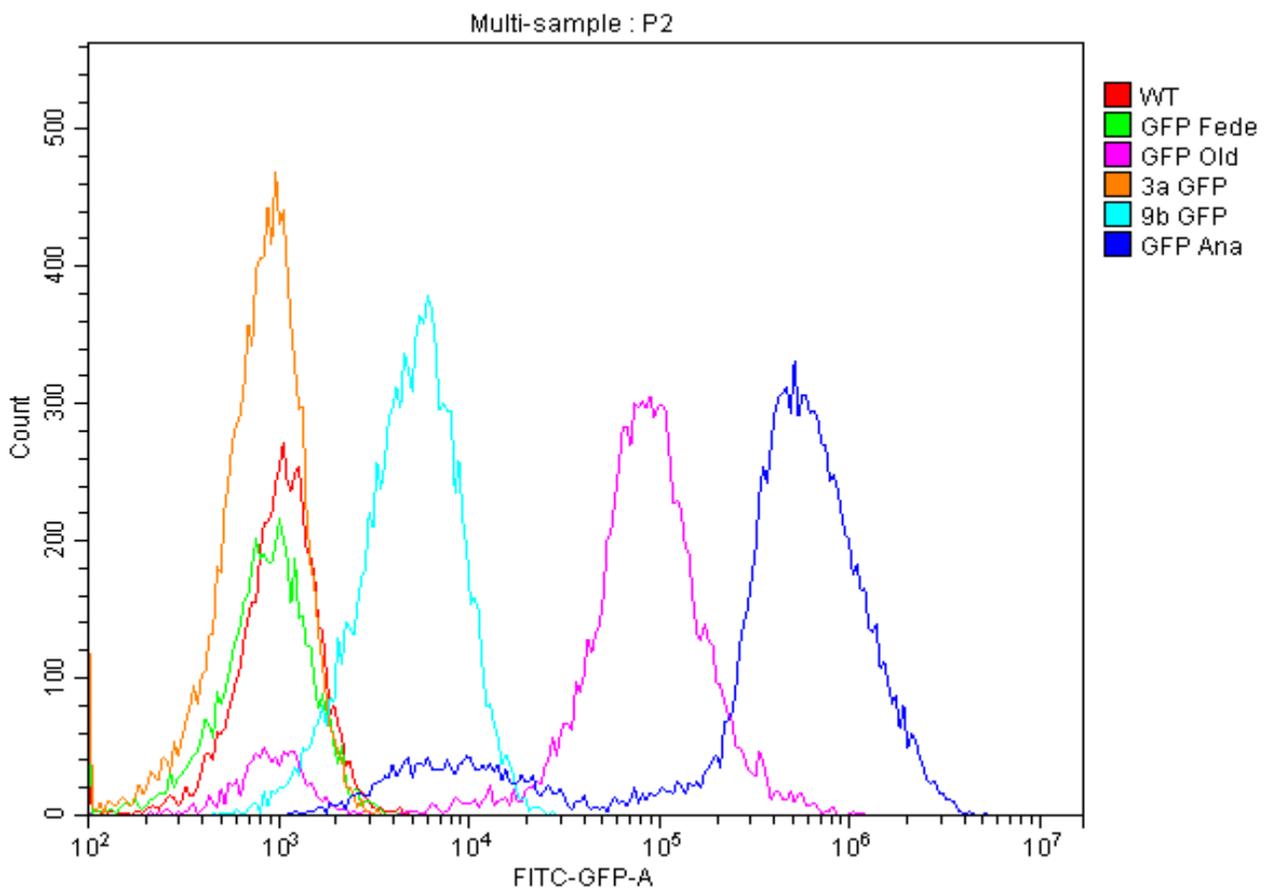
gruppi non siano statisticamente significative, per cui la differenza osservata fra i gruppi è dovuta al caso.

Si può quindi pensare che il fenotipo osservato non fosse una prerogativa delle cellule esprimenti la proteina accessoria 3a, ma che questa tipologia di manifestazione fenotipica sia presente con la stessa frequenza in tutte le tipologie cellulari analizzate. Per cui, almeno con questa tipologia di esperimento, con questo set-up sperimentale, non è possibile osservare alcuna influenza dell'espressione delle proteine accessorie 3a e 9b sul citoscheletro, né per abbondanza di produzione delle proteine citoscheletriche né in termini di distribuzione o di forma. Sarà eventualmente possibile l'esplorazione del fenomeno con differenti metodologie, per verificare il legame, se presente, fra le proteine accessorie e quelle citoscheletriche.

Successivamente, per completezza e valutare la congruità con questi risultati, sono state effettuate degli esperimenti di immunofluorescenza utilizzando sempre cellule A549 però la cui proteina accessoria aveva come partner di fusione la proteina GFP (green fluorescent protein). I tentativi di ottenere immagini di fluorescenza utilizzando queste linee cellulari è stato fallimentare, è non è stato evidenziato alcun segnale proveniente dalla proteina autofluorescente GFP, motivo per cui non verranno allegate immagini di tali esperimenti.

VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE CON CITOMETRIA

Alla luce dei precedenti risultati si è voluto approfondire e verificare l'espressione delle linee cellulari esprimenti le proteine accessorie mediante la valutazione della fluorescenza di GFP valutata con l'utilizzo della citometria a flusso. Sono stati presi in esame tre differenti batch di A549-GFP, denominate old, fede e ana e poi valutata l'espressione delle cellule WT, 3a-GFP e 9b-GFP.

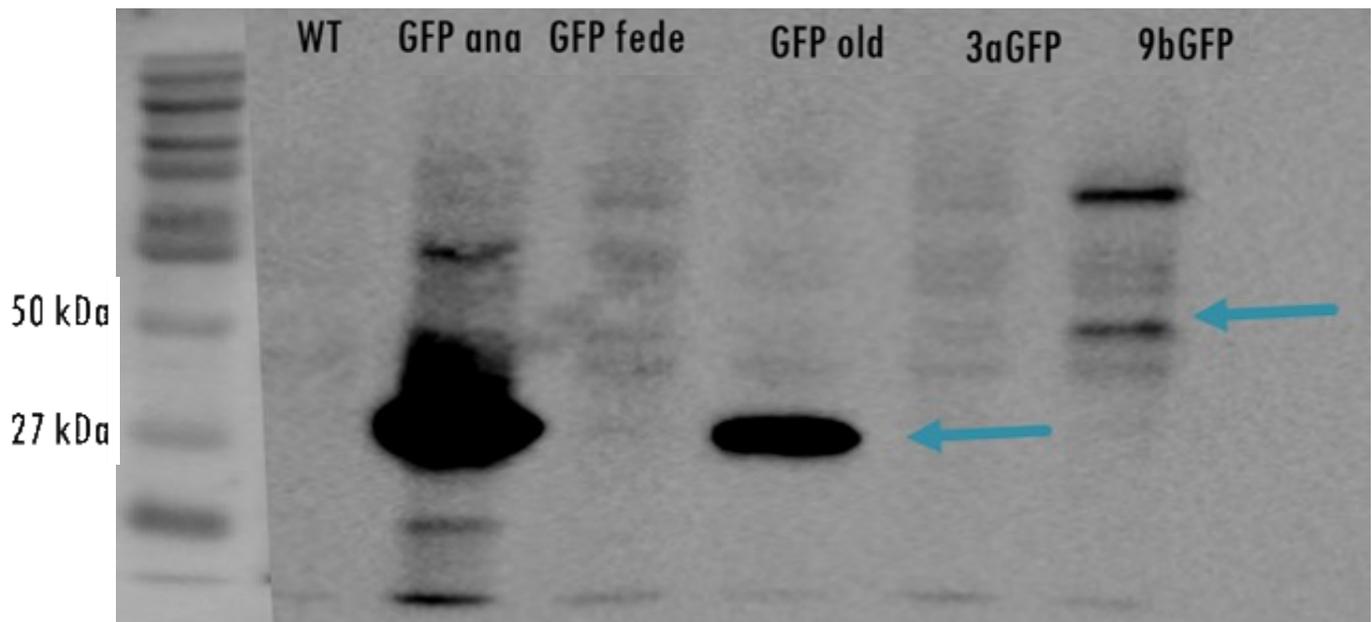


Il grafico mette in evidenza come vi sia uguaglianza di espressione fra il Wild Type e le cellule esprimenti la proteina 3a-GFP e la GFP (fede). La linea cellulare 9b-GFP sembra mostrare un livello di espressione intermedia mentre hanno un'espressione considerata ottimale solo le due linee cellulari chiamate GFP old e GFP ana. Tali linee però mostrano anche due piccoli picchi in corrispondenza di valori di

fluorescenza più bassi, suggerendo un possibile inizio di selezione di cellule verso una minor produzione delle proteine inserite mediante lentivirus, cosa ovviamente che sarà da confermare con successivi esperimenti di monitoraggio di tali linee. Ovviamente risulta che la produzione delle proteine esogene in alcune linee sia assente, cosa che dovrà essere esaminata e presa in considerazione cercando eventuali errori anche nella progettazione del vettore virale o nel rivalutare la tipologia di espressione, eventualmente optando per una espressione transiente delle proteine accessorie.

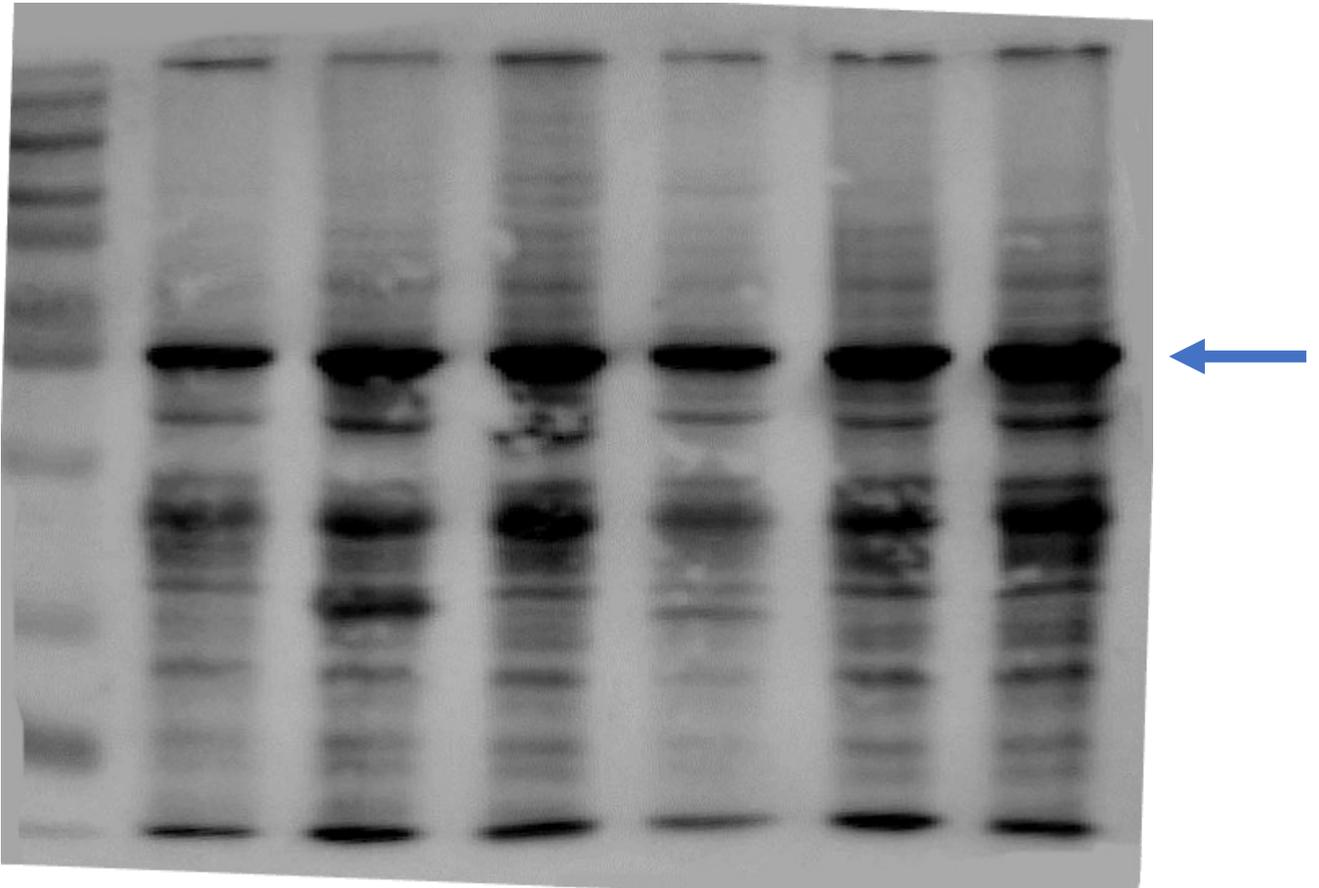
GEL DI WESTERN BLOTTING

In ultima analisi è stato condotto un esperimento di western blotting per valutare la possibilità di vedere l'espressione mediante un differente approccio e di confermare eventualmente i dati appena discussi relativi alla citometria.



Questa immagine è stata ottenuta mediante l'uso di un anticorpo diretto contro la proteina GFP e le bande segnalate in azzurro confermano i dati ottenuti con la citometria, le bande maggiormente spesse si presentano in corrispondenza della lane della linea cellulare GFP ana, GFP old (27 KDa circa) e 9b-GFP (50 kDa circa). Successivamente mediante stripping dell'anticorpo primario e secondario, diretti contro

la GFP e contro l'anticorpo primario rispettivamente, è stata valutata l'espressione della proteina housekeeping tubulina.



L'esperimento western blotting, come accennato prima, conferma i dati della citometria, ovviamente sarà necessario affinare la tecnica in modo da ottenere bande più definite e gel con meno aspecificità, al fine di avere gel meglio interpretabili.

CONCLUSIONI

Come è stato analizzato precedentemente, nonostante sia verosimile l'influenza e la modificazione del normale assetto citoscheletrico da parte del virus SARS-CoV-2, non è stato possibile la valutazione di tale influenza con la sola metodica utilizzata e mediante solo l'uso di un normale microscopio di fluorescenza. Sarebbe opportuno progettare altri esperimenti di immunofluorescenza in cui sia possibile anche fare valutazioni oggettive e quantificabili delle proteine citoscheletriche espresse avendo la vertenza di prendere in esame sempre un numero elevato di cellule (foto) e un numero elevato di replicati per esperimento, cercando anche di utilizzare altre strumentazioni microscopiche come ad esempio un microscopio confocale e cercando inoltre di analizzare esperimenti riprodotti mediante altri operati e altri protocolli che permettano di colorare il citoscheletro, in modo da minimizzare tutte le variabili che non sono strettamente legate ad una modifica causata dall'espressione delle proteine accessorie. Inoltre sarebbe necessario indagare tali espressioni mediante altre metodologie, come ad esempio potrebbero essere esperimenti di interatomica. Inoltre rimane fondamentale l'assicurarsi di utilizzare una linea cellulare che esprima in grande quantità le proteine di cui si vuole cercare un effetto biologico. In ultima analisi va sempre ricordato che queste analisi sarebbero comunque effettuate su linee cellulari immortalizzate (tumorali) e che rappresentano un sistema fondamentale, ma che comunque poco descrive la complessità di un intero organismo.

BIBLIOGRAFIA

- Ahn, Jeonghyun, and Glen N Barber. 2019. 'STING Signaling and Host Defense against Microbial Infection'. *Experimental & Molecular Medicine* 51 (12): 1–10. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0333-0>.
- Biancardi, Alessandro, Tarita Biver, Fernando Secco, and Benedetta Mennucci. 2013. 'An Investigation of the Photophysical Properties of Minor Groove Bound and Intercalated DAPI through Quantum-Mechanical and Spectroscopic Tools'. *Physical Chemistry Chemical Physics* 15 (13): 4596–4603. <https://doi.org/10.1039/c3cp44058c>.
- Billadeau, Daniel D., Jeffrey C. Nolz, and Timothy S. Gomez. 2007. 'Regulation of T-Cell Activation by the Cytoskeleton'. *Nature Reviews Immunology*. <https://doi.org/10.1038/nri2021>.
- Bonnevier Jody and Hammerbeck, Christopher and Goetz Christine. 2018. 'Flow Cytometry: Definition, History, and Uses in Biological Research'. In *Flow Cytometry Basics for the Non-Expert*, 1–11. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-98071-3_1.
- Chen, Di, Qiaoxia Zheng, Long Sun, Mingming Ji, Yan Li, Hongyu Deng, and Hong Zhang. 2021. 'ORF3a of SARS-CoV-2 Promotes Lysosomal Exocytosis-Mediated Viral Egress'. *Developmental Cell* 56 (23): 3250-3263.e5. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.10.006>.
- Diamond, Michael S., and Thirumala Devi Kanneganti. 2022. 'Innate Immunity: The First Line of Defense against SARS-CoV-2'. *Nature Immunology*. Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41590-021-01091-0>.
- Fletcher, Daniel A., and R. Dyche Mullins. 2010. 'Cell Mechanics and the Cytoskeleton'. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature08908>.
- Good, Norman E, G Douglas Winget, Wilhelmina Winter, Thomas N Connolly, Seikichi Izawa, and Raizada M Singh. 1966. 'Hydrogen Ion Buffers for Biological Research*'. Vol. 5. UTC. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>.
- Gudimchuk, Nikita B., and J. Richard McIntosh. 2021. 'Regulation of Microtubule Dynamics, Mechanics and Function through the Growing Tip'. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00399-x>.
- Han, Lulu, Meng Wei Zhuang, Jian Deng, Yi Zheng, Jing Zhang, Mei Ling Nan, Xue Jing Zhang, Chengjiang Gao, and Pei Hui Wang. 2021. 'SARS-CoV-2 ORF9b Antagonizes Type I and III Interferons by Targeting Multiple Components of the RIG-I/MDA-5–MAVS, TLR3–TRIF, and CGAS–STING Signaling Pathways'. *Journal of Medical Virology* 93 (9): 5376–89. <https://doi.org/10.1002/jmv.27050>.
- Hnasko, Robert. n.d. 'ELISA Methods and Protocols Methods in Molecular Biology 1318'. <http://www.springer.com/series/7651>.
- Jacobs, Jana L, and Carolyn B Coyne. 2013. 'Mechanisms of MAVS Regulation at the Mitochondrial Membrane'. *Journal of Molecular Biology* 425 (24): 5009–19. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.10.007>.
- Jungreis, Irwin, Rachel Sealfon, and Manolis Kellis. 2021. 'SARS-CoV-2 Gene Content and COVID-19 Mutation Impact by Comparing 44 Sarbecovirus Genomes'. *Nature Communications* 12 (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22905-7>.

- Kawai, Taro, and Shizuo Akira. 2005. 'Toll-like Receptor Downstream Signaling'. *Arthritis Research and Therapy*. <https://doi.org/10.1186/ar1469>.
- Kell, Alison M, and Michael Gale. 2015. 'RIG-I in RNA Virus Recognition'. *Virology* 479–480:110–21. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.017>.
- Kozak, Marilyn. n.d. 'Nucleic Acids Research An Analysis of 5'-Noncoding Sequences from 699 Vertebrate Messenger RNAs'. Vol. 15.
- Kurien, Biji T, and R Hal Scoo Eld Editors. n.d. 'Electrophoretic Separation of Proteins Methods and Protocols Methods in Molecular Biology 1855'. <http://www.springer.com/series/7651>.
- Kurien Biji T. and Scofield, R Hal. 2009. 'Introduction to Protein Blotting'. In *Protein Blotting and Detection: Methods and Protocols*, edited by R Hal Kurien Biji T. and Scofield, 9–22. Totowa, NJ: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-542-8_3.
- Lappalainen, Pekka, Tommi Kotila, Antoine Jégou, and Guillaume Romet-Lemonne. 2022. 'Biochemical and Mechanical Regulation of Actin Dynamics'. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00508-4>.
- Larsen, Teresa A, David S Goodsell, Duilio Cascio, Kazimierz Grzeskowiak, and Richard E Dickerson. 1989. 'The Structure of DAPI Bound to DNA'. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 7 (3): 477–91. <https://doi.org/10.1080/07391102.1989.10508505>.
- Louis, Cynthia, Chris Burns, and Ian Wicks. 2018. 'TANK-Binding Kinase 1-Dependent Responses in Health and Autoimmunity'. *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00434>.
- Miller, W. Allen, and Gennadiy Koev. 2000. 'Synthesis of Subgenomic RNAs by Positive-Strand RNA Viruses'. *Virology*. Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0421>.
- Mostowy, Serge, and Avinash R. Shenoy. 2015. 'The Cytoskeleton in Cell-Autonomous Immunity: Structural Determinants of Host Defence'. *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri3877>.
- Noble, James E, and Marc J A Bailey. 2009. 'Chapter 8 Quantitation of Protein'. In *Guide to Protein Purification, 2nd Edition*, edited by Richard R Burgess and Murray P Deutscher, 463:73–95. Methods in Enzymology. Academic Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63008-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63008-1).
- Panchuk-Voloshina, Nataliya, Rosaria P Haugland, Janell Bishop-Stewart, Mahesh K Bhalgat, Paul J Millard, Fei Mao, Wai-Yee Leung, and Richard P Haugland. 1999. 'Alexa Dyes, a Series of New Fluorescent Dyes That Yield Exceptionally Bright, Photostable Conjugates'. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. Vol. 47. <http://www.jhc.org>.
- Pegg, David E. 2007. 'Principles of Cryopreservation'. In *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*, edited by John G Day and Glyn N Stacey, 39–57. Totowa, NJ: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-362-2_3.
- Pollard, Thomas D. 2016. 'Actin and Actin-Binding Proteins'. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 8 (8). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018226>.

- Pospich, Sabrina, Felipe Merino, and Stefan Raunser. 2020. 'Structural Effects and Functional Implications of Phalloidin and Jasplakinolide Binding to Actin Filaments'. *Structure* 28 (4): 437-449.e5. <https://doi.org/10.1016/j.str.2020.01.014>.
- Ren, Yujie, Ting Shu, Di Wu, Jingfang Mu, Chong Wang, Muhan Huang, Yang Han, et al. 2020. 'The ORF3a Protein of SARS-CoV-2 Induces Apoptosis in Cells'. *Cellular and Molecular Immunology*. Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0485-9>.
- Robinson, J Paul, Jennifer Sturgis Bs, and George L Kumar. n.d. 'Chapter 10 | Immunofluorescence'.
- Rosas-Arellano, Abraham, Juan B. Villalobos-González, Lourdes Palma-Tirado, Felipe A. Beltrán, Alfonso Cáramez-Trejo, Fanis Missirlis, and Maite A. Castro. 2016. 'A Simple Solution for Antibody Signal Enhancement in Immunofluorescence and Triple Immunogold Assays'. *Histochemistry and Cell Biology* 146 (4): 421–30. <https://doi.org/10.1007/s00418-016-1447-2>.
- Sanderson, Michael J., Ian Smith, Ian Parker, and Martin D. Bootman. 2014. 'Fluorescence Microscopy'. *Cold Spring Harbor Protocols* 2014 (10): 1042–65. <https://doi.org/10.1101/pdb.top071795>.
- Shen, Jiaying, Junyan Fan, Yue Zhao, Doming Jiang, Zheyun Niu, Zihan Zhang, and Guangwen Cao. 2023. 'Innate and Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 and Predisposing Factors'. *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1159326>.
- Silva, Marcos Jessé Abrahão, Yan Corrêa Rodrigues, Karla Valéria Batista Lima, and Luana Nepomuceno Gondim Costa Lima. 2022. 'Innate Immunity to SARS-CoV-2 Infection: A Review'. *Epidemiology and Infection*. Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/S095026882200125X>.
- Steiner, Silvio, Annika Kratzel, G. Tuba Barut, Reto M. Lang, Etori Aguiar Moreira, Lisa Thomann, Jenna N. Kelly, and Volker Thiel. 2024. 'SARS-CoV-2 Biology and Host Interactions'. *Nature Reviews Microbiology*. Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41579-023-01003-z>.
- Takeuchi, Osamu, and Shizuo Akira. 2008. 'MDA5/RIG-I and Virus Recognition'. *Current Opinion in Immunology* 20 (1): 17–22. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.coi.2008.01.002>.
- Titus, Julie A, Richard Haugland, Susan O Sharrow, and David M Segal. 1982. 'Texas Red, a Hydrophilic, Red-Emitting Fluorophore for Use with Fluorescein in Dual Parameter Flow Microfluorometric and Fluorescence Microscopic Studies'. *Journal of Immunological Methods* 50 (2): 193–204. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-1759\(82\)90225-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-1759(82)90225-3).
- Tolar, Pavel. 2017. 'Cytoskeletal Control of B Cell Responses to Antigens'. *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.67>.
- Walker, John M. n.d. 'Methods in Molecular Biology™ Series Editor'. www.springer.com/series/7651.
- Xia, Hongjie, Zengguo Cao, Xuping Xie, Xianwen Zhang, John Yun Chung Chen, Hualei Wang, Vineet D. Menachery, Ricardo Rajsbaum, and Pei Yong Shi. 2020. 'Evasion of Type I Interferon by SARS-CoV-2'. *Cell Reports* 33 (1). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108234>.
- Xu, Huanzhou, Ibukun A. Akinyemi, Siddhi A. Chitre, Julia C. Loeb, John A. Lednicky, Michael T. McIntosh, and Sumita Bhaduri-McIntosh. 2022. 'SARS-CoV-2 Viroporin Encoded by ORF3a Triggers the NLRP3 Inflammatory Pathway'. *Virology* 568 (March):13–22. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2022.01.003>.

- Xu, Zhi Li, Hiroyuki Mizuguchi, Tadanori Mayumi, and Takao Hayakawa. 2003. 'Woodchuck Hepatitis Virus Post-Transcriptional Regulation Element Enhances Transgene Expression from Adenovirus Vectors'. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1621 (3): 266–71. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(03\)00078-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(03)00078-3).
- Yang, Zhanqiu, and Hai-Rong Xiong. 2012. 'Culture Conditions and Types of Growth Media for Mammalian Cells'. In *Biomedical Tissue Culture*, edited by Luca Ceccherini-Nelli and Barbara Matteoli. Rijeka: IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/52301>.
- Zennou, Véronique, Caroline Petit, Denise Guetard, Ulf Nerhbass, Luc Montagnier, and Pierre Charneau. 2000. 'HIV-1 Genome Nuclear Import Is Mediated by a Central DNA Flap'. *Cell* 101 (2): 173–85. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80828-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80828-4).
- Zhang, J, G Rokosh, Jing Zhao, and Andrew M L Lever. n.d. 'Lentivirus-Mediated Gene Expression 343 343 Lentivirus-Mediated Gene Expression'.