

# RUOLO DEI PROTEOGLICANI AD EPARAN SOLFATO NEL MODULARE L'INGRESSO DI SARS-COV-2 IN CELLULE ENDOTELIALI POLMONARI

A. Bugatti, F. Filippini, A. Zani, M. Duheric, M. Bertelli, S. Messali, A. Caruso and F. Caccuri

Sezione di Microbiologia, Dipartimento di Medicina Molecolare e Traslazionale, Università degli Studi di Brescia, Italia.

### Introduzione

Da dicembre 2019, un nuovo coronavirus appartenente al genere Betacoronavirus denominato "Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2" (SARS-CoV-2) è diventato una minaccia per la salute pubblica globale. Quando l'infezione da SARS-CoV-2 progredisce da lieve a grave, i pazienti possono sviluppare una sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS) seguita da shock, disturbi della perfusione tissutale e insufficienza multiorgano. L'ARDS classica riflette una drammatica disfunzione delle cellule endoteliali microvascolari (mECs) che comporta cambiamenti nella permeabilità vascolare, infiammazione, attivazione di vie pro-coagulanti e rottura della barriera alveolo-capillare. Le mECs primarie del polmone umano (HL-mECs) sostengono l'infezione abortiva da SARS-CoV-2 con espressione di proteine virali, ma assenza di rilascio di particelle virali infettanti (1). Inoltre, l'infezione abortiva induce disfunzione vascolare promuovendo il rilascio di molecole infiammatorie e angiogeniche (1). Le HL-mECs sono cellule prive dell'enzima di conversione dell'angiotensina-2 (ACE2) (1,3). L'integrina  $\alpha_v\beta_3$  è risultata essere un recettore alternativo ad ACE2 in tali cellule attraverso un motivo conservato Arg-Gly-Asp (RGD), situato nel "Receptor Binding Domain" (RBD) delle proteine Spike di tutte le varianti di SARS-CoV-2 (3,4). Il motivo RGD non è esposto nell'RBD della Spike né quando questa si trova in posizione "up" né in posizione "down" (5) impedendo pertanto un'interazione ottimale tra l'RBD e le integrine. Queste evidenze hanno portato ad ipotizzare che, per esporre e ottenere la geometria ottimale del motivo RGD, SARS-CoV-2 ha bisogno di un co-recettore. I dati da noi ottenuti hanno mostrato il coinvolgimento dei proteoglicani ad eparan solfato nel promuovere l'ingresso di SARS-CoV-2 mediato da integrina nelle HL-mECs rappresentando così dei co-recettori funzionali per l'ingresso del virus nelle cellule endoteliali. Sulla base dei risultati ottenuti, i proteoglicani ad eparan solfato potrebbero rappresentare un nuovo e importante bersaglio terapeutico per contrastare la presenza del virus a livello sistemico e contribuire a limitare la gravità della malattia a livello endoteliale.

### Infezione abortiva di SARS-CoV-2 in HL-mECs

Il sovrannatante di cellule A549-ACE2+ e di HL-mECs ACE2-negative infettate con la variante Omicron BA.1 di SARS-CoV-2, è stato raccolto a 1-24-48-72h dopo l'infezione e il genoma virale è stato quantificato mediante qRT-PCR. Come mostrato in Fig. 1A, le HL-mECs non hanno mostrato alcun aumento del numero di copie di SARS-CoV-2 nel tempo se confrontate con le A549-ACE2+. In maniera interessante, la quantifica dell'RNA intracellulare di SARS-CoV-2 in HL-mECs ha mostrato la presenza di un basso numero di copie di RNA virale e non è stato osservato nessun aumento significativo nel tempo. Tali risultati dimostrano l'assenza di progressione nella sintesi del genoma virale confermando che le cellule endoteliali di polmone sostengono un'infezione abortiva di SARS-CoV-2.

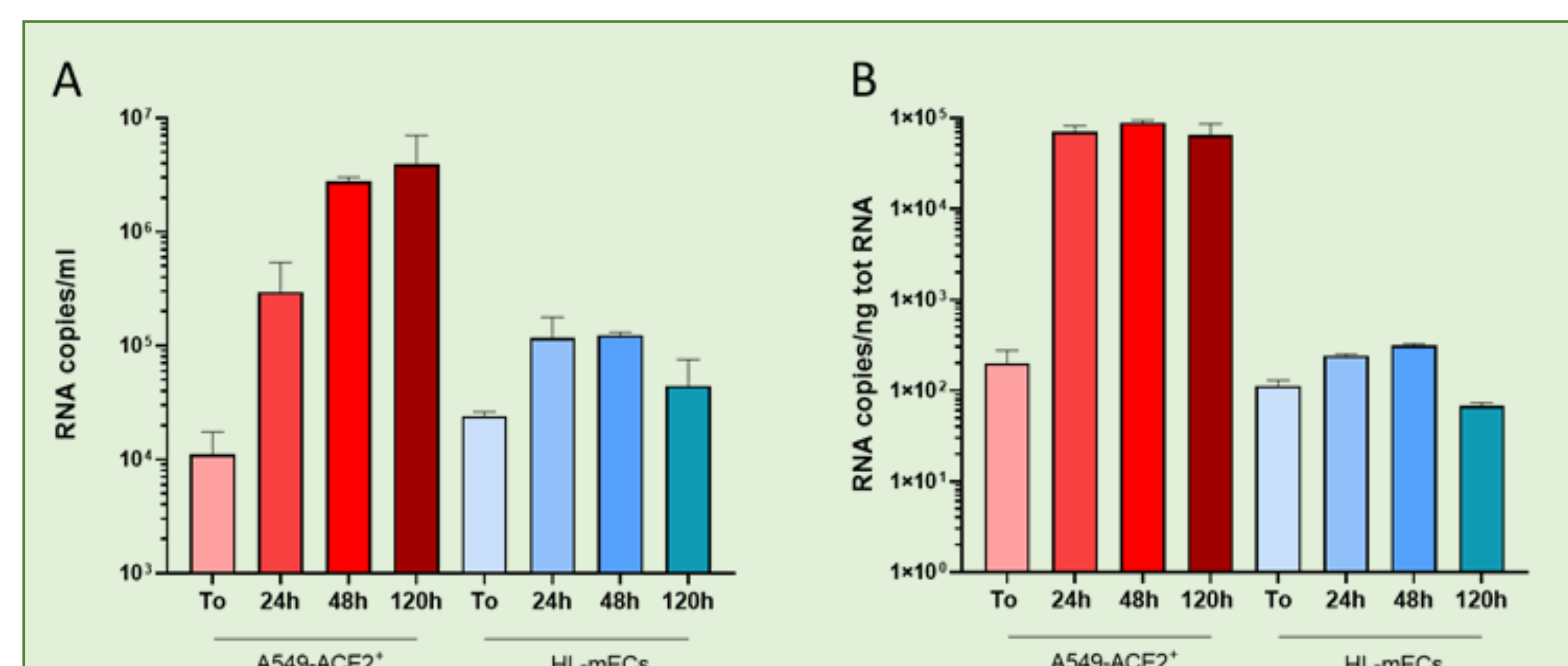


Figura 1. Espressione dell'RNA virale a livello extra- (A) ed intra-cellulare (B) in HL-mECs e A549-ACE2+ infettate con la variante Omicron BA.1 di SARS-CoV-2

### SARS-CoV-2 infetta le HL-mECs attraverso l'integrina $\alpha_v\beta_3$

Dati ottenuti nel nostro laboratorio hanno mostrato come le HL-mECs non esprimono il recettore ACE2 (1). È noto che numerosi virus mostrano sulle proteine associate all'envlope e/o al capsido un motivo di riconoscimento delle integrine caratterizzato dalla sequenza RGD (Arg-Gly-Asp). SARS-CoV-2 possiede tale motivo in posizione 403-405 dell'RBD della Spike e studi in «silico» ne hanno mostrato l'interazione con le integrine espresse sulla superficie cellulare. Basandoci sui tali evidenze, abbiamo valutato la possibilità che l'ingresso del virus nelle HL-mECs potesse essere mediato dall'integrina  $\alpha_v\beta_3$  abbondantemente espressa su queste cellule. Come mostrato nella Fig. 2A, le HL-mECs pre-trattate con un anticorpo monoclonale anti  $\alpha_v\beta_3$  e quindi infettate con la variante Omicron BA.1, presentano un' inibizione dell'ingresso di SARS-CoV-2 pari al 61%, dato confermato anche dal risultato ottenuto mediante il saggio di immunofluorescenza (Fig. 2B). Tale evidenza dimostra come l'ingresso di SARS-CoV-2 nelle HL-mECs ACE2-negative sia mediato principalmente dall'integrina  $\alpha_v\beta_3$ .

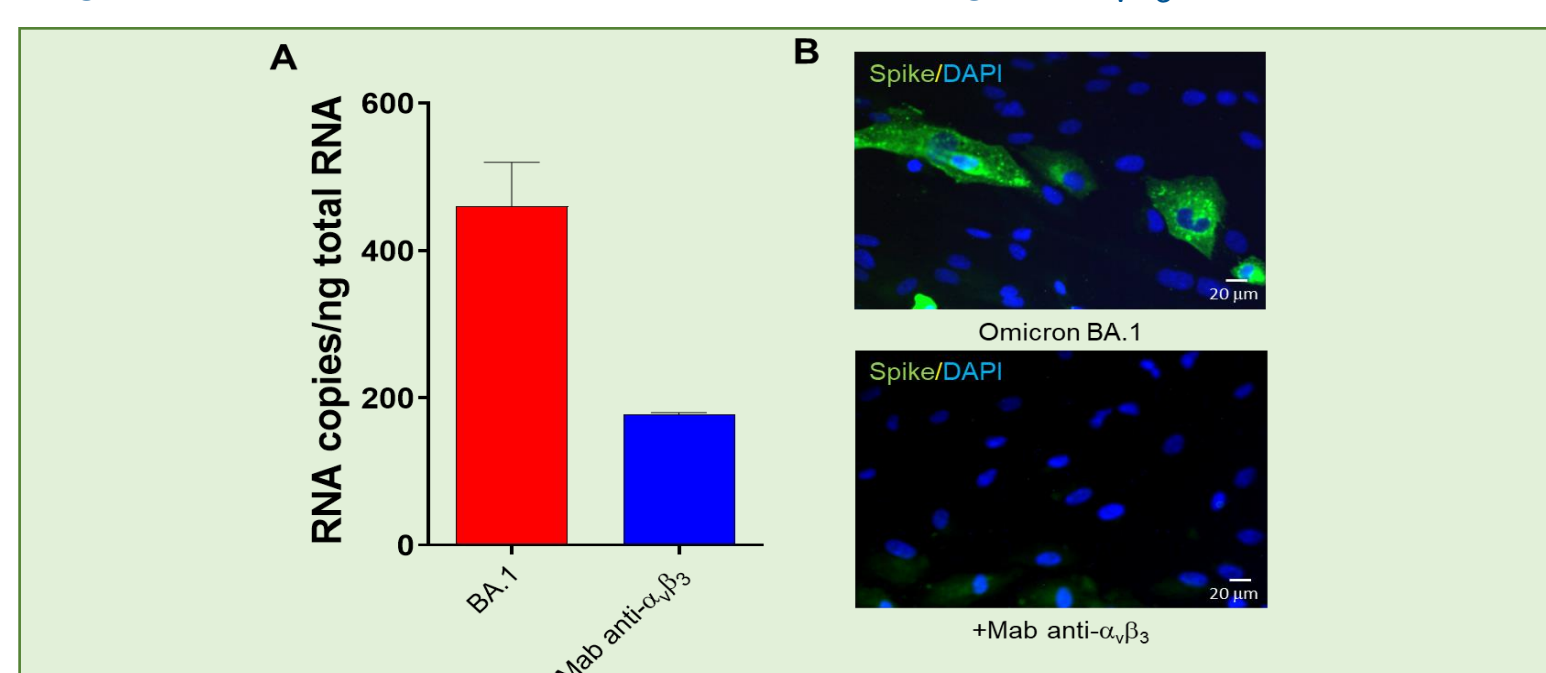


Figura 2. Inibizione dell'RNA e degli antigeni virali in HL-mECs pretrattate con mAb anti- $\alpha_v\beta_3$  e infettate con la variante Omicron BA.1 di SARS-CoV-2

### I proteoglicani ad eparan solfato mediano l'ingresso di SARS-CoV-2 nelle cellule endoteliali ACE2-negative

Per verificare la possibilità che anche i proteoglicani ad eparan solfato fossero coinvolti nell'ingresso di SARS-CoV-2 nelle cellule endoteliali, abbiamo eseguito degli esperimenti d'interazione mediante Risonanza Plasmonica di Superficie (Surface Plasmon Resonance, SPR). I dati ottenuti hanno permesso di dimostrare il legame tra l'RBD della Omicron BA.1 con l'eparina (Fig. 3A, linea rossa). Tale interazione era inibita quando l'RBD veniva pretrattato con eparina solubile (Fig. 3A, linea azzurra). Sulla base dei risultati ottenuti in SPR, la variante Omicron BA.1 pretrattata o meno con eparina solubile è stata utilizzata per infettare le HL-mECs pretrattate o non pretrattate con eparinase III. Come mostrato nella Fig. 3B, sia il pretrattamento con eparinase che quello con eparina inibiscono in maniera significativa l'ingresso di SARS-CoV-2 nelle cellule endoteliali. Il dato è stato confermato anche mediante un saggio di immunofluorescenza (Fig. 3C e D).

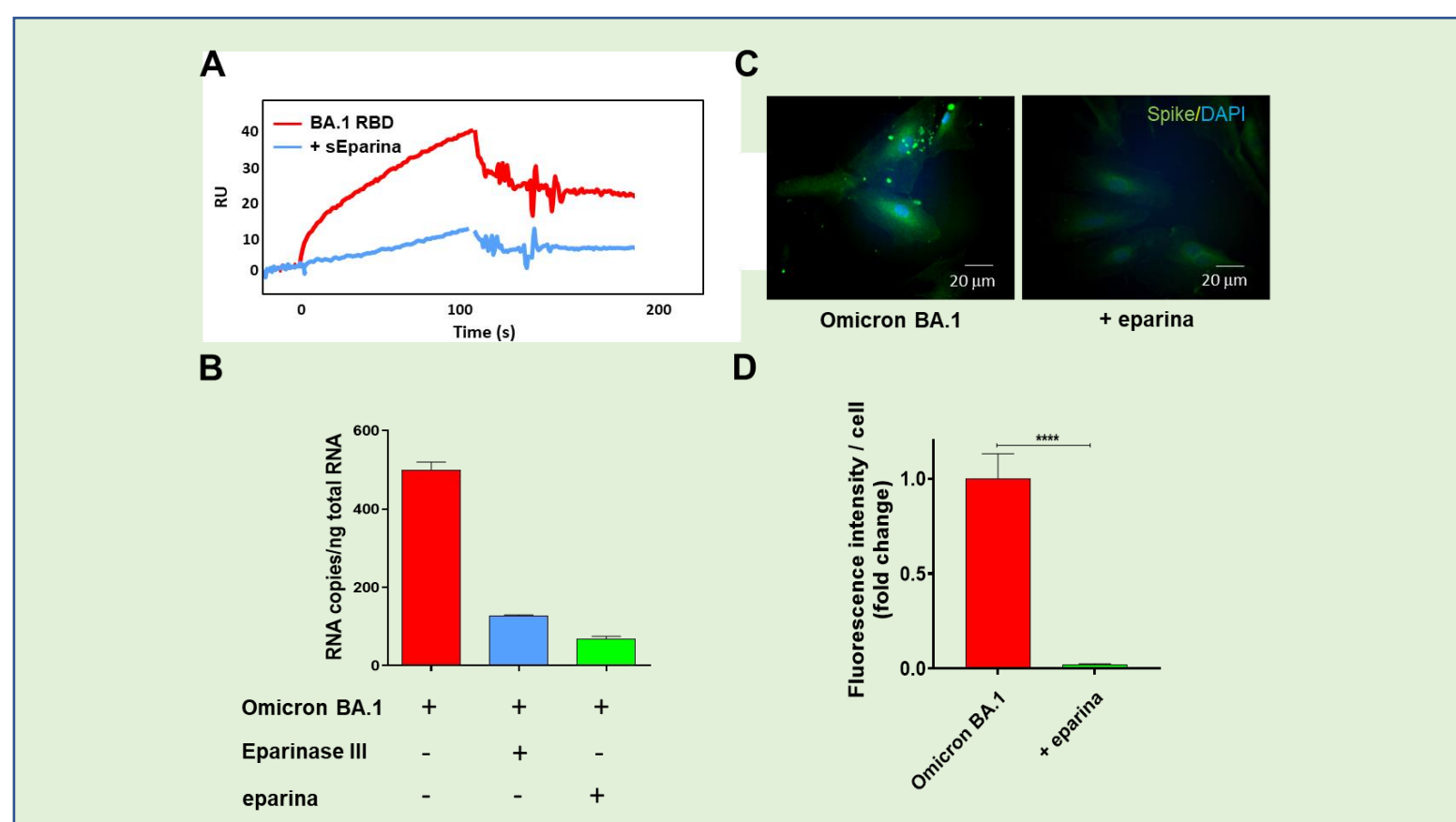


Figura 3. Inibizione dell'ingresso di SARS-CoV-2 da parte di eparina solubile e eparinase III

### L'eparina inibisce l'angiogenesi indotta da SARS-CoV-2 nelle HL-mECs

Dati ottenuti nel nostro laboratorio, hanno dimostrato come SARS-CoV-2 sia in grado di promuovere un fenotipo angiogenetico nelle HL-mECs (1). Abbiamo, quindi, valutato se il pretrattamento del virus con eparina fosse in grado di inibire l'angiogenesi indotta da SARS-CoV-2 nelle cellule endoteliali infette. Come mostrato in Fig. 4A, le HL-mECs infettate con la Omicron BA.1 e seminate su una matrice extracellulare (matrigell) a basso contenuto di fattori di crescita, formavano una fitta rete di tubi se confrontate con cellule non infette (NI). Al contrario, HL-mECs infettate con il virus pretrattato con eparina solubile, presentavano una riduzione della formazione dei tubi pari circa al 64% (Fig. 4B), confermando la capacità dell'eparina di inibire l'angiogenesi indotta da SARS-CoV-2 sulle ECs.

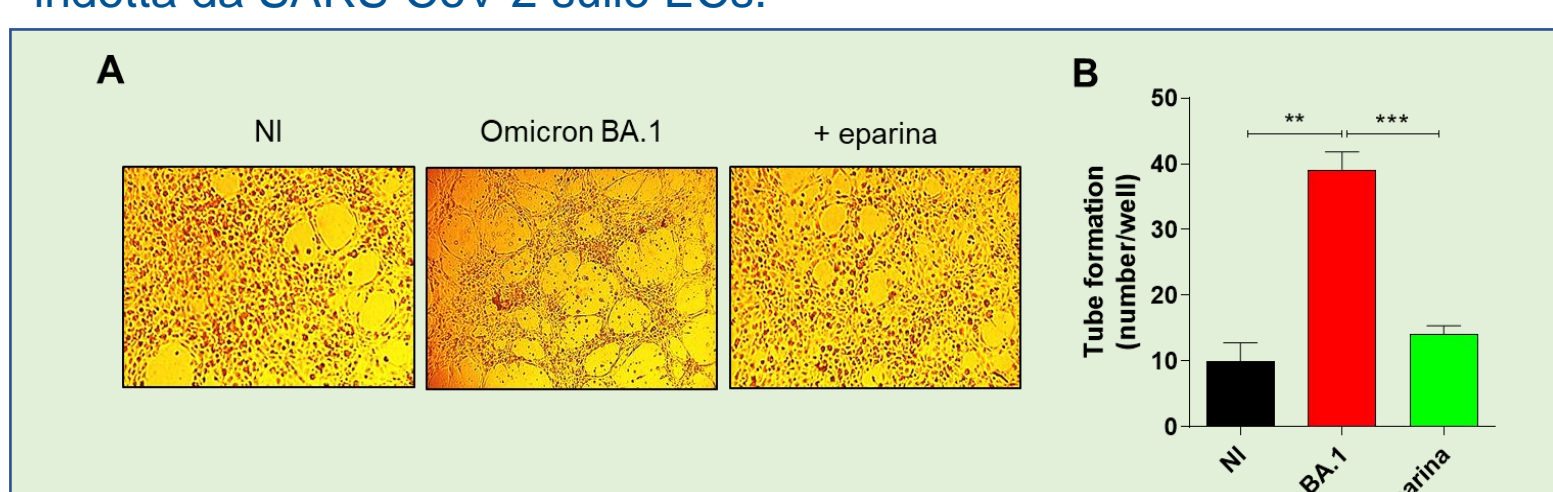


Figura 4. Inibizione dell'angiogenesi indotta da SARS-CoV-2 da parte di eparina solubile

### L'eparina inibisce la via del segnale che induce angiogenesi nelle HL-mECs infettate da SARS-CoV-2

Il fenomeno dell'angiogenesi viene innescato dall'attivazione di messaggeri intracellulari che inducono una modificazione della sopravvivenza, della capacità proliferativa e della capacità migratoria delle cellule endoteliali. Abbiamo, quindi, infettato le HL-mECs con la variante Omicron BA.1 e analizzato, mediante il saggio del western blot, la fosforilazione del secondo messaggero ERK. Come mostrato nella Fig. 5A, la Omicron BA.1 induce nelle HL-mECs una forte «up-regolazione» di pERK rispetto alle cellule non infette (NI). Il pretrattamento del virus con eparina solubile è in grado di inibire in modo significativo tale fosforilazione confermando ancora una volta la capacità dell'eparina di inibire l'angiogenesi indotta da SARS-CoV-2 nelle cellule endoteliali (Fig. 5B).

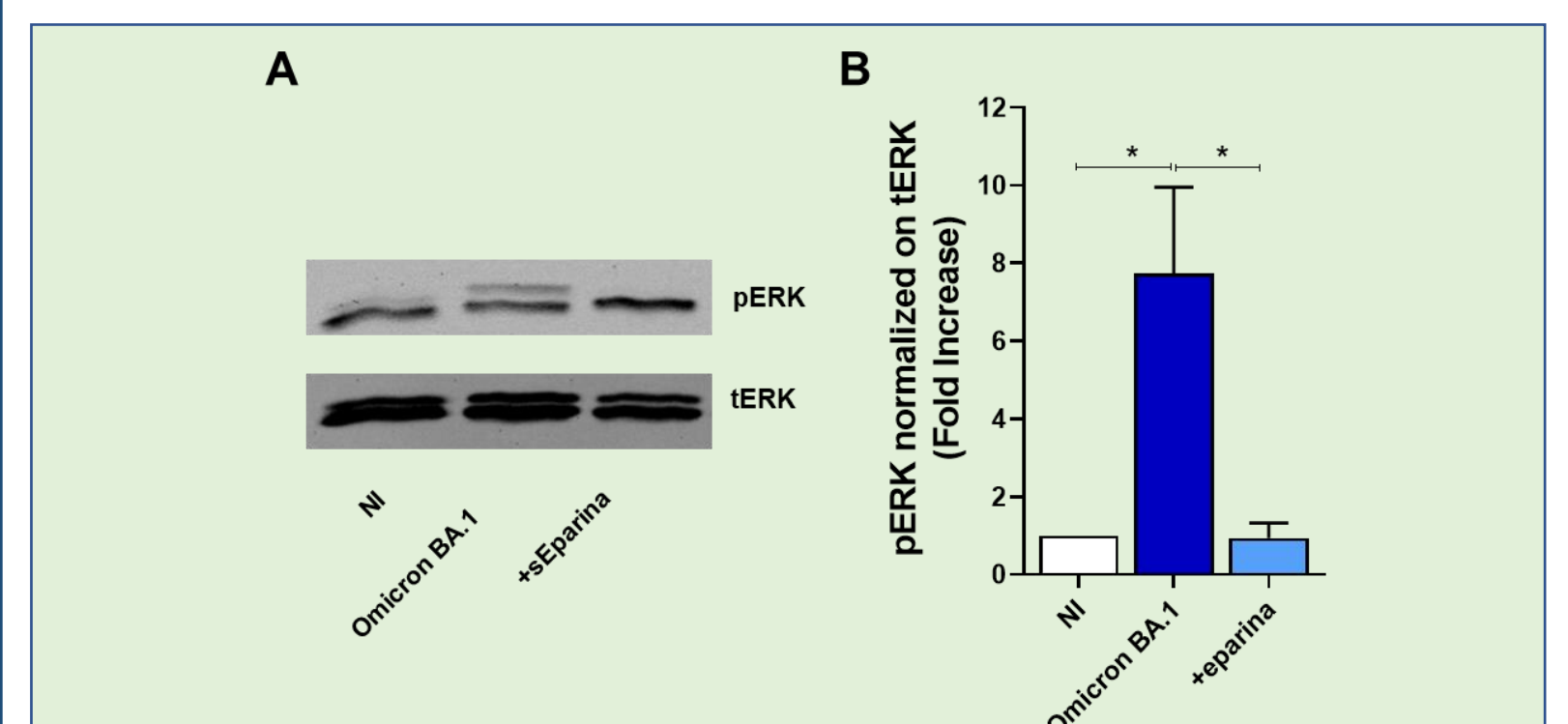


Figura 5. Fosforilazione di ERK indotta da SARS-CoV-2

### Conclusioni

I risultati ottenuti hanno dimostrato come i proteoglicani ad eparan solfati giocano un ruolo nel mediare l'ingresso di SARS-CoV-2 nelle cellule endoteliali microvascolari polmonari. SARS-CoV-2 promuove un fenotipo angiogenetico attraverso la via del segnale delle MAP chinasi, aumentando la fosforilazione di ERK. Il pre-trattamento del virus con eparina solubile è in grado di impedire l'ingresso di SARS-CoV-2 nelle cellule endoteliali bloccando la conseguente attivazione del «signalling» intracellulare che promuove l'angiogenesi in cellule endoteliali infettate. Pertanto, questo lavoro pone l'attenzione sul possibile utilizzo di composti eparino-simili in grado di bloccare l'ingresso del virus contrastando la sua presenza a livello sistemico e contribuendo a limitare la gravità della malattia dovuta alla conseguente disfunzione endoteliale (fig.6).

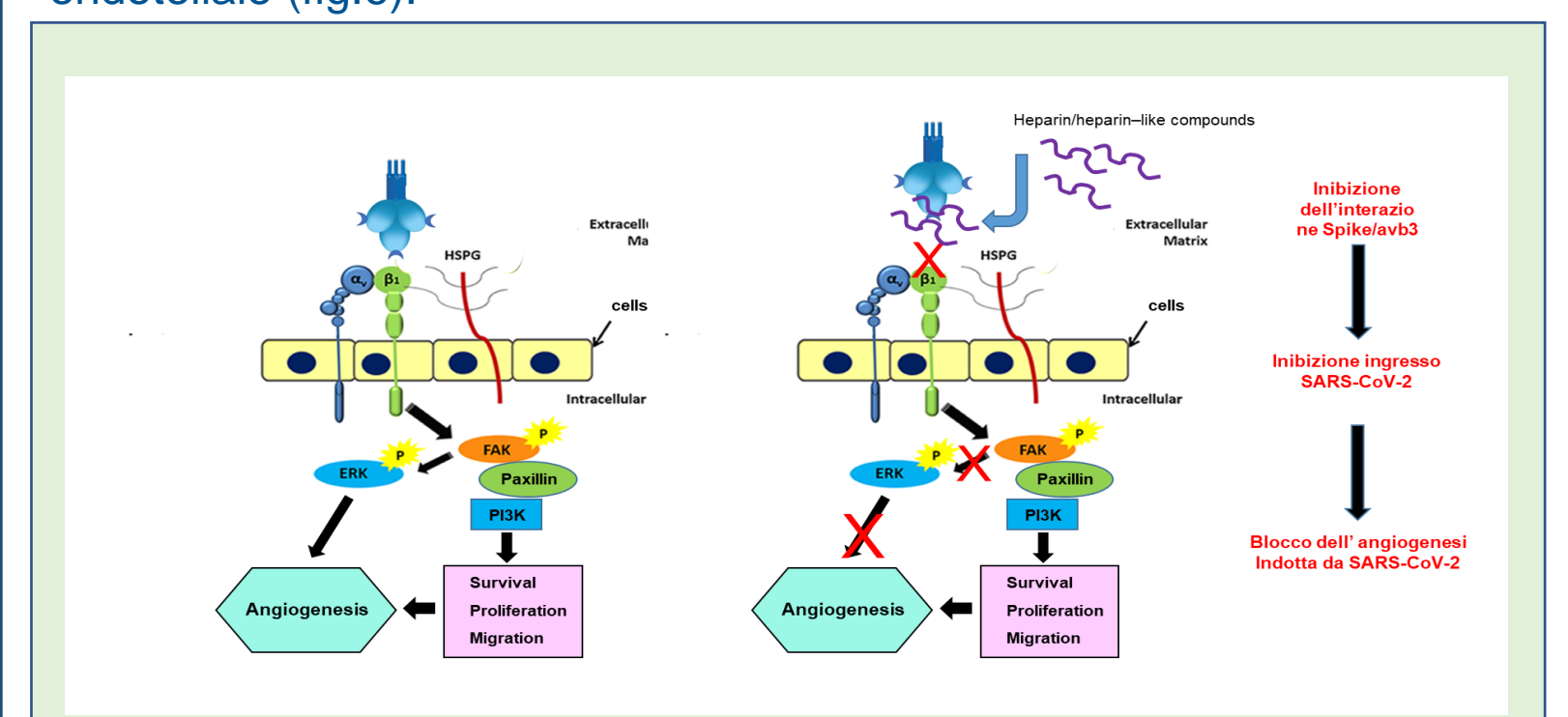


Figura 6. Possibile meccanismo d'azione di composti eparino-simili

### Reference bibliografiche

- 1) Caccuri F et al. 2021, Microorganisms. 3;9(7):1438.
- 2) Ma Z et al. Stem Cell Reports, 2020, 17, 538-55
- 3) Bugatti A et al. Viruses, 2022, 14, 705
- 4) Sigrist CJA et al. Antiviral Res, 2020, 177, 104759
- 5) Nitahara Y et al. Microbiol Spectr, 2021, 9, e0096521