



**UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE**

**Corso di Laurea
SCIENZE BIOLOGICHE**

**SARS-CoV-2: DALLO STUDIO DELLE INTERAZIONI TRA LE PROTEINE VIRALI E GLI RNA UMANI ALLO SVILUPPO DI VACCINI.
SARS-CoV-2: FROM STUDYING INTERACTIONS BETWEEN VIRAL PROTEINS AND HUMAN RNAs TO VACCINE DEVELOPMENT.**

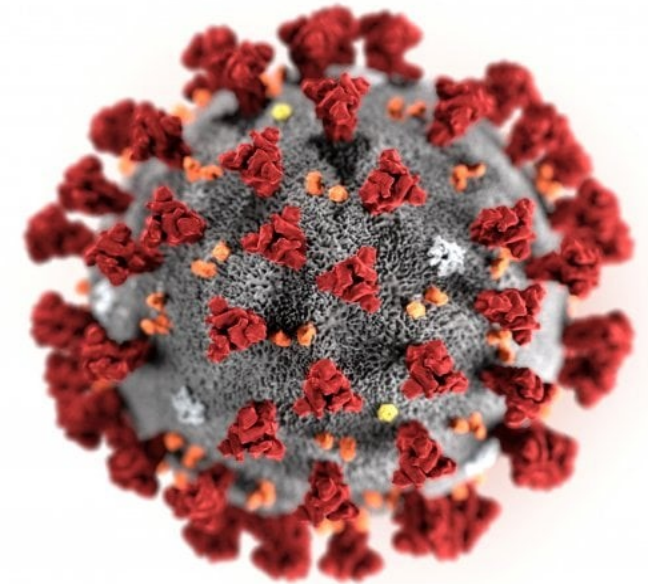
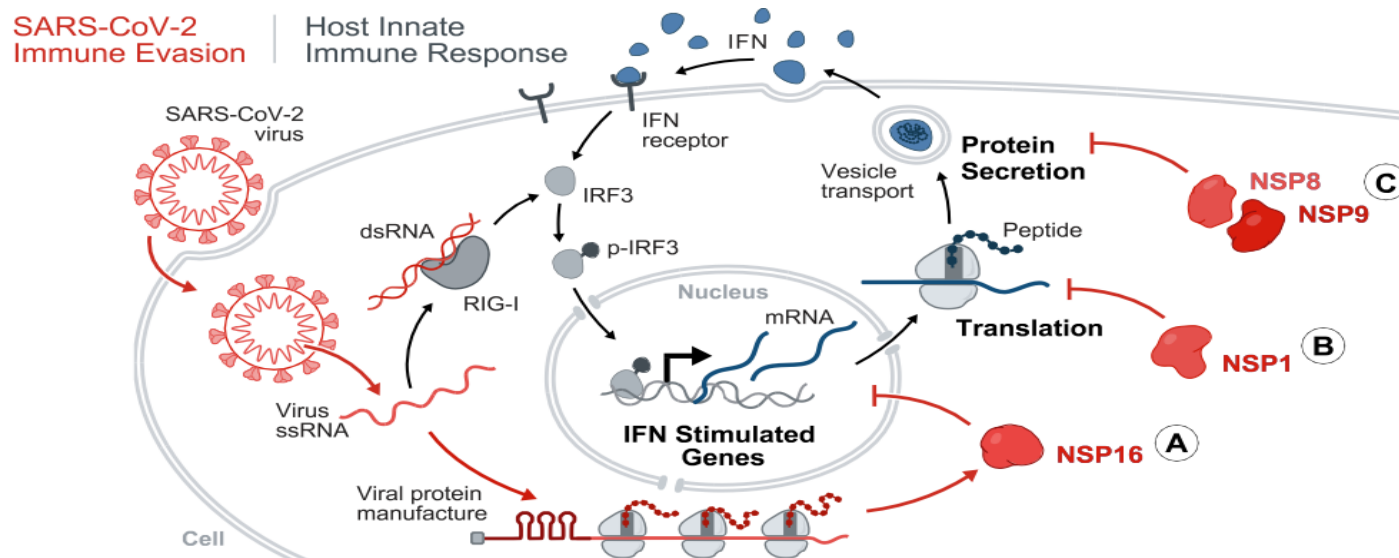
Tesi di Laurea di:
Alessia CHIAVARO

Docente Referente
Chiar.ma Prof.ssa
Anna LA TEANA

**Sessione Straordinaria
Anno Accademico 2020/2021**

LE INTERAZIONI TRA LE PROTEINE DEL SARS-CoV-2 E GLI RNA UMANI

Il coronavirus 2 della sindrome respiratoria acuta grave (SARS-CoV-2) è un coronavirus recentemente identificato che causa la malattia respiratoria nota come COVID-19.



QUI, DEFINIAMO IN MODO COMPLETO LE INTERAZIONI FONDAMENTALI CHE AVVENGONO TRA LE PROTEINE DEL SARS-COV-2 E GLI RNA UMANI.

INTERAZIONI TRA LE PROTEINE DEL SARS-CoV-2 E GLI RNA UMANI

Il SARS-CoV-2 codifica 27 proteine

4 proteine strutturali:

- Il nucleocapside (N);
- L'involucro (E);
- La membrana (M);
- Spike (S).

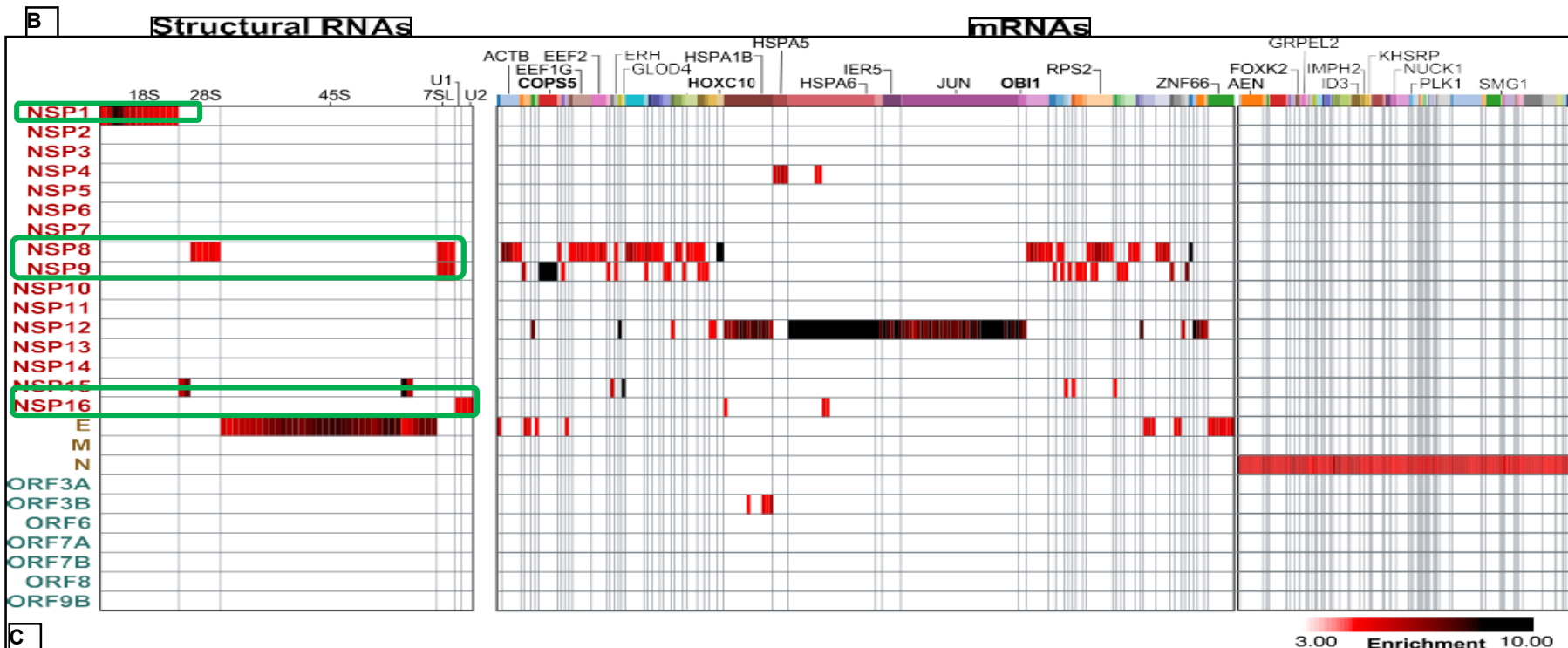
16 proteine non strutturali:

- (NSP1-NSP16).

7 proteine accessorie:

- ORF3A, ORF3B, ORF6,
ORF7A, ORF7B, ORF8 e ORF9B.

Attraverso questa tabella è possibile osservare tutte le interazioni che avvengono tra le proteine virali e gli RNA umani.



Interazioni su cui ci siamo concentrati:

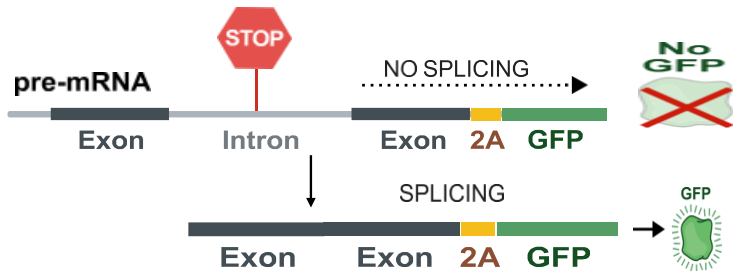
- NSP16-snRNA U1 e U2;
- NSP1-rRNA 18S;
- NSP8/NSP9-7SL

Soppressione risposta IFN

INTERAZIONE NSP16-snRNA U1/U2

È stata identificata un'interazione altamente specifica tra la proteina virale NSP16 e gli snRNA U1 e U2, quest'ultimi sono essenziali durante il processo di splicing degli mRNA.

Per testare questo, è stato co-espresso NSP16 in cellule umane insieme a un reporter di splicing derivato da IRF, fuso a GFP.



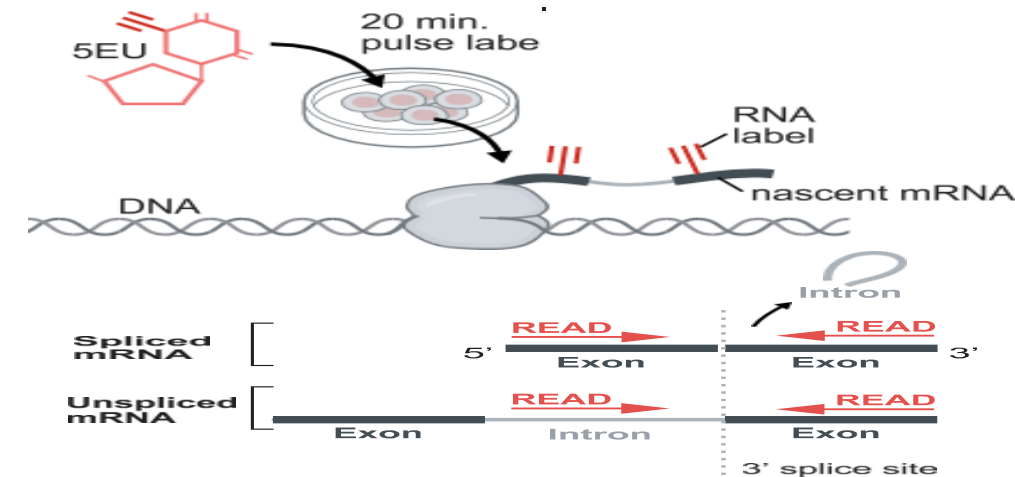
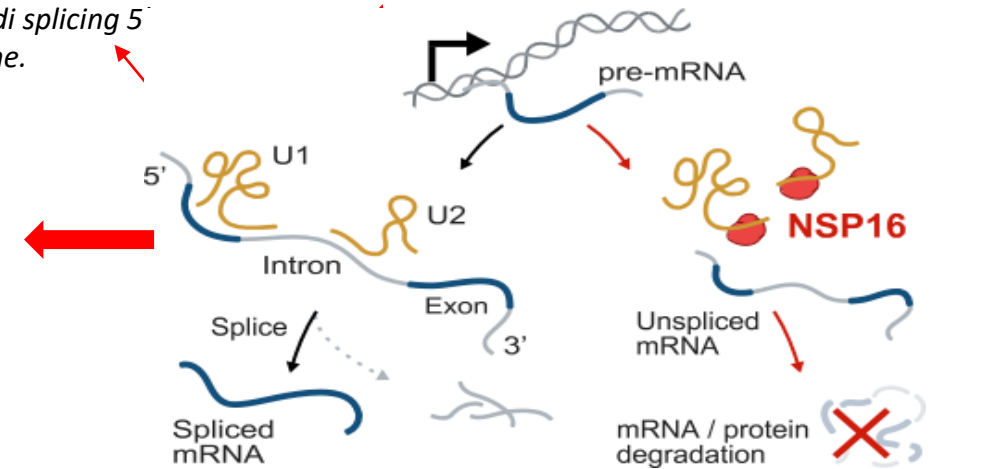
Il legame di NSP16 agli snRNA U1 e U2 interrompe lo splicing dei geni appena trascritti.

NSP16 ha un effetto globale sullo splicing

L'interazione tra la proteina virale NSP16 e gli snRNA U1 e U2, porta a un'interruzione globale del processo di splicing degli mRNA umani, di conseguenza a causa di questa interazione non viene stimolata una robusta risposta IFN.

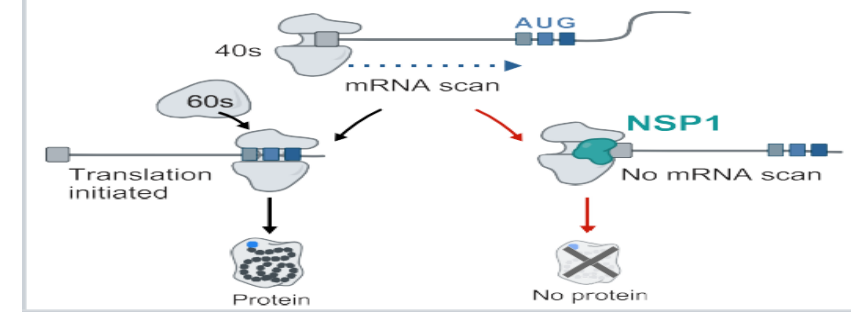
l'U1snRNA si ibrida al sito di splicing 5' alla giunzione esone-introne.

l'U2snRNA si ibrida al punto di ramificazione nell'introne

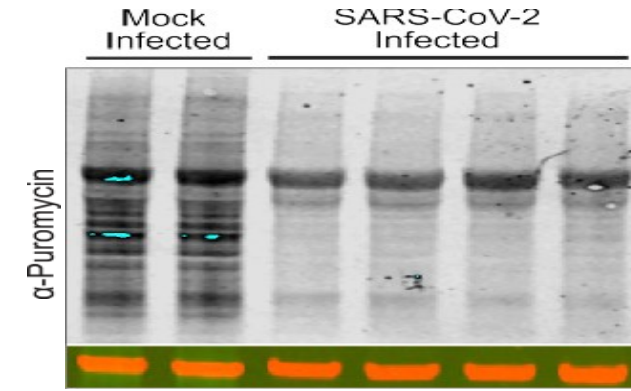
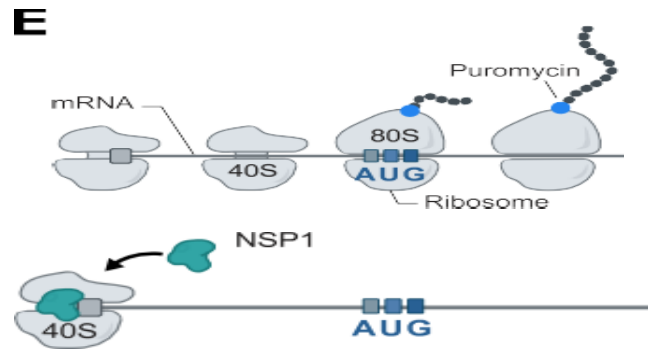


INTERAZIONE NSP1-rRNA 18S

È stato ipotizzato che questa interazione potesse sopprimere l'inizio globale della traduzione dell'mRNA. Per determinare se NSP1 porta all'inibizione della traduzione di proteine in cellule umane, è stata utilizzata una tecnica chiamata rilevamento di superficie di traduzione (SUnSET).

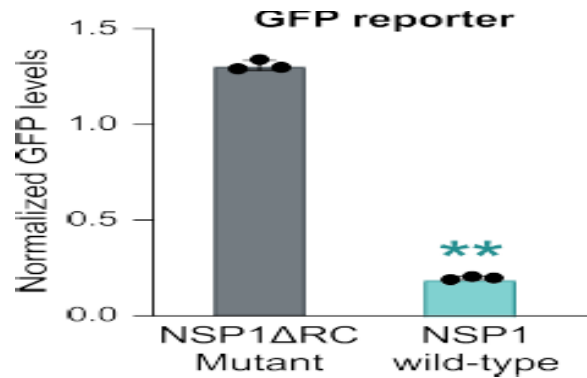


È stata osservata una forte riduzione del livello di integrazione di puromicina nelle cellule infettate dal SARS-CoV-2.

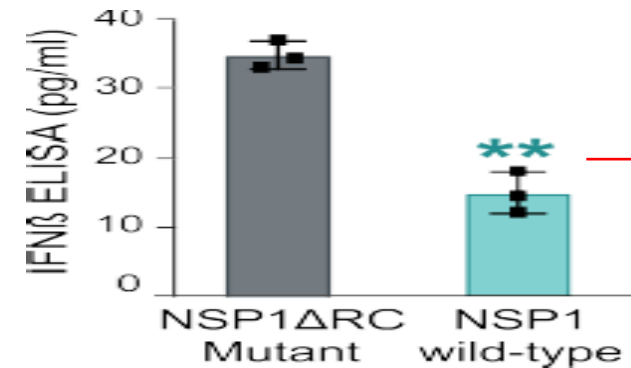
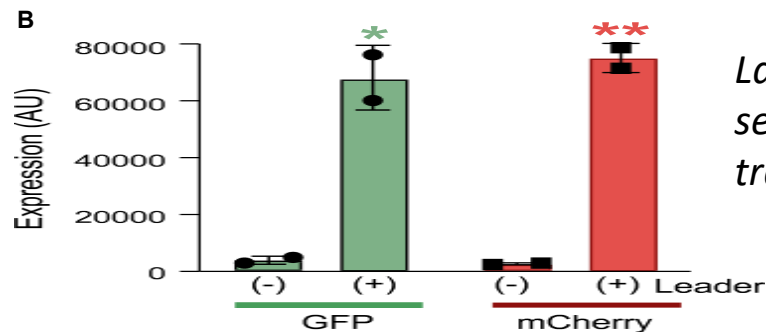


Per capire se il legame di NSP1 al 18S rRNA determina una soppressione globale della traduzione, è stato generato un mutante NSP1 (**NSP1DRC**).

Perdita completa di contatti in vivo con l'rRNA 18S



La presenza di una comune sequenza leader 5' permette la traduzione degli mRNA virali

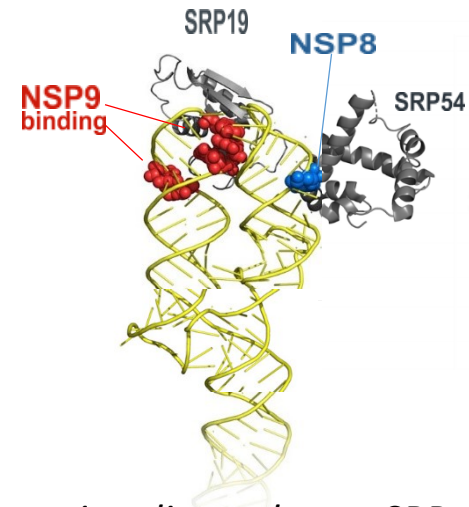


Soppressione della risposta IFN-β.

INTERAZIONE NSP8/NSP9-7SL

- NSP8 interagisce con l'RNA 7SL nella regione legata da SRP54
- NSP9 si lega all'RNA 7SL nella regione legata dalla proteina SRP19

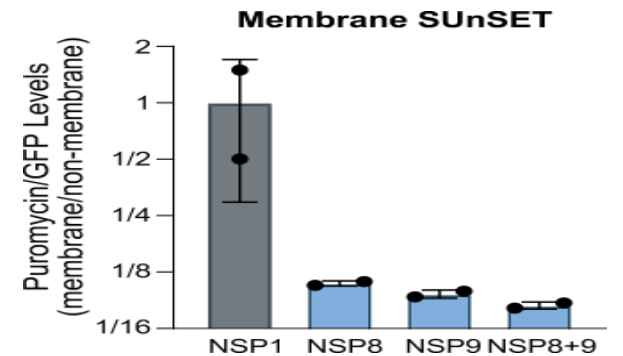
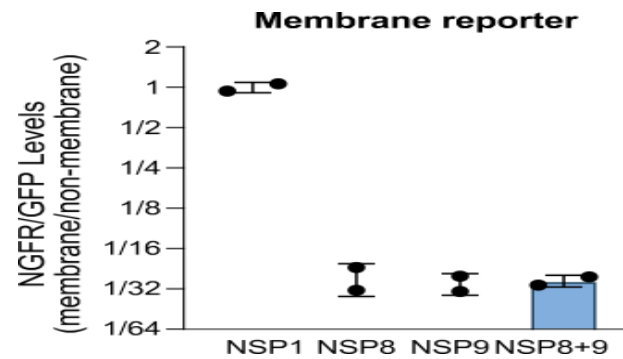
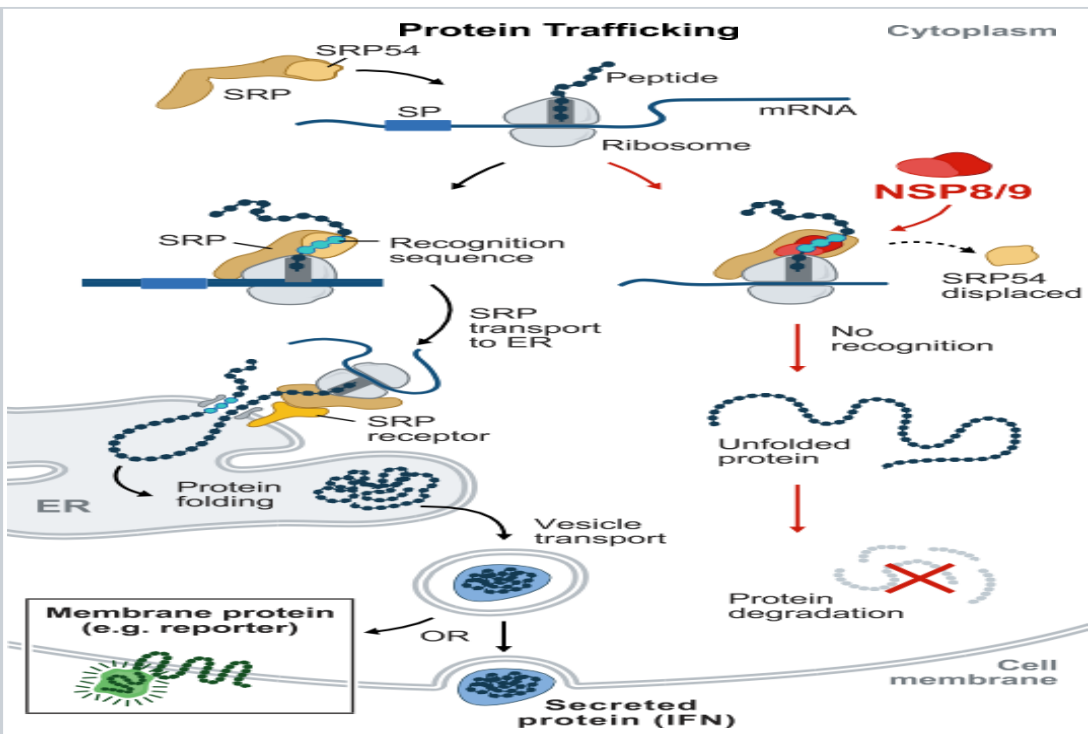
È stato ipotizzato che questa interazione alteri la traslocazione di proteine di membrana secrete e integrali.



È stata espressa una proteina di membrana SRP-dipendente [NGFR], fusa a una GFP non di membrana.

siRNA contro SRP54 o SRP19

diminuzione del rapporto tra i livelli delle proteine di membrana e non di membrana



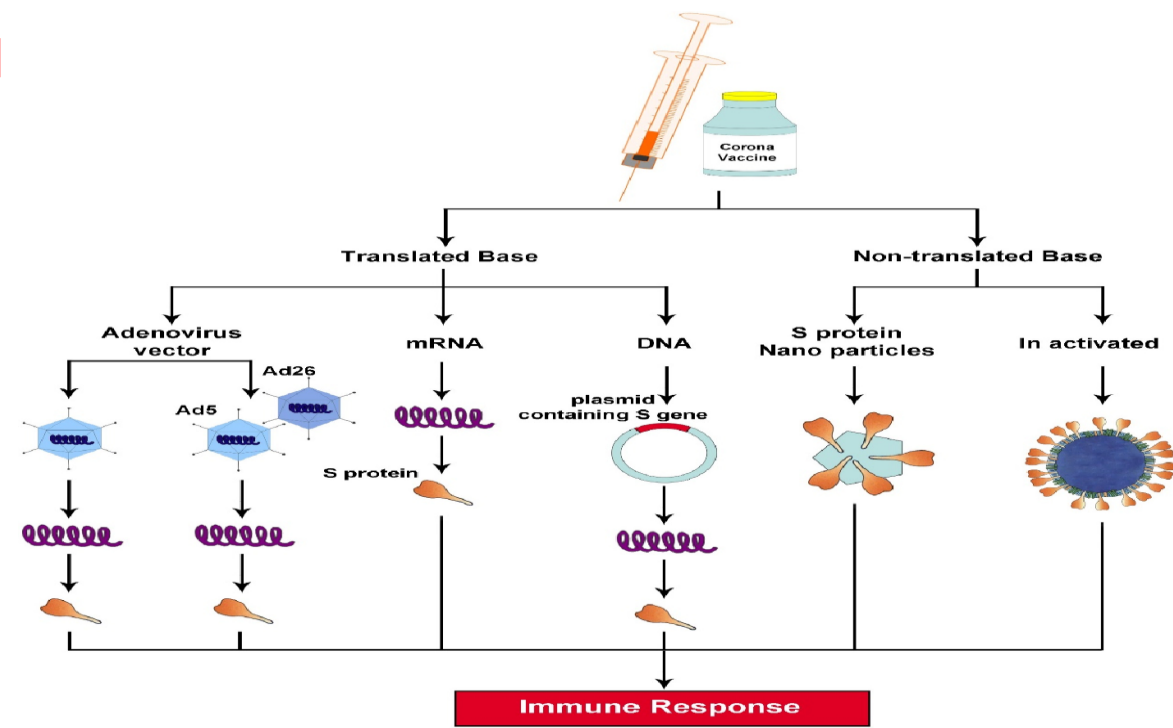
Questi risultati dimostrano che NSP8 e NSP9 si legano a 7SL per interrompere la funzione SRP e sopprimere il traffico delle proteine di membrana nelle cellule infettate da SARS-CoV-2.

VACCINI

- La proteina S risulta essere il bersaglio principale dei vaccini.
- Il recettore principale per il SARS-CoV-2 nelle cellule umane è l'enzima di conversione dell'angiotensina 2 (ACE2).

Spike
+
ACE2

rilascio dell'RNA virale nel citoplasma.



VACCINI VETTORIALI VIRALI

- Utilizzano come vettori virus che non sono in grado di replicarsi (ADENOVIRUS)

VANTAGGI

- Riduzione effetti collaterali indesiderati;
- Termostabilità;
- Forte risposta immunitaria.

SVANTAGGI

- Rischio di integrarsi nel genoma dell'ospite;
- La presenza di un'immunità contro il vettore può ridurre l'efficacia del vaccino.

AstraZeneca, Johnson & Johnson,
e sputnik

VACCINI INATTIVATI

SINOPHARM COVID-19 BBIBP-CorV

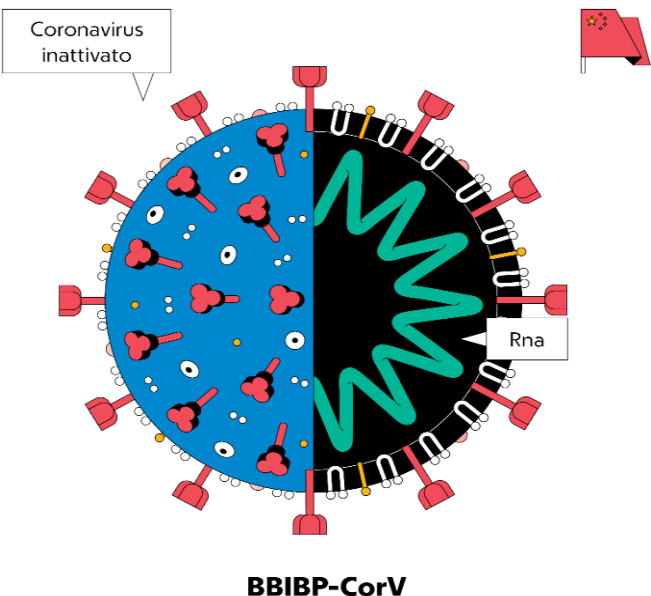
- *Inattivazione del virus attraverso l'uso di specifici metodi fisici e chimici;*
- *Utilizzo di subunità del virus;*
- *Utilizzo di adiuvanti.*

VANTAGGI

- *Robusta risposta immunitaria;*
- *Sicurezza e affidabilità;*
- *Veloce produzione.*

SVANTAGGI

- *VAERD;*
- *Breve periodo di immunità.*



VACCINI A mRNA

Pfizer/BioNTech e Moderna

mRNA BNT-162b2

mRNA-1273

S-2P

(differisce dalla proteina spike di due amminoacidi)

- *I vaccini a base di mRNA contengono molecole di mRNA che codificano antigeni proteici;*
- *Le molecole di mRNA sono posizionate all'interno di nanoparticelle lipidiche.*

VANTAGGI

- *Non c'è il rischio di infezione durante la produzione del vaccino;*
- *Ripetute immunizzazioni con vaccini a mRNA sono associate a immunità a lungo termine;*
- *Non c'è possibilità di creazione di mutazioni ;*
- *Robusta risposta immunitaria;*
- *Breve tempo di produzione.*

SVANTAGGI

- *Conservazione a temperature molto basse;*
- *Dosi di richiamo.*

CONCLUSIONI



BIBLIOGRAFIA

“SARS-CoV-2 Disrupts Splicing, Translation, and Protein Trafficking to Suppress Host Defenses” DI Abhik K. Banerjee, Mario R. Blanco, Emily A. Bruce, ..., Jason W. Botten, Devdoot Majumdar, Mitchell Guttman. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.10.004>

“SARS-CoV-2 (Covid-19) vaccines structure, mechanisms and effectiveness: A review” DI Hadis Fathizadeh a, Saman Afshar b, Mahmood Reza Masoudi c, Pourya Gholizadeh d, Mohammad Asgharzadeh e, Khudaverdi Ganbarov f, S,ükran K“ose g, Mehdi Yousefi h, Hossein Samadi Kafil. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.08.076>

«Come funzionano i vaccini anti Covid» A cura di [Gedi Visual](https://www.gedi-visual.com/) -Testi di **Nicla Panciera** - Illustrazioni di **Paula Simonetti** - Coordinamento editori **Cinzia Lucchelli** - Grafica e sviluppo **Patricio Angel Susanna** - Supervisione di **Annalisa D'Aprile**. <https://lab.gedidigital.it/gedi-visual/2021/covid-19-come-funzionano-i-vaccini/>

RIASSUNTO ESTESO

Il coronavirus 2 della sindrome respiratoria acuta grave (SARS-CoV-2) è un coronavirus recentemente identificato che causa la malattia respiratoria nota come coronavirus 2019 (COVID-19). Sono stati clonati i geni codificanti per tutte e 27 le proteine virali e sono state purificate con successo 26 delle 27 proteine virali. Sono state osservate interazioni specifiche tra le proteine virali e gli RNA umani. NSP16 si lega ai domini di riconoscimento dell'mRNA dell'RNA di splicing U1 e U2 e agisce per sopprimere lo splicing globale dell'mRNA durante l'infezione da SARS-CoV-2. NSP1 si lega all'RNA ribosomiale 18S nel canale di ingresso dell'mRNA del ribosoma e porta alla globale inibizione della traduzione dell'mRNA durante l'infezione. Infine, NSP8 e NSP9 si legano all'RNA 7SL nel segnale di riconoscimento e interferiscono con il traffico di proteine verso la membrana cellulare dopo l'infezione. L'interruzione di ciascuna di queste funzioni cellulari essenziali agisce per sopprimere la risposta dell'interferone all'infezione virale. I nostri risultati scoprono una strategia su più fronti utilizzata dalla SARS-CoV-2 per antagonizzare i processi cellulari essenziali per sopprimere le difese dell'ospite.

Il SARS-CoV-2 è un virus a RNA a singolo filamento positivo. La proteina spike risulta essere il bersaglio principale dei vaccini, mentre ACE2 risulta essere il principale recettore per il SARS-CoV-2. Importante punto per la progettazione dei vaccini è la conoscenza del punto isoelettrico. Sono stati sviluppati diversi vaccini alcuni di questi sono basati su vaccini inattivati, altri sono basati su acidi nucleici. I vaccini inattivati sono l'opzione più veloce per i vaccini antivirali, metodi fisici e chimici vengono utilizzati per inattivare il virus. BBIBP-CorV è uno dei vaccini inattivati. Vaccino vettoriale virale utilizzano un virus (solitamente un adenovirus) non in grado di replicarsi. AstraZeneca Johnson & Johnson e Sputnik sono tra i vaccini non replicanti. Vaccini a DNA funzionano utilizzando un plasmide geneticamente modificato contenente la sequenza di DNA che codifica per l'antigene. Il metodo utilizzato per iniettare il DNA plasmidico nelle cellule è l'elettroporazione. Vaccini a mRNA contengono molecole di mRNA che codificano antigeni proteici. La molecola di mRNA è posizionata all'interno di nanoparticelle lipidiche, a causa della loro instabilità. Pfizer/bioNTech e Moderna sono i vaccini a mRNA utilizzati contro il SARS-CoV-2. Vaccini basati su subunità proteiche sono altamente dipendenti dagli adiuvanti. I peptidi sono molecole instabili e quindi posizionati all'interno di nanoparticelle lipidiche. Nonostante gli sforzi degli scienziati e dei ricercatori di tutto il mondo per avanzare nella produzione di vaccini efficaci contro la SARS, c'è ancora molto da scoprire che può essere utilizzato per migliorare la qualità e l'efficacia dei vaccini e per superare i limiti degli attuali vaccini.