

**16 Maggio**

## **Dalla neutralizzazione disattivazione metacronale alla deciliazione: parte seconda**

### **Prologo**

La mucosa nasale è attrezzata per impedire la penetrazione di virus grazie al *lining protettivo* regolato dai *microvilli apicali* e dall'*attività metacronale* esercitata dalle *ciglia* presenti nella porzione apicale degli epitelioцитi che rivestono la mucosa nasale. Mezzo secolo di osservazioni sperimentali ci dicono che alcuni virus sono in grado di colonizzarla attraverso un processo che, nel lontano 1948 il patologo ungherese **Fazekas de St Groth** definì "viropexis" paragonandolo alla fagocitosi.

Questi riescono a neutralizzare i sistemi difensivi andando ad interferire con la attività dei microvilli e sabotando (danneggiando?) i *macchinari molecolari* che regolano il funzionamento ciliare.

Questa strategia adottata da molti virus (es. Sendai ) utilizza le ciglia per entrare negli epitelioцитi e da qui bloccare il funzionamento ciliare fino ad ottenere una progressivamente una *deciliazione parziale* del epitelio mucosale che viene indirettamente avvertita come *anosmia e perdita dell'odorato* come conseguenza delle modificazioni chemo-sensoriali che determina.

### **Evidenze Sperimentali**

Nel 1970, **Dourmashkin e Tyrrell** del *Clinical Research Centre Laboratories, National Institute for Medical Research di Londra* hanno dimostrato che il virus dell'influenza si allinea e si fonde con la membrana ciliare . Dopo essere penetrato nelle ciglia, il nucleocapside del virus Sendai si è parzialmente srotolato diffondendosi all'interno del corpo basale ciliare.

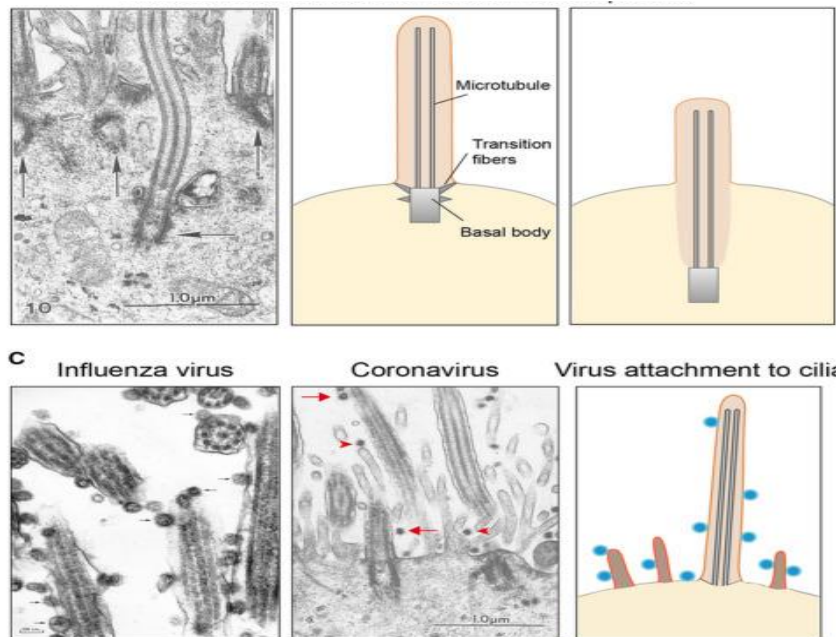
Nel 1994, **Bjorn Afzelius**, del *Dipartimento ultrastrutture dell' Università di Stoccolma*, per primo descrisse una discinesia ciliare primaria in uno studio ultrastrutturale della mucosa nasale di un paziente con diagnosi di rinite cronica e bronchite

*"I virioni erano visibili all'interno e all'esterno delle cellule ciliate, ma non all'esterno o all'interno delle cellule caliciformi o di altre cellule della mucosa nasale. Alcuni virioni si trovano vicino ai microvilli, altri nelle tasche della membrana cellulare apicale. Il citoplasma conteneva molte piccole vescicole con un singolo virione, grandi vescicole apicali contenenti centinaia di virioni e citosomi simili a lisosomi con un numero moderato di virioni. Alcune particelle simili a virus prive di un interno denso di elettroni erano visibili sia nei citosomi che a livello extracellulare. Il germogliamento del virus è stato osservato nell'apparato di Golgi ma in nessun altro posto nella cellula".*

In sintesi le ciglia fungono da siti di assorbimento per diverse famiglie di virus e, almeno per il virus Sendai, le ciglia sembrano essere uno dei siti di ingresso per l'infezione virale. Al momento non esistono evidenze dirette che dimostrino come i coronavirus siano capaci di colonizzare oltre la mucosa respiratoria nasale anche di infettare i neuroni olfattivi rendendo l'intera fossa nasale ugualmente a rischio di infezione.

Le puntuali osservazioni di Afzelius sono state confermate in studi successivi e recentemente dal *Dipartimento di Viroscienza, Erasmus University Medical Center, Rotterdam*, che rilevato il coronavirus nelle cellule ciliate di macachi infettati da SARS - CoV - 2. (Rockx B 2020 )

## Interazioni coronavirus epitelio respiratorio nasale



I coronavirus entrano nelle cellule ospiti usando la proteina spike (S), che si lega a uno specifico recettore cellulare presente sulla superficie ciliare con l'innesco automatico della proteina S dipendente dalla proteasi utilizzando l'enzima di conversione dell'angiotensina 2 (ACE2) come recettore dell'ospite e TMPRSS2 come proteasi cellulare. I set di dati di sequenziamento dell'RNA a cellula singola (scRNA - seq) del consorzio *Human Cell Atlas* hanno descritto l'espressione del recettore e della proteasi nelle cellule epiteliali nasali fornendo la base molecolare per l'ingresso del coronavirus nell'epitelio nasale umano. (Lukassen S 2020)

Sebbene i virioni non danneggiassero indebitamente l'epitelio ciliato, la deciliazione rappresentava una delle anomalie ultrastrutturali più evidenti nelle cellule infettate da coronavirus (Sungnak W 2020)

Il team di **Mary Mirvis** del Dipartimento di Fisiologia Molecolare e Cellulare, Stanford University, Stanford, California, ha proposto due modelli alternativi che spiegano i possibili meccanismi che portano alla deciliazione: l'amputazione ed il riassorbimento. (Mirvis M 2019)

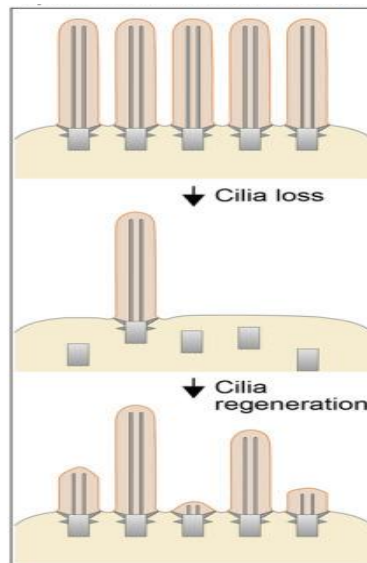
Nel *modello di amputazione*, il singolo ciglio viene eliminato di netto dai corpi basali, effetto che può essere riprodotto in laboratorio. Nel *modello di assorbimento*, il ciglio può essere assorbito gradualmente dal citoplasma per poter riemergere intatto e funzionante .... Entrambi i modelli sono in linea con le osservazioni di Afzelius: I cambiamenti nell'ultrastruttura delle ciglia respiratorie umane causati dal comune raffreddore sono stati studiati in 12 pazienti.

*La mucosa nasale è stata studiata tre volte: il primo o il secondo giorno dopo l'inizio dei sintomi e 1 settimana e 3 settimane dopo la prima biopsia. Il danno è stato più grave a 1 settimana. La scoperta più notevole è stata la perdita di ciglia e cellule ciliate. Tuttavia, l'ultrastruttura era normalmente normale, senza alcun aumento delle anomalie tubulari, rispetto al materiale normale dei rapporti precedenti. Tre settimane dopo l'inizio della malattia il numero di ciglia e cellule ciliate era aumentato fino a diventare quasi normale. Tuttavia, come segno di rigenerazione, sono state*

spesso osservate ciglia corte immature (da 0,7 a 2,5 micron di lunghezza). L'orientamento ciliare era uniforme, le braccia in dineina erano normali, e non vi è stato alcun aumento del numero di anomalie tubulari.

I risultati suggeriscono che la funzione mucociliare compromessa durante le infezioni virali è dovuta alla perdita di ciglia e cellule ciliate, piuttosto che ad anomalie ultrastrutturali nelle ciglia. Lo sviluppo di anomalie tubulari e l'orientamento ciliare casuale possono richiedere un'esposizione più estesa a fattori che influenzano la funzione ciliare. ( Rautiainen M,1992)

## Deiceliazione e rigenerazione dopo infezione virale



Come abbiamo visto precedentemente Il genoma di SARS - CoV - 2 30 kb codifica per 14 Orfs. Tra questi, la poliproteina Orf1a / Orf1ab viene trasformata autoproteolisi in 16 proteine non strutturali. Tra gli interattori ad alta confidenza, **Nsp13** si lega a ben 12 componenti nel centrosoma, di cui tre nella regione pericentrosomiale, cinque nell'appendice distale del centriolo e quattro nell'estremità prossimale del centriolo (Jaakobsen L, 2011) ) (Kumar A, 2013)

I **centrosomi** nelle cellule animali sono organelli dinamici con una matrice proteica di materiale pericentriolare assemblato attorno a una coppia di centrioli. Organizzano il citoscheletro dei microtubuli e l'apparato del fuso mitotico. I centrioli maturi sono essenziali per la biogenesi delle ciglia primarie che mediano eventi di segnalazione chiave. Nonostante i recenti progressi, la base molecolare per la pletera di processi coordinati dai centrosomi non è completamente compresa. Utilizzando la spettrometria di massa PCP-SILAC sono identificabili almeno 126 proteine centrosomali note e 40 candidate, di cui 22 sono state confermate come potenziali nuovi componenti.

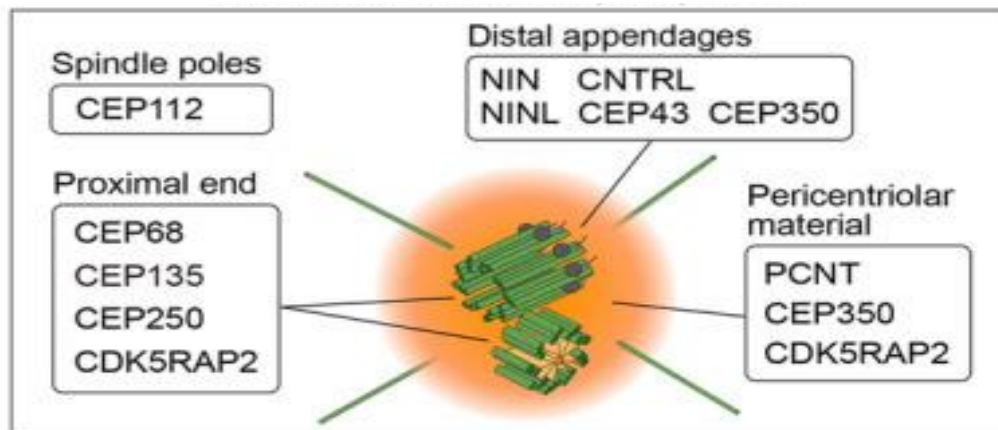
**Ambuj Kumar** della Divisione di bioinformatica, dell' Università di Vlore (India)

nell' avventuroso reèport Proteine CEP: i cavalieri della dinastia dei centrosomi identifica e classifica un totale di 31 proteine sono state classificate nella categoria delle proteine della famiglia CEP (Kumar A 2013)

Come abbiamo visto precedentemente Il genoma di SARS - CoV - 2 30 kb codifica per 14 Orfs. Tra questi, la poliproteina Orf1a / Orf1ab viene trasformata autoproteolisi in 16 proteine non strutturali. Tra gli interattori ad alta confidenza, **Nsp13** si lega a ben 12 componenti nel

centrosoma, di cui tre nella regione pericentrosomiale, cinque nell'appendice distale del centriolo e quattro nell'estremità prossimale del centriolo (Jaakkobsen L, 2011) (Kumar A, 2013)

## Interazioni tra proteine centrosomali e **Nsp13**



Queste interazioni non sono state convalidate sperimentalmente e la rilevanza biologica sottostante non è chiara. Non possiamo escludere la possibilità che le cellule ospiti trattino la proteina virale **Nsp13** come spazzatura cellulare depositandola nel centrosoma. In alternativa, **Nsp13** può localizzarsi attivamente al centriolo e competere con i partner di legame endogeni delle proteine centrosomiche, abolendo le interazioni fisiologiche all'interno della struttura. Il possibile ruolo della Nsp 13 è quello che continueremo a vedere domani.

## RIFERIMENTI

- Afzelius BA. Ultrastructure of human nasal epithelium during an episode of coronavirus infection. Virchows Arch. 1994;424(3):295-300.
- Rockx B et al. Comparative pathogenesis of COVID-19, MERS, and SARS in a nonhuman primate model. Science. 2020 May 29;368(6494):1012-1015.
- Lukassen S et al, SARS-CoV-2 receptor ACE2 and TMPRSS2 are primarily expressed in bronchial transient secretory cells. EMBO J. 2020 May 18;39(10):e105114.
- Sungnak W et al SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. Nat Med. 2020 May;26(5):681-687
- Mirvis M, Siemers KA, Nelson WJ, Stearns TP. Primary cilium loss in mammalian cells occurs predominantly by whole-cilium shedding. PLoS Biol. 2019 Jul 17;17(7):e3000381.
- Rautiainen M et al. Ultrastructural changes in human nasal cilia caused by the common cold and recovery of ciliated epithelium. Ann Otol Rhinol Laryngol. 1992 Dec;101(12):982-7.

- Jakobsen L et al. Novel asymmetrically localizing components of human centrosomes identified by complementary proteomics methods. *EMBO J.* 2011 Apr 20;30(8):1520-35.
- Kumar A, Rajendran V, Sethumadhavan R, Purohit R. CEP proteins: the knights of centrosome dynasty. *Protoplasma.* 2013 Oct;250(5):965-83.
- Casenghi M et al Polo-like kinase 1 regulates Nlp, a centrosome protein involved in microtubule nucleation. *Dev Cell.* 2003 Jul;5(1):113-25.
- Gordon DE et al A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. *Nature.* 2020 Jul;583(7816):459-468.
- Yan CH et al. Association of chemosensory dysfunction and COVID-19 in patients presenting with influenza-like symptoms. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2020 Jul;10(7):806-813.
- Pallanti S. Importance of SARS-Cov-2 anosmia: From phenomenology to neurobiology. *Compr Psychiatry.* 2020 Jul;100:152184.