

14.Ottobre

Viperina: un antivirale strategico

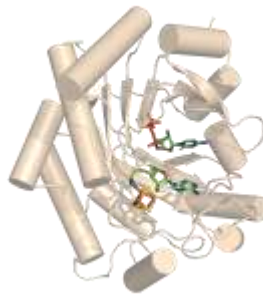
La strategia è madre di molte vittorie
Sigfrido

Le infezioni virali continuano a rappresentare le principali e più preoccupanti sfide per la salute pubblica ed è diventata imprescindibile una migliore comprensione dei meccanismi e dei processi che regolano i cicli di vita virale per poter sviluppare strategie terapeutiche efficaci.

Una tattica per provare a controllare l'infezione da Sars-cov-2 punta sulla stimolazione dei geni stimolati dall' **interferone (ISG)** capaci di inibire la replicazione virale.

Tra le varie molecole potenzialmente in grado di innescare questo processo, la **viperina**, possiede tutte le prerogative per poterlo fare.

La **viperina**, un membro della superfamiglia di enzimi **S-adenosil-L-metionina (SAM)**, è una proteina **inducibile dall'interferone** coinvolta nell'inibizione della replicazione di un'ampia gamma di virus a RNA e DNA, incluso il virus della dengue, il virus del Nilo occidentale, virus dell'epatite C, virus dell'influenza A, virus della rabbia 2 e HIV



Struttura tridimensionale della VIPERINA

possiede attività antivirali attraverso interazioni con un gran numero di host e proteine virali funzionalmente non correlate. **Nell' allegato sono riportate le principali caratteristiche molecolari e funzionali**

Nel 2014, **Karla Helbing e Michael Beard** del *Institute for Molecular Pathology della università di Adelaide* evidenziarono come la **viperina** per la sua capacità di limitare un'ampia varietà di infezioni virali potesse svolgere un ruolo nella stimolazione della produzione di **interferone di tipo I** e nella modulazione di numerosi **fattori di trascrizione** virali. La **viperina** sembrava avere la capacità di modulare le condizioni di alcune variabili intracellulari e di interferire con la produzione e/o assemblaggio di alcune proteine virali.

Helbig KJ, Beard MR. The role of viperin in the innate antiviral response. J Mol Biol. 2014 Mar 20;426(6):1210-9.

Negli anni successivi, lo studio delle azioni meccanicistiche riconducibili alla **viperina**, ha fatto molta strada descrivendo importanti domini funzionali della proteina in relazione alla sua attività antivirale e/o immunomodulatoria, oltre a dimostrare la sua attività come membro della famiglia di **enzimi SAM radicali** (vedi figura1) .

Nel 2018 **Antony Gizzi** del *Department of Biochemistry, Albert Einstein College di NY*



proponeva per la prima volta il principale meccanismo d'azione dimostrando che la **viperina** inibisce la replicazione del virus attraverso la sintesi del **ribonucleotide ddhCTP**, che interferisce con la sintesi dell'RNA virale.

Infatti la **viperina** catalizza la conversione della **citidina trifosfato (CTP)** in **3'-deossi-3', 4'-dideidro-CTP (ddhCTP)**, una molecola con spiccate proprietà antivirali, tramite un "meccanismo SAM-dipendente". (vedi figura 1). In particolare viene ribadito che il **ddhCTP** inibisce direttamente la replicazione del **virus Zika** in vivo ed enfatizzato come le cellule che esprimono **viperina** e in particolare i macrofagi stimolati con **interferon (IFN α)** producono quantità significative di **ddhCTP**.

Questi risultati suggeriscono un meccanismo parzialmente unificante per gli ampi effetti antivirali della **viperina** che si basa sulle proprietà enzimatiche intrinseche della proteina e comporta la generazione di un "terminator" della catena replicativa virale, codificato dai genomi dei mammiferi

Gizzi A e al. A naturally occurring antiviral ribonucleotide encoded by the human genome. Nature. 2018 Jun;558(7711):610-614.

Tuttavia, nonostante la rapida espansione delle conoscenze relative alle funzioni di questa proteina antivirale altamente conservata e antica, rimangono ad oggi lacune ed incertezze nella comprensione dei meccanismi che utilizza la **viperina** per esercitare una così ampia varietà di ruoli all'interno della cellula ed in particolare il suo impatto sul sistema immunitario

La **viperina** è stata identificata per la prima volta proprio nei macrofagi umani trattati con **interferone- γ** e nei **fibroblasti umani** infettati da citomegalovirus umano.

In questi contesti la svolge un ruolo come proteina antivirale e regolatore delle vie di segnalazione cellulare o del metabolismo cellulare quando indotta in una varietà di cellule come **fibroblasti**, **epatociti** e **cellule immunitarie**, comprese **le cellule T** e **le cellule dendritiche**. Tuttavia, il ruolo della **viperina** nei **macrofagi** è in gran parte sconosciuto.



ha dimostrato che La **viperina** è espressa a livello basale nelle cellule del midollo osseo murino compresi i monociti. La sua espressione è mantenuta nei **macrofagi** derivati da **monociti del midollo osseo (BMDM)** a seconda del trattamento con fattore stimolante le colonie di **macrofagi (M-CSF)**, ma non dal trattamento con fattore stimolante le colonie di **granulociti-macrofagi (GM-CSF)**.

Nei **BMDM wild type (WT)** e knockout della **viperina** differenziati con **M-CSF** o **G-MCSF**, ci sono piccole differenze ai livelli di espressione genica dei marcatori dei **macrofagi M1 e M2** come **l'ossido nitrico sintasi inducibile (iNOS)** e **l'arginase- 1 e citochine come IL-6 e IL-10**, indicando che l'espressione della viperina nei **BMDM** non influenza l'espressione genica basale dei marcatori dei macrofagi e delle citochine.

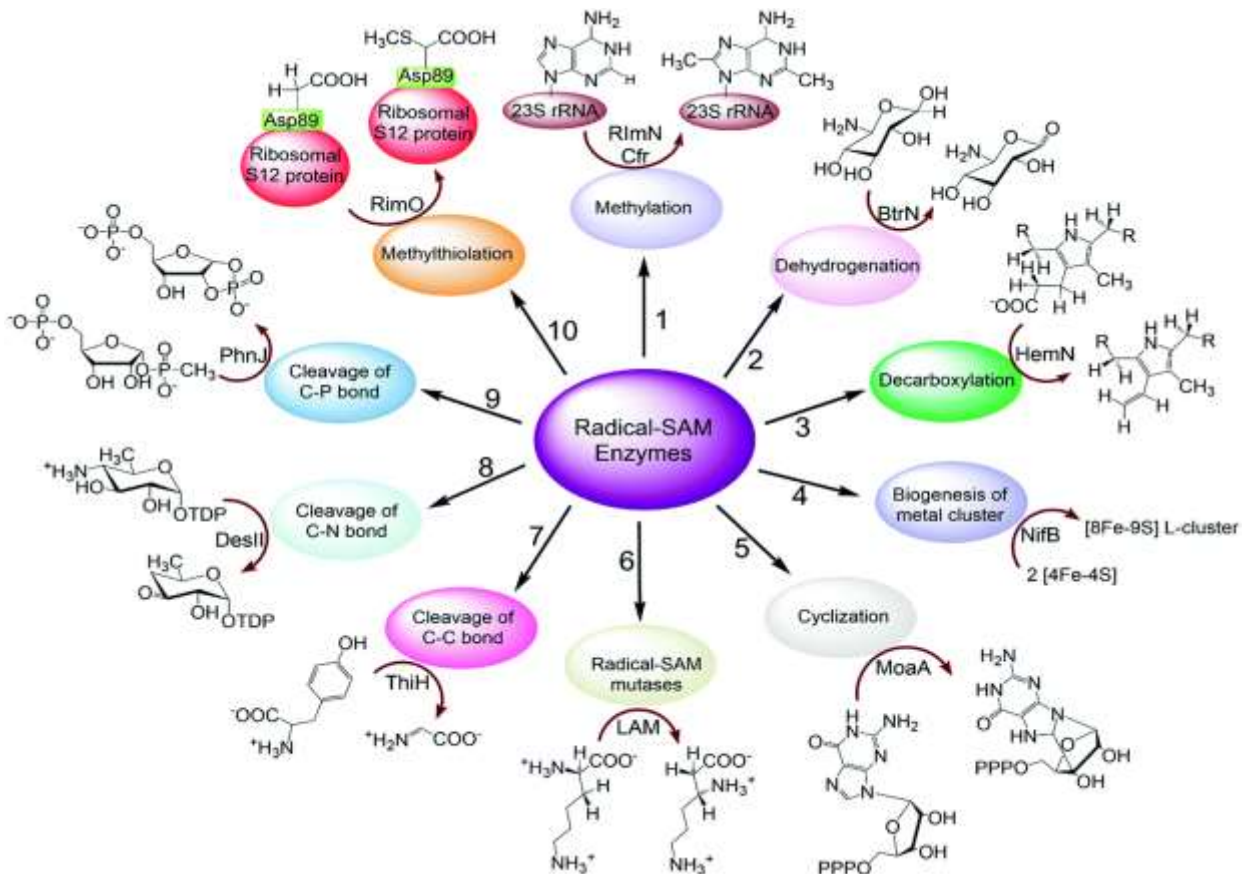
I dati suggeriscono che la **viperina** svolge un ruolo come regolatore nella polarizzazione dei macrofagi e nella secrezione delle citochine **M1 e M2**.

Eom J et al. Viperin Deficiency Promotes Polarization of Macrophages and Secretion of M1 and M2 Cytokines. Immune Netw. 2018 Aug 23;18(4):e32.

Pochi giorni fa, il 4 ottobre, l'azione della **viperina** sui macrofagi si è arricchita di un importante contributo da parte del team di Il team di **Xinying Zhou del Institute of Molecular Immunology di Guangzhou (China)** che ha dimostrato un aumento della viperina nei tessuti di pazienti con tubercolosi e in topi in seguito ad infezione con **Mycobacterium tuberculosis (Mtb)**, l'agente eziologico della tubercolosi (TB).

E' interessante rilevare come nei macrofagi infetti da Mtb, **Viperin** ha bloccato la risposta immunitaria inibendo la **produzione di citochine proinfiammatorie e ossido nitrico**. Insieme, questi risultati suggeriscono che la **viperina** potrebbe essere un bersaglio terapeutico nei pazienti con tubercolosi e lo sviluppo di una terapia diretta dall'ospite per eradicare l'infezione da Mtb

Zhou X et al. Viperin impairs the innate immune response through the IRAK1-TRAF6-TAK1 axis to promote Mtb infection. Sci Signal. 2022 Oct 4;15(754):eabe1621.



Meccanismi SAM-dipendenti

Allegato: Caratteristiche molecolari e attività della Viperina

La **viperina** proteina inibitoria del virus, associata al reticolo endoplasmatico, inducibile dall'interferone, nota anche come RSAD2 (radical SA Md omain - containing 2), è una proteina codificata dal **gene RSAD2**. La viperina è un gene stimolato dall'interferone la cui espressione inibisce molti virus a DNA e RNA (CHIKV, HCMV, HCV, DENV, WNV, SINV, influenza e HIV).

Inizialmente identificata come una proteina antivirale indotta da IFN- γ nei macrofagi infetti da citomegalovirus umano (HCMV), è stato riportato che la viperina potrebbe essere indotta dalla glicoproteina B dell'HCMV nei fibroblasti, ma nello stesso tempo inibisce l'infezione virale da HCMV edown-regola le proteine strutturali virali. Il motivo per cui la proteina del virus indurrebbe la viperina contro se stessa non è noto; tuttavia, la redistribuzione virale della viperina può riflettere il meccanismo con cui il virus elude le sue attività antivirali. La **viperina** può anche essere indotta e interagire con le proteine virali dell'HCMV e trasferirsi nei mitocondri nelle cellule infettate dal virus dell'HCMV per migliorare l'infettività virale interrompendo il metabolismo cellulare.

La **viperina** umana è un singolo polipeptide di **361 aminoacidi** con un peso molecolare previsto di **42 kDa**. I **42 aminoacidi N-terminali** della viperina formano un'**alfa-elica anfipatica**, che è relativamente meno conservata in specie diverse e ha un effetto minore sull'attività antivirale della **viperina**. Il **dominio N-terminale** della viperina è necessario per la sua localizzazione nell'ER e nelle goccioline lipidiche.

Gli **amminoacidi 77-209** della **viperina** costituiscono il dominio radicale S-adenosil metionina (SAM), contenente quattro motivi conservati. Il motivo 1 ha tre residui di cisteina conservati, CxxCxxC, che è il Fe-Smotivo vincolante ed essenziale anche per l'attività antivirale.

Gli **amminoacidi C-terminali 218-361** della **viperina** sono altamente conservati in diverse specie ed essenziali per la dimerizzazione della **viperina**.

La coda C-terminale sembra essere fondamentale per le attività antivirali contro l'HCV poiché una bandiera C-terminale contrassegnata da viperina ha perso la sua attività antivirale.

Quando la viperina è legata a SAM e la citidina trifosfato (CTP) o l'uridina trifosfato (UTP) viene utilizzata come substrato, esprime diversi parametri cinetici.

Si prevede che il substrato CTP si leghi molto più strettamente con la viperina a causa del basso valore K_m del substrato. Tuttavia, la struttura complessiva dei composti legati a UTP e CTP è simile. La differenza è che la parte uracile è meno efficace della parte citosina nel legare e ordinare i giri A e B. La **viperina** priva di nucleotidi contiene a ($\beta\alpha$) 6barilotto parziale e ha un'estensione N-terminale disordinata e un'estensione C-terminale parzialmente ordinata. Quando viene ordinata la coda C-terminale, vengono rivelate un'elica α con sei residui, un ciclo P con otto residui (che lega il γ -fosfato di CTP) e un'elica.

La **viperina** è normalmente localizzata nel *reticolo endoplasmatico (ER)* attraverso il suo dominio N-terminale e anche localizzata nelle **goccioline lipidiche**, che sono derivate dall'ER. Tuttavia, si trova anche nei mitocondri nei fibroblasti infetti da HCMV.

La **viperina** è un enzima SAM radicale in grado di produrre il terminatore di catena ddhCTP (3'-deossi-3', 4'-dideidro-CTP), che inibisce l'RNA polimerasi virale RNA dipendente (RdRp). Questa attività sembra abolire il metabolismo degli aminoacidi e la respirazione mitocondriale.

Nell'inibizione del germogliamento e del rilascio del virus dell'influenza, si suggerisce che la viperina distrugga le zattere lipidiche sulla membrana plasmatica della cellula legandosi e diminuendo le attività enzimatiche della farnesil difosfato sintasi (FPPS), un enzima essenziale nella via della biosintesi degli isoprenoidi. È stato suggerito che la **viperina** inibisca la replicazione virale dell'HCV attraverso la sua interazione con la proteina ospite hVAP-33 e NS5A e interrompendo la formazione del complesso di replicazione.

Un anno fa... Baedeker/Replay del 14 ottobre

Tre cose da sapere sulla miocardite correlata al vaccino COVID-19

L'introduzione dei vari vaccini contro la malattia del coronavirus 2019 (COVID-19) ha comportato un significativo calo della morbilità e della mortalità correlate al COVID-19 in tutto il mondo e tutti i vaccini COVID-19 approvati hanno dimostrato di fornire benefici che superano i potenziali rischi nelle diverse fasce di età. Tuttavia i rapporti recenti hanno sollevato preoccupazioni per la miocardite correlata a diversi tipi di vaccini COVID-19. Tuttavia, ci sono dati limitati sulle caratteristiche e sugli esiti della miocardite in questi pazienti. Uno studio condotto dalla Divisione di Cardiologia, Dipartimento di Medicina Interna, Università dell'Arkansas (Salah HM 2021) nel database PubMed/Medline dall'inizio fino al 27 giugno 2021, utilizzando i termini: ("miocardite" e "covid-19" e "vaccino") senza restrizioni linguistiche. Sono stati valutati - case report, serie di casi e studi di coorte; - individui che hanno sviluppato miocardite a seguito di un vaccino COVID-19, indipendentemente dal tipo o dalla dose del vaccino.

Sono stati correlati anche i livelli di picco di troponina I o T cardiaca, la frazione di eiezione ventricolare sinistra (LVEF), la durata dei sintomi e qualsiasi complicazione segnalata. Sono stati selezionati 15 studi. Dopo aver applicato i criteri di inclusione, sono stati analizzati solo 8 studi per un totale di 15 pazienti. Due degli studi inclusi erano serie di casi monografici, gli altri dei "case report". Quattordici su 15 (93%) dei pazienti erano maschi. La fascia di età era compresa tra 17 e 52 anni con un'età media di 28 anni. L'analisi riportava che il 60% dei casi di vaccino COVID-19 correlati alla miocardite era associato al vaccino

PfizerBioNTech, -il 33% era associato al vaccino Moderna e il 7% era associato al vaccino Johnson & Johnson.

Tutte le miocarditi legate al vaccino Moderna (5/5) si sono verificate dopo la seconda dose del vaccino, mentre 6/9 (66,7%) delle miocarditi legate al vaccino Pfizer-BioNTech si sono verificate dopo la seconda dose del vaccino. Il picco del livello cardiaco di troponina I (ng/mL) è stato riportato in 13/15 pazienti e variava tra 0,37 e 51,37 ng/mL (media 12,9 ng/mL). I livelli di picco di troponina T sono stati riportati negli altri 2/15 pazienti ed erano 854 ng/L e 1.693 ng/L.

L'ecocardiogramma transtoracico in tutti questi pazienti ha mostrato una LVEF conservata; il valore esatto della LVEF è stato riportato in 13/15 pazienti con una LVEF media del 53,5% e un intervallo dal 48% al 65%. Negli altri 2/15 pazienti, la FEVS è stata riportata come normale senza alcun valore. Non c'erano anomalie della parete regionale in 14/15 dei pazienti; 1 paziente aveva una sottile ipocinesia del setto apicale e laterale apicale con una FEVS del 52%. Tutti i pazienti si sono ripresi entro 6 giorni dalla presentazione con complicazioni segnalate. L'analisi aggregata dei dati disponibili mostra diversi risultati importanti...

(Per continuare vai all'originale)