

8. dicembre

Inibitori della palmitoiltransferasi come potenziali nuove strategie contro SARS-CoV-2

*C'è una crepa in ogni cosa
ed è da lì che entra la luce.*

Leonard Cohen

La **proteina spike** della sindrome respiratoria acuta grave coronavirus 2 (SARS-CoV-2) è responsabile del legame con il recettore umano dell'enzima di conversione **dell'angiotensina 2 (ACE2)** per facilitare l'ingresso nella cellula ospite, ottenuto in primo luogo mediante il legame tramite il dominio di legame del recettore e subendo successivi *cambiamenti conformazionali* che consentono la fusione della membrana.

Il lato citosolico di questo dominio proteico che attraversa la membrana è ricco di **cisteina** e capace di subire la **palmitoilazione proteica**, attraverso l'aggiunta reversibile di **acido palmitico**.

La **palmitoilazione** è una comune *modifica post-traduzionale* che si verifica in oltre il **30%** di tutte le *proteine cellulari* per incrementare la *stabilità proteica*, regolare il *traffico di membrana* e attivare la formazione di *vescicole endocitiche*

In particolare la **palmitoilazione** delle **proteine virali** influisce sulla **replicazione e sulla fusione virale**, svolgendo in alcuni casi un **ruolo essenziale**.

Ad esempio, la **proteina spike** del coronavirus murino deve subire la **palmitoilazione** per assemblare ed entrare correttamente nelle cellule ospiti. **Allo stesso modo**, lavori precedenti hanno dimostrato che le modifiche alla proteina spike SARS-CoV che impediscono la **palmitoilazione** riducono anche la capacità del virus di causare la formazione di sincizi, un indicatore dell'aggressività virale.

Il team del **Department of Molecular Medicine della University of South Florida, Tampa**,



ha dimostrato che la **palmitoilazione** dei **primi cinque residui di cisteina** del dominio C-terminale della proteina spike SARS-CoV-2 è essenziale per SARS-CoV-2, facilitando l'ingresso cellulare e la formazione dei sincizi.

Poiché gli enzimi endogeni facilitano la **palmitoilazione** della proteina spike pertanto l'inibizione di questi enzimi potrebbe essere una *strategia praticabile* contro COVID-19. Il team ha anche proposto **due possibili farmaci** candidati che dimostrano l'inibizione della SARS-CoV-2 nella coltura cellulare trattata.

Il dominio ricco di cisteina terminale C della proteina della punta SARS-CoV-2 porta dieci residui di cisteina altamente conservati.

Per studiare il ruolo della **palmitoilazione** in questi siti, i ricercatori li hanno prima scambiati con la **serina**, scoprendo così che alcuni dei gruppi di residui sono più inclini alla **palmitoilazione** di altri.

*È importante sottolineare che la mutazione dei cluster con la massima preferenza per la palmitoilazione ha anche degradato la capacità del **lentivirus pseudotipizzato spike SARS-CoV-2** di entrare maggiormente nelle cellule ospiti, evidenziando al gruppo che i primi cinque residui (C1235, 1236, 1240, 1241 e 1243) sono i più funzionalmente importanti. Ciò valeva per le interazioni tra cellule infette e cellule non infette, in cui la mutazione di questi cluster chiave causava una marcata riduzione dell'attività fusogena e della formazione di sincizi tra le cellule.*

Una volta che una cellula è stata infettata, la **trimerizzazione della proteina spike** avviene all'interno della membrana del **reticolo endoplasmatico** delle cellule ospiti prima dell'assemblaggio delle **particelle di virione**.

Successivamente confrontate le **proteine spike wild-type** a lunghezza intera con quelle prodotte con mutazioni della **serina**. Le proteine spike mutanti **incapaci di subire la palmitoilazione** erano difettose nella formazione del trimero, spiegando così la ridotta capacità di entrare nelle cellule ospiti osservata.

A differenza di altri betacoronavirus, SARS-CoV-2 porta anche un sito di clivaggio mediato dalla **furina** per facilitare la fusione della membrana ospite, che è risultata non essere influenzata dalle mutazioni imposte dal gruppo. Allo stesso modo, l'affinità verso il recettore ACE2 è risultata non influenzata dalle mutazioni.

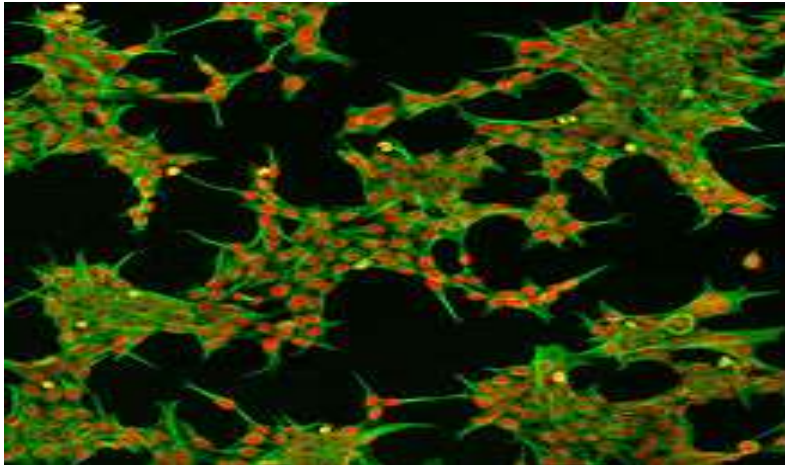
È stato inoltre riscontrato che la ridotta infettività dello pseudovirus della proteina spike mutata **non era dovuta** a una ridotta capacità di trasportare particelle di virione dal reticolo endoplasmatico ospite alla membrana plasmatica per l'espressione verso l'esterno, poiché solo le proteine spike con residui di cisteina completamente mutati mostravano un'espressione minore, non quelli con i primi cinque residui chiave.

Risultava pertanto evidente che la **palmitoilazione dell'intera catena della cisteina** è importante per una corretta trimerizzazione della punta, con i primi cinque residui che svolgono un ruolo meno importante in questo senso.

Inibizione della palmitoilazione SARS-CoV-2

E' noto che gli enzimi *palmitoil aciltransferasi* inducono la *palmitoilazione* del gruppo tiolico dei residui di **cisteina** e successivamente si è cercato di identificare l'enzima responsabile della *palmitoilazione* della proteina spike SARS-CoV-2.

Nelle **cellule HEK293T** utilizzando *siRNA* è stato realizzato il *knockdown* delle proteine **DHHC5** e **DHHC9**.



scoprendo che il *knockdown* della **DHHC5** ha causato una sovraregolazione compensativa non verificata per la **DHHC9**.

Pertanto, solo il *knockdown* di **DHHC9** è riduce significativamente la *palmitoilazione* della proteina spike nelle cellule infette.

Le cellule *knockdown* **DHHC9** sono state quindi esposte a particelle di pseudovirus recanti la proteina spike SARS-CoV-2, scoprendo che queste cellule erano più resistenti alle infezioni e significativamente meno inclini a impegnarsi nella formazione di sincizi.

Tuttavia, queste cellule non erano meno resistenti all'infezione originata da cellule vicine non trattate con *proteine spike palmitoilate*, il che suggeriva che la *palmitoilazione della proteina spike è necessaria solo per l'infezione iniziale* e non per qualsiasi altro evento successivo

Gli esperimenti di **immunofluorescenza** hanno ulteriormente confermato che il **DHHC5** è localizzato con la proteina spike nel reticolo endoplasmatico e nel Golgi.

Per verificare se l'inibizione farmacologica di **DHHC9** potesse ridurre l'infettività SARS-CoV-2, sono stati assemblati diversi inibitori della *palmitoilaciltransferasi* sottoposti a **screening computazionale** per l'affinità.

La tossicità di una selezione di questi composti è stata testata nelle cellule **HEK293T** e **Caco-2** e i composti sufficientemente tollerati sono stati utilizzati in un test di palmitoilazione della punta SARS-CoV-2.

È stato così scoperto che due composti "**senza nome**", denominati composti **13** e **25**, inibiscono l'infezione da SARS-CoV-2 nella coltura cellulare.

Le cellule pretrattate con *entrambi i composti* e successivamente infettate con SARS-CoV-2 hanno mostrato una riduzione dose-dipendente della carica virale SARS-CoV-2 e una riduzione delle dimensioni dei sincizi.

La progenie virale raccolta dal surnatante delle cellule trattate ha quindi dimostrato un'infettività significativamente ridotta nei confronti di cellule non trattate non infette, dimostrando che prevenire la **palmitoilazione** durante la generazione di nuove particelle virali può compromettere la loro capacità di infettare nuove cellule ospiti.

In sintesi

La **palmitoilazione** dei primi cinque residui di cisteina del dominio ricco di cisteina C-terminale della proteina SARS-CoV-2 S è indispensabile per l'infezione e che i mutanti della punta carenti di palmitoilazione sono difettosi nella fusione della membrana.

Il knockdown di **DHHC9** provoca una riduzione della fusione e dell'infezione di SARS-CoV-2.

Due inibitori **DHHC9** basati sulla spina dorsale bis-piperazina inibiscono la **palmitoilazione** della proteina SARS-CoV-2 S e le risultanti particelle di virione della progenie rilasciate sono difettose nella fusione e nell'infezione.

Ciò individua questi inibitori della **palmitoiltransferasi** come potenziali nuove strategie di intervento contro SARS-CoV-2.

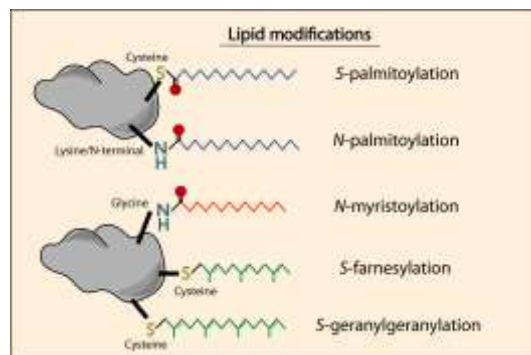
Riferimento

Ramadan AA et al. **Identification of SARS-CoV-2 Spike Palmitoylation Inhibitors That Results in Release of Attenuated Virus with Reduced Infectivity**. Viruses. 2022 Mar 4;14(3):531.

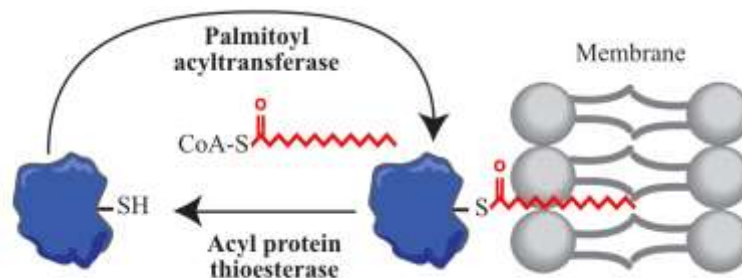
Allegato : La palmitilazione

La palmitilazione è la formazione di un legame covalente tra un acido grasso, come l'acido palmitico, e un residuo di cisteina, meno frequentemente di serina o treonina, solitamente su una proteina di membrana. La palmitilazione può verificarsi su quasi tutti i residui di cisteina tranne quelli all'estremità N-terminale e la sua precisa funzione varia a seconda della proteina in esame.

La palmitilazione aumenta l'idrofobicità delle proteine e contribuisce alla loro associazione con la membrana. La palmitilazione sembra anche svolgere un ruolo significativo nel traffico subcellulare di proteine tra diversi compartimenti cellulari, nonché nella modulazione delle interazioni proteina-proteina. A differenza della prenilazione e della miristoilazione, la palmitilazione è solitamente reversibile, poiché il legame tra l'acido palmitico e la proteina è spesso un legame tioestere.

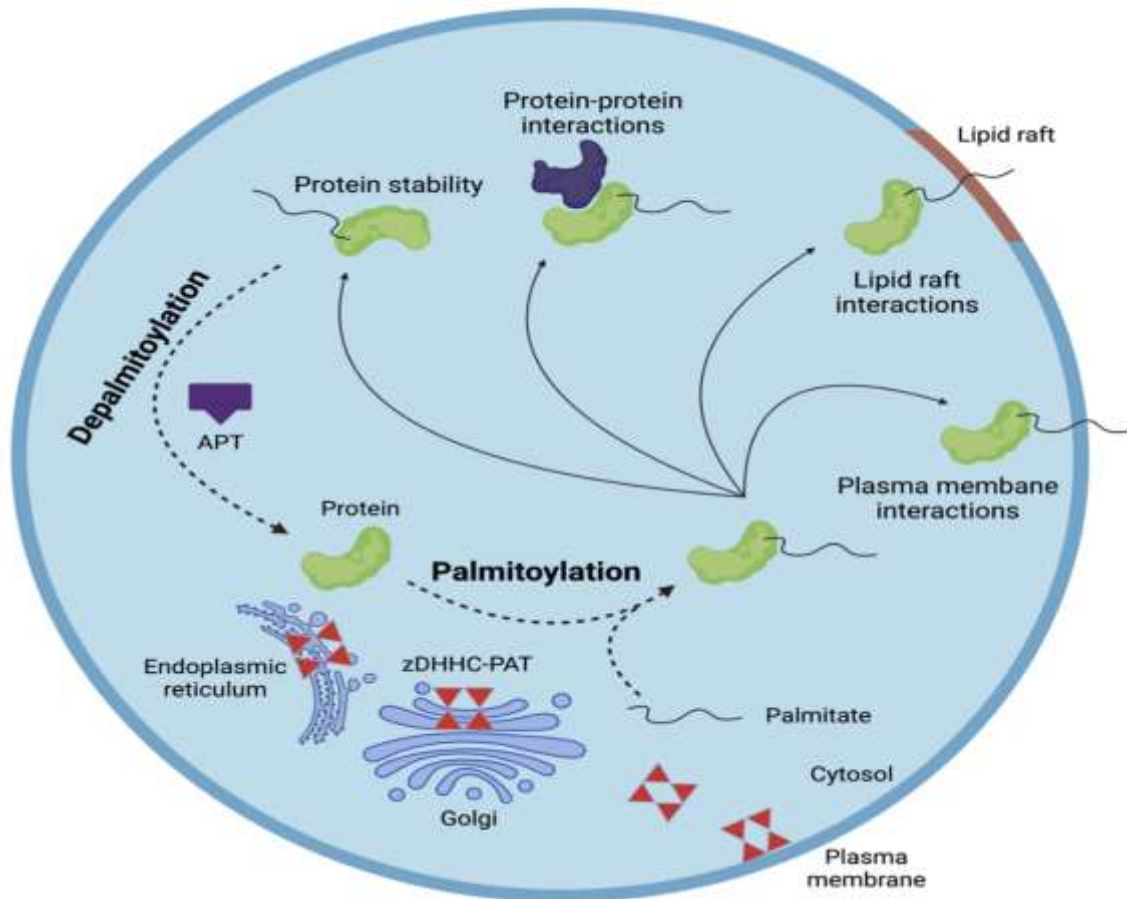


La reazione inversa è catalizzata da una proteina palmitoil tioesterasi (en). Poiché la palmitilazione è una modifica post-traduzionale dinamica, si ritiene che venga impiegata dalla cellula per modificare la localizzazione subcellulare, le interazioni proteina-proteina o le capacità di legame delle proteine.



Un esempio di una proteina che subisce la palmitilazione è l'emoagglutinina, una glicoproteina di membrana utilizzata dal virus dell'influenza per legarsi ai recettori nella cellula ospite. I cicli di palmitilazione di un'ampia varietà di enzimi sono stati caratterizzati durante gli anni 2010, tra cui H-Ras, G α , il recettore adrenergico β 2 e l'ossido nitrico sintasi dell'endotelio (eNOS). Un altro esempio è la proteina di segnalazione Wnt, che viene modificata mediante l'aggiunta di un gruppo palmitile su un residuo di serina. È un tipo di O- acilazione fornito da una O- aciltransferasi legata alla membrana.

Durante il segnale di trasduzione attraverso la proteina G, la palmitilazione della subunità α , la prenilazione della subunità γ e la miristoilazione sono coinvolte nel legame della proteina G sulla faccia interna della membrana plasmatica, in modo che la proteina G interagisca con il suo recettore .



Un anno fa... Baedeker/Replay del 8. Dicembre

Nella mente di un NO-VAX: un vizio di prospettive

La medicina e le aspettative della gente Dobbiamo riscoprire la distinzione fra speranza e aspettativa. Ivan Illich Marco Aurelio riteneva che tutto ciò che vediamo è una prospettiva, non la verità. Questo è l'equivoco di base che dovremo chiarire ai "non-vax" per bene disponibili ad accettare un dialogo ed confronto **Medicina: dal mito al mitocondrio e/o viceversa** Abbiamo un'immagine mitica di ciò che la scienza e la medicina possono fare. Crediamo nella medicina come fornitore di conoscenza oggettiva, ma non riusciamo a riconoscere questo atteggiamento per quello che è: una credenza, che dovrebbe essere esaminata come tale nella sua relazione con un sistema di credenze più generale.

Una promozione affrettata La medicina è entrata solo di recente nei ranghi di ciò che chiamiamo "scienze dure". i numerosi modi in cui gli studi randomizzati non riescono a fornire risultati coerenti, o anche semplicemente applicabili, iniziamo a chiederci se questa recente promozione non sia stata affrettata. Per secoli la medicina è stata concepita come rito magico o religioso, come tecnica o mestiere per i suoi aspetti pratici (chirurgia, ostetricia), o come disciplina letteraria che si basa sull'attenta lettura e glossatura di autori canonici dell'antichità (Galeno e Ippocrate) per la sua parte teorica (anatomia, farmacopea).

Secolarizzazione medica Ora che la letteratura medica è "secolarizzata" e basata su fatti e osservazioni, si potrebbe presumere che la medicina applichi i metodi scientifici più rigorosi e fornisca una conoscenza

basata sull'evidenza dei disturbi e delle condizioni per guidare i medici. Ma come mostrano il lavoro di Ioannidis una solida metodologia e criteri di pubblicazione selettivi non sono la norma. Né sono sufficienti di per sé per fornire il tipo di verità dura che i pazienti si aspettano. La fede odierna nella medicina come scienza (e nella scienza come ricerca della verità assoluta e nella tecnologia come soluzione per tutto) è un malinteso dominante che non rende meno reale il bisogno di ricerca medica e l'enorme servizio che i medici rendono all'umanità.

Un malinteso Tuttavia, questo malinteso è costoso finanziariamente, umanamente e intellettualmente: la fede cieca nei farmaci o nelle scoperte porta a trattamenti nella migliore delle ipotesi inefficaci, nel peggiore dei casi a quelli potenzialmente pericolosi. John Ioannidis e al suo team di studiosi per aver sfatato i miti dietro le "notizie" mediche: questo atto di interrogatorio sanitario ci costringe a pensare al corpo come a qualcosa di più complesso e prezioso di una macchina per essere risolto. La lezione da trarre non è certamente quella di tagliare i fondi per la ricerca medica, ma di riconoscere che le nostre aspettative tanto quanto le nostre metodologie devono essere ripensate. C'è la necessità dell'interpretazione dei dati sperimentali. Gli esperimenti e i risultati possono raramente, se non del tutto, essere classificati secondo il gold standard della "conoscenza certificata" che il pubblico richiede: anche lo studio più incontestabile deve essere interpretato prima che possa avere importanza intellettuale e terapeutica. Le "notizie" mediche diventano tali solo se presentate come potenzialmente rivoluzionarie o, più modestamente, utili. Estrapolare dall'ambiente clinico all'efficacia della vita reale richiede sempre un atto di fede, gradito quando allevia i dolori e salva vite, ma che non può mai essere fondato su una certezza scientifica assoluta. In altre parole, in medicina come in qualsiasi altro campo delle scienze umane, l'interpretazione è ciò che trasforma i dati in significato.

La stampa laica La stampa laica Spesso, è il modo in cui la maggior parte delle notizie mediche "adatte alla stampa" viene dichiarata che è difettosa, piuttosto che i risultati stessi che nella maggior parte dei casi non dicono molto in termini di applicazione nella vita reale. I risultati statistici (validi o meno) non hanno valore prognostico. Le probabilità di ottenere un doppio sei con due dadi sono sempre una su trentasei, indipendentemente dall'età, dal sesso e dalla storia medica della persona che lancia i dadi. Non così con la probabilità di ottenere miglioramenti dal farmaco XYZ perché il 40% del gruppo di test lo ha fatto negli studi clinici.

Una analisi delle probabilità Non siamo biomacchine come discettano alcuni psichiatri, non siamo oggetti inanimati; non siamo intercambiabili: ogni corpo risponde in modo diverso e si presenta al lettino con la propria zuppa di geni, ormoni, emocromo, squilibrio dei liquidi, cellule invecchiate, vulnerabilità, temperamento e convinzioni e aspettative mediche (queste ultime hanno ripetutamente dimostrato di influenzare il risultato di qualsiasi trattamento). Quelle variabili non possono essere eliminate: anche la sperimentazione clinica meglio concepita può solo segnalare la probabilità, in determinate condizioni, di vedere questi e quei cambiamenti. Ma per ogni caso specifico, le probabilità possono essere analizzate solo individualmente, poiché è l'intero quadro medico e l'identità culturale del paziente che influenzeranno i risultati.

L'illusione terapeutica Pochissimi farmaci sono farmaci mirati che affrontano la causa di una malattia o malattia: la maggior parte affronta i sintomi, a volte silenziosamente in modo obliquo (a chi non è stato prescritto un farmaco per la malattia X perché l'esperienza aveva dimostrato che potrebbe alleviare i sintomi di Z?). Gli studi che puntano ai benefici medici di alcuni nutrienti o vitamine non sono lasciati ai guai. Può essere vero che uno, due o una dozzina di studi hanno dimostrato che le persone che ricevevano alte dosi di omega-3 mostravano rischi inferiori, ad esempio, di attacchi di cuore e cancro al colon rispetto a un gruppo di prova. Ciò non significa che se prendi alte dosi di olio di pesce, sarai protetto da tali malattie o addirittura ridurrai i rischi di contrarle. Potremo dire di essere sulla strada giusta quando saremo riusciti a creare farmaci contro le aspettative.

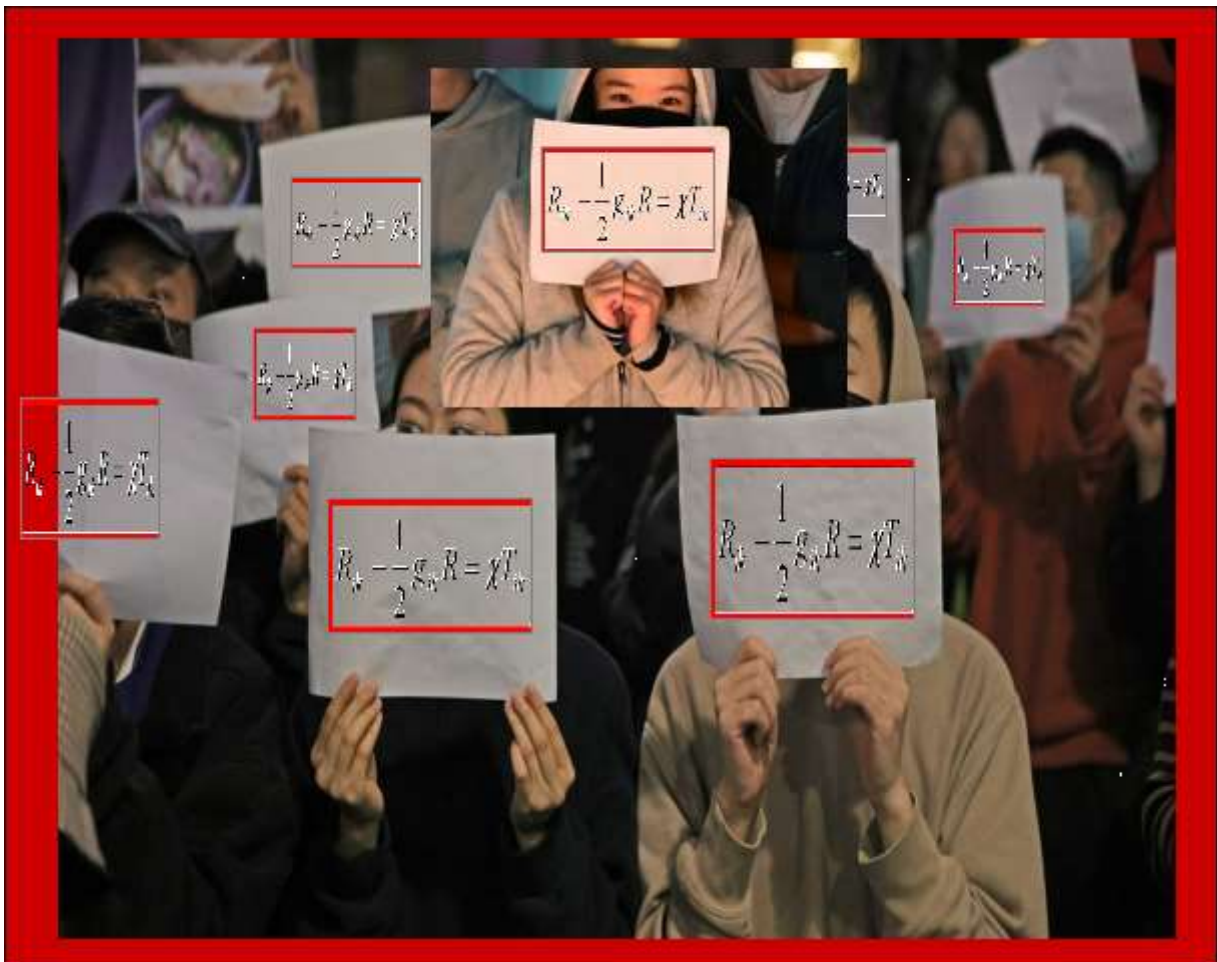


清華大學

Tsinghua University

L'equazione di Friedmann

Gli studenti della **Tsinghua University** hanno tenuto in mano fogli di carta su cui hanno scritto l' *equazione di Friedmann* durante le proteste in tutta la Cina contro la repressione del governo. L'equazione descrive *l'espansione dello spazio*: un riferimento *all'uomo liberato*.



to be continued...