



Da gennaio 2020 Elsevier ha creato un centro risorse COVID-19 con informazioni gratuite in inglese e mandarino sul nuovo coronavirus COVID-19. Il centro risorse COVID-19 è ospitato su Elsevier Connect, il sito web pubblico di notizie e informazioni della società.

Con la presente Elsevier concede l'autorizzazione a rendere immediatamente disponibili su PubMed Central e su altri archivi finanziati con fondi pubblici, come il database COVID dell'OMS, tutte le ricerche relative al COVID-19 disponibili sul centro risorse COVID-19, compresi i contenuti della presente ricerca, con diritti di riutilizzo e analisi senza limitazioni in qualsiasi forma o con qualsiasi mezzo, con riconoscimento della fonte originale. Questi permessi sono concessi gratuitamente da Elsevier per tutto il tempo in cui il centro risorse COVID-19 rimarrà attivo.

Elenchi dei contenuti disponibili su [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Comunicazioni sulla ricerca biochimica e biofisica

homepage della rivista: www.elsevier.com/locate/ybbrc

La funzione della proteina spike della SARS-CoV-2 è compromessa dall'interruzione del legame disolfuro con la mutazione della cisteina-488 e dalla reattività tiolica della *N*-acetilcisteina e del glutatione.



Mana Murae ^{a, b, 1}, Yoshimi Shimizu ^{b, c, 1}, Yuichiro Yamamoto ^a, Asuka Kobayashi ^a, Masumi Houru ^a, Tetsuya Inoue ^a, Takuya Irie ^{a, b}, Ryutarō Gemba ^b, Yosuke Kondo ^d, Yoshio Nakano ^d, Satoru Miyazaki ^d, Daisuke Yamada ^e, Akiyoshi Saitoh ^e, Isao Ishii ^f, Taishi Onodera ^g, Yoshimasa Takahashi ^g, Takaji Wakita ^h, Masayoshi Fukasawa ^{a, b, **}, Kohji Noguchi ^{a, b, *}

^a Laboratorio di Terapia Molecolare, Facoltà di Scienze Farmaceutiche, Università di Scienze di Tokyo, Yamasaki 2641, Noda, Chiba, 278-8510, Giappone

^b Dipartimento di Biochimica e Biologia Cellulare, Istituto Nazionale di Malattie Infettive, 1-23-1, Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo, 162-8640, Giappone

^c Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università Teikyo Heisei, 4-21-2 Nakano, Nakano-ku, 164-8530, Giappone

^d Dipartimento di Scienze Mediche e della Vita, Facoltà di Scienze Farmaceutiche, Tokyo University of Science, Yamasaki 2641, Noda, Chiba, 278-8510, Giappone

^e Laboratorio di Farmacologia, Facoltà di Scienze Farmaceutiche, Tokyo University of Science, Yamasaki 2641, Noda, Chiba, 278-8510, Giappone

^f Dipartimento di Chimica della Salute, Università Farmaceutica Showa, Tokyo, 194-8543, Giappone

^g Centro di ricerca per lo sviluppo di farmaci e vaccini, Istituto nazionale di malattie infettive, 1-23-1, Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo, 162-8640, Giappone

^h Istituto Nazionale di Malattie Infettive, 1-23-1, Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo, 162-8640, Giappone

ARTICOLO IN FORMATIVO

Storia dell'articolo:

Ricevuto il 18 gennaio 2022

Accettato il 26 gennaio 2022

Disponibile online il 29 gennaio 2022

Parole chiave:

SARS-CoV-2

Cisteina di

picco

A B S T R A T T O

Le proteine spike virali svolgono un ruolo importante nel processo di ingresso virale, facilitando l'attaccamento ai recettori cellulari e la fusione dell'involucro virale con la membrana cellulare. La proteina spike del coronavirus della sindrome respiratoria acuta grave 2 (SARS-CoV-2) si lega al recettore cellulare dell'enzima di conversione dell'angiotensina-2 (ACE2) attraverso il suo dominio di legame al recettore (RBD). Il residuo di cisteina in posizione 488, costituito da un ponte di solfuro con la cisteina 480, si trova in un importante anello strutturale sulla superficie di legame dell'ACE2 della RBD ed è altamente conservato tra i coronavirus legati alla SARS. Abbiamo dimostrato che la sostituzione della Cys-488 con l'alanina ha compromesso l'infezione pseudotipica del SARS-CoV-2, la formazione di sincizi e la fusione cellula-cellula innescata dall'espressione dello spike del SARS-CoV-2. Coerentemente, il legame *in vitro* di RBD e ACE2, la fusione cellula-cellula mediata da spike e l'infezione virale pseudotipica delle cellule VeroE6/TMPRSS2 sono stati inibiti dai composti reattivi al tiolo N-acetilcisteina (NAC) e da una forma ridotta di glutatione (GSH). Inoltre, abbiamo dimostrato che anche l'attività dei picchi varianti dei ceppi SARS-CoV-2 alfa e delta è stata soppressa da NAC e GSH. Nel complesso, questi dati indicano che la Cys-488 nella RBD dello spike è necessaria per le funzioni e l'infettività dello spike del SARS-CoV-2 e potrebbe essere un bersaglio dei farmaci anti-SARS-CoV-2.

© 2022 Elsevier Inc. Tutti i diritti riservati.

* Autore corrispondente. Laboratory of Molecular Target Therapy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science, Yamasaki 2641, Noda, Chiba, 278-8510, Giappone.

** Autore corrispondente. Dipartimento di biochimica e biologia cellulare, Istituto nazionale di malattie infettive, 1-23-1, Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo, 162-8640, Giappone.

Indirizzi e-mail: fuka@nih.go.jp (M. Fukasawa), noguchi-kj@rs.tus.ac.jp (K. Noguchi).

¹ Questi autori condividono la stessa paternità.

1. Introduzione

Uno dei quattro generi della famiglia di virus *Coronaviridae*, i beta-coronavirus, è un virus a RNA involupato a singolo filamento con senso positivo [1]. Il coronavirus 2 della sindrome respiratoria acuta grave (SARS-CoV-2) è il settimo membro identificato della famiglia dei coronavirus ed è l'agente causale della malattia da coronavirus 2019 (COVID-19) [2,3]. Il SARS-CoV-2 proviene probabilmente dai pipistrelli [4] e il recettore cellulare del SARS-CoV-2 nell'uomo è la proteina dell'enzima di conversione dell'angiotensina 2 (ACE2) [5,6]. Il SARS-CoV-2 è stato

dimostrato di infettare varie specie i cui ACE2 possono legarsi al SARS-CoV-2 [7].

La mutazione D614G è stata identificata durante il periodo iniziale della pandemia globale del COVID-19 come la variante dominante del SARS-CoV-2 [8,9] e da allora sono state segnalate molteplici varianti. In base ai recenti aggiornamenti dell'OMS, sono stati identificati quattro tipi principali di varianti preoccupanti (VOC): alfa (descritta per la prima volta nel Regno Unito), beta (segnalata per la prima volta in Sudafrica), gamma (segnalata per la prima volta in Brasile) e delta (segnalata per la prima volta in India) [10]. Questi COV presentano mutazioni distintive nel dominio di legame del recettore (RBD) [11]. La variante delta si sta rapidamente diffondendo in tutto il mondo [12], e si auspica l'individuazione di bersagli terapeutici efficaci per tutti i mutanti.

La proteina spike del SARS-CoV-2 è una molecola chiave per l'ingresso del virus nelle cellule ospiti [13]. Le dinamiche conformazionali della proteina spike, soprattutto a livello della RBD, sono necessarie per il suo legame con il recettore cellulare ACE2 [14]. La flessibilità conformazionale e la stabilità delle proteine virali sono influenzate dai ponti disolfuro intramolecolari e intermolecolari [15] e si ritiene che l'attaccamento del virus alla membrana cellulare mediato dalle proteine dell'involucro virale dipenda da un equilibrio tiolo/disolfuro all'interno del complesso della superficie virale [16,17]. Sebbene l'insensibilità al redox della proteina spike del SARS-CoV sia stata precedentemente riportata [18], l'importanza funzionale del ponte disolfuro nelle RBD del SARS-CoV e del SARS-CoV-2 è stata suggerita utilizzando sia l'approccio computazionale che quello sperimentale.

approcci [19e22]. Il ponte disolfuro Cys-480-Cys-488 in RBD sembra contribuire alla stabilità strutturale del motivo ad anello **b-sheet** [23,24], e si sono discussi i possibili effetti terapeutici di farmaci a base di tioli su COVID-19 [19,25,26].

In questo studio abbiamo dimostrato l'importanza funzionale della Cys-488 nella proteina spike della SARS-CoV-2. Abbiamo inoltre dimostrato l'effetto inibitorio della *N-acetilcisteina* (NAC), che altera i ponti disolfuro, e di una forma ridotta di glutatione (GSH) sull'attività funzionale delle RBD della variante SARS-CoV-2. I nostri dati suggeriscono che il ruolo funzionale della Cys-488 nella proteina spike del SARS-CoV-2 potrebbe essere un buon bersaglio per la terapia antivirale.

2. Materiali e metodi

2.1. Cellule e reagenti

HEK293T, Vero (ATCC, CCL-81) e VeroE6/TMPRSS2 (JCRB, JCRB1819) sono state coltivate in Medium (DMEM) integrato con 7,5% (v/v) di siero fetale bovino (FBS) e kanamicina (50 mg/ml). Le cellule FreeStyle 293-F (Thermo Fisher Scientific, R79007) adattate in sospensione sono state coltivate in FreeStyle 293 Expression Medium (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies Corp., Carlsbad, CA). Le cellule FreeStyle 293-F sono state mantenute in una fiasca di centrifugazione a 130 giri al minuto con un agitatore orbitale a 37 °C in un'atmosfera umidificata all'8% di CO₂. NAC e GSH sono stati acquistati da Sigma-Aldrich® (Merck KGaA, Darmstadt, Germania).

2.2. Preparazione di SARS-CoV-2 pseudotipato

Il plasmide pUC57-2019-nCoV-S (Human), contenente il cDNA sintetico per esprimere la proteina spike della SARS-CoV-2 con ottimizzazione del codone umano, è stato acquistato dalla Genscript Japan Inc. (Tokyo, Giappone) e clonato nel plasmide di espressione pcDNA3.1. I cDNA mutanti sono stati sintetizzati da GenScript. I plasmidi utilizzati in questo studio sono elencati nella [Tabella](#)

[supplementare 1](#). Per la produzione di virus pseudotipati basati su retrovirus, le cellule 293T sono state co-trasfettate con plasmidi esprimenti spike contenenti i plasmidi pHCMV- Gag-Pol 5349 e reporter pTG-Luc126 [27] utilizzando il reagente di trasfezione PEIpro® (Polyplus Transfection, New York,

NY). In breve, 2×10^6 cellule 293T sono state seminate in una fiasca T-25 un giorno prima della trasfezione e il giorno successivo le cellule sono state co-trasfettate seguendo le istruzioni del produttore. Il giorno successivo, il terreno di coltura è stato aggiunto alla fiasca per altri 2 giorni di coltura. Il surnatante cellulare contenente il virus pseudotipato è stato raccolto, filtrata attraverso un filtro da 0,45 mm, e aliquotata per essere conservata a -80°C .

2.3. Saggio di luciferasi per l'infezione da virus pseudotipico

Le cellule VeroE6/TMPRSS2 sono state seminate a 1×10^4 /100 mL/pozzetto in una piastra bianca a 96 pozzetti. Il giorno successivo, i virus pseudotipati sono stati aggiunti a ciascun pozzetto e messi in coltura per tre giorni. Per il pretrattamento con reagenti tiolici, il virus è stato preincubato con glutatione o terreno contenente N-acetilcisteina alle concentrazioni indicate per 30 minuti a 37°C e poi aggiunto ai pozzetti. Dopo 3 giorni, il terreno è stato rimosso. Le cellule sono state lavate una volta con PBS e successivamente lisate utilizzando un reagente per il saggio della luciferasi (PicaGene Meliora Star-LT Luminescence Reagent, TOYO B-NET Co., Ltd., Tokyo, Giappone). Per ogni esperimento è stata eseguita la trasduzione in triplo. Sono state calcolate la media e la SD e la riproducibilità è stata confermata.

2.4. Analisi microscopica in immunofluorescenza

Le cellule sono state seminate a 10^4 cellule/0,8 ml/pozzetto in camere a 4 pozzetti rivestite di poli-D-lisina (Corning Inc., Corning, NY) e trasfettate il giorno successivo. Dopo il tempo indicato, le cellule sono state fissate in para-formaldeide al 4% per 15 minuti, quindi permeabilizzate per 15 minuti con 0,2% di acido folico.

Triton-X100 o Tween-20/PBS o meno, e bloccate con 1% BSA/PBS per 30 minuti. Le cellule sono state incubate con l'anticorpo primario (0,5 mg/ml in 1% BSA/PBS) per una notte a 4°C , lavate con PBS tre volte,

e quindi sottoposti a trattamento con anticorpi secondari (diluizione $\times 1000$ e 5000 in 1% BSA/PBS). Gli anticorpi secondari coniugati in fluorescenza (IgG di capra anti-topo (H + L) con adsorbimento incrociato Alexa Fluor® 488 e IgG di asino anti-rabbit (H + L) con adsorbimento incrociato elevato -Alexa Fluor® Plus 594) sono stati acquistati da Thermo Fisher Scientific (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA). L'anticorpo (Vectashield Vibrance Antifade Mounting Medium) per l'analisi al microscopio è stato acquistato da Vector Laboratories Inc. (Burlingame, CA, USA). Le immagini sono state acquisite con un microscopio BZ-9000 (KEYENCE, Osaka, Giappone). Per l'analisi confocale sono stati utilizzati un microscopio a scansione laser confocale TCS SP8 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germania) e il software Leica Application Suite X (Leica). Le immagini TIFF bidimensionali sono state unite utilizzando il software Adobe® Photoshop CS4 Extended (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA).

2.5. Immunoblotting

Le cellule sono state lisate con un tampone UltraRIPA (BioDynamics Laboratory Inc., Tokyo, Giappone). Le proteine sono state risolte mediante SDS-PAGE ed elettrotrasferite su una membrana Immobilon-P (EMD Millipore, Billerica, MA, USA). Il Western blotting è stato eseguito con il metodo standard e sono stati utilizzati i seguenti anticorpi primari. L'anticorpo anti-spike (1A9) è stato acquistato da GeneTex Inc. (Irvine, CA, USA). Gli anticorpi secondari (anti-mouse IgG-HRP e anti-rabbit IgG-HRP)

sono stati acquistati da Cytiva™ (Tokyo, Giappone). L'anti-gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi (anti-GAPDH 3H12) è stato acquistato da Medical & Biological Laboratories Co., Ltd. (Aichi, Giappone). Ltd. (Aichi, Giappone). Come anticorpi secondari sono state utilizzate IgG di asino anti-rabbit coniugate con perossidasi di rafano e IgG di pecora anti-topo coniugate con perossidasi di rafano (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ, USA). I segnali dell'immunoblot sono stati sviluppati con il sistema EzWestLumi plus® (ATTO Corp., Tokyo, Giappone).

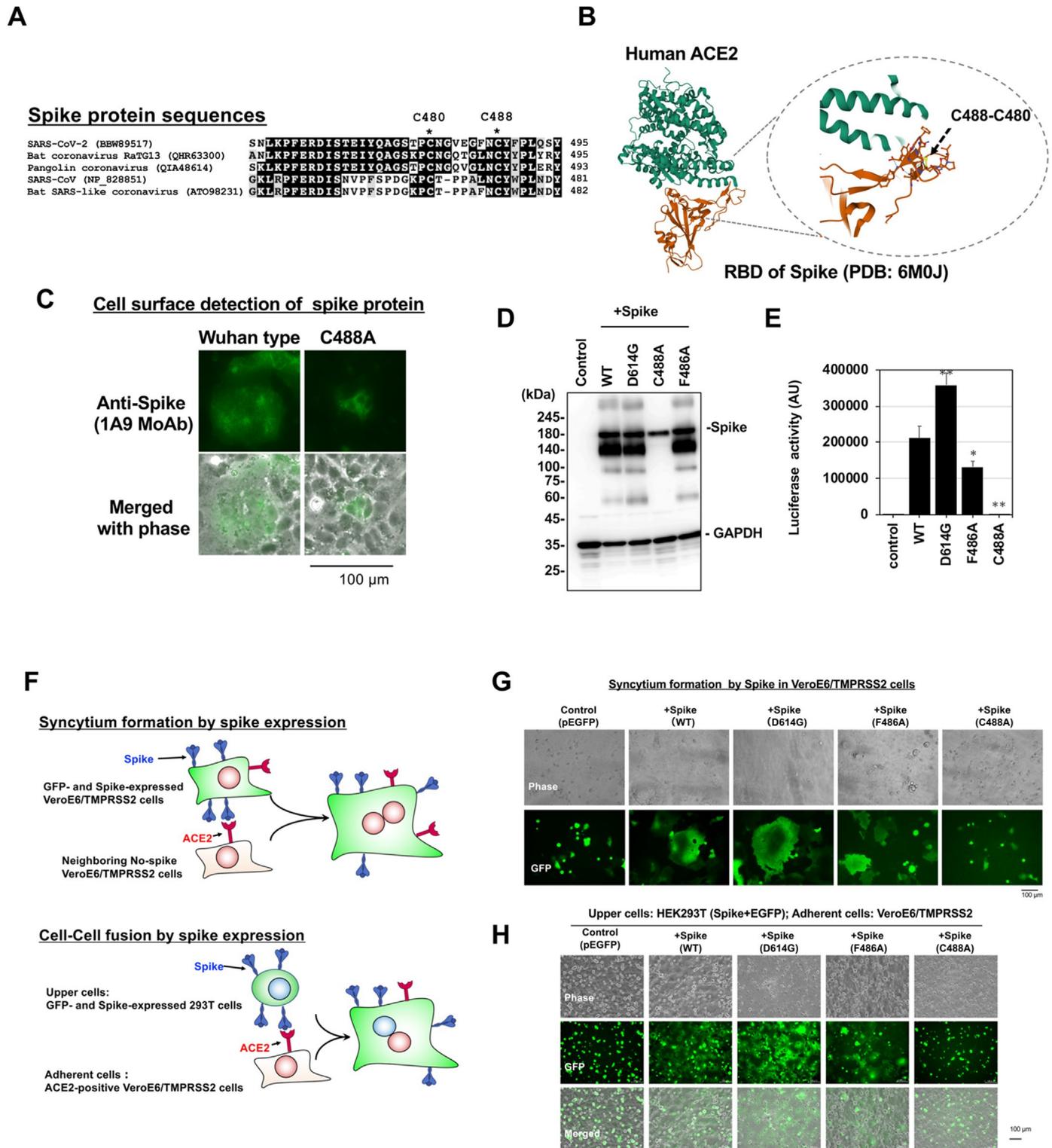


Fig. 1. Le funzioni fusogene e infettive della proteina spike sono interrotte dalla mutazione della Cys-488.

(A) Somiglianza della sequenza aminoacidica intorno alla Cys-488 nella RBD del SARS-CoV-2 tra i picchi ACE2-interattivi dei coronavirus correlati alla SARS. Il numero a destra di ogni allineamento è la posizione aminoacidica della Tyr finale (Y). (B) Il modello di struttura dell'interazione tra ACE2 e RBD tratto da PDB. Sono indicati i ponti disolfuro tra Cys-480 e -488. (C) L'espressione del mutante C488A non ha indotto la formazione di sincizi. L'espressione delle proteine spike di tipo Wuhan e del mutante C488A (segnale verde) in cellule Vero è stata analizzata in cellule non permeabilizzate. (D) Espressione delle proteine di spike mutanti rilevata mediante analisi Western blot. Le proteine di spike di tipo Wuhan (WT) e mutanti sono state espresse in cellule 293T. La GAPDH è indicata come controllo di carico. (E) L'infettività dei virus pseudotipati che esprimono ciascuna proteina spike mutante è stata valutata mediante un'attività di luciferasi reporter in cellule VeroE6/TMPRSS2. L'attività della luciferasi è indicata in unità arbitrarie (AU). I dati dei campioni triplicati sono stati espressi come media ± deviazione standard (SD). Per valutare la significatività statistica è stata eseguita un'ANOVA a una via. * indica $p < 0,05$ e ** indica $p < 0,01$. (F) Sono stati illustrati i saggi per la formazione di sincizi indotti da spike e la fusione cellula-cellula. (G) Formazione di sincizi mediante espressione di spike. Ogni proteina mutante dello spike è stata co-espressa con GFP in cellule VeroE6/TMPRSS2. A 12 ore dalla trasfezione, la formazione del sincizio è stata visualizzata dal segnale verde della GFP. Le cellule verdi giganti indicano la formazione del sincizio. (H) Fusione cellula-cellula mediata da spike. Le cellule 293T che coesprimono transitoriamente ogni spike e GFP sono state sovrapposte a cellule VeroE6/TMPRSS2 e le immagini delle cellule aderenti giganti fuse sono state acquisite dopo 3 ore di incubazione. La mancanza di cellule giganti verdi aderenti dopo il trattamento con lo spike mutante C488A indica la mancanza di fusione cellula-cellula tra le cellule 293T che esprimono lo spike mutante C488A e le cellule

VeroE6/TMPRSS2. Gli esperimenti sono stati ripetuti indipendentemente due volte e sono mostrate immagini rappresentative.

registrati con un analizzatore di immagini ImageQuant LAS4000 mini (GE Healthcare Japan Corp., Tokyo, Giappone).

26. Preparazione di RBD ricombinante e ACE2 solubile

Il vettore di espressione che codifica la RBD della proteina spike della SARS-CoV2 di tipo Wuhan è stato costruito come precedentemente descritto [28]. I plasmidi dei mutanti RBD della proteina spike del SARS-CoV-2 sono stati preparati mediante mutagenesi sito-diretta utilizzando il kit di mutagenesi KOD-Plus (Toyobo, Osaka, Giappone). Un gene che codifica l'ACE2 solubile umana (sACE2, numero di adesione GenBank NM_001371415.1, residui 18e614 aa) fuso con un tag Fc C-terminale è stato clonato nel vettore pSecTag2 (Thermo Fisher Scientific) tra il peptide di segnale Ig kappa e il codone di stop. Le proteine ricombinanti sono state prodotte utilizzando cellule FreeStyle 293-F secondo le istruzioni del produttore (Thermo Fisher Scientific). In breve, il surnatante delle cellule trasfettate è stato raccolto il giorno 5 dopo la trasfezione e le frazioni del surnatante sono state separate mediante centrifugazione a 9000xg per 10 minuti a temperatura ambiente. I surnatanti sono stati filtrati

attraverso un filtro da 0,45 mm. I peptidi RBD sono stati purificati con un filtro di

Il tampone è stato scambiato in PBS con la colonna di desalinizzazione Bio-Gel P6 (Bio-Rad Laboratories, Inc. CA, USA) utilizzando il sistema di purificazione delle proteine Profinia (Bio-Rad) secondo le istruzioni del produttore. La proteina sACE2-Fc umana è stata purificata utilizzando Ab-Capture Extra (ProteNova, Kagawa, Tokyo) e il tampone è stato sostituito con PBS per gel filtrazione utilizzando una colonna Sephadex G-25 (PD-10, Cytiva). Le concentrazioni di

Le proteine ricombinanti sono state calcolate misurando l'assorbanza a 280 nm, con coefficienti di estinzione di 1,55 L · g⁻¹ · cm⁻¹ e 1,98 L · g⁻¹ · cm⁻¹ per RBD e sACE2-Fc umano, rispettivamente.

27. ELISA per il test di legame in vitro

Le piastre EIA/RIA a 96 pozzetti (Corning-Coaster, Tokyo, Giappone) sono state rivestite con 200 mL di 250 ng/ml di proteina sACE2-Fc umana per tutta la notte a 4 °C. Le piastre sono state lavate con PBS contenente 0,1% Tween 20 (PBS/Tween) e bloccate con 200 mL di BSA al 5% in PBS per 30 minuti a temperatura ambiente. I peptidi RBD della SARS-CoV-2 (20 ng/pozzetto) sono stati preincubati con 200 mL di 1% BSA in PBS (PBS/BSA) in presenza o assenza di 10 mM GSH o NAC per 30 minuti a 37 °C, e poi aggiunto ai pozzetti. Dopo un'incubazione di 2 ore a temperatura ambiente

temperatura, le piastre sono state lavate con PBS/Tween e trattate con 200 mL di PBS/BSA contenente l'anticorpo monoclonale Avi-tag di topo (GenScript, Tokyo, Giappone, A01738, diluizione 1:10.000) per 1,5 h alla temperatura di 1,5 mL.

temperatura ambiente. Dopo il lavaggio con PBS/Tween, le piastre sono state ulteriormente incubate con 200 mL di PBS/BSA contenente IgG anti-topo coniugate con HRP (diluizione 1:5000, Jackson ImmunoResearch laboratory Inc., West Grove, PA, USA) per 1,5 ore a temperatura ambiente. Le proteine RBD legate sono state rilevate con l'aggiunta di

100 mL di substrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), 1-Step™ Ultra TMB-ELISA Substrate Solution (Thermo Fisher Scientific). Le piastre sono state poi incubate per 5e10 minuti e il cambiamento di colore è stato

monitorato visivamente. La reazione è stata fermata con l'aggiunta di 50 mL di 2 M H₂ SO₄. La densità ottica è stata misurata a 450 nm con un lettore di micropiastre iMark (Bio-Rad).

28. Analisi statistica Gli esperimenti in vitro sono stati ripetuti in

modo indipendente almeno due volte, e si sono ottenuti risultati simili. I risultati quantitativi sono indicati come media ± SD (n = 3) di campioni in triplo. Il test t di Student o l'ANOVA a una via sono stati utilizzati per valutare la significatività dei risultati.

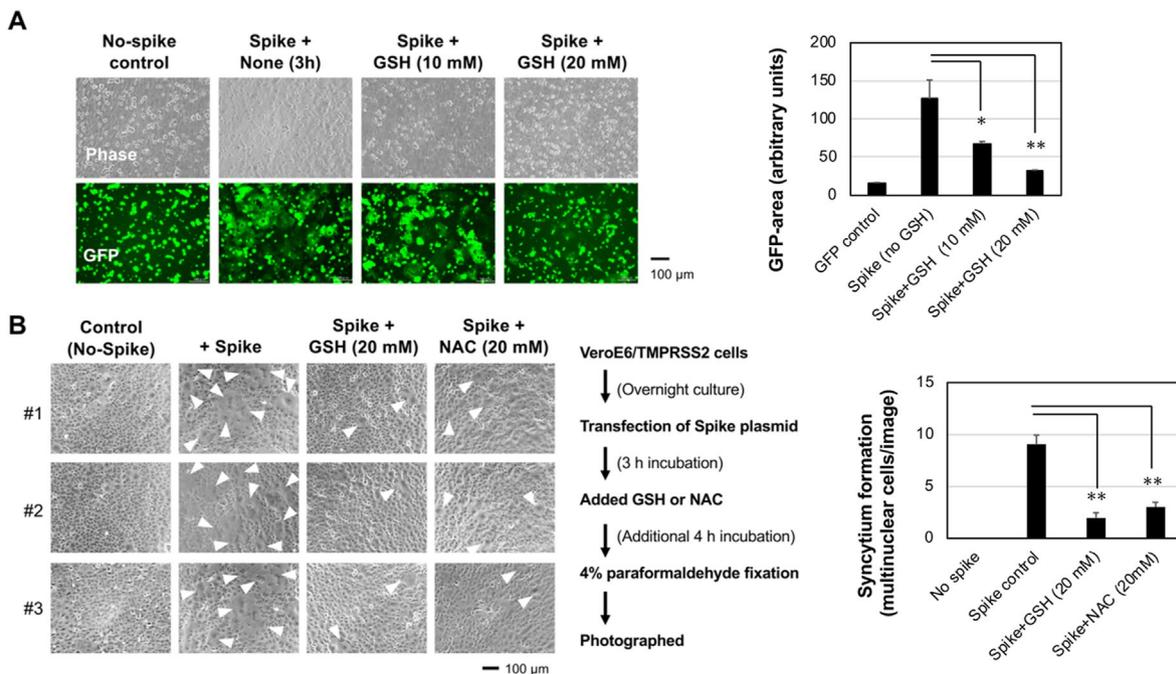


Fig. 2. NAC e GSH hanno compromesso la fusione cellula-cellula mediata da spike e la formazione di sincizi. (A) Le cellule 293T che esprimono Spike sono state sovrapposte a cellule VeroE6/TMPRSS2 in presenza di GSH per 3 ore alle dosi indicate. La fusione cellula-cellula,

riconosciuta come la generazione di cellule verdi aderenti, è stata soppressa dal trattamento con 20 mM di GSH.(B) La formazione di sincizi indotta da Spike è stata inibita da GSH tiolo-reattivo e NAC. Il protocollo di inibizione è mostrato in basso. Sono mostrate tre immagini di campo indipendenti (#1e3). Le punte delle frecce bianche indicano le cellule giganti del sincizio. Gli esperimenti sono stati ripetuti due volte in modo indipendente e sono mostrate immagini rappresentative. L'area/immagine positiva per GFP (A) o le cellule multinucleari del sincizio (B) sono state quantificate con il software ImageJ e i risultati di tre immagini sono stati espressi come medie \pm SD standard (grafici a destra). Per valutare la significatività statistica è stata eseguita un'ANOVA a una via. * indica $p < 0,05$, e ** indica $p < 0,01$.

differenze tra i gruppi sperimentali e il gruppo di controllo con varianze simili. Le differenze sono state considerate statisticamente significative a $p < 0,05$.

3. Risultati

3.1. *La cys-488 è essenziale per l'attività fusogena della proteina spike*

La proteina spike del SARS-CoV-2 esercita un'attività fusogena della membrana cellulare per facilitare l'ingresso virale attraverso il legame della RBD con l'ACE2 [29,30]. La Cys-488, che forma un ponte disolfuro nella proteina spike del SARS-CoV-2, è un residuo conservato nei virus correlati alla SARS, situato sulla superficie dell'interazione RBD-ACE2 (Fig. 1A e B); il mutante spike C488A, in cui la Cys-488 è stata sostituita con un'alanina, non ha indotto la formazione di sincizi (Fig. 1C). Altre espressioni di spike del tipo Wuhan, D614G, F486A e del mutante C488A sono state confermate (Fig. 1D) e il saggio di infezione del virus pseudotipato ha mostrato che il virus pseudotipato del mutante C488A ha perso l'apparente attività infettiva (Fig. 1E).

Le attività fusogene di queste proteine mutanti sono state valutate anche mediante saggi di formazione di sincizi e di fusione cellula-cellula (Fig. 1F). L'analisi microscopica ha mostrato che il mutante C488A ha perso le attività di formazione di sincizi e di fusione cellula-cellula (Fig. 1G e H, rispettivamente). Poiché il ponte disolfuro tra la Cys-488 e la Cys 480 è fondamentale per la struttura dell'anello di interazione con l'ACE2 [22], la mutazione della Cys-488 potrebbe compromettere la stabilità strutturale dell'anello di interazione con l'ACE2, essenziale per la funzione dello spike.

3.2. *NAC e GSH tiolo-reattivi sopprimono la formazione di sincizi mediata da spike e la fusione cellula-cellula*

Per esaminare la sensibilità del ponte disolfuro per l'attività di legame dell'ACE2 della proteina spike nei confronti di agenti tiolo-reattivi, è stata testata la fusione cellula-cellula tra cellule 293T che esprimono spike e cellule VeroE6/TMPRSS2 che esprimono ACE2, dopo il pretrattamento con l'agente riducente tiolo-reattivo GSH. La fusione cellula-cellula mediata dallo spike è stata soppressa dal GSH in modo dose-dipendente (Fig. 2A) e la formazione di sincizi indotta dallo spike, un altro segno distintivo dell'attività fusogena della proteina spike, è stata anch'essa ridotta dal GSH e dal relativo trattamento con NAC nelle cellule VeroE6/TMPRSS2 (Fig. 2B). Pertanto, le funzioni dello spike erano sensibili agli agenti reattivi ai tioli.

3.3. *La NAC e il GSH tiolo-reattivi inibiscono l'infettività del SARS-CoV-2 pseudotipato*

L'infezione da virus pseudotipato esprime spike di tipo Wuhan in cellule VeroE6/TMPRSS2 è stata ridotta dal trattamento con NAC e GSH in modo dose-dipendente (Fig. 3A). Entrambi gli agenti tiolo-reattivi hanno mostrato anche un'attività inibitoria nei confronti di altre varianti di infezione virale pseudotipica mediata da spike (Fig. 3B). Nella nostra condizione di coltura cellulare, NAC e GSH alla concentrazione indicata non hanno mostrato alcuna citotossicità. Queste osservazioni hanno suggerito che i ponti disolfuro nella proteina spike della variante ad ampia diffusione SARS-CoV-2 alfa e delta sarebbero sensibili agli agenti reattivi ai tioli, come la proteina spike precoce di tipo Wuhan.

3.4. *La NAC e il GSH tiolo-reattivi hanno soppresso il legame in vitro delle varianti della RBD con l'ACE2.*

Sono stati analizzati gli effetti di NAC e GSH sul legame *in vitro* tra RBD della proteina spike del SARS-CoV-2 e ACE2. Abbiamo osservato che NAC e GSH inibivano il legame tra RBD e ACE2 in modo dose-dipendente (Fig. 4A). Successivamente, il saggio di legame *in vitro*

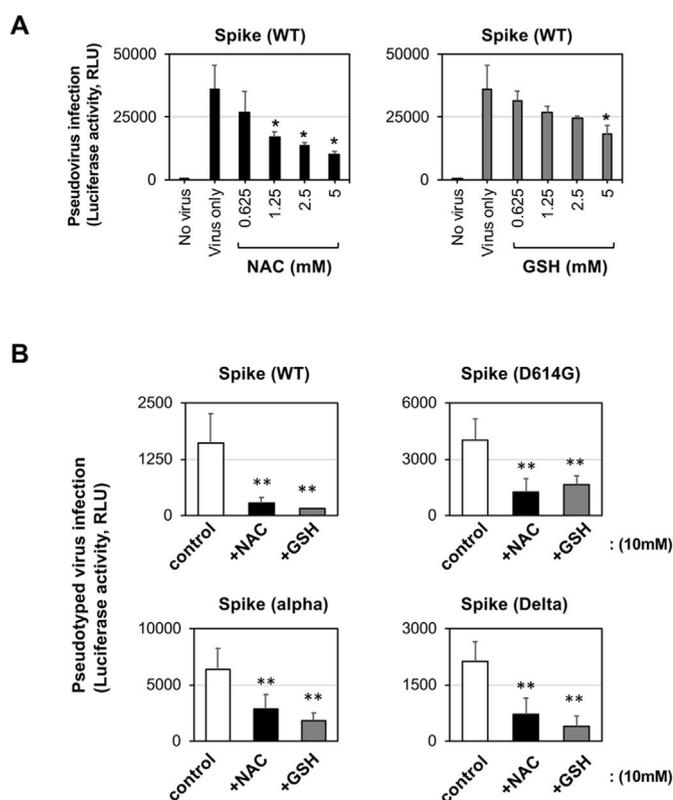


Fig. 3. La NAC e il GSH hanno compromesso l'infezione da SARS-CoV-2 pseudotipato. (A) Inibizione dose-dipendente dell'infezione da SARS-CoV-2 pseudotipato di tipo Wuhan (WT) da parte di NAC e GSH in cellule VeroE6/TMPRSS2. (B) Inibizione dell'infettività da SARS-CoV-2 pseudotipato di tipo spike variante da parte di NAC e GSH in cellule VeroE6/TMPRSS2. Gli esperimenti sono stati ripetuti due volte in modo indipendente e sono stati osservati risultati simili. I dati dei campioni triplicati sono stati espressi come media \pm SD standard. È stata eseguita un'ANOVA a una via per valutare la significatività statistica. * indica $p < 0,05$, e ** indica $p < 0,01$.

hanno mostrato che sia la NAC che il GSH hanno inibito l'attività di legame con l'ACE2 di tutte le RBD varianti testate; i tipi alfa, beta, gamma e delta (Fig. 4B e C). Questi dati indicano che le RBD della variante della proteina spike della SARS-CoV-2 sono sensibili agli agenti reattivi ai tioli. Nel complesso, questi dati sono coerenti con la debolezza della proteina spike nei confronti degli agenti reattivi ai tioli.

4. Discussione

Il legame della proteina spike del SARS-CoV-2 con il suo recettore cellulare ACE2 è il primo passo per l'ingresso nelle cellule virali e l'infezione [31]. Un ponte disolfuro intramolecolare della proteina spike tra Cys 488 e Cys-480 nella sua RBD è situato sulla superficie di legame con ACE2 e si ritiene che sia importante per la struttura molecolare per legare ACE2 [6,14,23,24,32]. Abbiamo dimostrato che il mutante C488A ha perso le sue attività fusogeniche e infettive. Gli agenti tiolo-reattivi NAC e GSH hanno soppresso sia l'attività fusogenica cellulare indotta dallo spike sia l'infezione dei virus pseudotipati. Questi due agenti tiolo-reattivi hanno anche soppresso la capacità di legame con ACE2 *in vitro* di diversi RBD con ceppi di varianti epidemiche attuali, di tipo alfa, beta, gamma e delta. Nel complesso, il legame tra spike e ACE2 è sensibile all'agente riducente tiolo-reattivo e il ponte disolfuro a livello della Cys-488 avrebbe un ruolo significativo nel legame tra RBD e ACE2.

L'impatto del ponte disolfuro nella proteina spike del SARS-CoV-2 sull'attività di legame con l'ACE2 della RBD è stato suggerito in precedenti studi computazionali [20,33]. Tuttavia, la funzione

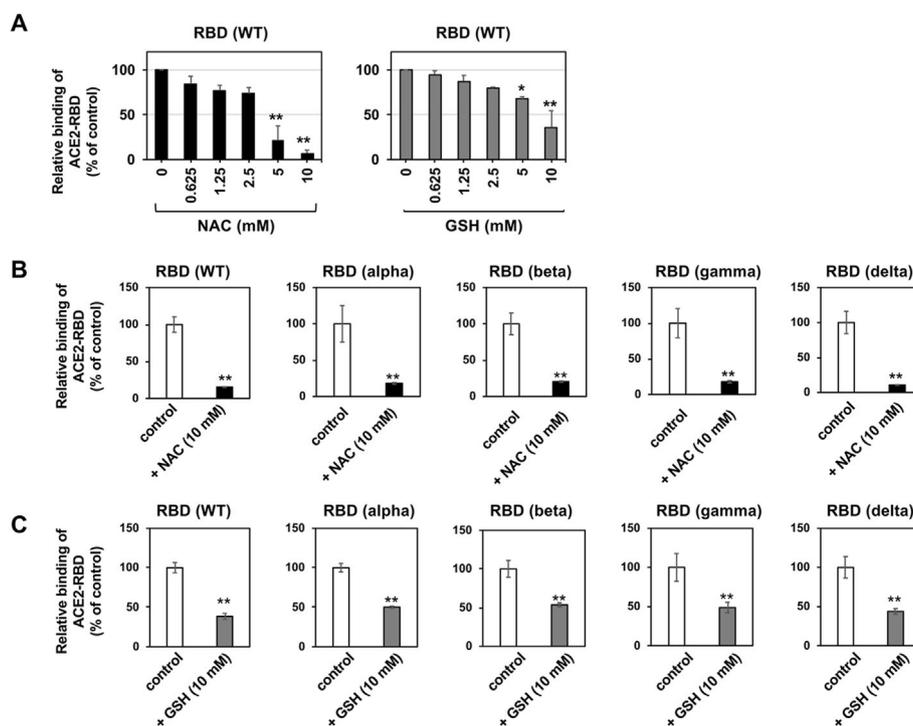


Fig. 4. NAC e GSH hanno compromesso il legame della variante RBD con ACE2 *in vitro*.

(A) Inibizione dose-dipendente del legame delle proteine RBD ricombinanti di tipo Wuhan con l'ACE2 da parte di NAC e GSH. (B) L'attività di legame con l'ACE2 delle proteine RBD varianti è stata inibita dalla NAC.

(C) L'attività di legame con l'ACE2 delle varianti della proteina RBD è stata inibita dal GSH. Gli esperimenti di cui sopra sono stati ripetuti due volte in modo indipendente e sono stati osservati risultati simili. I dati dei campioni triplicati sono stati espressi come media \pm SD. Il *test* t di Student è stato eseguito per valutare la significatività statistica. ** indica $p < 0,01$.

L'impatto di un solo ponte disolfuro nella proteina spike del SARS-CoV-2 resta da determinare [20]. Star et al. hanno effettuato un'analisi mutazionale approfondita della RBD utilizzando un sistema di visualizzazione del lievito, suggerendo un possibile impatto delle mutazioni della Cys-488 sulla capacità di legare l'ACE2 [34]. È stata suggerita la possibile efficacia terapeutica della NAC su COVID-19 [26] e i più recenti lavori di Manček-Keber et al. e Grishin et al. hanno coerentemente riportato che i composti reattivi ai tioli avrebbero come bersaglio la proteina spike e le alterazioni di Cys-480 e Cys-488 diminuiscono l'attività fusogena dello spike del SARS-CoV-2 [21,22]. Inoltre, il nostro studio indipendente ha dimostrato che le funzioni mediate dal legame RBD-ACE2 delle proteine spike varianti sono stati soppressi direttamente da agenti reattivi al tiolo. Pertanto, i risultati di questo e di altri studi supportano l'idea che i composti reattivi ai tioli e mirati ai ponti disolfuro possano essere efficaci contro le varie varianti del SARS-CoV-2. Tuttavia, occorre prestare attenzione al fatto che la Cys-488 non è un bersaglio selettivo per NAC e GSH e che anche altri ponti disolfuro potrebbero essere influenzati da questi agenti. Poiché non sono stati scoperti composti selettivi per la Cys-488, in futuro saranno necessari molti sforzi e uno screening di gruppo per cercare composti unici che abbiano come bersaglio la struttura ad anello Cys488-Cys-480.

Contributi

Concettualizzazione, M.F. e K.N.; Indagine, M.M., Y.S., Y.Y., M.F. e K.N.; Risorse, A.K., M.H., T.I., T.I., R.G., Y.K., Y.N., S.M., D.Y., A.S., T.O., Y.Y. e T.W.; stesura della bozza originale, M.M., Y.S., M.F. e K.N.; revisione ed editing, M.M., Y.Y., I. I., M.F. e K.N.; acquisizione dei fondi, M.F. e K.N. Tutti gli autori hanno letto e approvato la versione pubblicata del manoscritto.

Finanziamento

Questo lavoro è stato sostenuto da una borsa di studio nel campus TUS, finanziata da

grazie alle donazioni del "Conto per le donazioni per lo sviluppo di vaccini e farmaci per il trattamento di COVID-19" istituito dalla Sumitomo Mitsui Trust Bank, Limited, e alle sovvenzioni per la ricerca dell'Agenzia giapponese per la ricerca e lo sviluppo medico (AMED), Programma giapponese per la ricerca e l'infrastruttura sulle malattie infettive (ricerca interdisciplinare all'avanguardia) [Sovvenzione n. 21wm0325032j0201 a MF].

Dichiarazione di interesse

Gli autori dichiarano di non avere alcun concorrente noto. interessi finanziari o relazioni personali che potrebbero sembrare aver influenzato il lavoro riportato in questo articolo.

Gli autori dichiarano i seguenti interessi finanziari/relazioni personali che possono essere considerati come potenziali concorrenti
interessi:

Ringraziamenti

Ringraziamo tutti i membri del nostro laboratorio per il loro supporto tecnico.

Appendice A. Dati supplementari

I dati supplementari a questo articolo sono disponibili online su <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.01.106>.

Riferimenti

- [1] P.C.Y. Woo, Y. Huang, S.K.P. Lau, K.Y. Yuen, Coronavirus genomics and bioinformatics analysis, *Viruses* 2 (2010) 1805e1820, <https://doi.org/10.3390/v2081803>.
- [2] A.E. Gorbalenya, S.C. Baker, R.S. Baric, et al., The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2, *Nat. Microbiol.* 5 (2020) 536e544, <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>.

- [3] N. Zhu, D. Zhang, W. Wang, et al., A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019, *N. Engl. J. Med.* 382 (2020) 727e733, <https://doi.org/10.1056/nejmoa2001017>.
- [4] P. Zhou, X. Lou Yang, X.G. Wang, et al., A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin, *Nature* 579 (2020) 270e273, <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>.
- [5] M. Letko, A. Marzi, V. Munster, Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronavirus, *Nat. Microbiol.* 5 (2020) 562e569, <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0688-y>.
- [6] Q. Wang, Y. Zhang, L. Wu, et al., Structural and functional basis of SARS-CoV-2 entry by using human ACE2, *Cell* 181 (2020) 894e904, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.045>, e9.
- [7] L. Wu, Q. Chen, K. Liu, et al., Broad host range of SARS-CoV-2 and the molecular basis for SARS-CoV-2 binding to cat ACE2, *Cell Discov.* 6 (2020), <https://doi.org/10.1038/s41421-020-00210-9>.
- [8] B. Korber, W.M. Fischer, S. Gnanakaran, et al., Tracking changes in SARS-CoV-2 spike: evidence that D614G increases infectivity of the COVID-19 virus, *Cell* 182 (2020) 812e827, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.043>, e19.
- [9] E. Volz, V. Hill, J.T. McCrone, et al., Evaluating the effects of SARS-CoV-2 spike mutation D614G on transmissibility and pathogenicity, *Cell* 184 (2021) 64e75, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.11.020>, e11.
- [10] F. Konings, M.D. Perkins, J.H. Kuhn, et al., SARS-CoV-2 Variants of Interest and Concern naming scheme conducive for global discourse, *Nat. Microbiol.* 6 (2021) 821e823, <https://doi.org/10.1038/s41564-021-00932-w>.
- [11] J.A. Plante, B.M. Mitchell, K.S. Plante, et al., The variant gambit: COVID-19's next move, *Cell Host Microbe* 29 (2021) 508e515, <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.02.020>.
- [12] Vaidyanathan G., Coronavirus Variants Are Spreading in India ¶ what Scientists Know So Far, (n.d.).
- [13] F. Li, Structure, function, and evolution of coronavirus spike proteins, *Annu. Rev. Virol.* 3 (2016) 237e261, <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042301>.
- [14] D. Wrapp, N. Wang, K.S. Corbett, et al., Cryo-EM Structure of the 2019-nCoV Spike in the Prefusion Conformation, 2019. <http://science.sciencemag.org/>.
- [15] M. McCallum, A.C. Walls, J.E. Bowen, et al., Structure-guided covalent stabilization of coronavirus spike glycoprotein trimers in the closed conformation, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 27 (2020) 942e949, <https://doi.org/10.1038/s41594-020-0483-8>.
- [16] H. J-p Ryser, E.M. LEVYt, R. Mandel, G.J. DISCIULLot, Inhibition of human immunodeficiency virus infection by agents that interfere with thiol-disulfide interchange upon virus-receptor interaction, 1994.
- [17] T.M. Gallagher, Murine Coronavirus Membrane Fusion Is Blocked by Modification of Thiols Buried within the Spike Protein, 1996. <https://journals.asm.org/journal/jvi>.
- [18] D. Lavillette, R. Barbouche, Y. Yao, et al., Significativa insensibilità al redox delle funzioni della glicoproteina spike del SARS-CoV: confronto con l'envelope dell'HIV, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 9200e9204, <https://doi.org/10.1074/jbc.M512529200>.
- [19] D. Giustarini, A. Santucci, D. Bartolini, F. Galli, R. Rossi, Il declino età-dipendente dell'equilibrio tiolo-disolfuro extracellulare e il suo ruolo nella SARS-CoV-2, *Redox Biol.* 41 (2021), <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.101902>.
- [20] S. Hati, S. Bhattacharyya, Impact of thiol-disulfide balance on the binding of covid-19 spike protein with angiotensin-converting enzyme 2 receptor, *ACS Omega* 5 (2020) 16292e16298, <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c02125>.
- [21] M. Man'cek-Keber, I. Hafner-Bratkovi'c, D. Lain's'cek, et al., Disruption of disolfuri all'interno della RBD della proteina spike della SARS-CoV-2 impedisce la fusione e rappresenta un bersaglio per l'inibizione dell'ingresso virale da parte di farmaci registrati, *FASEB (Fed. Am. Soc. Exp. Biol.) J.* 35 (2021), <https://doi.org/10.1096/fj.202100560R>.
- [22] A.M. Grishin, N.v. Dolgova, S. Landreth, et al., Disulfide bonds play a critical role in the structure and function of the receptor-binding domain of the SARS-CoV-2 spike antigen, *J. Mol. Biol.* 434 (2022), <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167357>.
- [23] P. Baral, N. Bhattarai, M.L. Hossen, et al., Mutation-induced changes in the receptor-binding interface of the SARS-CoV-2 Delta variant B.1.617.2 and implications for immune evasion, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 574 (2021) 14e19, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.08.036>.
- [24] L. Guruprasad, Evolutionary relationships and sequence-structure de-terminants in human SARS coronavirus-2 spike proteins for host receptor recognition, *Proteins: Struct. Funct. Bioinf.* 88 (2020) 1387e1393, <https://doi.org/10.1002/prot.25967>.
- [25] F. Silvagno, A. Vernone, G.P. Pescarmona, The role of glutathione in protecting against the severe inflammatory response triggered by covid-19, *Antioxidants* 9 (2020) 1e16, <https://doi.org/10.3390/antiox9070624>.
- [26] H. Ibrahim, A. Perl, D. Smith, et al., Blocco terapeutico dell'infiammazione nell'infezione grave da COVID-19 con N-acetilcisteina per via endovenosa, *Clin. Immunol.* 219 (2020), <https://doi.org/10.1016/j.clim.2020.108544>.
- [27] S. Rafique, M. Idrees, A. Ali, K.I. Sahibzada, M. Iqbal, Generazione di particelle infettive HCV pseudotipizzate e loro utilizzo per studiare il ruolo dei recettori CD81 e SRBI nell'infezione da HCV, *Mol. Biol. Rep.* 41 (2014) 3813e3819, <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3247-x>.
- [28] S. Moriyama, Y. Adachi, T. Sato, et al., La maturazione temporale degli anticorpi neutralizzanti in individui convalescenti COVID-19 migliora la potenza e l'ampiezza delle varianti circolanti del SARS-CoV-2, *Immunity* 54 (2021) 1841e1852, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.06.015>, e4.
- [29] Y. Cai, J. Zhang, T. Xiao, et al., Distinct Conformational States of SARS-CoV-2 Spike Protein, 2020. <https://www.science.org>.
- [30] J. Buchrieser, J. Dufloo, M. Hubert, et al., Syncytia formation by SARS-CoV-2-infected cells, *EMBO J.* 39 (2020), <https://doi.org/10.15252/embj.2020106267>.
- [31] C.B. Jackson, M. Farzan, B. Chen, H. Choe, Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* (2021), <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00418-x>.
- [32] J. Lan, J. Ge, J. Yu, et al., Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor, *Nature* 581 (2020) 215e220, <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2180-5>.
- [33] T. Meirson, D. Bomze, G. Markel, Structural basis of SARS-CoV-2 spike protein induced by ACE2, *Bioinformatics* 37 (2021) 929e936, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa744>.
- [34] T.N. Starr, A.J. Greaney, S.K. Hilton, et al., Deep mutational scanning of SARS-CoV-2 receptor binding domain reveals constraints on folding and ACE2 binding, *Cell* 182 (2020) 1295e1310, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.012>, e20.