



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI BRESCIA

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE BIOMEDICHE E MEDICINA TRASLAZIONALE

Settore Scientifico Disciplinare: MED/07

CICLO XXXIII

**COVID-19: studi sull'attività replicativa del  
virus e sull'attività antivirale del  
Metotrexato**

Dott. Alberto Zani

*Firma*

Relatore:

Prof. Arnaldo Caruso

*Firma*

Co-relatore:

Prof.ssa Caccuri

*Firma*

*Alla mia famiglia*

# Indice

<b>Introduzione</b>	1
<i>Comparsa e diffusione di SARS-CoV-2</i>	4
<i>Struttura genomica e ciclo replicativo di SARS-CoV-2</i>	8
<i>Patogenesi di SARS-CoV-2</i>	17
<i>Caratteristiche cliniche di COVID-19</i>	19
<i>Diagnosi di COVID-19</i>	21
<i>Strategie Farmacologiche contro COVID-19</i>	22
<b>Obiettivi</b>	34
<b>Materiali e Metodi</b>	37
<i>Rilevamento di SARS-CoV-2</i>	38
<i>Coltura cellulare</i>	38
<i>Isolamento del virus e infezione</i>	39
<i>Efficacia del Metotrexato</i>	40
<i>Valutazione dell'attività antivirale di Metotrexato</i>	40
<i>Estrazione dell'RNA virale e quantificazione tramite real-time reverse-transcription PCR (qRT-PCR)</i>	40
<i>Western Blot</i>	41
<i>Immunofluorescenza</i>	42
<i>Metagenomica</i>	42
<i>Analisi filogenetica</i>	44
<i>Analisi statistica</i>	45

<b>Risultati</b>	46
<i>Effetti del Metotrexato sulla crescita e sul metabolismo delle cellule Vero E6</i>	47
<i>Il trattamento con il Metotrexato inibisce fortemente la replicazione di SARS-CoV-2</i>	49
<i>Epidemia di COVID-19 a Brescia</i>	51
<i>Persistenza dell'isolato di SARS-CoV-2 GZ69 nelle cellule Vero E6</i>	53
<i>Mutazione genetica di SARS-CoV-2 GZ69</i>	55
<b>Discussione e Conclusioni</b>	60
<b>Bibliografia</b>	69

# **INTRODUZIONE**

I coronavirus sono virus involuati a singolo filamento positivo di RNA che causano principalmente infezioni del tratto respiratorio superiore e dell'apparato digerente. Appartengono a questo gruppo di virus SARS-CoV e MERS-CoV, virus associati rispettivamente alla sindrome respiratoria acuta CoV e alla sindrome respiratoria mediorientale CoV, che si sono verificate come focolai rispettivamente nel 2002 e nel 2013. Entrambe le malattie presentarono gravi complicazioni, tra cui polmoniti gravi e bronchioliti [1]. I coronavirus appartengono alla sottofamiglia Coronavirinae, alla famiglia Coronaviridae e all'ordine Nidovirales, che può essere suddiviso a sua volta in 4 generi: alphacoronavirus ( $\alpha$ -CoV), betacoronavirus ( $\beta$ -CoV), gammacoronavirus ( $\gamma$ -CoV) e deltacoronavirus ( $\delta$ -CoV). Esistono sette tipi di coronavirus noti per causare infezioni nell'uomo, che includono 229E ( $\alpha$ -CoV), NL63 ( $\alpha$ -CoV), OC43 ( $\beta$ -CoV), HKU1 ( $\beta$ -CoV), MERS-CoV ( $\beta$ -CoV), SARS-CoV ( $\beta$ -CoV) e il recente SARS-CoV-2 ( $\beta$ -CoV) (**Figura 1**) [2]. Questi ultimi 3 virus possono colpire il sistema respiratorio, il sistema gastrointestinale, il sistema epatico e quello nervoso arrivando a causare insufficienza respiratoria e multiorgano con successiva morte dei pazienti nei casi più gravi [3].

Order: <i>Nidovirales</i>					
Family: <i>Coronaviridae</i>					
Sub-family	Genus	Sub-genus	Species	Sub-species	
<i>Orthocoronaviridae</i>	<i>Alphacoronavirus</i>	<i>Duvinacoronavirus</i>	<i>HCoV-229E</i>		
		<i>Setracovirus</i>	<i>HCoV-NL63</i>		
	<i>Betacoronavirus</i>	<i>Embecovirus</i>		<i>HCoV-HKU1</i>	
				<i>Betacoronavirus 1</i>	<i>HCoV-OC43</i>
		<i>Merbecovirus</i>	<i>MERS-CoV</i>		
		<i>Sarbecovirus</i>	<i>SARS-CoV</i>		
			<i>SARS-CoV-2</i>		
	<i>Deltacoronavirus</i>				
	<i>Gammacoronavirus</i>				

**Figura 1.** Tassonomia dei coronavirus dell'uomo. [4]

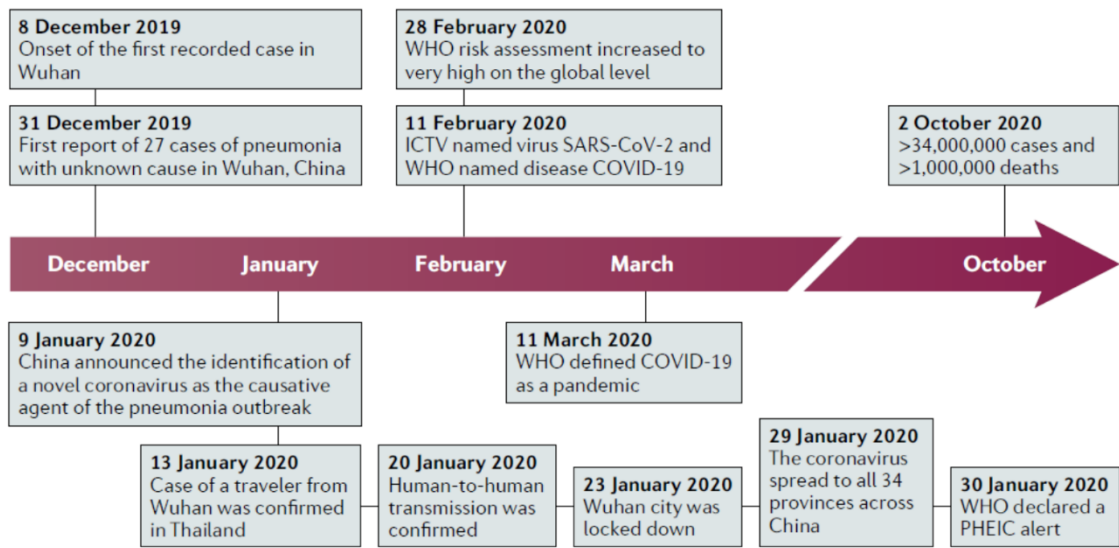
COVID-19 è la malattia respiratoria causata da SARS-CoV-2. La modalità di trasmissione più rilevante di questo virus è quella aerea, attraverso l'inalazione di goccioline provenienti dalle vie respiratorie (aerosol) di un soggetto infetto [5]. Anche se la maggior parte delle persone infette risulta asintomatica o presenta sintomi lievi, sia i pazienti sintomatici che asintomatici possono presentare una carica virale simile ed entrambi possono essere infettivi. Il periodo di incubazione medio (dall'infezione all'insorgenza dei primi sintomi) è di circa 5,1 giorni, mentre il 97% dei pazienti sintomatici sviluppa segni di malattia entro 11,5 giorni [6]. Il numero di riproduzione di base ( $R_0$ ) di SARS-CoV-2 è stato stimato essere intorno a 3,28, un valore superiore rispetto a quello di SARS-CoV [7].

Nel caso in cui l'ingresso di SARS-CoV-2 nell'ospite induca una forte risposta immunitaria, tale da consentire un immediato controllo dell'infezione virale, il paziente non sviluppa sintomi gravi. Se il sistema immunitario, al contrario, non riesce ad eliminare il virus, il paziente sviluppa sintomi severi, che includono polmonite virale con dispnea, che può portare a gravi complicazioni potenzialmente letali. Nei casi più gravi si manifesta la sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS), spesso complicata da tromboembolia polmonare, che porta alla morte [8].

### ***Comparsa e diffusione di SARS-CoV-2***

Il primo caso di infezione da COVID-19 è stato segnalato a dicembre 2019 nella città di Wuhan, provincia di Hubei, Cina [9] da dove poi si è diffusa a livello globale fino a essere dichiarata dall'OMS come la prima pandemia causata da coronavirus [10]. A dicembre del 2019, diverse strutture sanitarie a Wuhan, hanno segnalato diversi gruppi di pazienti che presentavano una polmonite di origine sconosciuta. Analogamente ai pazienti affetti da SARS e MERS, questi pazienti mostravano sintomi di polmonite virale come febbre, tosse, dolore al petto, e nei casi più gravi dispnea e infiltrazione polmonare bilaterale [11]. Il 31 dicembre, il Wuhan Municipal Health Commission ha reso noto al pubblico un focolaio di polmonite di origine sconosciuta e ha informato l'organizzazione mondiale della sanità (WHO). **(Figura 2)**.



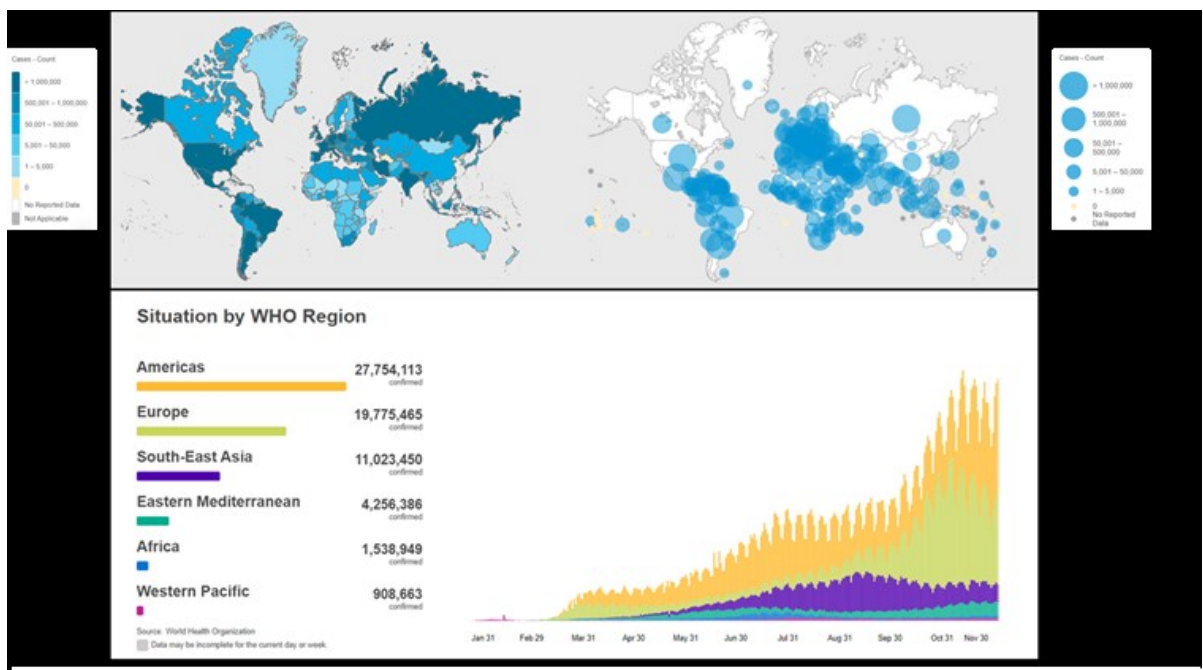


**Figura 2.** Cronologia degli eventi chiave dell'epidemia di coViD-19 [12].

Tra i primi 27 casi documentati di pazienti ricoverati in ospedale, la maggior parte di questi era epidemiologicamente collegata all'Huanan Seafood Wholesale Market, un mercato situato nel centro di Wuhan famoso per la vendita di prodotti ittici e di animali vivi, comprendenti pollame e fauna selvatica [13]. Successive analisi metagenomiche di ceppi virali isolati da pazienti con polmonite grave mostrarono che l'agente eziologico di questa malattia emergente fosse un nuovo betacoronavirus [11]. Successivamente iniziarono ad essere identificati cluster di infezione familiari che non avevano avuto precedenti contatti con l'Huanan Seafood Wholesale Market, a dimostrazione che questo nuovo betacoronavirus era in grado di trasmettersi da uomo a uomo [14]. Poiché l'epidemia in Cina è coincisa con l'avvicinarsi del capodanno cinese, gli spostamenti tra le città hanno facilitato la trasmissione del virus. In un mese, infatti, il nuovo betacoronavirus si diffuse in maniera massiccia in tutte le 34 province cinesi. Alla fine di gennaio, a causa dell'aumento improvviso dei casi, l'OMS dichiarava il nuovo focolaio di

coronavirus un'emergenza sanitaria di interesse internazionale e l'11 febbraio il comitato internazionale per la tassonomia dei virus nominava il nuovo virus SARS-CoV-2 mentre l'OMS definiva la nuova malattia causata da questo virus COVID-19 [15]. Il focolaio di COVID-19 in Cina ha raggiunto il suo picco a metà febbraio. Per contrastare il costante aumento dei casi, la Cina introdusse in quel periodo misure di salute pubblica più rigorose e senza precedenti. Il 23 gennaio la città di Wuhan venne isolata dal resto del paese, bloccando tutti i viaggi e i trasporti che la collegavano alle altre città. Nelle settimane successive anche le attività all'aperto e i raduni furono limitati e la maggior parte delle strutture pubbliche in molte città furono chiuse. Grazie a queste misure il numero di casi giornaliero in Cina iniziò a diminuire in maniera costante, tuttavia la diffusione internazionale di COVID-19 subì un'accelerazione. L'elevata efficienza di trasmissione di SARS-CoV-2 e la moltitudine di viaggi internazionali hanno consentito una rapida diffusione del virus in tutto il mondo. L'11 marzo 2020, l'OMS definiva ufficialmente l'epidemia globale di COVID-19 una pandemia [16]. Da marzo, mentre in Cina la malattia veniva controllata efficacemente, il numero di casi iniziò ad aumentare notevolmente in Europa, negli USA e nel resto del mondo. Fino al 6 dicembre sono stati segnalati più di 65 milioni di casi e circa 1 milione di decessi a livello globale (**Figura 3**). Il numero elevato di decessi è dovuto soprattutto al fatto che le strutture sanitarie sono state sovraccaricate principalmente durante i primi mesi della pandemia. L'analisi comparativa della sequenza genomica di SARS-CoV-2 indica come questo virus risulti molto simile alla sequenza di BAT-CoV, suggerendo una possibile origine mammifera partita dai pipistrelli nella città cinese di Wuhan [17]. Tuttavia ci sono evidenze che

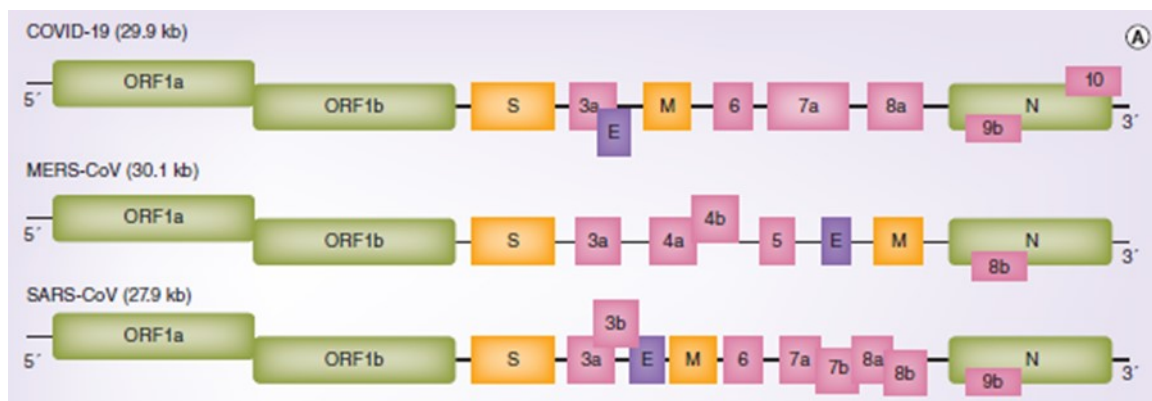
suggeriscono che i pipistrelli siano serbatoi naturali di coronavirus simili a SARS, incluso anche SARS-CoV-2 [18]. Siccome i coronavirus necessitano di un ospite intermedio per essere trasmessi all'uomo è stata suggerita anche un'origine pangolinica di SARS-CoV-2, sulla base di somiglianze significative di determinati geni. Sebbene le prove genetiche suggeriscano che SARS-CoV-2 sia un virus naturale, che ha avuto origine probabilmente negli animali, non ci sono ancora conclusioni definitive sul momento preciso in cui il virus abbia infettato per la prima volta l'uomo. Per affrontare tale questione altamente controversa, è necessario condurre in tutto il mondo ulteriori indagini retrospettive che coinvolgano un maggior numero di campioni raccolti da pazienti, animali e ambiente.



**Figura 3.** Conteggio e distribuzione dei casi di COVID-19 segnalati all'OMS.

## ***Struttura genomica e ciclo replicativo di SARS-CoV-2***

Tutti i coronavirus sono virus capsulati a singolo filamento positivo di RNA con un genoma policistronico di quasi 29,9 kb di lunghezza costituito da 6-11 Open Reading Frame (ORF) che codificano diverse proteine non strutturali (ORF1a e ORF1b le quali vengono trasformate in 15 proteine non strutturali) all'estremità 5', più 4 proteine strutturali (la glicoproteina di superficie [S], la proteina dell'involucro [E], la proteina di membrana [M] e la proteina del nucleocapside [N]) e molteplici proteine accessorie (ORF3a, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8 e ORF10 in SARS-CoV-2) all'estremità 3' (**Figura 4**) [2]. Il virus SARS-CoV-2 codifica anche per altre poliproteine come la RNA polimerasi, l'elicasi e varie proteasi.



**Figura 4.** Organizzazione genomica di SARS-CoV-2, MERS-CoV- e SARS-CoV.

### *La glicoproteina di superficie S*

La glicoproteina di superficie gioca un ruolo significativo nella patogenesi in quanto si lega alla cellula ospite attraverso il suo Receptor Binding Domain (RBD) dando il via all'infezione. [19]. La proteina S è composta da 1273 residui

aminoacidici suddivisi in 3 subunità, ovvero S1, S2 e S2' che agiscono in modo diverso durante il legame alla cellula ospite. La subunità S1 è coinvolta nell'attacco dei virioni alla membrana della cellula ospite in quanto interagisce con il recettore ACE2 umano che successivamente avvia il processo di infezione [20]. Durante questo processo, la proteina S subisce cambiamenti conformazionali indotti dal suo ingresso negli endosomi della cellula ospite. La comprensione di questi cambiamenti conformazionali è essenziale per lo sviluppo di un vaccino efficace, poiché mutazioni nella proteina bersaglio potrebbero influenzare la risposta immunitaria, causando un'alterata antigenicità. Sebbene siano state trovate diverse mutazioni nella regione di legame del recettore S1 di SARS-CoV-2, la sua interazione con ACE2 è preservata negli esseri umani, nei suini e nei pipistrelli [21]. La subunità S2 funziona come proteina di fusione che aiuta il virione a fondersi con la membrana della cellula ospite. Durante il processo di fusione, la proteina S2 appare in 3 stati conformazionali principali: uno stato nativo pre-fusione, seguito da uno stato intermedio (prehairpin) e infine uno stato post-fusione. Anche in questo caso è interessante capire come questi stati conformazionali dinamici orchestrino il meccanismo di ingresso del virus nella cellula ospite poiché questo potrebbe portare allo sviluppo di terapie efficaci [22]. La restante subunità S2' funziona come un peptide di fusione. La sequenza della subunità S2 di SARS-CoV-2 è molto simile a quella di pipistrello (BAT-CoV) e di SARS-CoV (~99%), indicando la possibilità di usare ad ampio spettro composti antivirali progettati contro il dominio S2 di questi virus nella terapia per il COVID-19 [23]. Il RBD della proteina S, lungo ~90 aminoacidi, è la parte meno conservata del virus, suggerendo il suo

coinvolgimento nei meccanismi di patogenesi. Dopo ulteriori analisi, sono stati identificati sei residui del RBD di SARS-CoV-2 (Leu455, Phe486, Gln493, Ser494, Asn501 e Tyr505) fondamentali per il legame con ACE2, di cui 5 differiscono da SARS-CoV, un aspetto questo che deve essere preso in considerazione nella progettazione e lo sviluppo di nuovi farmaci [20].

### La proteina dell'involucro (E)

Le proteine dell'involucro (E) sono un gruppo di proteine virali relativamente piccole che giocano un ruolo importante nell'assemblaggio e nel rilascio dei virioni [24]. La proteina E è relativamente piccola (75 aa) e svolge un ruolo significativo nella morfogenesi e nell'assemblaggio virale [25]. Le proteine E sono note per agire come viroporine che si assemblano nella membrana dell'ospite formando pori lipoproteici coinvolti nel trasporto ionico. Tra le proteine strutturali di SARS-CoV-2, la proteina E è considerata un potenziale bersaglio farmacologico. La sequenza della proteina E presenta regioni altamente conservate tra BAT-CoV, SARS-CoV e SARS-CoV-2 mentre mostra una leggera variazione nella sequenza di MERS-CoV.

### La proteina di membrana (M)

Le proteine M sono proteine strutturali lunghe 222 aminoacidi che funzionano in concomitanza con le proteine E, N ed S e svolgono un ruolo importante nell'impacchettamento dell'RNA virale [26]. La presenza di 3 domini

transmembrana è una caratteristica distintiva delle proteine M, che rappresentano le proteine virali più abbondanti nei coronavirus. La sequenza della proteina M è conservata tra BAT-CoV, SARS-CoV e SARS-CoV-2 mentre risulta diversa nel ceppo MERS-CoV.

### La nucleoproteina (N)

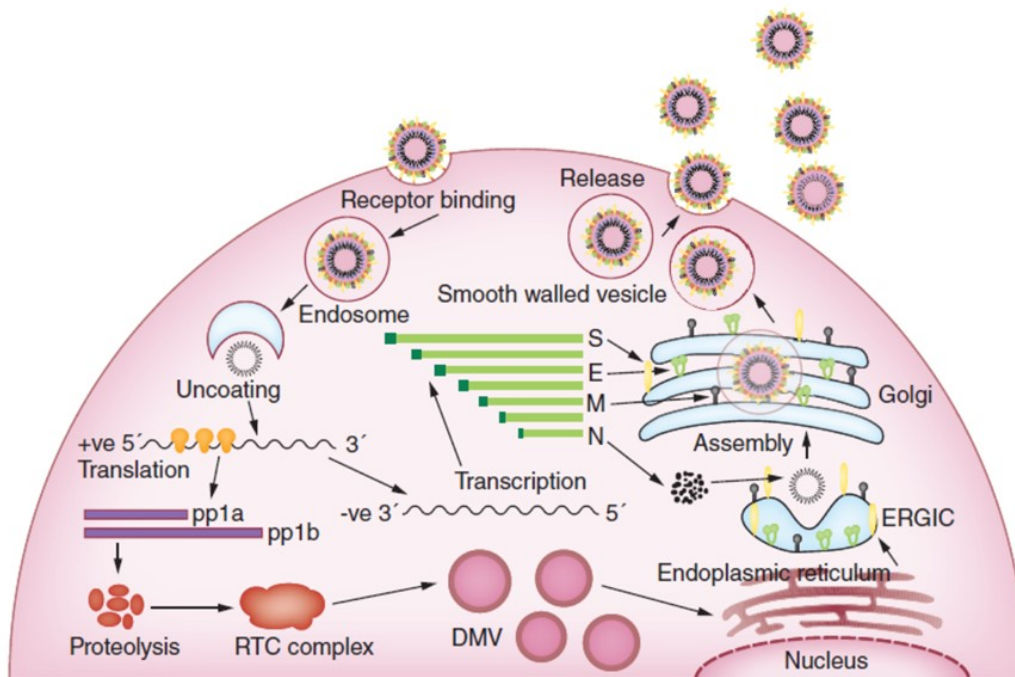
Le proteine del nucleocapside (N) svolgono un ruolo importante nell'impacchettamento dell'RNA virale nel ribonucleocapside, interagendo con il genoma virale e la proteina M [27]. Le proteine N si legano all'RNA virale attraverso un dominio lungo ~140 aminoacidi [24]. La proteina N è altamente conservata nei coronavirus che condividono un'identità di circa il 90% con quella di SARS-CoV.

### Ciclo replicativo di SARS-CoV-2 nella cellula ospite umana

L'infezione iniziale richiede l'ingresso del virus nella cellula ospite (**Figura 5**). La glicoproteina S media il legame del virus ai recettori della superficie delle cellule umane, seguito dalla fusione della membrana del virus con la membrana della cellula ospite che permette l'ingresso del virus [28]. La glicoproteina S è la proteina strutturale che determina la caratteristica forma "a corona" dei coronavirus (**Figura 6**). Espressa sulla superficie del virus come proteina trimerica, determina anche il tropismo e la patogenesi dell'ospite [29]. Esistono due subunità principali di questa proteina: S1 e S2. La subunità S1 interviene nel

legame del virione alla cellula ospite mentre la subunità S2 media la fusione della membrana virale con la membrana cellulare [30].

La proteina S possiede inoltre un sito di taglio polibasicco funzionale (furina) nella giunzione S1/S2 che dà origine alla subunità S2', peptide di fusione. La presenza di un tale sito di scissione distingue il SARS-CoV-2 da altri coronavirus come il SARS-CoV, che possiede invece un sito di scissione monobasico tra le subunità S1 e S2, che viene ulteriormente elaborato all'ingresso nella cellula ospite bersaglio. In diversi coronavirus, un'aumentata amplificazione della proteina S a livello della membrana cellulare può facilitare la fusione della membrana delle cellule infette con la membrana delle cellule non infette adiacenti, portando alla

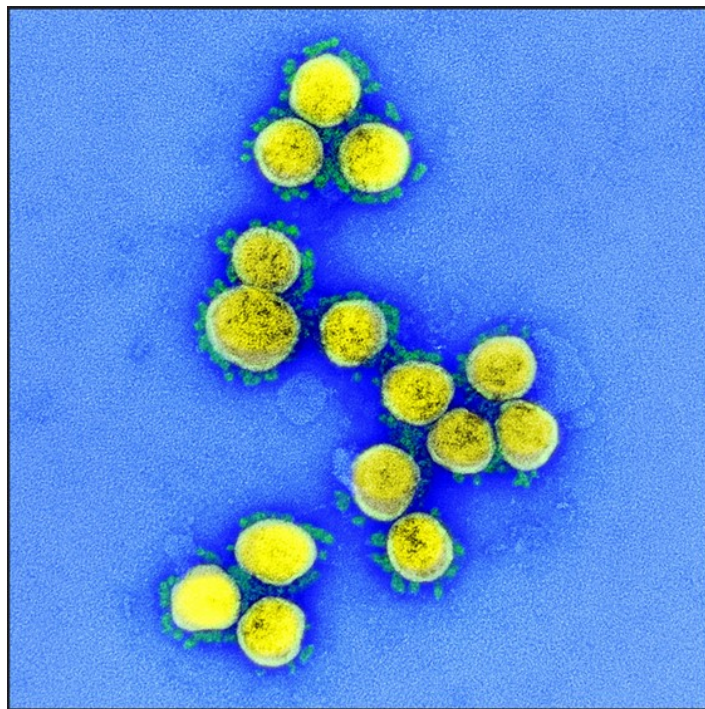


**Figura 5.** Ciclo di vita di SARS-CoV-2 nella cellula umana.



formazione di cellule giganti o multinucleate (sincizi) e ad un'ulteriore diffusione del virus [25].

La glicoproteina S possiede un dominio di legame al recettore (RBD) che è in grado di legare il recettore ACE2 presente sulla membrana delle cellule bersaglio [31]. Dei 14 aminoacidi presenti nella subunità S1 di SARS-CoV, 8 residui sono conservati in SARS-CoV-2, suggerendo che anche questo coronavirus utilizza il recettore ACE-2 per l'ingresso nella cellula. L'interazione tra la glicoproteina S e ACE-2 e la distribuzione del recettore stesso determinano il tropismo del virus. Un fatto interessante è che il virus SARS-CoV-2 non utilizza recettori utilizzati in precedenza da altri coronavirus come APN e DPP4 [32].



**Figura 6.** Micrografia elettronica a trasmissione di particelle di virus SARS-CoV-2, isolate da un paziente. Immagine acquisita e migliorata presso il NIAID Integrated Research Facility (IRF) a Fort Detrick, nel Maryland.

Una volta che la subunità S1 si lega al recettore della cellula ospite, la subunità S2 favorisce il meccanismo di fusione avvicinando la membrana virale e quella cellulare. Cambiamenti conformazionali nella proteina S e l'interazione dei peptidi di fusione completano la fase di fusione tra le due membrane, che rappresenta un passaggio chiave dell'infezione virale. Per endocitosi si intende il processo mediante il quale una macromolecola entra nella cellula umana; in questo caso la macromolecola è rappresentata dal virus SAR-CoV-2.

I coronavirus possono entrare nella cellula ospite attraverso la via endosomica o non endosomica. La via endosomiale del virus è un processo sensibile al pH, in cui i virioni endocitati vengono attivati dal pH acido endosomiale, che causa la fusione della membrana virale con quella endosomiale, con il successivo rilascio del genoma virale all'interno del citoplasma cellulare [33]. Diversi studi hanno dimostrato che la proteasi a cisteina catepsina favorisce la fusione della membrana virale e l'ingresso endosomiale dei coronavirus a causa del basso pH presente nell'ambiente cellulare [34]. TMPRSS2 e TMPTESS11D inducono invece il taglio della giunzione S1/S2 per favorire l'entrata non endosomiale del virus. Nella via endocitica mediata dalla proteina clatrina, nel momento in cui il recettore si lega con la glicoproteina S, il recettore presenta sulla sua coda citoplasmatica il complesso AP2, fattore che induce la polimerizzazione della clatrina che forma una struttura a tre raggi chiamata triscele. Quando queste strutture iniziano a legarsi al recettore, formano una struttura a nido d'ape in grado di formare una fossa sferica, rivestita di clatrine, che ingloba la particella virale, allontanandola dalla membrana cellulare attraverso la formazione di una vescicola con un pH compreso tra 6 e 6,5. Una volta che la vescicola entra nel

citoplasma, le clatrine iniziano a dissociarsi causando una riduzione del pH della vescicola (5,5-6). A questo punto i recettori presenti nella vescicola si dissociano ritornando alla membrana cellulare e l'endosoma si fonde con i lisosomi presenti nella cellula. All'interno del lisosoma avvengono reazioni enzimatiche volte a degradare il contenuto dell'endosoma ma gli enzimi presenti nel lisosoma non riescono a impedire all'RNA virale di raggiungere il citoplasma cellulare, dove inizierà il ciclo virale [35]. Dopo l'ingresso e l'uncoating dell'endosoma virale nel citoplasma della cellula ospite, il ciclo replicativo del coronavirus inizia con la traduzione dell'mRNA. Il virus dipende fortemente dal sistema di traduzione della cellula ospite per formare le sue proteine. L'RNA messaggero subgenomico (sgmRNA) presenta un cappuccio metilato al 5' e una coda poliadenilata al 3'. Il terminale 5' costituisce i 2/3 del genoma virale siccome contiene ORF1a e ORF1b. La codifica di queste due regioni dà origine a due poliproteine molto lunghe (pp1a e pp1b) che verranno ulteriormente tagliate dalle proteasi virali in 16 proteine non strutturali (NSP) che avranno un ruolo importante nella sintesi dell'RNA virale. Queste NSP formano delle vescicole a doppia membrana che proteggono il genoma virale dalle difese dell'ospite e formano il complesso di replicazione-trascrizione (RTC) che media la sintesi dell'RNA virale. La subunità catalitica RdRp rappresenta la macchina di sintesi dell'RNA responsabile della sintesi di tutti i virus a filamento positivo di RNA. Il processo di sintesi dell'RNA consiste in 2 fasi: replicazione del genoma virale e trascrizione di sgmRNA che codificano per l'RNA virale e le proteine accessorie. Durante questo processo viene prodotto un filamento negativo di RNA temporaneo che serve da stampo per produrre l'RNA a filamento positivo della progenie [36]. Dopo la replicazione e la sintesi

subgenomica dell'RNA, l'mRNA della proteina N viene tradotto dai ribosomi citosolici per formare la proteina nucleocapsidica virale. Gli mRNA delle proteine S, E e M vengono inseriti nel reticolo endoplasmatico (ER) e tradotti dai ribosomi presenti in esso [24]. Le proteine tradotte nell'ER viaggiano in un percorso secretorio che conduce all'ERGIC [37], compartimento intermedio tra ER e apparato di Golgi. Qui i genomi virali vengono incapsulati dalla proteina nucleocapsidica [N] prima della gemmazione dalla membrana dell'ERGIC che contiene le proteine strutturali virali necessarie per la formazione di virioni maturi [38]. La proteina M dirige quasi tutte le interazioni proteina-proteina necessarie per l'assemblaggio del virione, ma necessita della proteina E per formare particelle virali funzionali [39]. Alla fine dell'assemblaggio del virione la proteina M si lega al nucleocapside per aumentare la stabilità del virione stesso. I virioni appena formati vengono quindi trasportati sulla membrana cellulare all'interno di vescicole e rilasciati mediante esocitosi. Quando la sintesi proteica supera la capacità dell'ER di ripiegare correttamente le proteine prodotte, queste si accumulano causando uno stress dell'ER stesso. Per mantenere l'omeostasi, le cellule attivano delle vie di segnalazione note come unfolded protein response (UPR) [40]. La UPR attiva i trasduttori del segnale di stress dell'ER, come PERK, ATF6 o IRE1, che trasmettono il segnale prima al citosol e poi al nucleo. Di conseguenza la cellula risponde abbassando l'attività della sintesi proteica e aumentando la capacità dell'ER di ripiegare le proteine. Il mancato mantenimento dell'omeostasi durante questo processo attiva l'apoptosi [41].

## ***Patogenesi di SARS-CoV-2***

La patogenesi dell'infezione da SARS-CoV-2 nell'uomo si può manifestare con sintomi lievi fino a raggiungere grave insufficienza respiratoria. Legandosi alle cellule epiteliali nel tratto respiratorio, SARS-CoV-2 inizia a replicare e a migrare verso le vie aeree dove avviene l'ingresso nelle cellule epiteliali alveolari attraverso il recettore ACE2. La rapida replicazione a livello polmonare, mediata dall'enzima cPLA2 $\alpha$ , può innescare una forte risposta immunitaria. Se nelle fasi precoci, il virus non viene eliminato dal sistema immunitario, si diffonderà causando gravi danni ai tessuti colpiti, soprattutto a livello polmonare. I cambiamenti istopatologici nei pazienti con COVID-19 si verificano principalmente nei polmoni. A questo proposito, analisi istopatologiche hanno evidenziato danno alveolare bilaterale diffuso, formazione di membrane ialine, desquamazione dei pneumociti e depositi di fibrina nei polmoni di pazienti COVID-19 gravi [42]. In alcuni casi è stata osservata anche insufficienza multiorgano [43]. Le cellule danneggiate all'interno del polmone attivano la risposta infiammatoria, mediata principalmente da macrofagi e monociti proinfiammatori. In uno studio effettuato su 452 pazienti infetti da SARS-CoV-2, è stato riscontrato che i pazienti più gravi presentavano un numero inferiore di linfociti, monociti, basofili ed eosinofili e maggiore di leucociti, con un rapporto quindi tra neutrofilo e linfociti maggiore rispetto ai soggetti sani. Anche il numero di linfociti T Helper e citotossici risultava inferiore nei pazienti COVID-19 rispetto al gruppo di controllo [44]. Inoltre, nella maggior parte dei pazienti sono state riscontrate elevate concentrazioni di marcatori associati all'infezione e citochine

infiammatorie. Un ambiente ricco di citochine provoca l'attivazione di monociti CD14<sup>+</sup> e CD16<sup>+</sup> infiammatori, che causa una sovra-espressione di IL-6, in grado di aumentare la risposta infiammatoria [45]. Anche gli inflammasomi, oligomeri multiproteici intracellulari, sono in grado di intervenire nella risposta immunitaria innata a seguito di stimoli endogeni ed esogeni, trasformando una moltitudine di segnali in risposte pro-infiammatorie [46]. Questi complessi multiproteici inducono, infatti, l'attivazione della caspasi-1 infiammatoria che, a sua volta, attiva le citochine interleuchina-1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e interleuchina-18 (IL-18) che danno luogo ad una risposta infiammatoria sistemica. L'attivazione di caspasi-1 è in grado di indurre anche una forma di morte cellulare infiammatoria denominata piroptosi. Sono stati fino ad oggi identificati numerosi inflammasomi, tuttavia quello attualmente più caratterizzato è l'inflammasoma intracellulare Nod-Like Receptor Protein 3 (NLRP3), che appartiene alla famiglia dei recettori PRRs (Pattern Recognition Receptors) dell'immunità innata che sono in grado di rilevare i segnali provenienti da patogeni esterni. Questa tempesta citochinica è la responsabile della sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS) e dell'insufficienza respiratoria, considerate le principali cause di morte nei pazienti COVID-19. Al fine di comprendere meglio la patogenesi dell'infezione da SARS-CoV-2 e le sue dinamiche di trasmissione è molto importante effettuare studi su modelli animali, come primati, topi, furetti e criceti dorati, in quanto offrono informazioni importanti per lo sviluppo di terapie antivirali efficaci e vaccini.

## ***Caratteristiche cliniche di COVID-19***

La maggior parte dei pazienti con COVID-19 presenta sintomi dopo un periodo di incubazione di 1–14 giorni (più comunemente 5 giorni), mostrando inizialmente sintomi lievi come, mal di testa, febbre, tosse, diarrea, mal di gola, dolore toracico, brividi, nausea, vomito, ageusia e anosmia, evolvendosi e peggiorando in diversi casi, determinando insufficienza multi-organo, shock settico, edema polmonare, dispnea, mialgia, affaticamento e sindrome da distress respiratorio acuto [47] (**Figura 7**). È stato dimostrato che i pazienti in età avanzata (>60 anni) e con gravi malattie preesistenti presentano un rischio maggiore di sviluppare la ARDS e quindi di andare incontro ad una prognosi infausta [48]. Al momento del ricovero, il risultato radiologico più ricorrente alla tomografia computerizzata (TC) del torace è determinato da un'immagine opaca a “vetro smerigliato” e la maggior parte dei pazienti presentava anche una condizione di linfopenia marcata. I pazienti in terapia intensiva mostravano inoltre livelli molto elevati di citochine plasmatiche, il che confermava un processo immunopatologico causato da una cascata citochinica [42]. In questa coorte di pazienti, circa il 2,3% è deceduto entro un tempo medio di circa 16 giorni dall'esordio della malattia [43]. Ulteriori anomalie riportate nei test di laboratorio nei casi di grave infezione da COVID-19 includevano anche un aumento dei livelli degli enzimi epatici (LDH, ALT e AST), della bilirubina totale, della creatinina, della troponina cardiaca, del D-dimero, del tempo di protrombina, della procalcitonina e della proteina C reattiva (CRP) [49]. Successivi studi istologici effettuati da campioni prelevati dal fegato, sempre da pazienti infetti da SARS-CoV-2, hanno rivelato un notevole danno epatico con

un aumento di cellule mitotiche e di corpi eosinofili. Anche il coinvolgimento cardiaco può essere considerata un'altra manifestazione importante rilevata in pazienti affetto da COVID-19, che nella maggior parte dei casi porta a prognosi negativa. Nonostante tutte queste evidenze, si può affermare che qualsiasi persona, indipendentemente dall'età e dal caso clinico, possa essere suscettibile all'infezione da SARS-CoV-2 [43].

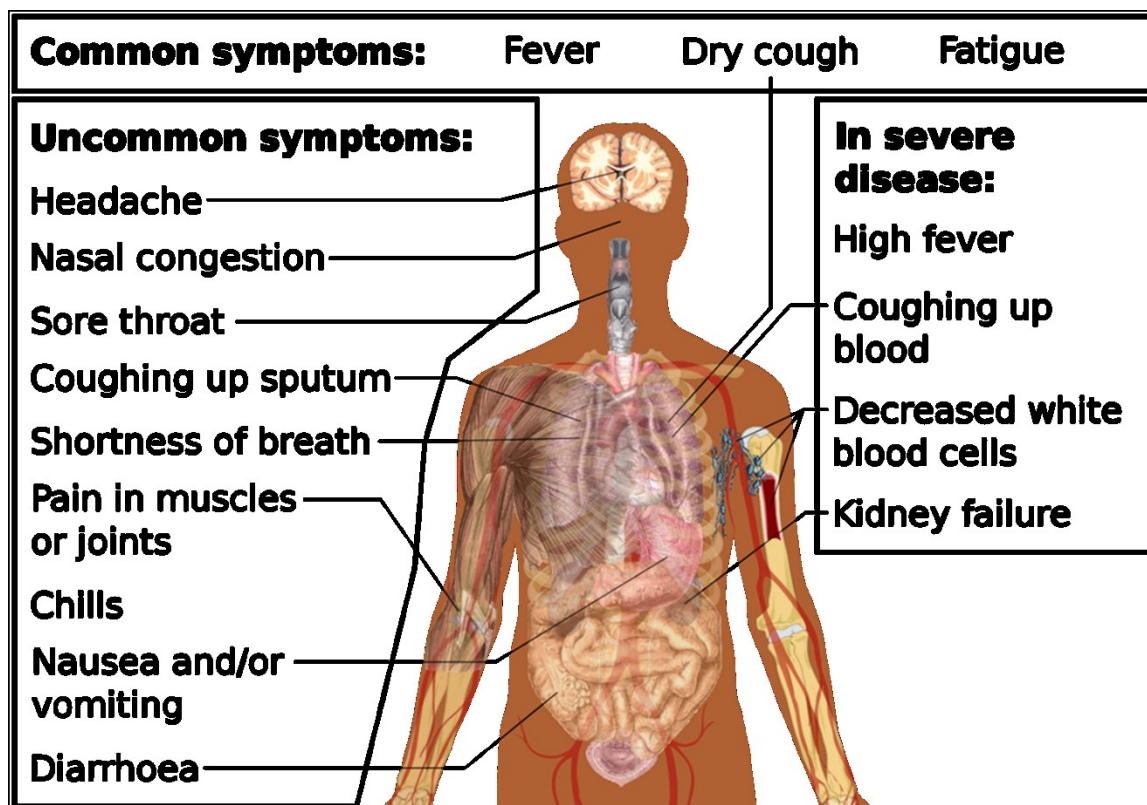


Figura 7. Sintomi di COVID-19



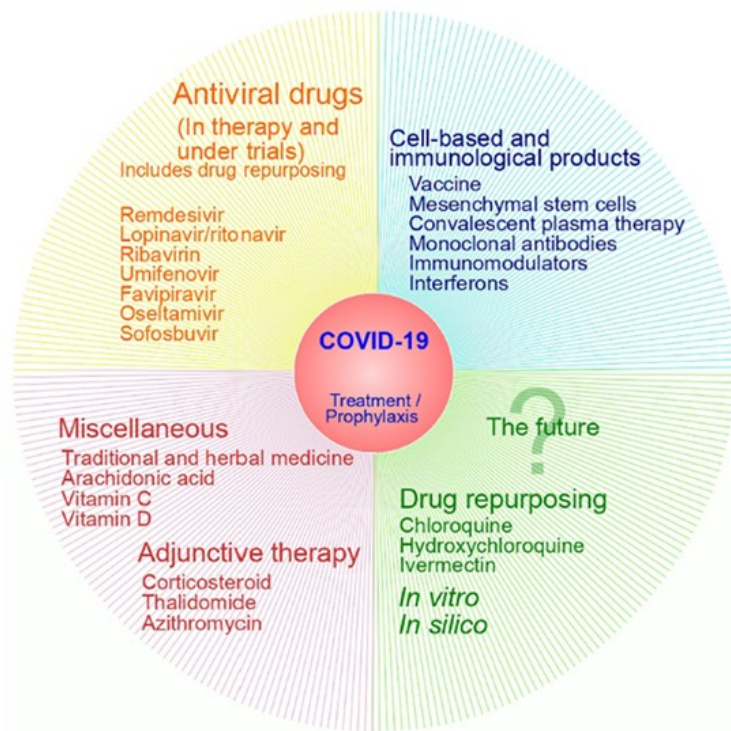
## ***Diagnosi di COVID-19***

La diagnosi standard di infezione da SARS-CoV-2 viene effettuata mediante l'esecuzione di un tampone nasofaringeo analizzato con tecniche molecolari di Real-Time RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) per individuare i geni virali principalmente espressi durante l'infezione, ORF1b (compreso RdRp), N, E o S [50]. Tale procedura viene eseguita solo in laboratori specializzati e richiede un tempo medio di elaborazione del campione di circa 5/6 ore dal momento della sua presa in carico. Inoltre possono essere analizzati anche campioni derivati da tamponi faringei, salivari orofaringei posteriori, espettorato e liquido bronchiale. La carica virale ottenuta mediante questa analisi molecolare può essere influenzata da diversi fattori e risulta essere maggiore nei campioni prelevati dal tratto respiratorio inferiore [9]. Esistono inoltre analisi le cui tempistiche possono durare solo diversi minuti, come l'imaging TC del torace o test sierologici per confermare una diagnosi di COVID-19 [51]. La TC del torace è uno strumento di imaging di routine per la diagnosi di polmonite, relativamente facile e rapida da eseguire che mostra caratteristiche radiografiche tipiche in quasi tutti i casi di COVID-19 [52]. I test sierologici SARS-CoV-2 sono invece test cromatografici di immunodosaggio che determinano il rilevamento qualitativo di anticorpi anti-SARS-CoV-2 IgG e IgM (contro la proteina N o S) nel sangue o nei campioni di siero o plasma. Gli anticorpi solitamente tendono ad aumentare alla fine del corso della malattia; la durata media del rilevamento degli anticorpi IgM SARS-CoV-2 è di 5 giorni, mentre il rilevamento di IgG avviene circa 2 settimane dopo la comparsa dei sintomi [53]. L'analisi sierologica è molto semplice, rapida,

non richiede strumentazione particolare, il campione è di facile raccolta e può fornire risultati in soli 15 minuti. Nonostante ciò, i test sierologici disponibili in commercio differiscono per sensibilità e specificità e questi limiti impongono che ogni campione risultato positivo alle IgG o alle IgM, debba essere obbligatoriamente sottoposto a un tampone di conferma.

### ***Strategie Farmacologiche contro COVID-19***

Lo scenario in cui stiamo vivendo richiede necessariamente l'identificazione di agenti terapeutici efficaci capaci di contrastare questa pandemia. Nella **Figura 8** viene mostrata una classificazione semplificata dei vari approcci terapeutici ad oggi utilizzati.



**Figura 8.** Approcci terapeutici contro COVID-19 [54]

Il riposizionamento di farmaci già in uso è l'approccio più veloce per trovare potenziali candidati per la prevenzione e la terapia di questa nuova pandemia. Allo stesso tempo, un gran numero di ricerche si sta concentrando sul testare agenti antivirali che venivano utilizzati nella terapia di SARS-CoV e MERS-CoV. Quest'ultimo approccio sembra essere il più efficace, forse giustificato dal fatto che tutti e 3 questi coronavirus appartengono alla classe dei betacoronavirus.

### Agenti antivirali

#### *Remdesivir*

Remdesivir è un farmaco antivirale entrato in fase di studio a livello clinico negli Stati Uniti come cura per il COVID-19 [55]. Possiede un ampio spettro d'azione contro diversi virus a RNA a singolo filamento, come ad esempio il virus respiratorio sinciziale umano, SARS-CoV e MERS-CoV. Nello specifico, Remdesivir essendo un analogo nucleotidico dell'adenosina, viene metabolizzato nelle cellule ospiti per formare il metabolita trifosfato nucleosidico farmacologicamente attivo. Remdesivir trifosfato agisce come un analogo dell'adenosina trifosfato (ATP) e compete con il substrato naturale dell'ATP per l'incorporazione nelle catene di RNA nascente da parte della RNA-polimerasi RNA-dipendente del SARS-CoV-2, causando la terminazione del filamento ritardato durante la replicazione dell'RNA virale. Da un'indagine condotta su un modello di scimmia è emersa la sua capacità di ridurre i danni a livello polmonare e inibire la replicazione del virus se somministrato prima o dopo l'infezione [56].

### *Lopinavir and Ritonavir*

Entrambi questi farmaci sono inibitori della proteasi antiretrovirale, in particolare ritonavir è un potente inibitore dell'enzima microsomiale citocromo P-450 3A4. La co-somministrazione di ritonavir e Lopinavir porta all'aumento della biodisponibilità e dell'emivita del lopinavir stesso [57]. Lopinavir/ritonavir vengono somministrato due volte al giorno ad una dose di 400 mg e 100 mg rispettivamente [58]. Diversi studi hanno dimostrato come il trattamento di questi due farmaci associato o alla somministrazione di INFa [59] o a farmaci adiuvanti [60] determinino un'azione benefica nella terapia COVID-19, migliorandone le condizioni.

### *Umifenovir (Arbidol)*

Umifenovir è un agente antivirale che agisce attraverso molteplici vie ed è efficace contro diversi virus a DNA e RNA, con e senza involucro. È in uso per la profilassi e il trattamento dell'influenza da oltre 25 anni in Russia e da 14 anni in Cina [61]. Poiché studi in vitro hanno dimostrato l'efficacia di questo agente contro SARS, viene, oggi, utilizzato come terapia empirica contro COVID-19 in Cina [62]. Questo farmaco viene somministrato per via orale per un massimo di 10 giorni, tre volte al giorno, alla dose di 200 mg [63]. Il 75% dei pazienti che hanno assunto una combinazione di farmaci, come umifenovir orale e lopinavir/ritonavir si è ripreso in 7 giorni rispetto al 35% dei pazienti che hanno ricevuto solo il farmaco lopinavir/ritonavir. Dopo 14 giorni, la clearance virale è stata raggiunta nel 94%

dei pazienti che hanno ricevuto entrambi i farmaci, mentre solo nel 69% del gruppo che ha ricevuto solamente lopinavir/ritonavir [64].

### *Favipiravir*

Favipiravir è un derivato della pirazina carbossammide, analogo dell'acido nucleico purinico, che interferisce con la replicazione del virus e inibisce l'RNA polimerasi RNA-dipendente dei virus a RNA. Possiede un'attività antivirale ad ampio spettro ed è efficace contro il virus dell'influenza, il bunyavirus, l'arenavirus e il filovirus [65]. Un primo risultato ottenuto da uno studio clinico ha rivelato che favipiravir possiede un'attività antivirale più forte rispetto a quella dei farmaci lopinavir e ritonavir, mostrando controindicazioni significativamente inferiori [66]. Grazie alla sua efficacia, il ministero della salute turco ha approvato il favipiravir per il trattamento di pazienti critici con polmonite Covid-19 [67].

### *Oseltamivir*

Oseltamivir è un inibitore della neuraminidasi, enzima necessario per il rilascio del virus dalle cellule. Questo farmaco è stato approvato per la profilassi e per il trattamento dell'influenza [68]. Ding et al hanno condotto uno studio su 115 pazienti con COVID-19, ai quali è stato somministrato oseltamivir contemporaneamente ad antibiotici e all'inalazione di ossigeno. Ciò che è stato

osservato è che questi pazienti sono stati in grado di riprendersi evitando il trasferimento in unità di terapia intensiva [69].

### *Ribavirin*

Ribavirin è un analogo della guanosina e un inibitore nucleosidico capace di arrestare la sintesi dell'RNA virale. È stato ampiamente utilizzato nel trattamento contro SARS, nei casi più gravi, in combinazione o meno di steroidi. Lo screening virtuale di alcuni farmaci approvati dalla FDA contro la proteasi principale SARSCoV-2 hanno dimostrato che ribavirin, galidesivir, sofosbuvir, remdesivir e tenofovir sono agenti molto efficaci nel trattamento di COVID-19 in quanto sono in grado di legarsi strettamente all'RNA polimerasi RNA-dipendente del virus [70].

### *Prodotti cellulari e immunologici*

#### *Anticorpi monoclonali*

Nell'infezione da COVID-19, si verifica l'attivazione di un numero elevato di macrofagi mononucleari e linfociti T che comportano la produzione di citochine, come IL-6. L'IL-6 si lega al recettore presente sulle cellule bersaglio, sia a livello polmonare, che in altri organi [71]. Il tocilizumab è un anticorpo monoclonale umanizzato che agisce bloccando il recettore dell'IL-6, così da diminuire la risposta infiammatoria e impedendole a IL-6 di danneggiare le cellule bersaglio [72]. CR3022, Sarilumab, gimsilumab e lenzilumab sono altri anticorpi

monoclonali che agiscono principalmente sulla glicoproteina S. Questi, legandosi ai recettori, sono in grado di determinare alterazioni conformazionali irreversibili nelle proteine S stesse, impedendo così il legame del virus alla cellula ospite e la successiva fusione con la membrana. [73].

### *Interferoni*

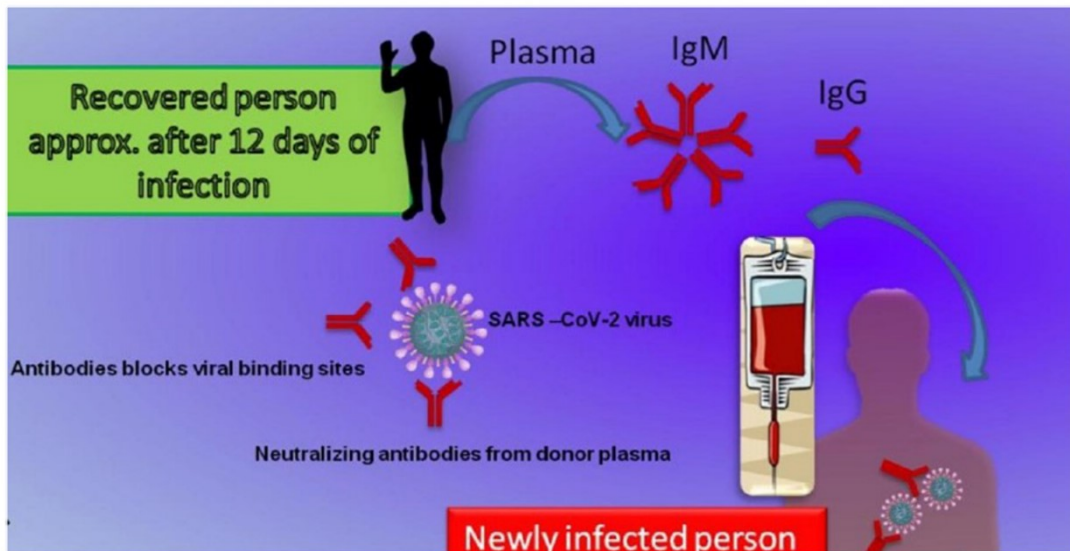
Gli interferoni sono proteine di segnalazione con attività antivirale che vengono rilasciati dalle cellule ospiti una volta infettate. Gli interferoni di tipo I possiedono un'ampia gamma di effetti antivirali *in vitro* e un recente studio ha dimostrato la loro efficacia nel trattamento di MERS-CoV. Gli interferoni di tipo 1 sottotipo  $\beta$  sono risultati quelli più promettenti come trattamento contro COVID-19, soprattutto se somministrati nelle prime fasi dell'infezione [74].

### *Cellule staminali mesenchimali*

La cellula staminale mesenchimale del cordone ombelicale umano (MSC) possiede straordinarie funzioni immunomodulatorie e antinfiammatorie. La terapia con MSC è stata dimostrata essere, grazie a diversi studi clinici [75], sicura ed efficace soprattutto per i pazienti che presentano casi critici di polmonite associati a COVID-19. Anche se i risultati ottenuti sono stati promettenti, sono necessarie indagini cliniche più approfondite e adeguate.

### *Terapia con plasma convalescente*

La terapia con plasma convalescente (CPT) è considerata una delle opzioni più all'avanguardia per il trattamento di COVID-19 [76]. Il plasma convalescente o immunitario è costituito dal plasma raccolto da pazienti che hanno sviluppato una quantità sufficiente di anticorpi per eliminare l'infezione (**Figura 9**). Lo scopo principale della CPT è quella di aiutare gli individui suscettibili a sviluppare un'immunità contro SARS-CoV-2 immediata, anche se per un breve periodo di tempo. L'immunità passiva ottenuta grazie a questa terapia può fornire anticorpi neutralizzanti che sono fondamentali per l'eliminazione del virus e il superamento dell'infezione. Oltre all'azione antivirale, la CPT è in grado di modulare il sistema immunitario contrastando l'infiammazione causata dal virus. L'efficacia di questa terapia è altamente correlata alla concentrazione di anticorpi neutralizzanti presenti nel plasma raccolto [77].



**Figura 9.** Rappresentazione schematica della terapia con plasma convalescente con i suoi meccanismi d'azione.



Nonostante i vantaggi della CPT, esistono numerosi effetti collaterali associati a questa terapia come reazioni anafilattiche, infezioni trasmesse da trasfusioni, danno polmonare acuto associato a trasfusioni, sovraccarico circolatorio ed emolisi. Cinque pazienti gravemente malati con COVID-19 hanno mostrato risultati promettenti quando hanno ricevuto una trasfusione di plasma convalescente. Dopo la trasfusione, la temperatura corporea e la carica virale sono diminuite e sono diventate negative entro 12 giorni [78]. Nell'aprile 2020, a fronte di un buon numero di studi clinici che ne hanno valutato la sicurezza e l'efficacia di questa terapia in pazienti affetti da COVID-19, la FDA statunitense ha autorizzato la CPT in pazienti gravemente malati con COVID-19.

### *Vaccini*

La Coalition for Epidemic Preparedness and Innovations (CEPI), organizzazione internazionale che ha lo scopo di promuovere lo sviluppo e lo stoccaggio di vaccini contro microorganismi in grado di causare nuove epidemie, sta coordinando i numerosi progetti per la preparazione di vaccini contro il virus SARS-CoV-2. A causa della recente scoperta del virus e della difficoltà di prevedere il tipo di risposta immunitaria prodotta, le strategie adottate per lo sviluppo del giusto tipo di vaccino risultano molto diversificate fra loro. In particolare, sono tre le tipologie di vaccini a cui si sta lavorando:

Vaccino a RNA: si tratta di una sequenza di RNA sintetizzata in laboratorio che, una volta iniettata nell'organismo umano, induce le cellule a produrre una

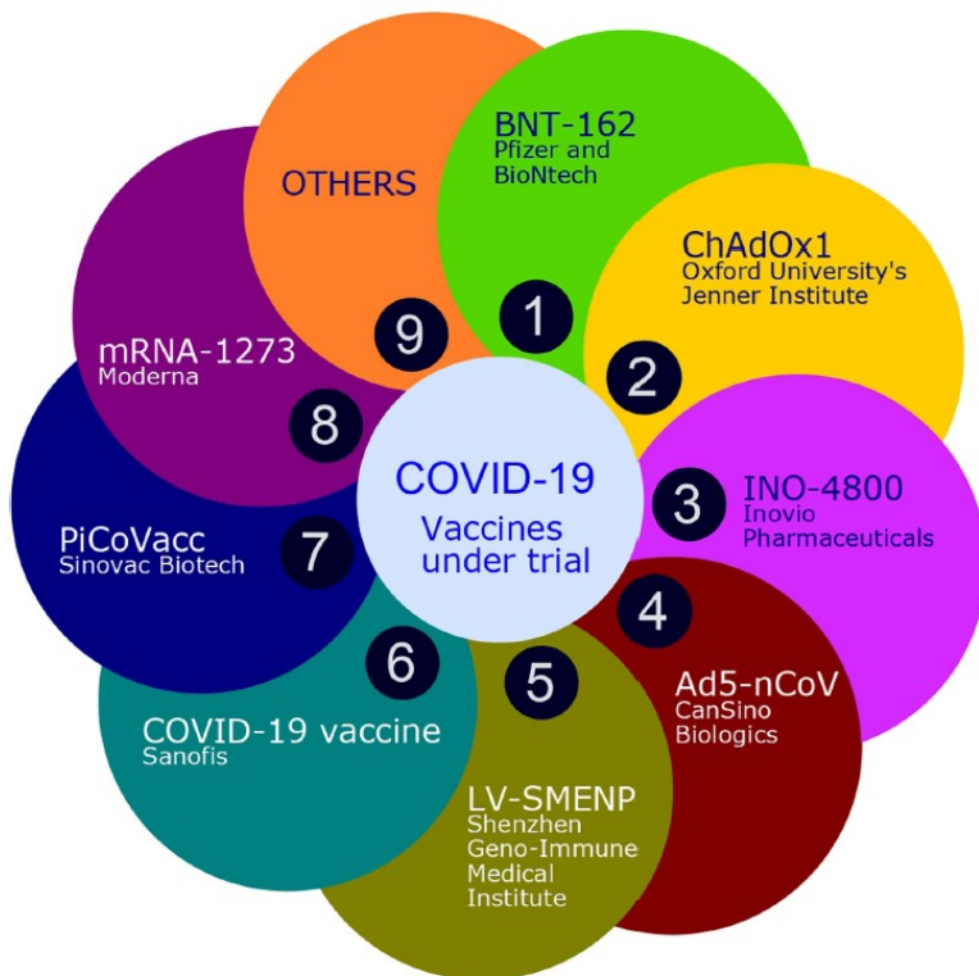
proteina simile a quella verso cui si vuole indurre la risposta immunitaria (producendo anticorpi che, conseguentemente, saranno attivi contro il virus).

Vaccino a DNA: il meccanismo è simile al vaccino a RNA, solo che in questo caso viene introdotto un frammento di DNA sintetizzato in laboratorio.

Vaccino proteico: utilizzando la sequenza di RNA del virus vengono sintetizzate proteine o frammenti di proteine del capsido virale. Una volta iniettate nell'organismo, in combinazione con altre sostanze, queste proteine inducono la risposta immunitaria con conseguente produzione di anticorpi.

Nonostante la forte pressione esercitata dalla pandemia di COVID-19, il futuro utilizzo di un vaccino deve essere necessariamente preceduto da studi rigorosi che richiedono il tempo necessario per valutarne l'efficacia e la sicurezza. Inizialmente la ricerca ha inizio con la valutazione in vitro delle componenti dell'agente che andrà a costituire la componente attiva del vaccino. Una volta definito questo aspetto ha inizio la fase preclinica in cui viene testata la risposta immunitaria e/o i meccanismi avversi su organismi viventi complessi non umani. Superata questa fase ha inizio la vera e propria sperimentazione clinica sull'uomo, che normalmente inizia dopo circa 2-5 anni dalle iniziali ricerche sulla risposta immunitaria, cui seguono altri 2 anni di prove pre-cliniche che coinvolgono la sperimentazione animale. La sperimentazione clinica si realizza in 3 fasi, in base al modello sperimentale adottato, la quantità di componente somministrata e la numerosità del campione di popolazione coinvolta. Se tutte le fasi danno esito positivo, il vaccino viene registrato e si procede alla

produzione e distribuzione su larga scala. Ad oggi, i vaccini in fase di sperimentazione e/o elaborazione sono: **ChAdOx1 nCoV-19**, sviluppato dall'Università di Oxford, in collaborazione con AstraZeneca e Irbm, **BNT162b2**, sviluppato da Pfizer e BioNTech, **Gam-COVID-Vac**, sviluppato in Russia dal Centro nazionale di ricerca epidemiologica e microbiologica Gamaleja, e **mRNA-1273**, sviluppato da Moderna (**Figura 10**).



**Figura 10.** Sperimentazioni in corso sui vaccini specifici per COVID-19. [54]

## Approccio di riconversione dei farmaci

### *Clorochina o idrossiclorochina*

La clorochina è un farmaco utilizzato normalmente per la profilassi della malaria e dell'amebiasi e per il trattamento di malattie autoimmuni come l'artrite reumatoide e il lupus eritematoso. Sono stati proposti diversi meccanismi per l'azione della clorochina contro COVID-19 [79]: potrebbe alterare il legame del virus al recettore della superficie cellulare, rallentandone l'ingresso nella cellula ospite [80], compromettere l'ingresso endosoma dipendente dei virus [81], oppure danneggiare la maturazione delle proteine virali [82]. Inoltre è in grado di agire come agente immunomodulatore mediante la regolazione delle citochine pro-infiammatorie. L'idrossiclorochina è efficace tanto quanto la clorochina per quanto riguarda l'inibizione in vitro dell'infezione da SARS-CoV-2 con una tossicità comparativamente inferiore [83]. Clorochina e idrossiclorochina sono attualmente i farmaci maggiormente utilizzati negli studi clinici al livello internazionale, 272 al 12 giugno, di cui sei in Italia: quattro riguardano l'uso come profilassi dell'infezione o trattamento precoce, due come terapia nei pazienti con polmonite o sintomi già evidenti.

### *Metronidazolo*

Il metronidazolo è un inibitore della sintesi degli acidi nucleici e un potenziale candidato in grado di contrastare la maggior parte dei sintomi immunopatologici dell'infezione da SARS-CoV-2. Studi in vitro e in vivo hanno dimostrato che questo

farmaco potrebbe ridurre i livelli di citochine, generalmente aumentati durante la malattia da COVID-19. Inoltre, può ridurre i ROS generati dai neutrofilii in caso di infiammazione. È comunque necessario condurre ulteriori studi su un maggior numero di pazienti per poterne affermare l'efficacia [84].

# **OBBIETTIVI**

L'analisi degli isolati virali di SARS-CoV-2 ha evidenziato la presenza di "quasispecie" che mostrano nuove mutazioni genetiche nonostante le date di campionamento relativamente precoci degli isolati virali [85, 86], indicando così che la vera diversità dei ceppi virali è largamente sottovalutata [85]. L'ampia varietà di sintomi clinici che caratterizzano i pazienti COVID-19 rende estremamente difficile stabilire un legame genotipo-fenotipo. Questa conoscenza è fondamentale per comprendere i meccanismi infettivi utilizzati da SARSCoV-2 e indicare la strategia per lo sviluppo di farmaci e vaccini. Pertanto, lo studio dell'impatto mutazionale degli isolati virali in vitro diventa fondamentale a questo scopo. Nella prima parte di questo lavoro di tesi, abbiamo dimostrato l'esistenza di una variante SARS-CoV-2, isolata durante la fase tardiva dell'epidemia italiana da un operatore sanitario asintomatico, capace di replicare in maniera persistente nelle cellule Vero E6 in assenza di effetto citopatico. La variante denominata SARS-CoV-2 GZ69 mostra diverse mutazioni puntiformi che possono spiegare le sue caratteristiche uniche e i processi di adattamento del SARS-CoV-2 all'ospite umano.

Dal momento che l'infezione da SARS-CoV-2 potrebbe essere limitata attraverso l'utilizzo di farmaci in grado di bloccare la riproduzione delle particelle virali, sono in corso diversi studi per il riposizionamento di farmaci come nuova strategia di sviluppo farmacologico e promettente filone di ricerca per interferire con le funzioni virali essenziali di SARS-CoV-2. Pertanto, allo scopo di trovare un farmaco in grado di inibire la replicazione virale di SARS-CoV-2, è stato fondamentale, non solo studiare gli eventi di ingresso e riproduzione virale negli pneumociti polmonari di tipo II, ma l'interazione con le vie cellulari dell'ospite

umano, tra cui quella che fornisce i nucleotidi richiesti per la sintesi dell'RNA virale. Il Metotrexato (MTX), un farmaco approvato dalla FDA [87] usato per trattare diversi tipi di cancro e, a dosi inferiori, alcune malattie autoimmuni, è in grado di inibire la sintesi delle purine (un componente dei nucleotidi) inibendo in modo competitivo e reversibile la diidrofolato reduttasi (DHFR). Sulla base di questi presupposti, lo scopo della seconda parte di questo lavoro di tesi è stato quello di effettuare un primo ciclo di esperimenti "in vitro", che mostrano chiaramente come il MTX sia in grado di bloccare, con alta efficienza, la replicazione di SARS-CoV-2 nella fase post-ingresso del virus.



## **MATERIALI E METODI**

## **Rilevamento di SARS-CoV-2**

I campioni nasofaringei sono stati raccolti, utilizzando come tamponi i FLOQSwabs contenente terreno di trasporto universale (UTM) (COPAN, Brescia, Italia), dalla fine di febbraio alla fine di maggio 2020 presso gli Spedali civili di Brescia (Brescia, Lombardia, Italia). L'RNA virale è stato estratto da 300µl di UTM attraverso il sistema automatico Nimbus (Arrow Diagnostics, Genova, Italia). L'amplificazione è stata eseguita utilizzando l'uso dei reagenti Allplex 2019-nCoV Assay (Seegene Inc. Seoul, Corea), mediante il macchinario PCR BioRad CFX (BioRad Laboratories Srl, Milano, Italia), in grado di rilevare le regioni conservate dei geni ORF1ab, E e N del genoma di SARS-CoV-2. I valori soglia del ciclo (Ct) sono stati calcolati automaticamente utilizzando il software di analisi 2019-CoV Viewer (Seegene).

## **Coltura Cellulare**

In questo studio sono state utilizzate le cellule Vero E6, una linea cellulare ottenuta dal rene di cercopiteco gialloverde africano, resa disponibile dall'American Type Culture Collection (ATCC) e dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale (Brescia, Italia). Le VERO E6 sono state coltivate utilizzando il terreno Dulbecco's Modified Eagle (DMEM; Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), integrato con un 10% di siero fetale bovino (FBS; Gibco, ThermoFisher Scientific), e mantenute a 37° C al 5% di CO<sub>2</sub> in ambiente umido.

## **Isolamento del virus e infezione**

Il ceppo di SARS-CoV-2 utilizzato negli esperimenti è stato isolato con successo da un tampone nasofaringeo di un paziente COVID-19, utilizzando cellule Vero E6. L'identità del ceppo è stata verificata tramite real-time polymerase chain reaction (PCR) e tramite sequenziamento metagenomico, dal quale sono state ottenute le reads che mappano sulla sequenza di nCoV-2019 (i dati genomici sono disponibili presso EBI al numero di accesso PRJEB38101). L'isolato clinico è stato successivamente amplificato in cellule Vero E6 e titolato mediante il saggio delle placche. I tamponi nasofaringei positivi alla PCR, prima di essere aggiunti alle cellule, sono stati diluiti 1:2 con DMEM contenente l'1% di penicillina-streptomina (Merck, Darmstadt, Germania) e l'1% di amfotericina B (Merck). Dopo 1h di incubazione a 37° C, l'inoculo è stato rimosso e prima dell'aggiunta del terreno di coltura fresco contenente antimicrobici e FBS al 2%, le cellule sono state lavate due volte con tampone salino fosfato caldo (PBS, Gibco, Thermo Fisher Scientific); dopodichè, le cellule sono state incubate a 37 ° C e osservate giornalmente mediante microscopia ottica per valutare l'insorgenza di un eventuale effetto citopatico (CPE). L'infezione è stata valutata mediante RT-PCR quantitativa (qRT-PCR) mentre gli esperimenti sono stati condotti utilizzando un coefficiente di molteplicità di infezione (MOI) pari a 0,05 e 1,0. Tutte le procedure sono state eseguite in un laboratorio con livello di biosicurezza 3 (BSL-3).

## **Efficacia del Metotrexato**

Le cellule Vero E6 sono state seminate in una piastra da 24 pozzetti ad una densità di  $5 \times 10^4$  cellule/pozzetto e trattate con diverse dosi di Metotrexato (MTX) (Sigma - Aldrich). L'efficacia di MTX è stata valutata tramite CellTiter-Glo (Promega) che misura i livelli di ATP e tramite conta diretta delle cellule vitali dopo colorazione con trypan blu.

## **Valutazione dell'attività antivirale di Metotrexato**

Le cellule Vero E6 sono state infettate per un'ora con il ceppo di SARS-CoV-2 isolato con successo a una MOI di 0,05, utilizzando il terreno di coltura DMEM privo di FBS. Dopo 1h di infezione, l'inoculo virale è stato rimosso, il monostrato cellulare è stato lavato con PBS caldo e sono stati aggiunti, per ogni condizione, 4ml di terreno con 2% di FBS contenente o meno MTX a diverse concentrazioni (25, 2,5 o 0,25  $\mu$ M). Quarantotto ore dopo l'infezione, le cellule e i surnatanti, sono stati raccolti per poter eseguire analisi relative alla quantificazione del genoma virale.

## **Estrazione dell'RNA virale e quantificazione tramite real-time reverse-transcription PCR (qRT-PCR)**

L'RNA è stato estratto dai surnatanti cellulari chiarificati (16.000 g  $\times$  10 min) e dalle cellule trattate utilizzando rispettivamente i kit QIAamp Viral RNA mini e RNeasy Plus Mini (Qiagen, Hilden, Germania). L'RNA è stato eluito in 30  $\mu$ l di H<sub>2</sub>O RNasi free e conservato a  $-80$  °C fino al suo utilizzo. La qRT-PCR è stata eseguita

seguendo le procedure descritte in precedenza, apportando piccole modifiche [88]. La trascrizione inversa e l'amplificazione del gene S sono state eseguite utilizzando come mix la one-step Quanti-Fast Sybr Green RT-PCR (Qiagen) come segue: 50°C per 10 min, 95°C per 5 min; 95°C per 10s, 60°C per 30s (40 cicli) (primer: RBD-qF1: 5' - CAATGGTTTAAACAGGCACAGG - 3' e RBD-qR1: 5' - CTCAAGTGTCTGTGGATCACG - 3'). La curva standard è stata ottenuta clonando il dominio di legame del recettore del gene S (primer: RBDF: 5'-GCT GGA TCC CCT AAT ATT ACA AAC TTG TGCC-3'; RBD-R: 5'-TGC CTC GAG CTC AAG TGT CTG TGG ATCAC-3') nel vettore pGEM T-easy (Promega, Madison, WI, USA). La curva standard è stata generata tramite la determinazione del numero di copie di RNA derivato da diluizioni seriali ( $10^3$ - $10^9$  copie).

## **Western blot**

I campioni costituiti dalle proteine (30 µg) ottenute dalla lisi con RIPA buffer (Cell Signaling Technology, Danvers) delle cellule Vero E6 infette e non infette, sono state separate mediante elettroforesi su gel di sodio dodecil solfato-poliacrilammide al 10% e successivamente trasferite su membrane di polivinilidene difluoruro (Millipore, Sigma). Le membrane, dopo essere state bloccate con una soluzione salina di tris contenente un 3% di albumina di siero bovino e lo 0,05% di Tween20, sono state incubate sia con un siero umano (diluizione 1:1000) contenente IgG in grado di riconoscere la nucleoproteina di SARS-CoV-2 (NP), che con un anticorpo monoclonale di ratto anti-GAPDH umano (G-9; Santa Cruz Biotechnology). I complessi antigene-anticorpo sono stati poi

rilevati utilizzando anticorpi coniugati a perossidasi mediante il sistema di chemiluminescenza potenziata (ECL) (Santa Cruz Biotechnology).

## **Immunofluorescenza**

Le cellule Vero E6 infette sono state seminate su chamber slides a 8 pozzetti (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) ad una densità di  $5 \times 10^4$  cellule/pozzetto. Ventiquattro ore dopo la semina, le cellule sono state fissate utilizzando una soluzione di PBS contenente paraformaldeide al 2% per 10 minuti, permeabilizzate in PBS con Triton X100 allo 0,1% e saturate in PBS con BSA al 3% e Tween20 allo 0,1%. Per la colorazione, le cellule sono state incubate over-night con un siero umano contenente IgG di SARS-CoV-2 (diluizione 1: 200) e successivamente con IgG anti-human coniugato con Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific). I nuclei sono stati controcolorati con 4',6-diamidin-2-fenilindolo (DAPI, Merck). Le cellule sono state analizzate utilizzando un microscopio a fluorescenza a scansione laser TCS SP5 Leica (Wetzlar, Germania) e acquisite mediante il software di imaging Leica Application Suite.

## **Metagenomica**

L'RNA totale è stato estratto da surnatanti di colture cellulari chiarificati (16.000 g x 10 min), utilizzando il kit RNeasy Mini (Qiagen). L'RNA è stato eluito in 30  $\mu$ l e conservato a  $-80^\circ \text{C}$  fino all'uso. Il cDNA, amplificato in modo casuale, è stato ottenuto utilizzando la tecnica Round A/B SISPA (Sequence-independent Single-

Primer Amplification) come descritto [89], con lievi modifiche. Nel Round A, l'RNA è stato retrotrascritto con SuperScript III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific), utilizzando 40 pmol di Sol-PrimerA (5'-GTT TCC CAC TGG AGG ATA -N9-3 '). La sintesi del DNA del secondo filamento è stata ottenuta utilizzando DNA polimerasi Sequenase (Thermo Fisher Scientific), incubando il cDNA del primo filamento a 37° C per 8 min in 5 µl di Mix Sequenase n.1 (1 µl 5 × Sequenase Buffer, 3,85 µl H<sub>2</sub>O, 0,15 µl Enzima sequenasi). Per favorire la sintesi completa del secondo filamento, alla miscela precedente sono stati aggiunti 0,6 µl di Sequenase Mix #2 (0,45 µl di tampone di diluizione Sequenase, 0,15 µl di enzima Sequenase) ed è stata eseguita un'ulteriore incubazione a 37° C per 8 minuti. Nella reazione del round B, 5 µl di cDNA, marcato con Round A, sono stati sottoposti ad amplificazione utilizzando AmpliTaq ® Gold (Thermo Fisher Scientific) e 100 pmol Sol-PrimerB (5'-GTT TCC CAC TGG AGG ATA -3 ') in un volume finale di 50 µl. Le condizioni della PCR sono state le seguenti: 95 ° C per 10 min; 94 ° C per 30 s, 50 ° C per 45 e 72 ° C per 60 s (40 cicli), 72 ° C per 7 min. Per massimizzare il recupero di frammenti (>200 bp), i prodotti della PCR sono stati purificati utilizzando sfere AMPure XP in rapporto 1,8 (Agencourt, Beckman Coulter Inc., USA). I prodotti purificati sono stati quantificati utilizzando il kit Qubit DNA HS (Thermo Fisher Scientific) e le librerie genomiche preparate utilizzando il kit Nextera DNA Flex (Illumina, San Diego, CA). Il sequenziamento è stato eseguito utilizzando una piattaforma Illumina MiniSeq in grado di generare letture paired-end 2x150 bp. L'analisi della qualità dei dati grezzi è stata effettuata utilizzando FastQC (<https://www.Bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) mentre la corrispondenza dei

genomi batterici, archeali e virali utilizzando Kraken2 con MiniKraken2 Database [90]. Successivamente i dati sono stati rifiniti con Trimmomatic ver. 0,38 a seconda della loro qualità (punteggio Q> 25) e lunghezza (> 36 bp) mediante la rimozione delle sequenze degli adattatori, la rimozione delle basi delle reads iniziali e finali con una qualità di codifica bassa, inferiore a PHRED <25%, la rimozione delle basi delle reads che presentano una bassa qualità di codifica PHRED <25% analizzando 20 basi per volta e la rimozione di reads con lunghezza <36 basi [91]. Le letture paired-end trimmate sono state analizzate con il software Geneious (versione 11.1.5) (Biomatters Ltd, Nuova Zelanda). La sequenza consenso è stata ricostruita e mappata sulla sequenza di riferimento SARSCoV-2 NC\_045512.2 utilizzando Bowtie2 in modalità locale sensibile con soglia di consenso al 65% [92]. La chiamata delle varianti è stata eseguita dal Variant Finder Tool (Geneious) filtrando le varianti con un  $p > 0$ , utilizzando una frequenza di variante minima di 0 e parametri predefiniti per il valore p della variante massima ( $10^{-6}$ ). La copertura di sequenziamento minima per ciascuna posizione di variante era di 10 reads. Le frequenze delle varianti sono state valutate come somma delle frequenze delle varianti in quella posizione. Ogni campione è stato elaborato e analizzato in due esperimenti indipendenti.

## **Analisi filogenetica**

Le sequenze genomiche pubbliche complete di SARS-CoV-2 (> 29 Kb) sono state recuperate dal GISAID. Escludendo i genomi di bassa qualità e le sequenze quasi identiche (somiglianza genetica > 99,99%), è stato ottenuto un set globale di dati



di 3.171 genomi pubblici più i 2 nuovi genomi riportati in questo studio. Le sequenze sono state allineate mediante MAFFT (algoritmo FF-NS-2) utilizzando parametri predefiniti [93]. L'allineamento è stato effettuato accuratamente in modo manuale per poter rimuovere artefatti alle estremità e all'interno dell'allineamento utilizzando Aliview [94]. L'analisi filogenetica è stata eseguita utilizzando IQ-TREE (versione 1.6.10) utilizzando il modello più adatto secondo il Bayesian Information Criterion (BIC) indicato dall'applicazione Model Finder implementata in IQ-TREE [95]. La solidità statistica dei singoli nodi è stata determinata utilizzando 1000 repliche di bootstrap mentre la valutazione dei lignaggi è stata condotta utilizzando il Phylogenetic Assignment of Named Global Outbreak LINEages disponibile su <https://github.com/hCoV-2019/pangolin>.

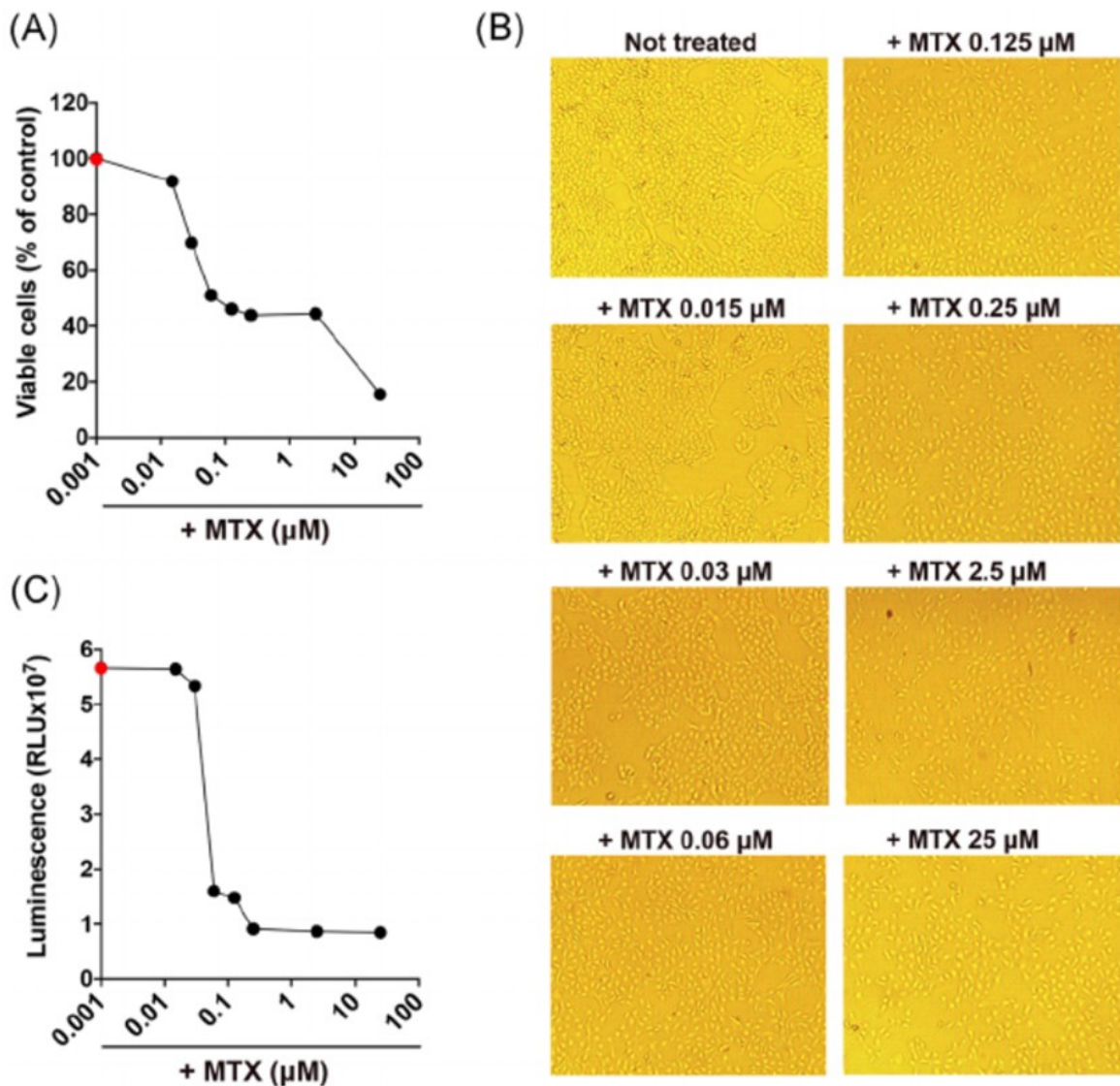
## **Analisi Statistica**

Le mediane dei Ct per i geni target E, RdRP e N sono state calcolate all'inizio e alla fine del periodo epidemico. La significatività statistica dei dati è stata effettuata mediante l'analisi della varianza one-way Anova, mentre per il confronto dei dati è stato utilizzato il test di Bonferroni. Le differenze sono state considerate significative con  $p < 0,05$ . Le statistiche e i grafici sono stati eseguiti utilizzando il software Prism 8 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

# **RISULTATI**

## ***Effetti del Metotrexato sulla crescita e sul metabolismo delle cellule Vero E6***

Inizialmente abbiamo analizzato l'effetto di varie concentrazioni (0,015  $\mu\text{M}$ ; 0,03  $\mu\text{M}$ ; 0,06  $\mu\text{M}$ ; 0,125  $\mu\text{M}$ ; 0,25  $\mu\text{M}$ ; 2,5  $\mu\text{M}$ ; 25  $\mu\text{M}$ ) di Metotrexato (MTX) sulla proliferazione delle cellule Vero E6, un modello consolidato per l'isolamento e la replicazione di SARS-CoV-2. Dopo 48h, la dose 0,015  $\mu\text{M}$  di MTX risultava avere un effetto trascurabile sull'entità della crescita, analizzando il numero di cellule vitali rilevato dal test di esclusione del colorante Trypan Blue. A questa concentrazione molto bassa, l'inibizione del MTX può essere compensata dal substrato intracellulare di DHFR. Le concentrazioni di MTX che vanno da 0,06  $\mu\text{M}$  a 2,5  $\mu\text{M}$  iniziavano ad avere un potente effetto inibitorio (circa il 45%) che diventava sostanzialmente più forte (85%) alla dose di 25  $\mu\text{M}$  (**Figura 11A**). Le cellule trattate con MTX, comunque, anche se inibite, mostravano un normale fenotipo aderente alla superficie a qualsiasi dose (**Figura 11B**). Il MTX inibiva fortemente l'accumulo di ATP cellulare (analizzato con CellTiter-Glo). Per un ampio spettro di concentrazioni di MTX, l'inibizione dei livelli di ATP rimaneva ragionevolmente costante, variando da un'inibizione del 73% alla dose di 0,06  $\mu\text{M}$  ad una dell'82% per la dose di 25  $\mu\text{M}$  (**Figura 11C**). Questi dati indicano che a concentrazioni comprese tra 0,06 e 25  $\mu\text{M}$ , la capacità proliferative delle cellule Vero E6, trattate con MTX è correlate alla down-modulazione della loro attività metabolica, con effetti trascurabili sulla morfologia cellulare e sulla citotossicità.

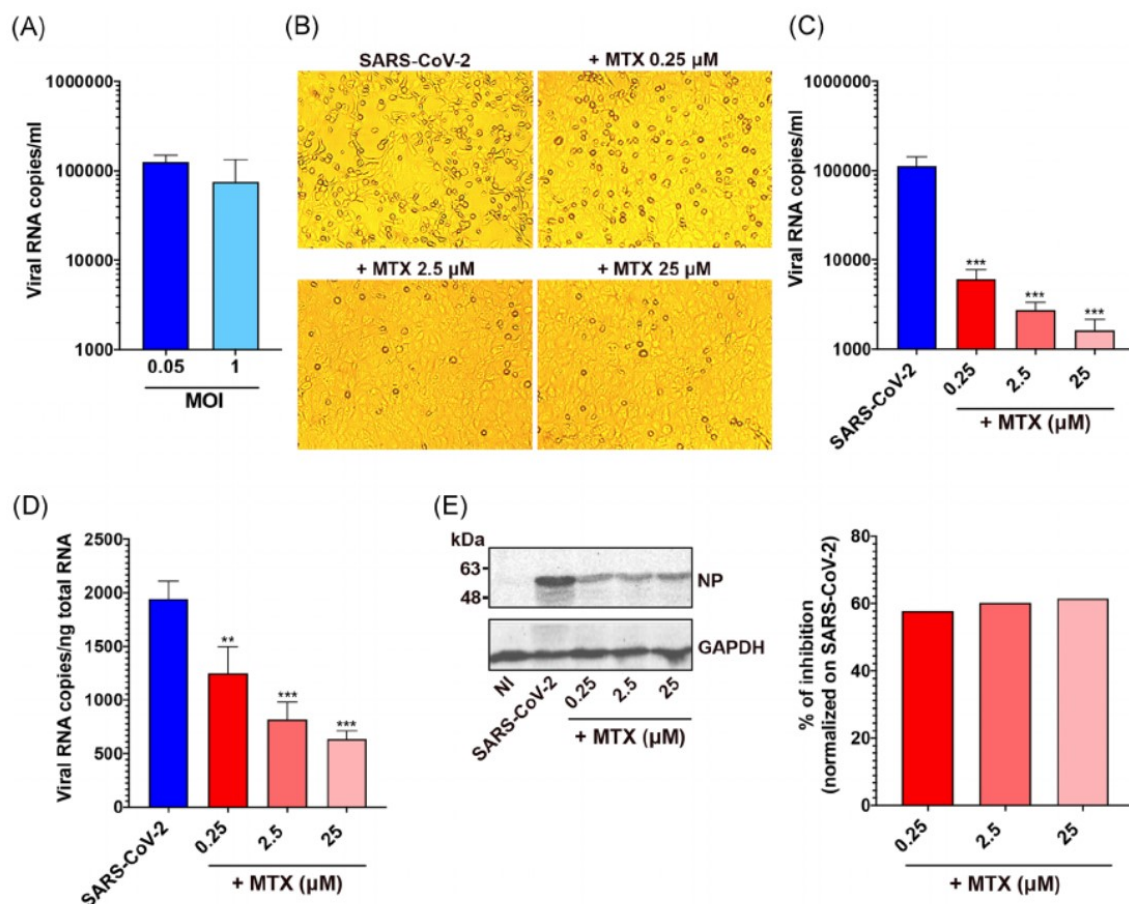


**Figura 11.** Valutazione dell'efficacia antimetabolica e antiproliferativa di MTX. (A) Inibizione della crescita cellulare dopo 48h di coltura in presenza di MTX a diverse concentrazioni (0,015  $\mu\text{M}$ ; 0,03  $\mu\text{M}$ ; 0,06  $\mu\text{M}$ ; 0,125  $\mu\text{M}$ ; 0,25  $\mu\text{M}$ ; 2,5  $\mu\text{M}$ ; 25  $\mu\text{M}$ ). (B) Immagini 10x in campo chiaro di cellule Vero E6 dopo incubazione per 48h a 37°C con le concentrazioni di MTX precedentemente indicate con un'iniziale densità cellulare di  $5 \times 10^4$  per pozzetto. (C) Misurazione dei livelli di ATP mediante CellTite-Glo come lettura luminescente della vitalità cellulare. I punti rossi in (A) e (C) si riferiscono a cellule non trattate con MTX.

## ***Il trattamento con il Metotrexato inibisce fortemente la replicazione di SARS-CoV-2***

Abbiamo infettato le cellule Vero E6 ad una MOI bassa (MOI = 0,05) e ad una MOI alta (MOI = 1). La quantificazione dell'RNA virale rilasciato nel surnatante dopo 48h ci indica che la produzione virale è molto simile a entrambe le MOI (**Figura 12A**). Pertanto, nei successivi esperimenti abbiamo utilizzato solamente la MOI più bassa (0,05). Successivamente abbiamo valutato se il MTX potesse influenzare in qualche modo la replicazione di SARS-CoV-2. Le cellule Vero E6 sono state infettate con un ceppo primario di SARS-CoV-2 isolato a Brescia, Italia e un'ora dopo sono state coltivate in assenza o in presenza di MTX a 3 diverse concentrazioni (0,25  $\mu$ M; 2,5  $\mu$ M e 25  $\mu$ M). MTX inibiva in maniera efficace la replicazione virale (**Figura 12B-E**). Tutte le dosi di MTX abolivano gli effetti citopatici e citolitici di SARS-CoV-2 sulle cellule Vero E6 con effetti citopatici minimi rilevabili solo alla dose più bassa (**Figura 12B**). La quantificazione del numero di copie dell'RNA virale presente nei surnatanti delle colture cellulari confermava il potente effetto inibitorio di MTX sulla produzione di particelle virali, con una riduzione di quasi 70 volte alla dose di 25  $\mu$ M e di circa 20 volte alla dose di 0,25  $\mu$ M, rispetto alle cellule infette non trattate (**Figura 12C**). La quantificazione tramite qRT-PCR dell'RNA di SARS-CoV-2 presente all'interno delle cellule infettate mostrava un'inibizione dose-dipendente che varia dal 40% al 70% alle dosi di MTX testate (da 0,25  $\mu$ M a 25  $\mu$ M) rispetto alle cellule infette non trattate (**Figura 12D**). Analisi di Western Blot con antisieri di pazienti che riconoscono la Nucleoproteina (NP) virale confermavano l'efficacia di MTX sulla

replicazione del virus. MTX induceva un'inibizione significativa (circa il 60%) dell'accumulo di NP (**Figura 12E**). Poiché ci sono molte copie di NP per ciascuna molecola di RNA nel virione, la costante banda immunoreattiva rilevata, osservata a tutte le concentrazioni, può riflettere principalmente la proteina virale presente all'inizio del trattamento, mascherando la robusta inibizione dose-dipendente osservata nei precedenti esperimenti.

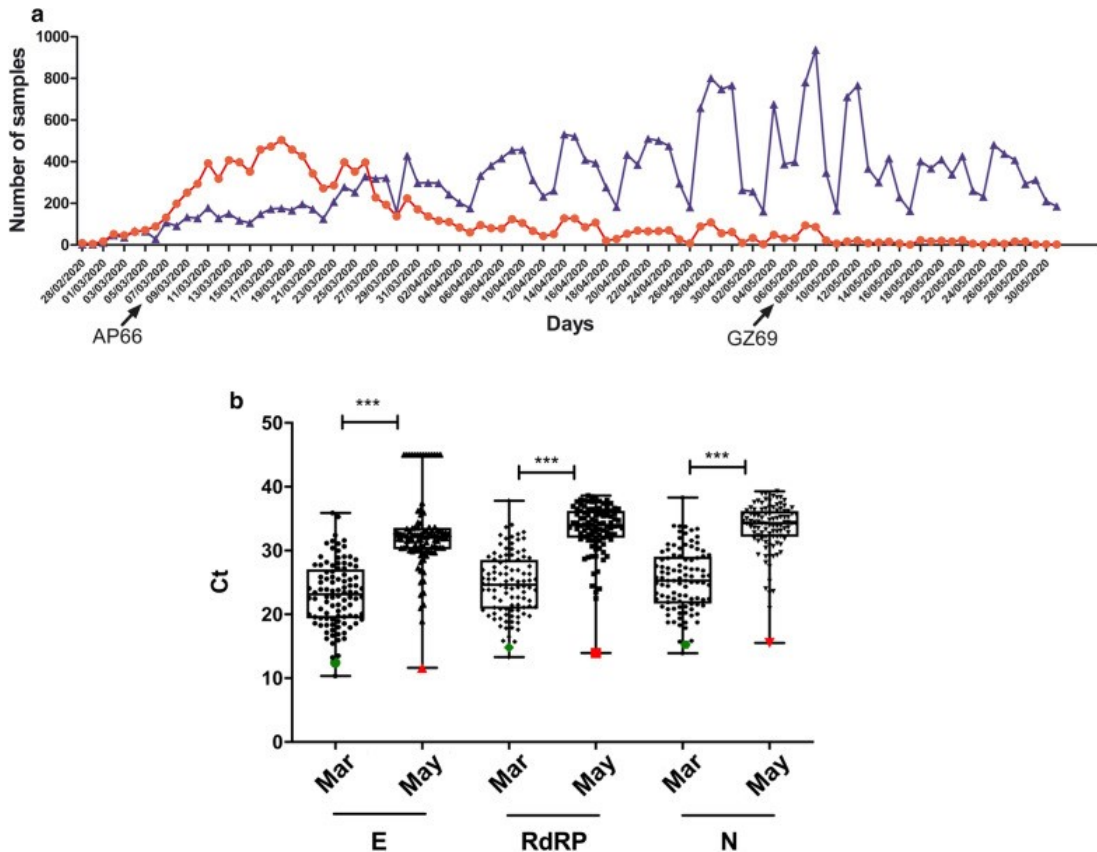


**Figura 12.** Attività antivirale di MTX. (A) Le cellule Vero E6 sono state infettate con SARS-CoV-2 a una MOI di 0,05 o 1,0 per 1 ora a 37 ° C e poi lavate e messe in coltura per 48 ore. La resa virale è stata quantificata nel surnatante cellulare tramite qRT-PCR. Le cellule Vero E6 sono state successivamente infettate con SARS-CoV-2 a una MOI di 0,05 in assenza o in presenza di diverse dosi di MTX. (B) Le cellule sono state sottoposte a imaging con un microscopio ottico per rilevare i tipici effetti citolitici indotti da SARS-CoV-2. La resa virale è stata quantificata sia nel surnatante cellulare(C) che a livello intracellulare (D) mediante qRT-PCR. (E) L'espressione della nucleoproteina (NP) nelle cellule infette è stata analizzata mediante Western blot (pannello di sinistra). Le barre rappresentano la percentuale media di inibizione dell'espressione di NP nelle cellule trattate con MTX a diverse concentrazioni.

## ***Epidemia di COVID-19 a Brescia***

Abbiamo analizzato tamponi rinofaringei provenienti dalla provincia di Brescia a partire dal 28 febbraio 2020 per la presenza del genoma di SARS-CoV-2. I campioni analizzati al 31 maggio 2020, sono stati 40.730 e, tra questi, 11.344 campioni (28,8 %) sono risultati positivi al SARS-CoV-2. Come mostrato in **Figura 13a**, la maggior parte dei campioni positivi sono stati ritrovati a marzo (N = 8.398, 62,0% dei 13.547 analizzati). Nonostante la presenza di ulteriori campioni positivi nei mesi successivi, la percentuale sul totale analizzato si è drasticamente ridotta. A maggio, solo 611 dei 12.705 campioni analizzati (4,8%) sono risultati positivi. Abbiamo inoltre cercato di valutare se le due fasi epidemiche differissero non solo per numero di casi positivi ma anche per la quantità di RNA virale rilevato. Per questo motivo, abbiamo analizzato 200 campioni positivi selezionati casualmente, 100 derivati nel periodo di picco dell'epidemia (marzo 2020) e 100 effettuati a maggio 2020, valutando i valori Ct. Per ogni campione, abbiamo suddiviso i valori di Ct osservati a seconda dei 3 bersagli molecolari rilevati dal reagente diagnostico Seegene (geni RdRP, E, N). I valori Ct medi per tutti e 3 i geni bersaglio osservati a marzo erano significativamente inferiori (Ct medio del gene E: 23,3, intervallo 10,3-35,9; Ct medio del gene RdRP: 24,6, intervallo 13,3-37,8; Ct medio del gene N: 25,3, intervallo 13,9- 38,3) rispetto ai valori Ct medi rilevati nei campioni raccolti a maggio (Ct medio del gene E: 32,1, intervallo 11,6-45,0; Ct medio del gene RdRP: 34,0, intervallo 13,9-38,6; Ct medio del gene N: 34,3, intervallo 15,5-39,3) (**Figura 13b**). Nella fase successiva dell'epidemia abbiamo individuato un campione (GZ69) notevolmente diverso da tutti gli altri tamponi nasofaringei analizzati. Il campione GZ69 ha mostrato un titolo virale molto

elevato con valori di Ct (gene E Ct: 11,6; gene RdRP Ct: 13,9; gene N Ct: 15,5) che rientrava nel quartile inferiore dei campioni analizzati nel primo periodo epidemico. È interessante notare come il paziente “GZ69” fosse completamente asintomatico essendo il suo campione ottenuto durante un normale screening effettuato agli operatori sanitari l'8 maggio.

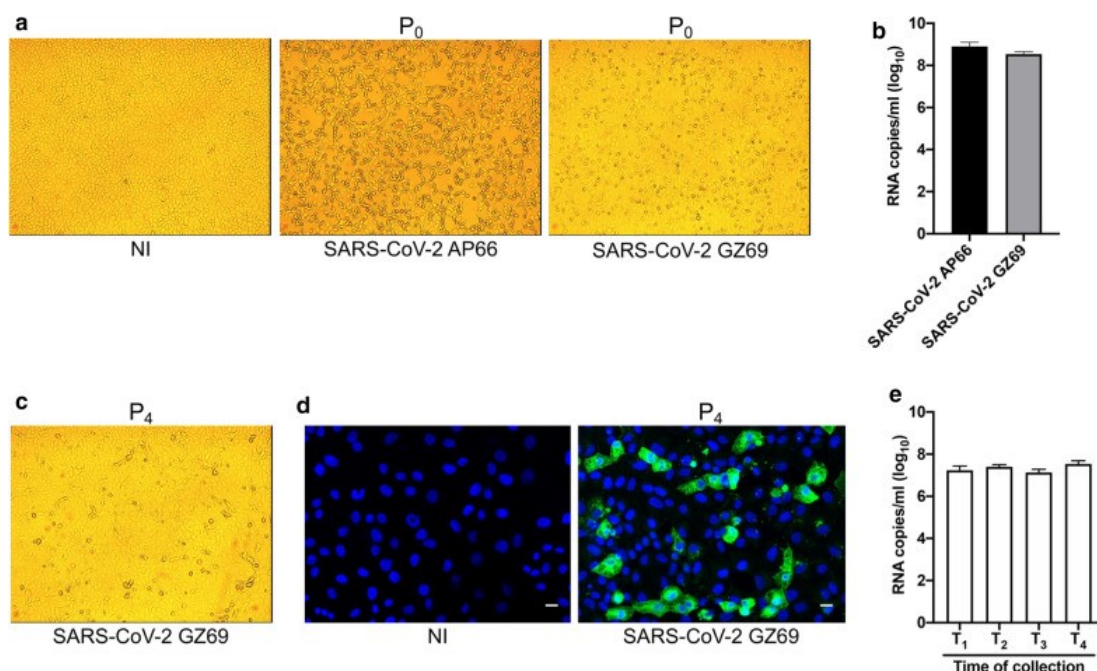


**Figura 13.** Caratterizzazione di campioni SARS-CoV-2 analizzati presso gli Spedali civili di Brescia. a) I grafici rappresentano il numero assoluto di campioni testati giornalmente. I campioni SARS-CoV-2 positivi sono mostrati in rosso; i campioni SARS-CoV-2 negativi in blu. L'asse orizzontale indica il tempo nell'intervallo giornaliero dal 28 febbraio al 31 maggio 2020. Le frecce mostrano i giorni in cui sono stati raccolti rispettivamente i campioni AP66 e GZ69. b) Cento campioni positivi SARS-CoV-2, selezionati casualmente raccolti al picco iniziale dell'epidemia di infezione (marzo 2020) e nella fase avanzata dell'epidemia di infezione (maggio 2020) nella regione di Brescia, sono stati suddivisi a seconda dei valori relativi ai Ct ottenuti da E, RdRP e N geni. Nei grafici del pannello b, le caselle si estendono dal 25° al 75° percentile, le linee indicano i valori medi e le barre indicano l'intervallo dei valori. (\*\*\*)  $p < 0,001$ . I segni verdi indicano Ct del campione AP66; i segni rossi indicano Ct dal campione GZ69.



### ***Persistenza dell'isolato di SARS-CoV-2 GZ69 nelle cellule Vero E6***

L'elevata carica virale rilevata nel campione GZ69 ci ha permesso di isolare SARS-CoV-2 utilizzando cellule Vero E6. Abbiamo inoltre isolato un secondo virus (SARS-CoV-2 AP66), ottenuto da un paziente dello stesso sesso e della stessa età venuto a contatto con COVID-19 durante la prima epidemia (9 marzo 2020). Il campione, denominato AP66, ha mostrato un livello di virus sovrapponibile alla quantità di virus rilevata nel campione GZ69. In particolare, i valori di Ct relativi ad AP66 erano compresi nel percentile inferiore del primo periodo epidemico (**Figura 13**) (gene E Ct: 12,4; gene RdRP Ct: 14,8; gene N Ct: 15,3). Sorprendentemente, l'isolato di SARS-CoV-2 GZ69 ha mostrato un'aggressività nettamente inferiore rispetto a SARS-CoV-2 AP66. Infatti, come previsto dalla carica virale dei campioni SARS-CoV-2 molto alta, con l'isolamento ottenuto da AP66 in Vero E6 (P0) abbiamo potuto osservare la comparsa di un effetto citopatico (CPE) già dopo 48 h dall'infezione (p.i.), capace successivamente di diffondersi rapidamente sull'intero monostrato cellulare a 72 h p.i. Al contrario, nonostante le quantità di virus fossero comparabili in entrambi i campioni di AP66 e GZ69, la vitalità cellulare delle Vero E6 è parsa leggermente diversa nell'isolamento GZ69, dove 72 h p.i. si è infatti potuto osservare un CPE limitato a pochi elementi dell'intero monostrato cellulare, che rimaneva ben conservato (**Figura 14a**). È interessante notare come 72 h p.i. (tempo 0, T0), non è stata osservata alcuna differenza nel titolo della progenie virale di AP66 ( $5,2 \times 10^8$  copie del genoma / ml di supernatante di coltura cellulare) e GZ69 ( $3,8 \times 10^8$  copie del genoma / ml di surnatante di colture cellulari), escludendo quindi che la mancanza di CPE sulle Vero E6 infettate con GZ69 fosse dovuta ad un



**Figura 14.** Persistenza di SARS-CoV-2 GZ69 nelle cellule Vero E6. a) CPE indotto da SARS-CoV-2 AP66 e SARS-CoV-2 GZ69 in Vero E6 a P<sub>0</sub> (72 h p.i.) (ingrandimento originale 10x). b) Il numero di copie dell'RNA di SARS-CoV-2 è stato analizzato dai surnatanti cellulari raccolti nel tempo P<sub>0</sub> mediante qRT-PCR. I valori rappresentano la media delle copie del gene S/ml  $\pm$  DS del triplicato. c) Microscopia in campo chiaro dell'infezione persistente di SARS-CoV-2 GZ69 al passaggio 4 (ingrandimento originale 10x). d) Immunofluorescenza su cellule Vero E6 infettate con SARS-CoV-2 GZ69 al passaggio 4. Le immagini mostrano in verde la presenza di SARS-CoV-2 e i nuclei cellulari in blu (barra della scala 20  $\mu$ m). e) Dai surnatanti cellulari raccolti prima della subcoltura cellulare è stato calcolato il numero di copie dell'RNA di SARS-CoV-2 mediante qRT-PCR. I tempi di raccolta del surnatante sono indicati con una T. I valori rappresentano la media  $\pm$  DS del triplicato di copie/ml del gene S. NI non infetto

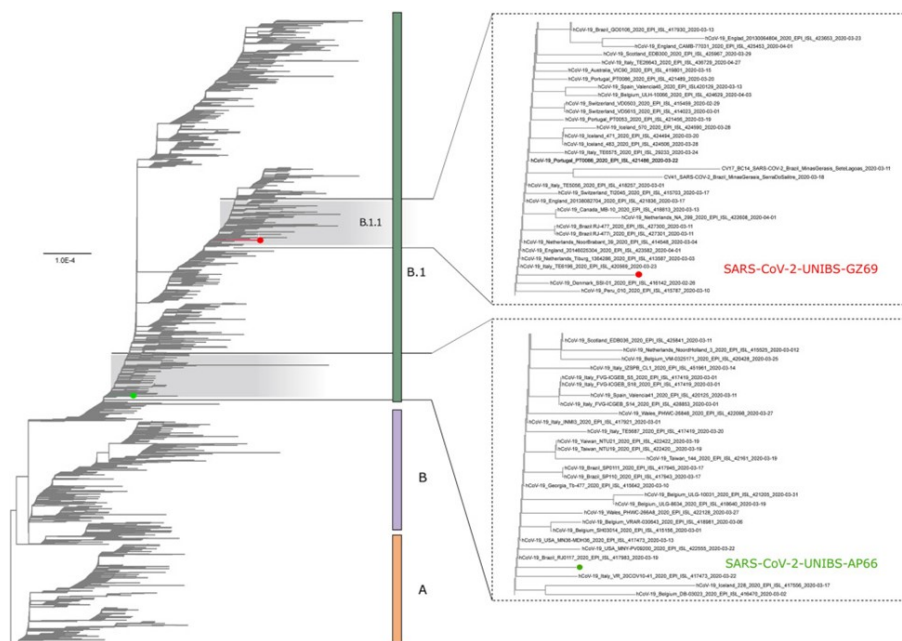
inefficiente processo di isolamento o ad una cinetica di replicazione virale più lenta (Fig. 2b). Il monitoraggio delle cellule fino a 8 giorni p.i. ha confermato che l'infezione delle cellule Vero E6 con SARS-CoV-2 GZ69 non aveva prodotto un chiaro CPE, confermando così la persistenza dell'infezione. Per confermare questa ipotesi, le cellule sono state passate regolarmente ogni 4 giorni, fino al passaggio 4 (P<sub>4</sub>), e i surnatanti cellulari raccolti prima di effettuare ciascuna

subcoltura cellulare, da T1 a T4. Le cellule Vero E6 infettate con GZ69 recuperate ad ogni passaggio risultavano essere ampiamente vitali (75-85%) e non hanno mostrato una crescita più lenta rispetto alla controparte non infetta (Fig. 2 c, d). Infine, è stato osservato anche un continuo rilascio di SARS-CoV-2 GZ69, compreso tra  $1,4 \times 10^7$  e  $3,8 \times 10^7$  copie del genoma/ml derivate da surnatante di coltura cellulare (Fig. 2e). Questo risultato mostra che l'assenza di CPE nelle cellule Vero E6 non era dovuta ad una scarsa capacità replicativa di SARS-CoV-2 GZ69.

### ***Mutazione genetica di SARS-CoV2 GZ69***

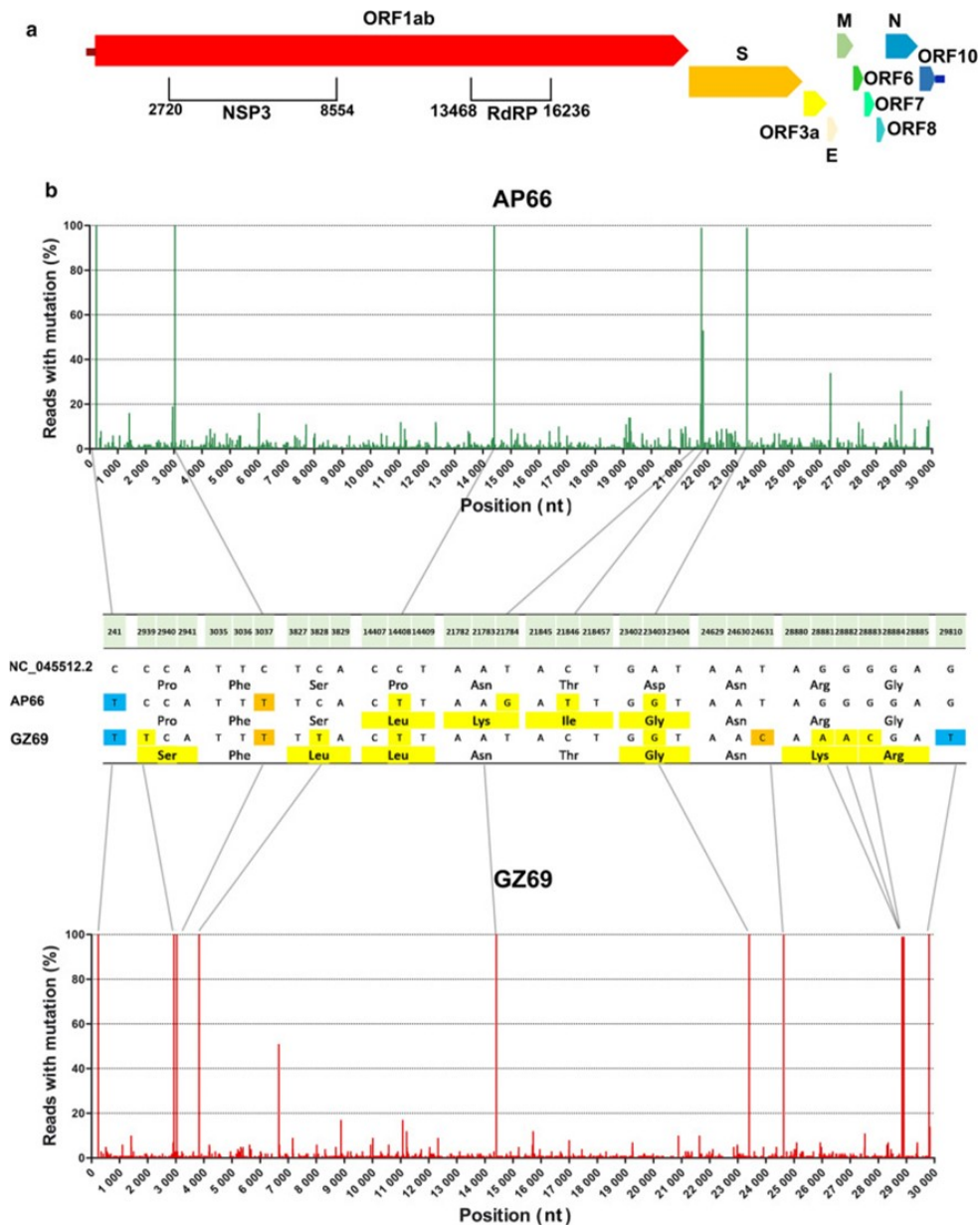
Successivamente abbiamo effettuato il sequenziamento dell'intero genoma (WGS) per valutare se le differenze nel CPE indotte da SARS-CoV-2 GZ69 e SARS-CoV-2 AP66 fossero dovute a variazioni genetiche tra i due isolati. Il sequenziamento metagenomico degli isolati (T0) è stato eseguito utilizzando una piattaforma MiniSeq Illumina. Dopo l'assemblaggio entrambi i genomi hanno mostrato una copertura totale del genoma al 99,9% senza lacune significative in nessuna posizione codificante. Per valutare la storia evolutiva ed avere una solida correlazione nel tempo dei due isolati, è stata eseguita un'analisi filogenetica basata sul metodo della massima verosomiglianza (Maximun Likelihood). Le sequenze di GZ69 e AP66, sono state allineate ad un dataset di 3.171 sequenze depositate in GISAID fino al 2 giugno 2020. Il modello filogenetico ottenuto in accordo con i criteri del (BIC) Bayesian Information indicava una solida robustezza dei dati e metteva in evidenza due principali clade, A e B, secondo un modello di nomenclatura recentemente proposta, a livello epidemiologico

globale [96]. L'analisi mostrava che l'isolato di SARS-CoV-2 AP66 si raggruppava nel clade B1, che include la maggior parte delle sequenze italiane, insieme alle sequenze derivate da altri paesi europei e Stati Uniti. La sequenza del genoma SARS-CoV-2 GZ69 sembrava, al contrario, trovarsi in un gruppo diverso assegnato al sub-lignaggio SARS-CoV-2 B.1.1. Anche in questo caso, questo recente sub-lignaggio includeva principalmente sequenze genomiche provenienti da Italia, Europa e Stati Uniti. Nell'albero, alcune sequenze di altri SARS-CoV-2 raccolte in area lombarda, si distribuiscono in gruppi diversi da quelli contenenti le due nuove sequenze caratterizzate in questo studio (**Figura 15**).



**Figura15.** Analisi filogenetica di isolati di SARS-CoV-2 AP66 e SARS-CoV-2 GZ69. Albero di massima verosimiglianza costituito da 3.173 sequenze di SARS-CoV-2 campionate in tutto il mondo. I due ceppi valutati in questo studio sono stati contrassegnati con i cerchi colorati. Sul lato destro sono mostrati gli zoom dei clades contenenti i due isolati italiani di SARS-CoV-2.

Ciò suggerisce che, in quest'area geografica, nel tempo si sono verificate più introduzioni di SARS-CoV-2. Le analisi di allineamento [97] hanno mostrato che, rispetto al genoma di riferimento Wuhan-Hu-1 NC\_045512.2, la sequenza consenso SARS-CoV-UNIBS-2 AP66 mostra 6 sostituzioni nucleotidiche (C241T; C3037T; C14408T; T21784G; C21846T; A23403G) determinando 4 cambiamenti non sinonimi (polipeptide ORF1ab: P4715L; proteina S: N74K, T95I, D614G). Tre sostituzioni nucleotidiche su 6 risiedono nel gene che codifica per la proteina S, dando origine a cambiamenti amminoacidici non sinonimi. Un'ulteriore sostituzione non sinonima osservata si trova nella regione codificante ORF1ab, all'interno del dominio RdRP. Le mutazioni (P4715L) e D614G nella proteina S, sono mutazioni ricorrenti, emerse in Europa a partire da febbraio 2020 come recentemente descritto chiaramente da Pachetti et al. [98]. In accordo con i risultati ottenuti, mutazioni nelle posizioni nucleotidiche 14.408 e 23.403 erano presenti anche nella variante virale SARS-CoV-2-UNIBS-GZ69. La sequenza consenso di GZ69 meno patogena differiva dall'isolato di Wuhan-Hu-1 in 11 posizioni nucleotidiche (C241T; C2939T; C3037T; C3828T; C14408T; A23403G; T24631C; G28881A; G28882A; G28883C; G29810T) e 6 di loro erano sinonimi (ORF1 non polipeptide: P892S, S1188L, P4715L; proteina S D614G; proteina N: R203K, G204R). È interessante notare che la sequenza consenso SARS-CoV2-UNIBS-GZ69 differiva dalla prima variante SARS-CoV-2-UNIBS-AP66 in 9 posizioni (C2939T; C3828T; G21784T; T21846C; T24631C; G28881A; G28882A; G28883C; G29810T) e queste variazioni genetiche hanno portato a 4 sostituzioni non sinonime nell'ORF1ab (P892S, S1188L), nella proteina S (K74N, I95T) e nella proteina N (R203K, G204R) [Figura 16].



**Figura 16.** Ispezione della variabilità genomica degli isolati SARS-CoV-2 AP66 e SARS-CoV-2 GZ69. a) Schema con codice colore delle regioni genetiche SARS-CoV-2, annotato come nel genoma di riferimento NC\_045512.2. I domini ORF1ab in cui si sono verificate mutazioni in SARS-CoV-2 AP66 e SARS-CoV-2 GZ69 sono indicati con parentesi quadre. I numeri indicano le posizioni dei nucleotidi (nt). b) Variabilità di sequenza rilevata in SARS-CoV-2 AP66 (grafico verde superiore) e SARS-CoV-2 GZ69 (grafico rosso inferiore). L'asse verticale rappresenta le percentuali di lettura rilevate che mostrano mutazioni nt rispetto alla sequenza di riferimento NC\_045512.2 in ogni posizione, valutato dal sequenziamento di nuova generazione. Le posizioni Nt nel genoma di SARS-CoV-2 sono riportate sull'asse orizzontale. La tabella centrale mostra posizioni nt in cui si verifica una sostituzione in SARS-CoV-2 AP66 e SARS-CoV-2 GZ69 rispetto a NC\_045512.2 (numeri all'interno del riquadro verde chiaro). Le sostituzioni Nt nelle regioni non codificanti sono in blu; le sostituzioni silenziose sono in arancione; le sostituzioni nt non sinonime e le corrispondenti modificazioni amminoacidiche sono evidenziate in giallo.

Per escludere che le mutazioni osservate nell'isolato SARS-CoV-2 GZ69 fossero state introdotte durante la replicazione virale in vitro, abbiamo eseguito WGS direttamente sul tampone nasofaringeo GZ69. Confrontato con l'isolato di Wuhan-Hu-1, la sequenza consenso del tampone nasofaringeo di GZ69 ha mostrato le stesse 11 modificazioni nucleotidiche identificate nell'isolato SARS-CoV-2 GZ69. Le sostituzioni identificate in ciascuna posizione nucleotidica nel campione clinico GZ69 erano presenti nel 100% delle letture analizzate, escludendo così che l'isolamento in vitro potesse aver selezionato una singola variante intra-ospite di SARS-CoV-2.

## **DISCUSSIONE E CONCLUSIONI**



All'inizio del 2020 la nuova sindrome respiratoria COVID-19, causata dal virus SARS-CoV-2, si è diffusa come una pandemia, a partire da Wuhan, in Cina, provocando una grave crisi sanitaria ed economica. Nonostante alcuni progressi nei trattamenti farmacologici delle complicanze mediche nelle fasi tardive della malattia, il bilancio delle vittime della pandemia è tragico, dal momento che attualmente non è disponibile un vaccino o un trattamento antivirale specifico.

Attualmente, i pazienti con sintomi lievi ricevono trattamenti prevalentemente basati sull'uso di antivirali. Fra i principali farmaci utilizzati nell'ambito del piano nazionale di gestione dell'emergenza COVID-19, troviamo il Lopinavir / Ritonavir (Kaletra), che viene utilizzato principalmente nei pazienti COVID-19 con minore gravità e nelle fasi iniziali della malattia, gestendo il malato sia a domicilio sia in ospedale. Precedenti esperienze nell'infezione da SARS e MERS, suggeriscono che tale farmaco possa migliorare alcuni parametri clinici dei pazienti. I pazienti ad uno stadio più grave della malattia, ricevono farmaci antinfiammatori, comprese basse dosi di steroidi o farmaci che agiscono sull'asse dell'IL-6 [99]. In base alla precedente esperienza dimostrata nei pazienti con SARS, vengono utilizzati nell'emergenza COVID-19 farmaci anti infiammatori (in particolare anticorpi monoclonali) che da alcuni anni vengono utilizzati in reumatologia al fine di inibire la risposta immunitaria: il Tocilizumab e l'Anakinra. Altre terapie essenziali sono le cosiddette terapie di supporto utilizzate per mantenere in vita il paziente in attesa che altri farmaci risultino efficaci nel combattere l'infezione o che la malattia guarisca spontaneamente. In questo contesto risulta di fondamentale importanza lo sviluppo di nuovi farmaci pertanto il numero delle sperimentazioni è in costante crescita.

Sulla base di queste premesse, in questo lavoro di tesi è stato quindi valutato l'effetto antivirale del Metotrexato (MTX), un farmaco approvato dalla FDA che agisce inibendo in modo competitivo e reversibile la diidrofolato reduttasi (DHFR), un enzima che partecipa alla sintesi del tetraidrofolato, alla cui inibizione consegue un esaurimento dei folati endocellulari. Visto che il suo meccanismo d'azione è basato sulla capacità di inibire la via della biosintesi delle purine, si è pensato che tale farmaco potrebbe essere in grado di inibire la replicazione dell'RNA virale e la sintesi di nuove particelle virali infettanti.

Nel nostro laboratorio sono quindi stati eseguiti, su un modello di cellule Vero E6 in vitro, degli esperimenti di infezione con un isolato di SARS-CoV-2 ottenuto dal tampone nasofaringeo di un paziente che presentava un'alta carica virale. I nostri risultati indicano che il MTX inibisce efficacemente e in modo dose-dipendente la replicazione virale di SARS-CoV-2 nelle fasi successive all'ingresso del virus. In accordo con i dati riportati in letteratura per l'infezione da virus Zika [100] e con il meccanismo d'azione sopra riportato di MTX, [87] i nostri dati indicano chiaramente che la via biosintetica delle purine cellulari risulta un valido target per inibire la replicazione di SARS-CoV-2. Inoltre uno studio eseguito su pazienti affetti da artrite reumatoide a cui venivano somministrati 15 mg di MTX, ha evidenziato che la concentrazione plasmatica del farmaco rimaneva in un range di concentrazione compreso tra 0,1 e 1  $\mu\text{M}$ , [101] cioè entro un intervallo di concentrazione sovrapponibile a quello riportato nel nostro studio (0,25-2,5  $\mu\text{M}$ ). Poiché la somministrazione metronomica multipla, terapia utilizzata in ambito oncologico, di basse dosi di MTX [102] può migliorare l'assorbimento del farmaco, le dosi efficaci riportate nel nostro lavoro sono compatibili con il

dosaggio di MTX terapeuticamente efficace (e ben tollerato) impiegato nell'uso clinico. Questi esperimenti potrebbero fornire la base per progettare trattamenti antivirali compatibili con l'assistenza domiciliare ai pazienti, monitorati dai medici di famiglia sotto la supervisione degli ospedali COVID. E' stato inoltre visto che, nell'artrite reumatoide e in altre sindromi infiammatorie, il bersaglio molecolare di MTX non è DHFR [87], ma il farmaco svolge un'azione anche come antiinfiammatorio e immunosoppressore, riducendo i livelli di interleuchina 6 (IL-6) e del recettore solubile di IL-2. Tale riduzione dei livelli di citochine è accompagnata da un miglioramento degli indici clinici dei pazienti [103]. Pertanto, nei pazienti COVID-19 in una fase più avanzata, si può ipotizzare che il trattamento con MTX possa ridurre da una parte la formazione di nuovi virioni e dall'altra sia in grado di inibire l'eccessiva produzione di IL-6, strategia attualmente in uso in diversi studi clinici [99] e che si presenta promettente per la cura dei pazienti COVID-19.

Oltre allo studio delle classiche vie attraverso le quali il virus replica e induce la malattia come target per nuovi farmaci, anche lo studio delle mutazioni degli isolati virali potrebbe rappresentare un possibile target per lo sviluppo di vaccini e farmaci terapeutici.

Dalla letteratura è noto che i tassi di mutazione virale/sostituzioni nucleotidiche variano per i virus a RNA approssimativamente tra  $10^{-6}$  e  $10^{-4}$ . L'eccezione a questa regola è data dai coronavirus [104]. Dall'inizio della pandemia sono stati sequenziati migliaia di genomi completi di SARS-CoV-2 che si sono dimostrati cruciali per tracciare l'origine e l'evoluzione del virus. Sorprendentemente, nella

popolazione globale sembra che il SARS-CoV-2 abbia accumulato solo una moderata diversità genetica in questa fase della pandemia COVID-19 [105]. Sebbene SARS-CoV-2 abbia la capacità di correggere gli errori della RNA polimerasi mediante l'attività della proteina non strutturale multidominio (nsp14) [106], l'esame di un set di dati di 7.666 gruppi genomici pubblici ha identificato regioni in cui si accumulano delle diversità, con 198 mutazioni ricorrenti in tutto il mondo emerse più volte indipendentemente (omoplasie). Di questi, quasi l'80% delle mutazioni ricorrenti ha prodotto cambiamenti non sinonimi a livello proteico, suggerendo un possibile adattamento in corso di SARS-CoV-2 all'ospite umano [105].

In uno studio recente, il sequenziamento massivo dell'RNA (Metatrascrittomica) su campioni di liquido di lavaggio bronco-alveolare di 8 pazienti ha mostrato che il numero di varianti intra-ospite variava da 0 a 51, con una mediana di 4, suggerendo un alto tasso di evoluzione del virus [107]. Ciò non sorprende perché quando il livello di infezione di una popolazione diventa significativo, alcuni individui si infettano in modo multiplo con diverse varianti del virus [108]. Inoltre, l'analisi degli isolati virali ha evidenziato la presenza di quasi-specie che mostrano nuove mutazioni genetiche nonostante le date di campionamento relativamente recenti [85, 86], indicando così che esiste una relativa diversità dei ceppi virali, ma questa viene ampiamente sottovalutata [85]. Pertanto questa conoscenza è fondamentale per comprendere i meccanismi infettivi utilizzati da SARS-CoV-2 e formulare una strategia per lo sviluppo di farmaci e vaccini. In questo contesto, nella seconda parte di questo lavoro di tesi, è stato condotto un importante studio "in vitro" di un particolare isolato virale allo scopo di

identificare il meccanismo d'infezione legato alla presenza di precise mutazioni nel suo genoma virale. A tale scopo nel nostro laboratorio è stato isolato un ceppo di SARS-CoV-2 da un soggetto asintomatico il cui tampone nasofaringeo, nonostante fosse stato processato nella fase calante della pandemia, presentava un'alta carica virale. Il genoma di questo isolato è stato sequenziato mediante NGS e sono quindi stati eseguiti esperimenti "in vitro" per studiarne le caratteristiche replicative. Gli esperimenti sono stati condotti su cellule Vero E6 in quanto sono cellule completamente suscettibili all'infezione da SARS-CoV-2 e forniscono un prezioso modello di forte replicazione virale grazie alla mancanza della risposta dell'interferone [109] a cui SARS-CoV-2 è altamente sensibile [110, 111]. Sorprendentemente, il nuovo isolato chiamato "SARS-CoV-2 GZ69" non ha indotto alcun effetto citopatico sulle cellule Vero E6 nonostante un'elevata carica virale nel surnatante della coltura. La carica virale ha continuato a essere sostenuta, a livelli solitamente raggiunti dai virus citopatici, anche dopo ripetuti passaggi delle cellule in coltura.

Questa scoperta ha dimostrato la capacità del nuovo isolato di manipolare il meccanismo cellulare per non indurre morte cellulare ed indurre un'infezione persistente. Dalla letteratura è noto che i Nidovirales e, tra loro, i coronavirus tendono a stabilire la persistenza sia in vivo che in vitro [112]. È noto, inoltre, che la persistenza deriva da adattamenti sia della cellula ospite che del virus [113] e che mutazioni nel genoma virale concorrono a tale persistenza [114]. Questo è stato chiaramente dimostrato anche per SARS-CoV, il virus filogeneticamente più vicino a SARS-CoV-2, dove una mutazione puntiforme viene stabilizzata durante l'instaurarsi della persistenza [115, 116], suggerendo che anche un singolo, ma

cruciale cambiamento di aminoacidi, può essere vantaggioso per l'adattamento del virus. In questo lavoro, abbiamo evidenziato che "SARS-CoV-2 GZ69" e "SARS-CoV-2 AP66", quest'ultimo virus geneticamente simile a quello isolato a Wuhan e in grado di indurre un forte effetto citopatico, mostrano alcune differenze a livello amminoacidico. Queste variazioni ci hanno permesso di classificare "SARS-CoV-2 GZ69" e "SARS-CoV-2 AP66" in diversi sottogruppi filogenetici e suggeriscono che "SARS-CoV-2 GZ69" potrebbe essersi evoluto nel tempo allontanandosi dal gruppo B1 in cui sono classificati "SARS-CoV-2 AP66" e molti altri ceppi italiani. Le mutazioni nel gene S di SARS-CoV-2 sono state correlate da una parte con la sua attenuazione mentre dall'altra con una sua maggiore aggressività [86]. In accordo con i nostri studi che hanno dimostrato che l'isolato "SARS-CoV-2 GZ69" ha mantenuto la sua capacità infettante, la sequenza della proteina S rimaneva praticamente uguale alla sequenza "wild type"; la sostituzione D614G è stata, infatti, l'unica differenza rilevata rispetto al ceppo di riferimento di Wuhan. Le sequenze di "SARS-CoV-2 GZ69" e "SARS-CoV-2 AP66" analizzate nel nostro laboratorio hanno rivelato la presenza di altre 4 sostituzioni non sinonime. Le mutazioni ai residui amminoacidici 892 (da P a S) e 1188 (da S a L) non sono state ancora descritte a livello globale. Entrambe risiedono all'interno del dominio nsp3, i cui eventi mutazionali sono stati considerati un potenziale meccanismo che differenzia la patologia COVID-19 dalla SARS [117]. In particolare, la mutazione S1188L di SARS-CoV-2 è compresa nel macrodominio (Mac1, residui 1023-1197 della poliproteina 1a), un dominio presente in tutti i coronavirus. Il Mac1 si lega e rimuove l'ADP-ribosio dalle proteine cellulari modificate post-traduzionalmente e questa attività contrasta la ribosilazione antivirale dell'ospite

[118]. Sorprendentemente, la mutazione Mac1 in SARS-CoV non interferisce con la replicazione del virus nelle colture cellulari Vero E6 [119] ma il virus mutante è altamente attenuato in vivo [120-122]. Questi risultati attestano che SARS-CoV Mac1 non è indispensabile per la replicazione virale ma è necessario per la patogenesi e probabilmente promuove la virulenza contrastando la risposta immunitaria innata dei mammiferi. È stato quindi ipotizzato che la mutazione osservata in Mac1 di “SARS-CoV-2 GZ69” possa essere coinvolta nei diversi effetti citopatici indotti su Vero E6 descritti in questo lavoro di tesi. Le altre differenze tra “SARS-CoV-2 AP66” e “SARS-CoV-2 GZ69” risiedono nel gene N, dove è stata rilevata la sostituzione di 2 amminoacidi consecutivi (203-204). Queste sostituzioni si trovano nel dominio del linker N2a che è eccezionalmente poco suscettibile alle mutazioni, in linea con il suo probabile ruolo strutturale di linker disordinato tra il dominio N1b legante l'RNA e il dominio di dimerizzazione N2b [123]. In accordo con questa evidenza, le mutazioni osservate nel gene N non sono uniche del ceppo virale “SARS-CoV-2 GZ69” ma sono già state rilevate in altri isolati di SARS-CoV-2 in tutto il mondo [124]. Tuttavia, non è stata ancora messa in evidenza alcuna relazione tra la presenza di queste sostituzioni e la patogenicità virale. In questo contesto, vale la pena notare che, in SARS-CoV, questi residui fanno parte di putativi siti di fosforilazione e questo epitopo è coinvolto nell'interazione con diversi enzimi cellulari come la chinasi ciclina-dipendente (CDK) e la glicogeno sintasi chinasi-3 (GSK3) [125]. Inoltre, analisi mutazionali che coinvolgono il residuo 204 hanno fornito prove sostanziali che la proteina N del SARS-CoV si lega e inibisce l'attività del complesso ciclina-CDK, determinando la down-regolazione dei prodotti del gene della fase S e la

successiva inibizione della progressione della fase S nelle cellule umane [126]. Gli eventi mutazionali verificatisi in “SARS-CoV-2 GZ69” a livello dei residui 203-204 potrebbero ridurre le proprietà antiproliferative della proteina N, favorendo la sopravvivenza cellulare e la persistenza virale. La recente disponibilità di un clone infettivo di cDNA di SARS-CoV-2 [127] potrebbe rendere possibile tentativi di genetica inversa per determinare se la sostituzione dei residui amminoacidici sopra descritti all'interno di un clone molecolare di SARS-CoV-2 ben caratterizzato possano alterare drasticamente l'aggressività virale. Presi insieme, questi risultati potrebbero aprire la strada a futuri studi volti ad analizzare il processo di selezione a favore delle mutazioni virali nell'ospite umano.



## **BIBLIOGRAFIA**

- [1] de Wit E, van Doremalen N, Falzarano D, Munster VJ. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* 14(8), 523 (2016).
- [2] Fung S-Y, Yuen K-S, Ye Z-W, Chan C-P, Jin D-Y. A tug-of-war between severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 and host antiviral defence: lessons from other pathogenic viruses. *Emerg. Microbes Infect.* 9(1), 558-570 (2020).
- [3] Peiris J, Lai S, Poon L *et al.* Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 361(9366), 1319-1325 (2003).
- [4] International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses The 9th Report of the ICTV (2011). [Internet]. Alabama: ICTV.
- [5] Zhang R, Li Y, Zhang AL, Wang y, Molina MJ. Identifying airborne transmission as the dominant route for the spread of COVID-19. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2020; 117(26):14857-14863.
- [6] Lauer SA, Grantz KH, Bi Q, *et al.* The incubation period of coronavirus disease 2019 (COVID-19) from publicly reported confirmed cases: estimation and application. *Ann Intern Med.* 2020.
- [7] Liu Y, Gayle AA, Wilder-Smith A, Rocklov J. The reproductive number of COVID-19 is higher compared to SARS coronavirus. *J. Travel Med.* 27(2), (2020).
- [8] Shi Y, Wang Y, Shao C, *et al.* COVID-19 infection: the prespectives on immune responses. *Cell Death Differ.* 2020;27(5):1451-1454.
- [9] Zou L, Ruan F, Huang M *et al.* SARS-CoV-2 viral load in upper respiratory specimens of infected patients. *N. Engl. J. Med.* 382(12), 1177-1179 (2020).
- [10] Mahase E. Covid-19: WHO declares pandemic because of “alarming levels” of spread, and inaction. *BMJ.* 2020;368:m1036.
- [11] Zhu N, Zhang D, Wang W *et al.* A novel coronavirus from patients with pneumonia in China. *N. Engl. J. Med.* 2019;382:727-733.
- [12] Hu B, Guo H, Zhou P *et al.* Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol.* 2020;6:1-14.
- [13] Jiang S, Du L, Shi Z. An emerging coronavirus causing pneumonia outbreak in Wuhan, China: calling for developing therapeutic and prophylactic strategies. *Emerg. Microbes Infect.* 2020;9:275-277.
- [14] Deng S, Peng HJ. Characteristics of and public health responses to the coronavirus disease 2019 outbreak in China. *J. Clin. Med.* 2020;9:575.
- [15] Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019 nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol.* 2020;5:536-544.
- [16] World Health Organization. Coronavirus disease 2019 (COVID-19). Situation report – 51.

- [17] Zhang YZ, Holmes EC. A genomic perspective on the origin and emergence of SARS-CoV-2. *Cell*. 2020;181:223-227.
- [18] Li W, Shi Z, Yu M, et al. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science*. 2003;310:676-679.
- [19] Lan J, Ge J, Yu S, et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*. 2020;581:215-220.
- [20] Hoffman M, Kleine-Weber H, Schroeder S, et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell*. 2020
- [21] Wrapp D, Wang N, Corbett KS, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*. 2020;367:1260-1263.
- [22] Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, et al. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell*. 2020;181:281-292.
- [23] Xu J, Zhao S, Teng T, et al. Systematic comparison of two animal-to-human transmitted human coronavirus: SARS-CoV-2 and SARS-CoV. *Viruses*. 2020.
- [24] Fehr AR, Perlman S. Coronavirus: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods Mol Biol*. 2015;1282:1-23.
- [25] Li S, Yuan L, Dai G, et al. Regulation of the ER stress response by the Ion channel activity of the infectious bronchitis coronavirus envelope proteine modulates virion release, apoptosis, viral fitness, and pathogenesis. *Front Microbiol*. 2020;10:3022.
- [26] Tang T, Bidon M, Jaimes JA et al. Coronavirus membrane fusion mechanism offers as a potential target for antiviral development. *Antiviral Research*. 2020;104792.
- [27] Neuman BW, Buchmeier MJ. Supramolecular architecture of the coronavirus particle. *Adv. Virus. Res*. 2016;96:1-27.
- [28] Kirchdoerfer RN, Cottrell CA, Wang N, et al. Pre-fusion structure of a human coronavirus spike protein. *Nature*. 2016;531(7592):118-121.
- [29] Li F. Structure, function, and evolution of coronavirus spike proteins. *Annu. Rev. Virol*. 2016;3(1):237-261.
- [30] Belouzard S, Millet JK, Licitra BN, Whittaker GR. Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. *Viruses*. 2012;4(6):1011-1033.
- [31] Li W, Moore MJ, Vasilieva N et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*. 2003;426(6965):450-454.
- [32] Raj VS, Mou H, Smits SL et al. Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. *Nature*. 2013;495(7440):251-254.
- [33] Alsaadi EA, Jones IM. Membrane binding proteins of coronaviruses. *Future Virol*. 2019;14(4):275-286.

- [34] Bosch BJ, Bartelink W, Rottier PJM. Cathepsin L functionally cleaves the severe acute respiratory syndrome coronavirus class I fusion protein upstream, of rather than adjacent to the fusion peptide. *J. Virol.* 2008;82(17):8887-8890.
- [35] Greber UF, Singh I, Helenius A. Mechanisms of virus uncoating. *Trends Microbiol.* 1994;2(2):52-56.
- [36] Sola I, Mateos-Gomez PA, Almazan F et al. RNA-RNA and RNA-protein interactions in coronavirus replication and transcription. *RNA Biol.* 2011;8(2):237-248.
- [37] Krijnse-Locker J, Ericsson M, Rottier PJM, Griffiths G. Characterization of the budding compartment of mouse hepatitis virus: evidence that transport from the RER to the Golgi complex requires only one vesicular transport step. *J. Cell Biol.* 1994;124(1-2):55-70.
- [38] de Haan CAM, Rottier PJM. Molecular interactions in the assembly of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* 2005;64(05):165-230.
- [39] Bos ECW, Luytjes W, van der Meulen H, et al. The production of recombinant infectious DI-particles of a murine coronavirus in the absence of helper virus. *Virology.* 1996;218(1): 52-60.
- [40] Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007;8(7):519-529.
- [41] Tabas I, Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat. Cell Biol.* 2011;13:184-190.
- [42] Huang C, Huang Y, Li X et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet.* 2020;395:497–506.
- [43] Wu Z, McGoogan JM. Characteristics of an important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *Jama.* 2020;323:1239-1242.
- [44] Qin C, Zhou L, Hu Z et al. Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China. *Clin. Infect. Dis.* 2020. doi:10.1093/cid/ciaa248.
- [45] Xu Z, Shi L, Wang Y et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir. Med.* 2020;8(4):420-422.
- [46] Moossavi M, Parsamanesyh N, Bahrami A et al. Role of the NLRP3 inflammasome in cancer. *Mol. Cancer.* 2018;17(1):158.
- [47] Chen N, Zhou M, Dong X et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet.* 2020;395(10223):507-513.
- [48] Wu C, Chen X, Cai Y et al. Risk factor associated with acute respiratory distress syndrome and death in patients with coronavirus disease 2019 pneumonia in Wuhan, China. *Jama Intern. Med.* 2020;180:934-943.

- [49] Chan JF, Zhang AJ, Yuan S et al. Stimulation of the clinical and pathological manifestations of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in golden Syrian hamster model: implications for disease pathogenesis and transmissibility. *Clin. Infect. Dis.* 2020.
- [50] Bordi L, Nicastrì E, Scorzolini L et al. Differential diagnosis of illness in patients under investigation for the novel coronavirus (SARS-CoV-2), Italy, February 2020. *Euro Surveill.* 2020;25:2000170.
- [51] Li T. Diagnosis and clinical management of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection: an operational recommendation of Peking Union Medical College Hospital (V2.0). *Emerg. Microbes Infect.* 2020;9:582-585.
- [52] Chung M, Bernheim A, Mei X et al. CT imaging features of 2019 novel coronavirus (2019-n-CoV). *Radiology.* 2020;295(1):202-207.
- [53] Guo L, Ren L, Yang S et al. Profiling early humoral response to diagnose novel coronavirus disease (COVID-19) *Clin. Infect. Dis.* 2020;71(15):778-785.
- [54] Kotta S, Aldawasari HM, Badr-Eldin SM et al. *Front. Mol. Biosci.* 2020;7:606393.
- [55] Holshue ML, DeVolt C, Lindquist S et al. First case of 2019 novel coronavirus in the United States. *N. Engl. J. Med.* 2020;382:929-936.
- [56] De Wit E, Feldmann F, Cronin J et al. Prophylactic and therapeutic remdesivir (GS-5734) treatment in the rhesus macaque model of MERS-CoV infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2020;117:6771-6776.
- [57] Cooper CL, van Heeswijk RPG, Gallicano K et al. A review of low-dose ritonavir in protease inhibitor combination therapy. *Clin. Infect. Dis.* 2003;36:1585:1592.
- [58] Dong D, Tang Z, Wang S et al. The role of imaging in the detection and management of COVID-19: a review. *IEEE Rev. Biomed. Eng.* 2020. Doi:10.1109/RBME.2020.2990959,
- [59] Yuan J, Zou R, Zeng L et al. The correlation between viral clearance and biochemical outcomes of 94 COVID-19 infected discharged patients. *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc.* 2020;69:599-606.
- [60] Ye XT, Luo Y, Xia S et al. Clinical efficacy of lopinavir/ritonavir in the treatment of Coronavirus disease 2019. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2020;24:3390-3396.
- [61] Blaising J, Polyak SJ, Pecheur EI. Arbidol as a broad-spectrum antiviral: An update. *Antiviral Res.* 2014;107:84-94.
- [62] Song Y, Zhang M, Yin L et al. COVID-19 treatment: close to a cure? – a rapid review of pharmacotherapies for the novel coronavirus department of pharmacy services. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2020;56:106080.

- [63] Dong L, Hu S, Gao J. Discovering drugs to treat coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Drug Discov. Ther.* 2020;14:58–60.
- [64] Deng L, Li C, Zeng Q et al. Arbidol combined with LPV/r versus LPV/r alone against corona virus disease 2019. *J. Infect.* 2020;81:E1-E5.
- [65] Du YX, Chen XP. Favipiravir: pharmacokinetics and concerns about clinical trials for 2019-nCoV infection. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2020;108:188.
- [66] Zhai P, Ding Y, Wu X. The epidemiology diagnosis and treatment of COVID-19. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2020;55:105955.
- [67] Kodaz H. EDITORIAL: successful treatment strategy of Turkey against covid-19 outbreak. *Eurasian J. Med. Oncol.* 2020;4:177-178.
- [68] Li L, Li Y, Zhang L et al. Theoretical studies on the susceptibility of oseltamivir against variants of 2009 A/H1N1 influenza neuramidase. *J. Chem. Inf. Model.* 2012;52:2715-2729.
- [69] Ding, Q, Lu P, Fan, Y et al. The clinical characteristics of pneumonia patients coinfecting with 2019 novel coronavirus and influenza virus in Wuhan, China. *J. Med. Virol.* 2020;92:1549–1555.
- [70] Elfiky AA. Ribavirin, remdesivir, sofosbuvir, galidesivir, and tenofovir against SARS-CoV-2 RNA dependent RNA polymerase (RdRp): A molecular docking study. *Life Sci.* 2020; 253:117592.
- [71] Xu X, Han M, Li T et al. Effective treatment of severe COVID-19 patients with tocilizumab. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2020;117:10970–10975.
- [72] Zhang C, Wu Z, Li J et al. The cytokine release syndrome (CRS) of severe COVID-19 and interleukin-6 receptor (IL-6R) antagonist Tocilizumab may be the key to reduce the mortality. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2020;55:105954.
- [73] Wang C, Li W, Drabek D et al. A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection. *Nat. Commun.* 2020;11:2251.
- [74] Sallard E, Lescure FX, Yazdanpanah Y et al. Type 1 interferons as a potential treatment against COVID-19. *Antiviral Res.* 2020;178:104791.
- [75] Liang B, Chen J, Li T et al. Clinical remission of a critically ill COVID-19 patient treated by human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Medicine.* 2020;99:e21429.
- [76] Zhao Q, He Y. Challenges of convalescent plasma therapy on COVID-19. *J. Clin. Virol.* 2020;127:104358.
- [77] Rojas M, Rodríguez Y, Monsalve D. et al. Convalescent plasma in Covid-19: possible mechanisms of action. *Autoimmun. Rev.* 2020;19:102554.
- [78] Shen C, Wang Z, Zhao F et al. Treatment of 5 Critically Ill patients with COVID-19 with convalescent plasma. *JAMA.* 2020;323:1582–1589.

- [79] Cortegiani A, Ingoglia , Ippolito M et al. A systematic review on the efficacy and safety of chloroquine for the treatment of COVID-19. *J. Crit. Care.* 2020;57:279–283.
- [80] Vincent MJ, Bergeron E, Benjannet S et al. Chloroquine is a potent inhibitor of SARS coronavirus infection and spread. *Virology.* 2005;2:69.
- [81] Gay B, Bernard E, Solignat M et al. (2012). Entry of chikungunya virus into *Aedes albopictus* cells. *Infect. Genet. Evol.* 2012;12:1275–1281.
- [82] Devaux CA, Rolain JM, Colson P et al. New insights on the antiviral effects of chloroquine against coronavirus: what to expect for COVID-19? *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2020;55:105938.
- [83] Liu J, Cao R, Xu M et al. Hydroxychloroquine, a less toxic derivative of chloroquine, is effective in inhibiting SARS-CoV-2 infection in vitro. *Cell Discov.* 2020;6:16.
- [84] Gharebaghi R, Heidary F, Moradi M et al. Metronidazole; a potential novel addition to the COVID-19 treatment regimen. *Arch. Acad. Emerg. Med.* 2020;8:e40.
- [85] Yao H, Lu X, Chen Q et al. Patient-derived mutations impact pathogenicity of SARS-CoV-2. *MedRxiv preprint.* [Fhttps://doi.org/10.1101/2020.04.14.20060160](https://doi.org/10.1101/2020.04.14.20060160).
- [86] Lau SY, Wang P, Mok BWY et al. Attenuated SARS-CoV-2 variants with deletions at the S1/S2 junction. *Emerg. Micr. Infect.* 2020;9(1):837-42.
- [87] Bedoui Y, Guillot X, Selambarom J et al. Methotrexate an old drug with new tricks. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20:20.
- [88] Wang M, Cao R, Zhang L, et al. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell Res.* 2020;30(3):269-271.
- [89] Kustin T, Ling G, Sharabi S et al. A method to identify respiratory virus infections in clinical samples using next-generation sequencing. *Sci Rep.* 2019;9(1):2606.
- [90] Wood DE, Lu J, Langmead B. Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biol.* 2019;20(1):257.
- [91] Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 2014;30(15):2114–20.
- [92] Langmead B, Salzberg LS. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods.* 2012;9(4):357–9. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>.
- [93] Katoh K, Rozewicki J, Yamada KD. MAFFT online service: Multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief Bioinform.* 2019;20(4):1160–6.
- [94] Laarson A. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large data sets. *Bioinformatics.* 2014;30(22):3276–8.

- [95] Nguyen LT, Schmidt HA, Von Haeseler A et al. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol Biol Evol.* 2015;32(1):268–74.
- [96] Rambaut A, Holmes EC, Hill V et al. A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 to assist genomic epidemiology. *bioRxiv.* 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.04.17.046086>.
- [97] Darling AE, Mau B, Perna NT. ProgressiveMauve: multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. *PLoS ONE.* 2010;5(6):e11147.
- [98] Pachetti M, Marini B, Benedetti F et al. Emerging SARS-CoV-2 mutation hot spots include a novel RNA-dependent-RNA polymerase variant. *J Transl Med.* 2020;18(1):179.
- [99] Tu YF, Chien CS, Yarmishyn AA et al. A review of SARS - CoV - 2 and the ongoing clinical trials. *Int J Mol Sci.* 2020;21:7.
- [100] Beck S, Zhu Z, Oliveira MF, et al. Mechanism of action of methotrexate against Zika virus. *Viruses.* 2019;11:4.
- [101] Seideman P, Beck O, Eksborg S et al. The pharmacokinetics of methotrexate and its 7-hydroxy metabolite in patients with rheumatoid arthritis. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1993;35(4):409 - 412.
- [102] Colleoni M, Gray KP, Gelber S, et al. Low-dose oral cyclophosphamide and methotrexate maintenance for hormone receptor - negative early breast cancer: International Breast Cancer Study Group Trial 22-00. *J. Clin. Oncol.* 2016;34(28):3400-3408.
- [103] Crilly A, McInness IB, McDonald AG et al. Interleukin 6 (IL-6) and soluble IL-2 receptor levels in patients with rheumatoid arthritis treated with low dose oral methotrexate. *J. Rheumatol.* 1995;22(2):224-226.
- [104] Sanjuán R, Domingo-Calap P. Mechanisms of viral mutation. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(23):4433-48.
- [105] van Dorp L, Acman M, Richard D et al. Emergence of genomic diversity and recurrent mutations in SARS-CoV-2. *Infect. Genet. Evol.* 2020;83:104351.
- [106] Minskaia E, Hertzog T, Gorbalenya AE et al. Discovery of an RNA Virus 3' -> 5' exoribonuclease that is critically involved in coronavirus RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103(13):5108-13.
- [107] Shen Z, Xiao Y, Kang L et al. Genomic diversity of SARS-CoV-2 in Coronavirus Disease 2019 patients. *Clin. Infect. Dis.* 2020.



- [108] Danchin A, Timmis K. SARS-CoV-2 variants: Relevance for symptom granularity, epidemiology, immunity (herd, vaccines), virus origin and containment? *Environ. Microbiol.* 2020;22(6):2001-6.
- [109] Desmyter J, Melnick JL, Rawls WE. Defectiveness of interferon production and of rubella virus interference in a line of African green monkey kidney cells (Vero). *J. Virol.* 1968;2(10):955-61.
- [110] Mantlo E, Bukreyeva N, Maruyama J et al. Potent Antiviral Activities of Type I Interferons to SARS-CoV-2 Infection. [bioRxiv. 2020;https://doi.org/10.1101/2020.04.02.022764](https://doi.org/10.1101/2020.04.02.022764).
- [111] Lokugamage KG, Hage A, Schindewolf C et al. SARS-CoV-2 is sensitive to type I interferon pretreatment. [bioRxiv. 2020;https://doi.org/10.1101/2020.03.07.982264](https://doi.org/10.1101/2020.03.07.982264).
- [112] Guo R, Shang P, Carrillo CA et al. Doublestranded viral RNA persists in vitro and in vivo during prolonged infection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology.* 2018;524:78-89.
- [113] Frisk G. Mechanisms of chronic enteroviral persistence in tissue. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2001;14(3):251-6.
- [114] Alidjinou EK, Engelmann I, Bossu J et al. Persistence of Coxsackievirus B4 in pancreatic ductal-like cells results in cellular and viral changes. *Virulence.* 2017;8(7):1229-44.
- [115] Pacciarini F, Ghezzi S, Canducci F et al. Persistent replication of severe acute respiratory syndrome coronavirus in human tubular kidney cells selects for adaptive mutations in the membrane protein. *J. Virol.* 2008;82(11):5137-44.
- [116] Roberts A, Deming D, Paddock CD et al. A mouse-adapted SARS-coronavirus causes disease and mortality in BALB/c mice. *PLoS Pathog.* 2007;3(1):e5.
- [117] Angeletti S, Benvenuto D, Bianchi M et al. COVID-2019: The Role of the nsp2 and nsp3 in Its Pathogenesis. *J Med Virol.* 2020;92(6):584-8.
- [118] Alhammad YMO, Fehr AR. The viral microdomain counters host antiviral ADP-Ribosylation. *Viruses.* 2020;12(4):384.
- [119] Kusov Y, Tan J, Alvarez E et al. A G-quadruplexbinding macrodomain within the “SARS-unique domain” is essential for the activity of the SARS-coronavirus replication–transcription complex. *Virology.* 2015;484:313-22.
- [120] Fehr AR, Channappanavar R, Jankevicius G et al. The conserved coronavirus macrodomain promotes virulence and suppresses the innate immune response during severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *mBio.* 2016; 7(6):e01721-16.

- [121] Eriksson KK, Cervantes-Barragán L, Ludewig B et al. Mouse hepatitis virus liver pathology is dependent on ADP-ribose-1"-phosphatase, a viral function conserved in the alpha-like supergroup. *J Virol.* 2008;82(24):12325-34.
- [122] Fehr AR, Athmer J, Channappanavar R et al. The nsp3 macrodomain promotes virulence in mice with coronavirus-induced encephalitis. *J. Virol.* 2015;89(3):1523-36.
- [123] Ye Q, West AMV, Silletti S et al. Architecture and self-assembly of the SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. *Protein Sci.* 2020.
- [124] Lai A, Bergna A, Caucci S et al. Molecular tracing of SARS-CoV-2 in Italy in the first three months of the epidemic. *Viruses.* 2020;12(8):E798.
- [125] Surjit M, Kumar R, Mishra RN et al. The severe acute respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein is phosphorylated and localizes in the cytoplasm by 14-3-3-mediated translocation. *J Virol.* 2005;79(17):11476–86.
- [126] Surjit M, Liu B, Chow VTK et al. The nucleocapsid protein of severe acute respiratory syndrome-coronavirus inhibits the activity of cyclin-dependent kinase complex and blocks S phase progression in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 2006;281(16):10669–81.
- [127] Xie X, Muruato A, Lokugamage KG et al. An Infectious cDNA Clone of SARS-CoV-2. *Cell Host Microbe.* 2020;27(5):841-848.e3.