

PROGETTO SHARCODE - RELAZIONE TECNICA STATO AVANZAMENTO DEL LAVORO I (SAL I)

Responsabile Scientifico:

Prof. Francesco BEGUINOT - Presidente del CdA di COEPICA s.c.a.r.l

Periodo Attività: 01/02/2023 – 12/07/2023

Sede operativa: Laboratori COEPICA scarl - Napoli, Via S. Pansini 5, 80131

WP 1 - Valutazione dell'espressione delle molecole coinvolte nell'ingresso del SARS-CoV-2 in adipociti e leucociti del sangue periferico (PBL) di soggetti obesi e/o diabetici e di individui sani parenti di primo grado di diabetici di tipo 2.

Descrizione risultati intermedi: È stato ipotizzato che l'alterata espressione di molecole coinvolte nell'ingresso di SARS-CoV-2 nelle cellule ospiti possa essere tra i meccanismi responsabili dell'aumentato rischio di prognosi peggiore di COVID-19 nei pazienti obesi e/o diabetici. Per chiarire tale problematica, si è fatto uso di una coorte di soggetti, già reclutati e resi disponibili dall'Università degli Studi di Napoli Federico II (co-fondatore di COEPICA s.c.a.r.l), caratterizzati come segue: individui magri sani con normale tolleranza al glucosio e individui obesi con normale tolleranza al glucosio, con intolleranza al glucosio (IGT) o diabete di tipo 2 (T2D). Alcuni dei parametri metabolici della popolazione oggetto del seguente studio sono riassunti nella Tabella 1. Da tali soggetti erano disponibili sin dall'inizio del progetto biopsie di tessuto adiposo addominale, leucociti da sangue periferico (Peripheral Blood Leukocytes, PBL), campioni di siero e plasma. Nella prima fase dello studio sono stati isolati gli acidi nucleici da PBL e da cellule precursori adipocitarie (Adipocyte Precursor Cells, APC) isolate dalla frazione stroma vascolare del tessuto adiposo sottocutaneo (scAT).

	Lean	Obese
Age, years	37.4 ± 9.4	37.8 ± 5.0
BMI, Kg/m ²	24.2 ± 2.2	43.5 ± 6.3***
Glycemia, mg/dL	76.8 ± 3.3	113.3 ± 47.9
HbA1c, %	/	6.1 ± 1.0
OGTT, mg/dL	83.2 ± 23.4	140.8 ± 31.2***
Insulin, uU/mL	5.0 ± 2.0	20.2 ± 9.3**
HOMA index	1.0 ± 0.4	6.1 ± 4.7*
Triglycerides, mg/dL	61.3 ± 17.0	158.7 ± 77.5**
Cholesterol, mg/dL	161.9 ± 16.5	201.3 ± 34.3*
HDL, mg/dL	61.8 ± 3.8	46.9 ± 11.3**
LDL, mg/dL	149.6 ± 14.6	121.9 ± 33.7

Tabella 1. Caratteristiche dei gruppi obesi e magri selezionati. I valori sono rappresentati come media ± SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$, Obese vs Lean.

Sui campioni di mRNA delle PBL è stata determinata, mediante tecnica di “quantitative PCR” (qPCR) con chimica SybrGreen, l’espressione di geni, identificati come interattori specifici di SARS-CoV-2, quali *Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2)*, *Transmembrane protease serine 2 (TMPRSS2)*, *Basagin (CD147)*, *ADAM Metallopeptidase Domain 17 (ADAM17)*, *Furin*, e *Glucose-regulating protein 78 (GRP78)*. Attraverso tale analisi è stato riscontrato un aumento di circa 3 volte dei livelli di espressione del gene *ACE2* ($p < 0,001$; Figura 1A), di circa 2,5 volte dei livelli di espressione del gene *CD147* ($p < 0,01$; Figura 1C) e di circa 1,5 volte del gene *GRP78* ($p < 0,05$; Figura 1F) nei soggetti con obesità rispetto ai soggetti magri di controllo, rispettivamente. Non sono state invece riscontrate differenze statisticamente significative nei livelli di espressione dei geni *TMPRSS2* (Figura 1B), *ADAM17* (Figura 1D) e *FURIN* (Figura 1E) tra i soggetti con obesità ed i soggetti magri di controllo.

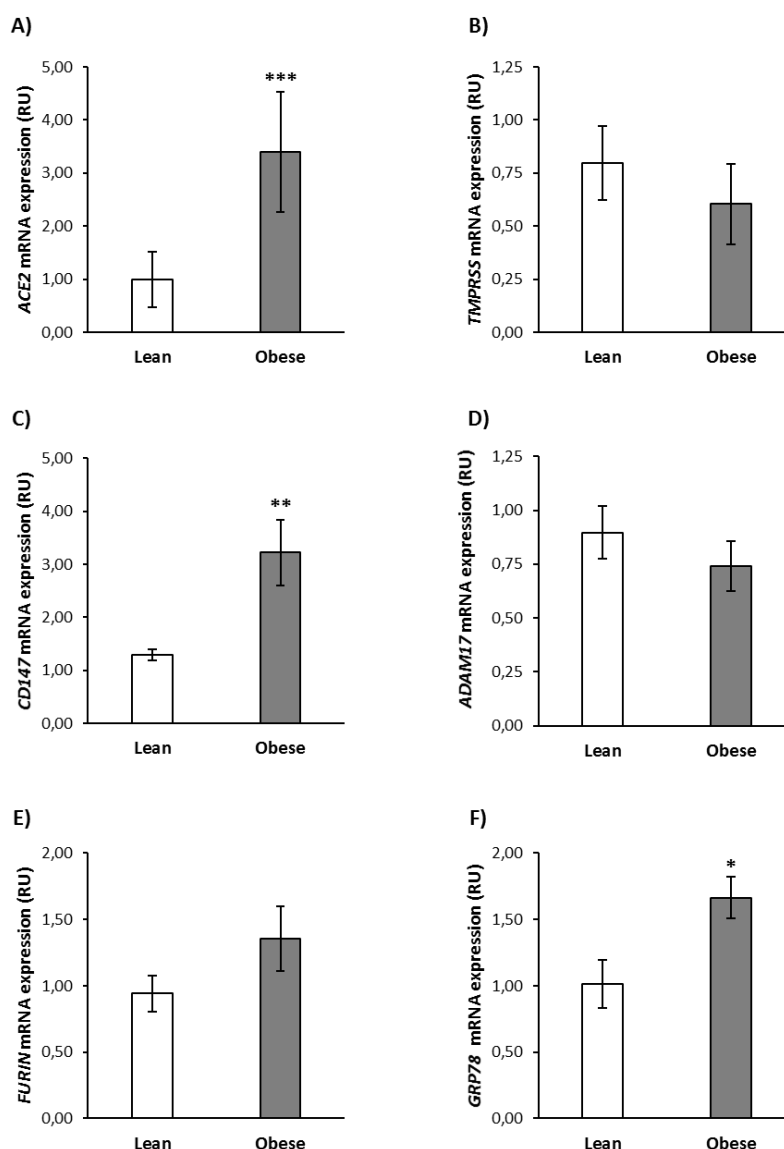


Figura 1. Valutazione dei livelli di espressione dei geni identificati come specifici interattori di SARS-CoV-2 in PBL di soggetti con obesità e soggetti magri. Espressione genica di *ACE2* (A), *TMPRSS2* (B), *CD147* (C), *ADAM17* (D), *FURIN* (E) e *GRP78* (F) è stata misurata mediante qPCR in PBL da soggetti magri (Lean) e soggetti con obesità (Obese). I risultati sono mostrati come media $\pm$ SE. Le differenze statistiche tra i gruppi sono state calcolate mediante t-test students. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ vs Lean.

Parallelamente a quanto sopra descritto, è stata determinata, mediante tecnica di “quantitative PCR” (qPCR) con chimica SybrGreen, l’espressione di *ACE2*, *TMPRSS2*, *CD147*, *ADAM17*, e *FURIN* anche sui campioni di mRNA delle APC del tessuto adiposo sottocutaneo. Attraverso tale analisi è stato riscontrato un aumento di circa 3 volte dei livelli di espressione del gene *ACE2* ($p < 0,05$; Figura 2A) e di circa 2 volte del gene *FURIN* ($p < 0,05$; Figura 2E) nei soggetti con obesità rispetto ai soggetti magri di controllo, rispettivamente. Non sono state invece riscontrate differenze statisticamente significative nei livelli di espressione dei geni *TMPRSS2* (Figura 2B), *CD147* (Figura 2C), e *ADAM17* (Figura 2D) tra i soggetti con obesità ed i soggetti magri di controllo.

Pertanto, dal raffronto dei dati di espressione genica ottenuti sia nelle PBL che nelle APC della popolazione oggetto del nostro studio si conferma la sovra-espressione di *ACE2* nei soggetti con obesità.

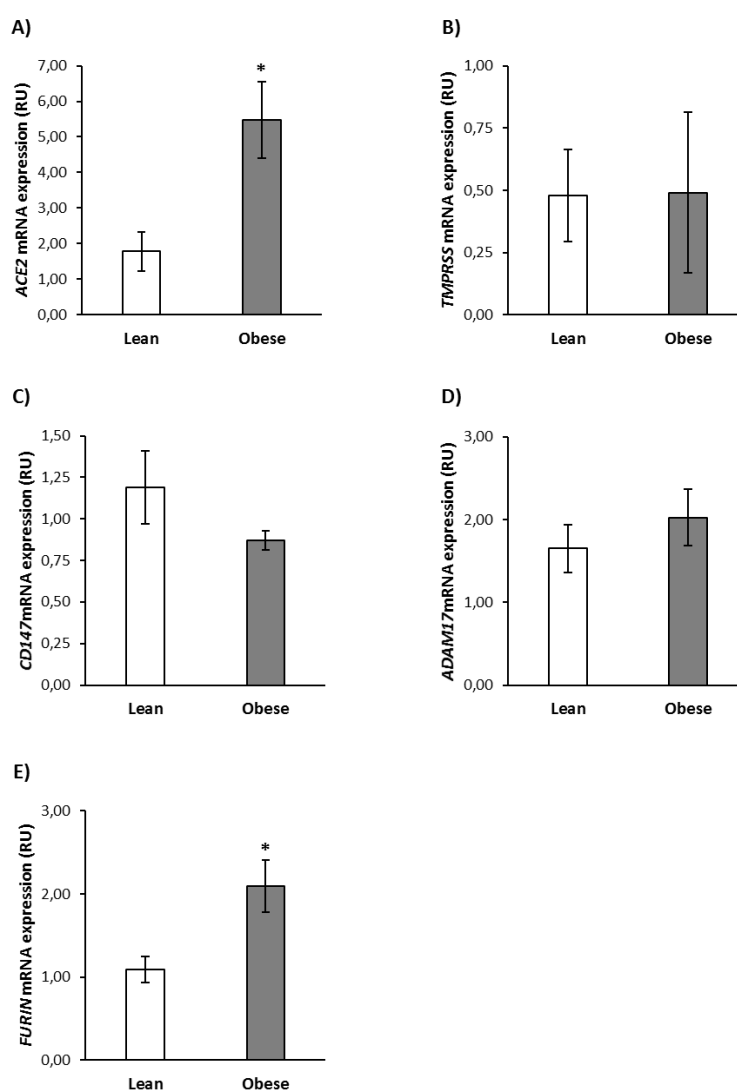


Figura 2. Valutazione dei livelli di espressione dei geni identificati come specifici interattori di SARS-CoV-2 in APC di soggetti con obesità e soggetti magri. Espressione genica di *ACE2* (A), *TMPRSS2* (B), *CD147* (C), *ADAM17* (D), e *FURIN* (E) è stata misurata mediante qPCR in APC del tessuto adiposo sottocutaneo da soggetti magri (Lean) e soggetti con obesità (Obese). I risultati sono mostrati come media $\pm$ SE. Le differenze statistiche tra i gruppi sono state calcolate mediante t-test students. * $p < 0,05$ vs Lean.

Con lo scopo di ampliare i risultati, e quindi conferire maggiore solidità alla presente proposta di ricerca, è stato inoltre eseguito uno studio della letteratura recente relativa alla pandemia di COVID-19. Da tale studio è stata identificata come molecola di particolare interesse biologico e potenzialmente valevole di valutazioni nella nostra casistica di studio la proteina 2'-5'-oligoadenylate synthetase 1 (OAS1). OAS1 appartiene alla famiglia delle proteine OAS coinvolte nella risposta immunitaria innata contro i virus a RNA. Queste proteine sono degli enzimi con attività di RNasi L, sono indotte dagli interferoni e determinano la distruzione endogene dell'RNA virale (doi: 10.1128/JVI.01003-10). Pertanto, OAS1 ha un'attività biologica plausibile contro SARS-CoV-2. Inoltre, recentemente è emerso che aumentati livelli sierici di OAS1 riscontrati in individui nello stato non infettivo sono fortemente associati ad un ridotto rischio di suscettibilità al COVID-19 nonché ad un ridotto rischio di malattia COVID-19 molto grave o di ospedalizzazione a seguito di COVID-19 (<https://doi.org/10.1038/s41591-021-01281-1>). Quanto detto sostiene un ruolo protettivo di OAS1 negli esiti avversi di COVID-19. Sui campioni di mRNA delle APC è stata dunque determinata, mediante tecnica di "quantitative PCR" (qPCR) con chimica SybrGreen, l'espressione genica di *OAS1*. Attraverso tale analisi è stato riscontrato una riduzione di circa il 60% dei livelli di espressione del gene *OAS1* ($p < 0,01$; Figura 3) nei soggetti con obesità rispetto ai soggetti magri di controllo. Tale dato suggerisce che nei soggetti con obesità l'aumentata suscettibilità ad una forma più grave di COVID-19 possa essere correlata alla ridotta espressione del fattore protettivo OAS1.

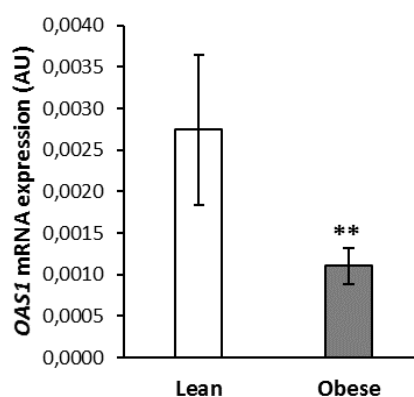


Figura 3. Valutazione dei livelli di espressione del gene *OAS1* in APC di soggetti con obesità e soggetti magri. Espressione genica di *OAS1* è stata misurata mediante qPCR in APC del tessuto adiposo sottocutaneo da soggetti magri (Lean) e soggetti con obesità (Obese). I risultati sono mostrati come media $\pm$ SE. Le differenze statistiche tra i gruppi sono state calcolate mediante t-test students. ** $p < 0,01$ vs Lean.

Attualmente, sono in corso esperimenti di Western Blotting per valutare i livelli di espressione proteica delle molecole sovra citate nei campioni biologici della popolazione oggetto di studio. Tali ulteriori esperimenti dovrebbero consentire di completare il quadro delle informazioni necessarie per identificare fattori con espressione differenziale tra soggetti obesi con o senza alterata tolleranza al glucosio (IGT o T2D) e soggetti magri e che potrebbero essere responsabili degli "outcome" negativi della popolazione obesa a seguito di infezione con SARS-CoV-2 e sviluppo della patologia COVID-19.



PROGETTO SHARCODE - RELAZIONE TECNICA STATO AVANZAMENTO DEL LAVORO I (SAL I)

Responsabile Scientifico:

Prof. Francesco BEGUINOT - Presidente del CdA di COEPICA s.c.a.r.l

Periodo Attività: 01/02/2023 – 12/07/2023

Sede operativa: Laboratori COEPICA scarl - Napoli, Via S. Pansini 5, 80131

WP 2 - Generazione di un lab-on-chip (LOC) per la predizione del rischio/gravità del COVID-19 nei soggetti diabetici o a rischio di diabete o obesi.

Descrizione risultati intermedi: La risonanza plasmonica di superficie (Surface Plasmon Resonance, SPR) è una tecnica molto sensibile volta a determinare le variazioni di indice di rifrazione all'interfaccia tra uno strato metallico e un mezzo dielettrico. Questo fenomeno è alla base di molti strumenti standard per la misurazione dell'adsorbimento del materiale su superfici metalliche (in genere oro), ed è una tecnica ampiamente usata come principio di rilevamento per molti sensori Lab on Chip (LOC) operanti nella diagnostica medica.

Sulla base dell'esperienza acquisita nel tempo, grazie alla condivisione di conoscenza con l'azienda privata Optosensing SRL (co-fondatore di COEPICA s.c.a.r.l) nel corso del progetto "Comorbidità ed Epigenetica del Cancro" (COEPICA; Regione Campania POR FESR 2014-2020 Objective 1.2. Realization of Technology Platform to fight oncologic diseases - CUP B63D18000640007), in questa fase dello studio è stato avviato il processo di progettazione del modello di prototipo LOC che si baserà sul principio di riconoscimento anticorpo-proteina. Pertanto, il dispositivo LOC prevederà la sua integrazione con anticorpi specifici che riconoscano proteine associate ad una maggiore gravità/rischio di COVID-19 in popolazioni di soggetti obesi e/o diabetici.

All'uopo è già stata identificata la proteina Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), specifico recettore di membrana per la glicoproteina spike (S) del virus SARS-CoV-2 e dunque necessaria per l'ingresso del virus nelle cellule ospiti, la cui espressione genica, come riportato nella relazione tecnica del WP1, risulta essere aumentata sia nei pre-adipociti (Adipocyte Precursor Cells, APC) che nelle cellule bianche del sangue periferico (Peripheral Blood Leukocytes, PBL) di soggetti obesi con o senza alterata tolleranza al glucosio (IGT o T2D) rispetto ad individui magri.

Tale prototipo, inoltre, sarà funzionalizzato anche per ulteriori marcatori proteici che verranno identificati nel corso del WP1. Ad oggi la proteina 2'-5'-oligoadenylate synthetase 1 (OAS1), identificata in individui nello stato non infettivo come fattore protettivo alla suscettibilità al COVID-19 nonché ad un ridotto rischio di malattia COVID-19 molto grave o di ospedalizzazione a seguito di COVID-19, e la cui espressione invece risulta essere ridotta nelle APC dei soggetti obesi con o senza alterata tolleranza al glucosio (IGT o T2D) rispetto ad individui magri, risulta essere un potenziale marcatore di interesse per l'ulteriore funzionalizzazione del LOC.



Nel prossimo futuro, si prevede la messa in punto del prototipo LOC con i marcatori identificati e selezionati nel WP1 (ACE2, OAS1, etc.) e la determinazione delle prestazioni del LOC saranno validate utilizzando campioni clinicamente rilevanti.