INTERAZIONI TRA PARTICOLATO E VIRUS SARS-COV-2

L'APPROCCIO IN SILICO DEI RICERCATORI ENEA, BASATO SU SIMULAZIONI NUMERICHE, HA MOSTRATO COME VIRUS E PARTICOLATO TENDANO A INTERAGIRE. SERVONO ULTERIORI STUDI PER CAPIRE SE IL LORO LEGAME RIMANE STABILE DURANTE I PROCESSI DI DISPERSIONE E TRASFORMAZIONE DEL PM IN ATMOSFERA E SE IL VIRUS RIMANE VITALE E INFETTIVO.

a possibilità che il particolato atmosferico (PM) possa agire da vettore nella trasmissione aerodispersa del virus Sars-cov-2 è ancora oggi una questione controversa e oggetto di dibattito (Anand et al., 2021). Per poter funzionare da vettore il PM deve possedere alcune caratteristiche specifiche. In particolare, deve essere in grado di "legare" il virus instaurando una serie di interazioni più o meno specifiche con le proteine virali di superficie. Allo stesso tempo, la stabilità del legame tra il PM e il virus deve essere mantenuta durante tutti i processi di dispersione e trasformazione in atmosfera del particolato, senza che la conformazione molecolare delle proteine virali, e

l'integrità del virus stesso, vengano compromessi. Inoltre in qualità di vettore, il PM deve anche essere in grado di rilasciare il virus quando quest'ultimo entra in contatto con la cellula ospite a livello dell'apparato respiratorio, per consentirne il legame specifico con il bersaglio molecolare, l'enzima 2 convertitore dell'angiotensina (ACE2). Nell'ambito del progetto Pulvirus, per verificare la presenza di alcune delle caratteristiche sopraelencate, è stato allestito un esperimento in silico, basato sull'uso delle simulazioni numeriche di dinamica molecolare classica, sfruttando il calcolo ad alte prestazioni (Hpc) fornito dall'infrastruttura Enea-Cresco 6 (Iannone et al. 2019).

Cosa sono le simulazioni di dinamica molecolare classica?

Le simulazioni di dinamica molecolare classica sono in grado di prevedere – sulla base di un modello generale della fisica che governa le interazioni inter atomiche – l'evoluzione temporale delle posizioni di ogni atomo in un sistema, mediante l'integrazione delle loro equazioni di moto (Hollingsworth, 2018). Il risultato di una simulazione è una traiettoria delle configurazioni molecolari, in funzione del tempo, del sistema simulato. Pertanto, mediante le simulazioni è possibile ottenere una mappa dinamica delle interazioni di un complesso molecolare,

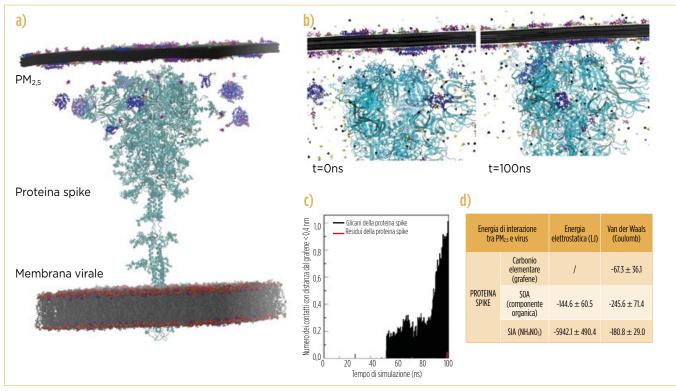


FIG. 1 MODELLO STRUTTURALE DEL COMPLESSO PM/VIRUS

a) Modello dell'interfaccia PM_{2.5}/Sars-cov-2.

b) Istantanee estratte dalla traiettoria di simulazione della durata totale di 100 ns. Nelle immagini sono mostrati il foglietto di grafene (grigio) che mima il nucleo carbonioso del PM, le molecole di benzo[a]pirene (rosso), acido palmitico (blu), acido ftalico (arancio), levoglucosano (porpora), acido ossalico (verde), NH₄ NO₃ (nero e giallo), la proteina spike (ciano) e i glicani (ciano chiaro).

c) Numero dei contatti a una distanza inferiore di 0,4 nm dal foglietto di grafene a carico dei glicani (istogramma nero) e dei residui (istogramma rosso) della proteina spike in funzione del tempo di simulazione d) Energie di interazione medie calcolate negli ultimi 50 ns di simulazione.

ad esempio tra il PM (vettore) e il virus (trasportato), con una risoluzione spaziale e temporale difficilmente accessibile alle tecniche sperimentali.

La costruzione del modello strutturale del complesso PM/virus

All'interno del progetto Pulvirus, per identificare le potenziali interazioni molecolari e quantificare la stabilità del legame tra il particolato e Sars-cov-2, è stato realizzato un complesso che

rappresenta una possibile interfaccia PM/virus (figura 1a). Per ridurre il costo computazionale, la strategia adottata è consistita nella realizzazione di modelli semplificati di particolato e di Sars-cov-2. Per rappresentare il virus, è stato realizzato un frammento della membrana lipidica dell'involucro virale nel quale è stato inserito il modello strutturale della glicoproteina di superficie spike (Woo et al., 2020). La costruzione del modello strutturale del PM ha richiesto un enorme sforzo di modellazione a causa delle scarsissime informazioni disponibili riguardo i modelli di struttura

di aerosol secondario. Un modello semplificato di una porzione di PM_{2,5} è stato in particolare realizzato a partire da una tipica composizione chimica registrata in campioni (filtri) raccolti dal Laboratorio di inquinamento atmosferico dell'Enea durante la stagione invernale 2021 nell'area padana. In base ai dati raccolti, il PM_{2.5} viene a essere costituito da oltre il 50% da nitrato di ammonio, che nel modello rappresenta la frazione di aerosol secondario inorganico (Sia), e da una miscela eterogenea di composti organici rappresentativi delle classi di molecole (idrocarburi aromatici

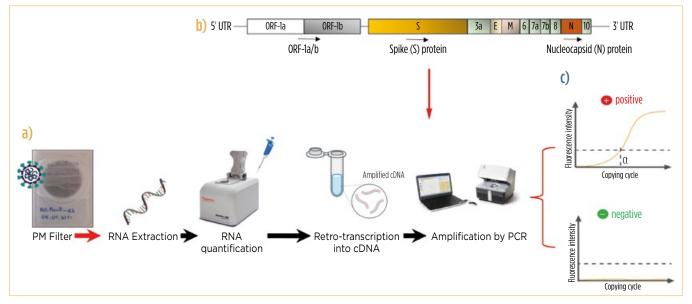


FIG. 2 PRESENZA DEL GENOMA VIRALE SUI FILTRI PER IL CAMPIONAMENTO DEL PM

- a) Organizzazione del genoma di Sars-cov-2.
- b) Workflow dell'approccio sperimentale.
- c) Esempio di curve di amplificazioni positive e negative di un gene.



policiclici, carboidrati, acidi alcaloidi, acidi aromatici e acidi alifatici) che costituiscono la frazione di aerosol secondario organico (Soa). Il nucleo di carbonio elementare di un tipico PM_{2,5} è stato invece semplificato costruendo un foglietto di grafene a tre strati. Questo modello è stato sottoposto a simulazione di dinamica molecolare per permettere ai composti organici e inorganici di stratificarsi sul foglietto di grafene, mimando la disposizione delle molecole attorno al nucleo di carbonio del PM_{2,5}.

La simulazione dell'interazione tra PM_{2.5} e la proteina spike

Il complesso PM_{2.5}-spike è stato successivamente sottoposto a simulazione numerica per seguire la dinamica del potenziale legame tra particolato e virus e quantificare la loro stabilità. L'analisi della traiettoria di simulazione dell'interazione tra il modello rappresentativo del virus e il frammento di particolato ha dimostrato che la proteina spike, durante 100 nanosecondi di simulazione, tende ad avvicinarsi al foglietto di grafene (figura 1b) e che un ruolo importante per il legame con il nucleo carbonioso del PM viene giocato dagli zuccheri (glicani) che rivestono la proteina spike. Come mostrato nella figura 1c sono proprio i glicani della proteina, dopo circa 50 ns di simulazione, a instaurare numerosi contatti ravvicinati (<0,4 nm) con gli atomi del foglietto di grafene. La stabilità del legame è stata stimata mediante l'analisi delle energia di interazione, ovvero delle forze elettrostatiche e di van der Waals. I risultati di questa analisi sono riassunti nella figura 1d e mostrano che sono soprattutto i componenti inorganici del particolato a svolgere un ruolo di "legante" fra il virus e la parte carboniosa del PM.

Presenza del genoma virale sui filtri per il campionamento del PM

Accanto all'approccio *in silico* sono state effettuate anche delle analisi atte a verificare l'eventuale presenza del genoma a Rna di Sars-cov-2 su campioni di PM_{2.5} raccolti nella città di Bologna tra il 19 gennaio e il 6 febbraio 2021. Dai filtri di fibra di quarzo usati per il campionamento del PM_{2.5} è stato estratto l'Rna genomico virale, successivamente purificato, applicando un protocollo specifico, ottimizzato

in Enea, per aumentare resa, stabilità e integrità dell'Rna genomico¹. Dopo la quantificazione spettrofotometrica, l'Rna è stato retro-trascritto e analizzato mediante quantitative real-time Pcr2, utilizzando sonde specifiche3 per tre geni virali – ORF-1a/b, proteina spike (S) e proteina del nucleocapside (N) - di Sars-cov-2 (figura 2a). Mediante qPCR, la sequenza ORF-1a/b è stata individuata in 6 campioni, la N in 3 e la S solamente in 1 filtro su 15 totali. In particolare, nessuna delle tre sequenze è stata rilevata contemporaneamente su un unico filtro. Il workflow dell'approccio sperimentale condotto è riportato nella figura 2b. Il grafico di amplificazione dei campioni viene riportato nella figura 2c dove sono stati considerati positivi (presenza del genoma virale) tutti i valori di CT compresi nell'intervallo tra 36 e 40 cicli di amplificazione.

Conclusioni

I principali risultati di questo studio risiedono nel raggiungimento, per la prima volta, di un modello strutturale di PM fine e di una prima caratterizzazione dell'interfaccia PM/virus, attraverso simulazioni di dinamica molecolare classica⁴. Inoltre, l'approccio integrato,

basato sulla caratterizzazione della presenza del genoma di Sars-cov-2 su filtri di quarzo PM_{2.5} raccolti nell'area di Bologna nell'inverno 2021, combinata con gli esperimenti in silico dell'interazione tra la superficie del virus e un modello di particolato fine, ha dimostrato che, sebbene il ruolo del PM come vettore del virus non sia da escludere, questi esperimenti non sono in grado di concludere se il legame rimane stabile per tutta la durata dei processi di dispersione e trasformazione del PM in atmosfera e se lo stesso virus rimane vitale e infettivo. Ulteriori studi sono necessari per chiarire questi aspetti.

A cura del gruppo di lavoro per la realizzazione dell'obiettivo 5.1 del progetto Pulvirus

NOTE

- ¹ L'Rna genomico virale è stato estratto mediante Trizol® (Thermo Fisher) e purificato su Quick-Rna Miniprep Kit (Zymo Research).
- ² qPCR: Eco-Illumina.
- ³ Sonde TaqMan 2019-nCoV Assay Kit v1.
- ⁴ I risultati di questo lavoro sono sottomessi alla rivista scientifica *peer-reviewed "The Science of the Total Environment"*.

GRUPPO DI LAVORO OBIETTIVO 5.1 PULVIRUS

Caterina Arcangeli¹, Alice Romeo², Roberto Pellegrini^{1,2}, Maurizio Gualtieri³, Barbara Benassi¹, Massimo Santoro¹, Federico Iacovelli², Milena Stracquadanio³, Mattia Falconi², Carmela Marino¹, Gabriele Zanini³

- 1. Divisione Tecnologie e metodologie per la salvaguardia della salute, Enea, Roma
- 2. Dipartimento di Biologia, Università di Tor Vergata, Roma
- 3. Divisione Modelli e tecnologie per la riduzione degli impatti antropici e dei rischi naturali, Enea, Bologna

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Anand U., Cabreros C., Mal, J., Ballesteros F., Sillanpää M., Tripathi V., Bontempi E., 2021, "Novel coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic: From transmission to control with an interdisciplinary vision", *Environmental Research*, 197, 111126, https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111126.

lannone F., Ambrosino F., Bracco G., De Rosa M., Funel A., Guarnieri G., Migliori S., Palombi F., Ponti G., Santomauro G., Procacci P., 2019, "Cresco Enea HPC clusters: a working example of a multifabric GPFS Spectrum Scale layout", *International Conference on High Performance Computing & Simulation* (HPCS). Presented at the 2019 International Conference on High Performance Computing & Simulation (HPCS), pp. 1051-1052, https://doi.org/10.1109/HPCS48598.2019.9188135.

Hollingsworth S.A., Dror R.O., 2018, "Molecular dynamics simulation for all", *Neuron*, 99, 1129–1143, https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.08.011.

Woo H., Park S.-J., Choi Y.K., Park T., Tanveer M., Cao Y., Kern N.R., Lee J., Yeom M.S., Croll T.I., Seok C., Im W., 2020, "Developing a fully glycosylated full-length Sars-cov-2 spike protein model in a viral membrane", *The Journal of Physical Chemistry B*, 124, 7128–7137, https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.0c04553.