

natura > articoli > articolo

Scarica il pdf

 $\overline{\mathbf{\Lambda}}$ 

#### Articolo | Pubblicato: 07 aprile 2021

# I farmaci che inibiscono le proteine TMEM16 bloccano la sincizia indotta da spike SARS-CoV-2

Luca Braga ,Hashim Ali ,Ilaria Secco ,Elena Chiavacci ,Guilherme Neves ,Daniel Goldhill ,Rebecca Penn ,Jose M. Jimenez-Guardeño ,Ana M. Ortega-Prieto ,Rossana Bussani ,Antonio Cannatà ,Giorgia Rizzari ,Chiara Collesi ,Edoardo Schneider ,Daniele Arosio ,Ajay M. Shah ,Wendy S. Barclay ,Michael H. Malim ,Juan Burrone eMauro Giacca 🖂

Nature (2021) 40k accessi | 1 Citazioni | 706 Altmetric | Metrica

#### Astratto

COVID-19 è una malattia con caratteristiche uniche che includono trombosi polmonare <sup>1</sup>, diarrea frequente <sup>2</sup>, attivazione anormale della risposta infiammatoria <sup>3</sup> e rapido deterioramento della funzione polmonare compatibile con edema alveolare <sup>4</sup>. Il substrato patologico per questi risultati rimane sconosciuto. Qui mostriamo che i polmoni dei pazienti con COVID-19 contengono pneumociti infetti con morfologia anormale e frequente multinucleazione. La generazione di questi sincizi deriva dall'attivazione della proteina spike SARS-CoV-2 a livello della membrana plasmatica cellulare. Sulla base di queste osservazioni, abbiamo eseguito due screening basati su microscopia ad alto contenuto con oltre 3.000 farmaci approvati per cercare inibitori della sincizia spike-driven. Siamo confluiti nell'identificazione di 83 farmaci che inibivano la fusione cellulare mediata da spike, molti dei quali appartenevano a classi farmacologiche definite. Abbiamo concentrato la nostra attenzione su farmaci efficaci

#### Drugs that inhibit TMEM16 proteins block SARS-CoV-2 spike-induced syncytia | Nature

che proteggessero anche dalla replicazione del virus e dalla citopatia associata. Una delle molecole più efficaci era il farmaco antielmintico niclosamide, che ha notevolmente attenuato le oscillazioni del calcio e la conduttanza della membrana nelle cellule che esprimono picchi sopprimendo l'attività di TMEM16F (noto anche come anoctamina 6), un canale ionico attivato dal calcio e scramblase che è responsabile dell'esposizione della fosfatidilserina sulla superficie cellulare. Questi risultati suggeriscono un potenziale meccanismo per la patogenesi della malattia COVID-19 e supportano il riutilizzo della niclosamide per la terapia.

#### Download PDF

#### **Principale**

Una delle caratteristiche distintive della biologia del coronavirus è il processo coordinato mediante il quale il virus si lega ed entra nella cellula ospite, che coinvolge sia l'aggancio ai recettori sulla superficie cellulare (ACE2 per SARS-CoV2  $^5$  ), sia l'attivazione proteolitica della proteina spike da parte di ospitare proteasi codificate in due siti distinti  $^{6}$ . Una fase di attivazione è la scissione dei picchi al confine S1 – S2, che può verificarsi prima o dopo il legame del recettore. Una seconda attivazione proteolitica espone la porzione S2 e innesca S2 per la fusione del virus e delle membrane cellulari. L'evento di innesco della proteasi in questo sito S2 ' e la successiva fusione possono verificarsi dopo l'endocitosi, in cui la scissione viene eseguita da proteasi endosomiali a basso pH attivate come la catepsina B e la catepsina L<sup>7</sup>, o sulla membrana plasmatica, dove la scissione può essere mediata da TMPRSS2<sup>8,9,10</sup>. Le proteine spike di MERS-CoV e SARS-CoV-2 possiedono una sequenza di amminoacidi multibasici all'interfaccia S1 – S2, che non è presente in SARS-CoV<sup>11</sup>, che consente anche la scissione da parte della serina proteasi furina<sup>12</sup>,  $^{13}$  espressa in modo ubiquitario  $^{,\,14}$  . Di conseguenza, le cellule che esprimono la proteina spike MERS-CoV e SARS-CoV-2 sulla membrana plasmatica possono fondersi con altre cellule che esprimono i rispettivi recettori e formare sincizi.

#### Sincitia pneumocitaria nei polmoni COVID-19

Abbiamo esaminato gli organi di 41 pazienti consecutivi deceduti per COVID-19 nel periodo da marzo a maggio 2020 presso l'Ospedale Universitario di Trieste, in Italia. In precedenza è stata riportata un'analisi dettagliata post mortem di questi pazienti <sup>15</sup>. Oltre al danno alveolare diffuso, alla trombosi frequente e all'estesa sostituzione fibrotica, un riscontro peculiare è stata la presenza, in quasi il 90% di questi pazienti, di cellule atipiche con la caratteristica di sincizia, che mostrano un ampio citoplasma contenente un numero variabile di nuclei da 2 a più di 20 (mostrato in Fig. 1aper 4 pazienti). La maggior parte di queste cellule sinciziali erano pneumociti in buona fede, poiché esprimevano due marcatori specifici dei pneumociti (napsina e surfattante B) ed erano positive per l'RNA virale mediante ibridazione in situ (Dati estesi Fig. 1a, b).



a, Analisi istologica post-mortem dei polmoni di pazienti con COVID-19 che mostra sincizi multinucleati. Ingrandimento originale, × 40. Un'ulteriore caratterizzazione di questi pazienti è stata precedentemente riportata <sup>15</sup>. **b**, Formazione di sincizi dopo 24 ore di espressione di spike nelle cellule Vero. Nuclei in bianco; contorni cellulari in rosso utilizzando agglutinina di germe di grano (WGA); proteine spike in verde. Barre della scala, 200 µm. c , screening SIA. S, spike. d, flusso di lavoro di analisi delle immagini; i sincizi sono stati definiti come cellule che mostrano un ammasso di nuclei con un'area almeno cinque volte più grande della media dell'area delle cellule non fuse. Barra della scala, 500 µm. e, Risultati dello screening SIA. La percentuale di sincizia normalizzata sul totale delle cellule viene tracciata come punteggio z . I composti con un punteggio  $z \leq$ -2,58 (linea tratteggiata rossa, 0,005% della coda) sono visualizzati in rosso; quelli tra  $\leq -1,96$  (0,025% coda, linea tratteggiata blu) e -2,58 area in blu. Sono indicati quattro farmaci che sono stati ulteriormente studiati con l'infezione virale. CLO, clofazimina; NIC, niclosamide; SAL, salinomicina; SER, sertralina. f, Effetto della niclosamide sulla sincizia. I sincizi spike-positivi sono in verde; i nuclei sono in blu; il corpo cellulare è in rosso usando HCS CellMask DeepRed. La percentuale di nuclei all'interno in sincizia rispetto ai nuclei totali è mostrata in basso. Barra della scala, 500 µm. I numeri su alcune immagini indicano bene la proiezione. Le immagini sono rappresentative di 25 per pozzetto; lo screening è stato eseguito in duplicato.

#### Proprietà fusogeniche della proteina spike

La presenza di cellule fuse nei polmoni dei pazienti con COVID-19 deriva probabilmente dall'attività fusogenica della proteina spike SARS-CoV-2. In vitro, l'espressione di cDNA spike ottimizzato per il codone nelle cellule Vero ha portato alla cospicua presenza di sincizi (Fig. 1b ). La presenza di proteine spike sulla membrana plasmatica ha anche innescato la fusione di cellule eterologhe quando queste esprimevano il recettore ACE2. Il video supplementare 1 mostra l'effetto della cocoltura, per 12 ore, di cellule U2OS umane transfettate con spike (che hanno livelli non rilevabili di ACE2) con cellule Vero trasfettate con proteine fluorescenti verdi (eGFP) potenziate. La fusione cellulare progressiva ed eterologa è continuata durante il periodo di osservazione di 12 ore.

A ingrandimento maggiore, le cellule Vero che esprimono spike e le sincizie spike positive hanno proiettato un numero notevole di protrusioni della membrana plasmatica, mostrando estensioni filopodia e contattando la membrana plasmatica delle cellule vicine (Extended Data Fig. 1c ). Queste cellule che esprimono picchi e sincizi hanno mostrato transitori improvvisi di calcio (Ca <sup>2+</sup> ) nel loro citoplasma, come visualizzato dalla trasfezione del sensore Ca <sup>2+</sup> fluorescente GCaMP6s (Video supplementari 2, 3 ).

In contrasto con la proteina spike SARS-CoV-2, non è stata osservata formazione di sincizi quando è stata espressa la spike da SARS-CoV, mentre la spike MERS-CoV era anche marcatamente sincitiogenica (Extended Data Fig. 1d, e).

#### Screening per farmaci che bloccano la sincizia

Volevamo trovare farmaci approvati clinicamente che inibissero la fusione cellulare mediata da spike SARS-CoV-2. Abbiamo sviluppato due saggi per lo screening ad alto rendimento (HTS) utilizzando immagini ad alto contenuto. Il primo era basato sulla fusione eterologa tra Vero e cellule U2OS che esprimono spike (test di inibizione della fusione cellulare (CFIA)), mentre il secondo era basato sull'espressione diretta della proteina spike nelle cellule Vero (test di inibizione della sincizia (SIA)). Con questi due test, abbiamo esaminato due librerie di farmaci approvate dalla FDA / EMA (Prestwick Chemical Library e The Spectrum Collection, MicroSource (MS) Discovery), per un totale di 3.825 farmaci. Poiché 776 farmaci sono comuni alle due librerie, ciò equivale a 3.049 diverse piccole molecole.

Il CFIA ei suoi risultati sono mostrati nella Figura 2a - g dei dati estesi . Per lo screening SIA, abbiamo espresso la proteina spike per 15 ore, incubato le cellule con i farmaci per altre 24 ore e poi abbiamo ripreso e quantificato la sincizia (Fig. 1c ). Questo screening ha rivelato 57 farmaci della Prestwick e 84 farmaci della libreria MS Discovery che hanno inibito la fusione mediata da spike con un punteggio *z* inferiore a -1,96 (0,025% coda della distribuzione), di cui 37 e 47, rispettivamente, avevano *z* punteggi <-2,58 (0,005% della coda) (mostrato in rosso nella Fig. 1e ed elencato nella Tabella supplementare 2 ). Tutti i pozzetti trattati con dimetilsolfossido (DMSO) per entrambe le librerie avevano una zpunteggio nell'intervallo  $\pm$  0,25. La distribuzione dei risultati per ciascuna delle due librerie è mostrata in Extended Data Fig. 3a, b . Per quanto riguarda CFIA, c'era una significativa correlazione di effetto per i farmaci comuni nelle due librerie (Extended Data Fig. 3c ) (*P* <0.0001, *R*<sup>2</sup> = 0.18). Le immagini rappresentative dello screening sono mostrate nella Fig. 1f per la niclosamide, la migliore hit nel Prestwick e la seconda nella libreria MS Discovery, e nella Fig. 3d Extended Data per altri farmaci efficaci. Le curve dose-risposta per l'inibizione della sincizia per tre farmaci selezionati (niclosamide, clofazimina e salinomicina) sono mostrate nelle Figure dei dati estesi. 3eper celle Vero e HEK293. Dati estesi La Fig. 4a mostra i risultati dello screening SIA secondo classi di farmaci terapeutici.

#### Effetto antivirale dei farmaci

Gli screening CFIA e SIA hanno identificato cumulativamente 83 farmaci con un punteggio z inferiore a -2,58 (Extended Data Fig. 4b ). La scelta per ulteriori studi ha preso in considerazione i seguenti criteri: (1) effetto inibitorio comune nei due screening; (2) efficacia relativa all'interno di classi di farmaci specifiche; e (3) l'idoneità farmacologica all'applicazione clinica. Sulla base di questi criteri, abbiamo valutato l'effetto di 43 farmaci sull'infezione da SARS-CoV-2 (elenco dei farmaci in Extended Data Fig. 5a ). Le cellule Vero sono state infettate con il ceppo SARS-CoV-2 IC19 / 2020 (dose infettiva mediana della coltura tissutale (TCID  $_{50}$ ) di 100 per pozzetto) in presenza di 10 µM di farmaci in piastre da 96 pozzetti. La capacità dei farmaci di proteggere le cellule dagli effetti citopatici virali è stata analizzata dopo 5 giorni (Extended Data Fig. 5b ). Tra i farmaci più efficaci, abbiamo selezionato un antistaminico (deptropina), un antidepressivo (sertralina) e l'antibiotico antileprotico clofazimina per ulteriori studi. Anche la niclosamide e la salinomicina, che hanno ottenuto un punteggio citotossico a 10 µM in assenza del virus (non mostrato), sono state selezionate, poiché questi farmaci erano tra i più efficaci nello screening SIA.

I cinque farmaci selezionati sono stati ulteriormente valutati per la protezione cellulare contro la morte cellulare indotta da virus in una gamma di dosi, seguita dall'analisi della sopravvivenza cellulare dopo cinque giorni. La niclosamide, la clofazimina e la salinomicina sono state le più efficaci in questo test di protezione cellulare (Extended Data Fig. 5c) e sono state quindi scelte per ulteriori test della funzione antivirale.

Le cellule Vero sono state infettate in triplicato con SARS-CoV-2 (molteplicità di infezione (MOI) 0,05) in presenza di concentrazioni di farmaco crescenti; i supernatanti di coltura sono stati raccolti 48 ore dopo la stimolazione virale e la produzione di virus infettivo è stata determinata mediante analisi della placca (Fig. 2a ). La niclosamide e la salinomicina hanno mostrato valori di concentrazione inibitoria metà massima (IC  $_{50}$ ) simili rispettivamente di 0,34 µM e 0,22 µM, mentre la clofazimina era circa 10 volte meno potente (IC  $_{50}$  di 2,56 µM). Tutti e tre i farmaci hanno anche inibito la replicazione virale nelle cellule Calu-3 respiratorie (Extended Data Fig. 5d ). Le immagini rappresentative della sincizia Calu-3 infettata da SARS-CoV-2 sono mostrate nella Fig. 5e dei dati estesi. Da notare, le cellule ancora infettate in presenza di niclosamide non erano più sinciziali (Extended Data Fig. 5f ).

Fig. 2: Effetti dei farmaci sulla replicazione della SARS-CoV-2 e sulle oscillazioni intracellulari del calcio.



a, Inibizione della replicazione di SARS-CoV-2. Le cellule Vero E6 sono state trattate con le concentrazioni di farmaco indicate per 2 ore, seguite dall'aggiunta di SARS-CoV-2 (MOI 0,05). Dopo 1 ora, le cellule sono state lavate e coltivate in terreno contenente farmaco per 48 ore. La produzione di virus nei supernatanti della coltura è stata quantificata mediante dosaggio della placca utilizzando cellule Vero E6. I dati sono media  $\pm$  sd; n = 3. **b**, Frame rappresentativi (da un totale di 600) da un filmato time-lapse di 12 ore di una co-coltura di cellule Vero che esprimono il sensore Ca<sup>2+</sup> GCaMP6s e cellule U2OS trasfettate con proteina spike e mCherry. Le punte delle frecce indicano oscillazioni di Ca<sup>2+</sup> nelle cellule che esprimono GCaMP6s-ACE2 guando si fondono con cellule che esprimono spike. Vedere il video supplementare 4per film accelerato. c , oscillazioni di Ca<sup>2+</sup> durante la formazione di sincizi. Fotogrammi rappresentativi (da un totale di 400) da un filmato time-lapse di 12 ore di cellule Vero che esprimono picchi. Le punte delle frecce indicano che le cellule si stanno fondendo progressivamente in un sincizio e mostrano intensi picchi di Ca<sup>2+</sup>. Vedere il video supplementare 5 per il filmato time-lapse (filmato nel pannello in alto a sinistra, etichettato "DMSO"). d,

intensità GCaMP nel tempo. Le cellule Vero sono state co-trasfettate con GCaMP6 e un vettore di espressione o di controllo e trattate con i farmaci indicati. I dati sono espressi come variazione della fluorescenza ( $\Delta F / F$ ) nel tempo (min); ogni riga è 1 di almeno 12 180 µm <sup>2</sup>regioni di interesse per condizione, che rappresentano in media un gruppo di 4 cellule GCaMP-positive. Vedere il video supplementare 5 per i filmati rappresentativi.

#### I farmaci antisinciziali bloccano il rilascio di calcio

Volevamo capire il meccanismo (i) con cui i farmaci selezionati inibiscono la formazione di sincizi. Siamo rimasti incuriositi dall'osservazione che i nostri saggi avevano selezionato per classi di farmaci specifiche. In particolare, c'erano 11 antipsicotici, 8 antidepressivi e 5 antagonisti del recettore dell'istamina 1 (H  $_1$  ) di prima generazione tra i farmaci selezionati. Una caratteristica comune di queste molecole è la loro capacità di regolare i livelli intracellulari di Ca $^{2+}$ . Il recettore H $_1$ , i recettori muscarinici M1, M2 e M5 ei recettori della serotonina 5-HT  $_2$  segnalano attraverso una subunità G  $_{_{\rm G}}$   $\alpha$  di attivare la fosfolipasi C- $\beta$  (PLC- $\beta$ ), che a sua volta idrolizza PIP2 per generare Ins (1 , 4,5) P  $_3$  (noto anche come IP  $_3$ ). IP  $_3$  agisce come un secondo messaggero per attivare il rilascio di Ca<sup>2+</sup> nel citoplasma dai depositi del reticolo endoplasmatico (ER) dopo il legame al recettore IP  $_{2}^{16}$ . Oltre agli antagonisti del recettore H  $_1$  e agli anticolinergici, anche gli antipsicotici fenotiazinici e altri triciclici agiscono, in misura diversa, su questi recettori. Ciclosporina A forma un complesso con ciclofillina, che in store-azionamento Ca piastrine-Inibisce<sup>2+</sup> entrata in cellule attraverso Ca<sup>2+</sup> rilascio attivato Ca<sup>2+</sup> canali<sup>17</sup>. Infine, i bloccanti dei canali del Ca<sup>2+ di</sup> tipo l e la maggior parte degli antidepressivi triciclici<sup>18</sup> inibiscono icanali del calcio di tipo l voltaggio-dipendenti, che sono espressi anche nelle cellule epiteliali, comprese le cellule HEK293<sup>19</sup>.

Combinando queste considerazioni, abbiamo voluto esplorare la dinamica dei livelli di Ca<sup>2+</sup> nelle cellule che esprimono il picco e durante la fusione cellulare. Abbiamo https://www.nature.com/articles/s41586-021-03491-6 eseguito l'imaging time-lapse delle cellule Vero che esprimono l'indicatore di calcio GCaMP6s<sup>20</sup>, co-coltivato con cellule U2OS che esprimono spike e proteina fluorescente mCherry. Abbiamo osservato che le cellule che esprimono spike così come i sincizi eterologhi che hanno formato avevano numerose oscillazioni nei livelli intracellulari di Ca<sup>2+</sup> (Video supplementare 4 ; singoli fotogrammi in Fig. 2b ). Per ottenere una misurazione quantitativa di questi Ca<sup>2+</sup>oscillazioni, abbiamo espresso GCaMP6 nelle cellule Vero, con o senza proteina spike, e abbiamo ripreso queste cellule per 400 min. Durante questo periodo, le cellule che esprimono la proteina spike si sono progressivamente fuse e hanno avuto frequenti oscillazioni di Ca<sup>2+</sup> (Video supplementare 5, film senza farmaci e singoli fotogrammi in Fig. 2c). Le tracce di oscillazione per più di 50 cellule (o sincizi nel caso di cellule fuse) sono sovrapposte per ciascuna condizione (controllo o picco) in Fig. 2d. La presenza della proteina spike ha aumentato l'ampiezza dei transitori di Ca<sup>2+</sup> nelle singole cellule (P < 0,01) (Extended Data Fig. 6a), senza una differenza significativa nella frequenza, il che suggerisce che l'espressione di spike amplifica i transitori Ca<sup>2+</sup> spontanei. L'espressione della proteina spike da SARS-CoV era inefficace (Extended Data Fig. 7a, b ), mentre la proteina spike da MERS-CoV ha anche indotto oscillazioni di Ca $^{2\mathrm{+}}$ . Sia 1 µM di niclosamide che 5 µM di clofazimina hanno notevolmente attenuato sia l'ampiezza che la frequenza delle oscillazioni del Ca<sup>2+</sup> nelle cellule trattate con la proteina spike SARS-CoV-2 (*P* <0,01) (Fig. 2d , Dati estesi Fig. 6b). La salinomicina, pur inibendo ancora la formazione di sincizi, è risultata inefficace in questi esperimenti. I filmati rappresentativi che mostrano questi risultati sono nel video supplementare 5.

Le cellule trattate per 400 min con thapsigargin o acido ciclopiazonico, due inibitori non competitivi del reticolo sarco / endoplamico Ca<sup>2+</sup> ATPasi (SERCA), che causano l' esaurimento del deposito di ER Ca<sup>2+21</sup>, hanno abolito queste oscillazioni, in modo simile alla rimozione del Ca<sup>2+</sup> dal terreno di coltura cellulare (Extended Data Fig. 6c, d). Questi risultati sono coerenti con la conclusione che l'ER è la principale fonte di rilascio di Ca<sup>2+</sup> indotto dalla proteina spike SARS-CoV-2. Da notare, il trattamento cellulare con thapsigargin o acido ciclopiazonico ha anche inibito l'espansione della sincizia senza influenzare la vitalità cellulare (Fig. 3a, b, Video supplementare 6). Fig. 3: Oscillazioni del calcio, attività del canale del cloruro e fabbisogno della proteina TMEM16F per la fusione cellula-cellula mediata da spike.



**a**, **b**, Effetto della deplezione di Ca<sup>2+</sup> o trattamento con inibitori SERCA non competitivi thapsigargin (TG) o acido ciclopiazonico (CPA) sulla sincizia (area cellulare  $\geq 20.000 \ \mu m^2$ ). Barra della scala, 500  $\mu m$ . I dati sono media  $\pm$  sd; n = 4. \*\* P <0,01, ANOVA unidirezionale con Bonferroni post hoc. c - e, la corrente sensibile alla niclosamide è potenziata da spike e ACE2 e inibita dal knockdown di TMEM16F. Le correnti sono state misurate utilizzando una rampa di tensione nelle celle HEK293. In **c**, le correnti provenienti dalle cellule di controllo (traccia nera) sono state bloccate da 2 µM di niclosamide (blu). L'inserto mostra la densità di corrente a +75 mV per le celle di controllo (C, n = 34 cellule) e cellule trattate con niclosamide (n = 7), salinomicina (n = 8) e clofazimina (n = 9). \*\* P < 0,01, Kruskal – Wallis, bilaterale, con il post hoc di Dunn. In **d**, cellule trasfettate con siRNA controllo (siNT1) (nero) (n = 24) oppure *TMEM16F* siRNA (siTMEM16F) (blu) (n = 17). L'inserto mostra la densità di corrente a +75 mV. \*\* P < 0,01, Mann - Whitney, bilaterale. In **e**, cellule trasfettate con controllo eGFP (C) (nero) (n =34; come in **c**) o con eGFP, spike e ACE2 (S – ACE2) (rosso) (n = 29). L'inserto mostra la densità di corrente a +75 mV. \* P <0,05, Mann – Whitney, bilaterale. I dati sono media ± sem f, g, esternalizzazione della fosfatidilserina misurata

mediante colorazione con annessina XII dopo knockdown siRNA di TMEM16F (n = 3). Barre della scala, 500 µm. Statistiche come in **b** . **h** , **i** , Esternalizzazione della fosfatidilserina misurata dall'annessina XII dopo il trattamento con niclosamide 100 nM, clofazimina 500 nM o salinomicina 500 nM (n = 3). Barra della scala, 500 µm. Statistiche come in **b** . **j** , **k**, Inibizione della sincizia da siRNA. Cellule trattate con gli siRNA indicati e, dopo 24 h, trasfettate per esprimere la proteina spike (n = 3). Barra della scala, 200 µm. I dati sono medi ± sd \* P < 0.05, \*\* P <0,01, ANOVA unidirezionale con Dunnett post hoc. I, m, La sovraespressione di TMEM16F induce sincizi. Le cellule HEK293 e ACE2 sono state co-trasfettate con spike e TMEM16A o TMEM16F (n = 3). Statistiche come in **b** . **n** , **p**, Inibizione dell'infezione da SARS-CoV-2 da parte di siRNA. Le cellule Calu-3 sono state silenziate per i geni indicati e, dopo 48 h, infettate con SARS-CoV-2 (MOI 0,5). Un'ora dopo l'infezione, le cellule sono state lavate e incubate con terreno fresco. Dopo 48 ore, le cellule sono state immunocolorate per proteine spike e nucleocapside (N). Barra della scala, 500 µm. I dati sono media ± sem; n = 4. \*\* P < 0.01, ANOVA unidirezionale con post hoc di Dunnett. **q**, Modello che mostra l'effetto dei farmaci su sincizi e TMEM16F. Le cellule che esprimono i picchi hanno un aumento delle oscillazioni di Ca<sup>2+</sup> (in arancione), portando a una maggiore attività di TMEM16F, che a sua volta aumenta il Ca <sup>2+</sup>livelli. Di conseguenza, la secrezione di cloruro (blu) è aumentata e la fosfatidilserina (PS) (rosa) è esternalizzata. I farmaci che bloccano TMEM16F o il rilascio di Ca<sup>2+</sup> attenuante inibiscono la sincizia indotta da spike.

#### TMEM16F è richiesto per la sincizia

Una possibile spiegazione di questi risultati è stata fornita dall'osservazione che la niclosamide è un potente inibitore della famiglia TMEM16 attivata con Ca<sup>2+</sup> di canali del cloruro e scramblas<sup>22</sup>. Abbiamo studiato i livelli dei 10 membri di questa famiglia in diverse linee cellulari e nelle cellule epiteliali primarie delle vie aeree bronchiali umane (Extended Data Fig. 8a ). Abbiamo scoperto che TMEM16F, che funziona sia come canale ionico aspecifico che come scramblasi lipidica responsabile dell'esternalizzazione della fosfatidilserina sul lembo esterno della membrana

plasmatica <sup>23</sup>, è stato espresso in tutte le cellule e che i suoi livelli sono ulteriormente aumentati dopo l'espressione dei picchi (Extended Data Fig. 8b ).

Ci siamo chiesti se l'attività di TMEM16F sulla membrana fosse influenzata dalla proteina spike. Abbiamo eseguito registrazioni di tensione a cella intera di celle HEK293 per misurare le correnti endogene trasportate da questo canale. Abbiamo registrato correnti di raddrizzamento verso l'esterno piccole ma chiaramente rilevabili in risposta alle rampe di tensione. Questa corrente richiedeva Ca<sup>2+</sup> intracellulare elevato (28 µM), è stata attenuata dal knockdown mirato di TMEM16F (Fig. 3d ; I livelli di RNA e proteine per confermare il knockdown sono in Extended Data Fig. 9a per tutti i tipi di cellule studiati), è stata bloccata dall'inibitore di TMEM16A e TMEM16F benzbromarone (10  $\mu$ M) ( P <0,01) ed è stato ridotto a Ca  $^{2+}$  intracellulare inferiore (0,5  $\mu$ M) (Extended Data Fig. 10a). Questi risultati suggeriscono che questa corrente è trasportata, almeno in parte, dai canali TMEM16F. Abbiamo scoperto che la somministrazione acuta di niclosamide (2  $\mu$ M) bloccava prontamente questa corrente ( P < 0,01), mentre sia la clofazimina (5  $\mu$ M) che la salinomicina (5  $\mu$ M) non hanno avuto alcun effetto diretto significativo (Fig. 3c). In particolare, abbiamo scoperto che le cellule HEK293 che esprimono spike e ACE2 hanno mostrato un aumento della corrente in risposta alle rampe di tensione (P < 0.05) (Fig. 3e), riflettendo un aumento dell'espressione di TMEM16F (Extended Data Fig. 8b) o una modulazione del canale attività. Nessuno dei farmaci studiati ha modificato i livelli di espressione di TMEM16A o TMEM16F (Extended Data Fig. 8c).

Collettivamente, questi risultati indicano che il picco di SARS-CoV-2 porta all'attivazione delle proteine TMEM16 e che la niclosamide inibisce questa attività. Abbiamo quindi voluto esplorare la relazione tra questo effetto e la soppressione della sincizia. In primo luogo, abbiamo scoperto che la sottoregolazione di TMEM16F inibiva i transitori di Ca<sup>2+</sup> indotti da spike (Extended Data Fig. 7c, d). In questi esperimenti, anche un breve RNA interferente (siRNA) contro *ACE2* ha avuto un effetto soppressivo simile, sottolineando ancora una volta la relazione tra oscillazioni di Ca<sup>2+</sup>, funzione TMEM16F e fusione cellula-cellula mediata da spike. Quindi, abbiamo osservato che la sottoregolazione di TMEM16F sopprimeva quasi completamente l'esternalizzazione della fosfatidilserina nelle cellule Vero trattate con Ca<sup>2+</sup> ionoforo ionomicina (10  $\mu$ M) (Fig. 3f, g, Extended Data Fig. 10b, c), che indica

#### Drugs that inhibit TMEM16 proteins block SARS-CoV-2 spike-induced syncytia | Nature

che TMEM16F è la principale scramblase cellulare che risponde al Ca<sup>2+</sup> in queste cellule. In linea con queste osservazioni, il trattamento con niclosamide o clofazimina per 1 h ha ridotto significativamente i livelli di fosfatidilserina esternalizzata in risposta alla ionomicina (Fig. 3h, i , Dati estesi Fig. 10d ). Più del 95% dei nuclei cellulari è rimasto negativo allo ioduro di propidio in questi esperimenti, escludendo l'apoptosi cellulare (non mostrata). Coerentemente con l'attivazione di TMEM16F, diversi sincizi indotti da spike hanno esposto la fosfatidilserina sulla loro membrana plasmatica (Extended Data Fig. 10e ).

Per confermare il coinvolgimento specifico di TMEM16F nella formazione di sincizi, abbiamo abbattuto ACE2, TMEM16A e TMEM16F in cellule Vero, HEK293 o Calu-3. La sottoregolazione della TMEM16F ha attenuato la formazione di sincizi nelle cellule che esprimono spike, simile a un siRNA anti- *ACE2* (Fig. 3j, k ). Un analogo effetto inibitorio del knockdown di TMEM16F è stato osservato nelle cellule Calu-3 (Extended Data Fig. 11a-d ). Di interesse per indagini future, il knockdown di TMEM16F non ha avuto alcun effetto apparente sulla sincizia indotta dalla proteina spike MERS-CoV (Extended Data Fig. 11e, f ). Al contrario, la sovraespressione di TMEM16F, ma non di TMEM16A, ha stimolato in modo significativo la sincizia indotta da spike SARS-CoV-2 (Fig. 3l, m , Dati estesi Fig. 11g). Infine, abbiamo osservato che le cellule Calu-3 in cui TMEM16F era sottoregolato mostravano una replicazione infettiva di SARS-CoV-2 significativamente ridotta (visualizzazione di cellule infette con anticorpi anti-spike e anti-nucleocapside in Fig. 3n, p ).

#### Discussione

Prevediamo almeno tre meccanismi attraverso i quali spike può attivare le proteine TMEM16. Ciò può verificarsi direttamente sulle cellule che esprimono spike (infette) *in cis* o dopo il legame con ACE2 e l'attivazione della proteasi *in trans*, o indirettamente attraverso l'attivazione del rilascio di Ca<sup>2+</sup>. Per quanto riguarda l'interazione tra i livelli di Ca<sup>2+</sup> e le proteine TMEM16, l'attivazione di TMEM16 da parte della proteina spike SARS-CoV-2 sembra aumentare l'ampiezza dei segnali spontanei di Ca<sup>2+</sup>. Ciò è in linea con i rapporti precedenti che mostrano che sia TMEM16A che TMEM16F aumentano i segnali intracellulari di Ca<sup>2+</sup> aumentando il riempimento dei depositi di ER e aumentando il Ca<sup>2+</sup> indotto dal recettore IP <sub>3</sub>rilascio, amplificando così i segnali di Ca<sup>2+</sup> attivati dai recettori accoppiati a proteine G<sup>24,25</sup>.

Il coinvolgimento di TMEM16F nella sincizia indotta da spike SARS-CoV-2 è coerente con il ruolo precedentemente proposto dell'esposizione alla fosfatidilserina nella maggior parte degli altri eventi fisiologici di fusione cellulare. I macrofagi che si fondono in cellule giganti infiammatorie <sup>26</sup> o per formare osteoclasti che riassorbono l'osso <sup>27</sup>, i mioblasti impegnati a fondersi nei miotubi <sup>28</sup>, i citotrofoblasti che diventano sinciziotrofoblasti <sup>29</sup> e, infine, gli spermatozoi durante la fecondazione dell'uovo <sup>30</sup> espongono tutti la fosfatidilserina sulla superficie cellulare. Nei casi di mioblasti e di sviluppo placentare, TMEM16E <sup>31</sup> e TMEM16F <sup>32</sup>, rispettivamente, hanno mostrato di partecipare in modo specifico a questo processo.

Da un punto di vista meccanicistico, questi risultati sono coerenti con un modello (Fig. 3q ) in base al quale le cellule che esprimono la proteina spike SARS-CoV-2 hanno aumentato le oscillazioni di Ca<sup>2+</sup> e una maggiore attività dei canali TMEM16 della membrana plasmatica, che porta a esternalizzazione della fosfatidilserina e secrezione di cloruri. Sebbene il primo evento sia necessario per la fusione della membrana plasmatica, la secrezione di cloruro potrebbe avere rilevanza nella patogenesi di COVID-19.

Oltre alla niclosamide, altri farmaci noti per inibire la famiglia TMEM16 sono stati anche in grado di inibire la sincizia indotta da spike nei nostri test, inclusi nitazoxanide, esaclorofene e diclorofene. Gefitinib, che è noto per bloccare l'EGFR attivato da TMEM16A sulla membrana plasmatica <sup>33</sup>, ha anche inibito la fusione spike-driven. Inoltre, sembra probabile che, simili a niclosamide e nitazoxanide <sup>22</sup>, altri farmaci che prendono di mira TMEM16A (in particolare, trifluoperazina <sup>34</sup>, inibitori della ricaptazione della serotonina <sup>35, 36</sup> e ivermectina <sup>37</sup>, che ha inibito la formazione di sincizi) potrebbe anche inibire TMEM16F. Pertanto, il nostro screening per l'inibizione della sincizia sembra aver rivelato un meccanismo comune per la fusione cellula-cellula dipendente da spike. L'attivazione dei membri della famiglia TMEM16 da parte della proteina spike SARS-CoV-2 potrebbe avere una rilevanza specifica per la patogenesi di COVID-19, poiché potrebbe partecipare all'infiammazione (TMEM16A promuove l'attivazione di NK- $\kappa$ B e la secrezione di IL-6 <sup>38</sup>), trombosi (TMEM16F è essenziale per il rimescolamento dei lipidi nelle piastrine durante la coagulazione del sangue <sup>39</sup>, <sup>40</sup>), la disfunzione delle cellule endoteliali <sup>41</sup> e l'edema alveolare e la diarrea a causa dell'aumentata secrezione di cloruri. Di conseguenza, vale la pena considerare i farmaci identificati per la terapia COVID-19. In particolare, la niclosamide è una salicilanilide sintetica sviluppata negli anni '50 come molluschicida contro le lumache <sup>42</sup> e successivamente approvata nell'uomo contro l'infezione da tenia <sup>43</sup>. In precedenza è stato segnalato che la niclosamide è attiva contro vari virus con e senza involucro, incluso SARS-CoV-2 <sup>44</sup>. Sebbene questo farmaco abbia una solubilità relativamente bassa, vi è evidenza di un assorbimento considerevole, con livelli sierici che possono raggiungere 1–20  $\mu$ M <sup>45</sup>, <sup>46</sup>. Insieme, i nostri risultati forniscono un meccanismo e un fondamento logico per il riutilizzo della niclosamide per il trattamento di pazienti con COVID-19.

#### Metodi

Nessun metodo statistico è stato utilizzato per predeterminare la dimensione del campione. I ricercatori non sono stati all'oscuro dell'assegnazione durante gli esperimenti e la valutazione dei risultati, tranne dove specificato di seguito. Gli esperimenti non sono stati randomizzati.

#### Pazienti

I campioni di polmone dei pazienti provengono dall'analisi post mortem di 6 pazienti deceduti per COVID-19 presso l'Ospedale Universitario di Trieste, Italia, dopo il supporto di terapia intensiva. Questi provengono da una coorte più ampia di 41 pazienti consecutivi, tutti morti di COVID-19. Di questi, 25 erano maschi e 16 femmine; l'età media era di 77 anni per gli uomini e 84 per le donne. Durante il ricovero, tutti i pazienti hanno ottenuto un punteggio positivo per SARS-CoV-2 su tampone nasofaringeo e hanno presentato sintomi e dati di imaging indicativi di polmonite interstiziale correlata alla malattia COVID-19. In precedenza è stata riportata un'ampia caratterizzazione di questi pazienti <sup>15</sup>. In questi pazienti erano presenti e abbondanti pneumociti dismorfici e sinciziali nei polmoni di 20 pazienti (50%), inclusi tutti e 6 i pazienti che necessitavano di terapia intensiva, e occasionalmente in ulteriori 16 pazienti (39%). L'uso di questi campioni post mortem per le indagini è stato approvato dal competente Comitato Etico Congiunto della Regione Friuli Venezia Giulia, Italia (rif. 0019072 / P / GEN / ARCS).

#### Cellule

Vero (WHO) clone 118 cellule (ECACC 88020401) sono state coltivate in DMEM (Life Technologies) con 1 gl<sup>-1</sup> glucosio (Life Technologies) integrato con il 10% di siero bovino fetale inattivato al calore (FBS) (Life Technologies) più una concentrazione finale di 100 UI ml<sup>-1</sup> penicillina e 100 µg ml<sup>-1</sup> streptomicina o senza antibiotici dove richiesto per la trasfezione. Le cellule sono state incubate a 37 ° C, 5% di CO<sub>2</sub>.

Le celle Vero E6 sono state fornite da A. Davidson e D. Matthews. Le cellule sono state coltivate in DMEM (Gibco) contenente il 10% di FBS, l'1% di amminoacidi non essenziali (Gibco) e l'1% di penicillina-streptomicina (Thermo Fisher Scientific). Le cellule sono state incubate a 37 ° C, 5% di CO <sub>2</sub>.

Le cellule U-2 OS (U2OS; ATCC HTB-96), HEK293T (ATCC CRL-3216) e Calu-3 (ATCC HTB-55) sono state coltivate in DMEM con 1 gl<sup>-1</sup> glucosio (Life Technologies) integrato con il 10% di FBS (Life Technologies) più una concentrazione finale di 100 UI ml<sup>-1</sup> penicillina e 100  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> streptomicina o senza antibiotici dove richiesto per le trasfezioni.

Il clone di cellule U2OS stabile che esprime mCherry è stato ottenuto mediante trasduzione con particelle lentivirali per l'espressione costitutiva di mCherry (rLV.EF1.mCherry-9, Takara 0037VCT) a 10 MOI con 4  $\mu$ g ml <sup>-1 di</sup> polibrene (Sigma-Aldrich TR-1003-G ). Il terreno è stato sostituito dopo 4 ore. La selezione delle cellule trasdotte è stata eseguita aggiungendo 1  $\mu$ g ml <sup>-1 di</sup> puromicina (InvivoGen ant-pr-1) a partire da 48 ore dopo la trasduzione. L'espressione del transgene è stata verificata mediante microscopia a fluorescenza.

Cellule epiteliali primarie bronchiali umane delle vie aeree sono state acquistate da Epithelix e mantenute nel terreno di coltura cellulare Mucilair (Epithelix).

Tutte le linee cellulari erano negative per la contaminazione da micoplasma. Le linee cellulari non sono state autenticate.

### Anticorpi

Sono stati utilizzati anticorpi contro le seguenti proteine: TMEM16A (Abcam, ab64085), TMEM16F (Abcam ab234422 e Sigma-Aldrich HPA038958-100UL), ACE2 (Abcam ab87436 e ab15348), V5 (Thermo Fisher Scientific R96025), V5-488 (Thermo Fisher Scientific 377500A488), mouse-HRP (Abcam ab6789), coniglio-HRP (Abcam ab205718), β-actina-HRP (Sigma-Aldrich A5316), pisina (Roche 760-4867), tensioattivo B (Thermo Fisher Scientific MS-704- P0), topo-biotina (Vector Laboratories BA-9200), proteina spike SARS-CoV-2 (GeneTex GTX632604), anticorpo nucleocapsidico SARS-CoV-2 (Sino Biological 40143-R001).

#### Test di inibizione della fusione cellulare

Le cellule U2OS "donatrici" sono state seminate in piastre Petri da 10 cm (2 milioni di cellule per piastra) per raggiungere una confluenza del 70-80% il giorno successivo. La trasfezione è stata eseguita utilizzando 10 µg di pEC117-Spike-V5 (che esprime la proteina Spike con etichetta V5, ottimizzata per il codone) o un vettore di controllo utilizzando 35 µl di FuGENE HD Transfection Reagent (Promega E2311) in 500 µl di terreno Opti-MEM ( Life Technologies). Dopo la trasfezione notturna, le cellule sono state caricate con 10 nM Qtracker 525 Cell Labelling Kit (Invitrogen Q25041MP) in 1 ml di terreno per 1 ora a 37 ° C in 5% di CO 2. Dopo ampi lavaggi con PBS, le cellule sono state staccate con Versene (Thermo Fisher Scientific 15040066). Le cellule Vero "accettore" sono state preparate come segue. Le cellule sono state seminate in piastre Petri da 10 cm (1,2 milioni di cellule per piastra) il giorno prima del test. Le cellule sono state quindi caricate con 10 nM Qtracker 800 Cell Labelling Kit (Invitrogen Q25071MP) in 1 ml di terreno per 1 ora a 37 ° C in 5% di CO 2.

PBS, le cellule sono state staccate con tripsina-EDTA allo 0,05% (Sigma-Aldrich

T4049). Le cellule Vero e U2OS sono state miscelate al rapporto finale di 5: 4 e diluite alla concentrazione finale di 20 × 10<sup>3</sup> cellule ml<sup>-1</sup> in DMEM con 1 g l<sup>-1</sup>glucosio (Life Technologies) integrato con il 10% di FBS inattivato al calore (Life Technologies). Le cellule diluite (50 µl per pozzetto, 1.000 cellule per pozzetto) sono state seminate in 12 micropiastre da 384 pozzetti (CellCarrierUltra 384, Perkin Elmer) utilizzando un dispensatore Multidrop. Tre ore dopo la semina, i farmaci di The Spectrum Collection, MS Discovery System (2.545 farmaci diversi) e la Prestwick Chemical Library, Prestwick Chemical (1.280 farmaci) sono stati dispensati sopra le cellule alla concentrazione finale di 10 µM (1% DMSO finale) . Ventiquattro ore dopo, le piastre sono state lavate in 50 µl per pozzetto di PBS e fissate in 40 µl di paraformaldeide al 4% (PFA) per 10 minuti a temperatura ambiente (RT). Dopo la fissazione, le cellule sono state lavate due volte in 50 µl per pozzetto di PBS e permeabilizzate in Triton X-100 allo 0,1% (Sigma-Aldrich 1086431000) per 10 minuti a temperatura ambiente.

L'acquisizione dell'immagine è stata eseguita utilizzando un microscopio per screening ad alto contenuto Operetta CLS (Perkin Elmer) con un obiettivo Zeiss 20 × (NA 0.80). È stato ripreso un totale di 25 campi per pozzetto a tre diverse lunghezze d'onda: (1) eccitazione 365–385 nm, emissione 430–500 nm (nucleo e citoplasma "blu"); (2) eccitazione 460–490 nm, emissione 500–550 nm (punti quantici donatori "verdi"); (3) eccitazione 615–645 nm, emissione 655–750 nm (punti quantici accettori 'rossi'). Le immagini sono state successivamente analizzate, utilizzando il pacchetto software Harmony (v.4.9; PerkinElmer). Le immagini sono state prima corrette a campo piatto e i nuclei sono stati segmentati utilizzando il modulo di analisi "Find Nuclei" (Harmony). Le soglie per la segmentazione dell'immagine sono state regolate in base al rapporto segnale-sfondo. Il coefficiente di divisione è stato impostato per evitare la divisione dei nuclei sovrapposti (cellule fuse). L'area del citoplasma, macchiato dalla HCS Cell Mask Blue, è stato definito utilizzando il modulo di analisi "Find Citoplasm" (Harmony) e il numero di punti verdi o rossi è stato contato utilizzando il modulo di analisi "Find Spots" (Harmony). Sono state considerate fuse tutte le cellule che avevano un'area nucleare maggiore di quattro volte l'area media di un singolo nucleo ed erano contemporaneamente positive per almeno due punti rossi e due verdi. I dati sono stati espressi come percentuale di cellule fuse calcolando il numero medio di cellule fuse normalizzato sul numero totale di cellule per pozzetto. Tutte le cellule che

avevano un'area nucleare maggiore di quattro volte l'area media di un singolo nucleo ed erano simultaneamente positive per almeno due punti rossi e due verdi sono state considerate fuse. I dati sono stati espressi come percentuale di cellule fuse calcolando il numero medio di cellule fuse normalizzato sul numero totale di cellule per pozzetto. Tutte le cellule che avevano un'area nucleare maggiore di quattro volte l'area media di un singolo nucleo ed erano simultaneamente positive per almeno due punti rossi e due verdi sono state considerate fuse. I dati sono stati espressi come percentuale di cellule fuse calcolando il numero medio di cellule fuse normalizzato sul numero totale di cellule per pozzetto.

#### Test di inibizione del sincizio

Le cellule Vero sono state seminate in piastre Petri da 10 cm (1,2 milioni di cellule per piastra) per raggiungere una confluenza del 70-80% il giorno successivo. La trasfezione è stata eseguita utilizzando 10 µg di pEC117-Spike-V5 utilizzando 30 µl e il reagente di trasfezione FuGENE HD (Promega E2311) in 500 µl di terreno Opti-MEM (Life Technologies). Dodici ore dopo la trasfezione, le cellule sono state staccate, lavate in PBS e diluite alla concentrazione finale di 12  $\times$  10<sup>3</sup> cellule ml<sup>-2</sup> in DMEM con 1 g l <sup>-1</sup>glucosio (Life Technologies) integrato con il 10% di FBS inattivato al calore (Life Technologies). Cinquanta microlitri di sospensione cellulare diluita (600 cellule per pozzetto) sono stati seminati in 12 micropiastre da 384 pozzetti (CellCarrierUltra 384, Perkin Elmer) utilizzando un dispensatore Multidrop. Tre ore dopo la semina, i farmaci di The Spectrum Collection, MS Discovery System (2.545 farmaci diversi) e Prestwick Chemical Library, Prestwick Chemical (1.280 farmaci) sono stati dispensati sopra le cellule alla concentrazione finale di 10  $\mu$ M (1% DMSO finale ). A 24 ore dopo il trattamento farmacologico, le piastre sono state lavate in 50 µl per pozzetto di PBS e fissate in 40 µl di PFA al 4% per 10 minuti a temperatura ambiente. Dopo la fissazione, le cellule sono state processate per l'immunofluorescenza utilizzando anti V5, Hoechst (H3570) e HCS CellMask Red (Thermo Fisher Scientific H32712), secondo le istruzioni del produttore.

L'acquisizione delle immagini è stata eseguita utilizzando il microscopio per screening ad alto contenuto Operetta CLS (Perkin Elmer) con un obiettivo Zeiss 20 × (NA 0.80). È stato ripreso un totale di 25 campi per pozzetto a tre diverse lunghezze d'onda: (1) eccitazione 365–385 nm, emissione 430–500 nm (nucleo "blu"); (2) eccitazione 460–490 nm, emissione 500–550 nm (proteina spike "verde"); (3) eccitazione 615–645 nm, emissione 655–750 nm (HCS Cell Mask "rossa"). Le immagini sono state successivamente analizzate, utilizzando il software Harmony (PerkinElmer). Le immagini sono state prima corrette a campo piatto e i nuclei sono stati segmentati utilizzando il modulo di analisi "Find Nuclei" (Harmony). Le soglie per la segmentazione dell'immagine sono state regolate in base al rapporto segnale-sfondo. Il coefficiente di divisione è stato impostato per evitare la divisione dei nuclei sovrapposti (cellule fuse). L'area del citoplasma, colorata dalla HCS Cell Mask Red, è stato definito utilizzando il modulo di analisi "Trova citoplasma" (Harmony) e l'intensità della fluorescenza verde è stata calcolata utilizzando il modulo "Calculate Intensity Properties" (Harmony). Tutte le cellule che avevano un'area nucleare maggiore di cinque volte l'area media di un singolo nucleo ed erano simultaneamente positive per il segnale verde nell'area del citoplasma sono state considerate come fuse. I dati sono stati espressi come percentuale di cellule fuse calcolando il numero medio di cellule fuse normalizzato sul numero totale di cellule per pozzetto. Tutte le cellule che avevano un'area nucleare maggiore di cinque volte l'area media di un singolo nucleo ed erano simultaneamente positive per il segnale verde nell'area del citoplasma sono state considerate come fuse. I dati sono stati espressi come percentuale di cellule fuse calcolando il numero medio di cellule fuse normalizzato sul numero totale di cellule per pozzetto. Tutte le cellule che avevano un'area nucleare maggiore di cinque volte l'area media di un singolo nucleo ed erano simultaneamente positive per il segnale verde nell'area del citoplasma sono state considerate come fuse. I dati sono stati espressi come percentuale di cellule fuse calcolando il numero medio di cellule fuse normalizzato sul numero totale di cellule per pozzetto.

#### Immunofluorescenza

Dopo la fissazione in PFA al 4% per 10 minuti a temperatura ambiente, le cellule sono state lavate due volte in 50 µl per pozzetto (piastra a 384 pozzetti) o 100 µl per pozzetto (piastra a 96 pozzetti) di PBS e quindi permeabilizzate negli stessi volumi di 0,1 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich 1086431000) per 10 minuti a temperatura ambiente. Le cellule sono state quindi lavate due volte in PBS e bloccate in BSA all'1% per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo il blocco, il surnatante è stato rimosso e le cellule sono state colorate in base al tipo di colorazione, come segue.

Per la colorazione dell'epitopo V5, dopo aver bloccato il surnatante è stato rimosso e 20 µl per pozzetto (piastra a 384 pozzetti) o 40 µl per pozzetto (piastra a 96 pozzetti) di V5 Tag Alexa Fluor 488 Monoclonale diluito (1: 1.000 in 1% di BSA) L'anticorpo (Thermo Fisher Scientific 37-7500-A488) è stato aggiunto a ciascun pozzetto e incubato a temperatura ambiente per 2 ore. Le cellule sono state quindi lavate due volte in PBS. La colorazione nucleare è stata eseguita da Hoechst 33342 secondo le istruzioni del produttore.

Per la colorazione dello spike e del nucleocapside SARS-CoV-2 e del TMEM16F cellulare, dopo il blocco il surnatante è stato rimosso e 40 µl per pozzetto (piastra a 96 pozzetti) diluito anticorpo primario (1: 500 in 1% BSA SARS-CoV- 2 anticorpi spike [1A9], GeneTex GTX632604; anticorpo TMEM16F, Sigma-Aldrich HPA038958, 1: 3.000 in BSA; e l'anticorpo nucleocapsidico SARS-CoV-2, Sino Biological 40143-R001) è stato aggiunto a ciascun pozzetto e incubato per una notte a 4 ° C. Le cellule sono state quindi lavate due volte in PBS, il surnatante è stato rimosso e gli stessi volumi di anticorpo secondario diluito (1: 500 in 1% di BSA) sono stati aggiunti a ciascun pozzetto e incubati per 2 h. Le cellule sono state quindi lavate due volte in PBS. La colorazione nucleare è stata eseguita da Hoechst 33342 secondo le istruzioni del produttore.

La colorazione citoplasmatica è stata eseguita mediante HCS Cell Mask Deep Red Staining (Invitrogen H32721) o HCS Cell Mask Blue Staining (H32720) secondo le istruzioni del produttore.

#### Istologia e immunoistochimica

I campioni delle autopsie COVID-19 sono stati fissati in formalina al 10% per almeno 50 ore e quindi incorporati in paraffina. Le sezioni di quattro micrometri sono state deparaffinate in xilene, reidratate e processate per la colorazione con ematossilinaeosina o immunoistochimica. Il recupero dell'antigene è stato eseguito in una soluzione bollente di citrato di sodio (0,01 M, pH 6,0) per 20 min. Le sezioni sono state lasciate raffreddare e permeabilizzate per 10 min in Triton X-100 all'1% in PBS, seguite dal blocco in BSA al 2% (Roche) e dalla colorazione notturna a 4 ° C con gli anticorpi primari diluiti in soluzione bloccante. Dopo inibizione della perossidasi endogena con il 3% di H  $_2$  O  $_{2'}$  le sezioni sono state incubate con un anticorpo secondario coniugato con biotina appropriato per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo l'amplificazione del segnale con il complesso avidina-biotina-HRP (Vectastain), è stata applicata la soluzione DAB (Vector) per 2-3 minuti. L'ematossilina (Bioptica) è stata ulteriormente utilizzata per colorare i nuclei e il reagente Bluing è stato utilizzato sulle colorazioni automatizzate Ventana. Le immagini sono state acquisite utilizzando un microscopio ottico Leica ICC50W.

#### Ibridazione in situ

L'ibridazione in situ è stata eseguita utilizzando sonde di acido nucleico bloccato (LNA) per U6 snRNA <sup>47</sup> e SARS-CoV-2 RNA, progettate per indirizzare il filamento sensoriale di ORF1ab e le regioni spike del genoma virale. Le sequenze criptate sono state utilizzate come controllo. Gli esperimenti sono stati eseguiti utilizzando un kit di ibridazione in situ dedicato per tessuti fissati in formalina inclusi in paraffina (FFPE) (Qiagen) secondo il protocollo del produttore. In breve, i vetrini di tessuto FFPE sono stati deparaffinati in xilene, trattati con proteinasi K (15  $\mu$ g ml <sup>-1</sup>) per 5 min a 37 ° C e incubate con sonde SARS-CoV-2 (40 nM) o U6 (2 nM) per 1 ha 54 ° C in un ibridatore. Dopo il lavaggio con tampone SSC, la presenza di SARS-CoV-2 RNA è stata rilevata utilizzando un anticorpo anti-fosfatasi alcalina (AP) (1: 500) (Roche Diagnostics) integrato con siero di pecora (Jackson Immunoresearch) e albumina di siero bovino (BSA). L'ibridazione è stata rilevata aggiungendo il substrato NBT-BCIP (Roche Diagnostics). I nuclei sono stati controcolorati con il rosso nucleare veloce.

#### Plasmidi

Il plasmide di espressione pEC117-Spike-V5 è stato generato come segue: la proteina di tipo selvatico SARS-CoV-2 (numero di accesso NCBI NC\_045512.2, posizione 21563-25384) è stata ottimizzata per il codone e sintetizzata in due frammenti di circa 2 kb ciascuno come frammenti di DNA gBlock (IDT Integrated DNA Technologies) con l'aggiunta nel frame del tag V5 all'estremità C, e quindi clonato nella spina dorsale pZac 2.1 sotto il controllo del promotore IE del citomegalovirus (CMV). Le sequenze di DNA del costrutto sono state verificate mediante sequenziamento di Sanger. Sono stati utilizzati i seguenti vettori di espressione: hTMEM16A (GenScript OHu26085D), hTMEM16F (GenScript OHu26351D), hACE2 (Addgene 1786), pGCaMP6s (Addgene 40753), pMERS-CoV-S e pSARS-CoV-1-S (laboratorio W. Barclay) , pCMV-eGFP e pmCherry-NLS (gli ultimi due sono stati ottenuti da L. Zentilin).

#### trasfezione di siRNA

Gli siRNA (Dharmacon siGENOME SMARTpools, quattro siRNA per gene target) che prendono di mira ACE2 (M-005755-00-0005), TMEM16A (noto anche come ANO1) (M-027200-00-0005), TMEM16B (ANO2) (M-016745-01-0005), TMEM16E (ANO5) (M-026787-00-0005), TMEM16F (ANO6) (M-003867-01-0005) e XKR8(M-015745-01-0005) sono stati dispensati sul fondo di micropiastre a 96 pozzetti (CellCarrierUltra 96, PerkinElmer); Il tampone siRNA e un siRNA non mirato sono stati usati come controlli. In breve, il reagente di trasfezione (Lipofectamine RNAiMAX, Life Technologies) è stato diluito in Opti-MEM (Life Technologies) e aggiunto a ciascun siRNA nella matrice di micropiastre. Trenta minuti dopo,  $6,5 \times 10^{-3}$  celle Vero o  $8 \times 10^{-3}$ <sup>3</sup>Le cellule HEK293T sono state seminate in ciascun pozzetto. Tutti gli siRNA sono stati testati a diverse concentrazioni comprese tra 6 nM e 50 nM. Ventiquattro ore dopo la trasfezione di siRNA, 100 ng del plasmide di espressione pEC117-Spike-V5 o pCMV-eGFP sono stati trasfettati utilizzando un protocollo di trasfezione in avanti standard. In breve, il pDNA è stato diluito in Opti-MEM (Life Technologies), miscelato con il reagente di trasfezione (FuGENE HD, Promega) utilizzando i seguenti rapporti: 1 µg pDNA: 3µl FugeneHD. La miscela è stata incubata per 20 minuti a temperatura ambiente e aggiunta alle piastre trasfettate con siRNA. Dopo 24 ore, le cellule sono state fissate in paraformaldeide al 4% e processate per l'immunofluorescenza. Per gli esperimenti di silenziamento genico, gli siRNA indicati sono stati trasfettati in cellule Vero o HEK utilizzando un protocollo di trasfezione inversa standard, a una concentrazione finale di 25 nM. In breve, il reagente di trasfezione (Lipofectamine RNAiMAX, Life Technologies) è stato diluito in Opti-MEM (Life Technologies) e aggiunto agli siRNA disposti in piastre da 12 pozzetti; 30 minuti dopo, circa  $1 \times 10^5$  –2  $\times$  10  $^5$  cellule sono state seminate per pozzetto. Dopo 48-72 ore, i lisati cellulari sono

stati analizzati mediante qPCR e / o western blotting, come descritto in dettaglio in seguito.

#### Test di esternalizzazione della fosfatidilserina

Le cellule Vero sono state trasfettate con pEC117-Spike-V5 e pmCherry-NLS o un vettore pZac 2.1 vuoto, o trasfettate inversamente con siRNA indicati come descritto sopra. Il giorno del test, le cellule sono state seminate in micropiastre a 96 pozzetti con un fondo piatto e trasparente (CellCarrierUltra 96, Perkin Elmer) a una densità di 6.500 cellule per pozzetto per 2 ore. Le cellule sono state quindi trattate con diverse concentrazioni di farmaco per 1 ora. Dopo un lavaggio con terreno senza FBS a temperatura ambiente, le cellule sono state incubate con 100  $\mu$ I di annessina XII 1: 100 (pSIVA Abcam ab129817), con o senza ionomicina 5-10  $\mu$ M. Le cellule sono state quindi immediatamente sottoposte a imaging mediante microscopia a fluorescenza utilizzando un microscopio Operetta CLS che montava una lente 20 × NA1.1. Nove immagini per pozzetto sono state acquisite automaticamente a diverse lunghezze d'onda: (1) eccitazione 460–490 nm, emissione 500–550 nm (annessina XII "verde"); (2) eccitazione 530–560, emissione 570–650 nm (mCherry-NLS 'rosso'); (3) campo chiaro; (4) contrasto di fase digitale.

#### Immagini del calcio

Le cellule sono state seminate in piastre di Petri da 10 cm (1,2 milioni di cellule per piastra) per raggiungere una confluenza del 70-80% il giorno successivo e trasfettate inversamente con siRNA indicativi. La co-trasfezione è stata eseguita utilizzando 5  $\mu$ g di pGCaMP6s e 5  $\mu$ g di plasmidi CoV-S indicati o un vettore pZac 2.1 vuoto utilizzando 30  $\mu$ l di FuGENE HD Transfection Reagent (Promega E2311) in 500  $\mu$ l di mezzo Opti-MEM (Life Technologies). Sedici ore dopo la trasfezione, le cellule sono state staccate, lavate in PBS e diluite alla concentrazione finale di 6 × 10<sup>4</sup> cellule per ml in DMEM con 1 gl <sup>-1</sup>glucosio (Life Technologies) integrato con il 10% di FBS inattivato al calore (Life Technologies). Un totale di 6.000 cellule per pozzetto (100  $\mu$ l) sono state seminate in micropiastre da 96 pozzetti con un fondo piatto e trasparente (CellCarrierUltra 96, Perkin Elmer). Per gli esperimenti di trattamento farmacologico, le cellule sono state trattate tre ore dopo la semina con 1  $\mu$ M di niclosamide (EP

N0560000), 5  $\mu$ M di clofazimina (EP Y0000313), 5  $\mu$ M di salinomicina (Sigma S4526-5) o 1% di DMSO. Per i test di deplezione del calcio, le cellule sono state mantenute in un terreno privo di calcio o trattate con acido ciclopiazonico 10  $\mu$ M (Tocris 1235), thapsigargin 500 nM (Tocris 1138) o DMSO allo 0,1%.

L'acquisizione delle immagini è stata eseguita utilizzando il microscopio per screening ad alto contenuto Operetta CLS (Perkin Elmer) con un obiettivo Zeiss 20 × (NA 0.80) a 37 ° C e 5% di CO<sub>2</sub>. Un totale di tre campi per pozzetto è stato ripreso ogni 2 min con eccitazione 460–490 nm, emissione 500–550 nm (sensore GCaMP6s 'Green'). Le immagini sono state successivamente analizzate con il software ImageJ. Per ogni fotogramma, l'intensità di fluorescenza (*F*) è stata sottratta dallo stesso fotogramma nell'acquisizione precedente per rimuovere il segnale di fondo e calcolare l' indice  $\Delta F$ / *F*<sub>0</sub>, in cui *F*<sub>0</sub> è la fluorescenza basale mediana e  $\Delta F = F - F_0$ . Per l'analisi dell'intensità, sono state considerate più di 12 regioni di interesse (ROI) da 180 µm<sup>2</sup> per condizione, compilando un totale di almeno 50 cellule positive a GCaMP6s per condizione. Per ogni ROI, i valori  $\Delta F$  positivi (ovvero, aumento) sono stati presi in considerazione con lo script BAR "Trova picchi". Tra questi, i valori al di fuori di 1,5 volte l'intervallo interquartile al di sopra del quartile superiore sono stati considerati come "picchi". La frequenza dei picchi di una singola cella è stata quindi conteggiata per l'intero periodo di osservazione.

#### Estrazione di RNA e qPCR

L'mRNA totale è stato isolato dalle cellule HEK293T o Vero 48-72 ore dopo la trasfezione di siRNA utilizzando un protocollo di estrazione dell'RNA Trizol standard. L'RNA ottenuto (0,5-1 µg) è stato trascritto al contrario utilizzando MLV-RT (Invitrogen) con primer esamericani casuali (10 µM) in una reazione di 20 µl seguendo le istruzioni del produttore. La quantificazione dell'espressione genica di *TMEM16A* (Hs00216121\_m1), *TMEM16B* (Hs00220570\_m1), *TMEM16E* (Hs01381106\_m1) e *TMEM16F* (Hs03805835\_m1) è stata eseguita mediante PCR quantitativa (qPCR) utilizzando sonde Taqman e primer Green. Per la normalizzazione è stata utilizzata l' espressione del gene housekeeping *GAPDH* (Hs02786624\_g1).

Le amplificazioni sono state eseguite utilizzando una macchina QuantStudio3 utilizzando TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems 4369016). Il profilo qPCR è stato programmato con un protocollo standard, secondo le istruzioni del produttore. Vedere la Tabella 3 supplementare per le sequenze di primer utilizzate nei saggi qPCR.

#### Macchia occidentale

Dopo le trasfezioni di siRNA per 48-72 h, le cellule HEK293 sono state raccolte e omogeneizzate in tampone di lisi RIPA (20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0,5% Nonidet P-40, 0,1% SDS, 0,5% sodio desossicolato integrato con inibitori della proteasi (Roche)) per 10 min a 4 ° C e sonicato utilizzando Bioruptor (Diagenode) per 30 min. Quantità uguali di proteine cellulari totali (15-20 µg), misurate con il reagente Bradford (Biorad), sono state risolte mediante elettroforesi in gel di poliacrilammide con gradiente del 4-20% (Mini-PROTEAN, Biorad) e trasferite su membrane di nitrocellulosa / PVDF (GE Healthcare). Le membrane sono state bloccate a temperatura ambiente per 60 minuti con PBST (PBS + 0.1% Tween-20) con il 5% di latte scremato in polvere (Cell Signaling, 9999). I blot sono stati quindi incubati (4 ° C, durante la notte) con anticorpi primari contro ACE2 (diluito 1: 1.000), TMEM16F (1: 1.000), β-actina (diluito 1: 5.000), V5 (diluito 1: 5.000) o TMEM16F (diluito 1: 500), TMEM16A (diluito 1: 500) e TMEM16B (diluito 1: 1.000). Le macchie sono state lavate tre volte (5 minuti ciascuna) con PBST. Per il rilevamento del western blotting standard, i blot sono stati incubati con anticorpo anti-coniglio coniugato con HRP (1: 5.000) o anticorpo anti-topo coniugato con HRP (1: 10.000) per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo tre lavaggi a temperatura ambiente con PBST (10 min ciascuno), i blot sono stati sviluppati con ECL (Amersham). 000) per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo tre lavaggi a temperatura ambiente con PBST (10 min ciascuno), i blot sono stati sviluppati con ECL (Amersham). 000) per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo tre lavaggi a temperatura ambiente con PBST (10 min ciascuno), i blot sono stati sviluppati con ECL (Amersham).

#### Elettrofisiologia

Registrazioni patch clamp cellule intere sono state effettuate su HEK293 cellule cresciute su vetrini di vetro rivestite con poli- L -lisina. Dopo la placcatura, le cellule sono state trasfettate il giorno successivo con eGFP o una combinazione di eGFP, proteina spike e ACE2. Le registrazioni venivano tipicamente effettuate 12-36 ore dopo la trasfezione. Gli esperimenti di knockdown di TMEM16F sono stati eseguiti come sopra trasfettando le cellule HEK293 con un siRNA di controllo (NT1) o un siRNA mirato a *TMEM16F* . La consegna di siRNA è stata effettuata mediante placcatura 500 × 10 <sup>3</sup>Cellule HEK293 insieme a siRNA da 12,5 nM per pozzetto di una piastra da 12 pozzetti. Ventiquattro ore dopo le trasfezioni di siRNA, le cellule sono state trasfettate con un plasmide di espressione pCMV-eGFP come descritto. Sei ore dopo la trasfezione, le cellule sono state piastrate su copertura in vetro 18 mm di diametro scivola rivestiti con poli L -lisina seminate a 10 × 10 <sup>3</sup> cellule per pozzetto, e registrato 12 a 36 ore dopo la placcatura.

Le registrazioni di cellule intere sono state eseguite in una soluzione extracellulare di HBS (pH 7,3, 315 mOsm) che conteneva (in mM): 139 NaCl, 2,5 KCl, 10 HEPES, 10 glucosio, 1,3 MgCl  $_2$  e 2 CaCl  $_2$ . Gli elettrodi di patch sono stati realizzati in vetro borosilicato a pareti spesse (diametro esterno: 1,5 mm, diametro interno 0,86 um, Sutter Instruments) ottenendo una resistenza tra 3 e 4 M $\Omega$  e riempiti con una soluzione intracellulare contenente (in mM): 130 CsCl, 10 HEPES, 10 EGTA, 1 MgATP, 1 MgCl  $_2$  e calcio libero aggiustato a 28  $\mu$ M usando CaCl  $_2$ secondo i calcoli utilizzando il software MAXchelator Ca-Mg-ATP-EGTA Calculator v.1.0. La soluzione è stata regolata a un pH di 7,4 utilizzando CsOH e l'osmolarità a 290 mOsm. Le registrazioni sono state ottenute con un amplificatore Multiclamp 700B (Molecular Devices) e digitalizzate con il digitalizzatore Digidata 1440A (Molecular Devices). I dati sono stati acquisiti con il software Clampex v.10.3.1.5 (Molecular Devices) e Axon Multiclamp 700B Commander Software (Molecular Devices). I segnali sono stati campionati a 5 kHz e filtrati a 2,5 kHz. Gli offset delle pipette sono stati annullati prima della formazione del sigillo e la capacità della pipetta è stata compensata nella configurazione collegata alla cella una volta ottenuto un giga-seal. Abbiamo utilizzato le risposte alle fasi di iperpolarizzazione e depolarizzazione per stimare la resistenza in serie (  $R_{\rm e}$  ) della registrazione, la resistenza della membrana ( $R_{\rm m}$  ; dalla corrente di

#### Drugs that inhibit TMEM16 proteins block SARS-CoV-2 spike-induced syncytia | Nature

mantenimento costante alla nuova tensione) e dalla capacità della membrana ( $C_{\rm m}$ ; dall'area sotto la corrente di decadimento esponenziale dal picco al mantenimento). Le registrazioni venivano escluse se la resistenza di accesso superava i 15 M $\Omega$  e se la resistenza di ingresso era inferiore a 150 M $\Omega$ . Tutte le registrazioni sono state effettuate a temperatura ambiente.

La nostra strategia era di prendere di mira le cellule mononucleate (cellule che non si erano ancora fuse), poiché abbiamo scoperto che non eravamo in grado di ottenere registrazioni stabili da grandi sincizi. Sebbene sia possibile che alcune delle registrazioni delle cellule che esprimono spike includano sincizi allo stadio iniziale, è improbabile che contengano più di 2 nuclei. In effetti, la capacità media della membrana, una misura indiretta della dimensione delle cellule, non era significativamente diversa tra i diversi gruppi sperimentali. Tuttavia, per evitare problemi con le dimensioni delle celle, tutte le correnti sono state espresse come densità di corrente. Le celle sono state mantenute a 0 mV e le rampe consistevano in un breve passo di 20 ms a -80 mV seguito da una rampa di 500 ms da -80 a +80 mV o in un passo più lungo di 300 ms a –80 mV seguito da una rampa di 500 ms da –80 a +80 mV. I dati sono stati raccolti da entrambi in quanto non vi era alcuna differenza significativa nelle risposte correnti. Per rimuovere la corrente di dispersione dai protocolli di rampa, una linea è stata adattata alla corrente misurata da -80 a -20 mV e sottratta dall'intera curva. Le rampe risultanti hanno mostrato correnti raddrizzatrici esterne chiaramente identificabili che si sono invertite a 0 mV. L'analisi è stata eseguita utilizzando routine scritte personalizzate in Matlab v. R2019a e su Prism v.9.0.1 (GraphPad).

#### Infezione da SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 / England / IC19 / 2020 (IC19), isolato su cellule Caco2 da un campione clinico raccolto da un paziente ricoverato al St Mary's Hospital di Londra (Regno Unito) è stato utilizzato per i test di protezione cellulare. La sopravvivenza delle cellule dopo l'infezione virale è stata misurata fissando le cellule nel 4% di PFA, seguita dalla quantificazione, mediante microscopia ad alto contenuto, dell'area cellulare totale per pozzetto utilizzando l'imaging DPC (Digital Phase Contrast). Il ceppo SARS-CoV-2 England 02/2020/407073 utilizzato per studiare l'effetto antivirale del farmaco è stato fornito dalla Public Health England (per gentile concessione di M. Zambon e H. McGregor <sup>48</sup>, <sup>49</sup>). Per i test di inibizione del farmaco, i farmaci sono stati diluiti in DMSO e aggiunti a piastre a 96 pozzetti di cellule Vero E6 per 2 h. Il virus è stato aggiunto a un MOI 0,05 per 1 ora, le cellule sono state lavate con PBS e quindi coltivate in terreno contenente farmaco fresco per ulteriori 48 ore. La produzione di virus nei supernatanti della coltura è stata quantificata mediante dosaggio della placca utilizzando cellule Vero E6. Il valore IC <sub>50 è</sub> stato definito come la concentrazione del farmaco alla quale si è verificata una diminuzione del 50% nel titolo del virus supernatante. I dati sono stati analizzati utilizzando Prism 8.0 (GraphPad) e IC <sub>50</sub> i valori sono stati calcolati mediante analisi di regressione non lineare utilizzando l'equazione dose-risposta (pendenza variabile).

#### Riepilogo dei rapporti

Ulteriori informazioni sulla progettazione della ricerca sono disponibili nel sommario dei rapporti sulla ricerca sulla natura collegato a questo documento.

#### Disponibilità dei dati

Non ci sono restrizioni sulla disponibilità dei dati. I numeri CAS per i farmaci studiati sono riportati nell'articolo. Tutti i dati sono riportati nell'Articolo o nell'Informativa Supplementare.

#### Riferimenti

**1.** Levi, M., Thachil, J., Iba, T. & Levy, JH Anomalie della coagulazione e trombosi in pazienti con COVID-19. *Lancet Haematol* . **7** , e438 – e440 (2020).

**2.** Goyal, P. et al. Caratteristiche cliniche del Covid-19 a New York City. *N. Engl. J. Med* . **382** , 2372–2374 (2020).

Bose, RJ e Manuel, A. COVID-19 tempesta di citochine: l'interazione tra infiammazione e coagulazione. *Lancet Respir. Med*. **8**, e46 – e47 (2020).

**4.** Edler, C. et al. Morire con infezione da SARS-CoV-2: uno studio autoptico dei primi 80 casi consecutivi ad Amburgo, in Germania. *Int. J. Legal Med* . **134** , 1275–1284 (2020).

5. Hoffmann, M. et al. L'ingresso delle cellule SARS-CoV-2 dipende da ACE2 e TMPRSS2 ed è bloccato da un inibitore della proteasi clinicamente testato. *Cella*181, 271-280 (2020).

**6.** Hoffmann, M., Hoffmann-Winkler, H. & Pohlmann, S. Tempo di priming: come le proteasi cellulari armano le proteine del picco del coronavirus. *I virus di attivazione ospitano proteasi* https://doi.org/10.1007/978–3-319-75474-1\_4 (2018).

**7.** Simmons, G. et al. Gli inibitori della catepsina L prevengono l'ingresso di coronavirus con sindrome respiratoria acuta grave. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **102**, 11876–11881 (2005).

**8.** Glowacka, I. et al. Prova che TMPRSS2 attiva la proteina spike del coronavirus della sindrome respiratoria acuta grave per la fusione di membrana e riduce il controllo virale da parte della risposta immunitaria umorale. *J. Virol* . **85** , 4122–4134 (2011).

**9.** Matsuyama, S. et al. Attivazione efficiente della proteina spike del coronavirus della sindrome respiratoria acuta grave da parte della proteasi transmembrana TMPRSS2. *J. Virol* . **84** , 12658–12664 (2010).

10. Shulla, A. et al. Una serina proteasi transmembrana è collegata al recettore del coronavirus della sindrome respiratoria acuta grave e attiva l'ingresso del virus.
J. Virol . 85 , 873–882 (2011).

**11.** Millet, JK e Whittaker, GR Ingresso nelle cellule ospiti del coronavirus della sindrome respiratoria del Medio Oriente dopo attivazione in due fasi della

proteina spike mediata dalla furina. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **111**, 15214–15219 (2014).

**12.** Burkard, C. et al. L'ingresso nelle cellule del coronavirus avviene attraverso la via endo- / lisosomiale in modo dipendente dalla proteolisi. *PLoS Pathog* . **10** , e1004502 (2014).

**13.** Coutard, B. et al. La glicoproteina spike del nuovo coronavirus 2019-nCoV contiene un sito di scissione simile a una furina assente nel CoV dello stesso clade. *Antiviral Res* . **176** , 104742 (2020).

**14.** Hoffmann, M., Kleine-Weber, H. & Pohlmann, S. Un sito di scissione multibasica nella proteina spike di SARS-CoV-2 è essenziale per l'infezione delle cellule polmonari umane. *Mol. Cella* **78**, 779–784 (2020).

**15.** Bussani, R. et al. La persistenza dell'RNA virale, la sincizia pneumocitaria e la trombosi sono segni distintivi della patologia COVID-19 avanzata. *Lancet EBioMedicine* **61** , 103104 (2020).

**16.** Marks, AR Canali intracellulari di rilascio del calcio: regolatori della vita e della morte cellulare. *Am. J. Physiol* . **272** , H597 – H605 (1997).

**17.** Lang, F., Münzer, P., Gawaz, M. & Borst, O. Regulation of STIM1 / Orai1dipendente Ca<sup>2+</sup> signaling in piastrine. *Thromb. Haemost* . **110** , 925-930 (2013).

18. Boselli, C., Barbone, MS & Lucchelli, A. Antidepressivi più vecchi contro nuovi antidepressivi: sostanza P o calcio antagonismo? *Può. J. Physiol. Pharmacol*.
85, 1004-1011 (2007).

**19.** Berjukow, S. et al. Canali del calcio endogeni nelle cellule del rene embrionale umano (HEK293). *Br. J. Pharmacol* . **118** , 748–754 (1996).

**20.** Chen, TW et al. Proteine fluorescenti ultrasensibili per l'imaging dell'attività neuronale. *Nature* **499** , 295–300 (2013).

**21.** Thastrup, O., Cullen, PJ, Drøbak, BK, Hanley, MR & Dawson, AP Thapsigargin, un promotore del tumore, scarica i depositi di Ca<sup>2+</sup> intracellulari mediante l'inibizione specifica del reticolo endoplasmatico Ca<sup>2+</sup> -ATPasi. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **87**, 2466–2470 (1990).

**22.** Miner, K. et al. Riproposizione di farmaci: gli antielmintici niclosamide e nitazoxanide sono potenti antagonisti di TMEM16A che broncodilano completamente le vie aeree. *Davanti. Pharmacol* . **10** , 51 (2019).

**23.** Suzuki, J., Umeda, M., Sims, PJ & Nagata, S. rimescolamento fosfolipidico dipendente dal calcio mediante TMEM16F. *Nature* **468**, 834–838 (2010).

**24.** Jin, X. et al. Attivazione del Cl<sup>-</sup> canale ANO1 da segnali di calcio localizzati nei neuroni sensoriali nocicettivi richiede l'accoppiamento con il recettore IP3. *Sci. Segnale* . **6** , ra73 (2013).

**25.** Cabrita, I. et al. Effetti differenziali degli anoctaminici sui segnali del calcio intracellulare. *FASEB J* . **31** , 2123–2134 (2017).

**26.** Helming, L. & Gordon, S. mediatori molecolari della fusione dei macrofagi. *Trends Cell Biol* . **19** , 514-522 (2009).

**27.** Verma, SK et al. La fosfatidilserina sulla superficie cellulare regola la fusione dei precursori degli osteoclasti. *J. Biol. Chem* . **293** , 254-270 (2018).

**28.** van den Eijnde, SM et al. L'espressione transitoria della fosfatidilserina nelle aree di contatto cellula-cellula è necessaria per la formazione del miotubo. *J. Cell Sci* . **114** , 3631–3642 (2001).

**29.** Lyden, TW, Ng, AK & Rote, NS Modulazione dell'espressione dell'epitopo della fosfatidilserina da parte delle cellule BeWo durante il trattamento con forskolina. *Placenta* **14** , 177–186 (1993).

30.

**Ro**vale, CM et al. La fosfatidilserina sugli spermatozoi vitali e il macchinario fagocitico negli ovociti regolano la fecondazione dei mammiferi. *Nat. Commun* . **10** , 4456 (2019).

**31.** Whitlock, JM, Yu, K., Cui, YY & Hartzell, HC Anoctamin 5 / TMEM16E facilita la fusione delle cellule precursori muscolari. *J. Gen. Physiol* . **150** , 1498-1509 (2018).

**32.** Zhang, Y. et al. La scramblasi fosfolipidica TMEM16F media la fusione dei trofoblasti e lo sviluppo placentare. *Sci. Adv* . **6** , eaba0310 (2020).

**33.** Bill, A. et al. ANO1 / TMEM16A interagisce con EGFR e si correla con la sensibilità alla terapia mirata all'EGFR nel cancro della testa e del collo. *Oncotarget* **6** , 9173–9188 (2015).

**34.** Tian, Y. et al. Attivazione calmodulina-dipendente del canale epiteliale calciodipendente del cloruro TMEM16A. *FASEB J* . **25** , 1058-1068 (2011).

**35.** Maertens, C., Wei, L., Voets, T., Droogmans, G. & Nilius, B. Blocco mediante fluoxetina di canali anionici regolati dal volume. *Br. J. Pharmacol* . **126** , 508-514 (1999).

**36.** Yang, YD et al. TMEM16A conferisce conduttanza cloruro dipendente dal calcio attivato dal recettore. *Nature* **455** , 1210–1215 (2008).

**37.** Zhang, X. et al. L'inibizione di TMEM16A Ca<sup>2+</sup> attivati Cl<sup>-</sup> canali per avermectins è essenziale per i loro effetti antitumorali. *Pharmacol. Ris* . **156** , 104763 (2020).

**38.** Wang, Q. et al. TMEM16A Ca <sup>2+</sup> attivati Cl <sup>-</sup> canale inibizione migliora acuta pancreatite via IP  $_3$  R / Ca <sup>2+</sup> / NFkB / IL-6 via di segnalazione. *J. Adv. Ris* . **23** , 25–35 (2020).

39.

**Ya**ng, H. et al. TMEM16F forma un canale cationico attivato con Ca<sup>2+</sup> necessario per il rimescolamento dei lipidi nelle piastrine durante la coagulazione del sangue. *Cella* **151** , 111–122 (2012).

40. Baig, AA et al. Il rimescolamento fosfolipidico della membrana piastrinica mediato da TMEM16F è fondamentale per l'emostasi e la trombosi, ma non per la tromboinfiammazione nei topi - breve rapporto. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*.
36, 2152–2157 (2016).

**41.** Ma, MM et al. TMEM16A contribuisce alla disfunzione endoteliale facilitando la generazione di specie reattive dell'ossigeno derivate dall'ossidasi Nox2 nell'ipertensione. *Ipertensione* **69** , 892–901 (2017).

42. Gonnert, R. & Schraufstatter, E. Un nuovo molluschicida: molluschicida
Bayer 73. *Proc. Sesto Int. Congr. Trop. Med. Malaria, Lisbona, 5–13 settembre 1958* 2, 197–202 (1959).

**43.** Kappagoda, S., Singh, U. & Blackburn, BG Antiparasitic therapy. *Mayo Clin. Proc*. **86**, 561–583 (2011).

**44.** Jeon, S. et al. Identificazione di farmaci antivirali candidati contro SARS-CoV-2 da farmaci approvati dalla FDA. *Antimicrob. Agenti Chemother* . **64** , e00819-20 (2020).

**45.** Andrews, P., Thyssen, J. & Lorke, D. La biologia e la tossicologia dei molluschicidi, Bayluscide. *Pharmacol. Ther* . **19** , 245–295 (1982).

**46.** Burock, S. et al. Studio di fase II per indagare la sicurezza e l'efficacia della niclosamide applicata per via orale in pazienti con metastasi metacrone o sincrone di un cancro del colon-retto in progressione dopo la terapia: lo studio NIKOLO. *BMC Cancer* **18**, 297 (2018).

**47.** Gabisonia, K. et al. La terapia con microRNA stimola la riparazione cardiaca incontrollata dopo un infarto miocardico nei suini. *Nature* **569** , 418–422 (2019).

**48.** Seow, J. et al. Osservazione longitudinale e diminuzione delle risposte anticorpali neutralizzanti nei tre mesi successivi all'infezione da SARS-CoV-2 negli esseri umani. *Nat. Microbiol* . **5** , 1598–1607 (2020).

**49.** Carter, MJ et al. Immunofenotipi periferici nei bambini con sindrome infiammatoria multisistemica associata a infezione da SARS-CoV-2. *Nat. Med* . **26** , 1701–1707 (2020).

#### Ringraziamenti

Ringraziamo S. Neil, A. Cave, G. Giacca, A. Ivetic e tutti gli altri membri del laboratorio Giacca che hanno contribuito da casa durante il periodo di blocco per i commenti. Riconosciamo la generosità di N. Leblanc, KM Hoque, M. Hayashi e Iain Greenwood per il loro dono di reagenti e ringraziamo M. Guiomar Oliveira per l'assistenza nella preparazione delle colture cellulari per l'elettrofisiologia. Questo lavoro è stato sostenuto da borse di studio del programma King's Together del King's College London (a MG e MHM); Borsa di studio del programma British Heart Foundation (BHF) RG / 19/11/34633 (MG); Borsa RE / 18/2/34213 del King's College London BHF Center of Research Excellence (a AMS e MG); Sovvenzione avanzata del Consiglio europeo della ricerca (ERC) 787971 "CuRE" (a MG); Wellcome Trust Investigator Awards (215508 / Z / 19 / Z a JB e 106223 / Z / 14 / Z a MHM), sovvenzione del progetto BBSRC BB / S000526 / 1 (JB),

#### Informazioni sull'autore

1. Questi autori hanno contribuito allo stesso modo: Luca Braga, Hashim Ali

#### Affiliazioni

1. King's College London, British Heart Foundation Centre of Research Excellence, School of Cardiovascular Medicine & Sciences, Londra, Regno Unito

Luca Braga, Hashim Ali, Ilaria Secco, Elena Chiavacci, Antonio Cannatà, Giorgia Rizzari, Edoardo Schneider, Ajay M. Shah & Mauro Giacca

Drugs that inhibit TMEM16 proteins block SARS-CoV-2 spike-induced syncytia | Nature

2. MRC Center for Neurodevelopmental Disorders, Institute of Psychiatry, Psychology and Neuroscience, King's College London, Londra, Regno Unito

Guilherme Neves e Juan Burrone

3. Centre for Developmental Neurobiology, Institute of Psychiatry, Psychology and Neuroscience, King's College London, Londra, Regno Unito

Guilherme Neves e Juan Burrone

4. Dipartimento di malattie infettive, Imperial College London, Londra, Regno Unito

Daniel Goldhill, Rebecca Penn e Wendy S. Barclay

5. Dipartimento di malattie infettive, Scuola di immunologia e scienze microbiche, King's College London, Londra, Regno Unito

Jose M. Jimenez-Guardeño, Ana M. Ortega-Prieto e Michael H. Malim

6. Dipartimento di Scienze Mediche, Chirurgiche e della Salute, Università degli Studi di Trieste, Trieste, Italia

Rossana Bussani, Chiara Collesi e Mauro Giacca

7. Centro Internazionale di Ingegneria Genetica e Biotecnologie (ICGEB), Trieste, Italia

Chiara Collesi, Edoardo Schneider & Mauro Giacca

8. Istituto di Biofisica (IBF), Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Trento, Italia

Daniele Arosio

### Contributi

LB ha eseguito le proiezioni HTS; HA, IS e LB hanno eseguito la maggior parte degli studi di biologia cellulare (esternalizzazione della fosfatidilserina, effetto della sovraespressione plasmidica e studi RNAi). HA ha eseguito gli immunoblottaggi. È eseguito gli studi di imaging time-lapse. La CE ha eseguito la clonazione del vettore di espressione e l'analisi del traffico intracellulare spike. GN e JB hanno eseguito lo studio di elettrofisiologia. DG, RP e WSB hanno condotto studi sull'effetto dei farmaci sulla protezione delle cellule Vero e Calu-3 da SARS-CoV-2; JMJ-G., AMO-P. e MHM hanno eseguito esperimenti di attività antivirale contro studi SARS-CoV-2 e RNAi su cellule Vero e Calu-3; RB ha eseguito autopsie e istologia sui campioni dei pazienti; AC ha fornito consulenza sul meccanismo d'azione dei farmaci clinici; GR ha svolto indagini sull'effetto della proteina spike sulle vie cellulari; CC ha eseguito l'immunoistochimica sui campioni dei pazienti; ES ha eseguito l'ibridazione dell'RNA in situ sui campioni dei pazienti; DA ha fornito consulenza e reagenti per studi sui canali del cloruro; AMS ha fornito consulenza sulla progettazione e sugli aspetti clinici dello studio. MG ha ideato e coordinato lo studio. IS, EC, GN e DG hanno contribuito allo stesso modo.

#### autore corrispondente

Corrispondenza a Mauro Giacca.

#### **Dichiarazioni etiche**

#### Interessi conflittuali

Il King's College di Londra ha depositato una domanda di brevetto sui metodi utilizzati per rilevare i sincizi indotti dalla proteina spike SARS-CoV-2 come descritto in questo articolo.

#### Informazioni aggiuntive

**Informazioni** *sulla* **revisione tra pari La** *natura* ringrazia Lily Jan e gli altri revisori anonimi per il loro contributo alla revisione tra pari di questo lavoro.

**Nota dell'editore** Springer Nature rimane neutrale rispetto alle rivendicazioni giurisdizionali nelle mappe pubblicate e nelle affiliazioni istituzionali.

#### Dati e tabelle di dati estesi

Dati estesi Fig. 1 Sincizia indotta dalle proteine spike del coronavirus. a, Pneumociti sinciziali nei polmoni di pazienti COVID-19. Immunoistochimica utilizzando gli anticorpi indicati. Ingrandimento originale, × 40. Ulteriori informazioni sulla coorte di pazienti sono state precedentemente descritte <sup>15</sup>. **b**, Ibridazione in situ utilizzando due sonde di RNA modificato da LNA per il genoma SARS-CoV-2 (quattro pannelli superiori) e immunoistochimica con un anticorpo antispike. Campioni polmonari di individui morti nel 2018 per altre cause sono serviti come controlli negativi per questa analisi e un controllo positivo è stata l'ibridazione con una sonda per l'onnipresente RNA U6, come descritto in precedenza 47, che ha mostrato la localizzazione nucleare in tutte le cellule. Barra della scala, 50 µm. La tecnica di ibridazione in situ è stata precedentemente descritta<sup>15</sup>. c, Alterazioni citologiche indotte dalla proteina spike. Le cellule Vero sono state trasfettate con un plasmide che esprime spike e coltivate per 12 ore; La proteina spike è stata quindi visualizzata mediante immunofluorescenza e il corpo cellulare è stato colorato utilizzando HCS CellMask DeepRed. Le cellule spike-positive mostrano marcate alterazioni morfologiche, inclusa la presenza di numerosi filopodi (inseriti nel pannello di sinistra) e sporgenze di membrana che contattano la membrana plasmatica delle cellule vicine. Barra della scala, 50 µm. d, e, Syncytia indotta da altre proteine spike del coronavirus. Le cellule Vero sono state trasfettate per esprimere la proteina spike di MERS-CoV, SARS-CoV o SARS-CoV-2. Dopo 24 ore, le cellule sono state immunocolorate per i nuclei (bianco). Le immagini rappresentative sono in **d**e la quantificazione è in **e** . I dati sono media  $\pm$  sem; n = 4. \*\* P < 0.01, ANOVA unidirezionale con correzione Bonferroni.

#### Dati estesi Fig. 2 Test di inibizione della fusione cellulare.

**a** , Schema del test di inibizione della fusione cellulare. Il test si basa sulla co-coltura, per 12 h, di cellule Vero con cellule U2OS transitoriamente trasfettate per esprimere la proteina spike. Per consentire la valutazione quantitativa della fusione cellulare mediante microscopia ad alto contenuto, le cellule U2OS "donatrici" spike vengono caricate con punti quantici (punti Q) che emettono a 525 nm (verdi) mentre le cellule Vero "accettori" con punti Q che emettono a 800 nm (rosso). Gli screening sono stati eseguiti in piastre da 384 pozzetti co-placcando cellule "donatrici" e "accettori" caricate con Q-dot, seguite da un trattamento farmacologico a concentrazione standard di 10 µM. Dopo 24 ore, le cellule sono state fissate ed elaborate mediante microscopia ad alto contenuto. In ciascuna piastra sono stati inclusi più pozzetti di controllo con DMSO all'1% e nessun farmaco. b, Immagini fluorescenti di cellule U2OS (punti Q verdi) e cellule Vero (punti Q rossi) co-coltivate. Le cellule sono colorate con HCS CellMask Blue; le cellule fuse (eterocarioni) sono identificate come cellule aventi più di due nuclei e contenenti punti Q sia verdi che rossi nel loro citoplasma. Pertanto, il test CFIA segna l'effetto dei farmaci sulla fusione di cellule eterologhe e rileva gli inibitori che bloccano la fusione di appena due cellule. Il test ha una gamma dinamica più di cinque volte. Barra della scala, 100 µm c, Pipeline di analisi ad alto contenuto di immagini CFIA. Le immagini sono state analizzate utilizzando il software Harmony (PerkinElmer). L'area citoplasmatica, colorata con HCS Cell Mask Blue, è stata definita utilizzando il modulo di analisi "Find Citoplasm" (Harmony) e il numero di punti verdi o rossi è stato contato utilizzando il modulo di analisi "Find Spots" (Harmony). Tutte le cellule che hanno ottenuto un'area nucleare maggiore di cinque volte l'area media di un singolo nucleo ed erano simultaneamente positive per almeno due punti rossi e due verdi sono state considerate fuse (evidenziate in verde). I dati sono stati espressi come percentuale di celle fuse. d, Risultati cumulativi dello screening CFIA delle librerie di farmaci approvate dalla FDA / EMA. Abbiamo esaminato due librerie di farmaci approvate dalla FDA / EMA, The Spectrum Collection, MS Discovery System e Prestwick Chemical Library, Prestwick Chemical; 2.545 e 1.280 singole piccole molecole, rispettivamente. Il grafico mostra i risultati cumulativi delle due proiezioni. La percentuale di sincizia normalizzata sul totale delle cellule viene tracciata come punteggio z . I composti con un punteggio  $z \le -2,58$  (linea tratteggiata rossa, 0,005% della coda della distribuzione) sono mostrati in rosso, quelli compresi tra  $\leq -1,96$  (0,025% della coda, linea tratteggiata blu) e -2,58 sono in blu. Nella raccolta Prestwick, 34 farmaci hanno inibito la fusione mediata da S con un punteggio z <-1,96, di cui 8 con zpunteggio <-2,58. Nella raccolta MS Discovery Spectrum, 54 farmaci sono stati eseguiti con un punteggio z < -1,96 di cui 14 con un punteggio z<-2,58. Tutti i controlli non trattati per entrambe le librerie avevano un punteggio z

nell'intervallo ± 0,40. **e** . Valutazione analitica dei risultati CFIA. Viene mostrato un grafico di correlazione tra la percentuale di sincizi per pozzetto e il numero totale di cellule per pozzetto per le due librerie di farmaci sottoposte a screening. Farmaci che mostrano un numero totale di cellule a ≥2 sd inferiore alla media di tutti i farmaci (linea tratteggiata rossa) considerati tossici e non inclusi nell'analisi successiva. La distribuzione dei pozzetti di controllo (1% DMSO) è indicata da un riquadro verde. **f**, Frequenza di distribuzione della percentuale di sincizi tracciata come numero di farmaci rispetto al punteggio z della percentuale di sincizi per pozzetto; le cellule tossiche sono state escluse come in **e** . Le linee tratteggiate blu sono a punteggi  $z \pm 1,96$  e le linee tratteggiate rosse a punteggi  $z \pm 2,56$ . Viene visualizzato il numero di farmaci. **g** , Grafico di correlazione per i farmaci comuni tra le due biblioteche. I dati vengono tracciati come punteggio z della percentuale di sincizi per pozzetto. Le linee blu e rosse sono come sopra.

#### Dati estesi Fig. 3 Risultati dello screening SIA.

a, Analisi dei risultati CFIA. Grafico di correlazione tra la percentuale di sincizi per pozzetto e il numero totale di cellule per pozzetto. I dati sono presentati come in Extended Data Fig. 2e . b , Frequenza di distribuzione dei risultati dello screening. I dati sono mostrati come in Dati estesi Fig. 2f. c, Grafico di correlazione per i farmaci comuni tra le due biblioteche. I dati sono mostrati come in Dati estesi Fig. 2g. d, Immagini di immunofluorescenza rappresentative per proteina spike (verde), corpo cellulare (rosso, utilizzando HCS CellMask DeepRed) e nuclei (blu, Hoechst) di cellule trattate con i farmaci indicati che aumentano la formazione di sincizi rispetto alle cellule di controllo trattate con DMSO. Il numero di sincizi è mostrato nella parte inferiore di ciascuna coppia di immagini come percentuale dei nuclei totali. Barra della scala, 500 µm. Immagini rappresentative in uno dei sei pozzetti. e, Effetto doserisposta sulla formazione di sincizi di niclosamide, clofazimina e salinomicina. I grafici mostrano l'effetto di diverse dosi dei tre farmaci sulla sincizia formata dalle cellule Vero e HEK / ACE2 in risposta all'espressione dei picchi. Le cellule sono state trasfettate con pEC117-Spike-V5 e, 12 ore dopo, trattate con le concentrazioni di farmaco indicate per ulteriori 24 ore. I sincizi sono stati quantificati mediante microscopia ad alto contenuto e sono espressi come percentuale di nuclei cellulari (*n* = 6 pozzetti per dose; i dati sono media  $\pm$  sd). La vitalità cellulare è stata valutata

mediante conteggi ad alto contenuto del numero di nuclei in ciascun pozzetto.

#### Dati estesi Fig. 4 Analisi dei risultati dello screening.

**a** , Effetto dei singoli farmaci nello screening SIA raggruppati per classi terapeutiche. I dati sono punteggi *z* dallo screening di entrambe le biblioteche (i farmaci presenti in entrambe le biblioteche sono duplicati). Le linee tratteggiate hanno un punteggio *z* ± 2,58 (rosso) e ± 1,96 (blu). Antipsicotici, antidepressivi e antagonisti del recettore dell'istamina H <sub>1 hanno</sub> esercitato effetti negativi sulla formazione di sincizi. Un'altra classe di farmaci inibitori includeva i glicosidi cardiaci, poiché digitossina, ouabaina, lanatoside C e digitossigenina erano tutti nella coda dello 0,025% della distribuzione quando usati a 10 µM. Al contrario, i farmaci antifungini della classe degli imidazoli avevano una tendenza ad aumentare la frequenza dei sincizi. **b** , diagramma di Venn che mostra i farmaci con *z*-punti <-2,58 dai risultati degli screening CFIA e SIA utilizzando le due librerie di farmaci, come indicato. I farmaci in grassetto sono quelli ulteriormente testati sull'infezione da SARS-CoV-2. CFIA e SIA sono intrinsecamente differenti, poiché la prima verifica gli eventi di fusione della membrana plasmatica tra singole cellule eterologhe mentre la seconda segna la formazione di sincizi più grandi.

#### Dati estesi Fig. 5 Capacità protettiva cellulare dei farmaci contro SARS-CoV-2.

**a** , Elenco dei farmaci (numero CAS e nome chimico) selezionati dai test di sincizia e testati con SARS-CoV-2 infettiva. **b** , Effetto dei farmaci sulla vitalità cellulare. Le cellule Vero E6 sono state preincubate con una selezione di farmaci a 10  $\mu$ M per 2 ore prima che venissero aggiunti 100 TCID <sub>50</sub> di IC19. Dopo 5 giorni, le cellule sono state fissate in PFA al 4%. La sopravvivenza delle cellule è stata quantificata mediante densitometria come l'area cellulare totale per pozzetto (media di due repliche). I farmaci etichettati con "Tox" hanno mostrato un effetto citotossico alla concentrazione utilizzata indipendentemente dall'infezione virale. I farmaci in verde sono stati ulteriormente testati per la risposta dose-dipendente. **c**, Protezione cellulare dose-dipendente di farmaci selezionati contro l'infezione da SARS-CoV-2. Le cellule sono state preincubate con farmaci o un controllo DMSO negativo a diverse concentrazioni per 2 ore prima che venissero aggiunti 100 TCID <sub>50</sub> di IC19. Dopo 3 giorni, le cellule sono state fissate nel 4% di PFA e la sopravvivenza cellulare è stata quantificata mediante microscopia ad alto contenuto come area cellulare totale per pozzetto utilizzando l'imaging a contrasto di fase digitale (DPC) (*n* = 3). L'immagine mostra

una delle repliche. Niclosamide e salinomicina hanno protetto contro la lisi cellulare indotta da virus in un'ampia gamma di concentrazioni da 5 µM fino a 39 nM per niclosamide e salinomicina, mentre la clofazimina ha mostrato un effetto citoprotettivo dose-dipendente superiore a 1 µM. Per la sertralina e la deptropina, l'effetto citoprotettivo era solo superiore a 2,5 µM e vicino agli effetti citotossici del solo farmaco (che sono stati valutati separatamente, non mostrati). d, Inibizione della replicazione virale di SARS-CoV-2 da parte di farmaci selezionati nelle cellule respiratorie Calu-3. Le cellule sono state preincubate con farmaci (niclosamide 2,5 µM, clofazimina 5  $\mu$ M e salinomicina 2,5  $\mu$ M) per 2 ore e quindi infettate con SARS-CoV-2. Dopo 1 ora, le cellule sono state lavate con PBS e quindi coltivate in mezzo fresco contenente farmaco per altre 48 ore. La produzione di virus nei supernatanti della coltura è stata quantificata mediante dosaggio della placca utilizzando cellule Vero E6. I grafici mostrano la produzione di virus nei supernatanti della coltura quantificata mediante analisi della placca utilizzando cellule Vero E6 (media  $\pm$  sem; n = 7). \*\* P<0,01, ANOVA unidirezionale con correzione post hoc Bonferroni. e, Immagini rappresentative di cellule Calu-3 sinciziali positive per infezione da SARS-CoV-2. Le cellule sono state immunocolorate per la proteina spike (verde) e i nuclei (blu). f, Inibizione della sincizia da parte di niclosamide dopo infezione da SARS-CoV-2. Le cellule Calu-3 sono state preincubate con niclosamide 2,5 µM e quindi infettate con SARS-CoV-2 in presenza del farmaco. Dopo 1 ora, le cellule sono state lavate con PBS e quindi coltivate in mezzo fresco contenente farmaco. Dopo 48 ore, le cellule sono state immunocolorate per spike (verde), nucleocapside (rosso) e nuclei (blu). Barra della scala, 200 µm.

### Dati estesi Fig. 6 Effetto dei farmaci sulle oscillazioni di Ca<sup>2+</sup>.

**a** , Ampiezza dei picchi transitori di calcio per gruppo di 4 cellule GCaMP <sup>+</sup> in media in almeno dodici 180 µm <sup>2</sup> ROI per condizione. Cellule Vero co-trasfettate con GCaMP6 e un vettore vuoto (barre grigie) o con proteina spike (barre verdi) e trattate con i farmaci specificati. I dati sono espressi come  $\Delta F / F$ ; le caselle indicano il 25 ° -75 ° percentile e la mediana, i baffi indicano i valori minimo-massimo; \*\* *P* <0,01, Kruskal – Wallis, bilaterale, con correzione di Dunn per confronti multipli. **b** , Distribuzione delle frequenze transitorie di singole cellule in un'analisi di 400 min. I dati sono espressi come percentuale di celle. Vengono visualizzati i risultati di almeno 50 cellule per condizione. \**P* <0,05, \*\* *P* <0,01, Kruskal – Wallis, bilaterale, con correzione di Dunn per confronti multipli. **c** , Transitori di calcio nel tempo in cellule Vero co-trasfettate con GCaMP6 e un vettore vuoto (a sinistra) o con picco (a destra) e il trattamento indicato. I dati sono espressi come  $\Delta F / F$  nel tempo (min); ogni riga è una di almeno dodici 180 µm<sup>2</sup> ROI per condizione, che rappresentano in media un gruppo di 4 cellule GCaMP<sup>+</sup>. **d** , Ampiezza dei picchi transitori di calcio per gruppo di 4 cellule GCaMP<sup>+</sup> in media in almeno 12 180 µm<sup>2</sup>ROI per condizione. Cellule Vero co-trasfettate con GCaMP6 e un vettore vuoto (barre grigie) o con spike (barre verdi) e trattate come indicato. I dati sono espressi come  $\Delta F / F$ ; scatole come in **a** . \*\* *P* <0,01, Kruskal – Wallis, bilaterale, con correzione di Dunn per confronti multipli.

#### Dati estesi Fig. 7 Induzione di oscillazioni di Ca<sup>2+</sup> da parte delle proteine Spike del coronavirus e al knockdown di ACE2 e TMEM16F.

**a** , **c** , Transitori di calcio nel tempo in cellule Vero co-trasfettate con GCaMP6 e i plasmidi e siRNA indicati. I dati sono espressi come  $\Delta F / F$  nel tempo (min); ogni riga è 1 di almeno 12 180 µm<sup>2</sup> ROI per condizione, che rappresenta un gruppo di 4 cellule GCaMP<sup>+</sup> in media. **b** , **d** , Ampiezza dei picchi transitori di calcio per gruppo di 4 cellule GCaMP<sup>+</sup> in media in almeno 12 180 µm<sup>2</sup> ROI per condizione. I dati sono espressi come  $\Delta F / F$ ; caselle come in Extended Data Fig. 6a . \* *P* <0,05, \*\* *P* <0,01, Kruskal – Wallis, bilaterale, con correzione di Dunn per confronti multipli.

#### Dati estesi Fig. 8 Livelli di espressione dei membri della famiglia TMEM16.

**a** , Profili di espressione delle 10 proteine TMEM16 note in diversi tipi di cellule e cellule respiratorie primarie umane. L'RNA è stato preparato dalle linee cellulari indicate e dalle cellule epiteliali delle vie aeree bronchiali umane primarie. I livelli di mRNA quantificati da qPCR sono espressi rispetto all'mRNA di *GAPDH* . I dati sono la media ± sem di tre esperimenti indipendenti. **b** , Western blot che mostra i livelli di TMEM16F e TMEM16A in condizioni basali e in caso di sovraespressione e dopo la trasfezione del picco di SARS-CoV-2 contrassegnato con V5. La  $\beta$ -actina è stata utilizzata come controllo del carico. Macchia rappresentativa di tre ripetizioni indipendenti. **c**, Espressione di TMEM16A (in alto) e TMEM16F (in basso) in presenza dei primi 5 farmaci selezionati. L'RNA è stato preparato dalle cellule HEK293 / ACE2 trasfettate con proteina spike o plasmidi di controllo in presenza dei farmaci indicati per 24 ore. I livelli di mRNA di *TMEM16A* e *TMEM16F* sono stati quantificati da qPCR e sono espressi come fold over control condition (DMSO), dopo la

normalizzazione *sull'mRNA* housekeeping di *GAPDH*. I dati sono la media  $\pm$  sem di tre esperimenti indipendenti.

## Dati estesi Fig. 9 Espressione di TMEM16A, TMEM16F e ACE2 in diverse condizioni sperimentali.

**a**, Livelli di espressione dei geni esaminati in questo studio in base al loro atterramento individuale nelle cellule Vero, HEK293 / ACE2 e Calu-3. L'RNA è stato preparato dalle diverse linee cellulari dopo la trasfezione con gli siRNA indicati (siRNA1 non-targeting di controllo siNT1) ei livelli di mRNA sono stati quantificati mediante qPCR. I dati sono espressi come cambiamento di piega rispetto alle cellule trattate con simulazioni dopo la normalizzazione rispetto all'mRNA di mantenimento della GAPDH. I dati sono la media  $\pm$  sem di tre esperimenti indipendenti. **b**, analisi Western blotting che mostra i livelli di ACE2 e TMEM16F in presenza di proteine spike dopo aver silenziato geni selezionati (ACE2, TMPRSS2, TMEM16A, TMEM16B, TMEM16E, TMEM16F e XKR8). La quantità di spike, ACE2 e TMEM16F misurata mediante immunoblotting viene mostrata dopo il trattamento cellulare con i rispettivi siRNA. I livelli di proteine spike, ACE2 e TMEM16F sono stati valutati mediante immunoblotting con anticorpi rispettivamente anti-V5, anti-ACE2 e anti-TMEM16F. La  $\beta$ -actina è stata utilizzata come controllo del carico. Macchia rappresentativa di tre ripetizioni indipendenti. **c** , Come in **b** nelle celle HEK293 / ACE2. Il blot con l'anticorpo anti-TMEM16A non ha rilevato alcuna banda della massa attesa (Extended Data Fig. 7b).

## Dati estesi Fig. 10 Densità di corrente ed esternalizzazione della fosfatidilserina.

**a** , Risultati delle registrazioni di tensione a cella intera di celle HEK293 che misurano la densità di corrente in risposta a una rampa di tensione. Le correnti sono state misurate utilizzando una rampa di tensione di 500 ms da –80 a +80 mV nelle celle di controllo (Cont; traccia nera, n = 34; controlli come in Fig. 3c – e ; registrati con 28 mM di calcio intracellulare), nelle cellule trattate con l'antagonista del canale TMEM16 di riferimento benzbromarone (Bbz, 10 mM; traccia marrone, n = 3) o registrato con una bassa concentrazione di calcio intracellulare (basso [Ca], 0,5 mM; traccia blu, n = 21) (n = 4). Il riquadro mostra la densità di corrente misurata a +75 mV. \*\* P <0,01, Kruskal – Wallis, bilaterale, con i confronti multipli post hoc di Dunn. Tutti i valori sono visualizzati come media ± sem **b** , **c** , Inibizione dell'esposizione alla fosfatidilserina

dopo il trattamento con *TMEM16F* siRNA e farmaci indicati. Immagine rappresentativa delle cellule Vero trasfettate inversamente con gli siRNA indicati e colorate per l'annessina XII senza (in alto) o con (in basso) induzione di ionomicina (10  $\mu$ M). Annessina in verde, contrasto di fase in grigio. Barra della scala, 500  $\mu$ m. Allargamento in **c** . Le immagini selezionate e la quantificazione sono in Fig. 3**f**, **g** . **d**, Immagine rappresentativa delle cellule Vero trattate con niclosamide 100 nM, clofazimina 500 nM o salinomicina 500 nM e colorate per l'annessina XII senza (in alto) o con (in basso) induzione di ionomicina (5  $\mu$ M). Annessina in verde, contrasto di fase in grigio. Barra della scala, 500  $\mu$ m. Allargamento in **b** . Immagini selezionate e quantificazione in Fig. 3**h**, i . **e** , reattività dell'annessina XII (esternalizzazione della fosfatidilserina) dei sincizi che esprimono la proteina spike. Le cellule sono state trasfettate con il plasmide che esprime spike e un plasmide che esprime mCherry che trasporta un segnale di localizzazione nucleare (nuclei arancioni). Barra della scala, 500  $\mu$ m. Immagine rappresentativa di oltre 10 sincizi in almeno 3 esperimenti indipendenti.

## Dati estesi Fig. 11 TMEM16F è coinvolto nella formazione di sincizi indotti da spike SARS-CoV-2.

a, b, Inibizione della formazione di sincizi nelle cellule Calu-3 dalla sottoregolazione di TMEM16F. Le cellule Calu-3 sono state prima silenziate per ciascuno dei geni indicati o trattate con siNT1 (siRNA1 non mirato come controllo negativo) e quindi, dopo 24 ore, trasfettate per esprimere la proteina spike. Dopo altre 24 ore, le cellule sono state immunocolorate per spike (verde) e nuclei (blu). Le immagini rappresentative sono in **a** , la quantificazione in **b** . I dati (media  $\pm$  sd; n = 3) sono rappresentati graficamente come percentuale di sincizi (area cellulare  $\geq 20.000 \ \mu m^2$ ) normalizzata al numero totale di cellule ed espressa come variazione di piega rispetto alle cellule trattate fittizie (solo lipidi). Barra della scala, 500 µm. \* *P* <0,05, \*\* *P* <0,01, ANOVA unidirezionale con correzione post hoc di Dunnett. **c** , **d** , Effetto dei singoli siRNA che formano il pool di siRNA di Dharmacon contro TMEM16F. L'immagine mostra l'efficienza della formazione di sincizi dopo la trasfezione del cDNA spike nelle cellule Vero in cui TMEM16F è stato sottoregolato utilizzando il pool 4-siRNA (che è stato utilizzato in tutti gli altri esperimenti in questo articolo) o i singoli siRNA che formano questo pool (siDH\_1-4). Abbiamo scoperto che il siRNA siDH\_2 commerciale non corrisponde alla sequenza TMEM16F. I dati in **d** sono media  $\pm$  sd,

rappresentati graficamente come percentuale di sincizi (area cellulare  $\geq 20.000 \ \mu m^2$ ) normalizzata sul numero totale di cellule ed espressa come volte rispetto alle cellule trattate fittizie (solo lipidi). \*\* *P* <0,01, ANOVA unidirezionale con correzione post hoc di Dunnett. e, f, Effetto di siRNA selezionati sulla formazione di sincizi indotta da MERS-CoV e SARS-CoV-2. Le cellule Vero sono state prima silenziate per ciascuno dei geni indicati (ACE2 e TMEM16F) o trattate con siNT1 (siRNA1 non mirato come controllo negativo) e quindi, dopo 24 ore, trasfettate per esprimere la proteina spike MERS o SARS-CoV. Dopo altre 24 ore, le cellule sono state immunocolorate per i nuclei (bianco). Le immagini rappresentative sono nei pannelli a sinistra, la quantificazione nel grafico a barre a destra. Dati (media  $\pm$  sem; n = 3) vengono tracciati come percentuale di sincizi normalizzata sul numero totale di cellule ed espressi come cambiamento di piega rispetto alle cellule trattate similmente (solo lipidi). \* P <0,05, \*\* P < 0.01, ANOVA unidirezionale con correzione post hoc Bonferroni. g, la sovraespressione di TMEM16F induce la formazione di sincizi mediati da spike. Le cellule HEK293 o ACE2 sono state co-trasfettate con TMEM16A o TMEM16F umano insieme a un plasmide che esprime spike. Dopo altre 24 ore, le cellule sono state immunocolorate per proteine spike (verde), TMEM16F (rosso) e nuclei (blu). Immagini selezionate e quantificazione in Fig. 31, m. Barra della scala, 200 µm.

#### Informazione supplementare

#### Informazione supplementare

Questo file contiene le tabelle supplementari 1-3 e la figura supplementare 1.

#### Riepilogo dei rapporti Video 1

: Fusione cellulare eterologa Imaging time-lapse di 12 ore di co-colture di cellule U2OS umane trasfettate con un plasmide di controllo (a sinistra) o con pEC117-Spike-V5, che esprime la proteina SARS-CoV-2 S (a destra), insieme a cellule Vero esprimendo EGFP. Alla fine del periodo di imaging, le cellule sono state fissate e i nuclei sono stati controcolorati con DAPI.

#### Video 2

: Formazione di sincizi Imaging time-lapse di 12 ore di cellule Vero trasfettate con GCaMP6s (verde), che mostra la fusione cellulare progressiva e la formazione di sincizi.

#### Video 3

: Formazione di sincizi Imaging time-lapse di 12 ore di cellule Vero trasfettate con GCaMP6s (verde), che mostra la fusione cellulare progressiva e la formazione di sincizi.

#### Video 4

: Oscillazioni del calcio nelle cellule in fase di fusione Imaging time-lapse di 12 ore di co-colture di cellule Vero che esprimono il sensore Ca2 + GCaMP6s con cellule U2OS che esprimono Spike e mCherry. Gli eventi di fusione mediati da spike erano correlati a numerose oscillazioni nei livelli di Ca2 + intracellulare. I singoli fotogrammi di questo film sono in **Fig**. 2 **b**.

#### Video 5

: Effetto dei farmaci che inibiscono la sincizia sulle oscillazioni di Ca2 + Dati sorgente Imaging time-lapse di cellule Vero che esprimono il sensore GCaMP6s Ca2 + in presenza dei farmaci indicati (1  $\mu$ M di Niclosamide e 5  $\mu$ M di Clofazimina e Salinomicina) o di controllo DMSO. Una riduzione dei transitori di Ca2 + è evidente con Niclosamide e Clofazimina. La quantificazione di questa attività di Ca2 + è in **Fig**. 2 **d**. I singoli fotogrammi del film con DMSO (Control) sono in **Fig**. 2 **c**.

#### Video 6

: Effetto dell'esaurimento del calcio e dell'inibizione di SERCA sulle oscillazioni di Ca2 + Imaging time-lapse di cellule Vero che co-esprimono il sensore Ca2 + GCaMP6s e un vettore vuoto (Controllo) o Spike. Le cellule sono state coltivate in terreno normale (pannelli superiori), terreno senza Ca2 + o terreno normale integrato con gli inibitori SERCA thapsigargin (TG) o acido ciclopiazonico (CPA). Una riduzione dei transitori di Ca2 + è evidente in tutti e tre i trattamenti. La quantificazione di questa attività di Ca2 + è nelle **figure dei dati estesi. 6c** e **6d**.

## Diritti e autorizzazioni

#### A proposito di questo articolo

#### Cita questo articolo

Braga, L., Ali, H., Secco, I. *et al.* I farmaci che inibiscono le proteine TMEM16 bloccano la sincizia indotta da spike SARS-CoV-2. *Natura* (2021). https://doi.org/10.1038/s41586-021-03491-6

Ricevuto 23 luglio 2020 Accettato 25 marzo 2021 Pubblicato 07 aprile 2021

DOI https://doi.org/10.1038/s41586-021-03491-6

#### Condividi questo articolo

Chiunque condividi il seguente link sarà in grado di leggere questo contenuto:

Ottieni link condivisibile Fornito dall'iniziativa di condivisione dei contenuti Springer Nature SharedIt

Soggetti Infezione • SARS-CoV-2 • Infezione virale • Fusione di membrana virale

#### **Ulteriore lettura**

La proteina spike SARS-CoV-2 determina l'eliminazione dei linfociti mediata dal sincizio

Zhengrong Zhang, Tu Zheng[...] E Qiang Sun

Morte cellulare e differenziazione (2021)