

BNT162b2: possibile lettura errata dei codoni, errori nella sintesi proteica e anomalie dello splicing alternativo

Dr. Kira Smith

Clinical and Experimental Medicine
Novara (NO) – Italy

kira-smith@mil-med.com

Received xxxxxx

Accepted for publication xxxxxx

Published xxxxxx

Astratto

Il vaccino BNT162b2 è composto da un RNA avente 4284 nucleotidi, suddivisi in 6 sezioni, che portano le informazioni per creare una fabbrica di proteine S Spike, quelle usate dal Sars-CoV-2 (Covid-19) per infettare il soggetto. Dopodiché, queste proteine vengono dirette al di fuori della cellula, facendo scattare la reazione immunitaria e la produzione di anticorpi.

Il problema è la pesante alterazione dell'mRNA: l'Uracile viene sostituito con Ψ (Pseudouridina) per ingannare il sistema immunitario, le lettere di tutte le triplette di codoni vengono sostituite da una C o una G, per aumentare la velocità di produzione delle proteine all'estremo, sostituzione di alcuni aminoacidi con la Prolina, l'aggiunta della sequenza (3'-UTR) con sconosciute alterazioni.

Queste modificazioni potrebbero causare forti dubbi circa la presenza di errori nell'uso dei codoni. Un'eventuale errata traduzione ha conseguenze nella fisiopatologia di una varietà di malattie. Inoltre, l'mRNA iniettato è un pre-mRNA, che può portare a multipli mRNA maturi; queste sono le anomalie dello splicing alternativo, sorgente diretta di danni a lungo termine sulla salute umana.

In sostanza, ciò che verrà creato potrebbe non essere identico alla proteina S Spike: basta un errore di traduzione, lettura errata dei codoni, produzione errata di aminoacidi, quindi di proteine, per provocare gravi danni a lungo termine alla salute umana, nonostante il DNA non venga modificato, essendo invece nel nucleo cellulare e non nel citoplasma, ove arriva l'mRNA modificato.

Tuttavia, in questo caso, la correlazione tra velocità di sintesi ed espressione proteica, oltre al meccanismo che potrebbe inficiare la traduzione della sequenza restano oscuri, in quanto molti trials non sono ancora stati effettuati.

Keywords: Covid-19, BNT162b2, splicing alternativo, codoni, misreading, errori, traduzione

1. Introduzione

Cenni sul funzionamento

Il vaccino contro il Sars-CoV-2 (Covid-19) di **BioNTec/Pfizer** denominato **BNT162b2**, ma denominato anche *Tozinameran*, o *Comirnaty*, contiene circa **30 mcg di RNA**, che viene iniettato in una sfera di **lipidi** dentro il corpo umano, in particolare dentro al **citoplasma** delle cellule, ma **al di fuori del nucleo** (dove vi è il DNA); tale RNA possiede informazione genetica modificata (da qua modRNA), ovvero un **mRNA** (RNA messaggero) contenente le **istruzioni** per mettere in moto una fabbrica di **proteine**, cloni della **proteina S Spike**, ovvero la proteina (e solo la proteina, non tutto il virus) **utilizzata dal Covid-19 per entrare nell'ospite** e infettarlo. Una volta che esse vengono prodotte in serie ad opera dei **ribosomi**, vengono trasportate all'**esterno** della cellula, oltre il rivestimento lipidico; in questo modo il **sistema immunitario** individua queste proteine come **invasori** delle cellule e le **attacca**, tramite la **produzione di anticorpi**. Ecco perché **non è ipotizzabile** che il vaccino **induca la malattia**, oppure che **modifichi il DNA** umano.

Cenni sulla traduzione nella sintesi proteica

La **traduzione** viene divisa in genere in **tre fasi: inizio, allungamento e termine**.

1. Il **ribosoma si lega all'mRNA** nel **codone di inizio**;
2. La **catena polipeptidica si allunga** in una **direzione del movimento del ribosoma**, per aggiunta successiva di aminoacidi;
3. Quando si trova un **codone di Stop**, il **polipeptide** viene rilasciato e il **ribosoma si dissocia**.

Errori nella creazione della sequenza e traduzione

La conversione della sequenza dell'**mRNA** in un **polipeptide** dipende dal **transfer RNA (tRNA)** di portare gli **aminoacidi al ribosoma**. Ai ribosomi, il **tRNA si accoppia con l'mRNA** tramite l'**accoppiamento di base complementare** tra i **nucleotidi di codone mRNA** e i **nucleotidi anticodone tRNA**. Una volta che il **tRNA corretto è legato** da un codone, **trasferisce il suo aminoacido** alla fine di una **catena polipeptidica**

crescente. La **decifrazione dei codici mRNA** mediante il trasferimento di RNA (tRNA) nel ribosoma comporta l'**accoppiamento di base Watson-Crick**.

I **tassi di errore generale della replicazione genomica** (circa 10^{-8}) sono stimati essere circa **10.000 volte inferiori a quelli della sintesi proteica** (circa 10^{-4}), e quindi nella maggior parte dei casi la **traduzione dell'mRNA** è il **processo chiave** che contribuisce all'**imprecisione del proteoma** cellulare. La **discrepanza** tra i tassi di errore nella **replicazione del DNA** e nella **traduzione dell'mRNA** può essere parzialmente correlata al fatto che la **replicazione del DNA** avviene a livello dei **singoli nucleotidi** (con $4! = 4$ possibili permutazioni), mentre la **macchina di traduzione** interpreta i **codici mRNA in triplette** (con $4^3 = 64$ possibili permutazioni).¹

L'**efficienza della macchina di decodifica mRNA** è anche essenzialmente **regolata** da una certa tendenza all'**uso di codoni** che si distingue per l'**eccesso** o la **scarsa presenza** di codoni **sinonimi**. Di conseguenza, l'**ottimizzazione dell'oscillazione del tRNA** e dell'**uso del codone in mRNA** può **migliorare** sostanzialmente l'**efficienza** e l'**accuratezza** della traduzione.¹

La **traduzione pre- o post-mRNA** può introdurre indirettamente **errori di sintesi proteica** durante la **trascrizione** e l'**elaborazione post-traslazionale**. Tuttavia, il **meccanismo di traduzione** può contribuire direttamente all'**errata trascrizione** mediante la **decodifica errata del tRNA** (che porta ad un'**errata incorporazione** o alla **lettura del codone di stop**), la **misacylation del tRNA** (che porta ad un **errato accoppiamento tRNA-amminoacido**), la **riassegnazione del codone** oppure i **frameshifts** provocati dalla **traslocazione ribosomica**.¹

2. Metodo di investigazione

Analisi della sequenza genetica

Il vaccino è composto da **4284 nucleotidi**, suddivisi in **6 sezioni: cap** è l'**inizio** della sequenza, che si apre con i due nucleotidi **GA**, indicanti falsamente che l'**mRNA proviene**

dalla cellula umana ed essere quindi accettato¹; **5'** indica la **direzione** da seguire per la traduzione, mentre **UTR** indica la **zona** dove il **ribosoma** deve **posarsi** per poter fabbricare le proteine e in questa sezione è stata **sostituita** la **U** di **Uracile** con una molecola di **1-metil-3'-pseudouridina**, indicata con il carattere **Ψ**, per **bypassare il sistema immunitario** e impedire che venga così degradato l'RNA appena entrato; questo è però un fattore che può portare ad **errori nella produzione di proteine**. Multiple sintasi di **Ψ** sono implicate nelle **modificazioni delle posizioni** e difetti in molte di esse sono collegate a **patologie umane**.²

Vi è poi la sezione **sig**, denominata **sequenza di avvio estesa del peptide di segnalazione della glicoproteina S**, la cui informazione è necessaria per **guidare la proteina** appena formata, tramite il **reticolo endoplasmatico**, fuori dalla cellula; anche qua vengono messe in atto delle **modifiche alle triplette di nucleotidi** per far accettare l'RNA dal sistema immunitario, **cambiando la posizione** di alcune **lettere** componenti l'informazione con altre (in genere in 3° posizione "wobble"), apparentemente "sinonimi innocui" (prevalentemente **umentando il numero di lettere C e G**, che codificano la **velocità di produzione delle proteine**). Tuttavia, mentre specificano identici aminoacidi, i **due sinonimi non sono precisamente la stessa cosa**, almeno quando arriva l'atto della **traduzione**. Diversi studi mostrano che **piccole ma significanti differenze** in come ogni aminoacido interagisce con il corrispondente **transfer mRNA (tRNA)** affliggono sia la **velocità**, che l'**accuratezza** della traduzione.³ Se è vero che **3 lettere formano un codone e più di un codone codifica per lo stesso aminoacido**, è anche vero che **umentando così sproporzionatamente la velocità di produzione delle proteine** e apportando **almeno una modifica a tutte le triplette**, si rischia di incorrere in **gravi errori di traduzione**.

Anche i caratteri che compongono la sequenza relativa alla **costruzione della proteina Spike** vera e propria **S protein_mut** sono stati **alterati** con più **C e G** che era possibile aggiungere, rispettando i **sinonimi in tabella di codice genetico standard**, con **sostituzione** degli aminoacidi **Lisina (AAA)** e **Valina (GUU)** con la **Prolina (CUU)**, per impedire che la proteina costruita collassi su se stessa. Alla **fine** di questa sequenza vi sono **2 codoni di Stop**. **Non** è del tutto **comprovato** che con tale sostituzione si andranno a **formare gli stessi elementi** e non vi saranno errori di **misreading**.

3'-UTR (Regione Non Tradotta 3 Primo): dovrebbe indicare la **direzione di traduzione** della sequenza e migliorare la sintesi proteica, tuttavia rimangono **sconosciute** molte delle sue **funzioni**; pertanto è **impossibile** accertarne la

sicurezza. Ciò che si sa è affermato dal **WHO** ed è la frase seguente: "la **3' UTR** per il vaccino **BioNTech/Pfizer** è stata **prelevata** da "**the amino-terminal enhancer of split (AES) mRNA and the mitochondrial encoded 12S ribosomal RNA**".

poly(A): arriviamo dunque alla **fine della sequenza** e incontriamo **30 A**, poi un **collegamento a 10 nucleotidi** GCAUAGACU, **seguito da altre 70 A**, poiché **ogni mRNA può essere riutilizzato** dall'organismo più volte.

Quando **terminano le A**, l'**mRNA** viene **degradato**.

Tutte queste sono **modifiche proprietarie** per aumentare l'**espressione proteica**, delle quali **non si sa nulla** circa la **traduzione effettiva** messa in atto dall'organismo.

Splicing alternativo ed altri errori

Un altro **problema correlato** consiste nel fatto che **uno stesso pre-mRNA** può dare origine a **mRNA maturi differenti**, quindi a **proteine leggermente diverse** tra loro (**splicing alternativo**). Un'**alterazione nel processo di sintesi delle proteine** si è scoperta essere proprio la **causa dello sviluppo e della crescita di alcuni tumori**, ed **altre patologie**, senza che venga in qualche modo **alterato il DNA**.

Tutti gli **eventi di splicing** individuati nei tre i geni della serie PHT comportano la **perdita della frame di lettura** della sequenza dei messaggeri, e l'**introduzione di un codone di stop prematuro (PTC, Premature Termination Codon)** sempre situato più di **50-55 nucleotidi a monte dell'ultima giunzione esone-esone**, il che rende i trascritti alternativi **bersagli del sistema di sorveglianza NMD (Nonsense-mediated mRNA Decay)**. Per **slc15a4/PHT1** di uomo e ratto, ciò è stato **dimostrato** mediante **esperimenti di inibizione del sistema NMD** in diverse linee cellulari, in cui l'**espressione delle varianti alternative** rispetto ai trascritti canonici è risultata sempre stabilizzata in seguito all'**inibizione**.⁴

3. Conclusioni

Evidenziazione dei possibili problemi a lungo termine sulla salute umana e riscontro finale

Possiamo dire che oltre a **non essere ottimizzata**, la sequenza genera forti dubbi circa la **presenza di errori dell'utilizzo del codone**. E' possibile ipotizzare che un'**eccessiva alterazione** mirata all'incremento estremo **nell'espressione proteica** può essere fonte di **errori nell'assemblaggio della sequenza** genetica dell'mRNA.

La **traduzione errata** ha conseguenze realmente serie nella **fisiopatologia** di un **ventaglio di disturbi**, inclusi sclerosi multipla, neurodegenerazione, miopia mitocondriale, encefalopatia, acidosi lattica, episodi di ictus, morbo di Parkinson e cancro (genes, accelerazione della crescita e metastasi).⁵

La **correlazione** tra **velocità di sintesi delle proteine**, aumentata del 100%, con gli **errori di traduzione della sequenza**, così come il **meccanismo che inficia la produzione di aminoacidi** restano **in questo caso** per ora **oscuri**, essendo molti **trials** non ancora effettuati.

In sostanza si può dire che il **codice della sequenza totale** sia **intrinsecamente alterato in modo sbilanciato**, troppo rispetto al corrispettivo naturale, e troppo per poter affermare che l'organismo umano **riproduca esattamente** le proteine **S Spike**, uguali una con l'altra, rischiando così apportare **gravi danni alla salute** umana a **lungo termine**, oltre alla **mancata efficacia nell'immunizzazione**.

Ciò che verrà prodotto da quella sequenza è **tutt'altro che ben definito**, ma è scritto **nei geni di ogni individuo** e dipende dal suo **profilo ribosomiale**, come verrà **tradotto** e cosa verrà **prodotto**, quindi i **benefici o danni** che si andranno a causare.

Referenze

¹Ou X, Cao J, Cheng A, Peppelenbosch MP, Pan Q (2019) Errors in translational decoding: tRNA wobbling or misincorporation? *PLoS Genet* 15(3): e1008017. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008017>

²*Biomolecules* 2020,10(5),729; <https://doi.org/10.3390/biom10050729>

³Robinson R (2014) Which Codon Synonym Is Best? It May Depend on What's on the Menu. *PLoS Biol* 12(12): e1002014. doi:10.1371/journal.pbio.1002014

⁴Andries, O. (2015). mRNA Modification and delivery strategies towards the establishment of a platform for safe and effective gene therapy. Ghent University. Faculty of Veterinary Medicine, Merelbeke, Belgium.

⁵Mafalda Santos, Patricia M. Pereira, A. Sofia Varanda, Joana Carvalho, Mafalda Azevedo, Denisa D. Mateus, Nuno Mendes, Patricia Oliveira, Fábio Trindade, Marta Teixeira Pinto, Renata Bordeira-Carriço, Fátima Carneiro, Rui Vitorino, Carla Oliveira & Manuel A. S. Santos(2018) Codon misreading tRNAs promote tumor growth in mice, *Biology*,15:6,773-786, DOI:10.1080/15476286.2018.1454244

Domande comuni

1. Per il sistema immunitario anche la proteina Spike non e' ok, infatti la elimina, quindi la stessa cosa avverra' per eventuali prodotti errati?

Non è così. I frutti di errori traslazionali possono non essere bersaglio di alcun anticorpo, o di anticorpi errati, non designati per eliminare la proteina S Spike, quindi inefficaci al fine immunitario contro il Covid-19.

2. L'mRNA si degrada dopo alcuni giorni?

L'mRNA si degrada in un tempo basato sulla struttura della coda della sequenza genetica poly(A) ed altri fattori minori, ma ciò che viene prodotto resta nel corpo e, come detto prima, potrebbe non essere eliminato e creare danni a lungo termine.

3. Siamo immersi negli RNA, la possibilità di anomalie di splicing alternativo ed errori traslazionali possono avvenire continuamente?

E' vero, ma la velocità di produzione delle proteine aumentata esageratamente, le modificazioni apportate inserendo la Pseudouridina ed altre alterazioni proprietarie inducono l'organismo a commettere errori con molta più probabilità e gravità. Del resto si tratta di introdurre, per la prima volta in tutta la popolazione, compresi soggetti sani, del materiale genetico.



4. Gli studi sull'mRNA sono iniziati almeno 10 anni fa, esiste una testistica valida?

Esistono studi e trials clinici su pazienti affetti da altre patologie. Infatti, se fosse stato possibile, l'mRNA sarebbe stato sfruttato per trattare disturbi diversi e preesistenti al Covid-19, ma il rischio superava il beneficio. Non è chiaro, quindi, come in questo caso possa essere adatto ad immunizzare la popolazione del mondo intero, senza portare effetti gravi a breve e lungo termine.

5. Il vaccino Pfizer ha però superato gli standard di sicurezza EMA ed AIFA, perché?

Il vaccino BNT162b2 è stato soltanto messo in commercio con *autorizzazione condizionata*, causa emergenza pandemica in atto, dopo pesanti pressioni dalla *Commissione degli Stati Membri*. In realtà, tale vaccino non ha indicazione nel trattamento preventivo di alcuna patologia, ovvero non è autorizzato con specifiche indicazioni cliniche.