

23. Ottobre

Syn61Δ3: un firewall perfetto!

*Non c'è niente di così paziente,
in questo mondo,
come un virus alla ricerca di un ospite.*

Mira Grant

Mentre un antivirus ha l'obiettivo di rilevare, disabilitare e rimuovere malware e virus già presenti all'interno del tuo computer o della tua rete, un *firewall* filtra tutto il tuo traffico di rete, evitando l'accesso di file infetti, malware e virus al computer o alla rete.

La strategia, descritta oggi su *Science* nel report del *Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology, Cambridge*, e in un *preprint* pubblicato a luglio, potrebbe proteggere i batteri produttori di farmaci dagli attacchi virali e impedire ai geni potenzialmente pericolosi di fuoriuscire dagli organismi geneticamente modificati: una sorta di firewall genetico
Zürcher JF et al. Refactored genetic codes enable bidirectional genetic isolation. Science. 2022 Oct 20:eadd8943.

Gli autori hanno rifattorizzato la struttura del codice genetico di Escherichia coli ed hanno creato codici genetici ortogonali che limitano la fuga di informazioni genetiche sintetiche nella vita naturale. Inoltre hanno sviluppato sistemi di trasferimento genico orizzontale ortogonale e reciprocamente ortogonale, che consentono il trasferimento di informazioni genetiche tra organismi che utilizzano lo stesso codice genetico, ma limitano il trasferimento di informazioni genetiche tra organismi che utilizzano codici genetici diversi. Infine hanno dimostrato che il blocco dei codici refactoring in organismi sintetici blocca completamente l'invasione di elementi genetici mobili, che portano i propri fattori di traduzione e invadono con successo gli organismi con codici genetici canonici e compressi

Riscrivendo parzialmente il codice genetico nei batteri, due gruppi di ricercatori hanno scoperto che possono contrastare i virus invasori, che devono dirottare il macchinario genetico dei microbi per replicarsi. La strategia, descritta oggi su *Science* e in un preprint pubblicato a luglio potrebbe proteggere i batteri produttori di farmaci dagli attacchi virali e impedire ai geni potenzialmente pericolosi di fuoriuscire dagli organismi geneticamente modificati.

Ned Budisa biologo sintetico *dell'Università di Manitoba*



Ritiene che questi due lavori costituiscono *importanti passi avanti, una grande innovazione tecnologica*.

Quasi ogni essere vivente si basa sullo stesso codice genetico. Varie sequenze di tre nucleotidi del DNA, chiamati codoni, dicono a una cellula quale amminoacido inserire in una proteina. I *tRNA*, leggono i codoni e agiscono secondo le loro istruzioni. Ogni tipo di *tRNA* trasporta un

amminoacido specifico che aggiunge a un filamento proteico in crescita solo quando riconosce il codone corretto. Le cellule portano anche tre tipi di codoni di stop che dicono loro quando smettere di produrre una proteina.

Poiché gli organismi condividono questo *linguaggio di programmazione genetica*, possono acquisire nuove abilità acquisendo geni da altri organismi. Il linguaggio comune consente inoltre ai ricercatori di inserire geni umani nei batteri, inducendo le cellule a produrre farmaci come l'insulina.

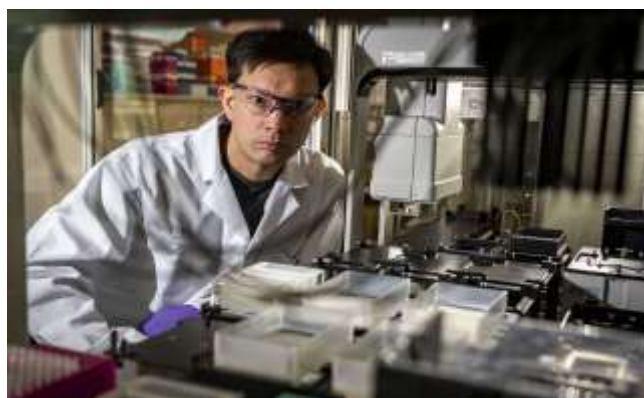
Ma un codice genetico universale lascia le cellule vulnerabili agli intrusi come *virus e plasmidi, frammenti di DNA* che si riproducono all'interno dei batteri e possono traghettare i geni tra di loro. Per anni, i ricercatori hanno cercato di bloccare questo traffico.

Nel 2013, il biologo sintetico [George Church](#) della [Harvard Medical School](#) ed il suo team



hanno modificato geneticamente il batterio *Escherichia coli*, sostituendo uno dei suoi codoni di stop con un'altra versione. Il team ha modificato i **tRNA** del batterio in modo che quando legge il codone di stop originale, ad esempio nel genoma di un virus invasore, installi un amminoacido inappropriato che altera la proteina virale. Il microbo "modificato" poteva sintetizzare in sicurezza le proprie proteine, ma era resistente a diversi tipi di virus e plasmidi.

L'anno scorso, il biologo sintetico [Jason Chin](#) dell'[Università di Cambridge](#) e il suo team



hanno fatto un ulteriore passo avanti. Hanno scambiato lo stesso codone di stop in *E. coli*, ma hanno aggiunto un altro livello di protezione. Hanno sostituito due dei codoni per l'amminoacido serina nel genoma del microbo con due diversi codoni della serina. Hanno quindi eliminato i **tRNA** che avrebbero riconosciuto i codoni della serina originali.

Questo ceppo batterico modificato, soprannominato **Syn61A3**, non è stato in grado di leggere due codoni di serina trovati negli invasori, aiutandolo a scrollarsi di dosso i virus che infettano i batteri. Tuttavia, **Syn61A3** non è invincibile.

Il di **Church** e dal suo post-dottorato **Akos Nyerges** ha dimostrato che era suscettibile a 12 tipi di virus isolati da varie fonti, tra cui letame di maiale e un capannone di polli.

Quindi **Chin** e colleghi hanno aggiunto nuove protezioni. Hanno ideato tRNA che rovinano attivamente le proteine virali fornendo gli amminoacidi sbagliati, tra cui prolina e alanina, in risposta ai codoni della serina degli estranei.

Il gruppo ha testato il suo migliorato **Syn61A3** esponendolo a un paio di virus ripescati dal fiume Cam a Cambridge. Entrambi hanno ucciso il **Syn61A3** originale ma hanno risparmiato le versioni aggiornate, riferiscono gli scienziati questa settimana su *Science*. Hanno anche dimostrato che sebbene le cellule **Syn61A3** migliorate potessero scambiare un plasmide progettato per utilizzare il loro codice genetico modificato, non potevano condividere il plasmide con altri batteri.

Dice **Chin**:

“Abbiamo creato una forma di vita che non legge il codice genetico canonico e che scrive le sue informazioni genetiche in una forma che non può essere letta da altri organismi”

La squadra di **Church's & Nyerges** ha seguito una strategia simile. I ricercatori hanno dotato **Syn61A3** di tRNA modificati che hanno letto male due dei codoni della serina trasportati dai virus invasori, inserendo leucina invece della serina. Rispetto all'originale **Syn61A3**, i microbi alterati sono diventati più resistenti ai **12 virus** che gli scienziati avevano prelevato da campioni ambientali.

Afferma **Church**:

Il documento mostra un modo per rendere qualsiasi organismo resistente a tutti i virus e con un solo passo

(Il team si è anche assicurato che i microbi richiedano un amminoacido che non si trova in natura, assicurandosi che non possano sopravvivere se scappano.)

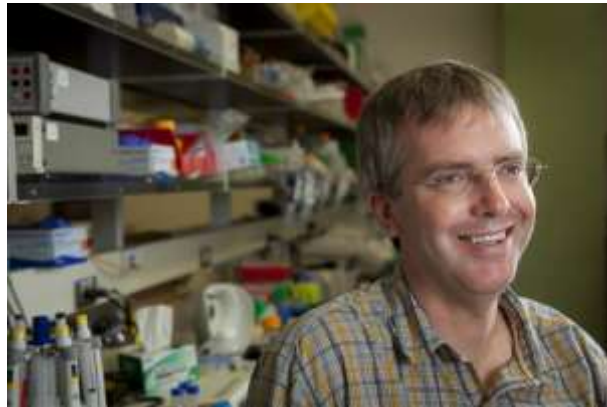
Tale ricodifica potrebbe aiutare a prevenire le epidemie virali nelle fabbriche che utilizzano i batteri per sfornare farmaci o altri prodotti. E ricodificando organismi geneticamente modificati, i ricercatori potrebbero impedire ad altri organismi di acquisire il loro DNA.

I batteri potrebbero anche aiutare i biologi a studiare l'evoluzione del codice genetico stesso, afferma il biologo sintetico **Chang Liu dell'Università della California**

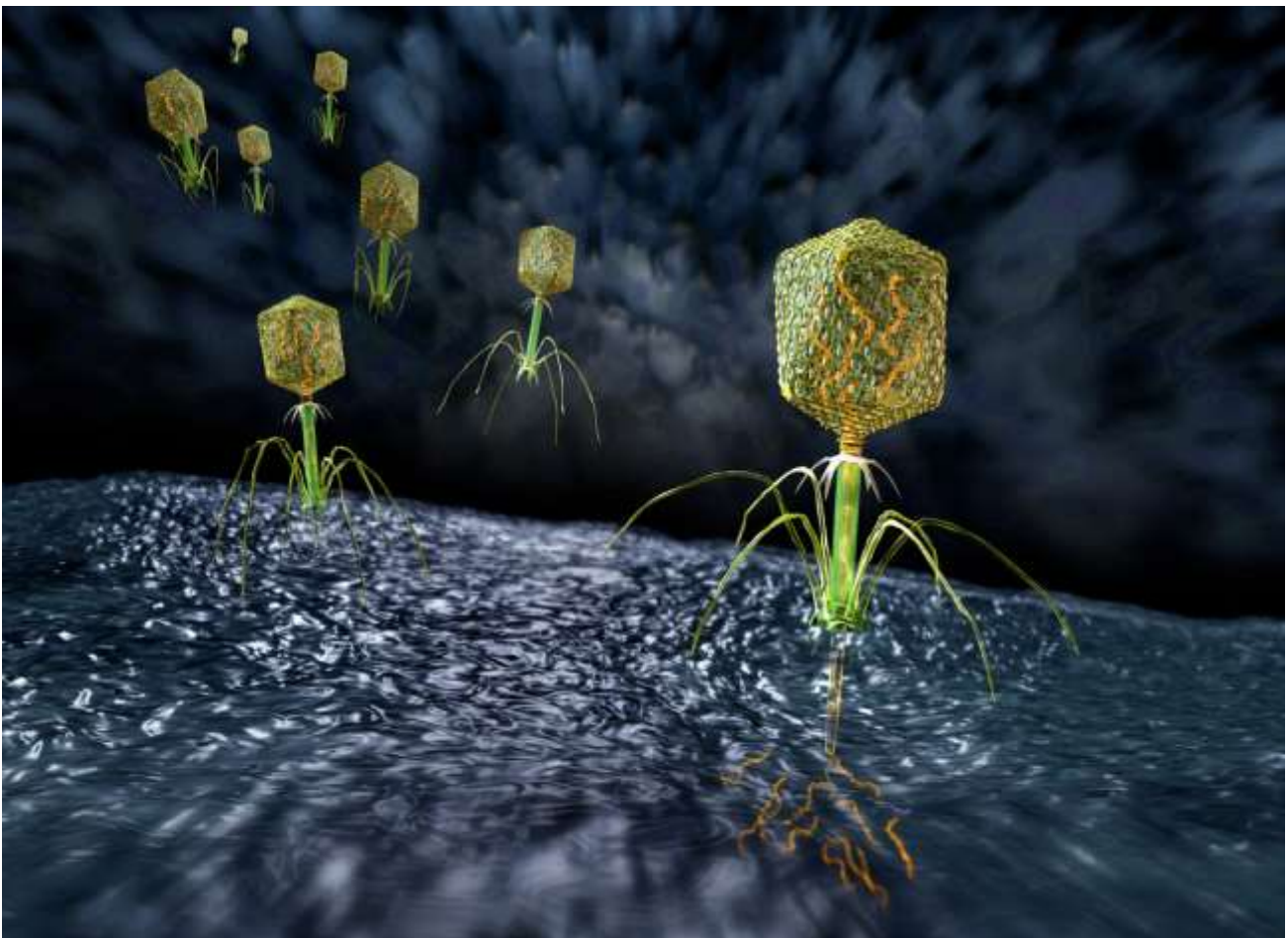


Church afferma che è improbabile che i virus evolvano strategie per aggirare questa difesa perché comporta più di 200.000 modifiche al genoma dei microbi.

E il biologo sintetico **Drew Endy** della *Stanford University*



ritiene che i ricercatori meritano credito per il rigore con cui hanno testato la resistenza virale dei batteri. *"Una delle cose più belle che hanno fatto qui è che sono andati allo stato brado" per trovare virus*, Tuttavia, lui e gli altri non sono così sicuri che gli insetti siano geneticamente isolati dagli altri esseri viventi. *"Dobbiamo ancora stare molto attenti"*, dice Ned Budisa. *"Non posso mettere la mano sul fuoco e dire: 'Questo è un firewall perfetto'"*. Endy è d'accordo. *"È una corsa agli armamenti tra l'ingegno umano e la biodiversità naturale" e non sappiamo per quanto tempo la corsa debba ancora correre"*.



Un anno fa... Baedeker/Replay del 23 ottobre

Il tallone di Achille di SARS-CoV-2: EXON l'implacabile correttore di bozze

Sebbene i vaccini forniscano protezione contro la sindrome respiratoria acuta grave coronavirus 2 (SARS-CoV-2), permane la necessità di poter utilizzare antivirali efficaci per colpire COVID-19 attaccandolo nei suoi bersagli sensibili. Uno dei più importanti target farmacologico per SARS-CoV-2 è il suo complesso di replicazione e trascrizione (RTC), una "macchina multi sub unità" che esegue la replicazione del genoma virale e che pertanto, svolge un ruolo centrale nel ciclo vitale del virus. Il motore dell'RTC del coronavirus è l'RNA polimerasi RNA-dipendente (RdRp) una proteina non strutturale 12 (nsp12) che interagisce con nsp7 e nsp8 due proteine del capsido, un bersaglio promettente per antivirali analoghi dei nucleotidi come ad esempio il Remdesivir.

Purtroppo l'efficacia degli inibitori dell'analogo nucleotidico è compromessa dalla presenza dell'esoribonucleasi virale Nsp14 ExoN, un "correttore di bozze" di RNA specifico per i coronavirus e alcune altre famiglie di virus strettamente correlate dell'ordine Nidovirales e che svolge un ruolo centrale per mantenere l'integrità del loro insolitamente grande genoma ad RNA. Inoltre, gli ExoN dei coronavirus e di altri virus a RNA svolgono un ruolo strategico nell'evasione delle risposte immunitarie dell'ospite degradando gli intermedi virali di RNA a doppio filamento (dsRNA) che sarebbero altrimenti riconosciuti dai recettori di riconoscimento dei patogeni dell'ospite. Nsp14 è in realtà un enzima bifunzionale che ospita sia ExoN che mRNA cap guanina-N7 metiltransferasi (N7-MTasi). Il dominio N-terminale ExoN di nsp14 migliora la fedeltà della sintesi dell'RNA rimuovendo nucleotidi o analoghi nucleotidici mal incorporati dall'RNA nascente, mentre il dominio N7-MTasi C-terminale è coinvolto nei processi di capping 5' degli mRNA virali genomici e subgenomici. Inoltre l'attività ExoN di nsp14 è stimolata da nsp10, che si lega al dominio ExoN e aiuta a stabilizzare l'architettura del sito attivo ExoN. Tuttavia, i dettagli molecolari del legame del substrato da parte del coronavirus nsp10-nsp14 ExoN sono poco chiari. Il modo con l'ExoN virale riconosce ed elimina i nucleotidi incorporati in modo errato o gli inibitori degli analoghi dei nucleotidi all'estremità 3' dell'RNA appena sintetizzato, è solo parzialmente noto. Gli analoghi dei nucleotidi come il Remdesivir, che prendono di mira la RNA polimerasi virale, sono ostacolati dall'attività dell'esoribonucleasi (ExoN) che implacabilmente rimuove i nucleotidi errati dall'RNA appena sintetizzato. Remdesivir è l'unico antivirale analogo nucleotidico approvato dalla Food and Drug Administration statunitense per il trattamento del COVID-19. Per valutare se può essere asportato da SARS-CoV-2 ExoN, il team di Liu del Department of Immunobiology di Yale ha esplorato la struttura del complesso che ospita l'attività ExoN (nsp10-nsp14) modellando un mimo dell'RNA (RMP) capace di incorporare un nucleotide errato. I dettagli sono nel lavoro Structural basis of mismatch recognition by a SARS-CoV-2 proofreading enzyme (Science 3 settembre 2021).

Questo ha consentito di comprendere come viene riconosciuto l'RNA e suggerisce come ExoN rimuova specificamente i nucleotidi non corrispondenti. Fornisce inoltre indizi per la progettazione di nucleotidi analoghi capaci di eludere l'escissione. Le informazioni ricavate dalla microscopia crio-elettronica rivelano i determinanti molecolari della specificità del substrato ExoN e offrono informazioni sui meccanismi molecolari della correzione del disadattamento durante la sintesi dell'RNA del coronavirus. L'RMP modellato mantiene la maggior parte delle interazioni favorevoli formate tra nsp14 e il CMP 3'-end. Inoltre, il gruppo 1'-ciano di RMP, il determinante della sua attività di stallo RdRp ritardata si adatta perfettamente allo spazio tra H95 e N104 e forma legami idrogeno con gli atomi di azoto della catena laterale dai due residui. Queste osservazioni indicano che l'RNA prodotto contenente RMP potrebbe essere un substrato per ExoN, e che i coronavirus privi di attività di correzione di bozze ExoN sono significativamente più sensibili a Remdesivir; inoltre che l'RNA prodotto contenente RMP potrebbe essere un substrato per il coronavirus ExoN, coerentemente con i risultati che l'RNA terminato con RMP non mostra una resistenza sostanziale all'escissione di ExoN e che i coronavirus privi di attività di correzione di bozze ExoN sono significativamente più sensibili a Remdesivir. Riflessioni e conclusioni....

(Per continuare vai all'originale)