

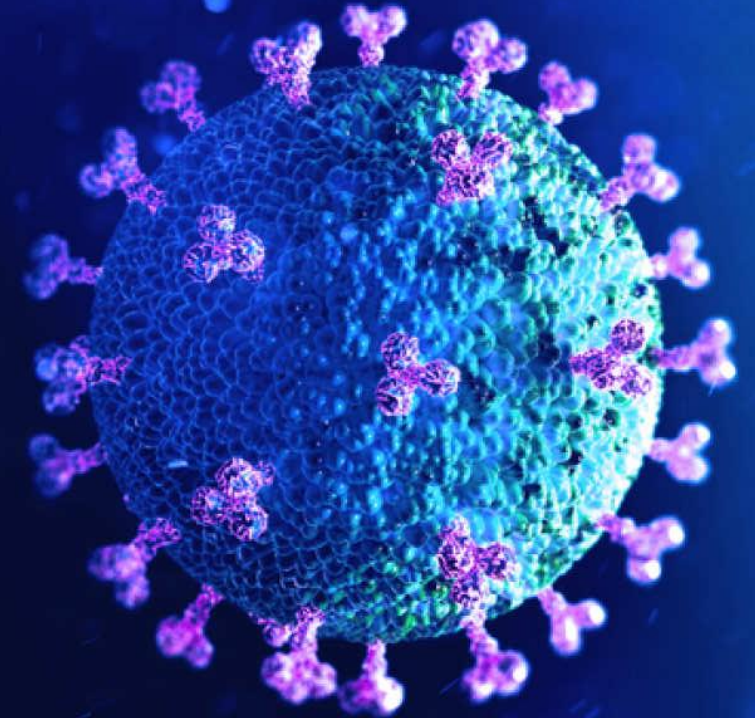
COVID-19: cambiamenti genetici, interazioni proteiche, modifiche genomiche



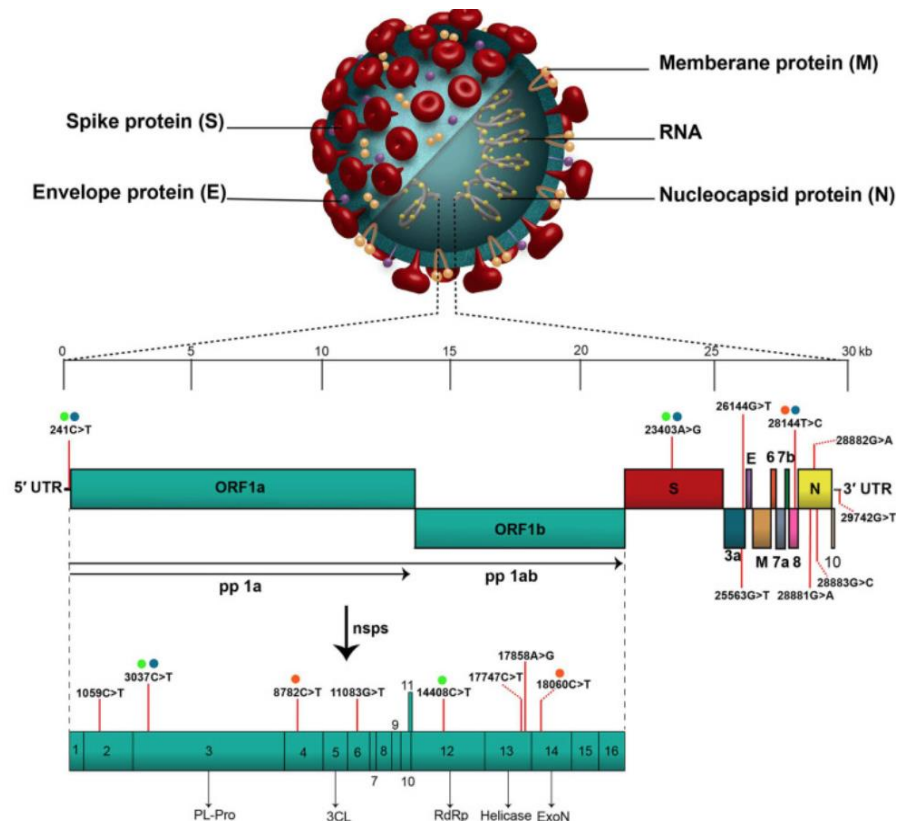
Dott.ssa Alessia Lai, PhD

Università degli Studi di Milano

Dipartimento di Scienze Biomediche e Cliniche – L. Sacco

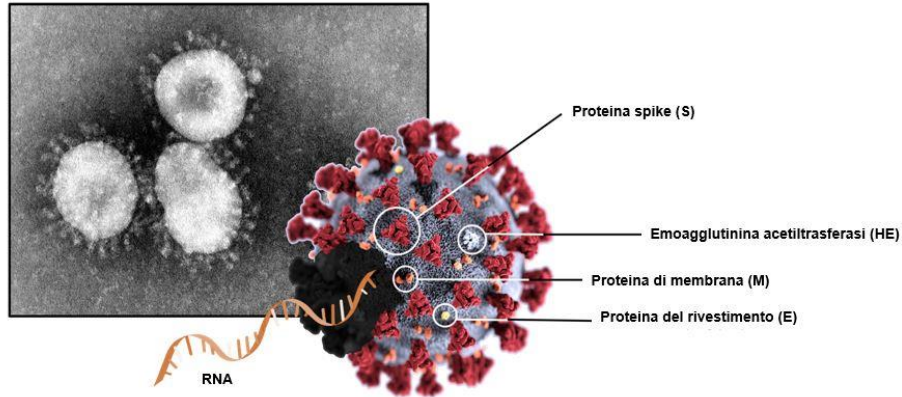


Il genoma di SARS-CoV-2



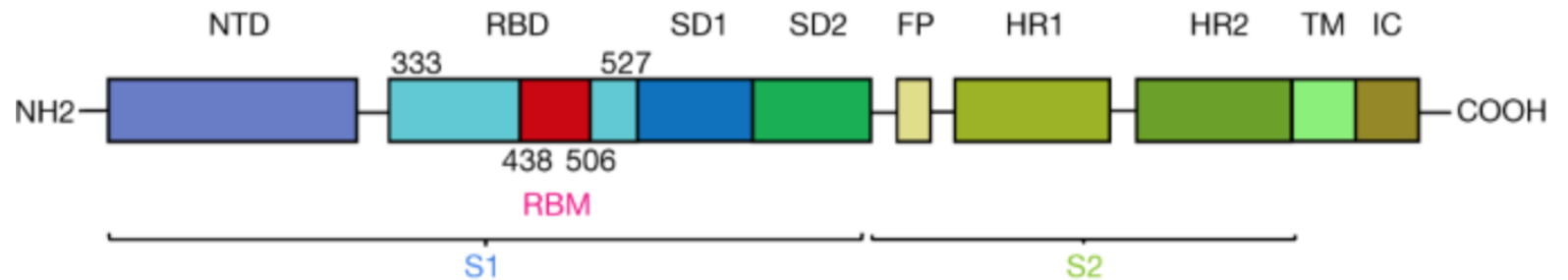
- 29.8 - 29.9 Kb
- Contenuto GC: 32-43%
- 12 ORFs
- 27 proteine di cui 4 strutturali (E, M, N, S), 16 non strutturali (nsp1-16) e 7 accessorie

La proteina S

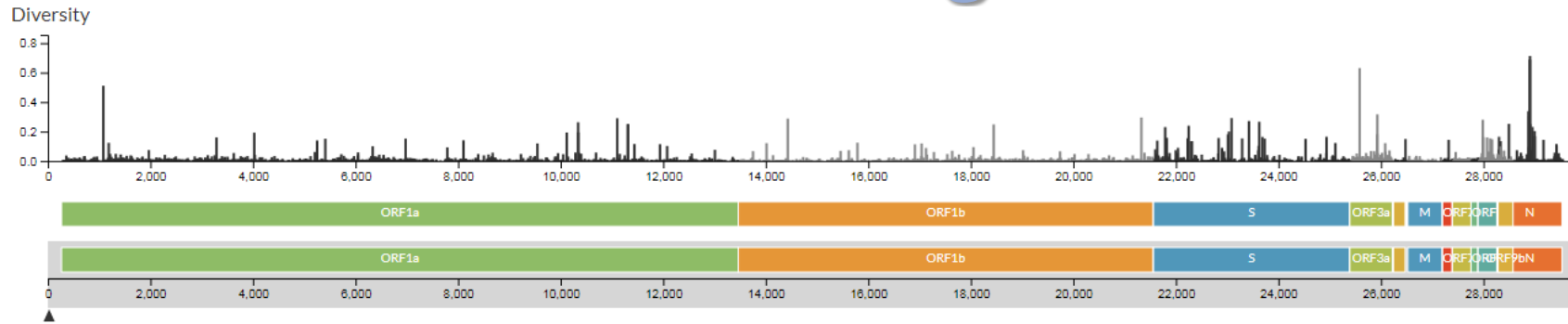


- 1,273 aa
- Proteina di fusione di tipo I
- È composta da due subunità:
S1: responsabile del legame al recettore
S2: per la fusione di membrana

R408I, L455Y,
F486L, Q493Y,
N501T su RBD
A930V, D936Y
su HR1



Mutazioni nel genoma



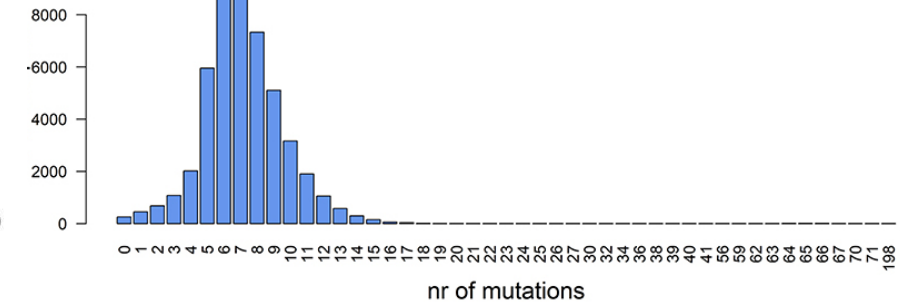
- Tasso di mutazione per SARS-CoV-2: 1-2 mutazioni al mese
- Prevalenza di polimorfismi a singolo nucleotide (SNP)
- Prevalenza di transizioni SNP in particolare C>T

Genomic coordinate	Effect on protein/UTR	Nr of samples	Class	Genomic region
A23403G	S:D614G	36,500	aa-changing SNP	Spike protein
C14408T	NSP12b:P314L	36,444	aa-changing SNP	Non-structural protein 12, post-ribosomal frameshift (RNA-dependent RNA polymerase)
C3037T	NSP3:F106F	36,384	silent SNP	Non-structural protein 3 (predicted phosphoesterase)
C241T	5'UTR:241	36,007	5'UTR SNP	5' UnTranslated Region
GGG28881AAC	N:RG203KR	14,095	aa-changing SNP triplet	Nucleocapsid protein
G25563T	ORF3a:Q57H	10,929	aa-changing SNP	ORF3a protein
C1059T	NSP2:T85I	8,451	aa-changing SNP	Non-structural protein 2
G11083T	NSP6:L37F	5,507	aa-changing SNP	Non-structural protein 6 (transmembrane protein)
C14805T	NSP12b:Y446Y	4,505	silent SNP	Non-structural protein 12, post-ribosomal frameshift (RNA-dependent RNA polymerase)
T28144C	ORF8:L84S	3,804	aa-changing SNP	ORF8 protein
G26144T	ORF3a:G251V	3,792	aa-changing SNP	ORF3a protein
C8782T	NSP4:S76S	3,743	silent SNP	Non-structural protein 4
A20268G	NSP15:L216L	2,479	silent SNP	Non-structural protein 15 (endoRNase)
C18060T	NSP14:L7L	1,813	silent SNP	Non-structural protein 14 (3'-5' exonuclease)
C23731T	S:T723T	1,799	silent SNP	Spike protein
G10097A	NSP5:G15S	1,798	aa-changing SNP	Non-structural protein 5 (protease)
A17858G	NSP13:Y541C	1,780	aa-changing SNP	Non-structural protein 13
C17747T	NSP13:P504L	1,736	aa-changing SNP	Non-structural protein 13
C2558T	NSP2:P585S	1,701	aa-changing SNP	Non-structural protein 2
A2480G	NSP2:I559V	1,615	aa-changing SNP	Non-structural protein 2

The acronym "aa" stands for "amino acid".

Worldwide mutations per sample

48635 samples (Avg. mutations per sample = 7.23)

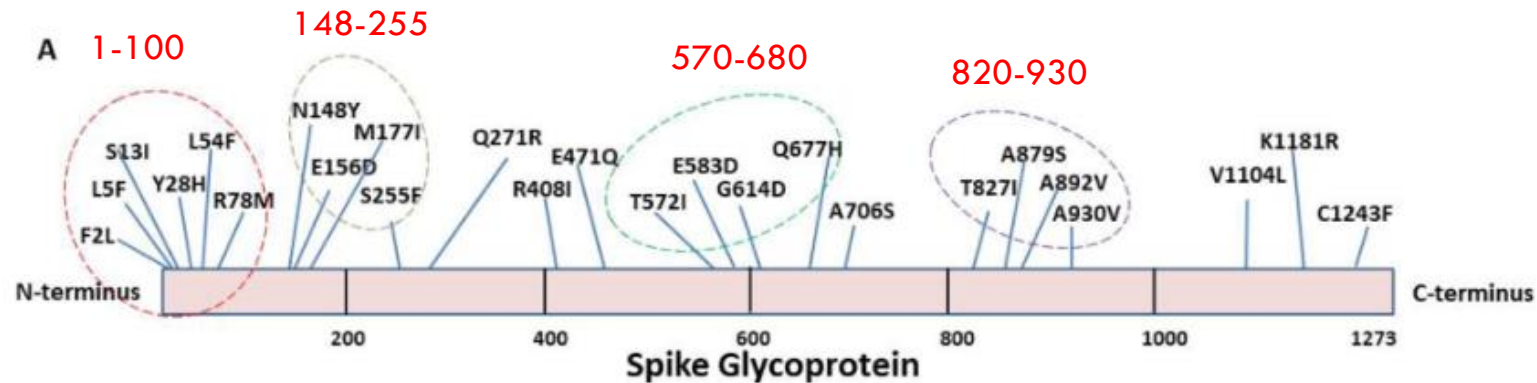


Identification of twenty-five mutations in surface glycoprotein (Spike) of SARS-CoV-2 among Indian isolates and their impact on protein dynamics

Gyanendra Bahadur Chand^{a,1}, Atanu Banerjee^{b,1}, Gajendra Kumar Azad^{a,*}

^a Department of Zoology, Patna University, Patna 800005, Bihar, India

^b Department of Zoology, Samastipur College, Samastipur 848134, Bihar, India



11 di queste mutazioni portano ad una alterazione della struttura secondaria della proteina S, mentre 5 non hanno effetto su questa.

- **T572I** causa lo shift della regione arrotolata intorno l'elica
- **A879S, A892V, A930V** portano ad un cambio conformazionale, da elica a β -sheet
- **V1104L, L54F, A930V, D614G** sono mutazioni cosiddette stabilizzanti ($\Delta G > 0,4$ kcal/mol), mentre **A879S** è considerata una mutazione destabilizzante ($\Delta G < 0,4$ kcal/mol)
- **T827I** incrementa la flessibilità della struttura proteica, mentre **A930V, A879S, A706S** portano ad un suo irrigidimento
- **L54F, T827I, V1104L** inducono un'alterazione circoscritta nella struttura della proteina, tuttavia **D614G, A706S, A879S, A930V** portano ad una alterazione più ampia della struttura proteica. Tutte queste mutazioni hanno un grande impatto sulla stabilità e la dinamica proteica

Glicosilazione

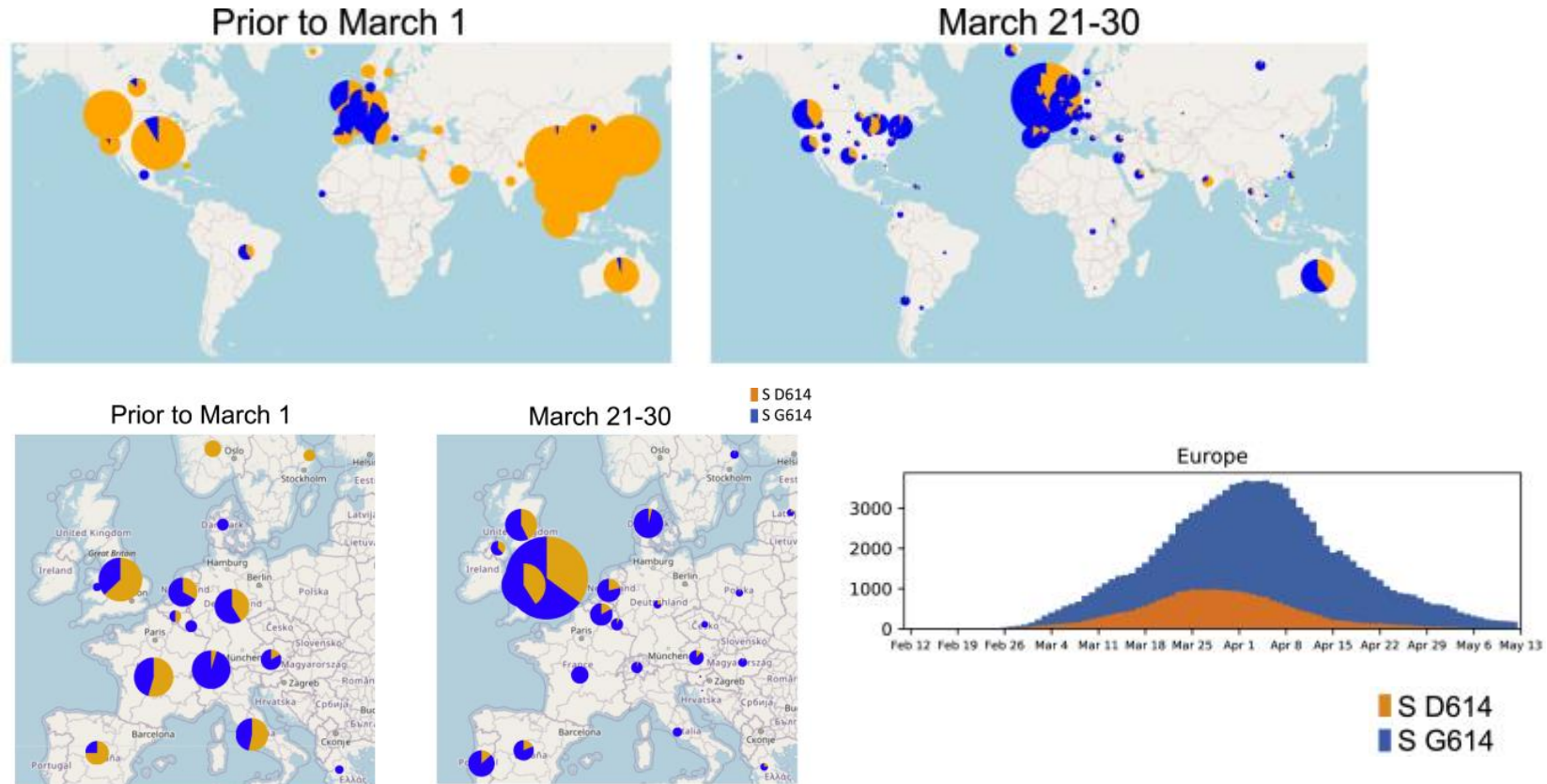
- La proteina S di SARS-CoV-2 è fortemente glicosilata → 22 potenziali siti di N-glicosilazione
- Le varianti naturali in grado di influenzare l'attività degli mAb sono risultate quasi tutte localizzate nella regione RBD (eccetto A831V)
- D614G + I472V ha mostrato una maggiore infettività e una maggiore resistenza agli anticorpi neutralizzanti
- Alcune mutazioni, tra cui N439K, L452R, A475V, V483A, F490L e Y508H, hanno mostrato una ridotta sensibilità alla neutralizzazione degli mAb
- In particolare, è stato confermato che alcune varianti RBD come A475V e F490L hanno una ridotta sensibilità sia ai sieri umani che a più mAb neutralizzanti
- Probabilmente necessario un regime terapeutico composto da almeno due mAb

Table 1. Characteristics of Variants and Mutants

	Group A	Group B	Group C
Number of variants or mutants	29	51	26
Increased infectivity	D614G, D614G+L5F, D614G+D936Y, D614G+S939F, D614G+S943T	D614G+V341I, D614G+K458R, D614G+I472V ^a	none
Decreased infectivity	Q239K, D839Y, P1263L, D614G+Q675H	V341I, D364Y, 385-387del, D405V, Q414P, I434K, S438F, D467V, P491R, V503F, R509K, V510L, P521S	N122Q, N343Q, N717Q, T719A, N801Q, N1074Q, N331Q+N343Q
Increased sensitivity to neutralizing mAbs	none	V367F, Q409E, Q414E, I468F, I468T, Y508H, A522V	N165Q, N709Q
Decreased sensitivity to neutralizing mAbs	A831V	N439K, L452R, A475V, V483A, F490L, Y508H, D614G+A435S, D614G+I472V ^a	N234Q
Increased sensitivity to convalescent sera	V615L	F338L, V367F, I468F, I468T	N149H, N149Q, N165Q, N331Q, N354D, N709Q, N1173Q
Decreased sensitivity to convalescent sera	Y145del, A831V, D614G+A831V, D614G+A879S, D614G+M1237I	Q414E, N439K, G446V, K458N, I472V, A475V, T478I, V483I, F490L, H519P, D614G+Q321L, D614G+I472V ^a	none

^aD614G+I472V is the only variant with increased infectivity and decreased sensitivity to neutralizing mAb and convalescent sera. It is of note only one sequence is recorded in GISAID.

Mutazione D614G



- D614G: sostituzione nucleotidica da A a G in posizione 23403
- La sostituzione potrebbe aver indotto un cambiamento conformazionale nella proteina S
- E' diventata la forma dominante nella pandemia
- La variante G614 è associata a una maggiore infettività e a cariche virali più elevate, ma non ad un aumento della severità

Cluster 5

- Aprile 2020, Olanda: variante di SARS-CoV-2 collegata all'infezione tra visoni d'allevamento e successivamente trasmesso all'uomo
- Novembre 2020: 214 casi di COVID-19 associate alla variante dei visoni e più di 200 allevamenti coinvolti a partire da giugno 2020
- Identificati almeno 5 cluster ognuno caratterizzato da una specifica variante del visone
- Una di queste (Cluster 5) presenta: 4 sostituzioni (Y453F, I692V, S1147L, M1229I) e una delezione nella proteina spike (69-70del)
- La mutazione Y453F è caratteristica della variante dei visoni ed è localizzata nell'RDB
- Questa mutazione conferisce un vantaggio nella trasmissione da visone a visone, ma è stata osservata anche in infezioni non direttamente correlate agli allevamenti di visoni
- L'associazione del mutante Y453F con ACE2 è più debole rispetto al WT
- Minore affinità del mutante Y453F rispetto a quattro anticorpi monoclonali
- Dati preliminari indicano una riduzione di circa 4 volte nella neutralizzazione con plasma convalescente
- Ad oggi: casi riportati in Danimarca, Italia, Spagna, Svezia e USA



B.1.1.7 lineage (20I/501Y.V1)

- Settembre 2020, Regno Unito: nuova variante indicata come SARS-CoV-2 VOC 202012/01 e conosciuta anche come lineage B.1.1.7
- Ad oggi diffusa in tutto il Regno Unito e in altri 57 paesi con segnalazioni in continuo aumento
- Elevato numero di cambiamenti genetici, in particolare nella proteina spike

N501Y: nel dominio di legame del recettore (RBD), l'amminoacido asparagina (N) viene sostituito da una tirosina (Y). È stata osservata associata una crescente affinità di legame con ACE2 umano e murino.

P681H: adiacente al sito di scissione della furina, sito con elevata variabilità nei coronavirus.

69-70del: descritta nel contesto dell'evasione della risposta immunitaria umana, ma si è anche verificata un certo numero di volte in associazione con altri cambiamenti RBD.

B.1.1.7		
gene	nucleotide	amino acid
ORF1ab	C3267T	T1001I
	C5388A	A1708D
	T6954C	I2230T
	11288-11296 deletion	SGF 3675-3677 deletion
spike	21765-21770 deletion	HV 69-70 deletion
	21991-21993 deletion	Y144 deletion
	A23063T	N501Y
	C23271A	A570D
	C23604A	P681H
	C23709T	T716I
	T24506G	S982A
	G24914C	D1118H
Orf8	C27972T	Q27stop
	G28048T	R52I
	A28111G	Y73C
N	28280 GAT->CTA	D3L
	C28977T	S235F

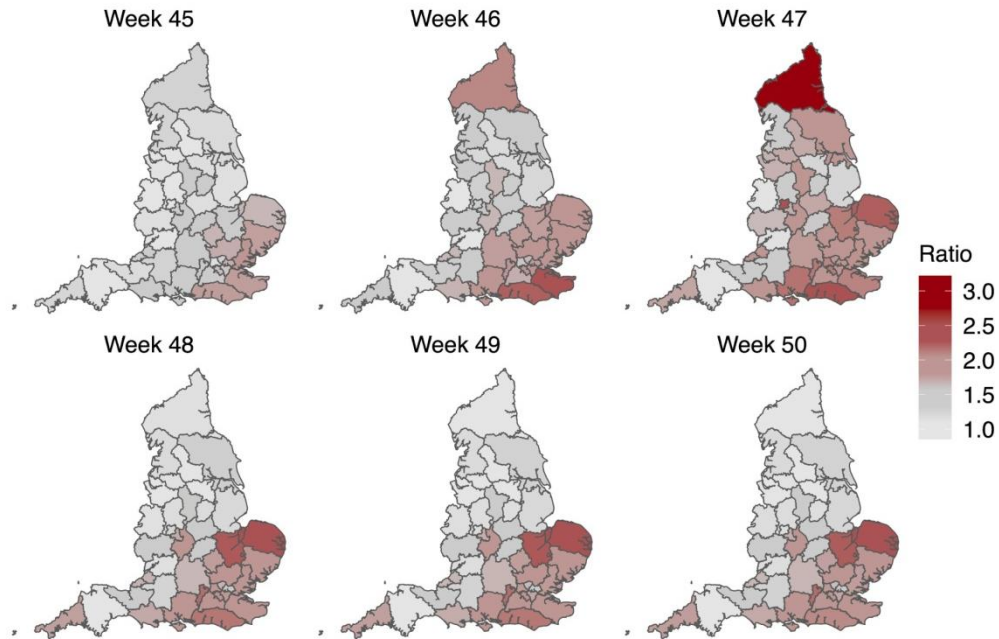
Summary:

14 lineage defining mutations

6 in spike

3 deletions (2 in spike)

B.1.1.7 lineage: caratteristiche e diffusione

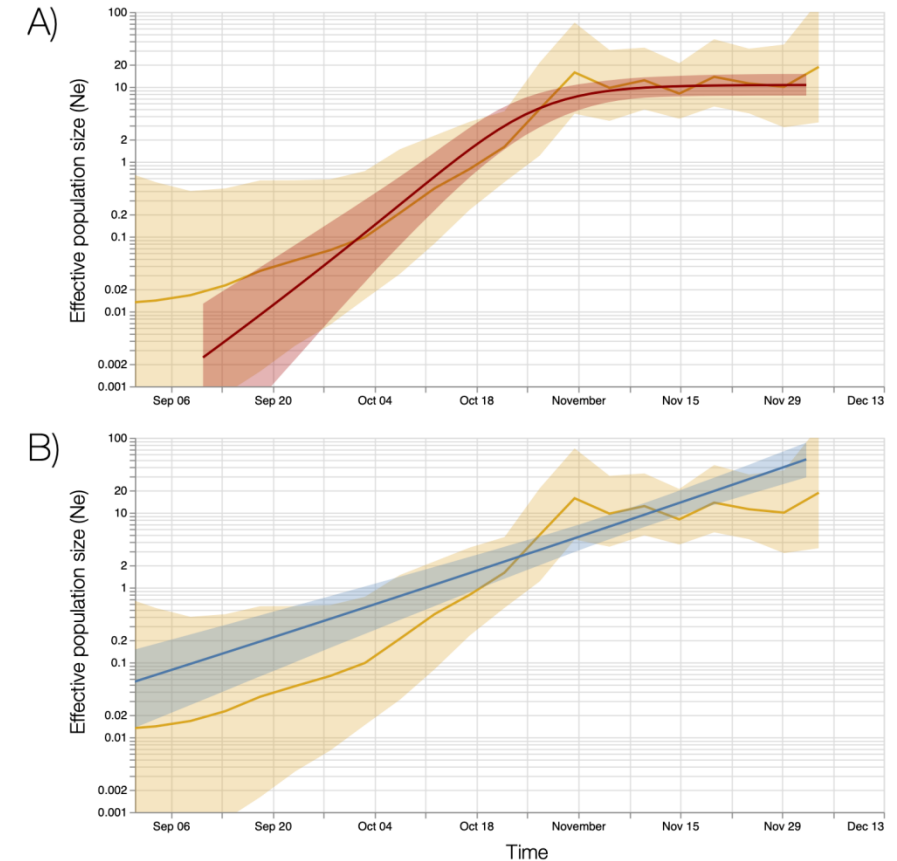


Stime di Rt mediane per le varianti VOC e non VOC tra la settimana 45 e la settimana 50. Il colore più scuro indica il vantaggio moltiplicativo più elevato per la variante VOC rispetto alla variante non VOC.

- Tasso di crescita da dati genomici: suggeriscono un tasso di crescita di VUI-202012/01 che è del 71% (95% CI: 67% - 75%) superiore rispetto ad altre varianti
- PCR ct values: suggeriscono una diminuzione del valore ct di circa 2 associati alla nuova variante
- Carica virale dedotta dal numero di letture genomiche uniche: suggerisce un aumento di 0,5 della carica virale dedotta log10 mediana in Y501 rispetto a N501
- Possibile sottostima della frequenza di questa variante per problemi legati al suo sequenziamento

B.1.1.7 lineage: caratteristiche e diffusione

- L'emergere e la successiva dominanza di VUI-202012/01 ne suggerisce un vantaggio selettivo rispetto ad altre varianti
- VUI-202012/01 ha avuto una crescita esponenziale durante un periodo in cui erano in vigore misure di blocco nazionali → NERVTAG ritiene che VUI-202012/01 dimostri un sostanziale aumento della trasmissibilità rispetto ad altre varianti
- Quattro probabili reinfezioni identificate tra 915 soggetti con questa variante, ma è necessario un ulteriore lavoro per confrontare questo tasso di reinfezione con set di dati comparabili
- Recentemente riportate evidenze che associano questa variante a un incrementato rischio di morte comparata ad altre varianti
- Report precedenti non avevano riportato evidenze di un impatto sulla severità della malattia e sull'efficacia del vaccino



Stime bayesiane della dimensione effettiva della popolazione nel tempo basate su 776 genomi campionati tra ottobre e dicembre

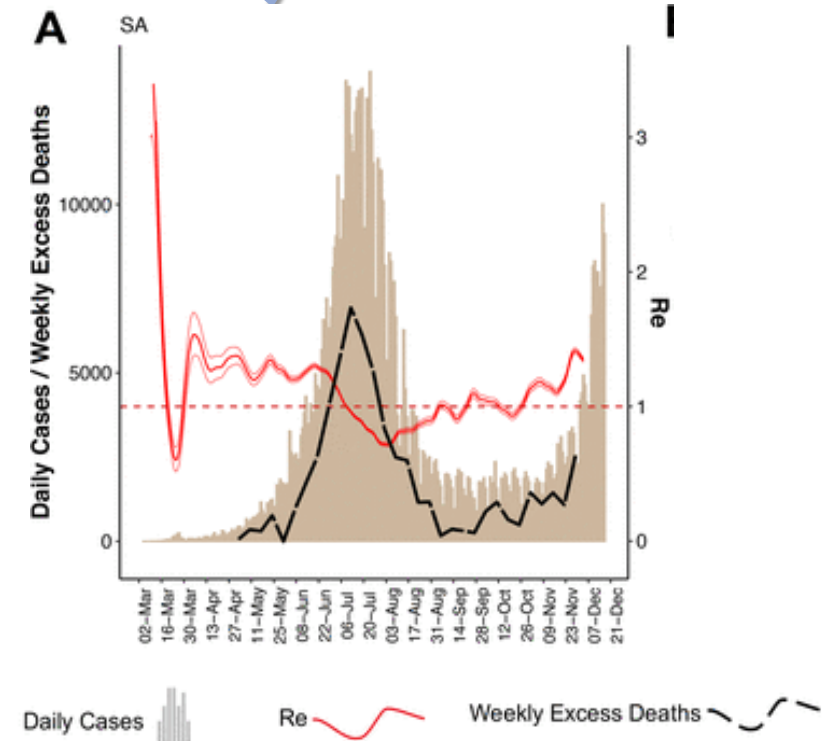
- A) modello di crescita logistica
B) modello di crescita esponenziale

B.1.351 lineage (20H/501Y.V2)

- 18 dicembre: scoperta di una nuova variante di SARS-CoV-2 in Sud Africa → 501Y.V2, lineage B.1.351
- Anche VOC 202012/01 (variante inglese) presenta la mutazione N501Y, ma l'analisi filogenetica ha dimostrato che 501Y.V2 e la variante inglese sono varianti di virus differenti
- Diversamente dalla variante inglese, quella sudafricana non presenta la delezione 69/70
- Studi preliminari suggeriscono che la variante è associata a una carica virale più elevata, ciò può suggerire un potenziale per una maggiore trasmissibilità
- Non ci sono prove chiare che la nuova variante sia associata a una malattia più grave o ad esiti peggiori
- Ad oggi, la variante 501Y.V2 è stata segnalata in oltre 31 paesi
- Ci sono alcune prove che indicano che una delle mutazioni della proteina spike, E484K, può influenzare la neutralizzazione da parte di alcuni anticorpi policlonali e monoclonali

S.501Y.V2		
Gene	Nucleotide	Amino Acid
orf1ab	1059C>T	T265I
	5230G>T	K1655N
	10323A>G	K3353R
spike	21614C>T	L18F
	21801A>C	D80A
	22206A>G	D215G
	22287T>A*	L242H*
	22286-22294 deletion*	L242_244L deletion*
	22299G>T	R246I
	22813G>T	K417N
	23012G>A	E484K
	23063A>T	N501Y
	23664C>T	A701V
orf3a	25563G>T	Q57H
	25904C>T	S171L
E	26456C>T	P71L
N	28887C>T	T205I

Summary:
15 lineage defining mutations
8 in spike
1 deletion



Dinamiche epidemiologiche SARS-CoV-2 in Sud Africa. Gli istogrammi mostrano il numero di casi COVID-19 confermati giornalmente. Le fluttuazioni delle stime giornaliere di Re sono mostrate in rosso (mappate sull'asse y destro), con un limite per $R = 1$ mostrato come linea tratteggiata rossa. Le morti settimanali in eccesso in ciascuna regione sono mostrate con linee tratteggiate nere (mappate sull'asse y sinistro).

P.1 lineage (20J/501Y.V3)

- Gennaio 2021, Manaus (Nord del Brasile) identificata una nuova variante → P.1 (deriva da B.1.1.28)
- Il nuovo lineage P.1 presenta 17 cambiamenti amminoacidici, 3 delezioni, 4 mutazioni non sinonime e un'inserzione di 4 nucleotidi
- Potenzialmente associato ad un aumento della trasmissibilità, possibile reinfezione
- La frequenza della mutazione E484K nel lineage B.1.1.28 era del 13% (n = 100/750 genomi), mentre tale frequenza nel lineage P.1 è del 100%
- P.1 e B.1.1.7 condividono la mutazione N501Y nello spike e la delezione in ORF1ab
- P.1 e B.1.351 (sud africana) condividono 3 mutazioni nello spike (K417N/T, E484K, N501Y) entrambe hanno anche la delezione nell'orf1ab del 11288-11296

Lineage	Time Period	N Seqs	Frequency (%)	Lower Adj CI	Upper Adj CI
P.1 (n=76)	March to Nov-20	0	0.0	< 0.01	6.3
	Dec-20	35	52.2	40.5	63.8
	Jan-21	41	85.4	72.5	93.1
P.2 (n=21)	March to Nov-20	1	3.7	< 0.01	19.8
	Dec-20	17	25.4	16.4	37.0
	Jan-21	3	6.3	1.5	17.5
Others (n=45)	March to Nov-20	26	96.3	80.2	>99.99
	Dec-20	15	22.4	14.0	33.8
	Jan-21	4	8.3	2.8	20.1

P.1	
Gene	Amino acid
Orf 1ab	S1188L
	K1795Q
	11288:9del
Spike	L18F
	T20N
	P26S
	D138Y
	R190S
	K417T
	E484K
	N501Y
	H655Y
	T1027I
Orf 3a	G174C
Orf 8a	E92K
N	P80R

RNA polimerasi RNA dipendente

- L'RNA polimerasi RNA dipendente (RdRp) è il principale costituente del meccanismo di replicazione/trascrizione ed è formata da tre domini distinti
- Sono state identificate 3 mutazioni nell'RdRp ricorrenti in Europa (posizione 3036, 14408 e 23403) e 3 altre mutazioni frequenti nel Nord America (posizioni 17746, 17857 e 18060)
- La mutazione RdRp situata alla posizione 14408 (P323L), che è presente nei genomi virali europei a partire dal 20 febbraio 2020, determina un aumento di rigidità nella struttura della proteina e un cambio di interazione con gli altri componenti del sistema di replicazione e trascrizione
- Altre mutazioni: A97V e A185V hanno un ruolo nel determinare cambiamenti nella struttura secondaria della proteina

Remdesivir

- Remdesivir è un inibitore dell'RNA polimerasi RNA dipendente, è il primo farmaco antivirale somministrato negli USA e in Europa, con un impatto nella durata dell'ospedalizzazione, ma non sulla mortalità
- Le mutazioni in nsp12 possono avere effetti sull'efficacia del Remdesivir: F480L, D484Y, V553L, V557L

Mutazioni e vaccini

- 2 vaccini: Moderna (mRNA-1273) e Pfizer-BioNtech (BTN162b2)
- 8 settimane dopo la seconda dose: elevati livelli IgM e IgG contro la proteina S
- Attività neutralizzante e numero di cellule B maggiori dopo 1,3 mesi, ma equivalenti dopo 6,2 mesi rispetto agli individui infettatisi naturalmente
- Anticorpi diretti contro epitopi associati ai residui K417, E484 e N50: siti che spesso vanno incontro a mutazione

- 18 pseudovirus: ciascuna singola mutazione + tutte le mutazioni delle varianti B.1.1.7 e B.1.351
- Variante B.1.1.7: refrattaria alla neutralizzazione della maggior parte degli mAb contro NTD e relativamente resistente alla maggior parte di quelli diretti contro RBD
- Variante B.1.351: refrattaria alla neutralizzazione della maggior parte degli mAb contro NTD e anche a quelli contro RDB. È la mutazione E484K che conferisce resistenza
- Plasma convalescente di pazienti infettati all'inizio della pandemia: attività neutralizzante leggermente diminuita per la variante inglese e significativamente diminuita per quella sudafricana
- Plasma soggetto vaccinato: meno efficace nel neutralizzare il virus con mutazioni E484K, N501Y e combinazione K417N + E484K + N501Y

Riassumendo...

First detection				Clinical changes				
Location	Date	Lineage	Other names	Notable mutations	Transmissibility	Virulence	Antigenicity	Spread
Nigeria	August 2020	B.1.1.207		P681H	No evidence of change	No evidence of change	No evidence of change	Localized
United Kingdom	September 2020	B.1.1.7	VOC-202012/01, 20B/501Y.V1	N501Y, 69–70del, P681H	Evidence of 30–70% increased transmissibility	Potentially 30% more lethal	No evidence of change	Global
Denmark	October 2020	N/A	Cluster 5, ΔFVI-spike (SSI)	Y453F, 69–70deltaHV	No evidence of change	No evidence of change	Moderately decreased sensitivity to neutralising antibodies	Likely extinct
South Africa	December 2020	B.1.351	501.V2, 20C/501Y.V2	N501Y, K417N, E484K	Evidence of increased transmissibility	No evidence of change	Undergoing investigation (E484K mutant)	Global
Brazil	January 2021	P.1	B.1.1.248	N501Y, E484K	Undergoing investigation (N501Y mutant)	No evidence of change	Undergoing investigation (E484K mutant)	Global

Conclusioni

- Il numero di varianti in circolazione sta aumentando e alcune di queste possono ridurre la potenza di neutralizzazione e potenzialmente anche l'efficacia vaccinale
- Necessario interrompere la trasmissione del virus il più rapidamente possibile, raddoppiando le misure di prevenzione e accelerando la somministrazione del vaccino
- L'utilizzo di vaccini a mRNA dovrebbe rendere più facile il loro aggiornamento, in risposta all'evoluzione antigenica del virus
- Probabile necessità di usare anticorpi monoclonali diretti contro epitopi non sovrapposti



Grazie dell'attenzione