

## La pandemia di Covid-19: un evento (im)prevedibile?

Barbara Illi

Istituto di Biologia e Patologia Molecolari, Consiglio Nazionale delle Ricerche (IBPM-CNR), c/o Dipartimento di Biologia e Biotecnologie “Charles Darwin”, Sapienza Università di Roma.

*Note: evidenziate in corsivo sono riportate informazioni per “non biologi”.*

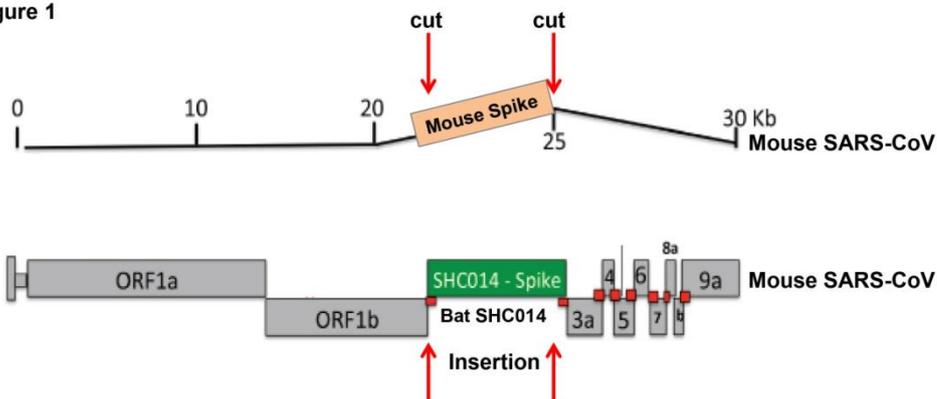
### Introduzione

Per tutte le zoonosi, tre condizioni devono essere soddisfatte perché queste diventino pandemiche. La prima: il virus responsabile deve essere compatibile con gli esseri umani. Secondo: deve esserci contatto tra esseri umani e animali; terzo: il virus deve poi essere trasmissibile tra esseri umani, una volta effettuato il cosiddetto “salto di specie”. Sfortunatamente, la pandemia di Covid-19 soddisfa tutte e tre queste condizioni. Tuttavia, da quale animale sia derivato SARS-CoV-2 (CoV-2), l’agente virale eziologico di Covid-19, non è ancora completamente chiaro.

### SARS-CoV-2: artificiale o naturale?

Nell’era del “complotto”, l’idea che CoV-2 potesse essere un virus artificiale, creato in laboratorio, ha fortemente destabilizzato l’opinione pubblica. Un video che ha circolato sui social media, relativo ad un servizio giornalistico italiano circa un virus SARS sintetico, ha fatto sorgere, immediatamente, dei dubbi sulla reale origine di CoV-2 e sulla responsabilità della Cina nel suo diffondersi.

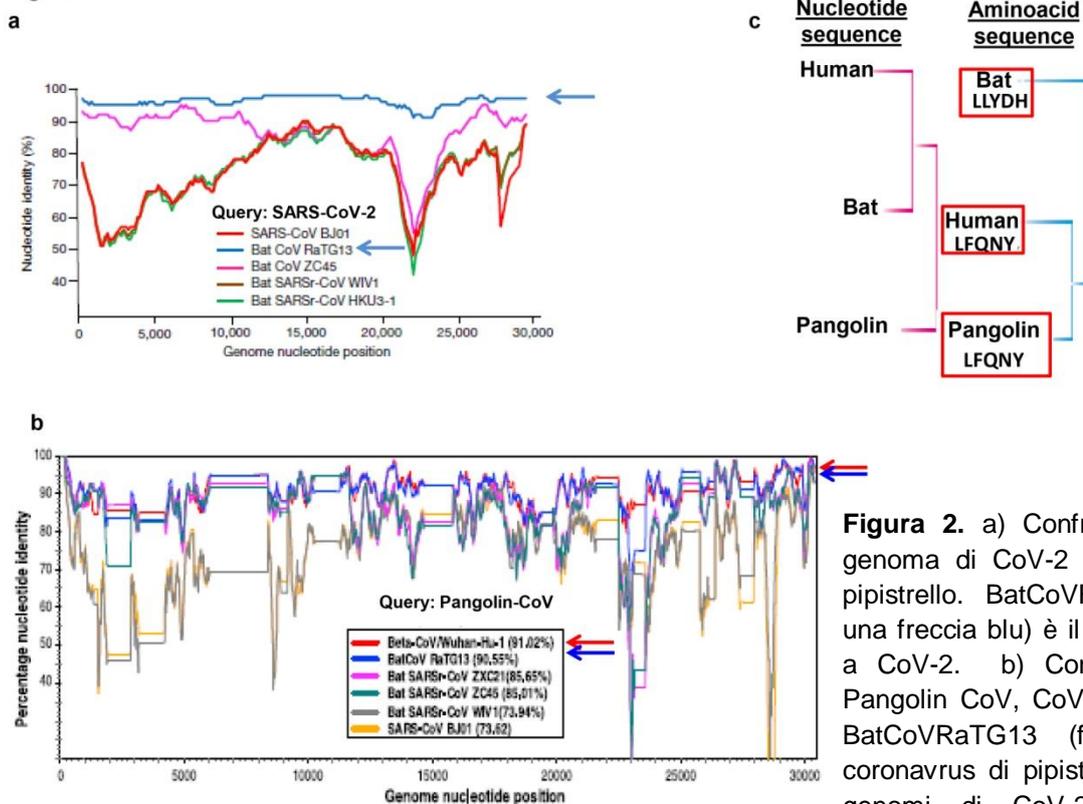
Figure 1



**Figura 1. Virus SARS chimera topo/pipistrello.** Schema del virus chimerico che mostra un SARS-CoV di topo come scheletro e la proteina spike di pipistrello SHC014 come gene estraneo. I siti di taglio sono indicati da frecce rosse. (Adapted from Menachery et al., Nat Med, 2015)

Quel video, all'interno della trasmissione televisiva italiana "Leonardo", risale al 2015 e, specificamente, riportava i risultati di un lavoro scientifico sulla costruzione e caratterizzazione di un virus chimera derivato da un coronavirus SARS (SARS-CoV) di topo con all'interno la proteina spike SHC014 di un coronavirus di pipistrello<sup>1</sup> (figura 1). La tecnica, chiamata clonaggio, consiste in una sorta di "taglia e cuci" di un gene all'interno di una molecola di DNA più grande (che può essere una molecola circolare, detta plasmide, o molecole più grandi come quelle virali) grazie a proteine, dette "enzimi di restrizione",

Figure 2



**Figura 2.** a) Confronto e identità tra il genoma di CoV-2 e altri SARSr-CoV di pipistrello. BatCoV RaTG13 (indicato da una freccia blu) è il coronavirus più vicino a CoV-2. b) Confronto e identità tra Pangolin CoV, CoV-2 (freccia rossa) and BatCoV RaTG13 (freccia blu) e altri coronavirus di pipistrello e SARS-CoVs. I genomi di CoV-2 e RaTG13 sono sovrapponibili e praticamente identici a quello di Pangolin-CoV. c) Analisi filogenetica basata sull'omologia di sequenza tra nucleotidi (linee rosa) e aminoacidi (linee blu). (Adapted from Zhang et al., Current Biol, 2020)

che tagliano il DNA a ridosso di nucleotidi specifici, e altre dette "ligasi" che, letteralmente, cuciono i pezzi. In questo caso, il gene SHC014 è stato tagliato da un plasmide e cucito all'interno del genoma di un SARS-CoV di topo, tagliato nello stesso modo in modo che l'inserzione di SHC014 fosse corretta (figura 1). In quel lavoro, studi "in vitro" e "in vivo" hanno dimostrato l'inefficacia sia di anticorpi neutralizzanti anti-SARS che di vaccini anti-SARS, rispettivamente, nel rallentare la crescita del virus nelle cellule ospiti e nel proteggere i topi dall'infezione. Perciò, la pubblicazione di quel vecchio

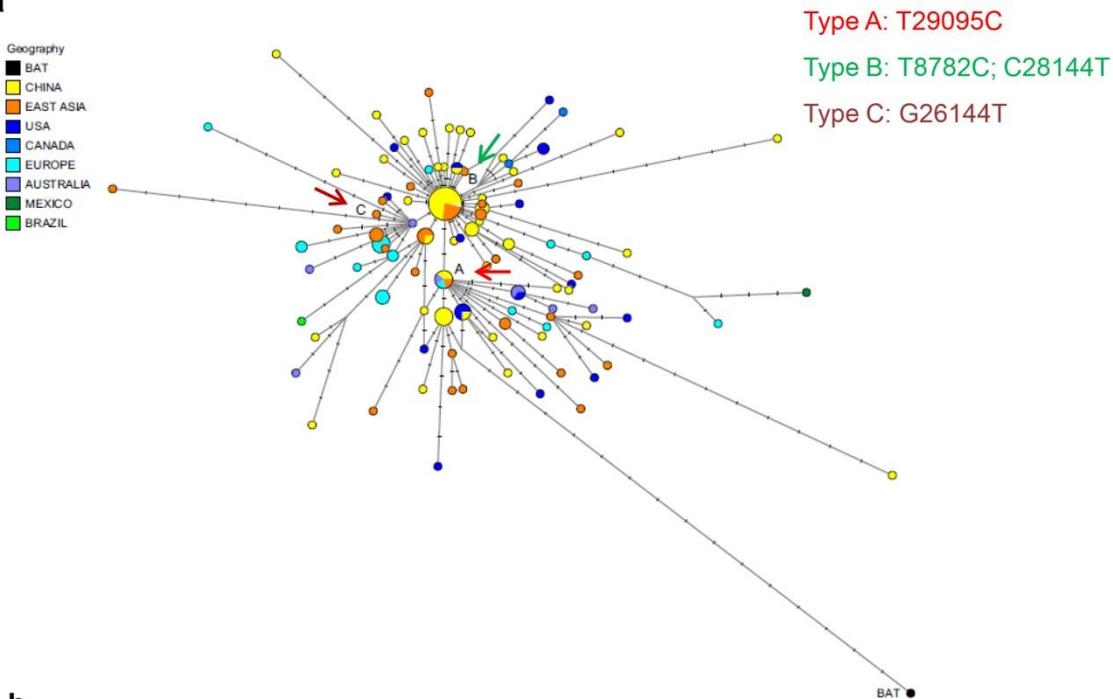
video della trasmissione “Leonardo” lo scorso marzo ha destato grande preoccupazione. Tuttavia, quel lavoro voleva essere semplicemente la dimostrazione di un principio, ossia che l’eventuale insorgenza di nuovi SARS-CoV e relative epidemie avrebbe potuto accadere e avrebbe potuto essere potenzialmente pericolosa per la possibile mancanza di cure e vaccini. Ma CoV-2 non ha tracce nel suo genoma del genoma di nessun SARS-CoV di topo. La presenza di 4 piccole sequenze di aminoacidi nella proteina spike di CoV-2, lo strumento che il virus usa per entrare nelle cellule, comuni al virus HIV, ha destato ulteriore preoccupazione. Questa somiglianza è stata sottolineata di recente dal Prof. Luc Montagnier, uno dei “padri” dell’HIV, rafforzando l’ipotesi che CoV-2 potesse essere il prodotto di una manipolazione genetica. Da un confronto con altre proteine in banche dati, è emerso che quelle sequenze sono comuni ad almeno altre 300 proteine, non correlate né a CoV-2 né ad HIV. Inoltre, già dallo scorso Febbraio, il confronto del genoma di CoV-2 con altri genomi ha indicato chiaramente che CoV-2 non abbia potuto acquisire quelle sequenze da HIV<sup>2</sup>. Più recentemente, una Lettera sul giornale Nature Medicine, ha chiarito molto bene come CoV-2 sia il prodotto di una selezione naturale di virus zoonotici, come illustrato nel prossimo paragrafo.

### **SARS-CoV-2: pipistrello o pangolino?**

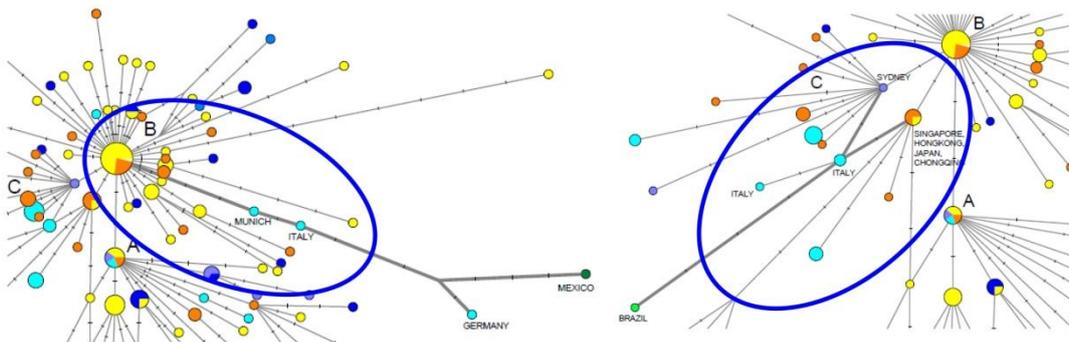
Le prime informazioni sulle origini di CoV-2 sono arrivate dall’analisi del liquido dopo lavaggio broncoalveolare di 1 tra 7 pazienti con polmonite grave, ricoverati in terapia intensiva nell’ospedale Jin Yin-Tan di Wuhan<sup>3</sup>. Le ricerche in banche dati per identificare somiglianze tra il genoma virale estratto da quel paziente e genomi virali noti ha indicato che quel virus era molto simile a coronavirus SARS correlati (SARS-related CoV; SARSr-CoV). Analisi ulteriori hanno dimostrato che il virus discende, probabilmente, da un coronavirus di pipistrello, specificamente dal coronavirus TG13 del *Rinolophus affinis* (BatCoVraTG13) (figura 2a). Dopodiché, la ricerca di un ospite intermedio ha focalizzato l’attenzione degli scienziati su altri serbatoi di virus SARSr-CoV come i Pangolini, piccoli formichieri contrabbandati nella provincia di Guandong e venduti nei mercati cinesi. In effetti, l’analisi del genoma estratto dai polmoni di 2 pangolini, morti in una finestra temporale compatibile con l’insorgenza della pandemia di Covid-19, ha rivelato che quei pangolini erano stati infettati da un virus (definito poi Pangolin-CoV) strettamente correlato a CoV-2 e ad altri SARSr-CoV di pipistrello<sup>5</sup> (figura 2b). Pangolin-CoV e CoV-2 condividono, nella sequenza della proteina spike, 5 aminoacidi chiave per l’ingresso del virus nella cellule ospite. Questa omologia rende CoV-2 molto più simile a Pangolin-CoV

**Figure 3**

**a**



**b**



**Figura 3.** Rete di 160 genomi di CoV-2. Il tipo A è il tipo ancestrale, come definito dalla comparazione con BatCoVraTG13. Ogni cerchio ha un'area corrispondente al numero di genomi contenuti in esso. Ogni tacca sulle linee identifica una mutazione. In alto a destra sono mostrate le mutazioni caratteristiche di ogni tipo, identificate da colori corrispondenti alle frecce che indicano i nodi nella rete. b) Traiettorie di infezione in Italia. Apparentemente, in Italia ci sono stati 2 ingressi del virus, uno da Monaco, derivato dal tipo B (sinistra) e uno da Singapore, derivato dal tipo C (destra). Entrambi sono contrassegnati da cerchi blu. (Adapted from Forster et al., PNAS, 2020)

che a BatCoVraTG13, suggerendo l'insorgenza di mutazioni del virus del pipistrello nel pangolino e i pangolini come ospiti intermedi (figura 2c, linee blu). Tuttavia, la comparazione delle sequenze genomiche sembrerebbe indicare Pangolin-CoV come l'antenato comune sia di CoV-2 che di BatCoVraTG13 (figura 2c, linee rosa), ed insieme costituirebbero un nuovo gruppo di coronavirus, denominato "il gruppo SARS-CoV-2". Tuttavia, l'origine di CoV-2 dal pangolino è ancora oggetto di dibattito.

## Capacità di mutare e varianti di SARS-CoV-2

La sopravvivenza e il mantenimento della “performance” virale sono alla base dell’alto tasso di mutazione dei virus a RNA, inclusi i coronavirus. Quando accadono eventi che rallentano la diffusione dei virus e questi rallentano il loro tasso di replicazione, essi perdono la loro “fitness” e mutazioni deleterie per la loro sopravvivenza possono comparire. Al contrario, quando i virus si propagano ripetutamente e grandemente nella popolazione, aumentano la loro “fitness”. Comunque, i virus a RNA possono tollerare un numero limitato e solo alcuni tipi di mutazione<sup>6</sup>. Inoltre, bisogna considerare che alcune mutazioni sono “sinonime”, ovvero *i cambiamenti nella sequenza di nucleotidi dell’RNA non corrisponde ad un cambiamento nella sequenza di aminoacidi che quella sequenza di RNA codifica*. Uno studio su 95 genomi di CoV-2 ha rivelato che questi sono simili al 99.9% sia a livello della sequenza genomica che proteica. Tuttavia, sono stati scoperti in CoV-2 13 siti particolarmente soggetti a mutazione. Di particolare rilievo è il fatto che alcuni di questi “punti caldi” di mutazione siano all’interno delle proteine spike e del nucleocapside e questo è particolarmente importante per studi sulla replicazione e trasmissione virale e sull’immunità indotta dal virus<sup>7</sup>. Gli studi di mutazione sono stati importanti per l’identificazione di varianti distribuite in specifiche aree geografiche. L’analisi di 160 genomi di CoV-2 ha permesso di identificare 3 tipi principali, identificati da particolari cambiamenti aminoacidici, definiti A, B e C<sup>8</sup>. Il tipo ancestrale A è il “padre” di B, ulteriormente evoluto nel tipo C. Il tipo A, suddiviso in 2 sottogruppi dalla mutazione sinonima T29095C (*T= timina; C=citosina; 29095 è la posizione del nucleotide nel genoma*), si è propagato soprattutto in Cina e meno nell’Asia dell’est, Europa, Australia e USA (figura 3a). Il tipo B è derivato da A grazie a 2 mutazioni, una sinonima (T8782C) e una non-sinonima (C28144T), quest’ultima risultante nel cambiamento dall’aminoacido leucina a serina. E’ interessante notare che il tipo B non ha mai lasciato l’est asiatico, se non dopo aver accumulato altre mutazioni. Il tipo C diverge dal tipo B per la mutazione non-sinonima G26144T (*G=guanina*), che cambia una glicina in una valina. Questo è il tipo principale diffuso in Europa (Francia, Germania, Italia, Svezia) e che ha raggiunto la California e il Brasile. E’ interessante notare che in Italia, secondo queste analisi, avremmo avuto 2 ingressi del virus: uno da Monaco, derivato dal tipo B (figura 3b, sinistra), ed un altro, più precoce, da Singapore, derivato dal tipo C (figura 3c, destra). Queste analisi sono importanti per ricostruire le traiettorie dell’infezione. Ad ogni modo, questa descritta è una fotografia degli stadi precoci della pandemia.

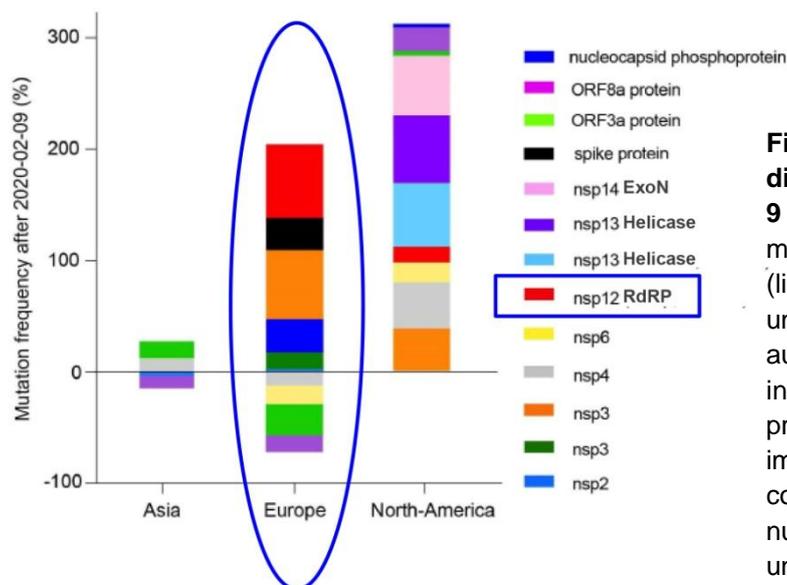
## Mutazioni potenzialmente dannose: la variante in RdRp

Molto recentemente, sono state identificate altre 8 mutazioni, 5 in Europa e 3 in Nord America. Sono tutte non-sinonime e producono cambiamenti nella sequenza di aminoacidi delle proteine codificate dai rispettivi geni mutati. Tra le “mutazioni europee”, una merita particolare attenzione perché ha colpito l’RNA polimerasi RNA-dipendente (RdRp) di CoV-2. RdRp di SARS-CoV e CoV-2 sono molto simili e questo indica che i coronavirus tendono a mantenere questa proteina conservata nella struttura e funzione. La mutazione di RdRp, specificamente al nucleotide 14408 del genoma virale, è comparsa in Inghilterra il 9 Febbraio scorso, contemporaneamente ad un aumento drammatico dei casi di Covid-19 in Europa. Più importante è il fatto che, a partire da quella data, si sia assistito ad un aumento della frequenza di mutazione di altre proteine virali (figura 4), codificate dai genomi con RdRp mutata rispetto a genomi con RdRp non mutata. Questa mutazione non compromette l’attività catalitica di replicazione dell’RNA di RdRp, ma, piuttosto, sembrerebbe inficiare il legame con altre proteine non strutturali, come nsp14 che, per omologia con nsp14 di SARS-CoV, dovrebbe avere una capacità di “correttore di bozze”, ovvero *corregge gli errori di RdRp che questa può commettere durante il processo di*

*replicazione,*

*togliendo i nucleotidi sbagliati ed inserendo quelli giusti.*

Figure 4



**Figura 4. Aumento della frequenza di mutazione di CoV-2 a partire dal 9 febbraio 2020.** L’istogramma mostra che, a partire dal 9 febbraio (linea grigia), quando è comparsa una mutazione in RdRp, è aumentata la frequenza di mutazione in geni di CoV-2 che codificano proteine che svolgono ruoli importanti per la biologia del virus, come spike, la proteina del nucleocapside e nsp3, un’endopeptidasi che taglia la poliproteina pp1ab di CoV-2. (Adapted from Pachetti et al., J Transl Med, 2020)

Questo potrebbe spiegare l'aumento della frequenza di mutazione in altri geni (e proteine), come conseguenza di errori nella replicazione. Inoltre, il sito mutato è vicino al sito di interazione di RdRp con farmaci antivirali che ne bloccano l'attività, come il Filibuvir e il Tegobuvir. Perciò, sarà importante verificare se questa mutazione effettivamente compromette la fedeltà del processo di replicazione e possa far insorgere fenomeni di farmaco-resistenza.

## **Conclusioni**

Dalla sua comparsa CoV-2 è mutato numerose volte, generando un buon numero di varianti. Tuttavia, correlazioni genotipo (virale)-fenotipo (clinico) non sono state ancora descritte. Anche il tasso di mortalità in specifiche aree geografiche non è stato correlato alla presenza di particolari varianti. E' stato dimostrato, comunque, che altri virus a RNA non-patogenici possono mutare in varianti patogeniche<sup>6</sup>. Importante è il fatto che una mutazione occorsa a Febbraio in Inghilterra sia strettamente correlata all'incremento nel tasso di mutazione dei genomi virali europei così come all'aumento dei casi europei di Covid-19. Perciò, sarà importante verificare se questa mutazione in RdRp abbia compromesso la sua capacità di replicare fedelmente l'RNA virale e/o abbia potuto indurre l'insorgenza di fenotipi virali resistenti ai farmaci. Inoltre, l'origine zoonotica di CoV-2, come anche quella delle epidemie di SARS e MERS, suggerisce questa pandemia come un evento prevedibile. In particolare, la contaminazione delle aree urbane con quelle selvatiche favorirà continuamente salti di specie di virus esclusivamente animali all'uomo e rende strategie preventive estremamente urgenti.

## **Referenze**

1. Menachery VD, Yount BL Jr, Debbink K, Agnihothram S, Gralinski LE, Plante JA, Graham RL, Scobey T, Ge XY, Donaldson EF, Randell SH, Lanzavecchia A, Marasco WA, Shi ZL, Baric RS. A SARS-like cluster of circulating bat coronaviruses shows potential for human emergence. *Nat Med.* 2015; 21: 1508-13. doi: 10.1038/nm.3985.
2. Xiao C, Li X, Liu S, Sang Y, Gao SJ, Gao F. HIV-1 did not contribute to the 2019-nCoV genome. *Emerg Microbes Infect.* 2020; 9:378-381. doi: 10.1080/22221751.2020.1727299.
3. Andersen KG, Rambaut A, Lipkin WI, Holmes EC, Garry RF. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nat Med.* 2020; 26: 450-452. doi: 10.1038/s41591-020-0820-9.

4. Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, Si HR, Zhu Y, Li B, Huang CL, Chen HD, Chen J, Luo Y, Guo H, Jiang RD, Liu MQ, Chen Y, Shen XR, Wang X, Zheng XS, Zhao K, Chen QJ, Deng F, Liu LL, Yan B, Zhan FX, Wang YY, Xiao GF, Shi ZL. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020; 579: 270-273. doi: 10.1038/s41586-020-2012-7.
5. Zhang T, Wu Q, Zhang Z. Probable Pangolin Origin of SARS-CoV-2 Associated with the COVID-19 Outbreak. *Curr Biol*. 2020; 30: 1346-1351.e2. doi: 10.1016/j.cub.2020.03.022.
6. Domingo E, Holland JJ. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol*. 1997;51:151-78.
7. Wang C, Liu Z, Chen Z, Huang X, Xu M, He T, Zhang Z. The establishment of reference sequence for SARS-CoV-2 and variation analysis. *J Med Virol*. 2020. doi: 10.1002/jmv.25762.
8. Forster P, Forster L, Renfrew C, Forster M. Phylogenetic network analysis of SARS-CoV-2 genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020; 117: 9241-9243. doi: 10.1073/pnas.2004999117.
9. Pachetti M, Marini B, Benedetti F, Giudici F, Mauro E, Storici P, Masciovecchio C, Angeletti S, Ciccozzi M, Gallo RC, Zella D, Ippodrino R. Emerging SARS-CoV-2 mutation hot spots include a novel RNA-dependent-RNA polymerase variant. *J Transl Med*. 2020; 18: 179. doi: 10.1186/s12967-020-02344-6.