

Articolo | [Accesso aperto](#) | [Pubblicato: 06 dicembre 2023](#)

La N1-metilpseudoidilazione dell'mRNA provoca +1 frameshift ribosomiale

[Thomas E. Mulrone](#), [Tuija Pöyry](#), [Juan Carlos Yam-Puc](#), [Maria Rust](#), [Robert F. Harvey](#), [Lajos Kalmar](#), [Emily Horner](#), [Lucy Booth](#), [Alexander P. Ferreira](#), [Mark Stoneley](#), [Ritwick Sawarkar](#), [Alexander J. Mentzer](#), [Kathryn S. Lilley](#), [C. Mark Smales](#), [Tobias von der Haar](#), [Lance Turtle](#), [Susanna Dunachie](#), [Paul Klenerman](#), [James E. D. Thaventhiran](#) ✉ & [Anne E. Willis](#) ✉

[Natura](#) (2023)

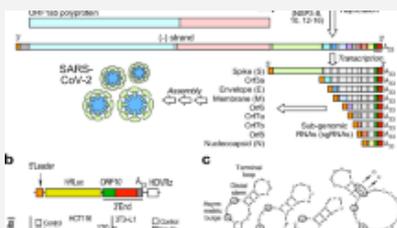
102k accessi | 5210 Altmetric | [delle metriche](#)

Astratto

Gli mRNA trascritti in vitro (IVT) sono modalità in cui possono combattere le malattie umane, esemplificate dal loro uso come vaccini per la sindrome respiratoria acuta grave coronavirus 2 (SARS-CoV-2). Gli mRNA IVT vengono trasfettati in cellule bersaglio, dove vengono tradotti in proteine ricombinanti, e l'attività biologica o l'immunogenicità della proteina codificata esercita un effetto terapeutico previsto^{1,2}. I ribonucleotidi modificati sono comunemente incorporati negli mRNA terapeutici IVT per diminuire la loro immunogenicità innata^{3,4,5}, ma i loro effetti sulla fedeltà alla traduzione dell'mRNA non sono stati completamente esplorati. Qui dimostriamo che l'incorporazione di N1-

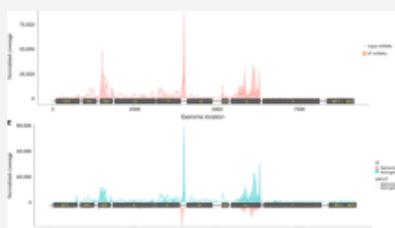
metilpseudoridina nell'mRNA si traduce in +1 frameshifting ribosomiale in vitro e che l'immunità cellulare nei topi e nell'uomo a +1 prodotti frameshifted dalla traduzione dell'mRNA del vaccino BNT162b2 si verifica dopo la vaccinazione. Il frameshifting +1 ribosoma osservato è probabilmente una conseguenza dello stallo del ribosoma indotto da *N1*-metilpseudoridina durante la traduzione dell'mRNA IVT, con il frameshifting che si verifica alle sequenze scivolose del ribosoma. Tuttavia, dimostriamo che il targeting sinonimo di tali sequenze scivolose fornisce una strategia efficace per ridurre la produzione di prodotti frameshifted. Nel complesso, questi dati aumentano la nostra comprensione di come i ribonucleotidi modificati influenzano la fedeltà della traduzione dell'mRNA e, sebbene non ci siano risultati avversi riportati da un errore di traduzione dei vaccini SARS-CoV-2 basati su mRNA negli esseri umani, questi dati evidenziano i potenziali effetti off-target per le future terapie basate sull'mRNA e dimostrano la necessità di ottimizzazione della sequenza.

Contenuti simili visualizzati da altri



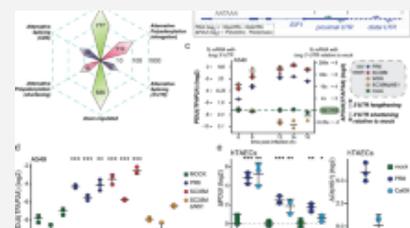
Un elemento virale pan-end di RNA e un complesso ospite definiscono un...

Articolo | Accesso aperto
09 giugno 2023



La N6-metiladenosina virale sovraregola la replicazione e la patogenesi del virus...

Articolo | Accesso aperto
09 ottobre 2019



L' allungamento dell'mRNA 3'UTR mediante poliadenilazione...

Articolo | Accesso aperto
15 agosto 2023

Principale

Una caratteristica chiave degli mRNA terapeutici IVT è che contengono ribonucleotidi modificati, che hanno dimostrato di ridurre l'immunogenicità innata e possono inoltre aumentare la stabilità dell'mRNA, entrambi caratteristiche favorevoli per le terapie mRNA^{1,2,3,4,5}. Ad esempio, i vaccini mRNA SARS-CoV-2 clinicamente approvati incorporano *N1*-metilpseudouridina (1-metil Ψ), che ha dimostrato di ridurre l'immunogenicità innata dell'mRNA IVT^{3,4,5}. Alcuni ribonucleotidi modificati, come la 5-metilcitosina (5-metilC), sono naturalmente presenti modifiche dell'mRNA post-trascrizionale negli eucarioti, mentre altri no, come l'1-metil Ψ (rif. [6,7,8,9,10](#)).

Abbiamo studiato come la 5-metossiuridina (5-metossiU), 5-metilC e 1-metil Ψ influenzano la traduzione dell'mRNA IVT. 5-metossiU, 5-metilC e 1-metil Ψ sono stati utilizzati negli mRNA IVT per tentare di aumentare la sintesi proteica ricombinante in vitro e per la prova preclinica di concetto per le terapie basate su mRNA IVT^{11,12}. Come accennato, 1-methyl Ψ è un ribonucleotide incorporato nei vaccini SARS-CoV-2 basati su mRNA IVT autorizzati, ma anche vaccini e terapie umane basati su mRNA in fase di sviluppo^{2,13,14}.

Nonostante il loro uso diffuso, si sa sorprendentemente poco su come la modifica del ribonucleotide influenzi la sintesi proteica, in particolare per la traduzione degli mRNA IVT terapeutici. Eravamo interessati a come i ribonucleotidi modificati influenzino la fedeltà della traduzione dell'mRNA per diversi motivi. Alcune modifiche dei ribonucleotidi possono ricodificare le sequenze di mRNA (ad esempio, inosina¹⁵). Il 5-metilC ha precedentemente dimostrato di aumentare la lettura errata durante la traduzione dell'mRNA nei procarioti, ma il suo effetto sulla fedeltà della traslazione dell'mRNA eucariotico non è stato esplorato¹⁶. L'effetto di 5-methoxyU sulla fedeltà della traduzione non è stato studiato. La pseudouridina (Ψ) è nota per aumentare la lettura errata dei codoni di stop dell'mRNA negli

eucarioti e può influenzare la lettura errata durante la traduzione dell'mRNA procariotica^{16,17,18}. 1-metilΨ non sembra influenzare la lettura errata del codone, ma ha dimostrato di influenzare i tassi di sintesi proteica e la densità dei ribosomi sugli mRNA, suggerendo un effetto diretto sulla traduzione dell'mRNA^{19,20}.

Al momento, non è chiaro quali ribonucleotidi modificati influenzino la fedeltà di traslazione dell'mRNA e gli studi esistenti sono per lo più limitati a comprendere le frequenze di lettura errata solo a un dato codone. La lettura errata dei codoni dell'mRNA è anche solo un tipo di meccanismo post-trascrizionale che può alterare una sequenza polipeptidica. Finora, nessuno studio ha studiato la questione fondamentale se i ribonucleotidi modificati possano influenzare il mantenimento della cornice di lettura corretta durante la traduzione di una trascrizione sintetica. Comprendere questi processi è fondamentale per aumentare la nostra conoscenza della sintesi proteica da mRNA modificati in generale, ma è anche indispensabile per la progettazione e la valutazione robuste di nuove terapie basate su mRNA che fanno uso di ribonucleotidi modificati all'interno di sequenze di RNA o contesti terapeutici molto diversi.

Per indagare su come la modifica dei ribonucleotidi influisce sulla manutenzione del frame di lettura durante la traduzione dell'mRNA, abbiamo progettato e sintetizzato mRNA IVT (Fluc+1FS) che riportano la sintesi proteica fuori dal frame (Fig. [1a](#)). Gli mRNA Fluc+1FS codificano un segmento amino-terminale di luciferasi di lucciola (NFluc) e un segmento carbossi-terminale complementare di Fluc (CFluc), direttamente a valle. CFluc è codificato nel frame di lettura +1. Gli mRNA Fluc+1FS sono progettati per produrre NFluc cataliticamente inattivo (truncato) quando vengono tradotti normalmente. Tuttavia, se i ribosomi si spostano fuori dal telaio durante la traduzione, possono essere prodotti polipeptidi allungati contenenti residui sia da NFluc in-frame che da CFluc out-of-frame, che possono aumentare l'attività catalitica.

e il segmento arancione rappresenta +1 sequenza di codifica Fluc terminale C frameshifted (CFluc). L'asterisco rappresenta un codone di arresto prematuro. **b**, attività di Luciferasi prodotta dalla traduzione degli mRNA WT Fluc, controllo non modificato (nucleotidi canonici), o contenente 1-metil Ψ (m1 Ψ), 5-metilC (m5C), 5-metossiU (mo5U) o le combinazioni indicate. $**P < 0,01$ (1-metil Ψ + 5-metilC, $P = 0,0051$; 5-metossiU, $P = 0,0023$; 5-metossiU + 5-metilC, $P = 0,0042$; analisi unidirezionale della varianza (ANOVA) con test di Dunnett). **c**, attività della Luciferasi prodotta dalla traduzione di mRNA Fluc+1FS modificati e controllo non modificato. 1-metil Ψ , $P = 0,002$ (ANOVA unidirezionale con il test di Dunnett). **d**, attività della Luciferasi nei lisati prodotti dalla trasfezione di cellule HeLa con mRNA Fluc+1FS non modificato o 1-metil Ψ per 8 ore. $P = 0,0104$ (test t a uno tailed di Welch). **e**, analisi Western blot (epitopo anti-Flag) di polipeptidi prodotti dalla traduzione di mRNA in **c**. Tutti i dati sono ottenuti da $n = 3$ esperimenti replicati. **e** mostra una singola macchia da $n = 3$ esperimenti replicati. Gli asterischi rappresentano bande a più alto peso molecolare. Per i dati sulla fonte del gel, vedere la Fig. [2](#).

Abbiamo sintetizzato mRNA Fluc+1FS non modificati, che contengono ribonucleotidi canonici, e li abbiamo tradotti in vitro. Abbiamo confermato che gli mRNA Fluc+1FS producono NFluc cataliticamente inattivo (Extended Data Fig. [1](#)). In confronto, l'mRNA Fluc wild-type (WT) non modificato, contenente la sequenza di codifica Fluc completa in-frame, ha prodotto la proteina attiva prevista (Extended Data Fig. [1](#)). Poi abbiamo sintetizzato e tradotto ogni mRNA contenente 5-metossiU, 5-metilC, 1-metil Ψ , 5-metossiU + 5-metilC o 1-metil Ψ + 5-metilC. La traduzione dell'mRNA WT Fluc non è stata significativamente influenzata dalle sole modifiche di 1-metil Ψ o 5-metilC, ma è stata diminuita incorporando entrambi i ribonucleotidi in un unico trascritto (Fig. [1b](#)). L'incorporazione di 5-metossiU da sola, o combinata con 5-metilC, ha ridotto significativamente la traduzione dell'mRNA WT Fluc (Fig. [1b](#)). L'incorporazione di 1-metil Ψ nell'mRNA Fluc+1FS ha aumentato significativamente il ribosomiale +1 frameshifting a circa l'8% della

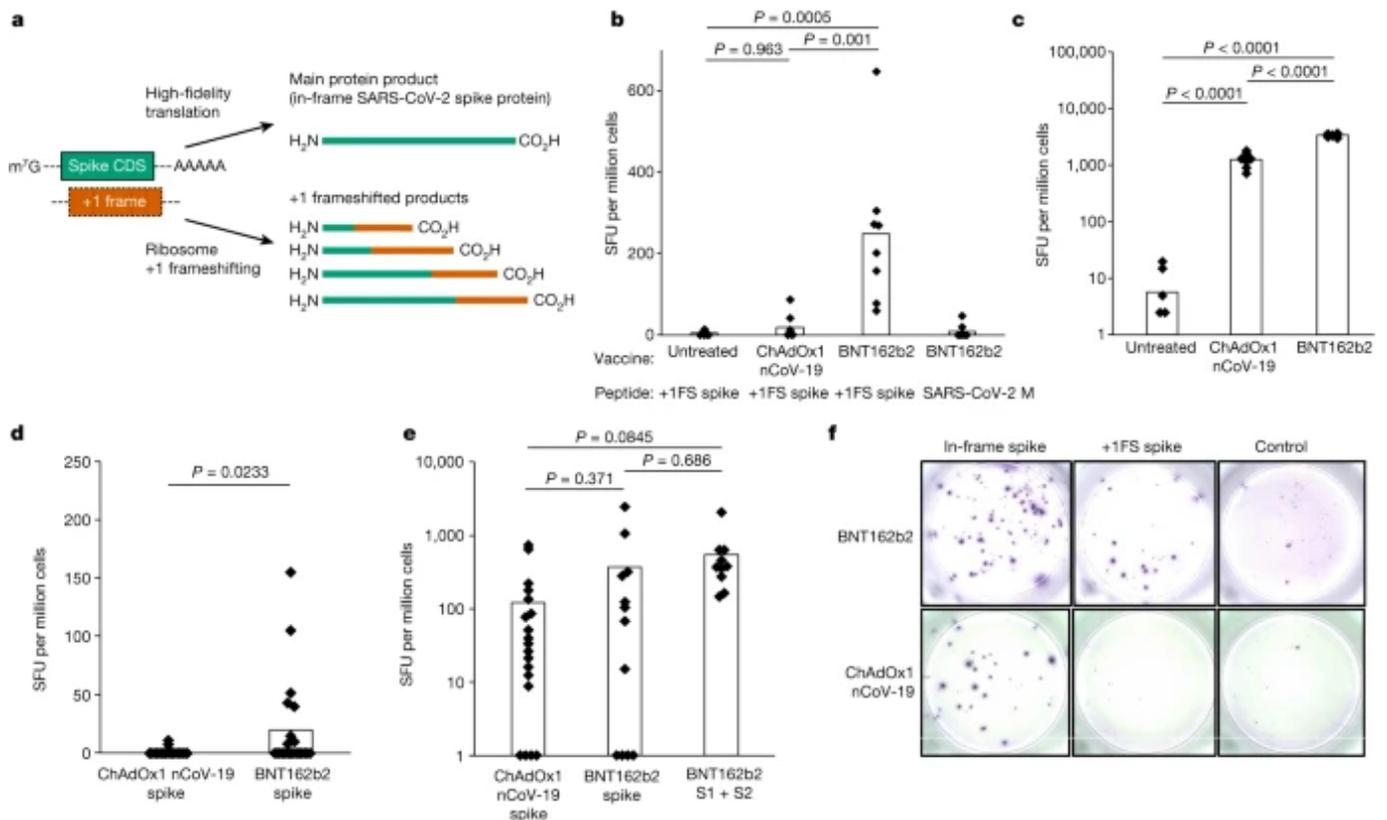
corrispondente proteina in-frame, che non è stata osservata per altri ribonucleotidi (Fig. [1c](#)). Le cellule HeLa trasfettate con mRNA 1-metilΨ Fluc+1FS hanno ricapitolato i risultati della traduzione in vitro (Fig. [1d](#)). Sulla base di queste osservazioni, abbiamo concluso che l'mRNA IVT contenente 1-metilΨ o 5-metilC presenta un'efficienza di traslazione simile all'mRNA non modificato, ma l'1-metilΨ aumenta significativamente il frameshift ribosomico +1 durante la traslazione dell'mRNA.

Abbiamo osservato un grande aumento del frameshifting ribosomiale +1 durante la traduzione dell'mRNA 1-metilΨ e abbiamo ragionato che ottenere una migliore comprensione dei prodotti di traduzione completerebbe i dati del saggio del reporter e aiuterebbe a spiegare come provengono i prodotti frameshifted +1. Per affrontare questi aspetti, abbiamo sondato i polipeptidi prodotti durante la traduzione dell'mRNA IVT mediante western blotting. La traduzione dell'mRNA Fluc+1FS non modificato ha prodotto il prodotto troncato in-frame previsto, che era vero anche per l'mRNA 5-methylC (Fig. [1e](#)). La traduzione dell'mRNA 1-metilΨ ha prodotto il prodotto in-frame previsto, ma ha anche prodotto due bande aggiuntive a peso molecolare più elevato (Fig. [1e](#)). Abbiamo ragionato che questi prodotti erano polipeptidi frameshifted +1. Abbiamo anche confermato che gli mRNA 1-metilΨ + 5-metilC-, 5-metossiU- e 5-metossiU + 5-metilC sono modelli di mRNA relativamente poveri per la sintesi proteica (Fig. [1e](#)).

1-metilΨ è utilizzato anche nei vaccini mRNA SARS-CoV-2 clinicamente approvati^{3,4}. Poiché 1-metilΨ ha aumentato il frameshifting di +1 ribosoma durante la traduzione in vitro, abbiamo studiato se questo si verifica in vivo per BNT162b2, un vaccino mRNA SARS-CoV-2 contenente 1-metilΨ. Abbiamo ragionato che il frameshifting ribosomiale +1 durante la traduzione dell'mRNA dell'antigene ricombinante potrebbe portare alla presentazione di prodotti +1 frameshifted alle cellule T e suscitare risposte immunitarie cellulari off-target (Fig. [2a](#)). La presentazione dell'antigene da traduzione errata dell'mRNA tumorale

endogeno ha dimostrato di verificarsi in vivo (ad esempio, rif. [21](#)). Per affrontare questa possibilità, abbiamo vaccinato i topi con BNT162b2 e quantificato la loro risposta delle cellule T alla proteina spike SARS-CoV-2 in-frame e ai prodotti +1 frameshifted che si prevede si verifichino per la traduzione del frame mRNA +1, nonché un antigene di controllo non correlato (proteina SARS-CoV-2 M), mediante test di ELISpot con interferone- γ (IFN γ). Non sono stati inclusi i peptidi di giunzione costituiti da residui N-terminali in-frame e residui C-terminal +1 frameshifted. Abbiamo scoperto che le risposte ai peptidi spike +1 frameshifted erano significativamente aumentate nei topi vaccinati rispetto ai topi non trattati o a quelli vaccinati con ChAdOx nCoV-19, che non produce antigene dalla traduzione di *n1*-metilpseudouridilato mRNA22-(Fig. [2b](#)). Sia la vaccinazione BNT162b2 che ChAdOx1 nCoV-19 hanno prodotto risposte ELISpot al picco in-frame SARS-CoV-2 (Fig. [2c](#)). Questi dati suggeriscono che i prodotti +1 frameshifted codificati nell'mRNA spike BNT162b2 sono antigeni a cellule T per topi inbred, ai quali l'immunità off-target può essere rilevata dopo la vaccinazione.

Fig. 2: +1 prodotti frameshifted suscitano risposte immunitarie cellulari off-target a seguito della vaccinazione mRNA modificata.



a, Rappresentazione di prodotti spike e +1 frameshifted (+1FS) prodotti dalla traduzione mRNA spike 1-metilψ-modificato. CDS, sequenza codificante. **b**, risposte Splenocyte IFNγ ELISpot da topi non trattati, vaccinati con ChAdOx1 nCoV-19 o BNT162b2- vaccinati stimolati con peptidi di picco +1FS. La risposta IFNγ ELISpot dei topi vaccinati con BNT162b2 stimolati con peptidi SARS-CoV-2 M (antigene di controllo non correlato) è inclusa per un ulteriore confronto. SFU, unità spot-forming. Ogni gruppo $n = 8$. Non trattato contro ChAdOx1 nCoV-19, $P = 0,963$; non trattato contro BNT162b2, $P = 0,0005$; ChAdOx1 nCoV-19 contro BNT162b2, $P = 0,001$. **c**, risposte Splenocyte IFNγ ELISpot da topi in **b** stimolate con peptidi di picco. Non trattato contro ChAdOx1 nCoV-19, $P = 2,05 \times 10^{-9}$; non trattato contro BNT162b2, $P = 4,5 \times 10^{-14}$; ChAdOx1 nCoV-19 contro BNT162b2, $P = 1,88 \times 10^{-13}$. **d**, Cellule mononucleari del sangue periferico (PBMC) Risposte IFNγ ELISpot da donatori vaccinati con ChAdOx1 nCoV-19 ($n = 20$) o BNT162b2 ($n = 21$) stimolate con peptidi di picco +1FS. $P = 0,0233$ (test t a una coda di Wich). **e**, PBMC IFNγ risposte ELISpot da parte dei donatori in **c** stimolati con peptidi spike in-frame: pool di spike totale o spike S1 + S2 subpools. ChAdOx1 nCoV-19 spike contro BNT162b2 spike, $P = 0.371$; ChAdOx1 nCoV-19 spike versus BNT162b2 S1 + S2, $P = 0.0845$; BNT162b2 spike versus BNT162b2 S1 + S2, $P = 0,686$. **f**, Immagini rappresentative dei pozzi di risposta PBMC IFNγ ELISpot per due individui vaccinati con

BNT162b2 responder (in alto) o ChAdOx1 nCoV-19 (in basso). Da sinistra a destra: risposta di picco in-frame (peptidi di picco); risposta di picco +1FS (peptidi di picco +1FS); nessun controllo peptidico. I valori *P* in **b,c,e** sono stati determinati dall'ANOVA unidirezionale e dal test di Tukey.

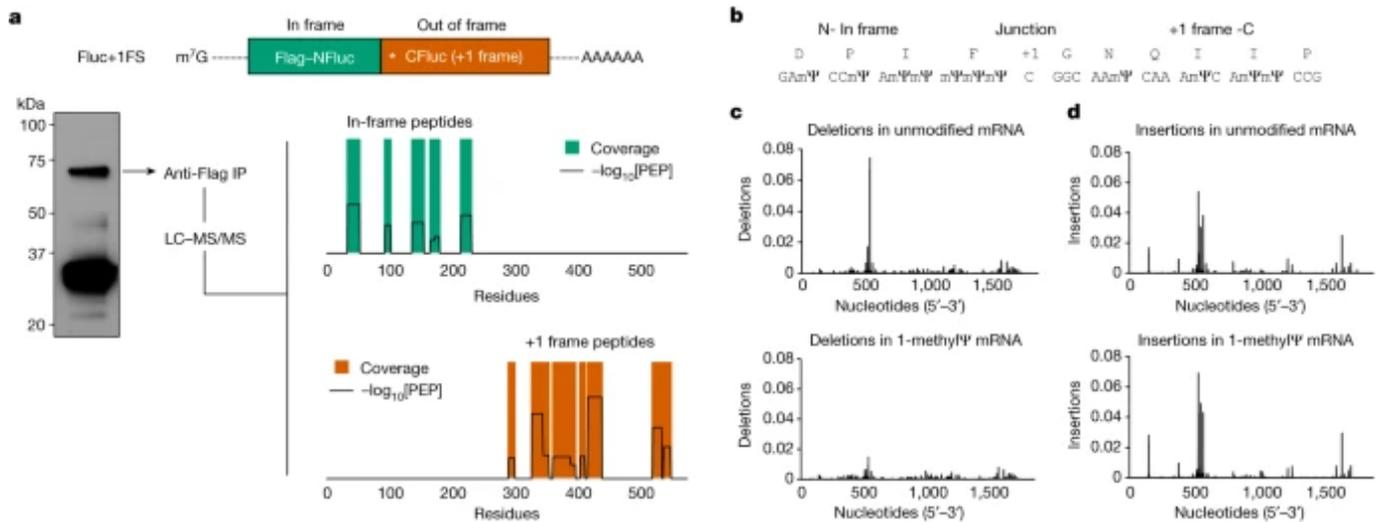
[Dati di origine](#)

Abbiamo quindi confrontato le risposte IFN γ ELISpot ai prodotti proteici spike SARS-CoV-2 frameshifted +1 previsti in 21 individui vaccinati con BNT162b2 e confrontato queste risposte con quelle di 20 individui vaccinati con ChAdOx1 nCoV-19, nessuno dei quali ha riportato effetti indebiti a seguito della vaccinazione. Abbiamo rilevato una risposta IFN γ significativamente più alta all'antigene +1 frameshifted nel gruppo vaccinale BNT162b2, rispetto a ChAdOx1 nCoV-19 (Fig. [2d](#)). Non c'era alcuna associazione tra le risposte delle cellule T all'antigene +1 frameshifted e l'età, il sesso o il sottotipo HLA (Tabella supplementare [1](#) e Dati estesi Fig. [2](#) e [3](#)). Sia la vaccinazione ChAdOx1 nCoV-19 che BNT162b2 hanno prodotto risposte ELISpot al picco in-frame SARS-CoV-2, ma le risposte ai prodotti +1 frameshifted sono state osservate solo in individui vaccinati con BNT162b2 (Fig. [2e,f](#)). Durante la replicazione virale di SARS-CoV-2, un frameshift ribosomiale programmato -1 si verifica naturalmente durante la traduzione del frame di lettura aperto (ORF) 1a e ORF1b (rif. [23](#)). Non è fattibile che questi dati siano una conseguenza dell'infezione naturale da SARS-CoV-2 per i seguenti motivi, non esaustivi. In primo luogo, non è nota alcuna attività di frameshifting che si verifica durante la traduzione dell'mRNA subgenomico del picco SARS-CoV-2 (che sarebbe una grande scoperta a sé stante). In secondo luogo, -1 frameshifting (e non +1 frameshifting) è limitato a un singolo sito programmato in ORF1a e ORF1b (rif. [23](#)). In terzo luogo, i peptidi frameshifted +1 sono previsti dalla sequenza mRNA BNT162b2 e non dalla sequenza del gene S dal virus selvaggio (Extended Data Fig. [4](#)). Invece, questi dati suggeriscono che la

vaccinazione con mRNA 1-metil Ψ può suscitare l'immunità cellulare agli antigeni peptidici prodotti dal frameshifting ribosomiale +1 sia nelle persone diverse dal complesso di istocompatibilità principale (MHC) che nei topi MHC-uniformi.

Per fornire ulteriori informazioni meccanicistiche sul frameshifting +1 ribosoma durante la traduzione dell'mRNA 1-metil Ψ e identificare potenziali siti o sequenze di frameshift, abbiamo tradotto l'mRNA 1-metil Ψ Fluc+1FS, purificato il principale polipeptide +1 frameshifted e effettuato la cromatografia liquida spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS) di digest triptici. Da questo singolo polipeptide, abbiamo identificato sei peptidi in-frame e nove peptidi derivati dal frame mRNA +1 (Fig. [3a](#) e Extended Data Table 1). Tutti i peptidi in-frame sono stati mappati alla regione N-terminale, mentre i peptidi +1 frameshifted sono stati mappati a valle (Fig. [3a](#)). Abbiamo poi ripetuto questa analisi usando una proteasi diversa e identificato un peptide di giunzione che attraversa il fotogramma principale e il fotogramma +1 (Fig. [3b](#)). Questi dati hanno dimostrato che il polipeptide allungato era effettivamente un polipeptide chimerico costituito da residui N-terminali in-frame e +1 residui C-terminali frameshifted. Come previsto, sono stati prodotti frameshifted più corti sono stati prodotti anche dalla traduzione di mRNA 1-metil Ψ che codifica Fluc full-length (Extended Data Fig.5).

Fig. 3: L'errata traduzione dell'mRNA 1-metil Ψ è dovuta al frameshifting ribosomiale +1 e non a errori trascrizionali.



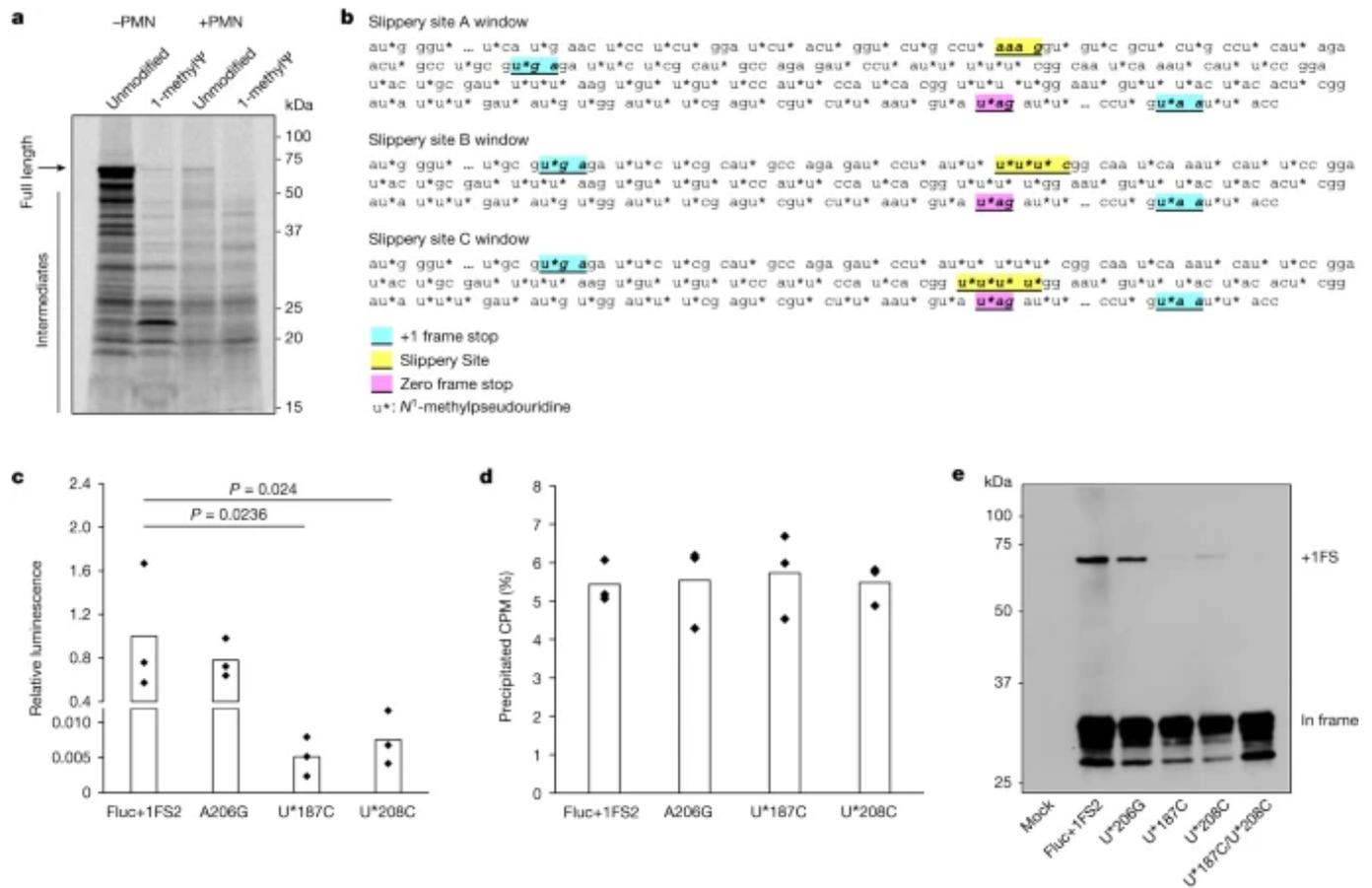
a, grafico di copertura del peptide triptico del polipeptide ad alto peso molecolare purificato prodotto dalla traduzione dell'mRNA 1-metil Ψ Fluc+1FS, che mostra residui in-frame (in alto) e +1 residui frameshifted (in basso). $-\log_{10}[\text{PEP}]$ è il punteggio del percolatore dello spettro di massa (sono mostrati solo peptidi di alta qualità). IP, immunoprecipitato. La struttura dell'mRNA Fluc+1FS della Fig. 1 viene nuovamente visualizzata e viene visualizzato un western blot della reazione di traslazione prima dell'immunoprecipitazione. Per i dati sulla fonte del gel, vedere la Fig. 3. **b**, peptide di giunzione derivato da +1 frameshifting ribosomiale e dalla sequenza di mRNA di origine. **c**, delezioni di nucleotidi in mRNA non modificato (in alto) e 1-metil Ψ (in basso) Fluc+1FS, quantificato da $n = 3$ analisi di sequenziamento RNA. **d**, Inserimenti di nucleotidi in mRNA non modificato (in alto) e 1-metil Ψ (inferiore) Fluc+1FS.

Errori apparenti nella sintesi proteica, compreso il frameshifting, possono essere conseguenze della mutazione del DNA o di errori trascrizionali²⁴. Quindi, una traduzione fedele di una sequenza di mRNA errata può produrre proteine errate. Si presume che le trascrizioni in vitro siano copie esatte dell'RNA del DNA modello, la cui accuratezza può essere stimata dalla fedeltà dell'RNA polimerasi utilizzata. Tuttavia, la sostituzione dei trifosfati ribonucleosidici del substrato canonico per nucleotidi modificati può aumentare gli errori trascrizionali. Per affrontare questa possibilità, abbiamo eseguito il sequenziamento dell'RNA ad alto rendimento di mRNA non modificato e 1-metil Ψ Fluc+1FS e inserimenti e delezioni di nucleotidi

quantificati in ogni popolazione di mRNA IVT. I profili di delezione dei nucleotidi per ogni mRNA erano molto simili (Fig. 3c), così come gli inserzioni di nucleotidi (Fig. 3d), suggerendo poche differenze specifiche del sito. La frequenza complessiva di inserimenti e delezioni era bassa e non differiva significativamente tra l'mRNA non modificato e l'mRNA 1-metil Ψ (Extended Data Table 2), che è supportato da recenti osservazioni²⁵. Da questi risultati, abbiamo concluso che i prodotti frameshifted della traduzione dell'mRNA 1-metil Ψ non erano dovuti a errori trascrizione, ma erano dovuti al frameshifting +1 ribosomiale in buona fede, un meccanismo post-trascrizionale.

Il frameshifting del ribosome è un fenomeno ben documentato che si verifica durante la traduzione di molti mRNA presenti in natura²⁴. Poiché lo stallo del ribosoma è implicato in diversi casi di +1 frameshifting, abbiamo chiesto come la presenza di 1-metil Ψ nell'mRNA IVT influenzi l'allungamento della traduzione^{26,27,28}. Per fare questo, abbiamo testato la sintesi proteica durante la traduzione dell'mRNA non modificato o 1-metil Ψ WT Fluc utilizzando l'etichettatura co-traduzionale [³⁵S]metionina²⁹. L'allungamento di traslazione dell'mRNA 1-metil Ψ era più lento rispetto all'mRNA non modificato (Fig. 4a), che è supportato da precedenti osservazioni²⁰. Tutte le reazioni sono state eseguite per 30 minuti e c'era meno proteina a lunghezza intera prodotta dalla traduzione di mRNA contenenti 1-metil Ψ , suggerendo un tasso di allungamento più lento rispetto a quello dell'mRNA non modificato, con una percentuale maggiore di prodotti polipeptidici prematuri. Questi dati hanno suggerito che i ribosomi allunganti si bloccano durante la traduzione dell'mRNA contenente 1-metil Ψ .

Fig. 4: +1 il frameshift ribosomiale dipende dalle sequenze scivolose dell'mRNA e associato allo stallo del ribosoma durante la traduzione dell'mRNA 1-metil Ψ .



a, SDS-poliacrilammide elettroforesi gel elettroforesi autoradiografia di polipeptidi marcati [³⁵S]metionina prodotti dalla traduzione di mRNA non modificato o 1-metilψ Fluc per 30 minuti, incluso o omettendo 100 μM di paromomicina (+PMN e -PMN, rispettivamente). **b**, Diagramma che mostra le sequenze scivolose di mRNA putativo e finestre stop-codon-flanked. **c**, Attività di +1 prodotti frameshifted dopo la traduzione di mRNA mutanti 1-metilψ, o mRNA di controllo 1-metilψ Fluc+1FS2, per 2 ore. Fluc+1FS2 contro U*187C, $P = 0,024$; Fluc+1FS2 contro U*208C, $P = 0,0236$ (ANOVA unidirezionale con test di Dunnett). **d**, Traduzione totale dell'mRNA su 2 ore per ciascuno degli mRNA Fluc+1FS2 o mRNA mutanti, quantificata mediante incorporazione di [³⁵S]metionina. CPM, conteggi al minuto. **e**, analisi Western blot (epitopo anti-Flag) dei polipeptidi prodotti dalla traduzione di mRNA in **c** e U*187C/U*208C doppio-mutante 1-metilψ mRNA. I dati provengono da $n = 3$ esperimenti replicati. **a** ed **e** mostrano immagini rappresentative da $n = 3$ esperimenti replicati. Per i dati sulla fonte del gel, vedere le Fig. 4 e 5.

Non era chiaro se 1-metil Ψ influenzasse i tassi di decodifica dell'mRNA, o un altro processo, durante l'allungamento. Abbiamo ragionato che la decodifica più lenta dei codoni 1-metil Ψ durante l'allungamento della traslazione potrebbe portare allo stallo dei ribosomi, simile alle precedenti osservazioni per i codoni "affamati" nei siti di +1 frameshifting durante la traslazione dell'mRNA naturale^{21,28}. Abbiamo sondato il meccanismo molecolare dello stallo del ribosoma durante la traduzione dell'mRNA 1-metil Ψ usando la paromomicina aminoglicoside. In breve, durante la decodifica dell'mRNA, l'interazione antinota aminoacil-tRNA anticodono-codono provoca cambiamenti conformativi locali nell'rRNA 18S (negli eucarioti), dopo di che si forma un nuovo legame peptidico, si verifica la rotazione della subunità ribosoma e successivi cambiamenti conformativi del ribosoma, il legame del fattore di allungamento 2 e la traslocazione al codone successivo completa il ciclo di allungamento³⁰. La paromomicina si lega all'elica 44 dell'rRNA 18S in ribosomi allunganti e altera la sua conformazione nel centro di decodifica, che inibisce la traduzione ma permette anche il legame produttivo di aminoacil-tRNA vicini e non cinati al sito A del ribosoma 80S³¹. In tal modo, la paromomicina aumenta la malincorporazione degli amminoacidi in polipeptidi allunganti³². Abbiamo ragionato che se la lenta decodifica durante la traduzione dell'mRNA 1-metil Ψ fosse dovuta a una cinetica di legame aminoacil-tRNA alterata, questo processo potrebbe essere ridotto dalla paromomicina. Questo perché i ribosomi legati alla paromicina potrebbero incorporare ulteriori aminoacil-tRNA vicini o non giunti e aumentare efficacemente il pool di aminoacil-tRNA del substrato nei siti di stallo dei ribosomi. La traduzione dell'mRNA 1-metil Ψ era più lenta di quella dell'mRNA non modificato e la proporzione di prodotti polipeptidici prematuri era maggiore (Fig. [4a](#)). Tuttavia, durante la traduzione dell'mRNA 1-metil Ψ , l'allungamento del polipeptide è stato migliorato con l'aggiunta di paromomicina, mentre la paromomicina era inibitoria solo alla traduzione dell'mRNA non modificata (Fig. [4a](#)). Insieme, questi dati mostrano che la lenta traduzione dell'mRNA 1-metil Ψ è probabilmente dovuta allo stallo del ribosoma, che è causato

dal legame alterato dell'aminoacil-tRNA, e che può essere salvato aumentando l'incorporazione di aminoacidi vicini o non-cognati in polipeptidi allungati.

Sebbene non vi siano prove che i prodotti frameshifted nell'uomo generati dalla vaccinazione BNT162b2 siano associati a esiti avversi, per l'uso futuro della tecnologia mRNA è importante che la progettazione della sequenza mRNA sia modificata per ridurre gli eventi di frameshifting ribosomi, in quanto ciò potrebbe limitare il suo uso futuro per applicazioni che richiedono dosi più elevate o dosi più frequenti, come la produzione in vivo di ormoni. È importante continuare a indagare sulla traduzione errata e sull'immunogenicità dell'mRNA terapeutico, poiché l'evoluzione delle risposte anticorpali e delle cellule T citolitiche contro le varianti di picco e i peptidi +1 frameshifted non è stata sistematicamente valutata negli esseri umani e le risposte ELISpot ottenute da peptidi aggregati possono anche sottovalutare le risposte delle cellule T. È improbabile che il principale prodotto codificato con mRNA in-frame edotti una risposta immunitaria adattiva, ma la presentazione di prodotti +1 frameshifted potrebbe attivare le cellule T che prendono di mira le cellule ospiti. Abbiamo ragionato che se fossimo stati in grado di identificare siti o sequenze di frameshift +1 ribosoma sarebbe stato possibile alterare la sequenza di mRNA per ridurre tali effetti. Come prova di principio, abbiamo usato il nostro sistema di mRNA reporter IVT. L'analisi LC-MS/MS ha mostrato che la traduzione dell'mRNA 1-metil Ψ porta alla sintesi di prodotti +1 frameshifted all'interno dell'area della sequenza di codifica tra i residui in-frame rilevati e i residui +1 frameshifted a valle (Fig. [3a](#)). Abbiamo cercato la sequenza di RNA corrispondente a questa regione nella sequenza di codifica del peptide di giunzione (Fig. [3b](#)) e i determinanti del frameshifting del ribosoma dai meccanismi pubblicati, da cui abbiamo identificato tre potenziali sequenze scivolose di ribosoma (Fig. [4c](#)), con tutte e tre le sequenze che hanno il potenziale per essere decodificate dallo stesso aminoacil-tRNA a un codone in-frame o nel codone frame immediato +1. In particolare, sei siti scivolosi identici ai siti scivolosi Fluc+IFS B e C

sono stati distribuiti anche nella sequenza di codifica dell'mRNA spike BNT162b2. Questi siti sono stati annotati nella sequenza di codifica Fluc+1FS (Fig. 4b) e nella sequenza di codifica mRNA spike BNT163b2 (Extended Data Fig. 6). Abbiamo ragionato che queste sequenze potrebbero quindi funzionare come siti per il frameshifting ribosomiale +1. Abbiamo mutato sinonimo ogni sito in mRNA 1-metilΨ Fluc+1FS in modo tale che l'amminoacido in-frame era invariato, ma il codone immediato +1 frame è stato mutato in un amminoacido non-cognato, distruggendo quindi la sequenza scivolosa del ribosoma, e tradotto gli mRNA per valutare il contributo di ciascun sito al frameshifting ribosomiale +1 (Fig. 4c). Un codone +1 frame stop era presente a valle del sito scivoloso A, ed era improbabile che il frameshifting in questo sito contribuisse ad aumentare l'attività della luciferasi. Come previsto, l'attività della luciferasi prodotta dalla traduzione del sito A mutante A206G mRNA era la stessa dei livelli di controllo (Fig. 4c). Tuttavia, sia il sito scivoloso B mutante U*187C mRNA che il sito scivoloso C mutante U*208C mRNA hanno fortemente diminuito +1 ribosoma frameshifting (Fig. 4c). In particolare, l'efficienza di traslazione di ciascun mRNA era uguale, il che suggerisce che nessuna mutazione ha influenzato negativamente la traduzione dell'mRNA in generale, ma solo +1 attività di frameshifting ribosomiale (Fig. 4d). La traduzione di un mRNA U*187C/U*208C double-mutant 1-methylΨ Fluc+1FS non ha prodotto alcun frameshifting rilevabile +1 ribosoma (Fig. 4e). Il prodotto proteico transframe previsto da +1 frameshifting nel sito scivoloso C contiene un'alterazione di 19 residui di aminoacidi (rispetto a WT Fluc), mentre +1 frameshifting nel sito scivoloso B produce un prodotto transframe che è effettivamente omologo al 100% di WT Fluc. Inoltre, dato che la mutazione del sito scivoloso B o C (U*187C o U*208C) ha diminuito significativamente l'attività della luciferasi, ma che il prodotto relativamente più frameshifted è stato prodotto dalla traduzione dell'mRNA U*208C (Fig. 4e), abbiamo ragionato che il prodotto transframe prodotto dal frameshifting nel sito scivoloso C aveva una minore attività specifica della luciferasi, e che il frameshifting nel sito scivoloso B ha

contribuito alla maggior parte dell'attività di luciferasi rilevata come conseguenza del frameshifting +1 ribosoma. Nel loro insieme, questi dati suggeriscono che la *N1*-metilpseudoidridilazione a sequenze di mRNA definite innesca il frameshifting del ribosoma +1; tuttavia, con un'appropriata progettazione della sequenza di mRNA, è possibile migliorare questo problema.

Conclusioni

Mostriamo che 1-metil Ψ è un ribonucleotide modificato che aumenta significativamente +1 frameshifting ribosomiale durante la traduzione dell'mRNA e che l'immunità cellulare ai prodotti +1 frameshifted può verificarsi dopo la vaccinazione con mRNA contenente 1-metil Ψ . Per quanto ne sappiamo, questo è il primo rapporto secondo cui la modifica dell'mRNA influisce sul frameshifting ribosomiale. Accanto a questo impatto sull'immunità delle cellule T dell'ospite, gli effetti off-target del frameshifting ribosomiale potrebbero includere una maggiore produzione di nuovi antigeni delle cellule B. Altre strategie di modificazione dei ribonucleotidi, come l'incorporazione di 5-methoxyU, hanno ridotto significativamente l'efficienza di traslazione degli mRNA IVT, il che può limitare la traduzione clinica. Anche se abbiamo dimostrato che la traduzione dell'mRNA *N1*-metilpseudoidilato porta al frameshifting ribosomiale +1 in vitro e nelle cellule in coltura, è concepibile che altri eventi di traduzione errata (come la scansione che perde) possano anche contribuire alle risposte delle cellule T agli antigeni peptidici +1 frameshifted. Mostriamo che gli mRNA IVT contengono pochi inserimenti e delezioni di nucleotidi, e questo non viene modificato dall'incorporazione di 1-metil Ψ . I nostri dati mostrano che il frameshifting ribosomiale +1 si verifica in due sequenze scivolose caratterizzate. Pertanto, riteniamo che la banda minore di circa 50 kDa prodotta dalla traduzione mRNA Fluc+1FS sia probabilmente una conseguenza di diversi eventi di frameshifting (Fig. [1e](#)). La traduzione dell'mRNA contenente 1-metil Ψ porta a un allungamento di

traslazione più lento, causato dal legame alterato dell'aminoacil-tRNA, il che dimostra perché il frameshifting +1 ribosomiale non si verifica durante la traduzione dell'mRNA non modificato: sia lo stallo del ribosoma che le sequenze scivolose del ribosoma sembrano essere necessarie per il frameshifting produttivo +1 ribosoma. I nostri dati meccanicistici sono supportati da precedenti osservazioni di frameshifting ribosomiale durante la traduzione di mRNA presenti in natura, che implicano lo stallo del ribosoma e richiedono sequenze scivolose del ribosoma per +1 frameshifting^{21,26,27,28,33,34}. Questi risultati sono di particolare importanza per la nostra comprensione fondamentale di come la modifica del ribonucleotide influisce sulla traduzione dell'mRNA e per la progettazione e l'ottimizzazione di future terapie basate sull'mRNA per evitare eventi di traduzione errata che possono ridurre l'efficacia o aumentare la tossicità.

Pdf by:
<https://www.pro-memoria.info>

Metodi

Plasmidi e sintesi dell'mRNA

I reagenti Phusion High-Fidelity DNA polimerasi sono stati ottenuti da New England Biolabs. Il DNA del modello WT Fluc in-frame è stato prodotto da XbaI digest di pUCK100Fluc, incluso un 80-nucleotide polyA tail²⁹. Il DNA del modello Fluc+1FS è stato prodotto mediante sovrapposizione PCR di estensione di pUCK100Fluc utilizzando FlucFlag_F (5'-TTATACCATGGGTGACTACAAAGACCATGTGTGTGGATATAAAAGATCATGACATCGATTACAAGGATGACGATGACAAGCTCGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGG-3'), Fluc+1FS_R (5'-GATTGCCGAAAATAGGATCTCTGGCATG-3') per Fluc+1FS NFluc, Fluc+1FS_F (5'-CAGAGATCCTATTTTTCGGCAATCAAATCAT-3') e Fluc_R (5'-TAGATTGCTAGCACTAGCTTATGTGGATCTCG-3') per Fluc+1 CFluc. I prodotti PCR sono stati reinseriti in pUCK100 utilizzando NcoI e NheI e il DNA del modello lineare è stato prodotto da XbaI digest. Gli mRNA A206G, U*187C e U*208C sono stati trascritti da geni personalizzati subclonati in pUC57T7 (Genscript Biotech) e il

DNA del modello lineare è stato prodotto da BamHI digest. L'mRNA Fluc+1FS2 è stato prodotto dal DNA del modello Fluc+1FS subclonato in pUC57T7 e linearizzato da BamHI. Il DNA modello U*187C/U*208C è stato prodotto mediante sovrapposizione di estensione PCR e reinserimento in pUC57. Le sequenze di RNA Reporter sono mostrate in Fig. 1. La trascrizione in vitro è stata effettuata utilizzando TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit (Thermo Scientific K0441). UTP e CTP sono stati sostituiti dove richiesto per 5-methoxyUTP, *N1*-methylpseudoUTP o 5-methylCTP. I nucleotidi modificati sono stati ottenuti da Trilink Biotechnologies. Le trascrizioni sono state 5'-capped utilizzando il Vaccinia Capping System (NEB M2080S) e purificate mediante estrazione di fenolo-cloroformio e esclusione delle dimensioni G50. Le trascrizioni sono state quantificate utilizzando uno spettrofotometro Nanodrop ND2000 (Thermo Scientific) e conservate a -80°C .

Elettroforesi con gel di RNA

I campioni sono stati riscaldati in formamide con colorante blu bromofenolo e xilene cianuro per 3 minuti a 95°C , raffreddati per 2 minuti su ghiaccio e risolti su un gel acetato MOPS di agarosi all'1% per 90 minuti a 90 V. Il gel è stato colorato in $0,5\ \mu\text{g}$ di bromuro di etidio per 1 ora, immerso in acqua distillata per 1 ora e visualizzato mediante transilluminazione UV.

Cultura cellulare e trasfezione dell'mRNA

Le cellule HeLa erano un regalo del Proudfoot Lab, Università di Oxford. Le celle sono state autenticate digitando STR. Le cellule sono state coltivate in DMEM

(Gibco 41966029), integrate con il 10% di FBS a 37 °C, 5% di CO₂. Le cellule sono state testate per la contaminazione da micoplasma e sono risultate negative. Circa 16 ore prima della trasfezione, le cellule sono state seminate a $0,2 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ in piastre a 6 pozzetti. Dieci minuti prima della trasfezione, il mezzo è stato cambiato in OptiMEM (Gibco 31985062), dopo di che le cellule sono state trasfettate con 4 pmol Fluc+1FS mRNA in Lipofectamine 2000 (Invitrogen 11668019). Dopo 4 ore di trasfezione, OptiMEM è stato sostituito con DMEM, e le cellule sono state coltivate per altre 4 ore, e poi lisate in Passive Lysis Buffer (Promega E1941). I lisati sono stati centrifugati (10.000 g, 5 min) e l'attività della luciferasi è stata determinata nei surnatanti utilizzando il sistema di analisi della Luciferasi (Promega E4550) e il luminometro a piastra multi-well GloMax (Promega).

—

Traduzione in vitro

Gli mRNA IVT sono stati tradotti utilizzando il Flexi Rabbit Reticulocyte Lysate System utilizzando RRL trattato con nucleasi (Promega L4540). Per l'etichettatura co-traduzionale, sono stati utilizzati 0,33 μl di metionina di grado traslazione [³⁵S] (Hartman Analytic KSM-01) e 0,67 μl di amminoacidi meno metionina (Promega L996A) per reazione di 15 μl . I prodotti non etichettati sono stati prodotti con 1 μl di amminoacidi totali (non etichettati) (Promega L4461). La concentrazione di mRNA IVT era di 50 nM e, quando inclusa, la concentrazione di paromomicina (Sigma Aldrich P9297) era di 100 μM . Il fosfato di creatina (Roche 10621714001), la creatina chinasi (Roche 21778721), l'acetato di potassio (Sigma Aldrich P1190) e l'acetato di magnesio (Sigma Aldrich M5661) sono stati inclusi rispettivamente a 10 mM, 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$, 50 mM e 0,5 mM³⁵. Le reazioni sono state incubate a 30 °C per il tempo indicato e spostate nel ghiaccio, dopo di che 10 μl RNasi A/T1 e benzonase sono stati aggiunti e incubati per 10 min. L'attività della Luciferase è stata determinata utilizzando il sistema di analisi della Luciferasi (Promega E4550) e misurata

utilizzando un luminometro a piastre multi-well GloMax (Promega). La proporzione relativa dell'attività di guadagno della funzione della luciferasi dalla traduzione dell'mRNA Fluc+1FS è stata calcolata dalle unità di luce relative (RLU) per ogni reazione di traslazione dell'mRNA come percentuale di RLU di traduzione dell'mRNA WT Fluc non modificate. Per il western blotting, il tampone LDS PAGE di 2 volte la riduzione è stato miscelato con ogni campione, che è stato riscaldato a 70 °C per 10 minuti. I campioni refrigerati sono stati risolti su NuPAGE 4–12% o 12%, Bis-Tris, 1,0 mm, Mini Protein Gels (Invitrogen). I prodotti risolti sono stati trasferiti nella membrana di nitrocellulosa e sondati utilizzando l'anticorpo anti-Flag M2 (Sigma Aldrich F1804) e l'anticorpo anti-mouse-HRP (Dako P0447) e rilevati con il substrato Clarity Western ECL (Bio-Rad 1705060). Le figure [1](#) e [4](#) mostrano reazioni di traslazione da $n = 3$ repliche.

—

Analisi del peptide LC-MS/MS

L'mRNA IVT è stato tradotto come sopra. Dopo la digestione dell'RNA, i prodotti di traduzione sono stati immunoprecipitati usando perline di agarosio magnetico anti-Flag (Pierce) durante la notte a 4 °C. Le perle sono state lavate due volte in PBS, una volta in acqua, elutate nel buffer LDS PAGE e risolte su un NuPAGE 4–12%, Bis-Tris, 1,5 mm, Mini Protein Gel (NP0335BOX). Il gel è stato colorato con colorante Coomassie e la regione tra circa 60 kDa e 75 kDa (Precision Plus Protein All Blue Prestained Protein Standard; Bio-Rad) è stata asportata ed elaborata per l'analisi della spettrometria di massa come descritto in precedenza³⁶. In breve, la fetta di gel asportata è stata tagliata in pezzi da 1 mm e posta in un microtubo da 1,5 ml. La colorazione della coomassie è stata rimossa incubando alternativamente con una miscela di bicarbonato di ammonio da 25 mM e acetonitrile (2:1) e bicarbonato di ammonio da 25 mM. Ogni incubazione di 15 minuti a 37 °C è stata ripetuta fino a quando i pezzi di gel sono stati completamente detenuti. La riduzione e

l'alchilazione delle cisteine sono state effettuate prima incubando con una concentrazione finale fresca di 10 mM di ditiotreitolo in bicarbonato di ammonio da 25 mM a 60 °C per 60 minuti e quindi cambiando la soluzione a 60 mM di concentrazione finale di iodoacetamide in bicarbonato di ammonio da 25 mM e incubando per un'aggiunta di 45 minuti a temperatura ambiente al buio. Dopo aver disidratato i pezzi di gel con acetonitrile, è stata aggiunta la soluzione di tripsina (10 μl^{-1} in 25 mM di bicarbonato di ammonio) o AspN (1 μl^{-1} in 25 mM di bicarbonato di ammonio) fino a quando i pezzi di gel non sono stati completamente coperti. La digestione è stata effettuata a 37 °C per 16 h, 1.000 r.p.m. shaking. Le proteasi sono state inattivate aggiungendo acido formico (tripsina digest) o TFA (AspN digest) ad una concentrazione finale dell'1% (v/v). I peptidi sono stati estratti mediante incubazioni sequenziali con acqua/acetonitrile/acido formico (50:49:1 e 80:19:1% (v/v)). I peptidi estratti sono stati raggruppati e essiccati fino al completamento e risospeso in acqua/acetonitrile (97:3% (v/v)) con 0,1% (v/v) TFA per l'analisi spettrometrica di massa. L'analisi spettrometrica di massa è stata effettuata una volta per il digest della tripsina e una volta per il digest AspN.

Analisi spettrometrica di massa

I digest in-gel sono stati analizzati utilizzando un nanosistema Ultimate 3000 RSLC (Thermo Scientific) accoppiato a uno spettrometro di massa Orbitrap Eclipse (Thermo Scientific). Il campione è stato caricato sulla colonna di cattura (Thermo Scientific, PepMap100, C18, 300 $\mu\text{m} \times 5 \text{ mm}$), utilizzando iniezione ad anello parziale, per 3 minuti ad una portata di 15 $\mu\text{l min}^{-1}$ con 0,1% (v/v) FA in acetonitrile al 3%. I peptidi sono stati separati sulla colonna analitica (Easy-Spray C18 75 $\mu\text{m} \times 500 \text{ mm}$ 2 μm colonna) ad una portata di 300 nl min^{-1} utilizzando un gradiente del 97% A (0,1% di acido formico)/3% B (80% di acetonitrile 0,1% di acido formico) al

25% B per 50 min, poi al 40% B per altri 6 minuti, e poi al 90% B per altri 2 minuti, rimanendo al 90% B per 12 minuti prima che la percentuale di B fosse poi abbassata al 3,8% per consentire alla colonna di riequilibrarsi per 15 minuti prima della prossima iniezione. I dati sono stati acquisiti utilizzando due CV di spettrometria di mobilità ionica asimmetrica di campo (-50 V, -70 V). Per ogni esperimento di spettrometria di mobilità ionica asimmetrica di campo (tempo di ciclo massimo di 1,5 s per esperimento), i dati sono stati acquisiti in modalità dipendente dai dati e MS1 consisteva in una scansione MS a scansione completa a risoluzione di 120.000 (AGC impostato al 100% (4×10^5 ioni) con un tempo massimo di riempimento di 50 ms) utilizzando un intervallo di massa di 380-1.500 m/z . La soglia di innesco dell'intensità MS2 è stata impostata su $5,0 \times 10^3$ e per evitare la selezione ripetuta dei peptidi per MS/MS, l'esperimento ha utilizzato una finestra di esclusione dinamica di 40-s. MS/MS è stato effettuato sull'Orbitrap utilizzando una risoluzione di 30.000 (AGC impostato al 100% (5×10^4 ioni) con un tempo massimo di riempimento di 54 ms). Un'energia di collisione di dissociazione collisionale ad alta energia del 32% è stata utilizzata per frammentare i peptidi ed è stata utilizzata una finestra di isolamento di 1,2.

Analisi Proteome Discoverer v2.5

I dati grezzi sono stati importati e i dati sono stati elaborati in Proteome Discoverer (versione 2.5, Thermo Fisher Scientific). I file grezzi sono stati sottoposti a una ricerca nel database utilizzando Proteome Discoverer con SequestHF contro il database *Oryctolagus cuniculus* (coniglio) contenente sequenze proteiche di UniProt/Swiss-Prot (Proteome ID [UP000001811](#)), aggiunte con Fluc (Uniprot ID [P08659](#)), polipeptidi frameshifted previsti +1 e proteine contaminanti comuni (diversi tipi di cheratina umana, BSA e tripsina suina suina). L'identificazione dello spettro è stata effettuata con i seguenti parametri: accuratezza MS, 10 ppm;

precisione MS/MS di 0,02 Da; fino a due siti di scissione mancati consentiti; carbamidometilazione della cisteina; e ossidazione della metionina come modifiche variabili. Nella fase di elaborazione è stato utilizzato un flusso di lavoro interattivo. Dopo la prima ricerca Sequest HT, è stato utilizzato il nodo Inferis Rescoring e gli spettri con confidenza peggiore che alta sono stati ripresentati per una seconda ricerca Sequest HT utilizzando ulteriori modifiche dinamiche (deamidazione N e Q; piroglutammato N-terminale; perdita di metionina e acetilazione). I peptidi sono stati assegnati al loro rispettivo telaio di lettura o giunzione mediante ispezione. Il nodo del percolatore è stato utilizzato per la stima del tasso di scoperta falsa e sono state accettate solo identificazioni peptidiche di grado 1 di alta confidenza (frequenza di scoperta falsa < 1%).



Analisi del sequenziamento RNA

Le librerie di sequenziamento dell'RNA (RNA-seq) sono state preparate da 1 μ g di mRNA IVT utilizzando il kit NextFlex Rapid Directional RNA-seq 2.0 (PerkinElmer), secondo il protocollo del produttore. Le librerie sono state amplificate da sei cicli PCR e purificate da PAGE. Il sequenziamento è stato effettuato utilizzando un MiSeq Illumina presso la struttura di sequenziamento del DNA del Dipartimento di Biochimica, Università di Cambridge (1 \times 150 cicli V3). Le letture sono state allineate con STAR (versione 2.7.4a)³⁷. Gli inserimenti e le delezioni per nucleotide di riferimento sono stati mappati da letture di alta qualità (punteggio QC > 35) filtrati per allineamenti parziali e normalizzati alla profondità di lettura. I grafici di inserimento o delezione mostrano la frequenza media di mutazione per $n = 3$ esperimenti RNA-seq replicati.

Autoradiografia SDS-PAGE

Gli mRNA IVT sono stati tradotti in RRL (Promega) trattati con nucleasi e i prodotti sono stati etichettati co-traduzionale come descritto sopra per 30 minuti. 2× il buffer LDS PAGE è stato miscelato ad ogni campione, che è stato riscaldato a 70 °C per 10 minuti. I campioni raffreddati sono stati risolti su NuPAGE 12%, Bis-Tris, 1,0 mm, Mini Protein Gels (Invitrogen NP0342BOX). I gel risolti sono stati fissati in metanolo al 10% in acido acetico per 45 minuti e asciugati a 80 °C per 2 ore utilizzando un sistema di essiccazione in gel Fisher. Le immagini sono state ottenute mediante autoradiografia utilizzando un Typhoon FLA 9000 e schermi di fosforo di stoccaggio (GE Healthcare).

Quantificazione incorporata [³⁵S]metionina

Gli mRNA IVT sono stati tradotti in RRL trattato con nucleasi (Promega) e i prodotti sono stati etichettati co-traduzionale per 2 ore, come descritto sopra. L'incorporazione di [³⁵S]metionina è stata saggiata secondo il protocollo del produttore. In breve, dopo la digestione dell'RNA, le reazioni sono state incubate per 10 minuti in 1 M NaOH. I polipeptidi sono stati precipitati nel 5% di TCA, raccolti su filtri in fibra di vetro Whatman e lavati tre volte con il 5% di TCA e una volta con acetone. I filtri essiccati sono stati immersi in un cocktail di scintillazione liquida EcoScint da 2 ml (National Diagnostics) e contati in un contatore di scintillazione liquida Tri-Carb 4910 TR (PerkinElmer). La [³⁵S]metionina incorporata è stata determinata da cpm di polipeptidi precipitati per conteggi al minuto di filtri non lavati per ogni reazione (conteggi totali al minuto).

Immunizzazione dei topi

I topi C57BL/6J (femmina, WT) sono stati acquistati dai Charles Rivers Laboratories. I topi di 8-12 settimane sono stati iniettati per via intramuscolare con tre dosi di 10 µg BNT162b2, 5×10^7 unità infettive di ChAdOx1 nCoV-19 o non trattate. Per le vaccinazioni di richiamo, la stessa dose del rispettivo vaccino è stata iniettata a 3 settimane e 6 settimane di distanza nello stesso sito dell'immunizzazione primaria. Le milza sono state ottenute al giorno 8 dopo la terza dose e sono state preparate sospensioni cellulari. In breve, le milza sono state schiacciate con un tuffo di siringa e filtrate attraverso filtri cellulari da 70 µm. I globuli rossi sono stati lisati con un tampone di lisi dei globuli rossi (155 mM NH₄Cl, 12 mM NaHCO₃, 0,1 mM EDTA), prima del conteggio e della crioconservazione prima dei test ELISpot. I topi non sono stati assegnati in modo casuale ai gruppi e gli sperimentatori non sono stati accecati agli esperimenti.

IFN γ ELISpot

I saggi IFN γ ELISpot umani sono stati eseguiti come descritto in precedenza utilizzando il kit IFN γ ELISpot PLUS umano (ALP; MabTech 3420-4APT)³⁸. Sono stati utilizzati pool di peptidi sovrapposti corrispondenti a: proteina spike SARS-CoV-2 in-frame (spike, 158 peptidi); regioni di spike protein S1 e S2 (S1 + S2), che sono state descritte in precedenza³⁸; proteina SARS-CoV-2 M, che è stata descritta in precedenza³⁸; e peptidi che si prevede si verifichino esclusivamente mediante la traduzione del frame +1 mRNA BNT162b2 (+1FS spike, 123 peptidi). I peptidi sono stati ottenuti da Mimotopes e sono elencati nella tabella dei dati estesi 3. I PBMC crioconservati sono stati scongelati in mezzo RPMI1640 integrato con 1% (v/v)

penicillina-streptomicina (Sigma), contenente 0,01% (v/v) di benzenasi nucleasi (Merck). I PBMC sono stati lavati e poi incubati per 1-2 ore a 37 °C, 5% di CO₂ in mezzo RPMI1640, 10% (v/v) siero AB umano e 1% (v/v) penicillina-streptomicina. Le piastre pre-rivestite IFN γ ELISpot 96-well (MabTech 3420-4APT-2) sono state lavate tre volte con PBS e poi bloccate con mezzo RPMI1640, siero AB umano al 10% (v/v) e penicillina-streptomicina all'1% (v/v) per 45 minuti. Le piscine peptidiche sovrapposte sono state placcate a 4 $\mu\text{g ml}^{-1}$, 50 μl per pozzo; il dimetilsolfossido (Sigma) è stato usato come controllo negativo alla concentrazione equivalente ai peptidi. Un totale di 200.000 cellule in 50 μl sono state aggiunte e incubate per 18-24 ore. Le cellule sono state scartate e le piastre sono state lavate con PBS 0,05% (v/v) Tween (Sigma) e incubate con l'anticorpo del rivelatore IFN γ (clone 7-B6-1, 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$) per 2-4 ore a temperatura ambiente. Le piastre lavate sono state poi incubate con l'anticorpo fosfatasi alcalina della streptavidina (1 $\mu\text{g ml}^{-1}$) per 1-2 ore. Le piastre sono state lavate e poi lo sviluppo del colore è stato effettuato utilizzando una soluzione di substrato NBT/BCIP in 1 fase. Un volume di 50 μl di NBT/BCIP filtrato è stato aggiunto a ciascun pozzo per 5 minuti a temperatura ambiente, dopo di che lo sviluppo è stato fermato con acqua fredda. I piatti sono stati asciugati a temperatura ambiente per circa 48 ore. Le macchie sono state quantificate utilizzando un AID iSpot Spectrum EliSpot Reader (AID EliSpot Software versione 7.0, Autoimmun Diagnostika). Il valore medio del conteggio spot nei pozzi di sfondo è stato sottratto da quello dei pozzi di prova e i valori sono stati espressi come SFU per milione di celle. I saggi di mouse IFN γ ELISpot sono stati eseguiti utilizzando splenociti crioconservati scongelati come sopra e incubati in mezzo RPMI1640 con il solo 10% di FBS. Le stimolazioni peptidiche e l'elaborazione a valle sono state come sopra, utilizzando il kit IFN γ ELISpot PLUS per mouse pre-rivestito (ALP; MabTech 3321-4APT-2). La figura [2b,c](#) mostra le risposte di ELISpot per $n = 8$ topi per gruppo. La figura [2d,e](#) mostra le risposte ELISpot per $n = 20$ individui vaccinati con ChAdOx1 nCoV-19 e $n = 21$ individui vaccinati con BNT162b2.

Genotipo HLA

La genotipizzazione HLA è stata condotta per $n = 40$ donatori da Histogenetics LLC (Ossining, New York). I dati HLA (Extended Data Table 1) sono stati filtrati ai geni *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-C* e sono stati troncati a livello di gruppo allele. I genotipi dei donatori per gli individui vaccinati con BNT162b2 sono stati visualizzati in una mappa di calore presenza-assenza in R (versione 4.3.0) utilizzando ggplot2 (versione 3.4.2). Le informazioni sui principali gruppi di alleli sono state riassunte e le frequenze dei singoli gruppi di alleli sono state calcolate per illustrare la composizione genetica complessiva.

Analisi statistica

Le analisi statistiche sono state eseguite in base R (versione 4.3.0) o utilizzando il pacchetto DescTools R (versione 0.99.46).

Dichiarazione etica

Gli esperimenti sugli animali sono stati autorizzati dal Ministero degli Interni del Regno Unito secondo l'Animals Scientific Procedures Act 1986 (Licenza PP6047951), e approvati e condotti in conformità con i protocolli dell'Università di Cambridge, University Biomedical Services Animal Welfare and Ethical Review Bodies committee. La raccolta e l'analisi del campione umano sono state condotte in conformità con i principi della buona pratica clinica e seguendo i protocolli

approvati della NIHR National BioResource. I campioni sono stati raccolti con il consenso informato scritto di tutti i partecipanti allo studio nell'ambito dell'etica NIHR National BioResource-Research Tissue Bank (comitato etico di ricerca (REC): 17/EE/0025) e dallo studio PITCH. PITCH è un sottostudio dello studio SIREN, che è stato approvato dalla Berkshire REC, Health Research 250 Authority (IRAS ID 284460, REC riferimento 20/SC/0230), con PITCH riconosciuto come sottostudio il 2 dicembre 2020. SIREN è registrato presso ISRCTN (ID di prova: 252 ISRCTN11041050). Alcuni partecipanti sono stati reclutati secondo protocolli di studio allineati. A Liverpool, alcuni partecipanti sono stati reclutati nell'ambito dello studio Risposte immunitarie umane alle infezioni virali acute (16/NW/0170), approvato da North West - Liverpool Central REC l'8 marzo 2016 e modificato il 14 settembre 2020 e il 4 maggio 2021. A Oxford, i partecipanti sono stati reclutati nell'ambito del GI Biobank Study 16/YH/0247, approvato dal REC presso Yorkshire & The Humber - Sheffield REC il 29 luglio 2016, che è stato modificato a tal fine l'8 giugno 2020. Lo studio è stato condotto in conformità con tutte le normative etiche pertinenti per il lavoro con i partecipanti umani e secondo i principi della Dichiarazione di Helsinki (2008) e delle linee guida della Conferenza internazionale sull'armonizzazione delle buone pratiche cliniche. Il consenso informato scritto per la pubblicazione di dati clinici e genetici, nonché per la partecipazione allo studio, è stato ottenuto per tutti i partecipanti iscritti allo studio.

Riepilogo report

Ulteriori informazioni sulla progettazione della ricerca sono disponibili nel [Nature Portfolio Reporting Summary](#) collegato a questo articolo.

Disponibilità dei dati

I dati della spettrometria di massa sono stati depositati con MassIVE ID [MSV000093074](#). Le letture e i file elaborati RNA-seq sono disponibili presso l'NCBI Gene Expression Omnibus (adesione [GSE223044](#)). Ulteriori dati sono disponibili da figshare (<https://doi.org/10.6084/m9.figshare.24271744>). Per l'analisi della spettrometria di massa sono state utilizzate le seguenti accessioni: [UP000001811](#) e [P08659](#) (UniProt). [I dati di origine](#) sono forniti con questo documento.

Disponibilità del codice

Gli script per l'elaborazione degli allineamenti sono disponibili su GitHub³⁹.

Pdf by:
<https://www.pro-memoria.info>

Riferimenti

1. Hogan, M. J. & Pardi, N. vaccini mRNA nella pandemia di COVID-19 e oltre. *Annu. Rev. Med.* **73**, 17–39 (2022).
 2. Chaudhary, N., Weissman, D. & Whitehead, K. A. Vaccini mRNA per le malattie infettive: principi, consegna e traduzione clinica. *Nat. Rev. Drug Discov.* **20**, 817–838 (2021).
 3. Anderson, B. R. et al. L'incorporazione di pseudouridina nell'mRNA migliora la traduzione diminuendo l'attivazione della PKR. *Acidi Nucleici Res.* **38**, 5884–5892 (2010).
-

4. Holtkamp, S. et al. La modifica dell'RNA che codifica l'antigene aumenta la stabilità, l'efficacia traslazionale e la capacità stimolante delle cellule T delle cellule dendritiche. *Blood* **108**, 4009–4017 (2006).

5. Andries, O. et al. L'mRNA incorporato nella pseudouridina N1-metilpseudoridina supera l'mRNA incorporato nella pseudouridina fornendo una maggiore espressione proteica e una ridotta immunogenicità nelle linee cellulari di mammifero e nei topi. *J. Controllo. Rilascio* **217**, 337–344 (2015).

6. Boo, S. H. & Kim, Y. K. Il ruolo emergente delle modifiche dell'RNA nella regolazione della stabilità dell'mRNA. *Exp. Mol. Med.* **52**, 400–408 (2020).

7. Squires, J. E. et al. Presenza diffusa di 5-metilcitosina nell'RNA codificante e non codificante umano. *Acidi Nucleici Res.* **40**, 5023-5033 (2012).

8. Argoudelis, A. D. & Mizesak, S. A. 1-metilpseudoridina, un metabolita di *Streptomyces platensis*. *J. Antibiot.* **29**, 818-823 (1976).

9. Pang, H. et al. Struttura di un nucleoside modificato nel tRNA arcoetbatterico che sostituisce la ribosiltimina. 1-Methylpseudouridine. *J. Biol. Chimica.* **257**, 3589–3592 (1982).

10. Marchio, R. C., Klootwijk, J., Planta, R. J. & Maden, B. E. Biosintesi di un nucleotide ipermodificato in *Saccharomyces carlsbergensis* 17S e nell'acido ribonucleico ribosomico HeLa-cell 18S. *Biochem. J.* **169**, 71-77 (1978).

11. Li, B., Luo, X. & Dong, Y. Effetti dell'RNA messaggero chimicamente modificato sull'espressione proteica. *Bioconiugato Chem.* 27, 849-853 (2016).

12. Zangi, L. et al. L'mRNA modificato dirige il destino delle cellule progenitrici cardiache e induce la rigenerazione vascolare dopo l'infarto miocardico. *Nat. Biotecnologico.* 31, 898–907 (2013).

13. Stadler, C. R. et al. Eliminazione di tumori di grandi dimensioni nei topi mediante anticorpi bispecifici codificati con mRNA. *Nat. Med.* 23, 815–817 (2017).

14. Pardi, N. et al. L'immunizzazione mRNA modificata con nucleosidici suscita anticorpi specifici del gambo dell'emoagglutinina del virus dell'influenza. *Nat. Comune.* 9, 3361 (2018).

15. Licht, K. et al. L'insina induce il ricodifica dipendente dal contesto e lo stallo traslazionale. *Acidi Nucleici Res.* 47, 3–14 (2019).

16. Hoernes, T. P. et al. Le modifiche dei nucleotidi all'interno degli RNA messaggeri batterici regolano la loro traduzione e sono in grado di ricablare il codice genetico. *Acidi Nucleici Res.* 44, 852–862 (2016).

17. Karijolich, J. & Yu, Y. T. Convertire i codoni senza senso in codoni sensoriali mediante pseudouridilazione mirata. *Natura* 474, 395–398 (2011).

18. Eyler, D. E. et al. La pseudouridinylazione delle sequenze di codifica dell'mRNA altera la traduzione. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **116**, 23068–23074 (2019).

19. Kim, K. Q. et al. La N1-metilpseudoridina trovata all'interno dei vaccini mRNA COVID-19 produce prodotti proteici fedeli. *Rep. cella* **40**, 111300 (2022).

20. Svitkin, Y. V. et al. N1-metil-pseudoridina nell'mRNA migliora la traduzione attraverso meccanismi eIF2 α -dipendenti e indipendenti aumentando la densità del ribosoma. *Acidi Nucleici Res.* **45**, 6023–6036 (2017).

21. Bartok, O. et al. L'immunità antitumorale induce una presentazione peptidica aberrante nel melanoma. *Natura* **590**, 332–337 (2021).

22. Folegatti, P. M. et al. Sicurezza e immunogenicità del vaccino ChAdOx1 nCoV-19 contro la SARS-CoV-2: una relazione preliminare di uno studio controllato di fase 1/2, in singolo cieco, randomizzato. *Lancet* **396**, 467–478 (2020).

23. Bhatt, P. R. et al. Base strutturale del frameshifting ribosomiale durante la traduzione del genoma dell'RNA SARS-CoV-2. *Scienza* **372**, 1306–1313 (2021).

24. Champagne, J., Mordente, K., Nagel, R. & Agami, R. Traduzione Slippy-Sloppy: una storia di frameshifting programmato e indotto-ribosomiale. *Tendenze Genet.* **38**, 1123–1133 (2022).

25. Chen, T. H., Potapov, V., Dai, N., Ong, J. L. & Roy, B. *La N1-metil-pseudouridina è incorporata con maggiore fedeltà rispetto alla pseudouridina negli RNA sintetici. Sci. Rep.* **12**, 13017 (2022).
-
26. Simms, C. L., Yan, L. L., Qiu, J. K. & Zaher, H. S. Le collisioni ribosomiche provocano +1 frameshifting in assenza di decadimento no-go. *Cell Rep.* **28**, 1679–1689 (2019).
-
27. Juszkiwicz, S. & Hegde, R. S. L'avvio del controllo di qualità durante la traduzione di poli(A) richiede l'ubiquitinazione del ribosoma specifica del sito. *Mol. Cellula* **65**, 743–750 (2017).
-
28. O'Connor, M. Lo squilibrio degli isoaccettori tRNA(Pro) induce +1 frameshifting ai codoni quasi-cognati. *Acidi Nucleici Res.* **30**, 759–765 (2002).
-
29. Stoneley, M. et al. I complessi ribosomi in stallo irrisolti limitano la progressione del ciclo cellulare dopo lo stress genotossico. *Mol. Cellula* **82**, 1557–1572 (2022).
-
30. Lareau, L. F., Hite, D. H., Hogan, G. J. & Brown, P. O. Fasi distinte del ciclo di allungamento della traslazione rivelate dal sequenziamento di frammenti di mRNA protetti dai ribosomi. *Elife* **3**, e01257 (2014).
-
31. Prokhorova, I. et al. Interazioni aminoglicosidi e impatti sul ribosoma eucariotico. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **114**, E10899–E10908 (2017).
-

32. Tuite, M. F. e McLaughlin, C. S. Gli effetti della paromomicina sulla fedeltà della traduzione in un sistema privo di cellule di lievito. *Biochim. Biofisica. Acta* **783**, 166–170 (1984).
-
33. Jacks, T., Madhani, H. D., Masiarz, F. R. & Varmus, H. E. Segnali per il frameshift ribosomiale nella regione gag-pol del virus del sarcoma di Rous. *Cellula* **55**, 447–458 (1988).
-
34. Devaraj, A. & Fredrick, K. La breve spaziatura tra la sequenza Shine-Dalgarno e il codone P destabilizza l'accoppiamento codon-anticodone nel sito P per promuovere il frameshifting programmato +1. *Mol. Microbiol.* **78**, 1500–1509 (2010).
-
35. Svitkin Y. V. & Sonenberg N. in *mRNA Processing and Metabolism* Vol. 257 (eds Schoenberg, D. R.) 155-170 (Humana, 2004).
-
36. Rosenfeld, J., Capdevielle, J., Guillemot, J. C. & Ferrara, P. Digestione in gel delle proteine per l'analisi della sequenza interna dopo elettroforesi su gel uni o duedimensionale. *Anale. Biochem.* **203**, 173-179 (1992).
-
37. Dobin, A. et al. STAR: allineante universale RNA-seq ultraveloce. *Bioinformatica* **29**, 15-21 (2013).
-
38. Payne, R. P. et al. Immunogenicità degli intervalli di dosaggio standard ed estesi del vaccino mRNA BNT162b2. *Cellula* **184**, 5699–5714 (2021).
-

39. Mulroney, T. E. RNA-seq_mutazioni. GitHub https://github.com/tom-mulroney/rna-seq_mutations (consultato il 23 gennaio 2023).

Ringraziamenti

A.E.W. e T.P. sono supportati dal Medical Research Council, numero di sovvenzione MC_UU_00025/7(A.E.W.). J.C.Y.-P., E.H., A.P.F. e J.E.D.T. sono supportati dal Medical Research Council (RG95376 e MC_UU_00025/12). T.E.M. è stato sostenuto finanziariamente dalla Integrative Toxicology Training Partnership. T.E.M., M.R., T.V.d.H., C.M.S., J.E.D.T., K.S.L. e A.E.W. riconoscono i finanziamenti di Wellcome Leap come parte del programma R3. PITCH è stato finanziato dal Dipartimento della Salute e dell'Assistenza Sociale del Regno Unito e dall'UKRI (MR/W02067X/1 e MR/X009297/1), con contributi di UKRI/NIHR attraverso il UK Coronavirus Immunology Consortium (UK-CIC), la Huo Family Foundation e il National Institute for Health Research (COV19-RECPLAS). A Liverpool PITCH è un sottostudio dello studio SIREN di UKHSA. P.K. è un investigatore senior NIHR ed è finanziato da WT109965MA. S.J.D. è finanziato da una NIHR Global Research Professorship (NIHR300791). L.T. è supportato dal Wellcome Trust (numero di sovvenzione 205228/Z/16/Z), dal National Institute for Health Research Health Protection Research Unit (NIHR HPRU) in Emerging and Zoonotic Infections (EZI) (NIHR200907) e dal Centre of Excellence in Infectious Diseases Research (CEIDR) e dall'Alder Hey Charity. Questa ricerca è stata sostenuta dal NIHR Cambridge Biomedical Research Centre (NIHR203312). Le opinioni espresse sono quelle degli autori e non necessariamente quelle del NIHR o del Dipartimento della Salute e dell'Assistenza Sociale. Gli autori ringraziano l'MRC Toxicology Unit Proteomics Facility per l'assistenza con l'analisi della spettrometria di massa e A. Chong e D. Launer per assistenza con l'estrazione del DNA e la tipizzazione HLA.

Informazioni sull'autore

Questi autori hanno contribuito allo stesso modo: James E. D. Thaventhiran, Anne E. Willis

Autori e affiliazioni

Unità di tossicologia MRC, Università di Cambridge, Cambridge, Regno Unito

Thomas E. Mulroney, Tuija Pöyry, Juan Carlos Yam-Puc, Maria Rust, Robert F. Harvey, Lajos Kalmar, Emily Horner, Lucy Booth, Alexander P. Ferreira, Mark Stoneley, Ritwick Sawarkar, James E. D. Thaventhiran e Anne E. Willis

Wellcome Centre for Human Genetics, Università di Oxford, Oxford, Regno Unito

Alexander J. Mentzer

Dipartimento di Biochimica, Università di Cambridge, Cambridge, Regno Unito

Kathryn S. Lilley

Scuola di Bioscienze, Divisione di Scienze Naturali, Università del Kent, Canterbury, Regno Unito

C. Mark Smales e Tobias von der Haar

Istituto nazionale per la ricerca e la formazione sul bioprocessing, University College Dublin, Foster Avenue, Mount Merrion, Dublino, Irlanda

C. Mark Smales

Unità di ricerca sulla protezione della salute NIHR per le infezioni emergenti e zoonotiche, Istituto di infezioni, scienze veterinarie ed ecologiche, Università di Liverpool, Liverpool, Regno Unito

Tartaruga lancia

NIHR Oxford Biomedical Research Centre, Oxford University Hospitals NHS Foundation Trust, Oxford, Regno Unito

Susanna Dunachie e Paul Klenerman

NDM Centre for Global Health Research, Dipartimento di Medicina di Nuffield, Università di Oxford, Oxford, Regno Unito

Susanna Dunachie

Unità di ricerca in medicina tropicale Mahidol-Oxford, Università Mahidol, Bangkok, Thailandia

Susanna Dunachie

Unità di gastroenterologia traslazionale, Dipartimento di Medicina di Nuffield, Università di Oxford, Oxford, Regno Unito

Paul Klenerman

Contributi

Concettualizzazione: T.E.M., J.E.D.T. e A.E.W.; metodologia: T.E.M., T.P., M.S., E.H., A.J.M. e J.C.Y.-P.; indagine: T.E.M. (Fici. [1–4](#) e Figure dei dati estesi. [1–6](#)), T.P. (Fici. [1](#) e

4), J.C.Y.-P. (Fig. [2b,c](#)), M.R. (Fig. [2b,c](#)), L.B. (Fig. [2e,f](#)), A.P.F. (Fig. [2e,f](#)), R.F.H. (Fig. [2b,c](#)) e L.K. (Fig. [3](#), Extended Data Figs. [2](#) e [3](#) e Extended Data Table [2](#)); scrittura (Bozza originale): T.E.M., A.E.W. e J.E.D.T.; risorse: L.T., P.K. e S.D.; curazione dei dati: T.E.M., J.E.D.T. e S.D.; scrittura (revisione e modifica): T.E.M., A.E.W., J.E.D.T., T.P., M.S., P.K., S.D., C.M., T.V.d., K.S.L.L., A.J.M. e R.S.; visualizzazione: T.E.M., L.K. e J.E.D.T.; supervisione: A.W.

Autori corrispondenti

Corrispondenza con [James E. D. Thaventhiran](#) o [Anne E. Willis](#).

Dichiarazioni etiche

Interessi concorrenti

T.E.M. e A.E.W. sono inventori su una domanda di brevetto in sospeso (2305297.0) relativa alla tecnologia mRNA.

Revisione tra pari

Pdf by:
<https://www.pro-memoria.info>

Informazioni sulla revisione tra pari

La natura ringrazia David Weiner e gli altri revisori anonimi per il loro contributo alla revisione tra pari di questo lavoro.

Informazioni aggiuntive

Nota dell'editore Springer Nature rimane neutrale per quanto riguarda le rivendicazioni giurisdizionali nelle mappe pubblicate e nelle affiliazioni istituzionali.

Figure e tabelle di dati estese

Dati estesi Fig. 1 Convalida degli mRNA WT Fluc, Fluc + 1FS e Fluc-1FS.

a, fotografia UV delle trascrizioni di mRNA WTFluc e Fluc+1FS analizzate mediante elettroforesi su gel di agarosio. **b**, Immunoblot della proteina luciferasi prodotta dalla traduzione di mRNA WTFluc e Fluc+1FS utilizzando anticorpi anti-FLAG. **c**, Espressione relativa della luciferasi prodotta dalla traduzione degli mRNA WTFluc e Fluc+1FS. I dati sono stati ottenuti da analisi $n = 1$ (non replicate). Per i dati sulla fonte del gel, vedere la Fig. [6](#).

Dati estesi Fig. 2 Visualizzazione dei genotipi HLA in individui vaccinati con BNT162b2.

Principali gruppi alleli nei geni HLA-A, -B e -C per $n = 40$ donatori. L'ID del campione contiene 3 campi separati dalla sottolineatura: (i) 1 o 0, con 1 che denota un conteggio ELISpot >40 dopo la stimolazione con il pool di peptidi +1 FS; (ii) identificatore del donatore; (iii) conteggio ELISpot se >40 . SFU/milione. Frequenza del gruppo allele indicata da tessera nera, linee tratteggiate verticali: geni HLA, linea tratteggiata orizzontale: indica il cut-off (conteggio ELISpot >40).

Dati estesi Fig. 3 distribuzioni di frequenza allele HLA.

Frequenze di ciascun gruppo allele principale nei geni HLA-A, -B e -C per $n = 40$ donatori.

Dati estesi Fig. 4 allineamento NCBI BLASTP di +1 prodotti tradotti.

Allineamento BLAST proteico dei polipeptidi previsto dalla traduzione del frame +1 dell'mRNA BNT162b2 o dell'mRNA Wuhan SARS-CoV-2 Spike (da [NC_045512.2](#)).

Dati estesi Fig. 5 La traslazione dell'mRNA Fluc modificato con 1-metil Ψ produce polipeptidi multipli.

a, Diagramma dell'mRNA NFLAG-WTFluc. **b**, analisi Western blot (epitopo anti-FLAG) di polipeptidi prodotti dalla traduzione di mRNA NFLAG-WTFluc non

modificato o 1-metil Ψ . La luciferasi della lucciola in-frame è indicata dalla freccia. I polipeptidi a basso peso molecolare sono indicati da un asterisco (*). Viene visualizzato un singolo blot da $n = 3$ esperimenti replicati. Per i dati sulla fonte del gel, vedere la Fig. [7](#).

Dati estesi Fig. 6 BNT162b2 annotato Spike mRNA CDS siti putative scivolosi.

Siti scivolosi del ribosoma putativo in BNT162b2 che sono stati identificati con la seguente formula: m1 Ψ m1 Ψ m1 Ψ X, dove m1 Ψ è (N)1-metilpseudoridina e X è (N)1-metilpseudoridina o citidina nel primo nucleotide del codone immediatamente a valle.

Tabella dei dati estesi 1 Analisi LC-MS/MS del polipeptide ad alto peso molecolare Fluc + 1FS

Tabella dei dati estesi 2 Frequenze di inserimento e cancellazione in mRNA non modificati e 1-metil Ψ

Tabella dei dati estesa 3 peptidi Spike e + 1FS Spike

Informazioni supplementari

Dati supplementari

Fig. supplementari 1-7, che mostrano sequenze di RNA reporter e pellicole non ritagliate/fotografie in gel/scansioni autoradiografiche.

[Riepilogo report](#)

[Tabella supplementare 1](#)

Età del partecipante, sesso, genotipo HLA, modalità del vaccino e risposta al picco ELISpot +1FS.

Dati di origine

[Dati di origine Fig. 2](#)

Diritti e autorizzazioni

Open Access Questo articolo è concesso in licenza sotto una licenza internazionale Creative Commons Attribution 4.0, che consente l'uso, la condivisione, l'adattamento, la distribuzione e la riproduzione su qualsiasi supporto o formato, purché si dia il credito appropriato agli autori originali e alla fonte, fornisca un link alla licenza Creative Commons e indichi se sono state apportate modifiche. Le immagini o altro materiale di terze parti in questo articolo sono inclusi nella licenza Creative Commons dell'articolo, se non diversamente indicato in una linea di credito al materiale. Se il materiale non è incluso nella licenza Creative Commons dell'articolo e l'uso previsto non è consentito dalla normativa legale o supera l'uso consentito, dovrai ottenere l'autorizzazione direttamente dal titolare del copyright. Per visualizzare una copia di questa licenza, visita <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

[Ristampe e autorizzazioni](#)

Informazioni su questo articolo

Cita questo articolo

Mulroney, T.E., Pöyry, T., Yam-Puc, J.C. *et al.* La N1-metilpseudoidrilazione dell'mRNA provoca +1 frameshift ribosomiale. *Natura* (2023). <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06800-3>

Ricevuto

25 gennaio 2023

Accettato

31 ottobre 2023

Publicato

06 dicembre 2023

DOI

<https://doi.org/10.1038/s41586-023-06800-3>

Condividi questo articolo

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

[Ottieni un link condivisibile](#)

Fornito dall'iniziativa di condivisione dei contenuti Springer Nature SharedIt

Soggetti

[Immunologia](#)

• [Biologia molecolare](#)

Natura (*natura*) | ISSN 1476-4687 (online) | ISSN 0028-0836 (stampa)