



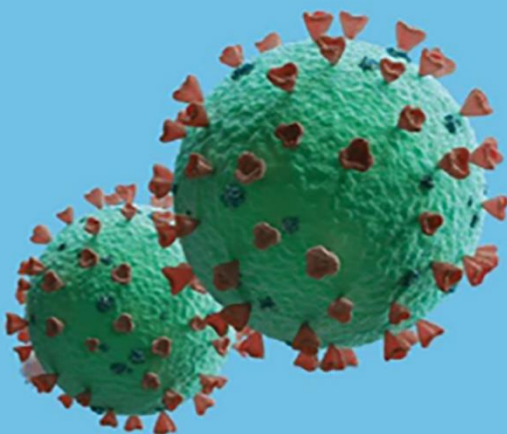
FEDERAZIONE
RINASCIMENTO
ITALIA

rinascimentoitalia.it

VACCINI COVID A VETTORE: INGEGNERIZZAZIONE E RISCHI, UNA REVISIONE SCIENTIFICA.

DR.SSA LORETTA BOLGAN

Dottore in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche
Dottorato in Scienze Farmaceutiche
Consulente Scientifico



VACCINI A VETTORE ADENOVIRALE

SOMMARIO

VACCINI A VETTORE VIRALE	3
Non replicanti	3
Replicanti	4
APPROFONDIMENTO	6
La regolazione dell'espressione genica	6
Sintesi dell'mRNA dei coronavirus	18
Virus a replicazione difettiva	27
Meccanismo d'azione	27
Produzione.....	27
Profilo di sicurezza	28
Vettori virali competenti per la replicazione	29
Meccanismo d'azione	29
Produzione.....	29
Profilo di sicurezza	29
Meccanismi dell'immunogenicità dei vaccini a vettore virale	30
I vaccini a vettori virali sono autoadiuvanti	30
Particelle virali e attivazione delle cellule T citotossiche	34
La stabilità dei vaccini a vettori virali: strategie di conservazione	40
Criticità' e limitazioni dei vaccini a vettori virali	41
Immunità anti-vettore.....	41
Complessità di produzione	45
Caratteristiche dei vettori adenovirali	46
Biologia molecolare e ciclo replicativo degli adenovirus	47
APPROFONDIMENTO	56
CONFRONTO TRA INFEZIONE ACUTA E INFEZIONE CRONICA	56
<i>Virus persistenti: vecchi nemici e nuovi passeggeri</i>	59
<i>Tipi di infezione virale cronica</i>	65
<i>Strategie virali per l'infezione cronica</i>	78
<i>La formazione del viroplasma e l'aggregazione proteica come meccanismi di evasione immunitaria</i>	86
<i>Meccanismi che regolano l'immunità durante le infezioni croniche</i>	107
<i>Ridefinire l'infezione virale cronica</i>	124
CICLO VITALE DELL'ADENOVIRUS: CICLO LITICO VERSO FASE LATENTE O DI PERSISTENZA VIRALE	130
Risposte immunitarie agli antigeni adenovirali.....	134
Difesa dell'ospite contro l'entrata dell'adenovirus e la perdita del rivestimento	135
Ingresso nelle cellule immunitarie.....	143
ingegnerizzazione dei Vettori adenovirali	155
APPROFONDIMENTO	155
FATTORI LIMITANTI AL TRASFERIMENTO GENICO	155

Barriere cellulari al trasferimento genico	155
Endocitosi	155
Fuoriuscita dal compartimento vescicolare.....	157
Indirizzamento al nucleo	158
STRUTTURA DEI VETTORI ADENOVIRALI	158
PRODUZIONE DEI VETTORI ADENOVIRALI.....	160
Produzione dei vettori di prima e seconda generazione.....	161
Produzione dei vettori adenovirali gutless	163
Schema riassuntivo dei metodi di produzione	165
Purificazione e caratterizzazione dei vettori adenovirali	166
Proprietà dei vettori adenovirali.....	166
VETTORI ADENOVIRALI PER LA PRODUZIONE DI VACCINI CONTRO IL SARS-COV-2.....	167
Principi di produzione dei vettori adenovirali utilizzati come vaccini	169
Costruzione dei vettori adenovirali ad uso vaccinale.....	174
VETTORI ADENOVIRALI UTILIZZATI NEI VACCINI CONTRO IL SARS-COV-2	176
Janssen/Johnson & Johnson (Ad26.COV2-S)	177
Sputnik V (gam-COVID-vac).....	177
ReiThera/LEUKOCARE/Univercells (GRAd-COV2)	178
Oxford/AstraZeneca (ChadOX1-nCoV)	178
REAZIONI AVVERSE.....	180
Trombocitopenia Indotta Da Vaccino (VIT)	180
Vettori adenovirali e rischio di riattivazione dell'HIV	192
Integrazione cromosomica dei vettori adenovirali	197
Persistenza del vettore adenovirale	207
LIMITAZIONI DEI VETTORI VIRALI USATI PER I VACCINI CONTRO IL SARS-COV-2.....	211
Meccanismo d'azione dei vaccini COVID-19 a vettore adenovirale.....	214
Valutazione del rischio ambientale dei vaccini a vettore adenovirale contro SARS-Cov-2	221

VACCINI A VETTORE VIRALE

I vaccini a vettore sono virus chimerici generati in laboratorio che si basano su vettori di virus replicanti ("vivi") o non replicanti ("difettosi"), in cui sono stati uniti geni che esprimono proteine antigeniche per un agente patogeno bersaglio.¹ I vaccini a vettore virale COVID-19 già autorizzati utilizzano vettori virali non replicanti.

Per "replicante" s'intende la capacità di un vettore virale di formare una progenie infettiva e quindi stabilire un'infezione che si propaga nelle cellule del vaccinato, mentre la sola capacità di esprimere geni virali e amplificare il genoma virale a livello intracellulare qualifica il vettore come "a replicazione difettiva" o "non replicante".²

I vettori virali, sia competenti per la replicazione che difettosi, sono particelle virali che possono infettare o trasdurre le cellule bersaglio in un vaccinato per fornire ed esprimere le proprie informazioni genetiche. Mentre il termine "infezione" richiede che la replicazione virale avvenga all'interno di una cellula bersaglio, la semplice introduzione di informazioni genetiche viene definita "trasduzione" (o infezione abortiva).² Di conseguenza, i vettori virali che infettano o trasducono cellule bersaglio appartengono entrambi alla categoria dei "vaccini genetici".

Vaccini in corso di sperimentazione clinica (draft landscape WHO 26.04.2022)³

Non replicanti

- ChAdOx1-S - (AZD1222) (Covishield; chimpanzee Ad-S) / AstraZeneca + University of Oxford
- Ad26.COVS.2.S / Janssen Pharmaceutical
- Sputnik V⁴ / The Gamaleya Center – Russia

¹ Viral Vectors in Veterinary Vaccine Development: A Textbook

Thiru Vanniasinkam, Suresh K. Tikoo, Siba K. Samal

2021 Edition: 1st ed. Publisher: Springer International Publishing; Springer Pages: 232 ISBN 13: 9783030519278

<https://cellculturedish.com/upstream-manufacturing-gene-therapy-viral-vectors-2/>

<https://cellculturedish.com/upstream-manufacturing-gene-therapy-viral-vectors/>

Pushparajah D, Jimenez S, Wong S, Alattas H, Nafissi N, Slavcev RA.

Advances in gene-based vaccine platforms to address the COVID-19 pandemic

[published online ahead of print, 2021 Jan 7]. Adv Drug Deliv Rev. 2021;170:113-141. doi:10.1016/j.addr.2021.01.003

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7789827/>

Ewer KJ, Lambe T, Rollier CS, Spencer AJ, Hill AV, Dorrell L.

Viral vectors as vaccine platforms: from immunogenicity to impact.

Curr Opin Immunol. 2016 Aug;41:47-54. doi: 10.1016/j.coi.2016.05.014. Epub 2016 Jun 7. PMID: 27286566.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27286566/>

Viral vector-based vaccine; DNA-based vaccine; RNA based vaccine

- A landscape for vaccine technology against infectious disease, COVID-19 and tumor.

<https://www.genemedi.net/i/vaccines-review>

² Pinschewer DD.

Virally vectored vaccine delivery: medical needs, mechanisms, advantages and challenges.

Swiss Med Wkly. 2017 Aug 8;147:w14465. doi: 10.4414/sm.w.2017.14465.

<https://smw.ch/article/doi/sm.w.2017.14465>

https://smw.ch/journalfile/download/article/ezm_smw/en/sm.w.2017.14465/e3601a3230708b0a70e71bf64e46a676b0eef9ed/sm.w_2017_14465.pdf/rsr/c/jf

³ <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>

⁴ <https://sputnikvaccine.com/about-vaccine/>

- CanSino Ad5-nCoV - Recombinant novel coronavirus vaccine (Adenovirus type 5 vector) / *CanSino Biological Inc./Beijing Institute of Biotechnology*
- Gam-COVID-Vac Adeno-based (rAd26-S+rAd5-S) / *Gamaleya Research Institute ; Health Ministry of the Russian Federation*
- GRAd-COV2 (Replication defective Simian Adenovirus (GRAd) encoding S) / *ReiThera + Leukocare + Univercells*
- VXA-CoV2-1 Ad5 adjuvanted Oral Vaccine platform / *Vaxart*
- MVA-SARS-2-S / *University of Munich (Ludwig-Maximilians)*
- hAd5-S-Fusion+N-ETSD vaccine / *ImmunityBio, Inc.*
- COH04S1 (MVA-SARS-2-S) / *City of Hope Medical Center + National Cancer Institute*
- LV-SMENP-DC vaccine. (Dendritic cells are modified with lentivirus vectors expressing Covid-19 minigene SMENP and immune modulatory genes. CTLs are activated by LV-DC presenting Covid-19 specific antigens) / *Shenzhen Geno-Immune Medical Institute*
- COH04S1 (MVA-SARS-2-S) - Modified vaccinia ankara (sMVA) platform + synthetic SARS-CoV-2 / *City of Hope Medical Center + National Cancer Institute*
- AdCLD-CoV19 (adenovirus vector) / *Cellid Co., Ltd.*
- Chimpanzee Adenovirus serotype 68 (ChAd) and self-amplifying mRNA (SAM) vectors expressing spike alone, or spike plus additional SARS-CoV-2 T cell epitopes. / *Gritstone Oncology*
- SC-Ad6-1, Adnevirial vector vaccine/ *Tetherex Pharmaceuticals Corporation*
- Modified Vaccinia Virus Ankara (MVA) vector expressing a stabilized SARS-CoV-2 spike protein/ *German Center for Infection Research*
- PIV5 vector that encodes the SARS-CoV-2 spike protein/ *CyanVac LLC*
- AZD2816; adenoviral vector ChAdOx platform and based on the Beta (B.1.351) variant/ *AstraZeneca + University of Oxford*
- AAV5-RBD-S vaccine (BCD-250), A recombinant Adenovirus-Associated viral Vector (AAV-5) encoding spike protein/ *Biocad*
- Ad5-triCoV/Mac or ChAd-triCoV/Mac, new experimental adenovirus-based vaccines expressing SARS-CoV-2 spike, nucleocapsid and RNA polymerase proteins / *McMaster University*
- MVA-SARS-2-ST Vaccine/ *Hannover Medical School*

Replicanti

- DeINS1-2019-nCoV-RBD-OPT1 (Intranasal flu-based-RBD) / *Jiangsu Provincial Center for Disease Prevention and Control*
- Covid-19/aAPC vaccine. The Covid-19/aAPC vaccine is prepared by applying lentivirus modification with immune modulatory genes and the viral minigenes to the artificial antigen presenting cells (aAPCs) / *Shenzhen Geno-Immune Medical Institute*
- rVSV-SARS-CoV-2-S Vaccine / *Israel Institute for Biological Research*
- Dendritic cell vaccine AV-COVID-19. A vaccine consisting of autologous dendritic cells loaded with antigens from SARS-CoV-2, with or without GM-CSF / *Aivita Biomedical, Inc.*
- COVIVAC. Newcastle Disease Virus (NDV) expressing membrane-anchored pre-fusion-stabilized/ *Institute of Vaccines and Medical Biologicals, Vietnam*
- NDV-HXP-S; A Live Recombinant Newcastle Disease Virus-vectored COVID-19 Vaccine/ *Sean Liu, Icahn School of Medicine at Mount Sinai*

Vaccini in corso di sperimentazione preclinica (draft landscape WHO 26.04.2022)

Vaccine platform description	Type of candidate vaccine
Viral vector (Non-replicating)	Sendai virus vector
Viral vector (Non-replicating)	Sendai virus vector
Viral vector (Non-replicating)	Adenovirus-based
Viral vector (Non-replicating)	Adeno-associated virus vector (AAVCOVID)
Viral vector (Non-replicating)	MVA encoded VLP
Viral vector (Non-replicating)	MVA-S
Viral vector (Non-replicating)	Adeno5-based
Viral vector (Non-replicating)	Ad5 S (GREVAX™ platform)
Viral vector (Non-replicating)	Oral Ad5 S
Viral vector (Non-replicating)	Adenovirus-based + HLA-matched peptides
Viral vector (Non-replicating)	MVA expressing structural proteins
Viral vector (Non-replicating)	Parainfluenza virus 5 (PIV5)-based vaccine expressing the spike protein
Viral vector (Non-replicating)	Recombinant deactivated rabies virus containing S1
Viral vector (Non-replicating)	Influenza A H1N1 vector
Viral vector (Replicating)	Newcastle disease virus expressing the spike protein
Viral vector (Non-replicating)	Newcastle disease virus expressing membrane-anchored spike
Viral vector (Non-replicating)	Lentiviral Vector
Viral vector (Non-replicating)	Lentiviral Vector
Viral vector (Non-replicating)	Lentiviral Vector Retro-VLP Particles
Viral vector (Non-replicating)	Ad 5 vector for intranasal administration
Viral vector (Non-replicating)	Oral vaccine platform
Viral vector (Non-replicating)	Recombinant Adenovirus Vector (Type 5) + Spike protein of SARS-CoV-2
Viral vector (Non-replicating)	Recombinant Adenovirus Vector (ChAdOx1) + Spike protein of SARS-CoV-2
Viral vector (Non-replicating)	Adenovirus-based
Viral vector (Non-replicating)	Chimpanzee adenovirus vector expressing the RBD-dimer without adjuvant
Viral vector (Replicating)	YF17D Vector
Viral vector (Replicating)	Measles Vector
Viral vector (Replicating)	Measles Vector
Viral vector (Replicating)	Measles Virus (S, N targets)
Viral vector (Replicating)	Horsepox vector expressing S protein
Viral vector (Replicating)	Live viral vectored vaccine based on attenuated influenza virus backbone (intranasal)
Viral vector (Replicating)	Recombinant vaccine based on Influenza A virus, for the prevention of COVID-19 (intranasal)
Viral vector (Replicating)	Attenuated Influenza expressing an antigenic portion of the Spike protein
Viral vector (Replicating)	Influenza vector expressing RBD
Viral vector (Replicating)	Replication-competent VSV chimeric virus technology (VSVΔG) delivering the SARS-CoV-2 Spike (S) glycoprotein.
Viral vector (Replicating)	Replicating VSV vector-based DC-targeting
Viral vector (Replicating)	VSV-S
Viral vector (Replicating)	VSV-S
Viral vector (Replicating)	VSV vector
Viral vector (Replicating)	M2-deficient single replication (M2SR) influenza vector
Viral vector (Replicating)	Newcastle disease virus vector (NDV-SARS-CoV-2/Spike)
Viral vector (Replicating)	Avian paramyxovirus vector (APMV)
Viral vector (Replicating)	Intranasal Newcastle disease virus vector (rNDV-LS1-FARVET) expressing RBD protein: rNDV-LS1-HN-RBD/SARS-CoV-2
Viral vector (Replicating)	Intranasal Newcastle disease virus vector (rNDV-LS1-FARVET) expressing S1 protein: rNDV-LS1-S1-F/SARS-CoV-2

APPROFONDIMENTO

Metodologie per il trasferimento genico: Vettori basati sul virus adeno-associato (AAV) pag 93

Dendritic cell-based COVID-19 vaccines: A mini review⁵

Cellule ricombinanti

APPROFONDIMENTO

LA REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA

Definizioni⁶

- **Cellula ospite** (host cell)
 - La cellula infettata dal virus
- **Cellula sensibile ad un virus**
 - La cellula che ha i recettori per quel virus
- **Cellula permissiva per un virus**
 - La cellula che permette lo svolgimento dell'intero ciclo di replicazione di quel virus

Possibili esiti dell'infezione virale

- **Infezione produttiva:** la cellula è permissiva per la replicazione virale, sono generati e rilasciati nuovi virioni
 - Morte della cellula e fine della produzione di virus
 - Sopravvivenza della cellula e persistenza della produzione di virus
- **Infezione abortiva:** la cellula non è permissiva per la replicazione virale oppure il virus è difettivo, non sono prodotti nuovi virioni
 - Possibile persistenza di (parte del) genoma virale
- **Infezione restrittiva:** la cellula è permissiva transitoriamente o solo in determinate condizioni occasionali
 - Permanenza del genoma virale (infezione latente) e possibilità di riattivazione

• **Cassetta genica**

Il transgene (nel nostro caso la proteina Spike del SARS-Cov-2 trasformato in cDNA per essere incorporato nel genoma del vettore) e gli elementi minimi richiesti per la regolazione della sua espressione (il promotore, cioè la sequenza di DNA che attiva la trascrizione, e il segnale di poliadenilazione per la terminazione della trascrizione) costituiscono insieme la cosiddetta '**cassetta d'espressione**', l'unità trascrizionale minima veicolata dal vettore.⁷

⁵ Pertwi D, Hafiz I, Nurhadi Illian D.
Dendritic cell-based COVID-19 vaccines: A mini review.
J.Res.Pharm. 2021; 25(6): 833-840. <http://dx.doi.org/10.29228/jrp.78>
https://jrespharm.com/uploads/pdf/pdf_MPJ_971.pdf

⁶ https://www.dbcf.unisi.it/sites/st13/files/allegatiparagrafo/28-04-2016/02_replica.pdf

⁷ http://unica2.unica.it/biotecnologie/index2.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=419&Itemid=218

Tratto da **Regolazione dell'espressione genica**

La regolazione genica è un processo mediante il quale una cellula decide *quali* geni devono funzionare (controllo qualitativo) e *quanto* (controllo quantitativo) funzionare (ad esempio: al 10%, 30%, 70% ...). Questo processo è alla base della differenziazione cellulare, della variabilità tissutale e dell'adattamento all'ambiente.

Differenziazione cellulare

È un processo mediante il quale cellule non specializzate (staminali) diventano specializzate, acquisendo funzioni e forme particolari.

Tutte le cellule di un organismo, pur essendo tra loro molto diverse (per forma e funzioni), hanno gli stessi geni (che nel caso dell'uomo sono circa 30.000). Questo è dovuto alla diversa regolazione genica che attiva alcuni geni (circa 5000) e ne silenzia altri (circa 25.000).

I geni attivati possono essere di 2 tipi:

- Geni costitutivi (housekeeping), che gestiscono le funzioni basali di tutte le cellule (ad esempio, la sintesi delle membrane cellulari, dell'RNA, degli istoni, etc);
- Geni regolati, cioè quei geni la cui trascrizione e traduzione è soggetta a controlli (per cui possono essere più o meno attivati o silenziati).

Variabilità tissutale

È una caratteristica in base alla quale *una stessa cellula* può assumere forma e funzioni diverse, a seconda dei tessuti in cui si trova. Per esempio, il monocita (un particolare tipo di globulo bianco) migra dal sangue verso vari tessuti (fegato, polmone, osso, cervello), assumendo in essi forme e funzioni diverse.

Adattamento all'ambiente

È un fenomeno in base al quale una stessa cellula in uno stesso tessuto può modificare il suo stato funzionale e morfologico in base alle condizioni ambientali esterne.

Per esempio, una cellula riduce l'attività di sintesi delle proteine ed attiva la respirazione anaerobica in condizioni di carenza di ossigeno e riprende la sintesi proteica e riattiva la respirazione aerobica quando l'ossigeno torna ad essere nuovamente disponibile.

<http://omero.farm.unipi.it/matdidFarm/9/Principi-BiolMol-Capitolo7.pdf>
<https://www.docenti.unina.it/webdocenti-be/allegati/materiale-didattico/34155881>

<https://www.biopills.net/regolazione-espressione-genica/>

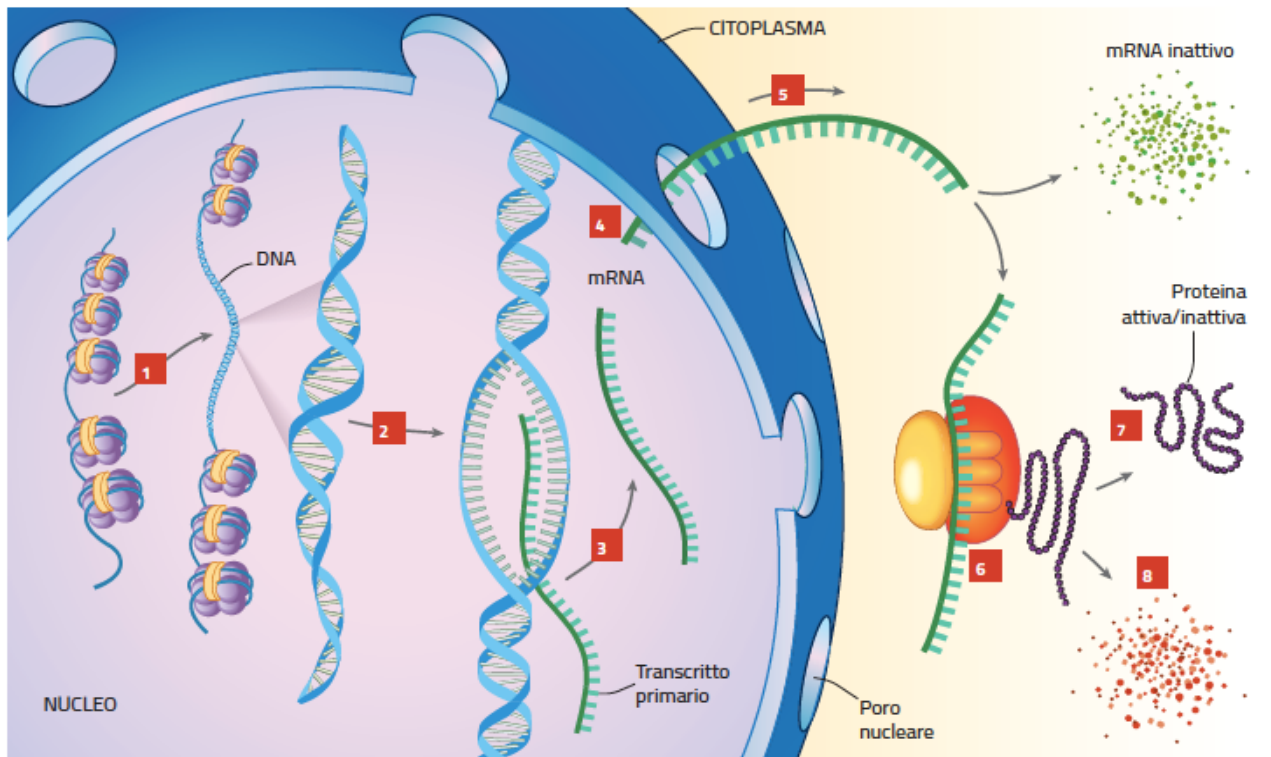
Gene Regulation in Eukaryotes
<https://www.csun.edu/~cmalone/pdf360/Ch20-1%20euk%20gene%20reg.pdf>

https://didattica-2000.archived.uniroma2.it//biolsvil/deposito/Expression_Regulation.pdf

La regolazione dell'espressione genica

Epigenetica ed espressione genica monoallelica

http://www.bgbunict.it/html/barbagallo/lezioni/strutt_gene.pdf



- | | | | |
|---|--------------------------------------|---|---|
| 1 Rimodellamento della cromatina | 3 Controllo della maturazione | 5 Controllo della stabilità dell'mRNA | 7 Controllo post-traduzionale dell'attività proteica |
| 2 Controllo trascrizione | 4 Controllo del trasporto | 6 Controllo della traduzione dell'mRNA | 8 Degradazione della proteina |

Curtis et al., *Il nuovo invito alla biologia*. blu © Zanichelli editore 2017

Regolazione genomica

La regolazione genomica comprende tutti quei processi di regolazione che intervengono sul DNA.

Modificazioni del DNA

Comprendono i processi di:

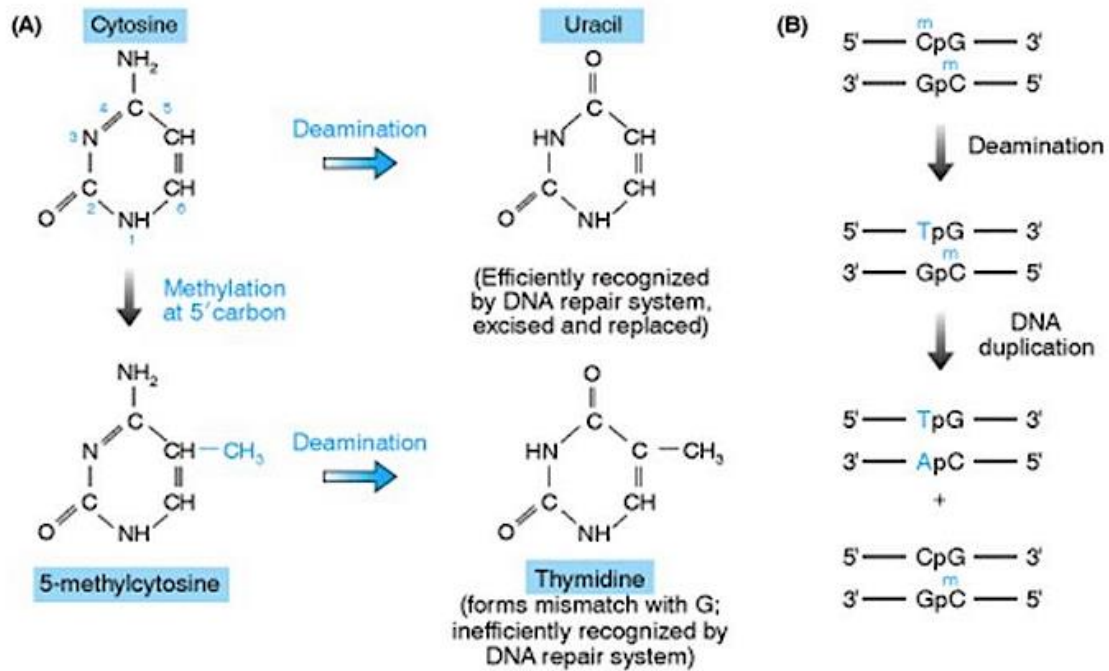
- Amplificazione genica (aumento di numero delle copie di un gene);
- Ricombinazione genica (geni o parti di essi che si combinano dando origine a trascritti e a proteine diverse);
- Delezione genica (perdita della funzione di un gene o di parte di esso);
- Inserimento di genomi virali.

Controllo pre-trascrizionale (epigenetico = a monte dei geni)

Comprende una serie di processi chimici che modificano l'accessibilità dei geni alla trascrizione e l'attività stessa dei geni.

-Metilazione del DNA

Si tratta dell'aggiunta di un gruppo metile (CH₃) al carbonio 5' di una citosina. Possono essere metilate solo le citosine che stanno vicino ad una guanina. I di-nucleotidi C-G non sono molto frequenti nel DNA, però quando presenti si trovano spesso raggruppati in cluster (grappoli) e sono chiamati *isole CpG* (Citosina-fosfato-Guanina). Queste isole si trovano per lo più in prossimità delle regioni promoter e la loro metilazione determina un blocco dei promoter e il blocco della trascrizione del gene correlato.



<https://slideplayer.it/slide/568583/>

le sequenze CpG sono sottorappresentate nel genoma (probabilmente per la tendenza della 5-metilcitosina a venire deaminata e mutata in T) ma abbondanti nelle regioni promotrici dei geni

Le sequenze di DNA che sono metilate hanno la capacità di legare alcune particolari proteine, che a loro volta richiamano l'istone-deacetilasi e l'istone-metilasi (vedi dopo).

Questi due enzimi causano un compattamento di quella determinata regione del DNA (e quindi l'impossibilità ad essere letta e trascritta).

La metilazione del DNA può essere ereditabile e reversibile ed è alla base del fenomeno dell'imprinting genico, dell'inattivazione del cromosoma X e del mosaicismo di espressione.

-L'imprinting genico è un processo che blocca la funzione di una delle due copie di un gene (quello paterno o materno).

Normalmente, la copia materna e quella paterna di un gene sono entrambe espresse; nel fenomeno dell'imprinting, una delle due copie viene metilata e quindi silenziata o inespresa.

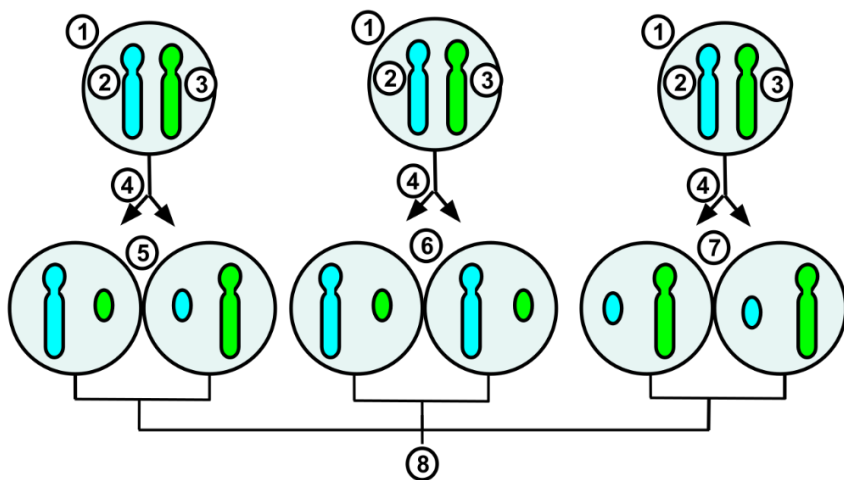
Anche nel caso del cromosoma X avviene una cosa simile, solo che non riguarda alcuni geni bensì l'intero cromosoma.

Nei mammiferi, i maschi e le femmine differiscono nei cromosomi sessuali. I maschi hanno infatti un cromosoma X e un cromosoma Y, mentre le femmine hanno due cromosomi X. Questa differenza determina un problema di regolazione dell'espressione genica; infatti, se la femmina esprimesse nello stesso modo i geni presenti su entrambe le copie del cromosoma X, le sue cellule avrebbero il doppio di questi prodotti proteici rispetto al maschio. Per risolvere questa situazione, nei mammiferi si è evoluto un meccanismo di compensazione del dosaggio, che inattivando la trascrizione di uno dei due cromosomi X presenti nelle cellule somatiche femminili (inattivazione dell'X), permette di rendere uguali nei due sessi i livelli di espressione dei geni legati a questo cromosoma. Durante il periodo della tarda blastocisti in ogni cellula di un individuo di sesso femminile viene inattivato casualmente uno dei due cromosomi X.

Di conseguenza, una parte delle cellule esprimerà i geni del cromosoma X paterno e l'altra parte esprimerà i geni del cromosoma X materno (mosaicismo di espressione).

Al momento dell'ovogenesi il cromosoma silente presente nel nucleo dell'ovocita come un ammasso di cromatina densa (corpuscolo di Barr), si riattiva affinché la cellula uovo possa avere al suo interno un cromosoma X funzionante e sia pronta per un eventuale fecondazione.

Anche nel caso della spermatogenesi il singolo cromosoma X presente come corpuscolo di Barr si riattiva affinché lo spermatozoo interessato possa avere, alla fine della meiosi, un cromosoma X funzionante o un Y.⁸



<https://hmn.wiki/it/X-inactivation>

Il processo e i possibili esiti dell'inattivazione casuale del cromosoma X nelle cellule embrionali umane femminili in fase di mitosi.

1. Cellula embrionale allo stadio iniziale di una femmina 2. Cromosoma X materno 3. Cromosoma X paterno 4.

Mitosi e evento casuale di inattivazione del cromosoma X

5. Il cromosoma paterno viene inattivato casualmente in una cellula figlia, il cromosoma materno è inattivato nell'altra 6. Il cromosoma paterno è inattivato casualmente in entrambe le cellule figlie 7. Il cromosoma materno è inattivato casualmente in entrambe le cellule figlie 8. Tre possibili combinazioni casuali di risultati

La colorazione dei gatti tartarugati e calico è una manifestazione visibile dell'inattivazione dell'X. Gli alleli neri e arancioni di un gene di colorazione della pelliccia risiedono sul cromosoma X. Per ogni dato pezzo di pelo, l'inattivazione di un cromosoma X che porta un allele determina il colore del pelo dell'altro allele attivo.

- Modifiche degli istoni.⁹

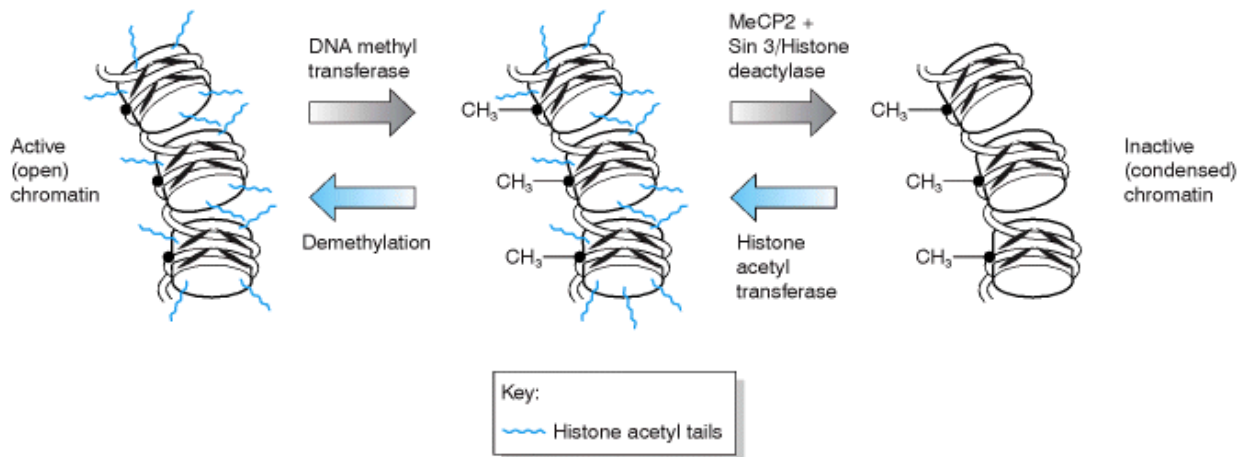
Si tratta di modifiche chimiche a carico della estremità N-terminale degli istoni. Questa estremità è formata da una sequenza di 60-70 aminoacidi e sporge al di fuori del nucleosoma (per questo motivo è chiamata anche coda). Le principali modifiche a carico di questa coda sono:

-Metilazione, che provoca una compattazione del DNA e un impedimento alla trascrizione. L'enzima responsabile della metilazione è l'*istone-metilasi*.

-Acetilazione (aggiunta del gruppo acetile CH₃CO-), che impedisce la compattazione e rende trascrivibile il DNA. L'enzima che produce l'acetilazione è l'*acetil-transferasi*; quello che elimina l'acetilazione è l'*istone-deacetilasi*.

⁸ https://www.treccani.it/enciclopedia/inattivazione-del-cromosoma-x_%28Enciclopedia-della-Scienza-e-della-Tecnica%29/

⁹ Bassett SA, Barnett MP. The role of dietary histone deacetylases (HDACs) inhibitors in health and disease. *Nutrients*. 2014;6(10):4273-4301. Published 2014 Oct 15. doi:10.3390/nu6104273 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4210916/>

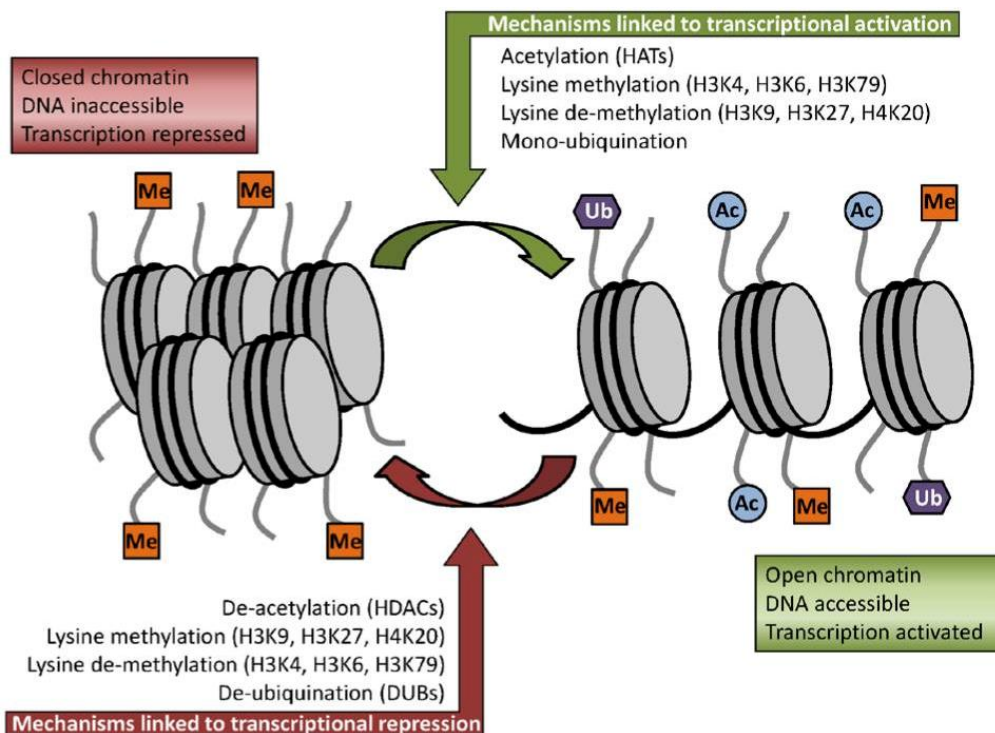


<https://www.albertovannelli.it/sites/default/files/articles/epigenetica.pdf>

-**Fosforilazione** (aggiunta di un gruppo fosfato), crea una forza repulsiva tra le cariche negative dei fosfo-istonni e quindi una decompattazione del DNA. La sua azione finale è quella di favorire la trascrizione.

-**Ubiquitinazione** (aggiunta dell'ubiquitina) favorisce, come l'acetilazione e la fosforilazione, la trascrizione dei geni.

Il controllo pre-trascrizionale è sfruttato anche dagli attivatori-repressori, nonché dagli enhancer e silencer (vedi sotto) che, attraverso modifiche dello stato di condensazione del DNA, regolano l'espressione genica spesso in un meccanismo di tipo combinatorio (in cui l'effetto finale deriva dalla somma degli effetti stimolatori ed inibitori).

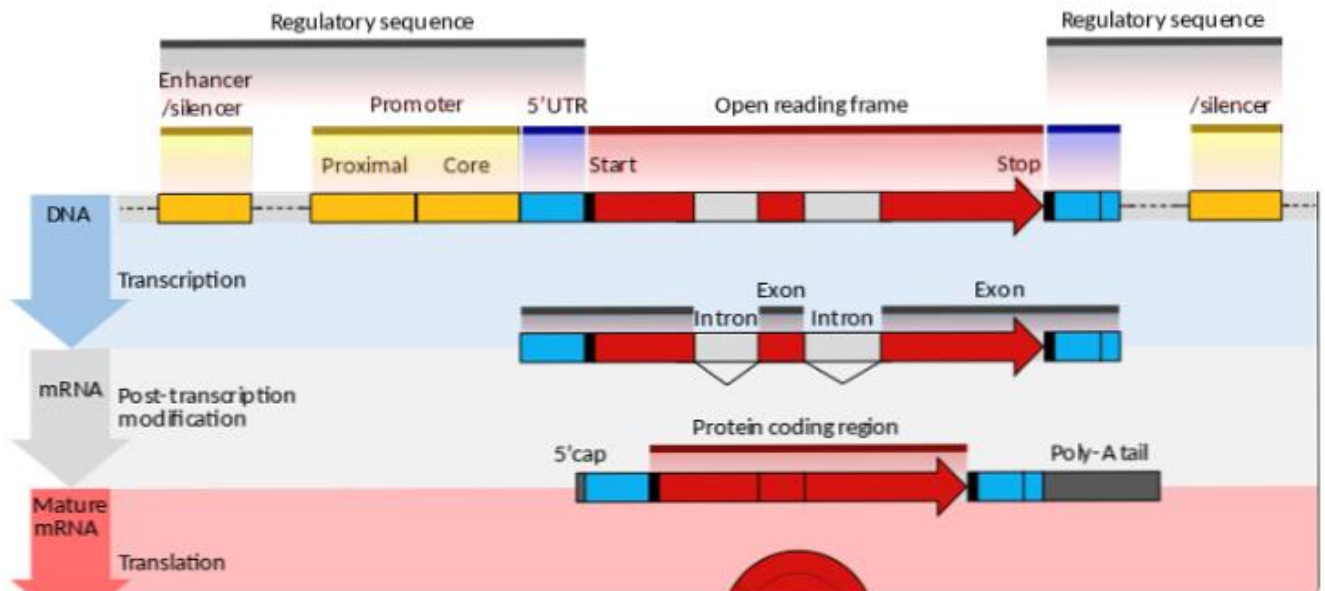


<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4210916/>

Alcune delle modifiche chiave dell'istone che influenzano l'espressione genica. A sinistra c'è una rappresentazione della cromatina chiusa, in cui il DNA è inaccessibile al macchinario trascrizionale e la trascrizione è quindi repressa. Modifiche a residui istonici specifici come l'aggiunta di un gruppo acetile a un residuo di lisina (tramite un'istone acetil transferasi o HAT) portano allo sviluppo della cromatina (come mostrato sul lato destro della figura), che a sua volta consente il meccanismo trascrizionale per accedere al DNA, con conseguente attivazione trascrizionale. Al contrario, la rimozione di questa porzione acetilica (attraverso un'istone deacetilasi, o HDAC) altera la configurazione dell'istone, riportando ancora una volta la cromatina alla forma chiusa. Nel caso della metilazione dell'istone, l'effetto sulla conformazione della cromatina dipende dallo specifico residuo di lisina che viene metilato (come mostrato).

Regolazione trascrizionale ¹⁰

In una cellula eucariota il gene codificante per le proteine è formato da sequenze che verranno trascritte dall'enzima RNA polimerasi II e poi tradotte in proteine, e zone che non vengono trascritte ma servono ad iniziare (Promotore), amplificare (Enhancer), diminuire (Silencer), cioè a regolare, la trascrizione.



<https://plantlet.org/regulation-of-gene-expression-in-prokaryotes-general-features-and-significance/>

La sequenza che viene trascritta in mRNA contiene le informazioni necessarie per la sintesi proteica (regione codificante tradotta) e altre sotto-sequenze non tradotte. La regione codificante è formata da elementi chiamati esoni intervallati da elementi non codificanti chiamati introni.

Le sequenze regolatrici sono situate a monte del sito di inizio della trascrizione. Svolgono un ruolo fondamentale nell'espressione del gene, permettendo l'avvio e la regolazione della trascrizione. Le sequenze regolatrici prossimali, cioè vicine al sito di inizio della trascrizione, sono dette promotori. Elementi promotori fondamentali sono il TATA box, il CAAT box e il GC box. Altri elementi regolatori distali, cioè lontani dal sito di inizio della trascrizione, sono gli enhancers e i silencers (i primi amplificano, i secondi reprimono la trascrizione)

Per poter iniziare la trascrizione, l'RNA polimerasi ha bisogno di numerosi fattori generali di trascrizione (TFIIA, TFIIB etc) che interagiranno con le varie parti del gene.

Il promotore contiene una sequenza di DNA chiamata TATA-box, posta ad una distanza di circa 25 nucleotidi a monte del punto in cui deve iniziare la sintesi di RNA.

Il TATA-box viene riconosciuto e legato dal fattore di trascrizione TFIID.

Anche gli altri fattori di trascrizione, tra i quali c'è la stessa RNA polimerasi, si assemblano a livello del promotore.

A questo punto il fattore TFIIF fosforila l'RNA polimerasi cambiandone la conformazione, in modo tale che essa si stacchi dal complesso e possa iniziare la trascrizione.

I fattori di trascrizione possono essere attivati o de-attivati selettivamente da altre proteine.

La trascrizione ha bisogno quindi di:

- elementi che agiscono in CIS e
- fattori che agiscono in TRANS.

¹⁰ <https://www.vialattea.net/content/2698/>

https://people.unica.it/patriziazavattari/files/2011/11/05_Trascrizione.pdf

<http://www.unife.it/medicina/laboratoriobiomedico/insegnamenti/scienze-biologiche/modulo-di-biologia-applicata/a-a-2015-16-biologia-applicata/trascrizione>

https://www.dir.uniupo.it/pluginfile.php/158167/mod_resource/content/1/trascrizione.pdf

Gli elementi che agiscono in CIS sono le sequenze di DNA che si trovano in vicinanza della porzione di gene che deve essere trascritta in RNA. Quindi il Promotore, l'Enhancer, il Silencer.

In TRANS agiscono dei fattori, normalmente proteine prodotte da altre sezioni di DNA, che si legano alle sequenze CIS, per controllare l'espressione del gene.

Fattori trascrizionali di base: ¹¹

questo gruppo di molecole agisce formando dei complessi multiproteici che consentono alla RNA-polimerasi di riconoscere i siti di attacco del promotore e legarsi ad essi. Il complesso che si forma è costituito da sei fattori di trascrizione e include una particolare proteina, la TATA binding protein (TBP), che possiede la specifica affinità per il sito TATA sul promotore del gene.

I fattori di trascrizione basali sono: IID, IIB, IIE, IIF, IIH. L'azione specifica di quelli più importanti è la seguente:

- IID: comprende la TBP e i TAF, fattori associati alla TBP, che la coadiuvano nello svolgimento della sua funzione specifica. Il Fattore IID è responsabile del legame con il nucleo del promotore, dell'interazione con gli eventuali attivatori o repressori e della formazione del complesso di inizio mediante il reclutamento della RNA-polimerasi II
- IIA: coadiuva la IID nel riconoscimento dei siti promotori
- IIB: agisce come ponte di collegamento per permettere alla IID di complessarsi con la polimerasi. Negli eucarioti l'RNA-polimerasi non è in grado di legare il DNA in maniera autonoma, pertanto l'azione dei fattori di trascrizione è necessaria perché possa avvenire l'interazione e quindi la trascrizione;
- IIH: i fattori di trascrizione generali di questa classe sono complessi proteici dall'azione enzimatica multipla. Sono allo stesso tempo delle chinasi in grado di aggiungere un gruppo fosfato alle estremità C-terminali delle polimerasi, causando il distacco dalla TBC e l'inizio dell'allungamento; sono delle elicasi capaci di determinare lo svolgimento della molecola del DNA e la formazione della bolla di trascrizione e hanno infine la capacità di reclutare gli enzimi di riparazione, anch'essi fondamentali nell'allungamento.
- IIE: si unisce al complesso prima di IIH e contribuisce ai processi enzimatici di quest'ultimo;
- IIF: l'azione di questo fattore di trascrizione è determinante per la stabilità dell'interazione tra polimerasi e DNA, in quanto inibisce le interazioni non specifiche tra queste molecole, assicurando che l'attacco avvenga esclusivamente in corrispondenza del sito promotore.

I fattori generici TF formano un complesso con la TBP e la Polimerasi II, detto Complesso di Inizio, in prossimità del sito promotore del gene (generalmente segnato dalla sequenza TATA):

Fattori di trascrizione specifici: attivatori e repressori

I fattori di trascrizione specifici agiscono come attivatori o repressori dei geni. Generalmente svolgono la propria funzione legando specifiche sequenze di DNA che possono trovarsi anche a notevole distanza dalla sequenza codificante per l'mRNA.

Gli attivatori e i repressori sono in grado di reclutare i fattori di trascrizione generali, di interagire con molecole mediatrici e di selezionare, in prossimità dei promotori, fattori di rimodellamento della cromatina. L'azione regolatrice da parte di queste molecole avviene in genere mediante una combinazione di una o più di queste azioni specifiche

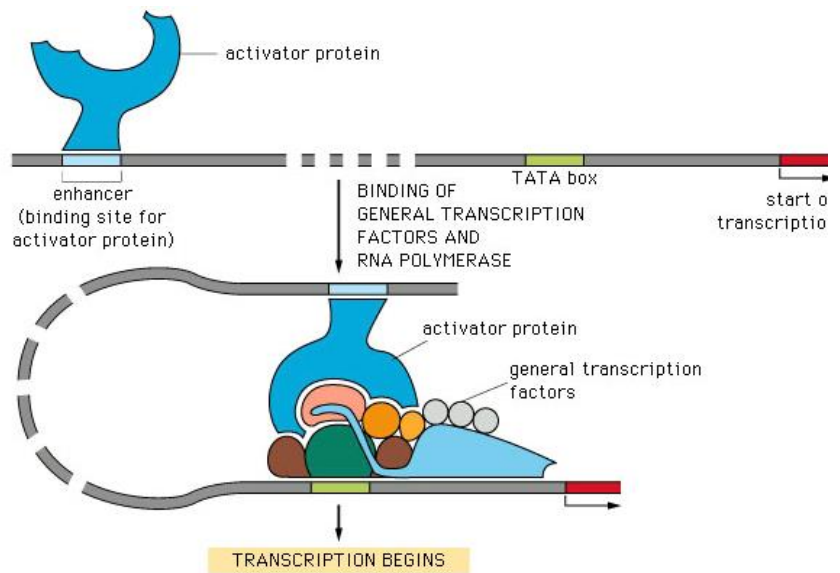
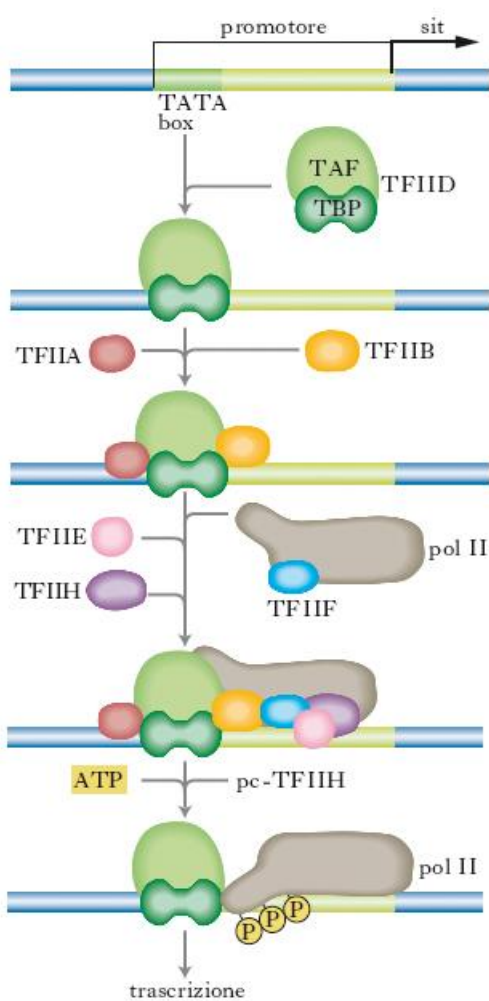
Quando il sito dell'attivatore/repressore è posizionato molto distante dal promotore, in genere vengono coinvolte molecole definite mediatori o coattivatori/corepressori.

¹¹ <https://www.chimica-online.it/biologia/fattori-di-trascrizione.htm>

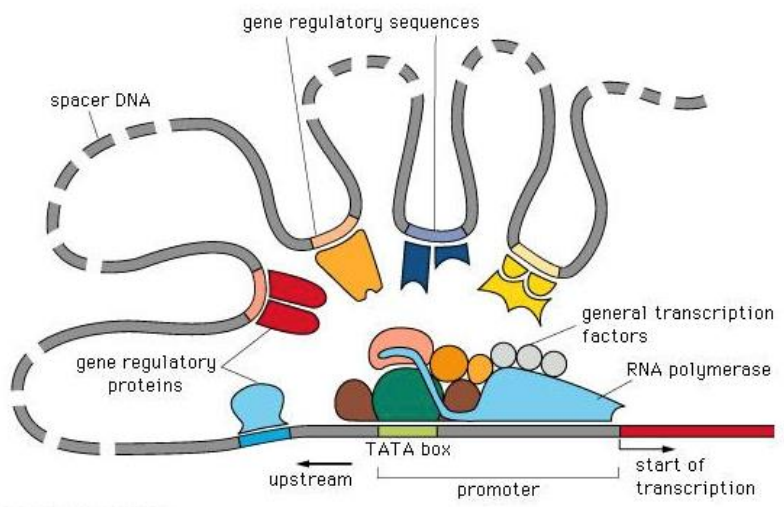
Uno schema di funzionamento classico che coinvolge un co-attivatore prevede che il legame dell'attivatore con il DNA determini il ripiegamento tridimensionale del DNA, portando l'attivatore (che lega il DNA di una specifica sequenza) in prossimità del mediatore (legato al DNA in un altro punto); l'interazione tra le due molecole causa un cambiamento conformazionale nell'attivatore che determina lo sblocco dell'attività della trascrizione.

Le sequenze di attacco degli attivatori e dei repressori non sono sequenze casuali ma hanno lo specifico compito di intervenire nella regolazione e sono definite *enhancers* se hanno il compito di attivare o amplificare la trascrizione e *silencers* se hanno invece il compito di sopprimerla. La collocazione di queste sequenze può arrivare ad essere distante anche 700-1000 copie di basi dal sito promotore.

Animazione
Transcription & Enhancers



©1998 GARLAND PUBLISHING



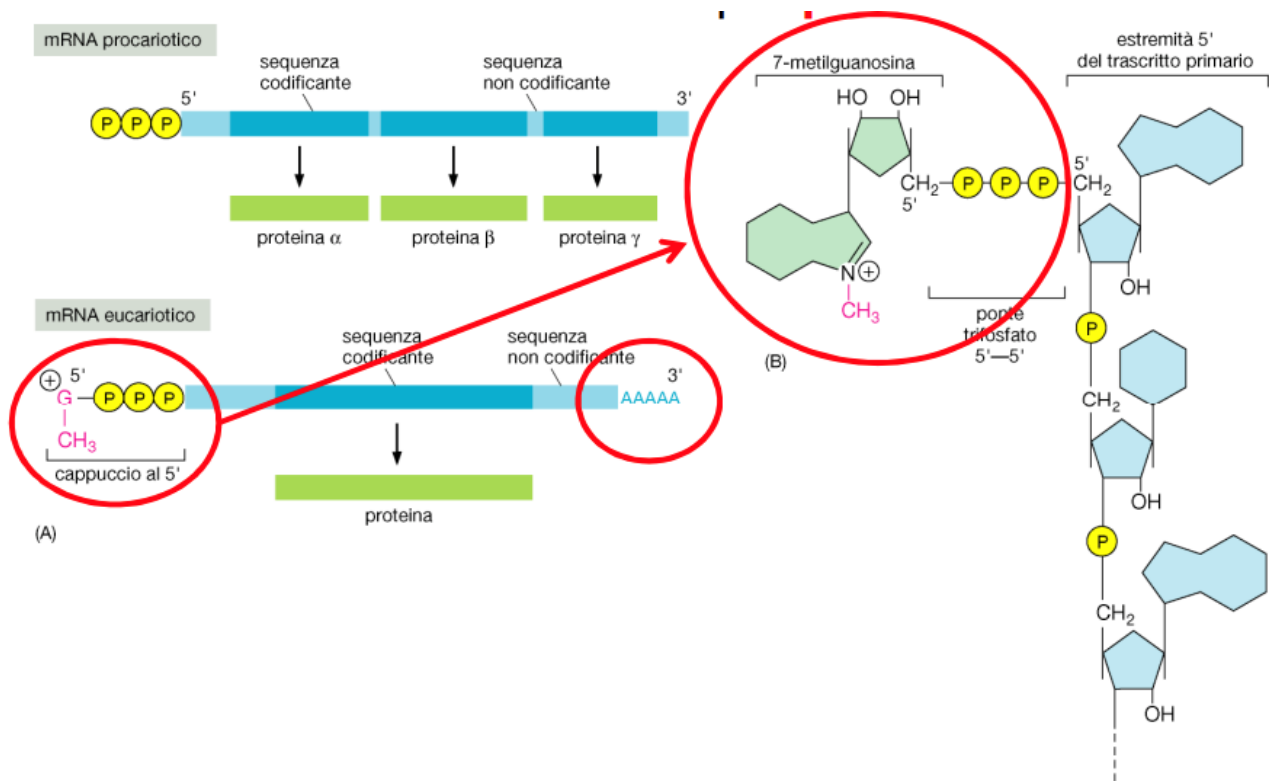
©1998 GARLAND PUBLISHING

<https://www.cliccascienze.it/biologia-molecolare-e-genetica/regolazione-della-trascrizione/>
<https://www.vialattea.net/content/2698/>

Gli RNA eucariotici sono trascritti nel nucleo dove subiscono anche un processo di maturazione (processing). Gli mRNA vengono dotati di un cappuccio (capping) all'estremità 5' e di una "coda" per poliadenilazione al 3' ed esportati selettivamente dal nucleo nel citoplasma per essere tradotti in proteine, in seguito a un processo di "splicing" che rimuove le sequenze non codificanti.

Animazione
5 prime capping dell'mRNA eucariotico
mRNA 5 prime cap and poly-A tail
mRNA Splicing

Piccoli RNA nucleari (snRNA) individuano il confine tra introni ed esoni e formano le piccole particelle ribonucleoproteiche nucleari (snRNP). Gli snRNP formano il corpo centrale dello spliceosoma, che provvede a tagliare gli introni e ricucire gli esoni.



https://people.unica.it/patriziazavattari/files/2011/11/05_Trascrizione.pdf

È importante ricordare che nel nucleolo (regione particolarmente densa che si trova all'interno del nucleo) avviene la sintesi e l'assemblaggio delle subunità ribosomiali costituite da RNA e proteine ribosomiali.¹²

¹² <http://www.unife.it/medicina/scienzemotorie/minisiti-LT/biologia-applicata-esercizio-fisico/Materiale%20didattico/principi-di-biologia-e-genetica-2019-2020-materiale-didattico-prof-ssa-rizzo/organuli-cellulari-nucleo-e-nucleolo>

Peter Shaw, John Brown,
Nucleoli: Composition, Function, and Dynamics,
Plant Physiology, Volume 158, Issue 1, January 2012, Pages 44–51,
<https://doi.org/10.1104/pp.111.188052>

Regolazione post-trascrizionale ¹³

La regolazione post-trascrizionale è affidata a tutti quei processi che modificano l'mRNA, dalla sua origine (pre-mRNA) alla sua completa maturazione e trasporto nel citoplasma.

I principali processi di regolazione a questo livello sono:

-*Splicing alternativo.*

-*Editing.*

-*Controllo dei nuclear basket ¹⁴ (complesso del poro nucleare)*

-*Controllo della stabilità e durata degli mRNA nel citoplasma.* Gli mRNA possono subire diverse forme di degradazione quando raggiungono il citoplasma.

Le principali sono:

-*Degradazione dipendente dalla coda Poli-A.* La coda poli-A influisce molto sulla stabilità e durata degli mRNA. Generalmente, più è lunga e maggiore è la durata dell'mRNA. Nel tempo però la coda Poli-A subisce (per effetto di vari fattori) una progressiva de-adenilazione (perdita di nucleotidi adenosinici) e quando si riduce troppo, la proteina viene degradata.

-*Degradazione indipendente dalla coda Poli-A.* Si tratta di un processo di decapitazione (decapping) del cappuccio in posizione 5'. In conseguenza di ciò, l'mRNA viene attaccato e distrutto da una esonucleasi 5'-3'. Talvolta però i tagli possono avvenire anche all'interno della molecola di mRNA, ad opera di endonucleasi.

-*Controllo della localizzazione degli mRNA nel citoplasma.* È stato visto che nel moscerino *Drosophila*, la localizzazione citoplasmatica dei vari mRNA incide sullo sviluppo del moscerino.

-*Mascheramento dell'mRNA.* Alcune proteine si legano all'mRNA, lo mascherano e ne impediscono la traduzione. Questo fenomeno è associato alle prime fasi di sviluppo embrionale. Si è visto che la sintesi proteica nelle prime fasi di sviluppo embrionale dipende da mRNA precedentemente sintetizzati, bloccati ed accumulati col meccanismo del mascheramento proteico (infatti, pur utilizzando farmaci che bloccano la trascrizione, la sintesi proteica avviene ugualmente).

-*Distruzione/inattivazione da parte dei siRNA e miRNA.* (vedi [Vaccini Covid-19 Piattaforme innovative Meccanismi del danno: la Spike](#), da pag 51)

Video

[Post Transcriptional Regulation
Biogenesis of miRNAs and mode of action
Gene Silencing by microRNA](#)

¹³ https://didattica-2000.archived.uniroma2.it/biolsvil/deposito/Expression_Regulation.pdf

¹⁴ Arlucea J, Andrade R, Alonso R, Aréchaga J.

The nuclear basket of the nuclear pore complex is part of a higher-order filamentous network that is related to chromatin. J Struct Biol. 1998 Dec 1;124(1):51-8. doi: 10.1006/jsbi.1998.4054. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9931273/>

<https://www.chimica-online.it/biologia/pori-nucleari.htm>

Regolazione traduzionale

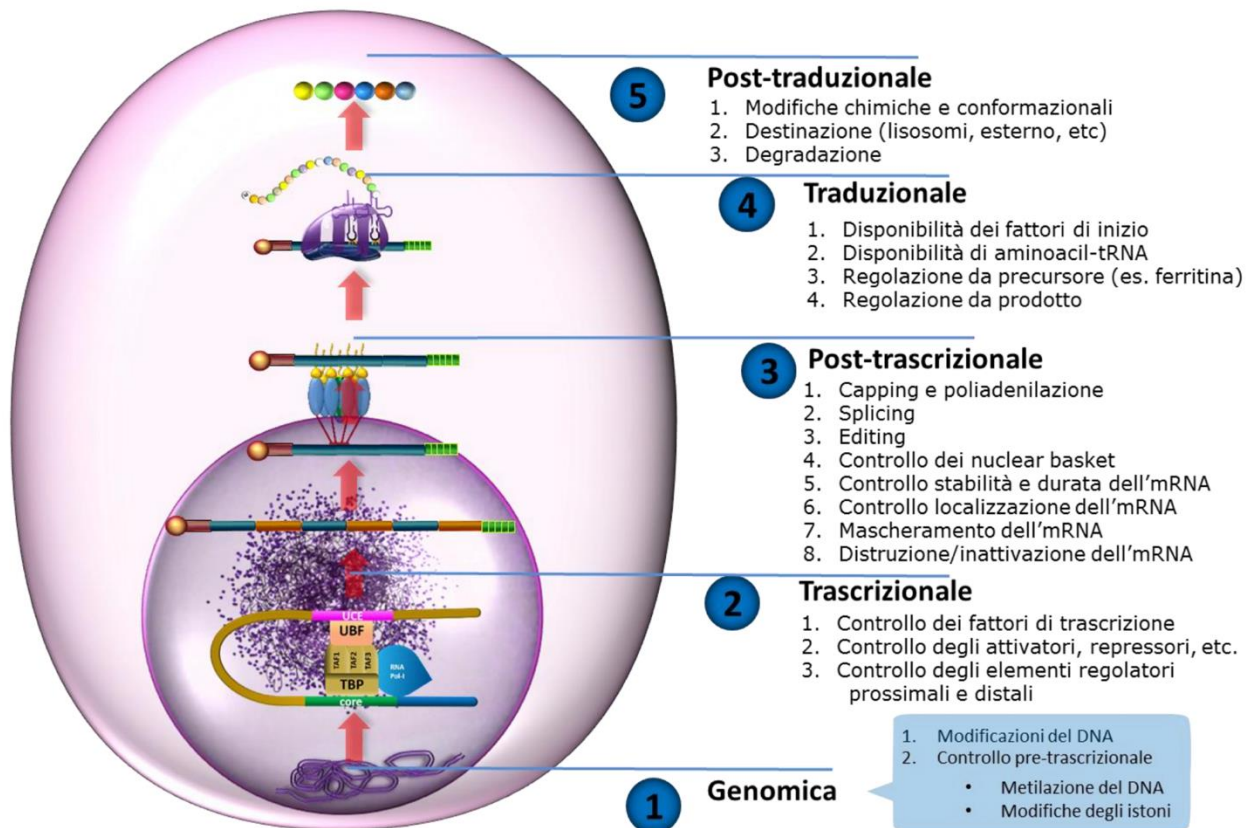
La regolazione traduzionale è soggetta a controllo da parte delle seguenti condizioni:

- Disponibilità dei fattori di inizio, di allungamento e di rilascio.
- Disponibilità di aminoacil-tRNA.
- Regolazione da precursore (ad esempio, la sintesi della ferritina ect).
- Regolazione da prodotto (ad esempio, un eccesso di prodotto può inibire la traduzione a diversi livelli).

Regolazione post-traduzionale

Comprende tutti quei fattori che intervengono dopo la sintesi delle proteine (quindi dopo la traduzione). Questo tipo di regolazione è soggetta a controllo da parte delle seguenti condizioni:

- Modifiche chimiche post-traduzionali. (fosforilazione, ubiquitinazione, glicosilazione, S-nitrosilazione, metilazione, N-acetilazione, lipidazione, ponti disulfuro, proteolisi)¹⁵
- Modifiche conformazionali post-traduzionali.
- Destinazione.
- Distruzione lisosomiale.
- Distruzione ubiquitina-dipendente.



[Biologia 41 – Regolazione espressione genica video](#)

¹⁵ Overview of Post-Translational Modifications (PTMs)

APPROFONDIMENTO

Regolazione dell'espressione genica

VIDEO

Biologia – Regolazione dell'espressione genica

Regulation of Gene Expression: Operons, Epigenetics, and Transcription Factors

Transcription and Translation: From DNA to Protein

Eukaryotic gene control

Epigenetic Regulation of Gene Expression

Eukaryotic gene expression regulation: concept of chromatin

AP Biology Chapter 18 Eukaryotic Gene Regulation-APBIO

Lec4 Protein Synthesis & Post-translational Modifications

Post Translational Modifications

SINTESI DELL'mRNA DEI CORONAVIRUS

Tratto da "[*Il mondo sorprendente del genoma del SARS-CoV-2*](#)"¹⁶

I coronavirus hanno il genoma più grande, circa 30 kilobasi, di tutti i virus a RNA.

Una volta che il coronavirus è entrato nella cellula, il suo genoma a RNA viene immediatamente tradotto dai ribosomi e da proteine specifiche della cellula ospite. Si forma una poliproteina gigante, detta pp1ab, codificata dal gene replicasi (replicase), a partire da due regioni del genoma virale che possono essere tradotte in proteine dette "cornici di lettura aperte" (ORF, Open Reading Frames). La pp1ab è tagliata in 16 proteine più piccole non strutturali (nsp, non structural proteins)¹⁷

È da notare che due delle proteine prodotte precocemente dall'RNA virale (nsp3 e nsp5) sono coinvolte nel taglio di pp1ab. Tutte le 16 nsp sono necessarie per la replicazione dell'RNA genomico (gRNA) e la produzione dei vari RNA messaggeri (mRNA) sub-genomici virali (sgRNA, i frammenti del genoma da cui vengono tradotte le proteine virali). A valle del gene replicasi, è contenuta l'informazione per la produzione delle proteine strutturali:

- spike;
- envelope (proteina del rivestimento del virione);

¹⁶ <https://sibbm.zanichelli.it/italiano/2020/08/23/genoma-covid-19/>

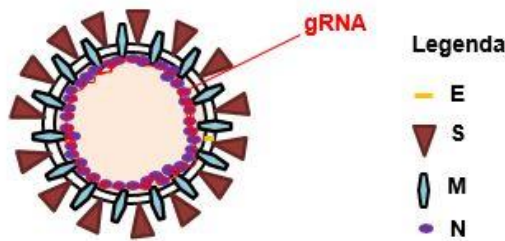
¹⁷ E.J. Snijder, E. Decroly, J. Ziebuhr,
Chapter Three - The Nonstructural Proteins Directing Coronavirus RNA Synthesis and Processing,
Editor(s): John Ziebuhr, *Advances in Virus Research*, Academic Press, Vol. 96, 2016, Pages 59-126,
ISSN 0065-3527, ISBN 9780128047361,
<https://doi.org/10.1016/bs.avir.2016.08.008>.

Sola I, Almazán F, Zúñiga S, Enjuanes L.
Continuous and Discontinuous RNA Synthesis in Coronaviruses.
Annu Rev Virol. 2015;2(1):265-288. doi:10.1146/annurev-virology-100114-055218
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC6025776/>

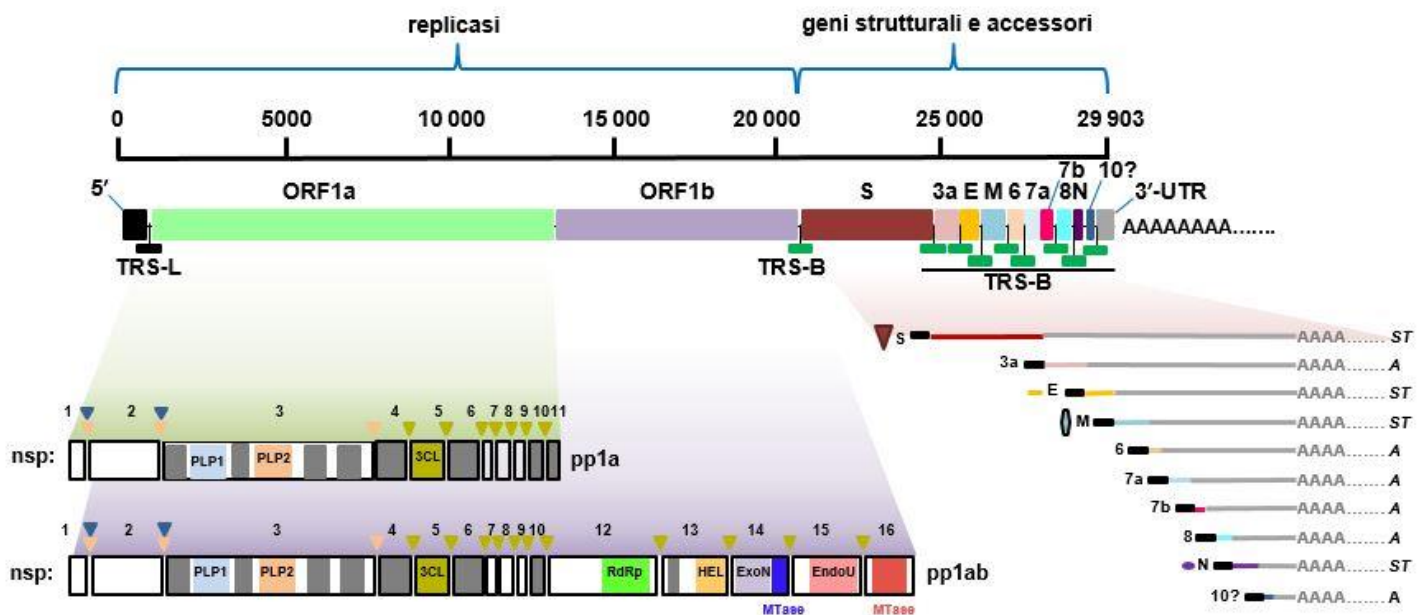
- M (proteina di membrana);
- N (proteina del nucleocapside, che complessa l'RNA virale).

Queste proteine “impacchettano” il genoma virale e sono necessarie alla produzione di nuovi virioni. Inoltre, sempre dal tratto a valle del gene della replicasi, sono prodotte sei proteine accessorie (3a, 6, 7a, 7b, 8, 10) il cui ruolo non è ancora del tutto chiaro.¹⁸

STRUTTURA DEL SARS-CoV-2



STRUTTURA DEL gRNA E PROTEINE VIRALI



<https://sibbm.zanichelli.it/italiano/2020/08/23/genoma-covid-19/>

La maggior parte del genoma è occupato dal gene della replicasi, che codifica per 16 nsp, prodotte dal taglio della poliproteina pp1ab. A valle, è presente l'informazione per le proteine strutturali e accessorie. Come si può osservare nella figura, oltre alla proteina pp1ab, viene prodotta anche una proteina più corta, pp1a, a partire dalla sola sequenza ORF1A. Abbreviazioni: L, Leader; TRS-L, Transcription Regulatory Sequence At The Leader (sequenza regolatoria della trascrizione al Leader); TRS-B, Transcription Regulatory Sequence At The Body (sequenza regolatoria della trascrizione all'interno del corpo del genoma); ORF, Open Reading Frame (cornice di lettura aperta); S, Spike; E, Envelope (proteina del rivestimento virale); M, Membrane (proteina della membrana); N, Nucleocapsid (proteina del nucleocapside che complessa il gRNA); le sigle 3a, 6, 7a, 7b, 8, 10 indicano i geni accessori; nsp, non structural

¹⁸ Paul S. Masters,
The Molecular Biology of Coronaviruses,
Advances in Virus Research, Academic Press, Vol. 66, 2006, Pages 193-292,
ISSN 0065-3527, ISBN 9780120398690,
[https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(06\)66005-3](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(06)66005-3).

protein; PLP, Papain-Like Protease (proteasi simile alla papaina); 3CL, Chymotrypsin-Like Protease (proteasi simile alla chimotripsina); RdRp, RNA-dependent RNA polymerase (RNA polimerasi dipendente dall'RNA); HEL, HELicase (elicasi); ExoN, ExoNuclease (esonucleasi); EndoU, EndonUclease (endonucleasi); Mtase, Methyltransferase (metiltrasferasi); UTR, UnTranslated Region (regione non tradotta); ST, proteina strutturale; A, proteina accessoria.¹⁹

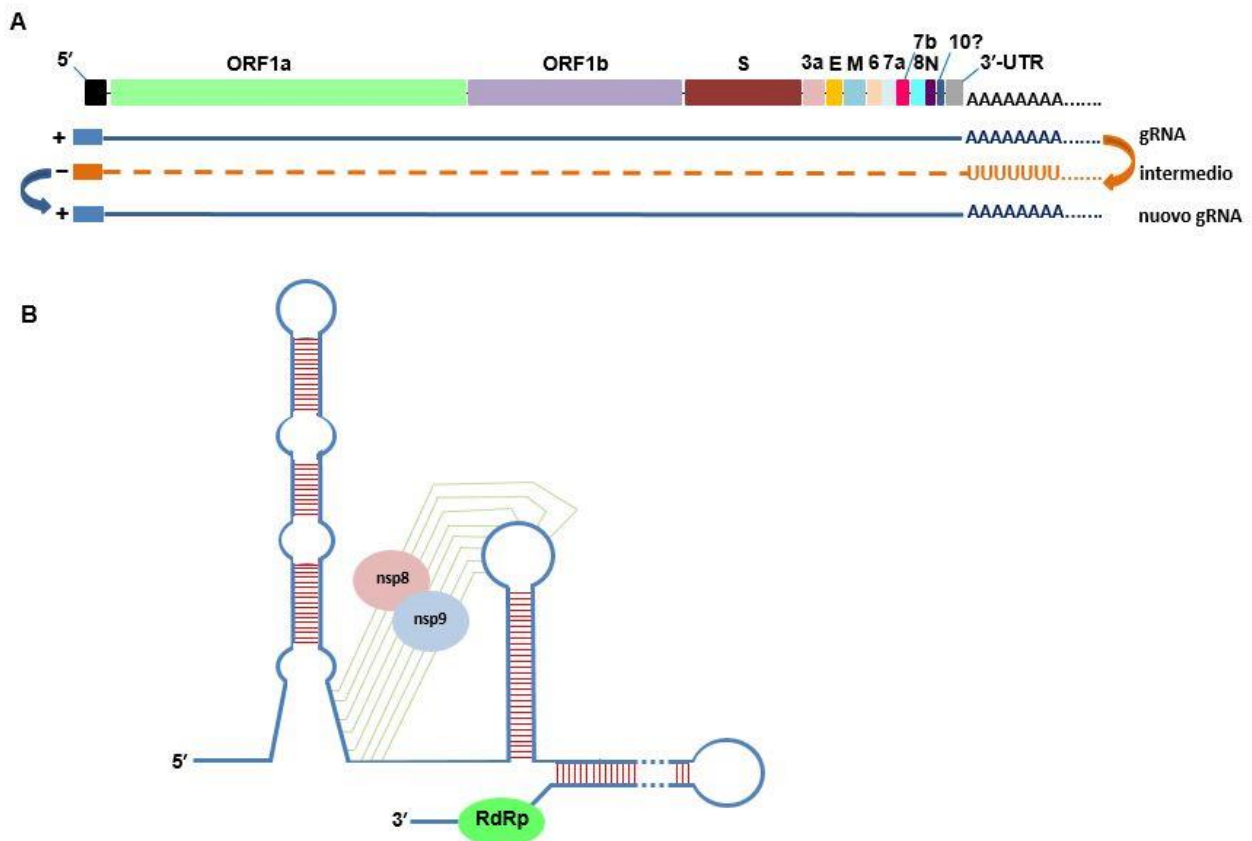
La replicazione del genoma di SARS-CoV-2

L'RNA dei coronavirus è di fatto un mRNA molto lungo. Si tratta di un filamento singolo positivo, letto dalle strutture deputate alla traduzione nella direzione 5'→3'.

La replicazione dell'RNA, cioè la produzione di più copie del genoma virale, è un processo continuo. Il nuovo gRNA viene prodotto per intero grazie alla sintesi di un filamento intermedio negativo (che decorre in direzione 3'→5'; linea arancione tratteggiata nella Figura A), che serve da stampo per produrre un nuovo gRNA positivo.

Questo processo coinvolge principalmente la proteina nsp12, che è un'RNA polimerasi dipendente dall'RNA (RdRp), e che sintetizza il primo filamento negativo legandosi all'estremità 3' del gRNA.

Il legame è possibile per la formazione di strutture complesse che flettono l'RNA in modo da facilitarne la replicazione grazie all'avvicinamento di alcune porzioni (Figura B).



<https://sibbm.zanichelli.it/italiano/2020/08/23/genoma-covid-19/>

A Sintesi continua del gRNA a partire da uno stampo intermedio negativo. **B** Esempio di formazione di una struttura complessa dell'RNA, mediata da nsp8 ed nsp9, che consente il legame di RdRp all'estremità 3' dell'RNA e la sintesi del filamento negativo. [Basato su Kim et al., Cell, 2020 and Sola et al, RNA Biol, 2011.]¹⁹

¹⁹ Kim D, Lee JY, Yang JS, Kim JW, Kim VN, Chang H. The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. Cell. 2020 May 14;181(4):914-921.e10. doi: 10.1016/j.cell.2020.04.011. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7179501/>

Sola I, Almazán F, Zúñiga S, Enjuanes L. Continuous and Discontinuous RNA Synthesis in Coronaviruses. Annu Rev Virol. 2015;2(1):265-288. doi:10.1146/annurev-virology-100114-055218 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC6025776/>

Al contrario, la sintesi degli sgRNA, è un processo discontinuo, ossia avviene “a salti”. Ogni sgRNA ha all’estremità 5’ una sequenza di 70 nt chiamata Leader (L), che è presente una volta sola all’estremità 5’ dell’intero gRNA. La sintesi discontinua degli sgRNA dipende da sequenze, chiamate sequenze regolatrici della trascrizione (TRS), presenti a valle del Leader (TRS-L) e che precedono ogni sgRNA (TRS-B). Le TRS contengono delle sequenze conservate (CS, Conserved Sequences) di 6–7 nt, identiche per il TRS-L e per ogni TRS-B e che permettono l’appaiamento della sequenza CS-L con la sequenza complementare CS-B (cCS-B, complimentary CS-B) dell’RNA intermedio negativo nascente, quando l’RNA si piega per allineare la TRS-L con ogni TRS-B (Figura A di seguito). Questo processo assicura la produzione di ogni sgRNA, che è sostanzialmente una fusione tra la sequenza Leader all’estremità 5’ dell’RNA virale e la sequenza dell’sgRNA, preceduto dalla TRS-B. L’intero processo richiede interazioni a distanza RNA-RNA mediate da complessi RNA-proteina. Un esempio di questo meccanismo è mostrato nella Figura B.

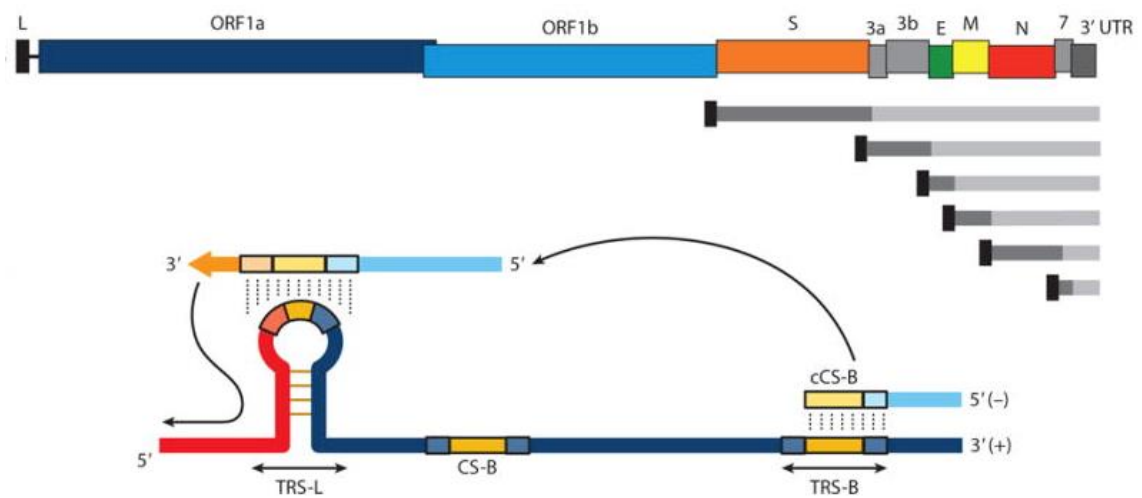


Fig. A

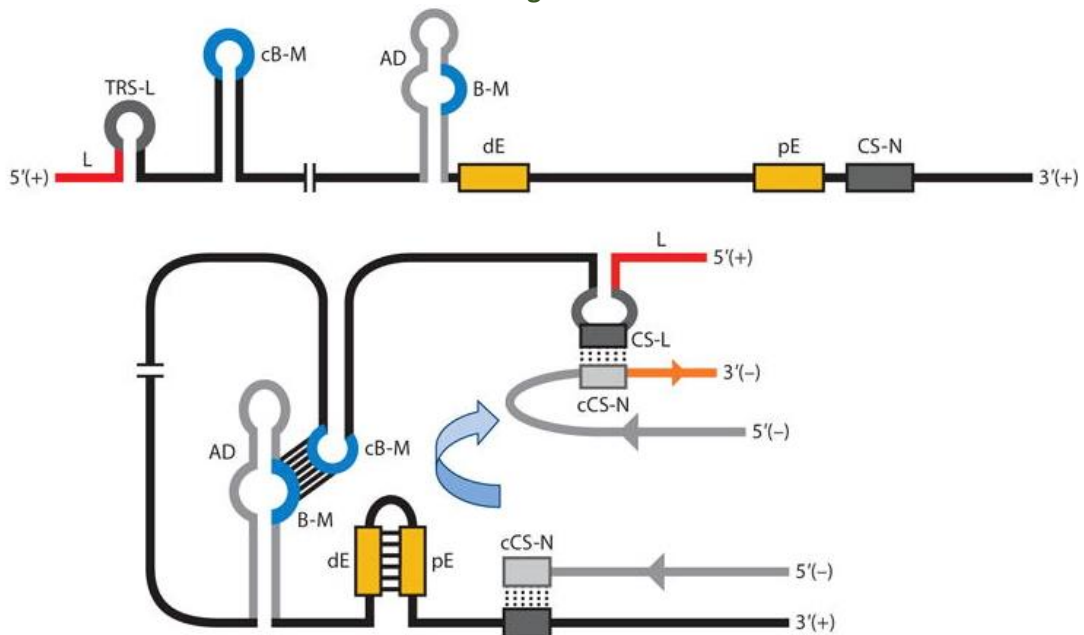


Fig. B

[Continuous and Discontinuous RNA Synthesis in Coronaviruses: Video 1](#) ²⁰

²⁰ Sola I, Almazán F, Zúñiga S, Enjuanes L.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6025776/>

Fig A Strategia del genoma del coronavirus per l'espressione di *sgmRNA*. Lo schema superiore rappresenta il genoma del TGEV. Le linee brevi rappresentano l'insieme annidato di *sgmRNA*, ciascuno contenente una sequenza leader comune (nero) e un gene specifico da tradurre (grigio scuro).

Elementi chiave nella trascrizione del coronavirus. Un TRS precede ogni gene (TRS-B) e include la sequenza centrale (CS-B) e le sequenze fiancheggianti variabili 5' e 3'. Il TRS del leader (TRS-L), contenente la sequenza core (CS-L), è presente all'estremità 5' del genoma, in una posizione esposta (riquadro arancione nell'ansa TRS-L). La trascrizione discontinua si verifica durante la sintesi dell'RNA a filamento negativo (azzurro), quando la copia del TRS-B si ibrida con il TRS-L. Le linee tratteggiate indicano la complementarità tra le sequenze di RNA a filamento positivo e a filamento negativo.

Fig. B Modello per la formazione di strutture genomiche di ordine elevato che regolano la trascrizione del gene N. Lo schema lineare superiore rappresenta il genoma del coronavirus. La linea rossa indica la sequenza leader nell'estremità 5' del genoma. Il tornante indica il TRS-L. La linea grigia con le punte di freccia rappresenta l'RNA nascente a senso negativo. La freccia blu curva indica il passaggio del modello alla sequenza direttrice durante la trascrizione discontinua. La linea arancione rappresenta la copia del leader aggiunta all'RNA nascente dopo il cambio del modello. Le interazioni RNA-RNA tra il pE (nucleotidi da 26894 a 26903) e dE (nucleotidi da 26454 a 26463) e tra il BM nel dominio attivo (nucleotidi da 26412 a 26421) e il cB-M nell'estremità 5' del genoma (nucleotidi da 477 a 486) sono rappresentati da linee continue. Le linee tratteggiate indicano la complementarità tra le sequenze di RNA a filamento positivo e a filamento negativo. Abbreviazioni: AD, predizione della struttura secondaria del dominio attivo; Motivo BM, B; cB-M, copia complementare del B-M; cCS-N, copia complementare del CS-N; CS-L, sequenza core conservata del leader; CS-N, sequenza core conservata del gene N; dE, elemento distale; pE, elemento prossimale; TRS-L, sequenza di regolazione della trascrizione del leader.

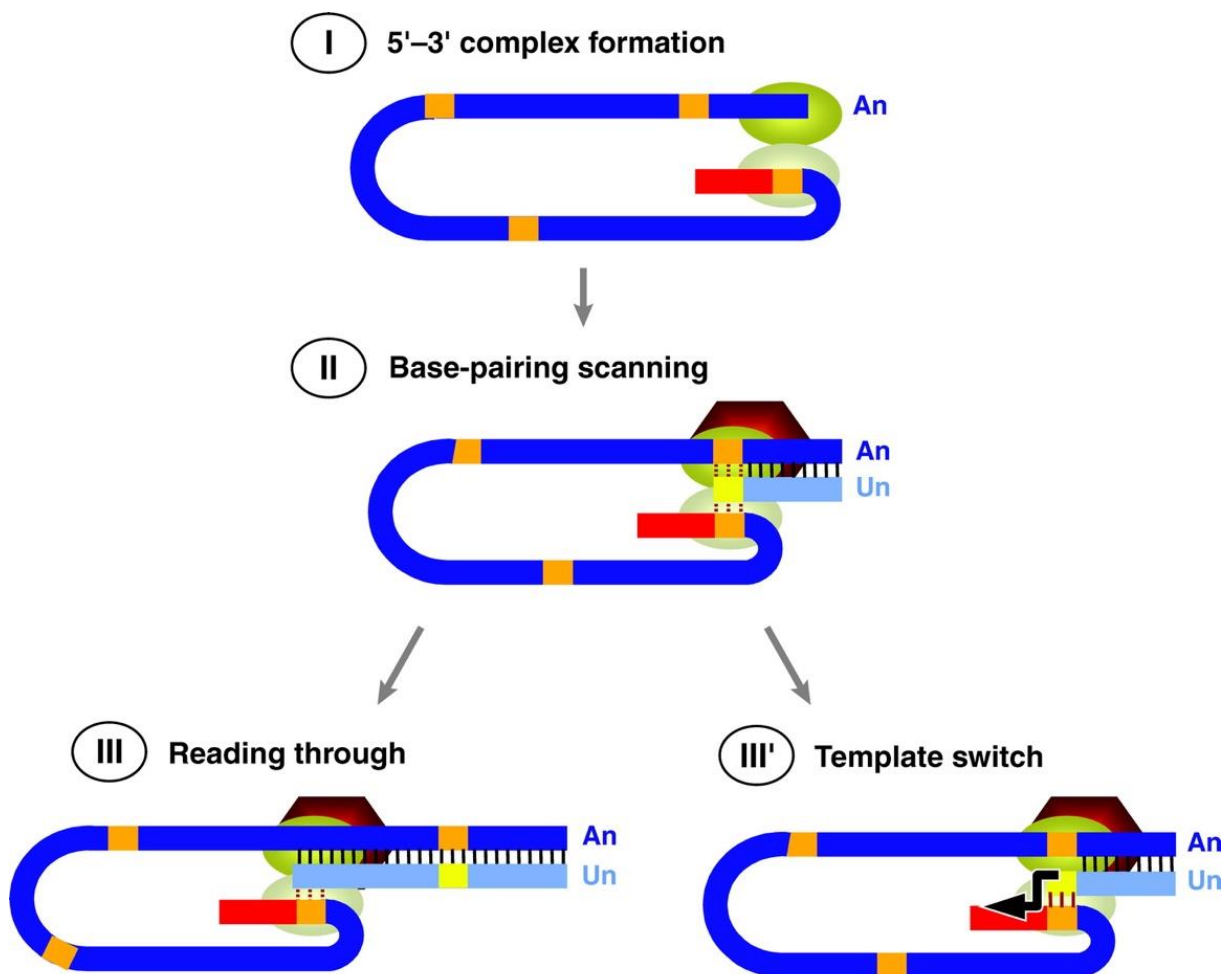


Fig A

Continuous and Discontinuous RNA Synthesis in Coronaviruses.
Annu Rev Virol. 2015 Nov;2(1):265-88. doi: 10.1146/annurev-virology-100114-055218.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6025776/>

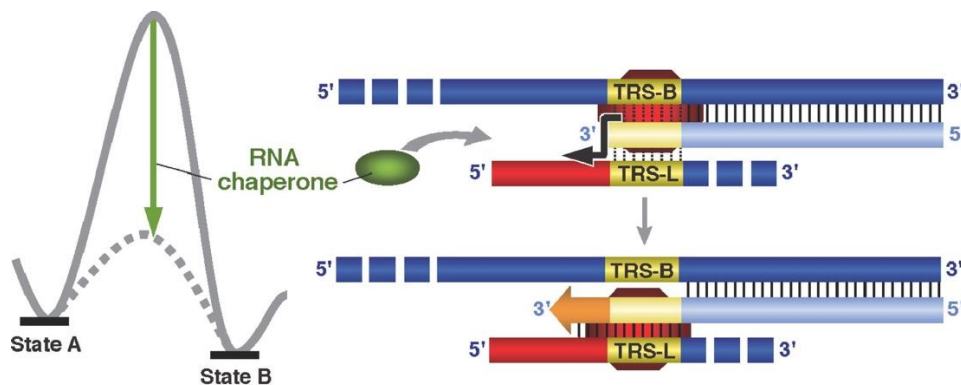


Fig. B

<https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.micro.60.080805.142157>

Fig. A Modello in tre fasi della trascrizione del coronavirus. (I) Formazione del complesso. Le sequenze di regolazione della trascrizione che legano le proteine sono rappresentate da ellissoidi, la sequenza leader è indicata con una barra rossa e le sequenze del core sono indicate con riquadri arancioni. (II) Scansione di appaiamento delle basi. L'RNA a filamento negativo è mostrato in azzurro; il complesso di trascrizione è rappresentato da un esagono. Le linee verticali indicano la complementarietà tra l'RNA genomico e il nascente filamento negativo. (III) La sintesi del filamento negativo può continuare a produrre un sgRNA più lungo (III), oppure può aver luogo una fase di cambio stampo (III') come indicato nella figura B. La freccia spessa indica l'interruttore nel modello realizzato dal complesso di trascrizione per completare la sintesi di sgRNA a filamento negativo.

Il cambio di modello durante la trascrizione rappresenta uno spostamento di una sequenza nel genoma che funge da modello (templato) per l'RNA ad altro modello, la sequenza leader. I chaperons dell'RNA possono aiutare a superare la soglia della barriera energetica associata a questi tipi di processi. I chaperons dell'RNA sono proteine che legano l'RNA con un'ampia specificità e riducono l'energia di attivazione richiesta per una transizione tra due stati.²¹ Il cambio di templato durante la trascrizione del CoV potrebbe essere interpretato come una transizione tra due stati. Nel primo stato, si forma un duplex tra l'RNA a filamento negativo nascente e l'RNA a filamento positivo genomico utilizzato come stampo; nel secondo stato, l'RNA a filamento negativo nascente è accoppiato con il TRS della sequenza leader (Figura B). I chaperons dell'RNA potrebbero essere coinvolti nel cambio del modello diminuendo l'energia richiesta per la transizione dal primo al secondo duplex.

I chaperons dell'RNA sono proteine con la più alta frequenza di lunghe regioni intrinsecamente disordinate.²² Anche le proteine CoV N sono proteine altamente disordinate ed è stato dimostrato che la proteina SARS-CoV N ha attività di chaperone dell'RNA in vitro.²³

I salti dell'RNA polimerasi dipendente dall'RNA

La sintesi dell'RNA di CoV-2 è, sostanzialmente identica a quella degli altri coronavirus umani. Tuttavia, le caratteristiche di alcuni dei suoi sgRNA suggeriscono meccanismi di sintesi alternativi. Nella cellula infettata sono sintetizzate nel complesso più molecole di mRNA del CoV-2 che di molecole degli mRNA della cellula stessa, come se l'espressione dei geni cellulari venisse silenziata (Figura 1).

Il 92% degli sgRNA di CoV-2 è prodotto secondo il meccanismo descritto nel paragrafo precedente e questi sono principalmente rappresentati dagli mRNA per N, S, M, E, 3a, 6, 7a, 7b e 8 (Figura 2A), ma un certo numero di geni, a funzione ignota, hanno una struttura insolita (Figura 2B).

²¹ Saibil H.

Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013 Oct;14(10):630-42. doi: 10.1038/nrm3658. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4340576/>

²² Woodson SA, Panja S, Santiago-Frangos A.

Proteins That Chaperone RNA Regulation. *Microbiol Spectr.* 2018 Jul;6(4):10.1128/microbiolspec.RWR-0026-2018. doi: 10.1128/microbiolspec.RWR-0026-2018. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6086601/>

²³ Zúñiga S, Sola I, Moreno JL, Alonso S, Enjuanes L.

Regulation of coronavirus transcription: viral and cellular proteins interacting with transcription-regulating sequences. *Adv Exp Med Biol.* 2006;581:31-5. doi: 10.1007/978-0-387-33012-9_4. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7123242/>

La presenza di alcune sequenze di 3–4 nt, identiche all'estremità 5' e 3' di questi geni, potrebbe far ipotizzare un meccanismo di "salto dell'RNA polimerasi" (polymerase jumping), già descritto in altri sistemi (Figura 3).

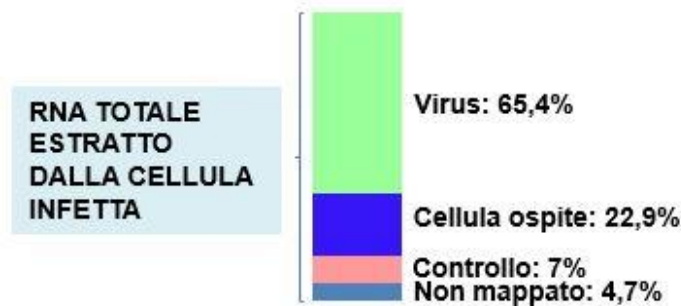


Fig. 1 - Trascrittoma in una cellula infetta dal SARS-CoV.2
Il 65,4% degli RNA all'interno delle cellule infette appartiene al virus.

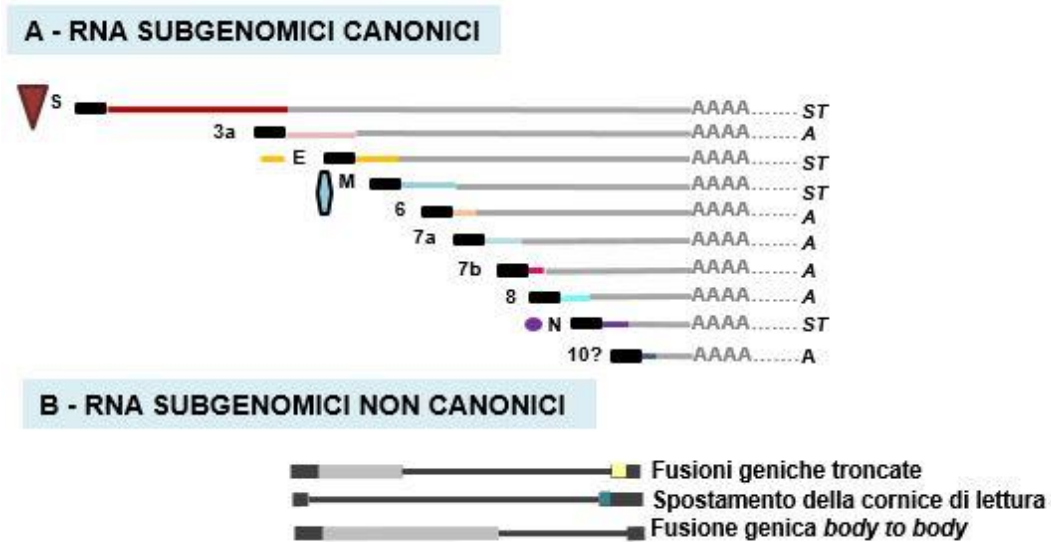


Fig. 2 - Prodotti dell'RNA di SARS-CoV-2. Gli sgRNA canonici (A) e insoliti (B)

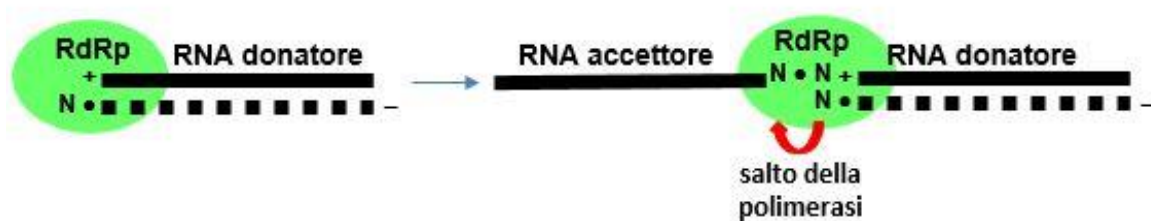


Fig. 3 - Un esempio di "salto della polimerasi"
L'RdRp salta dall'estremità 3' di un RNA donatore a filamento negativo all'estremità 3' di un RNA accettore, appaiando piccole sequenze complementari.

Questo processo produce un certo numero di sgRNA a funzione ignota nel ciclo vitale del virus, ma che possono essere potenzialmente tradotti in proteine agli stessi livelli delle proteine accessorie.

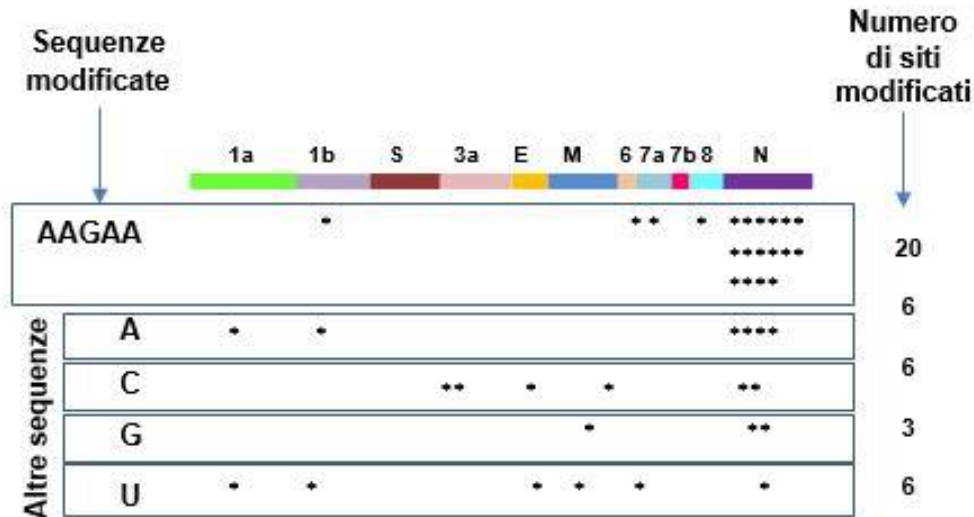
Le modifiche dell'RNA

Le modifiche epigenetiche più note sono quelle a carico del DNA e degli istoni associati, che nell'insieme formano la cromatina, quindi i cromosomi, all'interno della cellula.

Anche l'RNA può essere modificato e, in effetti, sono già state osservate modifiche dell'RNA virale in altri virus.

È stata osservata l'aggiunta di gruppi metilici (su A o C), la perdita di gruppi amminici dalle basi e l'aggiunta di nucleotidi (per esempio di uracile).

Sono state identificate modifiche dell'RNA nel CoV-2, ma la loro natura non è stata ancora identificata, né tantomeno è stato chiarito il loro ruolo. Tuttavia, si pensa possano essere coinvolte nel controllo della stabilità dei vari sgRNA o che potrebbero contribuire a eludere il sistema immunitario dell'ospite.



Modifiche dell'RNA

Gli asterischi corrispondono alla posizione approssimativa delle modifiche sul gRNA. Il numero di modifiche è mostrato a destra, il valore più alto si osserva in corrispondenza delle sequenze AAGAA.

Le caratteristiche biologiche del CoV-2 sono in larga parte sovrapponibili a quelle degli altri CoV. Nonostante ciò, il meccanismo di sintesi del suo RNA è molto complesso e, in alcuni casi sfugge ai meccanismi canonici.

In particolare, l'alta frequenza di geni con struttura molto diversa da quelli prodotti dal meccanismo di trascrizione canonico potrebbe produrre varianti virali, un punto che merita particolare attenzione se pensiamo ai meccanismi di farmaco-resistenza ed elusione del sistema immunitario che CoV-2 potrebbe evolvere per sopravvivere e propagarsi.²⁴

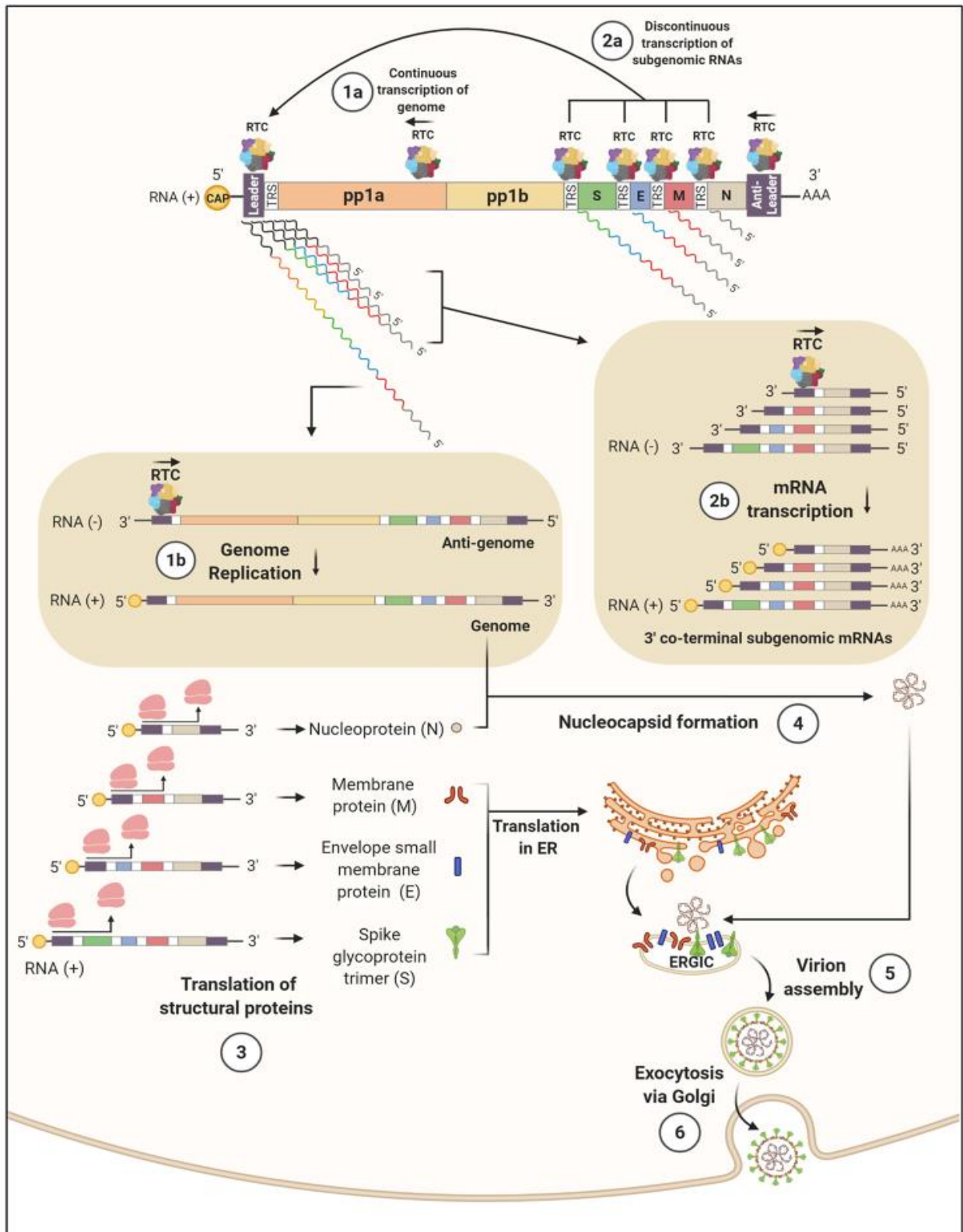
²⁴ Nakagawa K, Lokugamage KG, Makino S. Viral and Cellular mRNA Translation in Coronavirus-Infected Cells. *Adv Virus Res.* 2016;96:165-192. doi:10.1016/bs.aivir.2016.08.001 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC5388242/>

Irigoyen N, Firth AE, Jones JD, Chung BY, Siddell SG, Brierley I. High-Resolution Analysis of Coronavirus Gene Expression by RNA Sequencing and Ribosome Profiling. *PLoS Pathog.* 2016 Feb 26;12(2):e1005473. doi: 10.1371/journal.ppat.1005473. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC4769073/>

Malone B, Urakova N, Snijder EJ, Campbell EA. Structures and functions of coronavirus replication-transcription complexes and their relevance for SARS-CoV-2 drug design. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2022;23(1):21-39. doi:10.1038/s41580-021-00432-z <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC8613731/>

V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol.* 2021;19(3):155-170. doi:10.1038/s41579-020-00468-6 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC7592455/>

Hackstadt T, Chiramel AI, Hoyt FH, et al. Disruption of the Golgi Apparatus and Contribution of the Endoplasmic Reticulum to the SARS-CoV-2 Replication Complex. *Viruses.* 2021;13(9):1798. Published 2021 Sep 9. doi:10.3390/v13091798 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC8473243/>



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC7731901/>

Simabuco FM, Tamura RE, Pavan ICB, Morale MG, Ventura AM.
Molecular mechanisms and pharmacological interventions in the replication cycle of human coronaviruses.
Genet Mol Biol. 2020;44(1 Suppl 1):e20200212. Published 2020 Nov 23. doi:10.1590/1678-4685-GMB-2020-0212
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC7731901/>

Meccanismi molecolari legati alla produzione di proteine non strutturali (nsps) e all'assemblaggio del complesso di replicazione e trascrizione SARS-CoV-2 (RTC). **Processo 1:** dopo il riconoscimento del recettore cellulare ACE2 (Angiotensin Converting Enzyme 2), il nucleocapside virale viene rilasciato nel citoplasma per endocitosi, o fusione dell'involucro virale, con la membrana cellulare. **Processo 2:** la traduzione dei geni pp1a e pp1b dal genoma 5'-capped e 3'-poliadenilato (+) del virus produce le poliproteine pp1a o pp1ab, queste ultime generate da un frameshift -1 di ribosomi. Queste poliproteine vengono quindi scisse dalle proteasi virali generando 16 proteine virali non strutturali (nsps), alcune delle quali vengono utilizzate per assemblare l'RTC, inclusa la RNA polimerasi RNA-dipendente (RdRp o nsp12). Sono evidenziati gli interventi farmacologici mirati a punti specifici del ciclo di replicazione dei coronavirus. RTC: complesso di replica e trascrizione; RdRp: RNA polimerasi RNA-dipendente.

VIRUS A REPLICAZIONE DIFETTIVA

Meccanismo d'azione

In netto contrasto con i virus wild-type o vivi attenuati, i vettori virali a replicazione difettiva non riescono a produrre nuove particelle virali infettive quando infettano o trasducono la cellula di un vaccinato, tuttavia sono comunemente classificati come vaccini "vivi" (anche se in base alla [classificazione di virus](#), intesi come virioni, non si possono considerare esseri viventi e quindi non ha significato distinguerli in vivi o uccisi. Vedi [Vaccino Covid-19: le piattaforme tradizionali parte prima](#) da pag 4), perchè il principio immunogenico dei "vaccini genetici" consiste nell'espressione *de novo* degli antigeni del vaccino nelle cellule del vaccinato.

L'antigene, che dovrebbe indurre una risposta immunitaria protettiva, non è necessariamente contenuto nella particella virale ingegnerizzata. L'espressione dell'antigene è un processo che riproduce il ciclo vitale del virus in vivo, pertanto i sistemi di vettori virali "carenti di replicazione" che sono in grado di replicare le loro informazioni genetiche nelle cellule del vaccinato, ma non sono in grado di propagare l'infettività nel vaccinato, possono quindi anche essere definiti "carenti di propagazione".

Produzione

I vettori virali carenti di replicazione richiedono comunemente un substrato cellulare specifico per la produzione (cellule di produzione) che, a differenza delle cellule di un vaccinato, consente la formazione di progenie infettiva. Più comunemente, questo substrato cellulare è fatto per esprimere una o più proteine virali, che sono necessarie per l'assemblaggio di particelle virali infettive. Tale espressione può essere ottenuta mediante [trasfezione transitoria](#) o integrazione stabile di elementi genetici nella linea cellulare di produzione.

In tal modo, la linea cellulare è in grado di complementare *in trans* uno o più prodotti genici virali, che sono stati eliminati dal genoma virale, convertendo il virus ingegnerizzato in un vettore carente di replicazione.

Di conseguenza, il vettore che ne risulta è carente di replicazione perché la formazione di particelle infettive dipende dalla [trans-complementazione](#) di uno (o più) prodotti genici mancanti nelle cellule del vaccinato.²⁵

<https://smw.ch/article/doi/smw.2017.14465>

Funzionamento molecolare di vettori virali a replicazione difettiva.

I vettori virali con deficit di replicazione sono composti da tutte le proteine virali strutturali (qui schematicamente: proteine virali strutturali 1 e 2) e contengono il genoma virale. La produzione dei lotti (batch) viene eseguita nelle cosiddette "cellule produttrici", che esprimono una o più proteine virali per la trans-complementazione del genoma difettoso del vettore. In questo esempio, le cellule produttrici trasfettate stabilmente esprimono dalla loro cassetta di espressione genomica la "proteina strutturale 2" virale.

Il genoma del vettore è privo di "proteina strutturale 2" e codifica solo per "proteina strutturale 1" e "antigene vaccinale". Durante la produzione in batch (a sinistra e al centro), le particelle vettore infettive infettano le cellule produttrici, amplificano il loro genoma e producono la "proteina strutturale 1" e l'"antigene del vaccino". Si formano nuove particelle infettive, contenenti il genoma e la proteina strutturale 1 (espressa dal genoma del vettore) e la proteina strutturale 2 (espressa dal genoma della cellula produttrice). Dopo la somministrazione a un vaccinato, queste particelle virali carenti di replicazione infetteranno le cellule del vaccinato, determinando l'espressione della proteina strutturale 1 così come dell'antigene del vaccino. Tuttavia, a causa della mancanza della proteina strutturale 2 nelle cellule del vaccinato, non si possono formare ulteriori particelle infettive e l'infezione non si propaga. L'espressione dell'antigene del vaccino nelle cellule del vaccinato, porta alla risposta immunitaria desiderata.

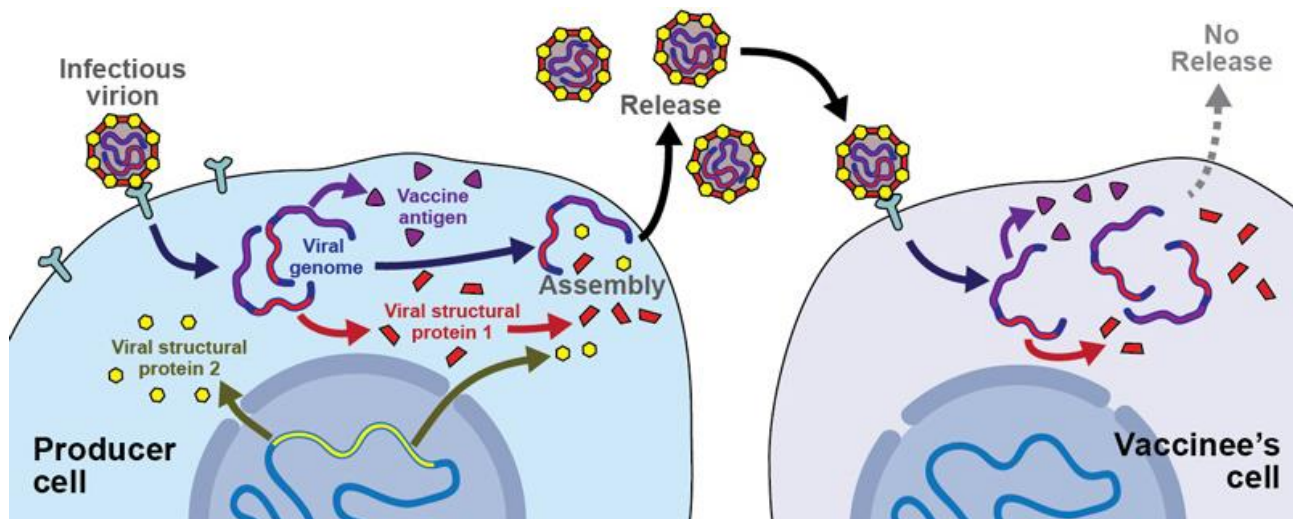
²⁵ Giacca M.

Metodologie per il trasferimento genico.

Terapia Genica. Springer, Milano (2011) https://doi.org/10.1007/978-88-470-1989-8_3

https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-88-470-1989-8_3

https://it.wikipedia.org/wiki/Terapia_genica#Gli_adenovirus



Profilo di sicurezza

La mancanza di replicazione in vivo dopo la somministrazione a un vaccinato, ha importanti implicazioni per l'uso clinico in quanto, se si esclude la reversione virale ²⁶, garantisce un livello di base di sicurezza per il paziente maggiore rispetto ai vaccini con vettori replicanti.

Sebbene gli eventi avversi associati all'uso di vettori per terapia genica possano essere imprevedibili ²⁷, l'infezione incontrollata e la malattia conseguente sono documentate e rappresentano una preoccupazione primaria per tutti i farmaci a base di virus e sono escluse se un vettore è carente o privo di replicazione.

²⁶ Hyvärinen A, Yongabi F, Mäkinen K, Wahlfors J, Pellinen R.

Recombination of replicon and helper RNAs and the emergence of propagation-competent vectors upon Sindbis virus vector production. *Int J Mol Med*. 2013 Aug;32(2):410-22. doi: 10.3892/ijmm.2013.1395. Epub 2013 May 28. PMID: 23716190. <https://www.spandidos-publications.com/ijmm/32/2/410>

Bett AJ, Prevec L, Graham FL.

Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors. *J Virol*. 1993 Oct;67(10):5911-21. doi: 10.1128/JVI.67.10.5911-5921.1993. PMID: 8371349; PMCID: PMC238011. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC238011/>

²⁷ Wilson JM.

Lessons learned from the gene therapy trial for ornithine transcarbamylase deficiency. *Mol Genet Metab*. 2009 Apr;96(4):151-7. doi: 10.1016/j.ymgme.2008.12.016. Epub 2009 Feb 10. PMID: 19211285. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S109671920800499X?via%3Dihub>

No authors listed

High-dose AAV gene therapy deaths. *Nat Biotechnol*. 2020 Aug;38(8):910. doi: 10.1038/s41587-020-0642-9. PMID: 32760031. <https://www.nature.com/articles/s41587-020-0642-9>

Hinderer C, Katz N, Buza EL, Dyer C, Goode T, Bell P, Richman LK, Wilson JM.

Severe Toxicity in Nonhuman Primates and Piglets Following High-Dose Intravenous Administration of an Adeno-Associated Virus Vector Expressing Human SMN. *Hum Gene Ther*. 2018 Mar;29(3):285-298. doi: 10.1089/hum.2018.015. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5865262/>

Wu C, Dunbar CE.

Stem cell gene therapy: the risks of insertional mutagenesis and approaches to minimize genotoxicity. *Front Med*. 2011;5(4):356-371. doi:10.1007/s11684-011-0159-1 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3508510/>

Baum C.

Parachuting in the epigenome: the biology of gene vector insertion profiles in the context of clinical trials. *EMBO Mol Med*. 2011 Feb;3(2):75-7. doi: 10.1002/emmm.201000110.

Ciò facilita le sperimentazioni cliniche e l'autorizzazione per l'uso umano. La garanzia di sicurezza diventa prioritaria per i vaccini da utilizzare in una popolazione sana che non è a rischio imminente di malattie gravi prevenibili con il vaccino, e quindi i sistemi di vettori virali con replicazione difettiva sono solitamente preferiti rispetto a quelli replicanti.

VETTORI VIRALI COMPETENTI PER LA REPLICAZIONE

Meccanismo d'azione

Analogamente ai vettori virali con replicazione difettiva, quelli competenti per la replicazione sono vaccini genetici e richiedono substrati di cellule eucariotiche per la produzione.

Per definizione, tuttavia, non dipendono dalla complementazione, e quindi non richiedono alcuna modificazione genetica delle cellule di produzione.

Produzione

I vettori virali competenti per la replicazione sono prodotti su linee cellulari eucariotiche secondo le GMP (Good Manufacturing Practice),²⁸ analogamente ai vaccini vivi attenuati per morbillo, parotite e rosolia, con processi di produzione industriale di routine da molto tempo già discussi nel documento [Vaccino Covid-19: le piattaforme tradizionali parte prima](#).

Di conseguenza, i vaccini umani attenuati sono d'interesse per la vettorializzazione, in particolare perché i processi di produzione sono già stabiliti, garantendo costi ragionevolmente bassi delle materie prime e dei reagenti.

Profilo di sicurezza

Le considerazioni sulla sicurezza sono al centro di ogni programma di sviluppo clinico basato sulla tecnologia dei vettori virali replicanti. Potenziali preoccupazioni e limitazioni normative possono emergere da due fattori indipendenti: la sicurezza del paziente e la sicurezza ambientale. Dipende da ogni vettore specifico e dal suo contesto d'uso se la diffusione ad altri individui o nell'ambiente rappresenta una possibilità e/o un rischio.

La gamma naturale dell'ospite e le vie di trasmissione del vettore virale aiuteranno a stabilire una valutazione del rischio ambientale²⁹. Il fatto che questi vettori siano classificati organismi geneticamente modificati deve essere preso in considerazione e implica una legislazione aggiuntiva.

La sicurezza del paziente è dettata dal profilo di rischio del virus parentale, in combinazione con eventuali modifiche potenzialmente attenuanti introdotte.

A volte, il processo di modificazione genetica per creare il vettore ingegnerizzato, cioè l'introduzione di un antigene vaccinale, può di per sé provocare un certo livello di attenuazione virale³⁰.

In altri casi, vengono apportate mutazioni o delezioni attenuanti specifiche, con l'obiettivo di migliorare la sicurezza per il paziente³¹.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3377063/>

²⁸ Gomez PL, Robinson JM. Vaccine Manufacturing. Plotkin's Vaccines. 2018;51-60.e1. doi:10.1016/B978-0-323-35761-6.00005-5 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7152262/>

²⁹ Baldo A, Galanis E, Tangy F, Herman P. Biosafety considerations for attenuated measles virus vectors used in virotherapy and vaccination. Hum Vaccin Immunother. 2016 May 3;12(5):1102-16. doi: 10.1080/21645515.2015.1122146. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4963060/>

³⁰ Buller RM, Smith GL, Cremer K, Notkins AL, Moss B. Decreased virulence of recombinant vaccinia virus expression vectors is associated with a thymidine kinase-negative phenotype. Nature. 1985 Oct 31-Nov 6;317(6040):813-5. doi: 10.1038/317813a0. PMID: 4058585. <https://www.nature.com/articles/317813a0>

³¹ Brun J, McManus D, Lefebvre C, Hu K, Falls T, Atkins H, Bell JC, McCart JA, Mahoney D, Stojdl DF.

L'uso di virus animali, che si sa o si prevede che non causino malattie negli esseri umani, può rappresentare un'ulteriore opzione da valutare ³².

Una delle strategie più comunemente utilizzate consiste però nell'impiego di vaccini vivi attenuati clinicamente convalidati come vettori (poliovirus, morbillo, febbre gialla). ³³

A seconda del contesto clinico di utilizzo, tuttavia, anche virus abbastanza patogeni per l'uomo, come il citomegalovirus replicante, vengono presi in considerazione ai fini della somministrazione del vaccino. ³⁴

MECCANISMI DELL'IMMUNOGENICITÀ DEI VACCINI A VETTORE VIRALE

DEFINIZIONI

L'ANTIGENICITÀ indica la capacità dell'antigene di combinarsi in maniera specifica con anticorpi e recettori per l'antigene.

L'IMMUNOGENICITÀ, nota anche come **POTERE IMMUNOGENO** indica la capacità dell'antigene di indurre una risposta immunitaria

I vaccini a vettori virali sono autoadiuvanti

Il sistema immunitario dei mammiferi si è evoluto per riconoscere in modo efficiente i virus infettivi e per attivare potenti risposte innate e adattive alle infezioni. Di conseguenza, sono stati identificati più sensori innati e percorsi che coordinano l'immunità ai virus. A seconda della loro natura e della strategia di replicazione del genoma, sono coinvolti recettori diversi di riconoscimento dei pattern.

Identification of genetically modified Maraba virus as an oncolytic rhabdovirus.
Mol Ther. 2010 Aug;18(8):1440-9. doi: 10.1038/mt.2010.103.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2927055/>

Mineta T, Rabkin SD, Yazaki T, Hunter WD, Martuza RL.
Attenuated multi-mutated herpes simplex virus-1 for the treatment of malignant gliomas.
Nat Med. 1995 Sep;1(9):938-43. doi: 10.1038/nm0995-938. PMID: 7585221.
<https://www.nature.com/articles/nm0995-938>

³² Agnandji ST, et al
Phase 1 Trials of rVSV Ebola Vaccine in Africa and Europe.
N Engl J Med. 2016 Apr 28;374(17):1647-60. doi: 10.1056/NEJMoa1502924.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5490784/>

³³ Mandl S, Sigal LJ, Rock KL, Andino R.
Poliovirus vaccine vectors elicit antigen-specific cytotoxic T cells and protect mice against lethal challenge with malignant melanoma cells expressing a model antigen.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Jul 7;95(14):8216-21. doi: 10.1073/pnas.95.14.8216.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC20956/>

Monath TP, et al Brighton Collaboration Viral Vector Vaccines Safety Working Group (V3SWG). Live virus vaccines based on a yellow fever vaccine backbone: standardized template with key considerations for a risk/benefit assessment.
Vaccine. 2015 Jan 1;33(1):62-72. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.10.004.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4656044/>

Tangy F, Naim HY.
Live attenuated measles vaccine as a potential multivalent pediatric vaccination vector.
Viral Immunol. 2005;18(2):317-26. doi: 10.1089/vim.2005.18.317.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16035943/>

³⁴ Hansen SG, et al
Effector memory T cell responses are associated with protection of rhesus monkeys from mucosal simian immunodeficiency virus challenge.
Nat Med. 2009 Mar;15(3):293-9. doi: 10.1038/nm.1935. Epub 2009 Feb 15. Erratum in: Nat Med. 2009 Apr;15(4):462. Erratum in: Nat Med. 2011 Dec;17(12):1692.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2720091/>

Come già discusso nel documento Immunopatologia³⁵, i sensori degli acidi nucleici includono il recettore Toll-like (TLR) 3, TLR7, TLR8 e TLR9 nell'endosoma, nonché molecole di riconoscimento citosolico come i recettori RIG-I simili RIG-I (gene I inducibile dall'acido retinoico), MDA5 (gene 5 del melanoma associato alla differenziazione), e sensori del DNA come cGAS (GMP-AMP sintasi ciclico).³⁶

Dopo il legame dei genomi virali, questi recettori attraverso l'NFκB (fattore nucleare "potenziatore della catena leggera kappa" delle cellule B attivate) e le chinasi della proteina attivata dal mitogeno (MAP), inducono la produzione di citochine pro-infiammatorie e chemochine.³⁷ Inoltre, la via del segnale del fattore di regolazione dell'interferone (IRF) 3 e dell'IRF7 porta all'induzione dell'interferone di tipo I (IFN-I)³⁸.

³⁵ [Studiesalute.it/salute
Immunopatologia](https://www.studiesalute.it/salute/immunopatologia)

³⁶ Iwasaki A.
A virological view of innate immune recognition.
Annu Rev Microbiol. 2012;66:177-196. doi:10.1146/annurev-micro-092611-150203
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3549330/>

Chen N, Xia P, Li S, Zhang T, Wang TT, Zhu J.
RNA sensors of the innate immune system and their detection of pathogens.
IUBMB Life. 2017;69(5):297-304. doi:10.1002/iub.1625
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7165898/>

Said EA, Tremblay N, Al-Balushi MS, Al-Jabri AA, Lamarre D.
Viruses Seen by Our Cells: The Role of Viral RNA Sensors.
J Immunol Res. 2018;2018:9480497. Published 2018 Apr 30. doi:10.1155/2018/9480497
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5952511/>

Ma Z, Ni G, Damania B.
Innate Sensing of DNA Virus Genomes.
Annu Rev Virol. 2018;5(1):341-362. doi:10.1146/annurev-virology-092917-043244
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6443256/>

Nie Y, Wang YY.
Innate immune responses to DNA viruses.
Protein Cell. 2013;4(1):1-7. doi:10.1007/s13238-012-2122-6
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4875446/pdf/13238_2012_Article_2122.pdf

Beachboard DC, Horner SM.
Innate immune evasion strategies of DNA and RNA viruses.
Curr Opin Microbiol. 2016 Aug;32:113-119. doi: 10.1016/j.mib.2016.05.015. Epub 2016 Jun 8.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4983539/>

Wilkins C, Gale M Jr.
Recognition of viruses by cytoplasmic sensors.
Curr Opin Immunol. 2010;22(1):41-47. doi:10.1016/j.coi.2009.12.003
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3172156/>

³⁷ Melchjorsen J.
Learning from the messengers: innate sensing of viruses and cytokine regulation of immunity - clues for treatments and vaccines.
Viruses. 2013;5(2):470-527. Published 2013 Jan 31. doi:10.3390/v5020470
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3640511/>

Iwasaki A, Medzhitov R.
Control of adaptive immunity by the innate immune system.
Nat Immunol. 2015 Apr;16(4):343-53. doi: 10.1038/ni.3123.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4507498/>

³⁸ Pichlmair A, Reis e Sousa C.
Innate recognition of viruses. *Immunity.* 2007 Sep;27(3):370-83. doi: 10.1016/j.immuni.2007.08.012.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.08.012>

Honda K, Takaoka A, Taniguchi T.
Type I interferon [corrected] gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors.
Immunity. 2006 Sep;25(3):349-60. doi: 10.1016/j.immuni.2006.08.009. Erratum in: *Immunity.* 2006 Nov;25(5):849.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.08.009>

Lo scopo evolutivo primario di questi percorsi consiste nella difesa antimicrobica, con lo “stato antivirale” indotto dall'IFN-I come paradigma³⁹.

Honda K, Taniguchi T.

IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat Rev Immunol.* 2006 Sep;6(9):644-58. doi: 10.1038/nri1900. PMID: 16932750. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16932750/>

Negishi H, Taniguchi T, Yanai H.

The Interferon (IFN) Class of Cytokines and the IFN Regulatory Factor (IRF) Transcription Factor Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018 Nov 1;10(11):a028423. doi: 10.1101/cshperspect.a028423. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6211389/>

³⁹ Lin F, Shen K.

Type I interferon: From innate response to treatment for COVID-19. *Pediatr Investig.* 2020 Dec 28;4(4):275-280. doi: 10.1002/ped4.12226. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7768291/>

Mdkhana B, Saheb Sharif-Askari N, Ramakrishnan RK, Goel S, Hamid Q, Halwani R. Nucleic Acid-Sensing Pathways During SARS-CoV-2 Infection: Expectations versus Reality. *J Inflamm Res.* 2021;14:199-216. Published 2021 Jan 26. doi:10.2147/JIR.S277716 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7847386/>

Acosta PL, Byrne AB, Hijano DR, Talarico LB.

Human Type I Interferon Antiviral Effects in Respiratory and Reemerging Viral Infections. *J Immunol Res.* 2020;2020:1372494. Published 2020 May 8. doi:10.1155/2020/1372494 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7231083/>

Mazewski C, Perez RE, Fish EN, Platanius LC.

Type I Interferon (IFN)-Regulated Activation of Canonical and Non-Canonical Signaling Pathways. *Front Immunol.* 2020;11:606456. Published 2020 Nov 23. doi:10.3389/fimmu.2020.606456 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7719805/>

Mesev EV, LeDesma RA, Ploss A.

Decoding type I and III interferon signalling during viral infection. *Nat Microbiol.* 2019 Jun;4(6):914-924. doi: 10.1038/s41564-019-0421-x. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6554024/>

Teijaro JR.

Pleiotropic Roles of Type 1 Interferons in Antiviral Immune Responses. *Adv Immunol.* 2016;132:135-158. doi:10.1016/bs.ai.2016.08.001 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7112115/>

Teijaro JR.

Type I interferons in viral control and immune regulation. *Curr Opin Virol.* 2016 Feb;16:31-40. doi: 10.1016/j.coviro.2016.01.001. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4821698/>

Abe T, Marutani Y, Shoji I.

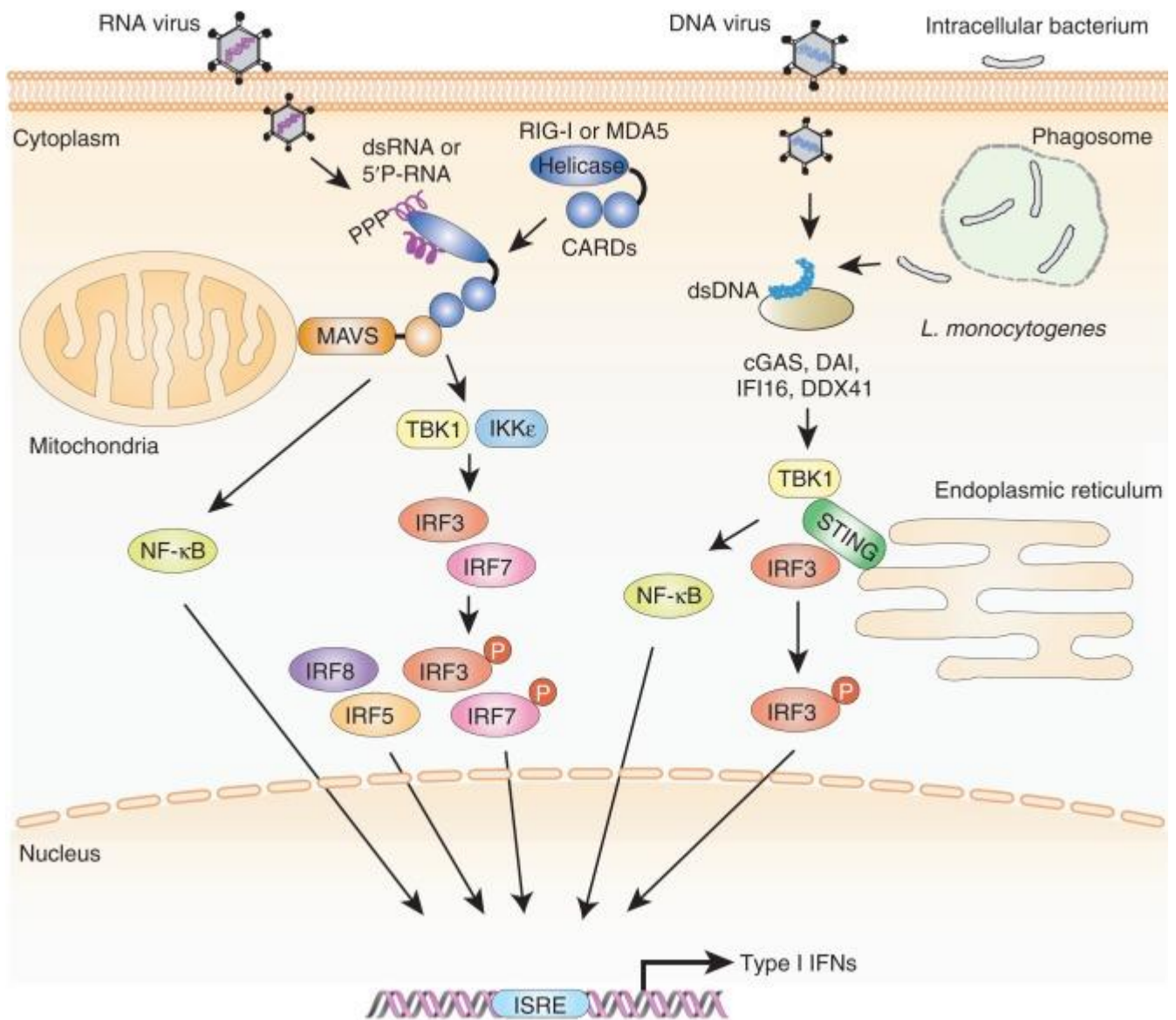
Cytosolic DNA-sensing immune response and viral infection. *Microbiol Immunol.* 2019;63(2):51-64. doi:10.1111/1348-0421.12669 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7168513/>

Takaoka A, Yanai H.

Interferon signalling network in innate defence. *Cell Microbiol.* 2006 Jun;8(6):907-22. doi: 10.1111/j.1462-5822.2006.00716.x. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16681834/>

Ivashkiv LB, Donlin LT.

Regulation of type I interferon responses. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(1):36-49. doi:10.1038/nri3581 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4084561/>



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6211389/>

Illustrazione schematica dell'induzione del gene dell'interferone di tipo I (IFN) da parte di fattori regolatori IFN (IRF) sul riconoscimento innato degli acidi nucleici citosolici. I geni IFN di tipo I, in particolare IFN- β , sono indotti tramite l'adattatore contenente il dominio TIR, incluso IFN- β (TRIF) a valle delle vie di segnalazione TLR3 e TLR4 e tramite la proteina di risposta primaria di differenziazione mieloide 88 (MyD88) a valle di TLR7 e le vie di segnalazione TLR9. Inoltre, il percorso TRIF segnala esclusivamente a IRF3 per indurre l'espressione del gene IFN- β . IRF7 può anche essere coinvolto per TLR3, ma non per l'induzione del gene IFN di tipo I indotto dal recettore dell'acido retinoico (RIG-I)-simile (RLR) 4. Nel percorso MyD88, IRF1, IRF5 e IRF7 formano un complesso con MyD88. Tra gli IRF legati a MyD88, IRF7 è fondamentale per l'induzione robusta dell'IFN di tipo I nelle cellule dendritiche plasmacitoidi (pDC). IRF5 è parzialmente coinvolto nell'induzione del gene IFN di tipo I nelle pDC, mentre IRF1 è importante per l'espressione degli IFN di tipo I nelle DC convenzionali (cDC). Al contrario, IRF8 è coinvolto nell'espressione dei geni IFN di tipo I nei pDC, ma non si lega a MyD88. IRF3 inoltre non si lega a MyD88, ma è coinvolto nell'induzione del gene IFN di tipo I mediata da *Listeria monocytogenes* nelle pDC.

Questi programmi di trascrizione indotti da virus attivano le cellule che presentano l'antigene e istruiscono il sistema immunitario adattativo ad indurre potenti risposte di cellule T helper di tipo 1 (Th1), comprese le cellule T CD8⁺.⁴⁰

⁴⁰ Kervevan J, Chakrabarti LA.

Role of CD4⁺ T Cells in the Control of Viral Infections: Recent Advances and Open Questions. *Int J Mol Sci.* 2021;22(2):523. Published 2021 Jan 7. doi:10.3390/ijms22020523 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7825705/>

Snell LM, Osokine I, Yamada DH, De la Fuente JR, Elsaesser HJ, Brooks DG.

Per questi motivi i vaccini a vettore virale sono generalmente "auto-adiuvati". Il significato di questo termine si riferisce alla constatazione che l'attività adiuvante è "intrinseca", senza necessità di integrazione.

L'attenuazione e la replicazione difettiva possono limitare l'infiammazione sistemica, prevenendo, o almeno riducendo sostanzialmente, la sensazione soggettiva di malattia che deriverebbe da un'infezione naturale. A livello cellulare e nei micro-compartimenti tissutali in cui i vaccini a vettore attenuati vengono veicolati, le vie cellulari di attivazione innata possono funzionare abbastanza normalmente. Tuttavia, la capacità di replicazione e il livello di attenuazione non possono predire facilmente le capacità auto-adiuvanti dei vaccini con virus attenuati replicanti, ma va valutata caso per caso.⁴¹

PARTICELLE VIRALI E ATTIVAZIONE DELLE CELLULE T CITOTOSSICHE

L'induzione delle cellule T CD8⁺ citotossiche (CTL) rappresentano un importante correlato di protezione contro molti tipi di patogeni intracellulari, nonché contro i tumori⁴².

Di conseguenza, una robusta immunità CTL è un elemento chiave che dovrebbe essere prodotto per ottenere una potente protezione contro una serie di agenti patogeni, e l'immunità CTL è più potentemente indotta dai virus. In quanto "sistema di trasporto genico naturale", i virus sfruttano il meccanismo di traduzione della cellula ospite per l'espressione genica.

Overcoming CD4 Th1 Cell Fate Restrictions to Sustain Antiviral CD8 T Cells and Control Persistent Virus Infection.
Cell Rep. 2016;16(12):3286-3296. doi:10.1016/j.celrep.2016.08.065
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5669380/>

Ekkens MJ, Shedlock DJ, Jung E, Troy A, Pearce EL, Shen H, Pearce EJ.
Th1 and Th2 cells help CD8 T-cell responses.
Infect Immun. 2007 May;75(5):2291-6. doi: 10.1128/IAI.01328-06.
<https://iai.asm.org/content/75/5/2291>

Daniels KA, O'Donnell CL, Castonguay C, Strutt TM, McKinsty KK, Swain SL, Welsh RM.
Virus-induced natural killer cell lysis of T cell subsets.
Virology. 2020 Jan 2;539:26-37. doi: 10.1016/j.virol.2019.10.003.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7553765/>

Schmidt ME, Varga SM.
The CD8 T Cell Response to Respiratory Virus Infections.
Front Immunol. 2018 Apr 9;9:678. doi: 10.3389/fimmu.2018.00678.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5900024/>

⁴¹ Symons JA, Alcam A, Smith GL.
Vaccinia virus encodes a soluble type I interferon receptor of novel structure and broad species specificity.
Cell. 1995 May 19;81(4):551-60.
doi: 10.1016/0092-8674(95)90076-4.

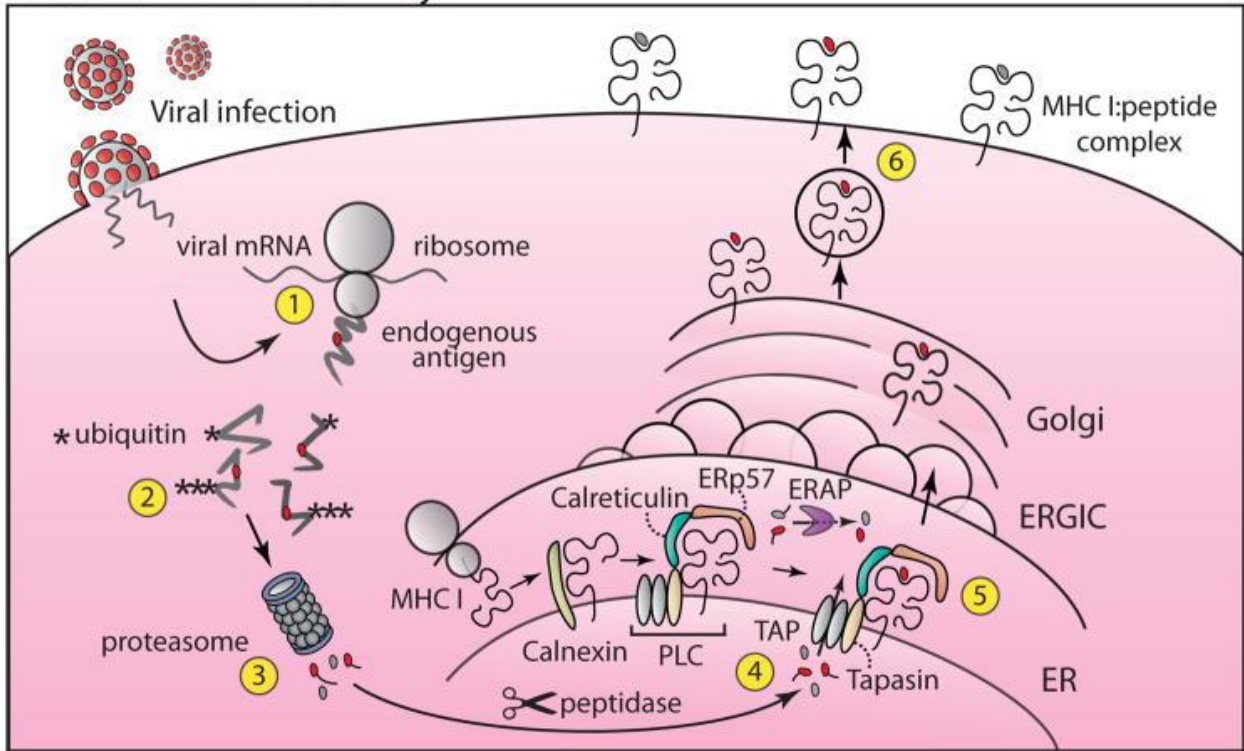
Waibler Z, Anzaghe M, Frenz T, Schwantes A, Pöhlmann C, Ludwig H, Palomo-Otero M, Alcamí A, Sutter G, Kalinke U.
Vaccinia virus-mediated inhibition of type I interferon responses is a multifactorial process involving the soluble type I interferon receptor B18 and intracellular components.
J Virol. 2009 Feb;83(4):1563-71. doi: 10.1128/JVI.01617-08.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2643777/>

⁴² Vesely MD, Schreiber RD.
Cancer immunoeediting: antigens, mechanisms, and implications to cancer immunotherapy.
Ann N Y Acad Sci. 2013 May;1284(1):1-5. doi: 10.1111/nyas.12105.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3648872/>

van der Gracht ETI, Beyrend G, Abdelaal T, et al.
Memory CD8⁺ T cell heterogeneity is primarily driven by pathogen-specific cues and additionally shaped by the tissue environment.
iScience. 2021 Jan 22;24(1):101954. Published 2020 Dec 16. doi:10.1016/j.isci.2020.101954
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7797528/>

I prodotti genici sono sintetizzati nel citosol delle cellule infettate e i suoi frammenti peptidici, attraverso il proteasoma e il trasportatore associato al complesso dell'antigene (TAP), hanno accesso diretto all'apparato di caricamento del peptide del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I dell'ospite (MHC). Questo processo è denominato "presentazione diretta".⁴³

Classical MHC I Pathway



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5508990/>

Presentazione classica dell'antigene di classe I.

Il percorso classico monitora il sé e le proteine estranee che vengono sintetizzate dalle cellule (**Fase 1**). Le proteine espresse destinate alla degradazione vengono coniugate con l'ubiquitina (**Fase 2**) seguita dalla degradazione proteasomale (**Fase 3**). I peptidi lunghi vengono tagliati dalle peptidasi citosoliche. Una frazione di peptidi (rosso) viene traslocata nel lume dell'ER tramite TAP (**Passaggio 4**). Alcuni peptidi lunghi subiscono la rifilatura in ER da ERAP. Le molecole MHC I di nuova sintesi si associano prima alla chaperone calnexina e poi tramite tapasin a TAP nel PLC. Dopo il legame del peptide trasportato con TAP (**Passaggio 5**), i complessi MHC I: peptide vengono trasportati attraverso la via secretoria alla membrana plasmatica (**Passaggio 6**) dove vengono presentati ai linfociti T citotossici CD8⁺. Trasportatore associato all'elaborazione dell'antigene (TAP), reticolo endoplasmatico aminopeptidasi (ERAP), complesso di caricamento del peptide (PLC), compartimento intermedio ER-Golgi (ERGIC).

Nel caso invece dei vaccini inattivati, si ha l'assorbimento mediante fagocitosi degli antigeni peptidici, la degradazione nel proteasoma e la presentazione su complessi MHC di classe I delle cellule professionali di presentazione dell'antigene (APC) mediante il processo di cross-priming (o cross-presentazione).⁴⁴

⁴³ Neefjes J, Jongmsa ML, Paul P, Bakke O.

Towards a system understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation.

Nat Rev Immunol. 2011 Nov 11;11(12):823-36. doi: 10.1038/nri3084. PMID: 22076556.

<https://www.nature.com/articles/nri3084>

⁴⁴ Flinsenbergh TW, Compeer EB, Boelens JJ, Boes M.

Antigen cross-presentation: extending recent laboratory findings to therapeutic intervention.

Clin Exp Immunol. 2011;165(1):8-18. doi:10.1111/j.1365-2249.2011.04411.x

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3110316/>

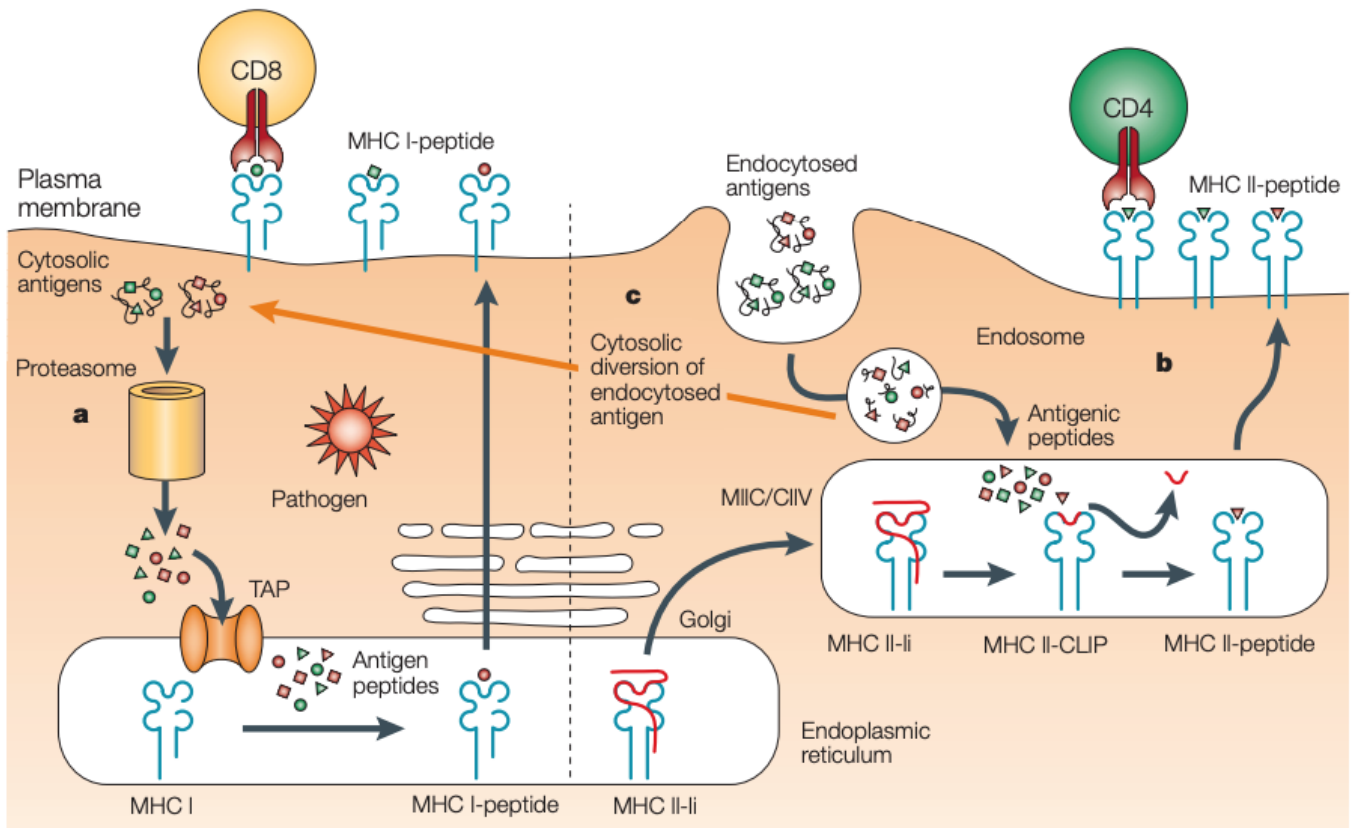
Heath WR, Carbone FR.

Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance.

Nat Rev Immunol. 2001 Nov;1(2):126-34. doi: 10.1038/35100512.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11905820/>

<https://www.semanticscholar.org/paper/Cross-presentation-in-viral-immunity-and-Heath-Carbone/e856f7ecc2b6a6e0364315de1e97f57f810e85f9>



<https://www.semanticscholar.org/paper/Cross-presentation-in-viral-immunity-and-Heath-Carbone/e856f7ecc2b6a6e0364315de1e97f57f810e85f9>
Diverse vie di elaborazione dell'antigene per le molecole MHC di classe I e II. **a)** Le molecole MHC di classe I presentano peptidi derivati principalmente da proteine sintetizzate a livello endogeno di origine propria o patogena. Queste proteine vengono degradate in peptidi dal proteasoma e quindi trasportate attraverso i trasportatori delle molecole di elaborazione dell'antigene (TAP) nel reticolo endoplasmatico per il caricamento sulle molecole MHC di classe I. **b)** Al contrario, le molecole MHC di classe II presentano proteine che entrano nella cellula attraverso la via endocitica. Durante la maturazione delle molecole MHC di classe II, viene impedito loro di legarsi agli antigeni endogeni nel reticolo endoplasmatico per associazione con la catena invariante (Ii). I complessi catena invariante-MHC di classe II (MHC II-Ii) si spostano attraverso il Golgi fino al compartimento MIIC / CIIV dove la catena invariante viene degradata a CLIP (per il peptide a catena invariante associato alla classe II). CLIP viene quindi rimosso dai complessi CLIP-MHC di classe II (MHC-CLIP) e scambiato con il peptide antigenico. **c)** Le cellule dendritiche possono endocitare gli antigeni di altre cellule e presentarli in modo crociato ai linfociti T citotossici CD8⁺. La dipendenza TAP di tale presentazione incrociata indica che implica la diversione degli antigeni cellulari nella via convenzionale MHC di classe I, sebbene i meccanismi per questa deviazione siano ancora indefiniti. Nella maggior parte dei casi, questi antigeni verranno anche processati nel percorso di presentazione MHC di classe II per il riconoscimento da parte dei linfociti T helper CD4⁺. (MIIC, MHC II compartimento di carico; CIIV, vescicole MHC II.)

Di conseguenza, la potente attivazione, espansione e differenziazione delle risposte CTL (induzione CTL) da parte di vaccini a vettore virale attenuati è, almeno in parte, dovuta all'espressione di antigeni a vettori in APC professionali come le cellule dendritiche,⁴⁵ attraverso il processo di presentazione diretta o di cross-

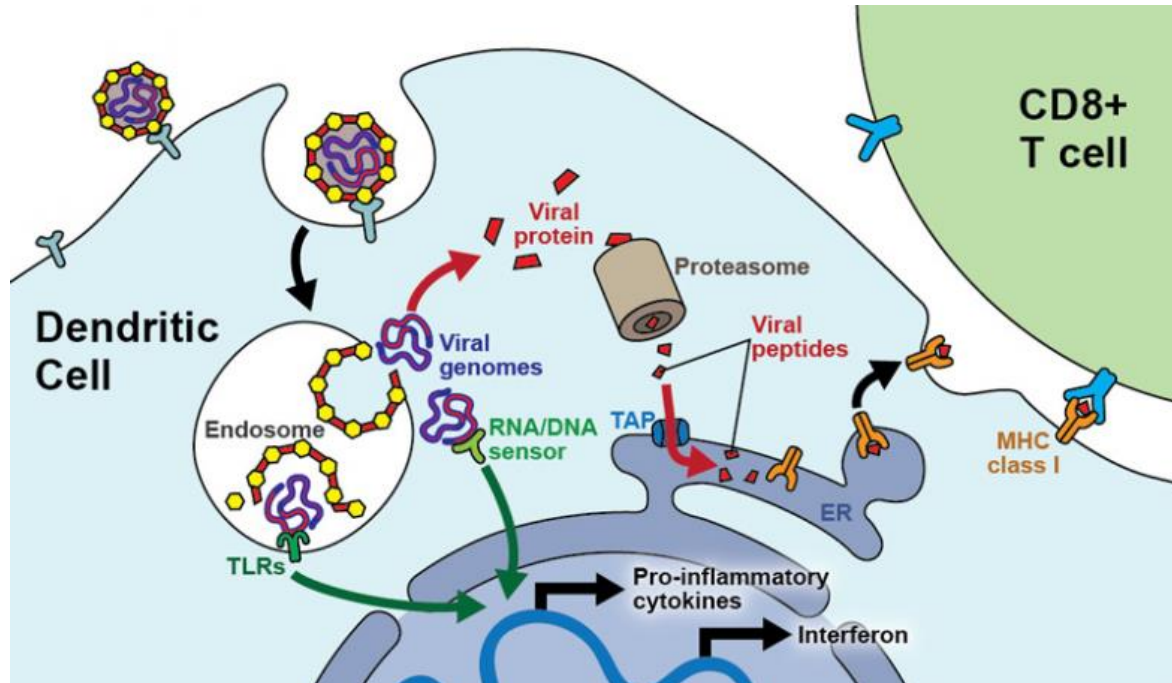
Cruz FM, Colbert JD, Merino E, Kriegsman BA, Rock KL.
 The Biology and Underlying Mechanisms of Cross-Presentation of Exogenous Antigens on MHC-I Molecules.
 Annu Rev Immunol. 2017;35:149-176. doi:10.1146/annurev-immunol-041015-055254
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5508990/>

Rock KL, Shen L.
 Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance.
 Immunol Rev. 2005 Oct;207:166-83. doi: 10.1111/j.0105-2896.2005.00301.x.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16181335/>

Baker K, Rath T, Lencer WI, Fiebiger E, Blumberg RS.
 Cross-presentation of IgG-containing immune complexes.
 Cell Mol Life Sci. 2013 Apr;70(8):1319-34. doi: 10.1007/s00018-012-1100-8.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3609906/>

⁴⁵ Woolard SN, Kumaraguru U.

presentazione.⁴⁶ È interessante notare che le cellule dendritiche possono apparentemente essere infettate o almeno trasdotte da una gamma molto ampia di virus anche in assenza del recettore virale specifico, e ciò può servire come strategia per attivare le risposte antivirali delle CTL.⁴⁷



<https://smw.ch/article/doi/smw.2017.14465>

Meccanismi di attivazione immunitaria da parte di vaccini a vettore virale. Le particelle di vettore di vaccino infettano le cellule dendritiche (DC) di un vaccinato. In questo schema, le particelle di vettore vengono assorbite dall'endocitosi mediata dal recettore e all'interno dell'endosoma rilasciano il loro genoma nel citoplasma della DC. Se il genoma virale viene esposto all'interno dell'endosoma piuttosto che essere rilasciato nel citoplasma, i recettori Toll-like (TLR) lo rilevano. Una volta all'interno del citoplasma, il genoma virale viene amplificato e rilevato da sensori citoplasmatici di acidi nucleici virali ("sensore RNA / DNA").

Entrambe le vie segnalano attraverso vie comuni come le vie NFκB e MAPK, determinando l'attivazione trascrizionale di citochine pro-infiammatorie ma anche nella produzione di interferone di tipo I. Complessivamente, questi eventi portano all'attivazione funzionale della cellula dendritica. Contemporaneamente, verranno espresse le informazioni genomiche virali, portando alla sintesi di proteine virali. Una parte di essa viene degradata dal

Viral vaccines and CTL response.

J Biomed Biotechnol. 2010;2010:141657. doi: 10.1155/2010/141657.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20379365/>

Ahlers JD, Belyakov IM.

Memories that last forever: strategies for optimizing vaccine T-cell memory.

Blood. 2010;115(9):1678-1689. doi:10.1182/blood-2009-06-227546

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2920202/>

⁴⁶ Shen X, Wong SB, Buck CB, Zhang J, Siliciano RF.

Direct priming and cross-priming contribute differentially to the induction of CD8+ CTL following exposure to vaccinia virus via different routes.

J Immunol. 2002 Oct 15;169(8):4222-9. doi: 10.4049/jimmunol.169.8.4222.

<https://www.jimmunol.org/content/169/8/4222.long>

⁴⁷ Freigang S, Probst HC, van den Broek M.

DC infection promotes antiviral CTL priming: the 'Winkelried' strategy.

Trends Immunol. 2005 Jan;26(1):13-8. doi: 10.1016/j.it.2004.11.013.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15629404/>

Ludewig B.

Dendritic cell vaccination and viral infection--animal models.

Curr Top Microbiol Immunol. 2003;276:199-214. doi: 10.1007/978-3-662-06508-2_9.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12797449/>

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04685603>

proteasoma e i frammenti peptidici risultanti vengono convogliati attraverso il trasportatore associato alla presentazione dell'antigene (TAP) nel reticolo endoplasmatico (ER). All'interno dell'ER, questi peptidi virali vengono caricati su molecole MHC di classe I, che vengono quindi esportate sulla superficie cellulare per la presentazione alle cellule T CD8⁺ specifiche del virus. L'attivazione funzionale simultanea del DC da parte dei sensori innati di cui sopra garantisce un priming efficiente delle cellule T CD8⁺.

Come discusso sopra, i vaccini a vettore virale sono costituiti da un virus ricombinante ingegnerizzato che consente la produzione endogena di livelli elevati dell'antigene vaccinale, nel caso del SARS-Cov-2 la proteina Spike, da parte delle cellule ospiti presentanti l'antigene (APC) e di conseguenza, l'induzione di livelli elevati di risposte immunitarie umorali e cellulari⁴⁸. Grazie alla naturale capacità dei vettori virali di infettare le cellule ospiti e per la presenza di componenti virali che stimolano il sistema immunitario innato, questi vaccini non richiedono adiuvanti⁴⁹.

Dopo l'infezione delle cellule ospiti, il *vettore virale replicante* genera una progenie infettiva che consente di amplificare e produrre la sequenza antigenica in ogni ciclo di replicazione⁵⁰.

I vettori virali replicativi comuni includono il virus del morbillo (MV), l'adenovirus (Ad) e il virus della stomatite vescicolare (VSV)⁵¹. Sebbene questa piattaforma conferisca alti livelli di immunogenicità, il potenziale ritorno alla virulenza rimane un problema di sicurezza⁵².

I *vettori virali non replicativi* invece non sono in grado di produrre progenie infettiva, in quanto tutto il materiale genetico necessario per la replicazione viene rimosso, garantendo un profilo di sicurezza migliore.

Tuttavia, a causa della carenza di replicazione, sono necessarie dosi più elevate per conferire l'immunità, che possono provocare reazioni immunitarie indesiderate contro il vettore stesso.

I vettori virali non replicativi più comuni includono adenovirus [es. Adenovirus umano sierotipo 5 (Ad5) e sierotipo 26 (Ad26)], adenovirus-associati (AAV), alphavirus e virus vaccinia Ankara (MVA) modificato.⁵³

⁴⁸ Ura T, Okuda K, Shimada M.
Developments in Viral Vector-Based Vaccines.
Vaccines (Basel). 2014;2(3):624-641. Published 2014 Jul 29. doi:10.3390/vaccines2030624
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4494222>

Krause A, Worgall S.
Delivery of antigens by viral vectors for vaccination.
Ther Deliv. 2011 Jan;2(1):51-70. doi: 10.4155/tde.10.84.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22833925/>

⁴⁹ Sebastian S, Lambe T.
Clinical Advances in Viral-Vectored Influenza Vaccines.
Vaccines (Basel). 2018;6(2):29. Published 2018 May 24. doi:10.3390/vaccines6020029
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6027524/>

⁵⁰ van Riel D, de Wit E.
Next-generation vaccine platforms for COVID-19.
Nat Mater. 2020 Aug;19(8):810-812. doi: 10.1038/s41563-020-0746-0.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32704139/>

⁵¹ Robert-Guroff M.
Replicating and non-replicating viral vectors for vaccine development.
Curr Opin Biotechnol. 2007 Dec;18(6):546-56. doi: 10.1016/j.copbio.2007.10.010. Epub 2007 Dec 11.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2245896/>

⁵² Choi Y, Chang J.
Viral vectors for vaccine applications.
Clin Exp Vaccine Res. 2013;2(2):97-105. doi:10.7774/cevr.2013.2.2.97
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3710930/>

⁵³ Pinschewer DD.
Virally vectored vaccine delivery: medical needs, mechanisms, advantages and challenges.
Swiss Med Wkly. 2017 Aug 8;147:w14465. doi: 10.4414/sm.w.2017.14465. PMID: 28804866.
<https://smw.ch/article/doi/sm.w.2017.14465>

Key features of replicating and non-replicating vaccine vectors

Viral vector	Type	Insert	Advantages	Disadvantages
Adenovirus	Non-replicating; ds DNA	7–8 kb	<p><i>Common features:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Targets mucosal inductive sites Infects dividing, non-dividing, and dendritic cells No integration Physically and genetically stable <p><i>Specific for non-replicating vector:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Safe Long history of gene therapy use Multiple serotypes and chimeric forms 	<ul style="list-style-type: none"> Prior immunity to Ad5 High doses needed to elicit immunity
Adenovirus	Replicating ds DNA	3–4 kb	<p><i>Specific for replicating vector:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Common features above Low dose, mucosal delivery Persistent immunity Induction of immune modulators Safe as an oral vaccine 	<ul style="list-style-type: none"> Small insert size Concern for intranasal administration
Adeno-associated virus	Non-replicating; ss DNA	<5 kb	<ul style="list-style-type: none"> Resistant to acid; physically stable Alternate serotypes available Tropic for dendritic cells Non-pathogenic 	<ul style="list-style-type: none"> Difficult production uses helper virus Possible integration Prior immunity to prevalent AAV2
Alphavirus	Non-replicating; +ss RNA	<8 kb	<ul style="list-style-type: none"> No integration Does not elicit anti-vector immunity Targets dendritic cells Highly immunogenic 	<ul style="list-style-type: none"> Safety concerns regarding VEE Difficult to produce
Herpesvirus	Non-replicating; ds DNA	<50 kb	<ul style="list-style-type: none"> Infects many cell types; targets mucosa Durable immunity Induces Th1 responses 	<ul style="list-style-type: none"> Prior immunity Lesser immunogenicity Difficult to manufacture
Measles virus	Replicating; -ss RNA	>5 kb	<ul style="list-style-type: none"> Persistent immunity Infects dendritic cells, macrophages No integration; genetic stability 	<ul style="list-style-type: none"> Prior immunity
Poxviruses: Vaccinia	Replicating; ds DNA	>10 kb	<ul style="list-style-type: none"> Excellent immunogenicity with history of eradicating smallpox 	<ul style="list-style-type: none"> Safety concerns in immune compromised
Poxviruses: NYVAC; MVA	Non-replicating; ds DNA	>10 kb	<ul style="list-style-type: none"> Excellent immunogenicity; more immunogenic than avian poxviruses 	<ul style="list-style-type: none"> Prior immunity
Poxviruses: ALVAC; FPV	Non-replicating; ds DNA	>10 kb	<ul style="list-style-type: none"> No prior immunity 	<ul style="list-style-type: none"> Less immunogenic than mammalian poxviruses
Vesicular stomatitis virus	Replicating; -ss RNA	>5 kb	<ul style="list-style-type: none"> No integration; high level expression Ease of production No prior immunity Mucosal administration 	<ul style="list-style-type: none"> Safety; potentially neurovirulent Attenuated forms less immunogenic

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2245896/>

I vettori adenovirali sono stati ampiamente studiati per la loro applicazione come vettori di rilascio genico. Sono virus a DNA a doppio filamento, lineari, senza involucro con una capacità di incorporazione del transgene fino a 8 kbps. La maggior parte delle cellule umane può essere facilmente infettata con vettori adenovirali poiché esprimono i recettori adenovirali sulla superficie cellulare (coinvolti nel legame alla cellula ospite) e i recettori di ingresso dell'integrina (per l'endocitosi e l'ingresso virale). Finora, sono i vettori virali più comuni utilizzati negli studi clinici per vaccini, terapia genica e applicazioni oncologiche.⁵⁴ Diversi adenovirus non umani, come quelli

⁵⁴ Lee C.S., Bishop E.S., Zhang R., Yu X., Farina E.M., Yan S.

Adenovirus-mediated gene delivery: potential applications for gene and cell-based therapies in the new era of personalized medicine. *Genes Dis.* 2017;4:43–63. doi: 10.1016/j.gendis.2017.04.001.

derivati dagli scimpanzé (ad esempio ChAd3, ChAd6, ChAd63), sono in fase di sperimentazione su modelli umani e animali.⁵⁵

LA STABILITÀ DEI VACCINI A VETTORI VIRALI: STRATEGIE DI CONSERVAZIONE

Le condizioni di conservazione dei vaccini virali a vettore dipendono fortemente dalle caratteristiche particolari di ciascun virus ricombinante, che determineranno la stabilità del vaccino e di conseguenza la sua durata.

Alcuni virus, inclusi gli adenovirus, sono più sensibili alla degradazione termica, causando una perdita di infettività⁵⁶.

L'esposizione a cicli di congelamento e scongelamento, e l'ossidazione da parte dei radicali liberi sono altri fattori che possono promuovere l'instabilità virale e la degradazione⁵⁷. Pertanto, la determinazione delle condizioni di conservazione ottimali per la distribuzione di vaccini a base virale è cruciale per mantenere l'attività farmaceutica a lungo termine⁵⁸.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5609467/>

Stasiak A.C., Stehle T.

Human adenovirus binding to host cell receptors: a structural view.

Med. Microbiol. Immunol. (Berl.) 2020;209:325–333. doi: 10.1007/s00430-019-00645-2.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7248032/>

⁵⁵ Robert-Guroff M.

Replicating and non-replicating viral vectors for vaccine development.

Curr. Opin. Biotechnol. 2007;18:546–556. doi: 10.1016/j.copbio.2007.10.010.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2245896/>

Colloca S, et al

Vaccine vectors derived from a large collection of simian adenoviruses induce potent cellular immunity across multiple species.

Sci Transl Med. 2012 Jan 4;4(115):115ra2. doi: 10.1126/scitranslmed.3002925.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3627206/>

Wold WS, Toth K.

Adenovirus vectors for gene therapy, vaccination and cancer gene therapy.

Curr Gene Ther. 2013;13(6):421-433. doi:10.2174/1566523213666131125095046

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4507798/>

⁵⁶ Rexroad J., Wiethoff C.M., Green A.P., Kierstead T.D., Scott M.O., Middaugh C.R.

Structural stability of adenovirus type 5.

J. Pharm. Sci. 2003;92:665–678. doi: 10.1002/jps.10340

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12587128/>

⁵⁷ Pelliccia M., Andreozzi P., Paulose J., D'Alicarnasso M., Cagno V., Donalisio M.

Additives for vaccine storage to improve thermal stability of adenoviruses from hours to months.

Nat. Commun. 2016;7 doi: 10.1038/ncomms13520

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5141364/>

⁵⁸ Bell K.N., Hogue C.J., Manning C., Kendal A.P.

Risk factors for improper vaccine storage and handling in private provider offices.

Pediatrics. 2001;107 doi: 10.1542/peds.107.6.e100.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11389298/>

Jones K.L., Drane D., Gowans E.J.

Long-term storage of DNA-free RNA for use in vaccine studies.

BioTechniques. 2007;43:675–681. doi: 10.2144/000112593.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4526277/>

Chen Y., Liao Q., Chen T., Zhang Y., Yuan W., Xu J., Zhang X.

Freeze-drying formulations increased the adenovirus and poxvirus vaccine storage times and antigen stabilities.

Viol. Sin. 2020;1–8. doi: 10.1007/s12250-020-00250-1.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7372743/>

In generale, i vaccini virali a vettori autorizzati sono conservati a circa 2-8°C o a basse temperature di congelamento (da -80 a -55°C) con una durata di oltre un anno⁵⁴.

Formulazioni liquide contenenti saccarosio, polisorbato-80 e inibitori dell'ossidazione da radicali liberi sono state impiegate per vaccini a vettore adenovirale, e hanno dimostrato una perdita minima di infettività dell'adenovirus e stabilità prolungata per 24 mesi a 4°C⁵⁹.

Una strategia di disidratazione come la liofilizzazione può aumentare la stabilità del vaccino a vettore virale ed eliminare la necessità di conservare il prodotto congelato.⁵⁴

Agenti protettivi come il polietilenglicole (PEG) e il destrano applicati durante la liofilizzazione possono proteggere il virus dai danni e aiutare a mantenere l'attività virale⁶⁰.

La liofilizzazione in saccarosio ha dimostrato una perdita minima del titolo virale per un periodo di 1 anno se conservata a 4 ° C.⁶¹

CRITICITA' E LIMITAZIONI DEI VACCINI A VETTORI VIRALI

I costi di sviluppo clinico dell'ordine di diverse centinaia di milioni di dollari, sono comuni alla maggior parte dei vaccini ad uso profilattico, e la produzione GMP, i test di rilascio del lotto e l'approvazione normativa sono particolarmente onerosi per i prodotti a vettore virale.

Inoltre, alcune limitazioni sono intrinseche agli approcci vaccinali a vettori virali e sono discusse di seguito.

Immunità anti-vettore

Dal punto di vista dell'immunogenicità e dell'efficacia, un limite dei sistemi di somministrazione del vaccino virale consiste nell'interferenza derivante dall'“immunità anti-vettore”.

Lo stesso fenomeno può manifestarsi essenzialmente in due modi:

Immunità anti-vettore preesistente

Gli individui immuni al virus parentale wild type, da cui deriva il vettore vaccinale virale, tendono a rispondere poco alla vaccinazione. Questo fenomeno è stato notato in modo prominente negli studi sui vaccini contro l'HIV che si basavano su vettori basati su adenovirus 5 (Ad5).

Quando confrontati con individui sieronegativi per Ad5, i partecipanti allo studio con immunità anticorpale ad Ad5 hanno presentato una risposta scarsa alla vaccinazione⁶².

⁵⁹ Evans R.K., Nawrocki D.K., Isopi L.A., Williams D.M., Casimiro D.R., Chin S.
Development of stable liquid formulations for adenovirus-based vaccines.
J. Pharm. Sci. 2004;93:2458–2475. doi: 10.1002/jps.20157
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15349956/>

⁶⁰ Kraan H, van Herpen P, Kersten G, Amorij JP.
Development of thermostable lyophilized inactivated polio vaccine.
Pharm Res. 2014;31(10):2618-2629. doi:10.1007/s11095-014-1359-6
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4197379/>

⁶¹ Croyle M.A., Cheng X., Wilson J.M.
Development of formulations that enhance physical stability of viral vectors for gene therapy.
Gene Ther. 2001;8:1281–1290. doi: 10.1038/sj.gt.3301527
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11571564/>

⁶² Flatz L, et al
Gene-based vaccination with a mismatched envelope protects against simian immunodeficiency virus infection in nonhuman primates.
J Virol. 2012 Aug;86(15):7760-70. doi: 10.1128/JVI.00599-12.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3421661/>

McElrath MJ, et al
Step Study Protocol Team. HIV-1 vaccine-induced immunity in the test-of-concept Step Study: a case-cohort analysis.

Il meccanismo sottostante consiste nell'interferenza immunologica della cosiddetta "immunità anti-vettore", che può comprendere meccanismi sia umorali che cellulari.⁶³

Esperimenti effettuati con il trasferimento del siero negli animali hanno dimostrato che l'infezione da Ad5, che in alcune aree del globo è abbastanza comune, provoca "anticorpi interferenti" che bloccano l'immunogenicità dei vettori basati su Ad5.⁶⁴

È presumibile che questi anticorpi neutralizzino le particelle del vettore virale del vaccino rendendole non infettive e innescando la loro degradazione, come avviene con l'infezione naturale in cui gli anticorpi servono principalmente per prevenire la reinfezione virale.⁶⁵

Immunità anti-vettore indotta dalla vaccinazione

Poiché la maggior parte dei vaccini richiede più somministrazioni per ottenere una protezione immunitaria ottimale e spesso sono necessarie vaccinazioni di richiamo regolari per mantenere l'immunità nel corso degli anni, l'induzione dell'immunità anti-vettore in seguito alla vaccinazione primaria, rappresentata principalmente da anticorpi interferenti, può ridurre drasticamente l'efficacia delle immunizzazioni di richiamo.

I produttori dei vaccini hanno tratto una serie di conclusioni da queste osservazioni.

In primo luogo, sembra vantaggioso sfruttare i *virus con bassa sieroprevalenza* nella popolazione umana, evitando così l'immunità anti-vettore preesistente.⁶⁶

Per ridurre al minimo gli effetti dannosi dell'immunità anti-vettore indotta dalla vaccinazione primaria sulla vaccinazione di richiamo, si dovrebbero creare dei vettori virali che non riescono a suscitare quantità significative di anticorpi interferenti.⁶⁷

Lancet. 2008 Nov 29;372(9653):1894-1905. doi: 10.1016/S0140-6736(08)61592-5.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2774110/>

⁶³ Schirmbeck R, Reimann J, Kochanek S, Kreppel F.
The immunogenicity of adenovirus vectors limits the multispecificity of CD8 T-cell responses to vector-encoded transgenic antigens.
Mol Ther. 2008 Sep;16(9):1609-16. doi: 10.1038/mt.2008.141.
<https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S1525-0016%2816%2932059-7>

Roberts DM, et al
Hexon-chimaeric adenovirus serotype 5 vectors circumvent pre-existing anti-vector immunity.
Nature. 2006 May 11;441(7090):239-43. doi: 10.1038/nature04721.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16625206/>

⁶⁴ Flatz L, et al
Development of replication-defective lymphocytic choriomeningitis virus vectors for the induction of potent CD8+ T cell immunity.
Nat Med. 2010 Mar;16(3):339-45. doi: 10.1038/nm.2104.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3247638/>

⁶⁵ Sumida SM, et al
Neutralizing antibodies to adenovirus serotype 5 vaccine vectors are directed primarily against the adenovirus hexon protein.
J Immunol. 2005 Jun 1;174(11):7179-85. doi: 10.4049/jimmunol.174.11.7179.
<https://www.jimmunol.org/content/174/11/7179.long>

⁶⁶ Barouch DH, et al
Immunogenicity of recombinant adenovirus serotype 35 vaccine in the presence of pre-existing anti-Ad5 immunity.
J Immunol. 2004 May 15;172(10):6290-7. doi: 10.4049/jimmunol.172.10.6290.
<https://www.jimmunol.org/content/172/10/6290.long>

Ewer K, et al.
A Monovalent Chimpanzee Adenovirus Ebola Vaccine Boosted with MVA.
N Engl J Med. 2016 Apr 28;374(17):1635-46. doi: 10.1056/NEJMoa1411627.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5798586/>

⁶⁷ Penaloza MacMaster P, et al
Development of novel replication-defective lymphocytic choriomeningitis virus vectors expressing SIV antigens.
Vaccine. 2017 Jan 3;35(1):1-9. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.11.063.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5147735/>

In alternativa, è possibile sviluppare strategie per rendere le particelle del vettore del vaccino meno suscettibili alla neutralizzazione degli anticorpi.⁶⁸ Una combinazione di questi approcci dovrebbe, in linea di principio, superare i limiti imposti dall'immunità anti-vettore preesistente o indotta dalla vaccinazione.

Un'ulteriore strategia per superare l'immunità anti-vettore indotta dalla vaccinazione, consiste in *combinazioni di vettori eterologhi*. Le risposte all'immunizzazione primaria da vettore adenovirale sono comunemente potenziate da vettori virali alternativi come quelli a base di poxvirus o rhabdovirus nella vaccinazione di richiamo detta anche "prime-boost eterologa".⁶⁹

Un esempio nei vaccini COVID-19 è lo Sputnik V, primo vaccino autorizzato in Russia.⁷⁰

La combinazione di due principi attivi in un prodotto vaccinale introduce, tuttavia, un ulteriore livello di complessità, in particolare per quanto riguarda la produzione, l'autorizzazione all'immissione in commercio e la somministrazione del vaccino su larga scala.

Conseguenze dell'immunizzazione di individui con o senza l'immunità da vettore adenovirale umano (HAd) preesistente e la sua elusione utilizzando un Ad non umano o un vettore HAd raro. (a) L'immunizzazione di un individuo con alti livelli di immunità al vettore HAd preesistente porterà alla neutralizzazione del vettore HAd in presenza di anticorpi neutralizzanti HAd preesistenti, abbassando così la trasduzione del vettore delle cellule ospiti, portando a livelli ridotti di transgene espressione seguita da livelli più bassi delle risposte immunitarie transgene-specifiche. (b) Negli individui con livelli non significativi di immunità del vettore HAd, l'immunizzazione con un vettore HAd porterà a robuste risposte immunitarie innate e adattative. Lo sviluppo di risposte immunitarie cellulari specifiche del vettore, in modo significativo le cellule T CD8, eliminerà le cellule trasdotte dal vettore. (c) L'uso di un vettore Ad non umano o di un vettore HAd raro in individui con o senza immunità al vettore HAd preesistente avrà eccellenti risposte immunitarie transgene-specifiche.

⁶⁸ Kreppel F, Kochanek S.

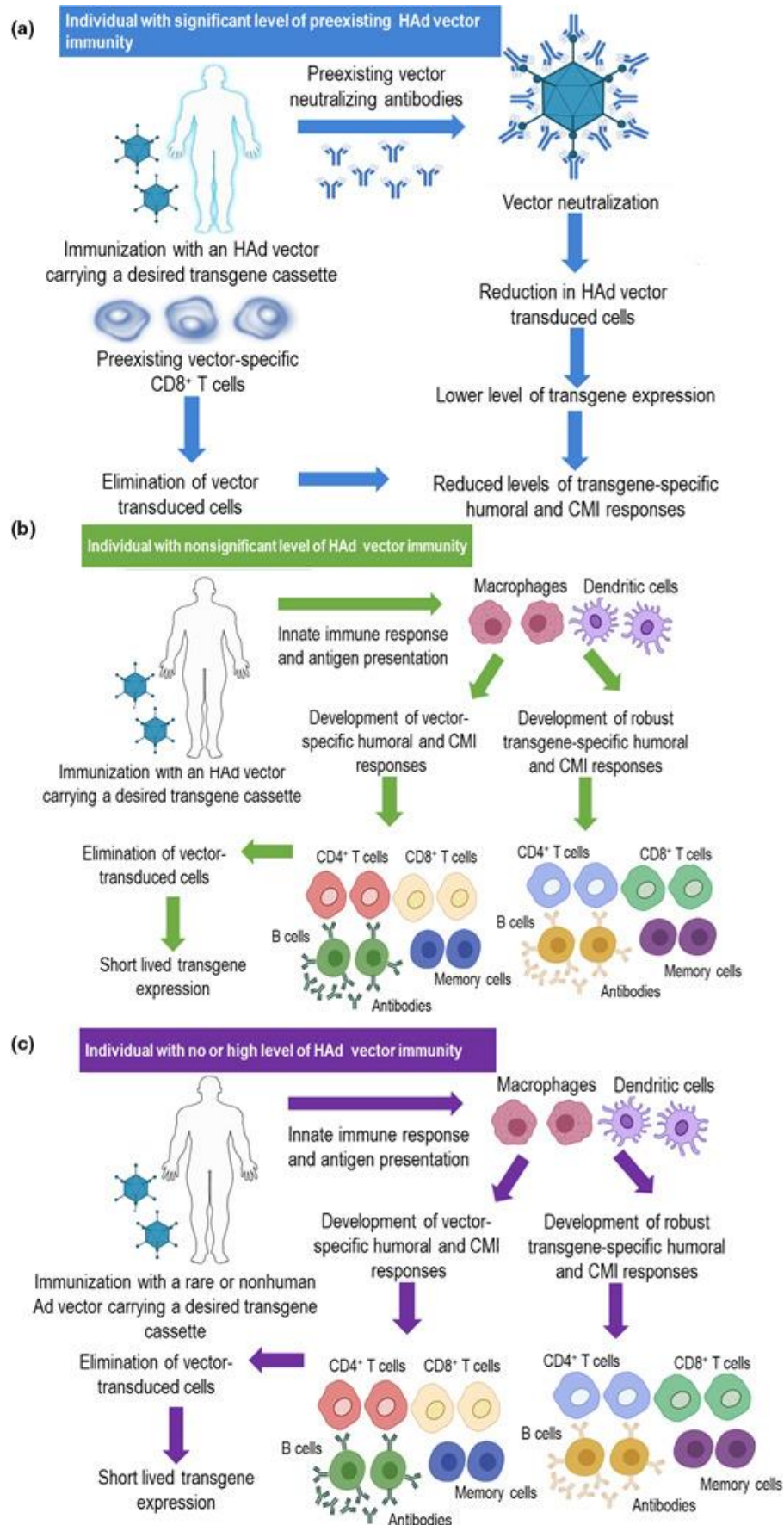
Modification of adenovirus gene transfer vectors with synthetic polymers: a scientific review and technical guide. Mol Ther. 2008 Jan;16(1):16-29. doi: 10.1038/sj.mt.6300321. <https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S1525-0016%2816%2931358-2>

⁶⁹ Pol JG, et al

Maraba virus as a potent oncolytic vaccine vector. Mol Ther. 2014 Feb;22(2):420-429. doi: 10.1038/mt.2013.249 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3916044/>

Flatz L, Gene-based vaccination with a mismatched envelope protects against simian immunodeficiency virus infection in nonhuman primates. J Virol. 2012 Aug;86(15):7760-70. doi: 10.1128/JVI.00599-12. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3421661/>

⁷⁰ <https://sputnikvaccine.com/about-vaccine/>



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8510854/>

COMPLESSITÀ DI PRODUZIONE

Per natura, i virus dei mammiferi richiedono generalmente cellule eucariotiche e spesso di mammiferi per la produzione. Sebbene il lavoro con bioreattori GMP su larga scala sia diventato una routine industriale negli ultimi decenni, può ancora rappresentare un importante fattore di costo. L'equilibrio tra la dose efficace del vaccino e le rese di produzione per volume di coltura (compresi i processi di purificazione) è solitamente indicativo della fattibilità commerciale di un vaccino a vettore in un dato programma di prevenzione di una malattia.

I sistemi a vettori con deficit di replicazione tendono a mostrare una dipendenza dalla dose più marcata rispetto a quelli competenti per la replicazione, e di conseguenza le rese di produzione sono spesso un fattore limitante più evidente.

I processi di purificazione pongono ulteriori criticità, in particolare per i vaccini attenuati, per i quali l'infettività virale deve essere preservata, e per escludere la presenza di agenti infettivi avventizi nei lotti di vaccini ⁷¹ sono necessari test approfonditi su linee cellulari e prodotti, restringendo la gamma di linee cellulari idonee a poche selezionate comunemente disponibili.

In linea di principio, potrebbero essere generate nuove linee cellulari immortalizzate, ma lo sforzo e il tempo necessari per la loro generazione dal tessuto umano primario, la loro selezione basata su caratteristiche biologiche favorevoli, la loro caratterizzazione e l'eventuale accettazione normativa sono notevoli e il successo è incerto. Di conseguenza, il processo di generazione di una nuova linea cellulare è dissuasivo per la maggior parte dei programmi vaccinali, e un piccolo numero di linee cellulari piuttosto vecchie e quindi di uso consolidato domina il campo.

In definitiva, la rivoluzione in corso nell'ingegnerizzazione del genoma dei mammiferi ⁷² mediante tecnologie CRISPR, potrebbe quindi rappresentare un punto di svolta anche per la vaccinazione a vettori virali. ⁷³

⁷¹ Victoria JG, Wang C, Jones MS, Jaing C, McLoughlin K, Gardner S, Delwart EL.
Viral nucleic acids in live-attenuated vaccines: detection of minority variants and an adventitious virus.
J Virol. 2010 Jun;84(12):6033-40. doi: 10.1128/JVI.02690-09.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2876658/>

Petricciani J, Sheets R, Griffiths E, Knezevic I.
Adventitious agents in viral vaccines: lessons learned from 4 case studies.
Biologicals. 2014 Sep;42(5):223-36. doi: 10.1016/j.biologicals.2014.07.003. Epub 2014 Aug 16.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1045105614000748?via%3Dihub>

Klug B, et al Brighton Collaboration Viral Vaccine Vector Safety Working Group.
Adventitious agents and live viral vectored vaccines: Considerations for archiving samples of biological materials for retrospective analysis.
Vaccine. 2016 Dec 12;34(51):6617-6625. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.02.015.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5130882/>

Pennathur S.
Application of Risk Assessments in the Design of the Overall Viral Control Strategy Used during the Manufacture and Testing of Live Virus Vaccines.
PDA J Pharm Sci Technol. 2011 Nov-Dec;65(6):730-6. doi: 10.5731/pdajpst.2011.00851.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22294607/>

Khan AS, et al
Report of the second international conference on next generation sequencing for adventitious virus detection in biologics for humans and animals.
Biologicals. 2020 Sep;67:94-111. doi: 10.1016/j.biologicals.2020.06.002.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7351673/>

⁷² Komor AC, Badran AH, Liu DR.
CRISPR-Based Technologies for the Manipulation of Eukaryotic Genomes.
Cell. 2017 Apr 20;169(3):559. doi: 10.1016/j.cell.2017.04.005. Erratum for: *Cell.* 2017 Jan 12;168(1-2):20-36.
[https://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674\(16\)31465-9.pdf](https://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674(16)31465-9.pdf)

⁷³ Okoli A, Okeke MI, Tryland M, Moens U.
CRISPR/Cas9-Advancing Orthopoxvirus Genome Editing for Vaccine and Vector Development.
Viruses. 2018 Jan 22;10(1):50. doi: 10.3390/v10010050.

CARATTERISTICHE DEI VETTORI ADENOVIRALI

Gli Adenovirus contengono numerosi geni virali che, nelle più recenti generazioni di vettori (detti ad alta capacità o helper-dipendenti o gutless), sono stati completamente rimossi.

I vettori gutless, che contengono solo le sequenze terminali invertite (ITR, Inverted Terminal Repeats), il segnale di incapsidazione e la cassetta d'espressione, richiedono un virus helper (difettivo per l'incapsidazione) che fornisca in *trans* le proteine virali necessarie per la sintesi della particella virale infettiva nella cellula produttrice. Il virus helper può poi essere rimosso dalla preparazione del vettore mediante un processo di purificazione, con efficienza superiore al 99,9%. Tutti i vettori adenovirali sono in grado di trasdurre efficientemente anche cellule non mitotiche e di determinare alti livelli d'espressione del transgene.

La durata variabile e comunque non permanente dell'espressione del transgene è imputabile all'assenza di integrazione e soprattutto alla risposta immune contro le cellule trasdotte, un fenomeno assai rilevante nei vettori di prima e seconda generazione che mantengono ed esprimono a basso livello alcuni geni virali.

I vettori gutless, che non esprimono proteine virali nella cellula trasdotta, sono molto meno immunogenici dei vettori adenovirali di precedente generazione e consentono un'espressione prolungata del transgene.

La somministrazione del vettore deve essere ben tollerata e priva di effetti tossici acuti. Nel caso di vettori virali, in particolare, deve essere garantita la perdita di patogenicità del virus parentale, che è principalmente legata alla replicazione e all'espressione delle proteine virali.

Inoltre, va considerato che l'impiego di un vettore genetico può determinare effetti avversi a lungo termine nella cellula e nell'organismo, tra i quali l'induzione di risposte autoimmuni, e la ricombinazione con virus endogeni in grado di generare una nuova forma virale potenzialmente trasmissibile, come si approfondirà in seguito.

I vaccini a vettore virale rimangono nel nucleo cellulare in forma di episoma, cioè come molecole di DNA extra-cromosomico competenti per la trascrizione. La natura episomale non permette però a questi vettori di duplicarsi dopo ripetute divisioni cellulari, e ciò limita in maniera sostanziale la stabilità di questi sistemi in assenza di specifici sistemi per la replicazione autonoma e la localizzazione nucleare.

Una volta giunto nel nucleo cellulare, il vettore deve permettere una espressione robusta, continua o eventualmente inducibile del transgene.

Molti vettori incorporano nella cassetta d'espressione un promotore di origine virale che induce alti livelli di espressione in certi tipi cellulari (ad esempio il promotore/enhancer del CMV- citomegalovirus; il promotore di SV-40 - Simian Virus-40; o il promotore della regione LTR - Long Terminal Repeat - degli onco-Retrovirus), oppure di origine cellulare (ad esempio promotori del gene della β -actina, del fattore EF1- α di allungamento della trascrizione, o del gene per l'enzima glicolitico PGK - fosfogliceratochinasi). Questi ultimi promotori sono molto utilizzati poiché dirigono l'espressione costitutiva e ubiquitaria dei transgeni, sono cioè attivi sempre e virtualmente in tutti i tipi cellulari.⁷⁴

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5795463/>

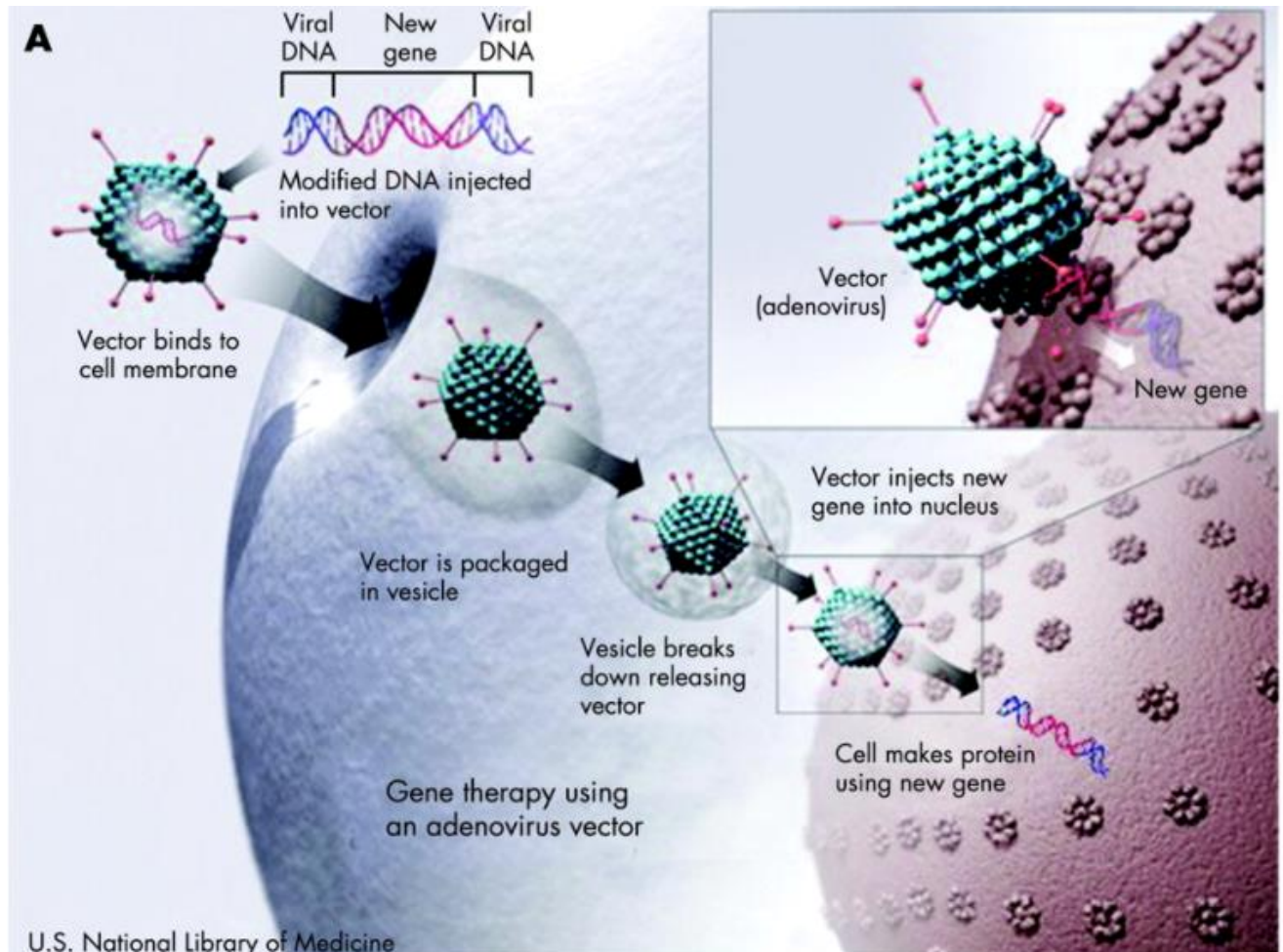
Tang N, Zhang Y, Pedrera M, Chang P, Baigent S, Moffat K, Shen Z, Nair V, Yao Y. A simple and rapid approach to develop recombinant avian herpesvirus vectored vaccines using CRISPR/Cas9 system. *Vaccine*. 2018 Jan 29;36(5):716-722. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.12.025. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5783714/>

Tang N, Zhang Y, Sadigh Y, Moffat K, Shen Z, Nair V, Yao Y. Generation of A Triple Insert Live Avian Herpesvirus Vectored Vaccine Using CRISPR/Cas9-Based Gene Editing. *Vaccines (Basel)*. 2020 Feb 21;8(1):97. doi: 10.3390/vaccines8010097. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7157232/>

Vilela J, Rohaim MA, Munir M. Application of CRISPR/Cas9 in Understanding Avian Viruses and Developing Poultry Vaccines. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020 Nov 24;10:581504. doi: 10.3389/fcimb.2020.581504. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7732654/>

⁷⁴ Terapia genica - Infoscience

Nella figura seguente è schematizzato l'ingresso del vettore adenovirale nelle cellule.



<https://heart.bmj.com/content/94/1/89/F2>

BIOLOGIA MOLECOLARE E CICLO REPLICATIVO DEGLI ADENOVIRUS

Gli adenovirus sono virus a DNA senza involucro che trasportano DNA lineare a doppia elica di circa 35kb scoperti nel 1953.⁷⁵ Sono i più grandi virus privi di involucro.

Sono distinguibili 49 sierotipi che possono essere ulteriormente classificati in sottogruppi da A ad F in base alle loro proprietà di emoagglutinazione.

⁷⁵ Enders JF, Bell JA, Dingle JH, Francis T JR, Hilleman MR, Huebner RJ, Payne AM. Adenoviruses: group name proposed for new respiratory-tract viruses. Science. 1956 Jul 20;124(3212):119-20. doi: 10.1126/science.124.3212.119. <https://science.sciencemag.org/content/124/3212/119>

Species	Hemagglutination Groups	Types	Oncogenic potential			Associated disease
			Tumors in animals	Transformation in cell culture	% GC	
HAdV-A	IV (little or none)	12, 18, 31	High	Positive	46–47	Cryptic enteric infection
HAdV-B	I (complete for monkey erythrocytes)	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 50	Moderate	Positive	49–51	Conjunctivitis Acute respiratory disease Hemorrhagic cystitis Central nervous system
HAdV-C	II (partial for rat erythrocytes)	1, 2, 5, 6	Low or none	Positive	55	Endemic infection Respiratory symptoms
HAdV-D	III (complete for rat erythrocytes)	8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22–30, 32, 33, 36–39, 42–49, 51, 53, 54	Low or none (mammary tumors)	Positive	55–57	Keratoconjunctivitis in immunocompromised and AIDS patients
HAdV-E	III	4	Low or none	Positive	58	Conjunctivitis Acute respiratory disease
HAdV-F	III	40, 41	Unknown	Negative	51	Infantile diarrhea
HAdV-G	Unknown	52	Unknown	Unknown	55	Gastroenteritis

<https://basicmedicalkey.com/adenoviridae/>
Schemi di classificazione per gli adenovirus umani (HAdV, genere *Mastadenovirus*)

I tipi di adenovirus più studiati sono il tipo 2 (Ad2) e il tipo 5 (Ad5) che sono membri del sottogruppo C. Questi sierotipi di adenovirus sono stati utilizzati per l'ingegnerizzazione dei primi vettori adenovirali, poiché è stato scoperto che questi tipi non sono associati a malattie gravi nell'uomo e sono quindi adatti per applicazioni in vivo.⁷⁶

Struttura del virione⁷⁷

Il virione dell'adenovirus ha una struttura virale unica: consiste di un capsido a simmetria icosaedrica, con un diametro di 70-100 nm, senza pericapside, e dell'acido nucleico virale. Il capsido è formato da 252 capsomeri di cui 240 esoni e 12 pentoni collocati ai vertici; all'apice di ciascun vertice si trova una fibra che facilita l'attacco alle cellule bersaglio. Gli esoni contengono anche diverse regioni ipervariabili e sono i principali obiettivi degli anticorpi neutralizzanti. Nei vettori adenovirali, questi siti possono essere progettati per trasportare l'antigene del vaccino.

⁷⁶ Ballay A, Levrero M, Buendia MA, Tiollais P, Perricaudet M.

In vitro and in vivo synthesis of the hepatitis B virus surface antigen and of the receptor for polymerized human serum albumin from recombinant human adenoviruses.

EMBO J. 1985 Dec 30;4(13B):3861-5.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC554741/pdf/emboj00279-0211.pdf>

Karlsson S, Van Doren K, Schweiger SG, Nienhuis AW, Gluzman Y.

Stable gene transfer and tissue-specific expression of a human globin gene using adenoviral vectors.

EMBO J. 1986 Sep;5(9):2377-85.

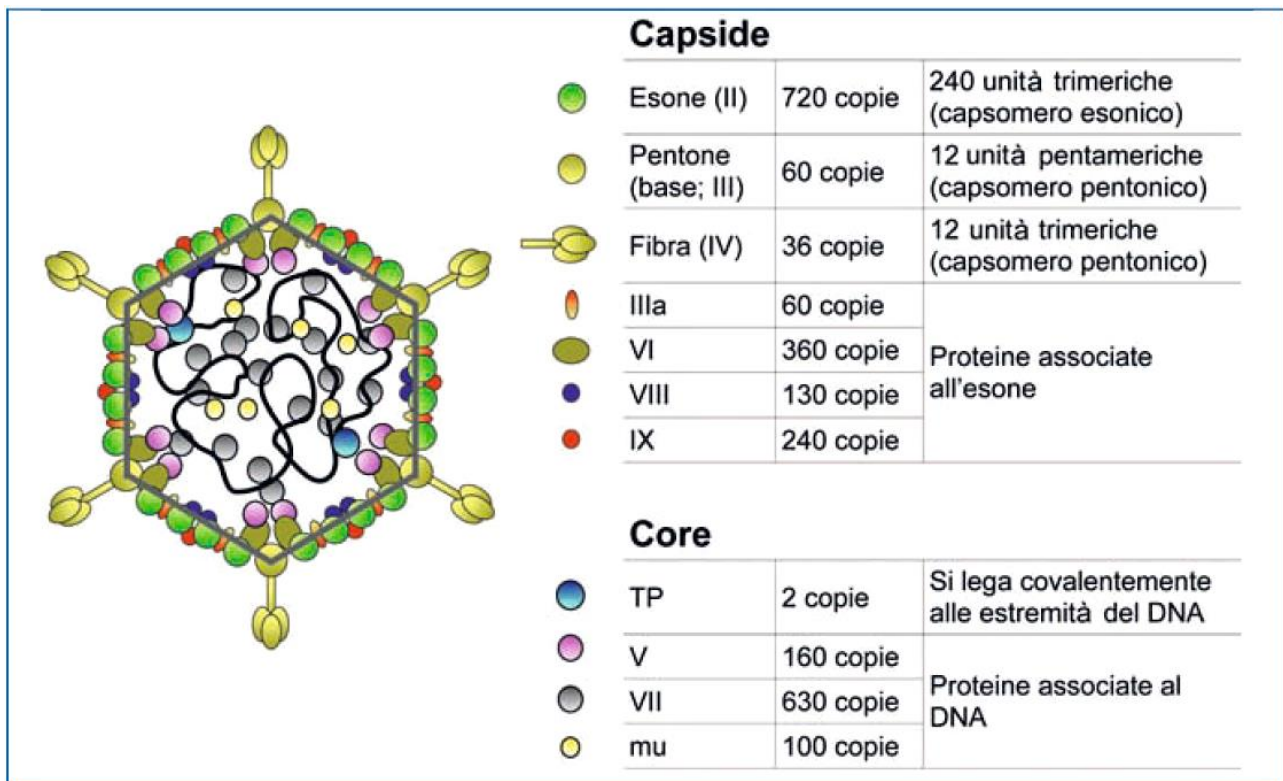
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1167123/pdf/emboj00172-0331.pdf>

⁷⁷ Terapia genica. Mauro Giacca © Springer-Verlag Italia 2011 pag 80-84

https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-88-470-1989-8_3.pdf

Le proteine IIIa si trovano nella superficie interna del capside e aiutano nell'assemblaggio e stabilizzazione delle regioni dei vertici e anche nell'assemblaggio del genoma virale; le proteine VI collegano il guscio esterno del capside al guscio icosaedrico interno; le proteine VIII aiutano a legare insieme gli esameri e sono fondamentali per la stabilità del capside virale.

Le proteine V, VII e X sono associate al genoma del DNA e costituiscono il nucleo del virione, mentre la proteina terminale si lega a ciascuna estremità del genoma del DNA.



https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-88-470-1989-8_3

Struttura del virione di adenovirus. Il capside di adenovirus ha una caratteristica morfologia icosaedrica. E' formato da tre proteine strutturali principali, l'esone (proteina II), la base del pentone (III) e la fibra (IV); cementano questa struttura le proteine minori VI, VIII, IX e IIIa. All'interno del virione, il genoma del virus, un DNA lineare a doppio filamento che porta attaccata covalentemente alle due estremità la proteina terminale TP. Il DNA virale si associa anche alle proteine VII, mu, e V; quest'ultima fornisce un legame strutturale al capside grazie alla sua interazione con la proteina VI. La tabella a destra riporta la relativa abbondanza di queste 11 proteine strutturali

Organizzazione del genoma

Il genoma è costituito da una molecola lineare di DNA a doppio filamento, di 36 kb nel caso di Ad2 e di Ad5, che porta alle estremità due sequenze ripetute identiche, denominate "inverted terminal repeat" (ITR; 103 bp nel caso di Ad2 ed Ad5); queste regioni fungono da origini di replicazione del DNA virale.

Il genoma contiene:

- cinque unità trascrizionali precoci, attivate immediatamente dopo l'infezione della cellula (E1A, E1B, E2 (E2A ed E2B), E3 ed E4);
- due unità trascrizionali intermedie (IX e IVa2, L4 intermedio ed E2 tardivo);
- una unità trascrizionale maggiore tardiva (major late, ML) che è processata per generare 5 famiglie di mRNA tardivi mediante processamento post-trascrizionale (da L1 a L5).

Tutte queste unità trascrizionali sono trascritte dall'RNA polimerasi II. Il genoma virale contiene anche 1 o 2 (a seconda dei sierotipi) geni trascritti dall'RNA polimerasi III (geni VA RNA, virus-associated).

Per convenzione, la mappa del genoma di adenovirus è presentata con il gene E1A all'estremità sinistra del genoma, e comprende quindi un'estremità "sinistra" e un'estremità "destra".⁷⁸

A causa della piccola dimensione del genoma, gli adenovirus impiegano diverse strategie per sfruttarlo al massimo. Ad esempio, codificano le proteine di entrambi i filamenti di DNA, impiegano lo splicing alternativo e utilizzano diverse modificazioni delle code di poliA dell'mRNA.

Nei vettori adenovirali non replicanti, il gene E1 viene eliminato per renderli difettosi nella replicazione in modo che possa infettare le cellule ospiti ma non moltiplicarsi.

Come si vedrà in seguito, per la produzione di vettori adenovirali non replicanti, vengono utilizzate le cellule trasfettate con E1 come HEK293 e PER.C6 per consentire la produzione di vettori adenovirali con difetto di replicazione.⁷⁹

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352304217300272>

La struttura del genoma e le principali unità di trascrizione dell'Ad5 umano. Il genoma Ad5 è composto da 36 kb di DNA lineare a doppia elica, mostrato anche in unità di mappa (μ). I geni Ad5 vengono trascritti temporalmente come unità iniziali (unità E1, E2, E3 ed E4) o unità tardive (da L1 a L5) in entrambe le direzioni. La parte superiore dei geni elencati viene trascritta da sinistra a destra, mentre la parte inferiore dei geni viene trascritta da destra a sinistra, come indicato dalle frecce tratteggiate. I prodotti del gene E1 sono coinvolti nella replicazione del virus. La regione E2 è suddivisa in E2A ed E2B. Queste proteine forniscono il meccanismo per la replicazione del DNA virale e la conseguente trascrizione dei geni tardivi, che codificano principalmente proteine strutturali per l'assemblaggio del virus. La maggior parte delle proteine E3 sono coinvolte nella modulazione della risposta immunitaria delle cellule infettate e non sono essenziali per la produzione virale in vitro.

⁷⁸ https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-88-470-1989-8_3

Lee CS, et al

Adenovirus-Mediated Gene Delivery: Potential Applications for Gene and Cell-Based Therapies in the New Era of Personalized Medicine.

Genes Dis. 2017 Jun;4(2):43-63. doi: 10.1016/j.gendis.2017.04.001.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352304217300272>

Sayedahmed EE, Elkashif A, Alhashimi M, Sambhara S, Mittal SK.

Adenoviral Vector-Based Vaccine Platforms for Developing the Next Generation of Influenza Vaccines.

Vaccines (Basel). 2020 Oct 1;8(4):574. doi: 10.3390/vaccines8040574.

<https://www.mdpi.com/2076-393X/8/4/574/htm>

Walther, Wolfgang & Stein, Ulrike.

Viral Vectors for Gene Transfer.

Drugs. (2000). 60. 249-71. 10.2165/00003495-200060020-00002.

https://www.researchgate.net/publication/12338027_Viral_Vectors_for_Gene_Transfer

Sharon, David & Kamen, Amine.

Advancements in the design and scalable production of viral gene transfer vectors: Advancements in viral vector design and production.

Biotechnology and Bioengineering. (2017). 115. 10.1002/bit.26461.

https://www.researchgate.net/figure/Adenovirus-structure-and-vector-design-a-Structure-of-adenovirus-virion-showing-linear_fig2_320006566

Cell Culture - Adenovirus Techniques

https://old.abmgood.com/marketing/knowledge_base/cell_culture_adenovirus_techniques.php

Adenovirus vector system, Adenovirus production and transduction

<https://www.genemedi.net/i/adenovirus-packaging>

Chen YH, Keiser MS, Davidson BL.

Viral Vectors for Gene Transfer.

Curr Protoc Mouse Biol. 2018 Dec;8(4):e58. doi: 10.1002/cpmo.58.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30485696/>

⁷⁹ Shakti Singh, Rakesh Kumar and Babita Agrawal (November 5th 2018).

Adenoviral Vector-Based Vaccines and Gene Therapies: Current Status and Future Prospects, Adenoviruses, Yulia Desheva, IntechOpen,

DOI: 10.5772/intechopen.79697.

<https://www.intechopen.com/books/adenoviruses/adenoviral-vector-based-vaccines-and-gene-therapies-current-status-and-future-prospects>

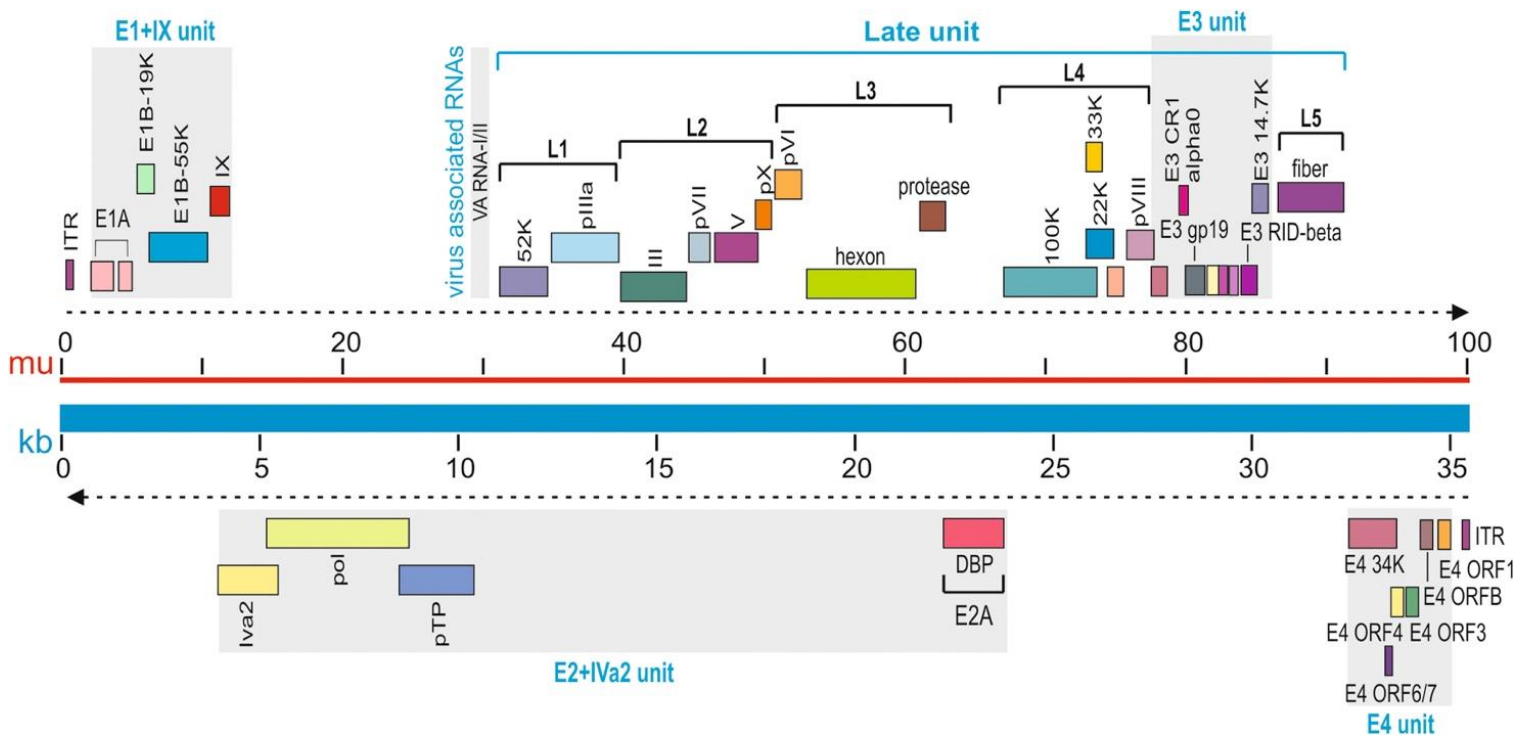
https://www.researchgate.net/publication/328875899_Adenoviral_Vector-Based_Vaccines_and_Gene_Therapies_Current_Status_and_Future_Prospets

Russell WC.

Adenoviruses: update on structure and function.

J Gen Virol. 2009 Jan;90(Pt 1):1-20. doi: 10.1099/vir.0.003087-0.

<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.19497-0>



Ciclo replicativo⁸⁰

Il ciclo replicativo degli adenovirus è per convenzione diviso in due fasi, separate dal processo di replicazione del DNA virale. Gli eventi precoci (early) iniziano immediatamente dopo l'entrata del virus infettivo nella cellula; questi includono il legame del virus alla superficie della cellula (adsorbimento), la penetrazione del virus nella cellula, il trasporto del DNA virale nel nucleo, e l'espressione del set di geni precoci. I prodotti dei geni precoci consentono l'ulteriore espressione dei geni virali, stimolano la replicazione del DNA virale, inducono la progressione del ciclo cellulare, bloccano l'apoptosi ed antagonizzano una serie di altri eventi cellulari con potenziale funzione antivirale.

La fase precoce dura circa 5-6 ore, dopo di che inizia la replicazione del genoma virale e, in maniera concomitante, la fase tardiva (late) di espressione, che consiste nella trascrizione dei geni tardivi e l'assemblaggio dei virioni. Il ciclo replicativo si completa in 20-24 ore nelle cellule HeLa; alla sua fine, ogni cellula ha generato circa 10^4 - 10^5 nuove particelle virali infettive.

Il ciclo replicativo ha inizio con l'adsorbimento del virus alla membrana della cellula grazie all'interazione della porzione C-terminale della proteina della fibra, che protrude all'esterno come un pomello, con una proteina di superficie nota come CAR (Coxsackie/Adenovirus Receptor), che funge anche da recettore per i Coxsackievirus di tipo B, da cui il nome. In seguito a quest'interazione, l'internalizzazione del virione nella cellula avviene con un meccanismo di endocitosi mediata da recettore all'interno di vescicole rivestite da clatrina.

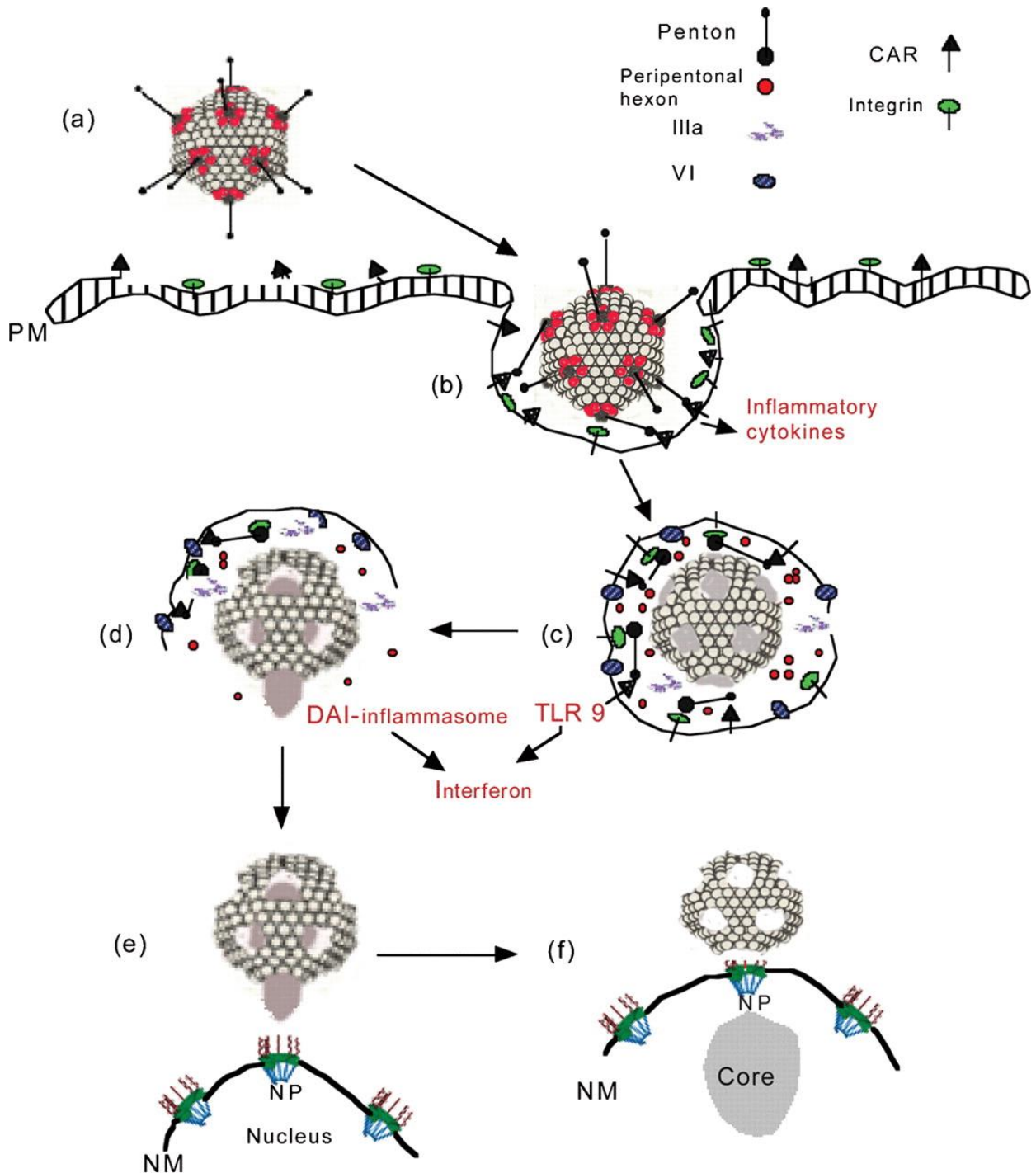
Il 90% dei genomi virali internalizzati esce quindi dalle vescicole di endocitosi a livello degli endosomi precoci, grazie alla proprietà endosomolitica della proteina della base del pentone, proprietà stimolata dalla progressiva acidificazione degli endosomi. Una volta nel citoplasma, le particelle virali sono trasportate nel nucleo in maniera attiva, sfruttando l'interazione dell'esone con i microtubuli della cellula.

Concomitante al processo di internalizzazione, avviene un progressivo disassemblaggio del virione, mediato dalla dissociazione e degradazione proteolitica dei suoi costituenti. Un complesso costituito dal DNA virale, associato

⁸⁰ Giacca M. (2011) Metodologie per il trasferimento genico. In: Terapia Genica. Springer, Milano.
https://doi.org/10.1007/978-88-470-1989-8_3

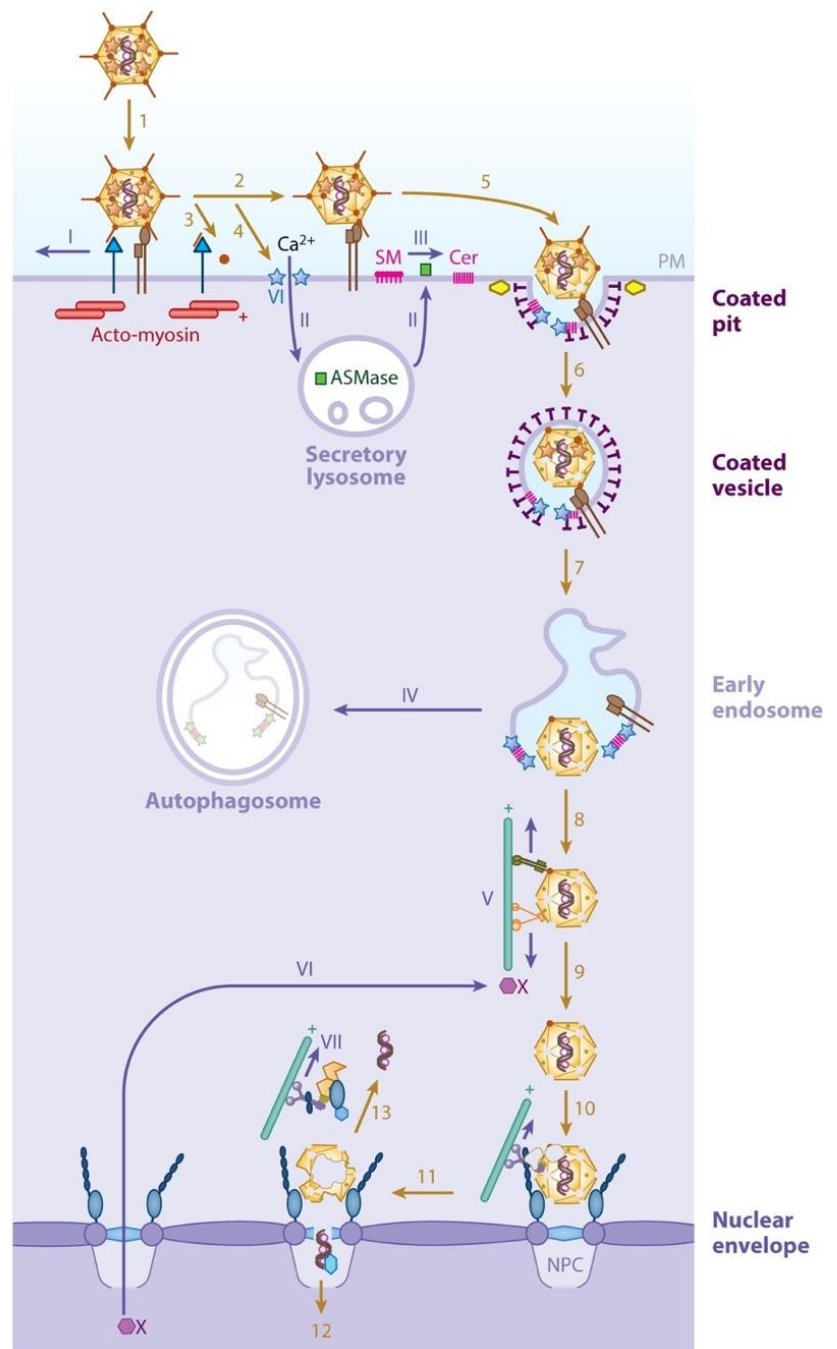
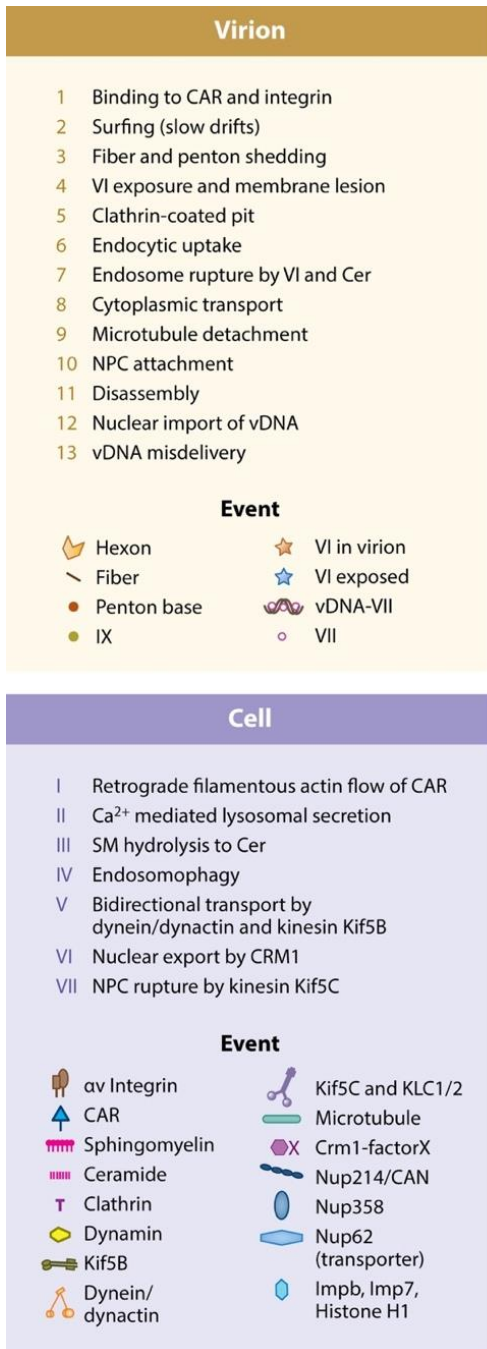
<https://biologyreader.com/life-cycle-of-adenovirus.html>

covalentemente alla proteina TP, insieme con le proteine basiche VII, V e il peptide mu passa quindi dal citoplasma al nucleo.



<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.003087-0>

Primi eventi nell'infezione. **(a)** Adenovirus sulla membrana plasmatica (PM), gli esoni peripentonali sono in rosso. **(b)** Legame dei pentoni alle integrine e ai recettori seguito da fagocitosi. **(c)** Una vescicola fagocitaria (endosoma/lisosoma) e rottura della particella di adenovirus che rilascia esoni peripentonali, Illa e VI e rivela il nucleo. **(d)** Rottura dell'endosoma/lisosoma e rilascio nel citoplasma del guscio esonico con un nucleo metastabile (DNA del virus con TP, VII, V, Mu e possibilmente proteasi). **(e)** Guscio esonico al poro nucleare (NP) con nucleo che viene rilasciato nel nucleo. **(f)** Nucleo nel nucleo mirato alla cromatina cellulare. I passaggi chiave nell'induzione della risposta immunitaria sono indicati in rosso. NM, membrana nucleare.



<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31283442/>

Ingresso di AdV nelle cellule epiteliali. Il disegno schematico raffigura una sequenza di eventi implicati nel processo di ingresso cellulare delle particelle di AdV-C, che porta alla veicolazione del genoma virale nel nucleo e all'infezione (passaggi 1-13). Gli eventi cellulari particolarmente rilevanti per questo processo sono indicati con numeri romani. Abbreviazioni: AdV, adenovirus; ASMase, acido sfingomielinasi; Ca²⁺, ione calcio; CAR, recettore AdV del coxsackievirus; Cer, ceramide; Crm1, mantenimento della regione cromosomica 1; Imp, importazione; NPC, complesso dei pori nucleari; Nup, nucleoporina; PM, membrana plasmatica; SM, sfingomielina.

Non appena il genoma di adenovirus entra nel nucleo, inizia la fase di trascrizione precoce. Questa fase ha 3 obiettivi primari, ovvero quelli di:

- 1) indurre la cellula ospite ad entrare nella fase S del ciclo cellulare e generare quindi un ambiente cellulare ottimale per la replicazione del virus – questa funzione è esercitata dai prodotti dei geni E1A, E1B ed E4;
- 2) proteggere la cellula infettata dai vari sistemi di difesa antivirale dell'organismo – geni E1A, E3 e VA RNA;

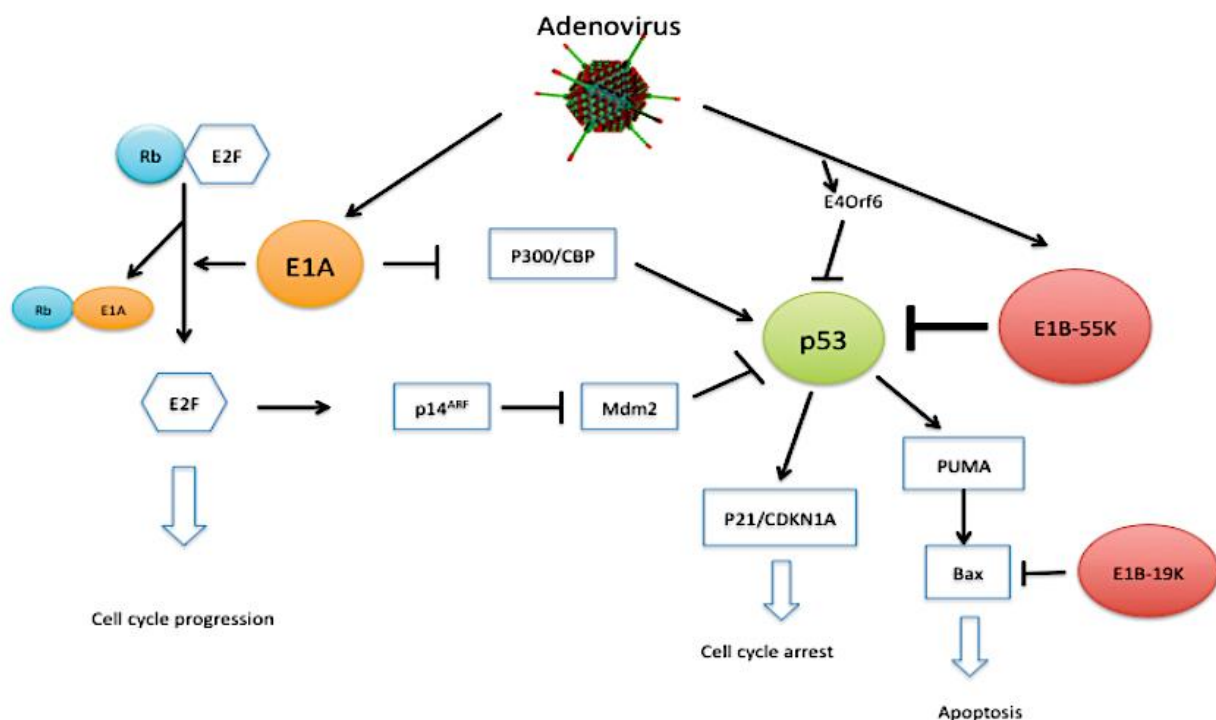
3) sintetizzare proteine virali indispensabili per la replicazione del DNA virale – gene E2.

Tutti e tre questi obiettivi dipendono dall'attivazione trascrizionale del genoma virale mediata dal prodotto del gene E1A. È interessante riportare che le proteine adenovirali E1A e VII influenzano in modo significativo sia i genomi virali che la cromatina dell'ospite. Il DNA virale è legato dalla proteina VII istone-simile, quando entra nel nucleo. E1A è la prima proteina prodotta durante l'infezione ed è stata implicata nell'avvio della trascrizione e nella rimozione della proteina VII dai genomi virali in arrivo.

In particolare, E1A interagisce da un lato con diverse proteine cellulari che controllano il ciclo cellulare, quali l'oncosoppressore pRb, stimolando l'ingresso nella fase S, e dall'altro, E1A si lega a diversi componenti del complesso basale di trascrizione, tra cui i co-attivatori trascrizionali e istone-acetiltrasferasi p300/CBP e P/CAF, diversi fattori di trascrizione della cellula, e le proteine del mediatore, TBP, stimolando l'attivazione trascrizionale di una serie di geni cellulari e della maggior parte dei geni virali.

La proteina VII tardiva si lega alla cromatina dell'ospite e sequestra le proteine HMGB che segnalano il pericolo nella cromatina.⁸¹

La presenza delle proteine E1A nella cellula ha anche la caratteristica di attivare la proteina p53, tramite l'attivazione trascrizionale dell'oncosoppressore p19ARF, che si associa a p53 e ne modula l'attività; una delle conseguenze di questa attivazione è l'induzione di apoptosi nella cellula infettata. Tuttavia, almeno tre proteine di adenovirus svolgono attività anti-apoptotica: i due prodotti generati dal gene E1B (E1B-55K, che si lega e inattiva p53 ed E1B-19K, un omologo del gene cellulare antipoptotico Bcl-2) e la proteina E4orf6, che anch'essa si lega e inattiva p53.



https://www.ibg.uu.se/digitalAssets/147/c_147660-l_1-k_rapport-sibel-ciftci.pdf

Un modello semplificato delle vie metaboliche p53 e pRb. Nell'infezione litica dell'adenovirus, pRb e p53 sono attaccate rispettivamente dalle proteine E1A ed E1B.

⁸¹ Kleinberger T.

En Guard! The Interactions between Adenoviruses and the DNA Damage Response.

Viruses. 2020;12(9):996. Published 2020 Sep 7. doi:10.3390/v12090996

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7552057/>

L'accumulo dei prodotti dei geni E2 (DNA polimerasi, DBP e TP) segna l'inizio della fase di replicazione del genoma virale. Questa inizia dalle ITR alle due estremità del genoma e continua in entrambe le direzioni; il processo, catalizzato dalla DNA polimerasi virale, richiede il legame covalente della TP all'estremità del genoma e l'interazione di una serie di fattori cellulari (NF-I, NF-III ed altri) alle ITR.

L'allungamento del DNA neosintetizzato richiede la proteina virale DBP, che si lega al DNA, e del fattore cellulare NF-II. All'inizio della replicazione del DNA virale, inizia anche la trascrizione dei geni tardivi di adenovirus.

Questi sono organizzati in un unico lungo trascritto di circa 29.000 nt, che viene successivamente processato mediante l'utilizzo di siti di poliadenilazione e splicing alternativi per dare origine a una serie di mRNA.

Questi possono essere raggruppati in 5 famiglie (L1-L5) sulla base dell'utilizzo di 5 diversi siti di poliadenilazione. L'espressione di tutti questi trascritti è controllata da uno specifico promotore, il major late promoter (MLP), attivato dal fattore di trascrizione cellulare USF/MLTF e transattivato da E1A.

La traduzione degli mRNA generati da L1-L5 porta alla sintesi delle proteine strutturali del virione. L'incapsidamento del genoma virale dipende dalla presenza del segnale di incapsidamento ψ , presente a circa 260 bp dall'estremità sinistra del genoma, che consiste in una serie di sequenze ricche in AT.

Dopo l'infezione da adenovirus, può verificarsi una delle tre diverse interazioni con le cellule.⁸²

La prima è l'**infezione litica**, che si verifica quando un adenovirus entra nelle cellule epiteliali umane e continua attraverso un intero ciclo di replicazione, che si traduce in citolisi, produzione di citochine e induzione della risposta infiammatoria dell'ospite.⁸³

La seconda è un'**infezione cronica o latente**, che spesso comporta un'infezione asintomatica del tessuto linfoide. Infine, nei ratti è stata osservata una **trasformazione oncogenica**. Durante l'oncogenesi, il ciclo di replicazione viene troncato e il DNA adenovirale viene quindi integrato nel DNA della cellula ospite. Successivamente, l'adenovirus produce potenti proteine E1A che immortalizzano le cellule primarie dei roditori alterando la trascrizione cellulare, portando infine alla deregolazione dell'apoptosi e alla trasformazione maligna.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6938402/>

Impatto di E1A e della proteina VII sulla cromatina ospite. L'E1A e la proteina VII adenovirali influenzano significativamente sia i genomi virali che la cromatina dell'ospite. Il DNA virale è legato dalla proteina simile all'istone VII quando entra nel nucleo. E1A è la prima proteina prodotta durante l'infezione ed è stata implicata nell'avvio della trascrizione e nello spostamento della proteina VII dai genomi virali in entrata. E1A lega le proteine dell'acetiltransferasi p300/CBP dell'ospite per interrompere l'acetilazione degli istoni e alterare la trascrizione dell'ospite per promuovere la replicazione virale. La proteina VII espressa in ritardo lega la cromatina dell'ospite e sequestra il pericolo che segnala le proteine HMGB nella cromatina.

⁸² Adenovirus

Updated: Apr 15, 2021

<https://emedicine.medscape.com/article/211738-overview>

⁸³ Russell WC.

Adenoviruses: update on structure and function.

J Gen Virol. 2009 Jan;90(Pt 1):1-20. doi: 10.1099/vir.0.003087-0.

<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.003087-0>

Flatt JW, Butcher SJ.

Adenovirus flow in host cell networks.

Open Biol. 2019;9(2):190012. doi:10.1098/rsob.190012

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6395880/>

Pied N, Wodrich H.

Imaging the adenovirus infection cycle.

FEBS Lett. 2019 Dec;593(24):3419-3448. doi: 10.1002/1873-3468.13690.

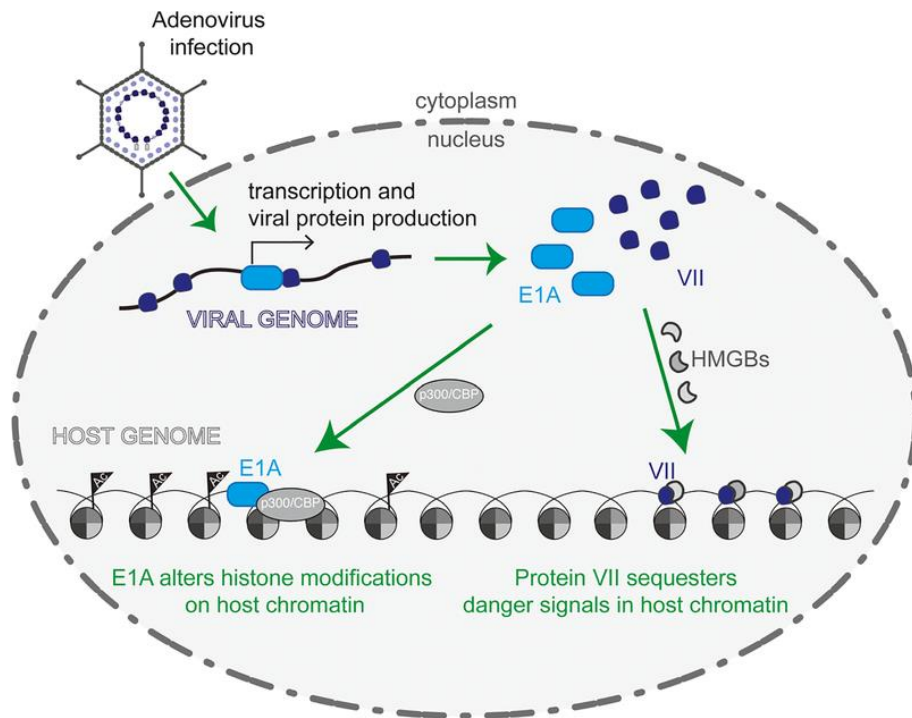
<https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/1873-3468.13690>

Berk AJ.

Recent lessons in gene expression, cell cycle control, and cell biology from adenovirus.

Oncogene. 2005 Nov 21;24(52):7673-85. doi: 10.1038/sj.onc.1209040.

<https://www.nature.com/articles/1209040>



APPROFONDIMENTO

[The viral life cycle](#)
[Virus life cycle](#)
[La natura dei virus](#)

CONFRONTO TRA INFEZIONE ACUTA E INFEZIONE CRONICA ⁸⁴

I virus che causano infezioni croniche costituiscono una parte stabile ma poco riconosciuta del nostro metagenoma: il nostro viroma. Le continue risposte immunitarie tengono a bada questi virus cronici evitando danni immunopatologici ai tessuti persistentemente infetti. L'impronta immunologica generata da queste risposte al nostro viroma definisce il normale sistema immunitario. Il risultante equilibrio dinamico ma metastabile tra il viroma e l'ospite può essere pericoloso, benigno o addirittura simbiotico.

Questi concetti richiedono che riformuliamo il modo in cui assegniamo le eziologie alle malattie, in particolare quelle con una componente infiammatoria cronica, nonché il modo in cui progettiamo e interpretiamo gli studi di associazione sull'intero genoma e come vacciniamo per limitare o controllare il nostro viroma.

⁸⁴ Virgin HW, Wherry EJ, Ahmed R. Redefining chronic viral infection. Cell. 2009 Jul 10;138(1):30-50. doi: 10.1016/j.cell.2009.06.036. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.036>

Zuniga EI, Macal M, Lewis GM, Harker JA. Innate and Adaptive Immune Regulation During Chronic Viral Infections. Annu Rev Virol. 2015 Nov;2(1):573-97. doi: 10.1146/annurev-virology-100114-055226. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC4785831/>

Il nostro metagenoma include tutti gli organismi che vivono su di noi o in noi. I batteri che ci colonizzano possono variare dall'essere simbiotici, opportunisti e patogeni, con l'equilibrio tra gli esiti estremi dell'infezione determinati dall'immunità dell'ospite e la virulenza batterica.

È noto che i batteri commensali regolano la risposta immunitaria dell'ospite e la fisiologia sistemica. Meno riconosciuti sono i contributi al nostro metagenoma dai virus che stabiliscono l'infezione cronica e gli elementi retrovirali che infestano i nostri cromosomi. Il modo in cui la natura dinamica delle interazioni tra questo viroma interno e l'ospite imprime il nostro sistema immunitario, e forse la nostra fisiologia più in generale, è stato tenuto in scarsa considerazione.

Alcune infezioni croniche sono così comuni che qualsiasi impronta immunologica di questi agenti, o potenziale contributo di questi virus alla malattia è oscurata dal fatto che fanno parte della normale flora della maggior parte degli esseri umani. Pertanto, per analizzare questo aspetto fondamentale della nostra biologia è necessaria una ridefinizione dell'infezione virale cronica che ponga le basi per nuovi e interessanti esperimenti.

Tutti noi trasportiamo, nel bene e nel male, molti passeggeri virali per tutta la vita.

L'infezione virale acuta è un processo di non equilibrio, mentre l'infezione virale cronica è un processo in equilibrio dinamico e metastabile. Durante l'infezione acuta, sia l'ospite che il virus cambiano continuamente fino a quando l'infezione non viene risolta, uccide l'ospite o diventa cronica.

Alcuni geni nei virus o nel sistema immunitario sono specifici di nicchia in quanto funzionano durante l'infezione acuta ma non quella cronica. Il mancato funzionamento di questi geni del sistema immunitario o l'evasione troppo efficace dell'immunità da parte dei geni virali può avere conseguenze devastanti. Al contrario, durante l'infezione cronica, i geni virali e dell'ospite si bilanciano a vicenda.

Comprendere come alcuni virus riescano a persistere nonostante l'impressionante armamentario immunitario dell'ospite, senza causare malattie conclamate, è una grande sfida della ricerca in immunobiologia.

La nostra comprensione dell'immunità dell'ospite e della virulenza virale deriva in gran parte da studi sulla risoluzione dell'infezione acuta (Figura 1).

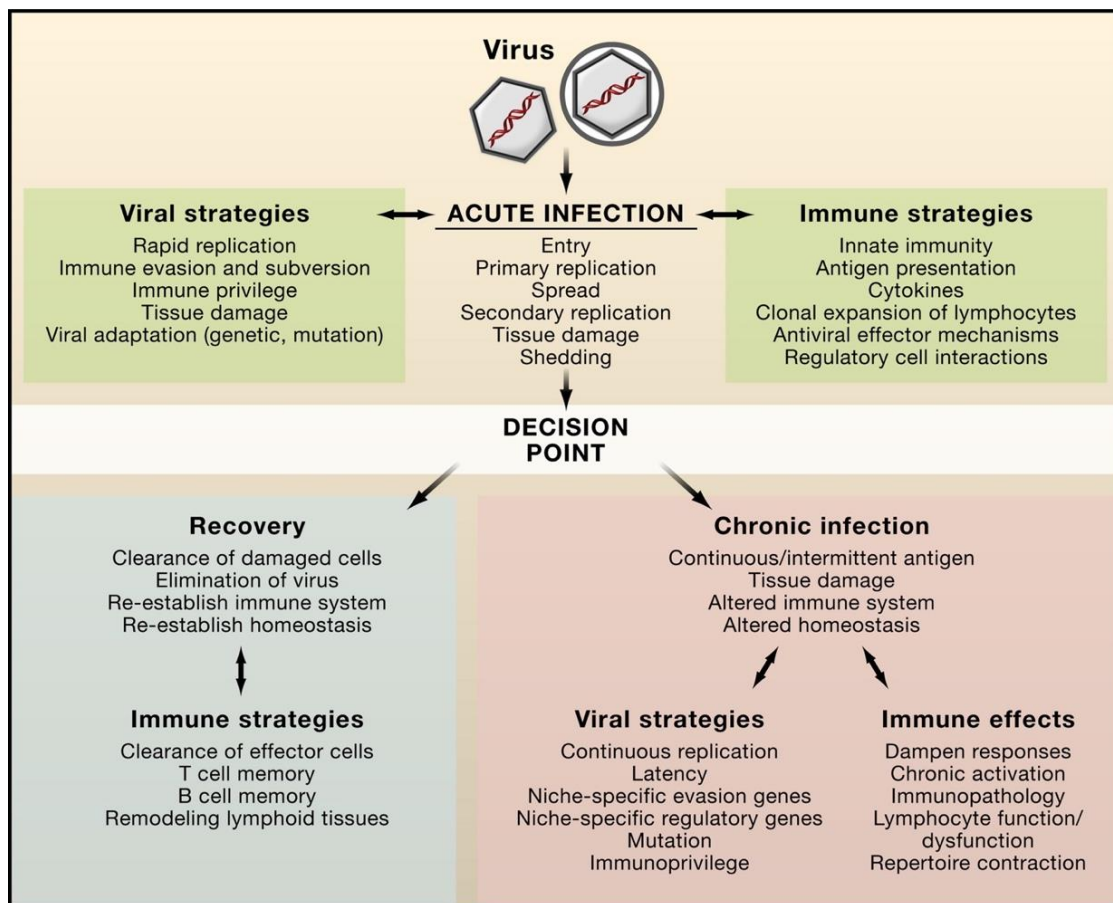


Fig.1

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.036>

Quando un virus entra nell'ospite, c'è una fase iniziale di non equilibrio di infezione acuta. Durante questa fase, le strategie virali e immunitarie competono per il predominio. Supponendo che l'ospite sopravviva, si raggiunge un punto decisionale in cui l'infezione viene eliminata o diventa cronica. Questo punto di decisione può essere raggiunto molto presto nell'infezione per i virus che possono stabilire un'infezione latente, nel qual caso l'infezione è permanente indipendentemente dal decorso dell'infezione acuta. Se si verifica il recupero, il sistema immunitario deve ripristinarsi eliminando l'antigene e ristabilendo l'omeostasi immunitaria. Se l'equilibrio si sposta verso l'infezione cronica, una nuova serie di strategie virali e dell'ospite interagiscono per definire un equilibrio metastabile in cui la replicazione virale è tenuta sotto controllo, ma il virus non viene eliminato.

La clearance dell'antigene virale, delle cellule effettrici e delle citochine consente al sistema immunitario di ripristinare uno stato non infetto ma dotato di memoria, che include cellule B e T di memoria quiescenti rapidamente riattivabili, nonché plasmacellule che producono continuamente anticorpi.

Gli studi sull'infezione acuta sono stati estremamente preziosi per definire la virulenza virale e l'immunità dell'ospite. Tuttavia, le regole "virali" e "dell'ospite" che governano l'infezione virale acuta rispetto a quella cronica differiscono notevolmente.

Ad esempio, mentre le cellule T CD8 che riconoscono i peptidi presentati dalle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità classico (MHC) sono importanti sia durante l'infezione acuta che cronica, le risposte delle cellule T CD8 limitate dalle molecole MHC non classiche svolgono un ruolo importante nel controllo di alcune infezioni virali croniche.⁸⁵

⁸⁵ Braaten D.C., McClellan J.S., Messaoudi I., Tibbetts S.A., McClellan K.B., Nikolich-Zugich J., Virgin H.W. Effective control of chronic gamma-herpesvirus infection by unconventional MHC class Ia-independent CD8 T cells. PLoS Pathog. 2006; 2: 394-407 <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020037>

Swanson PA 2nd, Pack CD, Hadley A, et al. An MHC class Ib-restricted CD8 T cell response confers antiviral immunity. J Exp Med. 2008;205(7):1647-1657. doi:10.1084/jem.20080570 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC2442642/>

Due eventi sono fondamentali per stabilire un'infezione virale cronica (Figura 1).

In primo luogo, il virus deve eludere l'immunità sterilizzante (l'eliminazione completa del virus).

In secondo luogo, il sistema immunitario deve adattarsi alla presenza continua di risposte infiammatorie guidate dall'antigene virale, al fine di limitare la replicazione virale a un livello accettabile senza danneggiare i tessuti permanentemente infetti. Se il sistema immunitario non è in grado di eliminare il virus, l'attacco immunitario eccessivo alle cellule portatrici dell'antigene del virus provoca l'immunopatologia.

Pertanto, la sottoregolazione della risposta infiammatoria durante le infezioni virali croniche può comportare una riduzione del danno tissutale, almeno per i virus non citopatici.

L'immunopatologia può essere grave nei modelli animali ed è stata implicata nelle infezioni croniche umane causate dal virus dell'epatite B (HBV) e dal virus dell'epatite C (HCV) ⁸⁶.

È importante rendersi conto che i virus che dipendono da un ospite vivente ma cronicamente infetto, per la propria sopravvivenza devono evitare accuratamente i meccanismi che sopraffanno l'immunità e uccidono i loro ospiti. In effetti, dato il rapido ritmo dell'evoluzione virale, è logico pensare che i virus relativamente benigni dal punto di vista clinico, nonostante abbiano instaurato un'infezione cronica, si sarebbero evoluti in una maggiore virulenza se ciò fosse stato vantaggioso.

È importante sottolineare che anche quando l'ospite e il virus sono in un equilibrio metastabile, l'infezione cronica è dinamica, con l'ospite e i processi virali bilanciati sul filo del rasoio in modo tale che piccoli cambiamenti possono interrompere l'equilibrio con conseguenze sfortunate.

Questo dinamismo ha effetti di fondamentale importanza sull'ospite, inclusa l'impostazione di un livello di citochine nei tessuti e nel siero che può alterare la funzione dell'immunità innata, delle cellule presentanti l'antigene (APC) e dei linfociti. Un esempio del lasso di tempo necessario per stabilire tali relazioni viene dagli herpesvirus, che derivano da un virus ancestrale condiviso da uccelli, rettili e mammiferi ⁸⁷ e hanno quindi condiviso più di 100 milioni di anni di coevoluzione con il loro attuale ospite.

Data la lunghezza di questa relazione genetica, è altamente probabile che gli adattamenti sia nel genoma dell'ospite che in quello virale aumentino la nostra capacità di coesistere con questi passeggeri secolari.

Queste complesse interazioni tra virus e ospite formano una rete intricata di geni e processi interdipendenti che devono essere compresi nel dettaglio molecolare se s'intende intervenire senza causare danni.

Virus persistenti: vecchi nemici e nuovi passeggeri

Sarebbe più appropriato classificare i virus che stabiliscono l'infezione cronica in base ai meccanismi utilizzati per stabilire la persistenza, ma questi sono ad oggi parzialmente noti.

Di seguito verranno classificati in base alla prevalenza stimata dell'infezione umana cronica, per enfatizzare il contributo del nostro viroma al nostro metagenoma (Tabella 1, Figura 2).

Moretta L, Romagnani C, Pietra G, Moretta A, Mingari MC.
NK-CTLs, a novel HLA-E-restricted T-cell subset.
Trends Immunol. 2003 Mar;24(3):136-43. doi: 10.1016/s1471-4906(03)00031-0.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12615209/>

⁸⁶ Guidotti LG, Chisari FV.
Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis.
Annu Rev Pathol. 2006;1:23-61. doi: 10.1146/annurev.pathol.1.110304.100230
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18039107/>

⁸⁷ McGeoch DJ, Rixon FJ, Davison AJ.
Topics in herpesvirus genomics and evolution.
Virus Res. 2006 Apr;117(1):90-104. doi: 10.1016/j.virusres.2006.01.002.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16490275/>

Renner DW, Szpara ML.
Impacts of Genome-Wide Analyses on Our Understanding of Human Herpesvirus Diversity and Evolution.
J Virol. 2017 Dec 14;92(1):e00908-17. doi: 10.1128/JVI.00908-17.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC5730764/>

I numeri nella Figura 2 sono estrapolazioni all'intera popolazione terrestre dalla prevalenza stimata di anticorpi antivirali nel siero (sieroprevalenza) (Tabella 1).

Poiché i dati sulla sieroprevalenza sono spesso ottenuti solo dai paesi sviluppati, l'impatto delle infezioni croniche sull'umanità nel suo insieme è scarsamente caratterizzato. Questa è una carenza importante nella nostra attuale comprensione del metagenoma umano. Tuttavia, un calcolo approssimativo rivela che ci sono molti miliardi di infezioni virali croniche negli esseri umani, con ciascuno di noi che ospita ~8-12 infezioni croniche (Figura 2, Tabella 1).

Alcuni di questi virus sono così comuni che sarebbe difficile trovare pazienti di controllo non infetti per studi per identificare le associazioni virali con la malattia, o gli effetti sul sistema immunitario "normale".

Il fatto che la maggior parte di noi non mostri sintomi evidenti di queste infezioni, contrassegna questi virus come parte del metagenoma degli individui normali. Questa osservazione non intende sminuire il fatto che alcuni di questi virus causano malattie umane. Piuttosto, richiama l'attenzione sulla necessità di considerare seriamente cosa significano queste infezioni per gli esseri umani senza una malattia evidente, e la necessità di comprendere le malattie croniche che sono considerate "non virali" in base alla nostra incapacità di confrontare gli individui infetti con quelli non infetti.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.036>

Nella prima colonna sono mostrati i virus noti per infettare cronicamente gli esseri umani, il loro tipo di acido nucleico primario e una stima della prevalenza dell'infezione negli esseri umani. Colonne aggiuntive elencano i siti noti di infezione persistente e le malattie associate all'infezione. Quando i numeri di incidenza non sono chiaramente disponibili in tutto il mondo, vengono sostituite le stime degli Stati Uniti. Per molti virus, i siti specifici di persistenza sono definiti in modo incompleto. Le sindromi cliniche associate presentate non costituiscono un elenco esaustivo. SNC, sistema nervoso centrale.

Table 1. Chronic Virus Infections in Humans

Virus, Primary Nucleic Acid, Estimated Percent of Humans Infected	Major Site of Persistence (Organ or Cell)	Acute Infection Examples	Disease during Chronic Infection		References
			Within Normal Hosts	Within Immunocompromised Hosts	
Endogenous retroviruses (ERV), DNA, 100%	All	Not applicable	Unknown	Unknown	Seifarth et al., 2005; Virgin, 2007b
Anellovirus/Circovirus, DNA, 90%–100%	Many tissues	Unknown	Unknown	Unknown	Davidson and Shulman, 2008; Ninomiya et al., 2008; Hino and Miyata, 2007
Human herpesvirus 6 (HHV-6), DNA, >90%	Lymphocytes?	Roseola	Unknown	Meningoencephalitis, secondary infections, immunomodulatory?	Straus, 2000; Yamanishi et al., 2007
Human herpesvirus 7 (HHV-7), DNA, >90%	Lymphocytes?	Roseola	Unknown	Unknown	Straus, 2000; Yamanishi et al., 2007
Varicella zoster virus (VZV), DNA, >90%	Sensory ganglia neurons and/or satellite cells, lymphocytes	Chicken pox	Herpes zoster	Disseminated disease, hepatitis, pneumonitis	Zerboni and Arvin, 2008; Straus, 2000
Cytomegalovirus (CMV), DNA, 80%–90%	Myelomonocytic cells	Mononucleosis	Rare	Disseminated disease, vasculitis, pneumonitis, retinitis, hepatitis, gastroenteritis, meningoencephalitis	Mocarski et al., 2007
Epstein-Barr virus (EBV), DNA, 80%–90%	Pharyngeal epithelial cells, B cells	Mononucleosis	Burkitt's lymphoma, nasopharyngeal carcinoma, non-Hodgkin's lymphoma	CNS lymphomas, oral hairy leukoplakia, lymphoproliferative disease	Rickinson and Kieff, 2007; Straus, 2000; Kieff and Rickinson, 2007
Polyomavirus BK, DNA, 72%–98%	Kidney	Unknown	Unknown	Hemorrhagic cystitis (post bone marrow transplantation), nephropathy (post kidney transplantation)	Zur, 2008
Polyomavirus JC, DNA, 72%–98%	Kidney, CNS	Unknown	Unknown	Progressive multifocal leukoencephalopathy	Zur, 2008
Adeno-associated virus (AAV), DNA, 60%–90%	Many tissues	Unknown	Unknown	Unknown	Gao et al., 2004; Berns and Parrish, 2008; Schnepp et al., 2005a, 2005b; Chen et al., 2005; Eries et al., 1999; Blacklow et al., 1968
Herpes simplex type 1 (HSV-1), DNA, 50%–70%	Sensory ganglia neurons	Pharyngitis, encephalitis, keratitis,	Cold sores, encephalitis, keratitis	Increased severity of same diseases, pneumonitis, hepatitis	Straus, 2000
Adenovirus, DNA, up to 80%	Adenoids, tonsils, lymphocytes	Upper respiratory infection, gastroenteritis	Unknown	Enteritis, hemorrhagic cystitis, pneumonitis, hepatitis, others	Garnett et al., 2002; Wold and Horwitz, 2008
Herpes simplex type 2 (HSV-2), DNA, 20%–50%	Sensory ganglia neurons	Genital herpes	Genital herpes, encephalitis	Increased severity of same diseases	Straus, 2000
Kaposi's sarcoma herpesvirus (KSHV) or human herpesvirus 8, DNA, 2%–60%	Endothelial cells, B cells	Unknown	Castleman's disease, Kaposi's sarcoma	Kaposi's sarcoma, primary effusion lymphoma	Ganem, 2006
Hepatitis B virus (HBV), DNA, 350 million, ~5%	Hepatocytes	Hepatitis	Cirrhosis, hepatocellular carcinoma	Same diseases	McGovern, 2007; Rehmann and Nascimbeni, 2005
GB virus C, RNA, 1%–4%	Lymphocytes	Unknown	Unknown	Unknown	Stapleton et al., 2004; Berzsenyi et al., 2005
Papilloma virus, DNA, <5%	Epithelial skin cells	Unknown	Papilloma, cervical and other mucosal carcinomas	Increased severity and incidence of same diseases	Leggatt and Frazer, 2007; Howley and Lowy, 2007

Table 1. Continued

Virus, Primary Nucleic Acid, Estimated Percent of Humans Infected	Major Site of Persistence (Organ or Cell)	Acute Infection Examples	Disease during Chronic Infection		References
			Within Normal Hosts	Within Immunocompromised Hosts	
Hepatitis C virus (HCV), RNA, 170 million, ~2.5%	Hepatocytes	Hepatitis	Cirrhosis, hepatocellular carcinoma	Same diseases	Rehermann and Nascimbeni, 2005; Lemon et al., 2007
Human immunodeficiency virus (HIV-1 and HIV-2), RNA, 33 million, ~0.5%	CD4 ⁺ T cells, monocyte/macrophages	Acute febrile illness	AIDS	AIDS	UNAIDS, 2008; Kuritzkes and Walter, 2007
Hepatitis D virus (HDV), RNA, 15 million, ~0.2%	Hepatocytes	Unknown	Exacerbation of chronic HBV infection	Unknown	Taylor et al., 2007
Human T cell leukemia virus type 1 (HTLV1), RNA, 10–20 million, ~0.2%	T cells	Unknown	Adult T cell leukemia (2%–6% of carriers), tropical spastic paraparesis, myelopathy, uveitis, dermatitis	Unknown	Matsuoka and Jeang, 2007; Lairmore and Franchini, 2007
Xenotropic murine leukemia virus-related virus (XMLV), RNA, unknown	Prostate	Unknown	Prostate Cancer?	Unknown	Urisman et al., 2006; Dong et al., 2007
HTLV II, III, IV, RNA, unknown	T cells	Unknown	Unknown	Unknown	Matsuoka and Jeang, 2007; Lairmore and Franchini, 2007
Polyomavirus MC, DNA, unknown	Merkel cell carcinoma	Unknown	Merkel cell carcinoma?	Unknown	Zur, 2008
Polyomavirus KI, DNA, unknown	Lung	Unknown	Unknown	Unknown	Zur, 2008
Polyomavirus WU, DNA, unknown	Lung	Unknown	Unknown	Unknown	Zur, 2008
Rubella virus, German measles, RNA, rare	CNS	Rubella, arthritis	Progressive rubella panencephalitis	Unknown	Hobman and Chantler, 2007
Parvovirus B19, DNA, rare	Bone marrow erythroid progenitors	Fifth disease, arthritis	Aplastic crisis in hemolytic anemia, hydrops fetalis, chronic bone marrow deficiency	Red cell aplasia	Berns and Parrish, 2008; Norja et al., 2008
Measles virus, RNA, rare	Neurons and supporting cells in CNS	Measles	Subacute sclerosing panencephalitis, measles inclusion body encephalitis	Unknown	Griffin, 2007
Coxsackie, RNA, rare	Myocardial cells	Hand foot and mouth disease, herpangina	Myocarditis	Unknown	Chapman and Kim, 2008; Whitton and Feuer, 2004

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.036>

Il numero di esseri umani infettati da diversi virus cronici è stimato dalla percentuale di esseri umani portatori di un determinato virus (Tabella 1), assumendo che la popolazione mondiale sia di 6,75 miliardi [popolazione mondiale 2009]. Ove disponibile, viene utilizzata la stima ragionevole inferiore della prevalenza dell'infezione della Tabella 1. Per l'adenovirus, la situazione non è chiara e la prevalenza dell'infezione cronica è arbitrariamente fissata all'1%. Per alcuni virus nella tabella 1 che contribuiscono al nostro viroma, la prevalenza dell'infezione non è sufficientemente definita per essere inclusa nel grafico. Questi includono il virus correlato al virus della leucemia murina xenotropica (XMLV), il virus della leucemia a cellule T umana (HTLV II, III, IV) e i poliomavirus MC, KI e WU. Le stime nel grafico sono approssimative in quanto applicano i dati sulla prevalenza nelle popolazioni limitate studiate fino ad oggi alla popolazione umana globale.

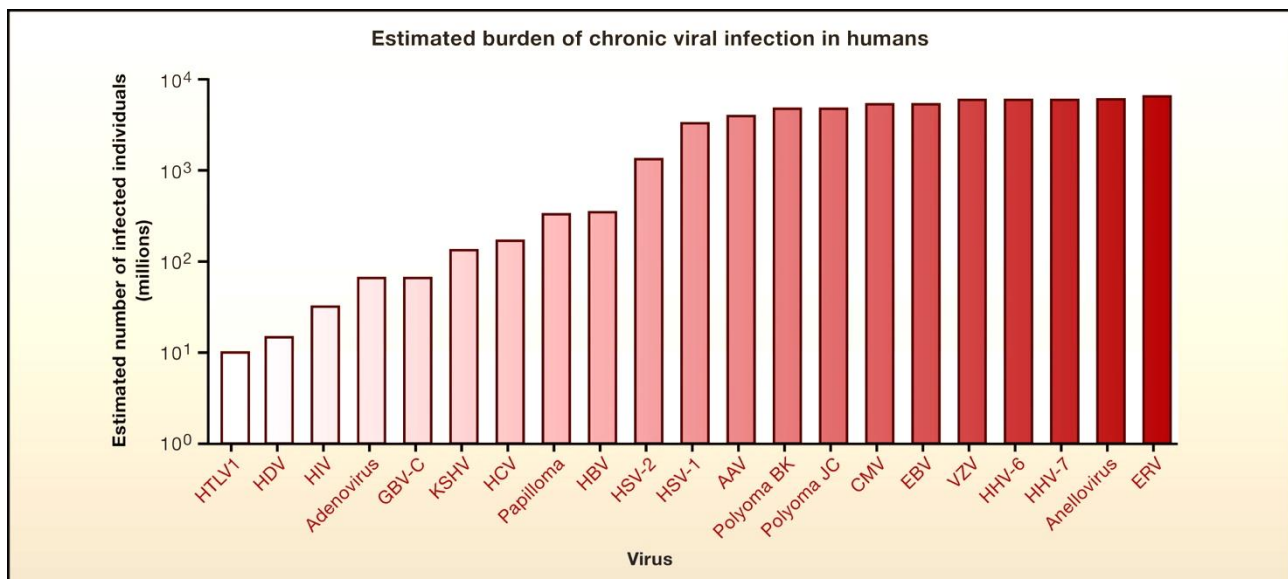


Fig. 2

Poco si sa di alcuni dei virus che ci abitano. Ciò è dovuto al focus della ricerca sui virus che causano malattie in un'alta percentuale di individui infetti. Molte delle infezioni virali croniche più diffuse causano solo raramente malattie, non sono associate ad alcuna malattia o causano malattie principalmente negli individui immunocompromessi (Figura 2, Tabella 1).

Al contrario, alcuni dei virus meglio conosciuti come HCV, HBV e virus dell'immunodeficienza umana (HIV) sono di grande importanza medica, ma infettano una percentuale inferiore della popolazione umana rispetto alle loro controparti meno virulente (Figura 2, Tabella 1). Altri virus raramente stabiliscono un'infezione cronica, ma quando lo fanno sono particolarmente dannosi. Ad esempio, il virus del morbillo può causare una malattia neurodegenerativa progressiva (Tabella 1).

È importante sottolineare che il numero di virus persistenti riconosciuti è aumentato con l'avvento delle nuove tecnologie d'indagine molecolare. Ad esempio, ci sono cinque poliomavirus umani,⁸⁸ di cui i poliomavirus JC e BK inizialmente scoperti infettano tra il 72% e il 98% degli esseri umani.⁸⁹

⁸⁸ Zur Hausen H.

Novel human polyomaviruses--re-emergence of a well-known virus family as possible human carcinogens. *Int J Cancer*. 2008 Jul 15;123(2):247-250. doi: 10.1002/ijc.23620. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.23620>

Astegiano S, Terlizzi ME, Elia M, Cavallo GP, Costa C, Cavallo R, Bergallo M. Prevalence of polyomaviruses BK, JC, SV40, KI, and WU in non-malignant tonsil specimens. *Minerva Med*. 2010 Dec;101(6):385-9. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21196897/>

Prado JCM, Monezi TA, Amorim AT, Lino V, Paladino A, Boccardo E. Human polyomaviruses and cancer: an overview. *Clinics (Sao Paulo)*. 2018 Oct 11;73(suppl 1):e558s. doi: 10.6061/clinics/2018/e558s. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC6157077/>

Imperiale MJ, Jiang M. Polyomavirus Persistence. *Annu Rev Virol*. 2016 Sep 29;3(1):517-532. doi: 10.1146/annurev-virology-110615-042226. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27501263/>

⁸⁹ Hussain I, Tasneem F, Gilani US, Arshad MI, Farhan UI Haque M, Abbas Z, Umer M, Shahzad N. Human BK and JC polyomaviruses: Molecular insights and prevalence in Asia. *Virus Res*. 2020 Mar;278:197860. doi: 10.1016/j.virusres.2020.197860. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31911182/>

È probabile che la maggior parte degli esseri umani porti molti o tutti questi cinque virus e quindi porti infezioni croniche da poliomavirus nel sistema nervoso, nei reni, nei polmoni e nella pelle (Tabella 1).
Esistono anche molti poliomavirus animali e l'infezione da poliomavirus è altamente specifica per specie.⁹⁰
Ciò suggerisce una coevoluzione prolungata degli esseri umani con almeno cinque diversi poliomavirus.
Allo stesso modo, gli otto herpesvirus umani conosciuti sono estremamente efficienti nello stabilire infezioni croniche; la maggior parte di noi porta molti herpesvirus per tutta la vita (Tabella 1).⁹¹
I nuovi poliomavirus non sono i nostri unici passeggeri riconosciuti. Gli anellovirus e i virus correlati⁹², così come

⁹⁰ Moens U, Krumbholz A, Ehlers B, Zell R, Johne R, Calvignac-Spencer S, Lauber C.
Biology, evolution, and medical importance of polyomaviruses: An update.
Infect Genet Evol. 2017 Oct;54:18-38. doi: 10.1016/j.meegid.2017.06.011.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28634106/>

⁹¹ Sehrawat S, Kumar D, Rouse BT.
Herpesviruses: Harmonious Pathogens but Relevant Cofactors in Other Diseases?
Front Cell Infect Microbiol. 2018 May 25;8:177. doi: 10.3389/fcimb.2018.00177.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC5981231/>

Cohen JL.
Herpesvirus latency.
J Clin Invest. 2020;130(7):3361-3369. doi:10.1172/JCI136225
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC7324166/>

Knipe DM, Raja P, Lee JS.
Clues to mechanisms of herpesviral latent infection and potential cures.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Sep 29;112(39):11993-4. doi: 10.1073/pnas.1516224112.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC4593103/>

Hertel L.
Herpesviruses and intermediate filaments: close encounters with the third type.
Viruses. 2011;3(7):1015-1040. doi:10.3390/v3071015
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC3185793/>

Dreyfus DH.
Herpesviruses and the microbiome.
J Allergy Clin Immunol. 2013 Dec;132(6):1278-86. doi: 10.1016/j.jaci.2013.02.039.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23611298/>

SusanPayne
Viruses - From Understanding to Investigation
Chapter 34 - Family Herpesviridae 2017, Pages 269-278
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803109-4.00034-9>

⁹² Freer G, Maggi F, Pifferi M, Di Cicco ME, Peroni DG, Pistello M.
The Virome and Its Major Component, Anellovirus, a Convoluted System Molding Human Immune Defenses and Possibly Affecting the Development of Asthma and Respiratory Diseases in Childhood.
Front Microbiol. 2018;9:686. Published 2018 Apr 10. doi:10.3389/fmicb.2018.00686
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC5902699/>

Cebriá-Mendoza M, Arbona C, Larrea L, Díaz W, Arnau V, Peña C, Bou JV, Sanjuán R, Cuevas JM.
Deep viral blood metagenomics reveals extensive anellovirus diversity in healthy humans.
Sci Rep. 2021 Mar 25;11(1):6921. doi: 10.1038/s41598-021-86427-4.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC7994813/>

Shulman LM, Davidson I.
Viruses with Circular Single-Stranded DNA Genomes Are Everywhere!
Annu Rev Virol. 2017 Sep 29;4(1):159-180. doi: 10.1146/annurev-virology-101416-041953.
<https://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev-virology-101416-041953>

Davidson I, Shulman LM.
Unraveling the puzzle of human anellovirus infections by comparison with avian infections with the chicken anemia virus.
Virus Res. 2008 Oct;137(1):1-15. doi: 10.1016/j.virusres.2008.06.014.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18656506/>

Ninomiya M, Takahashi M, Nishizawa T, Shimosegawa T, Okamoto H.

i virus adeno-associati (AAV)⁹³, sono ora riconosciuti per infettare la maggior parte degli esseri umani entro la fine dell'infanzia (Tabella 1).

Molti tessuti umani ospitano genomi AAV come sequenze integrate nel DNA genomico o come episomi circolari.⁹⁴ Con l'impiego del sequenziamento del genoma ad alto rendimento aumenterà significativamente il numero di virus umani conosciuti, e il numero di virus che contribuiscono al nostro metagenoma attraverso l'instaurazione di un'infezione cronica.

Tipi di infezione virale cronica

I virus hanno sviluppato strategie altamente efficaci per stabilire un'infezione cronica nonostante la presenza di una risposta immunitaria antivirale dell'ospite attiva. Pertanto, dovrebbero essere visti come macchine molecolari altamente sofisticate che ci hanno "studiato" molto più a lungo di quanto non le stiamo studiando noi.

Development of PCR assays with nested primers specific for differential detection of three human anelloviruses and early acquisition of dual or triple infection during infancy.

J Clin Microbiol. 2008;46(2):507-514. doi:10.1128/JCM.01703-07
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC2238095/>

Hino S, Miyata H.

Torque teno virus (TTV): current status.
Rev Med Virol. 2007 Jan-Feb;17(1):45-57. doi: 10.1002/rmv.524.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17146841/>

⁹³ Gonçalves MA.

Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector.
Virology. 2005 May 6;2:43. doi: 10.1186/1743-422X-2-43.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC1131931/>

Hüser D, Khalid D, Lutter T, Hammer EM, Weger S, Heßler M, Kalus U, Tauchmann Y, Hensel-Wiegel K, Lassner D, Heilbronn R.
High Prevalence of Infectious Adeno-associated Virus (AAV) in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells Indicative of T Lymphocytes as Sites of AAV Persistence.

J Virol. 2017 Jan 31;91(4):e02137-16. doi: 10.1128/JVI.02137-16.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC5286889/>

Gao G, Vandenberghe LH, Alvira MR, Lu Y, Calcedo R, Zhou X, Wilson JM.
Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues.
J Virol. 2004 Jun;78(12):6381-8. doi: 10.1128/JVI.78.12.6381-6388.2004.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC416542/>

Calcedo R, Morizono H, Wang L, McCarter R, He J, Jones D, Batshaw ML, Wilson JM.
Adeno-associated virus antibody profiles in newborns, children, and adolescents.
Clin Vaccine Immunol. 2011 Sep;18(9):1586-8. doi: 10.1128/CI.05107-11.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC3165215/>

Meier AF, Fraefel C, Seyffert M.

The Interplay between Adeno-Associated Virus and its Helper Viruses.
Viruses. 2020 Jun 19;12(6):662. doi: 10.3390/v12060662.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC7354565/>

⁹⁴ Smith RH.

Adeno-associated virus integration: virus versus vector.
Gene Ther. 2008 Jun;15(11):817-22. doi: 10.1038/gt.2008.55.
<https://www.nature.com/articles/gt200855>

Maurer AC, Weitzman MD.

Adeno-Associated Virus Genome Interactions Important for Vector Production and Transduction.
Hum Gene Ther. 2020 May;31(9-10):499-511. doi: 10.1089/hum.2020.069.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC7232694/>

Schnepf BC, Jensen RL, Chen CL, Johnson PR, Clark KR.

Characterization of adeno-associated virus genomes isolated from human tissues.
J Virol. 2005 Dec;79(23):14793-803. doi: 10.1128/JVI.79.23.14793-14803.2005.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC1287572/>

Esistono tre strategie generali per l'infezione virale cronica: replicazione continua, latenza e riattivazione e invasione del genoma seguita da diffusione verticale di generazione in generazione.

Le differenze tra queste strategie hanno profonde implicazioni per il sistema immunitario e per virologi e immunologi che progettano modi per prevenire o controllare le infezioni virali croniche dannose. Queste diverse strategie virali espongono i genomi virali a forze evolutive distinte, determinando differenze molecolari significative tra i virus che persistono attraverso meccanismi diversi.

Replicazione produttiva continua

La replicazione continua dipende dalla generazione di virioni infettivi nonostante l'immunità antivirale in corso (Figura 3). I virus in questa categoria includono HIV, HBV e HCV negli esseri umani, il virus dell'immunodeficienza delle scimmie (SIV) nei primati non umani e il virus della coriomeningite linfocitica (LCMV) nei topi.

La replicazione continua può generare fino a 10^{12} particelle al giorno per HBV e HCV.⁹⁵

C'è un'enorme opportunità per l'evoluzione del genoma del virus durante tali infezioni. I virus che persistono attraverso la replicazione continua esprimono proteine virali potenzialmente antigeniche necessarie per l'assemblaggio e il rilascio virale, con conseguente stimolazione antigenica continua dei linfociti (Figura 3).

La replicazione continua ha altri effetti sul sistema immunitario: bassi livelli di danno tissutale e stimolazione di citochine infiammatorie e molecole co-stimolatorie possono alterare il normale sistema immunitario.

Alcuni virus, tuttavia, sono molto efficaci nell'evitare la generazione di tali segnali infiammatori. Ad esempio, l'infezione da HBV può procedere per settimane senza alcuna induzione significativa dell'immunità innata o adattativa in un approccio "invisibile" per stabilire l'infezione cronica.⁹⁶

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.036>

Processi di infezione virale acuta e cronica

I virus utilizzano una serie di strategie per l'infezione acuta e cronica. (In alto) La strategia utilizzata durante l'infezione acuta si traduce nell'espressione di antigeni associati alla produzione di nuovi virus. (Medio) Quando un virus persiste attraverso la replicazione produttiva continua, vengono prodotti gli stessi antigeni espressi durante l'infezione acuta, ma il virus ha l'opportunità di evolversi sotto la selezione immunitaria per produrre virus che esprimono neo-antigeni e hanno capacità patogenetiche alterate.

(In basso) Contrariamente ai due processi precedenti, i virus che persistono tramite latenza e riattivazione possono generare antigeni associati alla replicazione produttiva, ma possono anche entrare in stati trascrizionali in cui vengono espressi antigeni associati all'infezione latente. Nel caso più estremo, non vengono espressi antigeni, con conseguente silenzio immunologico. Potrebbe esserci più di un programma genico associato alla latenza ed è probabile che i programmi genici di latenza siano specifici del tipo di cellula. Quando questi virus si riattivano, riattivano un programma di replicazione produttivo ed esprimono ancora una volta antigeni virali associati alla produzione di nuovi virus.

⁹⁵ Rehermann B, Nascimbeni M.

Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection.
Nat Rev Immunol. 2005 Mar;5(3):215-29. doi: 10.1038/nri1573.
<https://www.nature.com/articles/nri1573>

Shawa, Isaac.

Hepatitis B and C Viruses. Hepatitis B and C, edited by Luis Rodrigo,
IntechOpen, 2019. 10.5772/intechopen.82772.
<https://www.intechopen.com/chapters/65423>

⁹⁶ Wieland SF, Chisari FV.

Stealth and cunning: hepatitis B and hepatitis C viruses.
J Virol. 2005;79(15):9369-9380. doi:10.1128/JVI.79.15.9369-9380.2005
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC1181548/>

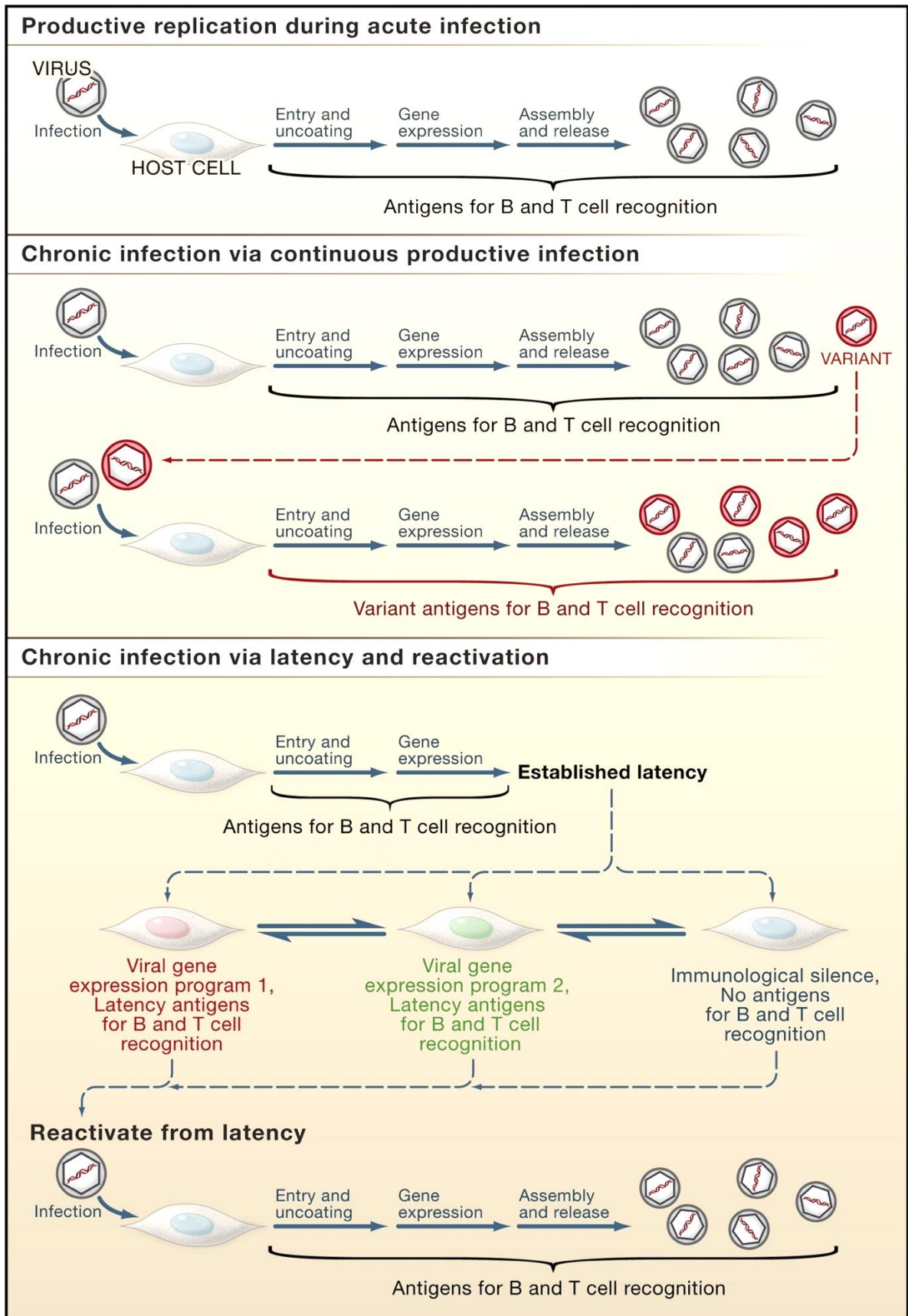


Fig. 3

Infezione latente e riattivazione

La latenza cellulare (qui denominata latenza) non è né la replicazione virale lenta né la presenza di acido nucleico virale senza la capacità di riattivarsi. Piuttosto, la latenza è uno stato trascrizionale e traduzionale unico di un virus in cui il ciclo produttivo di replicazione, e quindi l'espressione della maggior parte o di tutti gli antigeni, è silente ma può ricominciare (Figura 3). La latenza cellulare non deve essere confusa con la latenza clinica, un termine usato alternativamente per descrivere il tempo che intercorre tra l'infezione e i segni di malattia o un ospite portatore di un virus latente.

La natura della latenza è influenzata dal virus, dalla cellula infetta e dall'ambiente immunologico dell'ospite. Possono esserci diverse forme trascrizionali di latenza per un dato virus, che riflettono diversi modelli di espressione genica e antigenica. Ad esempio, il virus di Epstein-Barr (EBV) utilizza tre distinti programmi di espressione genica di latenza.⁹⁷

Lo stato di differenziazione della cellula infetta latente è una variabile essenziale nella latenza e nella riattivazione. Ad esempio, i papillomavirus infettano in modo latente le cellule staminali epiteliali e avviano diversi programmi di trascrizione virale mentre le cellule della pelle si differenziano e si spostano verso la superficie del corpo, determinando infine la desquamazione di uno strato di cellule metabolicamente morte pieno di virus infettivo.⁹⁸

⁹⁷ Rickinson, A., and Kieff, E. (2007). Epstein-Barr virus. In Fields Virology, D. Knipe, D.E. Griffin, R.A. Lamb, S.E. Straus, P.M. Howley, M.A. Martin, and B. Roizman, eds. (Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins), pp. 2655–2700.

Kieff, E., and Rickinson, A. (2007). Epstein-Barr virus and its replication. In Fields Virology, D. Knipe and P. Howley, eds. (Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins), pp. 2605–2654.

Kerr JR.
Epstein-Barr virus (EBV) reactivation and therapeutic inhibitors.
J Clin Pathol. 2019 Oct;72(10):651-658. doi: 10.1136/jclinpath-2019-205822.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31315893/>

Sausen DG, Bhutta MS, Gallo ES, Dahari H, Borenstein R.
Stress-Induced Epstein-Barr Virus Reactivation.
Biomolecules. 2021 Sep 18;11(9):1380. doi: 10.3390/biom11091380.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC8470332/>

Thorley-Lawson DA, Hawkins JB, Tracy SI, Shapiro M.
The pathogenesis of Epstein-Barr virus persistent infection.
Curr Opin Virol. 2013 Jun;3(3):227-32. doi: 10.1016/j.coviro.2013.04.005.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC3789532/>

Murata T.
Regulation of Epstein-Barr virus reactivation from latency.
Microbiol Immunol. 2014 Jun;58(6):307-17. doi: 10.1111/1348-0421.12155.
<https://doi.org/10.1111/1348-0421.12155>

⁹⁸ Longworth MS, Laimins LA.
Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia.
Microbiol Mol Biol Rev. 2004;68(2):362-372. doi:10.1128/MMBR.68.2.362-372.2004
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC419925/>.

Della Fera AN, Warburton A, Coursey TL, Khurana S, McBride AA.
Persistent Human Papillomavirus Infection.
Viruses. 2021 Feb 20;13(2):321. doi: 10.3390/v13020321.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC7923415/>

Maglennon GA, Doorbar J.
The biology of papillomavirus latency.
Open Virol J. 2012;6():190-7. doi: 10.2174/1874357901206010190
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC3547330/>

Doorbar J.
Latent papillomavirus infections and their regulation.
Curr Opin Virol. 2013 Aug;3(4):416-21. doi: 10.1016/j.coviro.2013.06.003.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23816390/>

Contrariamente ai virus a replicazione continua, i virus latenti si nascondono all'immunità adattativa con uno stato trascrizionale e antigenicamente quiescente. EBV può stabilire latenza nei linfociti B della memoria con espressione non rilevabile di RNA codificanti proteine, almeno fino a quando la cellula infettata latente non si divide.⁹⁹ Non esiste un meccanismo immunitario noto per riconoscere tali cellule infette da virus latenti; queste cellule non possono essere eliminate a meno che il virus non possa essere indotto a esprimere l'antigene.

Questo spiega l'eccezionale successo dei virus che prendono di mira le cellule longeve per la latenza. Esempi di queste cellule includono i neuroni (HSV, virus varicella zoster o VZV), le cellule staminali ematopoietiche (citomegalovirus o CMV), cellule staminali epiteliali (papillomavirus) e linfociti della memoria (HIV, EBV, KSHV o herpesvirus associato al sarcoma di Kaposi) (Tabella 1).

La capacità di stabilire un'infezione immunologicamente silente ha ovvie implicazioni per la fattibilità di vaccini preventivi o terapeutici. Prevenire queste infezioni richiederebbe il blocco immunitario dell'infezione prima dell'instaurazione della latenza o l'induzione di una risposta immunitaria che può sia innescare la riattivazione virale dalla latenza che eliminare le cellule infette ora visibili (Figura 3).

La cinetica dell'instaurazione della latenza immunologicamente silente è poco conosciuta a causa della complessità degli studi sulla storia naturale dell'infezione nell'uomo e della difficoltà di quantificare le cellule infette latenti anche utilizzando tecnologie molecolari avanzate. Il rapido instaurarsi di una latenza immunologicamente silente, come può verificarsi durante l'infezione da HIV, potrebbe rendere impossibile il raggiungimento dell'immunità sterilizzante. I meccanismi responsabili della scelta tra infezione latente o produttiva e il processo di riattivazione sono poco conosciuti per molti virus. Ciò limita la considerazione di come si potrebbero eliminare le cellule infette latenti.¹⁰⁰

I virus che stabiliscono la latenza si riattivano in modo intermittente per generare nuovo virus infettivo da diffondere all'interno e tra gli ospiti, generando così un'ondata di antigene. La riattivazione abortiva si verifica frequentemente per herpesvirus¹⁰¹ come EBV e CMV¹⁰² e forse altri virus.

⁹⁹ Hochberg D, Middeldorp JM, Catalina M, Sullivan JL, Luzuriaga K, Thorley-Lawson DA. Demonstration of the Burkitt's lymphoma Epstein-Barr virus phenotype in dividing latently infected memory cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(1):239-244. doi:10.1073/pnas.2237267100 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC314169/>

Ressing ME, van Gent M, Gram AM, Hooykaas MJ, Piersma SJ, Wiertz EJ. Immune Evasion by Epstein-Barr Virus. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2015;391:355-81. doi: 10.1007/978-3-319-22834-1_12. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26428381/>

Bauer M, Jasinski-Bergner S, Mandelboim O, Wickenhauser C, Seliger B. Epstein-Barr Virus-Associated Malignancies and Immune Escape: The Role of the Tumor Microenvironment and Tumor Cell Evasion Strategies. *Cancers (Basel)*. 2021 Oct 16;13(20):5189. doi: 10.3390/cancers13205189. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC8533749/>

¹⁰⁰ Lieberman PM. Epigenetics and Genetics of Viral Latency. *Cell Host Microbe*. 2016 May 11;19(5):619-28. doi: 10.1016/j.chom.2016.04.008. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC5166714/>

¹⁰¹ Weidner-Glunde M, Kruminis-Kaszkiel E, Savanagoudar M. Herpesviral Latency-Common Themes. *Pathogens*. 2020 Feb 15;9(2):125. doi: 10.3390/pathogens9020125. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC7167855/>

¹⁰² Kurz SK, Reddehase MJ. Patchwork pattern of transcriptional reactivation in the lungs indicates sequential checkpoints in the transition from murine cytomegalovirus latency to recurrence. *J Virol*. 1999;73(10):8612-8622. doi:10.1128/JVI.73.10.8612-8622.1999 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC112881/>

Crawford LB, Diggins NL, Caposio P, Hancock MH. Advances in Model Systems for Human Cytomegalovirus Latency and Reactivation. *mBio*. 2022 Jan 11;13(1):e0172421. doi: 10.1128/mbio.01724-21. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC8749418/>

In questo processo, i virus esprimono parte del programma del gene di replicazione produttiva che codifica per gli antigeni che possono attivare il sistema immunitario, ma la riattivazione viene interrotta prima della generazione del virus infettivo. Frequenti eventi di riattivazione completa o abortiva provocano una stimolazione immunitaria ripetitiva, una situazione che può essere simile a quella osservata durante la replicazione continua.

Infezione cronica della linea germinale

I genomi dei mammiferi sono cronicamente "infettati" da un numero enorme di elementi retrovirali endogeni (ERVs) che si diffondono verticalmente da una generazione ospite all'altra come genomi virali integrati o genomi parziali nei cromosomi dell'ospite.¹⁰³

Alcuni ERVs sono competenti per la replicazione, ma molti altri sono difettosi, però anche gli ERVs difettosi possono esprimere proteine. Gli ERVs umani di oltre 30 lignaggi costituiscono forse l'8%-9% del genoma umano.¹⁰⁴

Laichalk LL, Thorley-Lawson DA.

Terminal differentiation into plasma cells initiates the replicative cycle of Epstein-Barr virus in vivo.

J Virol. 2005;79(2):1296-1307. doi:10.1128/JVI.79.2.1296-1307.2005

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC538585/>

Inagaki T, Sato Y, Ito J, Takaki M, Okuno Y, Yaguchi M, Masud HMAA, Watanabe T, Sato K, Iwami S, Murata T, Kimura H.

Direct Evidence of Abortive Lytic Infection-Mediated Establishment of Epstein-Barr Virus Latency During B-Cell Infection.

Front Microbiol. 2021 Jan 21;11:575255. doi: 10.3389/fmicb.2020.575255.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC7888302/>

¹⁰³ Mager DL, Stoye JP.

Mammalian Endogenous Retroviruses.

Microbiol Spectr. 2015 Feb;3(1):MDNA3-0009-2014. doi: 10.1128/microbiolspec.MDNA3-0009-2014.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26104559/>

Irwin NAT, Pittis AA, Richards TA, Keeling PJ.

Systematic evaluation of horizontal gene transfer between eukaryotes and viruses.

Nat Microbiol. 2022 Feb;7(2):327-336. doi: 10.1038/s41564-021-01026-3.

<https://www.nature.com/articles/s41564-021-01026-3>

Bai J, Yang ZZ, Li H, Hong Y, Fan DD, Lin AF, Xiang LX, Shao JZ.

Genome-Wide Characterization of Zebrafish Endogenous Retroviruses Reveals Unexpected Diversity in Genetic Organizations and Functional Potentials.

Microbiol Spectr. 2021 Dec 22;9(3):e0225421. doi: 10.1128/spectrum.02254-21.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC8672886/>

Johnson WE.

Origins and evolutionary consequences of ancient endogenous retroviruses.

Nat Rev Microbiol. 2019 Jun;17(6):355-370. doi: 10.1038/s41579-019-0189-2.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30962577/>

Kitao K, Nakagawa S, Miyazawa T.

An ancient retroviral RNA element hidden in mammalian genomes and its involvement in co-opted retroviral gene regulation.

Retrovirology. 2021 Nov 10;18(1):36. doi: 10.1186/s12977-021-00580-2.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC8579622/>

Mao J, Zhang Q, Cong YS.

Human endogenous retroviruses in development and disease.

Comput Struct Biotechnol J. 2021;19:5978-5986. Published 2021 Nov 2. doi:10.1016/j.csbj.2021.10.037

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC8604659/>

¹⁰⁴ Virgin, H.W. (2007b). Pathogenesis of viral infection. In Fields Virology, D.M. Knipe and P.M. Howley, eds. (Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins), pp. 327–388.

Johnson WE.

Origins and evolutionary consequences of ancient endogenous retroviruses.

Nat Rev Microbiol. 2019 Jun;17(6):355-370. doi: 10.1038/s41579-019-0189-2.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30962577/>

Song Y, Li X, Wei X, Cui J.

Human Endogenous Retroviruses as Biomedicine Markers.

Virol Sin. 2021 Oct;36(5):852-858. doi: 10.1007/s12250-021-00387-7.

Gli ERVs sono trascritti in una varietà di tessuti normali e malati¹⁰⁵ e possono proliferare all'interno del genoma sia per produzione di virus che reinfettano il genoma sia per retrotrasposizione.¹⁰⁶

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33905075/>

¹⁰⁵ Tokuyama M, Kong Y, Song E, Jayewickreme T, Kang I, Iwasaki A.
ERVmap analysis reveals genome-wide transcription of human endogenous retroviruses.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2018;115(50):12565-12572. doi:10.1073/pnas.1814589115
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC6294949/>

Voisset C, Weiss RA, Griffiths DJ.
Human RNA "rumor" viruses: the search for novel human retroviruses in chronic disease.
Microbiol Mol Biol Rev. 2008;72(1):157-196. doi:10.1128/MMBR.00033-07
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC2268285/>

Young GR, Stoye JP, Kassiotis G.
Are human endogenous retroviruses pathogenic? An approach to testing the hypothesis.
Bioessays. 2013 Sep;35(9):794-803. doi: 10.1002/bies.201300049.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC4352332/>

Weiss RA.
Human endogenous retroviruses: friend or foe?
APMIS. 2016 Jan-Feb;124(1-2):4-10. doi: 10.1111/apm.12476.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26818257/>

Okahara G, Matsubara S, Oda T, Sugimoto J, Jinno Y, Kanaya F.
Expression analyses of human endogenous retroviruses (HERVs): tissue-specific and developmental stage-dependent expression of HERVs.
Genomics. 2004 Dec;84(6):982-90. doi: 10.1016/j.ygeno.2004.09.004.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15533715/>

Brütting C, Emmer A, Kornhuber ME, Staeger MS.
Cooccurrences of Putative Endogenous Retrovirus-Associated Diseases.
Biomed Res Int. 2017;2017:7973165. doi: 10.1155/2017/7973165.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC5343228/>

Antony JM, Deslauriers AM, Bhat RK, Ellestad KK, Power C.
Human endogenous retroviruses and multiple sclerosis: innocent bystanders or disease determinants?
Biochim Biophys Acta. 2011;1812(2):162-176. doi:10.1016/j.bbdis.2010.07.016
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC7172332/>

Suntsova M, Garazha A, Ivanova A, Kaminsky D, Zhavoronkov A, Buzdin A.
Molecular functions of human endogenous retroviruses in health and disease.
Cell Mol Life Sci. 2015 Oct;72(19):3653-75. doi: 10.1007/s00018-015-1947-6.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26082181/>

Dolei A.
Endogenous retroviruses and human disease.
Expert Rev Clin Immunol. 2006 Jan;2(1):149-67. doi: 10.1586/1744666X.2.1.149.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20477095/>

¹⁰⁶ Greenwood AD, Ishida Y, O'Brien SP, Roca AL, Eiden MV.
Transmission, Evolution, and Endogenization: Lessons Learned from Recent Retroviral Invasions.
Microbiol Mol Biol Rev. 2017;82(1):e00044-17. Published 2017 Dec 13. doi:10.1128/MMBR.00044-17
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC5813887/>

Weiss RA.
Exchange of Genetic Sequences Between Viruses and Hosts.
Curr Top Microbiol Immunol. 2017;407:1-29. doi: 10.1007/82_2017_21.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28550453/>

Stoye JP.
Studies of endogenous retroviruses reveal a continuing evolutionary saga.
Nat Rev Microbiol. 2012 May 8;10(6):395-406. doi: 10.1038/nrmicro2783.
<https://www.nature.com/articles/nrmicro2783>

Grandi N, Tramontano E.

HERV proteins expressed in tissues and cultured cells^d

HERV family	Protein(s) expressed	Tissue
HERV-K	Gag-Pro-Pol	Testicular cancer, melanomas, myeloproliferative disease, breast cancer, placenta
	Env	GCTs, melanoma, ovarian cancer
	Rec, Np9	GCTs, melanoma
	SAg	EBV-infected B cells, IDDM(?)
	Particles	GCTs, melanoma, myeloproliferative disease
HERV-W	Gag	Brain, normal tissue, MS lesions, schizophrenia
	Env (syncytin-1)	Brain, placenta, breast cancer
	Particles ^b (MSRV, LM7)	MS patient B cells and leptomeningeal cells
HERV-E	Env	Ovarian cancer, psoriasis, normal skin, interstitial lung disease
HERV-R	Env	Placenta, ovarian cancer
HERV-H	Intact ORFs for Env proteins	Unknown but immunosuppressive in experimental systems
	Particles ^b (RGH-2)	Transformed lymphocyte cultures from MS patients
HERV-FRD	Env (syncytin-2)	Placenta
HRES-1 ^e	Gag-related protein	Brain, liver, T-lymphoblastoid cell lines

Type W Human Endogenous Retrovirus (HERV-W) Integrations and Their Mobilization by L1 Machinery: Contribution to the Human Transcriptome and Impact on the Host Physiopathology.
Viruses. 2017 Jun 27;9(7):162. doi: 10.3390/v9070162.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC5537654/>

Schulz WA, Steinhoff C, Florl AR.
Methylation of endogenous human retroelements in health and disease.
Curr Top Microbiol Immunol. 2006;310:211-50. doi: 10.1007/3-540-31181-5_11.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16909913/>

Zhang M, Liang JQ, Zheng S.
Expressional activation and functional roles of human endogenous retroviruses in cancers.
Rev Med Virol. 2019;29(2):e2025. doi:10.1002/rmv.2025
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC6590502/>

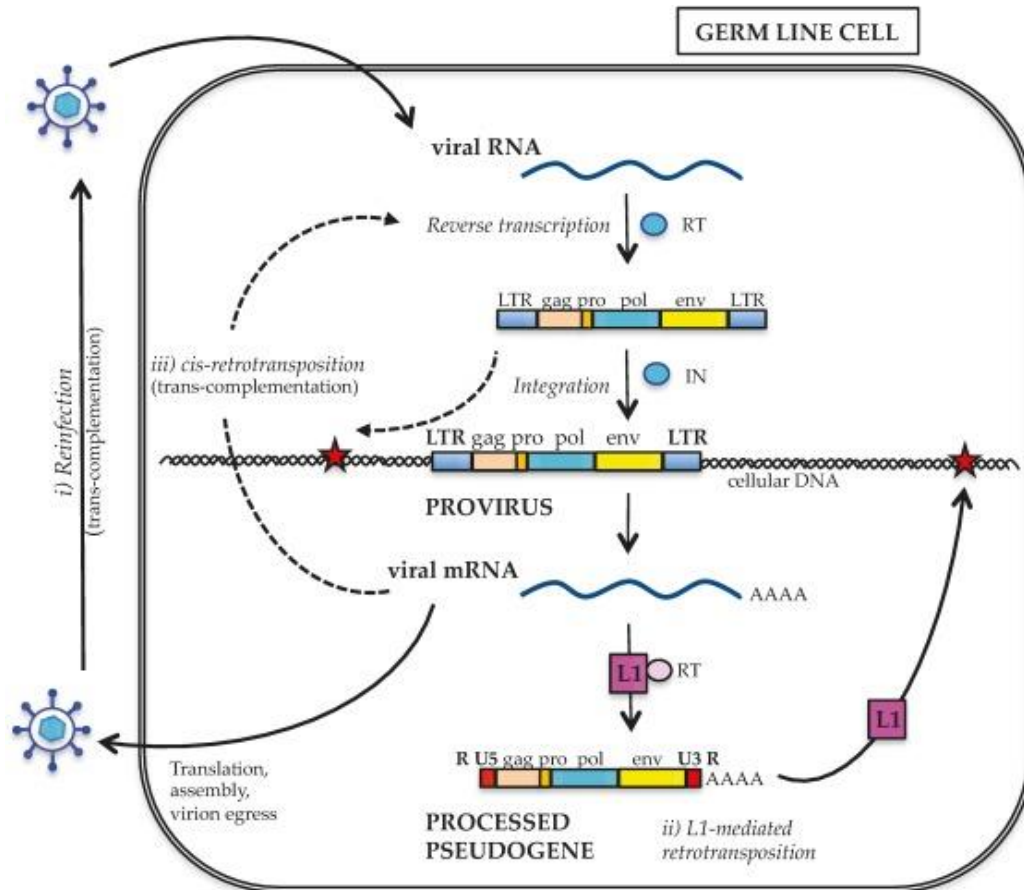
Seifarth W, Frank O, Zeilfelder U, et al.
Comprehensive analysis of human endogenous retrovirus transcriptional activity in human tissues with a retrovirus-specific microarray.
J Virol. 2005;79(1):341-352. doi:10.1128/JVI.79.1.341-352.2005
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC538696/>

Grandi N, Tramontano E.
Human Endogenous Retroviruses Are Ancient Acquired Elements Still Shaping Innate Immune Responses.
Front Immunol. 2018 Sep 10;9:2039. doi: 10.3389/fimmu.2018.02039.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC6139349/>

Mourier T, Willerslev E.
Does selection against transcriptional interference shape retroelement-free regions in mammalian genomes?
PLoS One. 2008;3(11):e3760. doi: 10.1371/journal.pone.0003760.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC2582637/>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC2268285/>

^aMany HERV families also transcribe RNA in a variety of tissues GCT, germ cell tumor. ^bThe identities of these RVLPS have not been demonstrated experimentally. ^cThe retroviral origin of HRES-1 is disputed



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC5537654/>

Amplificazione della sequenza HERV-W in cellule germinali. L'acquisizione iniziale delle sequenze HERV-W è stata dovuta a un tradizionale processo di infezione retrovirale. L'RNA virale è stato trascritto inversamente e il dsDNA provirale è stato integrato nel genoma della cellula ospite rispettivamente dagli enzimi virali della trascrittasi inversa (RT) e dell'integrasi (IN). L'espressione integrata del provirus ha fornito mRNA virali, che hanno generato nuove inserzioni HERV-W (stelle rosse) attraverso (i) retrotrasposizione mediata da L1: meccanismo di copia e incolla in cui gli mRNA virali sono stati trascritti inversamente da L1 RT e inseriti in una nuova posizione genomica, generazione di pseudogeni elaborati da HERV-W; (ii) reinfezione: gli mRNA provirali sono stati tradotti e le proteine derivate assemblate in una particella virale matura, che dopo la sua uscita avrebbe potuto reinfectare la stessa cellula; (iii) cis-retrotrasposizione: gli mRNA di HERV-W avrebbero potuto essere utilizzati come modelli per ulteriori eventi di trascrizione-integrazione inversa, portando all'acquisizione di nuove inserzioni in assenza di una fase extracellulare. A causa dell'accumulo di mutazioni nel tempo, gli ultimi due meccanismi potrebbero aver richiesto proteine fornite in trans da un virus helper. Come mostrato nella tabella che riporta il numero di inserzioni di HERV-W in ciascun cromosoma, la formazione di pseudogeni elaborati mediata da L1 era responsabile dell'acquisizione di circa 2/3 delle sequenze di HERV-W.

Gli ERVs possono avere due effetti sul sistema immunitario.¹⁰⁷

¹⁰⁷ Buttler CA, Chuong EB.

Emerging roles for endogenous retroviruses in immune epigenetic regulation.

Immunol Rev. 2022 Jan;305(1):165-178. doi: 10.1111/imr.13042.

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/imr.13042>

Meyer TJ, Rosenkrantz JL, Carbone L, Chavez SL.

Endogenous Retroviruses: With Us and against Us.

Front Chem. 2017 Apr 7;5:23. doi: 10.3389/fchem.2017.00023.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC5384584/>

Grandi N, Tramontano E.

HERV Envelope Proteins: Physiological Role and Pathogenic Potential in Cancer and Autoimmunity.

In primo luogo, possono codificare antigeni delle cellule B o T.¹⁰⁸ Gli anticorpi contro un tale antigene codificato da ERVs contribuiscono all'arterite spontanea nel ceppo SL/Ni dei topi di laboratorio.¹⁰⁹
Una proteina antigenica ERV è espressa anche in topi diabetici non obesi in concomitanza con lo sviluppo del diabete.¹¹⁰

Front Microbiol. 2018;9:462. Published 2018 Mar 14. doi:10.3389/fmicb.2018.00462
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC5861771/>

Brodziak A, Ziółko E, Muc-Wierzoń M, Nowakowska-Zajdel E, Kokot T, Klakla K.
The role of human endogenous retroviruses in the pathogenesis of autoimmune diseases.
Med Sci Monit. 2012;18(6):RA80-RA88. doi:10.12659/msm.882892
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC3560723/>

Geis FK, Goff SP.
Silencing and Transcriptional Regulation of Endogenous Retroviruses: An Overview.
Viruses. 2020;12(8):884. Published 2020 Aug 13. doi:10.3390/v12080884
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC7472088/>

Durnaoglu S, Lee SK, Ahnn J.
Human Endogenous Retroviruses as Gene Expression Regulators: Insights from Animal Models into Human Diseases.
Mol Cells. 2021;44(12):861-878. doi:10.14348/molcells.2021.5016
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC8718366/>

¹⁰⁸ Saini SK, et al
Human endogenous retroviruses form a reservoir of T cell targets in hematological cancers.
Nat Commun. 2020 Nov 9;11(1):5660. doi: 10.1038/s41467-020-19464-8.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC7653045/>

Mullins CS, Linnebacher M.
Endogenous retrovirus sequences as a novel class of tumor-specific antigens: an example of HERV-H env encoding strong CTL epitopes.
Cancer Immunol Immunother. 2012 Jul;61(7):1093-100. doi: 10.1007/s00262-011-1183-3.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22187063/>

Tu X, Li S, Zhao L, Xiao R, Wang X, Zhu F.
Human leukemia antigen-A*0201-restricted epitopes of human endogenous retrovirus W family envelope (HERV-W env) induce strong cytotoxic T lymphocyte responses.
Virol Sin. 2017 Aug;32(4):280-289. doi: 10.1007/s12250-017-3984-9.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC6598903/>

Christensen T.
Human endogenous retroviruses in the aetiology of MS.
Acta Neurol Scand. 2017 Nov;136 Suppl 201:18-21. doi: 10.1111/ane.12836.
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ane.12836>

Müller MD, Holst PJ, Nielsen KN.
A Systematic Review of Expression and Immunogenicity of Human Endogenous Retroviral Proteins in Cancer and Discussion of Therapeutic Approaches.
Int J Mol Sci. 2022;23(3):1330. Published 2022 Jan 25. doi:10.3390/ijms23031330
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC8836156/>

¹⁰⁹ Miyazawa M, Nose M, Kawashima M, Kyogoku M.
Pathogenesis of arteritis of SL/Ni mice. Possible lytic effect of anti-gp70 antibodies on vascular smooth muscle cells.
J Exp Med. 1987;166(4):890-908. doi:10.1084/jem.166.4.890
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC2188704/>

Miyazawa M, Tabata N, Fujisawa R, Hashimoto K, Shiwaku H, Takei YA.
Roles of endogenous retroviruses and platelets in the development of vascular injury in spontaneous mouse models of autoimmune diseases.
Int J Cardiol. 2000 Aug 31;75 Suppl 1:S65-73; discussion S75-6. doi: 10.1016/s0167-5273(00)00193-5.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10980339/>

Hashimoto K, Tabata N, Fujisawa R, Matsumura H, Miyazawa M.
Induction of microthrombotic thrombocytopenia in normal mice by transferring a platelet-reactive, monoclonal anti-gp70 autoantibody established from MRL/lpr mice: an autoimmune model of thrombotic thrombocytopenic purpura.
Clin Exp Immunol. 2000 Jan;119(1):47-56. doi: 10.1046/j.1365-2249.2000.01116.x.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC1905520/>

¹¹⁰ Levisetti MG, Suri A, Vidavsky I, Gross ML, Kanagawa O, Unanue ER.

In secondo luogo, i superantigeni codificati con gli ERVs possono modellare il repertorio dei linfociti T.¹¹¹ Questi superantigeni possono stimolare direttamente i linfociti T portatori di forme specifiche del recettore dei linfociti T, con conseguente eliminazione dei linfociti T stimolati. L'ERV-K18 umano codifica per un superantigene che seleziona negativamente specifiche cellule T umane e la cui espressione è aumentata dall'infezione da EBV o dall'interferone- α (IFN- α).¹¹² Questo è un punto molto importante quando si considera il ruolo dell'infezione virale cronica nel plasmare il sistema immunitario umano. Le interazioni tra virus cronici, come nell'esempio dell'EBV che induce l'espressione di una proteina ERV immunoregolatrice, possono definire il repertorio di rilevamento dell'antigene da parte dei linfociti T. Diversi studi hanno riscontrato un'associazione tra l'insorgenza di sclerosi multipla, infezione latente da EBV e attivazione di HERVs.¹¹³

Autoantibodies and CD4 T cells target a beta cell retroviral envelope protein in non-obese diabetic mice. *Int Immunol.* 2003 Dec;15(12):1473-83. doi: 10.1093/intimm/dxg143. PMID: 14645156. <https://academic.oup.com/intimm/article/15/12/1473/678199>

Bashratyan R, Regn D, Rahman MJ, Marquardt K, Fink E, Hu WY, Elder JH, Binley J, Sherman LA, Dai YD. Type 1 diabetes pathogenesis is modulated by spontaneous autoimmune responses to endogenous retrovirus antigens in NOD mice. *Eur J Immunol.* 2017 Mar;47(3):575-584. doi: 10.1002/eji.201646755. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/eji.201646755>

Dai YD, Dias P, Margosiak A, Marquardt K, Bashratyan R, Hu WY, Haskins K, Evans LH. Endogenous retrovirus Gag antigen and its gene variants are unique autoantigens expressed in the pancreatic islets of non-obese diabetic mice. *Immunol Lett.* 2020 Jul;223:62-70. doi: 10.1016/j.imlet.2020.04.007. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC7328525/>

¹¹¹ Meylan F, De Smedt M, Leclercq G, Plum J, Leupin O, Marguerat S, Conrad B. Negative thymocyte selection to HERV-K18 superantigens in humans. *Blood.* 2005 Jun 1;105(11):4377-82. doi: 10.1182/blood-2004-07-2596. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-07-2596>

Sutkowski N, Conrad B, Thorley-Lawson DA, Huber BT. Epstein-Barr virus transactivates the human endogenous retrovirus HERV-K18 that encodes a superantigen. *Immunity.* 2001 Oct;15(4):579-89. doi: 10.1016/s1074-7613(01)00210-2. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00210-2](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00210-2)

Stauffer Y, Marguerat S, Meylan F, Ucla C, Sutkowski N, Huber B, Pelet T, Conrad B. Interferon-alpha-induced endogenous superantigen. a model linking environment and autoimmunity. *Immunity.* 2001 Oct;15(4):591-601. doi: 10.1016/s1074-7613(01)00212-6. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00212-6](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00212-6)

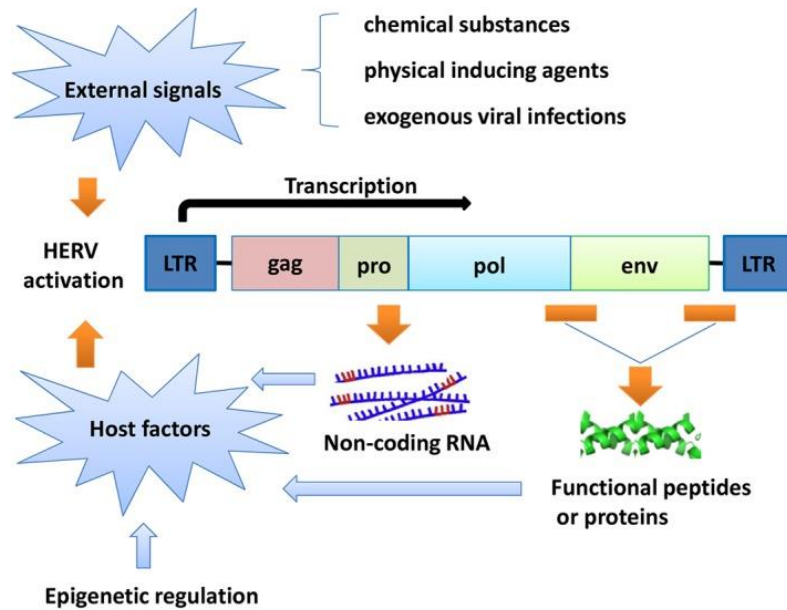
Emmer A, Staeger MS, Kornhuber ME. The retrovirus/superantigen hypothesis of multiple sclerosis. *Cell Mol Neurobiol.* 2014 Nov;34(8):1087-96. doi: 10.1007/s10571-014-0100-7. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25138639/>

¹¹² Sutkowski N, Chen G, Calderon G, Huber BT. Epstein-Barr virus latent membrane protein LMP-2A is sufficient for transactivation of the human endogenous retrovirus HERV-K18 superantigen. *J Virol.* 2004;78(14):7852-7860. doi:10.1128/JVI.78.14.7852-7860.2004 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC434102/>

Hsiao FC, Lin M, Tai A, Chen G, Huber BT. Cutting edge: Epstein-Barr virus transactivates the HERV-K18 superantigen by docking to the human complement receptor 2 (CD21) on primary B cells. *J Immunol.* 2006 Aug 15;177(4):2056-60. doi: 10.4049/jimmunol.177.4.2056. <https://www.jimmunol.org/content/177/4/2056.long>

Sutkowski N, Conrad B, Thorley-Lawson DA, Huber BT. Epstein-Barr virus transactivates the human endogenous retrovirus HERV-K18 that encodes a superantigen. *Immunity.* 2001 Oct;15(4):579-89. doi: 10.1016/s1074-7613(01)00210-2. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00210-2](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00210-2)

¹¹³ Meier UC, Cipian RC, Karimi A, Ramasamy R, Middeldorp JM. Cumulative Roles for Epstein-Barr Virus, Human Endogenous Retroviruses, and Human Herpes Virus-6 in Driving an Inflammatory Cascade Underlying MS Pathogenesis. *Front Immunol.* 2021 Nov 1;12:757302. doi: 10.3389/fimmu.2021.757302.



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC6590502/>

Modello proposto per l'attivazione di HERV. L'espressione di HERV può essere indotta da fattori ambientali e fattori dell'ospite

Potential mechanisms for HERV-induced disease

Mechanism	Agent
Direct action of HERV protein	HERV-K Rec and Np9
	HERV-K SAg
	HERV-W Env
	HERV-H Env
Autoimmune/immune response	HERV-K
	HIAP
Insertional mutagenesis ^a	LINEs
	Murine ERVs
Modulation of cellular gene expression	HERV-E
	HERV-L
Interaction with exogenous viruses	HERV-K
	HERV-W

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC2268285/>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC8592026/>

Mameli G, Poddighe L, Mei A, Uleri E, Sotgiu S, Serra C, Manetti R, Dolei A. Expression and activation by Epstein Barr virus of human endogenous retroviruses-W in blood cells and astrocytes: inference for multiple sclerosis. PLoS One. 2012;7(9):e44991. doi: 10.1371/journal.pone.0044991. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC3459916/>

Garcia-Montojo M, et al. Syncytin-1/HERV-W envelope is an early activation marker of leukocytes and is upregulated in multiple sclerosis patients. Eur J Immunol. 2020 May;50(5):685-694. doi: 10.1002/eji.201948423. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/eji.201948423>

^aInsertional mutagenesis by HERVs has not been described, but analogous mutations have been reported for murine ERVs and for long interspersed nuclear elements (LINES) in humans.

Putative association of human diseases with retroviruses²

Disease	Reported evidence	Retrovirus(es) implicated
Cancer		
Breast cancer	EM, PCR, RT, FISH, Ab	MPMV, MMTV, HERV-K
Lymphoma	PCR	MPMV, HRV-5
Lung adenocarcinoma	Ag	Betaretrovirus
Thymoma	EM	Unknown
Ovarian carcinoma	EM, PCR, Ab, Ag	HIV-like, HERVs
Melanoma	EM, PCR, RT, Ab	HERV-K
Myeloproliferative disease	EM, PCR, RT	HERV-K
Testicular tumors	EM, PCR, RT, Ab	HERV-K
Prostate cancer	PCR, Ag, FISH	XMRV
Neurological disease		
Schizophrenia	PCR	HERV-W, HERV-K
Motor neuron disease	PCR, RT	HERV-W
MS	EM, PCR, RT, Ab, Ag	HERV-W, HERV-H
Chronic fatigue syndrome	EM, RT	"JHK-retrovirus"
Autoimmune and inflammatory		
RA	EM, PCR	HRV-5, HERVs
SLE	EM, PCR, Ab	HRV-5, HERVs, HIAPs
Mixed connective tissue disease	Nab	HIV-related?
SS	EM, PCR, RT, Ag	HIAPs, HRV-5
PBC	EM, PCR, Ab, Ag	MMTV-like
Graves' disease	EM, PCR, Ab	HFV, HIAP
IDDM	PCR, RT	HERV-K
Psoriasis	EM, PCR, Ab, Ag	HERV-E
Systemic sclerosis	Ab	HIAP-I
Alopecia areata	Ab	HIAP-I
Other		
ICL	EM, Ab, RT	HIAP-II, HICRV
Osteopetrosis	EM	Unknown

^aAb, antiretroviral antibodies; Nab, neutralizing antibodies; Ag, retroviral antigen.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC2268285/>

Strategie virali per l'infezione cronica

I virus hanno sviluppato una moltitudine di strategie per eludere il sistema immunitario e persistere nell'ospite. Alcuni fanno affidamento sul ruolo dei singoli geni virali che hanno effetti mirati sulle cellule infette o sul sistema immunitario stesso. Altri si basano su meccanismi specifici di tropismo e patogenesi che rendono inefficace il sistema immunitario. La posizione, la tempistica e l'entità della risposta immunitaria rispetto alla velocità di replicazione e diffusione del virus è un fattore determinante dell'eventuale esito dell'infezione virale (clearance rispetto all'instaurazione dell'infezione cronica) (Figura 1 vedi sopra pag 44).¹¹⁴

Tropismo virale e privilegio immunitario

I virus persistono in specifici tipi cellulari durante l'infezione cronica, un fatto con importanti implicazioni per la comprensione del fallimento dell'immunità sterilizzante. Il programma di espressione genica virale, e quindi gli antigeni espressi, possono differire da un tipo di cellula all'altro, in particolare per ERVs o virus che persistono tramite latenza/riattivazione (Figura 3). Ad esempio, i geni espressi da EBV nei linfociti B e nelle cellule epiteliali durante l'infezione cronica possono differire.¹¹⁵

¹¹⁴ Moreno-Altamirano MMB, Kolstoe SE, Sánchez-García FJ. Virus Control of Cell Metabolism for Replication and Evasion of Host Immune Responses. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019;9:95. Published 2019 Apr 18. doi:10.3389/fcimb.2019.00095 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC6482253/>

Nelemans T, Kikkert M. Viral Innate Immune Evasion and the Pathogenesis of Emerging RNA Virus Infections. *Viruses.* 2019;11(10):961. Published 2019 Oct 18. doi:10.3390/v11100961 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC6832425/>

Iannello A, Debbeche O, Martin E, Attalah LH, Samarani S, Ahmad A. Viral strategies for evading antiviral cellular immune responses of the host. *J Leukoc Biol.* 2006 Jan;79(1):16-35. doi: 10.1189/jlb.0705397. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16204622/>

Simmons, R.A., Willberg, C.B. and Paul, K. (2013). Immune Evasion by Viruses. In eLS, (Ed.). <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0024790>

Beachboard DC, Horner SM. Innate immune evasion strategies of DNA and RNA viruses. *Curr Opin Microbiol.* 2016;32:113-119. doi:10.1016/j.mib.2016.05.015 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC4983539/>

¹¹⁵ Rickinson, A., and Kieff, E. (2007). Epstein-Barr virus. In *Fields Virology*, D. Knipe, D.E. Griffin, R.A. Lamb, S.E. Straus, P.M. Howley, M.A. Martin, and B. Roizman, eds. (Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins), pp. 2655–2700.

Kieff, E., and Rickinson, A. (2007). Epstein-Barr virus and its replication. In *Fields Virology*, D. Knipe and P. Howley, eds. (Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins), pp. 2605–2654.

Epstein Barr Virus Volume 1 - One Herpes Virus: Many Diseases, Christian Münz
Current Topics in Microbiology and Immunology - Springer, Cham – 2015
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-22822-8>

Epstein Barr Virus Volume 2 - One Herpes Virus: Many Diseases, Christian Münz
Current Topics in Microbiology and Immunology - Springer, Cham - 2015
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-22834-1>

Hatton OL, Harris-Arnold A, Schaffert S, Krams SM, Martinez OM. The interplay between Epstein-Barr virus and B lymphocytes: implications for infection, immunity, and disease. *Immunol Res.* 2014 May;58(2-3):268-76. doi: 10.1007/s12026-014-8496-1. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC4199828/>

Chen J, Longnecker R. Epithelial cell infection by Epstein-Barr virus. *FEMS Microbiol Rev.* 2019 Nov 1;43(6):674-683. doi: 10.1093/femsre/fuz023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC7317989/>

È importante sottolineare che le cellule bersaglio surrogate studiate in vitro per valutare l'immunità o la vaccinazione potrebbero non riflettere la gerarchia di dominanza antigenica delle cellule primarie infettate in vivo. Inoltre, i meccanismi immunoeffettori possono essere più o meno efficaci a seconda del tipo specifico di cellula. Le linee cellulari utilizzate in vitro potrebbero non riflettere queste interazioni immunitarie tessuto-specifiche. Ad esempio, il γ -herpesvirus murino 68 (MHV-68, γ HV68) stabilisce la latenza sia nei linfociti B che nei macrofagi. La citochina interferone- γ (IFN- γ) regola la latenza di γ HV68 e inibisce la riattivazione nei macrofagi, ma ha effetti minimi sull'infezione latente dei linfociti B.¹¹⁶ Inoltre, le proteine contenute nei granuli "litici" dei linfociti T citotossici possono partecipare all'inibizione della riattivazione dell'HSV dai neuroni senza causare la lisi della cellula bersaglio.¹¹⁷ Insieme, questi fattori complicano l'estrapolazione degli studi immunologici in vitro alla situazione reale nei tessuti durante l'infezione cronica.

La specificità del tipo cellulare riguardo le funzioni del gene virale e dell'ospite contribuisce a una maggiore efficienza del sistema immunitario in alcuni tessuti rispetto ad altri (immunoprivilegio). Questo è un importante contributo al mantenimento dell'infezione virale cronica¹¹⁸. Ad esempio, il sistema immunitario non riesce a eliminare LCMV dal rene o γ HV68 murino dalle fibre elastiche delle grandi arterie, mentre in altri tessuti viene eliminato in modo efficiente.¹¹⁹

Xu W, Jiang X, Chen J, Mao Q, Zhao X, Sun X, Zhong L, Rong L.
Chronic active Epstein-Barr virus infection involving gastrointestinal tract mimicking inflammatory bowel disease.
BMC Gastroenterol. 2020 Aug 5;20(1):257. doi: 10.1186/s12876-020-01395-9.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC7410156/>

Kimura H, Cohen JI.
Chronic Active Epstein-Barr Virus Disease.
Front Immunol. 2017;8:1867. Published 2017 Dec 22. doi:10.3389/fimmu.2017.01867
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC5770746/>

¹¹⁶ Steed A, Buch T, Waisman A, Virgin HW 4th.
Gamma interferon blocks gammaherpesvirus reactivation from latency in a cell type-specific manner.
J Virol. 2007;81(11):6134-6140. doi:10.1128/JVI.00108-07
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC1900319/>

Barton ES, Lutzke ML, Rochford R, Virgin HW 4th.
Alpha/beta interferons regulate murine gammaherpesvirus latent gene expression and reactivation from latency.
J Virol. 2005 Nov;79(22):14149-60. doi: 10.1128/JVI.79.22.14149-14160.2005.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC1280204/>

Jondle CN, Johnson KE, Mboko WP, Tarakanova VL.
T Cell-Intrinsic Interferon Regulatory Factor 1 Expression Suppresses Differentiation of CD4+ T Cell Populations That Support Chronic Gammaherpesvirus Infection.
J Virol. 2021 Sep 27;95(20):e0072621. doi: 10.1128/JVI.00726-21.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34346769/>

¹¹⁷ Knickelbein JE, Khanna KM, Yee MB, Baty CJ, Kinchington PR, Hendricks RL.
Noncytotoxic lytic granule-mediated CD8+ T cell inhibition of HSV-1 reactivation from neuronal latency.
Science. 2008;322(5899):268-271. doi:10.1126/science.1164164
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC2680315/>

¹¹⁸ Randall RE, Griffin DE.
Within host RNA virus persistence: mechanisms and consequences.
Curr Opin Virol. 2017 Apr;23:35-42. doi: 10.1016/j.coviro.2017.03.001.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC5474179/>

McCarthy MK, Morrison TE.
Persistent RNA virus infections: do PAMPS drive chronic disease?
Curr Opin Virol. 2017 Apr;23:8-15. doi: 10.1016/j.coviro.2017.01.003.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC5474173/>

¹¹⁹ Oldstone MB, Blount P, Southern PJ, Lampert PW.
Cytoimmunotherapy for persistent virus infection reveals a unique clearance pattern from the central nervous system.
Nature. 1986 May 15-21;321(6067):239-43. doi: 10.1038/321239a0.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3086743/>

L'immunoprivilegio probabilmente contribuisce alla persistenza dell'HSV nei neuroni e alla persistenza del papillomavirus nelle cellule epiteliali. Il tratto genitourinario è un luogo particolarmente difficile da controllare per il sistema immunitario e può essere infettato in modo persistente da virus della leucemia a cellule T umana (HTLV), citomegalovirus umano (HCMV), KSHV, EBV, HIV, LCMV, HSV e poliomavirus.¹²⁰

Il tropismo cellulare può avere altri importanti effetti in vivo. Ad esempio, il clone LCMV 13 stabilisce in modo efficiente un'infezione persistente nei topi immunocompetenti, in parte a causa del suo tropismo per le cellule reticolari fibroblastiche e le cellule dendritiche.¹²¹ I virus cronici comunemente colpiscono più di un tipo di cellula,¹²² ad esempio VZV attacca di preferenza i neuroni e i linfociti T, EBV i linfociti B e le cellule epiteliali e l'HIV le cellule T e i macrofagi. Inoltre, i processi immunitari che si occupano della riattivazione dell'HSV nei neuroni possono essere distinti da quelli che controllano la replicazione dell'HCV negli epatociti. Pertanto un approccio immunologico a "taglia unica" potrebbe non essere efficace nell'eliminare o controllare una determinata infezione persistente.

Privilegio immunitario e tolleranza immunologica¹²³

Poiché c'è una notevole sovrapposizione nei meccanismi della tolleranza immunologica, in particolare nei meccanismi della tolleranza periferica, e del privilegio immunitario, la domanda da porsi è se il concetto di privilegio immunitario aggiunga qualcosa alla nostra comprensione dell'immunità.

In effetti, il privilegio immunitario, al contrario della deviazione immunitaria indotta dal tessuto, descrive una proprietà del tessuto e ha valore in quanto aggiunge un terzo elemento ai nostri concetti già ben sviluppati di meccanismi di tolleranza. Pertanto, ci sono due principali meccanismi cellulo-mediati di tolleranza sistemica che coinvolgono meccanismi centrali e meccanismi periferici, in cui le cellule circolanti esaminano i tessuti per l'antigene estraneo mentre sopprimono o eliminano le cellule con il potenziale di rispondere all'autoantigene. Questi meccanismi sono sotto il controllo genetico, la cui complessità viene sempre più rivelata.¹²⁴

Dal Canto AJ, Swanson PE, O'Guin AK, Speck SH, Virgin HW.
IFN-gamma action in the media of the great elastic arteries, a novel immunoprivileged site.
J Clin Invest. 2001 Jan;107(2):R15-22. doi: 10.1172/JCI11540.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC199178/>

¹²⁰ Virgin, H.W. (2007b). Pathogenesis of viral infection. In Fields Virology, D.M. Knipe and P.M. Howley, eds. (Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins), pp. 327–388.

¹²¹ Sevilla N, McGavern DB, Teng C, Kunz S, Oldstone MB.
Viral targeting of hematopoietic progenitors and inhibition of DC maturation as a dual strategy for immune subversion.
J Clin Invest. 2004;113(5):737-745. doi:10.1172/JCI20243
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC351322/>

Mueller SN, Matloubian M, Clemens DM, et al.
Viral targeting of fibroblastic reticular cells contributes to immunosuppression and persistence during chronic infection.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(39):15430-15435. doi:10.1073/pnas.0702579104
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2000533/>

¹²² Zerboni L, and Arvin, A.M. (2008). The pathogenesis of varicella-zoster virus neurotropism and infection. In Neurotropic Viral Infections, C.S. Reiss, ed. (Cambridge: Cambridge University Press), pp. 225–250

Virgin, H.W. (2007b). Pathogenesis of viral infection. In Fields Virology, D.M. Knipe and P.M. Howley, eds. (Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins), pp. 327–388.

¹²³ Forrester, J., Xu, H., Lambe, T. et al.
Immune privilege or privileged immunity?
Mucosal Immunol 1, 372–381 (2008).
<https://doi.org/10.1038/mi.2008.27>

¹²⁴ Kersh GJ.
Transcriptional control of thymocyte positive selection.
Immunol Res. 2004;29(1-3):125-38. doi: 10.1385/IR:29:1-3:125.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15181276/>

Il terzo braccio della "regolazione immunitaria locale" basata sui tessuti è un altro modo per descrivere il privilegio immunitario e, come è stato dimostrato nel corso di molti anni, ha una gerarchia che probabilmente è correlata alla forza o al numero di meccanismi regolatori espressi da ciascun tessuto: quindi, la retina e il parenchima cerebrale possiedono molte delle caratteristiche tra cui barriere emato-tessutali pronunciate, relativa assenza di linfatici, numero minimo di APC in grado di presentare l'antigene in situ e un'ampia gamma di inibitori solubili e legati alle cellule del sistema immunitario, che in circostanze normali hanno la capacità di promuovere l'induzione delle cellule T-regolatrici. È anche possibile che alcune di queste cellule T regolatorie siano "residenti" in tessuti normali non infiammati, come la pelle, e contribuiscano al microambiente immunosoppressivo generale.¹²⁵

Le proprietà e le caratteristiche di ciascun tessuto possono avere un'influenza molto maggiore sulla risposta immunitaria rispetto a quanto precedentemente considerato, e il tessuto stesso può essere descritto come un regolatore della risposta al "pericolo".¹²⁶

Infine, è anche importante considerare quando e dove si stabilisce il privilegio immunitario durante lo sviluppo e se questo ha un'incidenza sul fatto che gli antigeni espressi all'inizio dello sviluppo abbiano maggiori probabilità di indurre tolleranza centrale rispetto agli antigeni che sono espressi più tardi nell'ontogenesi, per cui l'ignoranza immunologica può essere l'unica via per prevenire l'auto-reattività. Ad esempio, alcuni antigeni retinici, come gli antigeni neurali compaiono nell'occhio in via di sviluppo poco dopo la formazione della vescicola ottica, mentre altri antigeni potrebbero non essere completamente espressi fino a dopo la nascita. Ciò vale in particolare per gli antigeni fotorecettori fortemente autoantigenici, che non sono completamente espressi nella retina fino a dopo la nascita, momento in cui il sistema vascolare ialoide permeabile ha lasciato il posto alla formazione della barriera emato-retinica anatomica e funzionale, impedendo l'accesso al sistema immunitario ad antigeni legati alla membrana.¹²⁷ Questo problema ha implicazioni diffuse ed è meglio considerato nel contesto dell'espressione di

Matsumoto M.

Transcriptional regulation in thymic epithelial cells for the establishment of self-tolerance.
Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2007 Jan-Feb;55(1):27-34. doi: 10.1007/s00005-007-0007-9.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17277892/>

Holländer G, Gill J, Zuklys S, Iwanami N, Liu C, Takahama Y.
Cellular and molecular events during early thymus development.
Immunol Rev. 2006 Feb;209:28-46. doi: 10.1111/j.0105-2896.2006.00357.x.

Alberti P, Handel AE.
The contribution of thymic tolerance to central nervous system autoimmunity.
Semin Immunopathol. 2021 Feb;43(1):135-157. doi: 10.1007/s00281-020-00822-z.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC7925481/>

¹²⁵ de Boer OJ, van der Loos CM, Teeling P, van der Wal AC, Teunissen MB.
Immunohistochemical analysis of regulatory T cell markers FOXP3 and GITR on CD4+CD25+ T cells in normal skin and inflammatory dermatoses.
J Histochem Cytochem. 2007 Sep;55(9):891-8. doi: 10.1369/jhc.6A7119.2007.
<https://journals.sagepub.com/doi/10.1369/jhc.6A7119.2007>

Schuler P, Contassot E, Huard B. T
cell tolerance to the skin: a central role for central tolerance.
Semin Immunopathol. 2007 Apr;29(1):59-64. doi: 10.1007/s00281-007-0062-7.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17621954/>

Owczarczyk-Saczonek A, Czerwińska J, Orylska M, Placek W.
Evaluation of selected mechanisms of immune tolerance in psoriasis.
Postepy Dermatol Alergol. 2019 Jun;36(3):319-328. doi: 10.5114/ada.2019.85641.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC6640014/>

¹²⁶ Matzinger, P.
Friendly and dangerous signals: is the tissue in control?
Nat Immunol 8, 11–13 (2007).
<https://doi.org/10.1038/ni0107-11>

¹²⁷ Keino H, Horie S, Sugita S.
Immune Privilege and Eye-Derived T-Regulatory Cells.
J Immunol Res. 2018 May 20;2018:1679197. doi: 10.1155/2018/1679197.

antigeni "nuovi" o "tardivi", ad es. durante la pubertà, nei tumori e nel feto in via di sviluppo. La tolleranza agli autoantigeni "tardivi" è attualmente spiegata dall'espressione genica promiscua nelle cellule epiteliali del timo midollare.¹²⁸

Evasione virale e sovversione dell'immunità

Poiché esiste un vantaggio in termini di sopravvivenza per i virus che vengono eliminati in periodi prolungati, non sorprende che molti virus abbiano geni che svolgono un ruolo specifico di nicchia durante l'infezione cronica. L'esistenza di geni specifici di nicchia che hanno ruoli specializzati durante l'infezione cronica è ben dimostrata dai geni di latenza di EBV,¹²⁹ che sono specializzati per prolungare l'infezione dei linfociti B di memoria e per rispondere e regolare l'attivazione e la differenziazione delle cellule B.

Questi geni svolgono molteplici funzioni, tra cui il mantenimento dell'episoma virale, la regolazione della segnalazione del recettore dell'antigene delle cellule B, e la regolazione del ciclo cellulare e dell'apoptosi come nel caso dell'Herpesvirus del sarcoma di Kaposi¹³⁰. Anche geni come v-ciclina e v-Bcl-2 del γHV68 murino sono

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC5985108/>

Sugita S.

Role of ocular pigment epithelial cells in immune privilege.

Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2009 Jul-Aug;57(4):263-8. doi: 10.1007/s00005-009-0030-0.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19568919/>

Takeuchi M.

Immune tolerance and autoimmune uveoretinitis: the role of the ocular microenvironment.

Immunotherapy. 2011 Sep;3(9):1103-11. doi: 10.2217/imt.11.101.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21913832/>

¹²⁸ Kyewski B, Klein L.

A central role for central tolerance.

Annu Rev Immunol. 2006;24:571-606. doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115601.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16551260/>

¹²⁹ Kanda T.

EBV-Encoded Latent Genes.

Adv Exp Med Biol. 2018;1045:377-394. doi: 10.1007/978-981-10-7230-7_17.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29896676/>

Kalla M, Hammerschmidt W.

Human B cells on their route to latent infection--early but transient expression of lytic genes of Epstein-Barr virus.

Eur J Cell Biol. 2012 Jan;91(1):65-9. doi: 10.1016/j.ejcb.2011.01.014.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21450364/>

Pich D, Mrozek-Gorska P, Bouvet M, Sugimoto A, Akidil E, Grundhoff A, Hamperl S, Ling PD, Hammerschmidt W.

First Days in the Life of Naive Human B Lymphocytes Infected with Epstein-Barr Virus. mBio. 2019 Sep 17;10(5):e01723-19. doi: 10.1128/mBio.01723-19.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6751056/>

¹³⁰ De Leo A, Calderon A, Lieberman PM.

Control of Viral Latency by Episome Maintenance Proteins.

Trends Microbiol. 2020 Feb;28(2):150-162. doi: 10.1016/j.tim.2019.09.002.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC6980450/>

Broussard G, Damania B.

Regulation of KSHV Latency and Lytic Reactivation.

Viruses. 2020 Sep 17;12(9):1034. doi: 10.3390/v12091034.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7551196/>

Juillard F, Tan M, Li S, Kaye KM.

Kaposi's Sarcoma Herpesvirus Genome Persistence.

Front Microbiol. 2016;7:1149. Published 2016 Aug 12. doi:10.3389/fmicb.2016.01149

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4982378/>

specifici di nicchia per l'infezione cronica, svolgono un ruolo nella riattivazione dalla latenza ma sono meno importanti per l'infezione acuta.¹³¹

Le v-ciclina del γ -herpesvirus hanno sviluppato la capacità di interagire con una gamma più ampia di chinasi ciclina-dipendenti rispetto ai loro ospiti omologhi più vicini.¹³² Allo stesso modo, le proteine γ -herpesvirus Bcl-2 si sono evolute per avere interazioni altamente efficaci con i meccanismi della morte cellulare dell'ospite e le vie dell'autofagia che non sono soggette ai normali meccanismi di regolazione della cellula ospite.¹³³

Questi sono esempi del tipo di adattamento specifico di nicchia favorito dalla coevoluzione prolungata del virus e dell'ospite.

I virus codificano un'ampia gamma di geni che consentono loro di eludere l'immunità durante l'infezione acuta o cronica.¹³⁴ Questi geni possono contribuire all'instaurarsi di un'infezione cronica prevenendo l'eliminazione dell'infezione acuta o cronica (Figura 1).

¹³¹ van Dyk LF, Virgin HW 4th, Speck SH.

Maintenance of gammaherpesvirus latency requires viral cyclin in the absence of B lymphocytes. *J Virol.* 2003;77(9):5118-5126. doi:10.1128/jvi.77.9.5118-5126.2003
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC153990/>

Loh J, Huang Q, Petros AM, et al.

A surface groove essential for viral Bcl-2 function during chronic infection in vivo. *PLoS Pathog.* 2005;1(1):e10. doi:10.1371/journal.ppat.0010010
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC1238745/>

¹³² Upton JW, van Dyk LF, Speck SH.

Characterization of murine gammaherpesvirus 68 v-cyclin interactions with cellular cdk. *Virology.* 2005 Oct 25;341(2):271-83. doi: 10.1016/j.virol.2005.07.014.
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.07.014>

Niemeyer BF, Sanford B, Gibson JE, Berger JN, Oko LM, Medina E, Clambey ET, van Dyk LF.

The gammaherpesvirus 68 viral cyclin facilitates expression of LANA. *PLoS Pathog.* 2021 Nov 15;17(11):e1010019. doi: 10.1371/journal.ppat.1010019.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8629379/>

Uppal T, Banerjee S, Sun Z, Verma SC, Robertson ES.

KSHV LANA--the master regulator of KSHV latency. *Viruses.* 2014 Dec 11;6(12):4961-98. doi: 10.3390/v6124961.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4276939/>

¹³³ Loh J, Huang Q, Petros AM, et al.

A surface groove essential for viral Bcl-2 function during chronic infection in vivo. *PLoS Pathog.* 2005;1(1):e10. doi:10.1371/journal.ppat.0010010
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC1238745/>

Wei Y, Pattingre S, Sinha S, Bassik M, Levine B.

JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Mol Cell.* 2008;30(6):678-688. doi:10.1016/j.molcel.2008.06.001
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC2478643/>

Su M, Mei Y, Sanishvili R, Levine B, Colbert CL, Sinha S.

Targeting γ -herpesvirus 68 Bcl-2-mediated down-regulation of autophagy. *J Biol Chem.* 2014 Mar 21;289(12):8029-40. doi: 10.1074/jbc.M113.515361.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3961636/>

¹³⁴ Virgin, H.W. (2007b). Pathogenesis of viral infection. In Fields Virology, D.M. Knipe and P.M. Howley, eds. (Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins), pp. 327-388.

Mesev EV, LeDesma RA, Ploss A.

Decoding type I and III interferon signalling during viral infection. *Nat Microbiol.* 2019 Jun;4(6):914-924. doi: 10.1038/s41564-019-0421-x.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6554024/>

Mishra R, Kumar A, Ingle H, Kumar H.

The Interplay Between Viral-Derived miRNAs and Host Immunity During Infection. *Front Immunol.* 2020 Jan 23;10:3079. doi: 10.3389/fimmu.2019.03079.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6989438/>

I geni di evasione immunitaria virale possono agire:

- (1) diminuendo l'espressione delle molecole necessarie per il riconoscimento dei linfociti T o delle cellule natural killer (NK),¹³⁵
- (2) inibendo la presentazione dell'antigene,¹³⁶
- (3) agendo come agonisti o antagonisti di citochine e chemochine¹³⁷
- (4) bloccando gli effetti intracellulari antivirali o proinfiammatori di interferoni o altre citochine. Le cellule NK e l'IFN- $\alpha\beta$, solitamente ritenute importanti durante l'infezione acuta, possono influenzare l'infezione latente e persistente da herpesvirus.¹³⁸

¹³⁵ Strumillo ST, Kartavykh D, de Carvalho FF Jr, Cruz NC, de Souza Teodoro AC, Sobhie Diaz R, Curcio MF. Host-virus interaction and viral evasion. *Cell Biol Int.* 2021 Jun;45(6):1124-1147. doi: 10.1002/cbin.11565 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8014853/>

Mancini M, Vidal SM. Mechanisms of Natural Killer Cell Evasion Through Viral Adaptation. *Annu Rev Immunol.* 2020 Apr 26;38:511-539. doi: 10.1146/annurev-immunol-082619-124440. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32340578/>

Ma Y, Li X, Kuang E. Viral Evasion of Natural Killer Cell Activation. *Viruses.* 2016 Apr 12;8(4):95. doi: 10.3390/v8040095. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4848590/>

¹³⁶ van de Weijer ML, Luteijn RD, Wiertz EJ. Viral immune evasion: Lessons in MHC class I antigen presentation. *Semin Immunol.* 2015 Mar;27(2):125-37. doi: 10.1016/j.smim.2015.03.010. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25887630/>

Praest P, Liaci AM, Förster F, Wiertz EJHJ. New insights into the structure of the MHC class I peptide-loading complex and mechanisms of TAP inhibition by viral immune evasion proteins. *Mol Immunol.* 2019 Sep;113:103-114. doi: 10.1016/j.molimm.2018.03.020. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29606337/>

¹³⁷ Goubau D, Deddouche S, Reis e Sousa C. Cytosolic sensing of viruses. *Immunity.* 2013;38(5):855-869. doi:10.1016/j.immuni.2013.05.007 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7111113/>

Zhao C, Zhao W. NLRP3 Inflammasome-A Key Player in Antiviral Responses. *Front Immunol.* 2020 Feb 18;11:211. doi: 10.3389/fimmu.2020.00211. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7040071/>

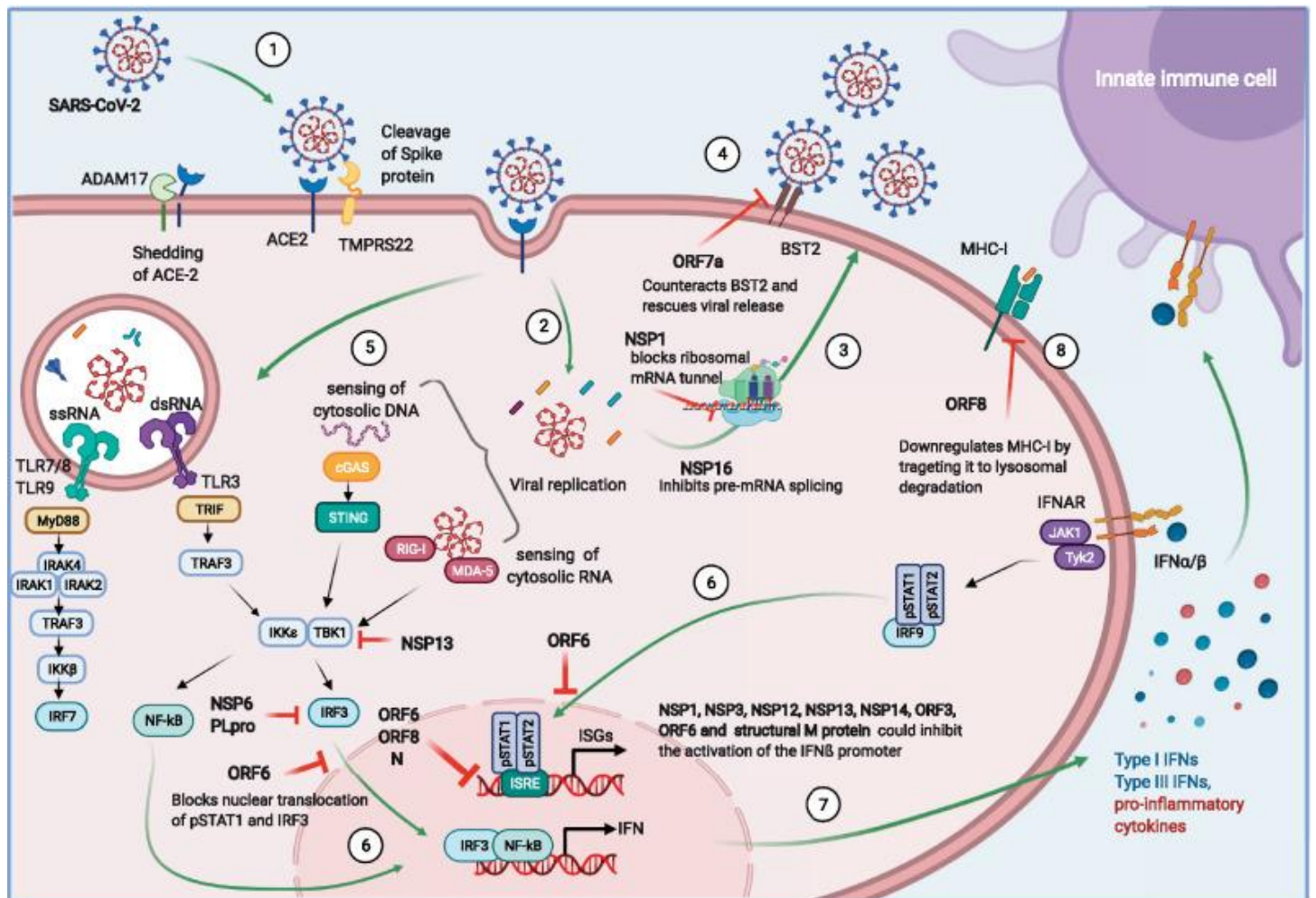
¹³⁸ Barton ES, Lutzke ML, Rochford R, Virgin HW 4th. Alpha/beta interferons regulate murine gammaherpesvirus latent gene expression and reactivation from latency. *J Virol.* 2005;79(22):14149-14160. doi:10.1128/JVI.79.22.14149-14160.2005 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1280204/>

Steed A, Buch T, Waisman A, Virgin HW 4th. Gamma interferon blocks gammaherpesvirus reactivation from latency in a cell type-specific manner. *J Virol.* 2007;81(11):6134-6140. doi:10.1128/JVI.00108-07 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1900319/>

Biron CA, Byron KS, Sullivan JL. Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *N Engl J Med.* 1989 Jun 29;320(26):1731-5. doi: 10.1056/NEJM198906293202605. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2543925/>

Zhu H, Zheng C. The Race between Host Antiviral Innate Immunity and the Immune Evasion Strategies of Herpes Simplex Virus 1.

Anche le infezioni virali da coronavirus sono favorite da potenti meccanismi immunoevasori che agiscono su molteplici aspetti dell'immunità innata, in particolare l'infezione da SARS-CoV-2 è in grado di indurre una tempesta di citochine, alterare le risposte dell'interferone e sopprimere la presentazione dell'antigene su entrambi gli MHC di classe I e classe II che portano all'immunopatologia responsabile delle complicazioni da COVID-19.¹³⁹



Microbiol Mol Biol Rev. 2020 Sep 30;84(4):e00099-20. doi: 10.1128/MMBR.00099-20.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7528619/>

Resing ME, van Gent M, Gram AM, Hooykaas MJ, Piersma SJ, Wiertz EJ.
Immune Evasion by Epstein-Barr Virus.
Curr Top Microbiol Immunol. 2015;391:355-81. doi: 10.1007/978-3-319-22834-1_12.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26428381/>

¹³⁹ Taefehshok N, Taefehshok S, Hemmat N, Heit B.
Covid-19: Perspectives on Innate Immune Evasion.
Front Immunol. 2020 Sep 30;11:580641. doi: 10.3389/fimmu.2020.580641.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7554241/>

Jacob CO.
On the genetics and immunopathogenesis of COVID-19.
Clin Immunol. 2020 Nov;220:108591. doi: 10.1016/j.clim.2020.108591.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7482598/>

Coveney C, et al
COVID19 Literature Consortium. Innate immunology in COVID-19-a living review. Part I: viral entry, sensing and evasion.
Oxf Open Immunol. 2020 Dec 8;1(1):iqaa004. doi: 10.1093/oxfimm/iqaa004.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7798570/>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7798570/>

Ingresso virale ed evasione immunitaria. Rappresentazione grafica dei meccanismi riportati di SARS-CoV-2 di rilevamento immunitario ed evasione virale nelle cellule ospiti. (1) coinvolgimento del virus in ACE2 e fusione nella membrana cellulare, (2) rilascio di materiale genetico virale nel citoplasma, (3) fase tardiva del ciclo virale: replicazione e rilascio virale, (4) fattori di restrizione dell'ospite che interferiscono con il virus ciclo vitale: BST2 che impedisce il rilascio virale, (5) rilevamento immunitario dell'ospite dei componenti virali, (6) traslocazione nucleare di diversi fattori regolatori che innescano programmi trascrizionali per citochine pro-infiammatorie, ISG e IFN; e il loro rilascio (7). (8) presentazione antigenica MHC-I; e la corrispondente controazione virale che potenzialmente influenza l'induzione delle risposte immunitarie.

Le cellule sono inoltre dotate di meccanismi che consentono loro di rilevare e rispondere rapidamente ai virus. Questi meccanismi di difesa si basano in parte sui recettori che monitorano il citosol per la presenza di acidi nucleici atipici associati all'infezione da virus. I recettori simili a RIG-I rilevano le molecole di RNA che sono assenti nell'ospite non infetto. I recettori del DNA avvisano la cellula della presenza anormale di quell'acido nucleico nel citosol. La segnalazione da parte dei recettori dell'RNA e del DNA provoca l'induzione di fattori di restrizione che impediscono la replicazione del virus e stabiliscono l'immunità antivirale intrinseca delle cellule.

Alla luce di questi formidabili ostacoli, i virus hanno sviluppato meccanismi di evasione, mascherando le strutture dell'acido nucleico riconosciute dall'ospite, sequestrandosi lontano dal citosol o prendendo di mira i sensori dell'ospite e i regolatori per la disattivazione o la degradazione.¹⁴⁰

In aggiunta ai meccanismi sopra descritti e studiati da tempo, nell'ultimo decennio è stato dimostrato che più virus a DNA e RNA producono miRNA noti come miRNA virali (v-miRNA) in modo da eludere la risposta immunitaria dell'ospite.¹⁴¹

Per un approfondimento su questo argomento si rimanda ai paragrafi dedicati all'argomento nel capitolo "Piattaforme Innovative – Meccanismi del danno: la Spike"

La formazione del viroplasma e l'aggregazione proteica come meccanismi di evasione immunitaria

Molti virus si replicano all'interno di microambienti subcellulari o "mini-organelli" chiamati fabbriche di virus o "viroplasma". La formazione di queste strutture comporta il riarrangiamento delle membrane delle cellule ospiti e del citoscheletro e induce un "effetto citopatico" indicativo dell'infezione da virus. Si ritiene generalmente che le fabbriche e il viroplasma creino una piattaforma per concentrare le replicasi proteiche, i genomi dei virus e le proteine ospiti necessarie per la replicazione e allo stesso tempo separare fisicamente i siti di replicazione da una miriade di difese antivirali cellulari. La sovrersione delle vie del traffico di membrana durante la formazione di siti

¹⁴⁰ Goubau D, Deddouche S, Reis e Sousa C.

Cytosolic sensing of viruses.

Immunity. 2013;38(5):855-869. doi:10.1016/j.immuni.2013.05.007

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7111113/>

Chiang C, Liu G, Gack MU.

Viral Evasion of RIG-I-Like Receptor-Mediated Immunity through Dysregulation of Ubiquitination and ISGylation.

Viruses. 2021 Jan 26;13(2):182. doi: 10.3390/v13020182.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7910861/>

Chan YK, Gack MU.

Viral evasion of intracellular DNA and RNA sensing.

Nat Rev Microbiol. 2016 Jun;14(6):360-73. doi: 10.1038/nrmicro.2016.45.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5072394/>

¹⁴¹ Boss IW, Renne R.

Viral miRNAs and immune evasion.

Biochim Biophys Acta. 2011 Nov-Dec;1809(11-12):708-14. doi: 10.1016/j.bbagr.2011.06.012.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3864029/>

Mishra R, Kumar A, Ingle H, Kumar H.

The Interplay Between Viral-Derived miRNAs and Host Immunity During Infection.

Front Immunol. 2020 Jan 23;10:3079. doi: 10.3389/fimmu.2019.03079.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6989438/>

di replicazione può aggiungere ulteriori benefici all'infezione virale, rallentando il trasporto di proteine immunomodulatorie sulla superficie delle cellule infette per proteggerle dalle risposte immunitarie, mentre l'interruzione del citoscheletro può aumentare il rilascio di virus dalle cellule.¹⁴²

Le molecole e le attività associate a questi compartimenti sono diverse ma includono sempre componenti che dirigono la replicazione e l'espressione del genoma virale. La formazione di compartimenti in cui i genomi virali vengono replicati e assemblati è stata descritta per i virus RNA a senso negativo (-), RNA a doppio filamento (dsRNA) ed RNA (+) a senso positivo.

Nel caso di genomi di RNA a filamento positivo di una varietà di famiglie di virus, tra cui i coronavirus¹⁴³ e il SARS-Cov-2¹⁴⁴, la replicazione dell'RNA è associata a un'ampia riorganizzazione e generazione di strutture membranose singole o doppie cooptate da complessi di replicasi virale (RC) associati alla membrana. Gli RC formati da virus RNA (+) sono stati oggetto di intense indagini ed è per queste famiglie di virus che sono disponibili maggiori informazioni incluse in diverse revisioni.¹⁴⁵ I virus a RNA e DNA che si replicano nel citoplasma formano fabbriche

¹⁴² Schmid M, Speiseder T, Dobner T, Gonzalez RA.

DNA virus replication compartments.

J Virol. 2014 Feb;88(3):1404-20. doi: 10.1128/JVI.02046-13.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3911613/>

¹⁴³ Romero-Brey I, Bartenschlager R.

Membranous replication factories induced by plus-strand RNA viruses.

Viruses. 2014 Jul 22;6(7):2826-57. doi: 10.3390/v6072826.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4113795/>

Hagemeijer MC, de Haan CA.

Studying the dynamics of coronavirus replicative structures.

Methods Mol Biol. 2015;1282:261-9. doi: 10.1007/978-1-4939-2438-7_22.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7122990/>

¹⁴⁴ Cortese M, et al Integrative Imaging Reveals SARS-CoV-2-Induced Reshaping of Subcellular Morphologies.

Cell Host Microbe. 2020 Dec 9;28(6):853-866.e5. doi: 10.1016/j.chom.2020.11.003

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7670925/>

Koepke L, Hirschenberger M, Hayn M, Kirchhoff F, Sparrer KM.

Manipulation of autophagy by SARS-CoV-2 proteins. Autophagy. 2021 Sep;17(9):2659-2661. doi: 10.1080/15548627.2021.1953847.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8496524/>

¹⁴⁵ Netherton C, Moffat K, Brooks E, Wileman T.

A guide to viral inclusions, membrane rearrangements, factories, and viroplasm produced during virus replication.

Adv Virus Res. 2007;70:101-182. doi:10.1016/S0065-3527(07)70004-0

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7112299/>

Netherton CL, Wileman T.

Virus factories, double membrane vesicles and viroplasm generated in animal cells.

Curr Opin Virol. 2011;1(5):381-387. doi:10.1016/j.coviro.2011.09.008

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7102809/>

Paul D, Bartenschlager R.

Architecture and biogenesis of plus-strand RNA virus replication factories.

World J Virol. 2013 May 12;2(2):32-48. doi: 10.5501/wjv.v2.i2.32.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3785047/>

Dreux M, Chisari FV.

Viruses and the autophagy machinery.

Cell Cycle. 2010 Apr 1;9(7):1295-1307. doi: 10.4161/cc.9.7.11109.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20305376/>

Novoa RR, Calderita G, Arranz R, Fontana J, Granzow H, Risco C.

Virus factories: associations of cell organelles for viral replication and morphogenesis.

Biol Cell. 2005 Feb;97(2):147-72. doi: 10.1042/BC20040058.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7161905/>

Olasunkanmi Ol, Chen S, Mageto J, Zhong Z.

Virus-Induced Cytoplasmic Aggregates and Inclusions are Critical Cellular Regulatory and Antiviral Factors.

virali o viroplasma che richiedono la rilocalizzazione degli organelli, la riorganizzazione del reticolo endoplasmatico (ER), l'apparato di Golgi, l'endosoma, il lisosoma, i mitocondri o altre membrane cellulari e cambiamenti nella distribuzione e nella dinamica del citoscheletro. Nel caso di virus a DNA che si replicano nel nucleo, come gli adenovirus, la formazione di RC non sembra richiedere strutture membranose, ma piuttosto una riorganizzazione delle componenti nucleari che accompagna la formazione di questi compartimenti. Questa riorganizzazione include la redistribuzione della cromatina e dei componenti dei domini nucleari, come i corpi nucleari della leucemia promielocitica (PML) (PML-NB), i corpi di Cajal (CB), i granuli di intercromatina (IG) o il nucleolo.

L'assemblaggio e la replicazione del virus possono verificarsi anche in fabbriche di virus vicino al centro di organizzazione dei microtubuli (MTOC). Queste inclusioni sono prive di membrane cellulari e assomigliano a inclusioni chiamate aggresomi che si formano all'MTOC in risposta all'aggregazione proteica.

Le inclusioni aggresomiche come i corpi di Lewy e Mallory sono un segno patologico delle malattie da ripiegamento errato delle proteine e proteggono le cellule dal danno associato all'aggregazione proteica. Aggresomi e fabbriche virali condividono molte caratteristiche in comune, tra cui il reclutamento di mitocondri, chaperoni cellulari e il confinamento all'interno di gabbie di filamenti di vimentina riorganizzati.¹⁴⁶

Molti virus vengono veicolati all'MTOC dopo essere entrati nelle cellule e, in comune con gli aggregati proteici, ciò comporta il riconoscimento da parte della proteina motoria dei microtubuli, la dineina. È possibile che i virus appaiano estranei o mal ripiegati sulle cellule e stimolino una risposta aggresomica.¹⁴⁷

Sebbene le cellule di solito eliminino rapidamente tali strutture potenzialmente citotossiche per garantire la sopravvivenza, è noto che diversi virus sfruttano il processo di aggregazione per aumentare la replicazione, l'evasione immunitaria e la virulenza.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7232513/>

Formazione di aggresomi indotta da virus. L'attivazione della via aggresomica è il risultato di una via di degradazione del proteasoma sopraffatta o bloccata. Gli aggresomi si formano attorno all'MTOC nella regione perinucleare della cellula mediante il trasporto attivo di proteine diretto verso l'estremità inferiore alla gabbia della vimentina. HDAC6 è importante per l'aggregazione di proteine virali e/o cellulari mal ripiegate/ubiquitinate al MTOC. Queste proteine sono collegate alla dineina, una proteina motoria, e all'HDAC6, una molecola linker con attività di deacetilasi. Gli aggresomi formati vengono eliminati da un evento di fusione autofagosoma-lisosoma chiamato aggreffagia. HDAC6, istone deacetilasi 6, MTOC, centro organizzativo dei microtubuli, ER, reticolo endoplasmatico.

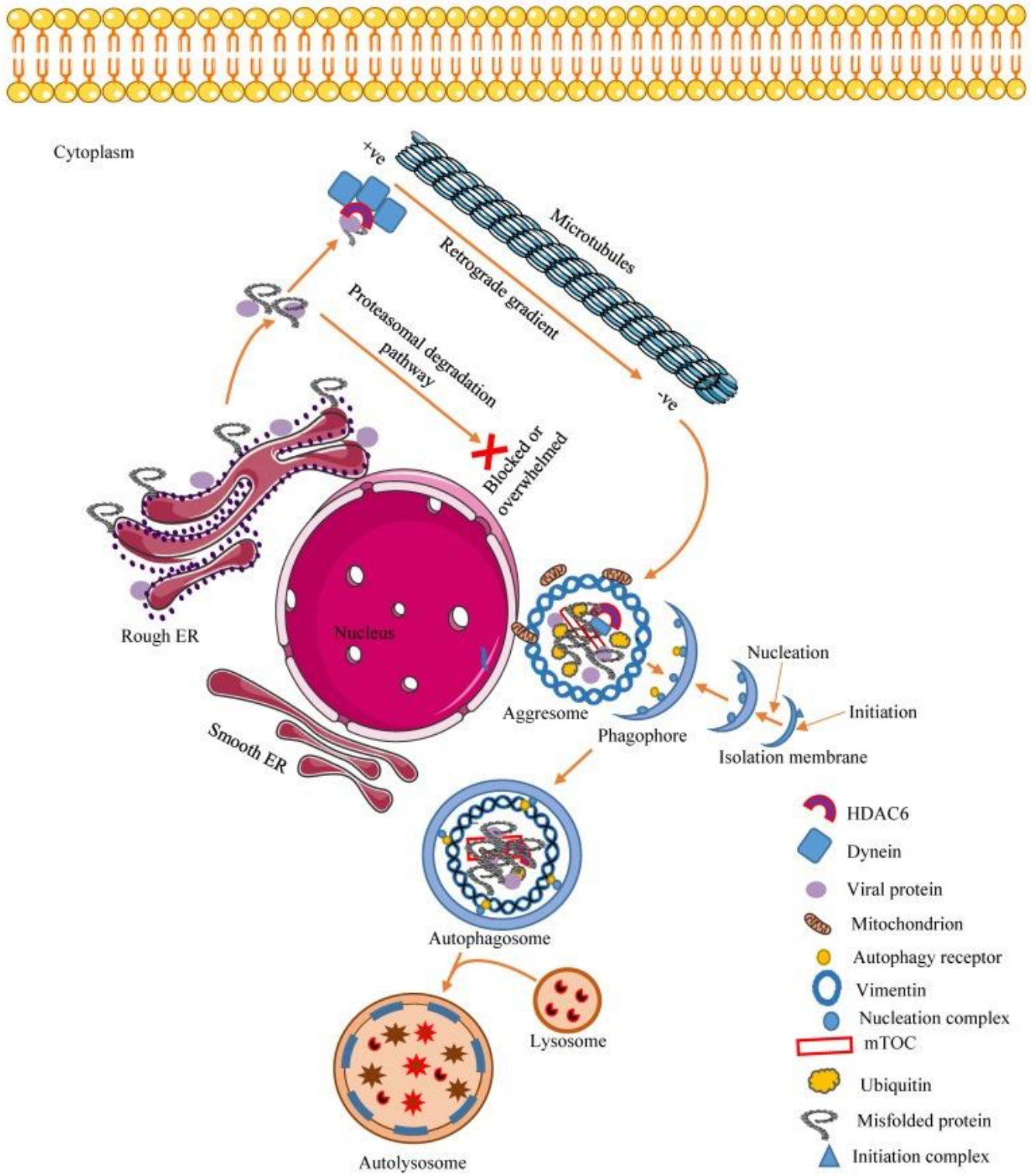
Viruses. 2020 Apr 4;12(4):399. doi: 10.3390/v12040399
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7232513/>

¹⁴⁶ Heath CM, Windsor M, Wileman T.
Aggresomes resemble sites specialized for virus assembly.
J Cell Biol. 2001;153(3):449-455. doi:10.1083/jcb.153.3.449
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2190574/>

Wileman T.
Aggresomes and autophagy generate sites for virus replication.
Science. 2006 May 12;312(5775):875-8. doi: 10.1126/science.1126766
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16690857/>

Wileman T.
Aggresomes and pericentriolar sites of virus assembly: cellular defense or viral design?
Annu Rev Microbiol. 2007;61:149-67. doi: 10.1146/annurev.micro.57.030502.090836.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17896875/>

¹⁴⁷ Muscolino E, Luoto LM, Brune W.
Viral Induced Protein Aggregation: A Mechanism of Immune Evasion.
Int J Mol Sci. 2021 Sep 6;22(17):9624. doi: 10.3390/ijms22179624.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8431809/>



Il processo altamente regolato di smaltimento degli aggregati può avvenire attraverso il sistema ubiquitina-proteasoma (UPS), l'autofagia mediata da chaperone (CMA) o attraverso la macroautofagia, che viene anche chiamata aggrephagia quando il substrato è un aggregato.¹⁴⁸

¹⁴⁸ Lamark T, Johansen T.

Aggrephagy: selective disposal of protein aggregates by macroautophagy.

L'UPS e il CMA sono in grado di degradare solo un polipeptide esteso alla volta. Quando l'accumulo di proteine con conformazione errata supera la capacità di questi due sistemi, le proteine mal ripiegate vengono attivamente trasportate lungo i microtubuli verso gli aggresomi¹⁴⁹ che si accumulano attorno ai MTOC e vengono poi eliminate dall'autofagia.

I grandi virus a DNA citoplasmatici utilizzano fabbriche virali simili ad aggresomi come impalcature per facilitare la replicazione e l'assemblaggio¹⁵⁰, mentre, ad esempio, gli adenovirus e gli herpesvirus promuovono l'aggregazione degli effettori immunitari cellulari e dei trasduttori di segnale per sopprimere il loro effetto antivirale o funzioni di segnalazione¹⁵¹.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7232513/>

Interazione tra aggregati e inclusioni cellulari indotti da virus. La replicazione dei virus innesca lo stress ER. Ciò provoca il rilascio di BiP/GRP79 nel citoplasma e la successiva attivazione della risposta delle proteine non ripiegate (UPR). Ciò alla fine potrebbe portare alla rimozione delle proteine tossiche da parte dell'autofagia. In alternativa, l'infezione da virus attiva direttamente le risposte immunitarie innate in grado di causare l'arresto traduzionale e la formazione di granuli di stress (SG). Le proteine cellulari e/o virali possono apparire come proteine mal ripiegate o tossiche e vengono reclutate nella via del chaperon per il ripiegamento produttivo e/o nella via proteasomale. Tuttavia, quando questi percorsi vengono bloccati, le proteine mal ripiegate vengono sequestrate negli aggresomi e vengono eliminate dall'autofagia-aggregofagia. BiP/GRP78, proteina immunoglobulinica legante/proteina regolata dal glucosio 78, ATF4, attivazione del fattore di trascrizione 4, eIF2 α , fattore di iniziazione eucariotica 2 alfa, ATF4, proteina correlata all'autofagia, RNP, ribonucleoproteina, AGO2aArgonaute, G3BP-1, Ras GTPasi-attivante proteina-1 legante le proteine, PERK, chinasi del reticolo endoplasmatico simile alla proteina chinasi.

Int J Cell Biol. 2012;2012:736905. doi:10.1155/2012/736905

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3320095/>

Wileman T.

Aggresomes and autophagy generate sites for virus replication.

Science. 2006 May 12;312(5775):875-8. doi: 10.1126/science.1126766.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16690857/>

¹⁴⁹ Kopito RR.

Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation.

Trends Cell Biol. 2000 Dec;10(12):524-30. doi: 10.1016/s0962-8924(00)01852-3.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11121744/>

¹⁵⁰ Netherton C, Moffat K, Brooks E, Wileman T.

A guide to viral inclusions, membrane rearrangements, factories, and viroplasm produced during virus replication.

Adv Virus Res. 2007;70:101-182. doi:10.1016/S0065-3527(07)70004-0

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7112299/>

¹⁵¹ Araujo FD, Stracker TH, Carson CT, Lee DV, Weitzman MD.

Adenovirus type 5 E4orf3 protein targets the Mre11 complex to cytoplasmic aggresomes.

J Virol. 2005;79(17):11382-11391. doi:10.1128/JVI.79.17.11382-11391.2005

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1193610/>

Liu Y, Shevchenko A, Shevchenko A, Berk AJ.

Adenovirus exploits the cellular aggresome response to accelerate inactivation of the MRN complex.

J Virol. 2005;79(22):14004-14016. doi:10.1128/JVI.79.22.14004-14016.2005

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1280221/>

Vidic J, Richard CA, Péchoux C, et al.

Amyloid Assemblies of Influenza A Virus PB1-F2 Protein Damage Membrane and Induce Cytotoxicity.

J Biol Chem. 2016;291(2):739-751. doi:10.1074/jbc.M115.652917

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4705394/>

Santarelli R, Granato M, Faggioni A, Cirone M.

Interference with the Autophagic Process as a Viral Strategy to Escape from the Immune Control: Lesson from Gamma Herpesviruses.

J Immunol Res. 2015;2015:546063. doi: 10.1155/2015/546063.

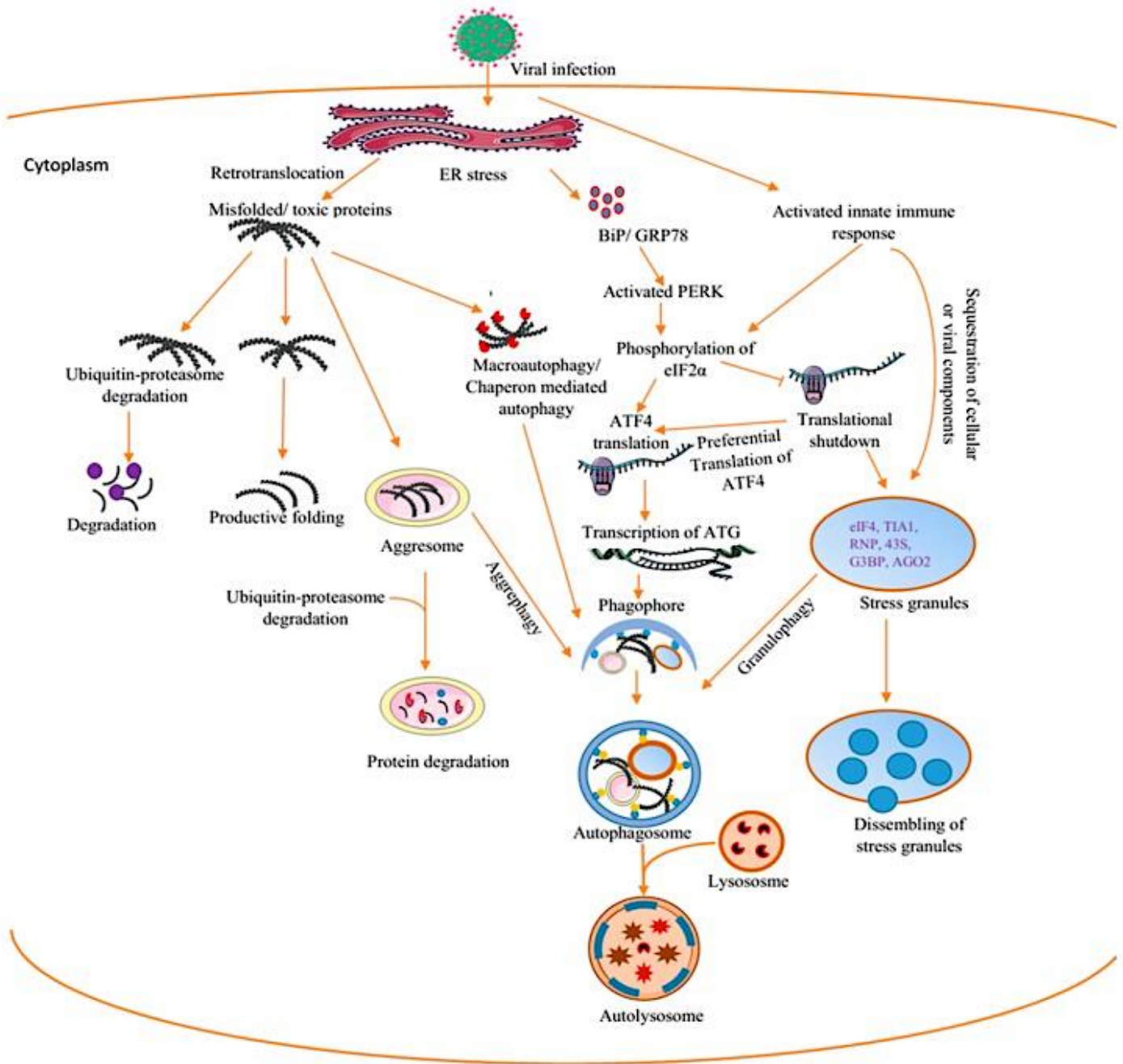
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4451563/>

Lussignol M, Esclatine A.

Herpesvirus and Autophagy: "All Right, Everybody Be Cool, This Is a Robbery!"

Viruses. 2017 Dec 4;9(12):372. doi: 10.3390/v9120372.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5744147/>



Mutazione e selezione di varianti virali

Le RNA polimerasi di virus a RNA sono soggette a errori, compreso il SARS-Cov-2, e contribuiscono in modo determinante all'infezione cronica attraverso la generazione di quasispecie, popolazioni di virus con sequenze diverse, che possono eludere il sistema immunitario o sviluppare nuove proprietà patogenetiche ¹⁵².

¹⁵² Domingo E, Perales C.
Viral quasispecies.
PLoS Genet. 2019 Oct 17;15(10):e1008271. doi: 10.1371/journal.pgen.1008271
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6797082/>

Jary A, et al
Evolution of viral quasispecies during SARS-CoV-2 infection.
Clin Microbiol Infect. 2020 Nov;26(11):1560.e1-1560.e4. doi: 10.1016/j.cmi.2020.07.032.

Oltre alle mutazioni puntiformi, in diversi virus si possono verificare duplicazioni, delezioni, eventi di ricombinazione e persino acquisizione genomica degli mRNA dell'ospite¹⁵³.

Forse i meglio studiati sono i mutanti di virus in grado di eludere il sistema immunitario con un ruolo ben consolidato nell'evasione delle risposte immunitarie adattative¹⁵⁴. In particolare, durante l'infezione da HCV, HIV o SIV, queste mutazioni si accumulano negli epitopi delle cellule T CD8, un processo associato alla progressione della malattia e all'evasione virale dal vaccino e dal controllo mediato dalle cellule T¹⁵⁵.

Sono state trovate mutazioni di evasione immunitaria nelle proteine virali che inibiscono più fasi nella presentazione dell'antigene, inclusa la generazione proteasomica del peptide, il legame dei peptidi alle molecole MHC di classe I e il riconoscimento del complesso peptide-MHC da parte del recettore delle cellule T.¹⁵⁶

Senza entrare nel dettaglio di questo meccanismo, in quanto sarà trattato in un altro capitolo, va tenuto presente che le basi modificate agiscono come marcatori di RNA-self per ridurre le risposte immunitarie innate all'RNA cellulare endogeno.¹⁵⁷ È noto che oltre 170 diversi tipi di modificazioni enzimatiche dell'RNA si verificano negli RNA stabili, come tRNA e rRNA, dove molti contribuiscono alla loro elevata stabilità e ottimizzano le attività di questi RNA. Diversi tipi di modificazioni delle basi sono state trovate anche negli mRNA eucariotici, definite modificazioni epitranscrittomiche¹⁵⁸. Le modificazioni delle basi rilevate nell'mRNA includono la deaminazione da adenosina a inosina (da A a I) e la deaminazione da citosina a uracile (da C a U), N6-metiladenosina (m6A), N1-metiladenosina (m1A), 5-metilcitosina (5mC), e pseudouridina (ψ), nonché ribosio 2'-O-metile. Molte di queste modifiche influenzano le risposte immunitarie innate all'RNA¹⁵⁹ con implicazioni nella cancerogenesi,

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7378485/>

¹⁵³ Becker Y.

Evolution of viruses by acquisition of cellular RNA or DNA nucleotide sequences and genes: an introduction.

Virus Genes. 2000;21(1-2):7-12.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11022785/>

¹⁵⁴ Chakraborty C, Sharma AR, Bhattacharya M, Lee SS.

A Detailed Overview of Immune Escape, Antibody Escape, Partial Vaccine Escape of SARS-CoV-2 and Their Emerging Variants With Escape Mutations.

Front Immunol. 2022 Feb 9;13:801522. doi: 10.3389/fimmu.2022.801522.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8863680/>

¹⁵⁵ Brooks K, Jones BR, Dileria DA, Wilkins DJ, Claiborne DT, McNally S, Gilmour J, Kilembe W, Joy JB, Allen SA, Brumme ZL, Hunter E.

HIV-1 variants are archived throughout infection and persist in the reservoir.

PLoS Pathog. 2020 Jun 3;16(6):e1008378. doi: 10.1371/journal.ppat.1008378.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7295247/>

Tsukiyama-Kohara K, Kohara M.

Hepatitis C Virus: Viral Quasispecies and Genotypes.

Int J Mol Sci. 2017 Dec 22;19(1):23. doi: 10.3390/ijms19010023.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5795974/>

¹⁵⁶ Bowen DG, Walker CM.

Mutational escape from CD8⁺ T cell immunity: HCV evolution, from chimpanzees to man.

J Exp Med. 2005 Jun 6;201(11):1709-14. doi: 10.1084/jem.20050808.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2213256/>

¹⁵⁷ Quin J, Sedmík J, Vukić D, Khan A, Keegan LP, O'Connell MA.

ADAR RNA Modifications, the Epitranscriptome and Innate Immunity.

Trends Biochem Sci. 2021 Sep;46(9):758-771. doi: 10.1016/j.tibs.2021.02.002.

<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2021.02.002>

¹⁵⁸ Saletore Y, Meyer K, Korlach J, Vilfan ID, Jaffrey S, Mason CE.

The birth of the Epitranscriptome: deciphering the function of RNA modifications.

Genome Biol. 2012 Oct 31;13(10):175. doi: 10.1186/gb-2012-13-10-175.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3491402/>

¹⁵⁹ Karikó K, Buckstein M, Ni H, Weissman D.

Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA.

Immunity. 2005 Aug;23(2):165-75. doi: 10.1016/j.immuni.2005.06.008.

<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.06.008>

nell'invecchiamento e nello sviluppo di malattie neurologiche, autoimmuni e cardiovascolari ¹⁶⁰, inoltre la comprensione di questi effetti è stata fondamentale per lo sviluppo di terapie e dei vaccini a mRNA contro il SARS-Cov-2. ¹⁶¹

Risposte immunitarie durante l'infezione virale cronica

Le strategie virali sopra descritte per il mantenimento dell'infezione cronica sono bilanciate dagli effetti della risposta immunitaria specifica del virus, stabilendo così un equilibrio metastabile tra ospite e patogeno.

È ben noto che esiste una complessa rete di regolazione che inibisce attivamente le risposte immunitarie durante le infezioni virali croniche ed è essenziale per due ragioni principali.

Il primo motivo è la riduzione dell'eccessiva immunopatologia. Ciò è particolarmente importante per la risposta dei linfociti T CD8 che possono causare enormi danni ai tessuti uccidendo le cellule infette e rilasciando citochine infiammatorie. Pertanto, non sorprende che la citotossicità e la produzione di citochine come il fattore di necrosi tumorale (TNF) siano strettamente regolate durante le infezioni croniche, e che queste funzioni siano spesso ridotte o perse nelle cellule T CD8 che rispondono a virus persistenti (Figura 4).

Il secondo motivo è quello di regolare lo straordinario potenziale proliferativo dei linfociti T virus-specifici.

Durante la fase acuta dell'infezione, i linfociti T specifici del virus possono raddoppiare di numero ogni 4-6 ore e subire 3-4 raddoppiamenti al giorno ¹⁶², che si traduce in un aumento di 10 volte al giorno. Se questo livello di proliferazione dovesse continuare incontrollato, si avrebbe un numero astronomico (e potenzialmente catastrofico) di cellule T specifiche del virus in un tempo molto breve (Figura 4, riquadro).

Mannion NM et al

The RNA-editing enzyme ADAR1 controls innate immune responses to RNA.
Cell Rep. 2014 Nov 20;9(4):1482-94. doi: 10.1016/j.celrep.2014.10.041.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4542304/>

O'Connell MA, Mannion NM, Keegan LP.

The Epitranscriptome and Innate Immunity.
PLoS Genet. 2015 Dec 10;11(12):e1005687. doi: 10.1371/journal.pgen.1005687.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4675516/>

¹⁶⁰ Niu G, Zou D, Li M, Zhang Y, Sang J, Xia L, Li M, Liu L, Cao J, Zhang Y, Wang P, Hu S, Hao L, Zhang Z.

Editome Disease Knowledgebase (EDK): a curated knowledgebase of editome-disease associations in human.
Nucleic Acids Res. 2019 Jan 8;47(D1):D78-D83. doi: 10.1093/nar/gky958.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6323952/>

Samuel CE.

Adenosine deaminase acting on RNA (ADAR1), a suppressor of double-stranded RNA-triggered innate immune responses.
J Biol Chem. 2019 Feb 1;294(5):1710-1720. doi: 10.1074/jbc.TM118.004166.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6364763/>

Erdmann EA, Mahapatra A, Mukherjee P, Yang B, Hundley HA.

To protect and modify double-stranded RNA - the critical roles of ADARs in development, immunity and oncogenesis.
Crit Rev Biochem Mol Biol. 2021 Feb;56(1):54-87. doi: 10.1080/10409238.2020.1856768.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8019592/>

¹⁶¹ Morais P, Adachi H, Yu YT.

The Critical Contribution of Pseudouridine to mRNA COVID-19 Vaccines.
Front Cell Dev Biol. 2021 Nov 4;9:789427. doi: 10.3389/fcell.2021.789427.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8600071/>

¹⁶² Murali-Krishna K, Altman JD, Suresh M, Sourdive DJ, Zajac AJ, Miller JD, Slansky J, Ahmed R.

Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection.
Immunity. 1998 Feb;8(2):177-87. doi: 10.1016/s1074-7613(00)80470-7.
[https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074-7613\(00\)80470-7](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074-7613(00)80470-7)

Miller JD, et al

Human effector and memory CD8⁺ T cell responses to smallpox and yellow fever vaccines.
Immunity. 2008 May;28(5):710-22. doi: 10.1016/j.immuni.2008.02.020.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.02.020>

È fondamentale porre un freno a questa notevole capacità proliferativa. In effetti, un segno distintivo delle cellule T virus-specifiche durante le infezioni croniche è una capacità notevolmente ridotta di proliferare in risposta all'antigene.¹⁶³

È importante sottolineare che, nonostante questa ridotta capacità proliferativa e una diminuzione di alcune funzioni effettrici (descritte di seguito), le cellule T specifiche del virus svolgono un ruolo cruciale nel controllo della replicazione virale e quindi nel mantenere sotto controllo il nostro viroma. Ad esempio, questo si manifesta per le infezioni da EBV e HCMV, così come per l'infezione da HIV nei controllori "d'élite", un sottotipo unico di individui con infezione da HIV che sono in grado di limitare l'infezione da HIV a un livello molto basso per lunghi periodi (Figure 1 e 4). Tuttavia, durante l'infezione progressiva da HIV, HCV o HBV, la disfunzione dei linfociti T può diventare così profonda che i linfociti T non sono in grado di controllare efficacemente la replicazione virale. Pertanto, ci sono vari gradi di funzione e disfunzione nei linfociti T durante le infezioni persistenti.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.036>

Durante l'infezione virale, le cellule T naive sono innescate dall'antigene, dalla costimolazione e dall'infiammazione per differenziarsi in cellule T effettrici. Se l'infezione viene eliminata e l'antigene e l'infiammazione vengono eliminati o sostanzialmente ridotti, alcune di queste cellule T effettrici funzionali possono ulteriormente differenziarsi in cellule T di memoria altamente polifunzionali. Queste cellule T di memoria sono in grado di coprodurre più citochine (ad esempio, IFN- γ , TNF, IL-2), diventando citolitiche e proliferando vigorosamente. Queste cellule hanno anche un'elevata capacità di sopravvivenza e vengono mantenute per lunghi periodi in assenza di antigene. Nell'uomo, le cellule T specifiche per il virus del vaccino o il vaccino contro il virus della febbre gialla vivo attenuato hanno queste proprietà. Al contrario, durante un'infezione cronica, l'antigene e l'infiammazione persistono dopo la fase effettrice e questi fattori possono influenzare la funzione dei linfociti T. Durante alcune infezioni persistenti, i livelli di antigene possono essere bassi e possono svilupparsi cellule T CD8 virus-specifiche che possiedono molteplici funzioni. Queste cellule potrebbero anche esprimere bassi livelli di molecole inibitorie come PD-1. Nell'uomo, i linfociti T CD8 specifici per CMV possono talvolta esistere in un tale stato di funzionalità. All'aumentare dell'antigene o della carica virale, i linfociti T diventano meno polifunzionali, perdendo le funzioni effettrici in modo gerarchico. L'espressione dei recettori inibitori può aumentare in questo contesto. Le cellule T CD8 specifiche per EBV nell'uomo potrebbero essere un esempio di questo tipo di cellula T. Con l'aumento della carica virale e dell'antigene, i linfociti T diventano sempre meno funzionali, mancando occasionalmente molte, se non la maggior parte, delle funzioni effettrici. L'espressione del recettore inibitorio aumenta e la suscettibilità all'apoptosi diventa maggiore. In queste fasi di disfunzione sono state descritte cellule T CD8 specifiche per HIV, HCV e HBV. In definitiva, se la gravità o la durata dell'infezione è elevata o prolungata, i linfociti T virus-specifici possono essere completamente eliminati, portando alla perdita delle risposte dei linfociti T virus-specifici. La disfunzione dei linfociti T può peggiorare progressivamente anche durante la stessa infezione all'aumentare della carica virale e/o dei segnali inibitori. Mentre la disfunzione può essere invertita nelle prime fasi dell'esaurimento, diventa più permanente con il progredire dell'esaurimento e le cellule diventano più differenziate in fase terminale. (Riquadro) È fondamentale limitare la proliferazione delle cellule T durante le infezioni croniche. Nella cinetica tipica di una risposta delle cellule T CD8 all'infezione virale (linea blu), il numero di cellule T antigene-specifiche raggiunge il picco a circa una settimana dopo l'infezione prima di diminuire. Se la proliferazione guidata dall'antigene non è sottoregolata durante le infezioni persistenti e le cellule T continuano a dividersi ogni ~ 4-6 ore, il numero di cellule T antigene-specifiche raggiungerebbe rapidamente livelli catastrofici (linea rossa).

¹⁶³ Lykken JM, DiLillo DJ, Weimer ET, Roser-Page S, Heise MT, Grayson JM, Weitzmann MN, Tedder TF.

Acute and chronic B cell depletion disrupts CD4⁺ and CD8⁺ T cell homeostasis and expansion during acute viral infection in mice.

J Immunol. 2014 Jul 15;193(2):746-56. doi: 10.4049/jimmunol.1302848.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4290158/>

Shin H, Wherry EJ.

CD8 T cell dysfunction during chronic viral infection.

Curr Opin Immunol. 2007 Aug;19(4):408-15. doi: 10.1016/j.coi.2007.06.004.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17656078/>

Wiesel M, Walton S, Richter K, Oxenius A.

Virus-specific CD8 T cells: activation, differentiation and memory formation.

APMIS. 2009 May;117(5-6):356-81. doi: 10.1111/j.1600-0463.2009.02459.x.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19400862/>

Desimmie BA, Raru YY, Awadh HM, He P, Teka S, Willenburg KS.

Insights into SARS-CoV-2 Persistence and Its Relevance.

Viruses. 2021 May 29;13(6):1025. doi: 10.3390/v13061025.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8228265/>

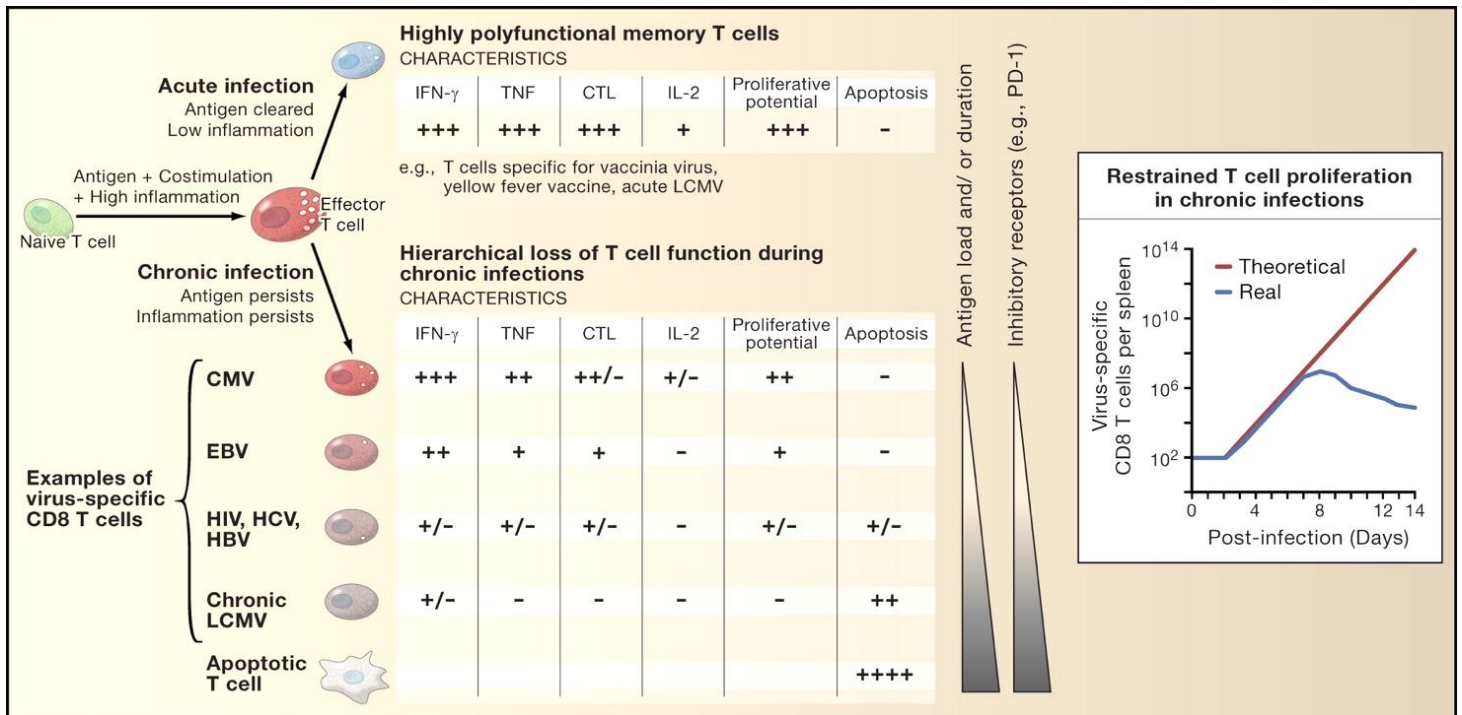


Fig. 4

Risposte dei linfociti T

Nel considerare la natura delle risposte dei linfociti T durante l'infezione cronica, è utile iniziare con la comprensione delle risposte all'infezione acuta. La differenziazione delle cellule della memoria T CD8 e CD4 in seguito a infezioni virali acute porta alla formazione di cellule di memoria di alta qualità e di lunga durata.¹⁶⁴ Queste cellule T hanno diverse proprietà fondamentali che consentono loro di conferire un'immunità protettiva. La principale tra queste proprietà è la capacità di persistere a lungo termine in assenza di antigene e di rispondere rapidamente alla riesposizione al patogeno. Questa risposta di richiamo è caratterizzata da una rapida elaborazione delle funzioni effettrici come citotossicità e produzione di citochine/chemochine, proliferazione accompagnata da aumenti sostanziali del numero di cellule T e migrazione delle cellule T effettrici verso i siti di infezione.¹⁶⁵

¹⁶⁴ Kaech SM, Wherry EJ.

Heterogeneity and cell-fate decisions in effector and memory CD8+ T cell differentiation during viral infection. *Immunity*. 2007 Sep;27(3):393-405. doi: 10.1016/j.immuni.2007.08.007. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3431921/>

Omilusik KD, Goldrath AW.

Remembering to remember: T cell memory maintenance and plasticity. *Curr Opin Immunol*. 2019 Jun;58:89-97. doi: 10.1016/j.coi.2019.04.009. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6612439/>

Youngblood B, Hale JS, Ahmed R.

T-cell memory differentiation: insights from transcriptional signatures and epigenetics. *Immunology*. 2013;139(3):277-284. doi:10.1111/imm.12074 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3701173/>

¹⁶⁵ Rahimi RA, Luster AD.

Chemokines: Critical Regulators of Memory T Cell Development, Maintenance, and Function. *Adv Immunol*. 2018;138:71-98. doi: 10.1016/bs.ai.2018.02.002. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6191293/>

Mueller SN, Gebhardt T, Carbone FR, Heath WR.

Memory T cell subsets, migration patterns, and tissue residence. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:137-61. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-095954.

La differenziazione di linfociti T di memoria robusti dopo l'infezione acuta segue un programma generale, con le proprietà di memoria critiche che si sviluppano gradualmente nel tempo. Sia la forza della stimolazione dell'antigene che l'infiammazione possono influire sulla cinetica o sul modello di questa differenziazione. Ad esempio, l'infiammazione è essenziale per un'efficace attivazione delle cellule T naïve e per la generazione di cellule T effettrici e di memoria, ma livelli più elevati di infiammazione possono favorire la generazione di cellule T effettrici terminali più differenziate.¹⁶⁶ Il microambiente tissutale può anche, forse attraverso segnali infiammatori locali dipendenti dal virus, influenzare la capacità dei linfociti T di produrre la citochina interleuchina-2 (IL-2)¹⁶⁷, alterare le proprietà del tropismo,¹⁶⁸ modificare il fenotipo dei linfociti T di memoria¹⁶⁹ e definire il modello generale di differenziazione dei linfociti T di memoria.¹⁷⁰ Se la risposta immunitaria primaria elimina l'infezione (Figura 1), alcune cellule T si differenzieranno in cellule T di memoria di lunga durata (Figura 5).

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23215646/>

Hussain T, Quinn KM.

Similar but different: virtual memory CD8 T cells as a memory-like cell population. *Immunol Cell Biol.* 2019 Aug;97(7):675-684. doi: 10.1111/imcb.12277.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31140625/>

¹⁶⁶ Mescher MF, Curtsinger JM, Agarwal P, Casey KA, Gerner M, Hammerbeck CD, Popescu F, Xiao Z.

Signals required for programming effector and memory development by CD8+ T cells.

Immunol Rev. 2006 Jun;211:81-92. doi: 10.1111/j.0105-2896.2006.00382.x.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16824119/>

Joshi NS, Cui W, Chandele A, Lee HK, Urso DR, Hagman J, Gapin L, Kaech SM.

Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8(+) T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor.

Immunity. 2007 Aug;27(2):281-95. doi: 10.1016/j.immuni.2007.07.010.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC2034442/>

Amsen D, Backer RA, Helbig C.

Decisions on the road to memory.

Adv Exp Med Biol. 2013;785:107-20. doi: 10.1007/978-1-4614-6217-0_12.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23456843/>

¹⁶⁷ Chang J, Cho JH, Lee SW, Choi SY, Ha SJ, Sung YC.

IL-12 priming during in vitro antigenic stimulation changes properties of CD8 T cells and increases generation of effector and memory cells.

J Immunol. 2004 Mar 1;172(5):2818-26. doi: 10.4049/jimmunol.172.5.2818.

<https://www.jimmunol.org/content/172/5/2818.long>

¹⁶⁸ Mora JR, Bono MR, Manjunath N, Weninger W, Cavanagh LL, Roseblatt M, Von Andrian UH.

Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells.

Nature. 2003 Jul 3;424(6944):88-93. doi: 10.1038/nature01726.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12840763/>

De Calisto J, Villablanca EJ, Wang S, Bono MR, Roseblatt M, Mora JR.

T-cell homing to the gut mucosa: general concepts and methodological considerations.

Methods Mol Biol. 2012;757:411-34. doi: 10.1007/978-1-61779-166-6_24. PMID: 21909925.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21909925/>

¹⁶⁹ Marzo AL, Yagita H, Lefrançois L.

Cutting edge: migration to nonlymphoid tissues results in functional conversion of central to effector memory CD8 T cells.

J Immunol. 2007 Jul 1;179(1):36-40. doi: 10.4049/jimmunol.179.1.36.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC2861291/>

Carbone FR.

Tissue-Resident Memory T Cells and Fixed Immune Surveillance in Nonlymphoid Organs.

J Immunol. 2015 Jul 1;195(1):17-22. doi: 10.4049/jimmunol.1500515.

<https://www.jimmunol.org/content/195/1/17.long>

¹⁷⁰ Masopust D, Vezys V, Wherry EJ, Barber DL, Ahmed R.

Cutting edge: gut microenvironment promotes differentiation of a unique memory CD8 T cell population.

J Immunol. 2006 Feb 15;176(4):2079-83. doi: 10.4049/jimmunol.176.4.2079.

<https://www.jimmunol.org/content/176/4/2079.long>

Infatti, la capacità di rispondere in modo efficiente a segnali omeostatici come IL-7 e IL-15 e di sottoporsi all'autorigenerazione omeostatica è una proprietà che viene acquisita solo dai linfociti T di memoria che si sviluppano in assenza di antigene.

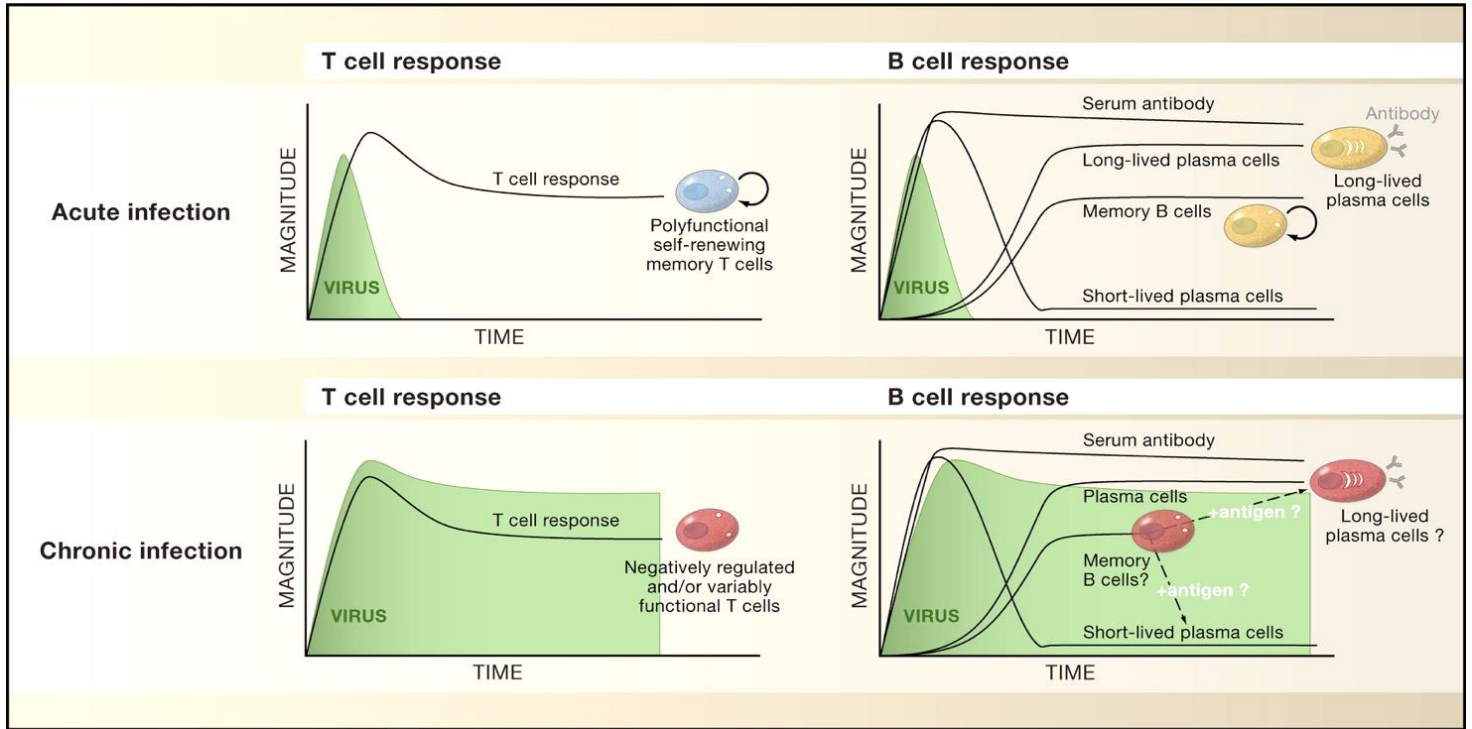


Fig. 5

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.036>

A seguito di un'infezione virale acuta, vengono generate risposte dei linfociti T che svolgono un ruolo nel controllo della replicazione virale iniziale. (In alto a sinistra) Dopo l'eliminazione dell'infezione, le cellule T formano un pool di cellule T di memoria stabili e altamente polifunzionali che possono persistere a lungo termine tramite l'autorinnovamento in assenza di antigene. (In alto a destra) La risposta dei linfociti B a seguito di un'infezione virale acuta è caratterizzata dalla generazione iniziale di plasmacellule di breve durata che contribuiscono a una fase iniziale della produzione di anticorpi nel siero. Dopo l'eliminazione del virus, vengono generati linfociti B di memoria e plasmacellule a vita lunga dal centro germinale. Le plasmacellule a vita lunga ospitano il midollo osseo e producono costitutivamente immunoglobuline che mantengono i livelli di anticorpi sierici circolanti per lunghi periodi. I linfociti B di memoria vengono mantenuti e possono dare origine a plasmacellule dopo la riattivazione. (In basso a sinistra) Durante l'infezione virale cronica, vengono generate anche risposte dei linfociti T che possono persistere nel tempo. Tuttavia, queste cellule T virus-specifiche generate durante l'infezione cronica sono soggette a regolazione negativa, perdono polifunzionalità e diventano dipendenti dall'antigene piuttosto che sviluppare la capacità di persistere a lungo termine attraverso l'autorinnovamento indipendente dall'antigene. (In basso a destra) Sebbene si sappia meno sulla dinamica delle risposte dei linfociti B durante l'infezione virale cronica rispetto alle risposte dei linfociti T, gli anticorpi sierici e le plasmacellule sono chiaramente generati durante le infezioni persistenti. Non è chiaro se le popolazioni di plasmacellule generate durante le infezioni virali croniche abbiano le stesse caratteristiche di quelle formate a seguito dell'eliminazione dell'infezione acuta. Inoltre, le cellule B della memoria potrebbero formarsi durante l'infezione virale cronica, ma la presenza continua dell'antigene potrebbe spingere queste cellule B della memoria a diventare plasmacellule a vita breve o lunga.

Molte delle proprietà chiave delle cellule T di memoria efficaci si sviluppano dopo la clearance dell'antigene e l'infiammazione in seguito a un'infezione acuta. Durante le infezioni virali croniche, dove l'antigene e/o l'infiammazione persistono, le risposte dei linfociti T antivirali possono differire notevolmente. Inoltre, le cellule T CD4 e CD8 specifiche del virus mostrano spesso vari stadi di esaurimento (Figura 4, Figura 5).¹⁷¹

¹⁷¹ Shin H, Wherry EJ.

CD8 T cell dysfunction during chronic viral infection. *Curr Opin Immunol.* 2007 Aug;19(4):408-15. doi: 10.1016/j.coi.2007.06.004. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17656078/>.

Klenerman P, Hill A. T cells and viral persistence: lessons from diverse infections. *Nat Immunol.* 2005 Sep;6(9):873-9. doi: 10.1038/ni1241. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16116467/>

Wherry EJ, Kurachi M.

I difetti dei linfociti T associati all'esaurimento vanno dalla perdita delle funzioni effettrici all'incapacità di mostrare una proliferazione omeostatica indipendente dall'antigene.¹⁷² L'esaurimento delle cellule T CD8 è stato descritto per la prima volta durante l'infezione da LCMV di topi, in cui le cellule T CD8 specifiche del virus inizialmente hanno sviluppato funzioni effettrici come la produzione di citochine e la citotossicità, ma hanno perso queste proprietà con il progredire dell'infezione cronica.¹⁷³ Questa perdita di funzione è gerarchica (Figura 4), con alcune funzioni esaurite precocemente o in presenza di una bassa carica virale (ad esempio produzione di IL-2, citotossicità, proliferazione) e altre (ad esempio produzione di IFN- γ) che persistono più a lungo. Alla fine, soprattutto se la carica virale è elevata o se manca l'aiuto dei linfociti T CD4, si trovano linfociti T CD8 specifici del virus carenti per la maggior parte delle funzioni effettrici (ad esempio, attività citotossica ex vivo, produzione di IL-2, TNF e IFN- γ).

174

Molecular and cellular insights into T cell exhaustion.
Nat Rev Immunol. 2015 Aug;15(8):486-99. doi: 10.1038/nri3862.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4889009/>

¹⁷² Man K, Gabriel SS, Liao Y, Gloury R, Preston S, Henstridge DC, Pellegrini M, Zehn D, Berberich-Siebelt F, Febbraio MA, Shi W, Kallies A. Transcription Factor IRF4 Promotes CD8+ T Cell Exhaustion and Limits the Development of Memory-like T Cells during Chronic Infection. Immunity. 2017 Dec 19;47(6):1129-1141.e5. doi: 10.1016/j.immuni.2017.11.021.
[https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074-7613\(17\)30522-8](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074-7613(17)30522-8)

Doering TA, Crawford A, Angelosanto JM, Paley MA, Ziegler CG, Wherry EJ. Network analysis reveals centrally connected genes and pathways involved in CD8+ T cell exhaustion versus memory. Immunity. 2012 Dec 14;37(6):1130-44. doi: 10.1016/j.immuni.2012.08.021.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3749234/>

Angelosanto JM, Blackburn SD, Crawford A, Wherry EJ. Progressive loss of memory T cell potential and commitment to exhaustion during chronic viral infection. J Virol. 2012 Aug;86(15):8161-70. doi: 10.1128/JVI.00889-12.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3421680/>

Kaminski H, Lemoine M, Pradeu T. Immunological exhaustion: How to make a disparate concept operational? PLoS Pathog. 2021 Sep 23;17(9):e1009892. doi: 10.1371/journal.ppat.1009892.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8460019/>

¹⁷³ Zajac AJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, et al. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. J Exp Med. 1998;188(12):2205-2213. doi:10.1084/jem.188.12.2205
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC2212420/>

Wherry EJ, Ha SJ, Kaech SM, Haining WN, Sarkar S, Kalia V, Subramaniam S, Blattman JN, Barber DL, Ahmed R. Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection. Immunity. 2007 Oct;27(4):670-84. doi: 10.1016/j.immuni.2007.09.006. Epub 2007 Oct 18. Erratum in: Immunity. 2007 Nov;27(5):824.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.09.006>

Wherry EJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, van der Most R, Ahmed R. Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. J Virol. 2003 Apr;77(8):4911-27. doi: 10.1128/jvi.77.8.4911-4927.2003.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC152117/>

¹⁷⁴ Zehn D, Wherry EJ. Immune Memory and Exhaustion: Clinically Relevant Lessons from the LCMV Model. Adv Exp Med Biol. 2015;850:137-52. doi: 10.1007/978-3-319-15774-0_10.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26324351/>

Kahan SM, Zajac AJ. Immune Exhaustion: Past Lessons and New Insights from Lymphocytic Choriomeningitis Virus. Viruses. 2019 Feb 13;11(2):156. doi: 10.3390/v11020156.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6410286/>

Im SJ, Ha SJ. Re-defining T-Cell Exhaustion: Subset, Function, and Regulation. Immune Netw. 2020 Feb 20;20(1):e2. doi: 10.4110/in.2020.20.e2.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7049579/>

Nella situazione estrema, i linfociti T CD8 esausti possono essere eliminati fisicamente.¹⁷⁵ La gravità della disfunzione dei linfociti T durante l'infezione cronica è direttamente correlata al livello di infezione e all'espressione dei recettori inibitori da parte dei linfociti T specifici del virus e si correla inversamente con l'aiuto dei linfociti T CD4. Tipi simili di cellule T sono stati descritti in molti modelli sperimentali, e cellule T CD8 disfunzionali specifiche per virus sono state descritte anche durante infezioni croniche umane.¹⁷⁶

I difetti nella differenziazione dei linfociti T della memoria durante le infezioni virali croniche non sono limitati alle funzioni effettrici. Includono anche un mancato sviluppo in cellule T di memoria indipendenti dall'antigene che si autorigenerano. L'espressione ridotta dei recettori per IL-7 e IL-15 e l'incapacità di rispondere efficacemente a queste citochine si traduce in un'autorigenerazione omeostatica indipendente dall'antigene difettosa.

Queste cellule T CD8 virus-specifiche richiedono un antigene cognato (cioè l'antigene che si accoppia in maniera specifica al recettore delle cellule T), invece di IL-7 e IL-15, per il mantenimento.¹⁷⁷ L'impossibilità di sottoporsi a un mantenimento indipendente dall'antigene guidato da IL-7 e IL-15 porta a una perdita di cellule T CD8 virus-specifiche se l'antigene viene rimosso. In questa situazione, i cambiamenti nell'espressione dell'antigene dovuti alla terapia antivirale o alla generazione di neo-epitopi da parte di mutanti virali possono comportare la perdita di queste cellule T CD8 "antigene-dipendenti" con importanti conseguenze per la ricomparsa o la reinfezione virale.¹⁷⁸

¹⁷⁵ Zajac AJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, et al.

Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function.
J Exp Med. 1998;188(12):2205-2213. doi:10.1084/jem.188.12.2205
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC2212420/>

Moskophidis D, Lechner F, Pircher H, Zinkernagel RM.

Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells.
Nature. 1993 Apr 22;362(6422):758-61. doi: 10.1038/362758a0. Erratum in: Nature 1993 Jul 15;364(6434):262.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8469287/>

Wherry EJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, van der Most R, Ahmed R.

Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment.
J Virol. 2003 Apr;77(8):4911-27. doi: 10.1128/jvi.77.8.4911-4927.2003.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC152117/>

¹⁷⁶ Shin H, Wherry EJ.

CD8 T cell dysfunction during chronic viral infection.
Curr Opin Immunol. 2007 Aug;19(4):408-15. doi: 10.1016/j.coi.2007.06.004.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17656078/>

Klenerman P, Hill A.

T cells and viral persistence: lessons from diverse infections.
Nat Immunol. 2005 Sep;6(9):873-9. doi: 10.1038/ni1241.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16116467/>

¹⁷⁷ Shin H, Blackburn SD, Blattman JN, Wherry EJ.

Viral antigen and extensive division maintain virus-specific CD8 T cells during chronic infection.
J Exp Med. 2007 Apr 16;204(4):941-9. doi: 10.1084/jem.20061937
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2118542/>

Takamura S.

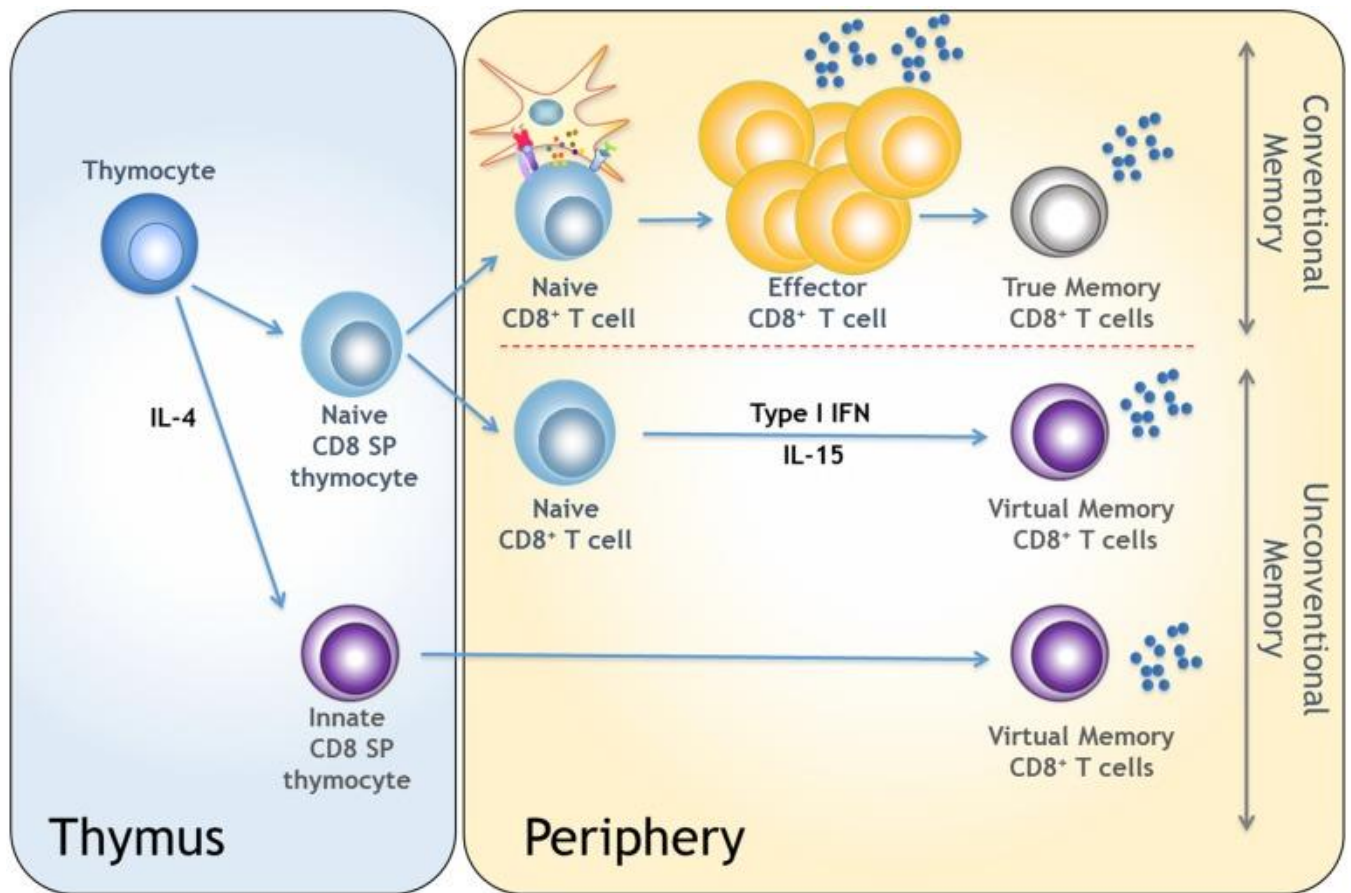
Impact of multiple hits with cognate antigen on memory CD8+ T-cell fate.
Int Immunol. 2020 Sep 8;32(9):571-581. doi: 10.1093/intimm/dxaa039.
<https://doi.org/10.1093/intimm/dxaa039>

Lauvau G, Goriely S.

Memory CD8+ T Cells: Orchestrators and Key Players of Innate Immunity?
PLoS Pathog. 2016;12(9):e1005722. Published 2016 Sep 1. doi:10.1371/journal.ppat.1005722
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5008753/>

¹⁷⁸ Wherry EJ, Barber DL, Kaech SM, Blattman JN, Ahmed R.

Antigen-independent memory CD8 T cells do not develop during chronic viral infection.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Nov 9;101(45):16004-9. doi: 10.1073/pnas.0407192101.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC524220/>



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5008753/>

Percorso di differenziazione dei linfociti T CD8 della memoria convenzionale e non convenzionale.

I linfociti T CD8 naive sottoposti al riconoscimento dell'antigene cognato nel contesto di un'infezione o di un'immunizzazione si differenziano in cellule effettrici e formano "vere" cellule di memoria sperimentate con l'antigene o "memoria convenzionale". In condizioni fisiologiche, le cellule T CD8 naive possono anche acquisire un fenotipo di memoria in assenza di stimolazione con antigene cognato non self. Ciò può verificarsi nel timo o nella periferia sotto il controllo di citochine come IL-4, IL-15 e IFN di tipo I e dare origine a "memoria virtuale" o cellule T CD8 "innate/simili della memoria".

Risposte delle cellule B

Le infezioni acute causate da virus citopatici provocano comunemente forti risposte neutralizzanti di Ab, che agiscono impedendo l'ingresso del virus nelle cellule ospiti.¹⁷⁹ (Figura 5)

Dopo l'infezione, i linfociti B attivati migrano al confine delle zone dei linfociti T e B degli organi linfoidi periferici dove formano una sinapsi immunologica e interagiscono con i linfociti T CD4⁺ affini. I linfociti T CD4⁺ riconoscono un peptide sull'MHC II della cellula B, che si traduce in una maggiore espressione di CD40L e citochine come l'interleuchina-4 che inducono l'attivazione e la proliferazione delle cellule B.

Shin H, Wherry EJ.

CD8 T cell dysfunction during chronic viral infection.

Curr Opin Immunol. 2007 Aug;19(4):408-15. doi: 10.1016/j.coi.2007.06.004.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17656078/>

¹⁷⁹ Cooper L, Good-Jacobson KL.

Dysregulation of humoral immunity in chronic infection.

Immunol Cell Biol. 2020 Jul;98(6):456-466. doi: 10.1111/imcb.12338.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32275789/>

Rodriguez S, Roussel M, Tarte K, Amé-Thomas P.

Impact of Chronic Viral Infection on T-Cell Dependent Humoral Immune Response.

Front Immunol. 2017;8:1434. Published 2017 Oct 31. doi:10.3389/fimmu.2017.01434

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.01434/full>

Ciò può comportare la differenziazione dei linfociti B attivati in plasmablasti di breve durata originati dai focolai extrafollicolari ai margini delle zone dei linfociti T e B nei tessuti linfoidi secondari come la milza e i linfonodi, cellule B della memoria precoce o la formazione dei centri germinali (GC) nel follicolo. Questi plasmablasti di breve durata secernono anticorpi a bassa affinità, principalmente dell'isotipo dell'immunoglobulina M, sebbene alcuni possano subire il passaggio di classe all'immunoglobulina IgG o IgA.¹⁸⁰

Questa ondata iniziale di plasmablasti funge da meccanismo di difesa precoce e ad azione rapida contro i patogeni durante una risposta primaria.¹⁸¹

In alternativa, la risposta relativamente più lenta del GC si verifica quando i linfociti T e i linfociti B migrano insieme dal confine tra le zone dei linfociti T e B al follicolo dove formano il GC. I GC sono strutture transitorie composte in gran parte da cellule B proliferanti. I linfociti B subiscono un'ipermutazione somatica all'interno dei GC, per cui le regioni variabili dei geni Ig mutano, alterando il potenziale di legame dell'antigene. I linfociti B competono per le cellule T follicolari helper e le cellule dendritiche follicolari, che selezionano i linfociti B con la maggiore affinità per la sopravvivenza dell'antigene. Questo processo è noto collettivamente come maturazione dell'affinità ed è vitale per la formazione di una memoria immunitaria efficace.¹⁸² Il risultato finale della reazione nel GC è la produzione di LLPC (long-lived plasma cells – plasmacellule di lunga vita¹⁸³) ad alta affinità che producono anticorpi neutralizzanti necessari per eliminare il patogeno, insieme a cellule B di memoria che preservano il loro fenotipo di cellule B ma sono in grado di proliferare rapidamente e differenziarsi in plasmablasti ad alta affinità in seguito all'esposizione secondaria all'antigene.¹⁸⁴ Contrariamente ai plasmablasti di breve durata, le LLPC

¹⁸⁰ Dörner T, Radbruch A.

Antibodies and B cell memory in viral immunity. *Immunity*. 2007 Sep;27(3):384-92. doi: 10.1016/j.immuni.2007.09.002. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.09.002>

Hangartner L, Zinkernagel RM, Hengartner H.

Antiviral antibody responses: the two extremes of a wide spectrum. *Nat Rev Immunol*. 2006 Mar;6(3):231-43. doi: 10.1038/nri1783. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16498452/>

¹⁸¹ Hangartner L, Zinkernagel RM, Hengartner H.

Antiviral antibody responses: the two extremes of a wide spectrum. *Nat Rev Immunol*. 2006 Mar;6(3):231-43. doi: 10.1038/nri1783. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16498452/>

Ahmed R, Gray D.

Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science*. 1996 Apr 5;272(5258):54-60. doi: 10.1126/science.272.5258.54. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8600537/>

¹⁸² Calame KL, Lin KI, Tunyaplin C.

Regulatory mechanisms that determine the development and function of plasma cells. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:205-30. doi: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141138. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12524387/>

Nakagawa R, Calado DP.

Positive Selection in the Light Zone of Germinal Centers. *Front Immunol*. 2021 Mar 31;12:661678. doi: 10.3389/fimmu.2021.661678. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8044421/>

Good-Jacobson KL, Shlomchik MJ.

Plasticity and heterogeneity in the generation of memory B cells and long-lived plasma cells: the influence of germinal center interactions and dynamics. *J Immunol*. 2010 Sep 15;185(6):3117-25. doi: 10.4049/jimmunol.1001155. <https://www.jimmunol.org/content/185/6/3117.long>

¹⁸³ Lightman SM, Utley A, Lee KP.

Survival of Long-Lived Plasma Cells (LLPC): Piecing Together the Puzzle. *Front Immunol*. 2019;10:965. Published 2019 May 3. doi:10.3389/fimmu.2019.00965 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6510054/>

¹⁸⁴ Good-Jacobson KL.

Strength in diversity: Phenotypic, functional, and molecular heterogeneity within the memory B cell repertoire.

possono rimanere per lunghi periodi in più organi, inclusi midollo osseo, milza, linfonodi mediastinici e polmoni.
¹⁸⁵ Anche i linfociti B di memoria risiedono per lunghi periodi all'interno dell'ospite, in ricircolo e pronti a rispondere rapidamente all'infezione secondaria. Insieme, queste popolazioni formano la memoria immunitaria, fornendo protezione a lungo termine all'ospite.¹⁸⁶

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.01434/full>

Reazione del centro germinale (GC). I linfociti B naïve pattugliano l'area dei linfociti B per incontrare antigeni specifici e attivarsi attraverso il loro coinvolgimento del recettore dei linfociti B (BCR). Quindi, le cellule B innescate migrano al confine T-B e incontrano le cellule follicolari pre-helper T (pre-Tfh), che sono cellule T CD4+ che sono state precedentemente attivate (atto T CD4) da antigeni elaborati presentati da cellule dendritiche mature (DC) nell'area dei linfociti T. Questa interazione affine tra le cellule pre-Tfh e le cellule B innescate ha comportato il riconoscimento degli antigeni trasformati presentati dalle cellule B innescate alle cellule pre-Tfh. A seguito di questa interazione, entrambi i tipi cellulari sottoregolano EBI2 e CCR7 e aumentano l'espressione di BCL-6, un prerequisito per la migrazione cellulare all'interno dei follicoli, l'inizio della reazione GC e la maturazione delle cellule B e delle cellule pre-Tfh nei centroblasti e nell'helper follicolare T del centro germinale cellule (GC Tfh), rispettivamente. I centroblasti, che mostrano l'espressione della membrana CXCR4, si localizzano a stretto contatto con le cellule reticolari che esprimono CXCL12 nella zona oscura di GC, proliferano e subiscono ipermutazioni somatiche. Quest'ultimo processo si traduce nella generazione di centroцити che ospitano BCR con affinità variabile per l'antigene stimolante, localizzato nella zona chiara. Si verifica una fase di selezione guidata dalle cellule dendritiche follicolari (FDC), al fine di scegliere i centroцити con BCR ad alta affinità. I centroцити sono cellule non proliferative soggette a morte a meno che non vengano salvate dalla loro interazione con le cellule GC Tfh. Questa interazione comporta la presentazione da parte dei centroцити di Ag processato in CMH-II ai recettori delle cellule T (TCR) delle cellule GC Tfh. Inoltre, i centroцити interagiscono con le cellule GC Tfh attraverso molecole costimolatorie, come CD86/C28, PD-L1/PD-1, CD40/CD40L e ICOS-ligando (ICOS-L)/ICOS. Questa interazione si traduce nell'attivazione delle cellule B dei percorsi pro-sopravvivenza e spinge i centroцити a subire la ricombinazione del cambio di classe. Successivamente, le cellule B lasciano i follicoli e si differenziano in cellule di memoria B (mem B) circolanti o in plasmacellule a vita lunga che secernono anticorpi ad alta affinità (IgG, IgA o IgE). Anche le cellule GC Tfh escono e diventano cellule Tfh circolanti. Un meccanismo coinvolto nel controllo della risposta umorale è correlato all'azione inibitoria di cellule specializzate denominate cellule T regolatorie follicolari T (Tfr). Le cellule Tfr sono cellule T regolatorie funzionali localizzate nei follicoli e rappresentano uno dei meccanismi che controllano l'entità della risposta GC.

Immunol Rev. 2018 Jul;284(1):67-78. doi: 10.1111/imr.12663.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29944763/>

¹⁸⁵ Slifka MK, Antia R, Whitmire JK, Ahmed R.
Humoral immunity due to long-lived plasma cells.
Immunity. 1998 Mar;8(3):363-72. doi: 10.1016/s1074-7613(00)80541-5.
[https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80541-5](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80541-5)

Manz RA, Thiel A, Radbruch A.
Lifetime of plasma cells in the bone marrow.
Nature. 1997 Jul 10;388(6638):133-4. doi: 10.1038/40540.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9217150/>

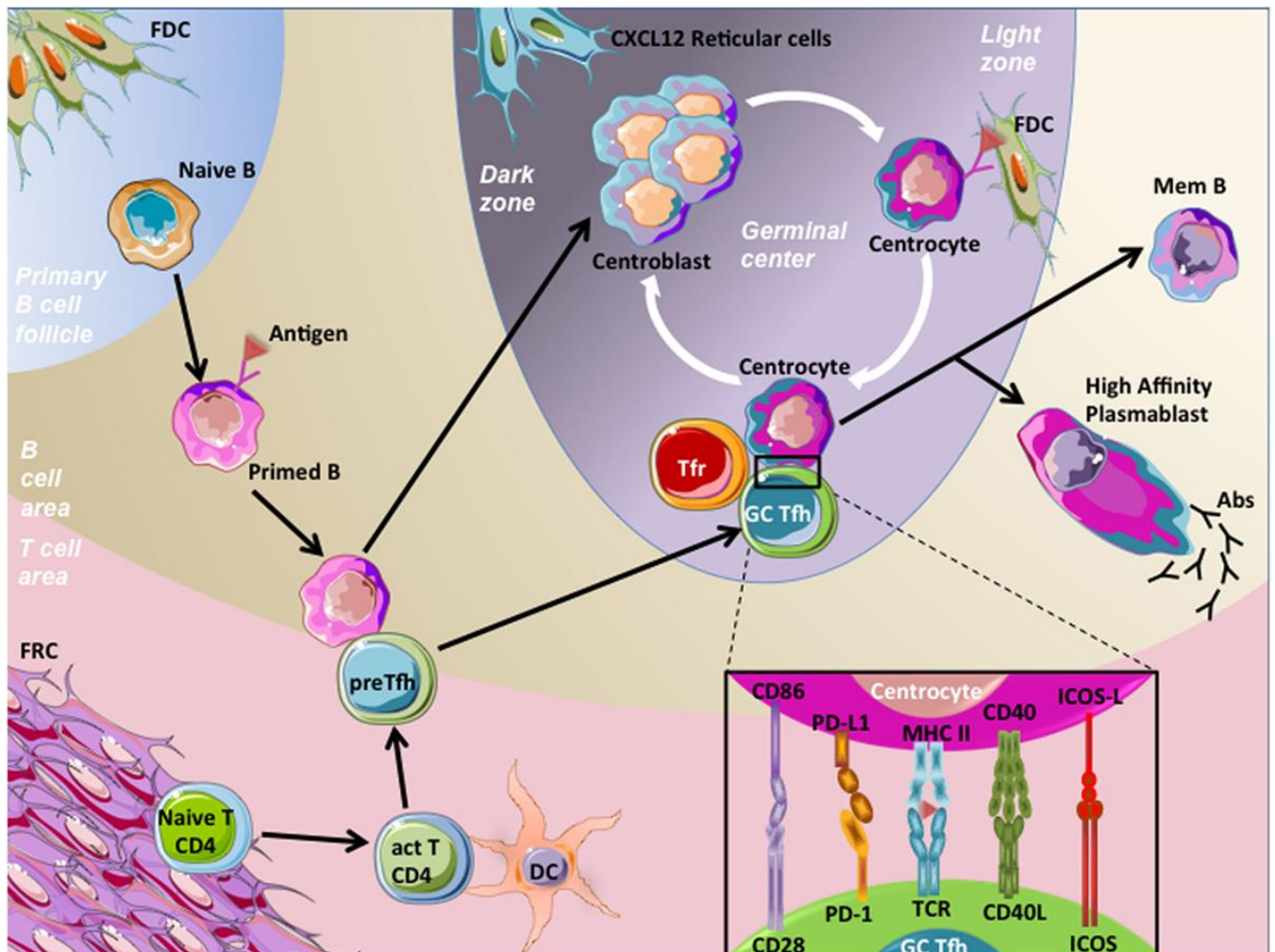
Cyster JG, Allen CDC.
B Cell Responses: Cell Interaction Dynamics and Decisions.
Cell. 2019 Apr 18;177(3):524-540. doi: 10.1016/j.cell.2019.03.016.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6538279/>

Ise W, Kurosaki T.
Plasma cell differentiation during the germinal center reaction.
Immunol Rev. 2019 Mar;288(1):64-74. doi: 10.1111/imr.12751.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30874351/>

Corcoran LM, Tarlinton DM.
Regulation of germinal center responses, memory B cells and plasma cell formation-an update.
Curr Opin Immunol. 2016 Apr;39:59-67. doi: 10.1016/j.coi.2015.12.008.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26799208/>

¹⁸⁶ Hammarlund E, Lewis MW, Hansen SG, Strelow LI, Nelson JA, Sexton GJ, Hanifin JM, Slifka MK.
Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination.
Nat Med. 2003 Sep;9(9):1131-7. doi: 10.1038/nm917.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12925846/>

Crotty S, Felgner P, Davies H, Glidewell J, Villarreal L, Ahmed R.
Cutting edge: long-term B cell memory in humans after smallpox vaccination.
J Immunol. 2003 Nov 15;171(10):4969-73. doi: 10.4049/jimmunol.171.10.4969.
<https://www.jimmunol.org/content/171/10/4969.long>



Le infezioni virali croniche, come l'HIV e l'HCV negli esseri umani o il virus della coriomeningite linfocitica (LCMV) nei topi, sono associate a scarse risposte di Ab neutralizzanti. A differenza dell'infezione virale acuta in cui la risposta immunitaria elimina l'infezione, l'infezione virale cronica o persistente ha una scala temporale allungata e il sistema immunitario non riesce a eliminare l'infezione.¹⁸⁷

Concentrandosi sulla risposta umorale, ci sono tre elementi principali per una risposta mediata da Ab di successo che vengono interrotti durante l'infezione cronica (Figura seguente):

- (1) la produzione di anticorpi che aiutano a eliminare l'agente patogeno,
- (2) la formazione di un GC e
- (3) la produzione di memoria immunitaria.

¹⁸⁷ Rodriguez S, Roussel M, Tarte K, Amé-Thomas P. Impact of Chronic Viral Infection on T-Cell Dependent Humoral Immune Response. *Front Immunol.* 2017;8:1434. doi:10.3389/fimmu.2017.01434 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5671495/>

Lam JH, Smith FL, Baumgarth N. B Cell Activation and Response Regulation During Viral Infections. *Viral Immunol.* 2020;33(4):294-306. doi:10.1089/vim.2019.0207 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7247032/>

L'obiettivo negli ultimi anni è stato capire perché c'è una risposta Ab debole e neutralizzante tardiva nell'infezione cronica. Contrariamente all'infezione virale acuta in cui una risposta Ab altamente antigene-specifica viene avviata rapidamente, la risposta post-infettiva indotta da cellule che secernono Ab è ampiamente polireattiva¹⁸⁸ e si ritiene che la presenza di un eccesso di antigene nell'infezione cronica potenzi la risposta Ab. In linea con ciò, l'elevato rapporto antigene-cellule B nell'infezione da LCMV si traduce in una maggiore produzione di plasmacellule IgM⁺ a vita breve differenziate in fase terminale, in una mancanza di LLPC che producono Ab neutralizzanti antigene-specifici e nella presenza di ipergammaglobulinemia,¹⁸⁹ cioè un aumento delle IgG nel siero.

Si ritiene che l'ipergammaglobulinemia si manifesti come risultato dell'attivazione non specifica dei linfociti B policlonali osservata nelle infezioni da HIV, HCV e LCMV, e può svolgere un ruolo nella debole risposta Ab neutralizzante in queste infezioni. Una conseguenza dell'ipergammaglobulinemia è la formazione di immunocomplessi di antigeni virali e anticorpi specifici del virus che possono depositarsi in vari tessuti durante l'infezione virale cronica.

Questi immunocomplessi sono un segno distintivo dell'infezione persistente da LCMV e hanno dimostrato di sopprimere la funzione effettrice degli Ab che a sua volta può portare a una clearance inadeguata del patogeno da parte dei fagociti.¹⁹⁰ Infine, la disregolazione della risposta dei linfociti B, può esacerbare l'incapacità di evolversi per combattere le mutazioni virali.

La glicosilazione della glicoproteina di superficie e la fuga mutazionale (varianti virali) dalla neutralizzazione sono caratteristiche strutturali dei virus persistenti che possono impedire la risposta neutralizzante dell'Ab.¹⁹¹

Sebbene sia molto più noto l'esaurimento e la disfunzione dei linfociti T durante l'infezione virale cronica, diversi studi recenti indicano che anche i linfociti B possono essere influenzati negativamente in questi contesti.¹⁹²

In particolare, GC persistenti sono stati osservati in modelli murini di infezione virale o parassitaria cronica. Non è ancora chiaro se questi GC siano utili o dannosi per la risposta: è probabilmente un buon equilibrio tra i due. Da un lato, GC persistenti possono portare alla produzione di Abs neutralizzanti efficaci. Dall'altro, può portare all'espansione delle cellule autoreattive o eventualmente portare a un linfoma, come quello osservato nei topi dopo l'infezione da *Plasmodium chabaudi*.¹⁹³

¹⁸⁸ Liao HX, et al

Initial antibodies binding to HIV-1 gp41 in acutely infected subjects are polyreactive and highly mutated. *J Exp Med*. 2011 Oct 24;208(11):2237-49. doi: 10.1084/jem.20110363. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3201211/>

¹⁸⁹ Hunziker L, Recher M, Macpherson AJ, Ciurea A, Freigang S, Hengartner H, Zinkernagel RM. Hypergammaglobulinemia and autoantibody induction mechanisms in viral infections. *Nat Immunol*. 2003 Apr;4(4):343-9. doi: 10.1038/ni911. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12627229/>

¹⁹⁰ Cooper L, Good-Jacobson KL. Dysregulation of humoral immunity in chronic infection. *Immunol Cell Biol*. 2020 Jul;98(6):456-466. doi: 10.1111/imcb.12338. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32275789/>

Casali P, Oldstone MB. Immune complexes in viral infection. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1983;104:7-48. doi: 10.1007/978-3-642-68949-9_2. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6307599/>

¹⁹¹ Ciurea A, Klenerman P, Hunziker L, Horvath E, Senn BM, Ochsenbein AF, Hengartner H, Zinkernagel RM. Viral persistence in vivo through selection of neutralizing antibody-escape variants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Mar 14;97(6):2749-54. doi: 10.1073/pnas.040558797. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC16001/>

¹⁹² Roe K. NK-Cell Exhaustion, B-Cell Exhaustion and T-Cell Exhaustion - the Differences and Similarities. *Immunology*. 2022 Mar 10. doi: 10.1111/imm.13464. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35266556/>

¹⁹³ Robbiani DF, et al

La risposta del GC dipende dai linfociti T CD4⁺, che si sono rivelati sia protettivi che patogeni durante l'infezione cronica. Pertanto, le modifiche alla capacità delle cellule T CD4⁺ di stimolare le cellule B influenzerebbero la formazione di GC e la capacità delle cellule di subire maturazione e selezione per affinità.

La sottoregolazione dell'espressione del complesso maggiore di istocompatibilità è un meccanismo usato frequentemente per proteggere le cellule infette dall'uccisione citotossica mediata dai linfociti T e ha dimostrato di essere un meccanismo nell'infezione cronica da LCMV, HIV, herpes simplex virus e virus di Epstein-Barr.¹⁹⁴

La ridotta espressione del maggior complesso di istocompatibilità II comporterebbe una riduzione delle interazioni tra le cellule T CD4⁺ e le cellule B, portando a cambiamenti nel destino e nella funzione delle cellule B.

Il ruolo del bias dei linfociti T CD4⁺, e in particolare la produzione di interferone (IFN) gamma (IFN di tipo II), è anche bilanciato tra risposte efficaci e orientamento verso un percorso inefficace di differenziazione delle cellule immunitarie.

Come discusso in precedenza, uno degli aspetti significativi della disregolazione dei linfociti B è il reclutamento di una risposta policlonale dei linfociti B, e un successivo aumento dell'ipergammaglobulinemia. Si è scoperto che ciò dipendeva dalle interazioni dei linfociti T CD4⁺: quando i linfociti T CD4⁺ diminuivano (ma soprattutto non del tutto assenti), l'ipergammaglobulinemia diminuiva e gli anticorpi neutralizzanti aumentavano.¹⁹⁵

Mentre questo lavoro si è concentrato sui linfociti T CD4⁺ totali, altre ricerche hanno dimostrato che la persistenza del virus sposta la risposta dei linfociti T CD4⁺ da un bias di tipo 1 del T helper verso la differenziazione dei linfociti follicolari T helper.¹⁹⁶ La formazione di una risposta a lungo termine dei linfociti T follicolari è stata correlata con la produzione di Abs neutralizzanti, almeno nell'infezione da LCMV nei topi.

I linfociti B della memoria classici sono caratterizzati dalla loro capacità di persistere a lungo termine, di rispondere rapidamente durante le risposte secondarie all'infezione.¹⁹⁷ Gli agenti patogeni che si risolvono in modo acuto,

Plasmodium Infection Promotes Genomic Instability and AID-Dependent B Cell Lymphoma.
Cell. 2015 Aug 13;162(4):727-37. doi: 10.1016/j.cell.2015.07.019.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4538708/>

¹⁹⁴ Moskophidis D, Lechner F, Hengartner H, Zinkernagel RM.
MHC class I and non-MHC-linked capacity for generating an anti-viral CTL response determines susceptibility to CTL exhaustion and establishment of virus persistence in mice.
J Immunol. 1994 May 15;152(10):4976-83.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8176216/>

Schwartz O, Maréchal V, Le Gall S, Lemonnier F, Heard JM.
Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein.
Nat Med. 1996 Mar;2(3):338-42. doi: 10.1038/nm0396-338.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8612235/>

Lewandowski GA, Lo D, Bloom FE.
Interference with major histocompatibility complex class II-restricted antigen presentation in the brain by herpes simplex virus type 1: a possible mechanism of evasion of the immune response.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Mar 1;90(5):2005-9. doi: 10.1073/pnas.90.5.2005.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC46009/>

Spriggs MK, Armitage RJ, Comeau MR, Strockbine L, Farrar T, Macduff B, Ulrich D, Alderson MR, Müllberg J, Cohen JI.
The extracellular domain of the Epstein-Barr virus BZLF2 protein binds the HLA-DR beta chain and inhibits antigen presentation.
J Virol. 1996 Aug;70(8):5557-63. doi: 10.1128/JVI.70.8.5557-5563.1996.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC190515/>

¹⁹⁵ Recher M et al
Deliberate removal of T cell help improves virus-neutralizing antibody production.
Nat Immunol. 2004 Sep;5(9):934-42. doi: 10.1038/ni1102.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15300247/>

¹⁹⁶ Fahey LM, Wilson EB, Elsaesser H, Fistonich CD, McGavern DB, Brooks DG.
Viral persistence redirects CD4 T cell differentiation toward T follicular helper cells.
J Exp Med. 2011 May 9;208(5):987-99. doi: 10.1084/jem.20101773.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3092345/>

¹⁹⁷ Ochsenbein AF, Pinschewer DD, Siervo S, Horvath E, Hengartner H, Zinkernagel RM.

come l'influenza, producono cellule B di memoria che vengono prodotte nelle prime settimane di una risposta primaria, escono dal ciclo cellulare e sono rilevabili nei tessuti per lunghi periodi (come l'infezione polmonare post-influenzale).¹⁹⁸

Definire un fenotipo distinto di queste cellule che comprenda la popolazione totale di cellule B della memoria nel topo e/o nell'uomo è stato difficile. Tuttavia, nell'uomo è generalmente caratterizzato dall'espressione di CD27 e CD21.¹⁹⁹ La stragrande maggioranza dei linfociti B di memoria circolanti negli esseri umani sani si adatta a questo fenotipo, ma una popolazione di cellule che sottoregola entrambi questi marcatori, denominate cellule B di memoria atipiche, insorgono in modo anomalo in infezioni croniche tra cui HIV,²⁰⁰ malaria²⁰¹, HCV²⁰² e infezione da citomegalovirus.²⁰³

La presenza di cellule B venute in contatto con l'antigene con fenotipo e capacità funzionale alterati ha portato all'ipotesi che queste cellule fossero il risultato, e forse anche l'agente, di una disfunzione all'interno del sistema immunitario umorale durante le infezioni croniche.

Protective long-term antibody memory by antigen-driven and T help-dependent differentiation of long-lived memory B cells to short-lived plasma cells independent of secondary lymphoid organs.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Nov 21;97(24):13263-8. doi: 10.1073/pnas.230417497.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC27213/>

¹⁹⁸ Weisel FJ, Zuccarino-Catania GV, Chikina M, Shlomchik MJ.

A Temporal Switch in the Germinal Center Determines Differential Output of Memory B and Plasma Cells.

Immunity. 2016 Jan 19;44(1):116-130. doi: 10.1016/j.immuni.2015.12.004.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4724390/>

Onodera T, Takahashi Y, Yokoi Y, Ato M, Kodama Y, Hachimura S, Kurosaki T, Kobayashi K.

Memory B cells in the lung participate in protective humoral immune responses to pulmonary influenza virus reinfection.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Feb 14;109(7):2485-90. doi: 10.1073/pnas.1115369109.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3289300/>

¹⁹⁹ Thorarindottir K, Camponeschi A, Cavallini N, Grimsholm O, Jacobsson L, Gjertsson I, Mårtensson IL.

CD21(-/low) B cells in human blood are memory cells. Clin Exp Immunol. 2016 Aug;185(2):252-62. doi: 10.1111/cei.12795.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4955005/>

Das A, Xu H, Wang X, Yau CL, Veazey RS, Pahar B.

Double-positive CD21+CD27+ B cells are highly proliferating memory cells and their distribution differs in mucosal and peripheral tissues.

PLoS One. 2011 Jan 27;6(1):e16524. doi: 10.1371/journal.pone.0016524.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3029363/>

Cancro MP, Tomayko MM.

Memory B cells and plasma cells: The differentiative continuum of humoral immunity.

Immunol Rev. 2021 Sep;303(1):72-82. doi: 10.1111/imr.13016

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34396546/>

²⁰⁰ Kardava L, et al

Abnormal B cell memory subsets dominate HIV-specific responses in infected individuals.

J Clin Invest. 2014 Jul;124(7):3252-62. doi: 10.1172/JCI74351.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4071400/>

²⁰¹ Portugal S, et al

Malaria-associated atypical memory B cells exhibit markedly reduced B cell receptor signaling and effector function.

Elife. 2015 May 8;4:e07218. doi: 10.7554/eLife.07218.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4444601/>

²⁰² Doi H, Tanoue S, Kaplan DE.

Peripheral CD27-CD21- B-cells represent an exhausted lymphocyte population in hepatitis C cirrhosis.

Clin Immunol. 2014 Feb;150(2):184-91. doi: 10.1016/j.clim.2013.12.001.

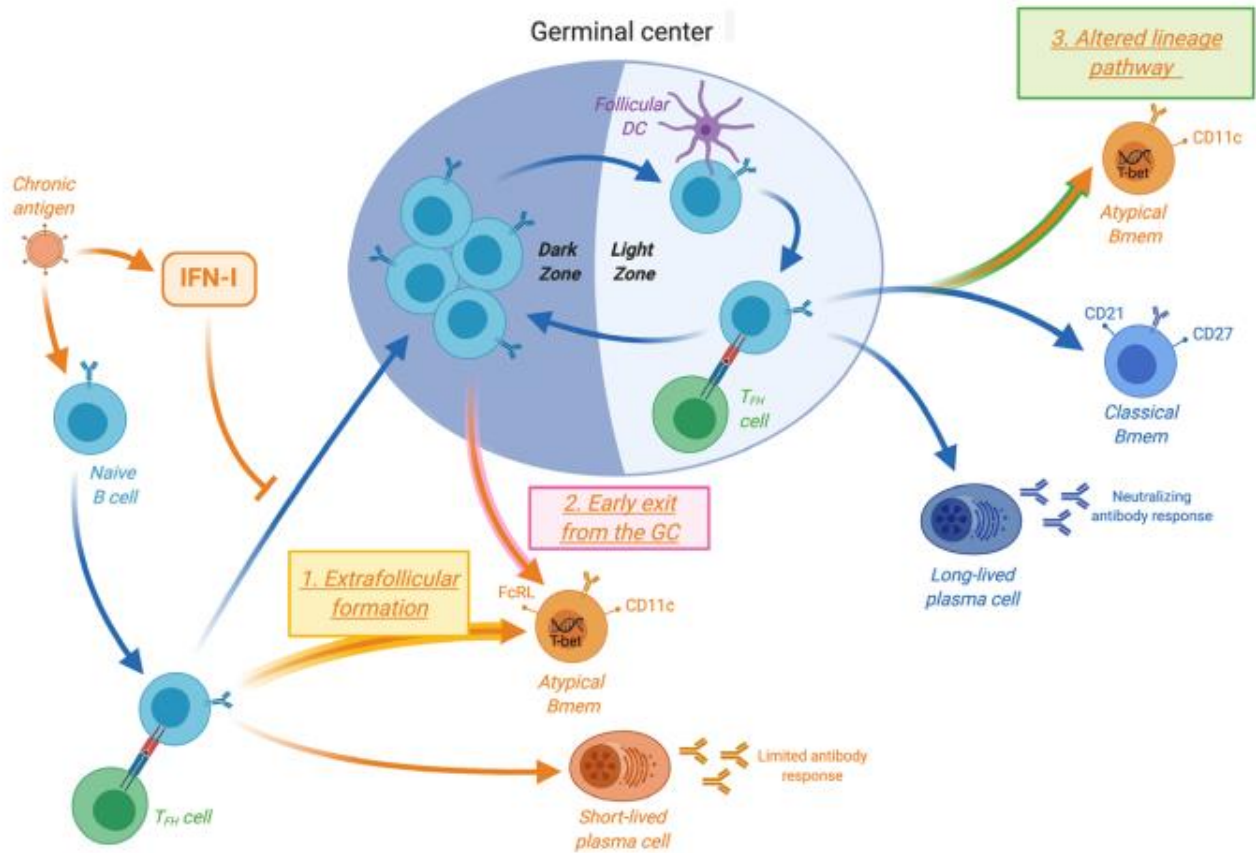
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4580910/>

²⁰³ Dauby N, Kummert C, Lecomte S, Liesnard C, Delforge ML, Donner C, Marchant A.

Primary human cytomegalovirus infection induces the expansion of virus-specific activated and atypical memory B cells.

J Infect Dis. 2014 Oct 15;210(8):1275-85. doi: 10.1093/infdis/jiu255.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24795470/>



<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32275789/>

Disregolazione della risposta dei linfociti B durante l'infezione virale cronica. Durante l'infezione virale cronica, la risposta immunitaria umorale si sposta verso la produzione di cellule che secernono anticorpi di breve durata e l'espansione delle cellule B della memoria atipica. La segnalazione dell'interferone di tipo I indotto dall'antigene (IFN-I) allontana la risposta dalla produzione di anticorpi neutralizzanti e verso cellule che secernono anticorpi di breve durata. Sono state proposte molteplici vie attraverso le quali sorgono le cellule B della memoria atipica: (1) attraverso una via di differenziazione extrafollicolare; (2) tramite uscita prematura dalla reazione del centro germinativo; (3) attraverso un percorso di lignaggio alterato rispetto ai classici linfociti B di memoria. Bmem, cellule B di memoria; DC, cellula dendritica; GC, centro germinativo; T_H, cellule T helper follicolari.

Meccanismi che regolano l'immunità durante le infezioni croniche

Diversi meccanismi regolano le risposte immunitarie durante l'infezione virale cronica (Figura 6). Questi includono recettori inibitori sui linfociti T, APC alterati, citochine immunoregolatrici e linfociti T regolatori (Treg).

Questi meccanismi possono lavorare di concerto per limitare l'immunopatologia. Tuttavia, questo smorzamento della funzione dei linfociti T può anche impedire al sistema immunitario di eliminare l'infezione.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.036>

Quattro classi distinte di eventi potrebbero limitare le risposte delle cellule T ai virus persistenti. In primo luogo, l'espressione intrinseca delle cellule T di recettori inibitori come PD-1, CTLA-4, LAG-3 e altri può regolare negativamente la funzione delle cellule T e limitare l'efficacia dell'attività antivirale. In secondo luogo, le citochine immunoregolatrici come IL-10, TGF- β e possibilmente fattori aggiuntivi prodotti da altre cellule nell'ambiente possono modulare e sopprimere vigorose risposte antivirali delle cellule T. In terzo luogo, le cellule regolatrici possono modulare le cellule T effettrici antivirali. Queste cellule regolatorie potrebbero includere cellule T regolatorie (Tregs) tradizionali FoxP3+ naturali o adattive CD4+, cellule T regolatorie CD8 o cellule soppressori mieloidi. Infine, i cambiamenti nell'uso o nella funzione delle cellule presentanti l'antigene (APC) potrebbero avere un impatto sulle cellule T CD8 specifiche del virus. La qualità della stimolazione delle cellule T può anche essere influenzata dai cambiamenti nella funzione o nel numero delle cellule dendritiche, nonché dalle differenze nella presentazione dell'antigene da parte dell'APC professionale rispetto a quello non professionale durante l'infezione virale persistente.

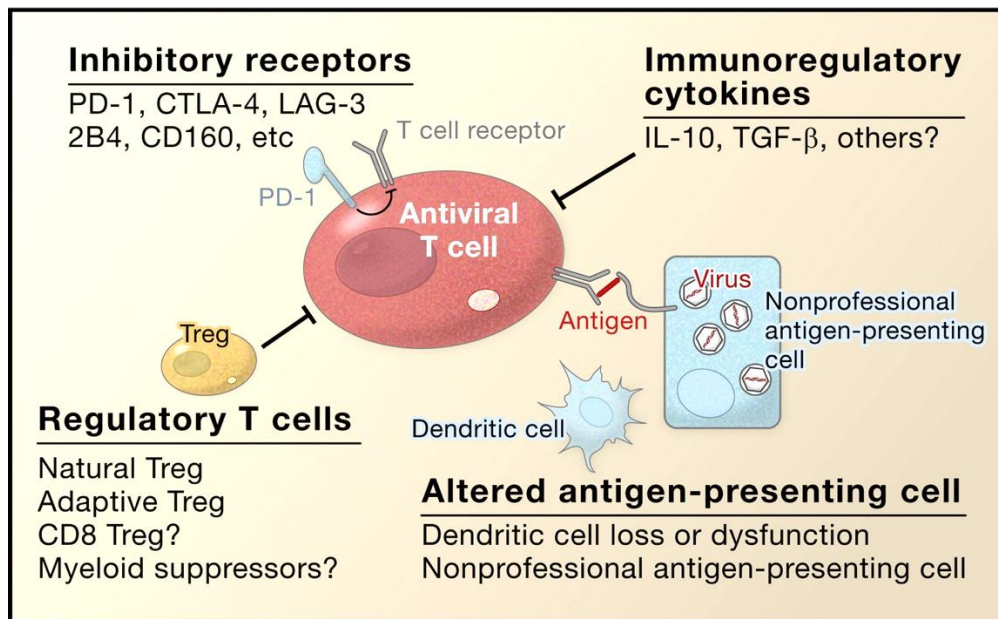


Fig. 6

Recettori inibitori sui linfociti T

La sovraregolazione dei recettori inibitori da parte delle cellule T CD8 esaurite è un importante meccanismo di disfunzione delle cellule T durante le infezioni virali croniche.²⁰⁴ Il recettore inibitorio PD-1, una molecola co-stimolatoria/co-inibitoria della famiglia CD28, regola l'esaurimento dei linfociti T CD8 durante l'infezione cronica da LCMV nei topi. PD-1 è altamente sovraespresso dai linfociti T CD8 esauriti specifici del virus rispetto ai linfociti T CD8 della memoria funzionale. In particolare, il blocco della via del ligando PD-1:PD-1 (PD-L) durante l'infezione cronica da LCMV porta al recupero della funzione delle cellule T e alla riduzione della carica virale.²⁰⁵

Questa è un'osservazione di fondamentale importanza che mostra che alcuni cambiamenti nei linfociti T CD8 durante l'infezione cronica sono reversibili. Questi risultati sono stati estesi all'uomo in cui il percorso PD-1:PD-L regola le cellule T specifiche di HIV, HBV, HCV e SARS-Cov-2 in vitro.²⁰⁶

²⁰⁴ Utzschneider DT, Gabriel SS, Chisanga D, Gloury R, Gubser PM, Vasanthakumar A, Shi W, Kallies A. Early precursor T cells establish and propagate T cell exhaustion in chronic infection. *Nat Immunol.* 2020 Oct;21(10):1256-1266. doi: 10.1038/s41590-020-0760-z. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32839610/>

²⁰⁵ Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, Freeman GJ, Ahmed R. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature.* 2006 Feb 9;439(7077):682-7. doi: 10.1038/nature04444. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16382236/>

Wherry EJ, Ha SJ, Kaech SM, Haining WN, Sarkar S, Kalia V, Subramaniam S, Blattman JN, Barber DL, Ahmed R. Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity.* 2007 Oct;27(4):670-84. doi: 10.1016/j.immuni.2007.09.006. Epub 2007 Oct 18. Erratum in: *Immunity.* 2007 Nov;27(5):824. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.09.006>

Klein S, Ghersi D, Manns MP, Prinz I, Cornberg M, Kraft ARM. PD-L1 Checkpoint Inhibition Narrows the Antigen-Specific T Cell Receptor Repertoire in Chronic Lymphocytic Choriomeningitis Virus Infection. *J Virol.* 2020 Aug 31;94(18):e00795-20. doi: 10.1128/JVI.00795-20. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7459548/>

²⁰⁶ Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R, Freeman GJ. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol.* 2007 Mar;8(3):239-45. doi: 10.1038/ni1443. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17304234/>

Jin HT, Ahmed R, Okazaki T.

Una domanda chiave è se il blocco PD-1:PD-L riprogramma l'intera popolazione di cellule T o solo un sottoinsieme di cellule T disfunzionali. Studi specifici suggeriscono che solo un sottoinsieme di cellule T CD8 esaurite risponde efficacemente al blocco PD-1: PD-L in vivo. Sorprendentemente, il sottoinsieme reattivo esprime livelli intermedi di PD-1 (PD-1Int), mentre il sottoinsieme che non può essere salvato esprime i livelli più alti di PD-1 (PD-1Hi).²⁰⁷

Anergia dei linfociti T contro esaurimento

La disfunzione dei linfociti T che si verifica durante le infezioni virali croniche è distinta dallo stato di anergia dei linfociti T (Figura 7). Una differenza fondamentale tra l'anergia e l'esaurimento è il diverso meccanismo di induzione di questi tipi di disfunzione dei linfociti T.

L'anergia è indotta quando le cellule T non ricevono tutti i segnali necessari per l'attivazione delle cellule T (ad esempio, le cellule ricevono la stimolazione del TCR ma non la co-stimolazione) e quindi non riescono a svilupparsi in cellule effettrici funzionali.

Al contrario, l'esaurimento delle cellule T durante l'infezione virale cronica è associato a una differenziazione dell'effettore inizialmente normale seguita da una progressiva perdita di funzione nel tempo. La caratteristica molecolare dell'esaurimento dei linfociti T rivela cambiamenti pervasivi nella trascrizione rispetto ai linfociti T funzionali,²⁰⁸ inclusa la sovraespressione dei recettori inibitori, l'espressione alterata dei fattori di trascrizione, i cambiamenti nella trasduzione del segnale e la sottoregolazione dei geni metabolici chiave (Table 2).

Role of PD-1 in regulating T-cell immunity.

Curr Top Microbiol Immunol. 2011;350:17-37. doi: 10.1007/82_2010_116.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21061197/>

Schönrich G, Raftery MJ.

The PD-1/PD-L1 Axis and Virus Infections: A Delicate Balance.
Front Cell Infect Microbiol. 2019 Jun 13;9:207. doi: 10.3389/fcimb.2019.00207.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6584848/>

Aghbash PS, Eslami N, Shamekh A, Entezari-Maleki T, Baghi HB.
SARS-CoV-2 infection: The role of PD-1/PD-L1 and CTLA-4 axis.
Life Sci. 2021 Apr 1;270:119124. doi: 10.1016/j.lfs.2021.119124
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7838580/>

Chang YM, Wieland A, Li ZR, et al. T

Cell Receptor Diversity and Lineage Relationship between Virus-Specific CD8 T Cell Subsets during Chronic Lymphocytic Choriomeningitis Virus Infection.
J Virol. 2020;94(20):e00935-20. Published 2020 Sep 29. doi:10.1128/JVI.00935-20
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7527051/>

²⁰⁷ Blackburn SD, Crawford A, Shin H, Polley A, Freeman GJ, Wherry EJ.

Tissue-specific differences in PD-1 and PD-L1 expression during chronic viral infection: implications for CD8 T-cell exhaustion.
J Virol. 2010 Feb;84(4):2078-89. doi: 10.1128/JVI.01579-09.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2812396/>

Blackburn SD, Shin H, Freeman GJ, Wherry EJ.

Selective expansion of a subset of exhausted CD8 T cells by alphaPD-L1 blockade.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Sep 30;105(39):15016-21. doi: 10.1073/pnas.0801497105.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2567485/>

²⁰⁸ Philip M, Schietinger A.

Heterogeneity and fate choice: T cell exhaustion in cancer and chronic infections.
Curr Opin Immunol. 2019;58:98-103. doi:10.1016/j.coi.2019.04.014
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC608527/>

Wherry EJ, Ha SJ, Kaech SM, Haining WN, Sarkar S, Kalia V, Subramaniam S, Blattman JN, Barber DL, Ahmed R.

Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection.
Immunity. 2007 Oct;27(4):670-84. doi: 10.1016/j.immuni.2007.09.006. Epub 2007 Oct 18. Erratum in: Immunity. 2007 Nov;27(5):824.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.09.006>

Schwartz RH.

T cell anergy.
Annu Rev Immunol. 2003;21:305-34. doi: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141110.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12471050/>

Questi cambiamenti trascrizionali non sono gli stessi osservati nei linfociti T anergici, confermando che l'esaurimento e l'anergia dei linfociti T sono effettivamente processi distinti. Mentre l'esaurimento è il principale tipo di disfunzione dei linfociti T durante l'infezione virale cronica, l'anergia può svolgere un ruolo quando i virus utilizzano strategie genetiche che inibiscono direttamente le vie di co-stimolazione nell'APC.

Va tenuto presente che l'anergia è stata ampiamente, anche se non perfettamente, divisa in due categorie.

La prima categoria è indicata come *anergia clonale*, in cui le cellule non proliferano ma sono comunque in grado di produrre citochine effettrici, in una certa misura, a seguito della successiva stimolazione del TCR. L'antigene non è necessario per mantenere questo stato disfunzionale sebbene l'anergia clonale possa essere reversibile con l'aggiunta di IL-2.

La *tolleranza adattativa* invece è caratterizzata dalla soppressione sia della proliferazione cellulare che della produzione di citochine. La tolleranza adattativa non è invertita dall'aggiunta di IL-2 e sembra essere necessaria un'esposizione continuativa all'antigene per il mantenimento di questo fenotipo.

Sebbene questi due stati anergici siano stati caratterizzati abbastanza bene, la nomenclatura non è universalmente applicata. Pertanto, molti studi utilizzano ampiamente la parola anergia per descrivere qualsiasi disfunzione osservata nei linfociti T caratterizzata da mancanza di proliferazione, produzione di citochine o persino una diminuzione della fosforilazione degli intermedi del segnale TCR a seguito di successiva stimolazione in condizioni che tipicamente attiverebbero un linfocita T naïve.²⁰⁹

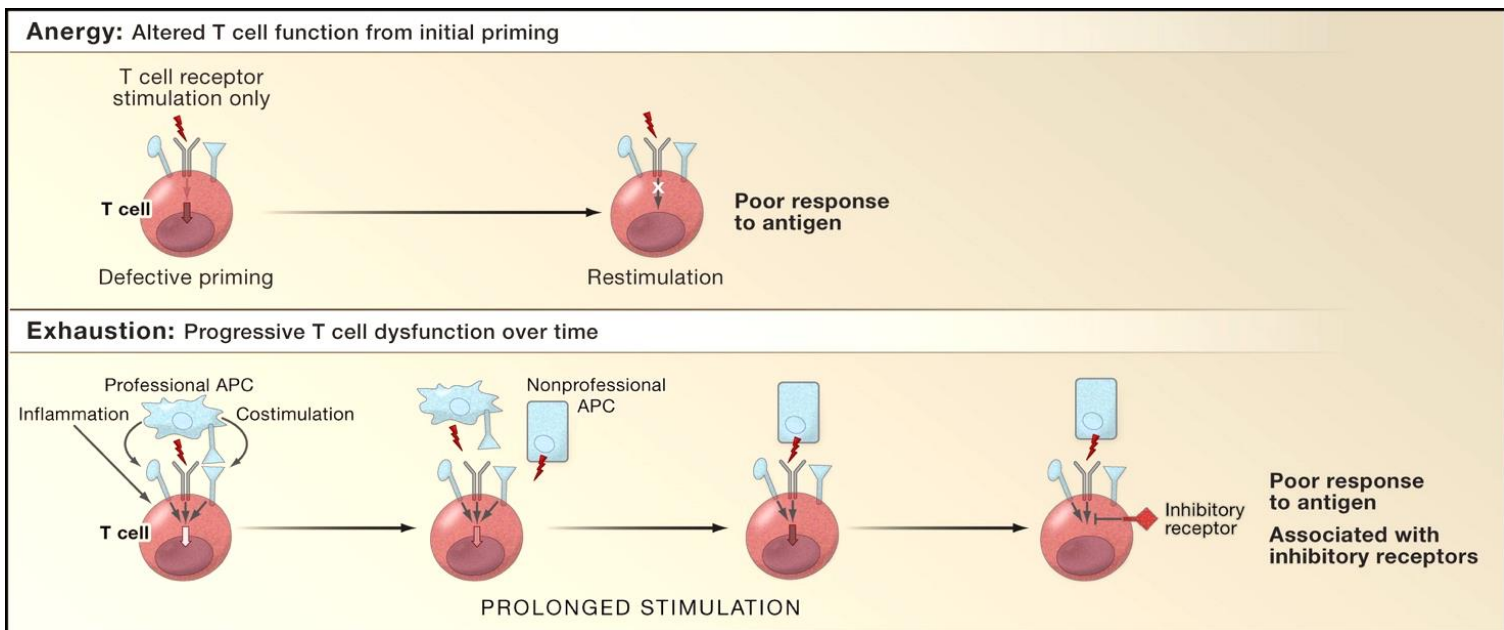


Fig. 7

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.036>

L'anergia è un tipo di disfunzione delle cellule T in cui le cellule T vengono inizialmente innescate in modo improprio segnalando (fulmine rosso) attraverso il recettore delle cellule T (TCR) in assenza di segnali costimolatori o infiammatori. Tali cellule T energizzate non riescono a sviluppare una funzione adeguata fin dall'inizio e sono refrattarie alla successiva stimolazione del TCR. Al contrario, le cellule T esauste sono innescate dall'antigene (fulmine rosso), dalla costimolazione e dall'infiammazione. Queste cellule T inizialmente sviluppano funzioni effettrici, ma una stimolazione prolungata (e forse eccessiva) porta a una progressiva perdita di funzione nel tempo. Alla fine mostrano una scarsa reattività all'antigene. In accordo con queste distinte modalità di induzione dell'anergia dei linfociti T rispetto all'esaurimento, ci sono anche differenze molecolari chiave tra i linfociti T che esibiscono questi due distinti tipi di disfunzione.

²⁰⁹ This S, Valbon SF, Lebel MÈ, Melichar HJ.

Strength and Numbers: The Role of Affinity and Avidity in the 'Quality' of T Cell Tolerance. Cells. 2021;10(6):1530. Published 2021 Jun 17. doi:10.3390/cells10061530 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8234061/>

Table 2. Cell-Intrinsic Mechanisms of T Cell Exhaustion during Chronic Viral Infection

Type of Defect	Examples	Potential Consequence
Overexpressed inhibitory receptors	Overexpression of PD-1, LAG-3	e.g., Inhibition of T cell responses, reduced TCR signaling, limited effector functions and proliferation
Signaling	Altered expression of LCK, NFATc, IL-7R	e.g., altered TCR and cytokine receptor signal transduction
Altered chemotaxis, homing, and adhesion	Increased expression of CCR5, CCL5, CCL3, decreased expression of several integrins	e.g., enhanced inflammatory cell recruitment, altered adhesion
Changes in transcription factor expression	PBX3, Blimp-1, Eomes	e.g., altered differentiation state
Metabolic deficiencies	Reduced expression of mRNAs encoding ribosomal subunits, citric acid cycle enzymes	e.g., reduced energy metabolism, defects in protein translation

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.036>

Diversi tipi di cambiamenti intrinseci alle cellule si verificano nei linfociti durante l'esaurimento. Questi sono elencati qui con esempi specifici dei difetti e delle loro potenziali conseguenze. PD-1, morte programmata 1; LAG-3, gene 3 di attivazione dei linfociti; LCK, proteina tirosina chinasi leucocitaria; NFATc, fattore nucleare della cellula T attivata c; CCR, recettore delle chemochine (motivo CC); CCL, ligando di chemochine (motivo CC); PBX3, leucemia a cellule pre-B homeobox 3; Blimp-1, proteina di maturazione indotta dai linfociti B 1; Eomes, Eomesodermin.

APPROFONDIMENTO

[Regolazione della risposta immunitaria](#)
[Tolleranza Immunologica](#)
[Tolleranza Immunologica ed Autoimmunità](#)

Cellule T regolatorie

Vi sono prove emergenti per un ruolo delle cellule T regolatorie (Tregs)²¹⁰ nell'equilibrio stabilito durante l'infezione virale cronica. Le Treg possono facilitare un'immunità efficace durante le prime fasi dell'infezione acuta modulando il reclutamento delle cellule T effettrici nei siti infetti²¹¹, tuttavia le Treg sono più spesso associate a

²¹⁰ Belkaid Y, Rouse BT.

Natural regulatory T cells in infectious disease.
 Nat Immunol. 2005 Apr;6(4):353-60. doi: 10.1038/ni1181.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15785761/>

Levin MJ, Weinberg A.

Regulatory T Cells in Infections: Getting It Just Right.
 J Infect Dis. 2016 Jul 1;214(1):4-5. doi: 10.1093/infdis/jiw092.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27117510/>

Karkhah A, Javanian M, Ebrahimpour S.

The role of regulatory T cells in immunopathogenesis and immunotherapy of viral infections.
 Infect Genet Evol. 2018 Apr;59:32-37. doi: 10.1016/j.meegid.2018.01.015.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29413883/>

Veiga-Parga T, Sehrawat S, Rouse BT.

Role of regulatory T cells during virus infection.
 Immunol Rev. 2013 Sep;255(1):182-96. doi: 10.1111/imr.12085
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3748387/>

Qiu R, Zhou L, Ma Y, Zhou L, Liang T, Shi L, Long J, Yuan D.

Regulatory T Cell Plasticity and Stability and Autoimmune Diseases.
 Clin Rev Allergy Immunol. 2020 Feb;58(1):52-70. doi: 10.1007/s12016-018-8721-0.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30449014/>

²¹¹ Lund JM, Hsing L, Pham TT, Rudensky AY.

risposte immunitarie inefficaci durante le infezioni croniche, comprese quelle da virus della leucemia Friend ²¹², HIV ²¹³, HCV ²¹⁴ e HBV.²¹⁵ Queste cellule potrebbero agire attraverso il contatto cellula-cellula, l'inibizione della maturazione dell'APC, la produzione di citochine immunoregolatrici o l'inibizione diretta della funzione effettrice delle cellule T CD8.

Le cellule Treg che limitano il controllo virale efficace potrebbero portare a un'espressione prolungata dell'antigene e all'esaurimento secondario delle cellule T, indicando il potenziale di sinergia tra i meccanismi che inibiscono l'efficacia delle cellule T durante l'infezione virale cronica.

Coordination of early protective immunity to viral infection by regulatory T cells.

Science. 2008 May 30;320(5880):1220-4. doi: 10.1126/science.1155209.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC2519146/>

²¹² Zelinsky G, Kraft AR, Schimmer S, Arndt T, Dittmer U.

Kinetics of CD8+ effector T cell responses and induced CD4+ regulatory T cell responses during Friend retrovirus infection.

Eur J Immunol. 2006 Oct;36(10):2658-70. doi: 10.1002/eji.200636059.

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/eji.200636059>

Hasenkrug KJ, Chougnnet CA, Dittmer U.

Regulatory T cells in retroviral infections.

PLoS Pathog. 2018 Feb 15;14(2):e1006776. doi: 10.1371/journal.ppat.1006776.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5814043/>

²¹³ Kinter A, McNally J, Riggan L, Jackson R, Roby G, Fauci AS.

Suppression of HIV-specific T cell activity by lymph node CD25+ regulatory T cells from HIV-infected individuals.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Feb 27;104(9):3390-5. doi: 10.1073/pnas.0611423104.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC1805624/>

Nilsson J, Boasso A, Velilla PA, Zhang R, Vaccari M, Franchini G, Shearer GM, Andersson J, Chougnnet C.

HIV-1-driven regulatory T-cell accumulation in lymphoid tissues is associated with disease progression in HIV/AIDS.

Blood. 2006 Dec 1;108(12):3808-17. doi: 10.1182/blood-2006-05-021576.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC1895475/>

²¹⁴ Boettler T, Spangenberg HC, Neumann-Haefelin C, Panther E, Urbani S, Ferrari C, Blum HE, von Weizsäcker F, Thimme R.

T cells with a CD4+CD25+ regulatory phenotype suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8+ T cells during chronic hepatitis C virus infection.

J Virol. 2005 Jun;79(12):7860-7. doi: 10.1128/JVI.79.12.7860-7867.2005.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC1143651/>

Ebinuma H, Nakamoto N, Li Y, Price DA, Gostick E, Levine BL, Tobias J, Kwok WW, Chang KM.

Identification and in vitro expansion of functional antigen-specific CD25+ FoxP3+ regulatory T cells in hepatitis C virus infection.

J Virol. 2008 May;82(10):5043-53. doi: 10.1128/JVI.01548-07.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC2346728/>

MacDonald AJ, Duffy M, Brady MT, McKiernan S, Hall W, Hegarty J, Curry M, Mills KH.

CD4 T helper type 1 and regulatory T cells induced against the same epitopes on the core protein in hepatitis C virus-infected persons.

J Infect Dis. 2002 Mar 15;185(6):720-7. doi: 10.1086/339340.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11920289/>

Wu SF, Tseng CW, Ho YC, Chen YC, Ko PH, He YT, Tseng KC. Regulatory T Cell Function Modulated After Successful Direct-Acting Antiviral Treatment for

Chronic Hepatitis C Patients. Dig Dis Sci. 2020 May;65(5):1385-1395. doi: 10.1007/s10620-019-05850-w.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31559553/>

²¹⁵ Franzese O, Kennedy PT, Gehring AJ, Gotto J, Williams R, Maini MK, Bertolotti A.

Modulation of the CD8+ T-cell response by CD4+ CD25+ regulatory T cells in patients with hepatitis B virus infection.

J Virol. 2005 Mar;79(6):3322-8. doi: 10.1128/JVI.79.6.3322-3328.2005.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC1075696/>

Xu D, Fu J, Jin L, Zhang H, Zhou C, Zou Z, Zhao JM, Zhang B, Shi M, Ding X, Tang Z, Fu YX, Wang FS.

Circulating and liver resident CD4+CD25+ regulatory T cells actively influence the antiviral immune response and disease progression in patients with hepatitis B.

J Immunol. 2006 Jul 1;177(1):739-47. doi: 10.4049/jimmunol.177.1.739.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16785573/>

Trehanpati N, Vyas AK.

Immune Regulation by T Regulatory Cells in Hepatitis B Virus-Related Inflammation and Cancer.

Scand J Immunol. 2017 Mar;85(3):175-181. doi: 10.1111/sji.12524.

<https://doi.org/10.1111/sji.12524>

Citochine immunoregolatrici

Le citochine immunoregolatrici modulano le risposte immunitarie all'infezione virale e possono essere correlate con la funzione dei Treg.²¹⁶

Ad esempio, quando il percorso dell'IL-10 viene bloccato, le risposte delle cellule T CD8 specifiche del virus all'infezione cronica con LCMV risultano migliorate.²¹⁷

Oltre all'IL-10, altre citochine soppressive o regolatorie come il fattore di crescita β (TGF- β) possono influire sulle risposte immunitarie durante le infezioni persistenti.²¹⁸

IL-10 e TGF- β possono entrambi alterare le funzioni dell'APC e delle cellule effettrici immunitarie innate come i macrofagi.

Questi effetti potrebbero fornire un'impronta significativa dell'infezione virale cronica sul sistema immunitario in generale con conseguenze per le risposte agli autoantigeni o agli antigeni estranei (vedi figura sotto).²¹⁹

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6955595/>

Plasticità delle cellule Treg. Le cellule Treg hanno il potenziale per acquisire l'espressione del macchinario molecolare che consente loro di adattarsi a diversi ambienti, mettendo in ombra le cellule T effettrici e le cellule residenti nei tessuti. Questo potenziale è schematicamente illustrato dai diversi colori, ciascuno corrispondente a una distinta localizzazione cellulare. Le frecce indicano i percorsi noti di differenziazione funzionale delle Treg e dei tessuti e degli organi in cui possono localizzarsi.

**Le cellule Treg sono state inizialmente descritte come una popolazione di cellule T CD4⁺ CD25^{high} la cui deplezione è associata allo sviluppo di una grave autoimmunità multiorgano e sono state definite dall'espressione del fattore di trascrizione forkhead box P3 (FoxP3)*

²¹⁶ Smigiel KS, Srivastava S, Stolley JM, Campbell DJ.

Regulatory T-cell homeostasis: steady-state maintenance and modulation during inflammation.

Immunol Rev. 2014;259(1):40-59. doi:10.1111/imr.12170

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4083836/>

Li X, Zheng Y.

Regulatory T cell identity: formation and maintenance.

Trends Immunol. 2015;36(6):344-353. doi:10.1016/j.it.2015.04.006

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4458194/>

²¹⁷ Ejrnaes M, Filippi CM, Martinic MM, Ling EM, Togher LM, Crotty S, von Herrath MG.

Resolution of a chronic viral infection after interleukin-10 receptor blockade.

J Exp Med. 2006 Oct 30;203(11):2461-72. doi: 10.1084/jem.20061462.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC2118120/>

Brooks DG, Trifilo MJ, Edelmann KH, Teyton L, McGavern DB, Oldstone MB.

Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo.

Nat Med. 2006 Nov;12(11):1301-9. doi: 10.1038/nm1492.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC2535582/>

Maris CH, Chappell CP, Jacob J.

Interleukin-10 plays an early role in generating virus-specific T cell anergy.

BMC Immunol. 2007 Jun 14;8:8. doi: 10.1186/1471-2172-8-8.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1903364/>

²¹⁸ Alatrakchi N, Graham CS, van der Vliet HJ, Sherman KE, Exley MA, Koziel MJ.

Hepatitis C virus (HCV)-specific CD8⁺ cells produce transforming growth factor beta that can suppress HCV-specific T-cell responses.

J Virol. 2007 Jun;81(11):5882-92. doi: 10.1128/JVI.02202-06.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC1900307/>

²¹⁹ Ciurkiewicz M, Herder V, Beineke A.

Beneficial and Detrimental Effects of Regulatory T Cells in Neurotropic Virus Infections.

Int J Mol Sci. 2020 Mar 2;21(5):1705. doi: 10.3390/ijms21051705.

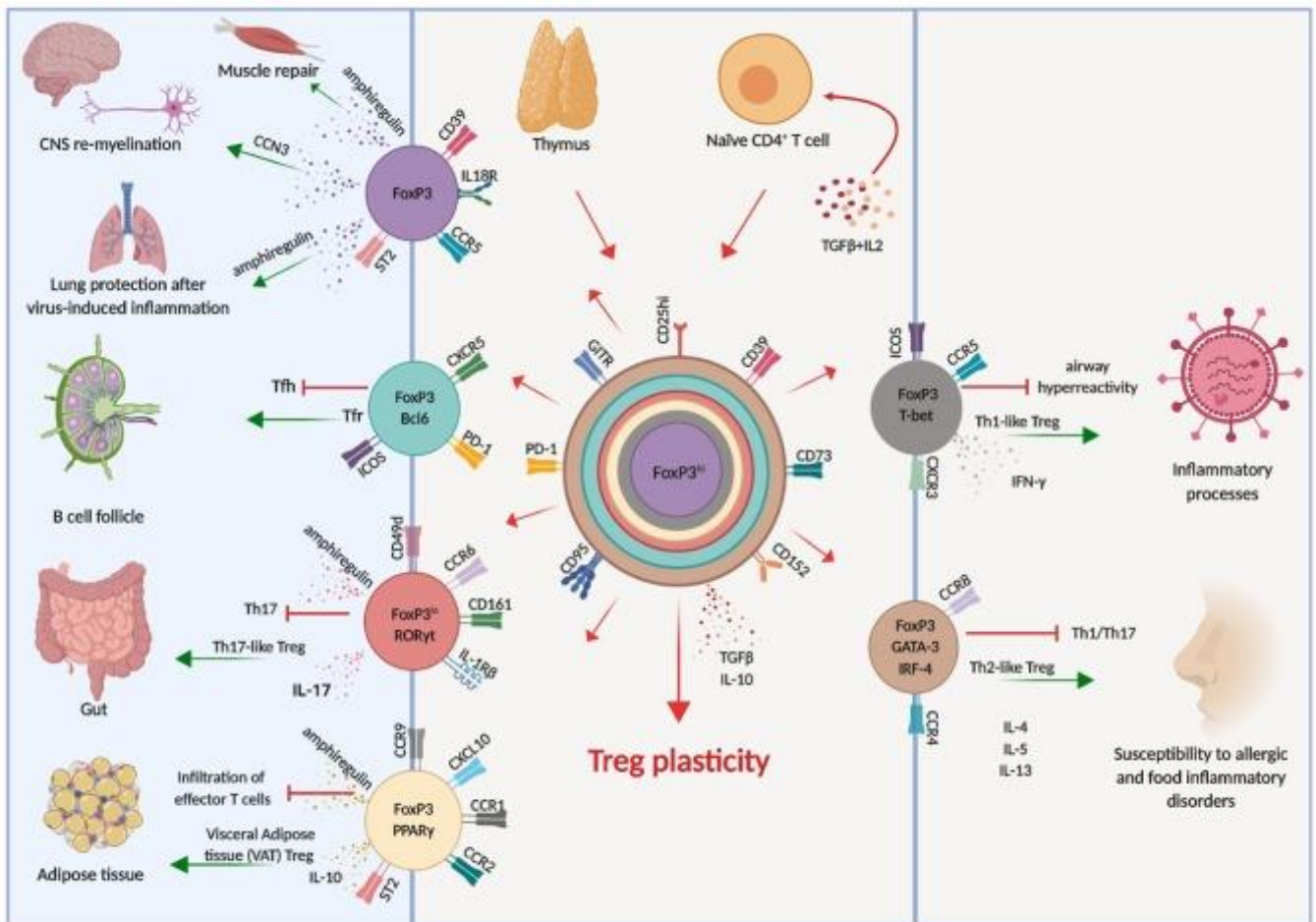
<https://www.mdpi.com/1422-0067/21/5/1705>

Sambucci M, Gargano F, Guerrera G, Battistini L, Borsellino G.

One, No One, and One Hundred Thousand: T Regulatory Cells' Multiple Identities in Neuroimmunity.

Front Immunol. 2019 Dec 20;10:2947. doi: 10.3389/fimmu.2019.02947.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6955595/>



Impronta immunologica dell'infezione virale cronica

Quali sono le conseguenze per l'ospite dell'equilibrio dinamico ma metastabile che si stabilisce tra viroma e ospite durante l'infezione cronica? Una conseguenza ovvia è lo sviluppo di malattie gravi durante l'infezione cronica progressiva da virus come HIV e HCV e lo sviluppo meno frequente di malattie gravi durante l'infezione cronica da EBV o HSV. Oltre a causare direttamente la malattia, ci sono ulteriori conseguenze fondamentali dell'infezione virale cronica? Come primo passo per affrontare questa domanda, devono essere considerati la natura e il livello di attività del sistema immunitario durante l'infezione virale cronica. Tutte le infezioni virali croniche sono sotto sorveglianza immunitaria continua. Virus come CMV, poliomavirus ed EBV causano più e diverse malattie nei pazienti immunodepressi rispetto agli individui con un sistema immunitario funzionante, indicando che l'immunità negli individui normali tiene sotto controllo questi virus (Tabella 1). Questo concetto è supportato da studi che dimostrano che l'infezione da herpesvirus è associata all'attivazione continua dei linfociti B e T sulle mucose dove si verifica la riattivazione²²⁰. Queste risposte sono presenti in assenza di malattia conclamata e quindi hanno un impatto sul sistema immunitario in ospiti apparentemente normali.

²²⁰ Zhu J, Koelle DM, Cao J, Vazquez J, Huang ML, Hladik F, Wald A, Corey L. Virus-specific CD8⁺ T cells accumulate near sensory nerve endings in genital skin during subclinical HSV-2 reactivation. J Exp Med. 2007 Mar 19;204(3):595-603. doi: 10.1084/jem.20061792. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC2137910/>

Hislop AD, et al. Tonsillar homing of Epstein-Barr virus-specific CD8⁺ T cells and the virus-host balance. J Clin Invest. 2005 Sep;115(9):2546-55. doi: 10.1172/JCI24810. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC1187932/>

La portata e l'impatto della sorveglianza immunitaria continua dell'infezione virale cronica non devono essere sottovalutati. La riattivazione dell'HSV-2 nel sistema genito-urinario è estremamente frequente anche nelle persone asintomatiche,²²¹ e quindi ci si può ragionevolmente aspettare che la risposta cronica dei linfociti T in questo tessuto ²²² abbia effetti significativi sull'immunità della mucosa in questo sito. Anche i virus asintomatici come gli anellovirus sono sotto continua sorveglianza immunitaria ²²³ (Tabella 1).

È stato stimato che oltre il 90% degli anellovirus nel siero viene sostituito quotidianamente con oltre un miliardo di nuovi virioni, suggerendo che un'espressione antigenica significativa può verificarsi per anni dopo l'acquisizione dell'infezione nei primi anni di vita.

Questo dinamismo del sistema immunitario potrebbe essere neutro per l'ospite, ma si ritiene che abbia un ruolo fondamentale, attraverso i cambiamenti nelle citochine tissutali e nei linfociti B e T, nella definizione del "normale" sistema immunitario umano. Questa "impronta immunologica" dell'infezione virale cronica può alterare fondamentalmente la risposta dell'ospite a nuove infezioni, vaccini o neo-epitopi che emergono durante la selezione immunitaria delle varianti virali.

Effetti del virus sull'immunità innata

Le risposte immunitarie in corso all'infezione virale cronica influenzano fortemente l'immunità innata attraverso l'azione delle citochine rilasciate durante la stimolazione cronica dei linfociti T e possibilmente dei linfociti NK.

Ciò può essere particolarmente importante per i virus ospitati nei tessuti linfoidi durante l'infezione cronica (Tabella 1) e per il SARS-Cov-2 ²²⁴ dove ci si potrebbe aspettare che gli effetti secondari [bystander effects] delle citochine abbiano un'importanza speciale. La stimolazione di cellule T CD4 o CD8 appena prelevate con peptidi di CMV induce una rapida secrezione di citochine IFN- γ , TNF- α e MIP1- β , indicando che le cellule innescate per

²²¹ Wald A, Zeh J, Selke S, Warren T, Ryncarz AJ, Ashley R, Krieger JN, Corey L.
Reactivation of genital herpes simplex virus type 2 infection in asymptomatic seropositive persons.
N Engl J Med. 2000 Mar 23;342(12):844-50. doi: 10.1056/NEJM200003233421203.
<https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM200003233421203>.

²²² Zhu J, Koelle DM, Cao J, Vazquez J, Huang ML, Hladik F, Wald A, Corey L.
Virus-specific CD8⁺ T cells accumulate near sensory nerve endings in genital skin during subclinical HSV-2 reactivation.
J Exp Med. 2007 Mar 19;204(3):595-603. doi: 10.1084/jem.20061792.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC2137910/>

²²³ Davidson I, Shulman LM.
Unraveling the puzzle of human anellovirus infections by comparison with avian infections with the chicken anemia virus.
Virus Res. 2008 Oct;137(1):1-15. doi: 10.1016/j.virusres.2008.06.014.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18656506/>

Ninomiya M, Takahashi M, Nishizawa T, Shimosegawa T, Okamoto H.
Development of PCR assays with nested primers specific for differential detection of three human anelloviruses and early acquisition of dual or triple infection during infancy.
J Clin Microbiol. 2008 Feb;46(2):507-14. doi: 10.1128/JCM.01703-07.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC2238095/>

Hino S, Miyata H.
Torque teno virus (TTV): current status.
Rev Med Virol. 2007 Jan-Feb;17(1):45-57. doi: 10.1002/rmv.524.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17146841/>

²²⁴ Lee S, Channappanavar R, Kanneganti TD.
Coronaviruses: Innate Immunity, Inflammasome Activation, Inflammatory Cell Death, and Cytokines.
Trends Immunol. 2020;41(12):1083-1099. doi:10.1016/j.it.2020.10.005
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7561287/>

Phetsouphanh C, Darley DR, Wilson DB, Howe A, Munier CML, Patel SK, Juno JA, Burrell LM, Kent SJ, Dore GJ, Kelleher AD, Matthews GV.
Immunological dysfunction persists for 8 months following initial mild-to-moderate SARS-CoV-2 infection.
Nat Immunol. 2022 Feb;23(2):210-216. doi: 10.1038/s41590-021-01113-x.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35027728/>

rispondere rapidamente all'antigene virale circolano continuamente nel corpo ²²⁵. Risultati simili sono stati riportati per le cellule T CD4 e CD8 specifiche per EBV.²²⁶ È importante sottolineare che le cellule T specifiche per EBV rappresentano fino al 20% delle cellule T CD8 totali nelle tonsille non infiammate dei portatori di EBV a lungo termine. Questo è un sito anatomico in cui si verifica una prolungata diffusione del virus che stimola queste cellule T.²²⁷ Dato l'alto livello di infezione cronica da herpesvirus nella popolazione (Tabella 1) e l'evidenza per la continua diffusione di herpesvirus nei siti della mucosa con l'espressione dell'antigene associato e l'attivazione dei linfociti T, è ragionevole concludere che la produzione da parte della mucosa di potenti citochine è frequente nella maggior parte dei casi umani normali.²²⁸ Ciò ha un'ovvia importanza potenziale per la regolazione della funzione di barriera della mucosa o, nel caso dell'HIV che si replica nei linfociti attivati, per il potenziamento dell'infezione.

Nuove prove negli animali indicano che l'infezione cronica da virus può alterare profondamente l'immunità innata ai patogeni non virali.²²⁹ L'espressione di IFN- γ durante la latenza dell'herpesvirus può proteggere in modo

²²⁵ Sester M, Sester U, Gärtner B, Kubuschok B, Girndt M, Meyerhans A, Köhler H.
Sustained high frequencies of specific CD4 T cells restricted to a single persistent virus.
J Virol. 2002 Apr;76(8):3748-55. doi: 10.1128/jvi.76.8.3748-3755.2002.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC136081/>

Casazza JP, Betts MR, Price DA, Precopio ML, Ruff LE, Brenchley JM, Hill BJ, Roederer M, Douek DC, Koup RA.
Acquisition of direct antiviral effector functions by CMV-specific CD4⁺ T lymphocytes with cellular maturation.
J Exp Med. 2006 Dec 25;203(13):2865-77. doi: 10.1084/jem.20052246.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC2118179/>

²²⁶ Forrest C, Hislop AD, Rickinson AB, Zuo J.
Proteome-wide analysis of CD8⁺ T cell responses to EBV reveals differences between primary and persistent infection.
PLoS Pathog. 2018;14(9):e1007110. Published 2018 Sep 24. doi:10.1371/journal.ppat.1007110
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6171963/>

Mautner J, Bornkamm GW.
The role of virus-specific CD4⁺ T cells in the control of Epstein-Barr virus infection.
Eur J Cell Biol. 2012 Jan;91(1):31-5. doi: 10.1016/j.ejcb.2011.01.007.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21458882/>

Ressing ME, Horst D, Griffin BD, Tellam J, Zuo J, Khanna R, Rowe M, Wiertz EJ.
Epstein-Barr virus evasion of CD8(+) and CD4(+) T cell immunity via concerted actions of multiple gene products.
Semin Cancer Biol. 2008 Dec;18(6):397-408. doi: 10.1016/j.semcancer.2008.10.008.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18977445/>

²²⁷ Hislop AD, et al
Tonsillar homing of Epstein-Barr virus-specific CD8⁺ T cells and the virus-host balance.
J Clin Invest. 2005 Sep;115(9):2546-55. doi: 10.1172/JCI24810.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC1187932/>

²²⁸ Ehlin-Henriksson B, Liang W, Cagigi A, Mowafi F, Klein G, Nilsson A.
Changes in chemokines and chemokine receptor expression on tonsillar B cells upon Epstein-Barr virus infection.
Immunology. 2009 Aug;127(4):549-57. doi: 10.1111/j.1365-2567.2008.03029.x.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2729532/>

²²⁹ Lian S, Liu J, Wu Y, Xia P, Zhu G.
Bacterial and Viral Co-Infection in the Intestine: Competition Scenario and Their Effect on Host Immunity.
Int J Mol Sci. 2022 Feb 19;23(4):2311. doi: 10.3390/ijms23042311.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8877981/>

Seelbinder B, et al
Triple RNA-Seq Reveals Synergy in a Human Virus-Fungus Co-infection Model.
Cell Rep. 2020 Nov 17;33(7):108389. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108389.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108389>

Frisan T, Nagy N, Chioureas D, Terol M, Grasso F, Masucci MG.
A bacterial genotoxin causes virus reactivation and genomic instability in Epstein-Barr virus infected epithelial cells pointing to a role of co-infection in viral oncogenesis.
Int J Cancer. 2019 Jan 1;144(1):98-109. doi: 10.1002/ijc.31652.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6587852/>

simbiotico l'ospite dall'infezione dei batteri *Listeria monocytogenes* e *Yersinia pestis*, l'agente eziologico della peste.²³⁰ Pertanto, la tolleranza sviluppata tra gli herpesvirus e i loro ospiti in decine di milioni di anni di coevoluzione può offrire vantaggi all'ospite.

Questa protezione può arrivare al costo di una maggiore autoimmunità.²³¹ Inoltre, la presenza prolungata degli acidi nucleici virali del virus Sendai nei topi è associata all'attivazione delle cellule NKT dipendenti da IL-13 che possono, a loro volta, contribuire alla malattia reattiva delle vie aeree.²³² Inoltre, la secrezione anormale di interferone da parte delle cellule dendritiche plasmacitoidi predispone ad un'infezione secondaria durante l'infezione cronica da LCMV.²³³

Rippee-Brooks MD, Marcinczyk RN, Lupfer CR.
What came first, the virus or the egg: Innate immunity during viral coinfections.
Immunol Rev. 2020 Sep;297(1):194-206. doi: 10.1111/imr.12911.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32761626/>

Desai P, Diamond MS, Thackray LB.
Helminth-virus interactions: determinants of coinfection outcomes.
Gut Microbes. 2021 Jan-Dec;13(1):1961202. doi: 10.1080/19490976.2021.1961202.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8405156/>

Shi Z, Gewirtz AT.
Together Forever: Bacterial-Viral Interactions in Infection and Immunity.
Viruses. 2018 Mar 10;10(3):122. doi: 10.3390/v10030122.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5869515/>

Wilks J, Beilinson H, Golovkina TV.
Dual role of commensal bacteria in viral infections.
Immunol Rev. 2013 Sep;255(1):222-9. doi: 10.1111/imr.12097.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3838194/>

²³⁰ Barton ES, White DW, Cathelyn JS, Brett-McClellan KA, Engle M, Diamond MS, Miller VL, Virgin HW 4th.
Herpesvirus latency confers symbiotic protection from bacterial infection.
Nature. 2007 May 17;447(7142):326-9. doi: 10.1038/nature05762.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17507983/>

²³¹ Peacock JW, ElSawa SF, Petty CC, Hickey WF, Bost KL.
Exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis in rodents infected with murine gammaherpesvirus-68.
Eur J Immunol. 2003 Jul;33(7):1849-58. doi: 10.1002/eji.200323148.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC7163599/>

Houen G, Trier NH.
Epstein-Barr Virus and Systemic Autoimmune Diseases.
Front Immunol. 2021 Jan 7;11:587380. doi: 10.3389/fimmu.2020.587380.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7817975/>

Zelazowska MA, McBride K, Krug LT.
Dangerous Liaisons: Gammaherpesvirus Subversion of the Immunoglobulin Repertoire.
Viruses. 2020;12(8):788. Published 2020 Jul 23. doi:10.3390/v12080788
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7472090/>

Steed AL, Stappenbeck TS.
Role of viruses and bacteria-virus interactions in autoimmunity.
Curr Opin Immunol. 2014 Dec;31:102-7. doi: 10.1016/j.coi.2014.10.006.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4254666/>

²³² Kim EY, et al
Persistent activation of an innate immune response translates respiratory viral infection into chronic lung disease.
Nat Med. 2008 Jun;14(6):633-40. doi: 10.1038/nm1770.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC2575848/>

²³³ Zuniga EI, Liou LY, Mack L, Mendoza M, Oldstone MB.
Persistent virus infection inhibits type I interferon production by plasmacytoid dendritic cells to facilitate opportunistic infections.
Cell Host Microbe. 2008 Oct 16;4(4):374-86. doi: 10.1016/j.chom.2008.08.016.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC2875928/>

Insieme, questi esempi forniscono un caso convincente per un'impronta immunologica significativa dell'infezione virale cronica sulla natura delle risposte immunitarie innate.

Poiché le risposte del nostro viroma imprimono il sistema immunitario, gli studi sui topi privi di infezioni croniche possono sacrificarne la rilevanza per la facilità di sperimentazione.

La maggior parte degli animali da esperimento non è cronicamente infetta da virus rilevanti, ma gli esseri umani sono portatori di molte infezioni virali croniche (Tabella 1, Figura 2). Pertanto, è possibile che le differenze tra le risposte immunitarie umane e murine riflettano l'impronta immunologica del nostro viroma piuttosto che le differenze intrinseche nell'immunità. Ciò ha implicazioni sul modo in cui i dati degli animali allevati in strutture di barriere prive di virus vengono utilizzati per definire i meccanismi di immunità e per convalidare gli approcci vaccinali da applicare negli ospiti con infezioni croniche multiple.

Gli studi sui meccanismi immunologici sono chiaramente più facili quando vengono rimossi gli effetti confondenti dell'infezione concomitante, ma il sistema immunitario non esiste nel vuoto. Gli studi su animali con infezione multipla il cui sistema immunitario è soggetto ad attivazione cronica e la conseguente impronta dell'infezione cronica dovrebbero essere confrontati con studi su animali da laboratorio standard.

Effetti del viroma sull'immunità adattativa

Esiste una significativa comunicazione tra infezioni virali croniche, nonché tra infezioni virali e altri tipi di infezione. Ad esempio, la co-infezione da HIV e HCV peggiora la prognosi di entrambe le infezioni.²³⁴ Il peggioramento HCV-dipendente della progressione della malattia da HIV, sebbene controverso²³⁵, è interessante perché l'HCV non causa immunosoppressione. L'impatto delle infezioni persistenti non è sempre negativo. Ad esempio, l'infezione da herpesvirus (HHV-6 o HHV-7) o GB virus C può inibire la progressione dell'HIV in alcuni contesti²³⁶.

²³⁴ De Luca A, et al Italian Cohort Naive Antiretrovirals Study Group.

Coinfection with hepatitis viruses and outcome of initial antiretroviral regimens in previously naive HIV-infected subjects.

Arch Intern Med. 2002 Oct 14;162(18):2125-32. doi: 10.1001/archinte.162.18.2125.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12374521/>

Greub G, et al

Clinical progression, survival, and immune recovery during antiretroviral therapy in patients with HIV-1 and hepatitis C virus coinfection: the Swiss HIV Cohort Study.

Lancet. 2000 Nov 25;356(9244):1800-5. doi: 10.1016/s0140-6736(00)03232-3. Erratum in: Lancet. 2001 May 12;357(9267):1536.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11117912/>

²³⁵ Sulkowski MS, Moore RD, Mehta SH, Chaisson RE, Thomas DL.

Hepatitis C and progression of HIV disease.

JAMA. 2002 Jul 10;288(2):199-206. doi: 10.1001/jama.288.2.199.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12095384/>

²³⁶ Grivel JC, Ito Y, Fagà G, Santoro F, Shaheen F, Malnati MS, Fitzgerald W, Lusso P, Margolis L.

Suppression of CCR5- but not CXCR4-tropic HIV-1 in lymphoid tissue by human herpesvirus 6.

Nat Med. 2001 Nov;7(11):1232-5. doi: 10.1038/nm1101-1232.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11689888/>

Lisco A, Grivel JC, Biancotto A, Vanpouille C, Origgi F, Malnati MS, Schols D, Lusso P, Margolis LB.

Viral interactions in human lymphoid tissue: Human herpesvirus 7 suppresses the replication of CCR5-tropic human immunodeficiency virus type 1 via CD4 modulation.

J Virol. 2007 Jan;81(2):708-17. doi: 10.1128/JVI.01367-06

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC1797468/>

Xiang J, Wünschmann S, Diekema DJ, Klinzman D, Patrick KD, George SL, Stapleton JT.

Effect of coinfection with GB virus C on survival among patients with HIV infection.

N Engl J Med. 2001 Sep 6;345(10):707-14. doi: 10.1056/NEJMoa003364.

<https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa003364>

Tillmann HL, Heiken H, Knapik-Botor A, Heringlake S, Ockenga J, Wilber JC, Goergen B, Detmer J, McMorro M, Stoll M, Schmidt RE, Manns MP.

Infection with GB virus C and reduced mortality among HIV-infected patients.

N Engl J Med. 2001 Sep 6;345(10):715-24. doi: 10.1056/NEJMoa010398.

<https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa010398>

L'effetto dell'infezione virale cronica va oltre le alterazioni nella biologia delle cellule T antigene-specifiche che rispondono agli antigeni virali. C'è una notevole compressione del repertorio di cellule T negli animali cronicamente infetti. La risposta in corso a HSV e CMV è così robusta che la proporzione di cellule T specifiche per questi virus aumenta nel tempo al punto che la diminuzione delle risposte a nuovi antigeni può contribuire alla progressiva diminuzione della reattività del sistema immunitario con l'età.²³⁷

Inoltre, gli studi sull'infezione sequenziale da virus rivelano reazioni crociate potenzialmente rilevanti tra virus come EBV e virus dell'influenza A.²³⁸ Durante l'infezione virale cronica, la reattività crociata potrebbe essere un'arma a doppio taglio se le cellule T cross-reattive diventano disfunzionali a causa dell'esaurimento o dell'inibizione delle Tregs. Inoltre, una precedente infezione da virus può alterare la risposta delle citochine dei linfociti T alle successive infezioni da virus diversi; una precedente immunità a un virus può alterare notevolmente le risposte del vaccino a un secondo virus.²³⁹

Insieme, queste osservazioni forniscono una solida base per considerare che l'infezione cronica da virus può influenzare fortemente la risposta immunitaria adattativa.

Immunità eterologa

Le risposte della memoria immunitaria ad agenti patogeni precedentemente incontrati possono talvolta alterare la risposta immunitaria e il decorso dell'infezione di un agente patogeno non correlato mediante un processo noto come immunità eterologa. Questa risposta può portare a un'immunità protettiva potenziata o ridotta e a un'immunopatologia alterata. L'immunità eterologa può interrompere i pool di memoria dei linfociti T, alterare la complessità del repertorio dei linfociti T, modificare i modelli di immunodominanza dei linfociti T, portare alla selezione di varianti virali di evasione immunitaria dell'epitopo, alterare la patogenesi delle infezioni virali e, in virtù della specificità privata dei repertori di cellule T all'interno degli individui, contribuiscono a variazioni drammatiche nella malattia virale.

Ne segue che l'immunità eterologa è un fattore importante nella resistenza e nelle variazioni delle infezioni virali umane e che i problemi dell'immunità eterologa dovrebbero essere considerati nello studio dell'efficacia vaccinale.²⁴⁰

²³⁷ Nikolich-Zugich J.

Ageing and life-long maintenance of T-cell subsets in the face of latent persistent infections. *Nat Rev Immunol.* 2008 Jul;8(7):512-22. doi: 10.1038/nri2318. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC5573867/>

²³⁸ Aslan N, Watkin LB, Gil A, Mishra R, Clark FG, Welsh RM, Ghersi D, Luzuriaga K, Selin LK.

Severity of Acute Infectious Mononucleosis Correlates with Cross-Reactive Influenza CD8 T-Cell Receptor Repertoires. *mBio.* 2017 Dec 5;8(6):e01841-17. doi: 10.1128/mBio.01841-17. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5717389/>

²³⁹ Selin LK, Brehm MA, Naumov YN, Cornberg M, Kim SK, Clute SC, Welsh RM.

Memory of mice and men: CD8⁺ T-cell cross-reactivity and heterologous immunity. *Immunol Rev.* 2006 Jun;211(1):164-81. doi: 10.1111/j.0105-2896.2006.00394.x. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC7165519/>

²⁴⁰ Welsh RM, Che JW, Brehm MA, Selin LK.

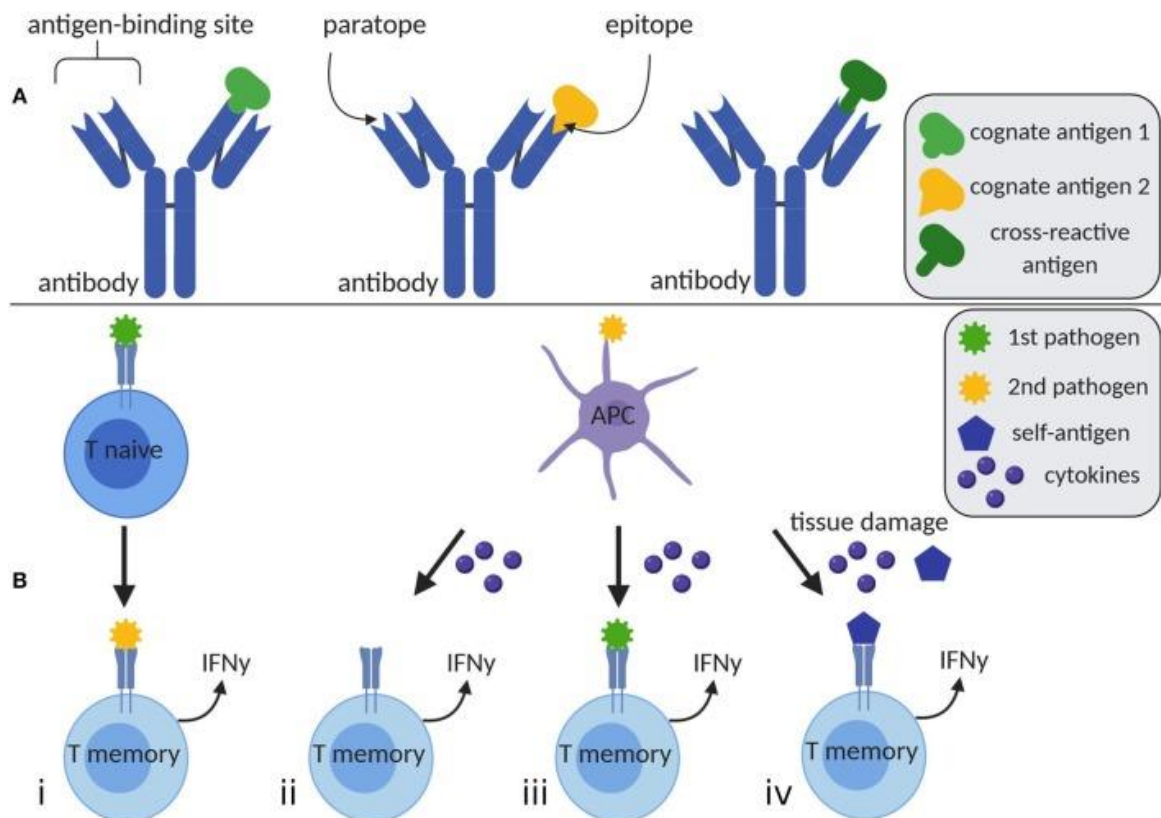
Heterologous immunity between viruses. *Immunol Rev.* 2010 May;235(1):244-66. doi: 10.1111/j.0105-2896.2010.00897.x. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2917921/>

Sharma S, Thomas PG.

The two faces of heterologous immunity: protection or immunopathology. *J Leukoc Biol.* 2014 Mar;95(3):405-16. doi: 10.1189/jlb.0713386. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3923083/>

Balz K, Trassl L, Härtel V, Nelson PP, Skevaki C.

Virus-Induced T Cell-Mediated Heterologous Immunity and Vaccine Development. *Front Immunol.* 2020;11:513. Published 2020 Mar 31. doi:10.3389/fimmu.2020.00513 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7137989/>



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7137989/>

Immunità eterologa umorale e cellulo-mediata. (A) Un singolo anticorpo ha la capacità di legare antigeni distinti 1 e 2 da diversi paratopi nel sito di legame dell'antigene. Inoltre, è in grado di rilevare un antigene cross-reattivo, il cui epitopo è simile a quello dell'antigene 1. (B) (i) Le cellule di memoria T possono essere attivate da un secondo patogeno non correlato, che è cross-reattivo con il primo patogeno incontrato. (ii) La comparsa di un secondo patogeno può elevare i livelli di citochine, che potenzialmente portano all'attivazione dei linfociti T TCR-indipendente. (iii) La presenza simultanea di citochine e antigeni rimanenti di agenti patogeni precedentemente incontrati può stimolare le cellule T. (iv) Livelli elevati di citochine e danni ai tessuti dovuti a infiammazioni o malattie croniche determinano un aumento delle concentrazioni di autoantigeni, che possono essere coinvolti dai linfociti T. adattato da Welsh et al. (3). APC, cellula presentante l'antigene; IFN γ , interferone γ .

Per quanto riguarda l'infezione da SARS-CoV-2, uno studio recente ha dimostrato l'esistenza di risposte preesistenti delle cellule T nell'81%²⁴¹ degli individui non esposti e ha convalidato la somiglianza con i comuni coronavirus del raffreddore, fornendo una base funzionale per l'immunità eterologa nell'infezione da SARS-CoV-2. La diversità delle risposte delle cellule T verso il SARS-CoV-2 è stata associata a sintomi lievi della COVID-19, fornendo prove che l'immunità richiede il riconoscimento di più epitopi.²⁴²

²⁴¹ Nelde A, et al

SARS-CoV-2-derived peptides define heterologous and COVID-19-induced T cell recognition. Nat Immunol. 2021 Jan;22(1):74-85. doi: 10.1038/s41590-020-00808-x. <https://www.nature.com/articles/s41590-020-00808-x>

²⁴² Tan CCS, Owen CJ, Tham CYL, Bertoletti A, van Dorp L, Balloux F.

Pre-existing T cell-mediated cross-reactivity to SARS-CoV-2 cannot solely be explained by prior exposure to endemic human coronaviruses. Infect Genet Evol. 2021;95:105075. doi:10.1016/j.meegid.2021.105075 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8428999/>

Stefano GB, Kream RM.

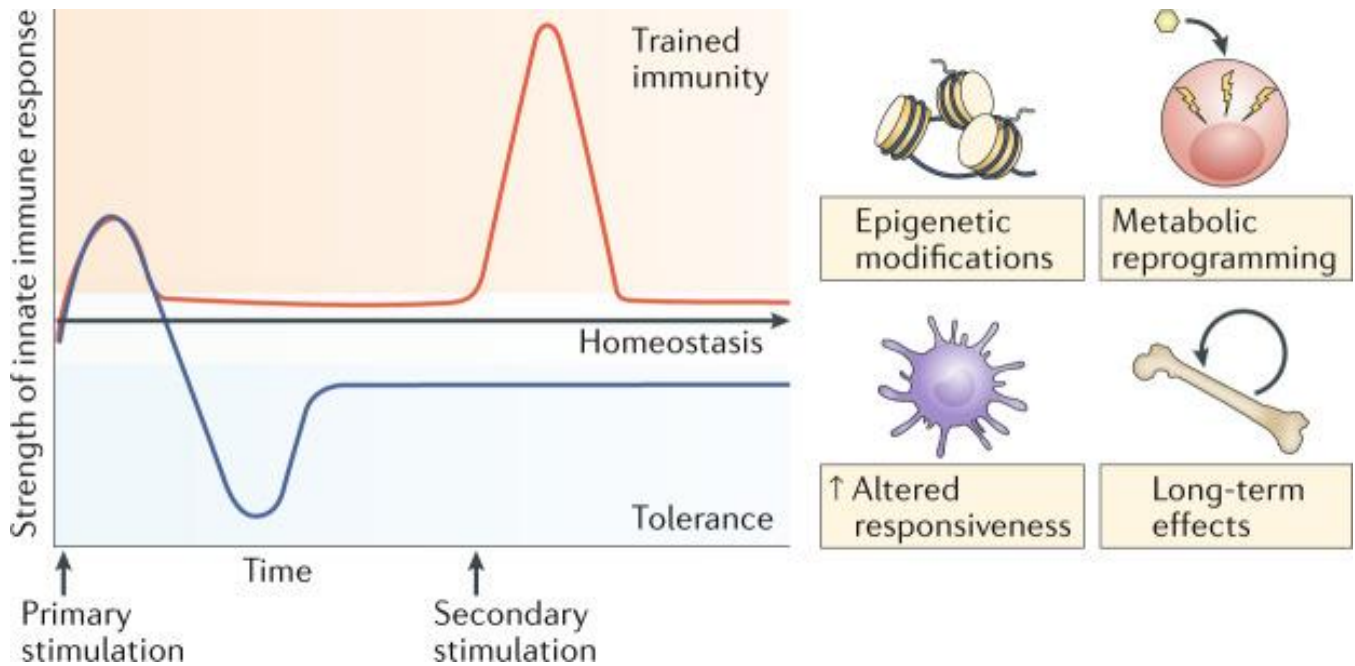
Convalescent Memory T Cell Immunity in Individuals with Mild or Asymptomatic SARS-CoV-2 Infection May Result from an Evolutionarily Adapted Immune Response to Coronavirus and the 'Common Cold'. Med Sci Monit. 2020;26:e929789. Published 2020 Nov 26. doi:10.12659/MSM.929789 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7706138/>

Schmidt KG, Nganou-Makamdop K, Tenbusch M, et al.

SARS-CoV-2-Seronegative Subjects Target CTL Epitopes in the SARS-CoV-2 Nucleoprotein Cross-Reactive to Common Cold Coronaviruses.

Trained immunity o memoria innata

La Trained Immunity, nota anche come memoria immunitaria innata, è un adattamento recentemente descritto delle cellule immunitarie innate in seguito all'esposizione antigenica. La riprogrammazione epigenetica porta alla produzione di mediatori infiammatori e ad uno spostamento del metabolismo cellulare, fornendo una risposta potenziata alla stimolazione secondaria. Pertanto, si ottengono processi fisiologici come la tolleranza della mucosa, la limitazione del danno tissutale, la maturazione dell'immunità innata e la protezione non specifica mediata dal vaccino. Tuttavia, la Trained Immunity può diventare disadattativa, causando paralisi immunitaria o iperinfiammazione.²⁴³



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7186935/>
Trained Immunity e tolleranza: due programmi funzionali opposti dell'immunità innata.

Front Immunol. 2021;12:627568. Published 2021 Apr 28. doi:10.3389/fimmu.2021.627568
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8113865/>

Pushpakumara PD, Madhusanka D, Dhanasekara S, Jeewandara C, Ogg GS, Malavige GN. Identification of Novel Candidate CD8+ T Cell Epitopes of the SARS-CoV2 with Homology to Other Seasonal Coronaviruses. Viruses. 2021;13(6):972. Published 2021 May 24. doi:10.3390/v13060972
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8225204/>

²⁴³ Netea MG, Domínguez-Andrés J, Barreiro LB, et al. Defining trained immunity and its role in health and disease. Nat Rev Immunol. 2020;20(6):375-388. doi:10.1038/s41577-020-0285-6
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7186935/>

Hu Z, Lu SH, Lowrie DB, Fan XY. Trained immunity: A Yin-Yang balance. MedComm (2020). 2022;3(1):e121. Published 2022 Mar 6. doi:10.1002/mco2.121
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8906449/>

Acevedo OA, Berrios RV, Rodríguez-Guilarte L, Lillo-Dapremont B, Kalergis AM. Molecular and Cellular Mechanisms Modulating Trained Immunity by Various Cell Types in Response to Pathogen Encounter. Front Immunol. 2021;12:745332. Published 2021 Oct 4. doi:10.3389/fimmu.2021.745332
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8521023/>

Netea MG, Joosten LA, Latz E, et al. Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. Science. 2016;352(6284):aaf1098. doi:10.1126/science.aaf1098
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5087274/>

Infezioni o trigger di tessuto sterile inducono infiammazione e l'attivazione di meccanismi effettori immunitari. In concomitanza con una risposta proinfiammatoria, vengono provocati meccanismi antinfiammatori per prevenire il superamento dell'infiammazione e del danno tissutale e per limitare nel tempo la risposta infiammatoria. La trained immunity comporta la riprogrammazione epigenetica e metabolica delle cellule immunitarie innate, consentendo risposte qualitativamente e quantitativamente aggiustate delle cellule immunitarie innate alla successiva stimolazione eterologa ritardata. Risposte errate della trained immunity possono contribuire alla progressione della malattia, determinando uno stato iperinfiammatorio cronico o uno stato persistente di tolleranza immunologica, un meccanismo che smorza la risposta infiammatoria dell'ospite per mantenere l'omeostasi e prevenire danni ai tessuti e insufficienza d'organo, con il conseguente rischio di infezioni secondarie e altre malattie legate alla ridotta attività del sistema immunitario.

Tolleranza delle cellule T

Come già discusso, la tolleranza delle cellule T si ottiene attraverso una combinazione di eventi timici e periferici che rendono il pool di cellule T periferiche non rispondente all'auto-antigene. I timociti reattivi per gli auto-peptidi vengono eliminati o resi funzionalmente non reattivi. Tuttavia, poiché particolari auto-peptidi non sono presenti nel timo, negli individui normali alcuni linfociti T autoreattivi raggiungono la periferia.²⁴⁴ Numerosi meccanismi impediscono a questi linfociti T autoreattivi di avviare risposte autoimmuni, che includono l'ignoranza immunitaria dell'antigene espressa a bassi livelli o in siti sequestrati, l'anergia, la soppressione e la delezione.

Dopo l'esposizione ad antigeni cross-reattivi, le cellule T autoreattive che migrano verso la periferia possono essere attivate e innescare reazioni autoimmuni.²⁴⁵

Da studi in vitro e in vivo è stato dimostrato che l'esposizione ripetuta ad un peptide antigenico solubile (come può avvenire con richiami vaccinali ravvicinati) può indurre uno stato di tolleranza funzionale delle cellule T CD8 caratterizzato da un segnale TCR difettoso, proliferazione ridotta e maggiore sensibilità alla morte cellulare.²⁴⁶

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3946600/>

La differenziazione dei linfociti T dei linfociti T CD8 naïve provoca la memoria funzionale dei linfociti T o la disfunzione dei linfociti T come riflesso dall'autotolleranza o dall'esaurimento nelle infezioni croniche. Memoria funzionale: quando i linfociti T CD8 naïve incontrano l'antigene (estraneo) in un contesto stimolante e infiammatorio (ad esempio un'infezione acuta), i linfociti T si differenziano in effettori e infine in linfociti T di memoria. Tolleranza: le cellule T CD8 auto-reattive periferiche che incontrano l'autoantigene in un contesto tolerogenico acquisiscono un programma di insensibilità funzionale. Le cellule T tolleranti possono essere salvate transitoriamente inducendo la proliferazione cellulare, ad es. da citochine (IL-2, IL-15) o linfopenia. Tuttavia, una volta che la proliferazione si interrompe, i linfociti T autoreattivi salvati vengono nuovamente tollerati. Resta da determinare se le cellule T autotolleranti possono essere riprogrammate e salvate in modo permanente. Esaurimento: le cellule T virus-specifiche inizialmente acquisiscono alcune funzioni effettive durante le infezioni croniche, ma, a causa della persistenza dell'antigene virale e dell'infiammazione, le cellule T si esauriscono progressivamente. Le cellule T esaurite rappresentano una popolazione eterogenea di cellule T contenente sottopopolazioni T-bet^{hi}PD-1^{int} e Eomes^{hi}PD-1^{hi} (vedi testo). I linfociti T esauriti T-bet^{hi}PD-1^{int} ma non Eomes^{hi}PD-1^{hi} possono essere salvati funzionalmente dal blocco PD-1.

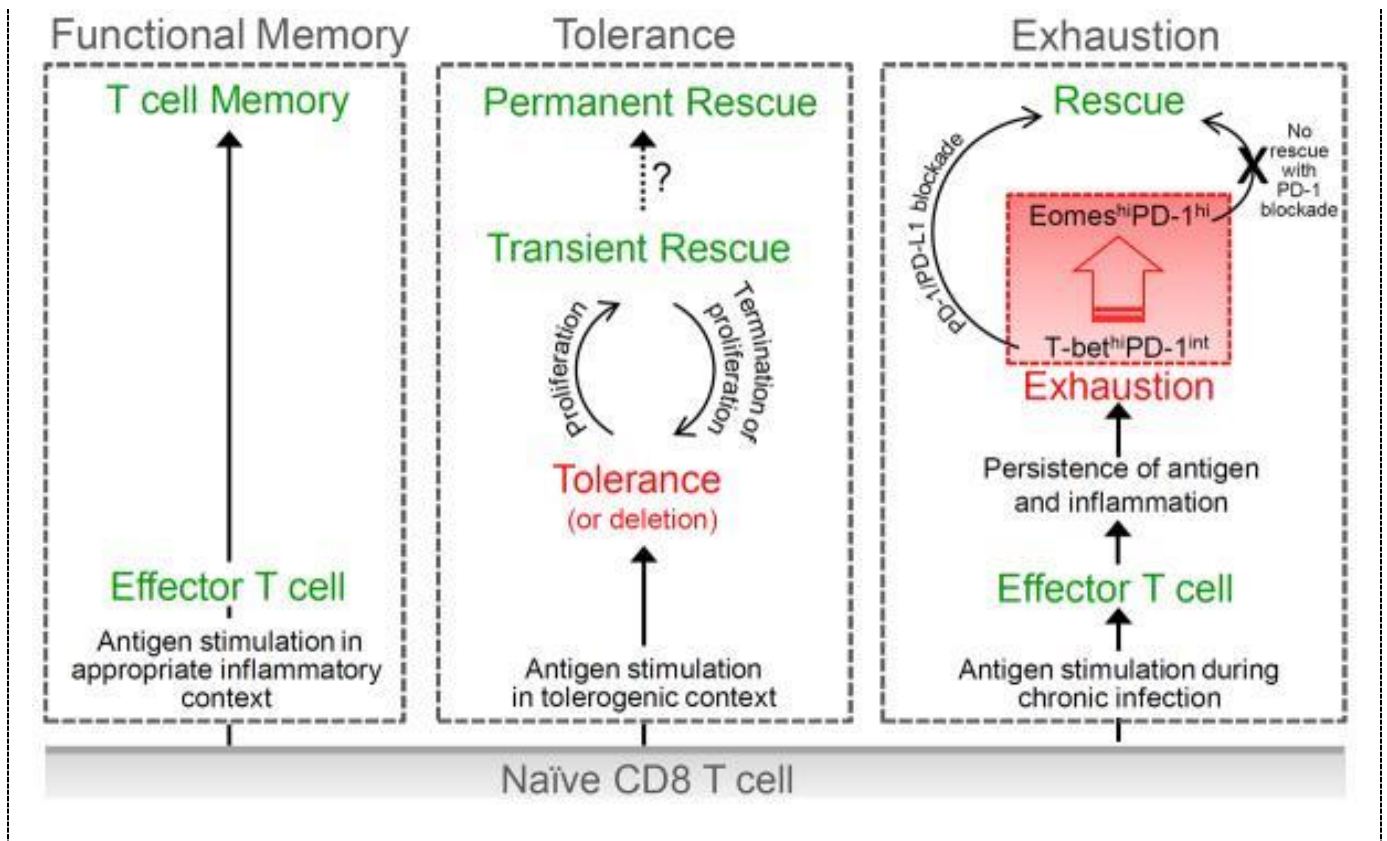
²⁴⁴ Marx A, Yamada Y, Simon-Keller K, Schalke B, Willcox N, Ströbel P, Weis CA. Thymus and autoimmunity. *Semin Immunopathol.* 2021 Feb;43(1):45-64. doi: 10.1007/s00281-021-00842-3. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7925479/>

Enouz S, Carrié L, Merkler D, Bevan MJ, Zehn D. Autoreactive T cells bypass negative selection and respond to self-antigen stimulation during infection. *J Exp Med.* 2012 Sep 24;209(10):1769-79. doi: 10.1084/jem.20120905. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3457731/>

²⁴⁵ Schietinger A, Greenberg PD. Tolerance and exhaustion: defining mechanisms of T cell dysfunction. *Trends Immunol.* 2014 Feb;35(2):51-60. doi: 10.1016/j.it.2013.10.001. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3946600/>

Jellison ER, Turner MJ, Blair DA, Lingenheld EG, Zu L, Puddington L, Lefrançois L. Distinct mechanisms mediate naïve and memory CD8 T-cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Dec 26;109(52):21438-43. doi: 10.1073/pnas.1217409110 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3535649/>

²⁴⁶ Dubois PM, Pihlgren M, Tomkowiak M, Van Mechelen M, Marvel J. Tolerant CD8 T cells induced by multiple injections of peptide antigen show impaired TCR signaling and altered proliferative responses in vitro and in vivo. *J Immunol.* 1998 Nov 15;161(10):5260-7. <https://www.jimmunol.org/content/161/10/5260.long>



Il profilo dell'ambiente delle citochine creato dall'infezione virale cronica sulle risposte adattative a nuovi agenti patogeni è più speculativo. Tuttavia, le cellule T richiedono segnali infiammatori per la piena attivazione e differenziazione in cellule T effettrici e di memoria ²⁴⁷. Studi in vivo hanno confermato l'importante ruolo delle citochine infiammatorie (tra cui IL-12 e IFN- α) nell'attivazione e differenziazione delle cellule T ²⁴⁸. L'IFN- γ è stato anche implicato nella modulazione della differenziazione delle cellule T di memoria CD8 e CD4 ²⁴⁹.

²⁴⁷ Curtsinger JM, Schmidt CS, Mondino A, Lins DC, Kedl RM, Jenkins MK, Mescher MF. Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *J Immunol.* 1999 Mar 15;162(6):3256-62. <https://www.jimmunol.org/content/162/6/3256.long>

Curtsinger JM, Mescher MF. Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. *Curr Opin Immunol.* 2010 Jun;22(3):333-40. doi: 10.1016/j.coi.2010.02.013. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2891062/>

Marchingo JM, Kan A, Sutherland RM, Duffy KR, Wellard CJ, Belz GT, Lew AM, Dowling MR, Heinzl S, Hodgkin PD. T cell signaling. Antigen affinity, costimulation, and cytokine inputs sum linearly to amplify T cell expansion. *Science.* 2014 Nov 28;346(6213):1123-7. doi: 10.1126/science.1260044. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25430770/>

²⁴⁸ Kolumam GA, Thomas S, Thompson LJ, Sprent J, Murali-Krishna K. Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection. *J Exp Med.* 2005 Sep 5;202(5):637-50. doi: 10.1084/jem.20050821. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC2212878/>

²⁴⁹ Whitmire JK, Tan JT, Whitton JL. Interferon-gamma acts directly on CD8⁺ T cells to increase their abundance during virus infection. *J Exp Med.* 2005 Apr 4;201(7):1053-9. doi: 10.1084/jem.20041463. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC2213135/>

Oltre a influenzare l'attivazione e l'espansione delle cellule T CD8²⁵⁰, IL-12, IFN- $\alpha\beta$ e altri segnali infiammatori modellano la memoria delle cellule T. L'innesco delle cellule T CD8 in vivo in assenza di infiammazione provoca risposte meno marcate delle cellule T effettrici ma una generazione più rapida di cellule T di memoria²⁵¹. Inoltre, livelli aumentati di infiammazione possono portare alla generazione di cellule T effettrici differenziate terminali.²⁵² Pertanto, l'infiammazione ha un ruolo critico nell'attivazione e nella differenziazione delle cellule T immunitarie adattative. È plausibile che un'infiammazione prolungata, secondaria all'impronta immunologica del nostro viroma, possa alterare le risposte delle cellule T verso più cellule T effettrici e meno precursori della memoria, con un impatto duraturo sulla qualità della popolazione delle cellule T della memoria.

Ridefinire l'infezione virale cronica

Riconoscere che i virus cronici contribuiscono al nostro normale metagenoma ha due conseguenze altamente interconnesse e di fondamentale importanza. In primo luogo, dobbiamo riformulare il modo in cui attribuiamo la malattia a virus specifici e come vengono eseguiti studi di associazione sull'intero genoma nell'uomo. In secondo luogo, dobbiamo riconoscere che il nostro normale sistema immunitario è soggetto all'impronta dell'equilibrio dinamico tra il nostro genoma e il viroma endogeno.

Viroma come parte del metagenoma: le implicazioni

Quali implicazioni ha per le malattie umane la presenza di un viroma interno che è in equilibrio dinamico con il nostro sistema immunitario?²⁵³

²⁵⁰ Mescher MF, Curtsinger JM, Agarwal P, Casey KA, Gerner M, Hammerbeck CD, Popescu F, Xiao Z. Signals required for programming effector and memory development by CD8⁺ T cells. *Immunol Rev.* 2006 Jun;211:81-92. doi: 10.1111/j.0105-2896.2006.00382.x. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16824119/>

²⁵¹ Pearce EL, Shen H. Generation of CD8 T cell memory is regulated by IL-12. *J Immunol.* 2007 Aug 15;179(4):2074-81. doi: 10.4049/jimmunol.179.4.2074. <https://www.jimmunol.org/content/179/4/2074>

Badovinac VP, Messingham KA, Jabbari A, Haring JS, Harty JT. Accelerated CD8⁺ T-cell memory and prime-boost response after dendritic-cell vaccination. *Nat Med.* 2005 Jul;11(7):748-56. doi: 10.1038/nm1257. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15951824/>

²⁵² Joshi NS, Cui W, Chandele A, Lee HK, Urso DR, Hagman J, Gapin L, Kaech SM. Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8(+) T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor. *Immunity.* 2007 Aug;27(2):281-95. doi: 10.1016/j.immuni.2007.07.010. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC2034442/>.

Sarkar S, Kalia V, Haining WN, Konieczny BT, Subramaniam S, Ahmed R. Functional and genomic profiling of effector CD8 T cell subsets with distinct memory fates. *J Exp Med.* 2008 Mar 17;205(3):625-40. doi: 10.1084/jem.20071641. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC2275385/>

²⁵³ Bai GH, Lin SC, Hsu YH, Chen SY. The Human Virome: Viral Metagenomics, Relations with Human Diseases, and Therapeutic Applications. *Viruses.* 2022;14(2):278. Published 2022 Jan 28. doi:10.3390/v14020278 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8876576/>

Stern J, Miller G, Li X, Saxena D. Virome and bacteriome: two sides of the same coin. *Curr Opin Virol.* 2019 Aug;37:37-43. doi: 10.1016/j.coviro.2019.05.007. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6768692/>

González R, Elena SF. The Interplay between the Host Microbiome and Pathogenic Viral Infections. *mBio.* 2021 Dec 21;12(6):e0249621. doi: 10.1128/mBio.02496-21. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8561389/>

Monaco DR, et al
Deconvoluting virome-wide antibody epitope reactivity profiles.

Classicamente, un virus è considerato una potenziale causa di malattia quando è presente in persone malate e assente in persone senza malattia. Numerose ricerche suggeriscono che questo semplice approccio non cattura l'intero ruolo dei virus nella malattia, indicando la necessità di riformulare i nostri criteri per la causalità della malattia durante l'infezione virale cronica.²⁵⁴ Anche i virus a bassa virulenza causano occasionalmente malattie gravi in persone apparentemente normali, un fenomeno che è stato attribuito a eventi stocastici, genetica umana, dose virale, varianti virali o immunosoppressione transitoria.²⁵⁵ Sebbene ciascuna di queste spiegazioni possa essere applicata, un cambiamento epocale nel modo in cui definiamo l'infezione virale è guidato da una combinazione di genetica classica e rivoluzione genomica²⁵⁶.

In questa nuova visione emergente, il ruolo ben noto della variazione genetica dell'ospite viene alla ribalta perché polimorfismi o mutazioni alleliche altamente specifici predispongono un numero limitato di individui a malattie causate da virus che altrimenti solo raramente causano malattie conclamate. In un certo senso, i geni nell'ospite "determinano" la malattia, poiché i virus possono infettare molti ma causare malattie solo in pochi.²⁵⁷

I fattori chiave in questa formulazione emergente sono:

- (1) nuove stime del numero di geni che conferiscono suscettibilità a un dato virus²⁵⁸
- (2) la specificità di alcuni alleli per determinati virus.²⁵⁹

EBioMedicine. 2022 Jan;75:103747. doi: 10.1016/j.ebiom.2021.103747.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8688874/>

²⁵⁴ Rascovan N, Duraisamy R, Desnues C.
Metagenomics and the Human Virome in Asymptomatic Individuals.
Annu Rev Microbiol. 2016 Sep 8;70:125-41. doi: 10.1146/annurev-micro-102215-095431.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27607550/>

²⁵⁵ Liang G, Bushman FD.
The human virome: assembly, composition and host interactions.
Nat Rev Microbiol. 2021;19(8):514-527. doi:10.1038/s41579-021-00536-5
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8008777/>

²⁵⁶ Kumata R, Ito J, Takahashi K, Suzuki T, Sato K.
A tissue level atlas of the healthy human virome.
BMC Biol. 2020 Jun 4;18(1):55. doi: 10.1186/s12915-020-00785-5.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7269688/>

²⁵⁷ Brinkmeyer-Langford C, Amstalden K, Konganti K, Hillhouse A, Lawley K, Perez-Gomez A, Young CR, Welsh CJ, Threadgill DW.
Resilience in Long-Term Viral Infection: Genetic Determinants and Interactions.
Int J Mol Sci. 2021 Oct 21;22(21):11379. doi: 10.3390/ijms222111379.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8584141/>

Khor CC, Hibberd ML.
Host-pathogen interactions revealed by human genome-wide surveys.
Trends Genet. 2012 May;28(5):233-43. doi: 10.1016/j.tig.2012.02.001.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22445588/>

²⁵⁸ Biemans F, de Jong MCM, Bijma P.
A model to estimate effects of SNPs on host susceptibility and infectivity for an endemic infectious disease.
Genet Sel Evol. 2017 Jun 30;49(1):53. doi: 10.1186/s12711-017-0327-0.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5492932/>

MacPherson A, Otto SP, Nuismer SL.
Keeping Pace with the Red Queen: Identifying the Genetic Basis of Susceptibility to Infectious Disease.
Genetics. 2018 Feb;208(2):779-789. doi: 10.1534/genetics.117.300481.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5788537/>

²⁵⁹ Retel C, Märkle H, Becks L, Feulner PGD.
Ecological and Evolutionary Processes Shaping Viral Genetic Diversity.
Viruses. 2019;11(3):220. Published 2019 Mar 5. doi:10.3390/v11030220
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6466605/>

La mutagenesi casuale del genoma del topo suggerisce che ci sono circa 300 geni che determinano la resistenza al CMV murino ²⁶⁰. Inoltre, insiemi di geni possono agire in modo combinatorio per conferire resistenza virale.

Ad esempio, le interazioni tra gli alleli killer inibitori (KIR) che codificano per i recettori delle cellule NK e gli alleli MHC di classe I contribuiscono alla suscettibilità all'infezione da HIV, HCV ed EBV. ²⁶¹

Esistono molte variazioni alleliche che influenzano l'infezione virale cronica. ²⁶² Queste includono variazioni nel CCR5 che influenzano l'infezione da HIV, variazioni nell'HLA che influenzano lo sviluppo del cancro cervicale e l'infezione da papillomavirus, HIV, HBV e HCV, variazioni nel CXCR4 e lo sviluppo di verruche, variazioni negli EVR1 ed EVR2 e lo sviluppo di epidermodisplasia indotta da papillomavirus verruciformis, e le variazioni geniche del complemento che influenzano la risposta al vaccino HBV. Inoltre, gli effetti della variazione allelica nei geni, da soli o in combinazione, possono essere altamente specifici per una data infezione. Ad esempio, la carenza delle molecole di segnalazione immunitaria innata MyD88 o IRAK-4 è associata a una grave infezione batterica piogenica, ma i pazienti sembrano avere una normale resistenza alle infezioni virali ²⁶³.

Al contrario, le mutazioni in UNC93B1 e TLR3, due proteine coinvolte nelle risposte immunitarie innate all'infezione da virus, predispongono selettivamente l'ospite all'encefalite da herpes simplex ²⁶⁴.

Questi nuovi dati suggeriscono che molti o tutti gli esseri umani devono essere considerati geneticamente "immunocompromessi" in misura maggiore o minore per infezioni specifiche, incluse le infezioni da virus che costituiscono il nostro viroma. Pertanto, un virus presente in tutti può causare malattie solo in coloro che sono predisposti da uno specifico profilo di geni.

Ne segue che attribuire una malattia ad una causa virale sulla base della presenza del virus non è corretto, soprattutto per i virus che infettano la maggior parte o tutti gli esseri umani (Tabella 1). In questa prospettiva, identifichiamo solo le malattie virali facilmente rilevabili, quelle causate da virus che sono virulenti in una percentuale sufficientemente alta di persone da consentire un confronto informativo tra persone infette e non infette. Ulteriori malattie virali potrebbero essere in attesa dell'identificazione di nuovi virus o della valutazione delle relazioni tra i singoli geni umani, il viroma e malattie specifiche. Un esempio provocatorio è il virus umano

²⁶⁰ Beutler B, Jiang Z, Georgel P, Crozat K, Croker B, Rutschmann S, Du X, Hoebe K. Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signaling and immunity at large. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:353-89. doi: 10.1146/annurev.immunol.24.021605.090552. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16551253/>

²⁶¹ Khakoo SI, et al
HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science.* 2004 Aug 6;305(5685):872-4. doi: 10.1126/science.1097670. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15297676/>

²⁶² Virgin, H.W. (2007b). Pathogenesis of viral infection. In Fields Virology, D.M. Knipe and P.M. Howley, eds. (Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins), pp. 327–388.

²⁶³ von Bernuth H, et al
Pyogenic bacterial infections in humans with MyD88 deficiency. *Science.* 2008 Aug 1;321(5889):691-6. doi: 10.1126/science.1158298. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC2688396/>

Ku CL, et al
Selective predisposition to bacterial infections in IRAK-4-deficient children: IRAK-4-dependent TLRs are otherwise redundant in protective immunity. *J Exp Med.* 2007 Oct 1;204(10):2407-22. doi: 10.1084/jem.20070628. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC2118442/>

²⁶⁴ Zhang SY, et al
TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis. *Science.* 2007 Sep 14;317(5844):1522-7. doi: 10.1126/science.1139522. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17872438/>

Casrouge A, et al
Herpes simplex virus encephalitis in human UNC-93B deficiency. *Science.* 2006 Oct 13;314(5797):308-12. doi: 10.1126/science.1128346. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16973841/>

correlato al virus della leucemia murina xenotropica (XMLV) (Tabella 1) rilevato nei tessuti del cancro alla prostata²⁶⁵, ma che non è presente in tutti i pazienti con cancro alla prostata.

È possibile quindi che l'XMRV causi il cancro alla prostata in individui con una specifica anomalia immunologica. L'infezione cronica da XMRV è fortemente associata a mutazioni omozigoti nella molecola antivirale RNaseL regolata dall'interferone e le mutazioni di RNaseL predispongono l'ospite al cancro alla prostata.²⁶⁶

Pertanto, il ruolo causale di un virus può essere chiaro solo alla luce del complemento genomico totale di anomalie immunitarie focali di un paziente.

Data l'ampiezza dell'infezione virale cronica (Figura 2, Tabella 1), questi cambiamenti nella nostra comprensione della relazione tra la genetica umana e la malattia indotta da virus richiedono l'apertura a nuovi modi di guardare alla causalità della malattia.

L'impronta immunologica dell'infezione virale cronica fornisce un potenziale meccanismo attraverso il quale il viroma può contribuire a una serie di malattie infiammatorie. Anche malattie generalmente non considerate di natura infiammatoria possono essere influenzate dal nostro viroma. Ad esempio, i topi cronicamente infettati da CMV murino presentano ipertensione a causa di alterazioni del sistema renina-angiotensina responsabile della regolazione della pressione sanguigna sistemica.²⁶⁷ Pertanto, l'esistenza di un contributo virale al nostro metagenoma può esigere un grande prezzo nelle persone con predisposizioni genetiche specifiche alle malattie. La conclusione è che molte delle principali malattie associate all'infiammazione, comprese le malattie cardiovascolari, la neurodegenerazione, le malattie allergiche, il cancro e l'autoimmunità, si verificano in persone cronicamente infettate da virus.²⁶⁸ Tuttavia, il potenziale dei virus persistenti di contribuire alla malattia in contesti

²⁶⁵ Dong B, et al

An infectious retrovirus susceptible to an IFN antiviral pathway from human prostate tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Jan 30;104(5):1655-60. doi: 10.1073/pnas.0610291104. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC1776164/>

²⁶⁶ Dong B, et al

An infectious retrovirus susceptible to an IFN antiviral pathway from human prostate tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Jan 30;104(5):1655-60. doi: 10.1073/pnas.0610291104. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC1776164/>

²⁶⁷ Cheng J, Ke Q, Jin Z, Wang H, Kocher O, Morgan JP, Zhang J, Crumpacker CS.

Cytomegalovirus infection causes an increase of arterial blood pressure. *PLoS Pathog.* 2009 May;5(5):e1000427. doi: 10.1371/journal.ppat.1000427. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC2673691/>

²⁶⁸ Tisza MJ, Buck CB.

A catalog of tens of thousands of viruses from human metagenomes reveals hidden associations with chronic diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021 Jun 8;118(23):e2023202118. doi: 10.1073/pnas.2023202118. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8201803/>

Cadwell K.

The virome in host health and disease. *Immunity.* 2015;42(5):805-813. doi:10.1016/j.immuni.2015.05.003 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4578625/>

Zárate S, Taboada B, Yocupicio-Monroy M, Arias CF.

Human Virome. *Arch Med Res.* 2017 Nov;48(8):701-716. doi: 10.1016/j.armed.2018.01.005. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29398104/>

Freer G, Maggi F, Pistello M.

Virome and Inflammasomes, a Finely Tuned Balance with Important Consequences for the Host Health. *Curr Med Chem.* 2019;26(6):1027-1044. doi: 10.2174/0929867324666171005112921. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28982318/>

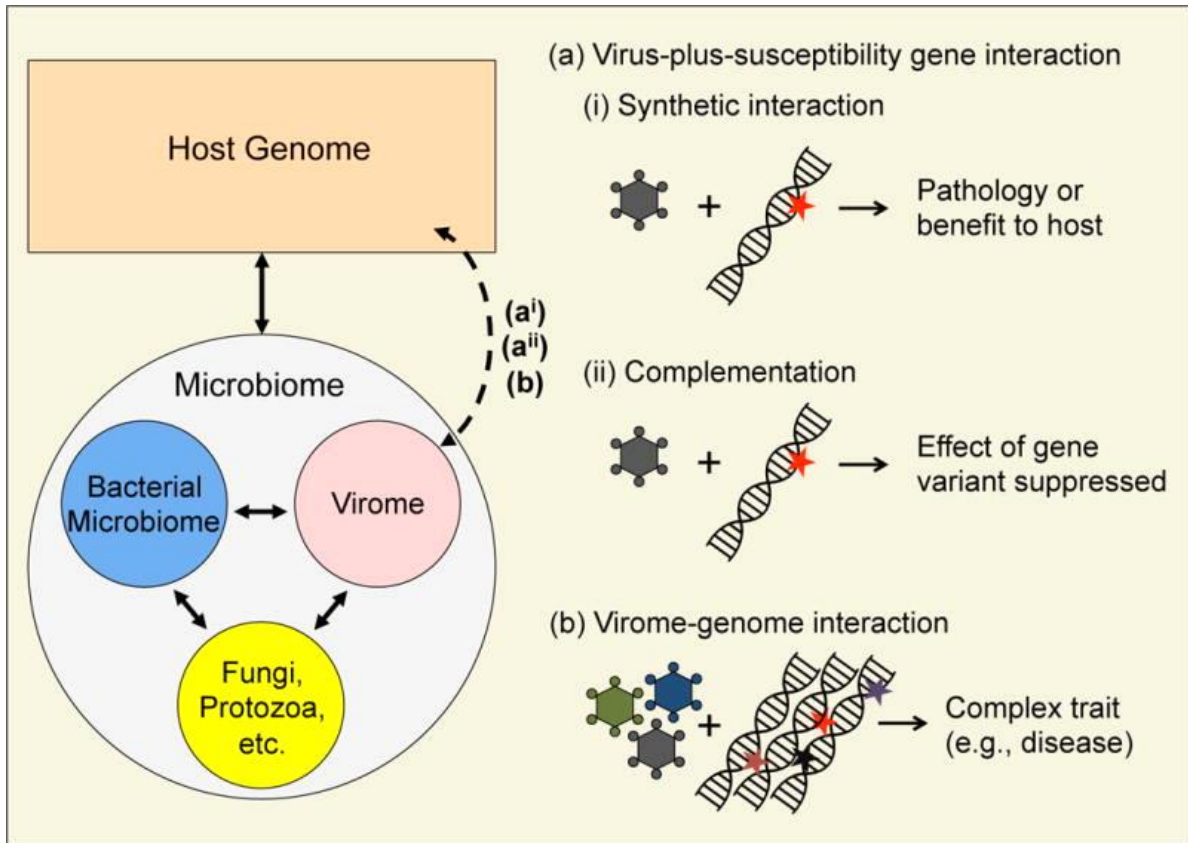
Lecuit M, Eloit M.

The human virome: new tools and concepts. *Trends Microbiol.* 2013 Oct;21(10):510-5. doi: 10.1016/j.tim.2013.07.001. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7172527/>

Handley SA.

The virome: a missing component of biological interaction networks in health and disease.

genetici specifici non è stato esaminato in modo definitivo e gli studi di associazione sull'intero genoma dovrebbero essere estesi per includere le variazioni del viroma come parte della normale variazione genetica umana.



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4578625/>

Il viroma esiste all'interno della rete del microbioma e interagisce con il microbioma batterico e altri organismi che abitano l'ospite come funghi (micobioma), archaea, protozoi ed elminti. L'effetto del viroma sul genoma ospite rappresenta un sottoinsieme dell'interazione genoma ospite-microbioma. Una semplice relazione tra il viroma e il genoma ospite è l'interazione genica virus-più-suscettibilità, in cui un esito fenotipico, come una patologia o un sintomo di malattia, è evocato dalla combinazione di un'infezione virale e una variante del gene dell'ospite (a-i). Oltre a questa interazione sintetica, un altro tipo di interazione genica virus-più-suscettibilità è la complementazione fenotipica, in cui l'infezione virale maschera l'effetto di una variante del gene dell'ospite (a-ii). Sebbene manchino esempi, un virus potrebbe indurre benefici in un modo dipendente da una variante del gene ospite o annullare l'effetto benefico di una variante del gene. In situazioni in cui l'esito è una malattia o un tratto complesso, l'interazione viroma-genoma coinvolge più virus e varianti genetiche dell'ospite (b). Alcune varianti genetiche esistono nella regione non codificante e possono influenzare l'espressione genica in modo dipendente dall'infezione virale. Queste interazioni sono influenzate da altri membri del microbioma, che regolano le attività sia dell'ospite che del virus.

L'impronta immunologica del metagenoma virale

La ridefinizione del sistema immunitario normale, in quanto portatore dell'impronta delle risposte a virus cronici con strategie genetiche molto diverse per evitare l'immunità sterilizzante, ha importanti implicazioni sul modo in cui consideriamo gli interventi immunitari per prevenire o curare le infezioni.

L'impronta delle risposte al nostro viroma può influenzare la vaccinazione preventiva o terapeutica contro i virus cronici stessi, ma può anche cambiare le risposte a patogeni non correlati e varianti virali che si verificano durante infezioni croniche con virus come HIV o HCV o autoantigeni.

Tuttavia, le strategie virali come la rapida mutazione in diverse quasispecie o la capacità di ritirarsi in un serbatoio latente immunologicamente silenzioso sono ancora sfide profonde, anche se i meccanismi che regolano la disfunzione delle cellule T e B durante l'infezione cronica possono essere definiti ed efficacemente mirati.

Genome Med. 2016 Apr 1;8(1):32. doi: 10.1186/s13073-016-0287-y.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4818473/>

Ad esempio, il trattamento o l'eliminazione dell'epatite C deve occuparsi della variazione genetica del virus e affrontare anche il fatto che il ruolo dei recettori inibitori nella disfunzione dei linfociti T può essere diverso tra i linfociti T epatici e i linfociti T circolanti più facilmente ottenibili.

L'impronta immunologica delle risposte al nostro viroma deve essere presa in considerazione per lo sviluppo di vaccini terapeutici e preventivi. Il fallimento del vaccino contro l'HIV a base di adenovirus, nonostante la generazione di risposte immunitarie rilevabili agli antigeni bersaglio, riporta alla mente le sfide da affrontare.²⁶⁹ Una questione importante è se le risposte presenti in persone con infezione persistente, come quelle con adenovirus persistente, possano alterare la risposta agli antigeni nei vettori virali derivati da un virus persistente. Ad esempio, gli anticorpi contro una particella del vettore del vaccino adenovirale possono alterare le risposte delle cellule T dipendenti dalle cellule dendritiche all'antigene codificato dal vettore.²⁷⁰

Un altro problema è se l'impronta dell'infezione cronica da virus non correlata al virus mirato dal vaccino o allo stesso vettore del vaccino, può alterare le risposte.

Data l'ampiezza del nostro viroma, l'impronta dell'infezione virale cronica può essere una variabile confondente nelle risposte al vaccino umano. Ancora un altro problema è quello fondamentale della selezione dei migliori sistemi modello per l'analisi delle risposte immunitarie rilevanti per l'uomo.²⁷¹

Poiché i sistemi sperimentali di topi o primati sono sempre più lontani dallo stato naturale impresso dall'infezione cronica, le loro risposte saranno sempre meno rilevanti per le risposte negli esseri umani.

Comprendere le infezioni virali croniche

Dato che le infezioni virali croniche possono essere dannose solo in un numero limitato di persone geneticamente predisposte o possono anche essere simbiotiche, i costi rispetto ai benefici dell'eliminazione dei virus cronici devono essere considerati attentamente. Si ritiene che le infezioni generalmente considerate innocue o irrilevanti svolgano un ruolo nel plasmare la normale risposta immunitaria, a costo di indurre la malattia in individui rari con alterazioni altamente specifiche dei geni del sistema immunitario.

Gli interventi possono essere mirati a coloro la cui costituzione genetica li rende specificamente vulnerabili a una determinata infezione virale, in modo da poter eliminare la malattia senza eliminare l'infezione in tutte le persone. È possibile riformattare la valutazione epidemiologica dei virus e le malattie associate tenendo conto dell'intero background genetico dell'ospite, incluso il viroma, soprattutto grazie all'impiego delle tecniche di sequenziamento di ultima generazione.²⁷²

²⁶⁹ Fauci AS, et al

HIV vaccine research: the way forward.
Science. 2008 Jul 25;321(5888):530-2. doi: 10.1126/science.1161000.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18653883/>

Walker BD, Burton DR.
Toward an AIDS vaccine.
Science. 2008 May 9;320(5877):760-4. doi: 10.1126/science.1152622.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18467582/>

²⁷⁰ Perreau M, Pantaleo G, Kremer EJ.
Activation of a dendritic cell-T cell axis by Ad5 immune complexes creates an improved environment for replication of HIV in T cells.
J Exp Med. 2008 Nov 24;205(12):2717-25. doi: 10.1084/jem.20081786.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC2585831/>

²⁷¹ Virgin HW.
In vivo veritas: pathogenesis of infection as it actually happens.
Nat Immunol. 2007 Nov;8(11):1143-7. doi: 10.1038/ni1529.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17952037/>

²⁷² Quiñones-Mateu ME, Avila S, Reyes-Teran G, Martinez MA.
Deep sequencing: becoming a critical tool in clinical virology.
J Clin Virol. 2014 Sep;61(1):9-19. doi: 10.1016/j.jcv.2014.06.013.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4119849/>

Ramamurthy M, Sankar S, Kannangai R, Nandagopal B, Sridharan G.
Application of viromics: a new approach to the understanding of viral infections in humans.

Gli studi futuri devono concentrarsi specificamente sulla definizione dei dettagli meccanicistici della malattia e dell'impronta immunologica delle risposte al nostro viroma, in modo da poter distinguere l'amico dal nemico e intervenire in modo appropriato.²⁷³

CICLO VITALE DELL'ADENOVIRUS: CICLO LITICO VERSO FASE LATENTE O DI PERSISTENZA VIRALE

Gli adenovirus (Ad) sono noti come virus litici per il loro ciclo di replicazione convenzionale, diviso nelle fasi precoci e tardive basate sull'esordio della replicazione del DNA virale, che dipendono dall'apparato cellulare dell'ospite per la replicazione e l'espressione del loro genoma.

Dopo la replicazione del DNA, i genomi di Ad vengono impacchettati nei capsidi appena assemblati nel nucleo della cellula infettata. Il rilascio della progenie Ad richiede la lisi della cellula infetta per distruzione del citoscheletro e il rilascio delle particelle virali.²⁷⁴

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6928415/>

Panoramica del ciclo di replicazione HAdV. L'ingresso di virus e l'importazione di genomi virali nel nucleo porta a un programma di espressione genica precoce che include il meccanismo di replicazione virale. L'inizio della replicazione del DNA virale segna la progressione dalla fase iniziale a quella tardiva dell'infezione ed è un prerequisito sia per l'espressione genica tardiva che per l'assemblaggio del virione.

VirusDisease. 2017 Dec;28(4):349-359. doi: 10.1007/s13337-017-0415-3.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5747850/>

Leung P, Eltahla AA, Lloyd AR, Bull RA, Luciani F.
Understanding the complex evolution of rapidly mutating viruses with deep sequencing: Beyond the analysis of viral diversity.
Virus Res. 2017 Jul 15;239:43-54. doi: 10.1016/j.virusres.2016.10.014.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27888126/>

²⁷³ Willner D, Hugenholtz P.
From deep sequencing to viral tagging: recent advances in viral metagenomics.
Bioessays. 2013 May;35(5):436-42. doi: 10.1002/bies.201200174.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23450659/>

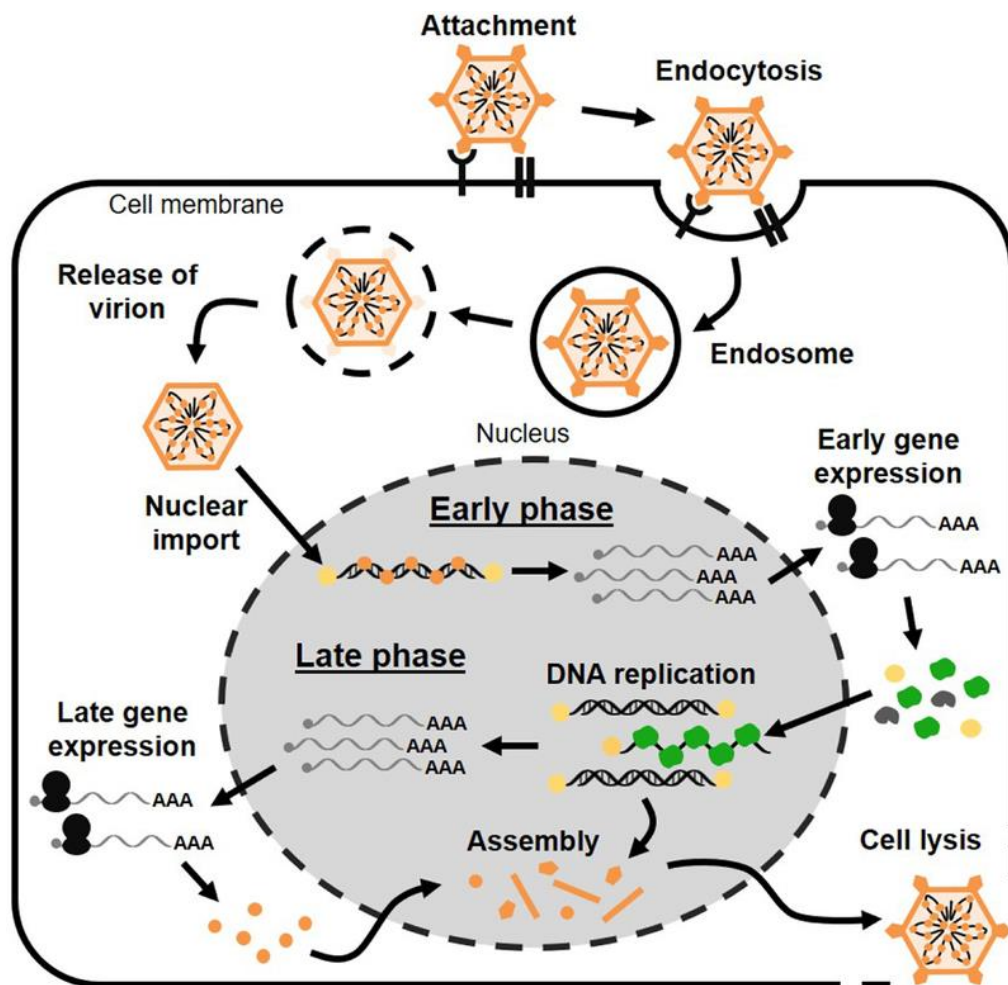
Liang G, Bushman FD.
The human virome: assembly, composition and host interactions.
Nat Rev Microbiol. 2021 Aug;19(8):514-527. doi: 10.1038/s41579-021-00536-5.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8008777/>

Santiago-Rodriguez TM, Hollister EB.
Potential Applications of Human Viral Metagenomics and Reference Materials: Considerations for Current and Future Viruses.
Appl Environ Microbiol. 2020 Oct 28;86(22):e01794-20. doi: 10.1128/AEM.01794-20
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7642086/>

²⁷⁴ Charman M, Herrmann C, Weitzman MD.
Viral and cellular interactions during adenovirus DNA replication.
FEBS Lett. 2019;593(24):3531-3550. doi:10.1002/1873-3468.13695
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6928415/>

Murali VK, Ornelles DA, Gooding LR, et al.
Adenovirus death protein (ADP) is required for lytic infection of human lymphocytes.
J Virol. 2014;88(2):903-912. doi:10.1128/JVI.01675-13
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC3911668/>

Nemerow G, Flint J.
Lessons learned from adenovirus (1970-2019).
FEBS Lett. 2019 Dec;593(24):3395-3418. doi: 10.1002/1873-3468.13700.
<https://doi.org/10.1002/1873-3468.13700>



Come già visto sopra, gli adenovirus sono classificati in sottogruppi (A-F) nell'uomo, ratti e scimmie e per l'oncogenicità nei roditori.

Gli adenovirus della specie C (sierotipi Ad1, 2, 5 e 6) sono prevalentemente associati ad infezioni sintomatiche dei tratti respiratori superiore e inferiore, tuttavia possono presentare anche un'infezione persistente caratterizzata dal rilascio virale intermittente nelle feci a distanza di tempo dalla scomparsa del virus a livello nasofaringeo.

I primi studi si erano focalizzati sull'isolamento da prelievi di tessuti tonsillari e di adenoidi umani per le colture. In maniera inaspettata, i tessuti prelevati non producevano virus infettivi immediatamente dopo il prelievo ma a distanza di settimane e mesi dopo.

Le osservazioni che i tessuti tonsillari e delle adenoidi contenenti adenovirus non portano alla produzione di virus infettivi, ha indotto i ricercatori ad affermare che questi tessuti insediano il virus per periodi di tempo lunghi.

Studi successivi si sono focalizzati sui tipi di cellule che presentano specie di adenovirus di tipo C persistenti o latenti e hanno suggerito che i linfociti sono la maggiore riserva dell'infezione da adenovirus.²⁷⁵

²⁷⁵ Garnett CT, Talekar G, Mahr JA, et al.
Latent species C adenoviruses in human tonsil tissues.
J Virol. 2009;83(6):2417-2428. doi:10.1128/JVI.02392-08
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC2648257/>

Zhang Y, Huang W, Ornelles DA, Gooding LR.
Modeling adenovirus latency in human lymphocyte cell lines.
J Virol. 2010 Sep;84(17):8799-810. doi: 10.1128/JVI.00562-10.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC2919008/>

Andiman WA, Miller G.

Nell'infezione persistente, una quantità minima di virus può essere rilasciata durante l'infezione senza danneggiare le cellule, mentre nell'infezione latente il virus rimane nelle cellule per lungo tempo senza alcun rilascio ma l'infezione litica potrebbe emergere tardivamente nell'infezione.²⁷⁶
Sebbene sia raramente rilevato nei linfociti del sangue periferico²⁷⁷, l'adenovirus si trova frequentemente nei linfociti che risiedono negli organi linfoidi dell'orofaringe²⁷⁸ e dell'intestino²⁷⁹.

Persistent infection with adenovirus types 5 and 6 in lymphoid cells from humans and woolly monkeys.
J Infect Dis. 1982 Jan;145(1):83-8. doi: 10.1093/infdis/145.1.83.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6274968/>

Dickherber ML, Garnett-Benson C.
NAD-linked mechanisms of gene de-repression and a novel role for CtBP in persistent adenovirus infection of lymphocytes.
Virol J. 2019 Dec 21;16(1):161. doi: 10.1186/s12985-019-1265-y.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC6925507/>

²⁷⁶ King CR, Zhang A, Mymryk JS.
The Persistent Mystery of Adenovirus Persistence.
Trends Microbiol. 2016 May;24(5):323-324. doi: 10.1016/j.tim.2016.02.007.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26916790/>

Traylen CM, Patel HR, Fondaw W, et al.
Virus reactivation: a panoramic view in human infections.
Future Virol. 2011;6(4):451-463. doi:10.2217/fvl.11.21
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC3142679/>

²⁷⁷ Durepaire N, Rogez JP, Verdier M, Rogez S, Weinbreck P, Denis F.
Detection of adenovirus DNA by polymerase chain reaction in peripheral blood lymphocytes from HIV-infected patients and a control group: preliminary results.
J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol. 1997 Feb 1;14(2):189-90. doi: 10.1097/00042560-199702010-00015.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9052731/>

Flomenberg P, Gutierrez E, Piaskowski V, Casper JT.
Detection of adenovirus DNA in peripheral blood mononuclear cells by polymerase chain reaction assay.
J Med Virol. 1997 Mar;51(3):182-8. doi: 10.1002/(sici)1096-9071(199703)51:3<182::aid-jmv7>3.0.co;2-2.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9139081/>

Shike H, Shimizu C, Kanegaye J, Foley JL, Burns JC.
Quantitation of adenovirus genome during acute infection in normal children.
Pediatr Infect Dis J. 2005;24(1):29-33. doi:10.1097/01.inf.0000148882.97399.79
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC2891530/>

²⁷⁸ Garnett CT, Erdman D, Xu W, Gooding LR.
Prevalence and quantitation of species C adenovirus DNA in human mucosal lymphocytes.
J Virol. 2002;76(21):10608-10616. doi:10.1128/jvi.76.21.10608-10616.2002
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC136639/>

Garnett CT, Talekar G, Mahr JA, et al.
Latent species C adenoviruses in human tonsil tissues.
J Virol. 2009;83(6):2417-2428. doi:10.1128/JVI.02392-08
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC2648257/>

Proenca-Modena JL, Pereira Valera FC, Jacob MG, et al.
High rates of detection of respiratory viruses in tonsillar tissues from children with chronic adenotonsillar disease.
PLoS One. 2012;7(8):e42136. doi:10.1371/journal.pone.0042136
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC3411673/>

²⁷⁹ Roy S, Calcedo R, Medina-Jaszek A, Keough M, Peng H, Wilson JM.
Adenoviruses in lymphocytes of the human gastro-intestinal tract.
PLoS One. 2011;6(9):e24859. doi:10.1371/journal.pone.0024859
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC3184098/>

Kosulin K, et al
Persistence and reactivation of human adenoviruses in the gastrointestinal tract.
Clin Microbiol Infect. 2016 Apr;22(4):381.e1-381.e8. doi: 10.1016/j.cmi.2015.12.013.
[https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(15\)01039-3/fulltext](https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(15)01039-3/fulltext)

L'adenovirus può persistere nell'intestino da cui può essere eliminato nelle feci di individui asintomatici.²⁸⁰

La natura latente di tale infezione può riflettere un equilibrio tra replicazione virale e una risposta antivirale attiva, perché trattamenti immunosoppressivi, come quelli richiesti per il trapianto di cellule staminali ematopoietiche allogeniche, spesso portano a una replicazione incontrollata dell'adenovirus, con un rischio aumentato di malattia e morte per il ricevente delle cellule staminali.²⁸¹

La proteina adenovirale E1A, se espressa da sola nelle cellule umane non avvia la trasformazione neoplastica, ma in combinazione con altri processi può contribuire alla trasformazione cellulare.²⁸² Infatti, la linea cellulare trasformata HEK293 è stata creata attraverso l'integrazione e l'espressione dell'adenovirus E1A, insieme a E1B, in cellule aneuploidi isolate dal rene embrionale umano²⁸³. La trasformazione messa in atto da E1A avviene attraverso alterazioni epigenetiche globali, principalmente dell'acetilazione degli istoni con conseguente alterazione del ciclo cellulare.²⁸⁴

²⁸⁰ Kosulin K.

Intestinal HAdV Infection: Tissue Specificity, Persistence, and Implications for Antiviral Therapy. *Viruses*. 2019;11(9):804. Published 2019 Aug 30. doi:10.3390/v11090804
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6783822/>

[https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(15\)01039-3/fulltext](https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(15)01039-3/fulltext)

Fox JP, Hall CE, Cooney MK.

The Seattle Virus Watch. VII. Observations of adenovirus infections. *Am J Epidemiol*. 1977 Apr;105(4):362-86. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a112394.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/192073/>

²⁸¹ Radke JR, Cook JL.

Human adenovirus infections: update and consideration of mechanisms of viral persistence. *Curr Opin Infect Dis*. 2018;31(3):251-256. doi:10.1097/QCO.0000000000000451
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC6367924/>

Lion T.

Adenovirus infections in immunocompetent and immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev*. 2014;27(3):441-462. doi:10.1128/CMR.00116-13
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC4135893/>

Kosulin K, Berkowitsch B, Matthes S, et al.

Intestinal Adenovirus Shedding Before Allogeneic Stem Cell Transplantation Is a Risk Factor for Invasive Infection Post-transplant. *EBioMedicine*. 2018;28:114-119. doi:10.1016/j.ebiom.2017.12.030
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC5835548/>

Lion T.

Adenovirus persistence, reactivation, and clinical management. *FEBS Lett*. 2019 Dec;593(24):3571-3582. doi: 10.1002/1873-3468.13576.
<https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1873-3468.13576>

²⁸² Frisch SM, Mymryk JS.

Adenovirus-5 E1A: paradox and paradigm. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002 Jun;3(6):441-52. doi: 10.1038/nrm827.
<https://www.nature.com/articles/nrm827>

²⁸³ Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R.

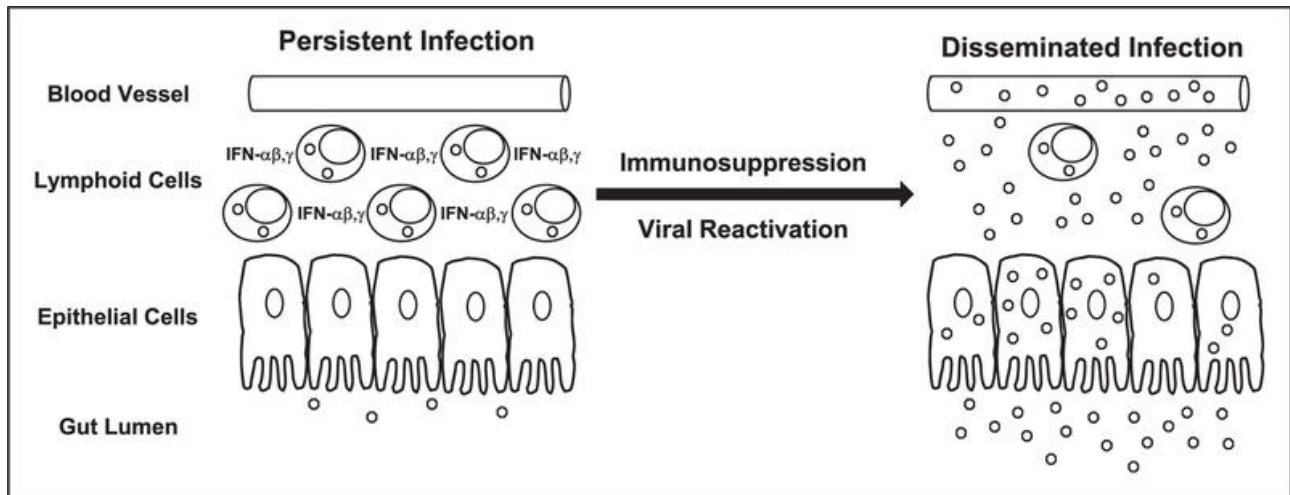
Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*. 1977 Jul;36(1):59-74. doi: 10.1099/0022-1317-36-1-59.
<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/0022-1317-36-1-59>

²⁸⁴ Lynch KL, Gooding LR, Garnett-Benson C, Ornelles DA, Avgousti DC.

Epigenetics and the dynamics of chromatin during adenovirus infections. *FEBS Lett*. 2019;593(24):3551-3570. doi:10.1002/1873-3468.13697
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6938402/>

Sibel Ciftci

Molecular mechanisms and epigenetic regulation of adenovirus genome structure in persistent infection
MSc Mol Biotech 12 003
https://www.ibg.uu.se/digitalAssets/147/c_147660-l_1-k_rapport-sibel-ciftci.pdf



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC6367924/>

Modello di persistenza e riattivazione di HAdV nell'intestino. Durante l'infezione iniziale da adenovirus, viene prodotto sufficiente interferone (IFN)- α , β e γ per creare uno stato di persistenza virale. L'adenovirus (o) si trova principalmente nelle cellule linfoidi dell'intestino ma è in gran parte assente dalle cellule epiteliali altamente permissive. Piccole quantità di virus vengono prodotte e versate nelle feci. L'immunosoppressione indotta dalla chemioterapia esaurisce le cellule linfoidi che producono IFN e reprime l'espressione di IFN nelle cellule linfoidi residue e in altre cellule ospiti. La repressione della risposta dell'IFN ospite consente una maggiore espressione del gene virale E1A, che, a sua volta, si traduce in una maggiore replicazione virale nelle cellule linfoidi e nelle cellule epiteliali associate ai tessuti linfoidi che possono produrre grandi quantità di virus. Questa amplificazione virale può comportare un aumento della diffusione virale fecale, una maggiore invasione dei tessuti e la diffusione dell'infezione per via ematica.

Risposte immunitarie agli antigeni adenovirali

Gli adenovirus sono altamente immunogenici.²⁸⁵ Attivano il sistema immunitario innato esprimendo i pattern molecolari associati ai patogeni (PAMP). I PAMP si legano ai recettori di riconoscimento dei patogeni sulle cellule ospiti, comprese quelle del sistema immunitario innato, avviando così la produzione di citochine proinfiammatorie e la differenziazione delle cellule dendritiche immature in cellule professionali presentanti l'antigene²⁸⁶.

È stato dimostrato che la somministrazione sistemica di alte dosi di vettori AdHu5 nei topi²⁸⁷ o nelle scimmie²⁸⁸ innesca il rilascio rapido di IL-6, IL-12 e TNF- α , e l'accumulo di macrofagi trasdotti e cellule dendritiche nei tessuti linfatici. È stato dimostrato inoltre che la maturazione delle cellule dendritiche indotta da adenovirus è NF- κ B-dipendente²⁸⁹. Uno studio ha descritto l'attivazione di cellule dendritiche legate alla regione a filamento β della

²⁸⁵ Tatsis N, Ertl HC.

Adenoviruses as vaccine vectors.

Mol Ther. 2004 Oct;10(4):616-29. doi: 10.1016/j.ymthe.2004.07.013.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC7106330/>

²⁸⁶ Medzhitov R, Janeway C Jr.

Innate immune recognition: mechanisms and pathways.

Immunol Rev. 2000 Feb;173:89-97. doi: 10.1034/j.1600-065x.2000.917309.x.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10719670/>

²⁸⁷ Zhang Y, Chirmule N, Gao GP, Qian R, Croyle M, Joshi B, Tazelaar J, Wilson JM.

Acute cytokine response to systemic adenoviral vectors in mice is mediated by dendritic cells and macrophages.

Mol Ther. 2001 May;3(5 Pt 1):697-707. doi: 10.1006/mthe.2001.0329.

<https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S1525-0016%2801%2990329-6>

²⁸⁸ Schnell MA, Zhang Y, Tazelaar J, Gao GP, Yu QC, Qian R, Chen SJ, Varnavski AN, LeClair C, Raper SE, Wilson JM.

Activation of innate immunity in nonhuman primates following intraportal administration of adenoviral vectors.

Mol Ther. 2001 May;3(5 Pt 1):708-22. doi: 10.1006/mthe.2001.0330.

<https://doi.org/10.1006/mthe.2001.0330>

²⁸⁹ Morelli AE, Larregina AT, Ganster RW, Zahorchak AF, Plowey JM, Takayama T, Logar AJ, Robbins PD, Falo LD, Thomson AW.

Recombinant adenovirus induces maturation of dendritic cells via an NF- κ B-dependent pathway.

J Virol. 2000 Oct;74(20):9617-28. doi: 10.1128/jvi.74.20.9617-9628.2000.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC112394/>

protuberanza della fibra ²⁹⁰, mentre un altro studio ha mostrato l'attivazione di cellule dendritiche legate a meccanismi autocrini mediati dal TNF- α , in cui il TNF- α indotto dalla sequenza [RGD](#) all'interno della base del pentone ha guidato la differenziazione delle cellule dendritiche immature ²⁹¹.

Le risposte immunitarie adattative sono dirette sia agli antigeni precoci che tardivi dell'adenovirus. Gli anticorpi neutralizzanti il virus indotti da infezioni adenovirali o dalla somministrazione di vettori adenovirali sono diretti principalmente contro le anse superficiali dell'esone virale ²⁹². Sono state riscontrate cellule T CD4⁺ verso gli antigeni adenovirali nell'uomo ed è stato dimostrato che le loro frequenze diminuiscono con l'età. Le cellule T CD4⁺, che sono principalmente di tipo Th1, reagiscono in modo crociato tra diversi sierotipi adenovirali ²⁹³.

Negli animali da esperimento, l'adenovirus e i vettori adenovirali inducono risposte dei linfociti T CD8⁺ a diverse proteine strutturali. I linfociti T CD8⁺ derivati dall'uomo e dal topo reagiscono in modo incrociato tra sierotipi umani e tra sierotipi umani e di scimmia ²⁹⁴, come ci si aspetterebbe considerando l'ampia omologia di sequenza dei loro antigeni bersaglio.

Difesa dell'ospite contro l'entrata dell'adenovirus e la perdita del rivestimento

I vertebrati si difendono dai virus mediante le cellule immunitarie inclusi macrofagi, DC, cellule natural killer e una serie di cellule B e T. Queste cellule rilevano ed eliminano gli agenti estranei, rilasciano segnali chimici diffusibili, innescano reazioni di difesa in altre cellule e producono anticorpi neutralizzanti i patogeni.

Nel caso degli AdV (adenovirus), questa difesa dà origine a un'immunità cellulare e umorale di lunga durata, protegge l'uomo dalle infezioni ricorrenti e impedisce la riacutizzazione di infezioni persistenti. ²⁹⁵ (Figura sotto).

²⁹⁰ Molinier-Frenkel V, Prévost-Blondel A, Hong SS, Lengagne R, Boudaly S, Magnusson MK, Boulanger P, Guillet JG. The maturation of murine dendritic cells induced by human adenovirus is mediated by the fiber knob domain. *J Biol Chem.* 2003 Sep 26;278(39):37175-82. doi: 10.1074/jbc.M303496200. [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(20\)83273-6/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(20)83273-6/fulltext)

²⁹¹ Philpott NJ, Nociari M, Elkon KB, Falck-Pedersen E. Adenovirus-induced maturation of dendritic cells through a PI3 kinase-mediated TNF-alpha induction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Apr 20;101(16):6200-5. doi: 10.1073/pnas.0308368101. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC395946/>

²⁹² Wohlfart C. Neutralization of adenoviruses: kinetics, stoichiometry, and mechanisms. *J Virol.* 1988 Jul;62(7):2321-8. doi: 10.1128/JVI.62.7.2321-2328.1988. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC253388/>

Hong SS, Habib NA, Franqueville L, Jensen S, Boulanger PA. Identification of adenovirus (ad) penton base neutralizing epitopes by use of sera from patients who had received conditionally replicative ad (add1520) for treatment of liver tumors. *J Virol.* 2003 Oct;77(19):10366-75. doi: 10.1128/jvi.77.19.10366-10375.2003. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC228409/>

²⁹³ Olive M, Eisenlohr L, Flomenberg N, Hsu S, Flomenberg P. The adenovirus capsid protein hexon contains a highly conserved human CD4⁺ T-cell epitope. *Hum Gene Ther.* 2002 Jul 1;13(10):1167-78. doi: 10.1089/104303402320138952. <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/104303402320138952>

²⁹⁴ Fitzgerald JC, Gao GP, Reyes-Sandoval A, Pavlakis GN, Xiang ZQ, Wlazlo AP, Giles-Davis W, Wilson JM, Ertl HC. A simian replication-defective adenoviral recombinant vaccine to HIV-1 gag. *J Immunol.* 2003 Feb 1;170(3):1416-22. doi: 10.4049/jimmunol.170.3.1416. <https://www.jimmunol.org/content/170/3/1416.long>

²⁹⁵ Lion T. Adenovirus infections in immunocompetent and immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev.* 2014 Jul;27(3):441-62. doi: 10.1128/CMR.00116-13. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4135893/>

Lion T. Adenovirus persistence, reactivation, and clinical management. *FEBS Lett.* 2019 Dec;593(24):3571-3582. doi: 10.1002/1873-3468.13576. <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1873-3468.13576>

Blocco della rimozione del rivestimento da parte dell' α -Defensina umana 5

I vertebrati hanno sviluppato vari peptidi antimicrobici (AMP) contro gli agenti patogeni invasori classificati in due categorie principali, le catelicidine (LL-37) e le defensine.²⁹⁶ La famiglia delle catelicidine comprende piccoli peptidi cationici, sintetizzati e immagazzinati nei neutrofili e nei macrofagi. Fanno parte del sistema immunitario innato e sono generalmente proteine proteoliticamente attive. La catelicidina LL-37, un AMP α -elicoidale, si lega alle glicoproteine virali e previene l'ingresso delle cellule virali²⁹⁷. Le defensine invece sono una famiglia di AMP costituiti da 6 residui di cisteina che formano 3 legami disolfuro e contengono tre sottofamiglie: α -defensine, β -defensine e θ -defensine che differiscono nella disposizione dei legami disolfuro. Questi si trovano nei tessuti coinvolti nella risposta immunitaria dell'ospite contro le infezioni microbiche e sono abbondanti nei granuli dei leucociti.

Le defensine sono piccoli (da 18 a 45 residui) peptidi anfifilici cationici con effetti antimicrobici ad ampio raggio, colpiscono sia le membrane dei batteri e dei virus con e senza involucro, come il papillomavirus e gli AdV.

Le α -defensine sono piccoli peptidi cationici ricchi di cisteine prodotte dalle cellule di Paneth nell'epitelio intestinale e dai neutrofili, mentre le β -defensine vengono prodotte dalle cellule epiteliali in un ambiente infiammatorio.²⁹⁸

Cederwall S, Pählman LI.

Respiratory adenovirus infections in immunocompetent and immunocompromised adult patients.
Epidemiol Infect. 2020 Jan 3;147:e328. doi: 10.1017/S0950268819002176.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7006015/>

Kosulin K, et al

Persistence and reactivation of human adenoviruses in the gastrointestinal tract.
Clin Microbiol Infect. 2016 Apr;22(4):381.e1-381.e8. doi: 10.1016/j.cmi.2015.12.013.
<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.12.013>

Nia Tatsis, Hildegund C.J. Ertl,

Adenoviruses as vaccine vectors,
Molecular Therapy, 10 (4), 2004, 616-629, ISSN 1525-0016, <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2004.07.013>.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1525001604013425>

²⁹⁶ Findlay F, Proudfoot L, Stevens C, Barlow PG.

Cationic host defense peptides; novel antimicrobial therapeutics against Category A pathogens and emerging infections.
Pathog Glob Health. 2016 Jun-Jul;110(4-5):137-47. doi: 10.1080/20477724.2016.1195036.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5072117/>

Zhang QY, Yan ZB, Meng YM, et al.

Antimicrobial peptides: mechanism of action, activity and clinical potential.
Mil Med Res. 2021;8(1):48. Published 2021 Sep 9. doi:10.1186/s40779-021-00343-2
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8425997/>

²⁹⁷ Fabisiak A, Murawska N, Fichna J.

LL-37: Cathelicidin-related antimicrobial peptide with pleiotropic activity.
Pharmacol Rep. 2016 Aug;68(4):802-8. doi: 10.1016/j.pharep.2016.03.015.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27117377/>

²⁹⁸ Holly MK, Diaz K, Smith JG.

Defensins in Viral Infection and Pathogenesis.
Annu Rev Virol. 2017 Sep 29;4(1):369-391. doi: 10.1146/annurev-virology-101416-041734.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28715972/>

Wilson SS, Wiens ME, Holly MK, Smith JG.

Defensins at the Mucosal Surface: Latest Insights into Defensin-Virus Interactions.
J Virol. 2016 May 12;90(11):5216-5218. doi: 10.1128/JVI.00904-15
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4934752/>

Diaz K, Hu CT, Sul Y, Bromme BA, Myers ND, Skorohodova KV, Gounder AP, Smith JG.

Defensin-driven viral evolution.
PLoS Pathog. 2020 Nov 24;16(11):e1009018. doi: 10.1371/journal.ppat.1009018.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7723274/>

Xu D, Lu W.

Defensins: A Double-Edged Sword in Host Immunity.

Esistono diversi modi e determinanti del legame della defensina ai virus. In primo luogo, le defensine interagiscono con i doppi strati lipidici grazie alla presenza di fosfolipidi carichi negativamente.

Quattro delle α -defensine (HNP1-3 e HD5) e HBD3 sono lectine in grado di legarsi alle glicoproteine e ai glicolipidi. Inoltre, le defensine possono agire attraverso interazioni proteina-DNA o proteina-proteina. Poiché sono cationiche e anfipatiche, le defensine possono legarsi ai ligandi sia attraverso interazioni ioniche che idrofobiche. L'oligomerizzazione della defensina, in particolare per le α -defensine, e la stabilità conformazionale conferita dai legami disolfuro influiscono ulteriormente sul legame.

Ognuna di queste interazioni contribuisce all'azione antivirale delle defensine che dipende dalla specifica combinazione virus/defensina sotto esame. Inoltre, le interazioni dirette tra le defensine e i componenti strutturali dei virus, in particolare il doppio strato lipidico dei virus inglobati, possono distruggere o destabilizzare il virus e renderlo non infettivo.

Al contrario, numerose defensine generano strutture multimeriche, che sono state rilevate sia nelle strutture cristalline che nella disposizione spaziale. Le interazioni tra i peptidi della defensina e i virus sono in grado di causare l'aggregazione dei virioni. Ad esempio, è stato dimostrato per IAV da parte di HNP1 e HNP2 e per HAdV-5 e BKV con HD5. Allo stesso modo, il legame della defensina con le proteine virali potrebbe bloccare le interazioni dei recettori fondamentali per l'ingresso del virus nella cellula.

HNP1-3, HD5 e HBD3, ad esempio, si legano con la glicoproteina virale ricombinante (gB) di HSV-1 e HSV-2 per prevenire l'adesione, mentre HNP4 e HD6 inibiscono l'infezione da HSV-1 e HSV-2 ma non possono interagire con le glicoproteine virali. HNP4 e HD6 si legano all'eparansolfato, il recettore per l'attacco, così come ad altri glicosaminoglicani. HBD3 è l'unica defensina in grado di interagire sia con i recettori delle cellule ospiti che con le glicoproteine virali.²⁹⁹

L'azione antimicrobica delle defensine è importante anche nella prevenzione e cura delle infezioni secondarie o co-infezioni batteriche. L'infezione secondaria o le co-infezioni di altri agenti patogeni dannosi sono state riportate per virus che infettano il sistema respiratorio come SARS, MERS e influenza spagnola. La possibilità di infezioni batteriche o fungine secondarie aumenta quando il paziente è affetto da una immunità compromessa.

La pandemia di influenza spagnola è stata segnalata per le co-infezioni di specie batteriche gravi, come anche le co-infezioni significative da batteri bacilli negativi e da *Candida* nel tratto respiratorio inferiore sono state riportate nell'infezione da virus della SARS, e l'infezione respiratoria polmonare da COVID-19 predispone a infezioni batteriche e virali come *Streptococcus pneumoniae*, *S. aureus*, *Escherichia coli* *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus* e Influenza.

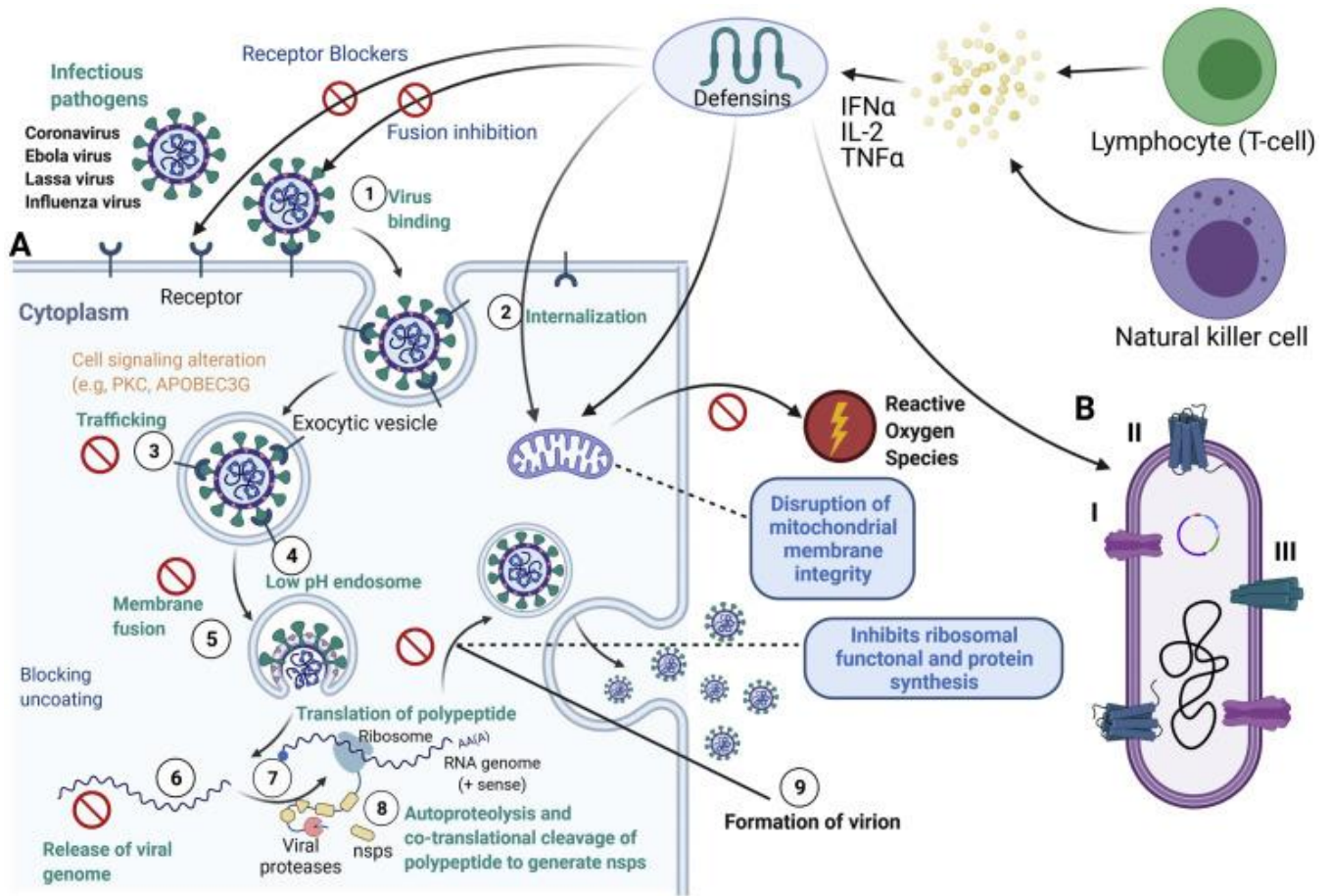
Un'altra minaccia nascosta è l'aumento della resistenza multifarmaco nelle infezioni secondarie che causano le specie batteriche. A questo proposito, le defensine possono essere utili per la loro vasta gamma di attività antimicrobiche, stimolazioni immunitarie e come farmaci non resistenti.³⁰⁰

Front Immunol. 2020;11:764. Published 2020 May 7. doi:10.3389/fimmu.2020.00764
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7224315/>

²⁹⁹ Solanki SS, Singh P, Kashyap P, Sansi MS, Ali SA.
Promising role of defensins peptides as therapeutics to combat against viral infection.
Microb Pathog. 2021 Jun;155:104930. doi: 10.1016/j.micpath.2021.104930.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8084285/>

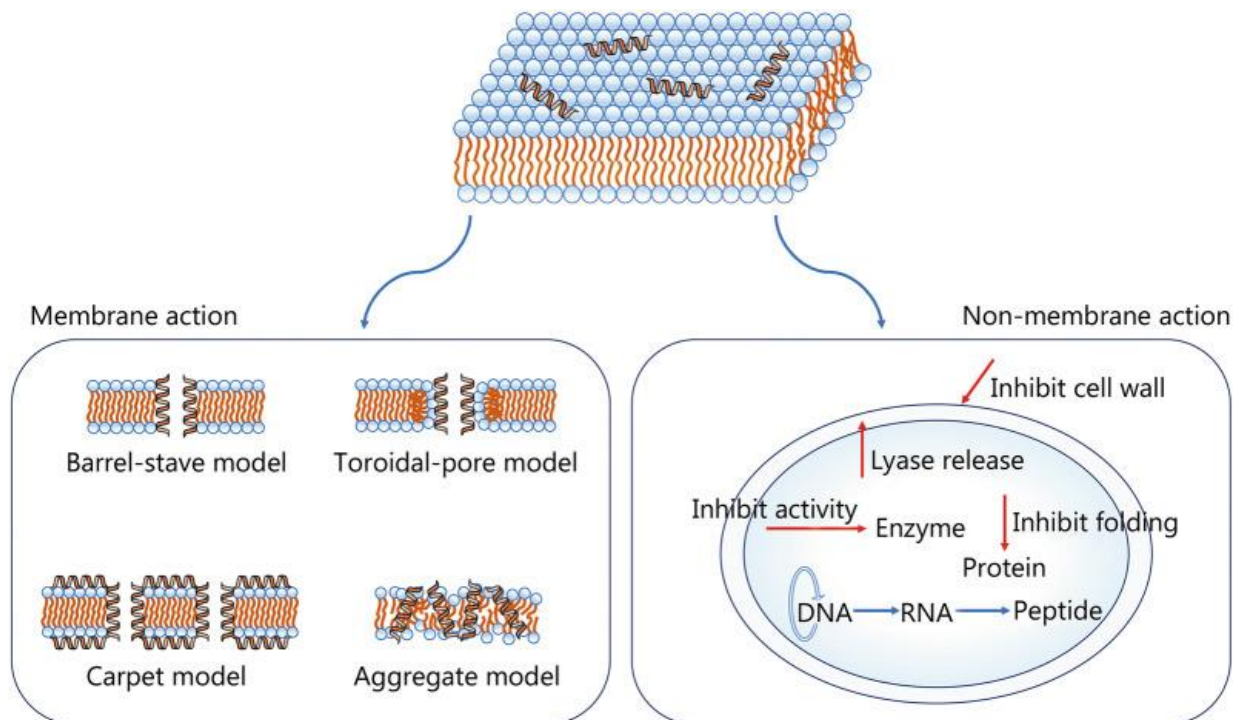
Fruitwala S, El-Naccache DW, Chang TL.
Multifaceted immune functions of human defensins and underlying mechanisms.
Semin Cell Dev Biol. 2019 Apr;88:163-172. doi: 10.1016/j.semcd.2018.02.023.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6485945/pdf/nihms-1524078.pdf>

³⁰⁰ Solanki SS, Singh P, Kashyap P, Sansi MS, Ali SA.
Promising role of defensins peptides as therapeutics to combat against viral infection.
Microb Pathog. 2021;155:104930. doi:10.1016/j.micpath.2021.104930
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8084285/>



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8084285/>

A. Azione antivirale delle defensine e come implica l'inibizione delle infezioni virali con e senza. B. Diverse modalit  di azione come peptide antimicrobico nella cellula batterica. (vedi testo dell'articolo)



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8425997/>

Modelli di meccanismi antibatterici degli AMP. Il meccanismo battericida diretto degli AMP viene eseguito interagendo con membrane caricate negativamente, con conseguente aumento della permeabilità della membrana, lisi della membrana cellulare o rilascio di contenuto intracellulare, che alla fine porta alla morte cellulare. Esistono quattro modelli principali di formazione dei pori della membrana, vale a dire il modello a doghe a botte, il modello a pori toroidali, il modello a tappeto e il modello aggregato. Dopo che gli AMP sono penetrati nella membrana fosfolipidica, le loro regioni idrofobiche si combinano con le regioni idrofobiche interne del doppio strato fosfolipidico, mentre le loro regioni idrofile sono esposte all'esterno. Un altro meccanismo battericida è che gli AMP penetrano nel citoplasma e interagiscono con sostanze intracellulari, come inibendo DNA, RNA e sintesi proteica, inibendo il ripiegamento delle proteine, inibendo l'attività enzimatica e la sintesi della parete cellulare e promuovendo il rilascio di liasi per distruggere le strutture cellulari. AMP peptidi antimicrobici

Nel caso particolare degli adenovirus, l' α -defensina 5 (α HD5) umana limita la rimozione del rivestimento di AdV-C5 stabilizzando i capsidi durante l'ingresso³⁰¹. AdV-A, -B1, -B2, -C e -E sono suscettibili, mentre le specie D e F resistono alle α -defensine³⁰². L' α HD5 si lega alla base del pentone e alla fibra di AdV-C5 e aumenta la rigidità della regione del vertice senza influenzare il doppio o il triplo asse.³⁰³

Gli AdV rivestiti con defensina non spongono la proteina VI o non rompono gli endosomi ma sono scortati ai lisosomi per la degradazione³⁰⁴. Il fatto che AdV-C5 non eluda il legame della α HD5 suggerisce che l' α HD5 o riconosce un pattern molecolare associato al patogeno che è difficile da mutare senza eliminare le funzioni essenziali del virione, o è vantaggioso per il virus. Quest'ultimo potrebbe essere quello di precludere l'infezione da AdV in un ambiente infiammatorio ricco di neutrofili, dove il legame dell' α HD5 con l'AdV smorza la risposta immunitaria adattativa e quindi impedisce l'eliminazione del virus.

Una recente ricerca ha studiato come la proteina 1 dei neutrofili umani (HNP-1), un' α -defensina che influenza le risposte immunitarie innate dirette e indirette a una serie di agenti patogeni, influisce sulla risposta innata dei fagociti umani a tre specie/tipi di HAdV (HAdV-C5, -D26, -B35) utilizzati come vettori vaccinali³⁰⁵ ed è emerso che HNP-1 si lega ai capsidi, reindirizza HAdV-C5, -D26, -B35 al recettore Toll-like 4 (TLR4), il quale porta all'interiorizzazione, a una risposta all'inflammasoma mediata da NLRP3 e al rilascio di IL-1 β senza una marcata distruzione dell'integrità della membrana plasmatica. Lo stesso gruppo di ricerca aveva già dimostrato un meccanismo analogo per la lattoferrina, mediante il quale questa glicoproteina è in grado di aumentare la captazione dell'HAdV e indurre la maturazione dei fagociti: l'internalizzazione mediata da TLR4 del complesso HAdV-lattoferrina attiva una risposta associata a NLRP3 con il rilascio di citochine e altera in maniera transitoria

³⁰¹ Smith JG, Nemerow GR.

Mechanism of adenovirus neutralization by Human alpha-defensins.
Cell Host Microbe. 2008 Jan 17;3(1):11-9. doi: 10.1016/j.chom.2007.12.001.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.12.001>

³⁰² Smith JG, Silvestry M, Lindert S, Lu W, Nemerow GR, Stewart PL.

Insight into the mechanisms of adenovirus capsid disassembly from studies of defensin neutralization.
PLoS Pathog. 2010 Jun 24;6(6):e1000959. doi: 10.1371/journal.ppat.1000959.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2891831/>

³⁰³ Flatt JW, Kim R, Smith JG, Nemerow GR, Stewart PL.

An intrinsically disordered region of the adenovirus capsid is implicated in neutralization by human alpha defensin 5.
PLoS One. 2013 Apr 19;8(4):e61571. doi: 10.1371/journal.pone.0061571.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3631211/>

Snijder J, Reddy VS, May ER, Roos WH, Nemerow GR, Wuite GJ.

Integrin and defensin modulate the mechanical properties of adenovirus.
J Virol. 2013 Mar;87(5):2756-66. doi: 10.1128/JVI.02516-12.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3571403/>

³⁰⁴ Smith JG, Nemerow GR.

Mechanism of adenovirus neutralization by Human alpha-defensins.
Cell Host Microbe. 2008 Jan 17;3(1):11-9. doi: 10.1016/j.chom.2007.12.001.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.12.001>

³⁰⁵ Eichholz K, Tran TH, Chéneau C, Tran TTP, Paris O, Pugniere M, Kremer EJ.

Adenovirus- α -Defensin Complexes Induce NLRP3-Associated Maturation of Human Phagocytes via Toll-Like Receptor 4 Engagement.
J Virol. 2022 Mar 23;96(6):e0185021. doi: 10.1128/jvi.01850-21.
<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.10.26.465098v1.full.pdf>

l'integrità della membrana plasmatica, senza causare la morte cellulare.³⁰⁶ Il coinvolgimento dell'asse HAdV-HNP-1 (o lattoferrina)-TLR4-NLRP3 può orientare le risposte delle cellule T verso un fenotipo Th1, ed è ipotizzabile che l'HNP-1 agisca come un adiuvante naturale aumentando la risposta innata e di conseguenza l'ampiezza della risposta adattativa ai patogeni intracellulari.

Preclusione dell'evasione endosomiale mediante il complemento

Il complemento è un sistema di difesa innato ben conservato che rileva i patogeni. La via classica viene attivata quando l'adenovirus (AdV) viene miscelato con plasma umano e gli anticorpi legano e opsonizzano i virioni con componenti del complemento, come C1q, C3 e C4³⁰⁷. Le particelle opsonizzate vengono assorbite dalle cellule attraverso i recettori del complemento, indipendentemente da CAR (Coxsackie and adenovirus receptor) e integrine³⁰⁸.

Il complemento, gli anticorpi naturali dell'immunoglobulina M e i recettori scavenger (SR) precludono la trasduzione * epatica eliminando l'AdV attraverso le cellule di Kupffer³⁰⁹.

** La capacità di un vettore virale o non virale di entrare in una cellula e determinare un effetto biologico (in generale l'espressione di un gene esogeno) è detto trasduzione*

La deposizione di C4b su AdV non influisce sul legame del virione o sull'assorbimento nelle cellule, ma inibisce il rilascio di fibre e l'esposizione alla proteina VI e impedisce la penetrazione endosomiale e l'ingresso del virus nel citosol³¹⁰. Nei topi, il knockout di C4 o la preclusione del legame del complemento all'AdV da parte di fattori di coagulazione del sangue migliora la trasduzione dell'AdV negli epatociti³¹¹.

³⁰⁶ Chéneau C, Eichholz K, Tran TH, Tran TTP, Paris O, Henriquet C, Bajramovic JJ, Pugniere M, Kremer EJ. Lactoferrin Retargets Human Adenoviruses to TLR4 to Induce an Abortive NLRP3-Associated Pyroptotic Response in Human Phagocytes. *Front Immunol.* 2021 May 20;12:685218. doi: 10.3389/fimmu.2021.685218 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8173049/>

³⁰⁷ Carlisle RC, Di Y, Cerny AM, Sonnen AF, Sim RB, Green NK, Subr V, Ulbrich K, Gilbert RJ, Fisher KD, Finberg RW, Seymour LW. Human erythrocytes bind and inactivate type 5 adenovirus by presenting Coxsackie virus-adenovirus receptor and complement receptor 1. *Blood.* 2009 Feb 26;113(9):1909-18. doi: 10.1182/blood-2008-09-178459. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2651010/>

³⁰⁸ Cotter MJ, Zaiss AK, Muruve DA. Neutrophils interact with adenovirus vectors via Fc receptors and complement receptor 1. *J Virol.* 2005 Dec;79(23):14622-31. doi: 10.1128/JVI.79.23.14622-14631.2005. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1287577/>

Tsai V, Varghese R, Ravindran S, Ralston R, Vellekamp G. Complement component C1q and anti-hexon antibody mediate adenovirus infection of a CAR-negative cell line. *Viral Immunol.* 2008 Dec;21(4):469-76. doi: 10.1089/vim.2008.0032. PMID: 19115936. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19115936/>

³⁰⁹ Xu Z, Tian J, Smith JS, Byrnes AP. Clearance of adenovirus by Kupffer cells is mediated by scavenger receptors, natural antibodies, and complement. *J Virol.* 2008 Dec;82(23):11705-13. doi: 10.1128/JVI.01320-08. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2583672/>

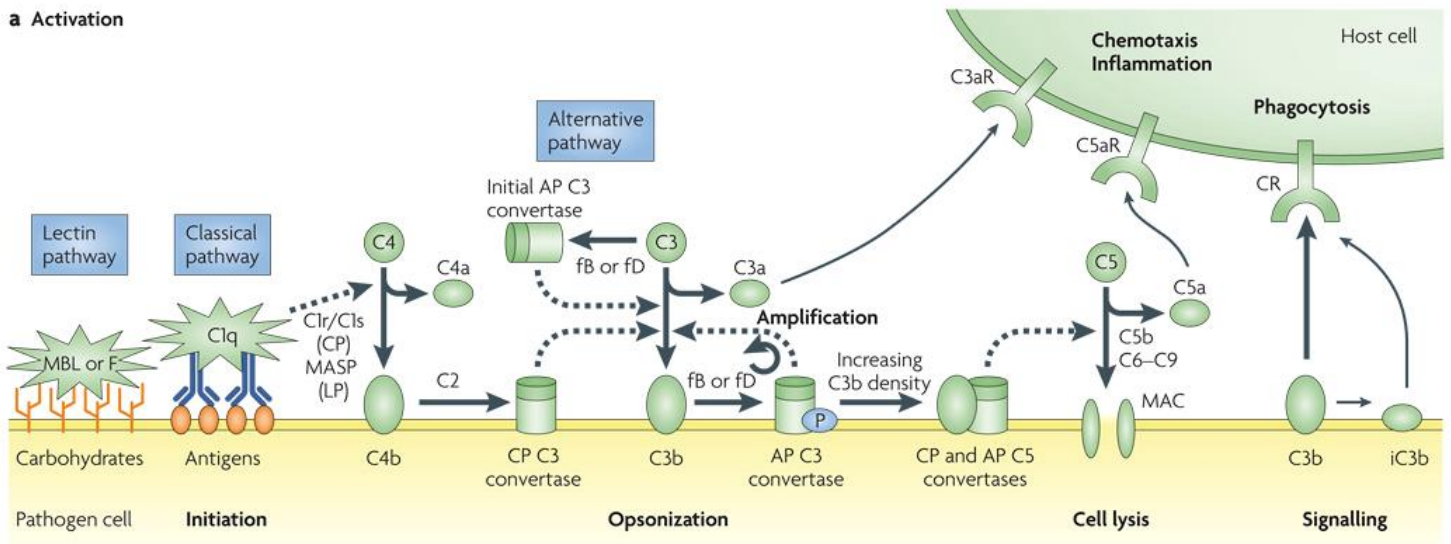
³¹⁰ Bottermann M, et al. Complement C4 Prevents Viral Infection through Capsid Inactivation. *Cell Host Microbe.* 2019 Apr 10;25(4):617-629.e7. doi: 10.1016/j.chom.2019.02.016. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6461443/>

³¹¹ Waddington SN, et al. Adenovirus serotype 5 hexon mediates liver gene transfer. *Cell.* 2008 Feb 8;132(3):397-409. doi: 10.1016/j.cell.2008.01.016. PMID: 18267072. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.016>

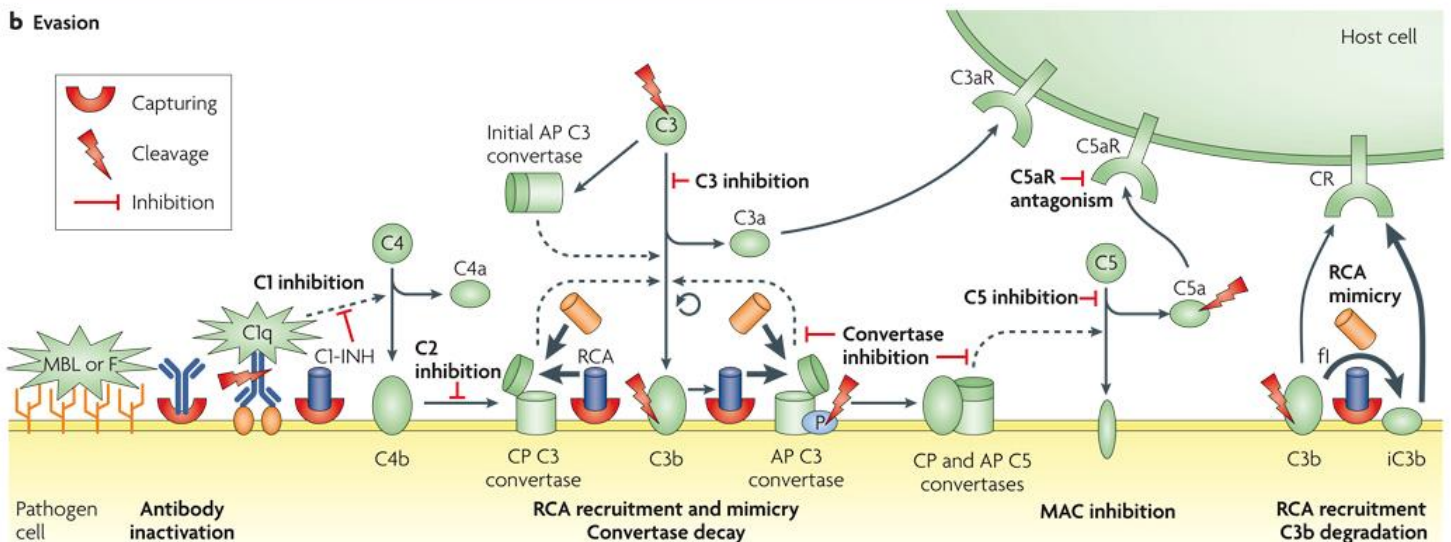
Doronin K, et al. Coagulation factor X activates innate immunity to human species C adenovirus. *Science.* 2012 Nov 9;338(6108):795-8. doi: 10.1126/science.1226625. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4762479/>

Questi risultati estendono i report precedenti che mostrano che il complemento C3 si lega ai virioni e attiva le risposte innate senza influenzare la penetrazione dei virioni negli endosomi³¹².
Ciò evidenzia l'importanza del sistema innato del complemento per la difesa sistemica contro l'AdV.³¹³

a Activation



b Evasion



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2814840/>

Attivazione ed elusione del complemento

a) Dopo l'attivazione del sistema del complemento da parte di complessi anticorpali (via classica (CP)), mannosio terminale (via della lectina (LP)) o per idrolisi spontanea e indotta da C3 (via alternativa (AP)), le convertasi C3 scindono C3 nei suoi frammenti attivi C3a e C3b. Il legame covalente di C3b (opsonizzazione) amplifica la cascata e media la fagocitosi e le risposte immunitarie adattative legandosi ai recettori del complemento (CR). L'accumulo di C3b depositato porta anche all'assemblaggio di convertasi C5 che attivano C5 in C5a e C5b. Mentre C5b avvia la formazione del complesso litico di attacco della membrana (MAC), le anafilattossine C3a e C5a inducono risposte pro-infiammatorie e chemiotattiche legandosi ai loro recettori (C3aR e C5aR). Sulle

³¹² Tam JC, Bidgood SR, McEwan WA, James LC. Intracellular sensing of complement C3 activates cell autonomous immunity. Science. 2014 Sep 5;345(6201):1256070. doi: 10.1126/science.1256070. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4172439/>

³¹³ Lambris JD, Ricklin D, Geisbrecht BV. Complement evasion by human pathogens. Nat Rev Microbiol. 2008;6(2):132-142. doi:10.1038/nrmicro1824 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2814840/>

superfici patogene, la properdina (P) induce e stabilizza la convertasi AP C3, che porta a una maggiore attività del complemento. **b)** I microrganismi hanno sviluppato molti modi per eludere le azioni del complemento. La soppressione dell'attivazione di CP può essere ottenuta intrappolando l'inibitore C1 endogeno (C1-INH) sulla superficie o inattivando gli anticorpi attraverso la cattura delle loro regioni Fc. Mentre il reclutamento di regolatori solubili catturando le proteine ospite è una strategia comune per compromettere le azioni del complemento a valle, alcuni virus producono anche imitazioni strutturali di questi regolatori. Inoltre, alcune proteine microbiche hanno attività simili al CD59 nel prevenire la formazione di MAC. L'inibizione diretta di C3, delle convertasi C3 e C5, del recettore C5 o C5a (C5aR) è una strategia importante dello *Staphylococcus aureus*. Infine, un insieme di diverse proteasi microbiche può degradare molti dei componenti cruciali del sistema del complemento. Queste proteasi agiscono direttamente o catturando e attivando una proteasi umana. Un elenco esteso di proteine di evasione del complemento può essere trovato in Informazioni supplementari S1 (tabella). L'aumento e la diminuzione dell'attività sono rappresentati rispettivamente da frecce spesse e sottili. F, ficolin; fB, fattore B; fD, fattore D; fI, fattore I, MASP, proteasi della serina associata a MBL; MBL, lectina legante il mannosio; RCA, regolatori di attivazione del complemento.

Uncoating (rimozione del rivestimento) catastrofico mediante anticorpi intracellulari

L'immunità adattativa e gli anticorpi limitano fortemente la diffusione sistemica di AdV. Gli anticorpi intracellulari veicolati nel citosol sui virioni in entrata forniscono un ulteriore livello di difesa contro l'AdV attraverso la proteina tripartita del recettore Fc dell'anticorpo ad alta affinità (TRIM) 21³¹⁴.

TRIM21 diventa K63-ubiquitinato, seguito dal reclutamento della proteina AAA-ATPasi p97/valosina, la quale dissocia il virione in subunità che possono essere degradate dal proteasoma³¹⁵.

Ciò porta all'esposizione del DNA virale al sensore del DNA citosolico cGAS e innesca una cascata di eventi di segnalazione immunitaria³¹⁶. Pertanto, TRIM21 fornisce protezione antivirale come parte della risposta immunitaria umorale.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4624778/>

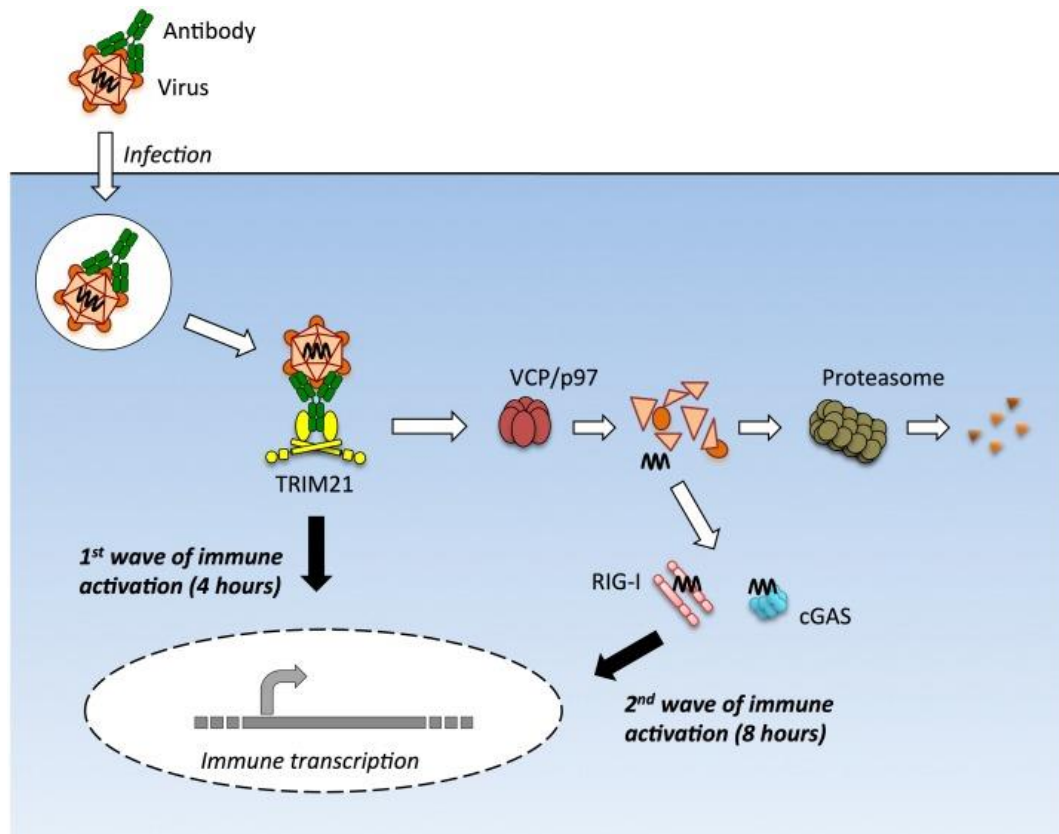
TRIM21 intercetta i virioni legati agli anticorpi durante l'infezione di cellule di vari lignaggi ematopoietici o non ematopoietici e media sia il sensing immunitario innato che la neutralizzazione post-ingresso. Al riconoscimento dell'anticorpo intracellulare, TRIM21 catalizza la formazione di catene di poliubiquitina legate a K63, che attivano direttamente i componenti delle vie di segnalazione NFκB, AP-1 e IRF3/5/7, risultando nella trascrizione dell'IFN di tipo I e di altri mediatori immunitari innati a 4 ore dopo l'infezione. In concomitanza con la segnalazione, TRIM21 recluta p97/VCP e il proteasoma per promuovere l'uncoating virale catastrofico prematuro e la degradazione delle proteine virali. Questo previene l'infezione produttiva ed espone i genomi virali dall'interno dei capsidi virali al citosol. I PRR citosolici, inclusi cGAS e RIG-I, rilevano quindi questi acidi nucleici virali liberi, attivando una seconda ondata di trascrizione immunitaria a 8 ore dall'infezione.

³¹⁴ Mallery DL, McEwan WA, Bidgood SR, Towers GJ, Johnson CM, James LC. Antibodies mediate intracellular immunity through tripartite motif-containing 21 (TRIM21). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Nov 16;107(46):19985-90. doi: 10.1073/pnas.1014074107. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2993423/>

³¹⁵ Hauler F, Mallery DL, McEwan WA, Bidgood SR, James LC. AAA ATPase p97/VCP is essential for TRIM21-mediated virus neutralization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Nov 27;109(48):19733-8. doi: 10.1073/pnas.1210659109. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3511720/>

Fletcher AJ, Mallery DL, Watkinson RE, Dickson CF, James LC. Sequential ubiquitination and deubiquitination enzymes synchronize the dual sensor and effector functions of TRIM21. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Aug 11;112(32):10014-9. doi: 10.1073/pnas.1507534112. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4538650/>

³¹⁶ Watkinson RE, McEwan WA, Tam JC, Vaysburd M, James LC. TRIM21 Promotes cGAS and RIG-I Sensing of Viral Genomes during Infection by Antibody-Opsonized Virus. *PLoS Pathog*. 2015 Oct 27;11(10):e1005253. doi: 10.1371/journal.ppat.1005253. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4624778/>



Ingresso nelle cellule immunitarie

Ingresso alterato nei macrofagi

I macrofagi proteggono l'ospite da stress, lesioni e agenti patogeni e sono funzionalmente adattati al loro ambiente tissutale. I macrofagi e altre APC utilizzano SR ([recettori scavengers](#)) per legarsi a molecole endogene ed estranee, comprese proteine, poliribonucleotidi, polisaccaridi e lipidi, nonché agenti patogeni che mostrano schemi ripetitivi. Essi endocitano le particelle di AdV e innescano reazioni infiammatorie ³¹⁷.

I macrofagi come le cellule di Kupffer residenti nel fegato e i macrofagi della zona marginale della milza rispondono alle particelle di AdV producendo citochine proinfiammatorie, come IFN di tipo I (IFN-I), IL-1 α , IL-6 e TNF ³¹⁸.

³¹⁷ Muruve DA.

The innate immune response to adenovirus vectors.

Hum Gene Ther. 2004 Dec;15(12):1157-66. doi: 10.1089/hum.2004.15.1157.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15684693/>

³¹⁸ Di Paolo NC, Miao EA, Iwakura Y, Murali-Krishna K, Aderem A, Flavell RA, Papayannopoulou T, Shayakhmetov DM.

Virus binding to a plasma membrane receptor triggers interleukin-1 alpha-mediated proinflammatory macrophage response in vivo.

Immunity. 2009 Jul 17;31(1):110-21. doi: 10.1016/j.immuni.2009.04.015.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2759279/>

Fejer G, Drechsel L, Liese J, Schleicher U, Ruzsics Z, Imelli N, Greber UF, Keck S, Hildenbrand B, Krug A, Bogdan C, Freudenberg MA.

Key role of splenic myeloid DCs in the IFN-alpha-beta response to adenoviruses in vivo.

PLoS Pathog. 2008 Nov;4(11):e1000208. doi: 10.1371/journal.ppat.1000208.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2576454/>

I macrofagi decodificano i virus mediante recettori di riconoscimento di pattern, inclusi i TLR, e producono IFN poco dopo l'esposizione a un virus³¹⁹. Ad esempio, gli AdV leganti il CD46 attivano il sensore del DNA endosomiale TLR9 di PBMC e DC plasmacitoidi e rilasciano IFN- γ ³²⁰.

I macrofagi hanno sistemi di difesa aggiuntivi oltre ai TLR. Le cellule simili ai macrofagi alveolari murini utilizzano SR-A6 per l'assorbimento di AdV-C2, C5, B35 e D26 ma non A31 o B3³²¹. SR-A6 è espresso su sottoinsiemi di macrofagi naïve residenti nei tessuti, inclusi i macrofagi alveolari polmonari³²² e si lega all'anello ipervariabile 1 di AdV-C e alla proteina esone AdV-D26 e -B35 (146). I virioni in arrivo spongono la proteina VI, interrompono la membrana endosomiale, si localizzano nell'NPC (nuclear pore complex) e trasportano il genoma del DNA nel nucleo. In maniera simile alle cellule epiteliali³²³, alcuni virioni veicolano in modo errato il loro genoma nel citosol e attivano la via cGAS/STING e la produzione di IFN- γ , IL-6 e IL-1 α maturo³²⁴. Pertanto, SR-A6 avverte l'organismo di un'infezione in corso innescando risposte innate dai macrofagi.

Attivazione dell'inflammasoma

AdV-C5 e B3 in entrata attivano l'inflammasoma NLRP3 nelle cellule THP-1 differenziate dal forbolo 12-miristato 13-acetato e nei macrofagi derivati da monociti umani, come indicato dalla secrezione di IL-1 β ³²⁵. L'AdV-C2_TS1 difettivo per la penetrazione, tuttavia, non innesca il rilascio di IL-1 β o di catepsina B endosomiale nel citosol.

³¹⁹ Hendrickx R, Stichling N, Koelen J, Kuryk L, Lipiec A, Greber UF.
Innate immunity to adenovirus.
Hum Gene Ther. 2014 Apr;25(4):265-84. doi: 10.1089/hum.2014.001.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3996939/>

³²⁰ Iacobelli-Martinez M, Nemerow GR.
Preferential activation of Toll-like receptor nine by CD46-utilizing adenoviruses.
J Virol. 2007 Feb;81(3):1305-12. doi: 10.1128/JVI.01926-06.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1797540/>

³²¹ Stichling N, et al
Lung macrophage scavenger receptor SR-A6 (MARCO) is an adenovirus type-specific virus entry receptor.
PLoS Pathog. 2018 Mar 9;14(3):e1006914. doi: 10.1371/journal.ppat.1006914.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5862501/>

³²² Maler MD, et al
Key Role of the Scavenger Receptor MARCO in Mediating Adenovirus Infection and Subsequent Innate Responses of Macrophages.
mBio. 2017 Aug 1;8(4):e00670-17. doi: 10.1128/mBio.00670-17. Erratum in: mBio. 2017 Sep 26;8(5):
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5539421/>

³²³ Wang IH, Suomalainen M, Andriasyan V, Kilcher S, Mercer J, Neef A, Luedtke NW, Greber UF.
Tracking viral genomes in host cells at single-molecule resolution.
Cell Host Microbe. 2013 Oct 16;14(4):468-80. doi: 10.1016/j.chom.2013.09.004.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.09.004>

Flatt JW, Greber UF.
Misdelivery at the Nuclear Pore Complex-Stopping a Virus Dead in Its Tracks.
Cells. 2015 Jul 28;4(3):277-96. doi: 10.3390/cells4030277.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4588037/>

³²⁴ Maler MD, et al
Key Role of the Scavenger Receptor MARCO in Mediating Adenovirus Infection and Subsequent Innate Responses of Macrophages.
mBio. 2017 Aug 1;8(4):e00670-17. doi: 10.1128/mBio.00670-17. Erratum in: mBio. 2017 Sep 26;8(5):
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5539421/>

³²⁵ Muruve DA.
The innate immune response to adenovirus vectors.
Hum Gene Ther. 2004 Dec;15(12):1157-66. doi: 10.1089/hum.2004.15.1157.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15684693/>

Barlan AU, Griffin TM, McGuire KA, Wiethoff CM.
Adenovirus membrane penetration activates the NLRP3 inflammasome.
J Virol. 2011;85(1):146-155. doi:10.1128/JVI.01265-10
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3014182/>

Il rilascio di IL-1 β è alterato da un inibitore della catepsina, un inibitore del TLR9 o un inibitore della caspasi citosolica³²⁶. Ciò suggerisce che la penetrazione di AdV dagli endosomi al citosol contribuisce alla secrezione di IL-1 β . Il sensore principale nella via dell'inflammasoma per il DNA citoplasmatico è l'AIM-2 (absent in melanoma 2) che si lega direttamente al DNA³²⁷. In alternativa all'inflammasoma NLRP3 indotto da AIM-2, il DNA citoplasmatico può indurre l'inflammasoma NLRP3 nei monociti umani e coinvolgere cGAS e STING ma non TBK1 e IKK ϵ , che sono essenziali per l'induzione dell'IFN mediata da cGAS-STING³²⁸.

L'attivazione di questo percorso alternativo è correlata alla traslocazione di STING nei lisosomi, alla rottura dei lisosomi e all'aumento della permeabilizzazione della membrana plasmatica. Questo percorso alternativo di attivazione di NLRP3 potrebbe offrire una spiegazione per l'induzione da parte del virus dell'inflammasoma NLRP3. I moDC umani endocitano gli immunocomplessi AdV, rompono gli endosomi come mostrato dalla microscopia a fluorescenza della galectina-3, rilasciano cluster di virioni nel citosol e attivano l'inflammasoma AIM2³²⁹. Ciò porta alla differenziazione di moDC e pirosi. È stato suggerito che l'attivazione di AIM2 dipenda dagli immunocomplessi AdV, dal TLR9 e dal pH basso.

<https://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev-virology-092818-015550>

Difesa a livello di ingresso di AdV nelle cellule immunitarie. Gli schemi raffigurano cinque scenari di difesa contro AdV in entrata

1) L'ingresso di AdV nei macrofagi derivati dal THP1 innesca il rilascio di catepsina dai lisosomi rotti, portando alla produzione di ROS e all'interruzione del potenziale della membrana mitocondriale. La veicolazione errata del DNA virale in ingresso nel citosol innesca la produzione di citochine infiammatorie, in parte attraverso il percorso cGAS/STING/TBK1/IRF7.

2) L' α HD5 rilasciato dai neutrofili ricopre le particelle di AdV, preclude la graduale rimozione del loro rivestimento, l'esposizione della proteina litica di membrana VI e porta alla degradazione del virione negli endolisosomi.

3) Il componente del complemento C4 sulle particelle di AdV rivestite con anticorpi blocca i primi passaggi dell'uncoating di AdV, ovvero il rilascio di fibre e l'esposizione della proteina VI, mentre il componente C3 è fondamentale per innescare segnali infiammatori dalle particelle citosoliche.

4) L'AdV rivestito di IgG, ad esempio, che decora la proteina esone, viene veicolato nel citosol e degradato dal recettore TRIM21 IgG, dal p97/VCP e dal proteasoma. Tale rimozione catastrofica del rivestimento espone il DNA del virione e porta all'induzione cGAS-dipendente di citochine proinfiammatorie e IFN-I.

5) Gli IC-AdV vengono assorbiti nelle cellule dendritiche e innescano la pirosi inducendo l'inflammasoma che coinvolge AIM2, ASC, caspasi-1, IL-1 β e lesione della membrana plasmatica. Negli endosomi dei macrofagi e delle cellule dendritiche, il DNA virale a doppio filamento contenente CpG in entrata innesca anche l'attivazione dipendente da TLR9 e MDA5 di NF κ B e la segnalazione proinfiammatoria.

Un'annotazione dei simboli è indicata nell'area del riquadro. Abbreviazioni: AdV, adenovirus; AIM, assente nel melanoma; α HD5, α -defensina 5 umana; ASC, proteina simile allo Speck associata all'apoptosi contenente un dominio di attivazione e reclutamento della caspasi; cGas, GMP-AMP sintasi ciclica; IC-AdV, adenovirus immunocomplesso; IFN, interferone; IgG, immunoglobulina G; IL, interleuchina; NPC, complesso dei pori nucleari; Nup, nucleoporina; PM, membrana plasmatica; ROS, specie reattive dell'ossigeno; STING, stimolatore dei geni dell'interferone; TLR, recettore Toll-like; TRIM, proteina motivo tripartito; VCP, proteina contenente valosina.

³²⁶ McGuire KA, Barlan AU, Griffin TM, Wiethoff CM.

Adenovirus type 5 rupture of lysosomes leads to cathepsin B-dependent mitochondrial stress and production of reactive oxygen species. *J Virol.* 2011 Oct;85(20):10806-13. doi: 10.1128/JVI.00675-11. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3187480/>

³²⁷ Fernandes-Alnemri T, Yu JW, Datta P, Wu J, Alnemri ES.

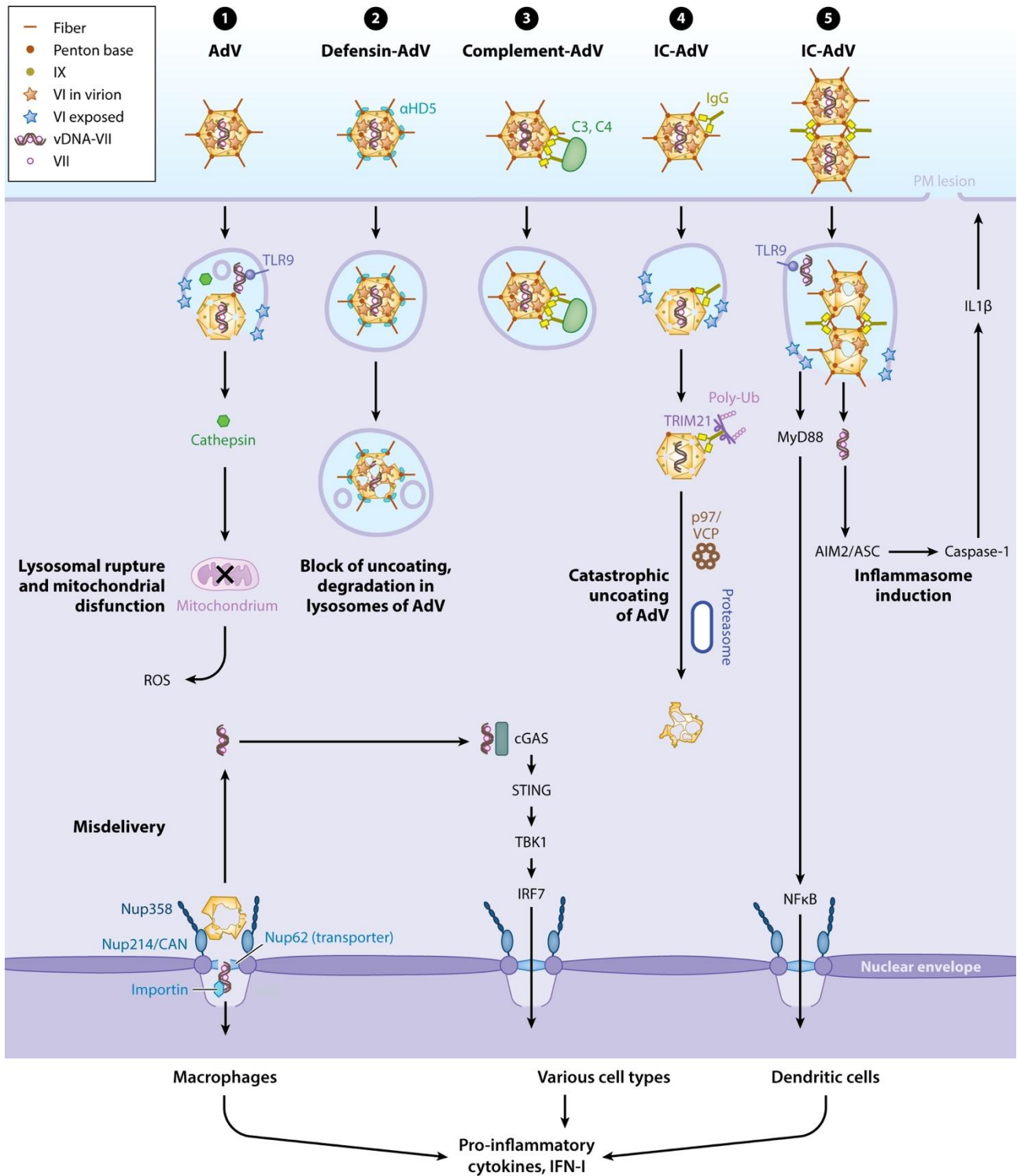
AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature.* 2009 Mar 26;458(7237):509-13. doi: 10.1038/nature07710. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2862225/>

³²⁸ Gaidt MM, et al

The DNA Inflammasome in Human Myeloid Cells Is Initiated by a STING-Cell Death Program Upstream of NLRP3. *Cell.* 2017 Nov 16;171(5):1110-1124.e18. doi: 10.1016/j.cell.2017.09.039. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5901709/>

³²⁹ Eichholz K, Bru T, Tran TT, Fernandes P, Welles H, Mennechet FJ, Manel N, Alves P, Perreau M, Kremer EJ.

Immune-Complexed Adenovirus Induce AIM2-Mediated Pyroptosis in Human Dendritic Cells. *PLoS Pathog.* 2016 Sep 16;12(9):e1005871. doi: 10.1371/journal.ppat.1005871. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5026364/>



RNA non codificanti con funzioni provirali

Un'altra caratteristica dell'infezione da adenovirus, riportata già più di 50 anni fa, è la presenza di piccoli (~ 160 nucleotidi) RNA prodotti in grandi quantità specificamente nelle cellule infettate da HAdV-C2³³⁰.

³³⁰ Reich PR, Forget BG, Weissman SM.
RNA of low molecular weight in KB cells infected with adenovirus type 2.
J Mol Biol. 1966 Jun;17(2):428-39. doi: 10.1016/s0022-2836(66)80153-5.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5963076/>

È stato successivamente dimostrato che questo RNA associato al virus (VA-RNA) viene sintetizzato mediante l'RNA polimerasi III della cellula ospite³³¹ da due geni adiacenti all'interno dell'unità di trascrizione ML, designati VA-RNA I e VA-RNA II.³³²

Gli studi iniziali hanno riscontrato che l'abbondante presenza di VA-RNA I facilita la traduzione durante la fase avanzata dell'infezione³³³, può legarsi e attivare il prodotto di un secondo gene sensibile all'interferone, la 2' - 5' - oligo - adenilato sintetasi³³⁴, e più recentemente è stato identificato come un pattern molecolare associato a patogeni.³³⁵

I microRNA (miRNA) sono potenti regolatori dell'espressione genica e regolano i geni in tutti i tessuti. I miRNA cellulari possono controllare centinaia di processi biologici (ad esempio, morfogenesi delle strutture embrionali, differenziazione di cellule tessuto-specifiche e controllo metabolico in tipi cellulari specifici), sono stati coinvolti nella regolazione di quasi tutte le vie cellulari. Poiché sono implicati in diversi processi fisiologici la deregolazione dei miRNA è stata associata a diverse malattie.³³⁶

³³¹ Price R, Penman S.

A distinct RNA polymerase activity, synthesizing 5-5 s, 5 s and 4 s RNA in nuclei from adenovirus 2-infected HeLa cells. *J Mol Biol.* 1972 Oct 14;70(3):435-50. doi: 10.1016/0022-2836(72)90551-7. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5083146/>

Weinmann R, Raskas HJ, Roeder RG.

Role of DNA-dependent RNA polymerases II and III in transcription of the adenovirus genome late in productive infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1974 Sep;71(9):3426-39. doi: 10.1073/pnas.71.9.3426. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC433786/>

³³² Mathews MB.

Genes for VA-RNA in adenovirus 2. *Cell.* 1975 Oct;6(2):223-9. doi: 10.1016/0092-8674(75)90013-6. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1182803/>

Pettersson U, Philipson L.

Location of sequences on the adenovirus genome coding for the 5.5S RNA. *Cell.* 1975 Sep;6(1):1-4. doi: 10.1016/0092-8674(75)90066-5. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1164730/>

³³³ Burgert HG, Ruzsics Z, Obermeier S, Hilgendorf A, Windheim M, Elsing A.

Subversion of host defense mechanisms by adenoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2002;269:273-318. doi: 10.1007/978-3-642-59421-2_16. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12224514/>

³³⁴ Desai SY, Patel RC, Sen GC, Malhotra P, Ghadge GD, Thimmapaya B.

Activation of interferon-inducible 2'-5' oligoadenylate synthetase by adenoviral VAI RNA. *J Biol Chem.* 1995 Feb 17;270(7):3454-61. doi: 10.1074/jbc.270.7.3454. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.7.3454>

³³⁵ Machitani M, Yamaguchi T, Shimizu K, Sakurai F, Katayama K, Kawabata K, Mizuguchi H.

Adenovirus Vector-Derived VA-RNA-Mediated Innate Immune Responses. *Pharmaceutics.* 2011 Jul 11;3(3):338-53. doi: 10.3390/pharmaceutics3030338. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3857070/>

Piedade D, Azevedo-Pereira JM.

MicroRNAs as Important Players in Host-Adenovirus Interactions. *Front Microbiol.* 2017;8:1324. Published 2017 Jul 17. doi:10.3389/fmicb.2017.01324 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC5511817/>

³³⁶ Trobaugh DW, Klimstra WB.

MicroRNA Regulation of RNA Virus Replication and Pathogenesis. *Trends Mol Med.* 2017;23(1):80-93. doi:10.1016/j.molmed.2016.11.003 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5836316/>

Liu DG.

MicroRNAs in human virus genomes: helping hands for viral infection. *Microna.* 2014;3(2):75-85. doi: 10.2174/2211536603666140825193447

A causa del loro ciclo di replicazione intracellulare, non sorprende che i virus si siano evoluti per creare meccanismi che consentano loro di utilizzare o eludere i miRNA codificati dall'ospite per infettare, sopravvivere e replicarsi nelle cellule ospiti.³³⁷

Per generare un ambiente cellulare più favorevole o per regolare i propri miRNA, i virus possono:³³⁸

https://www.researchgate.net/publication/265692225_MicroRNAs_in_Human_Virus_Genomes_Helping_Hands_for_Viral_Infection

Zhan S, Wang Y, Chen X.

RNA virus-encoded microRNAs: biogenesis, functions and perspectives on application. *ExRNA*. 2020;2(1):15. doi:10.1186/s41544-020-00056-z
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7548135/>

Nanbo A, Furuyama W, Lin Z.

RNA Virus-Encoded miRNAs: Current Insights and Future Challenges. *Front Microbiol*. 2021;12:679210. Published 2021 Jun 24. doi:10.3389/fmicb.2021.679210
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8266288/>

Saliminejad K, Khorram Khorshid HR, Soleymani Fard S, Ghaffari SH.

An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *J Cell Physiol*. 2019 May;234(5):5451-5465. doi: 10.1002/jcp.27486
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30471116/>

³³⁷ Grundhoff A, Sullivan CS.

Virus-encoded microRNAs. *Virology*. 2011 Mar 15;411(2):325-43. doi: 10.1016/j.virol.2011.01.002.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3052296/>

Harwig A, Das AT, Berkhout B.

Retroviral microRNAs. *Curr Opin Virol*. 2014 Aug;7:47-54. doi: 10.1016/j.coviro.2014.03.013.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24769093/>

Bakre AA, Maleki A, Tripp RA.

MicroRNA and Nonsense Transcripts as Putative Viral Evasion Mechanisms. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019 May 8;9:152. doi: 10.3389/fcimb.2019.00152
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6519394/>

Mishra R, Kumar A, Ingle H, Kumar H.

The Interplay Between Viral-Derived miRNAs and Host Immunity During Infection. *Front Immunol*. 2020;10:3079. Published 2020 Jan 23. doi:10.3389/fimmu.2019.03079
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6989438/>

Li C, Hu J, Hao J, Zhao B, Wu B, Sun L, Peng S, Gao GF, Meng S.

Competitive virus and host RNAs: the interplay of a hidden virus and host interaction. *Protein Cell*. 2014 May;5(5):348-56. doi: 10.1007/s13238-014-0039-y.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3996157/>

Ojha CR, Rodriguez M, Dever SM, Mukhopadhyay R, El-Hage N.

Mammalian microRNA: an important modulator of host-pathogen interactions in human viral infections. *J Biomed Sci*. 2016;23(1):74. Published 2016 Oct 26. doi:10.1186/s12929-016-0292-x
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5081962/>

³³⁸ Cullen BR.

How do viruses avoid inhibition by endogenous cellular microRNAs? *PLoS Pathog*. 2013;9(11):e1003694. doi: 10.1371/journal.ppat.1003694.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3820716/>

Lu S, Cullen BR.

Adenovirus VA1 noncoding RNA can inhibit small interfering RNA and MicroRNA biogenesis. *J Virol*. 2004 Dec;78(23):12868-76. doi: 10.1128/JVI.78.23.12868-12876.2004.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC524998/>

Bennasser Y, Yeung ML, Jeang KT.

HIV-1 TAR RNA subverts RNA interference in transfected cells through sequestration of TAR RNA-binding protein, TRBP. *J Biol Chem*. 2006 Sep 22;281(38):27674-8. doi: 10.1074/jbc.C600072200.
<https://doi.org/10.1074/jbc.C600072200>

- evitare i miRNA cellulari che colpiscono gli mRNA virali,
- bloccare o alterare il metabolismo dei miRNA interagendo con alcune proteine chiave,
- sintetizzare i propri miRNA,
- o fare uso di miRNA cellulari a proprio favore.

Al contrario, i miRNA endogeni della cellula ospite sono anche in grado di colpire gli mRNA virali.³³⁹

In generale, i miRNA cellulari reprimono l'espressione genica virale con conseguente diminuzione della replicazione virale; questa repressione virale può contribuire alla latenza virale.

Tuttavia, i miRNA cellulari possono anche aumentare la replicazione virale e alcuni virus, come il virus dell'epatite C (HCV), sembrano dipendere dai miRNA cellulari per replicarsi in modo efficiente. Infatti, sebbene alcuni miRNA cellulari (es. hsa-miR-181c, hsa-miR-196, hsa-miR-199a, hsa-miR-488 e hsa-miR-let-7b) interagiscano direttamente con il genoma virale inibendo la replicazione dell'HCV, un miRNA specifico per il fegato, hsa-miR-122, si lega alla regione 5' UTR dell'RNA dell'HCV migliorando la replicazione e l'accumulo del genoma virale nelle cellule infette.³⁴⁰

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5836316/>

Figura chiave: interazioni dirette e indirette tra miRNA cellulari e virus a RNA

I miRNA vengono trascritti nel nucleo dalla RNA polimerasi II (Pol II) in un miRNA primario (pri-miRNA) che viene scisso da Drosha risultando in un pre-miRNA. Il pre-miRNA viene esportato dal nucleo nel citoplasma e viene scisso enzimaticamente da Dicer nel duplex del miRNA. Un filamento del duplex del miRNA è riconosciuto dalle proteine argonaute per formare il complesso di silenziamento indotto dall'RNA (RISC). Interazione diretta: dopo l'infezione, il genoma del virus RNA viene rilasciato nel citoplasma dove il RISC caricato con miRNA si lega tramite la sequenza di semi di miRNA ai nucleotidi complementari nella regione virale 5' non tradotta (NTR), 3' NTR o regioni codificanti. Il legame del miRNA all'NTR 5' porta alla stabilità dell'RNA e all'aumento della replicazione virale. Il legame del miRNA all'NTR 3' può portare all'inibizione della traduzione virale o all'aumento della stabilità dell'RNA e della traduzione virale. Interazione indiretta: l'RNA virale è riconosciuto dai recettori di riconoscimento del pattern, dal recettore Toll-like (TLR)3, TLR7 e dal gene I inducibile dall'acido retinoico (RIG-I) o dalla proteina 5 associata alla differenziazione del melanoma (MDA5), portando all'induzione della cascata di segnalazione dell'interferone (IFN) e della sovraregolazione di IFN- α , IFN- β e altri geni stimolati dall'IFN (ISG) che inibiscono la replicazione virale. L'infezione virale e l'induzione di IFN e ISG possono anche portare a cambiamenti nell'espressione di miRNA all'interno di una cellula. Questi sovraregolano o sottoregolano le proteine coinvolte nella cascata di segnalazione dell'IFN o nell'espressione e funzione dell'ISG, nonché le proteine cellulari necessarie per la replicazione virale. Collettivamente, questi cambiamenti mediati dal virus nei livelli di miRNA danno luogo a un ambiente provirale o antivirale.

Luna JM, Scheel TK, Danino T, Shaw KS, Mele A, Fak JJ, Nishiuchi E, Takacs CN, Catanese MT, de Jong YP, Jacobson IM, Rice CM, Darnell RB.

Hepatitis C virus RNA functionally sequesters miR-122.

Cell. 2015 Mar 12;160(6):1099-110. doi: 10.1016/j.cell.2015.02.025.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4386883/>

³³⁹ Lecellier CH, Dunoyer P, Arar K, Lehmann-Che J, Eyquem S, Himber C, Saïb A, Voinnet O.

A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells.

Science. 2005 Apr 22;308(5721):557-60. doi: 10.1126/science.1108784.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15845854/>

Delorme-Axford E, Donker RB, Mouillet JF, Chu T, Bayer A, Ouyang Y, Wang T, Stolz DB, Sarkar SN, Morelli AE, Sadovsky Y, Coyne CB.

Human placental trophoblasts confer viral resistance to recipient cells.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Jul 16;110(29):12048-53. doi: 10.1073/pnas.1304718110.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3718097/>

Bai XT, Nicot C.

miR-28-3p is a cellular restriction factor that inhibits human T cell leukemia virus, type 1 (HTLV-1) replication and virus infection.

J Biol Chem. 2015 Feb 27;290(9):5381-90. doi: 10.1074/jbc.M114.626325

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4342455/>

³⁴⁰ Piedade D, Azevedo-Pereira JM.

MicroRNAs, HIV and HCV: a complex relation towards pathology.

Rev Med Virol. 2016 May;26(3):197-215. doi: 10.1002/rmv.1881.

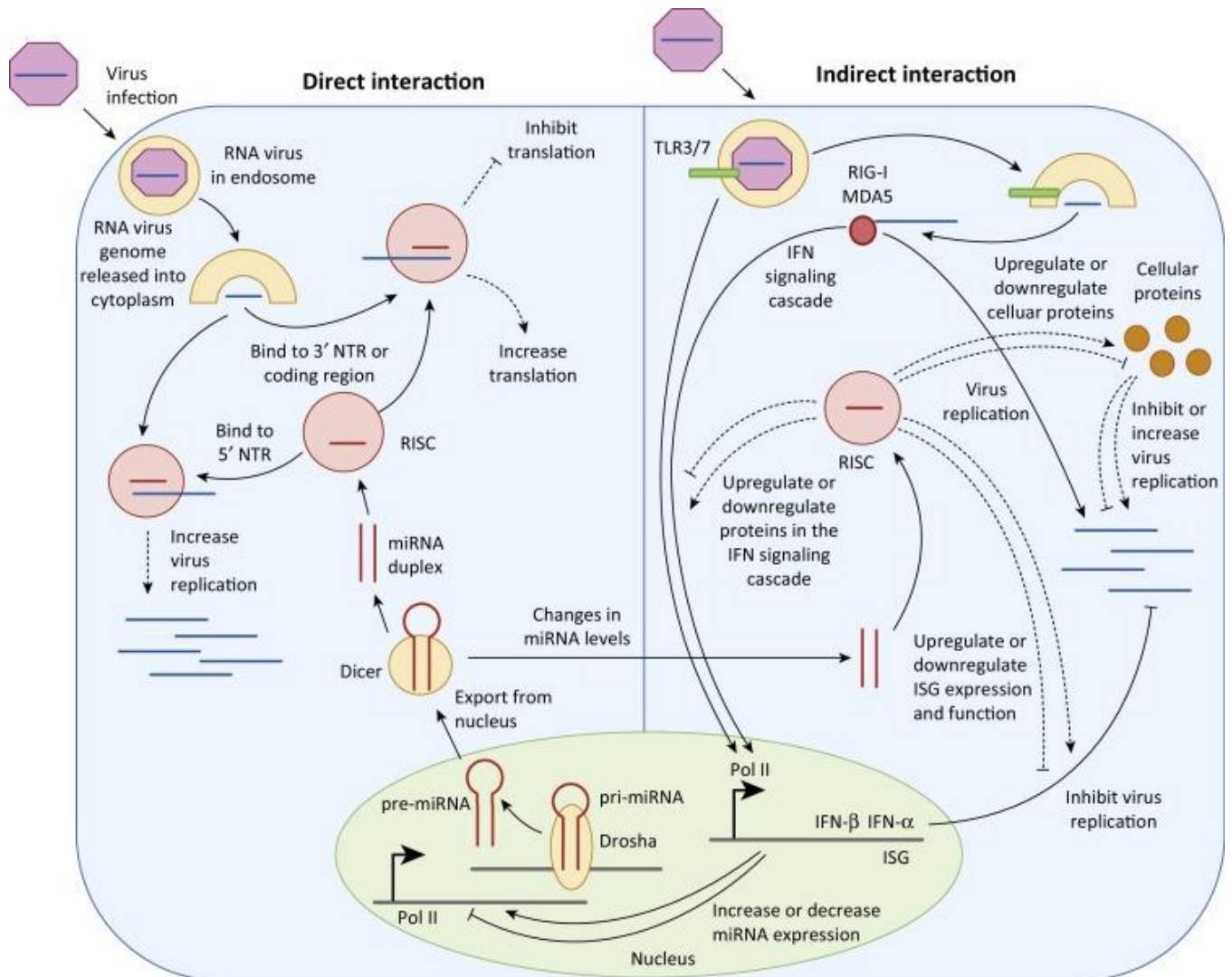
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27059433/>

Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P.

Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA.

Science. 2005 Sep 2;309(5740):1577-81. doi: 10.1126/science.1113329.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16141076/>



Il genoma degli adenovirus codifica per due RNA non codificanti, noti come RNA I associato al virus VA RNAI e VA RNA II, che sembrano svolgere un ruolo importante bloccando importanti proteine del metabolismo dei miRNA, come Exportin-5 e Dicer, o agendo su fattori cellulari.³⁴¹

Una volta nel citoplasma, gli RNA VA si legano e sequestrano Dicer impedendole di maturare pre-miRNA cellulari. Anche gli RNA VA vengono elaborati da Dicer e danno origine a due frammenti distinti: Apical Stem-Central Domain (AS-CD) e Terminal Stem che origina miRNA virali, noti come mivaRNA, che verranno caricati in RISC.³⁴²

³⁴¹ Aparicio O, Carnero E, Abad X, et al. Adenovirus VA RNA-derived miRNAs target cellular genes involved in cell growth, gene expression and DNA repair. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(3):750-763. doi:10.1093/nar/gkp1028 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2817457/>

Hood IV, Gordon JM, Bou-Nader C, Henderson FE, Bahmanjah S, Zhang J. Crystal structure of an adenovirus virus-associated RNA. *Nat Commun.* 2019 Jun 28;10(1):2871. doi: 10.1038/s41467-019-10752-6. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6599070/>

³⁴² Wakabayashi K, Machitani M, Tachibana M, Sakurai F, Mizuguchi H. A MicroRNA Derived from Adenovirus Virus-Associated RNAII Promotes Virus Infection via Posttranscriptional Gene Silencing. *J Virol.* 2019 Jan 4;93(2):e01265-18. doi: 10.1128/JVI.01265-18. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6321910/>

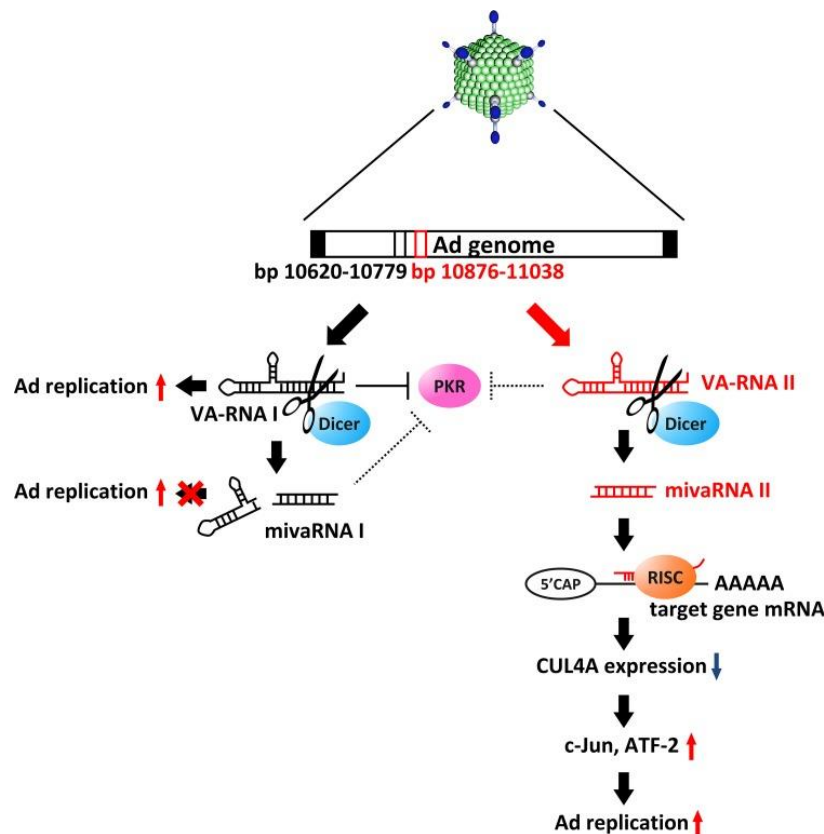
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7102710/>

A. Schema del genoma dell'adenovirus. Viene mostrato lo splicing alternativo del pre-mRNA E1a. Sono indicati tratti ricchi di U. Le frecce rappresentano la direzione della trascrizione. MLP è il principale promotore in ritardo. I geni E sono precoci e i geni L sono tardivi. B. Struttura dell'adenovirus di tipo 2 VA I RNA. La struttura è suddivisa in tre regioni associate alle funzioni indicate. Le frecce indicano i siti di scissione di Dicer per miRNAI-137 e miRNAI-138.

Adenovirus non-coding RNAs	Cellular targets	Predicted effects
VA RNA _I	PKR	Inhibition of innate immune response
	RIG-I	Activation of type I interferon
	OAS1	Protein synthesis arrest
VA RNA _I and VA RNA _{II} *	Exportin-5	Interference with the miRNA pathway by competition with pre-miRNAs for Exportin-5
	Dicer	Interference with the miRNA pathway by decreasing cellular levels of Dicer and saturation of Dicer
	RISC	Target the miRNA pathway by interfering with RISC's assembly and function
miRNAI	Ly6K	Deregulation of cell growth
	TIA1	Regulation of apoptosis; potential switch between early and late stages of adenoviral infection

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5511817/>

Riepilogo dei bersagli cellulari e degli effetti previsti di VA RNA e miRNA codificati dall'adenovirus. *Data la saturazione descritta di Dicer e la competizione per Exportin-5, ci si aspetterebbe che i VA RNA adenovirali portino a una generale sottoregolazione dei miRNA cellulari, e quindi ad un aumento dei loro target.



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6321910/>

Modello di promozione della replicazione dell'Ad mediata da VA-RNAII tramite silenziamento genico post-trascrizionale di CUL4A. Dopo l'infezione da Ad, VA-RNAI e -II vengono rapidamente trascritti e promuovono l'infezione da Ad in modi diversi. VA-RNAI inibisce l'attivazione di PKR, che svolge un ruolo chiave nelle risposte antivirali. VA-RNAII funziona come precursore di miRNAII, che promuove l'infezione da Ad, mentre miRNAI non supporta l'infezione da Ad. La soppressione di CUL4A, l'obiettivo a più alto potenziale di miRNAII, amplifica la segnalazione di JNK tramite la stabilizzazione di c-Jun e ATF2, portando alla promozione della replicazione di Ad.

Data la grande quantità di VA RNA espressi e il successivo blocco di Dicer ed Exportin-5, ci si aspetterebbe che l'infezione adenovirale porti a una generale sottoregolazione dei miRNA cellulari, e quindi ad un aumento dei loro bersagli. Tuttavia, ciò non si verifica durante le prime ore di infezione da adenovirus poiché l'accumulo di RNA VA non è immediato e altri fattori, sia cellulari che virali, contribuiscono all'espressione differenziale dei miRNA³⁴³. L'espressione differenziale dei geni cellulari sembra seguire quattro diversi stadi dopo l'infezione da adenovirus. Il primo stadio va da 0 a 12 ore dopo l'infezione, quando inizia l'espressione genica virale e la crescita cellulare viene inibita come difesa dell'ospite contro il virus³⁴⁴. Il secondo stadio va da 12 a 24 ore dopo l'infezione ed è caratterizzato dall'espressione del gene virale E1A, che contribuisce in gran parte ai cambiamenti nell'ambiente cellulare che contribuiscono alla replicazione virale ottimale. La maggior parte dei geni sottoregolati in questa fase sono correlati alla regolazione del ciclo cellulare, alla proliferazione cellulare e alla risposta antivirale.

Il terzo stadio segue fino a 36 ore dopo l'infezione, quando la replicazione del genoma virale avviene con il pieno controllo del metabolismo cellulare. Il quarto ed ultimo periodo è caratterizzato da una generale e marcata deregolazione dei geni cellulari. In questa fase, più di 3700 geni sono stati identificati come deregolati di almeno il doppio della loro normale espressione.³⁴⁵

Non sorprende che anche la deregolazione del miRNA segua questa progressione graduale, con l'espressione del miRNA che varia dalla sovra alla sottoregolazione e viceversa.

Zhao et al hanno dimostrato che la maggior parte dei miRNA deregolati durante l'infezione precoce (<24 h dopo l'infezione) erano sovregolati e i più altamente espressi erano noti per agire sui geni oncosoppressori o sulla risposta immunitaria.³⁴⁶ Dopo 12 h di infezione viene espressa una seconda ondata di miRNA antivirali cellulari e

³⁴³ Qi Y, Tu J, Cui L, Guo X, Shi Z, Li S, Shi W, Shan Y, Ge Y, Shan J, Wang H, Lu Z.

High-throughput sequencing of microRNAs in adenovirus type 3 infected human laryngeal epithelial cells. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:915980. doi: 10.1155/2010/915980. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2896912/>

Zhao H, Chen M, Tellgren-Roth C, Pettersson U.

Fluctuating expression of microRNAs in adenovirus infected cells. *Virology.* 2015 Apr;478:99-111. doi: 10.1016/j.virol.2015.01.033. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.01.033>

Piedade D, Azevedo-Pereira JM.

MicroRNAs as Important Players in Host-Adenovirus Interactions. *Front Microbiol.* 2017 Jul 17;8:1324. doi: 10.3389/fmicb.2017.01324. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5511817/>

³⁴⁴ Granberg F, Svensson C, Pettersson U, Zhao H.

Adenovirus-induced alterations in host cell gene expression prior to the onset of viral gene expression. *Virology.* 2006 Sep 15;353(1):1-5. doi: 10.1016/j.virol.2006.06.019. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16860366/>

Zhao H, Granberg F, Pettersson U.

How adenovirus strives to control cellular gene expression. *Virology.* 2007 Jul 5;363(2):357-75. doi: 10.1016/j.virol.2007.02.013. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.02.013>

³⁴⁵ Zhao H, Dahlö M, Isaksson A, Syvänen AC, Pettersson U.

The transcriptome of the adenovirus infected cell. *Virology.* 2012 Mar 15;424(2):115-28. doi: 10.1016/j.virol.2011.12.006. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.12.006>

³⁴⁶ Zhao H, Chen M, Tellgren-Roth C, Pettersson U.

Fluctuating expression of microRNAs in adenovirus infected cells. *Virology.* 2015 Apr;478:99-111. doi: 10.1016/j.virol.2015.01.033. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.01.033>

tra questi miRNA sovraespressi ci sono hsa-miR-29 e hsa-let-7d, entrambi coinvolti nella risposta immunitaria. Contemporaneamente, i miRNA oncogenici, come hsa-miR-21 e miRNA del cluster hsa-miR-17/92 (oncomir-1) sono sottoregolati. Durante il terzo periodo di infezione virale, la deregolazione dei miRNA cellulari raggiunge un punto di svolta quando le trascrizioni virali superano completamente le difese dell'ospite. In questa fase, 24 ore dopo l'infezione, si verifica il passaggio dall'infezione precoce a quella tardiva con un apparente controllo delle vie cellulari da parte delle proteine virali e degli RNA VA. Il profilo di espressione del miRNA codificato dalle cellule cambia e quasi tutti i miRNA cellulari che erano precedentemente sovraespressi diventano sottoregolati. Dopo 36 ore di infezione, solo cinque miRNA sono sovraregolati, tutti noti come oncogeni. Gli adenovirus codificano anche per piccoli RNA diversi dai VA RNA e dai rispettivi mivaRNA. È interessante notare che alcuni di questi piccoli RNA si sovrappongono a sequenze di mivaRNA e sono sintetizzati prima dell'espressione di VA RNA. I diversi modelli di espressione tra piccoli RNA virali e mivaRNA probabilmente indicano funzioni diverse poiché nessuno dei piccoli RNA rilevati aveva la dimensione canonica dei miRNA.³⁴⁷ L'espressione di miRNA e la regolazione dell'espressione genica mediata da miRNA è relativamente lenta, essendo visibile solo dopo 24 h dall'infezione.³³¹ Inoltre, è ipotizzabile che la regolazione del miRNA da parte degli adenovirus possa essere più importante per l'infezione persistente piuttosto che per quella litica, come è stato suggerito dall'associazione dei VA RNA con l'infezione latente da parte degli adenovirus.³⁴⁸ Infine, alcuni miRNA cellulari influiscono sul ciclo di replicazione dell'adenovirus, con attività pro-virali o antivirali.

³⁴⁷ Zhao H, Chen M, Pettersson U.
Identification of adenovirus-encoded small RNAs by deep RNA sequencing.
Virology. 2013 Aug 1;442(2):148-55. doi: 10.1016/j.virol.2013.04.006.
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.04.006>

³⁴⁸ Furuse Y, Ornelles DA, Cullen BR.
Persistently adenovirus-infected lymphoid cells express microRNAs derived from the viral VAI and especially VAI1 RNA.
Virology. 2013 Dec;447(1-2):140-5. doi: 10.1016/j.virol.2013.08.024.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3825519/>

Xu N, Segerman B, Zhou X, Akusjärvi G.
Adenovirus virus-associated RNAlI-derived small RNAs are efficiently incorporated into the rna-induced silencing complex and associate with polyribosomes.
J Virol. 2007 Oct;81(19):10540-9. doi: 10.1128/JVI.00885-07.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2045446/>

INGEGNERIZZAZIONE DEI VETTORI ADENOVIRALI

I vettori adenovirali sono utilizzati per il trasferimento di geni nelle applicazioni della terapia genica e quindi gran parte degli studi di riferimento riguardo l'efficienza del trasferimento e la sicurezza sono su questa metodica, adattata poi per lo sviluppo di vaccini a vettore adenovirale contro il SARS-Cov-2.

Di seguito (da pag 154 a 166) si riporterà un approfondimento tratto da [Metodologie per il trasferimento genico](#)³⁴⁹ sulle tipologie di vettori adenovirali impiegati per la terapia genica. Si rimanda al documento per la bibliografia.

APPROFONDIMENTO

FATTORI LIMITANTI AL TRASFERIMENTO GENICO

Barriere cellulari al trasferimento genico

In condizioni normali, il doppio foglietto fosfolipidico apolare e idrofobico di cui è composta la membrana plasmatica della cellula, costituisce una barriera impermeabile alle macromolecole polari di grandi dimensioni, quali il DNA o l'RNA. A pH fisiologico, i fosfati dello scheletro fosfo-glucidico degli acidi nucleici sono deprotonati, quindi dotati di un'uniforme carica negativa. L'entrata di questi poli-anioni nelle cellule deve essere opportunamente facilitata, usualmente sfruttando i meccanismi che regolano l'entrata fisiologica di macromolecole all'interno della cellula. Alternativamente, gli acidi nucleici possono essere veicolati all'interno di particelle biologiche, quali i virus, capaci di oltrepassare le membrane biologiche naturalmente.

Endocitosi

In condizioni fisiologiche, l'ingresso di grandi molecole polari all'interno delle cellule avviene attraverso una serie di meccanismi che determinano la formazione, a livello della superficie della cellula, di vescicole circondate da una membrana, seguita dall'internalizzazione di queste vescicole e dal loro trasporto intracellulare.

Questo processo è noto con il termine collettivo di "endocitosi". Negli ultimi anni, sono stati descritti diversi meccanismi di endocitosi, che si distinguono per il tipo di meccanismo molecolare coinvolto, e per la dimensione delle particelle internalizzate. I quattro principali tipi di endocitosi sono rappresentati nella figura seguente.

APPROFONDIMENTO

Endocitosi

Membrana cellulare - Eso-endo-citosi [Video](#) e [lezione scritta](#)

Fagocitosi [Video](#)

Fagocitosi e pinocitosi [Video](#)

I lisosomi [Video](#)

Lisosomi, perossisomi, inclusioni cellulari [Video](#) e [lezione scritta](#)

Clatrina [Video](#)

Il traffico vescicolare [Video](#)

Import ed export nucleare [Video](#)

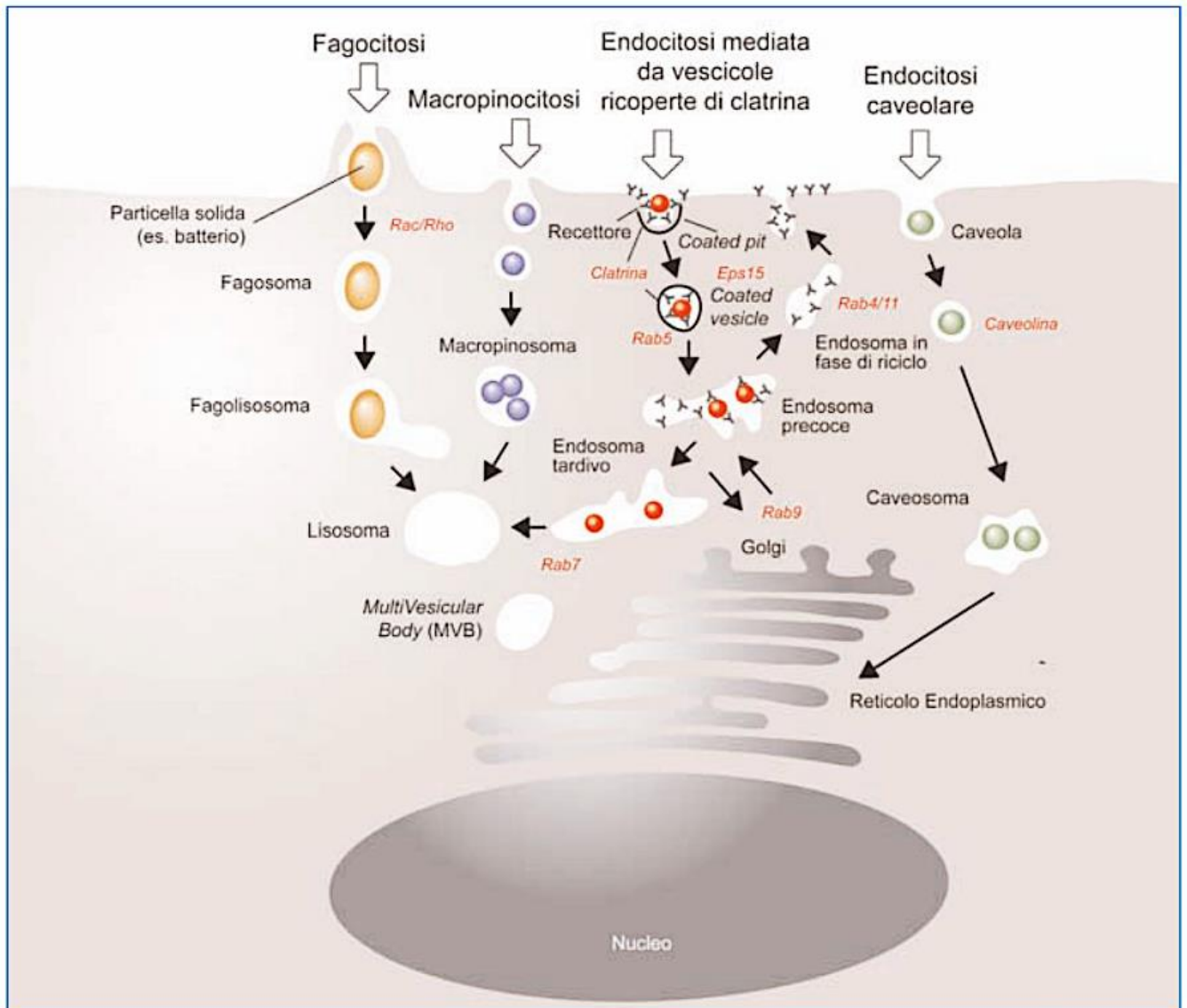
³⁴⁹ Mauro Giacca

Capitolo 3 Metodologie per il trasferimento genico

Terapia genica. ISBN 978-88-470-1988-1 Springer-Verlag Italia 2011

https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-88-470-1989-8_3.pdf

https://old.abmgood.com/marketing/knowledge_base/cell_culture_adenovirus_techniques.php



Endocitosi. Sono indicati in maniera schematica i quattro principali tipi di endocitosi (vedi testo per la descrizione)

La **fagocitosi** è il processo per il quale alcune cellule eucariote specializzate (nei mammiferi, tipicamente i granulociti neutrofili e i macrofagi) sono in grado di internalizzare particelle di grandi dimensioni (>500 nm di diametro, incluse cellule in apoptosi o batteri).

La **macropinocitosi** è un processo analogo alla fagocitosi, in cui vacuoli di grandi dimensioni, anch'essi tipicamente con un diametro >500 nm, si formano di continuo quale conseguenza dell'invaginazione della membrana plasmatica. Tali vacuoli, quindi, contengono vari tipi di soluti presenti nell'ambiente extracellulare, comprese diverse proteine che vengono di conseguenza internalizzate in maniera non specifica. Le vescicole che si formano quale conseguenza di entrambi questi tipi di endocitosi alla fine si fondono con i lisosomi, strutture che rappresentano il principale compartimento idrolitico della cellula.

Una terza forma di endocitosi è innescata dal legame a specifici recettori di superficie e caratterizzata dalla formazione di vescicole ricoperte della proteina clatrina. Questo processo, definito quindi **endocitosi mediata da vescicole di clatrina** o endocitosi mediata da recettore, avviene a carico delle regioni della membrana plasmatica

in cui esistono degli affossamenti ricoperti dalla proteina clatrina (clathrin coated pits). Queste regioni contengono specifici recettori che si legano a proteine presenti nell'ambiente extracellulare (ad esempio, transferrina, lipoproteine a bassa densità, alcuni fattori di crescita, anticorpi).

Quando questi ligandi interagiscono con i rispettivi recettori, si innesca un processo attivo per cui si vengono a formare delle piccole vescicole (~100 nm di diametro) ricoperte, sul lato citosolico, da un caratteristico complesso di proteine che si associano alla clatrina (clathrin-coated vesicles, CCVs). Queste vescicole progressivamente maturano per diventare prima endosomi precoci, che mostrano una caratteristica morfologia tubulo-vescicolare (vescicole fino a 1 µm di diametro connesse da tubuli di ~50 nm di diametro) e possiedono un pH moderatamente acido. All'interno di queste strutture, molti recettori si staccano dai loro ligandi a causa del basso pH e vengono riciclati nuovamente verso superficie della cellula grazie ad un meccanismo di trasporto mediato da vescicole. Molti di questi endosomi precoci invece maturano e diventano endosomi tardivi, che essenzialmente contengono materiale da veicolare nei lisosomi per essere idrolizzato.

Un quarto meccanismo di internalizzazione è rappresentato dalla **endocitosi caveolare**. Le caveole sono invaginazioni della membrana plasmatica a forma di fiasco, con un diametro di ~50 nm, non ricoperte da clatrina, presenti sulla superficie di molti tipi cellulari, tra cui gli adipociti, le cellule endoteliali, le cellule muscolari lisce e i fibroblasti. Questi microdominii della membrana sono spesso associati alla proteina cellulare caveolina, e corrispondono alle regioni della membrana ricche in colesterolo e sfingolipidi. In conseguenza di tale composizione lipidica, queste regioni sono caratterizzate da diminuita fluidità e rappresentano uno dei microdominii delle membrane resistenti alla solubilizzazione con detergenti e collettivamente noti con il termine di lipid rafts (zattere lipidiche). Le caveole gemmano dalla membrana plasmatica e determinano la formazione di endosomi contenenti caveolina, chiamati caveosomi. Questi hanno un pH neutro e un'emivita lunga, ed alla fine si fondono con le vescicole del reticolo endoplasmico (endoplasmic reticulum, ER) o dell'apparato di Golgi, rilasciando il loro contenuto all'interno di questi compartimenti. È interessante osservare che tutti i tipi di endocitosi, con l'eccezione dell'endocitosi caveolare, alla fine determinano il trasporto del materiale contenuto nelle vescicole all'interno del compartimento lisosomale, dove è destinato a distruzione. Questo concetto è di particolare importanza sia per la terapia genica sia, più in generale, per la somministrazione di altri tipi di molecole con proprietà farmacologica, in quanto evitare la distruzione lisosomale è un prerequisito fondamentale per l'efficacia di qualsiasi trattamento.

Fuoriuscita dal compartimento vescicolare

Il materiale internalizzato dalla cellula all'interno delle vescicole di endocitosi è ancora al di fuori del citosol, quindi in una sede virtualmente extracellulare. Nel caso degli acidi nucleici, è assolutamente fondamentale che possano fuoriuscire da questo compartimento, un processo che può avvenire o per distruzione dell'integrità delle membrane degli endosomi o attraverso il passaggio attivo attraverso le stesse.

A questo proposito, la natura ha evoluto una serie di meccanismi molecolari che consentono l'ingresso nel citosol di macromolecole contenute in diversi compartimenti vescicolari, meccanismi che sono variamente sfruttati da numerosi microorganismi.

In particolare, i virus e le tossine batteriche utilizzano prevalentemente due vie di ingresso per entrare nel citosol, la prima a partire dagli endosomi precoci o tardivi, sfruttando il basso pH di questi compartimenti, e la seconda a partire dall'apparato di Golgi o dall'ER. Un esempio del primo meccanismo è offerto dalla tossina difterica, per la quale la progressiva acidificazione del pH attiva un cambiamento di conformazione nella tossina, che causa la formazione di pori sulla membrana degli endosomi, consentendo quindi l'ingresso diretto della tossina nel citosol. Il passaggio dal Golgi o dall'ER è invece sfruttato da altre molecole che seguono un percorso inverso a quello della classica via di secrezione.

Queste molecole includono diverse tossine delle piante, tra cui la ricina, e dei batteri, tra cui la tossina della Shigella, l'esotossina A di *Pseudomonas* e, in parte, la tossina colerica. L'ingresso di queste tossine all'interno della cellula sfrutta, in senso retrogrado, le vie di trasporto che la cellula normalmente usa per la secrezione delle

proteine. In particolare, l'ingresso di alcune tossine all'interno della cellula avviene per endocitosi mediata dal legame a specifici recettori cellulari. Una volta all'interno degli endosomi precoci o tardivi, le tossine sfuggono alla degradazione lisosomale reindirizzando le vescicole che le contengono verso il trans-Golgi network e, da questo, verso l'ER, direttamente o attraverso l'apparato di Golgi.

Quando le tossine raggiungono l'ER, guadagnano accesso al citosol sfruttando il sistema di controllo che normalmente regola la qualità delle proteine sintetizzate all'interno di questo compartimento, sistema noto con il nome di ERAD (ER-associated protein degradation). In particolare, il meccanismo dell'ERAD elimina le proteine che assumono una conformazione non corretta re-indirizzandole nel citosol attraverso un poro noto con il nome di traslocone Sec61. Diverse tossine utilizzano proprio questo traslocone per accedere al citosol.

Infine, alcuni virus, tra cui poliomavirus, virus dell'influenza, coronavirus ed alcuni ecovirus, analogamente ad altre tossine, tra cui la tossina del colera, sfruttano invece il meccanismo di endocitosi caveolare per penetrare nell'ER. Nel caso dei virus di interesse per la terapia genica, l'accesso al citosol avviene sia direttamente mediante la fusione del pericapside virale con la membrana plasmatica (come nel caso dei retrovirus) o mediante fuoriuscita dagli endosomi grazie all'attività endosomolitica del capsido virale (come nel caso degli adenovirus e dei AAV).

Indirizzamento al nucleo

Una volta guadagnatosi l'accesso al citosol, l'acido nucleico deve trovare la sua via verso il compartimento subcellulare nel quale la sua funzione viene esercitata, solitamente il citosol stesso o il nucleo. I piccoli RNA regolatori sono attivi nel primo compartimento, mentre i geni codificanti devono raggiungere il nucleo per essere trascritti. La destinazione finale dell'acido nucleico è comunemente regolata dalle proteine cui esso si lega nel citosol. Per esempio, gli siRNA vengono caricati sul complesso RISC e rimangono citosolici. Nel caso dei virus, sono le proteine che si associano al genoma virale che determinano se e quando l'acido nucleico debba essere trasportato nel nucleo. Nel caso del DNA nudo, invece, questo viene legato da diverse proteine cellulari, tra cui ad esempio fattori di trascrizione che riconoscono il promotore, che possono trasportarlo nel nucleo grazie ai propri segnali di localizzazione nucleare. Alternativamente, il DNA può raggiungere il nucleo durante il processo di mitosi nelle cellule in attiva duplicazione.

STRUTTURA DEI VETTORI ADENOVIRALI

Tre diverse generazioni di vettori basati su Ad2 e Ad5 sono attualmente prese in considerazione per la terapia genica.³⁵⁰

La **prima generazione** di vettori adenovirali viene ottenuta sostituendo la regione E1, o le regioni E1 ed E3, con una cassetta di espressione contenente il gene terapeutico, un promotore e un sito di poliadenilazione.

Come riportato in precedenza, la regione E1 (contenente i geni precoci E1A ed E1B) codifica le proteine indispensabili per l'espressione degli altri geni precoci e dei geni tardivi del virus.

Dal momento che queste proteine sono indispensabili per la replicazione del virus, esse devono essere fornite in *trans* in linee cellulari specifiche.

La regione E3 codifica proteine che sono indispensabili al virus per controbattere i meccanismi difensivi dell'ospite. Questi prodotti non sono indispensabili per la replicazione virale in vitro, e quindi non è necessario che vengano complementati in *trans* nelle cellule in cui vengono generati i vettori. I vettori che portano soltanto la delezione

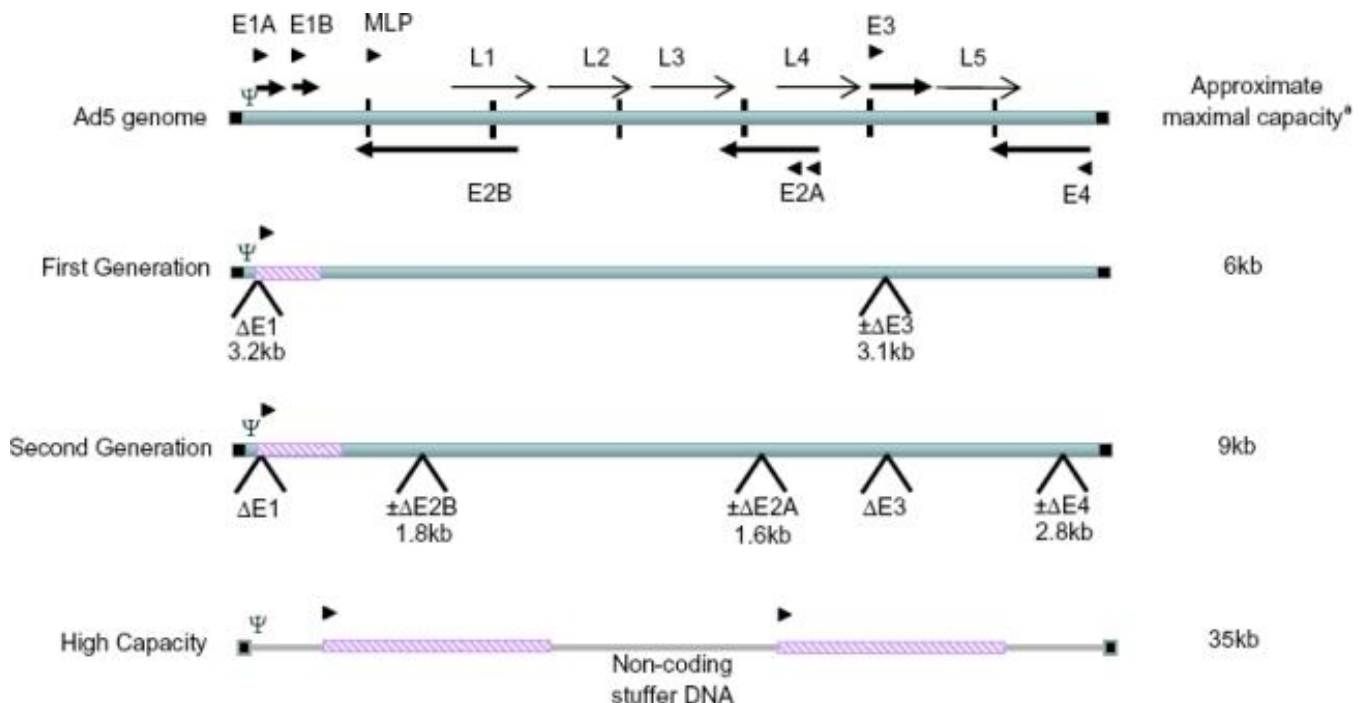
³⁵⁰ Kovesdi I, Hedley SJ.
Adenoviral producer cells.
Viruses. 2010;2(8):1681-1703. doi:10.3390/v2081681
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3185730/>

Lee CS, et al
Adenovirus-Mediated Gene Delivery: Potential Applications for Gene and Cell-Based Therapies in the New Era of Personalized Medicine.
Genes Dis. 2017 Jun;4(2):43-63. doi: 10.1016/j.gendis.2017.04.001.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5609467/>

di E1 possono contenere inserti fino a 5.1 kb, quelli deleti in E1 ed E3 fino a 8.2 kb. Nonostante i vettori deleti della regione E1 non possano replicarsi in vivo, l'espressione residua dei molteplici geni virali ancora contenuti in questi vettori stimola una importante risposta infiammatoria e immunitaria dell'ospite, che pone importanti problemi di sicurezza. Inoltre, la risposta immunitaria limita la durata dell'espressione del gene terapeutico in quanto le cellule trasdotte vengono eliminate dai linfociti T citotossici.

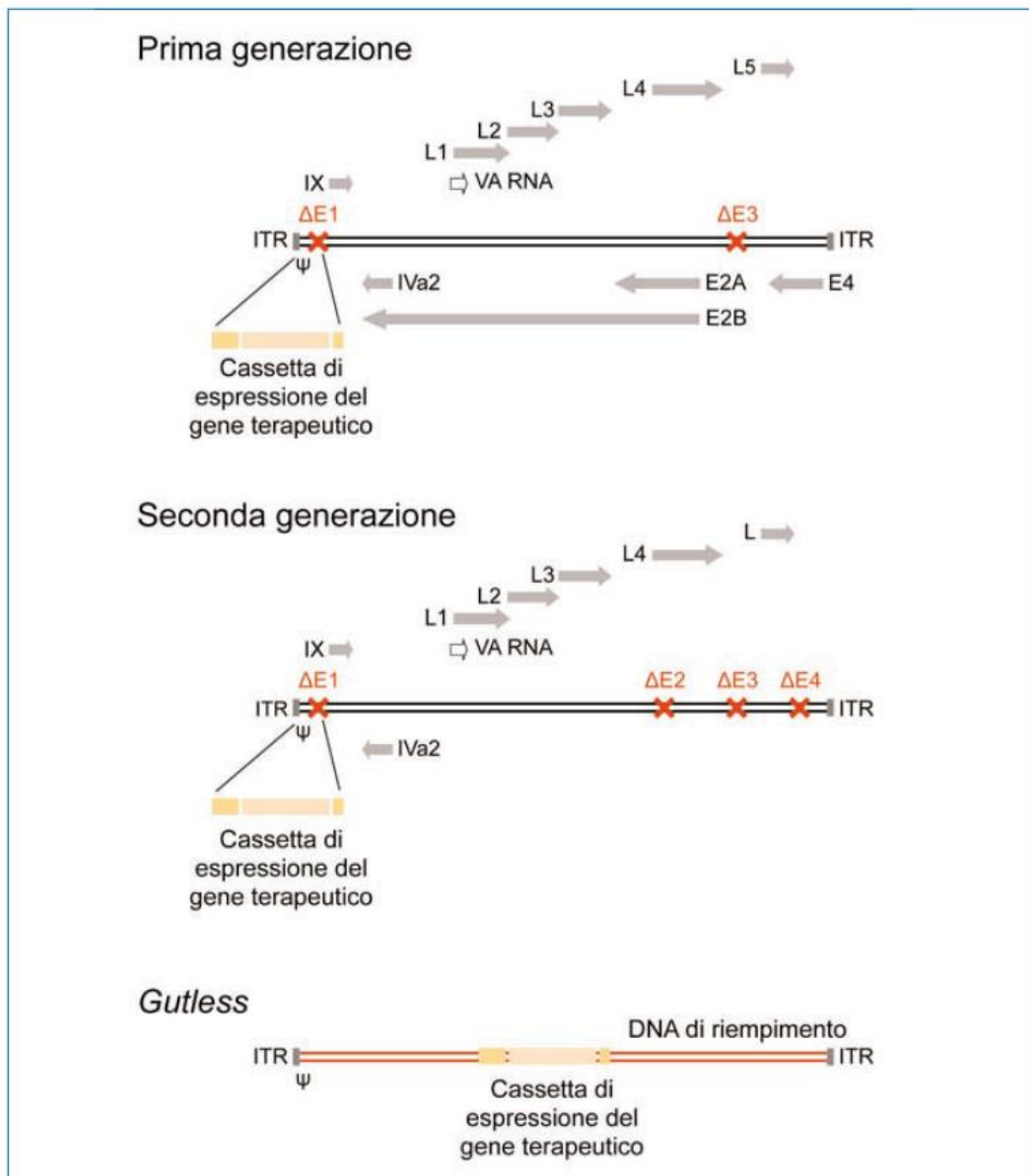
Per eliminare alcuni dei geni virali responsabili di questa stimolazione infiammatoria e immunitaria, è stata quindi ottenuta una **seconda generazione** di vettori adenovirali che porta delezioni aggiuntive nella regione E2 (in particolare, nei geni E2A - che codifica la proteina DBP -, E2B - proteina TP -, o DNA polimerasi), o in tutta o nella maggior parte della regione E4. Questi vettori possono contenere fino a 14 kb di materiale esogeno. Nonostante l'eliminazione di queste regioni, i vettori di seconda generazione non risolvono del tutto il problema dell'immunogenicità, a causa della residua espressione di altri geni ancora contenuti nel genoma virale. Inoltre, l'espressione del gene terapeutico risulta inferiore in questi vettori rispetto a quelli di prima generazione.

Infine, la **terza generazione** di vettori adenovirali è caratterizzata dalla delezione completa del genoma di adenovirus per fare posto all'inserto di DNA esogeno, con l'eccezione delle regioni indispensabili in *cis* per la replicazione del DNA virale e l'incapsidamento del genoma nei virioni nelle cellule di assemblamento. Questi vettori vengono definiti "gutless" o "guttated" (letteralmente "eviscerati" o "senza intestino") o "helper-dependent", in quanto la loro replicazione dipende interamente dalla co-infezione delle cellule in cui avviene l'assemblamento da parte di un vettore helper che fornisce in *trans* tutte le proteine indispensabili; vengono anche chiamati "high capacity" (HC), in quanto essi possono contenere fino a 37 kb di DNA esogeno, consentendo anche il trasferimento di larghe regioni di DNA genomico o di geni multipli.



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3185730/>

Strutture del genoma di prima e seconda generazione e vettori di adenovirus ad alta capacità. I promotori sono indicati da triangoli neri, le unità di trascrizione precoce e tardiva sono indicate rispettivamente da frecce spesse e sottili. Le ripetizioni del terminale invertito (ITR) sono indicate da quadrati neri e il segnale di packaging Ψ è indicato. Le sequenze non adenovirali nel genoma ad alta capacità sono indicate da una linea sottile, mentre i transgeni in tutti i genomi sono indicati da riquadri a strisce diagonali. Un numero molto elevato di sistemi diversi è in uso con una capacità aggiuntiva specifica. Per i vettori di seconda generazione, per queste stime è stata utilizzata la delezione di 3 loci genici e una dimensione del genoma conservatrice del 103%.



Struttura dei vettori adenovirali di prima e seconda generazione e dei vettori ad alta capacità (high capacity, HC) o gutless. Nei vettori di prima generazione, viene deletato o inattivato il gene E1, da solo o in combinazione con il gene E3. Il gene terapeutico, comprendente un promotore, il gene propriamente detto e un sito di poliadenilazione, è clonato in corrispondenza della regione E1. Nei vettori di seconda generazione, vengono introdotte mutazioni aggiuntive che inattivano i geni E2 ed E4. Infine, nei vettori gutless, l'intero genoma di adenovirus viene sostituito con il DNA esogeno, ad eccezione delle ITR (inverted terminal repeat) e del segnale di packaging (ψ)

PRODUZIONE DEI VETTORI ADENOVIRALI

La produzione di vettori adenovirali è una procedura a due passaggi, che richiede prima l'ottenimento del DNA genomico virale con la sequenza desiderata e poi la sua replicazione e incapsidamento per generare particelle virali che lo contengano.

Per quanto riguarda la generazione del DNA del vettore, la relativa lunghezza del genoma di adenovirus (~38 kb) pone un ostacolo all'utilizzo delle usuali tecniche dell'ingegneria genetica, essenzialmente basate sulla creazione di molecole ricombinanti in vitro, grazie all'utilizzo di enzimi di restrizione ed alla ligazione di frammenti di DNA, e alla propagazione di plasmidi che le contengono nei batteri.

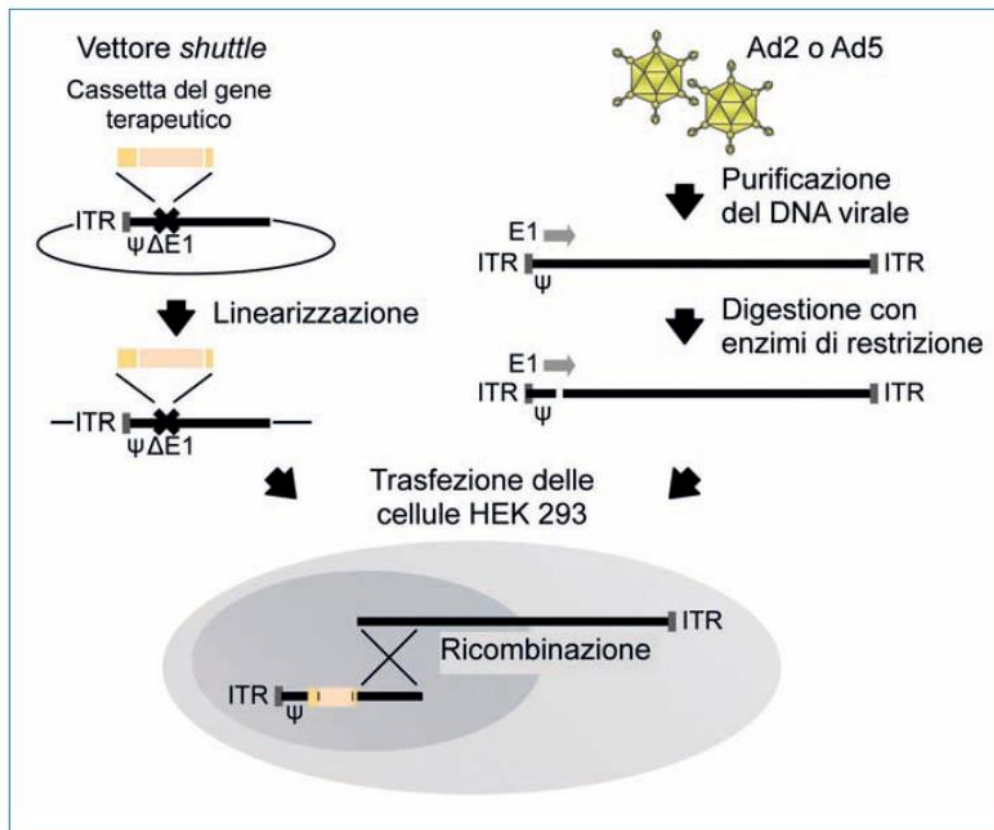
Nel corso degli ultimi anni, è stata sviluppata una estesa serie di protocolli relativamente complessi per la produzione di vettori di prima e seconda generazione e, più recentemente, di adenovirus gutless.

Per quanto riguarda invece la replicazione e produzione vera e propria dei vettori, essa solitamente avviene all'interno di cellule umane che forniscono in *trans* le proteine i cui geni sono stati rimossi dal genoma del vettore (tipicamente, i geni della regione E1 (E1A ed E1B) nel caso dei vettori di prima e seconda generazione. Queste cellule sono definite cellule helper.

Produzione dei vettori di prima e seconda generazione

La generazione di vettori adenovirali di prima o seconda generazione è sostanzialmente basata sull'ottenimento mediante eventi di ricombinazione di lunghe molecole di DNA lineari corrispondenti al genoma di adenovirus (da ITR ad ITR, incluso il segnale di incapsidamento ψ e con una cassetta di espressione con il gene di interesse a sostituire il gene E1 e/o E3).

Il metodo classico utilizzato per generare vettori adenovirali in cui il gene di interesse è inserito nella regione E1, sfrutta gli eventi di ricombinazione che avvengono spontaneamente tra due molecole di DNA presenti all'interno della stessa cellula.



Produzione di vettori adenovirali di prima generazione mediante ricombinazione nelle cellule helper. Dopo trasfezione delle cellule con un vettore shuttle (contenente il segmento "sinistro" del genoma al cui interno è clonato il gene di interesse) e il genoma di adenovirus linearizzato, un evento di ricombinazione genera la molecola di vettore desiderata; il virus che la contiene viene successivamente propagato. ITR, ripetizioni terminali invertite; ψ , segnale di packaging. I genomi dei vettori shuttle e del genoma adenovirale e gli elementi genetici in esse contenuti non sono disegnati in scala

Le cellule di una linea cellulare helper che esprime E1 in *trans* (tipicamente le cellule HEK 293, generate negli anni '70 mediante trasformazione di cellule derivate dal rene embrionale umano con il DNA di Ad5) vengono trasfettate con una molecola di DNA corrispondente alla maggior parte del genoma di adenovirus a partire dall'estremità "destra" (questa molecola è generata dal genoma intero purificato del virus o da un plasmide contenente il genoma mediante digestione con un enzima di restrizione) e con un plasmide contenente la porzione "sinistra"

del genoma di adenovirus, parzialmente sovrapposta a quella “destra”; in questo plasmide navetta (shuttle), la regione E1 è stata sostituita con la cassetta di espressione contenente il gene di interesse.

Grazie alla regione di omologia, all’interno delle cellule avviene un evento di ricombinazione tra le due molecole; ancorché raro, questo evento genera un genoma virale completo, che viene quindi incapsidato in una particella virale, che a sua volta viene rilasciata nel soprannatante delle cellule.

Questo soprannatante viene utilizzato per infettare altre cellule, ricoperte da uno strato di agar in modo che i virus prodotti non possano diffondersi nella coltura e infettino solo le cellule vicine, generando quindi delle placche di lisi. Una volta identificata una placca di lisi che produce il virus desiderato, questo viene utilizzato per l’infezione di un vasto numero di cellule helper e la conseguente produzione di una grande quantità di vettore. Il metodo sopradescritto risulta lungo e laborioso (l’intera procedura solitamente richiede 2-4 settimane), in quanto la ricombinazione tra le due molecole di DNA è comunque un evento raro; inoltre, nelle cellule, oltre al virus ricombinato, si vengono a ritrovare anche virus wild type generati a partire da molecole di DNA originalmente non digerite dall’enzima di restrizione.

La produzione del vettore quindi richiede molteplici passaggi successivi di infezione e analisi di numerose placche di lisi. Per ovviare a questi problemi, negli ultimi anni sono stati sviluppati metodi migliorativi utilizzando come fonte di DNA virale da far ricombinare nelle cellule, dei plasmidi corrispondenti ai segmenti “destra” e “sinistra” del virus, oppure ligando i due segmenti del genoma virale in vitro, prima della trasfezione nelle cellule, oppure cercando di ottenere la ricombinazione nei batteri.

Alternativamente, anziché sfruttare gli eventi di ricombinazione nelle cellule helper o nei batteri, è possibile ottenere dei plasmidi ricombinanti corrispondenti al genoma di adenovirus e contenenti la cassetta del gene di interesse in vitro e successivamente amplificare questi plasmidi in *E. coli*.

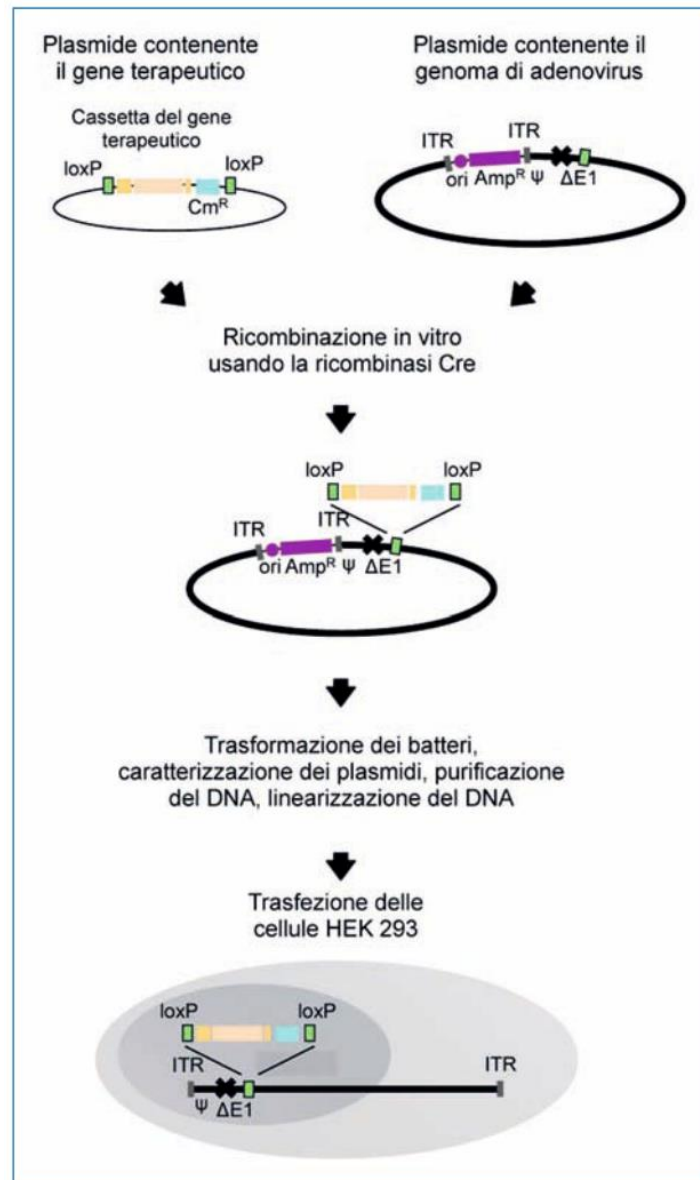
Il DNA plasmidico viene quindi recuperato e trasfettato nelle cellule helper, dove avviene la sua replicazione e incapsidamento. In particolare, l’inserimento del gene desiderato all’interno del genoma di adenovirus può essere ottenuto mediante ricombinazione sito-specifica in vitro.

Tipicamente, viene oggi utilizzato un sistema composto da due plasmidi:

- 1) il primo contiene il DNA di adenovirus circolarizzato in modo da contenere, tra le due ITR, una cassetta procariotica che include un’origine di replicazione e un gene di resistenza ad un antibiotico; il DNA di adenovirus contiene il sito di assemblamento intatto e porta una delezione che inattiva la regione E1; a valle della regione E1 è posto un sito di riconoscimento per una ricombinasi di origine procariotica;
- 2) il secondo plasmide contiene la cassetta di espressione corrispondente al gene terapeutico e un gene di resistenza ad un antibiotico diverso da quello portato dal plasmide adenovirale; queste sequenze sono fiancheggiate da due siti di riconoscimento per la medesima ricombinasi che riconosce il bersaglio nel DNA adenovirale. I due DNA sono purificati da *E. coli*, mescolati e incubati insieme alla ricombinasi, che media quindi un evento di ricombinazione tale da inserire il segmento del DNA di interesse all’interno del genoma adenovirale. Il prodotto della reazione viene quindi utilizzato per trasformare cellule batteriche, che vengono selezionate con l’antibiotico cui il gene posizionato a fianco del gene terapeutico conferisce resistenza. Il DNA plasmidico viene quindi caratterizzato, purificato e utilizzato per trasfettare le cellule helper.

La Figura seguente illustra un esempio di utilizzo di questa metodica, esempio che trae vantaggio del sistema di ricombinazione sito-specifica Cre-loxP.

Metodiche di questo tipo sono relativamente semplici e veloci, e quindi rappresentano oggi l’approccio di prima scelta per la produzione dei vettori adenovirali, anche grazie alla disponibilità di kit commerciali che facilitano la procedura.

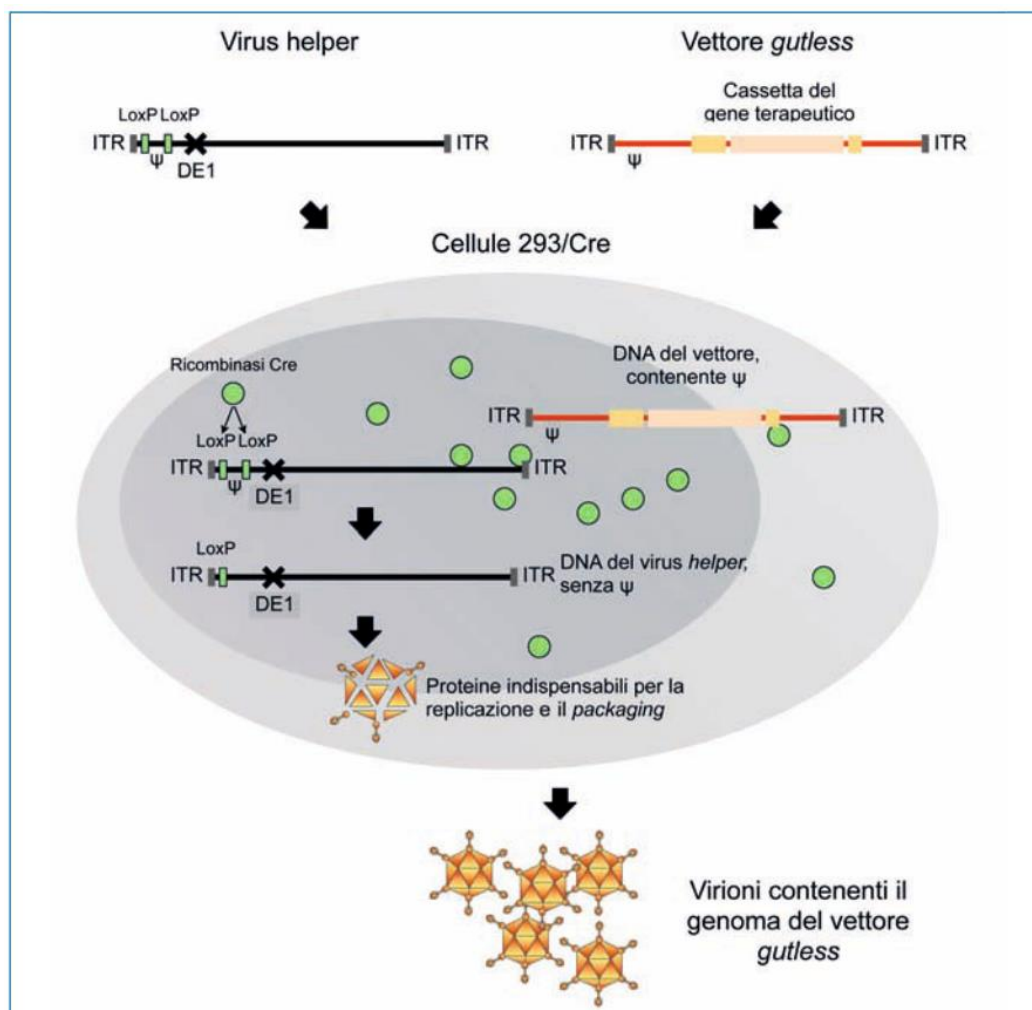


Produzione di vettori adenovirali di prima generazione mediante ricombinazione in vitro. La Figura illustra un esempio di generazione di un vettore adenovirale mediante ricombinazione guidata dalla ricombinasi Cre in vitro, seguita dall'amplificazione dei plasmidi ottenuti in *E. coli*. La proteina Cre, prodotta dal fago P1, ha come bersaglio una specifica sequenza di 34 bp, definita loxP (locus of crossover in P1). Quando due sequenze loxP sono presenti a distanza, Cre le riconosce e attiva un evento di ricombinazione per cui la regione di DNA tra le due sequenze viene rimossa, lasciando in loco una sequenza loxP residua. Utilizzando gli stessi siti di riconoscimento, Cre è anche in grado di mediare l'inserzione di un segmento di DNA fiancheggiato da siti loxP – in questo caso, il segmento derivato dal plasmide contenente il gene terapeutico - utilizzando un terzo sito loxP nella molecola di DNA bersaglio – in questo caso, il DNA adenovirale. ITR, ripetizioni terminali invertite; ψ, segnale di packaging; ori, origine di replicazione batterica; Amp^R, gene della resistenza all'ampicillina; Cm^R, gene della resistenza al cloramfenicolo. I genomi dei vettori shuttle e del genoma adenovirale e gli elementi genetici in esse contenuti non sono disegnati in scala.

Produzione dei vettori adenovirali gutless

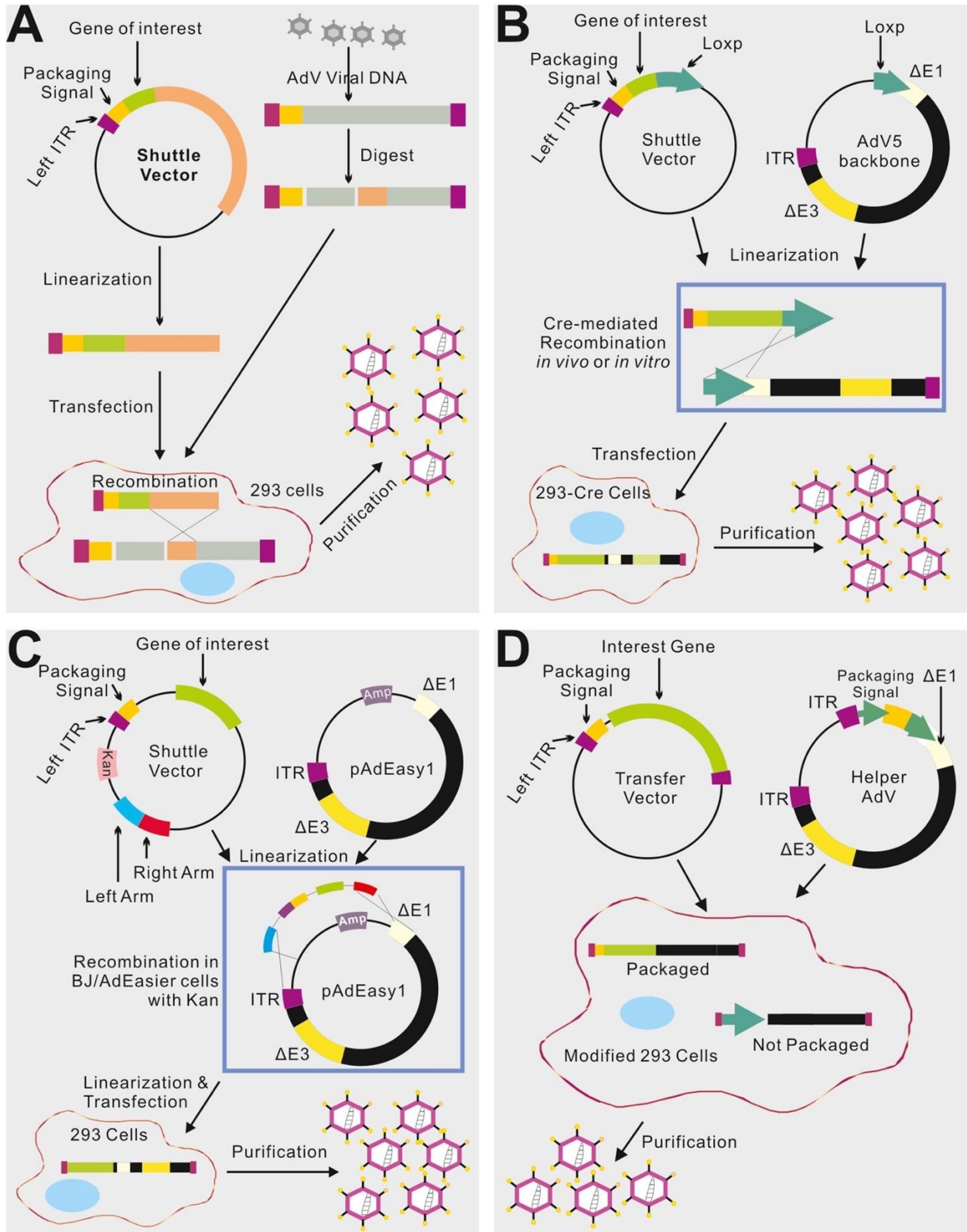
I vettori adenovirali gutless mantengono soltanto le due ITR e il segnale ψ, mentre tutto il resto del genoma è sostituito dal DNA di interesse. Dal momento che i virioni di adenovirus sono in grado di incapsidare DNA lineari che abbiano una lunghezza pari al 75-105% del genoma wild type, quando si vogliono utilizzare i vettori gutless per il trasferimento di un cDNA o comunque di una cassetta di espressione relativamente corta sussiste solitamente la necessità di completare il DNA da incapsidare con delle sequenze di riempimento (stuffer DNA). A questo scopo, viene utilizzato DNA di provenienza procariotica, di lievito o, meglio, sequenze di DNA derivate da larghi introni di geni umani che non contengano regioni espresse. Il DNA del vettore gutless così ottenuto viene

clonato sotto forma di plasmide, amplificato in *E. coli*, purificato e linearizzato per liberare il frammento fiancheggiato dalle due ITR, e trasfettato in una linea cellulare helper. Essendo i vettori gutless completamente privi di geni virali, tutte le proteine indispensabili per la replicazione del vettore devono essere fornite *in trans*. Questo viene ottenuto mediante la co-infezione delle cellule con un adenovirus in grado di replicarsi, che funge quindi da helper; tuttavia, mediante questa strategia, sia il genoma del vettore gutless sia quello del virus helper possono essere incapsidati, e considerevoli quantità di virus helper vengono quindi ad essere presenti nella preparazione finale di virus, un evento evidentemente non desiderato in vista dell'utilizzo clinico. Per evitare l'incapsidamento del genoma del virus helper possono essere adottate diverse strategie, tra cui la mutazione del segnale ψ del virus helper, l'utilizzo di virus helper con un genoma significativamente più lungo o più corto di quello ottimale per l'incapsidamento, o l'eliminazione del segnale ψ durante il processo di produzione virale. In particolare, la modalità finora più efficace per evitare l'incapsidamento del virus helper è basata su quest'ultima strategia. Cellule HEK 293 progettate in modo da esprimere la ricombinasi Cre (293Cre) vengono trasfettate con il genoma linearizzato del vettore gutless e infettate con un vettore adenovirale di prima generazione (deleto della regione E1) in cui il segnale ψ è fiancheggiato da due sequenze loxP. All'interno delle cellule, il segnale ψ viene quindi rimosso, prevenendo l'incapsidamento del genoma del virus helper nei virioni. Utilizzando questo sistema, la contaminazione da parte del virus helper nelle preparazioni finali di vettore è dell'ordine del 0.1-10% rispetto al vettore gutless. Nonostante la relativa efficienza con cui i vettori gutless possono essere prodotti utilizzando il metodo sopra descritto, i livelli residui di contaminazione da parte del virus helper, probabilmente dovuti all'incompleta efficacia della ricombinasi Cre, pongono comunque importanti problemi di sicurezza in vista della possibile applicazione clinica di questi vettori.



Produzione dei vettori adenovirali gutless. I vettori sono prodotti nelle cellule 293/Cre trasfettate con il DNA linearizzato del vettore gutless e con un vettore helper adenovirale in cui la regione ψ è fiancheggiata da due siti loxP. All'interno delle cellule, la ricombinasi Cre rimuove la regione ψ dal genoma del vettore helper, prevenendo quindi la sua incorporazione nei virioni e consentendo l'incapsidazione selettiva del DNA del vettore gutless

Schema riassuntivo dei metodi di produzione



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5609467/>

Quattro metodi comunemente usati per generare e produrre vettori adenovirali per la veicolazione del gene. (A) Il metodo tradizionale: ricombinazione nelle cellule HEK-293. Il gene di interesse (GOI) viene prima clonato in un vettore navetta, che contiene 5'-ITR, segnale di packaging e regioni omologhe al genoma adenovirale. Gli adenovirus sono generati nelle cellule HEK-293 attraverso la ricombinazione tra il vettore navetta e il vettore della spina dorsale adenovirale, che non è in grado di produrre virus da solo. (B) Ricombinazione mediata da Cre/LoxP. Il GOI viene clonato in un vettore navetta che contiene i siti LoxP. La ricombinazione mediata dalla ricombinasi cre si verifica con un vettore della spina dorsale adenovirale contenente LoxP in vitro o cellule 293-Cre, portando alla generazione di adenovirus. (C) Il sistema AdEasy. Il GOI è subclonato in un vettore navetta che contiene 5'-ITR e segnale di assemblaggio, nonché un'unità di replicazione batterica contenente kanamicina fiancheggiata da bracci omologhi. I plasmidi adenovirali ricombinanti vengono generati attraverso la ricombinazione omologa tra il vettore navetta linearizzato e il vettore della spina dorsale adenovirale resistente all'ampicillina, come pAdEasy1, nelle cellule del ceppo batterico BJ5183 sotto la selezione della kanamicina. I plasmidi adenovirali risultanti vengono linearizzati e utilizzati per la produzione di adenovirus nelle cellule HEK-293. (D) L'uso di adenovirus helper per la produzione di HC-AdV (o HD-AdV o Gutless AdV). Il GOI viene clonato in un vettore di trasferimento che contiene solo ITR e segnale di assemblaggio. Gli adenovirus sono generati con un adenovirus helper, che non verrà impacchettato a causa dell'eliminazione del segnale di impacchettamento nelle cellule HEK-293 modificate, solitamente tramite il sistema di escissione Cre/LoxP o FLP/FRT.

Purificazione e caratterizzazione dei vettori adenovirali

I virioni corrispondenti ai vettori adenovirali prodotti dalle cellule helper vengono purificati mediante tre centrifugazioni successive, di cui la prima è una centrifugazione convenzionale e le ultime due sono condotte in un gradiente di cloruro di cesio, in cui le particelle virali vengono separate in funzione della loro specifica densità e quindi purificate e concentrate. Prima dell'utilizzo, le preparazioni di vettore devono essere controllate per la possibile presenza di virus in grado di replicarsi autonomamente (replication competent adenovirus, RCA).

In particolare, le cellule HEK 293 utilizzate dalla maggior parte dei protocolli contengono ~4.5 kb della regione del braccio "sinistro" del genoma di Ad5, comprendente la regione E1, integrata nel cromosoma 19 umano.

Questa regione può quindi ricombinare con il vettore adenovirale di prima o seconda generazione, o con il virus helper nel caso dei vettori gutless, generando quindi degli RCA.

Questo evento è tanto più probabile quando più larga sia la scala della preparazione del vettore; inoltre, dal momento che gli RCA si replicano in maniera più efficace del vettore, essi possono progressivamente espandersi e la contaminazione diventare progressivamente sempre più rilevante nel corso di successive produzioni.

Nel caso una contaminazione da RCA sia rilevata, ad esempio mediante la PCR, il vettore originale va nuovamente isolato a partire da placche di lisi generate dalla replicazione di singoli cloni.

Proprietà dei vettori adenovirali

Gli adenovirus rappresentano uno strumento molto efficace per il trasferimento genico nelle cellule di mammifero. Infatti, i vettori basati su questi virus infettano un vasto numero di cellule, siano esse in fase replicativa o quiescenti; possono essere purificati e concentrati, fino a raggiungere titoli dell'ordine di 1×10^{13} particelle/ml.

A livello clinico, il loro utilizzo è tuttavia limitato dalla risposta infiammatoria e immunitaria che essi suscitano, risposta che da un lato limita la durata di espressione del transgene e dall'altro suscita importanti problemi di sicurezza. La potente induzione di una risposta infiammatoria o immunitaria fu alla base della morte nel 1999 di un paziente di 18 anni reclutato presso l'Università della Pennsylvania a Filadelfia per il deficit ereditario dell'enzima ornitina transcarbamilasi (OTC), indispensabile per il ciclo dell'urea. Al paziente era stato iniettato nel fegato, attraverso l'arteria epatica, un vettore adenovirale di seconda generazione che veicolava il cDNA di OTC. Dopo poche ore dall'infusione di una dose relativamente alta di vettore, il paziente iniziò a manifestare gravi sintomi di tossicità sistemica e dopo 4 giorni seguì il decesso. La morte di questo paziente è stata successivamente attribuita ad una massiccia risposta infiammatoria dovuta all'inoculazione del vettore adenovirale, probabilmente innescata dall'attivazione di una cascata di citochine da parte del capsido virale.

Alla luce di queste problematiche, l'utilizzo clinico dei vettori adenovirali di prima e seconda generazione rimane oggi limitato alle applicazioni in cui la durata dell'espressione del transgene non sia desiderata o richiesta, e la stimolazione immunitaria sia altresì desiderabile; in pratica, questo è il caso della terapia genica dei tumori e delle vaccinazioni a base genica. Per quanto riguarda invece i vettori gutless, essi non esprimono geni virali, e le cellule che li contengono non sono quindi riconosciute ed eliminate dal sistema immunitario, fatta salva la potenzialità antigenica del transgene che veicolano. Questo risulta di particolare interesse per quelle applicazioni in cui altri vettori (in particolare gli AAV) non sono invece in grado di veicolare geni terapeutici particolarmente lunghi. Questo è il caso, ad esempio, della distrofia muscolare di Duchenne, una patologia causata da mutazioni del gene

della distrofina. Il cDNA della distrofina ha una lunghezza di ~14 kb, troppo lungo, per essere veicolato nei vettori AAV ma ampiamente nei limiti di trasferimento genico da parte dei vettori adenovirali gutless. L'utilizzo clinico di questi vettori tuttavia è ancora limitato dalla quantità ancora inaccettabile di virus helper contaminante e dalla difficoltà di espandere la loro produzione su vasta scala.

VETTORI ADENOVIRALI PER LA PRODUZIONE DI VACCINI CONTRO IL SARS-COV-2

Come è noto, i vaccini virali tradizionali si basano su agenti patogeni inattivati o attenuati. I progressi nella virologia molecolare in concerto con l'immunologia virale consentono ora l'ingegneria genetica di vettori che esprimono esclusivamente quegli antigeni virali che inducono i correlati immunitari di protezione.

Gli adenovirus sono stati inizialmente studiati come veicoli per la terapia genica, come approfondito sopra.

I tentativi di sostituire i geni mancanti o difettosi mediante il trasferimento di geni adenovirali sono stati in gran parte infruttuosi negli animali da esperimento e nei volontari umani, a causa delle risposte immunitarie innate e adattative indotte dagli antigeni adenovirali. Sebbene ciò abbia ridotto l'interesse come veicoli di sostituzione di geni, dall'altro l'ha spostato verso l'uso come vettori di vaccini per la profilassi delle malattie infettive.

I vettori adenovirali sono candidati attraenti per l'industria farmaceutica dei vaccini per una serie di motivi: il genoma adenovirale è ben caratterizzato e relativamente facile da manipolare; la maggior parte degli adenovirus causa malattie lievi negli adulti umani immunocompetenti, e mediante l'eliminazione di regioni cruciali del genoma virale i vettori possono essere resi difettosi nella replicazione, il che aumenta la loro prevedibilità e riduce gli effetti collaterali indesiderati; gli adenovirus hanno un ampio tropismo verso una varietà di cellule in divisione e non; possono essere replicati a titoli elevati in colture di tessuti; possono essere applicati sia per via sistemica che attraverso le mucose e la loro relativa termostabilità ne facilita l'uso clinico.³⁵¹

³⁵¹ Tatsis N, Ertl HC.

Adenoviruses as vaccine vectors.

Mol Ther. 2004 Oct;10(4):616-29. doi: 10.1016/j.ymthe.2004.07.013

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7106330/>

Joe CCD et al

Manufacturing a chimpanzee adenovirus-vectored SARS-CoV-2 vaccine to meet global needs.

Biotechnol Bioeng. 2022 Jan;119(1):48-58. doi: 10.1002/bit.27945

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8653296/>

Kis Z, Tak K, Ibrahim D, et al.

Pandemic-response adenoviral vector and RNA vaccine manufacturing.

NPJ Vaccines. 2022;7(1):29. Published 2022 Mar 2. doi:10.1038/s41541-022-00447-3

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8891260/>

Hasanpourghadi M, Novikov M, Ertl HCJ.

COVID-19 Vaccines Based on Adenovirus Vectors.

Trends Biochem Sci. 2021 May;46(5):429-430. doi: 10.1016/j.tibs.2021.03.002.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7955943/>

Mendonça, S.A., Lorincz, R., Boucher, P. et al.

Adenoviral vector vaccine platforms in the SARS-CoV-2 pandemic.

npj Vaccines 6, 97 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41541-021-00356-x>

<https://www.nature.com/articles/s41541-021-00356-x>

Coughlan L, Kremer EJ, Shayakhmetov DM.

Adenovirus-based vaccines—a platform for pandemic preparedness against emerging viral pathogens.

Mol Ther. 2022 Jan 31:S1525-0016(22)00034-X. doi: 10.1016/j.ymthe.2022.01.034.

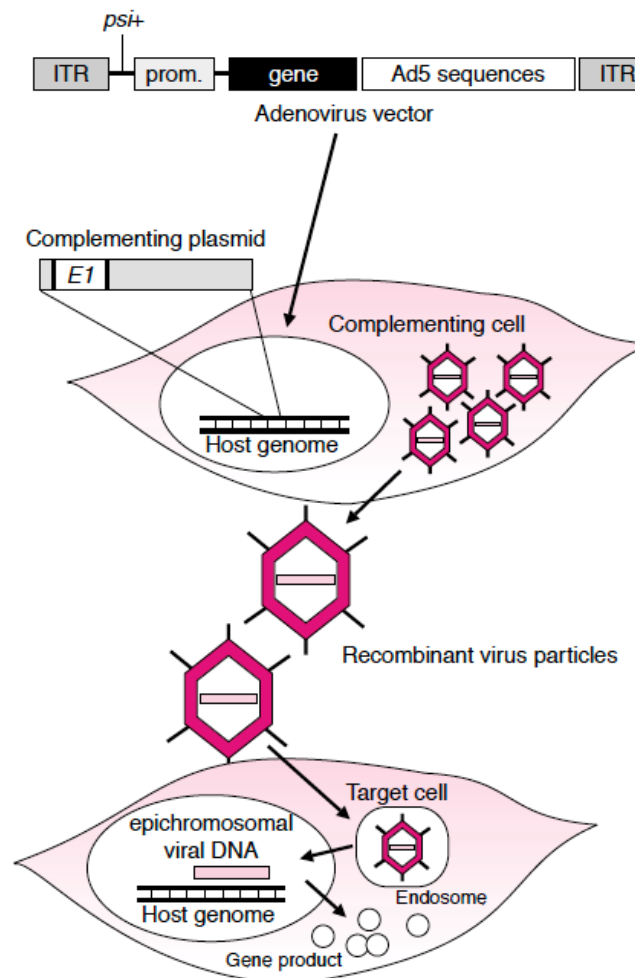
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8801892/>

<https://www.precisionvaccinations.com/vaccines/vaxzevria-covid-19-vaccine-astrazeneca>

<https://www.genengnews.com/sponsored/overview-manufacturing-adenoviral-vectors-at-large-scale/>

<https://www.science.org/content/blog-post/how-you-make-adenovirus-vaccine>

I vettori adenovirali si basano principalmente sui sierotipi 2 e 5. I geni degli antigeni vaccinali sono inseriti nella regione E1 rimossa dal genoma virale, guidati da promotori interni. Come già visto, la funzione di E1 per la produzione di particelle virali è fornita dalla linea cellulare complementare che esprime E1 e produce stock virali ad alto titolo per l'infezione delle cellule del sistema immunitario. Dopo l'infezione delle cellule bersaglio, le particelle virali entrano nell'endosoma citoplasmatico e rilasciano il DNA virale che contiene l'antigene. Il DNA virale si localizza poi a livello epicromosomico garantendo l'espressione genica dell'antigene vaccinale.³⁵²



https://www.researchgate.net/publication/12338027_Viral_Vectors_for_Gene_Transfer

³⁵² Walther, Wolfgang & Stein, Ulrike.
Viral Vectors for Gene Transfer.
Drugs. (2000) 60. 249-71. 10.2165/00003495-200060020-00002.
https://www.researchgate.net/publication/12338027_Viral_Vectors_for_Gene_Transfer

Tatsis N, Ertl HC.
Adenoviruses as vaccine vectors.
Mol Ther. 2004 Oct;10(4):616-29. doi: 10.1016/j.ymthe.2004.07.013.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7106330/>

Barry MA, Ruben JD, Lu SC.
Retargeting adenoviruses for therapeutic applications and vaccines.
FEBS Lett. 2020 Jun;594(12):1918-1946. doi: 10.1002/1873-3468.13731.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7311308/>

Special issue: Adenovirus biology, Disease and Therapy
FEBS Lett, 593(24) 3393-3673 December 2019
<https://febs.onlinelibrary.wiley.com/toc/18733468/2019/593/24>

Principi di produzione dei vettori adenovirali utilizzati come vaccini

La maggior parte dei vettori attualmente utilizzati come carrier vaccinali sono deleti in E1, e ciò non solo rende la replicazione dei vettori difettosa, ma consente anche una presentazione prolungata dell'antigene riducendo la capacità dei vettori di indurre la morte delle cellule infette.

Come già visto, E1 è essenziale per la replicazione virale e quindi deve essere fornito in *trans* durante la produzione dei vettori. Per incorporare sequenze estranee più grandi, sono stati sviluppati vettori in cui sono rimossi E1 ed E3³⁵³ e possono ospitare fino a 7,5 kb di DNA estraneo. I vettori con delezioni aggiuntive sono stati finora esplorati principalmente per la terapia genica. Tali vettori includono quelli deleti di E1 ed E4³⁵⁴.

I vettori senza E4 producono meno prodotti genici tardivi rispetto ai vettori senza E1 e quindi riducono l'induzione delle risposte immunitarie specifiche del vettore. Ci si aspetterebbe anche che, in presenza di cellule T CD8⁺ specifiche per adenovirus, i vettori senza E4 forniscano quantità inferiori di antigeni bersaglio per la distruzione mediata dai linfociti T delle cellule presentanti l'antigene, aumentino potenzialmente la durata della presentazione dell'antigene del vaccino, e di conseguenza l'entità della risposta immunitaria antigene-specifica. Inoltre, l'eliminazione di E4 riduce al minimo la crescita del virus competente per la replicazione nelle linee cellulari di assemblaggio³⁵⁵. Sono stati costruiti vettori senza E1 ed E2A, ma hanno prodotto rese da 30 a 40 volte inferiori rispetto ai costrutti contenenti E2A³⁵⁶. Per la terapia genica sono stati sviluppati vettori senza E1, E2A, E4 ed E3³⁵⁷ e vettori privi di tutti i geni virali (vettori gutted ["sventrati"]), che possono essere propagati solo in presenza di virus helper, che come già visto comunemente contaminano i lotti dei vettori³⁵⁸.

Inoltre, i costrutti adenovirali gutted non possono attualmente essere propagati alle quantità necessarie per lo sviluppo clinico di vettori destinati alla vaccinazione di massa.

³⁵³ Xiang ZQ, Yang Y, Wilson JM, Ertl HC.

A replication-defective human adenovirus recombinant serves as a highly efficacious vaccine carrier. *Virology*. 1996 May 1;219(1):220-7. doi: 10.1006/viro.1996.0239. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0239>

Makimura M, Miyake S, Akino N, Takamori K, Matsuura Y, Miyamura T, Saito I.

Induction of antibodies against structural proteins of hepatitis C virus in mice using recombinant adenovirus. *Vaccine*. 1996 Jan;14(1):28-36. doi: 10.1016/0264-410x(95)00161-s. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8821646/>

³⁵⁴ Mizuguchi H, Kay MA.

A simple method for constructing E1- and E1/E4-deleted recombinant adenoviral vectors. *Hum Gene Ther*. 1999 Aug 10;10(12):2013-7. doi: 10.1089/10430349950017374 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10466635/>

³⁵⁵ Yeh P, Dedieu JF, Orsini C, Vigne E, Deneffe P, Perricaudet M.

Efficient dual transcomplementation of adenovirus E1 and E4 regions from a 293-derived cell line expressing a minimal E4 functional unit. *J Virol*. 1996 Jan;70(1):559-65. doi: 10.1128/JVI.70.1.559-565.1996. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC189844/>

³⁵⁶ Zhou H, O'Neal W, Morral N, Beaudet AL.

Development of a complementing cell line and a system for construction of adenovirus vectors with E1 and E2a deleted. *J Virol*. 1996 Oct;70(10):7030-8. doi: 10.1128/JVI.70.10.7030-7038.1996. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC190753/>

³⁵⁷ Lusky M, Christ M, Rittner K, Dieterle A, Dreyer D, Mourou B, Schultz H, Stoeckel F, Pavirani A, Mehtali M.

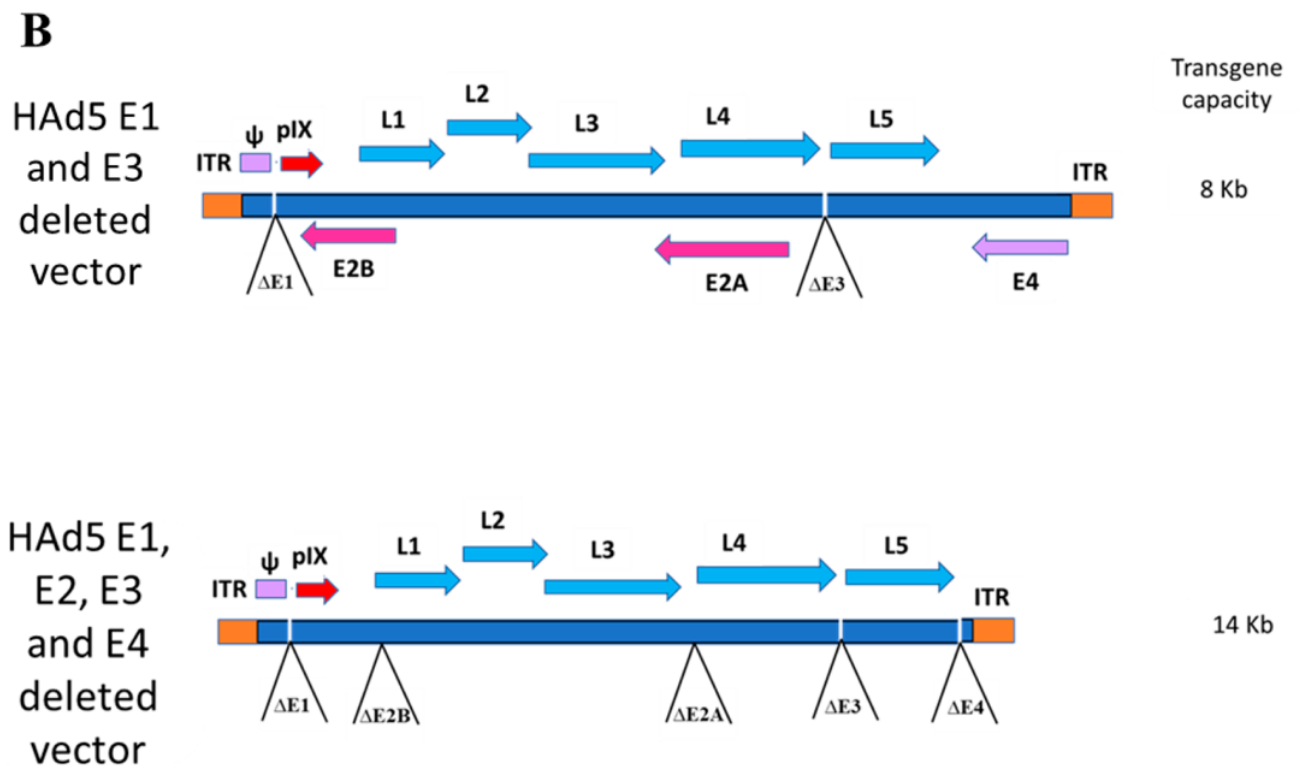
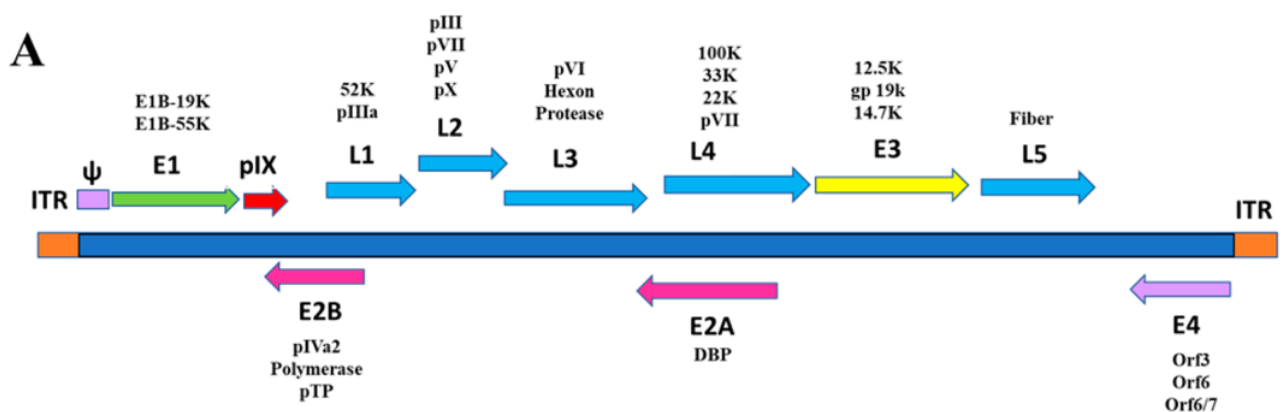
In vitro and in vivo biology of recombinant adenovirus vectors with E1, E1/E2A, or E1/E4 deleted. *J Virol*. 1998 Mar;72(3):2022-32. doi: 10.1128/JVI.72.3.2022-2032.1998. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC109495/>

Gozziglia MI, Lapcevic C, Roy S, Kang Q, Kadan M, Wu V, Pechan P, Kaleko M.

Generation of an adenovirus vector lacking E1, e2a, E3, and all of E4 except open reading frame 3. *J Virol*. 1999 Jul;73(7):6048-55. doi: 10.1128/JVI.73.7.6048-6055.1999. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC112666/>

³⁵⁸ Steinwaerder DS, Carlson CA, Lieber A.

Generation of adenovirus vectors devoid of all viral genes by recombination between inverted repeats. *J Virol*. 1999 Nov;73(11):9303-13. doi: 10.1128/JVI.73.11.9303-9313.1999. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC112965/>



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7712206/>

(A) La mappa trascrizionale dell'adenovirus umano di tipo 5 (HA5). È composto dai primi geni della regione (E) (E1–E4), che sono responsabili della replicazione del genoma, della regolazione della trascrizione virale e della soppressione della risposta cellulare infetta al virus. Le unità di trascrizione genica tardiva (L1–L5) sono espresse alla fine del ciclo di replicazione virale che porta alla sintesi della maggior parte delle proteine strutturali virali. (B) Rappresentazione schematica dei vettori del vaccino HA5. Il pannello superiore rappresenta il genoma del vettore contenente le delezioni E1 ed E3 e il pannello inferiore mostra l'organizzazione del genoma del vettore costituita dalle delezioni E1–E4 per aumentare la capacità di inserimento della cassetta del gene estraneo.

I vettori adenovirali con delezioni diverse da E3 possono essere coltivati solo su linee cellulari che forniscono in *trans* le unità di trascrizione eliminate. Le cellule HEK 293³⁵⁹, che portano il genoma di AdHu5 sul lato sinistro,

³⁵⁹Tan E, Chin CSH, Lim ZFS, Ng SK.

HEK293 Cell Line as a Platform to Produce Recombinant Proteins and Viral Vectors. Front Bioeng Biotechnol. 2021 Dec 13;9:796991. doi: 10.3389/fbioe.2021.796991. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8711270/>

incluso E1, l'ITR sinistrorso, le sequenze di assemblamento ad azione *cis* e le sequenze della proteina IX, sono più comunemente utilizzate per la propagazione di vettori AdHu5 senza E1.

Come già visto, a crescita dei vettori AdHu5 sulle cellule HEK 293 può portare alla ricombinazione omologa seguita dalla crescita dell'adenovirus competente per la replicazione (RCA).³⁶⁰ Ciò può verificarsi perché molti vettori Ad di prima generazione vengono deleti da nt 400 a 3500 e quindi mantengono ancora un'omologia significativa con il DNA cellulare, consentendo il verificarsi di un evento di ricombinazione del doppio crossover³⁶¹. Sebbene la presenza di RCA sia molto bassa nei primi passaggi del virus³⁶², ciò è problematico per la produzione virale su larga scala e le applicazioni cliniche³⁶³ a causa di problemi di sicurezza.

Nel 2001, la FDA ha stabilito che la preparazione del vettore adenovirale difettoso per la replicazione deve contenere meno di 1 RCA in 3×10^{10} particelle virali (Biological Response Modifiers Advisory Committee).

Nonostante questo problema, HEK293 era e rimane ancora una delle principali linee cellulari ospiti per lo sviluppo di vettori adenovirali, incluso lo sviluppo di banche di master cellule e lo sviluppo e l'ottimizzazione dei processi di produzione di vettori adenovirali.³⁶⁴

Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R.
Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5.
J Gen Virol. 1977 Jul;36(1):59-74. doi: 10.1099/0022-1317-36-1-59.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/886304/>

Kovesdi I, Hedley SJ.
Adenoviral producer cells.
Viruses. 2010;2(8):1681-1703. doi:10.3390/v2081681
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3185730/>

³⁶⁰ Sayedahmed EE, El Kashif A, Alhashimi M, Sambhara S, Mittal SK.
Adenoviral Vector-Based Vaccine Platforms for Developing the Next Generation of Influenza Vaccines.
Vaccines (Basel). 2020;8(4):574. Published 2020 Oct 1. doi:10.3390/vaccines8040574
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7712206/>

³⁶¹ Murakami P, Pungor E, Files J, Do L, van Rijnsoever R, Vogels R, Bout A, McCaman M.
A single short stretch of homology between adenoviral vector and packaging cell line can give rise to cytopathic effect-inducing, helper-dependent E1-positive particles.
Hum Gene Ther. 2002 May 20;13(8):909-20. doi: 10.1089/10430340252939023.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12031124/>

³⁶² Lochmüller H, Jani A, Huard J, Prescott S, Simoneau M, Massie B, Karpati G, Acsadi G.
Emergence of early region 1-containing replication-competent adenovirus in stocks of replication-defective adenovirus recombinants (delta E1 + delta E3) during multiple passages in 293 cells.
Hum Gene Ther. 1994 Dec;5(12):1485-91. doi: 10.1089/hum.1994.5.12-1485.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7711141/>

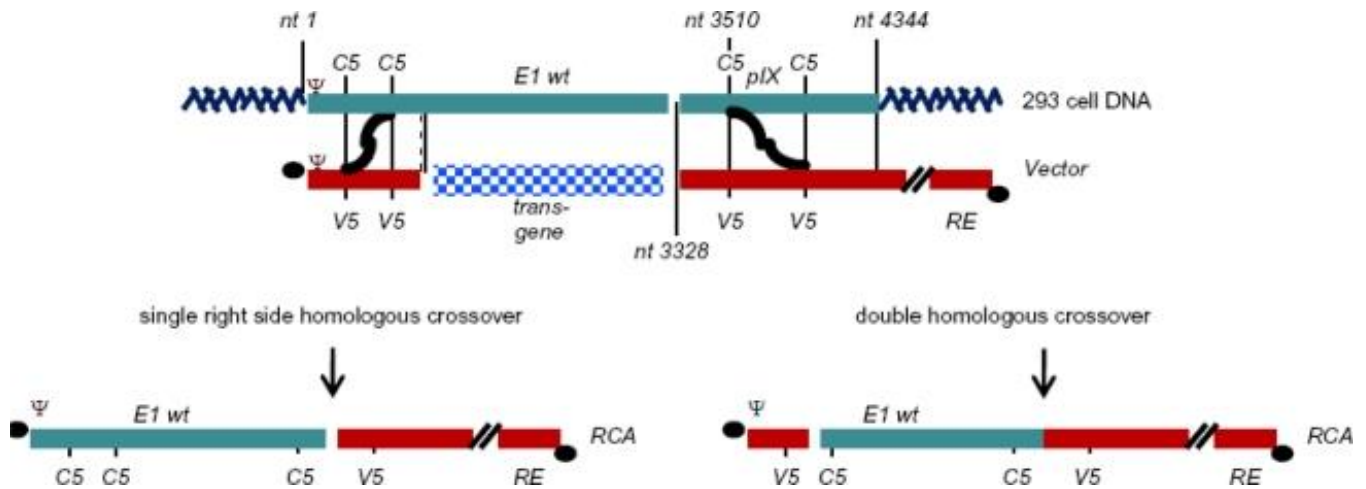
³⁶³ Hehir KM, Armentano D, Cardoza LM, et al.
Molecular characterization of replication-competent variants of adenovirus vectors and genome modifications to prevent their occurrence.
J Virol. 1996;70(12):8459-8467. doi:10.1128/JVI.70.12.8459-8467.1996
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC190936/>

Hehir KM, Armentano D, Cardoza LM, et al.
Molecular characterization of replication-competent variants of adenovirus vectors and genome modifications to prevent their occurrence.
J Virol. 1996;70(12):8459-8467. doi:10.1128/JVI.70.12.8459-8467.1996
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10505858/>

Zhu J, Grace M, Casale J, Chang AT, Musco ML, Bordens R, Greenberg R, Schaefer E, Indelicato SR.
Characterization of replication-competent adenovirus isolates from large-scale production of a recombinant adenoviral vector.
Hum Gene Ther. 1999 Jan 1;10(1):113-21. doi: 10.1089/10430349950019246.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10022536/>

³⁶⁴ Lusky M.
Good manufacturing practice production of adenoviral vectors for clinical trials.
Hum Gene Ther. 2005 Mar;16(3):281-91. doi: 10.1089/hum.2005.16.281.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15812223/>

Gaggar A, Shayakhmetov DM, Lieber A.
CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses.



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3185730/>

Generazione di RCA in cellule HEK293. Le regioni complementari della sequenza Ad5 nel vettore e il genoma HEK293 sono allineate nella parte superiore della figura. Queste regioni consentono la ricombinazione omologa e il salvataggio dell'adenovirus competente ricombinante.

Questo problema comune è almeno in parte aggirato in una linea cellulare di assemblamento alternativa, cioè le cellule PER.C6³⁶⁵. La sequenza Ad5 incorporata nel genoma cellulare è la sequenza codificante E1A- ed E1B, nt 459–3510, sotto il controllo del promotore della fosfoglicerato chinasi (PGK) umana per compensare la rimozione del promotore E1A endogeno in 5'.

Inoltre, in questo costrutto è stata eliminata anche la regione codificante per la proteina pIX del capsido minore che si trova nella regione 3' e segue la regione codificante E1B 55-kDA.

Il frammento più piccolo della sequenza Ad5 così incorporato nella linea cellulare ha un'omologia limitata con molti vettori adenovirali carenti di E1 e la doppia ricombinazione omologa non è possibile quando si utilizza un vettore adenovirale opportunamente progettato, eliminando così l'RCA.

Tuttavia, ulteriori studi hanno indicato che una rara ricombinazione non convenzionale può ancora verificarsi se il genoma del vettore adenovirale non è perfettamente abbinato.

È sufficiente solo un breve tratto di omologia tra il DNA cellulare e il genoma del vettore per consentire la ricombinazione³⁶⁶ con conseguente RCA atipica o pseudo RCA.

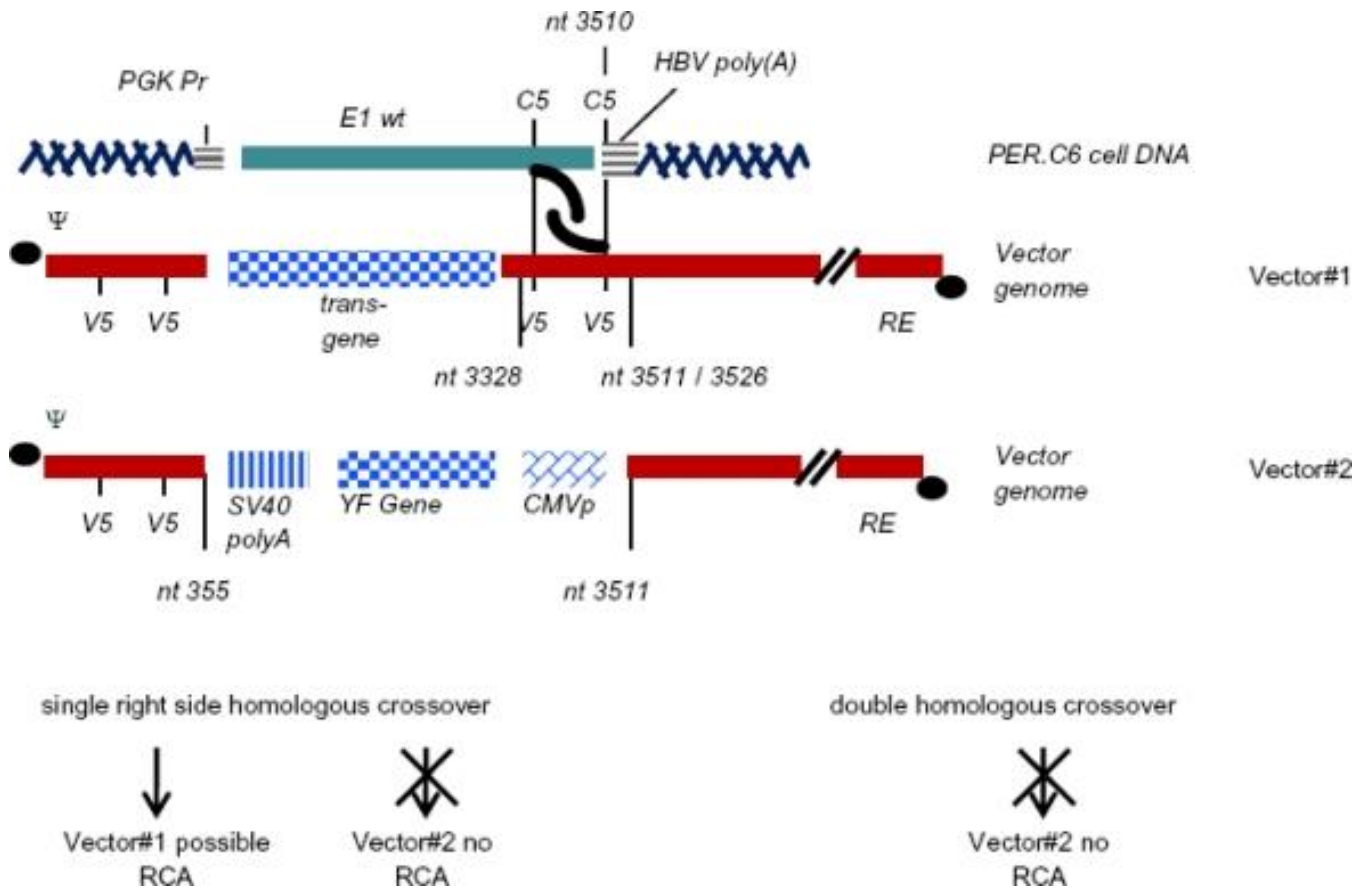
È stato riscontrato che, sebbene la particella virale contenga sequenze E1 intatte, non può replicarsi da sola poiché le delezioni genomiche si verificano anche altrove nel vettore. In questo caso, le particelle virali sono state definite E1-positive (HDEP) dipendenti dall'helper³⁶⁷.

Nat Med. 2003 Nov;9(11):1408-12. doi: 10.1038/nm952.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14566335/>

³⁶⁵ Fallaux FJ, Bout A, van der Velde I, van den Wollenberg DJ, Hehir KM, Keegan J, Auger C, Cramer SJ, van Ormondt H, van der Eb AJ, Valerio D, Hoeben RC. New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. Hum Gene Ther. 1998 Sep 1;9(13):1909-17. doi: 10.1089/hum.1998.9.13-1909.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9741429/>

³⁶⁶ Murakami P, Pungor E, Files J, Do L, van Rijnsoever R, Vogels R, Bout A, McCaman M. A single short stretch of homology between adenoviral vector and packaging cell line can give rise to cytopathic effect-inducing, helper-dependent E1-positive particles. Hum Gene Ther. 2002 May 20;13(8):909-20. doi: 10.1089/10430340252939023.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12031124/>

³⁶⁷ Murakami P, Havenga M, Fawaz F, et al. Common structure of rare replication-deficient E1-positive particles in adenoviral vector batches. J Virol. 2004;78(12):6200-6208. doi:10.1128/JVI.78.12.6200-6208.2004
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC416523/>



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3185730/>

Effetto della progettazione del vettore sulla produzione libera da RCA nella linea cellulare PER.C6. Nel vettore n. 1 c'è un breve tratto di omologia con la sequenza PER.C6-Ad5 che consente la ricombinazione omologa. Ciò si traduce in RCA atipico. Quando il vettore non ha omologia (Vettore n. 2) non si verifica alcuna ricombinazione omologa e la produzione virale è libera da RCA.

Questi fattori indicano che la progettazione del vettore adenovirale richiede maggiore attenzione e la rimozione di eventuali frammenti sovrapposti per impedire che questi eventi si verifichino anche quando si utilizzano cellule PER.C6. Tuttavia, PER.C6 è probabilmente la linea cellulare fino ad oggi meglio progettata e più favorevole per lo sviluppo di vettori Ad5 di prima generazione per lo sviluppo clinico. Uno dei principali svantaggi di questa linea cellulare è che, a differenza di HEK293, che è più liberamente disponibile per la comunità scientifica, PER.C6 ha attualmente costi/usi di licenza severi che impediscono a molti laboratori di lavorare con questa linea cellulare. Inoltre, la linea PER.C6 è considerata meno robusta della linea cellulare HEK293, in quanto è meno adattabile alla coltura priva di siero per vettori adenovirali di produzione su larga scala.

Vaccini COVID-19 e linee cellulari da feti abortiti

“Una preoccupazione per quanto riguarda la valutazione etica dei candidati al vaccino virale è il potenziale utilizzo di linee cellulari derivate da feti abortiti nello sviluppo, nella produzione o nella sperimentazione di un vaccino. Questa analisi utilizza i dati della letteratura scientifica primaria quando disponibili, insieme ai dati provenienti da documenti affidabili di studi clinici, siti Web di monitoraggio dei vaccini e informazioni commerciali pubblicate. La speranza è che, fornendo dati accurati, i destinatari possano prendere decisioni ben informate in merito alle scelte del vaccino.”

<https://lozierinstitute.org/update-covid-19-vaccine-candidates-and-abortion-derived-cell-lines/>
Update: COVID-19 Vaccine Candidates and Abortion-Derived Cell Lines

Costruzione dei vettori adenovirali ad uso vaccinale

I vettori adenovirali senza E1 venivano costruiti originariamente mediante ricombinazione omologa³⁶⁸.

Le cellule venivano cotrasfettate con il genoma adenovirale purificato delecto di E1 dall'enzima di restrizione e un vettore navetta (shuttle) che conteneva l'ITR sinistrorso, l'enhancer E1a, il segnale di incapsidamento, il promotore IE del citomegalovirus (CMV) (o un altro promotore adatto), un sito di multiclonazione per l'inserimento del gene di interesse e il segnale poli(A) di SV40 seguito da sequenze del genoma adenovirale situato in 3' del dominio di E1.³⁶⁹

Ora la maggior parte dei vettori adenovirali con delezione di E1 sono generati dai cosiddetti "cloni molecolari"³⁷⁰, in cui l'intero genoma adenovirale, compresi gli ITR, è inserito in un plasmide batterico, consentendo la sua propagazione in *Escherichia coli* (vedi figure seguenti). La sequenza di interesse può essere integrata direttamente nel clone molecolare, il quale dopo la rimozione delle sequenze batteriche viene trasfettato in linee cellulari di assemblamento adatte. L'uso di cloni molecolari non solo facilita la generazione di vettori AdHu5, che possono essere costruiti da kit disponibili in commercio, ma facilita anche l'eventuale uso clinico di vettori adenovirali derivati da specie diverse dall'uomo. Gli adenovirus isolati dagli scimpanzé vengono impiegati come vettori di vaccini³⁷¹, però potrebbero essere potenzialmente contaminati da agenti patogeni ancora da identificare in grado di propagarsi inosservati in parallelo con i vettori adenovirali nei tessuti in coltura. Considerando che i virus animali, in particolare quelli provenienti da specie strettamente legate all'uomo come gli scimpanzé, hanno il potenziale di infettare l'uomo³⁷², l'uso di vettori adenovirali di scimpanzé generati dalla propagazione esclusiva in linee cellulari di mammiferi rappresenterebbero un rischio inaccettabile per l'uomo, mentre la generazione di vettori vaccinali da cloni molecolari elimina il pericolo di contaminanti nascosti negli isolati originali.

³⁶⁸ Haj-Ahmad Y, Graham FL.

Development of a helper-independent human adenovirus vector and its use in the transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *J Virol.* 1986 Jan;57(1):267-74. doi: 10.1128/JVI.57.1.267-274.1986. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC252723/>

³⁶⁹ Bisgin A, Sanlioglu AD, Eksi YE, Griffith TS, Sanlioglu S.

Current Update on Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Vaccine Development with a Special Emphasis on Gene Therapy Viral Vector Design and Construction for Vaccination. *Hum Gene Ther.* 2021 Jun;32(11-12):541-562. doi: 10.1089/hum.2021.052. <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/hum.2021.052>

³⁷⁰ Ghosh-Choudhury G, Haj-Ahmad Y, Brinkley P, Rudy J, Graham FL.

Human adenovirus cloning vectors based on infectious bacterial plasmids. *Gene.* 1986;50(1-3):161-71. doi: 10.1016/0378-1119(86)90321-5. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3472993/>

³⁷¹ Farina SF, Gao GP, Xiang ZQ, Rux JJ, Burnett RM, Alvira MR, Marsh J, Ertl HC, Wilson JM.

Replication-defective vector based on a chimpanzee adenovirus. *J Virol.* 2001 Dec;75(23):11603-13. doi: 10.1128/JVI.75.23.11603-11613.2001. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC114747/>

Tatsis N, Tesema L, Robinson ER, Giles-Davis W, McCoy K, Gao GP, Wilson JM, Ertl HC.

Chimpanzee-origin adenovirus vectors as vaccine carriers. *Gene Ther.* 2006 Mar;13(5):421-9. doi: 10.1038/sj.gt.3302675 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16319951/>

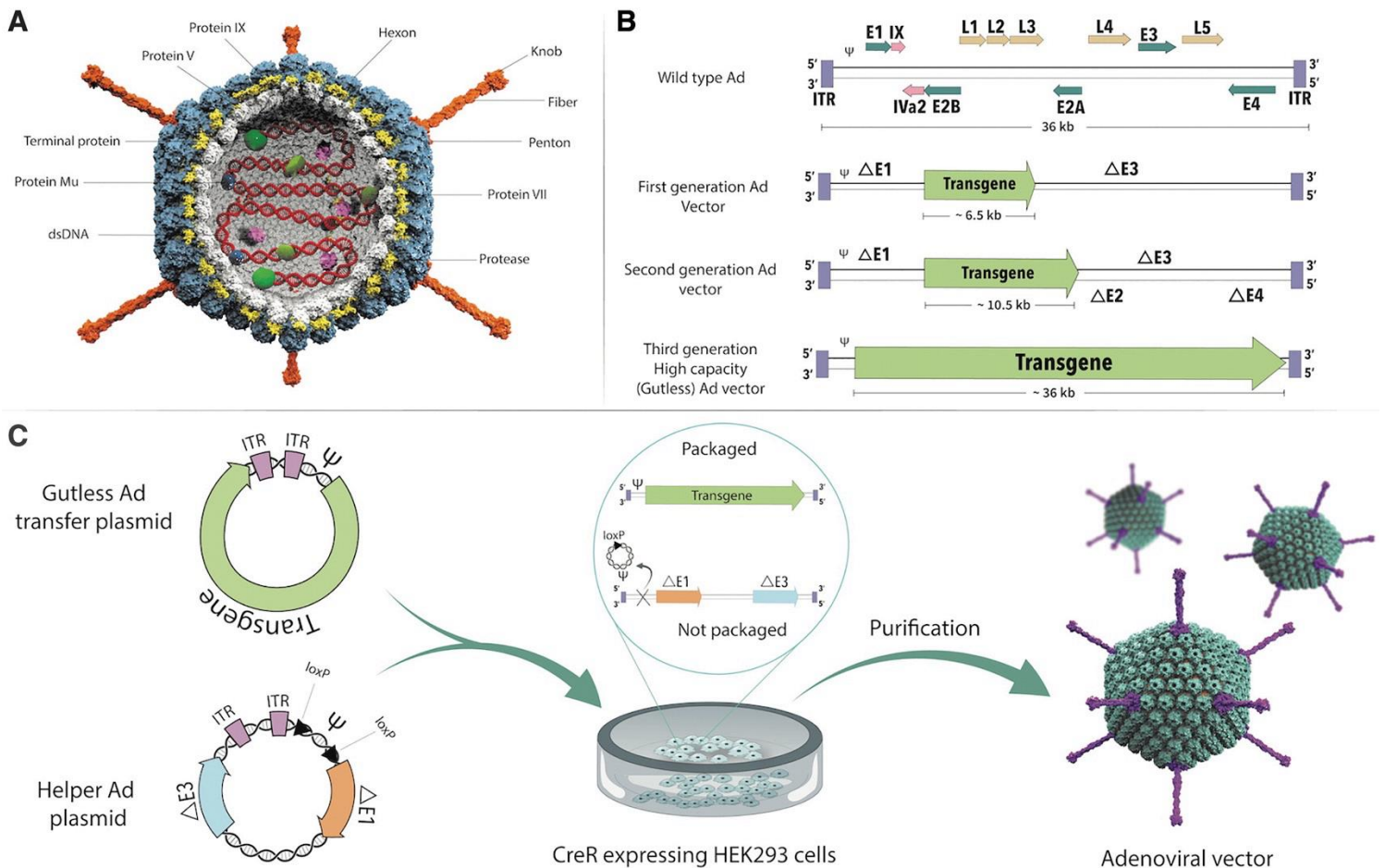
³⁷² Gonzalez JP, Prugnolle F, Leroy E.

Men, primates, and germs: an ongoing affair. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2013;365:337-53. doi: 10.1007/82_2012_304. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7121697/>

Pinto-Santini DM, Stenbak CR, Linial ML.

Foamy virus zoonotic infections. *Retrovirology.* 2017 Dec 2;14(1):55. doi: 10.1186/s12977-017-0379-9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5712078/>

L'identificazione delle placche virali ricombinanti può essere facilitata introducendo geni come la timidina chinasi del virus dell'herpes simplex³⁷³, la proteina fluorescente verde³⁷⁴ o la β -galattosidasi³⁷⁵ nel dominio E1, con il primo che consente la selezione del virus ricombinante da ganciclovir e quest'ultimo per la loro identificazione mediante fluorescenza o dopo colorazione.



<https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/hum.2021.052>

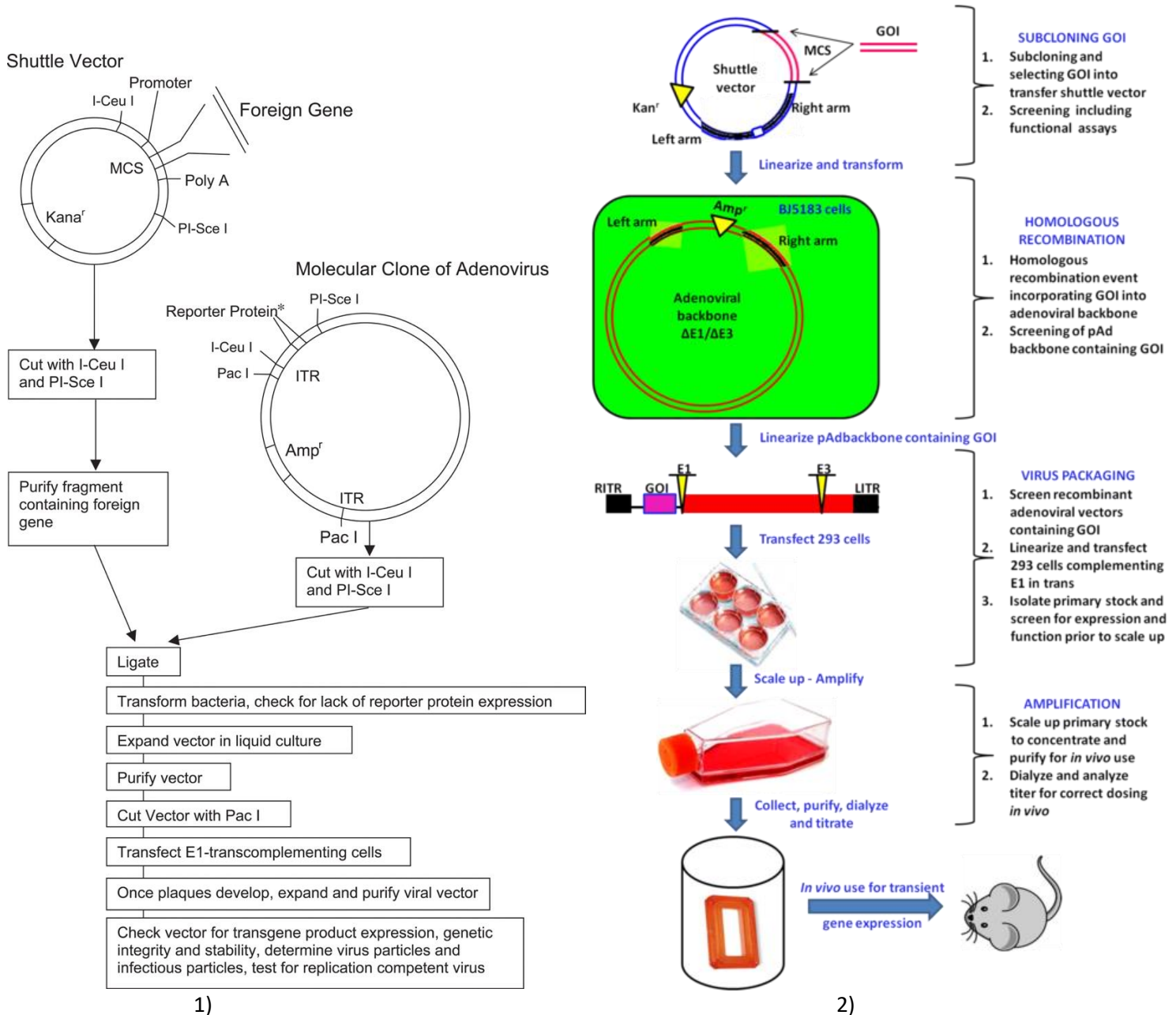
Struttura dell'adenovirus (Ad) e strategia di progettazione vettoriale.189 (A) Struttura molecolare dell'Ad che mostra un genoma dsDNA lineare, capsidi esoni, basi di pentone, fibre e domini della manopola delle proteine spike. (B) Analisi comparativa del genoma dell'Ad di tipo selvaggio con la prima, seconda e terza generazione di vettori adenovirali.93 Le posizioni genomiche dei geni precoci e tardivi, affiancati da ITR, e il segnale di confezionamento ψ sono fornite per l'annuncio di tipo selvaggio. Mentre i vettori adenovirali di prima generazione portano delezioni nelle regioni E1 e/o E3; geni aggiuntivi, E2 ed E4 vengono eliminati oltre a E1 ed E3 nei vettori di seconda generazione.96 Tutte le regioni virali codificanti vengono rimosse nei vettori di terza generazione,

³⁷³ Imler JL, Chartier C, Dieterlé A, Dreyer D, Mehtali M, Pavirani A.
An efficient procedure to select and recover recombinant adenovirus vectors.
Gene Ther. 1995 Jun;2(4):263-8.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7552986/>

³⁷⁴ Davis AR, Wivel NA, Palladino JL, Tao L, Wilson JM.
Construction of adenoviral vectors.
Mol Biotechnol. 2001 May;18(1):63-70. doi: 10.1385/MB:18:1:63
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11439700/>

³⁷⁵ Moraes MP, Mayr GA, Grubman MJ.
pAd5-Blue: direct ligation system for engineering recombinant adenovirus constructs.
Biotechniques. 2001 Nov;31(5):1050, 1052, 1054-6. doi: 10.2144/01315st05.
<https://www.future-science.com/doi/epdf/10.2144/01315st05>

chiamati anche Ad gutless o gutted. (C) Schema di produzione di annunci gutless.95 Il vettore di trasferimento trasporta il transgene, il segnale di confezionamento e gli ITR. Un plasmide Ad helper, che è simile a quello del vettore adenovirale di prima generazione con segnale di confezionamento che fiancheggia i siti loxP, viene utilizzato per produrre il vettore adenovirale gutless. La trasfezione transitoria di Cre ricombinasi (CreR) che esprimono le cellule HEK293 con il vettore di trasferimento e il plasmide codificante Ad helper determina esclusivamente il confezionamento di vettori Ad gutless ma non il genoma del virus helper. Annuncio, adenovirus; ITR, ripetizione terminale invertita.



1) <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2329050116301735>
 2) <https://www.labome.com/method/Adenoviral-Vectors.html>

Schematic illustration of generating recombinant adenoviruses depicting basic principle of three independent steps of 1) subcloning GOI into a shuttle vector which transfers the GOI into the pAd plasmid containing the adenoviral backbone 2) during homologous recombination in the bacterial system, and 3) packaging recombinant adenoviral DNA containing GOI in 293 cells complementing E1 in trans. Recombinant adenoviruses are collected, amplified, concentrated and titrated suitable for *in vivo* application.

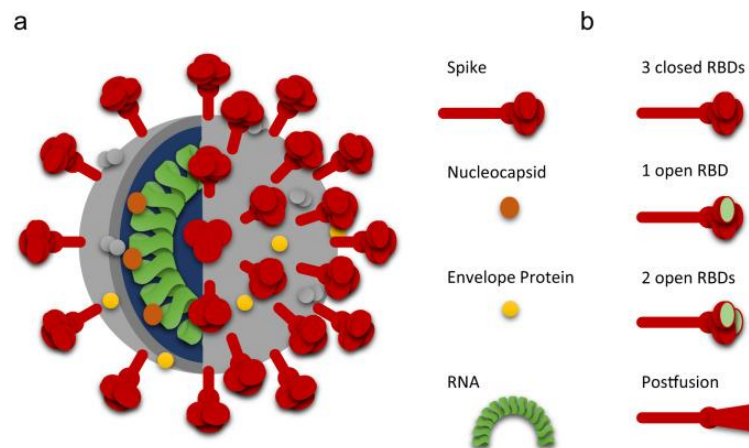
VETTORI ADENOVIRALI UTILIZZATI NEI VACCINI CONTRO IL SARS-COV-2

Sono stati approvati quattro tipi di vaccini a vettore adenovirale per SARS-CoV-2 (Tabella seguente): ChAdOx1 nCoV-19 (VAXZEVRIA, AZD1222) (AstraZeneca/Università di Oxford, Regno Unito), Sputnik V (Gamaleya Research Institute, Russia), Ad26 .COV2-S (Johnson & Johnson, Europa) e Ad5-nCOV (CanSino Biologics Inc., Cina).³⁷⁶

Janssen/Johnson & Johnson (Ad26.COV2-S)

<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/covid-19-vaccine-janssen>

Il vaccino Ad26.COV2-S è un vaccino monouso sviluppato da Janssen Vaccines & Prevention B.V. (Johnson & Johnson) che utilizza un vettore Ad26 di prima generazione (deleto in E1/E3) per fornire la proteina spike del SARS-CoV-2 (isolato di Wuhan-Hu-1) stabilizzata in pre-fusione e la tecnologia [AdVac](#) / PER.C6. Questa proteina è stata stabilizzata attraverso una mutazione in un sito di scissione della furina e una sostituzione della prolina. I dettagli di queste modifiche sono esaminati in Bos et al., 2020.³⁷⁷



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8342436/>

Struttura del coronavirus e aspetti rilevanti per lo sviluppo del vaccino.

a) I vaccini attuali stanno capitalizzando gli epitopi presenti nelle proteine SARS-CoV-2 per suscitare una risposta immunitaria. Le principali proteine utilizzate per lo sviluppo del vaccino sono il nucleocapside e la proteina spike, essenziale per l'ingresso delle cellule. **b)** La proteina Spike può avere modificazioni della conformazione mediate dalla proteasi. La stabilizzazione della proteina nella sua forma di prefusione migliora l'espressione proteica e l'immunogenicità.

Sputnik V (gam-COVID-vac)

Sputnik V è un vaccino sviluppato dal Gamaleya Research Institute in Russia. Il protocollo di vaccinazione consiste in un regime a due dosi che utilizza due Ads umani: Ad26 come primo inoculo e Ad5 come richiamo. I protocolli di immunizzazione con la prima dose e il richiamo con vettore eterologo, in cui viene applicato un diverso tipo di adenovirus a ciascuna dose, vengono utilizzati come strategia per aggirare le risposte immunitarie contro il vettore

³⁷⁶ Sakurai F, Tachibana M, Mizuguchi H.

Adenovirus vector-based vaccine for infectious diseases.

Drug Metab Pharmacokinet. 2022;42:100432. doi:10.1016/j.dmpk.2021.100432

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8585960/>

Mendonça SA, Lorincz R, Boucher P, Curiel DT.

Adenoviral vector vaccine platforms in the SARS-CoV-2 pandemic.

NPJ Vaccines. 2021;6(1):97. Published 2021 Aug 5. doi:10.1038/s41541-021-00356-x

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8342436/>

Custers J, Kim D, Leyssen M, et al.

Vaccines based on replication incompetent Ad26 viral vectors: Standardized template with key considerations for a risk/benefit assessment.

Vaccine. 2021;39(22):3081-3101. doi:10.1016/j.vaccine.2020.09.018

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7532807/>

³⁷⁷ Bos R, et al

Ad26 vector-based COVID-19 vaccine encoding a prefusion-stabilized SARS-CoV-2 Spike immunogen induces potent humoral and cellular immune responses.

NPJ Vaccines. 2020 Sep 28;5:91. doi: 10.1038/s41541-020-00243-x.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7522255/>

virale. Inoltre, è stato dimostrato che i regimi eterologhi di potenziamento primario sono più immunogenici rispetto ai regimi omologhi di potenziamento primario. Da un punto di vista tecnico, entrambi i vettori adenovirali portano lo stesso DNA che codifica per la sequenza proteica della spike a lunghezza intera del SARS-CoV-2 (isolato di Wuhan-Hu-1 con mutazione D614G), senza ulteriori modifiche e vengono replicati nella linea cellulare HEK293.

378

ReiThera/LEUKOCARE/Univercells (GRAd-COV2)³⁷⁹

Il vaccino GRAd-COV2 sviluppato da ReiThera/LEUKOCARE/Univercells utilizza un adenovirus di gorilla, GRAd32 per fornire una sequenza proteica della spike SARS-CoV-2 ingegnerizzata. Questo virus appartiene alla famiglia degli adenovirus del gruppo C, simile a Ad5 e ChAd3 umani³⁸⁰, e le modifiche della proteina spike mirano ad aumentare la stabilità della forma in pre-fusione della proteina per migliorarne l'espressione e la sua immunogenicità.³⁸¹ Il vettore viene deletato in E1 ed E3 e la regione di codifica E4 è stata scambiata con Ad5 ORF6 umano per migliorare la resa di produzione del vettore.

Oxford/AstraZeneca (ChAdOX1-nCoV)³⁸²

Durante l'epidemia di coronavirus della sindrome respiratoria del Medio Oriente (MERS-CoV) del 2012, il gruppo di Oxford ha sviluppato un vaccino utilizzando la tecnologia ChAd (vettore adenovirale dello scimpanzé), che aggira l'immunità preesistente all'Ad5. Il vettore è stato sviluppato da un adenovirus isolato da un campione fecale di scimpanzé e vettorizzato mediante l'eliminazione di E1/E3 e modifiche in E4 (*E4Orf4*, *Orf6* e *Orf6/7* scambiati con l'Ad5 umano).³⁸³

Con l'epidemia di SARS-CoV-2, la stessa struttura dell'adenovirus è stata utilizzata per creare ChAdOX1-nCoV, che codifica per la proteina spike del SARS-CoV-2.³⁸⁴

³⁷⁸ <https://sputnikvaccine.com/>
<https://www.precisionvaccinations.com/vaccines/sputnik-v-vaccine>

Lu S.
Heterologous prime-boost vaccination.
Curr Opin Immunol. 2009 Jun;21(3):346-51. doi: 10.1016/j.coi.2009.05.016.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3743086/>

Tostanoski LH et al
Ad26 vaccine protects against SARS-CoV-2 severe clinical disease in hamsters.
Nat Med. 2020 Nov;26(11):1694-1700. doi: 10.1038/s41591-020-1070-6.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7671939/>

<https://www.pharmaceutical-technology.com/special-focus/ukraine-crisis/russia-sanctions-sputnik-covid-19-vaccine-production/>

³⁷⁹ <https://www.aifa.gov.it/en/-/covid-19-alfa-autorizza-la-sperimentazione-di-fase-i-del-vaccino-reithera-in-italia>

³⁸⁰ Capone S et al
Immunogenicity of a new gorilla adenovirus vaccine candidate for COVID-19.
Mol Ther. 2021 Aug 4;29(8):2412-2423. doi: 10.1016/j.ymthe.2021.04.022.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8062434/>

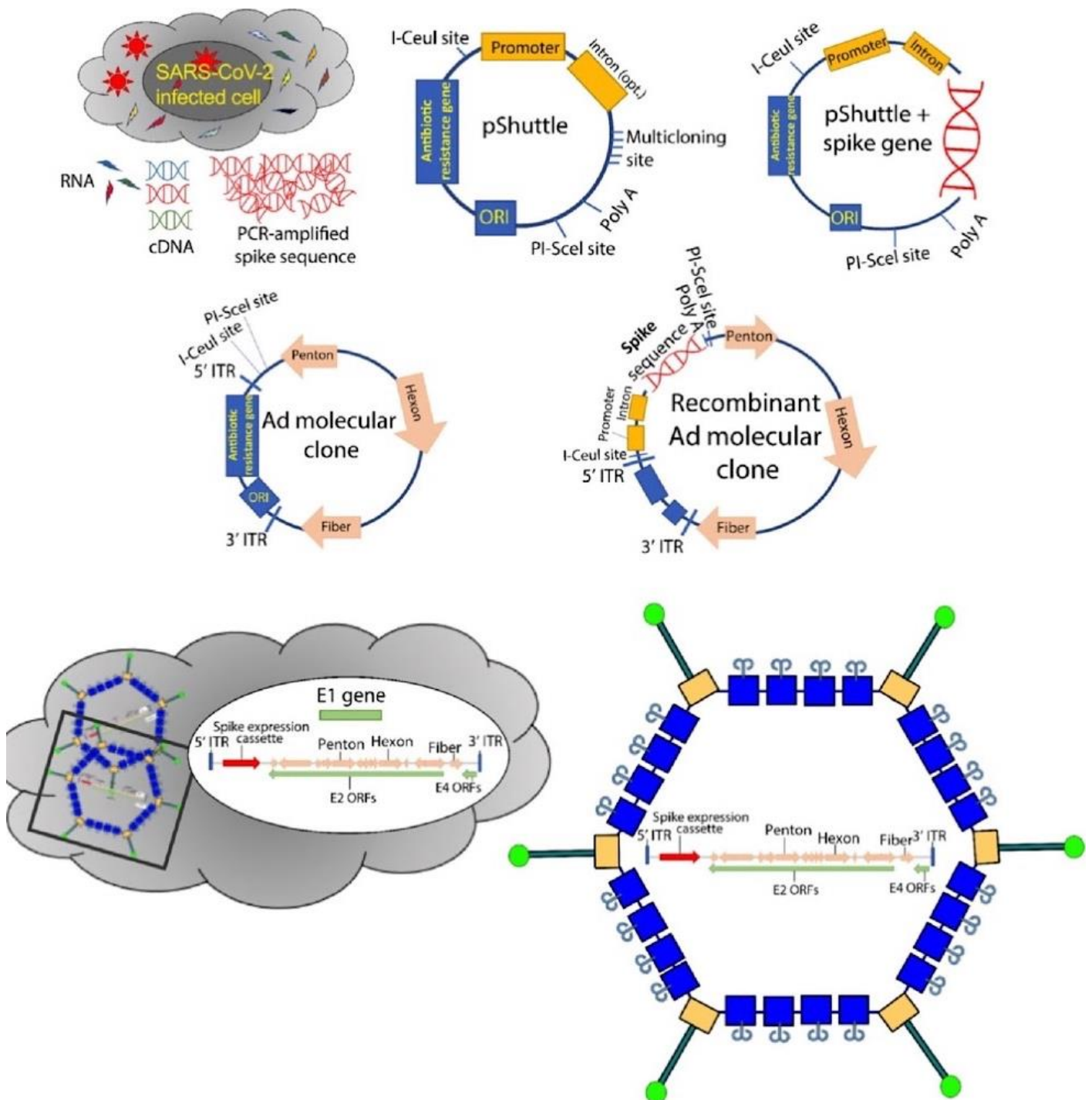
³⁸¹ Pallesen J et al
Immunogenicity and structures of a rationally designed prefusion MERS-CoV spike antigen.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2017 Aug 29;114(35):E7348-E7357. doi: 10.1073/pnas.1707304114.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5584442/>

³⁸² <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/vaxzevria-previously-covid-19-vaccine-astrazeneca>
<https://www.precisionvaccinations.com/vaccines/vaxzevria-covid-19-vaccine-astrazeneca>

³⁸³ Dicks MD, Spencer AJ, Edwards NJ, Wadell G, Bojang K, Gilbert SC, Hill AV, Cottingham MG.
A novel chimpanzee adenovirus vector with low human seroprevalence: improved systems for vector derivation and comparative immunogenicity.
PLoS One. 2012;7(7):e40385. doi: 10.1371/journal.pone.0040385.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3396660/>

³⁸⁴ van Doremalen N et al
A single dose of ChAdOx1 MERS provides protective immunity in rhesus macaques.
Sci Adv. 2020 Jun 10;6(24):eaba8399. doi: 10.1126/sciadv.aba8399.

Per approfondire si rimanda al documento [COVID-19 il vaccino](#) (maggio 2020)



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7955943/>

I vettori adenovirali (Ad) sono prodotti da cloni molecolari (MC) del genoma di Ad. I domini E1 ed E3 vengono eliminati; la rimozione di E1 impedisce la replicazione del virus. Il genoma viene clonato in un vettore plasmidico. Le cellule infette forniscono RNA virale, ad esempio, della spike del SARS-CoV-2. Le sequenze della spike vengono amplificate e clonate in un vettore navetta da cui la cassetta di espressione viene escissa e inserita in un Ad MC. La trasfezione con Ad MC delle cellule helper E1⁺ crea il vaccino, che viene ampliato, testato e reso pronto per la produzione secondo le buone pratiche di fabbricazione (GMP) e le sperimentazioni cliniche.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7286676/>

REAZIONI AVVERSE

In questo capitolo si discuteranno solo alcune delle molteplici reazioni avverse segnalate per i vaccini a vettore adenovirale, in quanto i meccanismi d'induzione saranno approfonditi nei capitoli dedicati alle singole tipologie di danni da vaccino.

Trombocitopenia Indotta Da Vaccino (VIT)

[COVID-19: Vaccine-induced immune thrombotic thrombocytopenia \(VITT\)](#)

A marzo e aprile 2021 sono iniziate le segnalazioni di coagulopatie associate alla somministrazione dei vaccini COVID-19 Oxford/AstraZeneca e Johnson & Johnson.³⁸⁵

Questi eventi avversi possono essere dovuti a vari meccanismi³⁸⁶ che saranno discussi nel dettaglio in un documento dedicato ai danni cardiovascolari da vaccini Covid-19. In sintesi, si è riscontrato che la coagulopatia aveva caratteristiche simili alla trombocitopenia indotta da eparina (HIT) e sembra essere specifica per i vaccini adenovirali, con correlazioni statisticamente significative associate solo ai vaccini Oxford/AstraZeneca e Johnson & Johnson.³⁸⁷ Tuttavia, una scoperta che è emersa successivamente, è stata la presenza quasi onnipresente di anticorpi anti-fattore 4 piastrinico (PF4) nei pazienti affetti da VIT.³⁸⁸ Il fattore piastrinico 4 è in grado di complessarsi con i polimeri carichi negativamente nel sangue ed è stato fortemente implicato nell'HIT.

³⁸⁵ Greinacher A, Thiele T, Warkentin TE, Weisser K, Kyrle PA, Eichinger S.
Thrombotic Thrombocytopenia after ChAdOx1 nCov-19 Vaccination.
N Engl J Med. 2021 Jun 3;384(22):2092-2101. doi: 10.1056/NEJMoa2104840.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8095372/>

Muir KL, Kallam A, Koepsell SA, Gundabolu K.
Thrombotic Thrombocytopenia after Ad26.COVS Vaccination.
N Engl J Med. 2021 May 20;384(20):1964-1965. doi: 10.1056/NEJMc2105869.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8063883/>

³⁸⁶ Othman M, Baker AT, Gupalo E, Elsebaie A, Bliss CM, Rondina MT, Lillicrap D, Parker AL.
To clot or not to clot? Ad is the question-Insights on mechanisms related to vaccine-induced thrombotic thrombocytopenia.
J Thromb Haemost. 2021 Nov;19(11):2845-2856. doi: 10.1111/jth.15485.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8420166/>

Azzarone B, Veneziani I, Moretta L, Maggi E.
Pathogenic Mechanisms of Vaccine-Induced Immune Thrombotic Thrombocytopenia in People Receiving Anti-COVID-19 Adenoviral-Based Vaccines: A Proposal.
Front Immunol. 2021;12:728513. doi:10.3389/fimmu.2021.728513
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8415022/>

Dotan A, Shoenfeld Y.
Perspectives on vaccine induced thrombotic thrombocytopenia.
J Autoimmun. 2021;121:102663. doi:10.1016/j.jaut.2021.102663
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8129886/>

McLean-Tooke A, Lucas M, French M.
Autoimmunity elicited by the chemokine response to adenovirus vector vaccines may underlie vaccine-induced immune thrombotic thrombocytopenia: a hypothesis.
Clin Transl Immunology. 2021 Oct 14;10(10):e1349. doi: 10.1002/cti2.1349.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8517088/>

³⁸⁷ Rodriguez EVC, Bouazza FZ, Dauby N, Mullier F, d'Otreppe S, Jissendi Tchofo P, Bartiaux M, Sirjacques C, Roman A, Hermans C, Cliquenois M.
Fatal vaccine-induced immune thrombotic thrombocytopenia (VITT) post Ad26.COVS: first documented case outside US.
Infection. 2022 Apr;50(2):531-536. doi: 10.1007/s15010-021-01712-8.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8501343/>

³⁸⁸ Cines DB, Bussel JB.
SARS-CoV-2 Vaccine-Induced Immune Thrombotic Thrombocytopenia.
N Engl J Med. 2021 Jun 10;384(23):2254-2256. doi: 10.1056/NEJMe2106315. Epub 2021 Apr 16. Erratum in: N Engl J Med. 2021 Jun 10;384(23):e92.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8063912/>

In pratica, il PF4 può legarsi all'eparina e ad altre strutture simili, che in alcuni individui può creare una reazione autoimmune contro i complessi. Ciò provoca una serie di reazioni a valle che alla fine portano alla trombocitopenia.³⁸⁹

Da questa scoperta iniziale, sono state avanzate una serie di ipotesi per tentare di spiegare i collegamenti tra VIT, PF4 e i vaccini Ad. Uno studio iniziale ha dimostrato che gli anticorpi anti-PF4 e la spike del SARS-CoV-2 non si legano tra loro, eliminando probabilmente la possibilità che l'antigene del vaccino stesso sia responsabile della VIT.³⁹⁰ Ciò è in linea con il fatto che la VIT sembra verificarsi solo nei vaccini COVID-19 con vettore adenovirale.

Inoltre, è stato dimostrato che gli Ad (vettori adenovirali) attivano le piastrine nel flusso sanguigno e inducono trombocitopenia, causando potenzialmente un rilascio di PF4 e portando all'induzione di anticorpi anti-PF4.³⁹¹

Questa ipotesi potrebbe essere abbastanza convincente se gli Ad sono in grado di entrare nel flusso sanguigno, attraverso la somministrazione inappropriata del vaccino o altri meccanismi.

Basandosi su questa idea, uno studio ha permesso di verificare che il vaccino Oxford/AstraZeneca potrebbe legarsi con il PF4 e indurre risposte immunitarie pro-infiammatorie nel sito di iniezione.³⁹² La formazione del complesso PF4/vaccino e l'ambiente proinfiammatorio stimolato dal vaccino innescano una pronunciata risposta dei linfociti B che si traduce nella formazione di anticorpi anti-PF4 ad alta avidità nei pazienti con VITT. Le ricerche suggeriscono che il legame dell'Ad con PF4 probabilmente induce cambiamenti conformazionali in PF4 e crea potenziali neo-antigeni (molecole immunogeniche a cui gli esseri umani non sono mai stati esposti tramite infezione, vaccinazione di routine o contatto con l'ambiente o ingestione).

Gli anticorpi anti-PF4 ad alto titolo risultanti attivano potentemente le piastrine in presenza di PF4 o DNA e polianioni polifosfato. Gli anticorpi dei pazienti VITT anti-PF4 stimolano i neutrofili a rilasciare le trappole extracellulari dei neutrofili (NET) in modo PF4 piastrinico -dipendente. I biomarcatori dei NET procoagulanti sono risultati elevati nel siero dei pazienti con VITT, e i NET sono stati visualizzati in abbondanza mediante immunoistochimica nei trombi venosi cerebrali.

Insieme, gli aggregati PF4/adenovirus indotti dal vaccino e le reazioni proinfiammatorie stimolano la produzione patologica di anticorpi anti-PF4 che guida la trombosi nel VITT. I dati supportano un meccanismo in 2 fasi alla base di VITT che ricorda la patogenesi della trombocitopenia (autoimmune) indotta da eparina.

Contaminazioni nei vaccini

Alcuni studi hanno riscontrato livelli significativi di impurezze a base proteica nel vaccino Oxford/AstraZeneca, comprese le proteine da shock termico (HSP 90-beta e HSP-90-alfa con il 9,5% e il 4,3% delle proteine totali). È noto che gli HSP extracellulari modulano le risposte immunitarie innate e adattative; possono esacerbare

³⁸⁹ Greinacher A.

CLINICAL PRACTICE. Heparin-Induced Thrombocytopenia.
N Engl J Med. 2015 Jul 16;373(3):252-61. doi: 10.1056/NEJMcp1411910.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26176382/>

³⁹⁰ Andreas Greinacher, Kathleen Selleng, Julia Mayerle et al.

Anti-SARS-CoV-2 Spike Protein and Anti-Platelet Factor 4 Antibody Responses Induced by COVID-19 Disease and ChAdOx1 nCov-19 vaccination, 09 April 2021, PREPRINT (Version 1) available at Research Square
<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-404769/v1>

³⁹¹ Mercier S, Gahéry-Segard H, Monteil M, Lengagne R, Guillet JG, Eloit M, Denesvre C.

Distinct roles of adenovirus vector-transduced dendritic cells, myoblasts, and endothelial cells in mediating an immune response against a transgene product.
J Virol. 2002 Mar;76(6):2899-911. doi: 10.1128/jvi.76.6.2899-2911.2002.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC136003/>

Othman M, Labelle A, Mazzetti I, Elbatarny HS, Lillicrap D.

Adenovirus-induced thrombocytopenia: the role of von Willebrand factor and P-selectin in mediating accelerated platelet clearance.
Blood. 2007 Apr 1;109(7):2832-9. doi: 10.1182/blood-2006-06-032524.
<https://doi.org/10.1182/blood-2006-06-032524>

³⁹² Greinacher, A. et al

Towards understanding ChAdOx1 nCov-19 vaccine-induced immune thrombotic thrombocytopenia (VITT)
Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis ; 5(SUPPL 2), 2021.
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/rth2.12590>

condizioni infiammatorie preesistenti, sono stati associati all'autoimmunità e possono persino diventare essi stessi bersagli di risposte autoimmuni.) ed EDTA.^{378, 393}

In particolare, Greinacher et al³⁹⁴ hanno studiato il vaccino ChAdOx1 nCoV-19 mediante analisi proteomica e Inaspettatamente hanno trovato 70-80 µg di proteine/mL in 4 lotti indipendenti di vaccino analizzati.

La colorazione d'argento del vaccino separato su SDS-PAGE ha mostrato numerose bande proteiche. L'analisi proteomica ha identificato le proteine del vettore adenovirale, le proteine T-REx HEK293 (umane) derivate dalla produzione di virus e alcune proteine di membrana, e la proteina spike del SARS-CoV-2. Approssimativamente dal 43% al 60% del contenuto proteico del vaccino (15-24 µg per dose) è costituito dalle proteine cellulari di T-REx HEK293.

Questo riscontro suggerisce che il vettore adenovirale agisca come adiuvante per le proteine umane presenti nella preparazione, e gli autoanticorpi contro le proteine di membrana umane provenienti dai contaminanti delle cellule di HEK293 durante il processo di produzione dell'adenovirus potrebbero essere la causa del danno.³⁹⁵

Tali impurezze possono anche contribuire alle reazioni immunologiche al vaccino e possono aiutare a spiegare le differenze nei tassi di VIT tra i principali vaccini Ad approvati, supponendo che ogni vaccino utilizzi un processo di purificazione leggermente diverso.³⁹⁶

Ulteriori analisi del vaccino ChAdOx1 nCoV-19 per piccole molecole mediante spettrometria ¹H-NMR hanno identificato l'EDTA (~ 100 µM). La permeabilità vascolare è un segno distintivo dell'infiammazione e l'EDTA come chelante del Ca²⁺ aumenta la perdita vascolare mediante il disassemblaggio delle giunzioni (VE)-caderina endoteliali vascolari.³⁹⁷ È stato quindi analizzata la capacità del vaccino di indurre reazioni proinfiammatorie nei topi utilizzando il modello di edema di Miles. Il vaccino iniettato per via intradermica ha innescato una perdita nei vasi dermici che è stata quantificata dallo stravasamento del tracciante Evans Blue. L'aumento della permeabilità vascolare è apparso principalmente mediato dall'EDTA nel vaccino, poiché l'iniezione intradermica di EDTA da solo (100 µM) ha stimolato la perdita vascolare in misura simile al vaccino. Inoltre, la ricostituzione del vaccino ChAdOx1 nCoV-19 dell'EDTA con Ca²⁺ (100 µM) prima dell'iniezione intradermica ha impedito l'aumento della permeabilità e della perdita vascolare innescata dal vaccino e dall'EDTA.

La maggior parte del DNA del vettore adenovirale iniettato per via intradermica rimaneva nel sito di iniezione (>99,99% a 30 minuti dopo l'iniezione, tuttavia la PCR ha rilevato sequenze specifiche di ChAdOx1 nCoV-19 in più tessuti tra cui il cervello e la milza, dove i linfociti B sono arricchiti nelle zone marginali spleniche³⁹⁸.

³⁹³ Krutzke, Lea & Rösler, Reinhild & Wiese, Sebastian & Kochanek, Stefan
Process-related impurities in the ChAdOx1 nCov-19 vaccine.
(2021). 10.21203/rs.3.rs-477964/v1.
https://assets.researchsquare.com/files/rs-477964/v1_stamped.pdf

³⁹⁴ Andreas Greinacher et al
Insights in ChAdOx1 nCoV-19 vaccine-induced immune thrombotic thrombocytopenia.
Blood 2021; 138 (22): 2256–2268.
<https://doi.org/10.1182/blood.2021013231>

³⁹⁵ McGonagle D, De Marco G, Bridgewood C.
Mechanisms of Immunothrombosis in Vaccine-Induced Thrombotic Thrombocytopenia (VITT) Compared to Natural SARS-CoV-2 Infection.
J Autoimmun. 2021 Jul;121:102662. doi: 10.1016/j.jaut.2021.102662.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8133385/>

³⁹⁶ Michalik S, Siegerist F, Palankar R, et al.
Comparative analysis of ChAdOx1 nCoV-19 and Ad26.COV2.S SARS-CoV-2 vector vaccines.
Haematologica. 2022;107(4):947-957. Published 2022 Apr 1. doi:10.3324/haematol.2021.280154
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8968905/>

³⁹⁷ Gao X, Kouklis P, Xu N, Minshall RD, Sandoval R, Vogel SM, Malik AB.
Reversibility of increased microvessel permeability in response to VE-cadherin disassembly.
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2000 Dec;279(6):L1218-25. doi: 10.1152/ajplung.2000.279.6.L1218. PMID: 11076812.
<https://doi.org/10.1152/ajplung.2000.279.6.L1218>

³⁹⁸ Leo Nicolai et al
Thrombocytopenia and splenic platelet directed immune responses after intravenous ChAdOx1 nCov-19 administration

L'interruzione della barriera endoteliale facilita la diffusione dei costituenti del vaccino in circolo. In alternativa, l'iniezione endovenosa accidentale può contribuire alla disseminazione del vaccino.³⁹⁹ Inoltre, i virus (e quindi anche i vettori adenovirali) possono raggiungere tessuti distanti dal sito di infezione invadendo le cellule endoteliali e accedendo allo spazio extravascolare. I virus possono anche essere trasportati attraverso la parete vascolare o essere cotrasportati in cellule immunitarie infette come i neutrofili, che hanno la capacità di trasmigrare attraverso la barriera endoteliale.⁴⁰⁰

La disseminazione sistemica dei componenti del vaccino non è esclusiva di ChAdOx1 nCoV-19; un'altra variante del vettore ChAdOx1 (con un inserto del vettore dell'epatite B) era rilevabile in più organi, inclusi fegato, cuore e linfonodi, dai 2 a 29 giorni dopo l'iniezione intramuscolare nei topi.⁴⁰¹

Dal giorno 5 al giorno 20 dopo la vaccinazione, gli anticorpi patologici anti-PF4 raggiungono titoli elevati e sono in grado di aggregare PF4 sulle superfici delle piastrine e attivare le piastrine legando FcγRIIA.

È importante tenere presente che l'attivazione piastrinica tramite FcγIIA è il meccanismo centrale nella VITT⁴⁰² e che le immunoglobuline endovenose possono interferire in questa fase e bloccare la VITT⁴⁰³. Anche i farmaci antiplastrinici (indometacina, ticagrelor) e gli inibitori della tirosin-chinasi bloccano l'attivazione piastrinica indotta dal plasma di pazienti con VITT in vitro.⁴⁰⁴

bioRxiv 2021.06.29.450356; doi: <https://doi.org/10.1101/2021.06.29.450356>
<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.06.29.450356v1.full.pdf>

³⁹⁹ Stepanenko AA, Dmitrenko VV.
HEK293 in cell biology and cancer research: phenotype, karyotype, tumorigenicity, and stress-induced genome-phenotype evolution. *Gene*. 2015 Sep 15;569(2):182-90. doi: 10.1016/j.gene.2015.05.065.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26026906/>

⁴⁰⁰ Gaudin R, Goetz JG.
Tracking Mechanisms of Viral Dissemination In Vivo. *Trends Cell Biol*. 2021 Jan;31(1):17-23. doi: 10.1016/j.tcb.2020.09.005.

⁴⁰¹ https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/vaxzevria-previously-covid-19-vaccine-astrazeneca-epar-public-assessment-report_en.pdf pag 47

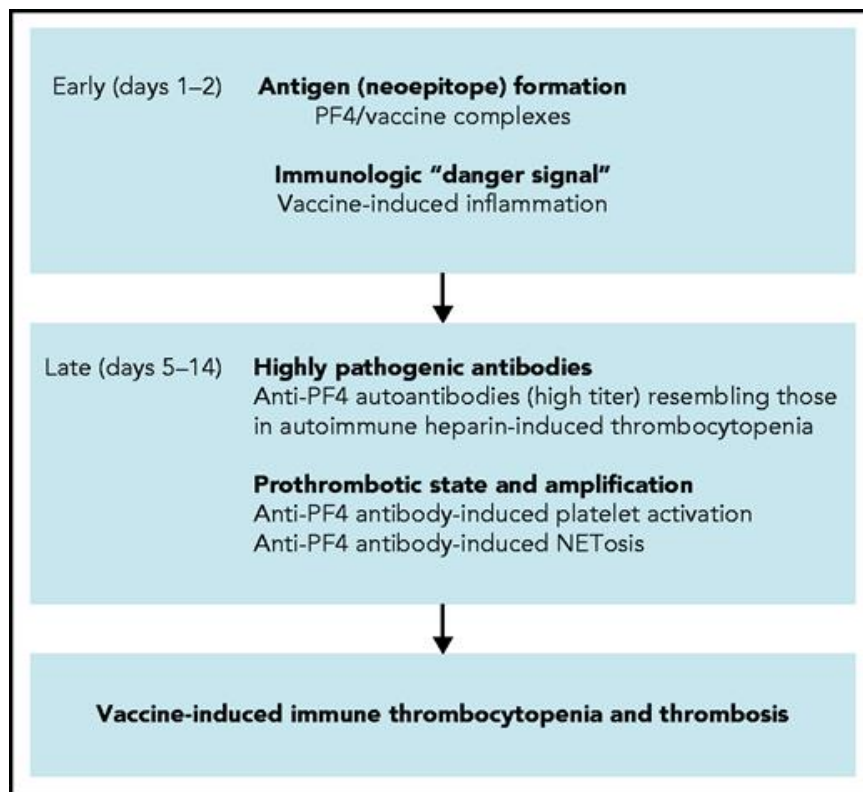
⁴⁰² Pelzl L, Singh A, Funk J, et al.
Antibody-mediated procoagulant platelet formation in COVID-19 is AKT dependent. *J Thromb Haemost*. 2022;20(2):387-398. doi:10.1111/jth.15587
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8646637/>

Uzun G, Pelzl L, Singh A, Bakchoul T.
Immune-Mediated Platelet Activation in COVID-19 and Vaccine-Induced Immune Thrombotic Thrombocytopenia. *Front Immunol*. 2022;13:837629. Published 2022 Feb 22. doi:10.3389/fimmu.2022.837629
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8901500/>

⁴⁰³ Lentz SR.
Cooling down VITT with IVIG. *Blood*. 2021;138(11):921-922. doi:10.1182/blood.2021012819
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8444694/>

Uzun G, Althaus K, Singh A, et al.
The use of IV immunoglobulin in the treatment of vaccine-induced immune thrombotic thrombocytopenia. *Blood*. 2021;138(11):992-996. doi:10.1182/blood.2021012479
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8444699/>

⁴⁰⁴ Smith CW, Montague SJ, Kardeby C, et al.
Antiplatelet drugs block platelet activation by VITT patient serum. *Blood*. 2021;138(25):2733-2740. doi:10.1182/blood.2021012277
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8697531/>



<https://ashpublications.org/blood/article/138/22/2256/477080/Insights-in-ChAdOx1-nCoV-19-vaccine-induced-immune>
Schema dei meccanismi procoagulanti proposti in VITT. Reazioni precoci: le reazioni VITT iniziali sono innescate da complessi formati da PF4 e dai componenti del vaccino e sono accompagnate da un "segnale di pericolo" indotto dall'inflamazione. Entrambi gli eventi si verificano subito dopo la vaccinazione (giorni 1-2). Reazioni tardive: in alcuni soggetti vaccinati, l'attivazione dei linfociti B indotta da PF4/vaccino produce autoanticorpi anti-PF4 ad alto titolo che si legano alle piastrine e inducono l'attivazione piastrinica. Gli anticorpi anti-PF4 insieme alle piastrine attivano i granulociti (neutrofili) per rilasciare i NET procoagulanti (NETosis), culminando nella trombosi associata a VITT.

Forma troncata solubile della spike vaccinale

E' stato recentemente dimostrato che l'mRNA codificato dal DNA per la proteina Spike inserito nel vettore adenovirale può essere splittato in modo tale da far perdere alla spike l'ancoraggio transmembrana, così la spike a lunghezza quasi intera (forma troncata solubile) viene secreta dalle cellule.

Questo tipo di splicing è piuttosto inusuale, perché un virus a RNA di per sé non contiene sequenze introniche nei suoi vari frame di lettura aperti. Pertanto, tutti questi eventi di splicing derivano dai cosiddetti siti di splicing critici. Questo non è correlato al meccanismo di splicing alternativo, funzionalmente attribuito a determinati geni del nostro genoma. Va tenuto presente che in studi in vivo nei topi, è stato osservato che dopo l'iniezione intramuscolare quantità significative di vettori adenovirali finiscono negli epatociti, dove si verifica l'espressione del transgene.⁴⁰⁵ È probabile che anche il vettore ChAdOx1-S sia un adenovirus epatotropico, poiché si basa sull'adenovirus dello scimpanzé Y25⁴⁰⁶, che apparteneva a un gruppo di isolati di scimpanzé associati a focolai di epatite virale.⁴⁰⁷ Se dopo l'iniezione intramuscolare la trasduzione degli epatociti si verifica con (alcuni) vaccini in

⁴⁰⁵ Kron MW, Espenlaub S, Engler T, Schirmbeck R, Kochanek S, Kreppel F.
miRNA-mediated silencing in hepatocytes can increase adaptive immune responses to adenovirus vector-delivered transgenic antigens.
Mol Ther. 2011 Aug;19(8):1547-57. doi: 10.1038/mt.2011.83.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3149177/>

⁴⁰⁶ Dicks MD, Spencer AJ, Edwards NJ, Wadell G, Bojang K, Gilbert SC, Hill AV, Cottingham MG.
A novel chimpanzee adenovirus vector with low human seroprevalence: improved systems for vector derivation and comparative immunogenicity.
PLoS One. 2012;7(7):e40385. doi: 10.1371/journal.pone.0040385.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3396660/>

⁴⁰⁷ Hillis WD, Goodman R.

una quantità significativa, è concepibile che quantità maggiori di proteina spike troncata solubile, avendo perso il dominio transmembrana a causa dello splicing, saranno secrete nella circolazione sistemica attraverso le vene epatiche. Queste varianti di spike solubili possono causare gravi effetti collaterali quando si legano alle cellule endoteliali che esprimono ACE2 nei vasi sanguigni. In analogia con gli eventi tromboembolici causati dalla proteina spike codificata dal virus SARS-CoV-2 durante la complicazione da COVID-19, Kowarz et al hanno definito il meccanismo della malattia sottostante come “*sindrome del mimetismo COVID-19 indotto dal vaccino*” (*sindrome VIC19M*).⁴⁰⁸

Ulteriori meccanismi possibili sono stati revisionati da Kircheis nell'articolo “*Coagulopathies after Vaccination against SARS-CoV-2 May Be Derived from a Combined Effect of SARS-CoV-2 Spike Protein and Adenovirus Vector-Triggered Signaling Pathways*”:⁴⁰⁹

- ipotesi del superantigene:

utilizzando modelli computazionali basati sulla struttura, Cheng et al. hanno dimostrato che la glicoproteina spike di SARS-CoV-2 (S) mostra un motivo ad alta affinità per il legame dei TCR e può formare un complesso ternario con l'MHCII. L'epitopo di legame sulla proteina spike ospita un motivo di sequenza unico per SARS-CoV-2 (che non è presente in altri coronavirus correlati alla SARS), molto simile sia nella sequenza che nella struttura all'enterotossina stafilococcica B del superantigene batterico.

Inoltre, la regione interfacciale include residui selezionati da un motivo simile a una molecola di adesione intercellulare (ICAM) condiviso tra i virus della SARS delle pandemie del 2003 e del 2019. Un motivo di sequenza simile a una neurotossina sul dominio di legame del recettore mostra anche un'elevata tendenza a legare i TCR. Un'analisi del repertorio TCR in pazienti adulti con COVID-19 ha dimostrato che quelli con grave malattia iperinflammatoria mostrano un orientamento del TCR coerente con l'attivazione del superantigene.⁴¹⁰

È stato sviluppato a questo scopo un esame del sangue che determina la presenza di specifici segmenti del gene variabile TCR per l'identificazione di pazienti a rischio di grave MIS-C (Sindrome infiammatoria multisistemica nei

Serologic classification of chimpanzee adenoviruses by hemagglutination and hemagglutination inhibition. J Immunol. 1969 Nov;103(5):1089-95. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4981794/>

⁴⁰⁸ Kowarz E, Krutzke L, Külp M, et al. Vaccine-induced COVID-19 mimicry syndrome. Elife. 2022;11:e74974. Published 2022 Jan 27. doi:10.7554/eLife.74974 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8846585/>

Kircheis R. Coagulopathies after Vaccination against SARS-CoV-2 May Be Derived from a Combined Effect of SARS-CoV-2 Spike Protein and Adenovirus Vector-Triggered Signaling Pathways. Int J Mol Sci. 2021 Oct 6;22(19):10791. doi: 10.3390/ijms221910791. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8509779/>

⁴⁰⁹ Kircheis R. Coagulopathies after Vaccination against SARS-CoV-2 May Be Derived from a Combined Effect of SARS-CoV-2 Spike Protein and Adenovirus Vector-Triggered Signaling Pathways. Int J Mol Sci. 2021 Oct 6;22(19):10791. doi: 10.3390/ijms221910791 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8509779/>

⁴¹⁰ Cheng M.H., Zhang S., Porritt R.A., Rivas M.N., Paschold L., Willscher E., Binder M., Arditi M., Bahar I. Superantigenic character of an insert unique to SARS-CoV-2 spike supported by skewed TCR repertoire in patients with hyperinflammation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2020;117:25254–25262. doi: 10.1073/pnas.2010722117. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7568239/>

bambini).⁴¹¹ Questi dati suggeriscono che la stessa proteina spike SARS-CoV-2 può fungere da superantigene per innescare lo sviluppo di MIS-C così come la tempesta di citochine nei pazienti adulti con COVID-19.⁴¹²

È interessante notare che sono stati segnalati i primi casi di MIS a seguito di infezione da SARS-CoV-2 anche negli adulti.⁴¹³

Nel contesto dell'ipotesi del superantigene, durante la sepsi grave l'attivazione della coagulazione del sangue gioca un ruolo fisiopatologico critico con conseguente shock settico, microtrombosi e disfunzione multiorgano. Inoltre, la tossina-1 (TSST-1) della sindrome da shock tossico e le enterotossine stafilococciche A e B inducono l'attivazione di NF-κB, che agisce come potenziatore trascrizionale legandosi alle sequenze trovate sia nei promotori di IL-1 beta che di TNF-alfa .

Questo, insieme ai complessi altamente immunogenici PF4-adenovirus, può facilitare l'induzione di anticorpi specifici per PF4. In particolare, sia l'attivazione cellulare normale che l'attivazione delle cellule T policlonali indotte da superantigene dipendono dalla segnalazione del percorso NFκB.⁴¹⁴

- Espressione a basso grado del vettore adenovirale

Sebbene originariamente applicato localmente, una disseminazione locale limitata di vaccini adenovirali, ad esempio attraverso il legame alle cellule endoteliali ⁴¹⁵ insieme all'espressione a basso grado di geni adenovirali

⁴¹¹ Kouo T., Chaisawangwong W.

SARS-CoV-2 as a superantigen in multisystem inflammatory syndrome in children (MIS-C)
J. Clin. Investig. 2021;131 doi: 10.1172/JCI149327.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33844652/>

⁴¹² Scaglioni V., Soriano E.R.

Are superantigens the cause of cytokine storm and viral sepsis in severe COVID-19? Observations and hypothesis.
Scand. J. Immunol. 2020;92:e12944. doi: 10.1111/sji.12944.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7404497/>

⁴¹³ Rieper K., Sturm A.

Erste Fälle des Multisystem Inflammatory Syndrome nach SARS-CoV-2-Infektion bei jungen Erwachsenen in Deutschland [First Cases of Multisystem Inflammatory Syndrome following SARS-CoV-2 infection in Adults in Germany]
Dtsch. Med. Wochenschr. 2021;146:598–602. doi: 10.1055/a-1404-6763.
<https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/a-1404-6763>

⁴¹⁴ Trede N.S., Castigli E., Geha R.S., Chatila T.

Microbial superantigens induce NF-kappa B in the human monocytic cell line THP-1.
J. Immunol. 1993;150:5604–5613
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8515079/>

Zollner T.M., Podda M., Pien C., Elliott P.J., Kaufmann R., Boehncke W.H.

Proteasome inhibition reduces superantigen-mediated T cell activation and the severity of psoriasis in a SCID-hu model.
J. Clin. Investig. 2002;109:671–679. doi: 10.1172/JCI0212736.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC150886/>

Krakauer T., Buckley M.

The Potency of Anti-Oxidants in Attenuating Superantigen-Induced Proinflammatory Cytokines Correlates with Inactivation of NF-κB.
Immunopharmacol. Immunotoxicol. 2008;30:163–179. doi: 10.1080/08923970701692577.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18306112/>

Fu X., Xu M., Song Y., Li Y., Zhang H., Zhang J., Zhang C.

Enhanced interaction between SEC2 mutant and TCR Vβ induces MHC II-independent activation of T cells via PKCθ/NF-κB and IL-2R/STAT5 signaling pathways.
J. Biol. Chem. 2018;293:19771–19784. doi: 10.1074/jbc.RA118.003668.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6314126/>

Paul S., Schaefer B.C.

A new look at T cell receptor signaling to nuclear factor-κB.
Trends Immunol. 2013;34:269–281. doi: 10.1016/j.it.2013.02.002
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3674144/>

⁴¹⁵ Clesham G., Adam P., Proudfoot D., Flynn P., Efstathiou S., Weissberg P.

High adenoviral loads stimulate NFκB-dependent gene expression in human vascular smooth muscle cells.
Gene Ther. 1998;5:174–180. doi: 10.1038/sj.gt.3300576

innescata da NF- κ B in vettori adenovirali originariamente incompetenti per la replicazione⁴¹⁶ può risultare in rari casi a cascate autoamplificanti che generano cellule endoteliali attivate o danneggiate, piastrine attivate e aggregate e attivazione del sistema di coagulazione in siti distanti dal sito di applicazione, ovvero eventi di procoagulazione protrombotica sistemica insieme a una corrispondente trombocitopenia (di consumo) come osservato in rari casi di vaccini SARS-CoV-2 basati su vettori di adenovirus.⁴¹⁷

In alcuni casi è stato riscontrato che la somministrazione sistemica di vettori di Ad provocava grave epatotossicità, che possono essere in parte dovute all'espressione a basso grado dei geni Ad nel fegato.

È stato dimostrato che NF- κ B media l'espressione a basso grado dei geni Ad dal vettore Ad e che l'inibizione di NF- κ B può sopprimere l'espressione del gene Ad e le epatotossicità in seguito all'applicazione di vettori Ad.

L'attivazione di NF- κ B da parte del TNF α ricombinante ha potenziato significativamente l'espressione a basso grado dei geni Ad, mentre l'espressione del gene Ad è stata soppressa dagli inibitori di NF- κ B o dal knockdown mediato da siRNA di NF- κ B.

Questi risultati indicano che l'inibizione di NF- κ B provoca la soppressione del danno tissutale mediato da vettori adenovirali sia mediante la soppressione delle risposte infiammatorie che la riduzione dell'espressione a basso grado dei geni adenovirali.⁴⁰²

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9578836/>

Tan P.H., Xue S.-A., Manunta M., Beutelspacher S.C., Fazekasova H., Alam A.S., McClure M.O., George A.J.
Effect of Vectors on Human Endothelial Cell Signal Transduction.
Arter. Thromb. Vasc. Biol. 2006;26:462–467. doi: 10.1161/01.ATV.0000200083.95349.9e
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16357316/>

Zhou L.F., Yin K.S., Zhu Z.L., Zhu Y., Yao X., Mao H., Xie W.P., Huang M.
Adenovirus-mediated overexpression of novel mutated IkappaBalpha inhibits nuclear factor kappaB activation in endothelial cells.
Chin. Med. J. 2005;118:1422–1428
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16157044/>

⁴¹⁶ Machitani M., Sakurai F., Wakabayashi K., Nakatani K., Shimizu K., Tachibana M., Mizuguchi H.
NF- κ B promotes leaky expression of adenovirus genes in a replication-incompetent adenovirus vector.
Sci. Rep. 2016;6:19922. doi: 10.1038/srep19922
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4728692/>

⁴¹⁷ Lo M.W., Kemper C., Woodruff T.M.
COVID-19: Complement, Coagulation, and Collateral Damage.
J. Immunol. 2020;205:1488–1495. doi: 10.4049/jimmunol.2000644.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7484432/>

Holter J.C., Pischke S.E., de Boer E., Lind A., Jenum S., Holten A.R., Tonby K., Barratt-Due A., Sokolova M., Schjalm C., et al.
Systemic complement activation is associated with respiratory failure in COVID-19 hospitalized patients.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2020;117:25018–25025. doi: 10.1073/pnas.2010540117.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7547220/>

Polycarpou A., Howard M., Farrar C.A., Greenlaw R., Fanelli G., Wallis R., Klavinskis L.S., Sacks S.
Rationale for targeting complement in COVID-19.
EMBO Mol. Med. 2020;12:e12642. doi: 10.15252/emmm.202012642.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7323084/>

Fletcher-Sandersjö A., Bellander B.-M.
Is COVID-19 associated thrombosis caused by overactivation of the complement cascade? A literature review.
Thromb. Res. 2020;194:36–41. doi: 10.1016/j.thromres.2020.06.027.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7301826/>

Mussbacher M., Salzmann M., Brostjan C., Hoesel B., Schoergenhofer C., Datler H., Hohensinner P., Basilio J., Petzelbauer P., Assinger A., et al.
Cell Type-Specific Roles of NF- κ B Linking Inflammation and Thrombosis.
Front. Immunol. 2019;10:85. doi: 10.3389/fimmu.2019.00085
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6369217/>

McCarthy C.G., Wilczynski S., Wenceslau C.F., Webb R.C.
A new storm on the horizon in COVID-19: Bradykinin-induced vascular complications.
Vasc. Pharmacol. 2021;137:106826. doi: 10.1016/j.vph.2020.106826
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7834250/>

- Sinergia tra spike vaccinale e il vettore adenovirale

È noto che la proteina spike SARS-CoV-2 si lega al recettore ACE2 seguito da endocitosi,⁴¹⁸ mentre la modalità principale dell'adenovirus (comprese le varianti di eliminazione E1/E3 difettose di replicazione) è il legame ad alta affinità della manopola della fibra con il CAR (recettore coxsackie e adenovirus), seguito dall'interazione tra il motivo arginina-glicina-aspartato (RGD) all'interno della base del pentone virale con le integrine sulla superficie cellulare, che facilita l'interiorizzazione virale⁴¹⁹.

Oltre ai siti di legame primari ad alta affinità per l'assorbimento cellulare, è stato descritto che sia il SARS-CoV-2 che l'adenovirus si legano e attivano vari recettori Toll-like (TLR).⁴²⁰ Tutti questi eventi di legame della proteina S SARS-CoV-2 e del vettore adenovirale agiscono su vari meccanismi, in particolare attivano la via di segnalazione NF- κ B, inducendo i complessi della chinasi I κ B (IKK), il rilascio dell'eterocomplesso p50/p65 dal complesso inibitore con I κ Ba mediante la degradazione proteasomica di I κ B e la traslocazione dell'eterocomplesso p50/p65 rilasciato e fosforilato nel nucleo, dove avviene la trascrizione di un enorme pannello di geni pro-infiammatori, compresi quelli per le citochine, come TNF α , IL-1, e IL-6; chemochine, come MCP-1 e MCP-3; molecola di adesione, come ICAM-1 e VCAM-1, e vengono indotti componenti del complemento e fattori di coagulazione, come PAI-1.⁴²¹

Questi processi sono attivati in un'ampia varietà di tipi cellulari che esprimono i rispettivi recettori, comprese le cellule epiteliali (ad esempio nel polmone), i macrofagi (compresi i macrofagi alveolari) e le cellule endoteliali, presenti in tutti gli organi.⁴²²

⁴¹⁸ Hoffmann M., Kleine-Weber H., Schroeder S., Krüger N., Herrler T., Erichsen S., Schiergens T.S., Herrler G., Wu N.-H., Nitsche A., et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*. 2020;181:271–280. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.052 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7102627/>

⁴¹⁹ Coughlan L. Factors Which Contribute to the Immunogenicity of Non-replicating Adenoviral Vectored Vaccines. *Front. Immunol.* 2020;11:909. doi: 10.3389/fimmu.2020.00909 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7248264/>

⁴²⁰ Khan S., Shafiei M.S., Longoria C., Schoggins J., Savani R.C., Zaki H. SARS-CoV-2 spike protein induces inflammation via TLR2-dependent activation of the NF- κ B pathway. *bioRxiv*. 2021 doi: 10.1101/2021.03.16.435700. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33758854/>

Appledorn D.M., Patial S., McBride A., Godbehere S., Van Rooijen N., Parameswaran N., Amalfitano A. Adenovirus Vector-Induced Innate Inflammatory Mediators, MAPK Signaling, As Well As Adaptive Immune Responses Are Dependent upon Both TLR2 and TLR9 In Vivo. *J. Immunol.* 2008;181:2134–2144. doi: 10.4049/jimmunol.181.3.2134 <https://www.jimmunol.org/content/181/3/2134.long>

Appledorn D., Patial S., Godbehere S., Parameswaran N., Amalfitano A. TRIF, and TRIF-Interacting TLRs Differentially Modulate Several Adenovirus Vector-Induced Immune Responses. *J. Innate Immun.* 2009;1:376–388. doi: 10.1159/000207194. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2853581/>

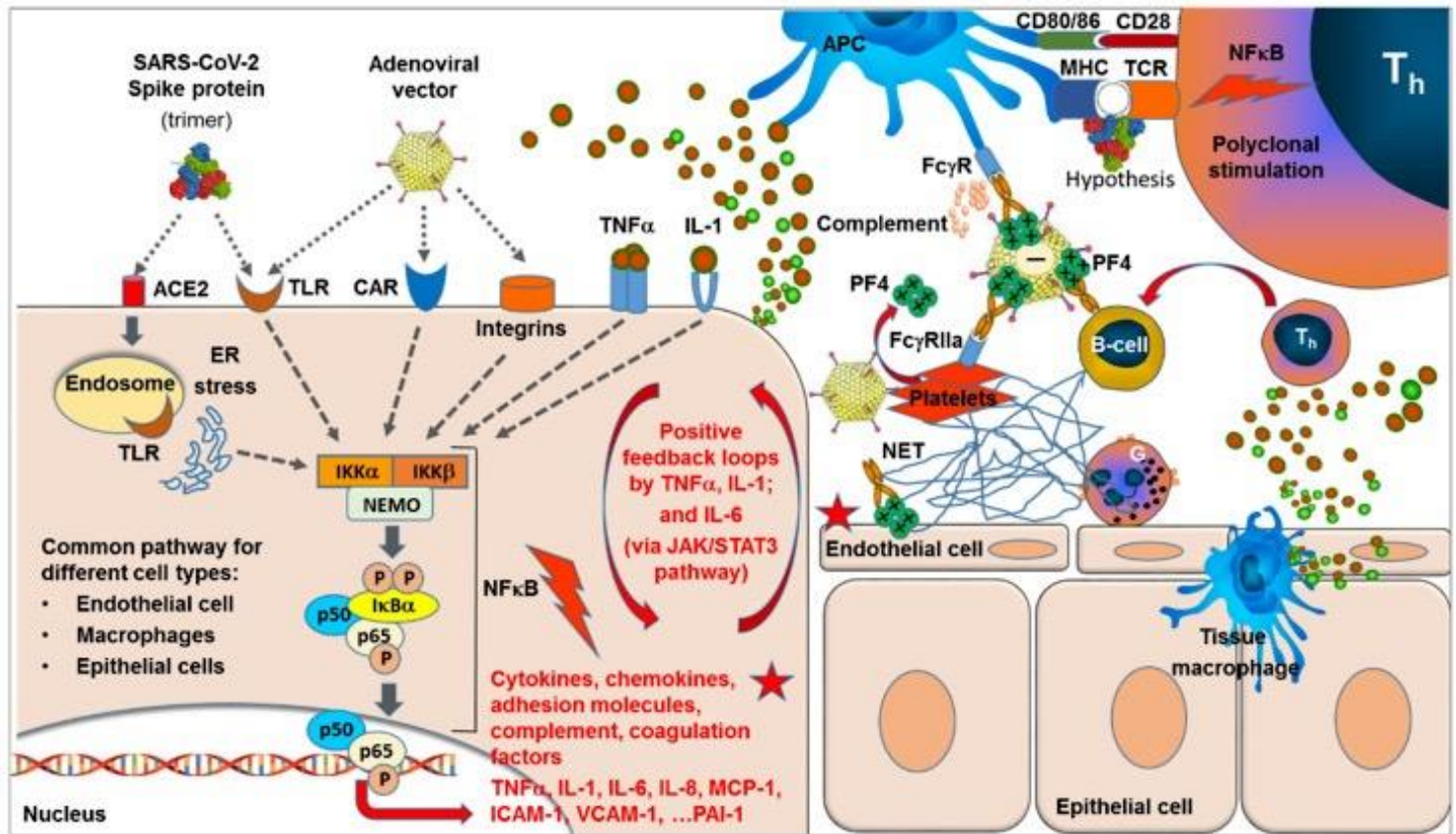
⁴²¹ Hou B., Eren M., Painter C., Covington J.W., Dixon J.D., Schoenhard J.A., Vaughan D.E. Tumor Necrosis Factor α Activates the Human Plasminogen Activator Inhibitor-1 Gene through a Distal Nuclear Factor κ B Site. *J. Biol. Chem.* 2004;279:18127–18136. doi: 10.1074/jbc.M310438200 [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021-9258\(19\)75357-5](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021-9258(19)75357-5)

⁴²² Patra T., Meyer K., Geerling L., Isbell T.S., Hoft D.F., Brien J., Pinto A.K., Ray R.B., Ray R. SARS-CoV-2 spike protein promotes IL-6 trans-signaling by activation of angiotensin II receptor signaling in epithelial cells. *PLoS Pathog.* 2020;16:e1009128. doi: 10.1371/journal.ppat.1009128. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7746263/>

Hsu A.C.-Y., Wang G., Reid A.T., Veerati P.C., Pathinayake P.S., Daly K., Mayall J.R., Hansbro P.M., Horvat J.C., Wang F., et al. SARS-CoV-2 Spike protein promotes hyper-inflammatory response that can be ameliorated by Spike-antagonistic peptide and FDA-approved ER stress and MAP kinase inhibitors in vitro. *bioRxiv*. 2020 doi: 10.1101/2020.09.30.317818 <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.09.30.317818v1.full.pdf>

Olajide O.A., Iwuanyanwu V.U., Lepiarz-Raba I., Al-Hindawi A.A.

Le attivazioni di ulteriori vie di trasduzione del segnale, come la via JAK/STAT3, sono attivate dal rilascio innescato da NF- κ B di IL-6, fattori stimolanti le colonie e varie chemochine leganti le proteine G⁴²³.



Induction of Exaggerated Cytokine Production in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells by a Recombinant SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein S1 and Its Inhibition by Dexamethasone.

Inflamm. 2021;44:1865–1877. doi: 10.1007/s10753-021-01464-5
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8050229/>

⁴²³ Biancatelli R.M.L.C., Solopov P.A., Sharlow E.R., Lazo J.S., Marik P.E., Catravas J.D.

The SARS-CoV-2 spike protein subunit S1 induces COVID-19-like acute lung injury in K18-hACE2 transgenic mice and barrier dysfunction in human endothelial cells.

Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol. 2021;321:L477–L484. doi: 10.1152/ajplung.00223.2021.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8384477/>

Grant A.H., Estrada A.I., Ayala-Marin Y.M., Alvidrez-Camacho A.Y., Rodriguez G., Robles-Escajeda E., Cadena-Medina D.A., Rodriguez A.C., Kirken R.A.

The Many Faces of JAKs and STATs Within the COVID-19 Storm.
Front. Immunol. 2021;12:690477. doi: 10.3389/fimmu.2021.690477
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8313986/>

Jafarzadeh A., Nemati M., Jafarzadeh S.

Contribution of STAT3 to the pathogenesis of COVID-19.
Microb. Pathog. 2021;154:104836. doi: 10.1016/j.micpath.2021.104836
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7937040/>

Matsuyama T., Kubli S.P., Yoshinaga S.K., Pfeffer K., Mak T.W.

An aberrant STAT pathway is central to COVID-19.
Cell Death Differ. 2020;27:3209–3225. doi: 10.1038/s41418-020-00633-7
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7545020/>

D'Alessandro A., Thomas T., Dzieciatkowska M., Hill R.C., Francis R.O., Hudson K.E., Zimring J.C., Hod E.A., Spitalnik S.L., Hansen K.C.

Serum Proteomics in COVID-19 Patients: Altered Coagulation and Complement Status as a Function of IL-6 Level.
J. Proteome Res. 2020;19:4417–4427. doi: 10.1021/acs.jproteome.0c00365
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7640953/>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8509779/>

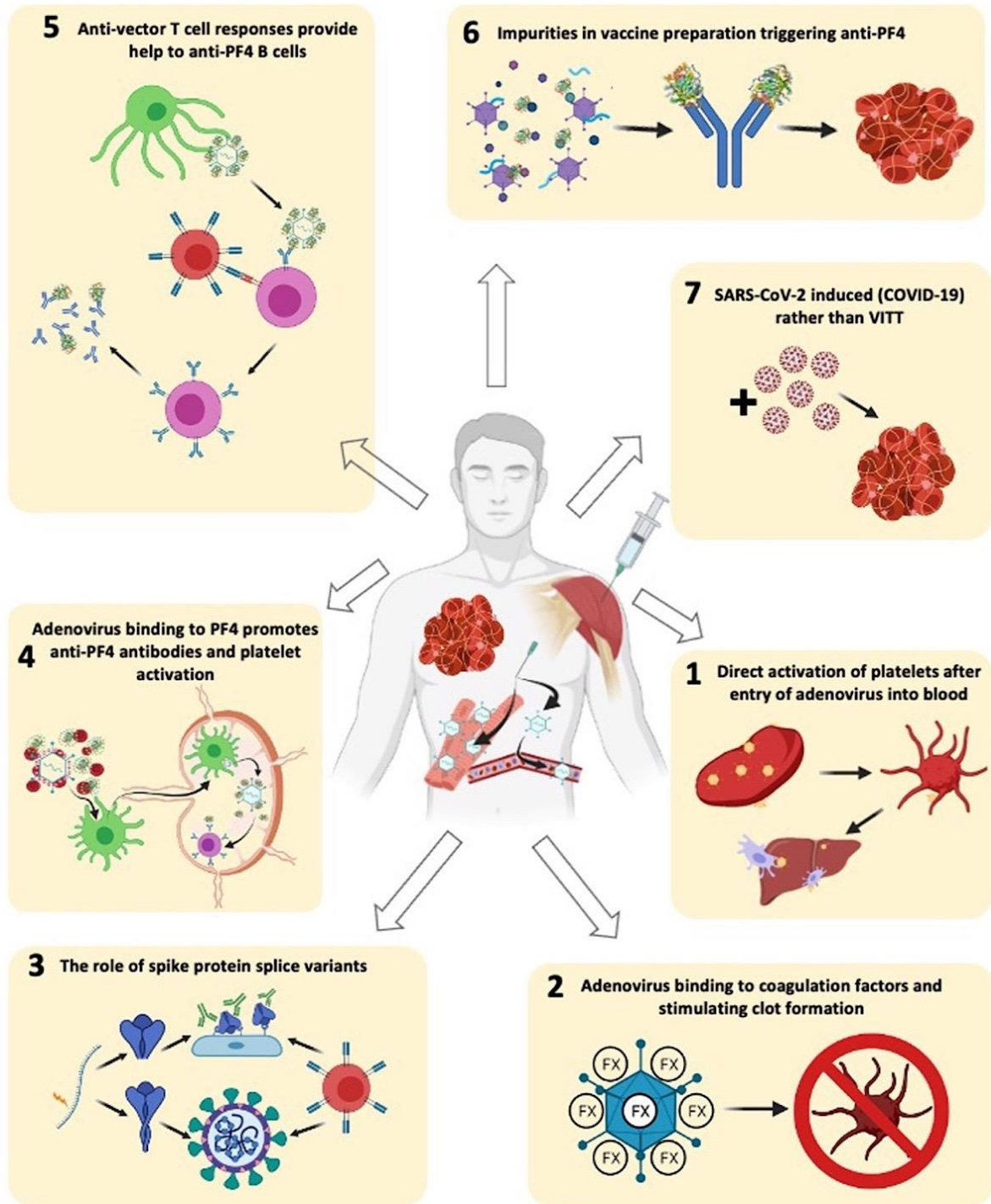
La proteina spike SARS-CoV-2 (espressa dopo la vaccinazione con mRNA o vettore adenovirale) si lega al recettore ACE2 seguito da endocitosi. Il legame dell'adenovirus (comprese le varianti di eliminazione E1/E3 difettose nella replicazione) avviene tramite il legame della manopola della fibra al CAR (recettore di coxsackie e adenovirus), seguito dall'interazione tra il motivo arginina-glicina-aspartato (RGD) all'interno del pentone virale base con le integrine sulla superficie cellulare. Inoltre, sia il SARS-CoV-2 che l'adenovirus si legano e attivano vari recettori Toll-like (TLR), portando all'attivazione della via di segnalazione NFkB, inclusa l'attivazione dei complessi IKK, il rilascio di complessi p50/p65 dal complesso inibitore con IkB α e traslocazione dell'eterocomplesso fosforilato p50/p65 nel nucleo, dove la trascrizione di geni proinfiammatori, inclusi quelli per citochine, come TNF α , IL-1 e IL-6; chemochine, come MCP-1 e MCP-3; molecole di adesione, come ICAM-1 e VCAM-1; e vengono indotti componenti del complemento e fattori di coagulazione, come PAI-1. Questi processi sono attivati in un'ampia varietà di tipi cellulari che esprimono i rispettivi recettori, comprese le cellule epiteliali, i macrofagi e le cellule endoteliali. L'espressione di TNF α e IL-1 e l'aumento dell'espressione dell'integrina possono comportare l'autoamplificazione di circuiti di feedback positivi, che possono estendersi ad altri sistemi integrati come il complemento e la coagulazione. La segnalazione di IL-6 tramite il percorso JAK/STAT3 dovrebbe attivare ulteriori circuiti di amplificazione. Il rilascio di chemochine, come MCP-1 e IL-8, attirerà la migrazione e l'accumulo di cellule infiammatorie e immunitarie nel sito. In particolare, i neutrofilo vengono attratti, rilasciando reti di cromatina del DNA, cioè NET. Mentre è noto che questi eventi accelerano e si amplificano nel caso di una massiccia infezione virale da SARS-CoV-2, non ci si aspettava che l'espressione localizzata della proteina spike nel caso della vaccinazione si traducesse in livelli che inducono un quadro sintomatico sistemico principale. Tuttavia, nel caso dei vaccini vettoriali adenovirali, sono possibili effetti additivi e sinergici. Oltre all'ulteriore attivazione della via NFkB, gli adenovirus si legano e attivano direttamente le piastrine, causando la loro attivazione/agggregazione. L'attivazione delle piastrine provoca un aumento del rilascio di PF4, un tetramero con un'elevata carica superficiale positiva, che può legarsi al glicosaminoglicano caricato negativamente sulle cellule endoteliali. Gli anticorpi indotti da VITT sono indotti dal legame elettrostatico dei tetrameri PF4 carichi positivamente alla superficie negativa degli esoni vettoriali adenovirali che formano complessi altamente immunogenici, che innescano la formazione di anticorpi diretti anti-PF4. Il legame degli anticorpi indotti alla superficie adenovirale attaccata a PF4 facilita l'assorbimento di questi complessi tramite un processo mediato da Fc-gammaR. Le cellule presentanti l'antigene (APC) assorbono i complessi anticorpo-PF4 (adenovirus) attraverso diversi tipi di recettori Fc-gamma, determinando l'attivazione cellulare e l'attivazione del complemento. Inoltre, le piastrine sono in grado di legare tali complessi tramite il loro recettore FcgammaR2a, determinando un'ulteriore attivazione, rilascio di PF4, aggregazione delle piastrine e trombotici. Le presunte caratteristiche del superantigene della proteina spike possono presentare un meccanismo aggiuntivo per accelerare l'induzione degli anticorpi anti-PF4. Diversamente dall'attivazione antigene-specifica di singoli cloni di cellule T nel caso di antigeni convenzionali, con l'antigene presentato nel solco MHC-TCR, i superantigeni si legano all'esterno di questo solco all'MHC e/o al TCR, determinando un'attivazione policlonale.

Riepilogo dei meccanismi della VITT

Le sette "pistole fumanti" della trombocitopenia trombotica immunitaria indotta da vaccino (VITT).

Possibili meccanismi di come i vettori adenovirali possono causare rari VITT.

1. L'adenovirus fuoriesce nel flusso sanguigno dopo l'iniezione intramuscolare del vaccino, si lega direttamente alle piastrine tramite il recettore di Coxsackie e dell'adenovirus (CAR) e/o i recettori secondari presenti sulle piastrine, inducendo l'attivazione piastrinica e innescando la coagulazione, nonché la clearance epatica delle piastrine attivate e trombocitopenia.
2. Il legame dell'adenovirus con fattori della coagulazione come il fattore X (FX), la loro potenziale attivazione innescando così la formazione di coaguli.
3. "Mimetismo COVID indotto dal vaccino" risultante dalla secrezione nel sangue di proteina spike troncata C-terminale con errato splicing, indotta dal vaccino, che attiva le cellule endoteliali attraverso ACE2. Questo avvia l'infiammazione vascolare e il danno con conseguente attivazione piastrinica, eventi trombotici e rilascio del fattore 4 piastrinico (PF4).
4. Legame del capsido dell'adenovirus a PF4. Il complesso adenovirus/PF4 stimola le cellule B di memoria preesistenti contro il PF4, il complesso IgG/PF4 si lega quindi al recettore Fc γ IIA (Fc γ RIIa) e stimola l'attivazione piastrinica e la formazione di coaguli.
5. I complessi PF4-adenovirus sono interiorizzati dai linfociti B che riconoscono PF4. Questi linfociti B presentano peptidi adenovirali tramite il complesso maggiore di istocompatibilità di classe II, che sono riconosciuti dai linfociti T CD4⁺ anti-vettore preesistenti che a loro volta forniscono l'aiuto dei linfociti T ai linfociti B e guidano la produzione di anticorpi anti-PF4 che possono stimolare le piastrine tramite Fc γ RIIa.
6. Impurezze di proteine virali umane o non strutturali nella preparazione del vaccino che innescano autoanticorpi come l'anti-PF4 che stimola l'attivazione piastrinica e la formazione di coaguli.
7. Infezione acuta da SARS-CoV-2 dopo somministrazione di vaccino, COVID-19 modificato/atipico, che si presenta con trombotici e trombocitopenia.



Dendritic cell	Vaccine impurities	T-cell	Kupffer Cell	SARS CoV2
Clot	PF4	Truncated soluble spike	Lymph Node	SARS CoV2
Inactive platelet	B-cell	Spike	Adenovirus	Liver
Activated platelet	Endothelial Cell	Antibody	Adenovirus	

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jth.15485>

Vettori adenovirali e rischio di riattivazione dell'HIV

Con l'uso a livello mondiale dei vaccini COVID-19 a vettore adenovirale, sono state sollevate preoccupazioni in merito al rischio di un potenziale aumento dei tassi di riattivazione dell'HIV nelle popolazioni vaccinate, nelle regioni in cui le infezioni da HIV sono prevalenti.⁴²⁴ Questa preoccupazione si basa sui risultati di due storici studi clinici randomizzati in doppio cieco controllati con placebo nelle Americhe, nei Caraibi e in Australia (studio STEP)⁴²⁵ e in Sud Africa (studio Phambili).⁴²⁶ Questi studi clinici sono stati progettati per testare l'efficacia di un trattamento preventivo contro l'HIV 1 con un vaccino basato sul vettore umano Ad5 in coorti ad alto rischio di esposizione all'HIV. I primi risultati di questi studi, così come il follow-up esteso, hanno dimostrato un aumentato rischio di riattivazione dell'HIV nei soggetti vaccinati, in cui gli uomini non circumcisi con un'immunità specifica preesistente per l'Ad5 sono risultati essere a rischio più elevato.⁴²⁷ Le analisi dei partecipanti nel follow-up esteso dello studio STEP hanno mostrato che il rischio di una maggiore riattivazione dell'HIV diminuisce 18 mesi dopo la vaccinazione,⁴²⁸ e nello studio Phambili, il rischio maggiore è stato osservato negli uomini (hazard ratio [HR] = 2,75; 95 % intervallo di confidenza [CI] 1,49, 5,06; p = 0,001), ma non nelle donne (HR = 1,12; IC 95% 0,73, 1,72; p = 0,62).⁴²⁹ Sebbene siano stati proposti diversi meccanismi potenziali, rimane ancora da investigare per

⁴²⁴ Buchbinder SP, McElrath MJ, Dieffenbach C, Corey L.
Use of adenovirus type-5 vectored vaccines: a cautionary tale.
Lancet. 2020 Oct 31;396(10260):e68-e69. doi: 10.1016/S0140-6736(20)32156-5.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7571904/>

Coughlan L, Kremer EJ, Shayakhmetov DM.
Adenovirus-based vaccines-a platform for pandemic preparedness against emerging viral pathogens [published online ahead of print, 2022 Jan 31].
Mol Ther. 2022;S1525-0016(22)00034-X. doi:10.1016/j.ymthe.2022.01.034
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8801892/>

<https://www.treatmentactiongroup.org/publication/adenovirus-vaccine-vectors-and-hiv-acquisition-risk-the-view-from-the-summit/>

⁴²⁵ Buchbinder SP, Mehrotra DV, Duerr A, et al.
Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step Study): a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial.
Lancet. 2008;372(9653):1881-1893. doi:10.1016/S0140-6736(08)61591-3
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2721012/>

⁴²⁶ Gray GE et al
HVTN 503/Phambili study team. Safety and efficacy of the HVTN 503/Phambili study of a clade-B-based HIV-1 vaccine in South Africa: a double-blind, randomised, placebo-controlled test-of-concept phase 2b study.
Lancet Infect Dis. 2011 Jul;11(7):507-15. doi: 10.1016/S1473-3099(11)70098-6.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3417349/>

⁴²⁷ Gray GE, Moodie Z, Metch B, et al.
Recombinant adenovirus type 5 HIV gag/pol/nef vaccine in South Africa: unblinded, long-term follow-up of the phase 2b HVTN 503/Phambili study.
Lancet Infect Dis. 2014;14(5):388-396. doi:10.1016/S1473-3099(14)70020-9
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4174314/>

Duerr A, Huang Y, Buchbinder S, et al.
Extended follow-up confirms early vaccine-enhanced risk of HIV acquisition and demonstrates waning effect over time among participants in a randomized trial of recombinant adenovirus HIV vaccine (Step Study).
J Infect Dis. 2012;206(2):258-266. doi:10.1093/infdis/jis342
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3490694/>

Huang Y, Follmann D, Nason M, et al.
Effect of rAd5-Vector HIV-1 Preventive Vaccines on HIV-1 Acquisition: A Participant-Level Meta-Analysis of Randomized Trials.
PLoS One. 2015;10(9):e0136626. Published 2015 Sep 2. doi:10.1371/journal.pone.0136626
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4558095/>

⁴²⁸ Duerr A, Huang Y, Buchbinder S, et al.
Extended follow-up confirms early vaccine-enhanced risk of HIV acquisition and demonstrates waning effect over time among participants in a randomized trial of recombinant adenovirus HIV vaccine (Step Study).
J Infect Dis. 2012;206(2):258-266. doi:10.1093/infdis/jis342
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3490694/>

⁴²⁹ Moodie Z, Metch B, Bekker LG, et al.

comprendere l'origine di questo fenomeno⁴³⁰. Non è inoltre noto se gli stessi meccanismi, che hanno portato a una maggiore riattivazione dell'HIV dopo la vaccinazione con vettori basati su Ad5, siano attivati anche dopo la somministrazione di vettori vaccinali basati su tipi alternativi, in particolare Ad26 o ChAdOx1 (Y25).

Al momento non ci sono dati sufficienti per dimostrare che la somministrazione dei vaccini Ad26.COVS.2 o ChAdOx1 COVID-19 porta a una maggiore riattivazione dell'HIV. Inoltre, gli studi di follow-on sui partecipanti allo studio STEP, oltre ad altri studi clinici, hanno determinato che la sieropositività ad Ad5 e ad una serie di altri tipi di vettori adenovirali non presentava un aumento del rischio.⁴³¹ Tuttavia, è certamente necessaria una particolare attenzione ai cambiamenti nell'infezione da HIV nelle popolazioni a rischio che ricevono vaccini adenovirali o nelle regioni geografiche ad alta prevalenza di HIV.⁴³²

Per quanto riguarda il meccanismo della riattivazione virale, vale la pena ricordare che è stata osservata un'attivazione di cellule T CD4⁺ infette da HIV in PLWH [people living with HIV] vaccinati. In effetti, è stato osservato un aumento della carica virale dell'RNA dell'HIV nel periodo immediatamente successivo alla somministrazione del vaccino SARS-CoV-2, in concomitanza con una diminuzione della conta assoluta dei linfociti T CD4⁺.⁴³³ Poiché l'HIV è un retrovirus e quindi ha una trascrittasi inversa, la domanda posta da Tombacz I et al.

Continued Follow-Up of Phambili Phase 2b Randomized HIV-1 Vaccine Trial Participants Supports Increased HIV-1 Acquisition among Vaccinated Men. *PLoS One*. 2015;10(9):e0137666. Published 2015 Sep 14. doi:10.1371/journal.pone.0137666

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4569275/>

⁴³⁰ Benlahrech A, Harris J, Meiser A, et al.

Adenovirus vector vaccination induces expansion of memory CD4 T cells with a mucosal homing phenotype that are readily susceptible to HIV-1.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(47):19940-19945. doi:10.1073/pnas.0907898106

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2785271/>

Perreau M, Pantaleo G, Kremer EJ.

Activation of a dendritic cell-T cell axis by Ad5 immune complexes creates an improved environment for replication of HIV in T cells.

J Exp Med. 2008;205(12):2717-2725. doi:10.1084/jem.20081786

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2585831/>

O'Brien KL, Liu J, King SL, et al.

Adenovirus-specific immunity after immunization with an Ad5 HIV-1 vaccine candidate in humans.

Nat Med. 2009;15(8):873-875. doi:10.1038/nm.1991

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2756115/>

⁴³¹ Stephenson KE, Hural J, Buchbinder SP, Sinangil F, Barouch DH.

Preexisting adenovirus seropositivity is not associated with increased HIV-1 acquisition in three HIV-1 vaccine efficacy trials.

J Infect Dis. 2012;205(12):1806-1810. doi:10.1093/infdis/jis285

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3415893/>

Curlin ME, Cassis-Ghavami F, Magaret AS, et al.

Serological immunity to adenovirus serotype 5 is not associated with risk of HIV infection: a case-control study.

AIDS. 2011;25(2):153-158. doi:10.1097/QAD.0b013e328342115c

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3057418/>

⁴³² Mennechet FJ, Tran TT, Eichholz K, van de Perre P, Kremer EJ.

Ebola virus vaccine: benefit and risks of adenovirus-based vectors.

Expert Rev Vaccines. 2015;14(11):1471-8. doi: 10.1586/14760584.2015.1083429

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26325242/>

Buchbinder SP, McElrath MJ, Dieffenbach C, Corey L.

Use of adenovirus type-5 vectored vaccines: a cautionary tale.

Lancet. 2020;396(10260):e68-e69. doi:10.1016/S0140-6736(20)32156-5

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7571904/>

Garbuglia, A.R.; Minosse, C.; Del Porto, P.

mRNA- and Adenovirus-Based Vaccines against SARS-CoV-2 in HIV-Positive People.

Viruses 2022, 14, 748. <https://doi.org/10.3390/v14040748>

<https://www.mdpi.com/1999-4915/14/4/748/htm>

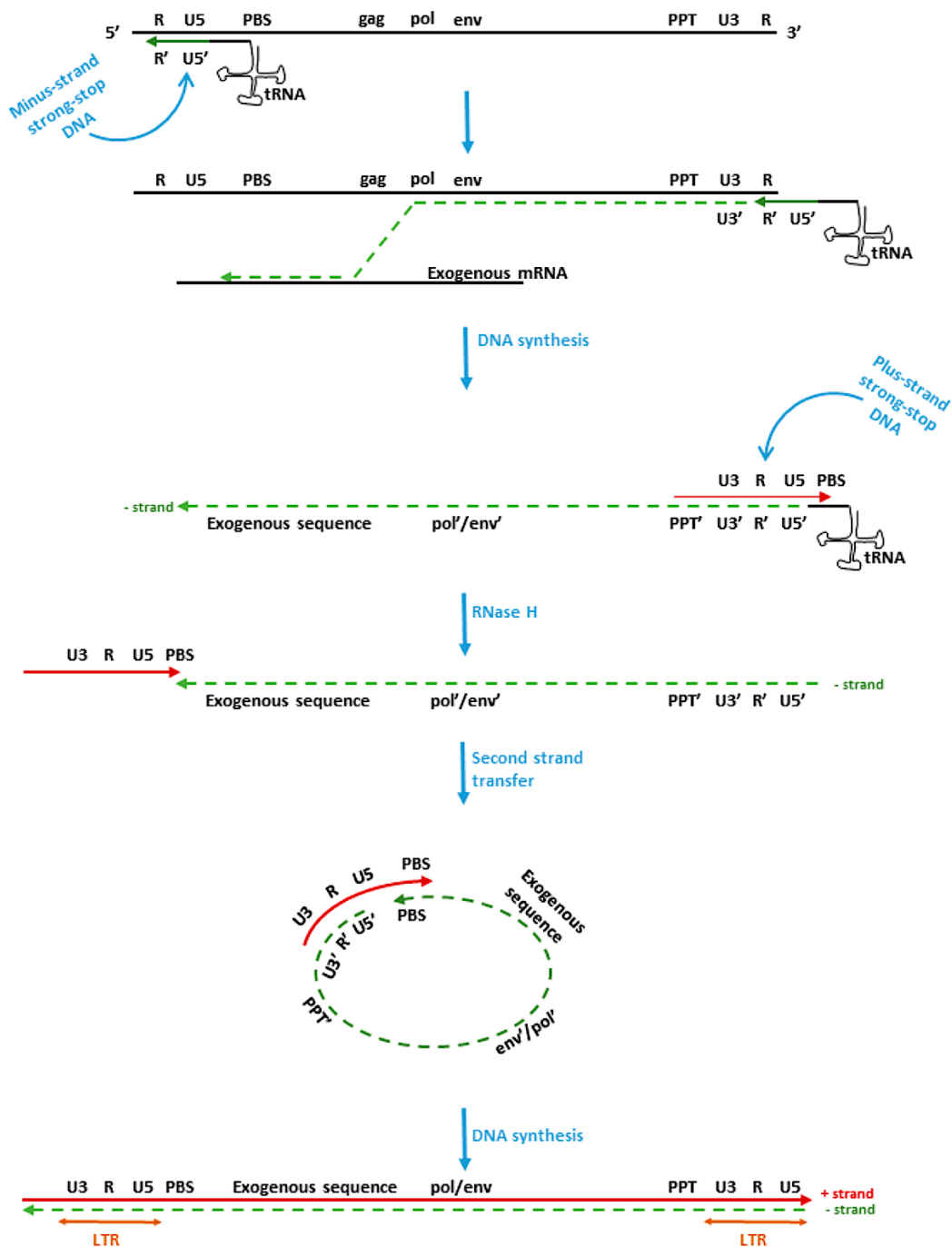
⁴³³ Levy I, Wieder-Finesod A, Litchevsky V, Biber A, Indenbaum V, Olmer L, Huppert A, Mor O, Goldstein M, Levin EG, Hod T, Cohen C, Lustig Y, Rahav G.

Immunogenicity and safety of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine in people living with HIV-1.

Clin Microbiol Infect. 2021 Dec;27(12):1851-1855. doi: 10.1016/j.cmi.2021.07.031

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8382485/>

⁴³⁴ è se, a seguito di eventi di ricombinazione, l'RNA messaggero che codifica per la proteina spike di SARS-CoV-2 possa essere incluso nel DNA provirale, integrato nel genoma umano e co-integrato nelle progenie retrovirali. Come è noto, l'RNA non è in grado di integrarsi nel DNA del genoma ospite a meno che non sia retroscritto da retrotrascrittasi virali come quelle dell'HIV o da quelle prodotte da retrotrasposoni endogeni. Per capire come e se ciò sia possibile, è necessaria una breve descrizione del ciclo di replicazione del retrovirus.



⁴³⁴ Tombácz I, Weissman D, Pardi N. Vaccination with Messenger RNA: A Promising Alternative to DNA Vaccination. *Methods Mol Biol.* 2021;2197:13-31. doi: 10.1007/978-1-0716-0872-2_2. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32827130/>

<https://www.mdpi.com/1999-4915/14/4/748>

Processo di trascrizione inversa del DNA retrovirale: RNA = sottile linea nera, trattino = meno (-) DNA del filamento, grassetto, colore scuro = più (+) DNA del filamento. PPT, tratto poliuridinico, resistente alla degradazione dell'RNasi H. PBS, sito di legame del primer; RNasi H, ribonucleasi H, un enzima specifico per il filamento di RNA: i duplex del DNA. Durante la sintesi del DNA del filamento meno (-) (linea tratteggiata) esiste la possibilità di ricombinazione non omologa.

I retrovirus hanno un genoma di RNA e all'interno di ogni virione ci sono due copie di RNA (genoma diploide). Per replicarsi, tuttavia, il virus richiede un DNA intermedio a doppio filamento che si integri sotto forma di provirus nel genoma dell'ospite.⁴³⁵ La ricombinazione avviene durante la fase di trascrizione inversa e si stima che la ricombinazione omologa avvenga ad alta frequenza (dal 10 al 30% per ogni ciclo di replicazione). Secondo il modello di scelta della copia dinamica, la retrotrascrittasi può passare da un RNA a un altro utilizzando porzioni di ciascun RNA come modello per generare sequenze chimeriche contenenti DNA da ciascuno dei due RNA genomici durante la sintesi del DNA a filamento negativo.⁴³⁶

Tuttavia, la ricombinazione non omologa può verificarsi anche tra retrovirus ed RNA esogeno. Hajjar e colleghi hanno utilizzato la linea cellulare SE21Q1b, che è in grado di assemblare in modo casuale l'mRNA cellulare in particelle retrovirali, per studiare la potenziale ricombinazione tra l'RNA genomico virale della leucosi e il neo-RNA privo di sequenze retrovirali.

Il neo-RNA è stato impacchettato in modo efficiente nei virioni SE21Q1B. Nella maggior parte dei casi, il neo-RNA è stato retrotrascritto all'estremità 5' e incorporato nel nuovo DNA provirale. Gli autori hanno ipotizzato un salto all'estremità 3' del DNA di senso negativo senza alcuna omologia, sebbene nella normale trascrizione inversa, il sito di legame del primer fornisca l'omologia affinché questo salto avvenga.⁴³⁷

D'altra parte, il sottogenere Sarbecoronavirus, che include il SARS-CoV-2, mostra un'elevata frequenza di ricombinazione, specialmente nella proteina spike.⁴³⁸ Uno studio recente, condotto applicando un approccio a livello di genoma per esaminare i polimorfismi, ha rivelato che la ricombinazione rappresenta la causa di circa il

⁴³⁵ Varmus, H.; Brown, P.

Retroviruses. In *Mobile DNA*; Berg, D.E., Howe, M.M., Eds.; American Society for Microbiology: Washington, DC, USA, 1989; pp. 53–108.

Mobile DNA III, 3rd Edition

Nancy L. Craig (Editor-in-Chief), Michael Chandler (Editor), Martin Gellert (Editor), Alan M. Lambowitz (Editor), Phoebe A. Rice (Editor), Suzanne B. Sandmeyer (Editor)

ISBN: 978-1-683-67338-5 May 2015

⁴³⁶ Hwang CK, Svarovskaia ES, Pathak VK.

Dynamic copy choice: steady state between murine leukemia virus polymerase and polymerase-dependent RNase H activity determines frequency of in vivo template switching.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98(21):12209-12214. doi:10.1073/pnas.221289898

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC59793/>

⁴³⁷ Hajjar AM, Linial ML.

A model system for nonhomologous recombination between retroviral and cellular RNA.

J Virol. 1993;67(7):3845-3853. doi:10.1128/JVI.67.7.3845-3853.1993

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC237749/>

⁴³⁸ Woo PC, Lau SK, Yip CC, et al.

Comparative analysis of 22 coronavirus HKU1 genomes reveals a novel genotype and evidence of natural recombination in coronavirus HKU1.

J Virol. 2006;80(14):7136-7145. doi:10.1128/JVI.00509-06

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1489027/>

Woo PC, Lau SK, Yuen KY.

Infectious diseases emerging from Chinese wet-markets: zoonotic origins of severe respiratory viral infections.

Curr Opin Infect Dis. 2006;19(5):401-407. doi:10.1097/01.qco.0000244043.08264.fc

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7141584/>

Woo PC, Lau SK, Huang Y, Yuen KY.

Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping.

Exp Biol Med (Maywood). 2009 Oct;234(10):1117-27. doi: 10.3181/0903-MR-94.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19546349/>

40% dei polimorfismi nella popolazione virale del coronavirus. È stato scoperto che gli scambi ricombinanti sono localizzati casualmente lungo il genoma del coronavirus, anche se erano concentrati nelle regioni coinvolte nell'interazione con le cellule ospiti.⁴³⁹

L'alto tasso di ricombinazione è favorito dalla presenza di RNA subgenomici, che vengono generati durante la replicazione e che consentono il cambio del template.⁴⁴⁰ I frammenti di RNA del coronavirus non replicanti possono essere coinvolti nella ricombinazione dell'RNA.

Nella ricombinazione non omologa, un RNA replicante può ricombinarsi con un RNA non replicante (ad esempio, RNA cellulare). Questi dati sperimentali giustificano la domanda se l'HIV possa dar luogo ad eventi di ricombinazione tra frammenti di RNA non replicanti del vaccino SARS-CoV-2 e il genoma dell'HIV, ma attualmente, prove sperimentali che confermano o escludono questi scenari è carente.

Per quanto riguarda il vettore AdV, è noto che gli adenovirus subiscono la ricombinazione durante l'infezione. L'analisi filogenetica ha rivelato che il sierotipo 16 è un prodotto della ricombinazione tra le sequenze delle specie B ed E.⁴⁴¹ Inoltre, dati sperimentali hanno dimostrato che l'AdV12 si integra rapidamente dopo l'infezione delle cellule di criceto BHK21 e che i siti di integrazione si trovano lungo l'intero genoma umano.⁴⁴²

Come accennato in precedenza, nei soggetti immunosoppressi, gli adenovirus possono causare infezioni croniche. Considerando l'ampio tropismo delle AdV, non si può escludere la possibilità di ricombinazione tra il vaccino adenovirale e un ceppo di AdV che causa infezione cronica. Occorre tenere in considerazione potenziali alterazioni dei profili trascrizionali e sono necessari studi appropriati volti a chiarire questo aspetto.

Come visto prima, va inoltre considerato che i risultati degli studi sui vaccini HIV basati sul vettore AdV5 hanno rilevato che gli uomini sieropositivi Ad5 erano ad alto rischio di contrarre l'HIV-1 durante i primi 18 mesi dopo la vaccinazione.⁴⁴³ È stato ipotizzato che l'immunocomplesso AdV5 possa attivare l'asse delle cellule dendritiche-cellule T con un aumento della replicazione virale dell'HIV e della suscettibilità delle cellule T all'infezione da HIV.⁴⁴⁴ In una conferenza di consenso sponsorizzata dall'NIH, gli esperti hanno scoraggiato l'uso del vettore virale AdV5 nello sviluppo di vaccini che potrebbero essere somministrati a PLWH.⁴²⁹

⁴³⁹ Bobay LM, O'Donnell AC, Ochman H.
Recombination events are concentrated in the spike protein region of Betacoronaviruses.
PLoS Genet. 2020;16(12):e1009272. Published 2020 Dec 17. doi:10.1371/journal.pgen.1009272
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7775116/>

⁴⁴⁰ Lau SK, Woo PC, Yip CC, et al.
Coronavirus HKU1 and other coronavirus infections in Hong Kong.
J Clin Microbiol. 2006;44(6):2063-2071. doi:10.1128/JCM.02614-05
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1489438/>

⁴⁴¹ Ebner K, Pinsker W, Lion T.
Comparative sequence analysis of the hexon gene in the entire spectrum of human adenovirus serotypes: phylogenetic, taxonomic, and clinical implications [published correction appears in J Virol. 2006 Mar;80(5):2586].
J Virol. 2005;79(20):12635-12642. doi:10.1128/JVI.79.20.12635-12642.2005
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1235814/>

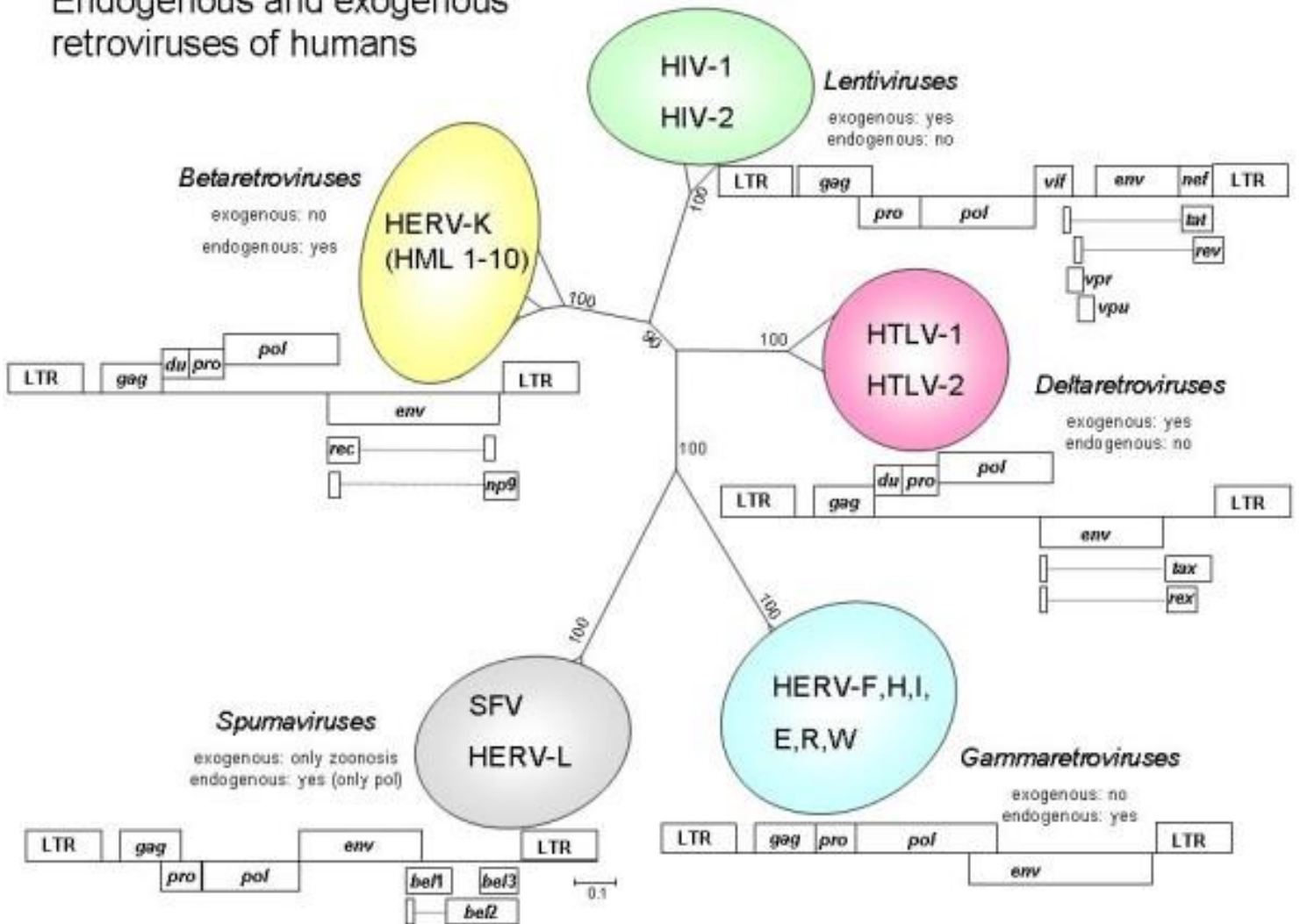
⁴⁴² Doerfler W.
A new concept in (adenoviral) oncogenesis: integration of foreign DNA and its consequences.
Biochim Biophys Acta. 1996 Oct 9;1288(2):F79-99. doi: 10.1016/0304-419x(96)00024-8.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8876634/>

⁴⁴³ Buchbinder SP, McElrath MJ, Dieffenbach C, Corey L.
Use of adenovirus type-5 vectored vaccines: a cautionary tale.
Lancet. 2020;396(10260):e68-e69. doi:10.1016/S0140-6736(20)32156-5
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7571904/>

⁴⁴⁴ Auclair S et al
Distinct susceptibility of HIV vaccine vector-induced CD4 T cells to HIV infection.
PLoS Pathog. 2018 Feb 23;14(2):e1006888. doi: 10.1371/journal.ppat.1006888.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5841825/>

L'origine e funzione del virus dell'immunodeficienza umana è tuttora oggetto di discussione. Senza entrare nel merito della questione, perché non oggetto di questa revisione, si riportano alcuni approfondimenti. In particolare, è interessante la stretta interazione e similitudine tra HIV ed HERVs.

Endogenous and exogenous retroviruses of humans



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3311604/>

Phylogenetic tree of human retroviruses. A 183 translated amino acid fragment surrounding the YXDD motif in the *pol* gene shows the relationship between endogenous and exogenous retroviruses of humans. Sequences were retrieved from the GenBank database [83], translated and aligned using BioEdit version 7.0 [84]. A phylogenetic tree with 500 bootstrap replicates was constructed with the neighbour-joining method based upon a distance matrix generated with the Poisson model for amino acid substitutions while assuming uniform rates among sites, as implemented in MEGA 5.0 [85]. Schematic genome organizations for different classes of retroviruses are shown. Drawings are not to scale. Additional reading frames may exist in other strains (e.g. non-primate lentiviruses encode a dUTPase). Abbreviations: HERV = human endogenous retrovirus; HIV = human immunodeficiency virus; HTLV = human T-cell lymphotropic virus; SFV = simian foamy virus.

Accession numbers: AF074086 (HERV-K HML-2); NC_001436 (HTLV-1); M10060 (HTLV-2); K03455 (HIV-1); M15390 (HIV-2); U04327 (SFV); NT_029419 (from which a HERV-E Pol sequence was retrieved). Analysed but not shown: AF033807 (MMTV, a betaretrovirus); J01998 (MuLV, a gammaretrovirus); M12349 (simian Mason-Pfizer monkey virus, a deltaretrovirus); DQ399707 (XMRV, a gammaretrovirus), and the horse endogenous betaretrovirus EqERV-beta 1 [86]. LTR = long terminal repeat, consisting of the U3, R and U5 regions in the integrated provirus, *gag* = group-specific-antigen, *du* = dUTPase, *pro* = protease, *pol* = polymerase (reverse transcriptase and integrase), *env* = envelope, *bel* 1-3 (*bel* 1 is also known as *tas*; the *bel* 2 reading frame overlaps with another one named *bet*), *tax*, *rex*, *tat*, *rev*, *vpu*, *vif*, *nef* and *vpr* encode small additional proteins. The HERV-K *rec* protein is also known as K-Rev. HERV-K *rec* is found in HERV-K type II proviruses, while *np9* is encoded by HERV-K type I proviruses [87]. In spumavirus, either *gag-pro* or *pro-pol* are encoded in the same translational reading frame.

Approfondimento

The Structural Biology of HIV

The Lurker: How A Virus Hid In Our Genome For Six Million Years

HIV infection and HERV expression: a review

The Interplay Among HIV, LINE-1, and the Interferon Signaling System

Integrazione cromosomica dei vettori adenovirali

Doefler et al nel loro articolo *“Adenoviral Vector DNA- and SARS-CoV-2 mRNA-Based Covid-19 Vaccines: Possible Integration into the Human Genome - Are Adenoviral Genes Expressed in Vector-based Vaccines?”*⁴⁴⁵ approfondiscono i rischi dei vaccini a vettore adenovirale, legati alla potenziale capacità d'integrarsi nel DNA genomico e modificarne stabilmente la sequenza.

Il lavoro su e con i vettori di adenovirus si basa sull'affermazione non provata che questi vettori sono sicuri perché il DNA di adenovirus "non si integrerebbe" nei genomi delle cellule riceventi, ma ad oggi non ci sono prove concrete per sostenere questa interpretazione. I problemi incontrati nelle procedure terapeutiche geniche del passato⁴⁴⁶, e attualmente con i vaccini SARS-CoV-2 basati su vettori di adenovirus, richiederanno una rivalutazione approfondita dei danni che comportano i sistemi a vettore adenovirale. Naturalmente, il destino del DNA adenovirale intatto e quello del DNA del vettore parzialmente difettoso è diverso per alcuni aspetti, sebbene entrambi siano soggetti agli stessi meccanismi di ricombinazione integrativa cellulare. Inoltre, le quantità di DNA vettore adenovirale somministrate nei programmi di vaccinazione (circa 2,5 μ) sono inferiori a quelle nelle procedure di terapia genica. Si pensa che il DNA del vettore adenovirale raggiunga principalmente le cellule del fegato⁴⁴⁷ e probabilmente entri anche nelle cellule del sistema immunitario.

Gli studi revisionati nell'articolo hanno permesso di dimostrare quanto segue:

- L'adenovirus umano di tipo 12 (Ad12) induce neoplasie neuroectodermali primitive nel 70-90% dei criceti siriani *Mesocricetus auratus* appena nati inoculati con il virus⁴⁴⁸. Il DNA di Ad12 nella linea cellulare tumorale di criceto

⁴⁴⁵ Doerfler W.

Adenoviral Vector DNA- and SARS-CoV-2 mRNA-Based Covid-19 Vaccines: Possible Integration into the Human Genome - Are Adenoviral Genes Expressed in Vector-based Vaccines?

Virus Res. 2021 Sep;302:198466. doi: 10.1016/j.virusres.2021.198466.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8168329/>

⁴⁴⁶ Somanathan S, Calcedo R, Wilson JM.

Adenovirus-Antibody Complexes Contributed to Lethal Systemic Inflammation in a Gene Therapy

Trial. Mol Ther. 2020;28(3):784-793. doi:10.1016/j.ymthe.2020.01.006

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7054813/>

⁴⁴⁷ Stephen SL, Montini E, Sivanandam VG, et al.

Chromosomal integration of adenoviral vector DNA in vivo.

J Virol. 2010;84(19):9987-9994. doi:10.1128/JVI.00751-10

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2937808/>

⁴⁴⁸ Trentin Jj, Yabe Y, Taylor G.

The quest for human cancer viruses.

Science. 1962 Sep 14;137(3533):835-41. doi: 10.1126/science.137.3533.835. PMID: 13922417.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13922417/>

Hohlweg U, Hösel M, Dorn A, Webb D, Hilger-Eversheim K, Remus R, Schmitz B, Buettner R, Schramme A, Corzilius L, Niemann A, Doerfler W.

Intraperitoneal dissemination of Ad12-induced undifferentiated neuroectodermal hamster tumors: de novo methylation and transcription patterns of integrated viral and of cellular genes.

indotta da Ad12 T637 viene integrato mediante ricombinazione eterologa in 10-12 copie, spesso in un sito genomico selezionato casualmente. Non vi è, tuttavia, alcuna prova che uno qualsiasi degli adenovirus umani sia implicato nella tumorigenesi umana.

- Sono state studiate le infezioni di cellule umane con adenovirus di tipo 2 (Ad2) o Ad12. Ci sono prove che il DNA dell'adenovirus umano sia in grado di ricombinarsi con il DNA cellulare anche in cellule umane infettate in modo produttivo, sebbene sia difficile documentare vere integrazioni poiché nessuna delle cellule umane infette sopravvive alle infezioni da adenovirus produttivo.⁴⁴⁹
- Nelle cellule tumorali di criceto indotte da Ad12 e nelle cellule di criceto trasformate da Ad2 o Ad12, il DNA virale integrato diventa metilato *de novo* con CpG in pattern specifici⁴⁵⁰ che tendono a diffondersi attraverso l'integrato virale in maniera specifica⁴⁵¹. La dimostrazione di correlazioni inverse tra i livelli di metilazione del DNA e le attività genetiche di specifiche regioni dei genomi integrati di Ad2 o Ad12 sono state tra le prime in letteratura e hanno segnato l'inizio di un impegno a lungo termine della ricerca nel settore per chiarire le funzioni biologiche della metilazione delle CpG del DNA in cellule di mammifero⁴⁵².

Questa interrelazione inversa tra silenziamento genetico e modelli specifici di metilazione del promotore CpG è stata successivamente confermata in molti sistemi eucariotici di importanza generale. In una serie di esperimenti con diversi promotori eucariotici e geni indicatori, è stato documentato che la metilazione specifica del promotore ha causato l'inattivazione di questi promotori⁴⁵³.

Virus Res. 2003 Dec;98(1):45-56. doi: 10.1016/j.virusres.2003.08.012.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14609629/>

⁴⁴⁹ Schick J, Baczek K, Fanning E, Groneberg J, Burger H, Doerfler W.
Intracellular forms of adenovirus DNA: integrated form of adenovirus DNA appears early in productive infection.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1976;73(4):1043-1047. doi:10.1073/pnas.73.4.1043
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC430196/>

⁴⁵⁰ Sutter D, Westphal M, Doerfler W.
Patterns of integration of viral DNA sequences in the genomes of adenovirus type 12-transformed hamster cells.
Cell. 1978 Jul;14(3):569-85. doi: 10.1016/0092-8674(78)90243-x.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/688383/>

⁴⁵¹ Toth M, Lichtenberg U, Doerfler W.
Genomic sequencing reveals a 5-methylcytosine-free domain in active promoters and the spreading of preimposed methylation patterns.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1989;86(10):3728-3732. doi:10.1073/pnas.86.10.3728
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC287213/>

⁴⁵² Sutter D, Doerfler W.
Methylation of integrated adenovirus type 12 DNA sequences in transformed cells is inversely correlated with viral gene expression.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1980;77(1):253-256. doi:10.1073/pnas.77.1.253
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC348247/>

Vardimon L, Neumann R, Kuhlmann I, Sutter D, Doerfler W.
DNA methylation and viral gene expression in adenovirus-transformed and -infected cells.
Nucleic Acids Res. 1980;8(11):2461-2473. doi:10.1093/nar/8.11.2461
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC324094/>

Doerfler W. DNA methylation and gene activity.
Annu Rev Biochem. 1983;52:93-124. doi: 10.1146/annurev.bi.52.070183.000521.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6311083/>

⁴⁵³ Vardimon L, Kressmann A, Cedar H, Maechler M, Doerfler W.
Expression of a cloned adenovirus gene is inhibited by in vitro methylation.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1982;79(4):1073-1077. doi:10.1073/pnas.79.4.1073
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC345902/>

Kruczek I, Doerfler W.
Expression of the chloramphenicol acetyltransferase gene in mammalian cells under the control of adenovirus type 12 promoters: effect of promoter methylation on gene expression.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1983;80(24):7586-7590. doi:10.1073/pnas.80.24.7586
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC534385/>

Inoltre, i modelli di metilazione CpG specifici nei genomi dei mammiferi possono essere interpretati come segnali per l'inattivazione genica a lungo termine.⁴⁵⁴

LA METILAZIONE ⁴⁵⁵

Negli eucarioti la metilazione coinvolge essenzialmente la citosina (modificata in 5-metilcitosina) e, in particolare, nei mammiferi ad essere metilate sono principalmente le citosine presenti nella sequenza 5'-CG-3' (dinucleotide CpG, citosina-fosfato-guanina).

Circa il 70-80% di tutte le sequenze CpG dei genomi dei mammiferi risulta metilato ed è stato anche osservato come le C sui due filamenti siano sempre entrambe metilate o entrambe non metilate e non presentino invece uno stato di metilazione discordante. Ci si aspetterebbe che sequenze così brevi come il dinucleotide CpG siano distribuite uniformemente lungo la sequenza genomica, ma in realtà non è così.

Vi sono infatti alcune regioni genomiche, lunghe fino a circa 3 kb, in cui i siti CpG si trovano raggruppati: le cosiddette isole CpG.

Per quanto a prima vista la definizione stessa sembrerebbe far pensare che le isole CpG presentino un eccesso di dinucleotidi CpG, in realtà sono piuttosto le altre regioni genomiche che risultano particolarmente prive di questi siti: la causa di tale mancanza nel genoma dei mammiferi è da ricondurre alla facilità con cui le metilcitosine presenti nel DNA possano mutare spontaneamente verso le timine.

Langner KD, Vardimon L, Renz D, Doerfler W.

DNA methylation of three 5' C-C-G-G 3' sites in the promoter and 5' region inactivate the E2a gene of adenovirus type 2. Proc Natl Acad Sci U S A. 1984;81(10):2950-2954. doi:10.1073/pnas.81.10.2950 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC345198/>

⁴⁵⁴ Doerfler W.

De novo methylation, long-term promoter silencing, methylation patterns in the human genome, and consequences of foreign DNA insertion. Curr Top Microbiol Immunol. 2006;301:125-75. doi: 10.1007/3-540-31390-7_5. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16570847/>

Doerfler W.

DNA methylation and gene activity. Annu Rev Biochem. 1983;52:93-124. doi: 10.1146/annurev.bi.52.070183.000521. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6311083/>

⁴⁵⁵ <https://upbiotech.wordpress.com/2019/03/19/la-metilazione-del-dna/>

https://www.pianetachimica.it/mol_mese/mol_mese_2011/07_DNA_metiltransferasi/DNA_metiltransferasi.htm

Jones PA.

Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. Nat Rev Genet. 2012 May 29;13(7):484-92. doi: 10.1038/nrg3230. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22641018/>

Angeloni A, Bogdanovic O.

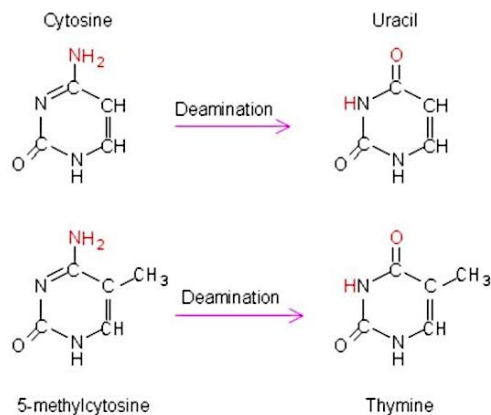
Sequence determinants, function, and evolution of CpG islands. Biochem Soc Trans. 2021;49(3):1109-1119. doi:10.1042/BST20200695 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8286816/>

Cain JA, Montibus B, Oakey RJ.

Intragenic CpG Islands and Their Impact on Gene Regulation. Front Cell Dev Biol. 2022;10:832348. Published 2022 Feb 11. doi:10.3389/fcell.2022.832348 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8873577/>

Paweł K, Maria Małgorzata S.

CpG Island Methylator Phenotype-A Hope for the Future or a Road to Nowhere? Int J Mol Sci. 2022 Jan 13;23(2):830. doi: 10.3390/ijms23020830. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8777692/>



Questa mutabilità aumentata ha portato, nel corso dell'evoluzione, ad un inesorabile impoverimento delle citosine che possono essere metilate, ovvero quelle della sequenza 5'-CG-3', tanto che queste ultime sono solo circa il 20% dell'atteso, stando al contenuto di G+C.

Va da sé che se, al contrario del resto del genoma, nelle isole CpG tali citosine siano sopravvissute, ci deve essere stato qualcosa che le abbia protette dalla metilazione. Non è un caso infatti che le isole CpG si trovino all'interno o comunque a ridosso dei promotori di alcuni geni, dove a causa dei legami di fattori e complessi proteici coinvolti nella trascrizione e nella sua regolazione, esse risultino poco accessibili alle metilasi; più un gene è espresso nei vari tessuti e nelle varie fasi di sviluppo, più le isole CpG saranno protette dalla metilazione. Il che è avvalorato dal fatto che sostanzialmente tutti i geni costitutivi (o housekeeping) sono caratterizzati dalla presenza di isole CpG. L'esistenza di isole CpG e di citosine che possono essere metilate hanno, come si diceva, un importante ruolo nella regolazione dell'attività genica: sequenze CpG ipermetilate a livello di un promotore determinano una inibizione della trascrizione e, viceversa se le sequenze non vengono metilate il gene risulta attivato. Tale fenomeno trova la sua spiegazione nella doppia influenza che la metilazione del DNA può esercitare sul processo di trascrizione: da una parte i siti metilati impediscono il riconoscimento e il legame tra i fattori trascrizionali e la loro sequenza target, dall'altra le sequenze metilate sono riconosciute da fattori implicati nel rimodellamento della cromatina, che intervengono nella condensazione della stessa.

La metilazione dei siti CpG è operata dalle proteine DNA metil transferasi (più semplicemente dette "metilasi"), che possiamo dividere in due categorie a seconda della funzione che svolgono:

- Le metilasi *de novo* aggiungono gruppi metilici in nuove posizioni;
- Le metilasi di mantenimento riconoscono i siti emimetilati e aggiungono un metile sul filamento non metilato, dimodoché sia garantita la perpetuazione del pattern di metilazione durante i vari cicli di replicazione del DNA. Esistono poi delle demetilasi che hanno invece il compito di rimuovere i gruppi metilici.

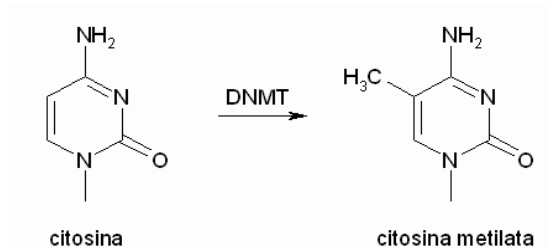
Dopo che ogni cellula si è differenziata, il codice epigenetico deve essere mantenuto per il resto della vita dell'organismo. Quando una cellula si divide, l'informazione deve essere trasmessa alle nuove cellule e la DNA metilasi DNMT1 realizza questo lavoro. Quando il DNA viene duplicato, aggiunge i gruppi metilici alle nuove catene. L'informazione viene trasmessa grazie ad un espediente: i gruppi metilici vengono quasi sempre aggiunti alle basi di citosina che appartengono alla seguente sequenza palindromica (che si legge nello stesso modo, in direzioni opposte, nei due filamenti):



In questa coppia di basi, la citosina è presente su tutte e due le catene così, in un tratto di DNA metilato, tutte e due le catene hanno un gruppo metilico. Quando il DNA viene duplicato, le due doppie eliche figlie sono composte

da una catena vecchia, metilata in modo corretto, e da una nuova, non metilata. L'enzima DNMT1 ha il compito di cercare le sequenze CpG che sono metilate su una sola catena e di metilare anche l'altra catena.

La metilazione della citosina avviene nella posizione 5' e questo altera il profilo della molecola nella parte sinistra, mentre non cambia la parte destra della molecola implicata nell'appaiamento con la guanina, con la quale forma tre legami idrogeno che tengono uniti i due filamenti nella doppia elica del DNA.



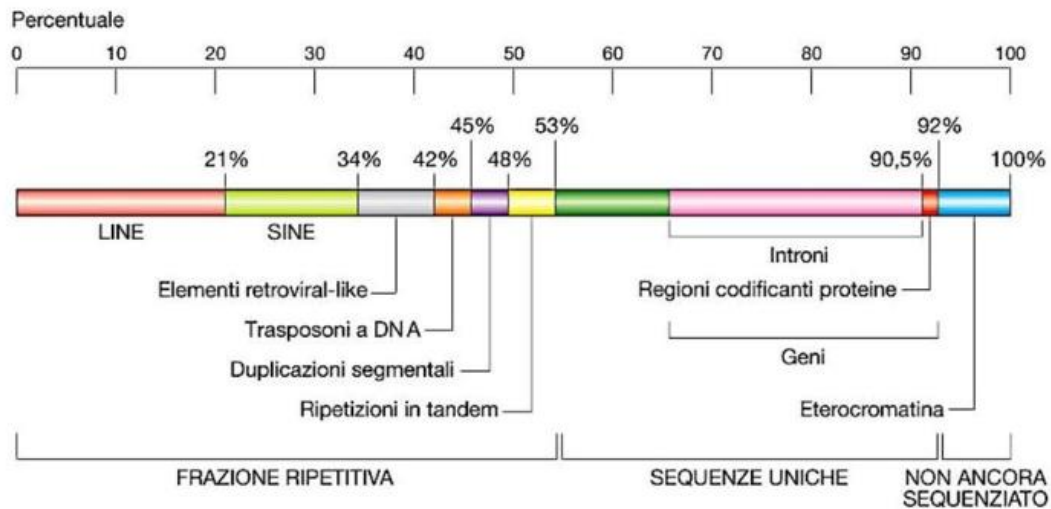
Nel DNA, il gruppo metile sporge nella fenditura principale e quindi la citosina metilata può essere riconosciuta toccando lateralmente la catena del DNA senza bisogno di separare le due catene.

Anche i batteri metilano il DNA, però non lo fanno per accendere o spegnere geni specifici, ma per difendersi dai virus. I batteri, infatti, sintetizzano enzimi di restrizione (mdm 8-2000) specializzati nel tagliare il DNA dei virus in corrispondenza di specifiche sequenze di basi azotate. I batteri devono però proteggere il proprio DNA dal rischio di essere tagliato dai propri enzimi di restrizione, e quindi sintetizzano delle specifiche DNA metilasi che aggiungono gruppi metilici al loro DNA in corrispondenza di quelle stesse sequenze. I gruppi metilici impediscono agli enzimi di restrizione di riconoscere e tagliare quella sequenza, ma consentono comunque al DNA di funzionare correttamente, cioè le basi metilate possono essere lette durante le operazioni di duplicazione e trascrizione.

In questo modo gli enzimi di restrizione si muovono nella cellula batterica senza fare nulla fino a quando un virus infetta la cellula. Il DNA virale non è metilato e quindi viene rapidamente tagliato in pezzi dagli enzimi di restrizione, e questo meccanismo può essere interpretato come una specie di sistema immunitario primitivo.

- È stato spesso affermato che l'integrazione di DNA estraneo nei genomi dell'ospite potrebbe portare all'interruzione dei geni nel cromosoma ospite e quindi potrebbero verificarsi mutazioni. Indubbiamente, questa è una possibilità che è stata effettivamente descritta in alcuni casi. Tuttavia, considerando che il genoma umano trasporta l'1,1% di esoni, il 24% di introni e il 75% di DNA intergenico ⁴⁵⁶, l'integrazione di DNA estraneo ha una probabilità di circa 1/100 di colpire i geni funzionali.

⁴⁵⁶ Venter JC, et al
The sequence of the human genome.
Science. 2001 Feb 16;291(5507):1304-51. doi: 10.1126/science.1058040. Erratum in: Science 2001 Jun 5;292(5523):1838.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11181995/>



<https://slideplayer.it/slide/12369156/>

Questo aspetto delle sequele dell'integrazione del DNA estraneo è stato oggetto di precedenti lavori ⁴⁵⁷.

- Nei siti di inserimento del DNA virale, il livello di metilazione del DNA CpG nel DNA cellulare adiacente è diminuito. Quindi l'integrazione del DNA estraneo è stata in grado di alterare i segnali epigenetici del DNA cellulare in *cis*, immediatamente nel sito di inserimento. ⁴⁵⁸

Tuttavia le alterazioni possono verificarsi anche in *trans*. Nelle cellule di criceto trasformate con Ad12 che trasportano da 10 a 12 copie di DNA virale integrate nel genoma in un sito cromosomico, i livelli di metilazione CpG nelle circa 900 copie di particelle intracitoplasmiche A di DNA del retrotrasposone cellulare (IAP) (o particelle A intracisternali) è stato notevolmente aumentato rispetto alle cellule di criceto non trasformate e alle cellule di criceto infette da Ad12. Il fatto che i genomi di adenovirus non si trovino ad esempio nelle cellule tumorali umane o nelle cellule di individui con malattie croniche, implicherebbe necessariamente che l'integrazione del DNA dell'adenovirus o quella di qualsiasi altro DNA estraneo non abbia svolto un ruolo importante nella patogenesi di queste malattie. Tuttavia, la persistenza del DNA transgenomico non è una precondizione necessaria per il

⁴⁵⁷ Heller H, Kämmer C, Wilgenbus P, Doerfler W.

Chromosomal insertion of foreign (adenovirus type 12, plasmid, or bacteriophage lambda) DNA is associated with enhanced methylation of cellular DNA segments.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92(12):5515-5519. doi:10.1073/pnas.92.12.5515

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC41726/>

Weber S, Hofmann A, Herms S, Hoffmann P, Doerfler W.

Destabilization of the human epigenome: consequences of foreign DNA insertions.

Epigenomics. 2015 Aug;7(5):745-55. doi: 10.2217/epi.15.40.

<https://doi.org/10.2217/epi.15.40>

Weber S, Jung S, Doerfler W.

DNA methylation and transcription in HERV (K, W, E) and LINE sequences remain unchanged upon foreign DNA insertions.

Epigenomics. 2016 Feb;8(2):157-65. doi: 10.2217/epi.15.109.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26627183/>

Doerfler W, Weber S, Naumann A.

Inheritable epigenetic response towards foreign DNA entry by mammalian host cells: a guardian of genomic stability.

Epigenetics. 2018;13(12):1141-1153. doi:10.1080/15592294.2018.1549463

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6986795/>

⁴⁵⁸ Lichtenberg U, Zock C, Doerfler W.

Integration of foreign DNA into mammalian genome can be associated with hypomethylation at site of insertion.

Virus Res. 1988 Nov;11(4):335-42. doi: 10.1016/0168-1702(88)90006-8.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3223064/>

mantenimento degli effetti *trans* nel caso dello stato trasformato dei genomi e delle cellule riceventi [meccanismo hit-and-run]. Nelle linee clonali di cellule umane transgenomiche per un plasmide batterico da 5,6 kbp, i modelli di trascrizione e metilazione CpG sono stati confrontati tra cloni cellulari transgenomici e non transgenomici utilizzando sistemi di microarray di chip genetici.

Nel 4,7% dei 28.869 segmenti genici analizzati, le attività trascrizionali erano sovra- o sottoregolate in maniera differenziale nei cloni transgenomici. La profilazione dell'intero genoma ha dimostrato la metilazione differenziale in 3791 di > 480.000 siti CpG che sono stati esaminati in cloni cellulari transgenomici rispetto a quelli non transgenomici. Questi dati hanno indicato che l'inserimento consolidato di DNA estraneo in un genoma umano può alterare notevolmente la metilazione del DNA cellulare CpG e i profili di trascrizione.⁴⁵⁹

Questi effetti epigenetici dell'inserimento di DNA estraneo sono di grande importanza poiché incidono sulla stabilità epigenetica e sulla funzione dell'intero genoma. Poiché molti approcci sperimentali in biologia e medicina ricorrono allo studio di cellule o organismi transgenomici, gli effetti epigenetici spesso insospettiti dell'inserimento di DNA estraneo dovranno essere presi in considerazione in un'interpretazione realistica dei dati sperimentali.

- Il laboratorio di Stefan Kochanek presso l'Università di Ulm in Germania ha condotto uno studio pilota per indagare se il DNA del vettore dell'adenovirus può integrarsi nei cromosomi, sulla base delle ricerche sul trasferimento genico mediato dal vettore adenovirale nei topi.⁴⁶⁰ I vettori adenovirali carenti di replicazione che trasportano transgeni diversi sono stati iniettati per via endovenosa nei topi. Negli epatociti che esprimono il transgene sono stati trovati costrutti del vettore integrati nel genoma del topo. Le analisi dei siti di giunzione tra vettore e DNA cellulare hanno rivelato un legame covalente degli estremi del vettore al DNA cellulare del topo mediante ricombinazione eterologa a una frequenza di $6,7 \times 10^{-5}$ epatociti trasdotti. Ricombinanti omologhi sono stati identificati a frequenze cento volte inferiori.⁴⁴⁵

Nella valutazione di questi risultati, gli autori hanno suggerito che la frequenza della ricombinazione del DNA del vettore adenovirale eterologo con il genoma ricevente era paragonabile a quella delle mutazioni spontanee nelle cellule di mammifero. Naturalmente, è una questione aperta quali fattori provocano "mutazioni spontanee". Tra le altre cause, la ricombinazione del DNA umano con DNA estraneo potrebbe svolgere un ruolo importante nella generazione di mutazioni spontanee. Va tenuto presente che la quantità di DNA del vettore adenovirale assemblato nel virione, che viene somministrata di routine per via intramuscolare, ad es. con il vaccino AstraZeneca (50×10^9 virioni per dose di vaccino, equivalenti a circa 2,5µg di DNA di vettore adenovirale per dose), è inferiore a quella di molti protocolli di terapia genica.

Motivati dai rapporti sulla dispersione prolungata dell'RNA SARS-CoV-2 e dai continui test RT-PCR positivi tra i sopravvissuti a Covid-19, Zhang et al. hanno studiato se l'RNA SARS-CoV-2 potesse essere trascritto inversamente nel DNA, che a sua volta potrebbe integrarsi nel genoma ospite e continuare a essere trascritto nell'RNA.⁴⁶¹

⁴⁵⁹ Weber S, Hofmann A, Herms S, Hoffmann P, Doerfler W.
Destabilization of the human epigenome: consequences of foreign DNA insertions.
Epigenomics. 2015 Aug;7(5):745-55. doi: 10.2217/epi.15.40.
<https://doi.org/10.2217/epi.15.40>

Doerfler W, Weber S, Naumann A.
Inheritable epigenetic response towards foreign DNA entry by mammalian host cells: a guardian of genomic stability.
Epigenetics. 2018;13(12):1141-1153. doi:10.1080/15592294.2018.1549463
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6986795/>

⁴⁶⁰ Stephen SL, Montini E, Sivanandam VG, et al.
Chromosomal integration of adenoviral vector DNA in vivo.
J Virol. 2010;84(19):9987-9994. doi:10.1128/JVI.00751-10
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2937808/>

⁴⁶¹ Zhang L, Richards A, Barrasa MI, Hughes SH, Young RA, Jaenisch R.
Reverse-transcribed SARS-CoV-2 RNA can integrate into the genome of cultured human cells and can be expressed in patient-derived tissues.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2021;118(21):e2105968118. doi:10.1073/pnas.2105968118
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8166107/>

Mediante l'analisi della sequenza nucleotidica, gli autori hanno osservato copie del DNA di SARS-CoV-2 nei genomi di circa il 10-20% dei pazienti con Covid-19. Questo DNA del SARS-CoV-2 è affiancato da duplicazioni del sito bersaglio e sequenze di riconoscimento dell'endonucleasi LINE-1 di consenso. Le ultime due caratteristiche non sono state sempre osservate, pertanto sono concepibili anche meccanismi indipendenti dalla LINE-1 per l'integrazione del DNA del SARS-CoV-2.

È stato sottolineato che solo le parti subgenomiche del DNA di SARS-CoV-2 sono state trovate integrate. Questo tipo di integrazione preclude la possibilità che il virus infettivo venga prodotto da coloro che portano DNA del SARS-CoV-2 virale frammentato. Le parti integrate del DNA del SARS-CoV-2 sono state spesso trascritte. Gli autori hanno concluso che l'infezione da SARS-CoV-2 potrebbe portare alla sintesi delle trascrittasi inverse codificate con il retrotrasposone LINE-1 endogeno.

Questi enzimi hanno generato retro-trascrizioni del DNA e probabilmente solo frammenti di questo DNA vengono inseriti nei genomi umani e trascritti nell'RNA del SARS-CoV-2. Questa scoperta potrebbe avere implicazioni nel contesto delle sequele a lungo termine delle infezioni da SARS-CoV-2 per i genomi dei pazienti con Covid-19. Inoltre, anche i vaccini a base di RNA impiegati in maniera massiccia in tutto il mondo dovranno essere esaminati sotto questo aspetto. Risultati imprevedibili come quelli qui descritti dovranno però essere riprodotti da altri gruppi di ricerca e si auspica che i risultati qui descritti stimolino indagini su meccanismi simili che influenzano ulteriori agenti patogeni virali a RNA. ⁴⁴⁶

Commenti sul vettore dell'adenovirus dello scimpanzé utilizzato nel vaccino AstraZeneca SARS-CoV-2 ChAdOx1

I dettagli sulla struttura e sulla trascrizione dello scheletro virale del vettore dell'adenovirus dello scimpanzé utilizzato nella progettazione del vaccino AstraZeneca SARS-CoV-2 ChAdOx1, sono stati recentemente pubblicati.⁴⁶² In questo vettore, una parte non specificata della regione E1 del genoma adenovirale è stata sostituita dalla sequenza codificante della proteina spike SARS-CoV-2 e quindi il costrutto vettoriale ha una replicazione difettosa. L'espressione della glicoproteina della spike SARS-CoV-2 nel costrutto del vettore è stata posta sotto il controllo del promotore del CMV [citomegalovirus] sensibile al Tet,⁴⁶³ uno dei promotori forti eucariotici. Il vettore, tuttavia, porta ancora 28 kbp, in particolare dei geni di adenovirus degli scimpanzé tardivi.⁴⁴⁷ La loro attività trascrizionale potrebbe essere ancora sotto il controllo remoto di segmenti della regione E1 che potrebbero essere rimasti nel costrutto. A seconda della linea cellulare umana che è stata infettata con il vettore, i geni dello scheletro adenovirale sono stati trovati espressi a livelli diversi. Al momento non è noto quali geni dell'adenovirus dello scimpanzé siano effettivamente espressi nei vaccinati umani e come i profili di espressione adenovirale variano tra i diversi destinatari del vaccino. Finora, il contributo causale dei prodotti del gene tardivo adenovirale agli effetti collaterali del vaccino osservati in tutto il mondo, non è stato studiato e non può essere escluso.

Quindi, oltre ai possibili problemi a lungo termine derivanti dall'uso di vettori adenovirali a causa della loro integrazione e sequele epigenetiche (vedi sopra), i vettori di adenovirus rimangono problematici in quanto esprimono ancora prodotti genici virali,⁴⁴⁷ il cui ruolo nel suscitare pericolosi effetti collaterali nei vaccinati umani non è stato valutato in modo critico.

Non sono state presentate informazioni sull'entità e sulla natura dell'espressione del gene adenovirale ChAdOx1 nei vaccinati umani, e in assenza delle funzioni transattivanti della regione ChAdOx1 E1, i transattivatori cellulari negli organismi dei vaccinati potrebbero facilitare l'espressione dei geni virali ChAdOx1 tardivi.

⁴⁶² Almuqrin A, Davidson AD, Williamson MK, et al.

SARS-CoV-2 vaccine ChAdOx1 nCoV-19 infection of human cell lines reveals low levels of viral backbone gene transcription alongside very high levels of SARS-CoV-2 S glycoprotein gene transcription.

Genome Med. 2021;13(1):43. Published 2021 Mar 15. doi:10.1186/s13073-021-00859-1
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7958140/>

⁴⁶³ Loew R, Heinz N, Hampf M, Bujard H, Gossen M.

Improved Tet-responsive promoters with minimized background expression.

BMC Biotechnol. 2010;10:81. Published 2010 Nov 24. doi:10.1186/1472-6750-10-81
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3002914/>

Omologie di brevi sequenze in questi geni ChAdOx1 con i geni dell'adenovirus umano potrebbero essere sufficienti per suscitare risposte immunitarie di memoria nei vaccinati con forza individualmente diversa.

Quest'ultimo potrebbe essere intensificato nei giovani che sono ancora più vicini alle loro esperienze infantili con infezioni adenovirali umane. In particolare, le giovani donne che forniscono la maggior parte dell'assistenza ai pazienti e agli anziani nella società potrebbero quindi essere preferenzialmente colpite da queste reazioni immunologiche eccessive alla vaccinazione. Resta da studiare il motivo per cui i trombociti sono presi di mira in maniera specifica da questo tipo di risposte immunitarie di memoria, e in questo contesto va tenuto presente che la trombocitopenia è stata riscontrata anche nei riceventi di costrutti vettore di adenovirus nel corso di applicazioni terapeutiche geniche.⁴⁶⁴

I ricercatori che lavorano sui vettori adenovirali sono a conoscenza dell'incidente di Jesse Gelsinger nel 1999. Come già accennato, un ragazzo di 18 anni che soffriva di una malattia metabolica genetica legata all'X, il deficit epatico di ornitina transcarbamilasi, fu il primo destinatario di un regime terapeutico genico basato su vettori adenovirali e morì pochi giorni dopo l'applicazione del adenovirus ricombinante. I possibili fattori coinvolti nell'esito fatale sono stati studiati all'epoca, ma non è stato possibile identificare chiaramente. L'incidente ha interrotto per molto tempo l'uso dei vettori di adenovirus nella terapia genica.

Molto recentemente, un'indagine dettagliata su questo incidente fatale lo ha attribuito alla generazione di complessi anticorpo-adenovirus, che hanno contribuito all'infiammazione sistemica letale nell'organismo del ricevente.⁴⁶⁵ Naturalmente, il vettore dell'adenovirus umano di tipo 5 (Ad5) che è stato impiegato nella misura terapeutica del gene del 1999, non può essere confrontato direttamente con il vettore dell'adenovirus dello scimpanzé utilizzato nel vaccino contro il SARS-CoV-2 nel 2021.

I vettori derivati dell'Ad5 sono, tuttavia, parte di altri vaccini contro il SARS-CoV-2, quindi dovrebbe ancora essere osservata un'estrema cautela quando si iniettano vettori adenovirali nell'uomo. Si spera che le esperienze catastrofiche del passato non riemergano con i vettori di oggi, che di fatto non sono poi così diversi da quelli problematici più antichi.

Per riassumere:

- I vaccini a base di vettori di adenovirus possono portare all'integrazione del DNA di adenovirus a frequenza sconosciuta e con conseguenze epigenetiche imprevedibili. È ipotizzabile che gli effetti epigenetici possano essere notati solo anni dopo la vaccinazione.
- I geni adenovirali ancora presenti nel DNA del vettore dell'adenovirus potrebbero essere transattivati da fattori cellulari e portare a reazioni di memoria immunitaria che variano individualmente, e sono vissute dai vaccinati come sintomi transitori post-vaccinazione. Gli esiti fatali dovuti a reazioni immunitarie estreme sono stati segnalati ad oggi come eventi molto rari.
- L'RNA del SARS-CoV-2 o segmenti di esso, come il gene della spike, possono essere retrotrascritti da trascrittasi inversa codificata da LINE-1 o altri fattori, e il DNA così sintetizzato può essere integrato a frequenze e posizioni sconosciute nei genomi dei vaccinati. Ne segue che il rischio di eventi di integrazione indesiderati delle trascrizioni inverse dell'RNA del SARS-CoV-2 durante le infezioni da SARS-CoV-2 potrebbe essere simile a quello della vaccinazione con il vaccino Covid-19 basato su mRNA.

⁴⁶⁴ Lopez-Gordo E, Doszpoly A, Duffy MR, et al.

Defining a Novel Role for the Coxsackievirus and Adenovirus Receptor in Human Adenovirus Serotype 5 Transduction In Vitro in the Presence of Mouse Serum.

J Virol. 2017;91(12):e02487-16. Published 2017 May 26. doi:10.1128/JVI.02487-16

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5446653/>

⁴⁶⁵ Somanathan S, Calcedo R, Wilson JM.

Adenovirus-Antibody Complexes Contributed to Lethal Systemic Inflammation in a Gene Therapy Trial.

Mol Ther. 2020;28(3):784-793. doi:10.1016/j.ymthe.2020.01.006

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7054813/>

Persistenza del vettore adenovirale

La persistenza nei tessuti (studio di Tatsis et al)

Gli adenovirus acquisiti da infezioni naturali persistono per anni nei linfonodi e nelle tonsille.⁴⁶⁶ I vettori adenovirali (Ad) E1-deleti derivati da sierotipi umani o di scimpanzé sembrano condividere questa caratteristica, persistendo nel sito di inoculazione, nel fegato e nei tessuti linfatici. All'interno della milza, i vettori Ad persistono preferenzialmente nei linfociti T attivati in risposta alle cellule trasdotte dall'Ad.⁴⁶⁷ In particolare, l'arricchimento delle copie del genoma del vettore nei linfociti T CD8⁺ specifici per il prodotto transgenico, riflette la resistenza relativa dei linfociti T attivati alla citolisi mediata dai linfociti T CD8⁺. Considerando i tassi di turnover naturali dei linfociti T effettori e di memoria,⁴⁶⁸ ci si aspetterebbe comunque un costante decremento del numero di copie del genoma Ad nel tempo, seguito da una perdita completa. I dati ottenuti da Tatsis et al⁴⁶⁹ al mostrano chiaramente che le copie del genoma del vettore diminuiscono durante il primo anno dopo l'iniezione e, sebbene siano stati in grado di rilevare il genoma del vettore Ad fino a 2 anni nella milza dei topi (non mostrato), non hanno escluso che il vettore Ad potrebbe essere eliminato in una specie a vita più lunga trasdotta. È anche possibile che il genoma del vettore subisca una certa replicazione durante la proliferazione cellulare. Ciò può riflettere sia l'integrazione nel genoma della cellula ospite, atipica per un genoma di Ad, sia più probabilmente la duplicazione del gene episomiale facilitata dal meccanismo di trascrizione delle cellule ospiti.⁴⁷⁰

La persistenza nel muscolo e nel fegato può riflettere la presenza continuativa di vettori negli epatociti non replicanti e nelle cellule muscolari o, in alternativa, la loro presenza nei linfociti T che hanno sede in questi tessuti. I prodotti del dominio virale E3, che non sono essenziali per la proliferazione virale, ma che facilitano la sopravvivenza virale sovvertendo le risposte dei linfociti T CD8⁺, sono stati implicati nel promuovere la persistenza di Ads acquisiti da infezioni naturali.⁴⁷¹ I risultati dello studio mostrano che i genomi E3-deleti o i vettori deleti in E3 ed E4 rimangono rilevabili per mesi dopo una singola inoculazione (non mostrata), indicando che nessuno dei due prodotti genici è essenziale per la persistenza del vettore osservato.

In sintesi, i vettori Ad inducono risposte sostenute delle cellule T CD8⁺ specifiche del prodotto transgenico, e ciò riflette la persistenza dei genomi dei vettori adenovirali attivi dal punto di vista trascrizionale.

Studi di biodistribuzione

La biodistribuzione dell'AZD1222 (ChAdOx1 nCov-19, vaccino Astrazeneca) è risultata in gran parte confinata ai siti di somministrazione e al nervo sciatico dopo l'iniezione intramuscolare nei topi, mentre non è stata rilevata nella maggior parte dei tessuti campionati, inclusi cervello, midollo spinale e tessuto riproduttivo, e non è stata

⁴⁶⁶ Snejdarová V, Vonka V, Kutinová L, Rezáčová D, Chládek V.
The nature of adenovirus persistence in human adenoid vegetations.
Arch Virol. 1975;48(4):347-57. doi: 10.1007/BF01317433.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1106359/>

⁴⁶⁷ Yang Y, Ertl HC, Wilson JM.
MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes to viral antigens destroy hepatocytes in mice infected with E1-deleted recombinant adenoviruses.
Immunity. 1994 Aug;1(5):433-42. doi: 10.1016/1074-7613(94)90074-4.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7533647/>

⁴⁶⁸ Sprent J.
Turnover of memory-phenotype CD8⁺ T cells.
Microbes Infect. 2003 Mar;5(3):227-31. doi: 10.1016/s1286-4579(03)00015-7.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12681412/>

⁴⁶⁹ <https://ashpublications.org/blood/article/110/6/1916/24190/Adenoviral-vectors-persist-in-vivo-and-maintain>

⁴⁷⁰ Ehrhardt A, Xu H, Kay MA.
Episomal persistence of recombinant adenoviral vector genomes during the cell cycle in vivo.
J Virol. 2003 Jul;77(13):7689-95. doi: 10.1128/jvi.77.13.7689-7695.2003.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC164819/>

⁴⁷¹ McNees AL, Garnett CT, Gooding LR.
The adenovirus E3 RID complex protects some cultured human T and B lymphocytes from Fas-induced apoptosis.
J Virol. 2002 Oct;76(19):9716-23. doi: 10.1128/jvi.76.19.9716-9723.2002.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC136506/>

rilevata nemmeno nel sangue. Nel corso dello studio,⁴⁷² dal giorno 2 al giorno 29, il numero di animali con tessuti positivi e il numero di copie del DNA presenti in quei tessuti è diminuito, indicando la clearance. Coerentemente con i risultati dello studio di tossicità a dose ripetuta, l'esame istopatologico dei principali animali dello studio ha identificato l'infiammazione a cellule mononucleate e/o miste nel tessuto sottocutaneo e il muscolo scheletrico sottostante nei siti di inoculazione nei controlli e AZD1222. Ciò si è verificato con un'incidenza maggiore negli animali trattati con AZD1222 rispetto agli animali di controllo, e alcuni animali si è verificata un'estesa distribuzione di cellule infiammatorie nella fascia e nel tessuto connettivo al di sotto del muscolo scheletrico nei siti di somministrazione, che si estendeva fino a circondare il nervo sciatico.

L'assenza di livelli significativi di vettore virale nel sangue, ma bassi livelli rilevati nei tessuti distali al sito di iniezione (es. fegato, milza, polmone e midollo osseo) è dovuta alla breve emivita delle particelle virali nel sangue e l'accumulo di vettore virale o suoi frammenti in siti coinvolti nella rapida eliminazione del particolato da parte del sistema reticoloendoteliale nel fegato, nella milza e nel midollo osseo.⁴⁷³

Come già ampiamente discusso, i moderni vettori virali utilizzati nei vaccini COVID-19 sono carenti di replicazione, e ogni dose del vaccino contiene una carica virale molto elevata (circa 50 miliardi di particelle virali per dose nei vaccini Ox/AZ o J&J/Janssen CoViD-19 e 100 miliardi di particelle virali per dose nello Sputnik-V). Poiché è improbabile che le particelle dei vettori virali siano confinate ai muscoli nel sito di iniezione e siano invece libere di distribuirsi in tutto il corpo e drenare attraverso il sistema linfatico, è ragionevole ipotizzare che il loro volume di distribuzione apparente sia molto elevato. La biodistribuzione di ChaAdOx1 contenente HBV nei topi BALB/c (studio 0841MV38.001) ha riscontrato i livelli virali più elevati nel sito di iniezione, ma sono stati rilevati bassi livelli di virus dopo 24 ore dall'iniezione in tutti gli altri tessuti (inclusi sangue, cervello, cuore, linfonodo inguinale, rene, fegato, polmone, gonadi e milza). È probabile che la distribuzione tissutale proporzionale dei vettori virali nei tessuti del corpo lontano dal sito di iniezione aumenti nel tempo, tuttavia la biodistribuzione oltre le 24 ore dopo la dose non è stata studiata. Tale studio conferma la veicolazione del vaccino nei tessuti cerebrali, in cui può stimolare le cellule cerebrali a produrre proteine spike e portare a una risposta immunitaria contro le cellule cerebrali, oppure può innescare una trombosi indotta da proteine spike. Ciò potrebbe spiegare le peculiari incidenze della CVST (cerebral venous sinus thrombosis, [trombosi cerebrale dei seni venosi](#)) fatale osservato con i vaccini CoViD-19 basati su vettori virali.⁴⁷⁴

Ci sono pochissime informazioni pubblicate per valutare la biodistribuzione di tutti i vaccini genetici, tuttavia si prevede che se questo meccanismo del danno è caratteristico del vettore virale impiegato nel vaccino AZ, anche gli altri vaccini che utilizzano una tecnologia simile (J&J e Sputnik V, ect) potrebbero portare agli stessi problemi di sicurezza. Per il vaccino mRNA COVID-19 (Pfizer o Moderna), non sono ancora stati condotti studi di biodistribuzione negli animali. Gli studi surrogati con luciferasi e nanoparticelle lipidiche solide (Pfizer) confermano una biodistribuzione al fegato e ad altri tessuti del corpo oltre il sito di somministrazione⁴⁷⁵.

Per Moderna, la biodistribuzione dell'mRNA-1647 (che codifica per i geni del CMV) formulato in un simile sistema di rilascio di nanoparticelle lipidiche, conferma una biodistribuzione oltre il sito di iniezione, in particolare è stata notata la distribuzione ai linfonodi, alla milza e all'occhio.

⁴⁷² <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8637436/>

⁴⁷³ Alemany R, Suzuki K, Curiel DT. Blood clearance rates of adenovirus type 5 in mice. *J Gen Virol.* 2000 Nov;81(Pt 11):2605-2609. doi: 10.1099/0022-1317-81-11-2605. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11038370/>

⁴⁷⁴ Wittstock M, Walter U, Volmer E, Storch A, Weber MA, Großmann A. Cerebral venous sinus thrombosis after adenovirus-vectored COVID-19 vaccination: review of the neurological-neuroradiological procedure. *Neuroradiology.* 2022;64(5):865-874. doi:10.1007/s00234-022-02914-z <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8929723/>

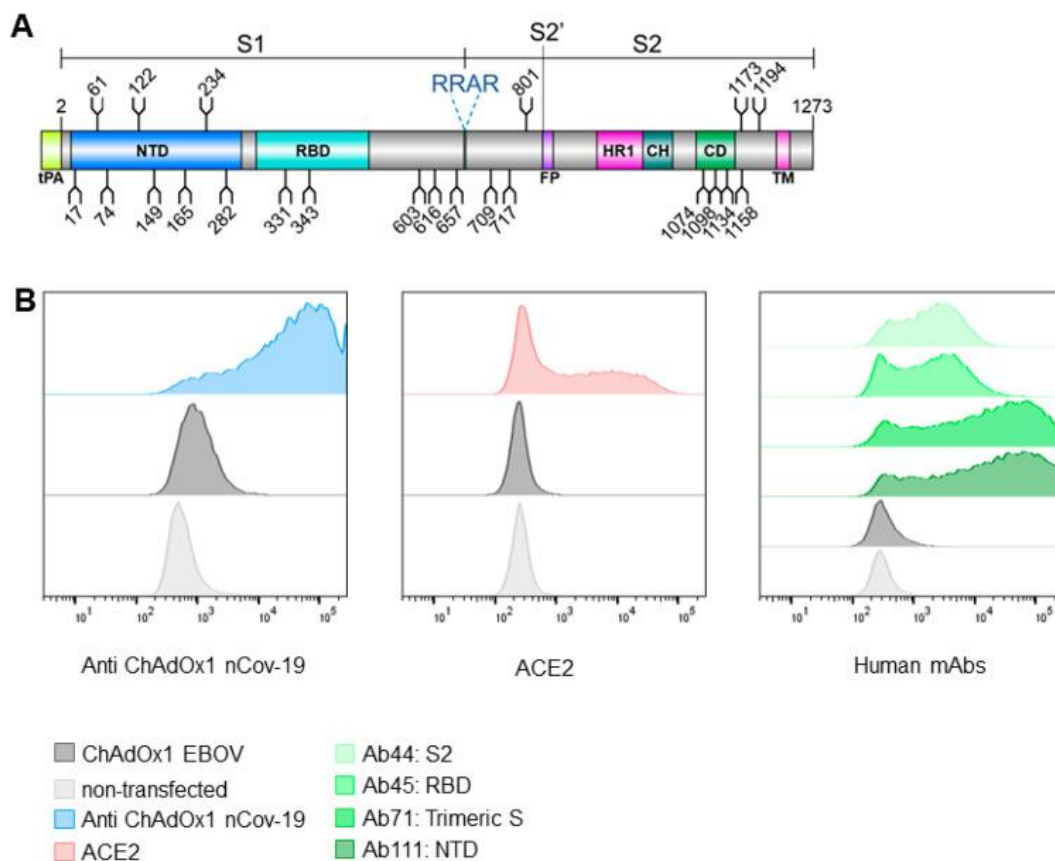
⁴⁷⁵ https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/997584/COVID-19_mRNA_Vaccine_BNT162b2_UKPAR___PFIZER_BIONTECH_ext_of_indication_11.6.2021.pdf

Vervaeke P, Borgos SE, Sanders NN, Combes F. Regulatory guidelines and preclinical tools to study the biodistribution of RNA therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev.* 2022;184:114236. doi:10.1016/j.addr.2022.114236 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8957368/>

Gli studi dettagliati sulla biodistribuzione, inclusa la farmacocinetica dei vari vaccini COVID, non sono stati condotti dai produttori di vaccini perché sono stati considerati "non richiesti" dalle autorità di regolamentazione, sulla base della premessa che i vaccini funzionano secondo una risposta immunologica, rispetto al classico approccio farmacologico. Tuttavia, tale esenzione può a malapena giustificare i vaccini convenzionali che incorporano il virus intero inattivato, il virione frazionato o i vaccini a sub-unità, che inducono direttamente una risposta immunitaria dopo l'iniezione. Al contrario, i moderni vaccini genetici funzionano sulla base della veicolazione del gene, pertanto una dettagliata biodistribuzione e valutazione farmacocinetica del prodotto formulato è fondamentale per comprendere il potenziale impatto della trasfezione del gene codificante per il vaccino in vari tessuti del corpo, oltre il sito di iniezione.⁴⁷⁶

Sequenza di ChAdOx1 nCoV-19

ChAdOx1 nCoV-19 codifica per una sequenza S di tipo selvaggio (wild type), compresi i domini transmembrana, che viene trasferita sulla superficie cellulare con una sequenza di segnalazione dell'attivatore del plasminogeno tissutale (tPA) (Figura A). Utilizzando la citometria a flusso, è stata riscontrata la presenza della glicoproteina S sulla superficie cellulare delle cellule HeLa S3 infettate da ChAdOx1 nCoV-19 (Figura B).



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8043200/>

ChAdOx1 nCoV-19 produce glicoproteina SARS-CoV-2 S associata alla membrana in conformazioni native in grado di legare il suo recettore ospite, ACE2.

(A) Rappresentazione schematica della proteina SARS-CoV-2 S codificata per il vaccino, che mostra la posizione dei sequoni di amminoacidi della glicosilazione N-linked (NXS/T, dove X ≠ P) come rami. I domini proteici sono illustrati: dominio N-terminale (NTD), dominio di legame del recettore (RBD), peptide di fusione (FP), ripetizione dell'eptade 1 (HR1), elica centrale (CH), dominio del connettore (CD) e dominio transmembrana (TM), con il segnale di secrezione di tPA aggiuntivo all'N-terminale. (B) Le cellule HeLa S3 sono state infettate con ChAdOx1 nCoV-19 e incubate con ACE2 ricombinante, anti-ChAdOx1 nCoV-19 (derivato da topi vaccinati) o un pannello di mAbs umani (Ab44, Ab45, Ab71 e Ab111, che riconoscono S2, RBD, trimerico S e NTD, rispettivamente) e confrontati con controlli non infetti, analizzati mediante citometria a flusso. (Sinistra). Viene tracciata la frequenza relativa delle cellule e

476 Watanabe Y, Mendonça L, Allen ER, et al. Native-like SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein Expressed by ChAdOx1 nCoV-19/AZD1222 Vaccine. ACS Cent Sci. 2021;7(4):594-602. doi:10.1021/acscentsci.1c00080

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8043200/>

la fluorescenza di AlexaFluor 488 associata al rilevamento di antispike. Sinistra, (blu) anti-ChAdOx1 nCoV-19; medio (rosso), ACE2; e destro (sfumature di verde) mAbs umani. Nelle cellule grigio scuro infettate con un vaccino ChAdOx1 irrilevante e nelle cellule grigio chiaro non infette vengono mostrati come controllo. Le repliche sperimentali sono state eseguite due volte e vengono mostrati dati rappresentativi.

I sieri di topi vaccinati con ChAdOx1 nCoV-19 sono stati utilizzati per rilevare il livello di espressione della spike sulla superficie cellulare, rivelando circa il 60-70% di tutte le cellule che esprimono la spike (intervallo di medie duplicate su tre ripetizioni sperimentali).

Come controllo negativo è stato utilizzato un vaccino ChAdOx1 che codifica per un antigene filovirus irrilevante (EBOV)⁴⁷⁷ che ha mostrato un basso livello di legame con il siero del vaccino anti-ChAdOx1 nCoV-19 (~0,5–2% di cellule in tutti gli esperimenti). Questa osservazione spiega la presenza degli anticorpi generati contro il vettore stesso piuttosto che l'antigene del vaccino. Successivamente, abbiamo cercato di esaminare le proprietà della proteina S espressa sulla superficie cellulare utilizzando ACE2 ricombinante e un pannello di mAb umani che si legano a regioni specifiche di S (Figura 1B). Il legame delle cellule infette all'ACE2 ricombinante conferma il corretto ripiegamento di S e la presentazione e la funzionalità nativa dell'RBD (Figura 1B). Questa osservazione è ulteriormente supportata dal legame dei mAbs umani, in particolare Ab45 che riconosce l'RBD, Ab71 che riconosce il picco trimetrico e Ab111 che riconosce l'NTD. Ab44 che riconosce S2 dimostra anche un forte legame. Questi dati confermano la presenza significativa del trimero di prefusione sulla superficie cellulare. In assenza di un anticorpo anti-S2 specifico per la postfusione, non siamo stati in grado di quantificare se sulla superficie cellulare è presente una spike di postfusione.

Produzione di ChAdOx1 nCoV-19

ChAdOx1 nCoV-19 è stato prodotto come descritto in precedenza.⁴⁷⁸ La proteina spike (S) di SARS-CoV-2 (numero di accesso Genbank YP_009724390.1) è stata ottimizzata per l'espressione in linee cellulari umane e sintetizzata da GeneArt Gene Synthesis (Thermo Fisher Scientific). La sequenza che codifica per gli amminoacidi 2–1273 è stata clonata in un plasmide navetta (shuttle) dopo la clonazione con InFusion (Clontech). Il plasmide navetta codifica per un promotore precoce immediato (IE CMV) del citomegalovirus umano modificato con siti dell'operatore della tetraciclina (TetO), un segnale di poliadenilazione dall'ormone della crescita bovino (BGH) e una sequenza di segnale tPA a monte del gene inserito.

Produzione di ChAdOx1 nCoV-19 Derivato da SARS-CoV-2 S ed Espressione e purificazione di SARS-CoV-2 ricombinante stabilizzato 2P S

Per la produzione sono state utilizzate cellule di rene embrionale umano 293 Freestyle (HEK293F), a una densità di 1×10^6 cellule/ml, infettate con ChAdOx1 nCoV-19 a un MOI di ~ 1 particelle virali per cellula.

La proteina SARS-CoV-2 S ricombinante stabilizzata con 2P è stata espressa come descritto in precedenza⁴⁷⁹.

⁴⁷⁷ Sebastian S, Flaxman A, Cha KM, et al. A

Multi-Filovirus Vaccine Candidate: Co-Expression of Ebola, Sudan, and Marburg Antigens in a Single Vector. *Vaccines (Basel)*. 2020;8(2):241. Published 2020 May 21. doi:10.3390/vaccines8020241
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7349952/>

⁴⁷⁸ van Doremalen N, et al

ChAdOx1 nCoV-19 vaccine prevents SARS-CoV-2 pneumonia in rhesus macaques.

Nature. 2020 Oct;586(7830):578-582. doi: 10.1038/s41586-020-2608-y. Epub 2020 Jul 30. Erratum in: *Nature*. 2021 Feb;590(7844):E24.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8436420/>

⁴⁷⁹ Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh CL, Abiona O, Graham BS, McLellan JS.

Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*. 2020 Mar 13;367(6483):1260-1263. doi: 10.1126/science.abb2507.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7164637/>

Watanabe Y, Allen JD, Wrapp D, McLellan JS, Crispin M.

Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike. *Science*. 2020;369(6501):330-333. doi:10.1126/science.abb9983
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7199903/>

In breve, il vettore di espressione contenente la proteina S stabilizzata con 2P è stato utilizzato per trasfettare transitoriamente le cellule FreeStyle293F. La proteina è stata poi purificata dal supernatante utilizzando la cromatografia di affinità al nichel prima della cromatografia di esclusione dimensionale.⁴⁸⁰

LIMITAZIONI DEI VETTORI VIRALI USATI PER I VACCINI CONTRO IL SARS-COV-2

I costi di sviluppo clinico nell'ordine di diverse centinaia di milioni di dollari sono comuni alla maggior parte dei vaccini profilattici e la produzione in GMP e i test di rilascio e l'approvazione normativa sono particolarmente onerosi per i prodotti con vettori virali. Inoltre, alcune limitazioni sono intrinsecamente legate agli approcci vaccinali con vettori adenovirali.

Come già discusso da pag. 30, dal punto di vista dell'immunogenicità e dell'efficacia, una limitazione dei sistemi di somministrazione del vaccino adenovirale consiste nell'interferenza derivante dalla cosiddetta "immunità anti-vettore" preesistente e indotta dalla vaccinazione.⁴⁸¹

I vettori AdHu5 sono destinati a incontrare problemi nei soggetti umani che, a differenza degli animali da esperimento, sono pre-esposti al virus AdHu5 e in molti casi, specialmente nei bambini e nei giovani adulti, ospitano ancora residui di virus di tipo selvatici nei loro tessuti linfatici, i quali attraverso una trascrizione limitata possono mantenere la risposta immunitaria adattativa contro gli antigeni dell'adenovirus a uno stato elevato di attivazione.⁴⁸²

L'immunità preesistente dovuta a infezioni naturali si traduce in titoli anticorpali sostenuti di neutralizzazione del virus, un handicap importante per l'uso efficace di sierotipi comuni di adenovirus, inclusi AdHu5 e AdHu2, come vettori per la terapia genica sostitutiva o di vaccini in una popolazione umana.

Gli anticorpi neutralizzanti anche se presenti a titoli moderati riducono l'assorbimento dei vettori adenovirali da parte delle cellule, comprese le cellule presentanti l'antigene⁴⁸³, e di conseguenza l'espressione del prodotto

⁴⁸⁰ <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acscentsci.1c00080>

⁴⁸¹ Alhashimi M, Elhashif A, Sayedahmed EE, Mittal SK.

Nonhuman Adenoviral Vector-Based Platforms and Their Utility in Designing Next Generation of Vaccines for Infectious Diseases.

Viruses. 2021;13(8):1493. Published 2021 Jul 29. doi:10.3390/v13081493

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8402644/>

Fausther-Bovendo H, Kobinger GP.

Pre-existing immunity against Ad vectors: humoral, cellular, and innate response, what's important?

Hum Vaccin Immunother. 2014;10(10):2875-2884. doi:10.4161/hv.29594

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5443060/>

McCoy K, Tatsis N, Koriath-Schmitz B, Lasaro MO, Hensley SE, Lin SW, Li Y, Giles-Davis W, Cun A, Zhou D, Xiang Z, Letvin NL, Ertl HC.

Effect of preexisting immunity to adenovirus human serotype 5 antigens on the immune responses of nonhuman primates to vaccine regimens based on human- or chimpanzee-derived adenovirus vectors.

J Virol. 2007 Jun;81(12):6594-604. doi: 10.1128/JVI.02497-06.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1900096/>

Krause A, Worgall S.

Delivery of antigens by viral vectors for vaccination.

Ther Deliv. 2011 Jan;2(1):51-70. doi: 10.4155/tde.10.84.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22833925/>

⁴⁸² Nia Tatsis, Hildegund C.J. Ertl,

Adenoviruses as vaccine vectors,

Molecular Therapy, Volume 10, Issue 4, 2004, Pages 616-629, ISSN 1525-0016, <https://doi.org/10.1016/j.yymthe.2004.07.013>.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1525001604013425>

⁴⁸³ Fitzgerald JC, Gao GP, Reyes-Sandoval A, Pavlakis GN, Xiang ZQ, Wlazlo AP, Giles-Davis W, Wilson JM, Ertl HC.

A simian replication-defective adenoviral recombinant vaccine to HIV-1 gag.

J Immunol. 2003 Feb 1;170(3):1416-22. doi: 10.4049/jimmunol.170.3.1416.

<https://www.jimmunol.org/content/170/3/1416.long>

transgenico, che a sua volta influisce sulla risposta immunitaria specifica del prodotto transgenico risultante, come è stato mostrato inizialmente negli animali da esperimento ⁴⁸⁴ e poi nell'uomo ⁴⁸⁵. Questo, in teoria, può essere superato aumentando la dose di vettore, un approccio limitato dalla tossicità del vettore.

I titoli anticorpali neutralizzanti per l'adenovirus variano enormemente tra gli individui, e in generale, sono più elevati nei bambini e nei giovani adulti e diminuiscono con l'età.

L'uso di comuni sierotipi umani di adenovirus per la vaccinazione richiederebbe il test preventivo di ciascun individuo per i titoli di anticorpi neutralizzanti e il successivo aggiustamento della dose di vaccino in base all'entità di tali titoli, altrimenti questo può comportare risposte immunitarie imprevedibili. L'elusione dell'impatto degli anticorpi neutralizzanti specifici per gli adenovirus è attualmente uno dei principali obiettivi scientifici dei vaccinologi dei vettori adenovirali.

Come già sottolineato, è improbabile che l'aumento della dose sia un'opzione realistica per l'uso nell'uomo a causa della tossicità associata.

Studi su primati non umani pre-esposti ad AdHu5 hanno mostrato che è necessario un aumento di 1000 volte della dose per ottenere una risposta delle cellule T CD8⁺ specifiche del prodotto transgenico paragonabili a quelle ottenute in animali che non erano stati pre-esposti ⁴⁸⁶. Altri sforzi si concentrano sulla combinazione dei vettori AdHu5 con altri vettori di vaccini in protocolli di vaccinazione primaria.

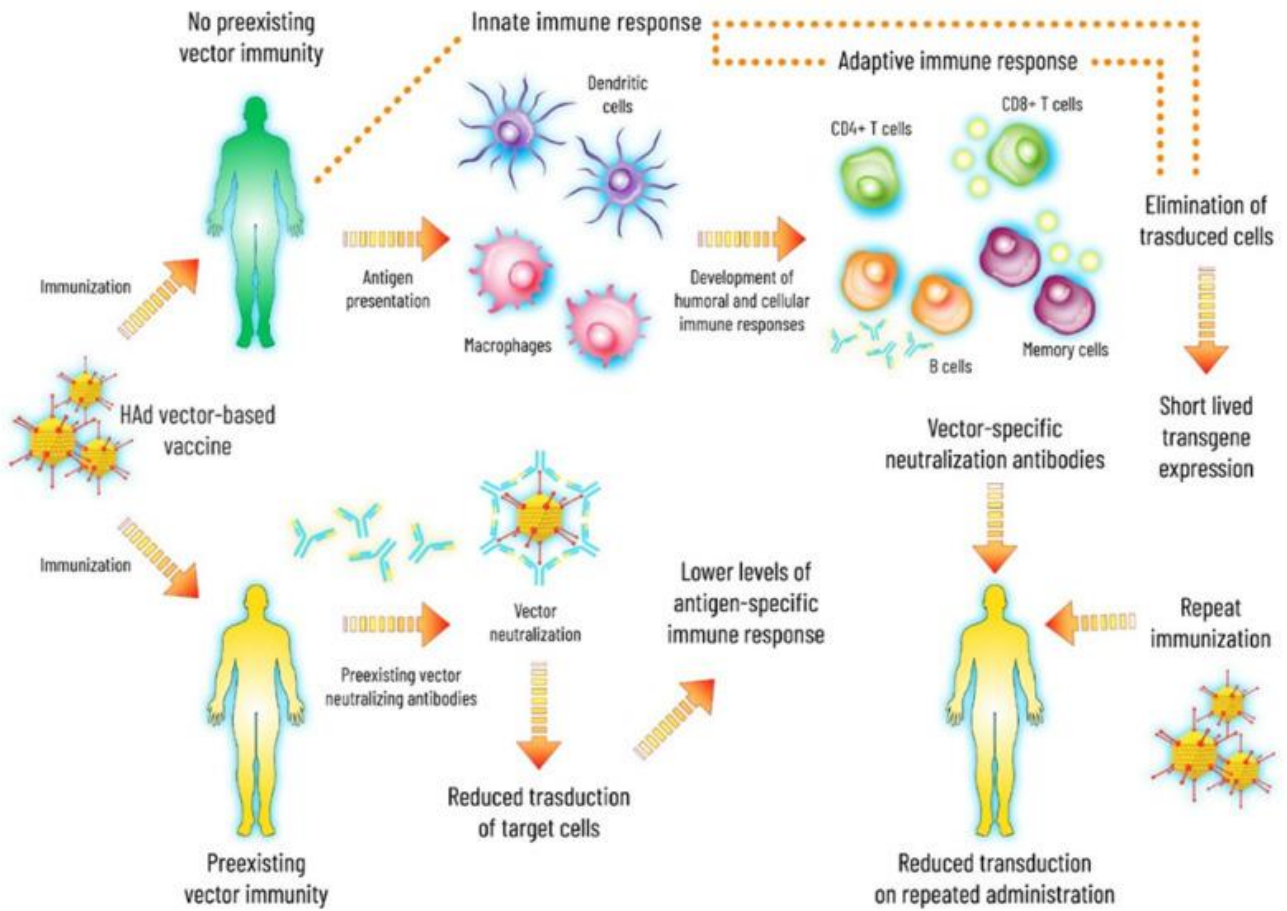
L'uso ripetuto di vettori AdHu5 è stato testato ⁴⁸⁷, ma in generale non offre un significativo effetto booster [di richiamo] a causa dell'induzione di anticorpi neutralizzanti l'adenovirus dopo la prima applicazione del vettore.

⁴⁸⁴ Xiang Z, Gao G, Reyes-Sandoval A, Cohen CJ, Li Y, Bergelson JM, Wilson JM, Ertl HC. Novel, chimpanzee serotype 68-based adenoviral vaccine carrier for induction of antibodies to a transgene product. *J Virol.* 2002 Mar;76(6):2667-75. doi: 10.1128/jvi.76.6.2667-2675.2002. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC135983/>

⁴⁸⁵ Guo J, Mondal M, Zhou D. Development of novel vaccine vectors: Chimpanzee adenoviral vectors. *Hum Vaccin Immunother.* 2018;14(7):1679-1685. doi:10.1080/21645515.2017.1419108 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6067905/>

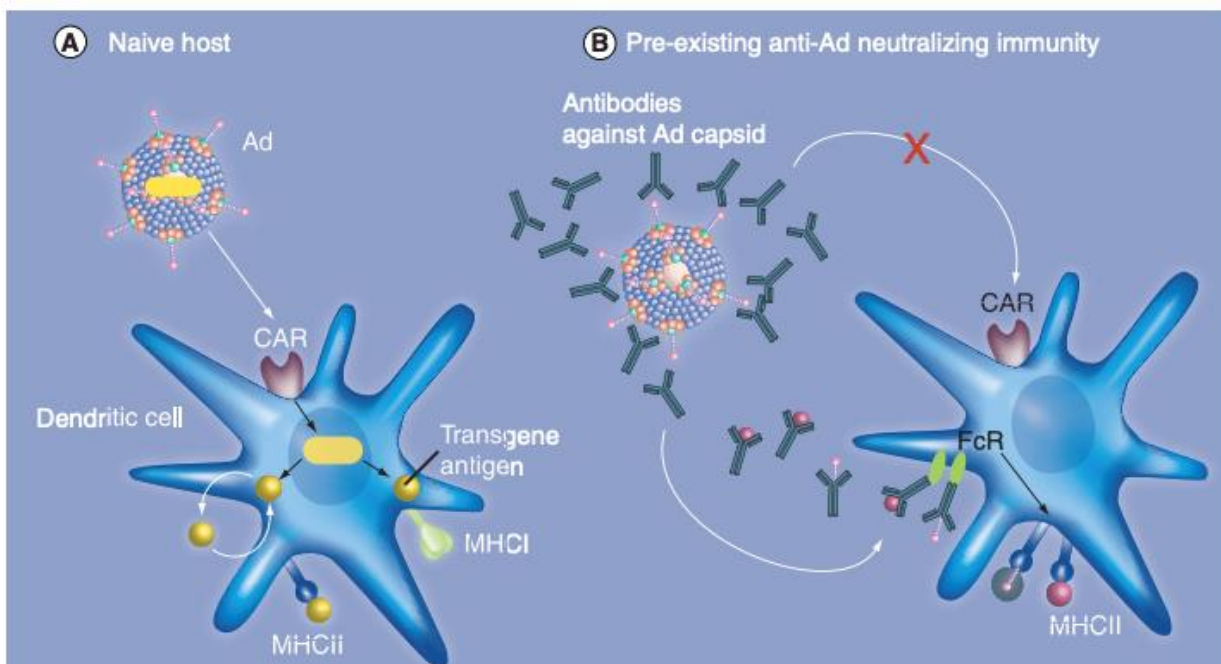
⁴⁸⁶ Casimiro DR et al. Comparative immunogenicity in rhesus monkeys of DNA plasmid, recombinant vaccinia virus, and replication-defective adenovirus vectors expressing a human immunodeficiency virus type 1 gag gene. *J Virol.* 2003 Jun;77(11):6305-13. doi: 10.1128/jvi.77.11.6305-6313.2003. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC154996/>

⁴⁸⁷ Casimiro DR et al. Vaccine-induced immunity in baboons by using DNA and replication-incompetent adenovirus type 5 vectors expressing a human immunodeficiency virus type 1 gag gene. *J Virol.* 2003 Jul;77(13):7663-8. doi: 10.1128/jvi.77.13.7663-7668.2003. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC164828/>



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8402644/>

Conseguenze dell'immunità del vettore di adenovirus (Ad) preesistente. L'immunità preesistente del vettore Ad inibisce la trasduzione iniziale con i vettori Ad e, quindi, impedisce il primo utilizzo di molti vettori Ad. Negli individui senza immunità Ad preesistente, il primo utilizzo del vettore Ad susciterebbe forti risposte immunitarie innate, cellulari e umorali. L'immunità cellulare specifica del vettore elimina quindi la maggior parte delle cellule trasdotte mentre l'immunità umorale specifica del vettore blocca la successiva infezione con lo stesso vettore Ad.



<https://www.future-science.com/doi/full/10.4155/tde.10.84>

Immunità anti-Ad prodotto transgenico con e senza immunità neutralizzante anti-Ad. **(A)** In un ospite naïve, Ad infetta la cellula bersaglio tramite il suo recettore (CAR). Il genoma Ad è espresso nel nucleo e il prodotto transgenico viene presentato tramite MHC I o dopo l'assorbimento da parte di (altre) cellule tramite MHC di classe II per generare l'immunità del prodotto transgene anti-Ad. **(B)** In presenza di anticorpi neutralizzanti anti-Ad, Ad non può infettare la cellula attraverso il suo recettore e il transgene non può essere espresso. L'immunità che viene generata o potenziata è contro i componenti del capsido degli Ad. Nel caso in cui sia incorporato un antigene in una proteina del capsido Ad, verrà generata anche l'immunità contro l'antigene nel capsido. Ad: Adenovirus; CAR: recettore di Cocksackie e adenovirus; FcR: recettore Fc

MECCANISMO D'AZIONE DEI VACCINI COVID-19 A VETTORE ADENOVIRALE

I vaccini a vettore adenovirale vengono iniettati per via intramuscolare nel muscolo deltoide dove infettano le cellule muscolari tramite endocitosi mediata da clatrina. I virioni fuoriescono dagli endosomi e vengono trasportati alla membrana nucleare dai microtubuli. Dopo l'aggancio a un complesso di pori nucleari, il DNA adenovirale viene rilasciato nel nucleo dove il gene della spike del SARS-CoV-2 viene trascritto nell'RNA messaggero (mRNA). L'mRNA viene trasportato nel citoplasma per essere tradotto dai ribosomi, producendo la proteina spike SARS-CoV-2. Le cellule muscolari intorno al sito di iniezione producono molte proteine spike, che possono essere rilevate dalle cellule immunitarie nel tessuto.

Nel sito di iniezione, la ferita da puntura e l'inoculazione di un bolo di liquido nel tessuto causano uno stress cellulare che avverte il sistema immunitario di un possibile problema. Inoltre, l'adenovirus stesso stimola una reazione infiammatoria che dà il via alla risposta immunitaria. Questa risposta infiammatoria e allo stress attira le cellule immunitarie nel muscolo, il che può portare a dolore, gonfiore e arrossamento del braccio nel sito di iniezione.

Le (APC) sono un tipo di cellula immunitaria che viene attratta nel sito. Il vaccino a vettore adenovirale può infettare le cellule presentanti l'antigene (APC) che vengono attratte nel sito d'iniezione e produrre proteine spike (come avviene nelle cellule muscolari) che stimolano i linfociti B e i linfociti T CD8. Le APC svolgono anche un altro ruolo fondamentale nell'avvio della risposta immunitaria in quanto raccolgono proteine extracellulari, cellule morte e detriti nel sito di iniezione. Distruggono le proteine, inclusa la proteina spike, e presentano frammenti peptidici ai linfociti T CD4. Inoltre, portano gli antigeni dal sito di iniezione ai linfonodi drenanti locali dove hanno una maggiore possibilità di incontrare cellule B, cellule T CD4 e cellule T CD8 con recettori in grado di riconoscere la proteina spike. Quando i linfociti antigene-specifici vengono attivati, subiscono la proliferazione e la differenziazione dalle cellule naïve alle cellule effettrici. La funzione principale dei linfociti B effettrici è quella di produrre anticorpi, che sono disponibili in diverse varietà e svolgono compiti distinti. Un'importante funzione degli anticorpi generati dopo la vaccinazione è la neutralizzazione (legando il virus e bloccando l'infezione delle cellule). I linfociti T CD4 effettrici sono in grado di svolgere un'ampia gamma di funzioni, dall'aiutare i linfociti B a produrre gli anticorpi più mirati al reprimere la risposta immunitaria. I linfociti T CD8 effettrici sono spesso conosciuti come linfociti T citotossici perché eliminano le cellule infette. Questa attività immunitaria può essere responsabile della reattogenicità sistemica ai vaccini con sintomi come febbre, affaticamento e dolori muscolari.

488

⁴⁸⁸ Hasanpourghadi M, Novikov M, Ertl HCJ.
COVID-19 Vaccines Based on Adenovirus Vectors.
Trends Biochem Sci. 2021;46(5):429-430. doi:10.1016/j.tibs.2021.03.002
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7955943/>

Coughlan L, Kremer EJ, Shayakhmetov DM.
Adenovirus-based vaccines-a platform for pandemic preparedness against emerging viral pathogens.
Mol Ther. 2022 Jan 31;S1525-0016(22)00034-X. doi: 10.1016/j.ymthe.2022.01.034.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8801892/>

Lundstrom K. Viral vector-based vaccines against SARS-CoV-2.
Explor Immunol. 2021;1:295-308. <https://doi.org/10.37349/ei.2021.00020>
<https://www.explorationpub.com/Journals/ei/Article/100320>

Daian E Silva DSO, da Fonseca FG.

The Rise of Vectored Vaccines: A Legacy of the COVID-19 Global Crisis.
Vaccines (Basel). 2021 Sep 29;9(10):1101. doi: 10.3390/vaccines9101101.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8538930/>

Kis Z, Tak K, Ibrahim D, Papathanasiou MM, Chachuat B, Shah N, Kontoravdi C.
Pandemic-response adenoviral vector and RNA vaccine manufacturing.
NPJ Vaccines. 2022 Mar 2;7(1):29. doi: 10.1038/s41541-022-00447-3.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8891260/>

Kennedy RB.
Efficacy of an adenovirus type 5 vectored SARS-CoV-2 vaccine.
Lancet. 2022 Jan 15;399(10321):212-213. doi: 10.1016/S0140-6736(21)02834-8.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8700275/>

Kennedy RB.
Efficacy of an adenovirus type 5 vectored SARS-CoV-2 vaccine.
Lancet. 2022 Jan 15;399(10321):212-213. doi: 10.1016/S0140-6736(21)02834-8.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8700275/>

<https://www.uptodate.com/contents/covid-19-vaccines>
<https://www.uptodate.com/contents/covid-19-adenovirus-vector-vaccines-united-states-and-canada-authorized-for-use-drug-information>

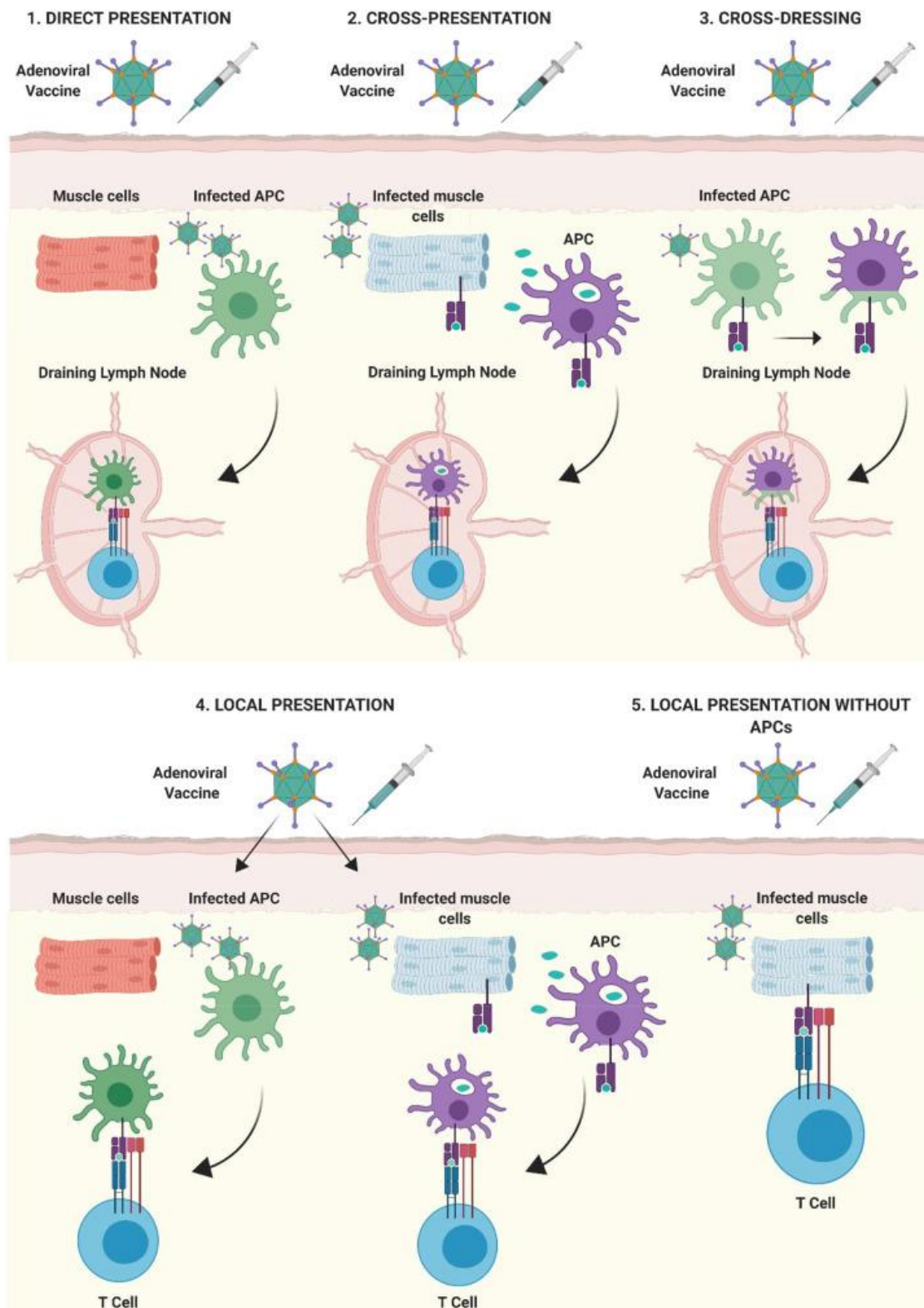
Lundstrom K.
Viral Vectors for COVID-19 Vaccine Development.
Viruses. 2021 Feb 19;13(2):317. doi: 10.3390/v13020317.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7922679/>

<https://www.ebsco.com/blogs/health-notes/adenovirus-vectored-vaccines-covid-19-how-do-they-work>

Jacob-Dolan C, Barouch DH.
COVID-19 Vaccines: Adenoviral Vectors.
Annu Rev Med. 2022 Jan 27;73:41-54. doi: 10.1146/annurev-med-012621-102252.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34609905/>

Farhang-Sardroodi S, Korosec CS, Gholami S, et al.
Analysis of Host Immunological Response of Adenovirus-Based COVID-19 Vaccines.
Vaccines (Basel). 2021;9(8):861. Published 2021 Aug 4. doi:10.3390/vaccines9080861
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8402548/>

Coughlan L.
Factors Which Contribute to the Immunogenicity of Non-replicating Adenoviral Vectored Vaccines.
Front Immunol. 2020 May 19;11:909. doi: 10.3389/fimmu.2020.00909.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7248264/>



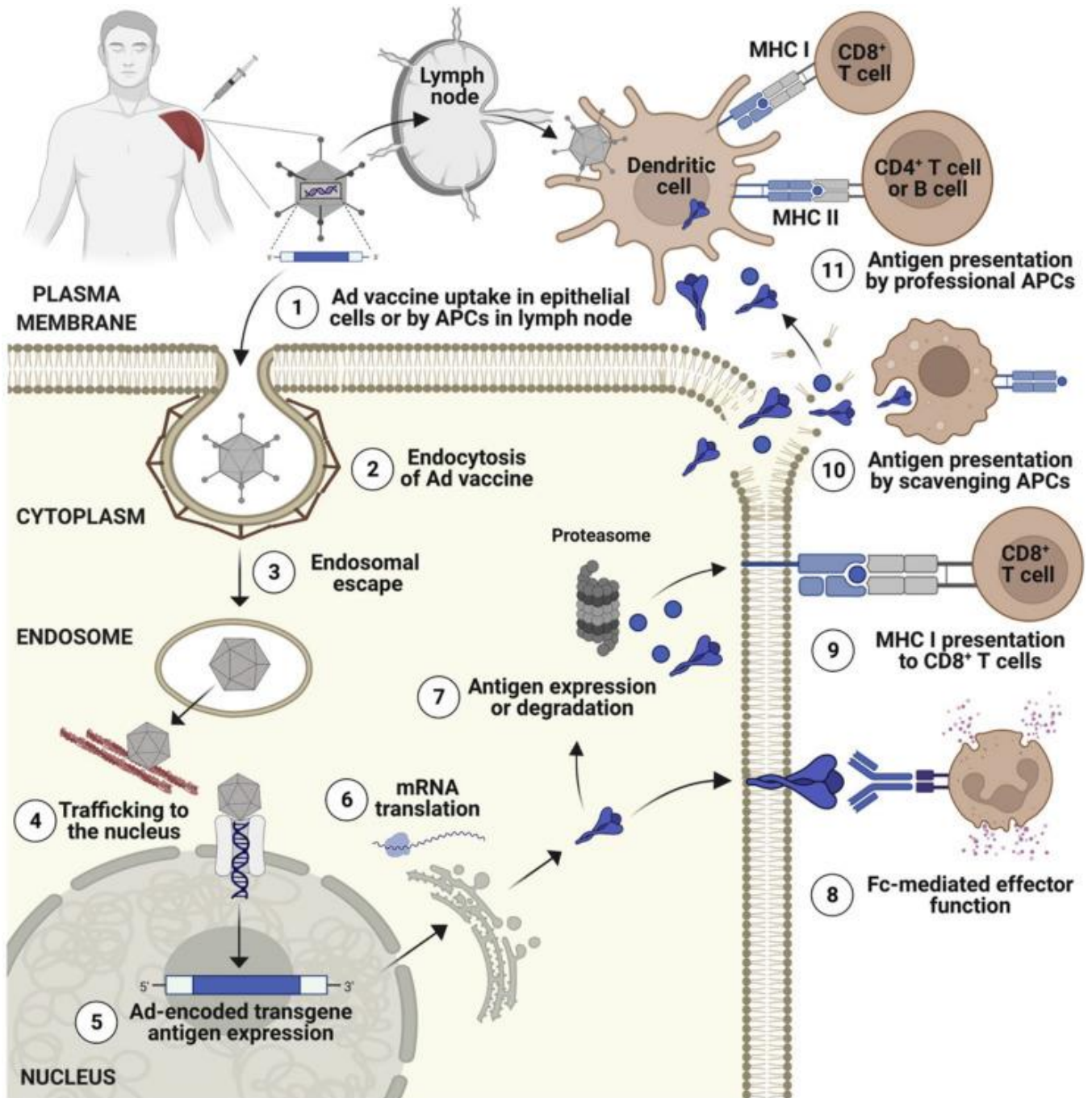
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7248264/>

Meccanismi di presentazione dell'antigene dopo immunizzazione intramuscolare con vaccini vettori adenovirali.

(1) Presentazione diretta: il vaccino adenovirale trasduce le APC nel sito di iniezione. Le APC migrano verso i linfonodi drenanti (dLN) dove presentano l'antigene del vaccino trasformato ai linfociti T.

(2) Presentazione incrociata: i detriti dell'antigene del vaccino dalle cellule trasdotte con il vaccino Ad vengono fagocitati da APC professionali nel sito di iniezione, trasferiti ai dLN dagli APC e presentati ai linfociti.

- (3) **Cross-dressing:** i complessi MHC-Peptide sulle APC trasdotte dal vettore Ad possono essere trasferiti ad APC naïve mediante un processo di “rosicchiamento” della membrana chiamato trogocitosi.
- (4) Le APC presenti o infiltrate nel sito di iniezione possono presentare l'antigene direttamente ai linfociti T.
- (5) APC non professionali come le cellule parenchimali nel sito di iniezione (cellule muscolari mostrate come esempio) possono presentare il peptide antigenico su MHC I a linfociti T CD8⁺ infiltranti, al di fuori degli organi linfoidi secondari.



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8801892/>

Diagramma schematico che delinea i meccanismi di presentazione dell'antigene utilizzati dai vaccini a base di vettori adenovirali:

- (1) Il vaccino a vettore adenovirale viene assorbito dalle cellule muscolari o dalle cellule presentanti l'antigene (APC) nel sito di iniezione o in seguito al traffico verso i linfonodi drenanti (dLN).
- (2) Nelle cellule parenchimali (cioè nei muscoli), l'assorbimento può essere mediato dall'endocitosi.
- (3) Il vaccino adenovirale fuoriesce dall'endosoma.
- (4) Il traffico dei capsidi Ad parzialmente smontati verso il nucleo utilizzando la rete di microtubuli.

- (5) Una volta nel nucleo, viene trascritto l'antigene transgene del vaccino codificato.
- (6) L'mRNA corrispondente all'antigene transgene codificato viene esportato nel citoplasma e tradotto in proteine. (7) L'antigene viene espresso e alcuni antigeni vengono degradati dal proteasoma.
- (8) A seconda del disegno dell'antigene, le glicoproteine che normalmente transitano sulla membrana plasmatica seguiranno questo percorso e possono essere potenzialmente riconosciute da Abs, comprese quelle capaci di funzione effettrice mediata da Fc.
- (9) L'antigene peptidico degradato può essere caricato su MHC di classe I per la presentazione diretta ai linfociti T CD8⁺.
- (10) Gli antigeni secreti possono essere rilasciati nello spazio extracellulare o l'apoptosi delle cellule che esprimono transgene può anche facilitare il rilascio dell'antigene. L'antigene extracellulare (esogeno) può essere eliminato dai macrofagi o da altre APC nel sito di iniezione.
- (11) I frammenti di antigene che arrivano nel dLN vengono fagocitati da APC e peptidi professionali elaborati e presentati ai linfociti T tramite appropriate molecole MHC.

Come già discusso, i vettori adenovirali inducono l'immunità adattativa dell'ospite.⁴⁸⁹ La risposta immunitaria antivirale dominante Th1 si verifica 5-7 giorni dopo la trasduzione ed è diretta contro l'espressione residua dei geni virali che sono ancora presenti nei vettori adenovirali ricombinanti di prima generazione.⁴⁹⁰ Lo sviluppo di nuove generazioni di Ad-vettori deleti del genoma virale ha ridotto la risposta immunitaria cellulo-mediata e migliorato la durata dell'espressione genica in vivo.⁴⁹¹

I vettori adenovirali, oltre a indurre l'immunità antivirale adattativa, attivano il braccio innato del sistema immunitario.⁴⁹²

⁴⁸⁹ Yang Y, Nunes FA, Berencsi K, Furth EE, Gönczöl E, Wilson JM.
Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 May 10;91(10):4407-11. doi: 10.1073/pnas.91.10.4407.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC43794/>

Liu Q, Muruve DA.
Molecular basis of the inflammatory response to adenovirus vectors.
Gene Ther. 2003 Jun;10(11):935-40. doi: 10.1038/sj.gt.3302036.
<https://www.nature.com/articles/3302036>

Holst, Peter, Thomsen, Allan.
"Harnessing the Potential of Adenovirus Vectors" In Viral Gene Therapy,
edited by Ke Xu. London: IntechOpen, 2011. 10.5772/22821
<https://www.intechopen.com/chapters/16782>

⁴⁹⁰ Yang Y, Ertl HC, Wilson JM.
MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes to viral antigens destroy hepatocytes in mice infected with E1-deleted recombinant adenoviruses.
Immunity. 1994 Aug;1(5):433-42. doi: 10.1016/1074-7613(94)90074-4.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7533647/>

⁴⁹¹ Parks RJ, Chen L, Anton M, Sankar U, Rudnicki MA, Graham FL.
A helper-dependent adenovirus vector system: removal of helper virus by Cre-mediated excision of the viral packaging signal.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Nov 26;93(24):13565-70. doi: 10.1073/pnas.93.24.13565.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC19345/>

Lieber A, He CY, Kirillova I, Kay MA.
Recombinant adenoviruses with large deletions generated by Cre-mediated excision exhibit different biological properties compared with first-generation vectors in vitro and in vivo.
J Virol. 1996 Dec;70(12):8944-60. doi: 10.1128/JVI.70.12.8944-8960.1996.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC190992/>

⁴⁹² Muruve DA, Barnes MJ, Stillman IE, Libermann TA.
Adenoviral gene therapy leads to rapid induction of multiple chemokines and acute neutrophil-dependent hepatic injury in vivo.
Hum Gene Ther. 1999 Apr 10;10(6):965-76. doi: 10.1089/10430349950018364.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10223730/>

McCoy RD, Davidson BL, Roessler BJ, Huffnagle GB, Janich SL, Laing TJ, Simon RH.
Pulmonary inflammation induced by incomplete or inactivated adenoviral particles.
Hum Gene Ther. 1995 Dec;6(12):1553-60. doi: 10.1089/hum.1995.6.12-1553.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8664380/>

Schnell MA, Zhang Y, Tazelaar J, Gao GP, Yu QC, Qian R, Chen SJ, Varnavski AN, LeClair C, Raper SE, Wilson JM.
Activation of innate immunity in nonhuman primates following intraportal administration of adenoviral vectors.
Mol Ther. 2001 May;3(5 Pt 1):708-22. doi: 10.1006/mthe.2001.0330.
<https://doi.org/10.1006/mthe.2001.0330>

L'infiammazione acuta innescata dai vettori Ad ha un impatto sull'efficienza del trasferimento genico e causa una morbilità significativa negli ospiti trasdotti,⁴⁹³ in particolare porta alla sindrome da tempesta di citochine, coagulazione intravascolare disseminata, trombocitopenia ed epatotossicità.⁴⁹⁴

Vari studi hanno caratterizzato la risposta innata ai vettori adenovirali in vivo. Contrariamente alla risposta adattativa, la risposta innata è dose-dipendente, si verifica entro 24 h dalla trasduzione, è indipendente dalla trascrizione virale o transgenica,⁴⁹⁵ ed è associata a una rapida clearance della dose di vettore (>80%) nelle prime 24 h.⁴⁹⁶ Istologicamente, i tessuti trasdotti dal vettore Ad contengono infiltrati infiammatori costituiti da neutrofili CD11b⁺, cellule natural killer e macrofagi.⁴⁹⁷

Nel fegato, i macrofagi residenti (cellule di Kupffer) assorbono efficacemente i vettori e rilasciano citochine e chemochine proinfiammatorie come il fattore di necrosi tumorale-alfa (TNF- α), IP-10 e RANTES.⁴⁹⁸

Un gran numero di studi sulle interazioni HAdv (vettore adenovirale)-ospite in un sistema murino è stato condotto somministrando elevate quantità di HAdv purificati nel flusso sanguigno.

Utilizzando vettori HAdv-C5, Alemany et al.⁴⁹⁹ hanno mostrato che l'emivita delle particelle virali nel sangue è

Otake K, Ennist DL, Harrod K, Trapnell BC.

Nonspecific inflammation inhibits adenovirus-mediated pulmonary gene transfer and expression independent of specific acquired immune responses. *Hum Gene Ther.* 1998 Oct 10;9(15):2207-22. doi: 10.1089/hum.1998.9.15-2207. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9794205/>

Zsengellér Z, Otake K, Hossain SA, Berclaz PY, Trapnell BC.

Internalization of adenovirus by alveolar macrophages initiates early proinflammatory signaling during acute respiratory tract infection. *J Virol.* 2000 Oct;74(20):9655-67. doi: 10.1128/jvi.74.20.9655-9667.2000. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC112398/>

⁴⁹³ Marshall E. Gene therapy's web of corporate connections.

Science. 2000 May 12;288(5468):954-5. doi: 10.1126/science.288.5468.954. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10841712/>

⁴⁹⁴ Atasheva S, Yao J, Shayakhmetov DM.

Innate immunity to adenovirus: lessons from mice. *FEBS Lett.* 2019 Dec;593(24):3461-3483. doi: 10.1002/1873-3468.13696. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6928416/>

⁴⁹⁵ Zhang Y, Chirmule N, Gao GP, Qian R, Croyle M, Joshi B, Tazelaar J, Wilson JM.

Acute cytokine response to systemic adenoviral vectors in mice is mediated by dendritic cells and macrophages. *Mol Ther.* 2001 May;3(5 Pt 1):697-707. doi: 10.1006/mthe.2001.0329. [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1525-0016\(01\)90329-6](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1525-0016(01)90329-6)

Muruve DA, Barnes MJ, Stillman IE, Libermann TA.

Adenoviral gene therapy leads to rapid induction of multiple chemokines and acute neutrophil-dependent hepatic injury in vivo. *Hum Gene Ther.* 1999 Apr 10;10(6):965-76. doi: 10.1089/10430349950018364. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10223730/>

⁴⁹⁶ Worgall S, Wolff G, Falck-Pedersen E, Crystal RG.

Innate immune mechanisms dominate elimination of adenoviral vectors following in vivo administration. *Hum Gene Ther.* 1997 Jan 1;8(1):37-44. doi: 10.1089/hum.1997.8.1-37. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8989993/>

⁴⁹⁷ McCoy RD, Davidson BL, Roessler BJ, Huffnagle GB, Janich SL, Laing TJ, Simon RH.

Pulmonary inflammation induced by incomplete or inactivated adenoviral particles. *Hum Gene Ther.* 1995 Dec;6(12):1553-60. doi: 10.1089/hum.1995.6.12-1553. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8664380/>

Muruve DA, Barnes MJ, Stillman IE, Libermann TA.

Adenoviral gene therapy leads to rapid induction of multiple chemokines and acute neutrophil-dependent hepatic injury in vivo. *Hum Gene Ther.* 1999 Apr 10;10(6):965-76. doi: 10.1089/10430349950018364. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10223730/>

⁴⁹⁸ Otake K, Ennist DL, Harrod K, Trapnell BC.

Nonspecific inflammation inhibits adenovirus-mediated pulmonary gene transfer and expression independent of specific acquired immune responses. *Hum Gene Ther.* 1998 Oct 10;9(15):2207-22. doi: 10.1089/hum.1998.9.15-2207. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9794205/>

⁴⁹⁹ Alemany R, Suzuki K, Curiel DT.

< 2 min, con eliminazione quasi completa di HAdV-C5 dal sangue entro 30 min dalla somministrazione del virus. Tale rapida eliminazione del virus ha suggerito l'esistenza di meccanismi altamente efficienti di rimozione e studi successivi hanno effettivamente confermato che meccanismi multipli operano in modo ridondante e sinergico per garantire una rimozione quantitativa e rapida di HAdV-C5 dal flusso sanguigno.⁵⁰⁰ Dopo la somministrazione intravascolare, i fattori umorali si legano alle particelle HAdV-C5 e possono mediare l'intrappolamento del vettore nei macrofagi residenti nei tessuti⁵⁰¹ e negli epatociti⁵⁰² attraverso un meccanismo a "ponte".⁵⁰³ Inoltre, le particelle dei vettori adenovirali possono essere sequestrate nelle piastrine, nei macrofagi tissutali e nelle cellule endoteliali sinusoidali nel fegato e nella milza⁵⁰⁴ attraverso il legame diretto ai recettori della superficie cellulare.

Blood clearance rates of adenovirus type 5 in mice.
J Gen Virol. 2000 Nov;81(Pt 11):2605-2609. doi: 10.1099/0022-1317-81-11-2605.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11038370/>

⁵⁰⁰ Di Paolo NC, van Rooijen N, Shayakhmetov DM.
Redundant and synergistic mechanisms control the sequestration of blood-born adenovirus in the liver.
Mol Ther. 2009 Apr;17(4):675-84. doi: 10.1038/mt.2008.307.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2835106/>

Di Paolo NC, Shayakhmetov DM.
Adenovirus de-targeting from the liver.
Curr Opin Mol Ther. 2009 Oct;11(5):523-31.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19806500/>

⁵⁰¹ Xu Z, Tian J, Smith JS, Byrnes AP.
Clearance of adenovirus by Kupffer cells is mediated by scavenger receptors, natural antibodies, and complement.
J Virol. 2008 Dec;82(23):11705-13. doi: 10.1128/JVI.01320-08.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2583672/>

Khare R, Hillestad ML, Xu Z, Byrnes AP, Barry MA.
Circulating antibodies and macrophages as modulators of adenovirus pharmacology.
J Virol. 2013 Apr;87(7):3678-86. doi: 10.1128/JVI.01392-12.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624219/>

⁵⁰² Shayakhmetov DM, Gaggar A, Ni S, Li ZY, Lieber A.
Adenovirus binding to blood factors results in liver cell infection and hepatotoxicity.
J Virol. 2005 Jun;79(12):7478-91. doi: 10.1128/JVI.79.12.7478-7491.2005.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1143681/>

⁵⁰³ Kalyuzhniy O, Di Paolo NC, Silvestry M, Hofherr SE, Barry MA, Stewart PL, Shayakhmetov DM.
Adenovirus serotype 5 hexon is critical for virus infection of hepatocytes in vivo.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Apr 8;105(14):5483-8. doi: 10.1073/pnas.0711757105.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2291105/>

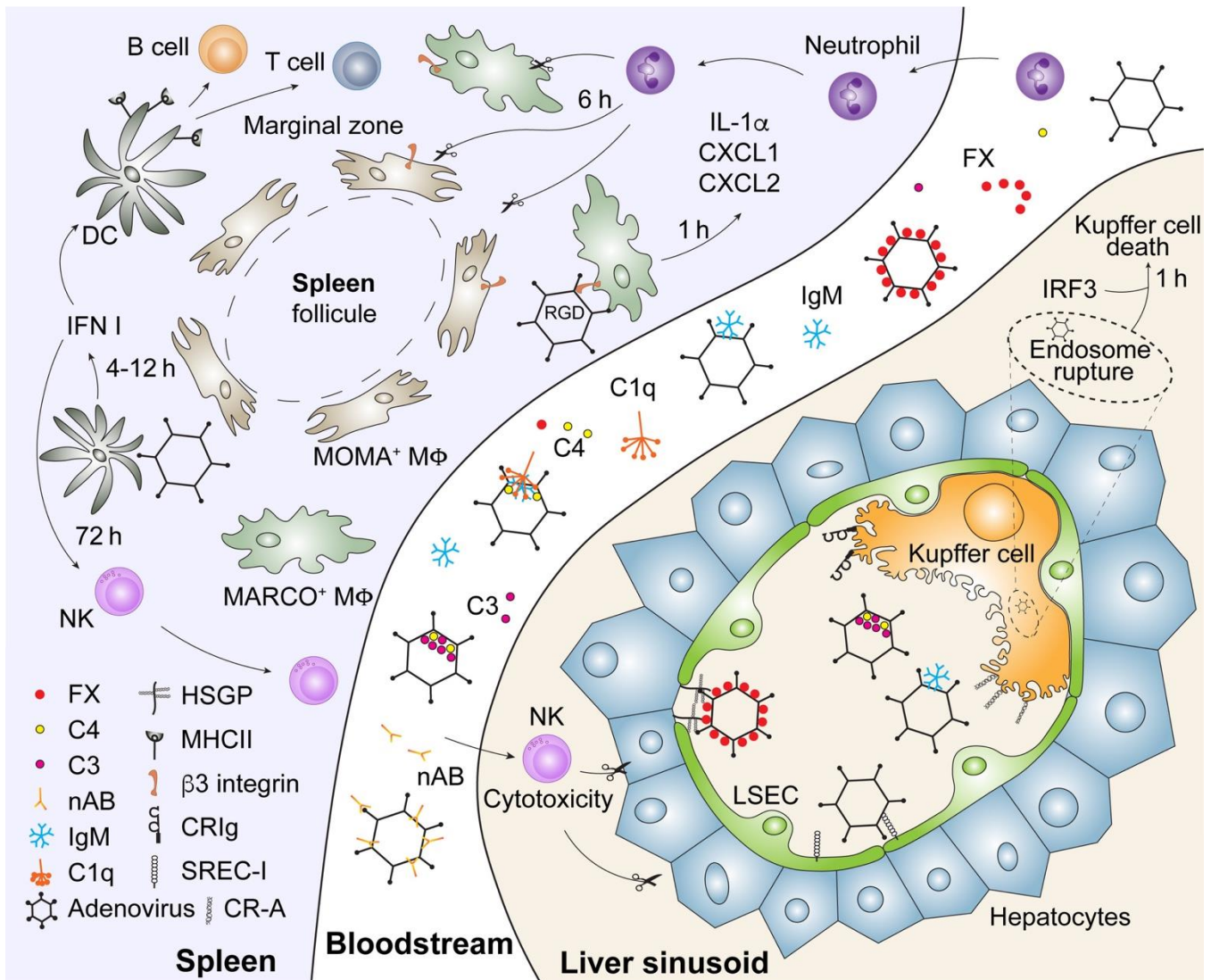
Waddington SN et al
Adenovirus serotype 5 hexon mediates liver gene transfer.
Cell. 2008 Feb 8;132(3):397-409. doi: 10.1016/j.cell.2008.01.016.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.016>

Baker AH, Mcvey JH, Waddington SN, Di Paolo NC, Shayakhmetov DM.
The influence of blood on in vivo adenovirus bio-distribution and transduction.
Mol Ther. 2007 Aug;15(8):1410-6. doi: 10.1038/sj.mt.6300206.
<https://doi.org/10.1038/sj.mt.6300206>

⁵⁰⁴ Liu Q, Zaiss AK, Colarusso P, Patel K, Haljan G, Wickham TJ, Muruve DA.
The role of capsid-endothelial interactions in the innate immune response to adenovirus vectors.
Hum Gene Ther. 2003 May 1;14(7):627-43. doi: 10.1089/104303403321618146.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12804145/>

Bradshaw AC, Coughlan L, Miller AM, Alba R, van Rooijen N, Nicklin SA, Baker AH.
Biodistribution and inflammatory profiles of novel penton and hexon double-mutant serotype 5 adenoviruses.
J Control Release. 2012 Dec 28;164(3):394-402. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.05.025.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3520007/>

Stone D, Liu Y, Shayakhmetov D, Li ZY, Ni S, Lieber A.
Adenovirus-platelet interaction in blood causes virus sequestration to the reticuloendothelial system of the liver.



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6928416/>

Componenti umorali e cellulari del sistema immunitario innato che orchestrano la risposta acuta al vettore adenovirale dopo la somministrazione per via endovenosa. Sono illustrati i ruoli individuali dei fattori del sangue e dei tipi cellulari nel mediare la rimozione di HAdV dal flusso sanguigno e i loro recettori e molecole effettrici corrispondenti, discussi in dettaglio nel testo della review.

VALUTAZIONE DEL RISCHIO AMBIENTALE DEI VACCINI A VETTORE ADENOVIRALE CONTRO SARS-COV-2

J Virol. 2007 May;81(9):4866-71. doi: 10.1128/JVI.02819-06.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1900148/>

Othman M, Labelle A, Mazzetti I, Elbatarny HS, Lillicrap D.
Adenovirus-induced thrombocytopenia: the role of von Willebrand factor and P-selectin in mediating accelerated platelet clearance.
Blood. 2007 Apr 1;109(7):2832-9. doi: 10.1182/blood-2006-06-032524
<https://doi.org/10.1182/blood-2006-06-032524>

L'impatto sull'ecosistema della presenza della spike virale o vaccinale, vista l'ampia diffusione del virus e della campagna vaccinale che vede ad oggi rispettivamente circa 500 milioni di casi d'infezione e circa 12 miliardi di dosi somministrate⁵⁰⁵, è un aspetto che non è stato affrontato con la doverosa preoccupazione da parte delle agenzie regolatorie e dai produttori, con una grave violazione del principio di precauzione per la salute umana e ambientale.

Questa preoccupazione è stata motivata in vari studi scientifici che saranno discussi qui di seguito. In particolare, si riporta sotto un estratto dell'articolo "*Environmental Risk Assessment of Recombinant Viral Vector Vaccines against SARS-Cov-2*".⁵⁰⁶

Nella UE, lo svolgimento delle sperimentazioni cliniche con i vaccini e la loro approvazione all'immissione in commercio devono essere conformi rispettivamente alle disposizioni della direttiva 2001/20/CE⁵⁰⁷ e del regolamento (CE) n. 726/2004⁵⁰⁸.

L'obiettivo principale di queste normative è garantire che i vaccini soddisfino i requisiti pertinenti in merito alla loro efficacia e sicurezza per i soggetti umani coinvolti e al loro controllo di qualità. I vaccini basati su vettori virali ricombinanti sono soggetti a requisiti normativi aggiuntivi, poiché sono considerati organismi geneticamente modificati (OGM).

Alcuni di questi requisiti, che hanno la loro base giuridica nella Direttiva 2001/18/CE⁵⁰⁹, mirano a valutare gli aspetti relativi ai potenziali rischi per la salute umana e l'ambiente, inclusi animali, piante e microrganismi, attraverso la "valutazione del rischio ambientale (ERA)".

Una ERA consiste nell'identificazione e caratterizzazione dei potenziali rischi associati all'OGM (in questo caso il vaccino a vettore virale ricombinante) per la salute umana (con particolare attenzione a individui diversi dai pazienti o vaccinati) e per l'ambiente in generale, compresi animali, piante e microorganismi, nonché una stima della loro probabilità di accadimento nelle condizioni d'uso. Il rischio per la salute umana e per l'ambiente rappresentato da ciascun pericolo identificato dell'OGM è stimato combinando la probabilità che si verifichi e l'entità delle sue conseguenze. Un rischio complessivo viene quindi determinato combinando tutti i rischi individuali⁵¹⁰.

⁵⁰⁵ <https://covid19.who.int/> Overview 29 aprile 2022

⁵⁰⁶ Baldo A, Leunda A, Willemarck N, Pauwels K. Environmental Risk Assessment of Recombinant Viral Vector Vaccines against SARS-Cov-2. *Vaccines (Basel)*. 2021 May 3;9(5):453. doi: 10.3390/vaccines9050453. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8147846/>

⁵⁰⁷ Directive 2001/20/EC of the European Parliament and of the Council of 4 April 2001 on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the member states relating to the implementation of good clinical practice in the conduct of clinical trials on medicinal products for human use. *Med Etika Bioet*. 2002 Spring-Summer;9(1-2):12-9. PMID: 16276663. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16276663/>

⁵⁰⁸ European Commission. "Regulation (EC) No. 726/2004 of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 laying down Community procedures for the authorisation and supervision of medicinal products for human and veterinary use and establishing a European Medicines Agency." *Off J Eur Union* 50.March 2004 (2004): 1-32. https://ec.europa.eu/health/system/files/2016-11/reg_2004_726_en_0.pdf

⁵⁰⁹ Directive, E. C. "18/EC of the European Parliament and of the Council of 12 March 2001 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing Council Directive 90/220/EEC." *Official Journal of the European Communities* 106 (2001): 1-39. <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2001L0018:20080321:EN:PDF>

⁵¹⁰ Committee for the Medicinal Product for Human Use (CHMP) Guideline on Scientific Requirements for the Environmental Risk Assessment of Gene Therapy Medicinal Products. EMA 2008. [(accessed on 26 March 2021)]; Available online: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-scientific-requirements-environmental-risk-assessment-gene-therapy-medicinal-products_en.pdf.

Baldo A, van den Akker E, Bergmans HE, Lim F, Pauwels K. General considerations on the biosafety of virus-derived vectors used in gene therapy and vaccination. *Curr Gene Ther*. 2013;13(6):385-394. doi:10.2174/15665232113136660005 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3905712/>

La ERA si basa sulla metodologia del peso dell'evidenza, che comprende considerazioni sia qualitative che quantitative⁵¹¹, descritto utilizzando termini qualitativi che vanno da alto, moderato, basso a trascurabile.⁵¹²

Dopo la determinazione generale del rischio, si esamina se è necessario attuare misure di gestione del rischio al fine di ridurre al minimo la probabilità che si verifichino effetti avversi. Se non sono stati identificati effetti avversi, non sono necessarie strategie di gestione del rischio.

Inoltre, è importante notare che L'ERA è condotta caso per caso: quando viene utilizzato un vettore virale ricombinante, l'ERA dovrebbe tenere conto delle caratteristiche dello scheletro [backbone] del vettore virale e delle proprietà della sequenza o delle sequenze geniche inserite e del prodotto o dei prodotti genici.

I potenziali effetti dannosi variano a seconda dello scheletro del vettore virale. Dovrebbero essere affrontati aspetti come la tipologia dell'ospite, il tropismo tissutale, il potenziale di mutagenesi inserzionale nel genoma dell'ospite, il riassortimento, la riconversione in virulenza o patogenicità mediante eventi di complementazione tra il vettore virale e i virus complementari circolanti, nonché gli eventi di ricombinazione che possono dare origine a nuovi e virus non caratterizzati con patogenicità riacquistata o cambiamento nel tropismo tissutale e nell'area dell'ospite.

La tabella seguente fornisce un riassunto conciso di come l'ERA potrebbe essere applicata ai vaccini basati su vettori virali contro SARS-CoV-2.

<p>Elements of the ERA to be considered related to the backbone</p>	<p>Intrinsic hazardous properties (e.g., pathogenicity, toxic, allergenic and oncogenic properties, e.g., risk of genomic insertions with transformative changes)</p> <p>Reconversion abilities to wild-type features, including the likelihood of recombination, reassortment, reconversion or complementation events between the viral vector and circulating complementing viruses to an uncharacterized virus variant with reacquired pathogenicity or change in tissue tropism and host range</p> <p>Dissemination abilities, due to exposure events (during production, administration), shedding, biodistribution (leading to possible vertical transmission, vector-borne transmission)</p>
<p>Elements of the ERA to be considered related to the exogenous inserted gene sequences and its product</p>	<p>Intrinsic hazardous properties (e.g., toxic, allergenic, oncogenic properties)</p> <p>Impact on host range, cellular or tissue tropism (biodistribution), shedding, especially when changes on the surface of the virion are expected due to the genetic modification(s)</p> <p>Impact on replication efficiency</p> <p>Probability of recombination due to homology with e.g., circulating coronaviruses</p>

⁵¹¹ Linkov I, Loney D, Cormier S, Satterstrom FK, Bridges T.

Weight-of-evidence evaluation in environmental assessment: review of qualitative and quantitative approaches.

Sci Total Environ. 2009 Sep 15;407(19):5199-205. doi: 10.1016/j.scitotenv.2009.05.004.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19619890/>

⁵¹² EC. "Commission Decision (2002/623/EC) of 24 July 2002 establishing guidance notes supplementing Annex II to Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing Council Directive 90/220/EEC." *Official Journal of the European Communities L 200* (2002): 22-33.

<https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/21e969dd-15b9-4f7e-83f0-b6a5a6687c20>

Nell'ambito della valutazione della probabilità di insorgenza di potenziali effetti avversi identificati, devono essere prese in considerazione le vie di esposizione attraverso le quali il vettore virale può interagire con l'uomo (soggetti diversi da quelli che ricevono il candidato al vaccino vettore virale) o l'ambiente.

Le vie di esposizione non sono eventi avversi di per sé, ma piuttosto meccanismi attraverso i quali può verificarsi un effetto avverso.

Tali vie di esposizione comprendono la biodistribuzione (diffusione nei tessuti ospiti), la diffusione che avviene nel sito di somministrazione o durante la manipolazione del vaccino, la capacità di trasmissione da parte degli artropodi (vettori virali) e la dispersione (diffusione da parte dei reflui).⁵¹³

Ad esempio, la valutazione degli eventi avversi associati alla dispersione dovrebbe considerare la capacità delle particelle virali funzionali di mantenere la loro infettività nell'ambiente, la via di trasmissione, la capacità del vettore virale di infettare cellule di altre persone o animali e il potenziale effetto negativo nell'uomo e/o negli animali.

Tuttavia, la trasmissione a terzi basata sulla dispersione è scarsamente documentata con dati sperimentali. Pertanto, il rischio potenziale per la popolazione umana in generale per gli animali dovuto alla trasmissione basata sulla dispersione è spesso valutato solo sulla base di un'evidenza di elementi che contribuiscono o sono coinvolti nell'efficienza della trasmissione.

L'esposizione al vettore virale ricombinante può verificarsi anche in diverse fasi della manipolazione del vaccino, come la sua produzione, la sua preparazione o somministrazione o la gestione delle perdite e lo smaltimento dei rifiuti.

L'esposizione diretta può anche derivare da inoculazione accidentale durante la somministrazione, tramite goccioline o aerosol a contatto con le mucose o a seguito di lesioni dovute all'uso di taglienti.

Questi percorsi di esposizione possono essere drasticamente ridotti mediante l'applicazione di adeguate misure di gestione del rischio.

La valutazione del potenziale impatto del materiale genetico inserito è un altro aspetto importante dell'ERA perché la sequenza o le sequenze geniche inserite e/o il prodotto o i prodotti genici possono influenzare le proprietà dello scheletro del vettore virale o possono avere un pericolo intrinseco (ad es. proprietà tossiche, allergizzanti, oncogeniche).

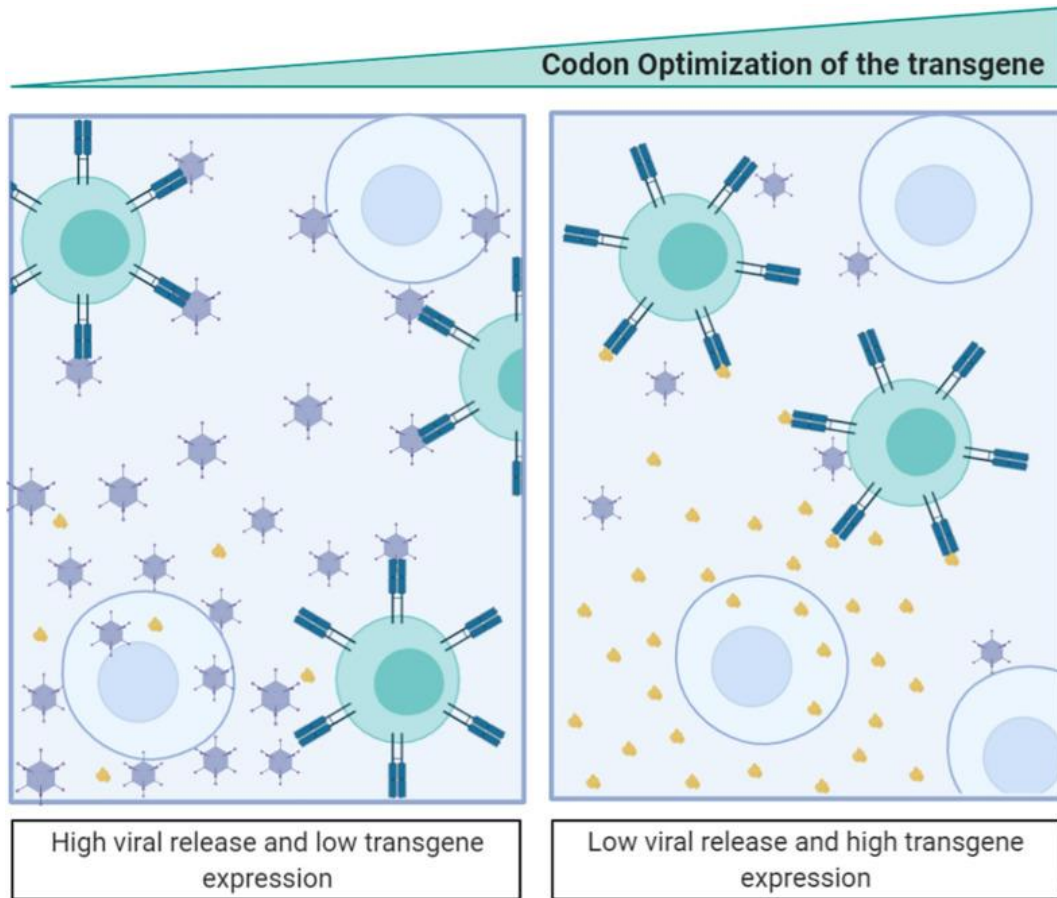
I prodotti genici che possono essere considerati potenzialmente pericolosi sono descritti in dettaglio nella revisione di Bergmans et al.⁵¹⁴ Oltre alle caratteristiche intrinseche delle sequenze inserite, l'ERA dovrebbe anche prendere in considerazione il potenziale impatto delle strategie utilizzate per la progettazione ottimale dell'espressione dell'antigene.

Queste strategie mirano ad aumentare la stabilità genetica del transgene espresso e/o a indurre risposte immunitarie più efficaci nei vaccinati. Gli approcci includono l'ottimizzazione del codone con l'obiettivo di aumentare l'espressione del transgene⁵¹⁵ o la modificazione degli aminoacidi del gene integrato.

⁵¹³ Schenk-Braat EA, van Mierlo MM, Wagemaker G, Bangma CH, Kaptein LC.
An inventory of shedding data from clinical gene therapy trials.
J Gene Med. 2007 Oct;9(10):910-21. doi: 10.1002/jgm.1096.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17880045/>

⁵¹⁴ Bergmans H, Logie C, Van Maanen K, Hermsen H, Meredyth M, Van Der Vlugt C.
Identification of potentially hazardous human gene products in GMO risk assessment.
Environ Biosafety Res. 2008 Jan-Mar;7(1):1-9. doi: 10.1051/ebr:2008001.
<http://publications.edpsciences.org/10.1051/ebr:2008001>

⁵¹⁵ Giménez-Roig J, Núñez-Manchón E, Alemany R, Villanueva E, Fillat C.
Codon Usage and Adenovirus Fitness: Implications for Vaccine Development.
Front Microbiol. 2021;12:633946. Published 2021 Feb 10. doi:10.3389/fmicb.2021.633946
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7902882/>



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7902882/>

Strategia di ricodifica antigene-transgene per vaccini a base di adenovirali. Lo schema illustra che l'ottimizzazione del codone dell'antigene transgenico induce la sua alta espressione mentre attenua l'idoneità dell'adenovirus. L'antigene espresso dall'adenovirus è mostrato in marrone.

Quest'ultimo è esemplificato dalle modifiche per stabilizzare la conformazione di prefusione della proteina S, in modo da indurre risposte anticorpali neutralizzanti efficaci contro la spike e prevenire così il legame ACE2 e l'ingresso cellulare.⁵¹⁶

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2020.605236/full>

Diverse conformazioni della proteina spike di SARS-CoV-2 S. Rappresentazione schematica delle fasi della fusione SARS-CoV-2 alla membrana delle cellule ospiti. Il trimero S è esposto sulla busta dei virus assemblati nella sua conformazione chiusa (i). Sotto lo schema, viene mostrata una rappresentazione a cartoni animati della proteina SARS-CoV-2 nella sua conformazione chiusa pre-fusione (PDBID: 6vxx). La scissione da parte della furina consente l'esposizione degli RBD nella loro conformazione "su" e il legame al recettore ACE2 (ii). Dopo il legame con ACE2 e un'ulteriore scissione da TMPRSS2, si verificano ulteriori cambiamenti conformazionali che alla fine portano alla conformazione post-fusione della proteina S e causano la fusione tra la membrana virale e quella ospite (iii). Una rappresentazione in cartone animato della struttura del trimero SARS-CoV-2 post-fusione è mostrata sotto lo schema nella parte (iii).

⁵¹⁶ Xiong, X., Qu, K., Ciazynska, K.A. *et al.*

A thermostable, closed SARS-CoV-2 spike protein trimer.

Nat Struct Mol Biol 27, 934–941 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41594-020-0478-5>

<https://www.nature.com/articles/s41594-020-0478-5>

McCallum, M., Walls, A.C., Bowen, J.E. *et al.*

Structure-guided covalent stabilization of coronavirus spike glycoprotein trimers in the closed conformation.

Nat Struct Mol Biol 27, 942–949 (2020).

<https://doi.org/10.1038/s41594-020-0483-8>

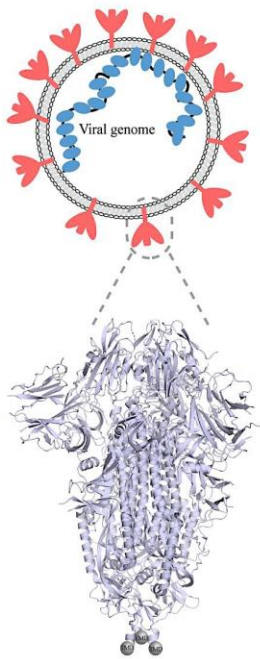
Mariano G, Farthing RJ, Lale-Farjat SLM, Bergeron JRC.

Structural Characterization of SARS-CoV-2: Where We Are, and Where We Need to Be.

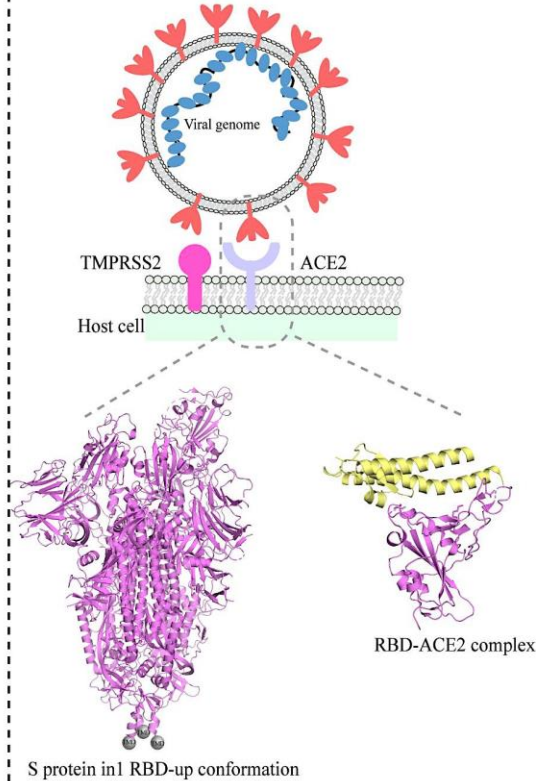
Front Mol Biosci. 2020 Dec 17;7:605236. doi: 10.3389/fmolb.2020.605236.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7773825/>

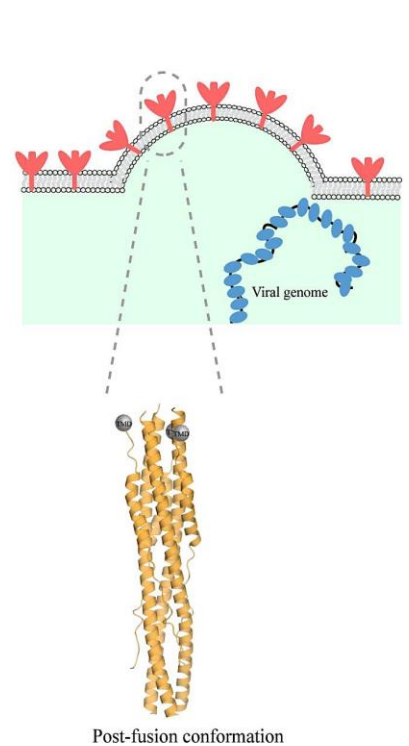
(i)Pre-binding



(ii)Receptor Binding



(iii)Membrane fusion and entry



L'ERA dovrebbe considerare il potenziale impatto di sequenze di acidi nucleici o amminoacidi alterati nella proteina S sulla biodistribuzione, o sulla gamma degli ospiti dei vettori virali ricombinanti, in particolare quando la proteina è espressa sulla superficie del virione.⁵¹⁷ In effetti, la proteina S sembra essere un determinante principale per eventi di infezione tra specie diverse e si ritiene che svolga un ruolo nel tropismo dell'ospite, evidenziando così il suo ruolo quando è espressa anche sulla superficie del vettore virale ricombinante per le considerazioni sull'ERA.⁵¹⁸

Riguardo la tossicologia ambientale della spike del SARS-Cov-2 (naturale o vaccinale) è importante tenere presente i risultati di alcuni studi recenti.⁵¹⁹

⁵¹⁷ Mauro VP, Chappell SA.
A critical analysis of codon optimization in human therapeutics.
Trends Mol Med. 2014;20(11):604-613. doi:10.1016/j.molmed.2014.09.003
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4253638/>

⁵¹⁸ Hulswit RJ, de Haan CA, Bosch BJ.
Coronavirus Spike Protein and Tropism Changes.
Adv Virus Res. 2016;96:29-57. doi:10.1016/bs.aivir.2016.08.004
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7112277/>

⁵¹⁹ Mendonça-Gomes JM et al
Shedding light on toxicity of SARS-CoV-2 peptides in aquatic biota: A study involving neotropical mosquito larvae (Diptera: Culicidae).
Environ Pollut. 2021 Nov 15;289:117818. doi: 10.1016/j.envpol.2021.117818.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8291650/>

Jones DL, Baluja MQ, Graham DW, et al.

Nell'articolo divulgativo "*Chiare, fresche e dolci acque. Con spike o senza?*"⁵²⁰ si revisionano i risultati dell'impatto ambientale della contaminazione da SARS-Cov-2 e della spike virale.

Di seguito si riporta un estratto dell'articolo:

L'analisi dei reflui urbani, all'ingresso di un depuratore, può dirci molto in merito al consumo nella popolazione di sostanze quali droghe, alcol e farmaci. L'Istituto Mario Negri, più di 15 anni fa, mise a punto una tecnica chiamata "epidemiologia delle acque reflue". La stessa tecnica è utilizzata dall'Istituto in collaborazione con l'Università statale di Milano per la sorveglianza virologica ambientale per controllare i virus eliminati dall'apparato intestinale.⁵²¹

Bisogna, più generalmente, ripensare i rischi legati alle acque reflue e il loro monitoraggio alla luce della pandemia di COVID-19 perché "(...) le prove convergenti dell'attuale pandemia, dei precedenti focolai e degli esperimenti controllati indicano che i SARS-CoV sono presenti nelle acque reflue per diversi giorni, portando a potenziali rischi per la salute attraverso i percorsi delle acque reflue trasportate dall'acqua e aerosolizzate. Il trattamento convenzionale delle acque reflue fornisce solo la rimozione parziale dei SARS-CoV, quindi lo smaltimento o il riutilizzo sicuri dipenderanno dall'efficacia della disinfezione finale. Ciò sottolinea la necessità di un quadro di valutazione e gestione del rischio su misura per la trasmissione di SARS-CoV-2 attraverso le acque reflue, compresi nuovi strumenti per la sorveglianza ambientale, garantendo un'adeguata disinfezione come componente del contenimento complessivo della pandemia di COVID-19".⁵²²

Shedding of SARS-CoV-2 in feces and urine and its potential role in person-to-person transmission and the environment-based spread of COVID-19. *Sci Total Environ.* 2020;749:141364. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.141364
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7836549/>

Dhama K, Patel SK, Yatoo MI, et al.
SARS-CoV-2 existence in sewage and wastewater: A global public health concern? *J Environ Manage.* 2021;280:111825. doi:10.1016/j.jenvman.2020.111825
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7728433/>

Mohapatra S, Menon NG, Mohapatra G, et al.
The novel SARS-CoV-2 pandemic: Possible environmental transmission, detection, persistence and fate during wastewater and water treatment. *Sci Total Environ.* 2021;765:142746. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.142746
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7536135/>

Al Huraimel K, Alhosani M, Kunhabdulla S, Stietiya MH.
SARS-CoV-2 in the environment: Modes of transmission, early detection and potential role of pollutions. *Sci Total Environ.* 2020;744:140946. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.140946
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7361046/>

Liu D, Thompson JR, Carducci A, Bi X.
Potential secondary transmission of SARS-CoV-2 via wastewater. *Sci Total Environ.* 2020;749:142358. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.142358
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7490247/>

Sbaoui Y, Bennis F, Chegiani F.
SARS-CoV-2 as Enteric Virus in Wastewater: Which Risk on the Environment and Human Behavior? *Microbiol Insights.* 2021 Mar 15;14:1178636121999673. doi: 10.1177/1178636121999673.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7968024/>

Charlie-Silva I, Malafaia G.
Fragments SARS-Cov-2 in aquatic organism represent an additional environmental risk concern: Urgent need for research. *Sci Total Environ.* 2022 Apr 15;817:153064. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.153064.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8755410/>

⁵²⁰ <https://www.francescocappello.com/2021/07/05/chiare-fresche-e-dolci-acque-con-spike-o-senza/>

⁵²¹ <https://www.marionegri.it/magazine/monitoraggio-di-sars-cov-2-nei-reflui-urbani-della-lombardia>

⁵²² Bogler, A., Packman, A., Furman, A. et al.
Rethinking wastewater risks and monitoring in light of the COVID-19 pandemic. *Nat Sustain* 3, 981–990 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41893-020-00605-2>
<https://www.nature.com/articles/s41893-020-00605-2>

Che l'agente eziologico, SARS-CoV-2, fosse un virus a RNA escreto nelle feci è noto da tempo.⁵²³ Molti gruppi di ricerca hanno, infatti, analizzato la concentrazione di frammenti di RNA virale nelle acque reflue, quale strumento epidemiologico atto a valutare la prevalenza di agenti patogeni fecali nella comunità. È certamente importante "discutere le diverse potenziali fonti di questa contaminazione, le forme di persistenza nell'ambiente, le tecniche di eliminazione parziale e la possibilità di creare nuovi serbatoi".⁵²⁴

Le concentrazioni di RNA del SARS-CoV-2 risultano altamente correlate con la curva epidemiologica della COVID-19 e i ricoveri ospedalieri locali.⁵²⁵

Esse possono anticipare di una settimana i dati raccolti sui test COVID-19 e di tre giorni quelli dei dati sui ricoveri ospedalieri locali. Per inciso, questo implica che lo stesso tipo di analisi, fatte man mano che avanza la campagna vaccinale, potrebbe egualmente dirci, con un pò d'anticipo, se, come e quanto, la campagna vaccinale di massa stia contribuendo all'inquinamento delle acque e più in generale dell'ambiente.

Nel nostro paese, per fare un esempio, la Regione Liguria sta potenziando il sistema di monitoraggio e controllo della virologia ambientale con il coinvolgimento dell'Università di Genova e dell'Arpal e un investimento di quasi mezzo milione di euro in due anni.⁵²⁶ Complessivamente la Regione vede il monitoraggio di 27 depuratori.

Tuttavia, "Gli scarichi complessivamente censiti sono stati 1.280, di questi l'8,4% recapita in mare, il 91,1% in acque interne, mentre lo 0,5% trova altra destinazione. Un'ulteriore ripartizione in base all'origine vede il 46% degli scarichi prodotto da attività industriali e il 54% da reti fognarie urbane. L'indicatore prende in considerazione tutti gli scarichi di cui si ha notizia sul territorio regionale fatta eccezione per gli scarichi domestici, così come definiti dal d.lgs. 152/99, in quanto il loro effetto come fonte di inquinamento puntuale è trascurabile".⁵²⁷

In "*Toxicological insights of Spike fragments SARS-CoV-2 by exposure environment: A threat to aquatic health?*" si valuta se i peptidi della proteina Spike possano causare un impatto negativo negli animali acquatici a causa della tossicità dei derivati dei peptidi proteici Spike SARS-CoV-2 in essa confluenti.⁵²⁸

Ecco le conclusioni della ricerca riportate nell'abstract: "La contaminazione da particelle acquatiche di SARS-CoV-2 ha un effetto colinesterasico nei girini di *P. cuvieri*. Questi risultati indicano che il COVID-19 può costituire un impatto ambientale o un potenziale danno biologico."

⁵²³ Nafisa Neault, et al

SARS-CoV-2 Protein in Wastewater Mirrors COVID-19 Prevalence
medRxiv 2020.09.01.20185280; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.09.01.20185280>
<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.09.01.20185280v1.full.pdf>

⁵²⁴ Sbaoui Y, Bennis F, Chegani F.

SARS-CoV-2 as Enteric Virus in Wastewater: Which Risk on the Environment and Human Behavior?
Microbiol Insights. 2021 Mar 15;14:1178636121999673. doi: 10.1177/1178636121999673.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7968024/>

⁵²⁵ Jordan Peccia, et al

SARS-CoV-2 RNA concentrations in primary municipal sewage sludge as a leading indicator of COVID-19 outbreak dynamics
medRxiv 2020.05.19.20105999; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.05.19.20105999>
<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.05.19.20105999v1.full.pdf>

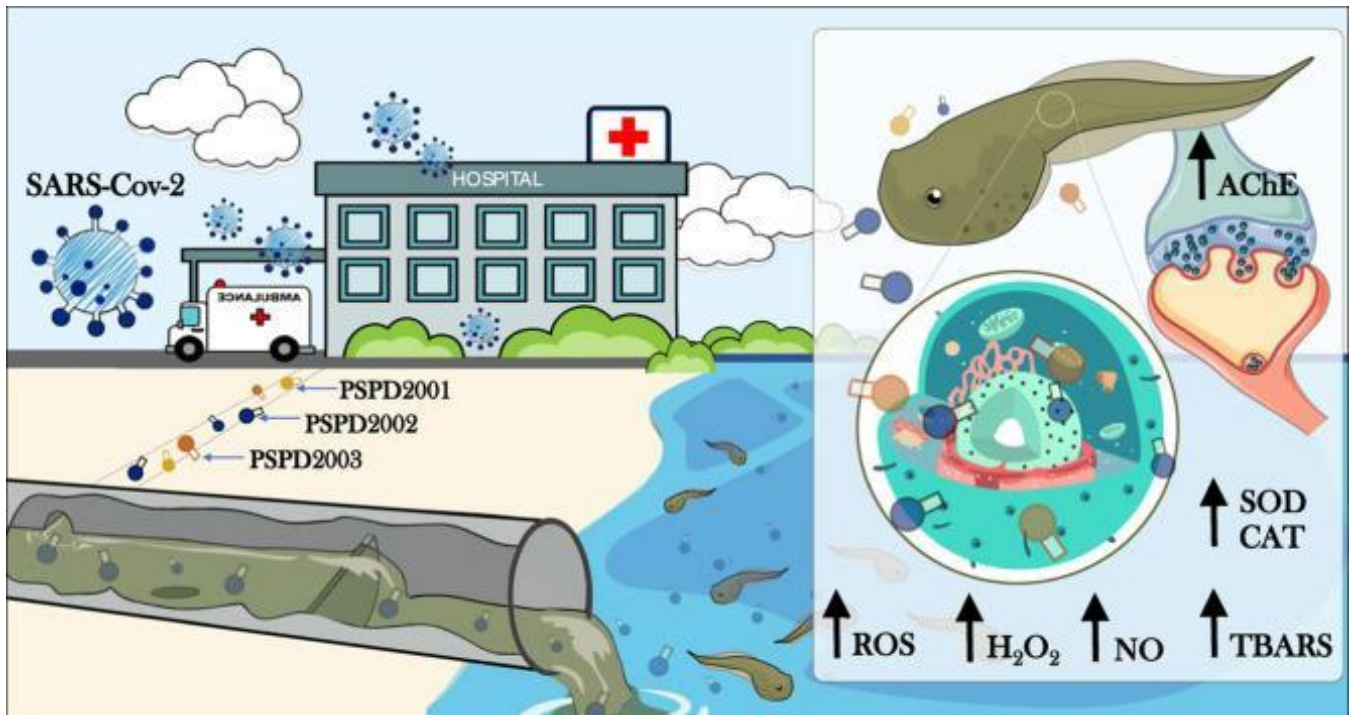
⁵²⁶ <https://www.levantenews.it/2021/04/27/covid-nelle-acque-reflue-liguria-apripista-metodo-individuato-da-iss/322289/>

⁵²⁷ http://www.cartografiarl.regione.liguria.it/SiraRsa/doc/2006/07_scarichi.pdf

<https://www.arpal.liguria.it/tematiche/acqua/controlli-minerali,-naturali,-piscine-e-scarichi.html>

⁵²⁸ Charlie-Silva I, Araújo APC, Guimarães ATB, et al.

Toxicological insights of Spike fragments SARS-CoV-2 by exposure environment: A threat to aquatic health?
J Hazard Mater. 2021;419:126463. doi:10.1016/j.jhazmat.2021.126463
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8226002/>



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8226002/>

La proteina Spike (proteina S) è un componente critico nell'infezione del nuovo coronavirus (SARS-CoV-2). L'obiettivo di questo lavoro era valutare se i peptidi della proteina S potessero causare un impatto negativo negli animali acquatici. La tossicità acquatica dei derivati dei peptidi della proteina Spike SARS-CoV-2 è stata valutata in girini ($n = 50$ girini/5 repliche di 10 animali) dalla specie *Physalaemus cuvieri* (Leptodactylidae). Dopo sintesi, purificazione e caratterizzazione dei peptidi (PSPD2001, PSPD2002, PSPD2003) è stata simulata una contaminazione acquatica con questi peptidi durante 24 h di esposizione in due concentrazioni (100 e 500 ng/mL). Il gruppo di controllo ("C") era composto da girini tenuti in contenitori di polietilene contenenti acqua dechlorata. Sono stati valutati lo stress ossidativo, i biomarcatori antiossidanti e l'attività AChE. In entrambe le concentrazioni, PSPD2002 e PSPD2003 hanno aumentato le attività degli enzimi antiossidanti della catalasi e della superossido dismutasi, nonché lo stress ossidativo (livelli di nitriti, perossido di idrogeno e specie reattive dell'ossigeno). Tutti e tre i peptidi hanno anche aumentato l'attività dell'acetilcolinesterasi alla massima concentrazione. Questi peptidi hanno mostrato interazioni molecolari in silico con acetilcolinesterasi ed enzimi antiossidanti. La contaminazione da particelle acquatiche di SARS-CoV-2 ha un effetto colinesterasico nei girini di *P. cuvieri*. Questi risultati indicano che il COVID-19 può costituire un potenziale impatto ambientale o danno biologico.

I microrganismi come virus, batteri e protozoi sono la causa di molte infezioni umane trasmesse dall'acqua. Questi microbi sono naturalmente presenti negli ambienti acquatici o trasferiti al loro interno da fonti fecali. Rimangono in questi ambienti per periodi di tempo variabili prima di contaminare un nuovo ospite. Con l'emergere della pandemia di COVID-19, alcuni studi hanno riportato la presenza di acidi nucleici virali in campioni di feci di pazienti COVID-19, suggerendo la possibilità di trasmissione oro-fecale. L'RNA di SARS-CoV-2 è stato quindi rilevato nelle acque reflue di persone sintomatiche e asintomatiche con un rischio per la salute umana e ambientale. In questo lavoro si cerca di discutere le diverse potenziali fonti di questa contaminazione, le forme di persistenza nell'ambiente, le tecniche di eliminazione parziale e la possibilità di creare nuovi serbatoi. Per quanto riguarda i rischi per la salute umana di una contaminazione ambientale da spike è importante segnalare la seguente ricerca, che evidenzia come la Spike possa provocare infiammazione cardiaca, rimodellamento ipertrofico e risposte autoimmunitarie nei topi.

Leggiamo dall'abstract del preprint: *"L'espressione selettiva della subunità S1 della proteina Spike SARS-CoV-2 nei cardiomiociti induce ipertrofia cardiaca nei topi"*⁵²⁹: "Il danno cardiaco è comune nei pazienti COVID-19 ospedalizzati e fa presagire una prognosi peggiore e una mortalità più elevata. Per comprendere meglio come SARS-CoV-2 (CoV-2) danneggia il cuore, è fondamentale chiarire la biologia delle proteine codificate da CoV-2, ognuna delle quali può svolgere molteplici ruoli patologici. Ad esempio, la glicoproteina Spike CoV-2 (CoV-2-S)

⁵²⁹ Steven G. Negron, Chase W. Kessinger, Bing Xu, William T. Pu, Zhiqiang Lin
Selectively expressing SARS-CoV-2 Spike protein S1 subunit in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy in mice
bioRxiv 2021.06.20.448993; doi: <https://doi.org/10.1101/2021.06.20.448993>
<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.06.20.448993v1.full.pdf>

non solo impegna ACE2 per mediare l'infezione da virus, ma altera anche direttamente la funzione endoteliale e può innescare risposte immunitarie innate nei macrofagi murini coltivati. Qui abbiamo testato l'ipotesi che CoV-2-S danneggi il cuore attivando le risposte immunitarie innate dei cardiomiociti (CM). (...) L'espressione selettiva mediata da AAV9 (vettore a virus adenovirale associato 9) di S1-TM (truncated CoV-2-S) nei CM ha causato disfunzione cardiaca, ha indotto il rimodellamento ipertrofico e ha suscitato l'infiammazione cardiaca. Poiché CoV-2-S non interagisce con l'ACE2 murino, il nostro studio presenta un nuovo ruolo patologico indipendente da ACE2 di CoV-2-S e suggerisce che il CoV-2-S1 circolante sia un'allarmina riconoscibile da TLR4 che può danneggiare i CMs attivando le loro risposte immunitarie innate."

Come con altri vettori virali, un potenziale rischio associato ai vaccini a base di vettori adenovirali è il ritorno alla competenza di replicazione a seguito di eventi di ricombinazione omologhi. La probabilità di comparsa degli adenovirus competenti per la replicazione (RCA) è elevata durante la produzione dei vaccini a base di vettore adenovirale in una linea cellulare di assemblaggio (solitamente HEK293), a causa della presenza di sequenze originate da hAd5 che non solo possono completarsi in *trans*, in modo da consentire la produzione delle particelle virali, ma ciò può anche comportare eventi di ricombinazione e formazione di RCA.

Un approccio per limitare gli eventi di ricombinazione omologa durante la produzione consiste nel ridurre ulteriormente le sequenze omologhe tra le sequenze vettoriali virali e le sequenze complementari della regione E1 della linea cellulare di assemblaggio.⁵³⁰ Tuttavia, l'assenza di RCA dovrebbe essere dimostrata dai produttori per ogni rilascio del lotto del candidato vaccino a vettore adenovirale come parte del controllo di qualità di routine.⁴⁸⁰

L'emergere di RCA potrebbe verificarsi anche dopo la somministrazione del vaccino da eventi di ricombinazione omologhi tra le sequenze vaccinali basate sul vettore adenovirale e il virus parentale di tipo selvaggio, o altro adenovirus umano correlato che infetta la stessa cellula ospite. Questo rimane un rischio ipotetico poiché finora non sono stati segnalati eventi di ricombinazione con vettori difettosi di replicazione.

Dopo aver coinfectato con virus di tipo selvaggio come hAd5, eventi di ricombinazione omologhi potrebbero teoricamente portare alla generazione di varianti replicative di hAd5 che ospitano il gene E1 senza transgeni o, a seconda del costruito adenovirale, possono comportare la replicazione dell'adenovirus di scimmia competente/hAd5 o hAd26/ Vettori chimerici hAd5 senza transgeni e vettori chimerici carenti di replicazione che ospitano la sequenza del transgene. Ad esempio, considerando i vaccini bivalenti con protocollo di vaccinazione primaria e richiamo con vettori hAd26/hAd5, come per lo Sputnik V, gli eventi di ricombinazione tra hAd26 e hAd5, se si verificassero, darebbero alla fine a vettori con versioni delete di E3 ed E1.

Da notare, i vettori adenovirali di scimmia (ChAdY25 e GRAd32) sono stati ulteriormente modificati geneticamente per ospitare regioni codificanti E4 da hAd5⁵³¹ in modo da ottimizzare il tasso di crescita e la resa dei vaccini a vettore nelle cellule di assemblaggio umane. Tuttavia, dal punto di vista dell'ERA, ciò aumenta le omologie di sequenza e la propensione alla ricombinazione omologa con hAd5 di tipo selvaggio. D'altra parte, le possibilità di eventi di ricombinazione omologhi tra hAd26 o vettori adenovirali di scimmia e un hAd5 di tipo selvaggio

⁵³⁰ Fallaux FJ, et al

New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses.

Hum Gene Ther. 1998 Sep 1;9(13):1909-17. doi: 10.1089/hum.1998.9.13-1909.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9741429/>

⁵³¹ Capone S, Raggioli A, Gentile M, et al.

Immunogenicity of a new gorilla adenovirus vaccine candidate for COVID-19.

Mol Ther. 2021;29(8):2412-2423. doi:10.1016/j.ymthe.2021.04.022

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8062434/>

Dicks MD, Spencer AJ, Edwards NJ, et al.

A novel chimpanzee adenovirus vector with low human seroprevalence: improved systems for vector derivation and comparative immunogenicity.

PLoS One. 2012;7(7):e40385. doi:10.1371/journal.pone.0040385

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3396660/>

potrebbero essere basse poiché questi virus appartengono a diversi sottogruppi di adenovirus e condividono brevi regioni di omologia di sequenza E1.

Nello scenario in cui RCA e vettori adenovirali chimerici competenti per la replicazione vengono eliminati dai vaccinati, la popolazione generale e l'ambiente potrebbero essere esposti. I potenziali effetti avversi sulla salute umana e sull'ambiente dei virus chimerici competenti per la replicazione non sono chiari sebbene sia stata segnalata una ridotta capacità di replicazione delle chimere di adenovirus di specie diverse.⁵³²

Affinché si verifichi l'emergenza di virus chimerici competenti per la replicazione e RCA, la co-localizzazione dei vaccini a vettore adenovirale con un altro virus presente in natura dovrebbe avvenire nella stessa cellula.

La co-localizzazione è tuttavia un evento che si prevede si verifichi con bassa probabilità in primo luogo a causa della presenza relativamente breve del vettore adenovirale nelle cellule infette risultante dalla sua incompetenza di replicazione e per la sua rapida eliminazione da parte della risposta immunitaria dell'ospite.

L'uso di vaccini a vettore adenovirale derivati da adenovirus a bassa prevalenza come hAd26 o adenovirus di scimmia (ChAdY25 e GRAd32) riduce ulteriormente le possibilità di una co-infezione cellulare con la loro controparte wild-type. ChAdY25 e GRAd32 circolano solo tra scimpanzé e gorilla, rispettivamente, che nella maggior parte dei casi non sono presenti nel nostro ambiente diretto. Questo potrebbe non essere il caso in altre parti del mondo come l'Africa e l'Asia.

La probabilità di co-localizzazione di vettori con virus wild-type sarà influenzata anche dalla via di somministrazione del vaccino. Le membrane mucose del tratto respiratorio, degli occhi o del tratto gastrointestinale sono un portale di ingresso predominante per gli adenovirus circolanti di tipo selvaggio. Dall'altra parte, la maggior parte dei vaccini basati su vettori adenovirali contro SARS-CoV-2 sono somministrati mediante iniezione intramuscolare (IM), spesso nel muscolo deltoide.⁵³³

Non sono stati rilevati vettori adenovirali nei reflui dei pazienti umani (feci, urina, tampone faringeo) dopo la somministrazione di IM nella gamba, il che significa che il portale naturale di ingresso dei virus wild-type e la via di somministrazione vaccinale differiscono.

Altri vaccini a base di vettori adenovirali sottoposti a studi clinici di fase I o II, sono destinati ad essere somministrati per via sottocutanea e orale. Mentre l'ingresso sottocutaneo potrebbe non imitare l'infezione naturale degli adenovirus, la via di somministrazione orale potrebbe essere paragonata a un portale naturale di ingresso attraverso le membrane mucose degli adenovirus di tipo selvatico negli organismi. Ad esempio, per i vaccini candidati a base di hAd5 destinati ad essere somministrati attraverso la mucosa orale, la probabilità di co-infezione della stessa cellula con adenovirus di tipo selvaggio potrebbe essere aumentata e quindi potrebbe aumentare anche la probabilità di eventi di ricombinazione omologhi.

È stato dimostrato che l'eliminazione dei vettori adenovirali e la durata dell'eliminazione dipende dal sierotipo del vettore, dalla dose somministrata e dalla modalità di somministrazione.^{483,503} Sulla base della letteratura esistente,^{483,503,534} la dispersione in seguito alla somministrazione intramuscolo di vettori adenovirali nell'uomo è stato segnalato come un evento molto raro.

Un altro potenziale problema di sicurezza da considerare associato alla biodistribuzione e all'eliminazione dei vaccini a base di vettori adenovirali è la diffusione del vettore alle gonadi, con conseguente rischio di trasmissione dalla linea germinale. Nonostante l'espressione di Coxsackievirus e Adenovirus Receptor (CAR) che mediano

⁵³² Youil R, Toner TJ, Su Q, Chen M, Tang A, Bett AJ, Casimiro D.
Hexon gene switch strategy for the generation of chimeric recombinant adenovirus.
Hum Gene Ther. 2002 Jan 20;13(2):311-20. doi: 10.1089/10430340252769824.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11812286/>

⁵³³ Tiesjema B, Hermsen HP, van Eijkeren JC, Brandon EF.
Effect of administration route on the biodistribution and shedding of replication-deficient HAdV-5: a qualitative modelling approach.
Curr Gene Ther. 2010 Apr;10(2):107-27. doi: 10.2174/156652310791111038.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20222861/>

⁵³⁴ Wold WS, Toth K.
Adenovirus vectors for gene therapy, vaccination and cancer gene therapy.
Curr Gene Ther. 2013;13(6):421-433. doi:10.2174/1566523213666131125095046



l'ingresso di cellule di adenovirus sulle cellule germinali di topo, gli studi sulla somministrazione sistemica di vettori hAd5⁵³⁵ sugli spermatozoi testicolari e sull'analisi dello sperma dell'epididimo non hanno mostrato alcuna evidenza di infezione. Gli stessi risultati sono stati osservati durante l'inoculazione di ovaie e ovociti di topo direttamente con vettori hAd5.

Nonostante ad oggi non ci siano evidenze di ricombinazione tra i vettori virali attualmente in uso, dal punto di vista dell'ERA è di fondamentale importanza che si avvii il monitoraggio dell'emergenza di RCA negli studi clinici in corso e si conducano studi sulla diffusione come parte del piano di sviluppo clinico.

⁵³⁵ Peters AH, Drumm J, Ferrell C, Roth DA, Roth DM, McCaman M, Novak PL, Friedman J, Engler R, Braun RE. Absence of germline infection in male mice following intraventricular injection of adenovirus. *Mol Ther.* 2001 Dec;4(6):603-13. doi: 10.1006/mthe.2001.0500. <https://doi.org/10.1006/mthe.2001.0500>