



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE MEDICHE E CHIRURGICHE TRASLAZIONALI
CICLO XXXIV

**Esaurimento funzionale dei linfociti T CD8 nell'epatite cronica B:
caratterizzazione di un network di funzioni intracellulari deregolate la cui
correzione induce ripristino della funzione antivirale**

Coordinatore:

Prof. Nicola Sverzellati

Tutore:

Prof. Carlo Ferrari

Dottoranda: Dott.ssa Paola Fiscaro

Anni Accademici 2018/2021

SOMMARIO

RIASSUNTO.....	5
INTRODUZIONE.....	7
CARATTERISTICHE BIOLOGICHE DEL VIRUS DELL'EPATITE B.....	7
STORIA NATURALE DELL'INFEZIONE CRONICA DA HBV.....	9
NUOVI BIOMARCATORI VIRALI IN CORSO DI INFEZIONE CRONICA DA HBV.....	10
HBV RNA.....	10
Hepatitis B core-related antigen (HBcrAg).....	11
HBV Nucleic Acid-Related Antigen (HBV-NRAg).....	11
HBsAg quantitativo.....	12
Anti-HBc quantitativo.....	12
CENNI DI TERAPIA.....	14
NUOVE STRATEGIE TERAPEUTICHE.....	17
1. Farmaci ad azione antivirale.....	17
Inibitori dell' <i>entry</i>	17
Induttori della degradazione di cccDNA.....	18
Strategie mirate alla espressione dei geni virali.....	18
Controllo trascrizionale.....	19
Controllo post-trascrizionale.....	19
Assemblaggio del capsido.....	20
Rilascio di HBsAg.....	21
2. Immunomodulazione.....	22
Strategie mirate al sistema immunitario innato.....	22
Strategie rivolte alla immunità adattativa.....	23
LA RISPOSTA IMMUNITARIA ALL'INFEZIONE DA VIRUS DELL'EPATITE B.....	25
Immunità innata.....	25
Immunità adattativa.....	26
Risposta NK e T linfocitaria.....	27
EXHAUSTION T LINFOCITARIA.....	29
DATI PRELIMINARI.....	32

SCOPO DELLO STUDIO.....	34
MATERIALI E METODI.....	36
1. Pazienti e controlli.....	36
2. Peptidi sintetici, complessi destramerici peptide-HLA di classe I e anticorpi.....	37
3. Isolamento dei linfociti del sangue periferico.....	37
4. Valutazione della risposta al danno del DNA.....	38
4.1 Marcatura fosfoH2AX, fosfoATM, 53BP1.....	38
4.2 Poli-ADP-ribosilazione (PARilazione).....	38
4.3 PARilazione in seguito ad aggiunta di NAD o di inibitore di CD38 (CD38i).....	39
5. Acetilazione dell'istone H3.....	39
6. Lunghezza dei telomeri.....	39
7. Espansione in vitro dei linfociti T.....	40
8. Valutazione del potenziale di membrana mitocondriale.....	40
9. Rilevazione degli aggregati proteici.....	41
10. Valutazione della risposta al danno del DNA.....	41
11. Valutazione della produzione di citochine intracellulari (ICS).....	41
12. Analisi statistiche.....	42
RISULTATI.....	43
1. Aumentato danno del DNA e validazione della disfunzione della risposta al danno nei linfociti T CD8 HBV-specifici di pazienti con infezione cronica da HBV.....	43
2. CD38 è over-espresso sui linfociti T CD8 HBV-specifici dei pazienti con epatite B cronica....	47
3. I linfociti exhausted HBV-specifici hanno telomeri più corti rispetto ai linfociti FLU-specifici.....	50
4. L'acetilazione istonica è alterata nei linfociti CD8 HBV-specifici exhausted.....	51
5. La supplementazione di NAD può correggere le disfunzioni intracellulari nei linfociti HBV-specifici.....	52
6. La supplementazione con NMN può migliorare la funzionalità linfocitaria antivirale.....	54
7. L'inibizione di CD38 può complementare l'effetto di NMN nel ripristino funzionale T linfocitario.....	56
DISCUSSIONE.....	59
BIBLIOGRAFIA.....	67

RIASSUNTO

L'attuale terapia per l'epatite cronica B si basa principalmente sulla somministrazione di farmaci antivirali con analoghi nucleos(t)idici (NUC), i quali spesso devono essere dispensati per tutta la vita per evitare la possibile riattivazione del virus. Per questo motivo è necessario individuare un trattamento in grado di ridurre la durata delle attuali terapie. In quest'ottica, la ricostituzione della funzionalità T linfocitaria anti-virale è considerata una strategia potenziale in quanto, durante la fase cronica dell'infezione, i linfociti T CD8 perdono progressivamente le loro funzioni in un processo noto come “*exhaustion* linfocitaria”.

Nel nostro laboratorio abbiamo precedentemente svolto uno studio di analisi trascrittomico, allo scopo di individuare direttamente nei linfociti T CD8 HBV-specifici isolati da pazienti con infezione cronica le alterazioni funzionali associate alla persistenza virale. I dati raccolti hanno evidenziato una prevalente down-regolazione di geni coinvolti in diverse funzioni cellulari, tra cui quelle più significative erano relative a vari processi mitocondriali, alla proteostasi, alla risposta al danno del DNA e al controllo epigenetico della trascrizione. Alcuni di questi aspetti sono stati ulteriormente indagati funzionalmente, dimostrando un'alterazione mitocondriale, con produzione di elevati livelli di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e una ridotta proteostasi, con accumulo di aggregati proteici intracellulari.

Chiarire come i difetti riscontrati siano meccanicisticamente interconnessi è centrale per fare luce sulla patogenesi dell'*exhaustion* T linfocitaria e per disegnare nuovi interventi efficaci di immunomodulazione per l'epatite B cronica.

A questo fine, nel presente lavoro abbiamo inteso verificare se l'elevato contenuto di ROS provochi un aumento del danno del DNA nei linfociti T CD8 HBV-specifici *exhausted*, e investigare se la disfunzione della risposta al danno del DNA, emersa dalla precedente analisi trascrizionale, può rappresentare un *target* per una strategia mirata di recupero della funzionalità T linfocitaria.

Studi di letteratura, effettuati in modelli di senescenza cellulare, indicano l'associazione di accumulo di danno del DNA e attivazione persistente di meccanismi di risposta al danno. Tra questi, gli enzimi NAD-dipendenti della famiglia delle poli-ADP-ribosilasi (PARP) catalizzano la formazione di catene di poli-ADP-ribosio in corrispondenza della lesione del DNA, allo scopo di reclutare altri mediatori della risposta al danno, con la conseguente diminuzione dei livelli cellulari di NAD.

Per studiare se questo modello possa rappresentare un meccanismo alla base della disfunzione dei linfociti T CD8 virus-specifici nell'epatite cronica B sono stati analizzati i possibili “consumatori” cellulari di NAD e l'effetto della supplementazione di NAD sul ripristino della funzionalità T linfocitaria.

I linfociti T CD8 HBV-specifici di pazienti affetti da epatite cronica B presentano un elevato accumulo di danno del DNA e disfunzione di meccanismi di risposta al danno, che comprendono livelli di poli-ADP-ribosilazione più bassi rispetto ai controlli. La somministrazione di NAD esogeno permette il miglioramento significativo della funzionalità degli enzimi PARP specificamente nelle cellule dei pazienti con epatite cronica, suggerendo che una carenza di NAD a livello intracellulare può essere una causa della disfunzione linfocitaria. Inoltre l'enzima CD38, noto per essere il maggior consumatore di NAD intracellulare, è risultato sovra-espresso nelle cellule HBV-specifiche dei pazienti cronici, come ulteriore effetto della deplezione di NAD. Di conseguenza, è stato testato *in vitro* un precursore del NAD, la Nicotinamide Mononucleotide (NMN), per verificarne la capacità nel ripristinare i *pathway* cellulari disfunzionali individuati in precedenza. I risultati hanno confermato che l'uso di NMN è in grado di migliorare la funzionalità mitocondriale, la risposta al danno del DNA, la proteostasi cellulare, l'acetilazione istonica e potenziare la funzionalità T linfocitaria antivirale. Effetto questo ulteriormente potenziato dall'aggiunta di un inibitore dell'attività di CD38.

In conclusione, i dati qui esposti delineano un modello di *exhaustion* dei linfociti T CD8 virus-specifici, in cui diversi difetti intracellulari interconnessi, compresa una diminuzione della lunghezza dei telomeri, sono causalmente associati alla deplezione di NAD, suggerendo similarità tra il fenomeno dell'*exhaustion* e della senescenza cellulare. Una terapia incentrata sul ripristino del *pool* cellulare di NAD potrebbe quindi rappresentare una strategia idonea alla ricostituzione della risposta T linfocitaria nei pazienti affetti da epatite cronica B.

INTRODUZIONE

CARATTERISTICHE BIOLOGICHE DEL VIRUS DELL'EPATITE B

Il virus dell'epatite B è un patogeno a trasmissione ematica, la cui trasmissione materno-fetale rappresenta una importante sorgente di infezione. L'infezione da HBV può causare severo danno epatico, che può evolvere in cirrosi epatica ed epatocarcinoma.

HBV è un piccolo virus a DNA della famiglia delle *Hepadnaviridae*. I virioni sono composti da un nucleocapside icosaedrico, formato da proteine del core (HBcAg) contenenti il DNA parzialmente a doppia elica (rcDNA: *relaxed circular DNA*). Il nucleocapside è circondato dall'envelope, composto da 3 tipi di HBsAg: L (*large*), M (*middle*), e S (*small*) HBsAg (**Figura 1**). L'HBsAg gioca un ruolo cruciale nell'attacco del virione alla superficie dell'epatocita, grazie all'interazione ad elevata affinità tra i 75 amminoacidi della parte N-terminale di L-HBsAg (domain preS1) e i residui 157-165 sul recettore presente sull'epatocita: il polipeptide co-trasportatore taurocolato sodio-dipendente (NTCP)¹. La miristilazione all'estremità N-terminale della forma L di HBsAg è importante per l'attacco al recettore NTCP². L'ingresso di HBV nella cellula infetta è seguito dalla traslocazione del nucleocapside nel nucleo. Quindi il rcDNA è rimodellato da enzimi cellulari in cccDNA (cccDNA, *covalently closed circular DNA*), che è avvolto da istoni per formare un minicromosoma episomico e serve come template per 4 trascritti poliadenilati, codificanti per l'RNA pregenomico (pgRNA) e 7 proteine: HBeAg (Antigene e, secreto), HBcAg (antigene core, che costituisce il capsido virale), HBV Pol/RT (polimerasi, con attività di trascrittasi inversa), PreS1/PreS2/HBsAg (L-large, M-medium, S-small: forme dell'antigene s), e HBx (antigene x, regolatore della trascrizione, necessario per l'inizio dell'infezione). Nel citoplasma della cellula infetta, pgRNA è selettivamente incluso in un capsido proteico, insieme alla polimerasi virale. Questo costrutto citoplasmatico funziona come un veicolo per la replicazione del genoma virale e anche per generare ulteriore cccDNA. Il genoma virale può anche integrarsi nel genoma della cellula infettata: questo processo non è richiesto per la replicazione virale, ma è un importante meccanismo di trasformazione degli epatociti, inoltre il DNA virale può portare alla produzione di HBsAg anche nella sua forma integrata³. Le forme di HBsAg sono necessarie per lo sviluppo del capsido, eccetto M-HBsAg, che non è essenziale per la morfogenesi e la secrezione del virione. S e PreS1 interagiscono con HBcAg per la secrezione del virione. L'eccesso di produzione di HBsAg porta anche alla formazione di particelle sferiche e filamentose non infettive, insieme ai virioni infettivi.

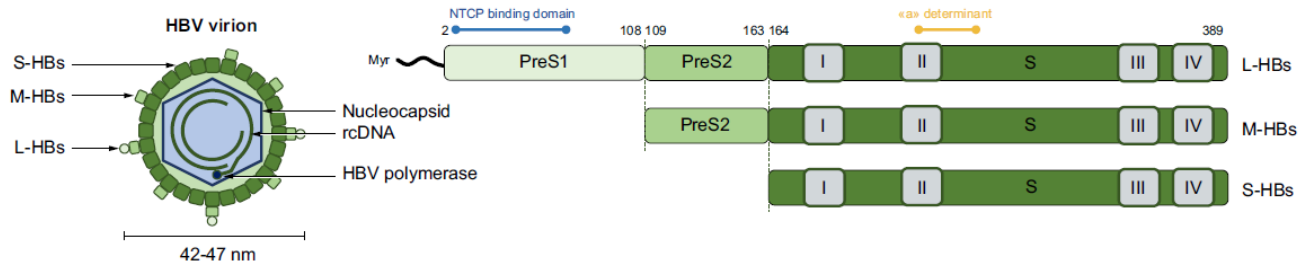


Figura 1. Rappresentazione del virione di HBV e delle proteine HBsAg.

Il genoma di HBV è contenuto nel capsid, avvolto dalle 3 diverse forme di HBsAg: L, M, e S-HBsAg. Tutte le forme di HBsAg condividono il dominio S, che contiene 4 putativi domini di transmembrana. M-HBsAg è composto da un ulteriore dominio PreS2 e L-HBsAg contiene sia PreS1 che PreS2. (Da: Tout I et al. Hepatitis B surface antigen seroclearance: immune mechanisms, clinical impact, importance for drug development. JHepatol. 2020, 73:409-422.)

STORIA NATURALE DELL'INFEZIONE CRONICA DA HBV

La storia naturale dell'infezione cronica da HBV prevede schematicamente 5 fasi⁴. La classificazione dei pazienti in queste fasi si basa sulla determinazione longitudinale dell'HBeAg positività, dei livelli di replicazione virale, di alanina-aminotransferasi (ALT) e la presenza di infiammazione epatica (**Figura 2**). Secondo le linee guida EASL del 2017, la prima fase è l'infezione cronica HBeAg-positiva, caratterizzata da presenza di HBeAg nel siero, alti livelli di HBV-DNA, transaminasi nei limiti della norma e necroinfiammazione epatica minima o assente. La seconda fase è quella di epatite cronica HBeAg-positiva, in cui si riscontra ancora la presenza di HBeAg nel siero, elevati livelli non solo di HBV-DNA, ma anche di transaminasi, e infiammazione epatica da moderata a severa con accelerata progressione verso la fibrosi. In questa fase molti pazienti raggiungono la sieronegativizzazione per HBeAg e sieroconversione anti-HBe. La terza fase è l'infezione cronica HBeAg-negativa (precedentemente chiamata fase di portatore asintomatico, o *inactive carrier*), caratterizzata dall'assenza di HBeAg e la presenza di anticorpi anti-HBe. In questa fase si riscontrano livelli bassi di HBV-DNA (<2000 UI/ml) e transaminasi persistentemente normali. In una percentuale variabile tra l'1-3% dei pazienti, più facilmente in quelli con livelli di HBsAg<1000 UI/ml, può avvenire la negativizzazione di HBsAg. Tuttavia, può verificarsi anche la riattivazione della malattia, con progressione alla quarta fase di epatite cronica HBeAg-negativa, in cui si riscontrano livelli da moderati ad alti di HBV-DNA, che possono fluttuare, così come i valori di transaminasi al di sopra del limite della norma, e infiammazione epatica. Questa fase è associata con la comparsa di mutanti virali nella regione del precore e/o del core che modulano o prevengono l'espressione di HBeAg. La quinta fase è quella HBsAg-negativa: la clearance di HBsAg rappresenta l'obiettivo principale delle attuali terapie, in quanto in questa fase il rischio di sviluppo di malattia del fegato è minimo. La negativizzazione di HBsAg e di HBV-DNA con transaminasi normali, che accade raramente, può essere accompagnata o meno dalla comparsa di anticorpi anti-HBs. Tuttavia il cccDNA virale è ancora rilevabile nel fegato, per questo motivo questa fase viene definita "infezione occulta". Possono infatti verificarsi episodi di riacutizzazione in caso di immunosoppressione. Nelle fasi di infezione cronica o di HBsAg-negatività i pazienti hanno un basso rischio di sviluppare fibrosi epatica o cirrosi, mentre nelle fasi di epatite cronica il rischio di danno epatico è aumentato. Tuttavia, per i pazienti che avevano sviluppato cirrosi prima della sieronegativizzazione di HBsAg, il rischio di evoluzione ad epatocarcinoma rimane.

NUOVI BIOMARCATORI VIRALI IN CORSO DI INFEZIONE CRONICA DA HBV

Mentre alcuni marcatori virali tradizionali, come HBsAg e anticorpi anti-HBc sono utilizzati nella diagnosi dell'infezione da HBV, altri sono utili per identificare la fase dell'infezione cronica, come HBeAg, HBV-DNA, anticorpi anti-HBe e anti-HBs e sono quindi utilizzati nel monitoraggio dell'infezione. Questi hanno tuttavia dei limiti nella predizione dell'esito di malattia o di risposta alla terapia. La quantificazione del cccDNA in campioni di biopsie epatiche rappresenta il *gold standard* per una piena comprensione dell'attività replicativa e trascrizionale virale, tuttavia il carattere invasivo delle procedure legate alla biopsia epatica impedisce il monitoraggio di questo parametro a titolo prognostico nella routine clinica. La quantificazione di nuovi marcatori sierici è attualmente allo studio per l'identificazione di surrogati affidabili del cccDNA, non solo per evitare biopsie epatiche, ma anche per raccogliere ulteriori informazioni sullo stato della malattia, per una guida più precisa nella gestione clinica e per ampliare la conoscenza attuale della storia naturale dell'infezione cronica da HBV.

Questi nuovi marcatori includono: HBV-RNA sierico, HBcrAg (*hepatitis B core-related antigen*), quantificazione di anticorpi anti-core, quantificazione ultrasensibile di HBsAg, HBV-NRAg (*HBV nucleic acid-related antigen*) (**Figura 2**).

HBV RNA

L'HBV-RNA, di cui l'RNA pre-genomico virale (pgRNA) rappresenta il principale componente, è stato rilevato in biopsie epatiche e anche nel siero dei pazienti. Diversi studi hanno dimostrato che la determinazione di HBV-RNA nel siero può essere utilizzato come marcatore surrogato di trascrizione del cccDNA nel fegato. In pazienti naive alla terapia sono stati riscontrati livelli di HBV-RNA più alti nei pazienti HBeAg-positivi che in quelli HBeAg-negativi⁵. In accordo con la stretta associazione di HBV-RNA con la fase HBeAg-positiva dell'infezione, questo marcatore ha il potenziale di predire la siero-conversione anti-HBe durante il trattamento. Infatti è stato riportato che pazienti HBeAg-positivi con riduzioni significative dei livelli sierici di HBV RNA durante la terapia con NUC, avevano maggiori probabilità di raggiungere la sieroconversione HBeAg⁶.

Tuttavia, uno dei ruoli più promettenti per questo test è nel monitoraggio dell'attività trascrizionale durante il trattamento antivirale, quando HBV-DNA non è più rilevabile. Infatti, sebbene diversi studi abbiano mostrato anche riduzioni di HBV-RNA sierico in risposta alla terapia, questo parametro rimane comunque rilevabile più a lungo, decrescendo più lentamente di HBV-DNA durante il trattamento con NUC⁷.

Un ulteriore impiego di questo marcatore è relativo alla potenzialità di predizione di una riattivazione virale in seguito alla sospensione della terapia. Infatti, potrebbe essere usato per identificare quei pazienti con bassa attività trascrizionale residua del cccDNA a livello epatico, che può risultare in una maggiore probabilità di riattivazione in seguito alla sospensione della terapia. Infatti, in uno studio in pazienti in terapia NUC per più di 3 anni, con HBV DNA soppresso, si è osservata riattivazione virale in tutti i soggetti che alla sospensione della terapia avevano HBV RNA rilevabile, e in solo 3 su 12 con HBV RNA non rilevabile⁸.

Hepatitis B core-related antigen (HBcrAg)

HBcrAg è formato da 3 diverse proteine: HBeAg, HBcAg e p22cr, che condividono una sequenza comune di 149 aminoacidi, di queste però HBeAg rappresenta la maggior parte della composizione di HBcrAg nel siero di pazienti HBeAg-positivi⁹.

Diversi studi hanno descritto una migliore correlazione di HBcrAg con il cccDNA rispetto ad altri parametri, quali HBV-DNA, pgRNA e qHBsAg, e il declino di HBcrAg è stato associato con quello di cccDNA in pazienti in trattamento con NUC¹⁰⁻¹². Inoltre, elevati livelli di HBcrAg sierico sono stati associati con indici più alti di necroinfiammazione epatica e fibrosi¹³, con HBeAg positività^{10,14} e con attività trascrizionale di cccDNA nel fegato¹⁰, evidenziando la presenza di replicazione virale più attiva in pazienti positivi per HBcrAg. Inoltre, questo parametro correla con i livelli sierici di pgRNA sia in pazienti naive al trattamento che in quelli in terapia con NUC. In pazienti HBeAg-positivi trattati con peg-IFN, una risposta sostenuta al trattamento, con calo di HBV-DNA < 2000 UI/ml è stata associata con la riduzione combinata di HBcrAg e di HBV-RNA, mostrando che il monitoraggio di una combinazione di marcatori potrebbe essere utile nell'interpretazione degli esiti di terapia, con un valore predittivo potenziato da valutazioni quantitative¹⁵.

HBV Nucleic Acid-Related Antigen (HBV-NRAg)

Questo test rileva qualitativamente l'antigene PreS1 e HBcAg, con il primo che è stato dimostrato avere impiego potenziale come surrogato di attività di cccDNA e replicazione di HBV¹⁶. Alcuni studi hanno dimostrato che HBV-NRAg correla meglio con la presenza di HBV DNA nel siero rispetto a HBsAg e a HBeAg¹⁵. Questo test viene proposto dal costruttore in sostituzione della quantificazione relativa di HBV-DNA, con il vantaggio di essere più semplice ed economico.

HBsAg quantitativo

Mentre la ricerca qualitativa dell'antigene HBsAg nel siero è utile per la diagnosi e lo screening di infezione da HBV, la determinazione quantitativa di HBsAg nel siero dei pazienti è comunemente utilizzata in quanto informativa e predittiva della risposta al trattamento e di progressione di malattia, mentre la negativizzazione di HBsAg è considerata indicativa di cura funzionale di infezione cronica da HBV.

Recentemente sono stati sviluppati saggi ultrasensibili qualitativi e quantitativi, con soglia di rilevabilità ridotta da 10 a 250 volte rispetto a quelli tradizionali^{17,18}. Questi test possono trovare impiego per una più precoce diagnosi negli stadi iniziali di epatite acuta, come anche nel monitoraggio di riattivazioni virali, e nella rilevazione di una presenza residuale dell'antigene in seguito a siero-negativizzazione spontanea o indotta da terapia^{19,20}.

Anti-HBc quantitativo

Poiché la risposta umorale ad HBV è primariamente diretta verso l'antigene core HBcAg e questa risposta segue le fasi dell'infezione²¹, la misurazione degli anticorpi anti-HBc ha efficacia nel monitoraggio della storia naturale dell'infezione e della severità della malattia epatica. Infatti, è stata dimostrata una correlazione tra i livelli di anticorpi anti-HBc e valori di transaminasi (ALT)²², come pure livelli più bassi di anticorpi anti-HBc sono stati riportati in pazienti naive alla terapia, o anche in trattamento, in associazione con bassi indici di necroinfiammazione e di fibrosi epatica^{23,24}. Anche se per il monitoraggio della malattia epatica questo parametro non è sufficiente, in associazione ad altri test, come HBV-DNA ed HBsAg, ne migliora il potere predittivo. In particolare, analogamente al saggio quantitativo per HBsAg, anche la quantificazione di anticorpi anti-HBc può essere utile nella predizione di riattivazione virale in seguito a sospensione di terapia, in quanto alti titoli di anti-HBc al momento della sospensione sono risultati associati a minore rischio di riattivazione²⁵.

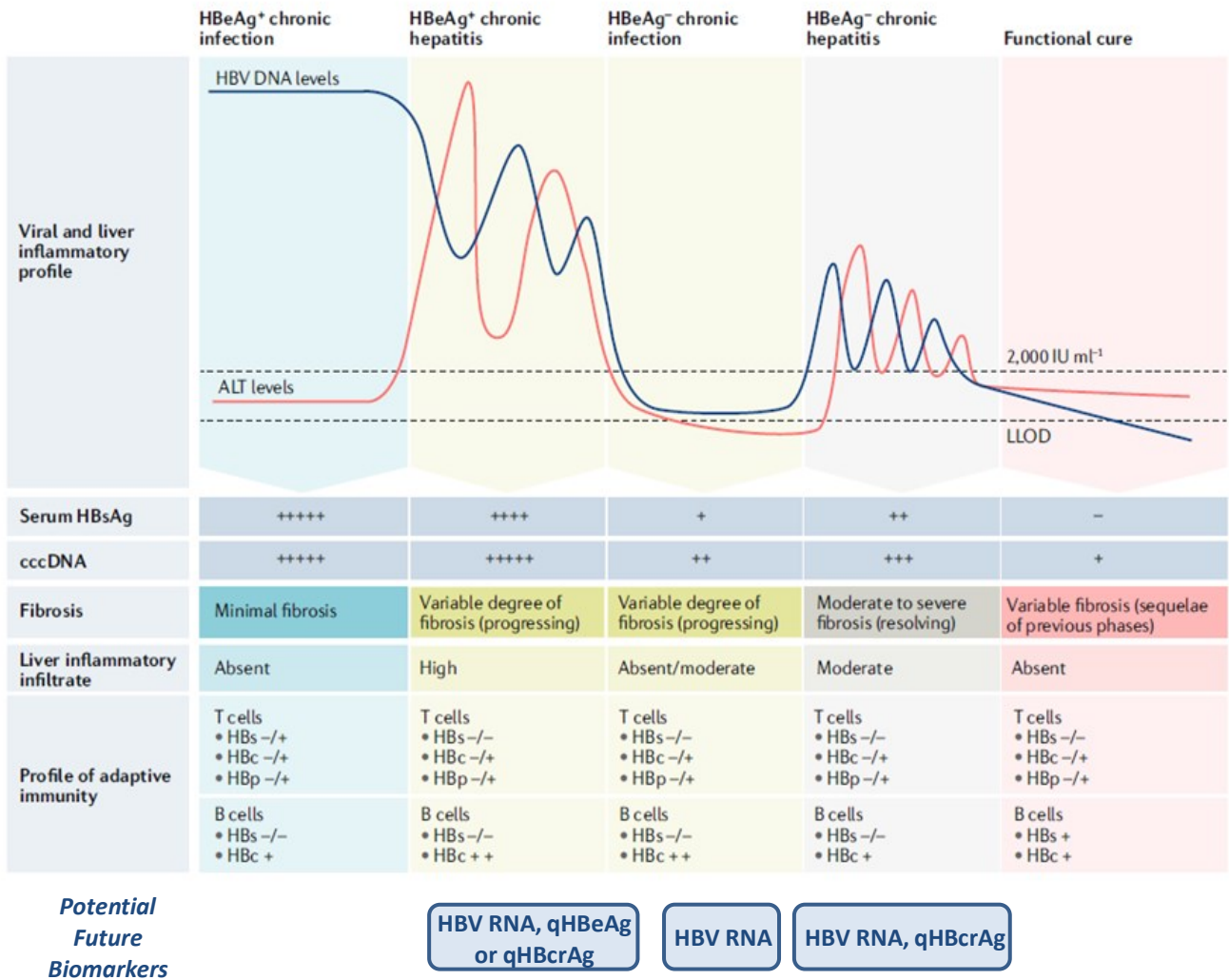


Figura 2. Fasi dell'infezione cronica da HBV e potenziali biomarcatori

(Modificato da: Fanning GC *et al.* Therapeutic strategies for hepatitis B virus infection: towards a cure. *Nat Rev Drug Discov.* 2020;19(4):291; e Coffin CS *et al.* New and old biomarkers for diagnosis and management of chronic HBV infection. *Gastroenterology* 2019;156(2):355-368.)

CENNI DI TERAPIA

La terapia dell'epatite cronica B, mediante la soppressione sostenuta della replicazione virale, si propone di migliorare la qualità della vita e prolungare la sopravvivenza prevenendo la progressione della malattia epatica e di conseguenza dello sviluppo di epatocarcinoma. Inoltre, la terapia antivirale si propone anche di prevenire la trasmissione verticale dell'infezione dalla madre al figlio e la prevenzione e il trattamento delle manifestazioni extra-epatiche HBV-associate. La regressione della fibrosi e della cirrosi possono essere considerate ulteriori goal del trattamento dei pazienti. L'eradicazione completa di HBV non è per ora un obiettivo perseguibile, poiché è nota la persistenza di cccDNA nel nucleo degli epatociti infettati in grado di sostenere riattivazioni del virus. Quindi, a fronte di un *end-point* ideale, rappresentato dalla *clearance* virale, difficilmente raggiungibile con gli attuali presidi terapeutici, gli *end-points* che realisticamente ci si prefigge di ottenere sono costituiti da:

- risposta virologica, definita come soppressione a lungo termine dei livelli di HBV DNA sotto il limite di rilevazione delle metodiche in uso
- risposta sierologica, indicata da negativizzazione di HBeAg, con o senza siero-conversione ad anti-HBe. Questo evento in pazienti HBeAg-positivi rappresenta spesso un parziale controllo dell'infezione cronica. L'*endpoint* ottimale è rappresentato dalla negativizzazione di HBsAg, con o senza siero-conversione ad anti-HBs. In questo caso si parla di cura "funzionale", e permette la sospensione sicura della terapia antivirale. Tuttavia è raramente raggiunta con i trattamenti attualmente a disposizione
- risposta biochimica, rappresentata dalla normalizzazione dei livelli di alanina-amino-trasferasi (ALT)
- risposta istologica, intesa come diminuzione dell'attività necroinfiammatoria senza peggioramento della fibrosi, comparata con il reperto pre-trattamento.

L'indicazione al trattamento di pazienti con epatite cronica da HBV si basa su:

- riscontro di attività di malattia (ECA, Epatite cronica attiva), ovvero presenza di livelli di ALT oltre il limite superiore di normalità, HBV-DNA maggiore di 2.000 UI/ml e attività necroinfiammatoria moderata-severa e/o fibrosi alla biopsia epatica;
- presenza di cirrosi compensata o decompensata indipendentemente dal livello di replicazione virale o di trasaminasi
- HBV-DNA > 20000 UI/ml, ALT > 2x limiti superiori, indipendentemente dal grado di fibrosi

- infezione cronica HBeAg-positiva o HBeAg-negativa con familiarità per epatocarcinoma o cirrosi e manifestazioni extraepatiche

Attualmente ci sono due opzioni terapeutiche per pazienti con epatite B cronica: interferone (IFN) α , la cui formulazione convenzionale è stata ormai soppiantata dall'Interferone α -2a peghilato (PEG-IFN α), e dagli Analoghi Nucleosidici (Lamivudina, Telbivudina, Emtricitabina, Entecavir) e Nucleotidici (Adefovir, Tenofovir, Tenofovir-Alafenamide), cui globalmente ci si riferisce con l'acronimo NUC⁴. Le strategie terapeutiche correnti si fondano rispettivamente sulla somministrazione di Interferone in regime a durata definita (generalmente pari a 48 settimane) o sulla somministrazione a lungo termine di Analoghi Nucleos(t)idici. Nei pazienti cronici candidati alla terapia, sia HBsAg+/HBeAg- che HBsAg+/HBeAg+, l'approccio di primo livello si basa sulla somministrazione di Interferone alfa-2a peghilato (PEG-IFN), mediante iniezione sottocutanea a cadenza settimanale, per 12 mesi. Il rationale di tale terapia risiede nell'azione antivirale, immunomodulante ed antiproliferativa dell'IFN α ; tale trattamento non è gravato dall'induzione di resistenza. Sono documentate possibilità sia di risposta virologica sostenuta dopo la sospensione, che di clearance di HBsAg. Per contro, l'ottenimento di risposte virologiche e biochimiche persistenti viene raggiunto in meno di un terzo dei casi: la normalizzazione protratta di ALT si verifica nel 26,2% dei casi (95% CI: 18,3-34%), mentre la soppressione sostenuta di HBV-DNA si ottiene nel 23,4% dei casi (95% CI: 17,9-28,8%). Inoltre la frequenza degli effetti collaterali - tra i quali astenia, sintomi simil-influenzali, fluttuazioni dell'umore, mielosoppressione, sviluppo o esacerbazione di manifestazioni autoimmuni - è elevata²⁶. Gli Analoghi Nucleos(t)idici, introdotti in terapia più recentemente, sono indicati in prima istanza nelle forme di infezione cronica HBeAg negative, nonché come trattamento di secondo livello nei pazienti che non mostrino risposta virologica sostenuta dopo un tentativo terapeutico con Interferone. Inoltre, questa strategia farmacologica è raccomandata in pazienti con cirrosi, indipendentemente dallo status di HBeAg. Gli Analoghi Nucleos(t)idici vengono somministrati per periodi di tempo indefiniti poiché, nonostante siano efficaci nel garantire una remissione virologica nella maggior parte dei pazienti nel periodo di assunzione, generalmente, al momento della sospensione del farmaco si verifica riattivazione dell'infezione. Tra gli svantaggi dei NUC va considerato il rischio di induzione di resistenze imputabili alla comparsa di mutazioni in grado di diminuire la sensibilità del virus al farmaco. I NUC di terza generazione (Entecavir e Tenofovir) sono agenti dotati di elevata barriera genetica (numero di mutazioni necessarie a produrre una marcata riduzione della suscettibilità al farmaco) e allo stesso tempo di elevata potenza (relazione tra concentrazione plasmatica raggiunta e intensità dell'effetto farmacologico); per tali ragioni sono considerati i farmaci di prima scelta da utilizzare in monoterapia nei pazienti naive. Quest'approccio terapeutico, rispetto al trattamento con IFN,

presenta maggiore tollerabilità e maneggevolezza (via di somministrazione orale) per il paziente²⁷. La scelta tra terapia con IFN o NUC in prima linea deve basarsi sulla valutazione di preferenze e *compliance* del paziente, sull'eventuale presenza di comorbilità mediche e psichiatriche e sull'entità del danno epatico.

NUOVE STRATEGIE TERAPEUTICHE

Come già anticipato, le terapie attualmente disponibili sono in grado di migliorare la qualità della vita e la sopravvivenza delle persone infette con HBV, sopprimendo la replicazione virale e riducendo la necroinfiammazione epatica, ritardando così l'insorgenza di complicanze come cirrosi ed epatocarcinoma. Tuttavia, il trattamento con NUC necessita di essere mantenuto per evitare riattivazioni virali e riacutizzazioni epatiche e in molti pazienti la completa soppressione della produzione virale non viene raggiunta dal trattamento con NUC. La comunità scientifica è quindi impegnata nell'identificazione nuovi farmaci antivirali e interventi immunologici finalizzati a curare l'infezione. Diversi meccanismi e strategie sono attualmente allo studio.

1. Farmaci ad azione antivirale

Il cccDNA è il target principale per la scoperta e lo sviluppo di nuovi farmaci antivirali. A questo scopo sono attualmente allo studio nuove strategie antivirali: quelle che riducono la produttività del cccDNA e ne riducono il pool prevenendo il riciclo intracellulare di cccDNA o nuovi cicli di infezione, e strategie dirette che mirano a eradicare il cccDNA dalle cellule infette o silenziare la sua attività trascrizionale. Di seguito si accennerà a queste nuove strategie.

Inibitori dell'entry

Strategie che mirano a inibire l'*entry* virale comprendono lo sviluppo di peptidi derivati da HBsAg, come il Myrcludex B (MyrB), che è un peptide miristolato, derivato da 47 aminoacidi del dominio pre-S1 di L-HBsAg²⁸. Quando MyrB è stato usato in monoterapia in pazienti con coinfezione HBV/HDV, si è osservato un decremento di 2,84 log nei livelli di HDV-RNA dopo 48 settimane di trattamento, con un declino maggiore quando veniva usato in combinazione con IFN α per lo stesso periodo di tempo²⁹. La sinergia tra MyrB e IFN α era evidente anche relativamente al declino di HBsAg nel 40% dei pazienti, che sono stati classificati come "*responders*", mentre nel 26,7% si è osservata la siero-negativizzazione di HBsAg.

Piccole molecole, come Ezetimibe e derivati della ciclosporina sono state valutate in modelli sperimentali per la loro abilità di inibire l'*entry* virale e alcuni composti agiscono indipendentemente dal recettore NTCP³⁰⁻³².

L'*entry* può essere anche inibita da anticorpi monoclonali diretti contro epitopi di HBsAg. Questi anticorpi sono stati valutati per la loro capacità di accelerare la *clearance* virale e neutralizzare il virus circolante; inoltre possono avere un'attività antivirale aggiuntiva in quanto sono in grado di interferire con HBsAg presente nel siero e con la secrezione di virus infettivo³³⁻³⁶.

Induttori della degradazione di cccDNA

L'inibizione della formazione del cccDNA è una strategia attraente, anche se necessita di una più ampia comprensione degli eventi biochimici coinvolti in questo processo³⁷. Una volta formato, il cccDNA può potenzialmente essere aggredito da nucleasi *zinc-finger* o nucleasi "*activator-like*", che sono state usate con successo in modelli di colture cellulari per modificare il cccDNA di HBV³⁸.

Esperimenti pre-clinici hanno mostrato che strategie basate sulle endonucleasi CRISPR-Cas9 possono portare a mutazioni e delezioni che inattivano funzionalmente il cccDNA³⁹; più del 90% del DNA di HBV può infatti essere frammentato da Cas9. Tuttavia, approssimativamente il 7% dei genomi cccDNA vengono riparati, con la formazione di mutanti che potrebbero non annullare la funzione del gene interessato. Inoltre, prima che questi approcci possano venire utilizzati nella clinica, alcuni potenziali problemi devono essere studiati attentamente, tra cui l'interessamento dell'epatocita, effetti aspecifici, intervento su HBV-DNA integrato con eventuali imprevedibili conseguenze di ricombinazione cromosomica. Nonostante questi motivi di precauzione, la mutagenesi mediata da endonucleasi è attualmente l'unico approccio sperimentale che può portare alla inattivazione permanente del cccDNA nel tessuto⁴⁰.

Un ulteriore approccio potenziale riguarda una piccola molecola che ha indotto la diminuzione del *pool* di cccDNA in epatociti primari umani e nel modello murino, accompagnato dalla diminuzione di trascritti e di antigeni virali; la sua precisa modalità di azione è tuttora allo studio⁴¹.

Strategie mirate alla espressione dei geni virali

Si ritiene che un'elevata carica virale abbia un ruolo importante nell'instaurarsi della cronicizzazione e nel suo mantenimento, di conseguenza c'è interesse nel ridurre direttamente l'espressione degli antigeni virali e delle proteine regolatorie, silenziando la trascrizione del cccDNA o degradando l'RNA virale.

Controllo trascrizionale

La modificazione del controllo epigenetico del cccDNA tramite i farmaci epigenetici sarebbe probabilmente associato ad eventi avversi sulla omeostasi cellulare, quindi devono essere valutate strategie mirate specificamente ai fattori virali⁴². Il controllo trascrizionale dell'espressione di cccDNA può essere raggiunto intervenendo sulla proteina HBx, o core, entrambe implicate nella stabilità e/o nell'espressione del cccDNA⁴³⁻⁴⁵.

È recentemente emerso che HBx promuove la trascrizione di cccDNA, dirottando la proteina cellulare DDB1 alla degradazione del complesso SMC5/6, quindi approcci diretti all'interazione HBx-DDB1 sono degni di interesse.

Il Pevonedistat, un inibitore dell'enzima attivatore di NEDD8, è stato in grado di ripristinare i livelli di SMC5/6 e di sopprimere la trascrizione virale e la produzione di proteine in colture di epatociti⁴⁶.

La Nitazoxanide, un tiazolide approvato da FDA per le enteriti da protozoi, ha mostrato di inibire efficientemente l'interazione HBx-DDB1, ristabilire i livelli di SMC5 e sopprimere la trascrizione e la produzione di proteine virali in colture di linfociti⁴⁷.

Il trattamento di cellule con IFN α riduce la trascrizione di HBV, probabilmente perché l'istone deacetilasi cellulare HDAC1 è richiamata ad intervenire sul cccDNA, riducendo l'acetilazione dei residui K27 e K122 dell'istone H3⁴⁶, anche se non è ancora noto se l'attività osservata per IFN α sia legata al ruolo di HBx nella trascrizione.

C646, una piccola molecola con azione inibente selettiva per le acetiltrasferasi istoniche CBP e p300, ha mostrato di inibire la trascrizione di HBV da cccDNA in colture di epatociti primari^{44,48}.

Sebbene queste osservazioni suggeriscano vie di silenziamento dell'attività trascrizionale di HBV, al momento manca la desiderata selettività per il cccDNA.

Analogamente la molecola GS-5801 recentemente descritta, inibisce la trascrizione del cccDNA bloccando l'attività della lisina demetilasi 5. Questo porta ad un globale aumento della trimetilazione del residuo K4 dell'istone H3 sulla cromatina cellulare che è poi lentamente diminuita dopo la sospensione dell'uso del farmaco; il silenziamento trascrizionale del cccDNA durava per più di 10 giorni dopo una singola applicazione del farmaco⁴⁹.

Controllo post-trascrizionale

Strategie contro HBV basate sugli acidi nucleici hanno utilizzato l'*RNA interference*, oligonucleotidi antisenso (ASO) ed enzimi a RNA (ribozimi)⁵⁰.

Il potenziale degli *small interfering RNA* (siRNA) per la cura di HBV è stata dimostrata dal composto ARC-520. La risposta differenziale ad ARC-520 in pazienti con epatite B cronica (soprattutto in pazienti HBeAg positivi, naive per terapia NUC) non era prevista da modelli in cui cccDNA è l'unica fonte di trascritti HBV³, mentre i dati sottolineano l'importanza dell'HBV-DNA integrato, come sorgente addizionale di HBsAg³. Sebbene sia noto che anche l'HBV-DNA integrato contribuisce alla produzione di HBsAg, non è completamente chiaro quanto sia importante per regimi potenzialmente curativi bloccare la trascrizione e la traduzione di sequenze integrate.

Gli ASO sono dipendenti dalla complementarità della sequenza al loro target. Sono stati riportati diversi studi sugli effetti antivirali *in vitro* degli ASO contro HBV in linee cellulari che esprimono HBV e in topi transgenici HBV⁵¹. Gli ASO si differenziano dai siRNA in quanto, una volta che essi sono legati alla loro sequenza target, la degradazione dell'RNA è mediata dalla RNasi H, risultando nella frammentazione dell'mRNA virale. Analogamente ai siRNA, dovrebbero essere sviluppati molteplici ASO in considerazione delle variazioni delle sequenze che si verificano tra pazienti.

ASO e siRNA sono grandemente differenziati dal numero delle sequenze target, la specifica chimica degli acidi nucleici e le strategie di delivery. Tutte queste variabili possono influenzare costi, stabilità, attività, effetti off-target e accumulo degli oligonucleotidi nel fegato³⁷.

Gli effetti dei siRNA nei trial clinici sono promettenti, per esempio JNJ3989 (ARO-HBV) è un siRNA di seconda generazione che ha indotto una diminuzione da 1,3 a 3,8 log nei livelli di HBsAg, dopo 3 somministrazioni⁵².

In termini di potenziale curativo, non è attualmente chiaro fino a che soglia sia necessario abbassare i livelli di HBsAg e per quanto tempo questo decremento richieda di essere mantenuto, o quale background immunitario permetta una possibile ripresa della risposta immunitaria HBV-specifica³⁷. Anche piccole molecole possono essere usate per inibire gli RNA virali (*RNA destabilizers*). RG7834 è una nuova piccola molecola somministrabile per via orale⁵³. A differenza delle terapie con NUC, RG7834 ha ridotto significativamente i livelli di proteine virali (compreso HBsAg) e la viremia. Una combinazione di RG7834, Entecavir e peg-IFN α , ha indotto la riduzione significativa sia di HBV DNA che dei livelli di HBsAg in topi con fegato umanizzato. Studi molecolari hanno suggerito che RG7834 modifica gli RNA virali per promuovere la loro degradazione, con una preferenza per l'RNA subgenomico⁵⁴.

Assemblaggio del capsido

L'uso potenziale di inibitori dell'assemblaggio del capsido in combinazione con i NUC si basa sull'ipotesi che l'ulteriore riduzione del virus rispetto ai livelli raggiungibili con la terapia NUC

possa incrementare la ricostituzione della risposta immunitaria HBV-specifica. I composti che interferiscono con l'assemblaggio del capsido ricadono in due categorie sulla base delle caratteristiche morfologiche che il capsido assume in presenza del composto:

- i. i modulatori allosterici della proteina core (CpAM), rappresentati dalle etero-di-idro-pirimidine, come GLS4 e RO7049389, che portano alla formazione di polimeri core con capsidi aberranti, e
- ii. dell'assemblaggio dei capsidi, come le fenilpropenamidi o sulfamoidbenzamidi, che portano alla formazione di capsidi morfologicamente normali, non contenenti acido nucleico virale^{37,55-59}.

Entrambe le classi di molecole riducono il rilascio di particelle virali infettanti, riducendo quindi l'ammontare di HBV DNA ed RNA che esiste nella cellula. Entrambi i tipi di inibitori hanno mostrato di bloccare il trasporto dei nucleocapsidi nel nucleo e quindi la formazione di cccDNA durante l'infezione.

In studi clinici di breve termine (inferiori a 12 mesi), i livelli di HBV-DNA ed RNA si sono ridotti nel siero sia di pazienti HBeAg-positivi che HBeAg-negativi^{37,55,58,59}. Trattamenti più lunghi hanno portato ad una ulteriore riduzione dei livelli di HBV DNA, ma senza calo di HBsAg. Tuttavia, HBsAg era diminuito in modelli animali di infezione^{37,59,60}.

Rilascio di HBsAg

I polimeri antivirali appartengono ad una classe di inibitori dell'*entry* o dell'attacco virale ad ampio spettro, la cui attività aumenta con la lunghezza dei polimeri e con il loro carattere idrofobico. I componenti più nuovi di questa classe di composti sono i polimeri di acidi nucleici, la cui attività è derivata dalle proprietà dei polimeri anfipatici oligonucleotidi fosforotioato. I meccanismi virali e l'ampio spettro di attività antivirale dei polimeri non sono del tutto chiare, ma rispecchiano la funzionalità degli altri membri di questa classe. Esercitano anche una attività *post-entry*: l'inibizione del rilascio di HBsAg dagli epatociti infetti⁶¹.

In un trial clinico recentemente pubblicato, il trattamento combinato di REP 2139 (un polimero antivirale) e IFN α ha ristabilito il controllo della coinfezione da HBV e HDV e ha normalizzato i livelli delle sierotrasferasi, come le ALT, in una elevata proporzione di pazienti dopo 1 anno di terapia. L'effetto antivirale era associato con elevazione delle ALT e successiva sieroconversione in un numero sostanziale di pazienti⁶². Dati più recenti in pazienti con epatite B cronica, che

ricevevano una combinazione di tenofovir, peg-IFNa e un polimero, hanno mostrato la perdita di HBsAg nel 50% dei pazienti dopo 48 settimane di *follow up*⁶³.

Il potenziale di questa classe di composti sta attualmente emergendo attraverso l'acquisizione di dati clinici. Capire più a fondo i loro meccanismi d'azione e monitorare attentamente gli episodi di riattivazione indotti provvederà nuove opportunità per biomarcatori, stratificazione dei pazienti e combinazione con altri agenti per ottimizzare la negativizzazione di HBsAg.

2. Immunomodulazione

L'attivazione dei meccanismi immunologici che permettono la risoluzione spontanea dell'infezione da HBV può portare al trattamento dell'infezione cronica.

Strategie mirate al sistema immunitario innato

Le terapie che agiscono sull'immunità innata sfruttano principalmente l'efficacia antivirale diretta delle citochine (TNF α , IFN α , IFN γ e IL-1 β), ma sono finalizzate anche all'attivazione dell'immunità adattativa³⁷.

La terapia con IFN α è basata su questo razionale. È efficace in una minoranza di pazienti (circa il 5-10%), in cui induce una vera e propria "*functional cure*". Il meccanismo d'azione non si basa solo sull'effetto antivirale diretto dell'IFN α , ma anche sulla sua abilità ad attivare la risposta NK^{64,65}. Inoltre, i pazienti che diventano HBsAg sieronegativi in seguito a trattamento con IFN α ripristinano stabilmente la risposta T linfocitaria HBV-specifica⁶⁶.

Una terapia a base di citochine antivirali potrebbe inoltre eliminare anche il cccDNA, che rappresenta la strategia più diretta ed efficiente per curare l'epatite B cronica. L'osservazione derivante da studi *in vitro* che IFN α o la linfotossina- β può indurre la deaminazione APOBEC-dipendente del DNA virale ha portato ad una considerevole discussione riguardo alla possibilità che questo possa diminuire i livelli di cccDNA negli epatociti infetti, senza ucciderli⁶⁷. Lo stesso gruppo ha mostrato che, come IFN α e linfotossina β , anche TNF α ed IFN γ potevano indurre la perdita di cccDNA attraverso la deaminazione⁶⁸.

L'attivazione dell'immunità innata nei pazienti con infezione cronica da HBV può anche essere raggiunta attraverso agonisti dei Toll-like receptors (TLR) o di RIG-I. Questi composti attivano l'immunità innata direttamente negli epatociti (RIG-I) o nelle cellule immunitarie (TLR7 e 8)⁶⁹⁻⁷¹ in seguito a somministrazione orale.

Studi in scimpanzè e in marmotte hanno evidenziato una risposta antivirale sostenuta da parte dell'agonista di TLR7, GS-9620⁷¹. Un altro studio condotto in pazienti ha dimostrato che questo composto può stimolare le risposte da parte dei linfociti NK e T in pazienti con infezione cronica in terapia con NUC⁷². Questo non è stato tuttavia sufficiente per indurre il controllo completo dell'infezione, probabilmente a causa delle dosi particolarmente basse utilizzate nell'uomo con l'intento di evitare possibili effetti tossici. Recentemente un nuovo agente agonista del TLR7, APR002, è stato usato da solo o in combinazione con Entecavir nel modello di infezione della marmotta. Questo composto ha mostrato un tropismo preferenziale per il fegato, minimizzando così l'esposizione sistemica e promuovendo un controllo virale sostenuto negli animali⁷³.

Un grosso interesse si è concentrato su GS-9688 (Segantolimod), un agonista di TLR8, la cui stimolazione porta alla produzione di citochine immunomodulatorie (es. IL-12, IL-18) e pro-infiammatorie (es. IL-1 β , TNF α), risultando in una intensa produzione di IFN γ da parte delle cellule residenti nel fegato. Attraverso questi effetti, l'agonista di TLR8 ha dimostrato attività antivirale sia *in vitro*, in epatociti umani primari, che *in vivo*, in marmotte cronicamente infette con WHV (il virus dell'epatite delle marmotte)^{74,75}.

SB9200 è un piccolo dinucleotide che attiva RIG-I, stimolando di conseguenza il signaling dell'IFN. Il pretrattamento con SB9200, seguito da Entecavir ha mostrato efficacia antivirale ed aumentata espressione degli interferoni di tipo I nel sangue e nel fegato di marmotte con infezione cronica da WHV⁷⁶. Tuttavia, nonostante risultati promettenti dimostrati negli esperimenti con gli animali, nell'uomo la stimolazione di RIG-I non rappresenta attualmente una prospettiva terapeutica praticabile in quanto un trial di fase II è stato interrotto a causa di seri eventi avversi inaspettati.

Strategie rivolte alla immunità adattativa

Poiché in corso di epatite cronica B l'immunità virus-specifica è disfunzionale, può in parte essere rinvigorita dall'utilizzo degli inibitori dei "checkpoints" (come per esempio anticorpi anti-PD1 o anti-CTLA4) o di vaccini terapeutici. Gli anticorpi che bloccano l'interazione di PD1 con i suoi ligandi possono parzialmente ripristinare le risposte T e B linfocitarie HBV-specifiche⁷⁷⁻⁸⁰.

La terapia anti-PD1 ha un effetto antivirale limitato e richiede l'appropriata selezione dei pazienti sulla base delle loro caratteristiche virologiche e cliniche, inoltre la dose più appropriata di anticorpi anti-PD1 deve ancora essere identificata³⁷.

Diversi trial hanno testato vaccini terapeutici per l'epatite B cronica⁸¹, ma attualmente l'unico studio che ha mostrato una buona efficacia si riferisce ad un piccolo trial con una vaccinazione terapeutica in combinazione con la somministrazione di anticorpo anti-PD1 nelle marmotte⁸².

La scarsa efficacia di approcci immunoterapeutici per la stimolazione dell'immunità anti-HBV in pazienti con infezione cronica è probabilmente dovuta alle caratteristiche della risposta immunitaria: i linfociti T HBV-specifici sono rari e hanno un fenotipo esaurito, con alterazioni metaboliche⁸³, quindi rispondono debolmente alle stimolazioni rappresentate dai vaccini terapeutici. Per aggirare questo ostacolo, è stato proposto il trasferimento (“*adoptive transfer*”) di linfociti ingegnerizzati HBV-specifici⁸⁴⁻⁸⁶. Di conseguenza sono stati sviluppati e studiati diversi metodi per modificare i linfociti T: o con un recettore antigenico chimerico contenente un dominio anticorpale HBsAg-specifico, oppure con un *T cell receptor* canonico^{87,88}. Questi linfociti T ingegnerizzati riconoscono dei bersagli infettati da HBV *in vitro*, e dati originati in modelli animali o da situazioni cliniche selezionate sono incoraggianti^{84,88,89}.

Ci sono tuttavia diversi tipi di ostacoli nell'implementare l'uso di questa strategia per uso clinico, non ultimo la difficoltosa produzione di grosse quantità di tali cellule, che richiede personale altamente specializzato⁹⁰.

Per queste ragioni sono state anche proposte strategie che utilizzano anticorpi con specificità simili al TCR, o TCR solubili che possono re-indirizzare linfociti T endogeni verso epatociti infetti^{91,92}. Anticorpi e TCR solubili sono disegnati in modo da causare l'accumulo dei linfociti T in organi particolari. Questa strategia è stata sperimentata nel campo delle infezioni da HIV⁹³.

LA RISPOSTA IMMUNITARIA ALL'INFEZIONE DA VIRUS DELL'EPATITE B

Una rete complessa di interazione tra fattori virali e immunitari, sia innati che acquisiti, va ad influenzare la progressione clinica dell'infezione da virus dell'epatite B. Se, da una parte, è universalmente riconosciuto il ruolo di una intensa risposta cellulo-mediata nell'eradicazione dell'infezione, dall'altra la conoscenza dei processi immunitari innati, che si verificano in risposta all'ingresso di HBV nell'ospite, è ancora in parte limitata^{94,95}.

Immunità innata

I processi immunitari innati sono caratterizzati dall'induzione di uno stato antivirale e dalla produzione di IFN di tipo I (α e β), fenomeni questi che si scatenano a seguito del riconoscimento dei patogeni da parte dei toll-like receptors (TLRs); a loro volta, gli IFN-I (α e β) stimolano le cellule presentanti l'antigene (cellule dendritiche e cellule di Kupffer) a secernere IL-8, IL-12, IL-18 e altre citochine, che successivamente attivano le cellule Natural Killer (NK).

Purtroppo le conoscenze sul ruolo dell'immunità innata nell'epatite B sono limitate dalla ridotta disponibilità di modelli di infezione *in vitro* ed *in vivo*, e dalle difficoltà tecniche che si hanno nel reclutare pazienti negli stadi precoci della patologia.

Nell'infezione da HBV acquisita in età adulta, solitamente autolimitante, una caratteristica tipica è che HBV rimane quiescente per alcune settimane prima di iniziare una fase di replicazione attiva esponenziale, che può portare ad elevati livelli di viremia e alla potenziale infezione di tutti gli epatociti. Il picco di replicazione virale è seguito da un rapido declino della viremia, che generalmente inizia prima della massima elevazione delle transaminasi. Questo controllo precoce è probabilmente sostenuto da meccanismi non citolitici⁹⁶, come gli interferoni di tipo I. Tuttavia, dati derivanti da modelli animali indicano la mancata espressione di geni inducibili, associati all'infezione e all'espansione del virus, riflettendo una scarsa attivazione del sistema innato^{97,98}.

In linea con queste osservazioni, la produzione di citochine durante l'infezione acuta da HBV è risultata ridotta e in ritardo rispetto a quanto avviene durante l'infezione acuta da HIV⁹⁹. Inoltre, una bassa produzione di IFN di tipo I, IL-15 ed IFN- λ , insieme ad elevati livelli di IL10 sono stati riportati negli stadi precoci dell'infezione acuta da HBV in uno studio longitudinale, in cui i pazienti erano studiati nella fase pre-clinica dell'infezione¹⁰⁰. In contrasto con questi dati indicanti una ridotta attivazione dell'immunità innata, altri studi mostrano invece che quest'ultima è in grado di

rilevare l'infezione da HBV. E' infatti noto che sensori degli acidi nucleici come RIG-1 e cGAS, siano in grado di riconoscere HBV¹⁰¹.

Inoltre, l'espressione dei geni dell'immunità innata a livello intraepatico è stata osservata immediatamente dopo l'infezione in marmotte infettate con WHV¹⁰². Tuttavia questa attivazione è transitoria e stimolata dall'inoculo di elevate concentrazioni virali. Il ruolo della risposta innata nel controllo iniziale dell'infezione da HBV è quindi ancora soggetto di dibattito, anche se il punto di vista predominante è che HBV abbia sviluppato specifiche strategie per evadere il riconoscimento del sistema innato, tra cui, l'uso di un templatato trascrizionale (cccDNA) che è sequestrato all'interno del nucleo delle cellule infette durante il ciclo replicativo virale^{103,104}. Inoltre, un altro studio ha mostrato la capacità del virus di inibire l'induzione di IFN- β , interferendo con le vie di signalling attivate da TLR-3 e da RIG-1¹⁰⁵.

In aggiunta alla capacità di evadere il riconoscimento da parte dell'immunità innata, HBV è in grado di mettere in atto meccanismi di inibizione, per esempio interferendo con la produzione di IFN di tipo I per mezzo delle sue proteine non strutturali¹⁰⁶⁻¹¹⁴. Anche le proteine virali secrete come HBsAg e HBeAg sono state riportate in grado di sopprimere l'espressione dei *Toll Like Receptors* (TLR) e di indurre la produzione di citochine regolatorie, come IL-10. Ad esempio, le particelle subvirali secrete in circolo sembrano inibire, nelle cellule dendritiche plasmocitoidi, la produzione di IFN- α mediata da TLR-9¹¹⁵. Anche le cellule di Kupffer, oltre alle altre numerose funzioni, svolgono un compito nel creare un microambiente epatico immuno-soppressivo, grazie alla produzione di IL-10 indotta dal legame tra TLR-2 e proteina core di HBV¹¹⁶.

Immunità adattativa

Mentre, come si è visto, la branca innata dell'immunità è utile ad ottenere un rapido controllo della replicazione virale, non ci sono dubbi sull'importanza dei linfociti B e T specifici nella risoluzione dell'infezione da epatite B. Nello specifico, l'immunità umorale aiuta a combattere l'infezione da HBV attraverso la produzione di anticorpi diretti contro le differenti proteine di HBV¹¹⁷. Gli anticorpi HBV-specifici sono importanti sia come meccanismo di protezione, sia come marcatori per distinguere le diverse fasi naturali dell'infezione. Durante un'infezione acuta da HBV, gli anticorpi anti-HBs e anti-HBc hanno una diversa cinetica di comparsa, ma solo gli anticorpi anti-HBs sono associati alla risoluzione della malattia e considerati protettivi verso eventuali reinfezioni.

Nonostante la produzione di anticorpi specifici contro HBV sia un elemento importante per la risoluzione dell'infezione, l'elemento chiave per il raggiungimento della clearance virale è la risposta immunitaria acquisita di tipo cellulo-mediata.

Risposta NK e T linfocitaria

A differenza delle risposte innate, quelle adattative risultano efficacemente indotte immediatamente dopo l'inizio della replicazione virale^{118,119}. Sebbene i linfociti T virus-specifici risultino rilevabili diverse settimane dopo l'infezione, queste risposte sono solo apparentemente in ritardo rispetto al momento dell'infezione, a causa dell'iniziale quiescenza del virus, che probabilmente non fornisce un sufficiente livello di stimolazione per l'espansione T linfocitaria. Un ruolo chiave nel reclutamento dei linfociti T CD8 nel fegato infetto è giocato dall'attivazione delle piastrine, che può facilitare la migrazione dei linfociti CD8 dal torrente sanguigno con accumulo nel parenchima epatico¹²⁰⁻¹²². Le citochine rilasciate dai linfociti virus-specifici infiltranti il fegato sono ritenute la causa principale della risoluzione dell'infezione^{96,123}. Infatti, in corso di epatiti acute auto-limitanti, il titolo di HBV-DNA sierico diminuisce di più del 90% entro 2-3 settimane dal picco della replicazione virale e prima del rilevamento del danno epatico, indicato dall'innalzamento dei valori di transaminasi (ALT). In questo modo una grossa quantità di virus viene eliminata senza distruzione del parenchima epatico. Naturalmente il reclutamento di linfociti virus-specifici citotossici nel fegato porta anche alla morte degli epatociti infetti, infatti i linfociti T CD8 HBV-specifici agiscono anche lisando direttamente gli epatociti attraverso la secrezione di granuli litici (Perforine e Granzyme A/B,), o tramite apoptosi mediante l'attivazione della via Fas/Fas ligando, con la conseguente infiltrazione di cellule non antigene specifiche (neutrofili, macrofagi), facilitata dalla secrezione di chemochine (come CXCL-10) e dalla attivazione piastrinica, che amplifica il danno epatocellulare e la malattia epatica, inizialmente indotte da meccanismi virus-specifici¹²⁰⁻¹²³. La popolazione linfocitaria CD4 non svolge, a differenza delle CD8, un ruolo centrale come effettrice ma risulta fondamentale per l'attivazione e, soprattutto, per il mantenimento dei linfociti T CD8 e dei linfociti B virus-specifici. I linfociti T CD4 sono inoltre considerati i maggiori produttori di IL-2 e IL-21, citochine che influenzano il differenziamento dei linfociti T CD8¹²⁴.

Le risposte T linfocitarie virus-specifiche nella fase acuta dell'infezione sono tipicamente multispecifiche, di tipo Th1, poli-funzionali e più intense rispetto a quelle rilevate nella fase cronica dell'infezione^{125,126}.

I linfociti Natural Killer (NK), che sono in grado di produrre citochine antivirali, come IFN- γ e TNF- α contribuiscono al controllo non citolitico dell'infezione. Anche in assenza di una precoce induzione di citochine pro-infiammatorie, le cellule NK rimangono in grado di rispondere all'infezione acuta da HBV nel fegato, grazie ai bassi livelli di espressione delle molecole MHC di classe I da parte degli epatociti¹²⁷ e anche all'elevata frequenza di cellule NK nel fegato, in cui normalmente costituiscono il 30-40% della popolazione linfocitaria intraepatica. Tuttavia, in contrasto all'attivazione tempestiva dei linfociti T, nelle infezioni acute l'attivazione dei linfociti NK risulta ritardata, come osservato in studi longitudinali eseguiti a partire dal primo rilevamento di HBsAg e HBV-DNA, rivelando un'attivazione limitata dei linfociti NK durante l'incremento della carica virale, con il picco di frequenza delle cellule NK in corrispondenza della risoluzione della viremia. Questa inibizione temporanea dell'attivazione NK è stata associata all'induzione di IL-10¹⁰⁰, sollevando ancora una volta la possibilità che HBV possa attivamente evadere la risposta immunitaria. In contrasto con questi risultati di induzione tardiva della risposta NK, i risultati osservati nel modello sperimentale delle marmotte infettate con alte dosi di WHV mostrano l'attivazione di geni correlati all'attivazione NK immediatamente dopo l'infezione¹⁰². Inoltre, in pazienti con infezione acuta subclinica con bassi livelli di viremia e senza elevazione delle transaminasi, l'attivazione dei linfociti NK e delle loro funzioni effettrici è risultata facilmente rilevabile prima della espansione dei linfociti T virus-specifici¹¹⁹.

Per evitare un'eccessiva patologia indotta dalla risposta immunitaria, vengono messi in opera meccanismi regolatori di inibizione dei linfociti T, grazie all'effetto di fattori solubili, come l'enzima arginasi rilasciato dalle cellule necrotiche del fegato¹²⁸.

Questa inibizione funzionale è solo transitoria, perché la risoluzione dell'infezione è associata al declino delle cellule T attivate, con aumento dell'espressione di CC127 e declino di PD-1, e il ripristino della funzionalità T linfocitaria con la maturazione della memoria immunologica protettiva^{77,129}. Nell'infezione da HBV la memoria immunologica non è tipicamente antigene-indipendente¹³⁰, ma è piuttosto mantenuta dalla continua esposizione dei linfociti T a piccole quantità di antigeni virali, in quanto si ritiene che il virus non venga mai completamente eliminato dal fegato infetto. Questo meccanismo può attivare risposte anticorpali e T linfocitarie di buona qualità, che sono proteggenti, ma non sterilizzanti.

Al contrario di quanto avviene nell'infezione acuta autolimitantesi, il processo di cronicizzazione di HBV, di gran lunga più frequente nell'infezione acquisita nel periodo perinatale, è contraddistinto dalla presenza di risposte T linfocitarie tardive, disfunzionali e inefficienti, che non sono in grado di controllare la replicazione virale: tale processo multifattoriale e progressivo è noto con il nome di *exhaustion* dei linfociti T¹³¹.

EXHAUSTION T LINFOCITARIA

In corso di epatite cronica da HBV, i linfociti T virus-specifici sono profondamente disfunzionali, con la severità del loro stato di iporesponsività dipendente dai livelli e durata di viremia e antigenemia. Tale stato disfunzionale viene chiamato esaurimento (o *exhaustion*) T linfocitario, ed è caratterizzato dalla perdita progressiva delle funzioni effettrici a causa della persistente esposizione dei linfociti T a elevate concentrazioni di antigeni virali¹³². Questo fenomeno, osservato per la prima volta in modelli murini di infezione cronica, è stato successivamente descritto anche in corso di infezioni virali croniche umane e nel tumore¹³². Sono stati identificati diversi livelli di disfunzione T linfocitaria, con la produzione di IL-2, l'attività citolitica, proliferativa e la polifunzionalità perse per prime, seguite dalla produzione di IFN- γ e TNF- α , fino alla delezione fisica dei linfociti T agli stadi terminali¹³³. Oltre alla stimolazione antigenica cronica, ulteriori fattori estrinseci contribuiscono alla disfunzione T linfocitaria, come l'aumento dell'attività dei linfociti regolatori, la produzione di citochine inibitorie e la perdita della risposta T CD4 helper¹³⁴⁻¹³⁶. Il confronto di profili di espressione genica dei linfociti T CD8 virus-specifici derivanti da topi con infezione acuta o cronica da LCMV hanno condotto alla scoperta dell'elevata espressione del recettore inibitorio PD-1 nella infezione cronica, e al suo ruolo nel promuovere il fenotipo disfunzionale^{137,138}. In seguito, anche la co-espressione di altri recettori inibitori up-regolati è stata associata all'esaurimento funzionale dei linfociti T^{134,139}. Tipicamente, più alto è il numero dei recettori inibitori co-espressi dei linfociti T, più severo è lo stato di esaurimento¹³⁸. Ulteriori caratteristiche dei linfociti esauriti sono rappresentate da alterazione del programma trascrizionale, metabolismo alterato, perdita di marcatori di memoria e up-regolazione di alcuni fattori trascrizionali, tra cui Eomes e Blimp-1, con esaurimento più severo associato ad elevata espressione di Eomes^{140,141}. A tal riguardo è stato recentemente dimostrato che non solo il livello di espressione di Eomes, ma anche la sua localizzazione intracellulare influenza il grado di esaurimento funzionale. Infatti, quando è presente all'interno del nucleo, Eomes regola l'espressione di PD1, in competizione con un altro fattore di trascrizione, Tbet. Quindi un più alto rapporto Eomes/Tbet può aumentare l'espressione di PD-1, dal momento che Eomes ha dimostrato di essere un repressore di PD-1 più debole di Tbet¹⁴².

In corso di infezione cronica da HBV sia i linfociti T CD8 che CD4 sovra-esprimono recettori inibitori, che regolano la funzione linfocitaria in seguito al legame con i corrispettivi ligandi^{77,143-146}. A livello intraepatico, i linfociti CD8 HBV-specifici mostrano la massima up-regolazione di PD-1, seguita da altri corecettori inibitori, come 2B4, LAG3, CD160¹⁴³. Anche un'elevata espressione di diversi ligandi, come PD-L1 e galectin-9 è stata osservata su cellule presentanti

l'antigene (APC) e su cellule di Kupffer residenti nel fegato^{147,148}. Da un punto di vista meccanicistico, in seguito al legame PD-1/PD-L1, si verifica la de-fosforilazione di CD28 e di altri mediatori associati al signaling del T cell receptor (TCR), portando all'attenuazione del signaling corrispondente e alla up-regolazione dei geni inibitori¹⁴⁹⁻¹⁵², con PD1 e CTLA4 noti per intervenire anche nel metabolismo cellulare, inibendo la glicolisi¹⁵³. Inoltre, i linfociti HBV-specifici exhausted, che sono stati descritti come più inclini all'apoptosi a causa dell'up-regolazione del recettore TRAIL-2 e del mediatore pro-apoptotico BIM¹⁵⁴⁻¹⁵⁶, hanno mitocondri disfunzionali, con un'elevata produzione di specie reattive dell'Ossigeno (ROS) e scarsa capacità di usare la fosforilazione ossidativa per produrre energia, che le rende strettamente dipendenti dalla glicolisi^{157,158}.

Il blocco dei “*checkpoint*” inibitori è una strategia ampiamente studiata per il ripristino immunologico non solo nel contesto delle infezioni croniche, ma anche della risposta ai tumori. Nell'infezione cronica da HBV molti studi *in vitro* hanno mostrato che il blocco di PD1/PD-L1, da solo o in combinazione con la manipolazione di altri pathways, può indurre livelli variabili di recupero funzionale non solo dei linfociti T, ma anche dei linfociti B, dal momento che un'elevata espressione di PD1 è stata descritta anche per i linfociti B HBV-specifici disfunzionali isolati da pazienti cronici^{77,79,80,143,145,147,159-162}. Il blocco di PD1 è stato studiato anche *in vivo* in modelli animali, in cui si è potuto osservare un controllo persistente della viremia in una ridotta percentuale di casi^{163,164}. Un unico trial è stato condotto in pazienti con infezione cronica da HBV, in trattamento con NUC, a cui è stata somministrata un'unica dose di anticorpo anti-PD1 (Nivolumab). In alcuni pazienti si è osservata la riduzione del titolo di HBsAg, che ha raggiunto la negativizzazione in un solo paziente¹⁶⁵.

Tuttavia, il dato recente che ha messo in luce specifici profili epigenetici associati all'*exhaustion* dei linfociti T CD8 che il blocco di PD1 non corregge completamente, suggerisce che questa strategia non è sufficiente per raggiungere una completa correzione della disfunzione T linfocitaria nelle infezioni virali e fornisce il razionale per studiare la combinazione del blocco dei *checkpoint* inibitori con farmaci epigenetici, come si sta già testando nell'immunoterapia dei tumori.

A iniziare dalle prime osservazioni nel modello dell'infezione cronica da LCMV, che linfociti ad elevata espressione di PD1 (PD1hi), terminalmente esauriti, coesistono con linfociti meno differenziati ad espressione di PD1 intermedia (PD1int), è risultato evidente che i linfociti T esauriti non possono essere considerati una popolazione disfunzionale omogenea¹⁶⁶. Infatti, sottopopolazioni con differenti livelli di funzionalità e quindi differente sensibilità ad interventi

immuno-modulatori sono stati descritti in modelli di infezioni virali croniche. Inoltre, dati recenti derivati da esperimenti di RNA-seq in singola cellula, hanno rilevato una eterogeneità associata al tessuto infettato, dimostrando che il profilo trascrittomico dei linfociti T CD8 esauriti può essere influenzato dal microambiente in cui avviene la differenziazione linfocitaria¹⁶⁷. L'espressione del fattore di trascrizione TCF1 su linfociti CD8 esauriti ha permesso di identificare cellule con caratteristiche che sono state definite “*memory-like*” e una maggiore sensibilità al blocco dei recettori inibitori rispetto a cellule con bassa o nulla espressione di TCF1^{168,169}. Anche in corso di epatite cronica B la popolazione di linfociti T HBV-specifici esauriti è stata descritta come eterogenea^{170,171}, e vari livelli di disfunzione sono stati osservati anche in corrispondenza della diversa specificità antigenica per epitopi della proteina Core o della polimerasi di HBV¹⁷². Sebbene in base a studi recenti si ritiene che l'esaurimento funzionale profondo non sia completamente reversibile, anche a seguito della completa eliminazione dell'antigene¹⁷³⁻¹⁷⁷, il ripristino funzionale sembra essere raggiungibile da parte dei linfociti T meno terminalmente esauriti.

DATI PRELIMINARI

Numerosi studi svolti negli ultimi anni hanno permesso l'identificazione e la caratterizzazione di diversi pathways implicati nell'insorgenza e sviluppo dello stato di esaurimento funzionale nei linfociti T in corso di epatite B cronica; questi pathways possono essere utilizzati come target nella ricerca di cure atte a ripristinare lo stato funzionale dei linfociti T CD8. Il blocco dei corecettori inibitori nel contesto dell'epatite B cronica ha indotto un miglioramento parziale, in una frazione di pazienti^{77,143,159,165}.

Poiché la rilevanza della sovraespressione dei corecettori inibitori è stata traslata al modello dell'infezione da HBV, derivando da esperimenti svolti in modelli animali di infezione cronica, si è pensato di studiare l'espressione genica direttamente nei linfociti virus-specifici isolati da pazienti con epatite B cronica, allo scopo di identificare target molecolari per lo sviluppo di nuove strategie mirate di immunomodulazione. L'analisi ha evidenziato che molti pathways risultano down-regolati nei linfociti T *exhausted* di pazienti con epatite cronica a confronto con pazienti che hanno risolto l'infezione acuta da HBV, e di linfociti CD8+ influenza (FLU)-specifici appartenenti a soggetti sani¹⁵⁸. Tra i pathways maggiormente down-regolati risultano quelli associati alla funzionalità mitocondriale, alla riparazione dei danni al DNA, alla proteostasi e alla regolazione della trascrizione genica. Tale profilo trascrittomico, caratteristico delle cellule T in fase di infezione cronica, è inoltre amplificato dall'up-regolazione di regolatori trascrizionali negativi (KRAB domain e Zn-finger).

Successivamente all'analisi trascrittomico esperimenti di validazione hanno confermato le disfunzioni a livello di mitocondrio e di proteostasi.

Il mitocondrio è un organello con un ruolo fondamentale per sostenere la risposta immunitaria. Infatti una equilibrata produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) a livello mitocondriale è necessaria per un corretto funzionamento di NFAT, NF- κ B e per la via di segnalazione del TCR. Inoltre, mediante la modulazione del rapporto AMP/ATP, i mitocondri modulano lo *shift* metabolico da catabolico, caratteristico dei linfociti T *naïve*, ad anabolico, necessario per la biosintesi delle macromolecole richieste per un'adeguata proliferazione cellulare¹⁷⁸. Esperimenti in citofluorimetria hanno mostrato che una frazione significativamente maggiore di linfociti HBV-specifici di pazienti cronici presenta depolarizzazione della membrana mitocondriale, rispetto a soggetti guariti spontaneamente e a controlli sani, con più elevata produzione di ROS, condizione che può sfociare in stress ossidativo. Il ruolo dell'eccesso di ROS sulla disfunzione T linfocitaria è stato confermato dall'osservazione di un buon livello di ripristino funzionale osservato *in vitro*, in

presenza di composti ad azione antiossidante mirati al mitocondrio, come mitoquinone (MitoQ) e piperidina-nitrossido (MitoTempo).

Per quanto riguarda il ruolo del proteasoma, l'inibizione del meccanismo proteosomale induce la morte apoptotica ed inoltre è stato evidenziato che la sua attività è coinvolta nella regolazione del differenziamento linfocitario: in particolare una bassa espressione del proteasoma induce il differenziamento in cellule T effettrici, mentre un'elevata attività proteosomale è associata al differenziamento in cellule T della memoria¹⁷⁹.

Nei linfociti T di pazienti cronici è stata evidenziata un accumulo di aggregati proteici intracellulari rispetto ai controlli, come pure un'alterata autofagia, confermando la disfunzione a carico della proteostasi^{158,180}.

SCOPO DELLO STUDIO

I pazienti con infezione cronica da HBV presentano una risposta linfocitaria fortemente disfunzionale. La capacità antivirale e l'attività citolitica dei linfociti virus-specifici risultano fortemente limitate, per questo si parla di linfociti esauriti o “*exhausted*”. Tale disfunzione linfocitaria contribuisce alla persistenza del virus nell'ospite⁹⁴.

Il nostro precedente studio di trascrittomica su linfociti HBV-specifici isolati da pazienti con epatite B cronica, svolto allo scopo di identificare target ottimali per il recupero della funzionalità linfocitaria, ha dimostrato la presenza di diversi pathways intracellulari alterati, tra cui i più significativamente down regolati sono relativi a funzione mitocondriale, proteostasi, risposta al danno e trascrizione del DNA¹⁵⁸. A partire da questo profilo trascrizionale abbiamo potuto validare la disfunzione mitocondriale e della proteostasi a livello molecolare e funzionale, evidenziando nei linfociti esauriti la presenza di mitocondri disfunzionali con elevata produzione di ROS e scarsa efficienza della proteostasi cellulare, con accumulo di aggregati proteici intracellulari^{158,180}.

Tali processi biologici deregolati ricordano in parte i difetti funzionali associati alla senescenza cellulare, in cui la disfunzione mitocondriale con elevata produzione di ROS svolge un ruolo centrale¹⁸¹. Studi recenti sulla senescenza legata all'invecchiamento indicano un'associazione tra l'accumulo di danno del DNA, iperattivazione di PARP1 (poli-ADP-riboso-polimerasi-1) e diminuiti livelli di NAD intracellulare¹⁸², e dimostrano che la supplementazione di NAD può migliorare la funzione mitocondriale e la riparazione del DNA, incrementando la durata della vita in modelli animali di invecchiamento¹⁸³.

Anche nei linfociti CD8 HBV-specifici esauriti l'accumulo di danno del DNA, facilmente causato dagli elevati livelli di ROS indotti dalla disfunzione mitocondriale, potrebbe risultare nella persistente attivazione di processi di riparazione del DNA NAD-dipendenti, come la poli-ADP-ribosilazione o parilazione, catalizzata dalle poli(ADP-riboso) polimerasi (PARP) che dipendono dal NAD per la loro attività¹⁸⁴.

L'ipotesi di lavoro sottintesa nel presente studio prevede che la ripetuta stimolazione dei linfociti CD8 HBV-specifici, dovuta alle alte concentrazioni di antigene e all'infiammazione epatica, possa causare l'accumulo di proteine ossidate, con sovraccarico della proteostasi, e danno del DNA con attivazione persistente dei meccanismi di riparazione del danno, tra cui la parilazione, che insieme alla sovra-espressione di CD38, altro importante consumatore di NAD, indurrebbe deplezione delle scorte cellulari di NAD. Questo può avere un impatto negativo su diverse molecole effettrici, tra cui i componenti della famiglia delle sirtuine, deacetilasi NAD dipendenti, e sulla disponibilità di acetil-coenzima A per l'acetilazione degli istoni, potenzialmente generando un circolo vizioso che

può portare all'amplificazione della disfunzione mitocondriale, con ulteriore produzione di ROS, mantenimento del danno al DNA, progressivo deterioramento dei meccanismi di riparazione del DNA, condensazione della cromatina e silenziamento genico.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di approfondire le nostre attuali conoscenze sull'*exhaustion* T linfocitaria in corso di epatite B cronica, studiando come le principali alterazioni trascrizionali precedentemente identificate, relative alla funzione mitocondriale, della proteostasi, della risposta al danno del DNA e alla regolazione epigenetica dell'espressione genica, siano funzionalmente interconnesse ed associate al fenomeno dell'*exhaustion* T linfocitaria. Perseguendo questo scopo, il fine ultimo del presente studio è stato quello di identificare specifici difetti cellulari su cui poter intervenire per perseguire il ripristino dell'attività T linfocitaria. Sebbene già individualmente descritti in altri modelli cellulari, questi processi disfunzionali non sono stati ancora documentati nel contesto di un network di pathway interconnessi, associato ad una malattia clinicamente e socialmente rilevante come l'epatite cronica B.

MATERIALI E METODI

1. Pazienti e controlli

La popolazione dei pazienti studiati è stata arruolata presso l'Unità Operativa di Malattie Infettive ed Epatologia dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma, l'Unità Operativa di Malattie Infettive dell'Azienda USL-IRCCS di Reggio Emilia, e presso la Divisione di Gastroenterologia ed Epatologia della Fondazione IRCCS Ca' Granda, Ospedale Maggiore Policlinico di Milano.

I pazienti reclutati appartengono alle seguenti categorie:

- 53 pazienti con epatite cronica attiva da HBV, nessuno dei quali sottoposti a terapia. La diagnosi si è basata su livelli di alanina aminotransferasi (ALT) sopra il limite della norma e positività per HBsAg, anticorpi anti-HBc, anti-HBe e per HBV-DNA per più di sei mesi. L'età dei pazienti era compresa nell'intervallo 23-68 anni. Di questi pazienti, 14 sono risultati positivi per HLA-A2. Lo screening per HLA-A2 è stato realizzato tramite marcatura delle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) con l'anticorpo fluorescente anti-HLA A2.01 (BD Biosciences, San Jose, CA) e relativa analisi citofluorimetrica. **(Tabella 1)**
- 12 soggetti HLA-A2+ guariti spontaneamente dall'infezione acuta da HBV (8 maschi, 4 femmine, di età compresa tra i 30 e 60 anni), risultati quindi sieronegativi per HBsAg e positivi per anticorpi anti-HBs. I campioni di PBMC di questi pazienti sono stati raccolti 6-10 mesi dopo il picco delle transaminasi.
- 15 soggetti sani HLA-A2 positivi, (10 femmine, 5 maschi, di età compresa tra 25-60 anni), utilizzati come gruppo di controllo.

Tutti i pazienti sono risultati negativi per anticorpi anti-HCV (virus dell'epatite C), virus delta, HIV-1 e HIV-2 (virus dell'immunodeficienza umana di tipo 1 e di tipo 2) e per altri marcatori di epatite virale o autoimmune.

I dati presentati in questo studio derivano da due progetti non-profit, approvati dal Comitato Etico di Parma (protocollo n.35331), dal Comitato Etico dell'Area Vasta Emilia Nord AVEN (n. 730/2020/UNIPR, n. 376/2021/TESS/AOUMO, n. 429/2021/TESS/AUSLRE) e dal Comitato Etico di Milano Area 2 (approvazione n. 518 e n.993_2020) e tutti i soggetti hanno sottoscritto il consenso informato.

2. Peptidi sintetici, complessi destramericici peptide-HLA di classe I e anticorpi

Per stimolare *in vitro* la popolazione linfocitaria HBV-specifica è stata utilizzata una miscela di 42 peptidi sintetici, ognuno avente lunghezza di 15 amminoacidi e sequenze sovrapposte di 10 residui, corrispondenti all'intera sequenza della proteina CORE di HBV, genotipo D (Chiron Mimotopes, Victoria, Australia). Per studiare la risposta dei linfociti T CD8 HLA-A2-positivi virus-specifici è stato usato un peptide sintetico corrispondente all'epitopo HLA-A2 ristretto della proteina CORE (aa. 18-27: FLPSDFFPSV) di HBV di genotipo D e il peptide sintetico corrispondente all'epitopo HLA-A2 ristretto della proteina della matrice (GILGFVFTL) del virus dell'influenza A (FLU), entrambi acquistati da Proimmune (Oxford, UK). I complessi destramericici peptide-HLA di classe I coniugati con i fluorocromi PE o APC, contenenti i peptidi precedentemente descritti sono stati acquistati da Immudex (Copenhagen, Denmark). La stimolazione *in vitro* dell'intera popolazione T linfocitaria è stata eseguita utilizzando gli anticorpi monoclonali purificati anti-CD3 LEAF e anti-CD28 LEAF, prodotti da Biolegend (San Diego, Ca, USA). I seguenti anticorpi sono stati utilizzati per l'analisi citofluorimetrica dei linfociti T nei diversi protocolli: Anti- CD3-PE-CF594, CD3 APC-R700, CD3 BB515, CD3 BV510, CD8-APC-H7, CD8 AlexaFluor®700, CD8PE-Cy7, CD8 BV786, CD107a-PE-Cy7, phosphoH2AX PE-CF594, CD38 BB700, HLA-DR BV605 (Becton-Dickinson (BD) Biosciences-Pharmingen), Anti-CD8-PerCP e CD4-PE (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), CD3-PE-Cy7, PE anti-phospho ATM, PD1 PE-Cy7 (Biolegend), Goat Anti-mouse IgG3 Alexa 488, anti-53BP1 Dy-Light®488 (ThermoFisher Scientific, MA, USA), anti-acetyl-Histone-H3 PE (Merck-Millipore, Burlington, MA, USA). Gli anticorpi utilizzati per la marcatura intracellulare delle citochine sono: Anti-IFN- γ APC-R700, IL-2-APC, forniti da Becton-Dickinson (BD), e TNF- α -FITC (Miltenyi Biotec). Infine, le sonde di vitalità adoperate sono LIVE/DEAD™ Fixable Near-IR Dead Cell Stain Kit (ThermoFisher Scientific) e 7-AAD (BD Biosciences).

3. Isolamento dei linfociti del sangue periferico

Le cellule linfomononucleate del sangue periferico (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*, PBMC) sono state isolate da sangue fresco eparinato, mediante centrifugazione su gradiente di densità utilizzando *Ficoll-Hypaque*. La conta e la vitalità delle cellule recuperate è stata determinata mediante colorazione vitale con *Türk* e la camera di *Neubauer*. In seguito le PBMC sono state congelate in *medium* di congelamento (Siero Fetale Bovino -FBS 90% e Dimetilsolfossido -DMSO 10%) e crioconservate in azoto liquido fino al momento del loro utilizzo.

4. Valutazione della risposta al danno del DNA

4.1 Marcatura fosfoH2AX, fosfoATM, 53BP1

La fosforilazione dell'istone H2AX alla serina 139 è stata rilevata sia direttamente *ex vivo*, sia dopo 1 ora di trattamento con l'agente genotossico Etoposide (50 μ M, Sigma, MO, USA), sia in seguito a stimolazione *overnight* con anticorpo monoclonale (MAb) anti-CD3 (10 μ g/ml in PBS sterile) pre-adsorbito ai pozzetti di una piastra, e anticorpo anti-CD28 (2 μ g/ml, in PBS sterile). Il “*coating*” dei pozzetti veniva effettuato *overnight*, a 4°C. Cellule lasciate in pozzetti non adsorbiti con anticorpo anti-CD3, e quindi non stimolate, servivano da controllo.

La marcatura con fosfoATM (ser1981) e 53BP1 è stata eseguita solo in seguito a stimolazione dei PBMC *overnight* con anti-CD3/CD28.

In tutti i casi, in seguito allo scongelamento le PBMC di pazienti cronici e di soggetti sani sono state lavate, risospese in PBS e marcate con la sonda di vitalità LIVE/DEAD, 10 min a temperatura ambiente. Poi, dopo un lavaggio, i campioni sono stati incubati per 10 minuti a 37°C con i destrameri di classe I, fissati con Fix Buffer I (10 minuti a 37°C) del kit “BD Phosflow™” (BD Biosciences), e successivamente permeabilizzati effettuando due lavaggi con Perm/Wash Buffer I dello stesso kit. Successivamente le cellule sono state incubate 30 minuti a temperatura ambiente con gli anticorpi di superficie (anti-CD3 e anti-CD8) fluorescenti e con anti-phospho-H2AX o phosphoATM, o 53BP1. Dopo opportuni lavaggi con PBS 1X i campioni sono stati acquisiti ed analizzati mediante citofluorimetro a otto colori (FACS-Canto, Becton-Dickinson, CA, USA). Per le analisi sono stati usati i software FACS-DIVA e FlowJo.

4.2 Poli-ADP-ribosilazione (PARilazione)

I campioni sono stati marcati sia direttamente *ex vivo*, sia in seguito a stimolo *overnight* con anti-CD3 (10 μ g/ml) e anti-CD28 (2 μ g/ml), come descritto sopra, e cellule non stimolate, servivano da controllo. Le cellule sono state marcate con la sonda di vitalità LIVE/DEAD, poi incubate a 37° C per 15 minuti con i destrameri e gli anticorpi di superficie anti-CD3 e anti-CD8; in seguito sono state fissate e permeabilizzate con il kit eBioscience™ Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer (ThermoFisher). I campioni sono stati poi incubati per 30 minuti a 4°C con l'anticorpo monoclonale non coniugato a tracciante fluorescente anti-Poly-(ADP-ribose) (anti-PAR), per marcare le catene di poli-ADP-Ribosio (PAR). Dopo lavaggio con la soluzione permeabilizzante è stato aggiunto ai campioni l'anticorpo secondario fluorescente “anti-mouse IgG3” per 20 minuti a 4°C. Dopo

opportuni lavaggi con la soluzione Perm, i campioni sono stati acquisiti ed analizzati mediante citofluorimetro a otto colori FACS-Canto.

4.3 PARilazione in seguito ad aggiunta di NAD o di inibitore di CD38 (CD38i)

Le PBMC dei pazienti cronici e dei controlli sani sono state incubate per 2 ore a 37°C, in pozzetti a cui è stato fatto precedentemente adsorbire anti-CD3 Mab (10 µg/ml) e ai quali è stato aggiunto anti-CD28 solubile (2 ng/ml) e in pozzetti di controllo privi di anti-CD3 e anti-CD28, come sopra descritto. Le cellule sono state incubate per 15 minuti a 37°C con destrameri e anticorpi di superficie in presenza e in assenza di β-Nicotinamide adenina dinucleotide (NAD, 500 µM, Sigma) o inibitore di CD38 (78c, 10mM, Sigma, CD38i). Quindi, dopo un lavaggio con PBS 1X freddo, è stato seguito il protocollo per la parilazione sopra descritto.

5. Acetilazione dell'istone H3

L'acetilazione dell'istone H3 è stata valutata in PBMC in seguito a stimolazione overnight con anti-CD3/CD28, come già descritto sopra. Le cellule sono state marcate con la sonda di vitalità LIVE/DEAD e incubate per 10 minuti a 37°C con i destrameri. Il kit "BD Phosflow™" è stato usato per la fissatura e la permeabilizzazione, come già descritto. Siero normale di topo (Sigma) è stato utilizzato per prevenire legame aspecifico degli anticorpi, prima della marcatura con anti-CD3, anti-CD8 e anti-acetil-H3 per 30 minuti a temperatura ambiente. Quindi i campioni sono stati risospesi in PBS prima dell'acquisizione a citofluorimetro.

6. Lunghezza dei telomeri

Il kit Prime Flow RNA Assay (Thermo-Fisher) è stato utilizzato per analizzare la lunghezza dei telomeri nei linfociti T CD8 virus-specifici, in confronto alle cellule della linea 1301, nota per avere telomeri particolarmente lunghi, che è stata aggiunta ai campioni come controllo. Dopo marcatura di superficie a 4°C per 30 minuti, le cellule sono state fissate e risospese in PrimeFlow RNA Permeablization Buffer con un inibitore delle RNasi. Le cellule sono state permeabilizzate seguendo le istruzioni del costruttore, prima dell'incubazione di 2 ore con la sonda target per i telomeri e la sonda RPL13A come normalizzatore (Thermo-Fisher) a 40°C al buio. I campioni sono stati lavati in Wash Buffer contenente l'inibitore delle RNasi prima di lasciarli overnight a 4°C. Il giorno seguente, i campioni sono stati pre-riscaldati a temperatura ambiente e poi incubati per

un'ora e mezzo con la mix pre-Amp, al buio, a 40°C. Dopo i lavaggi, le cellule sono state incubate con la amp mix nelle stesse condizioni descritte sopra. Infine, i campioni sono stati incubati con la "Label Probe" per 1 ora a 40°C, lavati in wash buffer, risospesi in PBS e acquisiti a citofluorimetro LSRFortessa™ (BD)¹⁸⁵. Per ciascun campione, la lunghezza dei telomeri nei linfociti T CD8 virus-specifici è stata espressa come percentuale della lunghezza dei telomeri nelle cellule della linea 1301 (lunghezza relativa dei telomeri, RTL). Questa è stata calcolata come il rapporto tra la fluorescenza media dei telomeri nei linfociti T CD8 virus-specifici e la fluorescenza media dei telomeri nelle cellule di controllo 1301, moltiplicato per 100¹⁸⁶.

7. Espansione in vitro dei linfociti T

Le PBMC dei pazienti cronici crioconservate in azoto liquido, sono state scongelate, lavate con HBSS pre-riscaldato e risospese in terreno completo pre-riscaldato (RPMI 1640 integrato con 40 µg/ml di Gentamicina, 2,5 µg/ml di Fungizone, 0,05 mM di 2-Mercaptoetanololo, 1X NEA e 8% siero umano). Le PBMC sono state distribuite in piastre a 96 pozzetti con fondo tondo e sono state incubate a 37°C in presenza di CO₂ (5%) per 9 giorni, in presenza di stimolo con miscela di peptidi sintetici HBV-CORE specifici o con peptidi HLA-A2-ristretti (1µM) in presenza o assenza del trattamento, β-Nicotinamide Mononucleotide (NMN, 10, 100 o 500 µM, Sigma, Missouri, USA). L'inibitore di CD38 è stato testato alla concentrazione di 1 o 5 nM. Al terzo giorno di coltura, è stata aggiunta, in tutti i pozzetti, IL-2 alla concentrazione di 50 U/ml.

Per alcuni esperimenti di controllo è stata stimolata l'intera popolazione T linfocitaria CD3+. Le PBMCs sono state distribuite in pozzetti in cui precedentemente è stato fatto adsorbire, tramite *coating*, l'anticorpo anti-CD3 alla concentrazione di 10 µg/ml in PBS, prima della deposizione delle PBMC. In questo caso le cellule sono state incubate a 37°C per 6 giorni in presenza o assenza di trattamenti, alle concentrazioni sopra riportate.

8. Valutazione del potenziale di membrana mitocondriale

Per quantificare la percentuale di cellule aventi il potenziale di membrana mitocondriale depolarizzato (MMP) è stata utilizzata la sonda JC-1 (Molecular Probes, Life Technologies). In seguito ad espansione *in vitro*, le cellule sono state marcate con gli anticorpi di superficie (anti-CD3 e anti-CD8) per 15 minuti a temperatura ambiente, successivamente sono state risospese in terreno RPMI con 10% di FCS (Corning, New York, USA) preriscaldato a 37°C e incubate con la sonda JC-1 (2,5 µg/ml) per 10 minuti a temperatura ambiente al riparo dalla luce. Infine i campioni sono

stati marcati con la sonda di vitalità 7-AAD e i dati sono stati acquisiti mediante citofluorimetro FACSCanto.

9. Rilevazione degli aggregati proteici

La quantificazione degli aggregati proteici cellulari è stata effettuata utilizzando il kit “ProteoStat® Aggresome Detection” (Enzo Life Sciences, New York, NY). In seguito ad espansione *in vitro* le cellule sono state marcate con gli anticorpi di superficie (anti-CD3 e anti-CD8) per 15 minuti a temperatura ambiente, sono state fissate (Citofix, BD) e permeabilizzate (Triton X 0,5%, Sigma e EDTA 2mM) e successivamente incubate con “ProteoStat® Aggresome Detection” per 30 minuti a temperatura ambiente. I campioni sono stati analizzati e i dati acquisiti mediante citofluorimetro a otto colori FACS-Canto.

10. Valutazione della risposta al danno del DNA

Il ripristino della funzionalità di risposta al danno del DNA è stato valutato in linfociti T CD8 di pazienti cronici in seguito ad espansione *in vitro*. Al nono giorno, metà delle cellule sono state ri-stimolate con i peptidi CORE per 2 ore a 37°C e poi sono state marcate seguendo il protocollo precedentemente descritto per la marcatura della forma fosforilata dell’istone H2AX.

Acetilazione dell’istone H3 in colture linfocitarie espanse in presenza di NMN

I livelli di acetilazione dell’istone H3 sono stati determinati nei campioni in seguito ad espansione *in vitro* in presenza e in assenza di NMN. Le cellule sono state marcate con la sonda di vitalità LIVE/DEAD, e il kit “BD Phosflow” è stato usato per fissare e permeabilizzare i campioni come già descritto.

11. Valutazione della produzione di citochine intracellulari (ICS)

La quantificazione delle citochine prodotte è stata effettuata su PBMCs derivanti da pazienti cronici espanse *in vitro* in presenza e in assenza dei trattamenti già descritti. Al nono giorno i linfociti T sono stati ri-stimolati con la miscela di peptidi HBV-specifici corrispondenti alla proteina CORE di HBV e incubate con l’anticorpo anti-CD107a per un’ora a 37°C. Successivamente le cellule sono state incubate per ulteriori 3 ore a 37°C in presenza di Brefeldina-A (10 µg/ml). Al termine del trattamento, le cellule sono state lavate con PBS 1X, marcate con gli anticorpi di superficie (Destramero MHC di Classe I, anti-CD3, anti-CD8 e anti-CD4), fissate e permeabilizzate tramite

medium A e medium B (Nordic MUBio, Susteren Olanda); infine sono state marcate con gli anticorpi monoclonali anti-IFN- γ , anti-TNF- α e anti-IL-2 per 15 minuti a temperatura ambiente, lavate accuratamente con PBS 1X e sottoposte ad analisi citofluorimetrica.

12. Analisi statistiche

Le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando il software GraphPad Prism. Negli esperimenti di validazione funzionale di analisi dell'espressione di H2AX fosforilato e di PAR è stato utilizzato il test U di Mann-Whitney per confrontare la mediana dell'intensità di fluorescenza (MFI) tra i pazienti cronici e i soggetti sani e per confrontare il *fold change* (FC) dei valori di MFI di anti-PAR a seguito dei trattamenti con NAD. Il test di Wilcoxon per dati appaiati è stato applicato in tutti i confronti tra linfociti HBV- e FLU-specifici degli stessi pazienti cronici. Il test di Wilcoxon per dati appaiati è stato poi utilizzato per confrontare le percentuali di linfociti T CD8 caratterizzati da depolarizzazione della membrana mitocondriale tra campione trattato e non trattato con NMN. Lo stesso test statistico è stato utilizzato per confrontare i valori di intensità mediana di fluorescenza (MFI) in esperimenti di rilevazione di aggregati proteici, per fosforilazione di H2AX. Anche i livelli di citochine prodotte dai linfociti T sono stati confrontati utilizzando il test di Wilcoxon per dati appaiati, confrontando per ciascun paziente le linee cellulari trattate con NMN rispetto alle linee di controllo non trattate. Il *fold change* (FC), o incremento della produzione di citochine da parte delle cellule trattate ($FC \neq 1$) è stato valutato con il test di Wilcoxon per ranghi.

RISULTATI

1. Aumentato danno del DNA e validazione della disfunzione della risposta al danno nei linfociti T CD8 HBV-specifici di pazienti con infezione cronica da HBV

Abbiamo precedentemente descritto la disfunzione mitocondriale con elevata produzione di specie reattive dell'Ossigeno (ROS) e diminuita proteostasi nei linfociti T CD8 HBV-specifici isolati da pazienti con infezione cronica da HBV¹⁵⁸. Il danno del DNA risultante da questa condizione di stress ossidativo dovrebbe stimolare una continua attivazione della risposta al danno del DNA¹⁸⁷. Tuttavia, in apparente contrasto con questa predizione, l'analisi trascrittomica ha mostrato una profonda down-regolazione dei trascritti codificanti per proteine coinvolte nella riparazione del danno del DNA¹⁵⁸. Per analizzare questa apparente discrepanza, abbiamo studiato la risposta al danno del DNA nei linfociti CD8 HBV-specifici di pazienti con epatite cronica B.

In caso di danno della doppia elica di DNA, diversi mediatori di riparazione del danno vengono richiamati al sito della lesione in seguito alla fosforilazione dell'istone H2AX alla serina 139 da parte di chinasi appartenenti alla famiglia fosfoinositolo 3-fosfato (PI3K)¹⁸⁸, di cui fa parte anche ATM (*ataxia-telangiectasia-mutated kinase*), che è risultata down-regolata nell'analisi trascrittomica precedentemente eseguita¹⁵⁸.

Abbiamo quindi analizzato la fosforilazione di H2AX (phosphoH2AX) come marcatore di danno del DNA¹⁸⁹. Un livello significativamente più alto di H2AX fosforilato, valutato come intensità mediana di fluorescenza (MFI) dell'anticorpo anti-fosfoH2AX, è stato rilevato nei linfociti T CD8 HBV-specifici, rispetto a quelli influenza (FLU)-specifici degli stessi pazienti con infezione cronica (**Fig. 3A**) e ai linfociti FLU-specifici isolati da soggetti sani (**Fig. 3B**). Questi risultati indicano che i linfociti T CD8 HBV-specifici hanno un alto accumulo di danno al DNA rispetto ai controlli.

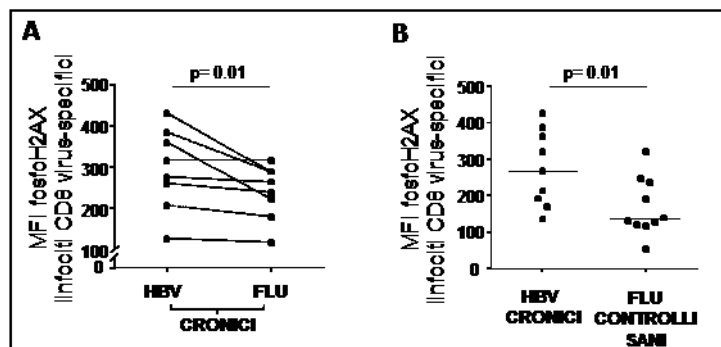


Figura3: Confronto dei livelli di fosforilazione dell'istone H2AX nei linfociti T CD8 HBV- e influenza (FLU)-specifici dei pazienti con epatite B cronica (cronici) (test di Wilcoxon per dati appaiati) (A) e tra linfociti T CD8 HBV- e influenza (FLU)-specifici di soggetti sani di controllo (test U di Mann-Whitney) (B).

Abbiamo poi testato la risposta al trattamento con l'inibitore della topoisomerasi II, Etoposide, che è un agente genotossico noto per stimolare la comparsa di foci di fosfoH2AX causando rotture della doppia elica del DNA¹⁹⁰. In seguito ad un'ora di trattamento con Etoposide, le cellule T CD8 FLU-specifiche dei pazienti cronici e dei soggetti sani hanno mostrato un valore di MFI di anti-fosfo-H2AX significativamente maggiori rispetto alle cellule T CD8+ HBV-specifiche dei pazienti cronici (**Figura 4A**). Come conseguenza, il rapporto tra l'MFI di fosfo-H2AX nei campioni trattati/non trattati è risultato significativamente minore nei linfociti HBV-specifici dei pazienti cronici rispetto ai controlli, mettendo così in evidenza che i meccanismi di riparazione del danno al DNA sono meno efficacemente attivati nelle cellule *exhausted* (**Figura 4B**).

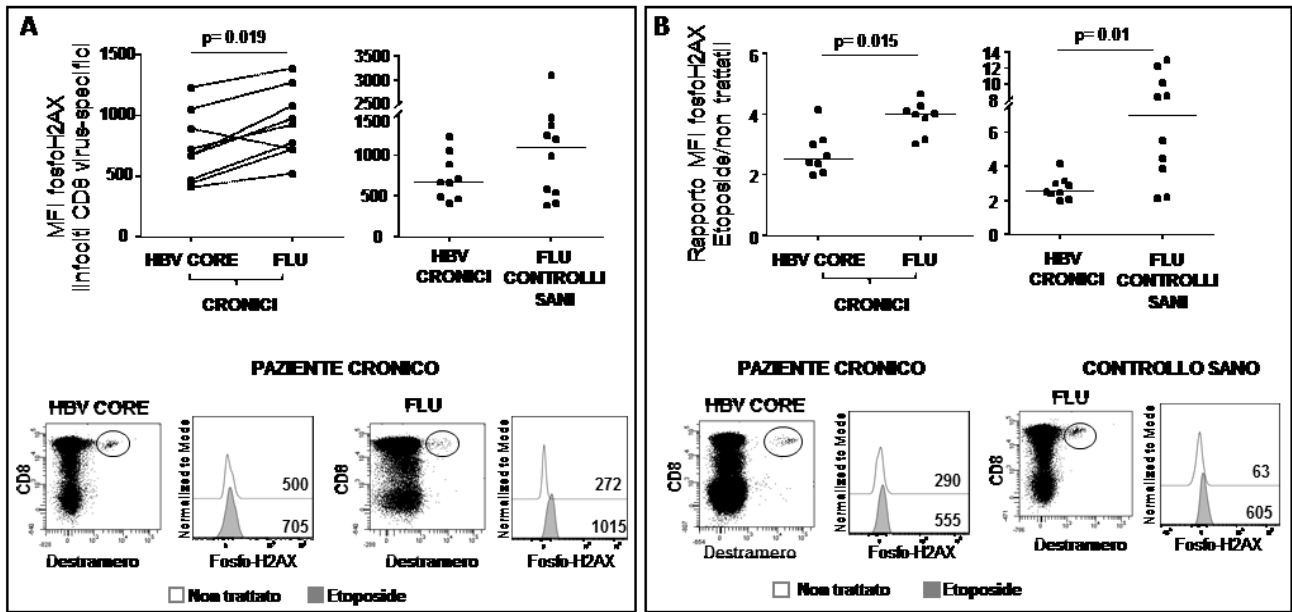


Figura 4. (A) I grafici mostrano il valore di MFI della forma fosforilata dell'istone H2AX in seguito a 1 ora di trattamento dei campioni con l'agente genotossico Etoposide: i linfociti T CD8 HBV-specifici dei pazienti cronici sono confrontati con i linfociti FLU-specifici degli stessi pazienti (sinistra, test di Wilcoxon per dati appaiati) e con i linfociti FLU-specifici dei soggetti sani di controllo (destra, test di Mann-Whitney). (B) Per ciascun campione è rappresentato l'incremento della fosforilazione di H2AX come rapporto tra il valore di MFI nelle cellule trattate con Etoposide rispetto alle stesse cellule non trattate, per entrambi i confronti mostrati nel pannello A (sinistra, test di Wilcoxon per dati appaiati, destra, test U di Mann-Whitney). Nella parte bassa di ciascun pannello sono mostrati campioni rappresentativi di valori di MFI in campioni trattati con Etoposide (grigio) e non trattati (bianco) per i linfociti virus-specifici di pazienti cronici e di soggetti sani di controllo rispettivamente.

Poiché è noto che anche la proliferazione T linfocitaria è associata alla formazione di lesioni della doppia elica di DNA, abbiamo analizzato la variazione di espressione di fosfoH2AX in seguito a stimolazione *overnight* con anti-CD3/CD28. Come mostrato in **Figura 5A**, anche in questa condizione sperimentale le cellule dei controlli erano in grado di up-regolare significativamente fosfoH2AX, a differenza dei linfociti HBV-specifici dei pazienti cronici. Lo stesso tipico andamento è stato osservato quando è stata testata la fosforilazione della serina 1981 della chinasi ATM (fosfoATM)¹⁹¹, (**Fig. 5B**), che è un mediatore chiave della fosforilazione di H2AX in risposta al danno del DNA¹⁹², così come l'espressione di 53BP1 (**Fig. 5C**), fattore richiamato da fosfoH2AX, che si co-localizza con quest'ultimo a livello dei foci nucleari di riparazione¹⁹³. Quindi, nonostante un maggior accumulo di danno del DNA, indicato dalla maggiore fosforilazione basale di H2AX, in seguito all'induzione esogena di danno del DNA, i linfociti CD8 HBV-specifici dei pazienti con infezione cronica attivano meno efficientemente i meccanismi di riparazione del DNA, come la fosforilazione di H2AX, di ATM e la up-regolazione di 53BP1.

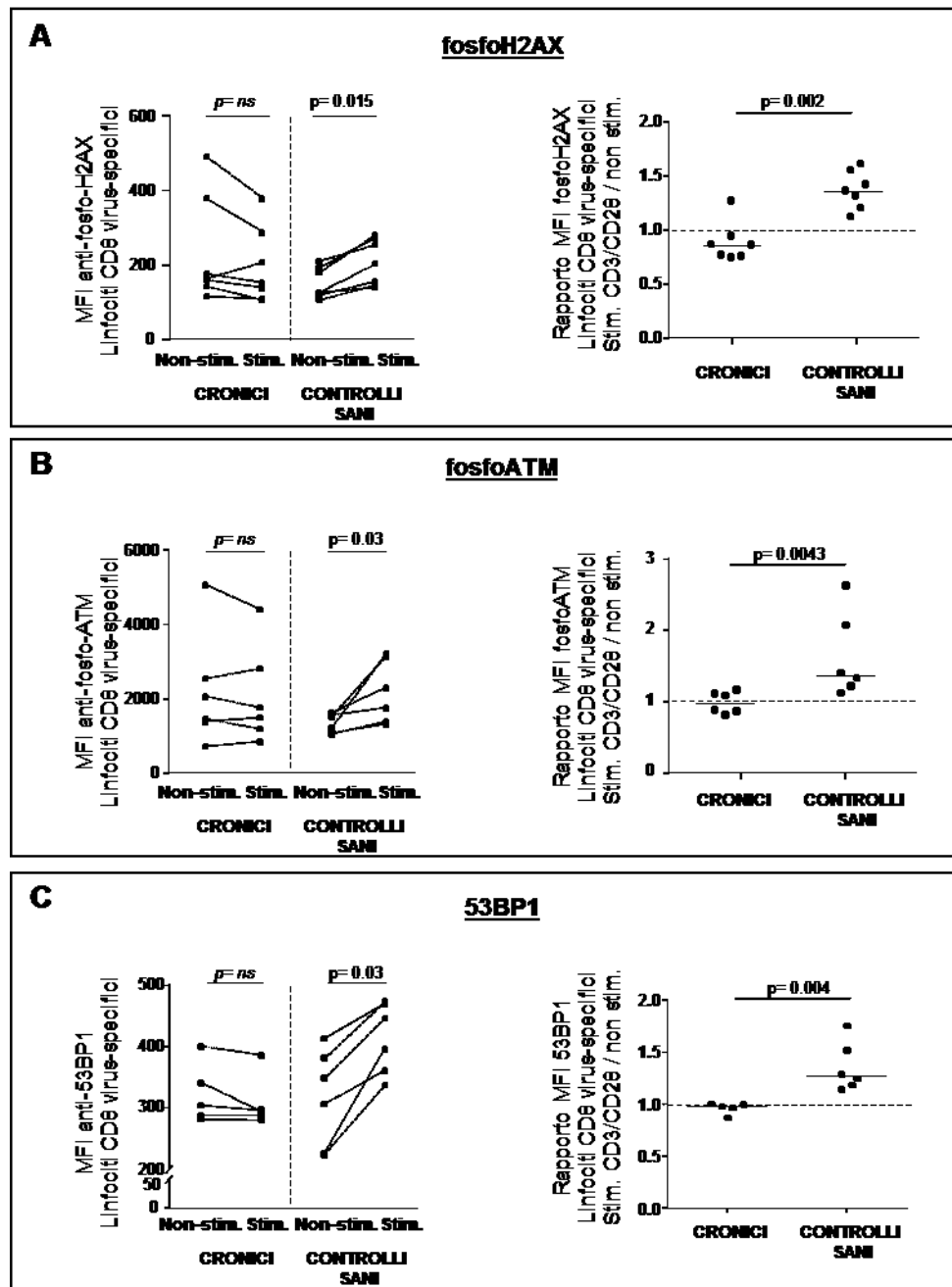


Figura 5. I PBMC isolati dai pazienti con infezione cronica da HBV e da controlli sani sono stati stimolati *overnight* con anti-CD3/CD28. I grafici a sinistra mostrano la mediana dell'intensità di fluorescenza (MFI) di fosfoH2AX (A), fosfoATM (B), 53BP1 (C) in linfociti CD8 HBV-specifici di pazienti cronici e FLU-specifici di controlli sani in campioni appaiati non stimolati e stimolati (test di Wilcoxon per dati appaiati). I grafici a destra rappresentano l'incremento di MFI di fosfoH2AX (A), fosfoATM (B), 53BP1 (C) in seguito a stimolazione con anti-CD3/CD28, calcolato come il rapporto della MFI nei campioni stimolati/non stimolati (test di Mann-Whitney).

Successivamente abbiamo anche valutato la formazione di polimeri di ADP-ribosio (“parilazione”), come indicatore dell'attività delle poli-(ADP-ribosio)polimerasi (PARP), come PARP-1, PARP-2 e

PARP-3, che riverstano un ruolo attivo nella risposta al danno del DNA¹⁸⁴. Questi enzimi infatti, sono attivati da diversi tipi di lesioni del DNA per richiamare rapidamente mediatori della risposta al danno¹⁹⁴. Poiché è noto che i livelli di parilazione possono variare significativamente su base individuale¹⁹⁵, abbiamo confrontato i linfociti CD8 HBV-specifici e FLU-specifici degli stessi pazienti cronici, osservando una più bassa parilazione nelle cellule HBV-specifiche (**Fig. 6A**). Inoltre, in seguito a stimolazione anti-CD3/CD28, i livelli di parilazione tendevano ad aumentare nei linfociti dei controlli, mentre nei campioni derivati dai pazienti cronici si osservava una tendenza alla diminuzione (**Fig. 6B**). Questo comportamento opposto è ulteriormente illustrato dalla differenza significativa nel rapporto dell'MFI dell'anticorpo anti-PAR tra campioni stimolati/non stimolati di pazienti cronici e di soggetti sani (**Fig. 6B**). Questi dati indicano che i linfociti T CD8 HBV-specifici isolati dai pazienti con epatite B cronica mostrano un più alto danno del DNA, ma una più debole attivazione della risposta al danno, come mostrato dal confronto di linfociti specifici per epitopi non correlati ad HBV (come gli epitopi del virus dell'influenza) degli stessi pazienti o dei controlli sani.

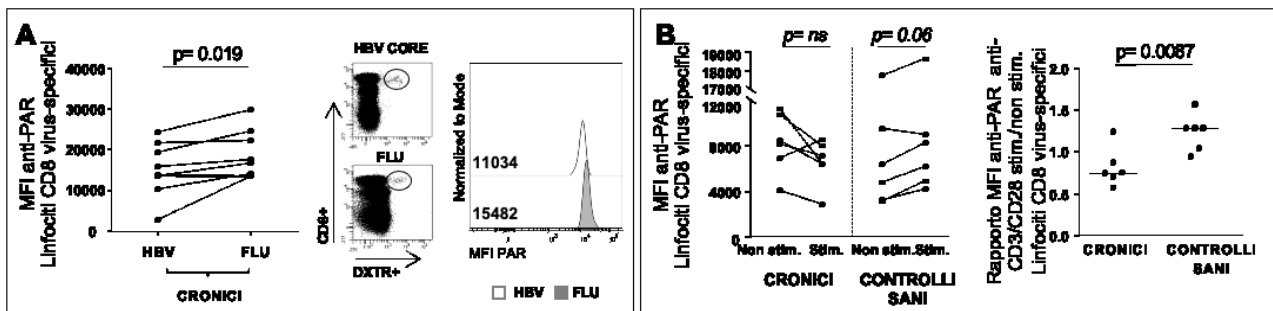


Figura 6: (A) Il grafico a sinistra mostra i livelli di poli(ADP)ribosilazione (parilazione) nei linfociti CD8 HBV- e FLU- specifici di pazienti cronici (test di Wilcoxon per dati appaiati). Sulla destra è mostrato un esempio rappresentativo di diversi livelli di parilazione in linfociti CD8 HBV- e FLU-specifici dello stesso paziente con infezione cronica da HBV. (B) Il grafico a sinistra mostra la mediana dell'intensità di fluorescenza (MFI) di PAR in linfociti CD8 HBV-specifici di pazienti cronici e FLU-specifici di controlli sani in campioni appaiati non stimolati e stimolati overnight con anti-CD3/CD28 (test di Wilcoxon per dati appaiati). Il grafico a destra rappresenta l'incremento di MFI di PAR in seguito a stimolazione con anti-CD3/CD28, calcolato come il rapporto della MFI nei campioni stimolati/non stimolati (test U di Mann-Whitney).

2. CD38 è *over*-espresso sui linfociti T CD8 HBV-specifici dei pazienti con epatite B cronica.

In aggiunta agli enzimi PARP disfunzionali, una ridotta capacità di parilazione potrebbe essere dovuta alla diminuita disponibilità di molecole di NAD, che rappresentano i donatori di molecole di

ADP-ribosio necessarie per la formazione di catene di poli-ADP-ribosio¹⁸⁴. E' concepibile che la generazione cronica di ROS possa mantenere il danno del DNA, che a sua volta stimola gli effettori della risposta al danno, compresi gli enzimi PARP, portando a consumo di NAD. E' infatti noto che l'attivazione persistente di PARP può arrivare a depletare le scorte di NAD cellulare¹⁹⁶. Questo potrebbe causare l'instaurarsi di un circolo vizioso, in cui il danno del DNA indotto persistentemente dai ROS può essere aggravato dalla disfunzione della risposta al danno dovuta alla carenza di NAD.

Per indagare se altri meccanismi possano contribuire alla deplezione di NAD nei pazienti con infezione cronica da HBV, abbiamo valutato l'espressione della glicoidrolasi CD38, che catalizza l'idrolisi delle molecole di NAD con formazione di ADP-ribosio e ADP-ribosio-ciclico (cADPR), rappresentando uno dei maggiori regolatori di NAD intracellulare¹⁹⁷. Analizzando l'espressione di CD38 nei linfociti T CD8 HBV-specifici dei pazienti cronici, abbiamo potuto confermare a livello proteico l'up-regolazione precedentemente osservata nello studio di espressione genica tramite microarrays¹⁵⁸ (**Fig. 7A**). All'analisi citofluorimetrica CD38 è risultato infatti up-regolato sui linfociti CD8 HBV-specifici dei pazienti cronici non solo in termini di percentuale di linfociti CD38+, ma anche quando analizzato come intensità mediana di fluorescenza, al confronto di linfociti CD8 FLU-specifici degli stessi pazienti cronici, di linfociti HBV-specifici di pazienti guariti da una precedente epatite acuta B e anche di linfociti FLU-specifici di soggetti sani (**Fig. 7B**). Dal momento che l'espressione di CD38 è comunemente associata all'attivazione T linfocitaria, abbiamo marcato i campioni anche per HLA-DR e PD1 (**Fig. 7C**).

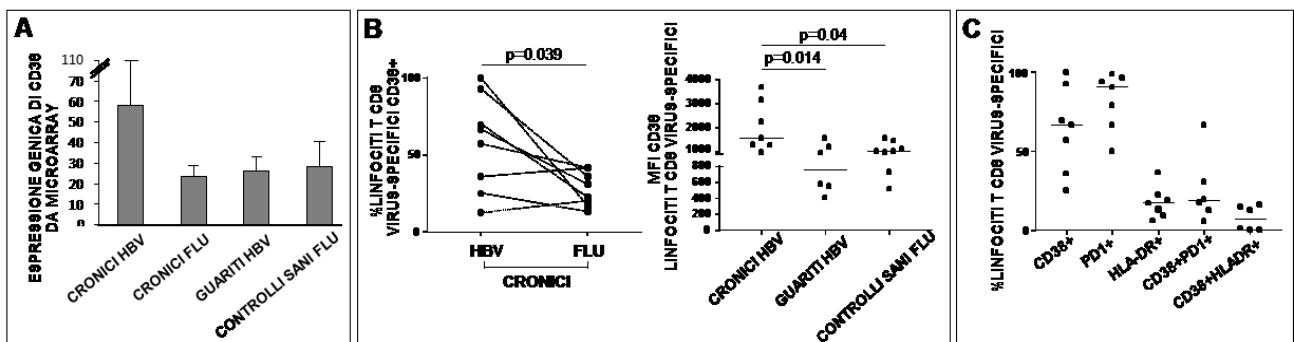


Figura 7: (A) Espressione genica di CD38 estrapolata dai precedenti esperimenti di microarrays, in linfociti T CD8 virus-specifici (HBV e FLU rispettivamente) di pazienti con epatite B cronica, di soggetti che hanno risolto spontaneamente una epatite B acuta (guariti) e di soggetti sani di controllo. (B) Il grafico a sinistra rappresenta le percentuali di cellule positive per CD38 tra i linfociti T CD8 HBV- e FLU-specifici di pazienti cronici (test di Wilcoxon per dati appaiati). Il grafico a destra mostra i valori di MFI di CD38 nei linfociti T CD8 HBV-specifici di pazienti cronici, pazienti guariti spontaneamente da un'epatite B acuta e soggetti sani di controllo (test di Mann Whitney). (C) Percentuali di linfociti T CD8 HBV-specifici di pazienti cronici positivi per CD38, PD1, HLA-DR e di linfociti che coesprimono CD38 e PD1(CD38+PD1+), e CD38 e HLA-DR (CD38+HLA-DR+).

Come mostrato in **Fig. 8A**, sui linfociti T CD8 HBV-specifici CD38 mostrava una minima co-espressione con HLA-DR (media della percentuale di linfociti positivi sia per CD38 che per HLA-DR pari a 7,37%). Come atteso, un'alta proporzione di linfociti HBV-specifici esprimeva il recettore inibitorio PD1 (**Fig. 7C, 8A**), la cui espressione correlava significativamente con quella di CD38 (**Fig. 8B**). L'espressione di PD1 era quindi significativamente più alta sui linfociti virus-specifici con alti livelli di CD38 ("CD38hi", **Fig. 8B**), suggerendo un'associazione tra l'espressione di CD38 e l'*exhaustion* T linfocitaria e confermando quanto già riportato in letteratura in altri modelli di *exhaustion*^{198,199}.

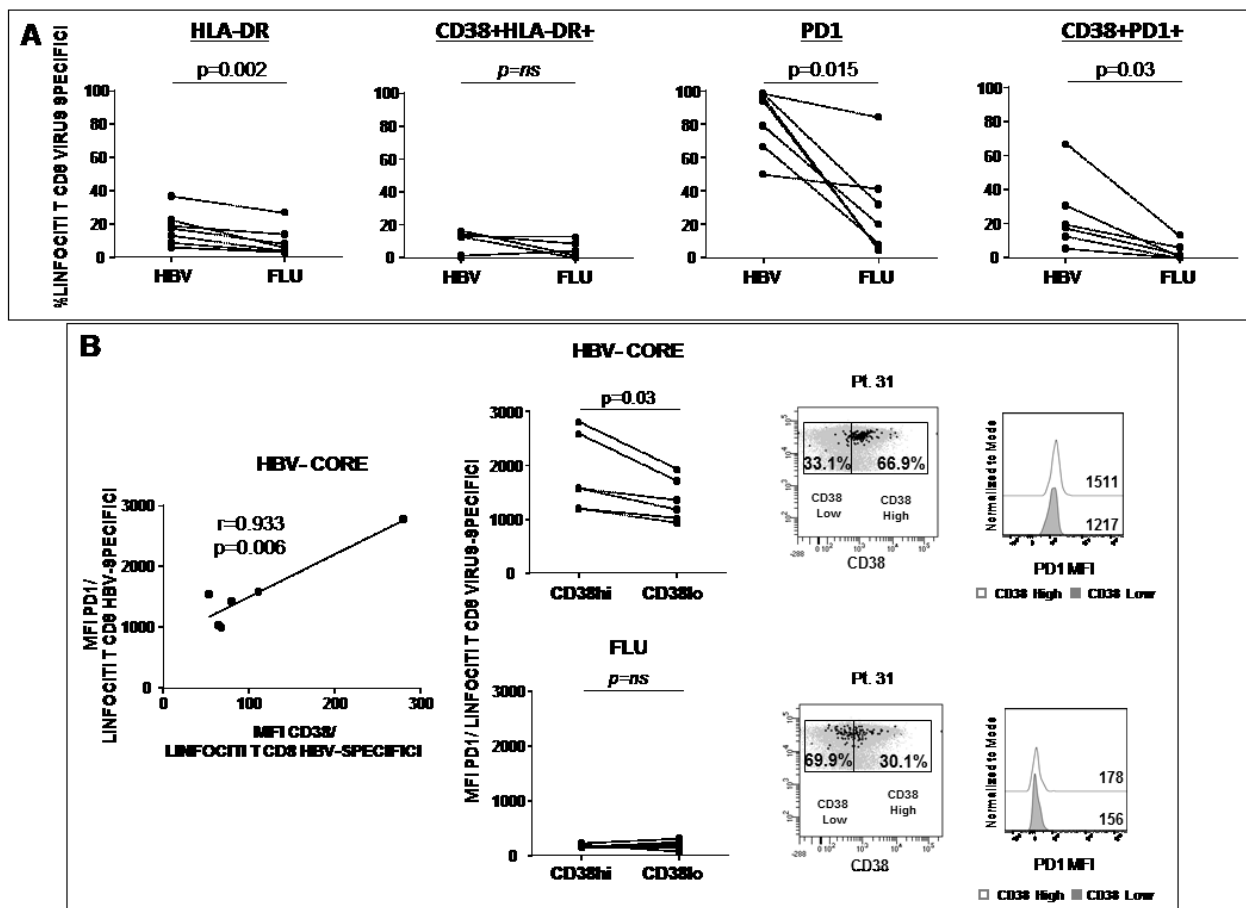


Figura 8. (A) Percentuali di linfociti che esprimono rispettivamente HLA-DR, CD38 ed HLA-DR, PD1, CD38 e PD1 in campioni appaiati di linfociti T CD8 HBV- e FLU- specifici di pazienti cronici (Test di Wilcoxon per dati appaiati). (B) Il grafico a sinistra mostra la correlazione tra MFI di PD1 e CD38 in linfociti T CD8 HBV-specifici di pazienti cronici (coefficiente di correlazione di Pearson). Al centro viene mostrata l'espressione di PD1 in cellule ad alta (CD38hi) o a bassa espressione di CD38 (CD38lo) tra i linfociti T CD8 HBV- (in alto) o FLU- specifici (in basso) di pazienti cronici (test di Wilcoxon per dati appaiati). A destra un esempio rappresentativo di selezione di linfociti T CD8 HBV- o FLU-specifici di uno stesso paziente cronico con alta o bassa espressione di CD38 e relativa espressione di PD1.

3. I linfociti exhausted HBV-specifici hanno telomeri più corti rispetto ai linfociti FLU-specifici

Diversi dati di letteratura evidenziano un'associazione tra l'espressione di CD38, la disfunzione mitocondriale, il declino di NAD e la senescenza cellulare²⁰⁰. Inoltre, inefficienze del sistema di riparazione del DNA possono risultare nell'accumulo di danno al DNA sia telomerico che non telomerico²⁰¹ e i ROS intervengono nella regolazione della lunghezza dei telomeri²⁰². Ci siamo quindi chiesti se gli elevati livelli di ROS precedentemente descritti nei linfociti T CD8 HBV-specifici di pazienti cronici, che possono rappresentare una causa di danno al DNA, insieme ai meccanismi di riparazione disfunzionali, potrebbero determinare un'alterazione della lunghezza dei telomeri, conducendo così queste cellule verso la senescenza. Per analizzare questa possibile associazione, abbiamo studiato la lunghezza dei telomeri nei linfociti HBV-specifici mediante FLOW-FISH¹⁸⁵, a confronto con linfociti FLU-specifici degli stessi pazienti cronici, in modo da evitare l'interferenza di una serie di variabili individuali note per poter influire sulla lunghezza dei telomeri (come per esempio età, dieta, stile di vita ...). In questi esperimenti, i telomeri dei linfociti HBV-specifici sono risultati più corti rispetto a quelli FLU-specifici (**Fig. 9**). Questo suggerisce che l'infezione cronica da HBV può portare all'accorciamento dei telomeri e accelerata senescenza dei linfociti T CD8 HBV-specifici²⁰³.

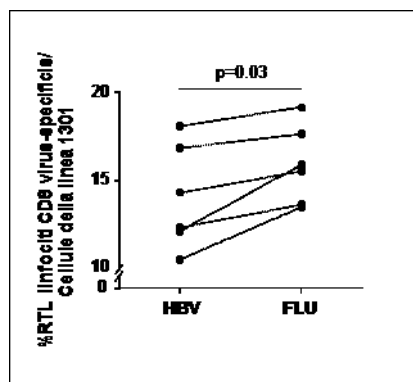


Figura 9. Confronto della lunghezza relativa dei telomeri in linfociti T CD8 HBV- e FLU-specifici di pazienti cronici, analizzati mediante tecnica FLOW-FISH. La lunghezza relativa dei telomeri (RTL) è espressa come percentuale rispetto alla lunghezza dei telomeri nelle cellule della linea 1301 di riferimento (test di Wilcoxon per dati appaiati).

4. L'acetilazione istonica è alterata nei linfociti CD8 HBV-specifici *exhausted*

Una ridotta disponibilità di NAD può determinare una minore formazione di acetil-Coenzima A (acetil-CoA), che tra le altre funzioni, è anche donatore di gruppi acetile per l'acetilazione istonica, causando quindi indirettamente una minore acetilazione istonica, con condensazione della cromatina e silenziamento genico²⁰⁴. Questo sarebbe in accordo con i dati tratti dai nostri precedenti esperimenti di trascrittomica, che mostravano una ampia down-regolazione dell'espressione genica nei linfociti CD8 HBV-specifici dei pazienti cronici. In aggiunta, alcuni regolatori negativi della trascrizione del DNA, come HDAC1, risultavano up-regolati¹⁵⁸. Sulla base di questi dati abbiamo analizzato l'acetilazione dell'istone H3 nei linfociti T CD8 HBV-specifici dei pazienti con epatite B cronica in seguito a stimolazione *overnight* con anti-CD3/CD28, a confronto con i linfociti FLU-specifici dei soggetti sani. Come mostrato in **Figura 10**, in seguito alla stimolazione si è potuto osservare l'up-regolazione dell'acetilazione istonica nei linfociti dei soggetti sani, ma non in quelli dei pazienti cronici, rivelando così una scarsa capacità di acetilare gli istoni nei linfociti HBV-specifici *exhausted*.

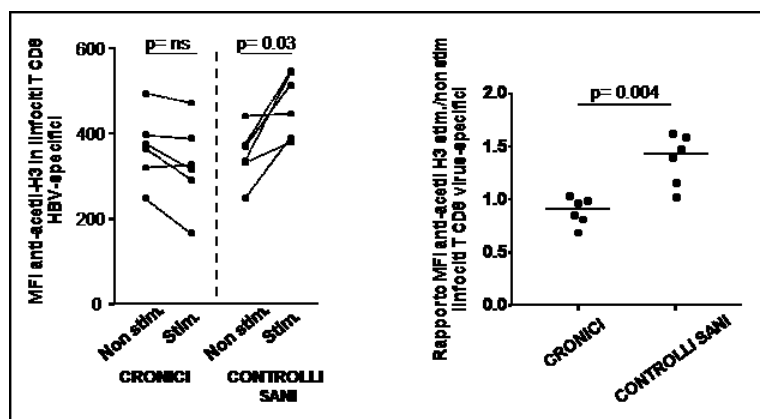


Figura 10. I PBMC di pazienti cronici e di soggetti sani di controllo sono stati stimolati *overnight* con anti-CD3/CD28. Il grafico a sinistra mostra la mediana di intensità di fluorescenza dell'anticorpo anti-acetil-H3 in linfociti T CD8 HBV-specifici di pazienti cronici e FLU-specifici di soggetti sani in campioni appaiati stimolati e non stimolati (test di Wilcoxon per dati appaiati). Il grafico a destra rappresenta i valori di incremento di MFI di anti-acetylH3 in seguito a stimolo anti-CD3/CD28, calcolato come rapporto tra il valore nel campione stimolato / non stimolato (test di Mann-Whitney).

5. La supplementazione di NAD può correggere le disfunzioni intracellulari nei linfociti HBV-specifici

Se la deplezione di NAD è effettivamente coinvolta nella disfunzione dei linfociti T CD8 HBV-specifici dei pazienti cronici, la supplementazione con NAD potrebbe correggere non solo le funzioni alterate intracellulari, ma potenzialmente anche la funzionalità antivirale linfocitaria. Per affrontare questo interrogativo, abbiamo utilizzato NAD, o il precursore del NAD nicotinamide mononucleotide (NMN).

Per primo abbiamo ripetuto la marcatura per rilevare la parilazione nei linfociti stimolati con anti-CD3/CD28, in presenza o in assenza di NAD esogeno¹⁹⁵. L'incubazione con NAD determinava l'incremento significativo della MFI dell'anticorpo anti-PAR nei campioni stimolati derivanti dai pazienti cronici, ma non in quelli FLU-specifici dei soggetti sani (Fig. 11), supportando il concetto che la ridotta disponibilità di NAD può interferire con il processo di parilazione nei linfociti CD8 HBV-specifici *exhausted*.

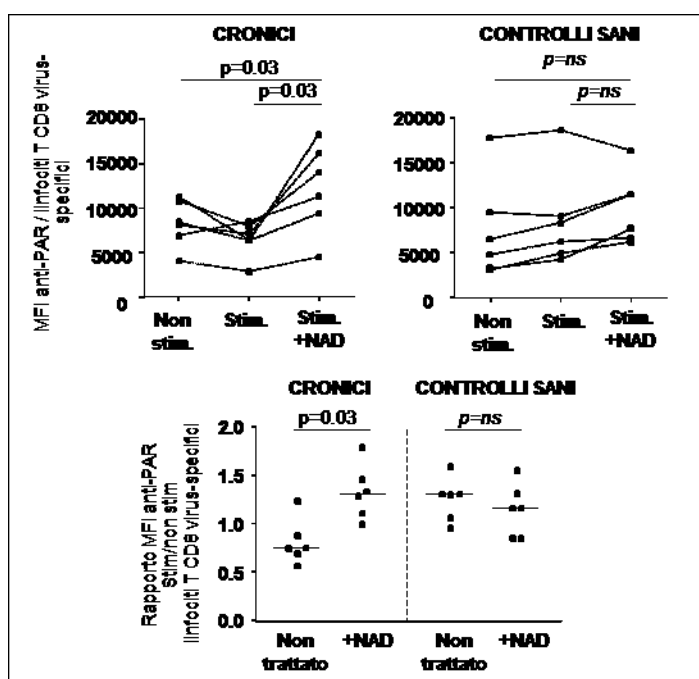
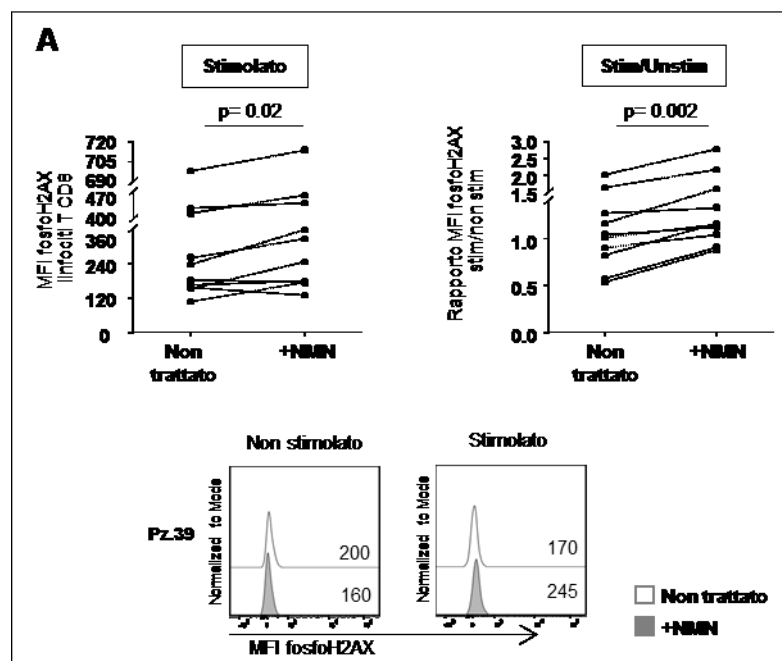


Figura 11. I grafici mostrano l'MFI dell'anticorpo anti-PAR, come misura dei livelli di parilazione, in linfociti T CD8 virus-specifici non stimolati e stimolati per 2 ore con anti-CD3/CD28 in assenza e in presenza di NAD esogeno. Sono riportati i risultati per i campioni di pazienti cronici, in alto a sinistra, e di soggetti sani, in alto a destra (statistica secondo test di Wilcoxon per dati appaiati). I grafici in basso rappresentano i valori di incremento di MFI di anti-PAR calcolati come rapporto tra MFI nei campioni stimolati e non stimolati rispettivamente in assenza e in presenza di NAD (test Wilcoxon per dati appaiati).

Abbiamo successivamente saggiato l'effetto del precursore del NAD, NMN (nicotinamide mononucleotide), nei linfociti T CD8 espansi *in vitro* in presenza o in assenza di NMN, alla luce di evidenze di letteratura indicanti che la sua somministrazione può efficientemente aumentare la biosintesi di NAD in differenti condizioni sperimentali *in vitro* ed *in vivo*²⁰⁵. La risposta al danno del DNA nelle colture linfocitarie trattate con NMN rispetto a quelle non trattate di controllo è stata quindi misurata tramite il livello di fosforilazione dell'istone H2AX, mentre la funzione mitocondriale e la proteostasi sono state saggiate rispettivamente misurando il potenziale di membrana mitocondriale e il contenuto di aggregati intracellulari, è stata poi valutata anche l'acetilazione dell'istone H3. I linfociti T CD8 *exhausted* coltivati in presenza di NMN hanno mostrato di incrementare l'espressione di fosfoH2AX in seguito a stimolazione con peptidi 15-meri corrispondenti alla proteina Core di HBV. Questo effetto può essere meglio apprezzato quando i risultati vengono espressi come rapporto della MFI di fosfoH2AX tra i campioni stimolati e i non stimolati (**Fig. 12A**).

Il trattamento con NMN poi riduceva la frazione di linfociti CD8 depolarizzati, come rilevato in citofluorimetria per mezzo della sonda JC1, sensibile al potenziale di membrana mitocondriale (**Fig. 12B**). Nelle stesse condizioni sperimentali si osservava un accumulo significativamente più basso di aggregati, ad indicare un aumento della degradazione proteica (**Fig. 12C**) e l'incremento dell'acetilazione dell'istone H3 (**Fig. 12D**).



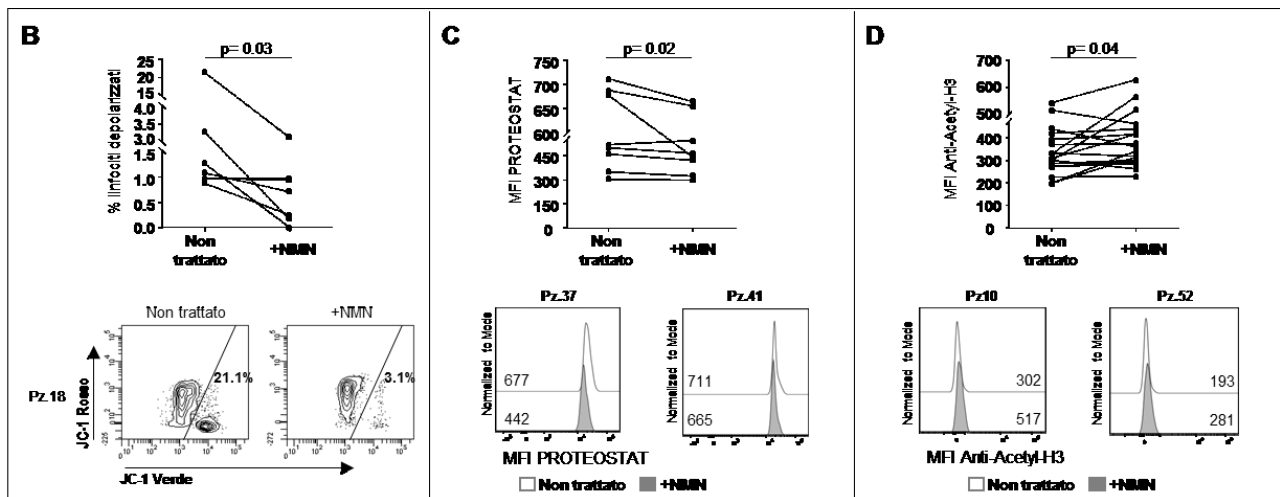


Figura 12. L'effetto di NMN su risposta al danno del DNA, funzionalità mitocondriale, proteostasi ed acetilazione istonica è stata analizzata in linfociti T CD8 di pazienti cronici espansi in colture a breve termine in seguito a stimolazione con peptidi HBV, in assenza (non trattato) e in presenza di NMN (+NMN). (A) La risposta al danno del DNA è stata studiata come fosforilazione di H2AX in seguito a ri-stimolo con una miscela di peptidi corrispondenti alla proteina core di HBV. Il grafico a sinistra riporta i valori di MFI di fosfoH2AX in seguito a stimolazione peptidica nelle colture appaiate non trattate e trattate con NMN. Il grafico a destra mostra il rapporto tra MFI di fosfoH2AX nei campioni ri-stimolati/non stimolati per le colture non trattate e trattate con NMN rispettivamente. La funzionalità mitocondriale è stata analizzata come percentuale di linfociti con membrana mitocondriale depolarizzata, rilevati mediante sonda JC-1 (B). La proteostasi è stata valutata come accumulo intracellulare di aggregati proteici, impiegando la sonda Proteostat (C). Per l'acetilazione dell'istone H3 il pannello (D) mostra i valori di MFI dell'anticorpo anti-acetilH3 rilevati in colture non trattate e trattate con NMN. Statistiche secondo test di Wilcoxon per dati appaiati. In basso, in ciascun pannello sono riportati esempi rappresentativi.

6. La supplementazione con NMN può migliorare la funzionalità linfocitaria antivirale

Abbiamo poi analizzato l'effetto *in vitro* di NMN sulla funzionalità antivirale. A questo fine, in seguito all'espansione dei PBMC dei pazienti cronici mediante stimolazione con i peptidi HBV in presenza o assenza di NMN (26 pazienti), i linfociti T CD8 sono stati testati per la produzione di citochine e per la up-regolazione di CD107a, come marcatore di citotossicità. Nelle colture trattate con NMN si è potuto osservare un incremento significativo di produzione di citochine da parte dei linfociti CD8 stimolati con peptidi HBV, con un incremento medio pari a 3,4-, 4-, 2,7- per $IFN\gamma$, $TNF\alpha$ e IL2 rispettivamente (**Fig. 13A**). Anche i linfociti CD8 positivi sia per $IFN\gamma$ che per $TNF\alpha$, come indice di polifunzionalità, erano aumentati significativamente in presenza di NMN, con un incremento medio di 3,8 volte (**Fig. 13A**), come pure l'attività citotossica dei linfociti T CD8, misurata dalla up-regolazione di CD107a (**Fig. 13A**). Attraverso marcatura con complessi destramerici di MHC di classe I di linfociti di restrizione HLA-A2, abbiamo potuto osservare che in presenza di NMN non solo la produzione citochinica era aumentata, ma anche la capacità

proliferativa (Fig. 13B). Un incremento significativo di citochine prodotte è stato rilevato anche analizzando l'intera popolazione T linfocitaria CD3-positiva (Fig. 13C).

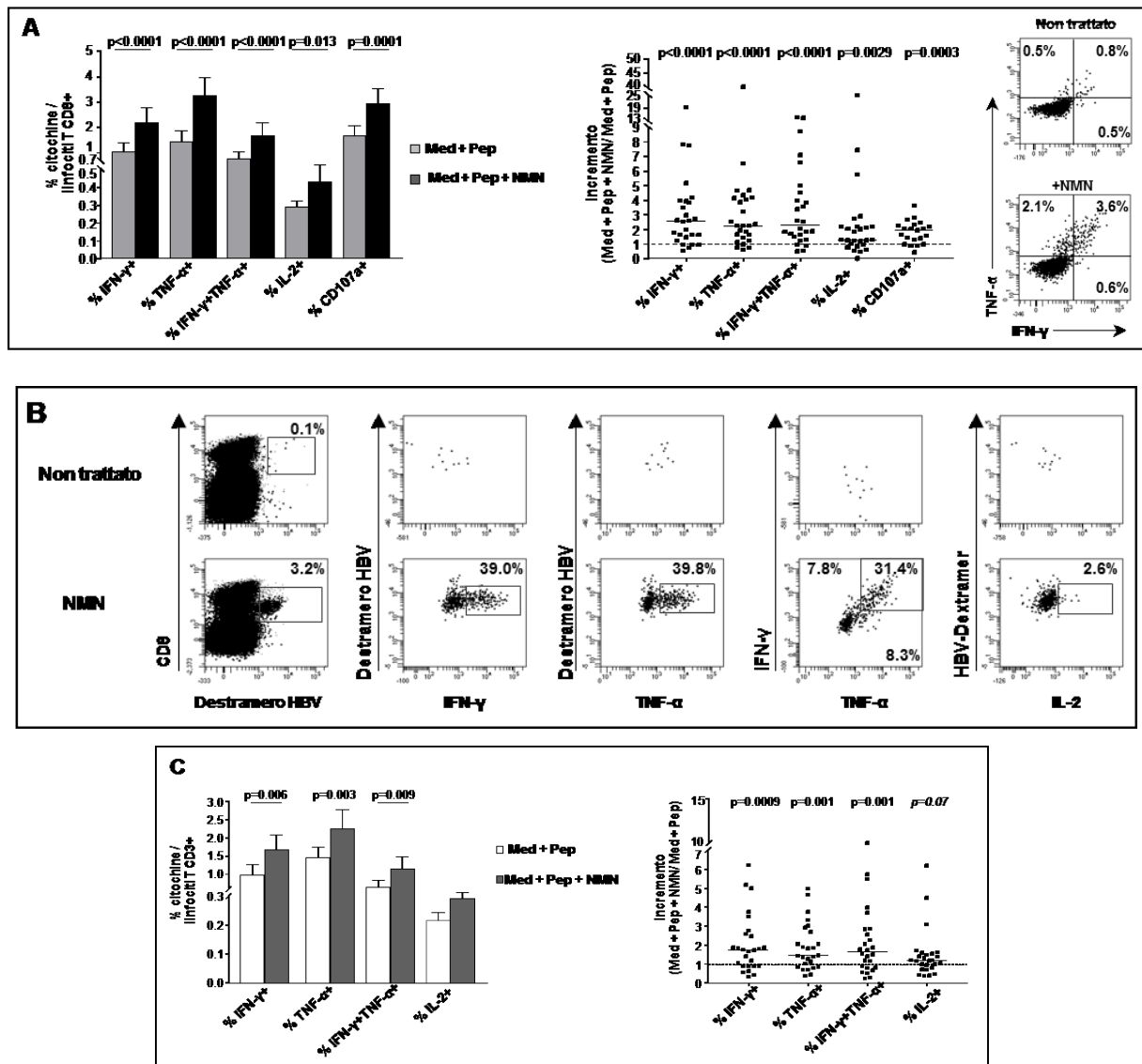


Figura 13. (A) L'effetto di NMN sull'attività T linfocitaria antivirale è stata analizzata nei linfociti T CD8 di pazienti cronici espansi in colture a breve termine in seguito a stimolazione con peptidi HBV, in assenza (Med + Pep) e in presenza di NMN (Med + Pep + NMN) mediante *intracellular cytokine staining* (ICS). Il grafico a barre a sinistra mostra la media e l'errore standard della percentuale di linfociti T CD8 che producono IFN γ , TNF α , IFN γ /TNF α , IL2 e che up-regolano il marcatore di degranulazione CD107a, in seguito a ri-stimolazione per 4 ore con i peptidi HBV (test di Wilcoxon per dati appaiati). Il grafico al centro mostra, per ciascun campione, l'incremento nei livelli di citochine e di CD107a nei linfociti T CD8, calcolato come il rapporto tra il valore misurato in presenza di NMN / coltura non trattata di controllo. Le barre orizzontali rappresentano il valore mediano di incremento. Per ciascun parametro, il valore mediano di incremento è stato confrontato con il valore teorico di 1 (corrispondente ad assenza di incremento) per mezzo del test di Wilcoxon per ranghi. A destra è mostrato un esempio rappresentativo di incremento di produzione di citochine in presenza di NMN. Nel pannello **(B)** i dot plots mostrano un campione HLA-A2+, in cui è stato possibile evidenziare l'incremento della frequenza dei linfociti T CD8 HBV-specifici tramite l'utilizzo di complessi dextramerici peptide-MHC di classe I, come pure l'aumentata produzione di citochine nella coltura trattata con NMN. **(C)** L'effetto di NMN sull'attività T linfocitaria antivirale è stata analizzata anche nell'intera popolazione T linfocitaria CD3+ nelle

stesse colture a breve termine in assenza (Med + Pep) e in presenza di NMN (Med + Pep + NMN) (test di Wilcoxon per dati appaiati).

7. L'inibizione di CD38 può complementare l'effetto di NMN nel ripristino funzionale T linfocitario

Una strategia additiva e complementare per incrementare i livelli di NAD può essere rappresentata dalla modulazione dell'attività enzimatica di CD38²⁰⁶. Per indagare questa possibilità, abbiamo testato l'effetto di una piccola molecola con attività inibitoria su CD38 (CD38i)²⁰⁶. Per primo ne abbiamo misurato l'effetto sulla parilazione nei linfociti T CD8 HBV-specifici dei pazienti cronici, in seguito alla stimolazione anti-CD3/CD28. Analogamente a quanto già osservato con l'aggiunta di NAD esogeno (**Fig. 11**), anche in questo caso i livelli di parilazione tendevano ad aumentare in seguito ad un'incubazione breve con l'inibitore di CD38 (**Fig. 14**).

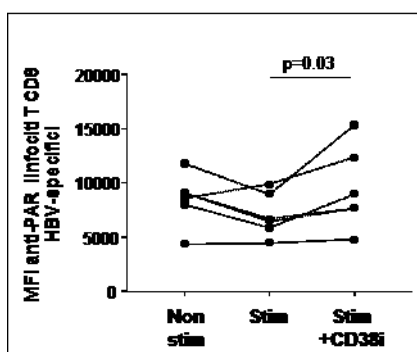


Figura 14. Parilazione in linfociti HBV-specifici di pazienti cronici non stimolati (Non stim) o stimolati (Stim.) per 2 ore con anti-CD3/CD28, in assenza e in presenza del composto inibitore dell'attività di CD38 (CD38i) (test di Wilcoxon per dati appaiati).

Abbiamo quindi saggiato l'effetto di CD38i in quelle colture linfocitarie che avevano risposto debolmente, con un incremento di IFN γ minore o uguale a 2 al trattamento con NMN. La produzione di citochine aumentava in 8 dei 13 campioni testati, pari al 61,5% (**Fig. 15A**). Per 5 di questi pazienti un miglioramento si era potuto osservare per tutte le funzioni analizzate, mentre solo un paziente non ha risposto sinergisticamente alla combinazione di CD38i+NMN. Nei campioni HLA-A2+, anche la proliferazione dei linfociti T CD8 HBV-specifici risultava incrementata (**Fig. 15B**). Infine, abbiamo saggiato la specificità d'azione del trattamento combinato, confrontando la reattività linfocitaria in colture cellulari appaiate, stimolate con peptidi HBV o con stimolo aspecifico anti-CD3, osservando un incremento significativamente maggiore di produzione di citochine in risposta allo stimolo specifico con peptidi HBV (**Fig. 15C**).

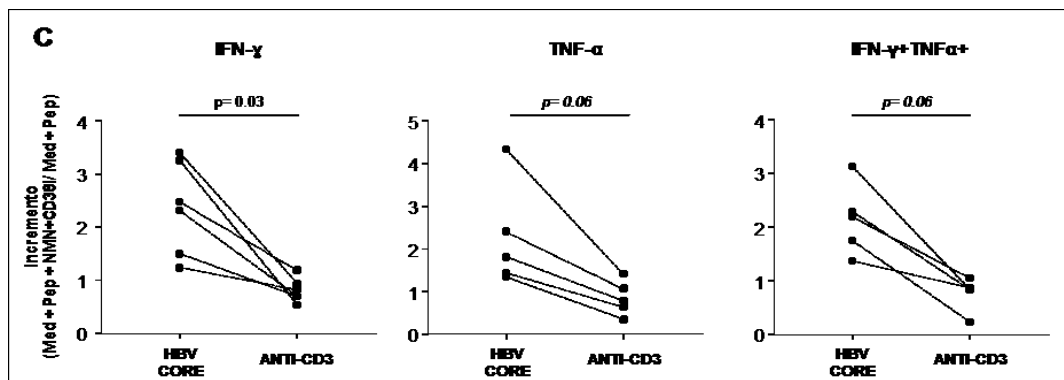
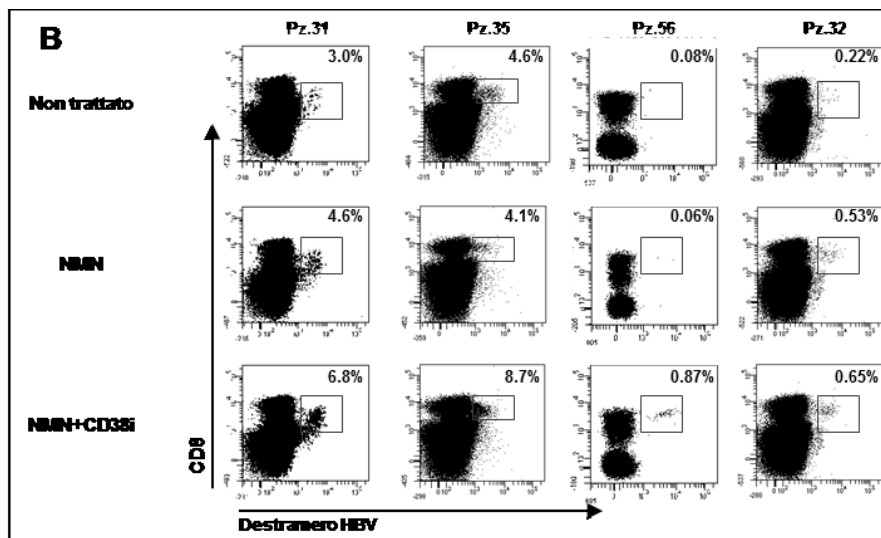
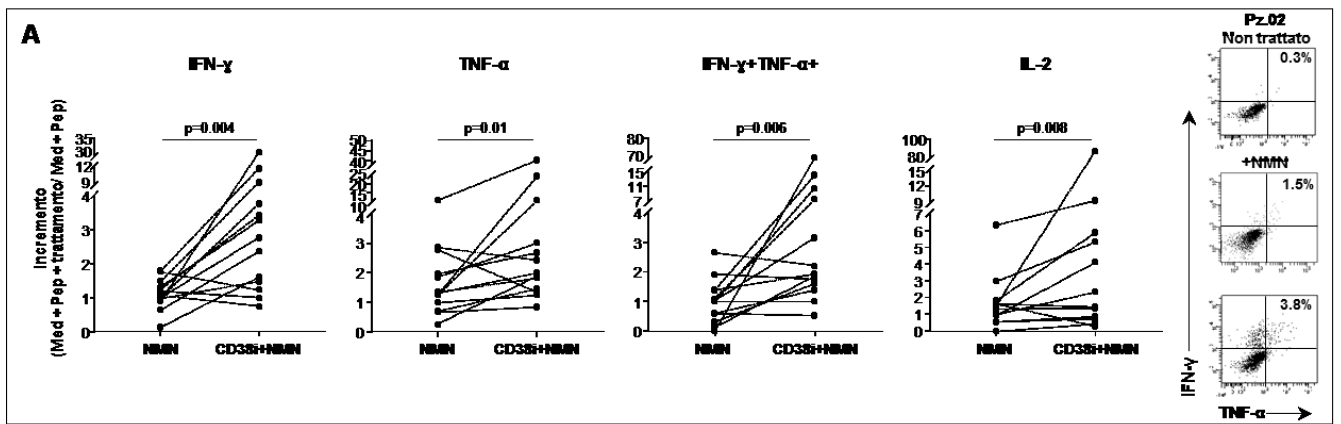


Figura 15. Le linee T linfocitarie sono state generate per mezzo della stimolazione dei PBMC di pazienti cronici con peptidi HBV *in vitro* per 9 giorni in presenza di NMN con e senza l'aggiunta del composto inibitore di CD38 (CD38i). (A) I grafici mostrano l'incremento di produzione di citochine in campioni appaiati trattati con il solo NMN o con NMN+CD38i. Per questi esperimenti sono stati selezionati i campioni che avevano mostrato una risposta più debole al trattamento con NMN, con un incremento di produzione di IFN γ \leq 2. Il pannello B mostra i dot plot relativi a 4 pazienti rappresentativi, in cui l'uso dei destrameri MHC di classe I ha permesso di apprezzare anche l'incremento della frequenza dei linfociti T CD8 HBV-specifici nelle colture trattate. (C) I grafici mostrano l'incremento di produzione di citochine in linfociti T CD8 di colture trattate con NMN+CD38i, in seguito a stimolazione appaiata con peptidi

corrispondenti alla proteina core di HBV (stimolo HBV specifico) o con anticorpo anti-CD3 pre-adsorbito nei pozzetti della piastra (stimolo aspecifico). Statistiche in base al test di Wilcoxon per dati appaiati.

DISCUSSIONE

L'*exhaustion* T linfocitaria è una caratteristica distintiva associata alla persistenza cronica di HBV. I meccanismi primari che portano allo sviluppo di tale disfunzione dei linfociti CD8 HBV-specifici sono ancora oggetto di dibattito, soprattutto perché la natura auto-limitante dell'infezione da HBV acquisita in età adulta preclude la possibilità di studi longitudinali fenotipici e funzionali sui linfociti *exhausted* dagli stadi pre-clinici di incubazione alle successive fasi di sviluppo di malattia acuta e cronica. Studi effettuati quando l'infezione cronica è già consolidata indicano che l'*exhaustion* T linfocitaria è caratterizzata da una serie di alterazioni cellulari, che comprendono un'ampia riprogrammazione trascrizionale associata a deregolazioni metaboliche e delle vie di segnalazione, che contribuiscono alla perdita progressiva e gerarchica delle funzioni effettrici delle cellule T CD8⁸³. Nella cronicizzazione dell'infezione l'esposizione persistente dei linfociti T ad alte cariche antigeniche e virali, che sono tipicamente presenti nei pazienti cronici, assumono certamente un ruolo chiave nel mantenimento dell'*exhaustion*, sostenendo uno stress replicativo con accumulo di danno del DNA, soprattutto se il sistema di risposta al danno è inefficiente. La stimolazione cronica dei linfociti T e l'infiammazione epatica possono inoltre risultare nella sovraespressione di CD38, che è tipicamente considerato un marcatore di attivazione linfocitaria. CD38 è un enzima multifunzionale, presente non solo sulla membrana plasmatica, ma anche a livello degli organelli intracellulari, che si esprime in risposta a stimoli diversi, tra cui quello citochinico¹⁹⁷.

I nostri dati mostrano che la up-regolazione di CD38 sui linfociti isolati da pazienti con infezione cronica non è strettamente associata all'attivazione linfocitaria, in quanto la sua espressione non correla con un marcatore di attivazione come HLA-DR, ma piuttosto con i livelli di PD1. Una correlazione diretta tra l'espressione di PD1 e CD38 è stata già osservata anche in linfociti infiltranti il tumore²⁰⁷. Inoltre, un'aumentata espressione di CD38 è stata associata all'*exhaustion* linfocitaria in altri modelli di infezione cronica e nel cancro, e con alterazioni metaboliche ed epigenetiche in linfociti T esauriti tumore-specifici, identificando così CD38 come ulteriore marcatore di *exhaustion* linfocitaria^{198,199,208-210}. È interessante osservare che in linfociti T *knock-out* per CD38 è stata riportata un'aumentata espressione di geni antiossidanti, mentre al contrario, cellule trasfettate con CD38 hanno mostrato un metabolismo alterato, ridotta proliferazione e aumentata sensibilità al danno ossidativo, a causa di una minore espressione di trascritti e proteine con funzione antiossidante e di risposta al danno del DNA²¹¹. Un metabolismo alterato è stato descritto anche in modelli murini di invecchiamento, in cui l'alta espressione di CD38 era associata a basso potenziale di membrana mitocondriale ed aumentata dipendenza dalla, caratteristiche

metaboliche che sono state descritte anche per i linfociti CD8 HBV-specifici in corso di infezione cronica da HBV^{157,158}. CD38 esercita una forte attività di idrolisi del NAD sia a livello intra che extra-cellulare, in base alla quale è considerato il più importante consumatore di NAD, seguito dagli enzimi poli-ADP-riboso-polimerasi (PARP) e dalle sirtuine (SIRT) che esprimono attività deacetilasi NAD-dipendente. Questo è stato dimostrato in esperimenti con topi *knock-out* (KO) per CD38, PARP1, o SIRT1, dove negli animali CD38-KO e in minor misura in quelli PARP1-KO, ma non SIRT1-KO, si è osservato un incremento dei livelli di NAD^{212,213}. L'elevata espressione di CD38 è stata recentemente associata all'elevato consumo e successivo declino di NAD, con un'alterata funzione mitocondriale nel modello murino di invecchiamento e anche, potenzialmente, con la progressione della malattia nell'infezione da HIV^{212,214}. La up-regolazione di CD38 potrebbe quindi rappresentare una causa determinante la diminuzione dei livelli di NAD anche nei linfociti T CD8 *exhausted* in corso di epatite B cronica. Inoltre, l'elevata espressione di CD38 può essere rilevante nel contesto del fegato infetto, a causa della sua attività ectonucleotidasica che porta alla produzione della adenosina, che ha proprietà immunosoppressive^{215,216}. Infine, l'idrolisi del NAD da parte di CD38 è stata riportata in associazione all'acquisita resistenza al blocco di PD1/PD-L1 nei tumori²⁰⁹.

In questo studio la deplezione di NAD è anche suggerita dai ridotti livelli di poli-(ADP-riboso)polimerizzazione (parilazione) che abbiamo osservato nei linfociti HBV-specifici dei pazienti cronici. La parilazione è infatti un processo a carico degli enzimi PARP in risposta al rilevamento di lesioni del DNA, che ha un ruolo nel richiamo di diversi fattori di riparazione del DNA ed è strettamente dipendente dalla disponibilità di molecole di NAD come donatori di unità di ADP-riboso^{184,194}. Sebbene la quantificazione diretta dei livelli di NAD intracellulare non sia tecnicamente possibile a causa delle frequenze estremamente basse di linfociti HBV-specifici nel sangue periferico di pazienti con infezione cronica da HBV, l'incremento di parilazione che abbiamo potuto rilevare in risposta all'esposizione dei linfociti CD8 *exhausted* all'aggiunta di NAD esogeno è un dato fortemente suggestivo di carenza di NAD.

In aggiunta ad una parilazione deficitaria, una scarsa efficienza dei meccanismi di risposta al danno del DNA è indicata anche dalla ridotta attivazione di altri mediatori chiave in seguito a induzione *in vitro* di danno del DNA. Questi includono alterazioni nei meccanismi di rilevazione del danno, come la difettosa fosforilazione alla serina 139 dell'istone H2AX (fosfo-H2AX, chiamato anche γ H2AX) e alla serina 1981 della chinasi ATM, responsabile della fosforilazione di H2AX^{191,192,217}. Livelli particolarmente elevati di fosfoH2AX in assenza di stimoli esogeni sono inoltre indicativi di accumulo di danno del DNA nei linfociti HBV-specifici *exhausted*, in quanto il rilevamento del livello di fosfoH2AX è tipicamente considerato un marcatore di danno del DNA¹⁸⁹.

E' stato riportato che una smorzata attivazione di ATM rappresenta una causa di accumulo di danno del DNA anche in linfociti isolati da pazienti con infezione cronica da HCV e HIV^{218,219}. L'interessante osservazione che la parilazione è richiesta anche per l'ottimale attivazione della chinasi ATM²²⁰, suggerisce che anche la ridotta fosforilazione di ATM che abbiamo potuto rilevare in questo studio, così come la relativa disfunzione dei suoi *target* a valle, come H2AX, potrebbero essere causalmente legati alla diminuita disponibilità di NAD.

La disfunzione mitocondriale, con elevazione dei livelli di ROS e aumento del danno del DNA sono stati riportati anche nell'ambito di patologie genetiche caratterizzate da un'alterata risposta al danno del DNA, dove l'accumulo del danno causato da difetti nei meccanismi di riparazione è associato a deplezione di NAD causata da iperattivazione di PARP²²¹. Quando infatti il DNA non può essere completamente riparato, lo stimolo persistente all'attivazione di PARP può portare al profondo consumo e deplezione del pool intracellulare di NAD¹⁹⁶. Questa deplezione può poi compromettere l'attività delle sirtuine, le quali intervengono in molteplici funzioni, come la regolazione della biogenesi e funzione mitocondriale, e anche in meccanismi di riparazione del DNA²²². Analogamente, anche in corso di infezione cronica da HBV, l'incrementato danno del DNA, probabilmente dovuto allo stress replicativo da esposizione dei linfociti ad alte cariche antigeniche fin dalle fasi precoci dell'*exhaustion*, possono aver determinato l'iperattivazione di PARP, con consumo e deplezione di NAD, che a sua volta può aver compromesso l'attività di parilazione negli stadi più avanzati dell'*exhaustion*. Una simile sequenza di eventi potrebbe avvenire nell'infezione cronica da HCV, come suggeriscono i dati di un nostro precedente studio, in cui si osserva l'elevata espressione dei trascritti di PARP nelle fasi precoci dell'*exhaustion* dei linfociti CD8 HCV-specifici, a differenza che nella fase più tardiva di cronicizzazione stabilizzata²²³. Nell'infezione da HBV potrebbe quindi verificarsi una simile sequenza di eventi, anche se la rarità della cronicizzazione delle infezioni contratte in età adulta rende quasi impossibile studiare le fasi precoci dell'*exhaustion*.

Il consumo di NAD da parte di CD38 e di PARP può avere anche un effetto sull'omeostasi mitocondriale, limitando il NAD disponibile per l'attività delle sirtuine. Una delle sirtuine meglio caratterizzate, SIRT1, può deacetilare diversi fattori di trascrizione relativi alla funzione mitocondriale, tra cui PGC1 α , che regola la biogenesi mitocondriale²²⁴. Una minore disponibilità di molecole di NAD nel nucleo può quindi interferire con l'asse NAD-SIRT1-PGC1 α , che rappresenta un'importante modalità di comunicazione tra nucleo e mitocondrio, compromettendo di conseguenza l'omeostasi mitocondriale²²¹. In supporto di questo meccanismo, il trascritto della sirtuina mitocondriale 3 (SIRT3) è risultato down-regolato nel nostro precedente studio sui linfociti HBV-specifici *exhausted*¹⁵⁸. Questa sirtuina è un noto effettore della risposta cellulare allo stress e

può contribuire al mantenimento della normale funzione mitocondriale inducendo la neutralizzazione dell'eccesso di ROS e regolando diversi mediatori metabolici²²². La trascrizione di SIRT3 è infatti nota per essere indotta da SIRT1 attraverso PGC1 α , sia direttamente che indirettamente attraverso Nrf2 e ERR α , quindi la sua down-regolazione può rappresentare un'ulteriore conseguenza della deplezione di NAD²²⁵⁻²²⁷. Inoltre, le sirtuine sono state descritte anche come regolatori tipici dei processi di riparazione del danno del DNA e della stabilità genomica²²⁸. Di conseguenza, una ridotta disponibilità di NAD per le sirtuine può determinare il declino della loro attività, amplificando il danno del DNA e l'alterazione dei processi mitocondriali^{182,229}.

La disfunzione mitocondriale, con elevati livelli di ROS, accumulo di danno del DNA con meccanismi di risposta al danno alterati e diminuzione dei livelli di NAD sono stati anche descritti nella senescenza cellulare associata all'invecchiamento^{181,221,230,231}, e l'aumentata espressione di CD38 e dell'attività di PARP sono considerati rilevanti nel causare il declino di NAD e la diminuzione dell'attività delle sirtuine osservati in associazione all'invecchiamento^{212,232}. Anche una riduzione dell'espressione di nicotinamide fosforibosiltrasferasi (NAMPT), enzima chiave per la biosintesi del NAD, è stata descritta come causa della diminuzione di NAD durante l'invecchiamento²³³, e non può essere esclusa come ulteriore concausa della ridotta disponibilità di NAD nei linfociti CD8 HBV-specifici, sebbene la sua espressione non sia risultata significativamente down-regolata nell'analisi trascrittomico¹⁵⁸.

La senescenza cellulare è tipicamente associata con l'erosione dei telomeri²³⁴. Questo fenomeno è stato osservato in corso di infezione da HIV, dove è stato associato alla carenza dell'attività di ATM²¹⁹. Anche i linfociti CD8 HBV-specifici, in cui abbiamo osservato sia una ridotta attivazione di ATM che la down-regolazione del suo trascritto¹⁵⁸, hanno una ridotta lunghezza dei telomeri, come evidenziato dal confronto con i linfociti influenza (FLU)-specifici degli stessi pazienti cronici. Questo dato è in linea anche con la down-regolazione di TERF2IP (*telomeric-repeat-binding-factor 2-interacting protein*) già riportata in precedenza¹⁵⁸, noto per regolare le dinamiche dei telomeri²³⁵, ed è anche in accordo con evidenze di letteratura relative all'accelerata riduzione dei telomeri a causa dello stress ossidativo conseguente all'aumento di ROS²³⁶ e con la profonda sensibilità dei telomeri ai ROS originati dalla disfunzione mitocondriale²³⁷. Questa sensibilità dei telomeri al danno da ROS è stata descritta in relazione alla suscettibilità del sito GGG alle lesioni di 8-oxoguanina e all'effetto sull'attività della telomerasi^{238,239}, che è inducibile nei linfociti T attivati²⁴⁰, ma progressivamente persa in presenza di stimolazione antigenica persistente²⁴¹. Per questa ragione in altre infezioni croniche la stimolazione antigenica persistente è già stata associata all'erosione telomerica e alla senescenza dei linfociti T²⁴². CD28 tipicamente down-regolato in cellule

senescenti, risultato sotto-espresso anche nei linfociti CD8 HBV-specifici dei pazienti con infezione cronica da HBV¹⁵⁸, è stato descritto svolgere un ruolo importante nell'induzione dell'attività della telomerasi²⁴³. Inoltre, anche in presenza della telomerasi, è risaputo che il danno esogeno al DNA telomerico è schermato dalle proteine del complesso *shelterin* rispetto all'apparato cellulare di riparazione del DNA^{244,245}. Per questo motivo, l'attivazione continua dei meccanismi di risposta al danno del DNA è uno dei meccanismi con cui l'instabilità telomerica può promuovere la senescenza²⁴⁶. Quindi i ROS possono partecipare nell'indurre la senescenza sia direttamente, causando danno ai telomeri, sia interferendo con i meccanismi deputati al mantenimento della lunghezza dei telomeri¹⁸¹.

Complessivamente i risultati del presente lavoro permettono di delineare un *network* di *pathways* intracellulari deregolati funzionalmente interconnessi, relativi a mitocondri, proteostasi, risposta al danno del DNA e controllo epigenetico della trascrizione, che può contribuire, direttamente o indirettamente, alla deplezione di NAD, che a sua volta agisce mantenendo la disfunzione degli stessi *pathways*. Questo crea un circolo vizioso in cui la sovrapproduzione di ROS contribuisce all'accumulo di danno del DNA e alla persistente attivazione dei meccanismi di riparazione del danno (**Fig. 16**). La iperattivazione di PARP e l'overespressione di CD38 porterebbero alla progressiva deplezione di NAD, compromettendo il sistema di riparazione del DNA, con ulteriore amplificazione della disfunzione mitocondriale e silenziamento genico. Rispetto a quest'ultimo, abbiamo precedentemente descritto nel modello di infezione cronica da HCV, una simile down-regolazione trasritmica, che comprendeva anche l'espressione di ATM, associata alla up-regolazione di istone metil-transferasi²²³. E' interessante osservare che l'up-regolazione della metiltransferasi EZH2, conseguente alla deplezione di NAD e ridotta attività di SIRT1, indotte a loro volta dalla elevata espressione di CD38, è stata riportata in linfociti T CD8 disfunzionali di pazienti affetti da Lupus eritematoso sistemico (LES)²⁴⁷. La carenza di NAD può quindi influenzare il controllo epigenetico della trascrizione del DNA sia limitando l'attività delle sirtuine²⁴⁷⁻²⁴⁹, sia inducendo alterazioni metaboliche²⁰⁴. Un basso rapporto NAD⁺/NADH può infatti indurre la preferenziale conversione del piruvato in lattato, causando così una diminuita formazione di acetil-CoA disponibile per l'acetilazione istonica, come indicato anche dalla scarsa capacità di acetilazione dell'istone H3 che nel presente studio abbiamo osservato nei linfociti HBV-specifici di pazienti cronici. Tutta questa informazione è cruciale per la comprensione dei meccanismi intracellulari coinvolti nell'*exhaustion* T linfocitaria per l'identificazione dei processi intracellulari alterati e delle relative molecole effettrici su cui agire con strategie immunomodulanti per migliorare il controllo antivirale dei linfociti T. Alcuni di questi meccanismi rappresentano una chiara associazione tra *exhaustion* linfocitaria e senescenza cellulare, dove la deplezione di NAD è

ritenuta svolgere un ruolo chiave nella deregolazione di diversi processi vitali, tra cui il metabolismo mitocondriale, meccanismi di riparazione del DNA e di rimodellamento della cromatina. In uno studio recentemente pubblicato su linfociti T infiltranti il tumore con disfunzione mitocondriale, la supplementazione di NAD ha permesso di osservare la correzione della disfunzione in associazione ad una migliore responsività al blocco di PD1²⁵⁰. In modelli animali di invecchiamento prematuro, il metabolismo del NAD si è rivelato un buon bersaglio terapeutico per migliorare la qualità e la durata della vita, attenuando le alterazioni mitocondriali, il danno del DNA e lo stress ossidativo^{183,251}, con un effetto preferenziale negli animali più vecchi rispetto a quelli giovani²⁰⁵. Inoltre, la supplementazione di NAD si è dimostrata un intervento efficace nello stimolare la biogenesi mitocondriale e l'attività della catena respiratoria anche in pazienti affetti da miopatia mitocondriale²⁵².

Sulla base di questi dati di letteratura e della evidenza indiretta dell'aumentato consumo e successiva deplezione di NAD nei linfociti HBV-specifici di pazienti con infezione cronica da HBV, abbiamo saggiato l'effetto *in vitro* della supplementazione di NAD sulle differenti funzioni cellulari alterate, tramite l'aggiunta del suo precursore nicotinamide mononucleotide (NMN)²⁰⁵ in colture di linfociti isolati da pazienti cronici. Il trattamento è stato in grado di ristabilire il potenziale di membrana mitocondriale, facilitare la digestione di aggresomi e migliorare l'attivazione dei meccanismi di riposta al danno del DNA e l'acetilazione istonica. Come probabile risultato della ampia e coordinata correzione di diversi *pathway* intracellulari interconnessi, anche l'attività antivirale dei linfociti è risultata significativamente ripristinata nelle stesse colture espanse in presenza di NMN.

Con l'obiettivo di migliorare ulteriormente l'effetto di NMN, ne abbiamo testato la combinazione con un composto inibitore dell'attività di CD38²⁵³, in base all'evidenza che CD38 può degradare non solo le molecole di NAD intra- ed extra-cellulare, ma anche il suo precursore NMN²⁵⁴. In questi esperimenti abbiamo utilizzato una piccola molecola con effetto inibitorio sull'attività NADasica di CD38, disegnata per terapie mirate alla ricostituzione del pool cellulare di NAD, con un buon profilo farmacocinetico in seguito a somministrazione orale²⁰⁶. Questa molecola somministrata *in vivo* in modelli animali aveva mostrato di poter contrastare il declino di NAD associato all'invecchiamento, inducendo la correzione di diverse disfunzioni metaboliche e attenuazione del danno associato al DNA telomerico²⁵³. Nei nostri esperimenti in seguito ad un'incubazione breve *ex vivo* il composto inibitore di CD38 poteva aumentare i livelli di parilazione nei linfociti HBV-specifici e induceva una migliore produzione di citochine in quelle colture linfocitarie che avevano risposto più debolmente a supplementazione con il solo NMN. Questo effetto era più evidente nella risposta dei linfociti T allo stimolo con peptidi HBV, rispetto allo stimolo non specifico con

anticorpo anti-CD3, suggerendo un effetto preferenziale sui linfociti deficienti di NAD.

In conclusione, i nostri dati mostrano un aumentato danno del DNA, con limitata attivazione dei meccanismi di risposta al danno nei linfociti esauriti HBV-specifici isolati dal sangue di pazienti con infezione cronica da HBV, al confronto non solo con linfociti influenza-specifici di soggetti sani di controllo, ma anche con quelli degli stessi soggetti cronici, suggerendo che enzimi consumatori di NAD, soprattutto CD38, probabilmente indotto da citochine infiammatorie¹⁹⁷, possono ricoprire un ruolo chiave nella deplezione di NAD. Il ripristino di molte funzioni cellulari interconnesse in seguito a supplementazione di NAD indica che la deplezione di NAD può rappresentare un importante determinante dell'*exhaustion* T linfocitaria, evidenziando punti di contatto tra *exhaustion* e senescenza. In base ai risultati esposti, la supplementazione di NAD rappresenta una strategia da considerare per l'immunomodulazione nella cura dell'epatite cronica B.

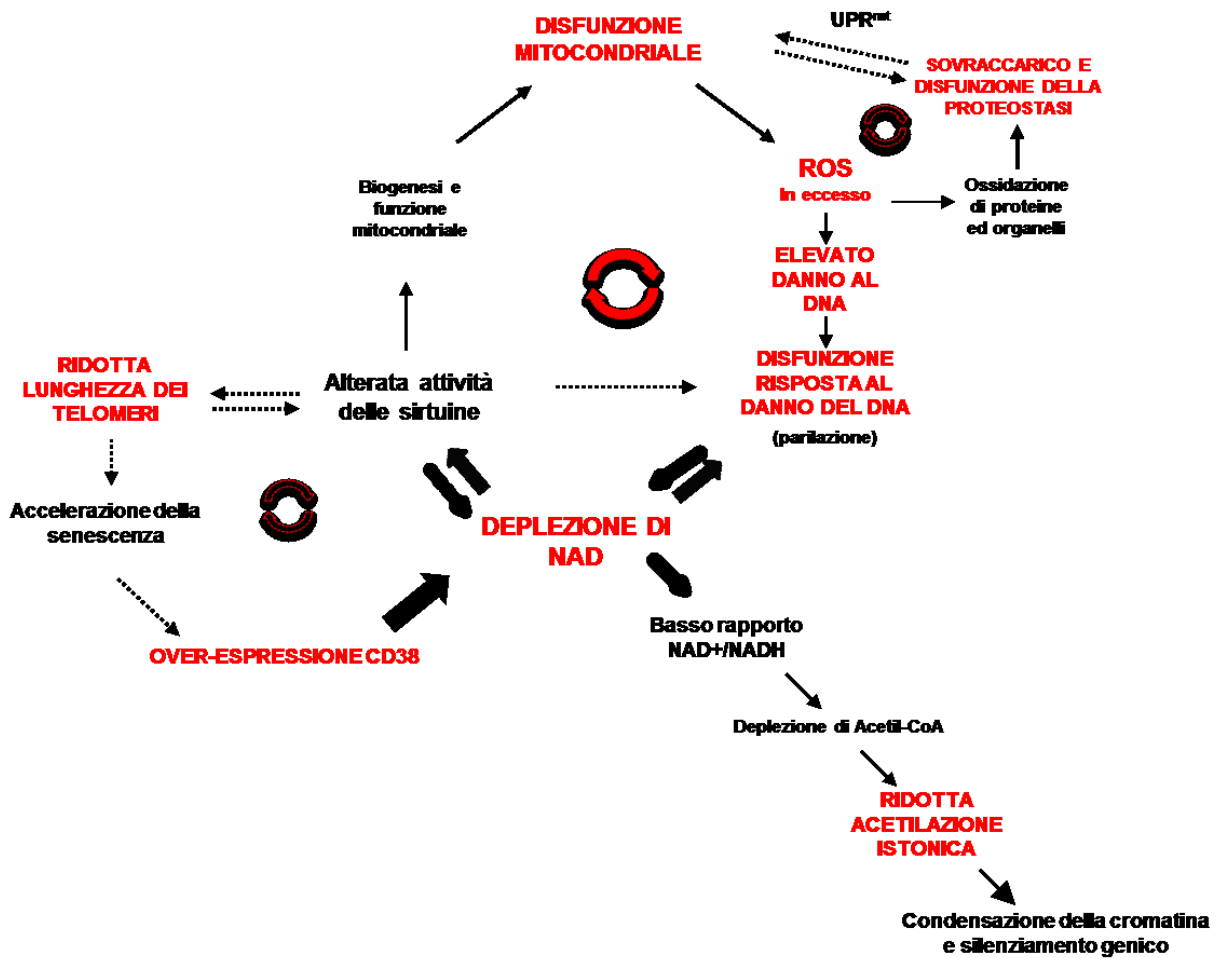


Figura 16. Network intracellulare di funzioni deregolate interconnesse associate alla exhaustion dei linfociti T CD8 HBV-specifici in corso di epatite B cronica. Gli elevati livelli di ROS associati alla disfunzione mitocondriale possono incrementare l'ossidazione proteica e il danno del DNA, con accumulo di aggregati intracellulari e sovraccarico della proteostasi. I mitocondri potrebbero contribuire a ristabilire l'omeostasi proteica attivando geni mitocondriali protettivi attraverso la "mitochondrial unfolded protein response (UPR^{mt})". Il danno del DNA stimola l'attivazione persistente dei meccanismi di risposta al danno, tra cui la poli-ADP-ribosilazione (o parilazione) ad opera degli enzimi della famiglia PARP, che consumando NAD per espletare la loro funzione, possono indurne la diminuzione. Alla deplezione di NAD contribuisce principalmente la up-regolazione di CD38, il maggior "consumatore" cellulare di NAD. L'esaurimento delle scorte cellulari di NAD possono compromettere l'attività delle sirtuine e indurre la riduzione del rapporto NAD/NADH, con conseguente diminuita disponibilità di acetil-CoA per l'acetilazione istonica, portando alla condensazione della cromatina e silenziamento genico. La ridotta attività delle sirtuine può contribuire alla disfunzione mitocondriale, attraverso l'aumento dei ROS mitocondriali e l'alterazione della mitofagia, può alterare la lunghezza dei telomeri e anche diversi pathway di riparazione del danno del DNA, generando un circolo vizioso, che può mantenere ed amplificare il danno del DNA e il consumo di NAD. La disfunzione mitocondriale, gli elevati livelli di ROS, la deplezione di NAD, la up-regolazione di CD38 rappresentano caratteristiche condivise tra l'*exhaustion* T linfocitaria e la senescenza cellulare. In figura sono indicati in rosso gli aspetti di questo schema già validati. L'elevata produzione di ROS, la proteostasi sovraccaricata, la deplezione di NAD, l'up-regolazione di CD38 e la deregolazione epigenetica rappresentano potenziali target per strategie di immunomodulazione nell'epatite B cronica.

BIBLIOGRAFIA

1. Yan, H. *et al.* Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *Elife* **2012**, 1–28 (2012).
2. Meier, A., Mehrle, S., Weiss, T. S., Mier, W. & Urban, S. Myristoylated PreS1-domain of the hepatitis B virus L-protein mediates specific binding to differentiated hepatocytes. *Hepatology* **58**, 31–42 (2013).
3. Wooddell, C. I. *et al.* RNAi-based treatment of chronically infected patients and chimpanzees reveals that integrated hepatitis B virus DNA is a source of HBsAg. *Sci. Transl. Med.* **9**, (2017).
4. Idilman, R. The summarized of EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *Turkish J. Gastroenterol.* **28**, 412–416 (2017).
5. Liu, Y., Jiang, M., Xue, J., Yan, H. & Liang, X. Serum HBV RNA quantification: useful for monitoring natural history of chronic hepatitis B infection. *BMC Gastroenterol.* **19**, 53 (2019).
6. van Bömmel, F. *et al.* Serum hepatitis B virus RNA levels as an early predictor of hepatitis B envelope antigen seroconversion during treatment with polymerase inhibitors. *Hepatology* **61**, 66–76 (2015).
7. Wang, J. *et al.* Relationship between serum HBV-RNA levels and intrahepatic viral as well as histologic activity markers in entecavir-treated patients. *J. Hepatol.* **68**, 16–24 (2018).
8. Wang, J. *et al.* Serum hepatitis B virus RNA is encapsidated pregenome RNA that may be associated with persistence of viral infection and rebound. *J. Hepatol.* **65**, 700–710 (2016).
9. Hong, X. *et al.* Characterization and Application of Precore/Core- Related Antigens in Animal Models of Hepatitis B Virus Infection. *Hepatology* **74**, 99–115 (2021).
10. Testoni, B. *et al.* Serum hepatitis B core-related antigen (HBcrAg) correlates with covalently closed circular DNA transcriptional activity in chronic hepatitis B patients. *J. Hepatol.* **70**, 615–625 (2019).
11. Wong, D. K.-H. *et al.* Hepatitis B virus core-related antigen as a surrogate marker for covalently closed circular DNA. *Liver Int.* **37**, 995–1001 (2017).
12. Chen, S. *et al.* Clinical evaluation of hepatitis B core-related antigen in chronic hepatitis B and hepatocellular carcinoma patients. *Clin. Chim. Acta* **486**, 237–244 (2018).
13. Wong, D. K.-H. *et al.* Hepatitis B Virus Core-Related Antigens as Markers for Monitoring Chronic Hepatitis B Infection. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 3942–3947 (2007).
14. Brunetto, M. R. *et al.* Incremental value of HBcrAg to classify 1582 HBeAg-negative

- individuals in chronic infection without liver disease or hepatitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **53**, 733–744 (2021).
15. Vachon, A. & Osiowy, C. Novel Biomarkers of Hepatitis B Virus and Their Use in Chronic Hepatitis B Patient Management. *Viruses* **13**, 951 (2021).
 16. Liu, X. *et al.* Correlation between hepatitis B virus DNA levels and diagnostic tests for HBsAg, HBeAg, and PreS1-Ag in chronic hepatitis B. *Genet. Mol. Res.* **15**, (2016).
 17. Deguchi, M. *et al.* Evaluation of the highly sensitive chemiluminescent enzyme immunoassay “Lumipulse HBsAg-HQ” for hepatitis B virus screening. *J. Clin. Lab. Anal.* **32**, e22334 (2018).
 18. Takeda, K. *et al.* Highly Sensitive Detection of Hepatitis B Virus Surface Antigen by Use of a Semiautomated Immune Complex Transfer Chemiluminescence Enzyme Immunoassay. *J. Clin. Microbiol.* **51**, 2238–2244 (2013).
 19. Yang, R. *et al.* The Lumipulse G HBsAg-Quant assay for screening and quantification of the hepatitis B surface antigen. *J. Virol. Methods* **228**, 39–47 (2016).
 20. Kusumoto, S. *et al.* Ultra-high sensitivity HBsAg assay can diagnose HBV reactivation following rituximab-based therapy in patients with lymphoma. *J. Hepatol.* **73**, 285–293 (2020).
 21. Vanwolleghem, T. *et al.* Hepatitis B core-specific memory B cell responses associate with clinical parameters in patients with chronic HBV. *J. Hepatol.* **73**, 52–61 (2020).
 22. Li, M.-R. *et al.* Quantitative hepatitis B core antibody level is associated with inflammatory activity in treatment-naïve chronic hepatitis B patients. *Medicine (Baltimore)*. **95**, e4422 (2016).
 23. Li, M.-R. *et al.* Serum hepatitis B core antibody titer use in screening for significant fibrosis in treatment-naïve patients with chronic hepatitis B. *Oncotarget* **8**, 11063–11070 (2017).
 24. Yuan, Q. *et al.* Total Hepatitis B Core Antigen Antibody, a Quantitative Non-Invasive Marker of Hepatitis B Virus Induced Liver Disease. *PLoS One* **10**, e0130209 (2015).
 25. Chi, H. *et al.* Serum Level of Antibodies Against Hepatitis B Core Protein Is Associated With Clinical Relapse After Discontinuation of Nucleos(t)ide Analogue Therapy. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **17**, 182-191.e1 (2019).
 26. Scaglione, S. J. & Lok, A. S. F. Effectiveness of Hepatitis B Treatment in Clinical Practice. *Gastroenterology* **142**, 1360-1368.e1 (2012).
 27. Craxì, A., Antonucci, G. & Cammà, C. Treatment options in HBV. *J. Hepatol.* **44**, S77–S83 (2006).
 28. Schulze, A., Schieck, A., Ni, Y., Mier, W. & Urban, S. Fine Mapping of Pre-S Sequence

- Requirements for Hepatitis B Virus Large Envelope Protein-Mediated Receptor Interaction. *J. Virol.* **84**, 1989–2000 (2010).
29. Wedemeyer, H. *et al.* GS-13-Final results of a multicenter, open-label phase 2 clinical trial (MYR203) to assess safety and efficacy of myrcludex B in cwith PEG-interferon Alpha 2a in patients with chronic HBV/HDV co-infection. *J. Hepatol.* **70**, e81 (2019).
 30. Lucifora, J., Esser, K. & Protzer, U. Ezetimibe blocks hepatitis B virus infection after virus uptake into hepatocytes. *Antiviral Res.* **97**, 195–197 (2013).
 31. Watashi, K. *et al.* Cyclosporin A and its analogs inhibit hepatitis B virus entry into cultured hepatocytes through targeting a membrane transporter, sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP). *Hepatology* **59**, 1726–1737 (2014).
 32. Shimura, S. *et al.* Cyclosporin derivatives inhibit hepatitis B virus entry without interfering with NTCP transporter activity. *J. Hepatol.* **66**, 685–692 (2017).
 33. Li, D. *et al.* A potent human neutralizing antibody Fc-dependently reduces established HBV infections. *Elife* **6**, (2017).
 34. Zhang, T.-Y. *et al.* Prolonged suppression of HBV in mice by a novel antibody that targets a unique epitope on hepatitis B surface antigen. *Gut* **65**, 658–671 (2016).
 35. Neumann, A. U. *et al.* Novel mechanism of antibodies to hepatitis B virus in blocking viral particle release from cells. *Hepatology* **52**, 875–885 (2010).
 36. Galun, E. *et al.* Clinical evaluation (phase I) of a combination of two human monoclonal antibodies to HBV: Safety and antiviral properties. *Hepatology* **35**, 673–679 (2002).
 37. Fanning, G. C., Zoulim, F., Hou, J. & Bertoletti, A. Author Correction: Therapeutic strategies for hepatitis B virus infection: towards a cure. *Nat. Rev. Drug Discov.* **19**, 291–291 (2020).
 38. Maepa, M., Roelofse, I., Ely, A. & Arbuthnot, P. Progress and Prospects of Anti-HBV Gene Therapy Development. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 17589–17610 (2015).
 39. Seeger, C. & Sohn, J. A. Complete Spectrum of CRISPR/Cas9-induced Mutations on HBV cccDNA. *Mol. Ther.* **24**, 1258–1266 (2016).
 40. Bloom, K., Maepa, M., Ely, A. & Arbuthnot, P. Gene Therapy for Chronic HBV—Can We Eliminate cccDNA? *Genes (Basel)*. **9**, 207 (2018).
 41. Wang, L. *et al.* PS-074-A first-in-class orally available HBV cccDNA destabilizer ccc_R08 achieved sustainable HBsAg and HBV DNA suppression in the HBV circle mouse model through elimination of cccDNA-like molecules in the mouse liver. *J. Hepatol.* **70**, e48 (2019).
 42. Seeger, C. Control of viral transcripts as a concept for future HBV therapies. *Curr. Opin.*

Virology. **30**, 18–23 (2018).

43. Rivière, L. *et al.* HBx relieves chromatin-mediated transcriptional repression of hepatitis B viral cccDNA involving SETDB1 histone methyltransferase. *J. Hepatol.* **63**, 1093–1102 (2015).
44. Belloni, L. *et al.* Nuclear HBx binds the HBV minichromosome and modifies the epigenetic regulation of cccDNA function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 19975–19979 (2009).
45. Lucifora, J. *et al.* Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection. *J. Hepatol.* **55**, 996–1003 (2011).
46. Belloni, L. *et al.* IFN- α inhibits HBV transcription and replication in cell culture and in humanized mice by targeting the epigenetic regulation of the nuclear cccDNA minichromosome. *J. Clin. Invest.* **122**, 529–537 (2012).
47. Sekiba, K. *et al.* Inhibition of HBV Transcription From cccDNA With Nitazoxanide by Targeting the HBx–DDB1 Interaction. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **7**, 297–312 (2019).
48. Cougot, D. *et al.* The Hepatitis B Virus X Protein Functionally Interacts with CREB-binding Protein/p300 in the Regulation of CREB-mediated Transcription. *J. Biol. Chem.* **282**, 4277–4287 (2007).
49. Gilmore, S. *et al.* Antiviral activity of GS-5801, a liver-targeted prodrug of a lysine demethylase 5 inhibitor, in a hepatitis B virus primary human hepatocyte infection model. *J. Hepatol.* **66**, S690–S691 (2017).
50. Murphy, C. M. *et al.* Hepatitis B Virus X Protein Promotes Degradation of SMC5/6 to Enhance HBV Replication. *Cell Rep.* **16**, 2846–2854 (2016).
51. Billioud, G. *et al.* In vivo reduction of hepatitis B virus antigenemia and viremia by antisense oligonucleotides. *J. Hepatol.* **64**, 781–789 (2016).
52. Yuen, M.-F. *et al.* PS-080-Short term RNA interference therapy in chronic hepatitis B using JNJ-3989 brings majority of patients to HBsAg < 100 IU/ml threshold. *J. Hepatol.* **70**, e51–e52 (2019).
53. Mueller, H. *et al.* A novel orally available small molecule that inhibits hepatitis B virus expression. *J. Hepatol.* **68**, 412–420 (2018).
54. Zhou, T. *et al.* HBsAg mRNA degradation induced by a dihydroquinolizinone compound depends on the HBV posttranscriptional regulatory element. *Antiviral Res.* **149**, 191–201 (2018).
55. Gane, E. *et al.* FRI-219-RO7049389, a core protein allosteric modulator, demonstrates robust decline in HBV DNA and HBV RNA in chronic HBV infected patients. *J. Hepatol.* **70**, e491 (2019).

56. Katen, S. P., Chirapu, S. R., Finn, M. G. & Zlotnick, A. Trapping of Hepatitis B Virus Capsid Assembly Intermediates by Phenylpropenamide Assembly Accelerators. *ACS Chem. Biol.* **5**, 1125–1136 (2010).
57. Sari, O. *et al.* Synthesis of sulfamoylbenzamide derivatives as HBV capsid assembly effector. *Eur. J. Med. Chem.* **138**, 407–421 (2017).
58. Yuen, M. F. *et al.* Antiviral Activity, Safety, and Pharmacokinetics of Capsid Assembly Modulator NVR 3-778 in Patients with Chronic HBV Infection. *Gastroenterology* **156**, 1392-1403.e7 (2019).
59. Ma, X. *et al.* LBO-06-Interim safety and efficacy results of the ABI-H0731 phase 2a program exploring the combination of ABI-H0731 with Nuc therapy in treatment-naive and treatment-suppressed chronic hepatitis B patients. *J. Hepatol.* **70**, e130 (2019).
60. Lahlali, T. *et al.* Novel Potent Capsid Assembly Modulators Regulate Multiple Steps of the Hepatitis B Virus Life Cycle. *Antimicrob. Agents Chemother.* **62**, (2018).
61. Vaillant, A. Nucleic acid polymers: Broad spectrum antiviral activity, antiviral mechanisms and optimization for the treatment of hepatitis B and hepatitis D infection. *Antiviral Res.* **133**, 32–40 (2016).
62. Bazinet, M. *et al.* Safety and efficacy of REP 2139 and pegylated interferon alfa-2a for treatment-naive patients with chronic hepatitis B virus and hepatitis D virus co-infection (REP 301 and REP 301-LTF): a non-randomised, open-label, phase 2 trial. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* **2**, 877–889 (2017).
63. Bazinet, M. *et al.* FRI-210-Establishment of high rates of functional cure of HBeAg negative chronic HBV infection with REP 2139-Mg based combination therapy: Ongoing follow-up results from the REP 401 study. *J. Hepatol.* **70**, e486 (2019).
64. Gill, U. S. *et al.* Interferon Alpha Induces Sustained Changes in NK Cell Responsiveness to Hepatitis B Viral Load Suppression In Vivo. *PLOS Pathog.* **12**, e1005788 (2016).
65. Micco, L. *et al.* Differential boosting of innate and adaptive antiviral responses during pegylated-interferon-alpha therapy of chronic hepatitis B. *J. Hepatol.* **58**, 225–233 (2013).
66. Suslov, A., Wieland, S. & Menne, S. Modulators of innate immunity as novel therapeutics for treatment of chronic hepatitis B. *Curr. Opin. Virol.* **30**, 9–17 (2018).
67. Lucifora, J. *et al.* Specific and Nonhepatotoxic Degradation of Nuclear Hepatitis B Virus cccDNA. *Science (80-.).* **343**, 1221–1228 (2014).
68. Xia, Y. *et al.* Interferon- γ and Tumor Necrosis Factor- α Produced by T Cells Reduce the HBV Persistence Form, cccDNA, Without Cytolysis. *Gastroenterology* **150**, 194–205 (2016).

69. Guo, H. *et al.* Activation of Pattern Recognition Receptor-Mediated Innate Immunity Inhibits the Replication of Hepatitis B Virus in Human Hepatocyte-Derived Cells. *J. Virol.* **83**, 847–858 (2009).
70. Guo, F. *et al.* STING Agonists Induce an Innate Antiviral Immune Response against Hepatitis B Virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 1273–1281 (2015).
71. Lanford, R. E. *et al.* GS-9620, an oral agonist of toll-like receptor-7, induces prolonged suppression of hepatitis B virus in chronically infected chimpanzees. *Gastroenterology* **144**, 1508-1517.e10 (2013).
72. Boni, C. *et al.* TLR7 Agonist Increases Responses of Hepatitis B Virus–Specific T Cells and Natural Killer Cells in Patients With Chronic Hepatitis B Treated With Nucleos(T)ide Analogues. *Gastroenterology* **154**, 1764-1777.e7 (2018).
73. Korolowicz, K. E. *et al.* Liver- Targeted Toll- Like Receptor 7 Agonist Combined With Entecavir Promotes a Functional Cure in the Woodchuck Model of Hepatitis B Virus. *Hepatol. Commun.* **3**, 1296–1310 (2019).
74. Mackman, R. L. *et al.* Discovery of GS-9688 (Selgantolimod) as a Potent and Selective Oral Toll-Like Receptor 8 Agonist for the Treatment of Chronic Hepatitis B. *J. Med. Chem.* **63**, 10188–10203 (2020).
75. Daffis, S. *et al.* Toll-Like Receptor 8 Agonist GS-9688 Induces Sustained Efficacy in the Woodchuck Model of Chronic Hepatitis B. *Hepatology* **73**, 53–67 (2021).
76. Suresh, M. *et al.* Antiviral Efficacy and Host Immune Response Induction during Sequential Treatment with SB 9200 Followed by Entecavir in Woodchucks. *PLoS One* **12**, e0169631 (2017).
77. Boni, C. *et al.* Characterization of Hepatitis B Virus (HBV)-Specific T-Cell Dysfunction in Chronic HBV Infection. *J. Virol.* **81**, 4215–4225 (2007).
78. Fisicaro, P. *et al.* Antiviral Intrahepatic T-Cell Responses Can Be Restored by Blocking Programmed Death-1 Pathway in Chronic Hepatitis B. *Gastroenterology* **138**, 682-693.e4 (2010).
79. Salimzadeh, L. *et al.* PD-1 blockade partially recovers dysfunctional virus–specific B cells in chronic hepatitis B infection. *J. Clin. Invest.* **128**, 4573–4587 (2018).
80. Burton, A. R. *et al.* Circulating and intrahepatic antiviral B cells are defective in hepatitis B. *J. Clin. Invest.* **128**, 4588–4603 (2018).
81. Michel, M.-L., Pol, S., Brechot, C. & Tiollais, P. Immunotherapy of chronic hepatitis B by anti HBV vaccine: from present to future. *Vaccine* **19**, 2395–2399 (2001).
82. Liu, J. *et al.* Enhancing Virus-Specific Immunity In Vivo by Combining Therapeutic

- Vaccination and PD-L1 Blockade in Chronic Hepadnaviral Infection. *PLoS Pathog.* **10**, e1003856 (2014).
83. Barili, V. *et al.* Unraveling the Multifaceted Nature of CD8 T Cell Exhaustion Provides the Molecular Basis for Therapeutic T Cell Reconstitution in Chronic Hepatitis B and C. *Cells* **10**, 2563 (2021).
 84. Kah, J. *et al.* Lymphocytes transiently expressing virus-specific T cell receptors reduce hepatitis B virus infection. *J. Clin. Invest.* **127**, 3177–3188 (2017).
 85. Koh, S. *et al.* Nonlytic Lymphocytes Engineered to Express Virus-Specific T-Cell Receptors Limit HBV Infection by Activating APOBEC3. *Gastroenterology* **155**, 180-193.e6 (2018).
 86. Bohne, F. *et al.* T Cells Redirected Against Hepatitis B Virus Surface Proteins Eliminate Infected Hepatocytes. *Gastroenterology* **134**, 239–247 (2008).
 87. Gehring, A. J. *et al.* Engineering virus-specific T cells that target HBV infected hepatocytes and hepatocellular carcinoma cell lines. *J. Hepatol.* **55**, 103–110 (2011).
 88. Krebs, K. *et al.* T Cells Expressing a Chimeric Antigen Receptor That Binds Hepatitis B Virus Envelope Proteins Control Virus Replication in Mice. *Gastroenterology* **145**, 456–465 (2013).
 89. Qasim, W. *et al.* Immunotherapy of HCC metastases with autologous T cell receptor redirected T cells, targeting HBsAg in a liver transplant patient. *J. Hepatol.* **62**, 486–491 (2015).
 90. Kaiser, A. D. *et al.* Towards a commercial process for the manufacture of genetically modified T cells for therapy. *Cancer Gene Ther.* **22**, 72–78 (2015).
 91. Sastry, K. S. R. *et al.* Targeting Hepatitis B Virus-Infected Cells with a T-Cell Receptor-Like Antibody. *J. Virol.* **85**, 1935–1942 (2011).
 92. Oates, J., Hassan, N. J. & Jakobsen, B. K. ImmTACs for targeted cancer therapy: Why, what, how, and which. *Mol. Immunol.* **67**, 67–74 (2015).
 93. Yang, H. *et al.* Elimination of Latently HIV-infected Cells from Antiretroviral Therapy-suppressed Subjects by Engineered Immune-mobilizing T-cell Receptors. *Mol. Ther.* **24**, 1913–1925 (2016).
 94. Ferrari, C. HBV and the immune response. *Liver Int.* **35**, 121–128 (2015).
 95. Maini, M. K. & Gehring, A. J. The role of innate immunity in the immunopathology and treatment of HBV infection. *J. Hepatol.* **64**, S60–S70 (2016).
 96. Guidotti, L. G. *et al.* Viral Clearance Without Destruction of Infected Cells During Acute HBV Infection. *Science (80-.).* **284**, 825–829 (1999).
 97. Wieland, S., Thimme, R., Purcell, R. H. & Chisari, F. V. Genomic analysis of the host

- response to hepatitis B virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 6669–6674 (2004).
98. Fletcher, S. P. *et al.* Transcriptomic analysis of the woodchuck model of chronic hepatitis B. *Hepatology* **56**, 820–830 (2012).
 99. Stacey, A. R. *et al.* Induction of a Striking Systemic Cytokine Cascade prior to Peak Viremia in Acute Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection, in Contrast to More Modest and Delayed Responses in Acute Hepatitis B and C Virus Infections. *J. Virol.* **83**, 3719–3733 (2009).
 100. Dunn, C. *et al.* Temporal Analysis of Early Immune Responses in Patients With Acute Hepatitis B Virus Infection. *Gastroenterology* **137**, 1289–1300 (2009).
 101. Sato, S. *et al.* The RNA Sensor RIG-I Dually Functions as an Innate Sensor and Direct Antiviral Factor for Hepatitis B Virus. *Immunity* **42**, 123–132 (2015).
 102. Guy, C. S., Mulrooney-Cousins, P. M., Churchill, N. D. & Michalak, T. I. Intrahepatic Expression of Genes Affiliated with Innate and Adaptive Immune Responses Immediately after Invasion and during Acute Infection with Woodchuck Hepadnavirus. *J. Virol.* **82**, 8579–8591 (2008).
 103. Wieland, S. F. & Chisari, F. V. Stealth and Cunning: Hepatitis B and Hepatitis C Viruses. *J. Virol.* **79**, 9369–9380 (2005).
 104. Bertoletti, A., Maini, M. K. & Ferrari, C. The host–pathogen interaction during HBV infection: immunological controversies. *Antivir. Ther.* **15**, 15–24 (2010).
 105. Luangsay, S. *et al.* Early inhibition of hepatocyte innate responses by hepatitis B virus. *J. Hepatol.* **63**, 1314–1322 (2015).
 106. Wang, H. & Ryu, W.-S. Hepatitis B Virus Polymerase Blocks Pattern Recognition Receptor Signaling via Interaction with DDX3: Implications for Immune Evasion. *PLoS Pathog.* **6**, e1000986 (2010).
 107. Yu, S. *et al.* Hepatitis B virus polymerase inhibits RIG-I- and Toll-like receptor 3-mediated beta interferon induction in human hepatocytes through interference with interferon regulatory factor 3 activation and dampening of the interaction between TBK1/IKK ϵ and DDX3. *J. Gen. Virol.* **91**, 2080–2090 (2010).
 108. Wei, C. *et al.* The Hepatitis B Virus X Protein Disrupts Innate Immunity by Downregulating Mitochondrial Antiviral Signaling Protein. *J. Immunol.* **185**, 1158–1168 (2010).
 109. Kumar, M. *et al.* Hepatitis B Virus Regulatory HBx Protein Binds to Adaptor Protein IPS-1 and Inhibits the Activation of Beta Interferon. *J. Virol.* **85**, 987–995 (2011).
 110. Wang, X. *et al.* Hepatitis B virus X protein suppresses virus-triggered IRF3 activation and IFN- β induction by disrupting the VISA-associated complex. *Cell. Mol. Immunol.* **7**, 341–

- 348 (2010).
111. Lütgehetmann, M. *et al.* Hepatitis B Virus Limits Response of Human Hepatocytes to Interferon- α in Chimeric Mice. *Gastroenterology* **140**, 2074-2083.e2 (2011).
 112. Christen, V. *et al.* Inhibition of Alpha Interferon Signaling by Hepatitis B Virus. *J. Virol.* **81**, 159–165 (2007).
 113. Wu, M. *et al.* Hepatitis B virus polymerase inhibits the interferon-inducible MyD88 promoter by blocking nuclear translocation of Stat1. *J. Gen. Virol.* **88**, 3260–3269 (2007).
 114. Foster, G. R. *et al.* Expression of the terminal protein region of hepatitis B virus inhibits cellular responses to interferons alpha and gamma and double-stranded RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**, 2888–2892 (1991).
 115. Xu, Y. *et al.* HBsAg inhibits TLR9-mediated activation and IFN- α production in plasmacytoid dendritic cells. *Mol. Immunol.* **46**, 2640–2646 (2009).
 116. Li, M. *et al.* Kupffer Cells Support Hepatitis B Virus–Mediated CD8 + T Cell Exhaustion via Hepatitis B Core Antigen–TLR2 Interactions in Mice. *J. Immunol.* **195**, 3100–3109 (2015).
 117. Bertolotti, A. & Ferrari, C. Adaptive immunity in HBV infection. *J. Hepatol.* **64**, S71–S83 (2016).
 118. Webster, G. Incubation Phase of Acute Hepatitis B in Man: Dynamic of Cellular Immune Mechanisms. *Hepatology* **32**, 1117–1124 (2000).
 119. Fisicaro, P. *et al.* Early kinetics of innate and adaptive immune responses during hepatitis B virus infection. *Gut* **58**, 974–982 (2009).
 120. Sitia, G., Iannacone, M., Müller, S., Bianchi, M. E. & Guidotti, L. G. Treatment with HMGB1 inhibitors diminishes CTL-induced liver disease in HBV transgenic mice. *J. Leukoc. Biol.* **81**, 100–107 (2007).
 121. Sitia, G. *et al.* MMPs are required for recruitment of antigen-nonspecific mononuclear cells into the liver by CTLs. *J. Clin. Invest.* **113**, 1158–1167 (2004).
 122. Iannacone, M. *et al.* Platelets mediate cytotoxic T lymphocyte-induced liver damage. *Nat. Med.* **11**, 1167–1169 (2005).
 123. Guidotti, L. G. & Chisari, F. V. IMMUNOBIOLOGY AND PATHOGENESIS OF VIRAL HEPATITIS. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **1**, 23–61 (2006).
 124. Chisari, F. V., Isogawa, M. & Wieland, S. F. Pathogenesis of hepatitis B virus infection. *Pathol. Biol.* **58**, 258–266 (2010).
 125. Rehermann, B. & Nascimbeni, M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 215–229 (2005).
 126. Bertolotti, A. Kinetics of the immune response during HBV and HCV infection. *Hepatology*

- 38**, 4–13 (2003).
127. Gehring, A. J. *et al.* The Level of Viral Antigen Presented by Hepatocytes Influences CD8 T-Cell Function. *J. Virol.* **81**, 2940–2949 (2007).
 128. Sandalova, E. *et al.* Increased Levels of Arginase in Patients With Acute Hepatitis B Suppress Antiviral T Cells. *Gastroenterology* **143**, 78-87.e3 (2012).
 129. Boettler, T. *et al.* Expression of the Interleukin-7 Receptor Alpha Chain (CD127) on Virus-Specific CD8 + T Cells Identifies Functionally and Phenotypically Defined Memory T Cells during Acute Resolving Hepatitis B Virus Infection. *J. Virol.* **80**, 3532–3540 (2006).
 130. Wherry, E. J., Barber, D. L., Kaech, S. M., Blattman, J. N. & Ahmed, R. Antigen-independent memory CD8 T cells do not develop during chronic viral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 16004–16009 (2004).
 131. Wherry, E. J. & Ahmed, R. Memory CD8 T-Cell Differentiation during Viral Infection. *J. Virol.* (2004). doi:10.1128/jvi.78.11.5535-5545.2004
 132. McLane, L. M., Abdel-Hakeem, M. S. & Wherry, E. J. CD8 T Cell Exhaustion During Chronic Viral Infection and Cancer. *Annu. Rev. Immunol.* **37**, 457–495 (2019).
 133. Wherry, E. J., Blattman, J. N., 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.* **77**, 4911–4927 (2003).
 134. Wherry, E. J. & Kurachi, M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 486–499 (2015).
 135. Ng, C. T. & Oldstone, M. B. A. IL-10: Achieving Balance During Persistent Viral Infection. in *Current topics in microbiology and immunology* **380**, 129–144 (2014).
 136. Battegay, M. *et al.* Enhanced establishment of a virus carrier state in adult CD4+ T-cell-deficient mice. *J. Virol.* **68**, 4700–4704 (1994).
 137. Barber, D. L. *et al.* Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* **439**, 682–687 (2006).
 138. Blackburn, S. D. *et al.* Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat. Immunol.* **10**, 29–37 (2009).
 139. Chew, G. M. *et al.* TIGIT Marks Exhausted T Cells, Correlates with Disease Progression, and Serves as a Target for Immune Restoration in HIV and SIV Infection. *PLoS Pathog.* **12**, 1–28 (2016).
 140. Paley, M. A. *et al.* Progenitor and terminal subsets of CD8+ T cells cooperate to contain chronic viral infection. *Science* **338**, 1220–1225 (2012).
 141. Shin, H. *et al.* A Role for the Transcriptional Repressor Blimp-1 in CD8+ T Cell Exhaustion

- during Chronic Viral Infection. *Immunity* **31**, 309–320 (2009).
142. McLane, L. M. *et al.* Role of nuclear localization in the regulation and function of T-bet and Eomes in exhausted CD8 T cells. *Cell Rep.* **35**, 109120 (2021).
 143. Fisicaro, P. *et al.* Combined blockade of programmed death-1 and activation of CD137 increase responses of human liver T cells against HBV, but not HCV. *Gastroenterology* **143**, 1576-1585.e4 (2012).
 144. Bengsch, B., Martin, B. & Thimme, R. Restoration of HBV-specific CD8+ T cell function by PD-1 blockade in inactive carrier patients is linked to T cell differentiation. *J. Hepatol.* **61**, 1212–1219 (2014).
 145. Raziorrouh, B. *et al.* Inhibitory Phenotype of HBV-Specific CD4+ T-Cells Is Characterized by High PD-1 Expression but Absent Coregulation of Multiple Inhibitory Molecules. *PLoS One* **9**, e105703 (2014).
 146. Dong, Y. *et al.* CD4+ T cell exhaustion revealed by high PD-1 and LAG-3 expression and the loss of helper T cell function in chronic hepatitis B. *BMC Immunol.* **20**, 27 (2019).
 147. Nebbia, G. *et al.* Upregulation of the Tim-3/Galectin-9 Pathway of T Cell Exhaustion in Chronic Hepatitis B Virus Infection. *PLoS One* **7**, e47648 (2012).
 148. Li, H. *et al.* Tim-3/galectin-9 signaling pathway mediates T-cell dysfunction and predicts poor prognosis in patients with hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **56**, 1342–1351 (2012).
 149. Riley, J. L. PD-1 signaling in primary T cells. *Immunol. Rev.* **229**, 114–125 (2009).
 150. Yokosuka, T. *et al.* Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2. *J. Exp. Med.* **209**, 1201–1217 (2012).
 151. Boussiotis, V. A. Molecular and Biochemical Aspects of the PD-1 Checkpoint Pathway. *N. Engl. J. Med.* **375**, 1767–1778 (2016).
 152. Hui, E. *et al.* T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1–mediated inhibition. *Science (80-.).* **355**, 1428–1433 (2017).
 153. Patsoukis, N. *et al.* PD-1 alters T-cell metabolic reprogramming by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty acid oxidation. *Nat. Commun.* **6**, 6692 (2015).
 154. Boni, C. *et al.* Natural killer cell phenotype modulation and natural killer/T-cell interplay in nucleos(t)ide analogue-treated hepatitis e antigen-negative patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* **62**, 1697–1709 (2015).
 155. Lopes, A. R. *et al.* Bim-mediated deletion of antigen-specific CD8+ T cells in patients unable to control HBV infection. *J. Clin. Invest.* **118**, 1835–1845 (2008).

156. Peppas, D. *et al.* Up-regulation of a death receptor renders antiviral T cells susceptible to NK cell-mediated deletion. *J. Exp. Med.* **210**, 99–114 (2013).
157. Schurich, A. *et al.* Distinct Metabolic Requirements of Exhausted and Functional Virus-Specific CD8 T Cells in the Same Host. *Cell Rep.* **16**, 1243–1252 (2016).
158. Fisicaro, P. *et al.* Targeting mitochondrial dysfunction can restore antiviral activity of exhausted HBV-specific CD8 T cells in chronic hepatitis B. *Nat. Med.* **23**, 327–336 (2017).
159. Bengsch, B., Martin, B. & Thimme, R. Restoration of HBV-specific CD8+ T cell function by PD-1 blockade in inactive carrier patients is linked to T cell differentiation. *J. Hepatol.* **61**, 1212–1219 (2014).
160. Fisicaro, P. *et al.* Antiviral Intrahepatic T-Cell Responses Can Be Restored by Blocking Programmed Death-1 Pathway in Chronic Hepatitis B. *Gastroenterology* **138**, 682-693.e4 (2010).
161. Schurich, A. *et al.* Role of the coinhibitory receptor cytotoxic T lymphocyte antigen-4 on apoptosis-prone CD8 T cells in persistent hepatitis B virus infection. *Hepatology* **53**, 1494–1503 (2011).
162. Jacobi, F. J. *et al.* OX40 stimulation and PD-L1 blockade synergistically augment HBV-specific CD4 T cells in patients with HBeAg-negative infection. *J. Hepatol.* **70**, 1103–1113 (2019).
163. Kosinska, A. D., Liu, J., Lu, M. & Roggendorf, M. Therapeutic vaccination and immunomodulation in the treatment of chronic hepatitis B: preclinical studies in the woodchuck. *Med. Microbiol. Immunol.* **204**, 103–114 (2015).
164. Balsitis, S. *et al.* Safety and efficacy of anti-PD-L1 therapy in the woodchuck model of HBV infection. *PLoS One* **13**, e0190058 (2018).
165. Gane, E. *et al.* Anti-PD-1 blockade with nivolumab with and without therapeutic vaccination for virally suppressed chronic hepatitis B: A pilot study. *J. Hepatol.* **71**, 900–907 (2019).
166. Blackburn, S. D., Shin, H., Freeman, G. J. & Wherry, E. J. Selective expansion of a subset of exhausted CD8 T cells by α PD-L1 blockade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 15016–15021 (2008).
167. Sandu, I. *et al.* Landscape of Exhausted Virus-Specific CD8 T Cells in Chronic LCMV Infection. *Cell Rep.* **32**, 108078 (2020).
168. Utzschneider, D. T. *et al.* T Cell Factor 1-Expressing Memory-like CD8+ T Cells Sustain the Immune Response to Chronic Viral Infections. *Immunity* **45**, 415–427 (2016).
169. Im, S. J. *et al.* Defining CD8+ T cells that provide the proliferative burst after PD-1 therapy. *Nature* **537**, 417–421 (2016).

170. Li, Y. *et al.* CXCL13-mediated recruitment of intrahepatic CXCR5+CD8+ T cells favors viral control in chronic HBV infection. *J. Hepatol.* **72**, 420–430 (2020).
171. Cheng, Y. *et al.* Multifactorial heterogeneity of virus-specific T cells and association with the progression of human chronic hepatitis B infection. *Sci. Immunol.* **4**, eaau6905 (2019).
172. Schuch, A. *et al.* Phenotypic and functional differences of HBV core-specific versus HBV polymerase-specific CD8+ T cells in chronically HBV-infected patients with low viral load. *Gut* 905–915 (2018). doi:10.1136/gutjnl-2018-316641
173. Hensel, N. *et al.* Memory-like HCV-specific CD8+ T cells retain a molecular scar after cure of chronic HCV infection. *Nat. Immunol.* **22**, 229–239 (2021).
174. Heim, K. *et al.* TOX defines the degree of CD8+ T cell dysfunction in distinct phases of chronic HBV infection. *Gut* **70**, 1550–1560 (2021).
175. Aregay, A. *et al.* Elimination of hepatitis C virus has limited impact on the functional and mitochondrial impairment of HCV-specific CD8+ T cell responses. *J. Hepatol.* **71**, 889–899 (2019).
176. Tonnerre, P. *et al.* Differentiation of exhausted CD8+ T cells after termination of chronic antigen stimulation stops short of achieving functional T cell memory. *Nat. Immunol.* **22**, 1030–1041 (2021).
177. Yates, K. B. *et al.* Epigenetic scars of CD8+ T cell exhaustion persist after cure of chronic infection in humans. *Nat. Immunol.* **22**, 1020–1029 (2021).
178. Weinberg, S. E., Sena, L. A. & Chandel, N. S. Mitochondria in the Regulation of Innate and Adaptive Immunity. *Immunity* **42**, 406–417 (2015).
179. Chang, J. T. *et al.* Proteasome activity regulates CD8+ T lymphocyte metabolism and fate specification. *J. Clin. Invest.* **127**, 3609–3623 (2017).
180. Acerbi, G. *et al.* Functional reconstitution of HBV-specific CD8 T cells by in vitro polyphenol treatment in chronic hepatitis B. *J. Hepatol.* **74**, 783–793 (2021).
181. López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M. & Kroemer, G. The hallmarks of aging. *Cell* **153**, 1194–1217 (2013).
182. Covarrubias, A. J., Perrone, R., Grozio, A. & Verdin, E. NAD+ metabolism and its roles in cellular processes during ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **22**, 119–141 (2021).
183. Fang, E. F. *et al.* NAD + in Aging: Molecular Mechanisms and Translational Implications. *Trends Mol. Med.* **23**, 899–916 (2017).
184. Surjana, D., Halliday, G. M. & Damian, D. L. Role of Nicotinamide in DNA Damage, Mutagenesis, and DNA Repair. *J. Nucleic Acids* **2010**, 1–13 (2010).
185. Henning, A. L., Levitt, D. E., Vingren, J. L. & McFarlin, B. K. Measurement of T- Cell

- Telomere Length Using Amplified- Signal FISH Staining and Flow Cytometry. *Curr. Protoc. Cytom.* **79**, 7.47.1-7.47.10 (2017).
186. Schmid, I. *et al.* Simultaneous flow cytometric analysis of two cell surface markers, telomere length, and DNA content. *Cytometry* **49**, 96–105 (2002).
 187. Lee, T.-H. & Kang, T.-H. DNA Oxidation and Excision Repair Pathways. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 6092 (2019).
 188. Mah, L.-J., El-Osta, A. & Karagiannis, T. C. γ H2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia* **24**, 679–686 (2010).
 189. Kuo, L. J. & Yang, L.-X. Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo* **22**, 305–9 (2008).
 190. Tanaka, T., Halicka, H. D., Traganos, F., Seiter, K. & Darzynkiewicz, Z. Induction of ATM Activation, Histone H2AX Phosphorylation and Apoptosis by Etoposide: Relation to Cell Cycle Phase. *Cell Cycle* **6**, 371–376 (2007).
 191. Bakkenist, C. J. & Kastan, M. B. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* **421**, 499–506 (2003).
 192. Burma, S., Chen, B. P., Murphy, M., Kurimasa, A. & Chen, D. J. ATM Phosphorylates Histone H2AX in Response to DNA Double-strand Breaks. *J. Biol. Chem.* **276**, 42462–42467 (2001).
 193. Celeste, A. Genomic Instability in Mice Lacking Histone H2AX. *Science (80-.)*. **296**, 922–927 (2002).
 194. Beck, C., Robert, I., Reina-San-Martin, B., Schreiber, V. & Dantzer, F. Poly(ADP-ribose) polymerases in double-strand break repair: Focus on PARP1, PARP2 and PARP3. *Exp. Cell Res.* **329**, 18–25 (2014).
 195. Kunzmann, A. *et al.* Flow-cytometric assessment of cellular poly(ADP-ribosylation) capacity in peripheral blood lymphocytes. *Immun. Ageing* (2006). doi:10.1186/1742-4933-3-8
 196. Berger, N. A. Poly(ADP-Ribose) in the Cellular Response to DNA Damage. *Radiat. Res.* **101**, 4 (1985).
 197. Hogan, K. A., Chini, C. C. S. & Chini, E. N. The Multi-faceted Ecto-enzyme CD38: Roles in Immunomodulation, Cancer, Aging, and Metabolic Diseases. *Front. Immunol.* **10**, 1187 (2019).
 198. Bengsch, B. *et al.* Epigenomic-Guided Mass Cytometry Profiling Reveals Disease-Specific Features of Exhausted CD8 T Cells. *Immunity* **48**, 1029-1045.e5 (2018).
 199. Chatterjee, S. *et al.* CD38-NAD⁺Axis Regulates Immunotherapeutic Anti-Tumor T Cell Response. *Cell Metab.* **27**, 85-100.e8 (2018).

200. Chini, C. C. S., Zeidler, J. D., Kashyap, S., Warner, G. & Chini, E. N. Evolving concepts in NAD⁺ metabolism. *Cell Metab.* **33**, 1076–1087 (2021).
201. KAWANISHI, S. & OIKAWA, S. Mechanism of Telomere Shortening by Oxidative Stress. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1019**, 278–284 (2004).
202. Ponnappan, S. & Ponnappan, U. Aging and Immune Function: Molecular Mechanisms to Interventions. *Antioxid. Redox Signal.* **14**, 1551–1585 (2011).
203. Ji, Y. *et al.* Topological DNA damage, telomere attrition and T cell senescence during chronic viral infections. *Immun. Ageing* **16**, 12 (2019).
204. Reid, M. A., Dai, Z. & Locasale, J. W. The impact of cellular metabolism on chromatin dynamics and epigenetics. *Nat. Cell Biol.* **19**, 1298–1306 (2017).
205. Yoshino, J., Baur, J. A. & Imai, S. NAD⁺ Intermediates: The Biology and Therapeutic Potential of NMN and NR. *Cell Metab.* **27**, 513–528 (2018).
206. Chini, E. N., Chini, C. C. S., Espindola Netto, J. M., de Oliveira, G. C. & van Schooten, W. The Pharmacology of CD38/NADase: An Emerging Target in Cancer and Diseases of Aging. *Trends Pharmacol. Sci.* **39**, 424–436 (2018).
207. Su, D. *et al.* Tumor Immune Microenvironment Characteristics and Their Prognostic Value in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Front. Oncol.* **11**, 634059 (2021).
208. Hoffmann, M. *et al.* Exhaustion of Activated CD8 T Cells Predicts Disease Progression in Primary HIV-1 Infection. *PLOS Pathog.* **12**, e1005661 (2016).
209. Chen, L. *et al.* CD38-Mediated Immunosuppression as a Mechanism of Tumor Cell Escape from PD-1/PD-L1 Blockade. *Cancer Discov.* **8**, 1156–1175 (2018).
210. Philip, M. *et al.* Chromatin states define tumour-specific T cell dysfunction and reprogramming. *Nature* **545**, 452–456 (2017).
211. Hu, Y., Wang, H., Wang, Q. & Deng, H. Overexpression of CD38 Decreases Cellular NAD Levels and Alters the Expression of Proteins Involved in Energy Metabolism and Antioxidant Defense. *J. Proteome Res.* **13**, 786–795 (2014).
212. Camacho-Pereira, J. *et al.* CD38 dictates age-related NAD decline and mitochondrial dysfunction through a SIRT3-dependent mechanism HHS Public Access CD38/NADase increases during aging, and causes NAD decline and subsequent mitochondrial dysfunction. *Cell Metab* **23**, 1127–1139 (2016).
213. Aksoy, P., White, T. A., Thompson, M. & Chini, E. N. Regulation of intracellular levels of NAD: A novel role for CD38. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **345**, 1386–1392 (2006).
214. Rodríguez- Alba, J. C. *et al.* HIV Disease Progression: Overexpression of the Ectoenzyme CD38 as a Contributory Factor? *BioEssays* **41**, bies.201800128 (2018).

215. Morandi, F. *et al.* A non-canonical adenosinergic pathway led by CD38 in human melanoma cells induces suppression of T cell proliferation. *Oncotarget* **6**, 25602–25618 (2015).
216. Horenstein, A. L. *et al.* A CD38/CD203a/CD73 ectoenzymatic pathway independent of CD39 drives a novel adenosinergic loop in human T lymphocytes. *Oncoimmunology* **2**, e26246 (2013).
217. Rothkamm, K. *et al.* DNA damage foci: Meaning and significance. *Environ. Mol. Mutagen.* **56**, 491–504 (2015).
218. Zhao, J. *et al.* Insufficiency of DNA repair enzyme ATM promotes naive CD4 T-cell loss in chronic hepatitis C virus infection. *Cell Discov.* **4**, 16 (2018).
219. Zhao, J. *et al.* ATM Deficiency Accelerates DNA Damage, Telomere Erosion, and Premature T Cell Aging in HIV-Infected Individuals on Antiretroviral Therapy. *Front. Immunol.* **10**, 2531 (2019).
220. Aguilar-Quesada, R. *et al.* Interaction between ATM and PARP-1 in response to DNA damage and sensitization of ATM deficient cells through PARP inhibition. *BMC Mol. Biol.* **8**, 29 (2007).
221. Fang, E. F. *et al.* Nuclear DNA damage signalling to mitochondria in ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**, 308–321 (2016).
222. Shahgaldi, S. & Kahmini, F. R. A comprehensive review of Sirtuins: With a major focus on redox homeostasis and metabolism. *Life Sci.* **282**, 119803 (2021).
223. Barili, V. *et al.* Targeting p53 and histone methyltransferases restores exhausted CD8+ T cells in HCV infection. *Nat. Commun.* **11**, 604 (2020).
224. Gerhart-Hines, Z. *et al.* Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1 α . *EMBO J.* **26**, 1913–1923 (2007).
225. Ozden, O. & Tural, K. Changes in the Expression and the Role of Sirtuin 3 in Cancer Cells and in Cardiovascular Health and Disease. in *Gene Expression and Regulation in Mammalian Cells - Transcription Toward the Establishment of Novel Therapeutics* (InTech, 2018). doi:10.5772/intechopen.71865
226. Satterstrom, F. K. *et al.* Nuclear respiratory factor 2 induces <scp>SIRT</scp> 3 expression. *Aging Cell* **14**, 818–825 (2015).
227. Kong, X. *et al.* Sirtuin 3, a New Target of PGC-1 α , Plays an Important Role in the Suppression of ROS and Mitochondrial Biogenesis. *PLoS One* **5**, e11707 (2010).
228. Saville, K. M. *et al.* NAD⁺-mediated regulation of mammalian base excision repair. *DNA Repair (Amst)*. **93**, 102930 (2020).
229. Imai, S. & Guarente, L. NAD⁺ and sirtuins in aging and disease. *Trends Cell Biol.* **24**, 464–

- 471 (2014).
230. Korolchuk, V. I., Miwa, S., Carroll, B. & von Zglinicki, T. Mitochondria in Cell Senescence: Is Mitophagy the Weakest Link? *EBioMedicine* **21**, 7–13 (2017).
 231. Gumeni, S. & Trougakos, I. P. Cross Talk of Proteostasis and Mitostasis in Cellular Homeodynamics, Ageing, and Disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, 1–24 (2016).
 232. Bai, P. *et al.* PARP-1 Inhibition Increases Mitochondrial Metabolism through SIRT1 Activation. *Cell Metab.* **13**, 461–468 (2011).
 233. Yoshino, J., Mills, K. F., Yoon, M. J. & Imai, S. Nicotinamide Mononucleotide, a Key NAD⁺ Intermediate, Treats the Pathophysiology of Diet- and Age-Induced Diabetes in Mice. *Cell Metab.* **14**, 528–536 (2011).
 234. Vaiserman, A. & Krasnienkov, D. Telomere Length as a Marker of Biological Age: State-of-the-Art, Open Issues, and Future Perspectives. *Front. Genet.* **11**, 630186 (2021).
 235. Martínez, P. & Blasco, M. A. Telomeric and extra-telomeric roles for telomerase and the telomere-binding proteins. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 161–176 (2011).
 236. Barnes, R. P., Fouquerel, E. & Opresko, P. L. The impact of oxidative DNA damage and stress on telomere homeostasis. *Mech. Ageing Dev.* **177**, 37–45 (2019).
 237. Qian, W. *et al.* Chemoptogenetic damage to mitochondria causes rapid telomere dysfunction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **116**, 18435–18444 (2019).
 238. Oikawa, S. & Kawanishi, S. Site-specific DNA damage at GGG sequence by oxidative stress may accelerate telomere shortening. *FEBS Lett.* **453**, 365–368 (1999).
 239. Petersen, S., Saretzki, G. & Zglinicki, T. von. Preferential Accumulation of Single-Stranded Regions in Telomeres of Human Fibroblasts. *Exp. Cell Res.* **239**, 152–160 (1998).
 240. Patrick, M. & Weng, N.-P. Expression and regulation of telomerase in human T cell differentiation, activation, aging and diseases. *Cell. Immunol.* **345**, 103989 (2019).
 241. van Baarle, D., Tsegaye, A., Miedema, F. & Akbar, A. Significance of senescence for virus-specific memory T cell responses: rapid ageing during chronic stimulation of the immune system. *Immunol. Lett.* **97**, 19–29 (2005).
 242. Bellon, M. & Nicot, C. Telomere Dynamics in Immune Senescence and Exhaustion Triggered by Chronic Viral Infection. *Viruses* **9**, (2017).
 243. Valenzuela, H. F. & Effros, R. B. Divergent telomerase and CD28 expression patterns in human CD4 and CD8 T cells following repeated encounters with the same antigenic stimulus. *Clin. Immunol.* **105**, 117–125 (2002).
 244. Fumagalli, M. *et al.* Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation. *Nat. Cell Biol.* **14**, 355–365 (2012).

245. Hewitt, G. *et al.* Telomeres are favoured targets of a persistent DNA damage response in ageing and stress-induced senescence. *Nat. Commun.* **3**, 708 (2012).
246. Rossiello, F., Herbig, U., Longhese, M. P., Fumagalli, M. & d'Adda di Fagagna, F. Irreparable telomeric DNA damage and persistent DDR signalling as a shared causative mechanism of cellular senescence and ageing. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **26**, 89–95 (2014).
247. Katsuyama, E. *et al.* The CD38/NAD/SIRTUIN1/EZH2 Axis Mitigates Cytotoxic CD8 T Cell Function and Identifies Patients with SLE Prone to Infections. *Cell Rep.* **30**, 112-123.e4 (2020).
248. Brunet, A. Stress-Dependent Regulation of FOXO Transcription Factors by the SIRT1 Deacetylase. *Science (80-.).* **303**, 2011–2015 (2004).
249. Bosch-Presegué, L. & Vaquero, A. Sirtuin-dependent epigenetic regulation in the maintenance of genome integrity. *FEBS J.* **282**, 1745–1767 (2015).
250. Yu, Y.-R. *et al.* Disturbed mitochondrial dynamics in CD8+ TILs reinforce T cell exhaustion. *Nat. Immunol.* **21**, 1540–1551 (2020).
251. Zhang, M. & Ying, W. NAD + Deficiency Is a Common Central Pathological Factor of a Number of Diseases and Aging: Mechanisms and Therapeutic Implications. *Antioxid. Redox Signal.* **30**, 890–905 (2019).
252. Pirinen, E. *et al.* Niacin Cures Systemic NAD⁺ Deficiency and Improves Muscle Performance in Adult-Onset Mitochondrial Myopathy. *Cell Metab.* **31**, 1078-1090.e5 (2020).
253. Tarragó, M. G. *et al.* A Potent and Specific CD38 Inhibitor Ameliorates Age-Related Metabolic Dysfunction by Reversing Tissue NAD⁺ Decline. *Cell Metab.* **27**, 1081-1095.e10 (2018).
254. Chini, C. C. S. *et al.* CD38 ecto-enzyme in immune cells is induced during aging and regulates NAD⁺ and NMN levels. *Nat. Metab.* **2**, 1284–1304 (2020).