



**UNIVERSITÀ DI PARMA**

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA**

**DOTTORATO DI RICERCA IN**

**SCIENZE MEDICHE E CHIRURGICHE TRASLAZIONALI**

**CICLO XXXV**

**Up-regolazione di CD38 e deplezione di NAD nella  
disfunzione T linfocitaria in corso di epatite cronica B**

**Coordinatore:**

Prof. Nicola Sverzellati

**Tutore:**

Prof. Carlo Ferrari

**Dottoranda:** Dott.ssa Ilaria Montali

Anni accademici 2019/2020-2021/2022



## SOMMARIO

<b>RIASSUNTO</b> .....	6
<b>INTRODUZIONE</b> .....	9
1. Caratteristiche biologiche del virus dell'epatite B.....	9
1.1 Morfologia delle particelle virali e struttura del virus .....	9
1.2 Ciclo replicativo .....	10
2. Epidemiologia e storia naturale dell'infezione da HBV .....	12
2.1 Epidemiologia dell'epatite da virus B.....	12
2.2 Modalità di trasmissione e storia naturale del virus.....	12
3. Nuovi biomarcatori virali in corso di infezione cronica da HBV .....	14
HBV-RNA.....	15
HBcrAg.....	15
HbsAg .....	16
Anti-HBc quantitativo.....	16
HBV Nucleic Acid-Related Antigen (HBV-NRAg).....	17
4. Cenni di terapia antivirale .....	18
Interferoni .....	20
Analoghi nucleos(t)idici .....	20
5. Nuove terapie antivirali .....	21
5.1 Farmaci ad azione antivirale .....	21
5.2 Immunomodulazione .....	27
6. Immunopatogenesi dell'infezione da virus dell'epatite B.....	30
Immunità innata.....	30
Immunità adattativa.....	32

7. Exhaustion.....	35
<b>DATI PRELIMINARI</b> .....	<b>39</b>
<b>SCOPO DELLO STUDIO</b> .....	<b>47</b>
<b>METODI</b> .....	<b>50</b>
1. Pazienti e controlli .....	50
2. Peptidi sintetici, complessi destramerici peptide-HLA di classe I e anticorpi .....	51
3. Isolamento dei linfociti del sangue periferico .....	52
4. Sequenziamento del DNA sierico per la ricerca di epitopi mutati.....	53
5. Marcatura CD38 e PD1.....	53
6. Acetilazione dell'istone H3 .....	54
7. Valutazione della risposta al danno del DNA.....	54
7.1 Marcatura di fosfoH2AX.....	54
7.2 Poli-ADP-ribosilazione (PARilazione).....	55
8. Espansione <i>in vitro</i> dei linfociti T .....	55
9. Lunghezza dei telomeri in seguito ad espansione <i>in vitro</i> .....	56
10. Valutazione del potenziale di membrana mitocondriale in seguito ad espansione <i>in vitro</i> .....	57
11. Rilevazione degli aggregati proteici in seguito ad espansione <i>in vitro</i> .....	58
12. Acetilazione dell'istone H3 in seguito ad espansione <i>in vitro</i> .....	58
13. Valutazione della produzione di citochine intracellulari (ICS).....	58
14. Strategie di gating per citometria a flusso.....	59
15. Isolamento dei linfociti T CD8 antigene-specifici tramite "single cell" sorting .....	59
16. Sequenziamento dell'mRNA .....	60
17. Analisi statistiche .....	61
<b>RISULTATI</b> .....	<b>63</b>

1. Lo stress ossidativo è una causa dell'accorciamento dei telomeri e dell'up-regolazione di CD38 e PD1 .....	63
2. L'up-regolazione di CD38 sui linfociti T CD8 HBV-specifici correla con il grado di <i>exhaustion</i> linfocitaria .....	65
3. La Sirtuina 3 risulta <i>down</i> -regolata nei linfociti T HBV-specifici .....	70
4. Il trattamento con NMN+CD38i ripristina i linfociti HBV-specifici <i>exhausted</i> a livello trascrizionale.....	72
5. Il trattamento <i>in vitro</i> con NMN+CD38i contrasta l'accorciamento dei telomeri e regola l'espressione di PD1 nei pazienti con epatite B cronica .....	74
6. Nei linfociti T CD8 <i>exhausted</i> dei pazienti con epatite B cronica l'acetilazione dell'istone H3 risulta disfunzionale.....	75
7. La supplementazione con NMN+CD38i, ed Entinostat ripristina i livelli di acetilazione istonica nei linfociti HBV-specifici .....	76
8. Il trattamento con Entinostat corregge le disfunzioni intracellulari e la funzionalità antivirale nei linfociti T HBV-specifici .....	77
9. Confronto fra l'efficacia del trattamento con Entinostat e quella di NMN+CD38i .....	80
10. Specificità dell'efficacia dei trattamenti con NMN+CD38i .....	81
11. Studio dei meccanismi di risposta al danno del DNA e di ripristino funzionale nei linfociti T CD8 specifici per gli epitopi mutati CORE 18-27 .....	82
12. Confronto dei linfociti HBV-specifici per l'epitopo CORE 18-27 con i linfociti HBV-specifici per l'epitopo POL 455-463 .....	86
<b>DISCUSSIONE</b> .....	89
<b>RINGRAZIAMENTI</b> .....	119

## RIASSUNTO

Si stima che nel mondo più di 257 milioni di persone abbiano contratto un'infezione cronica da HBV. Attualmente il trattamento dell'epatite cronica B è principalmente basato sulla terapia con analoghi nucleos(t)idici (NUC), che nella maggior parte dei pazienti deve tuttavia essere somministrata per tutta la vita per il rischio di pericolose riattivazioni virali alla sospensione del trattamento. Esiste pertanto un'urgente necessità di approcci terapeutici che accelerino il controllo virale completo, al fine di abbreviare la durata delle attuali terapie. In corso di infezione cronica i linfociti T HBV-specifici risultano profondamente disfunzionali, e perdono progressivamente le loro funzioni in un processo noto come "*exhaustion* linfocitaria". Pertanto, la ricostituzione di una risposta anti-virale efficiente rappresenta una strategia razionale per il trattamento dei pazienti con infezione cronica da HBV e per l'integrazione delle attuali terapie anti-virali. Nel Laboratorio di Immunopatologia Virale dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma è stato precedentemente condotto uno studio di trascrittomica, allo scopo di individuare direttamente nei linfociti T CD8 HBV-specifici isolati da pazienti con infezione cronica le alterazioni funzionali associate alla persistenza virale. Tale studio ha permesso di evidenziare una prevalente *down*-regolazione di geni coinvolti in diverse funzioni cellulari; particolarmente significative sono quelle relative a vari processi mitocondriali, al sistema ubiquitina-proteasoma, alla risposta al danno del DNA e al controllo epigenetico della trascrizione. La disfunzione mitocondriale, con eccesso di produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), e l'alterazione della proteostasi cellulare sono state successivamente validate tramite test funzionali. È emerso inoltre che i linfociti HBV-specifici mostrano un accumulo di danno al DNA e un'inefficiente risposta al danno, una diminuita acetilazione istonica e telomeri significativamente più corti rispetto a linfociti funzionali influenza (FLU)-specifici degli stessi pazienti con infezione cronica. Tra i mediatori che intervengono per riparare il danno del DNA, rientrano le poli-ADP-ribosilasi (PARP), enzimi nicotinamide adenina dinucleotide (NAD)-dipendenti come le sirtuine e le ciclo-ADP-ribosio sintasi, tra cui CD38. In particolare, CD38 è noto per essere il maggiore

consumatore di NAD, ed è risultato sovra-espresso nei linfociti T HBV-specifici dei pazienti cronici. Partendo dall'ipotesi che la deplezione di NAD possa concorrere alla disfunzione T linfocitaria, si è testato l'effetto della somministrazione *in vitro* della molecola precursore del NAD Nicotinamide Mononucleotide (NMN) da sola e in combinazione con un inibitore dell'attività NAD-asi del CD38 (78c o CD38i). L'efficacia del singolo trattamento con NMN è risultata ulteriormente potenziata dall'associazione con il CD38i, nel ripristinare la funzionalità T linfocitaria anti-virale.

Lo scopo della presente tesi è stato quello di approfondire lo studio dei meccanismi alla base della disfunzione linfocitaria in corso di epatite B cronica, indagando il ruolo dell'up-regolazione di CD38 in tale contesto e verificando che l'accumulo di ROS, e quindi lo stress ossidativo, sia associato alla riduzione della lunghezza dei telomeri. Si è poi caratterizzato l'effetto del trattamento combinato con NMN e inibitore di CD38 non solo sul ripristino dei diversi aspetti alterati descritti, compreso il profilo trascrizionale, la lunghezza dei telomeri e l'acetilazione istonica, ma anche su linfociti specifici per diversi epitopi virali, descritti in letteratura per avere diversi livelli di esaurimento funzionale, inclusi epitopi mutanti.

I dati indicano che i linfociti T CD8 HBV-specifici che esprimono elevati livelli di CD38, mostrano più alta espressione di PD-1 e una capacità di rispondere al danno del DNA, così come di produrre la citochina antivirale interferone- $\gamma$ , molto più compromessa, rispetto ai linfociti che esprimono meno CD38. L'utilizzo di trattamenti con antiossidanti mitocondriali, neutralizzando l'effetto dannoso dei ROS, è in grado di ripristinare significativamente la lunghezza dei telomeri. La deplezione di NAD compromette anche l'acetilazione dell'istone H3 e l'espressione genica di Sirt3, studiata mediante sequenziamento dell'RNA (RNA-Seq). Attraverso questa metodica, è stato inoltre possibile osservare anche che il trattamento con NMN+CD38i influisce sul profilo trascrizionale dei linfociti HBV-specifici *exhausted* e sulla lunghezza dei telomeri. Inoltre tale trattamento è efficace per recuperare l'acetilazione istonica e ripristinare l'attività antivirale a livelli confrontabili con Entinostat, un farmaco epigenetico ad attività inibitoria sulle istone-deacetilasi (HDAC). In linfociti T CD8 HBV-specifici che riconoscono epitopi virali diversi da CORE 18-27, quali epitopi CORE mutati ed

epitopi della polimerasi virale, i meccanismi di riparazione del danno del DNA risultano disfunzionali e il trattamento con NMN+CD38i ripristina la funzionalità linfocitaria a livelli confrontabili con quelli osservati per i linfociti T HBV-specifici per il CORE *wild type*.

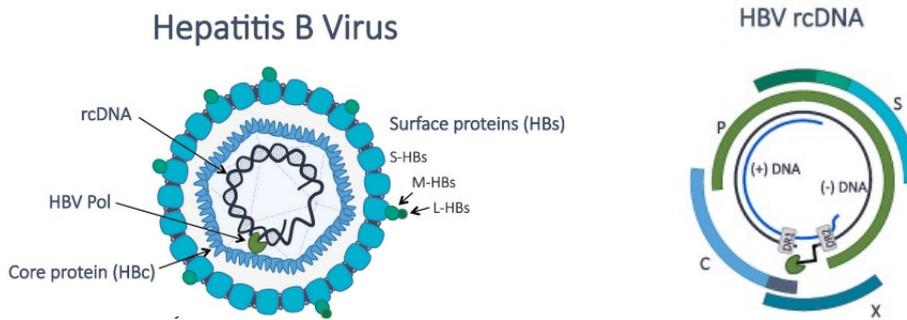
In conclusione, lo studio riportato nella presente tesi ha permesso di approfondire ulteriormente la conoscenza dei meccanismi alla base dell'*exhaustion* linfocitaria. Le diverse disfunzioni cellulari, incluso l'accorciamento dei telomeri, risultano interconnesse e correlate all'esaurimento del NAD, suggerendo una somiglianza tra *exhaustion* T linfocitaria e senescenza cellulare. La carenza di NAD può ridurre anche la disponibilità di Acetil-CoA per l'acetilazione istonica, portando alla condensazione della cromatina e quindi al silenziamento genico. La correzione delle funzioni intracellulari deregolate mediante la supplementazione di NAD in associazione all'inibizione di CD38 è in grado di ripristinare la funzionalità antivirale dei linfociti T CD8 antivirali indipendentemente dall'epitopo riconosciuto e anche in caso di mutanti virali. Tale trattamento rappresenta quindi una potenziale strategia terapeutica per un'immunoterapia finalizzata alla cura dell'infezione cronica da HBV.

## INTRODUZIONE

### 1. Caratteristiche biologiche del virus dell'epatite B

#### 1.1 Morfologia delle particelle virali e struttura del virus

Il virus dell'epatite B (HBV) è un virus a DNA della famiglia degli *Hepadnaviridae*<sup>1</sup>. Sono stati caratterizzati 10 genotipi del virus dell'epatite B (da A a J) ulteriormente suddivisi in subgenotipi (circa 40)<sup>2</sup>. I virioni infettivi sono costituiti da una membrana lipidica con inserita la componente antigenica HbsAg, che circonda un nucleocapside composto dalla proteina CORE (Hbc), dalla polimerasi virale (Pol) e dal DNA. Il genoma di HBV è una molecola DNA parzialmente a doppia elica (rcDNA: *relaxed circular DNA*) lunga 3,2 Kb, che codifica quattro *open reading frame* (ORF) sovrapposte, C, P, S e X, da cui vengono prodotte le proteine virali funzionali (**Figura 1**). Il gene C codifica per l'antigene CORE (HbcAg) proteina che dimerizza e forma il nucleocapside per auto-assemblamento, e l'antigene e (HbeAg), una proteina non strutturale che ha funzione immunomodulatrice ed è un marker di attiva replicazione virale. Il gene S codifica per tre glicoproteine presenti nell'envelope prodotte a partire da tre diversi punti di traduzione che dividono il gene in tre sezioni: pre-S1, pre-S2 e S. Data la presenza di diversi codoni di inizio, vengono prodotti tre diversi polipeptidi chiamati large, middle, small (pre-S1+pre-S2+S; pre-S2+S; S). Il gene P codifica per la polimerasi virale, la proteina più grande che funziona sia come trascrittasi inversa che come ribonucleasi<sup>3</sup>. Infine il gene X codifica per una proteina regolatoria Hbx. Questa proteina è importante per modulare la replicazione virale, l'apoptosi, il ciclo cellulare, la risposta al danno al DNA, l'autofagia e la mitofagia<sup>4</sup>.



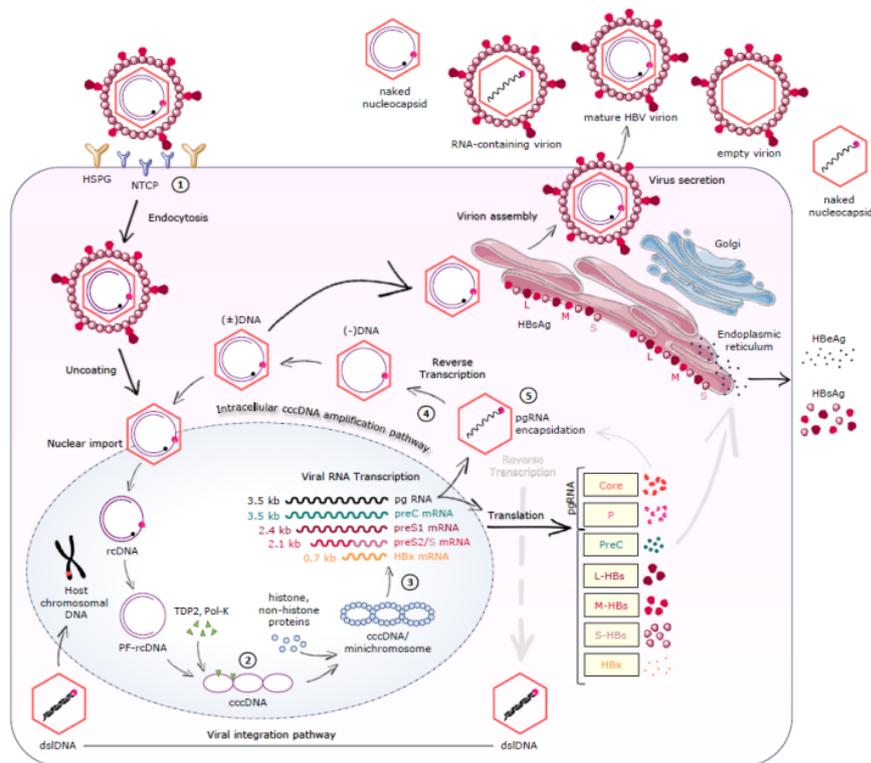
**Figura 1:** A sinistra è mostrata la morfologia della particella virale. A destra è rappresentata la struttura del genoma di HBV: al centro sono riportati i due filamenti di DNA, esternamente sono rappresentate, le differenti regioni del genoma di HBV codificanti per le proteine strutturali e non strutturali del virus.

Fonte: Tsukuda S. Hepatitis B virus biology and life cycle. Antiviral Research 182 (2020) 104925.

## 1.2 Ciclo replicativo

L'ingresso del virus nella cellula ospite avviene grazie all'interazione della parte N-terminale di L-HBsAg del virus e il co-trasportatore taurocolato sodio dipendente (NTCP) delle cellule epatiche<sup>5</sup>. Dopo l'infezione degli epatociti, il rivestimento esterno viene digerito dai lisosomi cellulari e il genoma di HBV viene trasportato nel nucleo dove viene rimodellato da enzimi cellulari in cccDNA (*covalently closed circular DNA*) una forma di DNA particolarmente stabile che è avvolto da istoni per formare un minicromosoma episomico. Il cccDNA viene trascritto dall'RNA polimerasi II della cellula ospite per formare mRNA sub-genomico, tradotto nel citoplasma in proteine dell'envelope e proteina X, e mRNA pre-genomico (pgRNA) che serve per la produzione delle proteine CORE e POL; inoltre funge da stampo per il nuovo DNA virale. Il pgRNA viene incorporato nel capsido virale insieme alla polimerasi, che media la trascrizione inversa. Viene quindi sintetizzato il primo filamento completo di DNA a polarità negativa e l'RNA stampo viene degradato grazie all'attività RNasi H della polimerasi. Infine viene sintetizzato il filamento a polarità positiva che risulterà invece incompleto<sup>6</sup>. I nucleocapsidi maturi possono essere rivestiti dall'envelope in cui sono presenti le glicoproteine di superficie, ed essere così secreti dalla cellula per esocitosi, oppure rientrare nel

nucleo formando nuovo cccDNA e dando avvio ad un nuovo ciclo replicativo (**Figura 2**). Proprio la persistenza del cccDNA nel nucleo è una delle cause della difficile eradicazione del virus. Il genoma virale inoltre può integrarsi nel DNA della cellula ospite. L'integrazione del DNA dell'HBV non è implicata nella produzione di nuovi virioni, tuttavia rappresenta una fonte stabile di HBx e dell'immunomodulatore HbsAg; per questo potrebbe favorire la replicazione virale, la tolleranza immunitaria e la persistenza virale<sup>7-9</sup>.



**Figura 2: Illustrazione schematica del ciclo replicativo di HBV**

Fonte: Myrto Prifti G et al. Recent Advances in Hepatitis B Treatment, Pharmaceuticals 2021, 14, 417.

## **2. Epidemiologia e storia naturale dell'infezione da HBV**

### **2.1 Epidemiologia dell'epatite da virus B**

Il virus dell'epatite B è la causa più comune di infezioni croniche a carico del fegato, che evolvono in cirrosi epatica ed epatocarcinoma; rappresenta quindi un problema di salute pubblica mondiale. Nel 2019 l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha stimato che 296 milioni di persone convivevano con un'infezione cronica da epatite B. Inoltre si stimano annualmente circa 820.000 decessi per cirrosi e carcinoma epatocellulare (cancro primario del fegato) e 1,5 milioni di nuovi casi di infezione<sup>10</sup>. In base alla modalità di trasmissione si distinguono tre gradi di endemicità:

- alta (HBsAg  $\geq$  8%), nelle regioni del Sud America, Africa Sub-Sahariana e Sud-Est Asiatico.
- intermedia (HBsAg 2-8%) in Medio Oriente ed Est Europa.
- bassa (HBsAg  $\leq$  2%) in Europa Occidentale, Australia, Nord America<sup>11</sup>.

Nei paesi altamente endemici il grado di diffusione è in diminuzione, grazie ai programmi di vaccinazione e ai trattamenti antivirali. Tuttavia, i movimenti migratori stanno cambiando l'incidenza della malattia in diversi paesi europei con un basso grado di endemicità (es. Italia, Germania), e anche con i programmi di vaccinazione universali, è stato impossibile prevenire i casi acuti di infezione da HBV, in particolare nelle popolazioni ad alto rischio<sup>12</sup>.

### **2.2 Modalità di trasmissione e storia naturale del virus**

Il virus dell'epatite B viene trasmesso attraverso sangue e fluidi corporei e il contagio può avvenire per via verticale, da madre a figlio, o per via orizzontale da un individuo all'altro. Nelle regioni ad alta endemicità, l'infezione è contratta soprattutto in età perinatale per trasmissione verticale o durante la prima infanzia per trasmissione orizzontale, e il rischio di cronicizzare l'infezione è molto alto, probabilmente perché il sistema immunitario non è ancora maturo. In particolare i bambini più a rischio sono quelli nati da madri portatrici del virus e HbeAg positive<sup>13</sup>; il 70-90% di questi bambini contrae l'infezione e il 90% diventa un portatore cronico<sup>14</sup>. La trasmissione orizzontale

invece è caratteristica delle regioni a bassa endemicità e avviene soprattutto tra individui adulti di categorie maggiormente a rischio come: tossicodipendenti, omosessuali, operatori sanitari, familiari di persone infette<sup>15</sup>.

La storia naturale dell'infezione cronica da HBV è stata suddivisa in cinque fasi, non necessariamente sequenziali, che tengono conto dei livelli di HBeAg, di HBV DNA, di alanina aminotransferasi (ALT) e la presenza di infiammazione nel fegato (**Figura 3**). La prima fase è **l'infezione cronica HBV HbeAg positiva (o di immunotolleranza)** è caratterizzata dalla presenza nel siero di HBeAg, e alti livelli di HBV DNA, transaminasi nei limiti della norma e necroinfiammazione epatica minima o assente, a causa di una minima o assente risposta immunitaria. Nei soggetti infettati in età perinatale questa fase può durare anche più di trent'anni, mentre ha una durata più breve se l'infezione è contratta in età adulta. La seconda fase è **l'epatite cronica HBV HBeAg positiva**. Il sistema immunitario dell'ospite riconosce HBV e inizia una risposta immunitaria che danneggerà progressivamente gli epatociti. Si riscontra ancora la presenza di HBeAg nel siero, elevati livelli di HBV-DNA, ma anche di transaminasi, e infiammazione epatica. Il risultato di questa fase è variabile; la maggior parte dei pazienti va incontro alla sieronegativizzazione per HBeAg e sieroconversione anti-HBe, ed entra nella fase di infezione HBeAg negativa. Altri pazienti potrebbero non riuscire a controllare l'HBV e passare alla fase di epatite cronica HBeAg-negativa. La terza fase è **l'infezione cronica HBeAg negativa (o fase inattiva)** ed è caratterizzata dalla presenza di anticorpi anti-HBe, livelli di HBV DNA e alanina amino transferasi (ALT) normali e da un miglioramento della condizione infiammatoria del fegato. Alcuni pazienti, inoltre, vanno incontro alla clearance di HbsAg e allo sviluppo dei relativi anticorpi, con conseguente ingresso in una fase di guarigione caratterizzata da basso rischio di cirrosi ed epatocarcinoma. Per quanto riguarda i pazienti "portatori inattivi", il 10%-30% va incontro a successiva riattivazione, entrando in una fase di **epatite cronica HbeAg negativa**<sup>16</sup>. Durante questa fase nel siero sono rilevabili gli anti-HBe, i livelli di HBV DNA e ALT sono variabili e l'istologia epatica mostra necroinfiammazione e fibrosi. Questa condizione è dovuta a mutazioni nelle regioni *core* e *pre-core* del genoma di HBV che

portano ad una riduzione nella sintesi dell'antigene HbeAg. Questa fase è associata a bassi tassi di remissione spontanea della malattia.

Durante la quinta e ultima fase **HBsAg negativa**, il siero è caratterizzato dalla presenza degli anticorpi anti-HBc e dalla presenza o assenza di anti-HBs. Poiché il cccDNA è ancora rilevabile nel fegato questa fase è nota anche come "infezione occulta da HBV". La perdita di HBsAg prima dell'inizio della cirrosi è associata ad un minor rischio di sviluppare cirrosi ed epatocarcinoma. Tuttavia, se la cirrosi si è sviluppata prima della perdita di HBsAg, i pazienti rimangono a rischio di carcinoma epatocellulare<sup>17</sup>.

### **3. Nuovi biomarcatori virali in corso di infezione cronica da HBV**

I biomarcatori sierici attualmente in uso nella pratica clinica includono l'HbsAg, HBeAg, HBV DNA e ALT e servono per discriminare le diverse fasi di malattia, Tuttavia questi biomarcatori non riflettono completamente l'attività intraepatica del virus dell'HBV. La quantificazione di cccDNA e dell'RNA virale rappresentano una strategia utile per caratterizzare meglio i diversi stadi di malattia, per prevenire il rischio di epatocarcinoma e seguire la risposta immunitaria e la risposta alla terapia. La misurazione intraepatica del cccDNA e dell'RNA virale richiede l'utilizzo di campioni di biopsia epatica, una pratica invasiva e poco utilizzata nella routine clinica. Questo rende necessaria la quantificazione di nuovi marcatori sierici che riflettano il quantitativo di cccDNA intraepatico e la sua attività trascrizionale<sup>18</sup>. 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*)<sup>19</sup>(**Figura 3**).

## **HBV-RNA**

Il cccDNA serve come template di cinque trascritti virali: precore/core RNA, pgRNA, preS1 RNA, preS2/S RNA e X RNA. Di questi il pgRNA sierico deriva esclusivamente dal cccDNA, ed è stato rilevato in biopsie epatiche sia nel siero dei pazienti. Nei pazienti cronici naïve al trattamento, sia l'HBV DNA sia l'HBV RNA sono marcatori dell'attività di cccDNA; in seguito al trattamento con analoghi nucleos(t)idici (NUC) i livelli di HBV DNA diminuiscono, mentre i livelli di pgRNA possono rimanere relativamente elevati. La determinazione di pgRNA nel siero può quindi essere utilizzata come marcatore surrogato di trascrizione del cccDNA nel fegato<sup>20</sup>. Nei pazienti cronici i livelli di HBV RNA variano in stretta associazione con i livelli HBeAg, e nella fase HBeAg positiva mostrano una maggiore correlazione con l'HBV DNA del siero<sup>21</sup>. I livelli sierici di HBV RNA possono rappresentare un valido strumento per predire la sieroconversione anti-HBe durante il trattamento con NUC. Infatti è stato dimostrato che la riduzione significativa dei livelli sierici di HBV RNA durante la terapia con NUC, correla con maggiori probabilità di raggiungere la sieroconversione HBeAg, rispetto ai livelli di DNA dell'HBV, HBsAg, alanina aminotransferasi, genotipo HBV, età e sesso<sup>22</sup>. Diversi studi hanno dimostrato che l'HBV RNA è un marcatore utile per predire la riattivazione virale in seguito alla sospensione della terapia. I pazienti con livelli di HBV RNA negativi al termine del trattamento, avevano un rischio significativamente più basso di recidiva clinica rispetto a quelli con livelli di HBV RNA positivi. Inoltre i pazienti con recidiva clinica hanno mostrato un aumento di HBV RNA dopo la sospensione del farmaco. Al contrario, tra i pazienti senza recidiva clinica, il livello di HBV RNA è rimasto ad un livello molto basso<sup>23</sup>.

## **HBcrAg**

L' *Hepatitis B core-related antigen (HBcrAg)* è costituito da tre proteine virali tradotte a partire dalla regione core/precore dell'HBV, che condividono una regione di 149 aminoacidi: HBeAg, HBcAg e p22cr<sup>24</sup>. L'HBcrAg sta emergendo come nuovo biomarcatore per monitorare i livelli di cccDNA e la sua attività trascrizionale ed è utile per distinguere le diverse fasi cliniche dell'epatite cronica B. I

livelli di HBcrAg risultano più elevati nella fase HBeAg positiva rispetto la negativa<sup>25-27</sup> e in questa fase risulta più forte anche la correlazione con i livelli di cccDNA e la sua attività trascrizionale<sup>25</sup>. Livelli più alti di HBcrAg nell'epatite cronica HBeAg-negativa sono associati a una maggiore attività necroinfiammatoria e fibrosi<sup>28</sup>. A differenza della fase HBeAg-positiva, se i pazienti HBeAg-negativi hanno ancora livelli relativamente alti di HBcrAg dopo la sierconversione HBeAg, le attività della malattia sono in realtà più avanzate e il rischio di cirrosi più elevato. Inoltre l'HBcrAg costituisce un possibile marcatore predittivo di insorgenza di carcinoma epatocellulare (HCC). Il trattamento con NUC può ridurre ma non sempre eliminare il rischio di HCC<sup>29</sup>, e la positività all'HBcrAg dopo due anni di trattamento potrebbe predire il rischio di sviluppare HCC<sup>30</sup>.

### **HbsAg**

La quantificazione dell'HBsAg nella pratica clinica è utilizzata per differenziare i diversi stadi di malattia e per predire la risposta al trattamento sia nei pazienti HBeAg-positivi e negativi, trattati con peg-IFN o NUC<sup>31</sup>. La perdita dell'HBsAg è considerato l'*endpoint* della terapia antivirale, poiché fortemente correlata con la soppressione duratura dell'HBV DNA e con un basso rischio di complicanze, tra cui HCC<sup>32</sup>. Le tre proteine di superficie (*small, medium, large*) che costituiscono l'HBsAg variano durante le varie fasi dell'epatite cronica B e seguono dinamiche diverse durante il trattamento<sup>33</sup>. Attualmente sono tre i test disponibili in commercio per la quantificazione dell'HBsAg e hanno una sensibilità inferiore a 0,05 UI/ml<sup>34</sup>. Inoltre sono in fase di sperimentazione diversi saggi qualitativi e quantitativi che aumentano la sensibilità del test da 10 a 250 volte<sup>19</sup>. Questi test permettono una diagnosi più tempestiva nelle fasi iniziali dell'epatite acuta, permettono il monitoraggio delle riattivazioni virali e rilevano la presenza di antigene anche in seguito a sierconversione spontanea o indotta da terapia<sup>35,36</sup>.

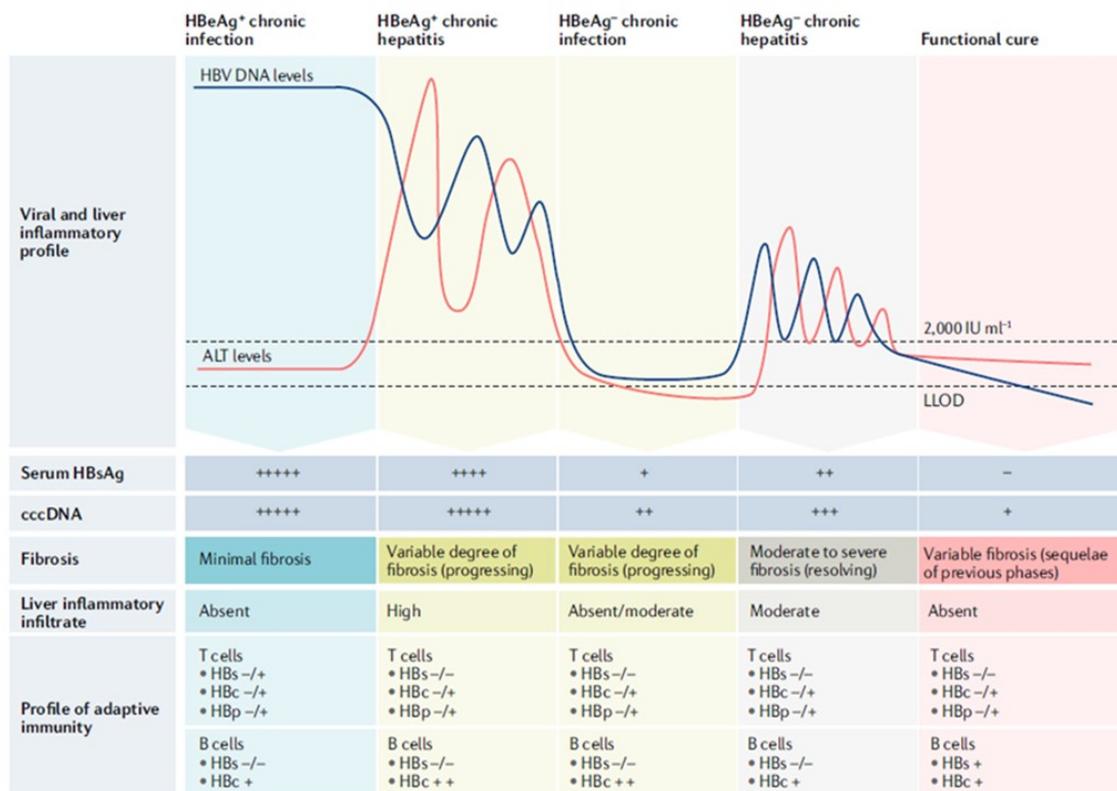
### **Anti-HBc quantitativo**

L'anticorpo diretto contro la proteina CORE (anti-HBc) è un marcatore diagnostico che ha efficacia nel monitoraggio della storia naturale dell'infezione e della severità della malattia epatica. La

risposta umorale è diretta principalmente contro la l'HBcAg<sup>37</sup>, e la misurazione dei livelli di anticorpi anti-HBc permette di monitorare la storia naturale dell'infezione da HBV e la gravità della malattia epatica<sup>19</sup>. In particolare la rilevazione di anti-HBc in assenza di HBsAg è associata all'infezione occulta da HBV<sup>38</sup>. Inoltre, i livelli relativi di anti-HBc sono stati utilizzati in passato per differenziare l'infezione acuta da quella cronica<sup>31</sup> e, più recentemente, per predire la sieroconversione spontanea dell'HBsAg in pazienti HBeAg negativi<sup>39</sup>. Diversi studi hanno dimostrato l'utilità dell'anti-HBc nel predire la riattivazione virale in seguito alla sospensione della terapia antivirale. Quantità più elevate di anti-HBc al momento della sospensione della terapia è correlato ad un minor rischio di riattivazione<sup>40</sup>.

#### **HBV Nucleic Acid-Related Antigen (HBV-NRAg)**

Un metodo alternativo basato sull'ELISA è stato sviluppato per rilevare l'antigene PreS1 e l'HBcAg, con lo scopo di monitorare il cccDNA<sup>41</sup>. Gli studi condotti su questo test hanno evidenziato una correlazione significativa tra l'HBV-NRAg e l'HBV DNA sierico, rispetto ad altri marcatori quali l'HbsAg e l'HbeAg<sup>19</sup>. Inoltre la positività all'HBV-NRAg è stata associata a tassi significativamente più elevati di anomalie epatiche, rispetto ai pazienti HBV-NRAg negativi<sup>19</sup>. Questo test viene proposto come valido sostituto per la quantificazione dell'HBV DNA, con il vantaggio di essere più semplice ed economico.



Potential  
Future  
Biomarkers

HBV RNA, qHBeAg  
or qHBcrAg

HBV RNA

HBV RNA, qHBcrAg

**Figura 3: 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.

#### 4. Cenni di terapia antivirale

Le terapie antivirali si pongono come principale obiettivo quello di ridurre la mortalità, sopprimere la replicazione virale e l'infiammazione epatica per prevenire la progressione verso la cirrosi epatica e l'epatocarcinoma. Inoltre, la terapia antivirale si propone anche di prevenire la trasmissione verticale dell'infezione dalla madre al figlio e la prevenzione della fibrosi e della cirrosi. Le terapie attualmente disponibili sono efficaci grazie alla loro capacità di normalizzare i livelli di ALT, sopprimere la replicazione virale portare a sierconversione anti-HBe e talvolta anche anti-HBs<sup>42</sup>. Attualmente non è ancora possibile eradicare completamente il virus dalla cellula epatica per la sua

tendenza ad integrarsi nel genoma dell'ospite e a restare latente come cccDNA all'interno del nucleo degli epatociti infettati<sup>43</sup>. Quindi gli obiettivi realmente perseguibili sono costituiti da:

- La soppressione a lungo termine dei livelli di HBV DNA. L'inibizione della replicazione virale migliora, nella maggior parte dei pazienti, la risposta istologica intesa come riduzione dell'attività necroinfiammatoria, dei processi fibrotici e di conseguenza il rischio di epatocarcinoma. Inoltre la soppressione dell'HBV DNA è associato alla normalizzazione dei livelli di ALT.
- La perdita dell'HBeAg, con o senza sieroconversione anti-HBe. Questo indica un controllo immunitario parziale anche se la stabilità di questa fase è verificabile solo al termine della terapia. La perdita dell'HBsAg è considerata l'*end-point* del trattamento. 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<sup>17</sup>. Le linee guida per il trattamento farmacologico di HBV sono state stilate da AASLD (American Association for the Study of Liver Disease), EASL (European Association for the Study of Liver) e APASL (Asian Pacific Association for the Study of the Liver) e si basano su tre criteri:

1. livelli sierici di ALT
2. livelli sierici di HBV DNA
3. condizioni del fegato.

I pazienti che necessitano una terapia antivirale, sia che siano HbeAg positivi che negativi, hanno livelli sierici di DNA superiori a 2000 UI/ml, ALT due volte superiori alla normalità e presentano attività necroinfiammatoria e/o fibrosi a livello epatico<sup>17</sup>. Per il trattamento di HBV cronica, attualmente si dispone di due categorie di farmaci approvati dalla "U.S. Food and Drug Administration" (FDA):

- Interferoni: Interferone standard (IFN- $\alpha$ ) e Interferone peghilato (peg-IFN- $\alpha$ ).

- Analoghi nucleot(s)idici o NUC: Lamivudina(LAM), Adefovir(ADV), Telbivudine (LdT), Entecavir(ETV), Tenofovir disoproxil fumarate (TDF), Tenofovir alafenamide (TAF).

### **Interferoni**

Gli interferoni sono citochine antivirali e immunomodulanti, rilasciate dalle cellule del sistema immunitario in risposta alla presenza di patogeni. Esistono gli Interferoni di Tipo I ( $\alpha$  e  $\beta$ ), e di Tipo II ( $\gamma$ ). Tra questi l'IFN- $\alpha$  è stato il primo farmaco disponibile per il trattamento dell'epatite cronica B; questo ha caratteristiche immunomodulanti ed è in grado di inibire la replicazione virale. Nel 2005 l'IFN- $\alpha$  è stato sostituito con l'interferone pegilato (IFN-PEG), ovvero legato ad una molecola di polietilene glicole che ne migliora la farmacocinetica e ne diminuisce l'antigenicità<sup>44</sup>. La terapia viene somministrata con iniezioni sottocutanee una volta a settimana per 48 settimane. Gli studi hanno dimostrato che i pazienti cronici HBeAg-positivi trattati con Peg-IFN per via sottocutanea 180  $\mu$ g a settimana per 48 settimane hanno raggiunto la normalizzazione delle ALT nel 41% dei casi, sieroconversione HBeAg con HBV DNA <400 copie/mL nel 32% dei casi e sieroconversione HBsAg nel 3% dei casi<sup>45,46</sup>. Sebbene sia raccomandato come uno dei trattamenti di prima linea da tutte le linee guida terapeutiche, il Peg-IFN viene utilizzato in meno del 5% dei pazienti. Infatti il suo uso è limitato dalla modalità di somministrazione, e per i numerosi effetti collaterali quali: fatica, sintomi simil-influenzali, fluttuazioni dell'umore, mielosoppressione, sviluppo di malattie autoimmuni. Inoltre, è anche controindicato nei pazienti con scompenso epatico, stati immunosoppressi, comorbidità maggiori e gravidanza<sup>47</sup>.

### **Analoghi nucleos(t)idici**

Gli analoghi nucleosidici e nucleotidici (NUC) sono stati introdotti in terapia in tempi più recenti; competono con il substrato naturale della polimerasi virale, e interrompono l'allungamento della catena nucleotidica, inibendo così l'attività di trascrittasi inversa<sup>44</sup>. La terapia a base di NUC si è dimostrata efficace per diminuire la replicazione virale e indurre la soppressione dei livelli sierici di HBV DNA. È indicata principalmente per il trattamento delle forme di infezione cronica HBeAg

negativa, nei pazienti con cirrosi e come trattamento di secondo livello, successivo al trattamento con interferone. Lo svantaggio rispetto l'interferone, però, è che i NUC devono essere somministrati per tutta la vita, a causa della tendenza alla riattivazione virale in seguito alla sospensione del farmaco; inoltre la negativizzazione dell' HBsAg è raramente raggiunta, con un'incidenza annuale del 0,22%<sup>48</sup>. Il trattamento con i NUC, in particolare l'uso prolungato di Lamivudina (il primo analogo nucleosidico approvato) determina in un'elevata percentuale di pazienti lo sviluppo di resistenze farmacologiche e seleziona varianti virali resistenti al farmaco<sup>43</sup>. Per questo tra i NUC, l'Entecavir e i Tenofovir sono i più utilizzati a causa della loro potente attività antivirale e dell'elevata barriera genetica (numero di mutazioni necessarie a produrre una marcata riduzione della suscettibilità al farmaco)<sup>43</sup>.

## **5. Nuove terapie antivirali**

Le attuali terapie sopprimono la replicazione virale, riducono la necroinfiammazione epatica con conseguente riduzione del rischio di insufficienza epatica e carcinoma epatocellulare; quindi migliorano la qualità della vita e le possibilità di sopravvivenza nei pazienti con epatite B cronica. Tuttavia i loro effetti non sono duraturi e nella maggior parte dei pazienti la terapia con NUC deve essere somministrata per tutta la vita. Lo studio di nuove strategie terapeutiche ha come obiettivo la "cura funzionale", ovvero dopo la fine della terapia i livelli di HBsAg e HBV DNA non devono essere rilevabili nel siero<sup>49</sup>.

### **5.1 Farmaci ad azione antivirale**

Le terapie NUC sopprimono i livelli di HBV DNA ma non hanno un'azione diretta sul cccDNA. Questo potrebbe portare a nuovi cicli di infezione, e di conseguenza a mantenere il pool di cccDNA intraepatico. Il cccDNA è quindi il bersaglio principale per lo sviluppo di nuovi farmaci antivirali. Diverse strategie sono in fase di studio: quelle che riducono la produttività del cccDNA e

impediscono il riciclo intracellulare o nuovi cicli di infezione, strategie mirate allo sradicamento del cccDNA dalle cellule infette o al silenziamento della sua attività trascrizionale.

### **Inibitori dell'entry**

L'interazione tra il dominio pre-S1 dell'L-HBsAg e il recettore NTCP è il primo step per l'ingresso del virus nella cellula ospite<sup>50</sup>. Sono state proposte diverse strategie di inibizione dell'entry del virus, che comprendono l'uso di peptidi derivati dal dominio pre-S1. Di questa categoria il più importante è il *Myrcludex B* (Myr B; anche noto come bulevirtide), un lipopeptide miristilato costituito da 47 aminoacidi della regione pre-S1. Inibisce fortemente l'ingresso del virus sia in colture cellulari (IC<sub>50</sub> = 80 pM) sia nel modello murino umanizzato uPA/SCID, senza inibire l'ingresso degli acidi biliari negli epatociti<sup>51-55</sup>. Il Myr è stato testato come monoterapia in pazienti co-infetti HBV/HDV per 48 settimane, ed è stata registrata una riduzione di 2,84 log dei livelli di HDV RNA, e un maggiore decremento (4,81 log) quando utilizzato in associazione con IFN- $\alpha$ ; l'effetto sinergico è risultato significativo anche nelle misurazioni dell'HBsAg; il 40% dei pazienti ha risposto alla terapia e di questi il 26,7% ha negativizzato l'HBsAg<sup>56</sup>. Anche la sicurezza e l'efficacia negli studi clinici di fase IIb sono risultati eccellenti<sup>57</sup>, e una formulazione liposomiale è in fase di sviluppo per la somministrazione orale<sup>58</sup>. Recentemente diversi composti già approvati dall'FDA sono stati identificati come efficaci inibitori dell'entry, tra questi la *ciclosporina A*, l'*ezetimibe*, l'*angiotensina II* e la *rapamicina*<sup>59</sup>. Inoltre anche gli anticorpi monoclonali sono efficienti inibitori dell'entry. Gli studi hanno dimostrato che gli anticorpi monoclonali non solo inibiscono l'ingresso del virus, ma bloccano anche la secrezione di nuovi virioni infettivi dagli epatociti<sup>60</sup>.

### **Induttori della degradazione di cccDNA**

L'eliminazione o l'inattivazione del cccDNA rappresenta la "cura funzionale" dell'epatite cronica B, tuttavia è necessaria una comprensione più completa degli eventi biochimici coinvolti in questo processo<sup>61</sup>. Uno strumento potenzialmente utile per l'inattivazione completa del cccDNA è il sistema di endonucleasi CRISPR-Cas9. Il sistema CRISPR-Cas9 utilizza un RNA guida sintetico (gRNA)

che si adatta perfettamente alla sequenza bersaglio del cccDNA e una proteina Cas9 che provoca il taglio della regione selezionata. Pertanto, per inattivare il cccDNA, sono necessari diversi gRNA, mirati a diversi siti del genoma dell'HBV. Esperimenti preclinici dimostrano che più del 90% del DNA di HBV può infatti essere frammentato da Cas9. Tuttavia, circa il 7% dei genomi cccDNA vengono riparati, con la formazione di mutanti che potrebbero non annullare la funzione del gene interessato<sup>61-63</sup>. Prima di utilizzare nella pratica clinica questo approccio di editing genomico, devono essere valutate le potenziali problematiche. Queste includono la degradazione incompleta del cccDNA, la necessità di trovare un sistema di distribuzione di CRISPR-Cas9 specifico le cellule epatiche ed extraepatiche infette, la risposta immunitaria indotta contro l'enzima batterico che potrebbe provocare una grave tossicità, e gli effetti sull'HBV-DNA integrato<sup>64</sup>. Un altro sistema di degradazione prevede l'utilizzo delle nucleasi *zinc-finger (ZFNs)* e le nucleasi *activator-like (TALENs)*. Sono nucleasi di nuova concezione, utilizzate con successo in modelli di colture cellulari per modificare il cccDNA di HBV<sup>65</sup>. In alternativa, si stanno studiando piccole molecole che agiscono direttamente sul cccDNA. A questo proposito, un destabilizzatore del cccDNA dell'HBV (denominato ccc\_R08) ha determinato una riduzione dei livelli di cccDNA negli epatociti infettati dall'HBV e nel fegato dei topi trattati. La natura della molecola e la sua modalità d'azione non sono ancora state rese note<sup>66</sup>.

### **Strategie mirate alla espressione dei geni virali**

Si ritiene che un'elevata carica antigenica svolga un ruolo centrale nell'instaurare e mantenere la cronicità, per cui la ricerca si sta muovendo per sviluppare terapie che riducano direttamente l'espressione degli antigeni virali e delle proteine regolatrici, silenziando la trascrizione del cccDNA o degradando l'RNA virale.

### **Controllo trascrizionale**

Un bersaglio che potrebbe contribuire al controllo trascrizionale del cccDNA è la proteina X dell'HBV. L'HBx induce la degradazione proteasomica del complesso Smc5/6, che normalmente

sopprime la trascrizione del cccDNA. Di conseguenza, l'inibizione della proteina HBx impedirà l'espressione di tutti i trascritti delle molecole di cccDNA e sopprime la formazione di nuove molecole di cccDNA<sup>67</sup>. L'HBx dirotta la proteina DDB1 (DNA damage-binding protein 1) che contiene l'ubiquitina ligasi E3, sul complesso SMC 5/6 e ne promuove la degradazione<sup>68,69</sup>, quindi approcci diretti all'interazione HBx-DDB1 sono degni di interesse.

Il Pevonedistat inibisce NEDD8, una proteina che fa parte della famiglia delle ubiquitine. In tal modo ripristina i livelli di SMC5/6 e sopprime la trascrizione virale e la produzione di proteine in epatociti in coltura. La Nitazoxanide, un farmaco antivirale e antiparassitario già approvato dalla FDA, è in grado di inibire in modo efficace l'interazione HBx-DDB1, di ripristinare i livelli di SMC5 e sopprime la trascrizione virale negli epatociti in coltura<sup>70</sup>. Altri meccanismi di regolazione genica del cccDNA, prevedono la regolazione dell'acetilazione e della metilazione. Il trattamento con IFN $\alpha$  riduce la trascrizione dell'HBV, in quanto recluta l'istone deacetilasi 1 (HDAC1) sul cccDNA, riducendo l'acetilazione dei residui K27 e K122 dell'istone H3<sup>71</sup>, anche se non è ancora noto se l'attività osservata per IFN $\alpha$  sia legata al ruolo di HBx nella trascrizione. L'HBx interagisce direttamente con l'istone acetiltransferasi CBP/p300 per potenziare l'attività di CREB, un fattore di trascrizione cellulare; il C646, una piccola molecola selettiva inibitore delle istone acetiltransferasi CBP e p300, ha dimostrato di inibire la trascrizione dell'HBV dal cccDNA in colture primarie di epatociti umani<sup>72,73</sup>. 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, e una successiva diminuzione in seguito alla sospensione del farmaco; il silenziamento trascrizionale del cccDNA durava per più di 10 giorni dopo una singola applicazione del farmaco<sup>74</sup>. Sebbene queste osservazioni suggeriscano l'esistenza di diversi modi per di silenziare la trascrizione dell'HBV a livello terapeutico, sono necessari ulteriori studi per proporre farmaci strettamente selettivi per il cccDNA.

## Controllo post-trascrizionale

Un metodo innovativo per la terapia dell'epatite cronica B, consiste nell'inibire l'mRNA virale. Gli inibitori devono legarsi all'mRNA dell'HBV con elevata specificità, per sopprimerne la traduzione o per degradarlo. Le strategie utilizzate di basano sull'*RNA interference (RNAi)*, sugli oligonucleotidi antisenso (ASO), e sugli enzimi a RNA (ribozimi)<sup>61</sup>. Un'opinione condivisa è che utilizzare l'mRNA come *target*, limiterebbe la produzione di HBsAg sia da parte del cccDNA sia da parte del DNA integrato. L'*RNA interference* è mediato da corte sequenze di 20-30 nucleotidi che legano e silenziano l'mRNA<sup>75</sup>. Uno dei primi farmaci testati in studi clinici sull'uomo, è stato ARC-520. Il composto, somministrato tramite iniezione, è formato da due siRNA coniugati con colesterolo, insieme all' N-acetilgalattosamina (NAG); questi vengono rilasciati nell'epatocita tramite il recettore dell'asialoglicoproteina. ARC-520 sembra essere molto efficiente nel ridurre i livelli di HBV DNA, e HBsAg in esperimenti condotti su scimpanzé<sup>76</sup>. Le potenziali limitazioni d'uso sono la somministrazione endovenosa, l'epatotossicità e l'aspecificità, oltre al rischio di attivazione immunitaria da parte dei PRR<sup>77</sup>. Il passo successivo nell'evoluzione dei siRNA è avvenuto con JNJ-3989, progettato per bersagliare diversi siti del genoma dell'HBV. Viene somministrato per via sottocutanea e colpisce sia il cccDNA sia il DNA integrato dell'HBV, non ha mostrato gravi interazioni farmaco-farmaco, ed è in fase II di sperimentazione clinica<sup>76,78</sup>. Gli oligonucleotidi antisenso sono brevi frammenti a singolo filamento di acidi nucleici, sia di DNA o RNA, che si legano alla sequenza complementare degli mRNA virali per appaiamento di basi. Quando si legano all'RNA, formano ibridi di DNA:RNA (DNA antisenso) e duplex di RNA:RNA (RNA antisenso), rispettivamente. La successiva degradazione dell'RNA trascritto e il silenziamento dell'espressione proteica avvengono grazie all'RNasi H dell'ospite<sup>77,79,80</sup>. L'RNA virale può essere inibito da piccole molecole che funzionano come destabilizzatori. RG7834 è una molecola somministrata per via orale, che promuove la degradazione RNA virale, con una preferenza per l'RNA subgenomico. I risultati hanno mostrato che, a differenza delle terapie a base di NUC, RG7834 ha ridotto in modo significativo i livelli di proteine virali (compresa l'HBsAg) e la viremia. Una combinazione di RG7834, Entecavir e

PEG-IFN $\alpha$  ha ridotto significativamente sia i livelli di HBV-DNA sia i quelli di HBsAg nei topi con fegato umanizzato<sup>81</sup>.

### **Assemblaggio del capsido**

La particella CORE dell'HBV è attivamente coinvolta nel ciclo di replicazione dell'HBV. È necessaria per il trasferimento del genoma virale da e verso il nucleo dell'epatocita infetto e per la trascrizione inversa. Pertanto, è un bersaglio promettente per i farmaci antivirali<sup>82</sup>. Sono stati sviluppati due diversi tipi di composti, in base alla morfologia che assume il capsido in presenza di essi. La prima categoria è quella dei modulatori allosterici delle proteine del nucleo (CpAM) di classe I, rappresentata dalle eteroaril diidropirimidine (HAP) come GLS4, RO7049389 e Bay41-4109. Le CpAM di classe I inducono la formazione di nucleocapside deformato. L'altra categoria è quella delle CpAM di classe II, come le fenilpropenamidi (PP) o le sulfamoilbenzamidi (SBA), i cui principali rappresentanti sono: AT-130, NVR-3778, JNJ6379, JNJ0440, JNJ-632, JNJ56136379, AB-423. Questi composti accelerano l'autoassemblaggio del capsido virale morfologicamente normali, ma prive del genoma virale<sup>59</sup>. Entrambi i tipi di inibitori bloccano il trasporto del nucleocapside nel nucleo e quindi la formazione di cccDNA. Negli studi clinici di breve durata (meno di 12 mesi), i livelli di HBV DNA e RNA si sono ridotti nel siero dei pazienti HBeAg-positivi e HBeAg negativi. Trattamenti più lunghi hanno portato ad una ulteriore riduzione dei livelli di HBV DNA, ma senza calo di HBsAg<sup>83-86</sup>. I livelli di HBsAg, tuttavia, sono diminuiti in modelli di infezione *in vivo*; ad esempio nei topi, RO7049389 ha ridotto i livelli sierici di HBV DNA, inoltre ha ridotto i livelli di HBsAg e HBeAg<sup>86-88</sup>.

### **Rilascio di HBsAg**

I polimeri di acido nucleico appartengono a una classe di inibitori dell'attacco o dell'ingresso virale ad ampio spettro, la cui attività aumenta con la lunghezza del polimero e con l'aumento del carattere idrofobico<sup>89</sup>. In uno studio clinico pubblicato di recente, il trattamento combinato con REP 2139 (un polimero antivirale) e IFN $\alpha$  ha permesso un controllo funzionale della co-infezione da HBV/HDV e ha normalizzato i livelli delle aminotransferasi sieriche, come le ALT, in un'elevata

percentuale di pazienti un anno dopo la terapia<sup>90</sup>. Dati più recenti in pazienti cronici, trattati con una combinazione di tenofovir disoproxil fumarato, IFN $\alpha$  pegilato e un polimero a base di acido nucleico hanno mostrato una perdita sostenuta di HBsAg nel 50% dei pazienti dopo 48 settimane di follow-up<sup>91</sup>. 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.

In sintesi, le nuove strategie antivirali che hanno come target il pool di cccDNA e la produzione di HBsAg sono attualmente in fase di studio preclinico. L'obiettivo è quello di sopprimere la trascrizione del cccDNA o colpire direttamente il cccDNA per eliminarlo o silenziarlo. Per quanto riguarda l'HBsAg, la sua produzione dipende dal cccDNA e dall'HBV DNA integrato, per questo si stanno studiando composti che siano in grado di bersagliare sia il cccDNA sia il DNA integrato. Tuttavia, potrebbero essere necessari anche approcci di immuno-stimolazione per sinergizzare l'effetto antivirale.

## **5.2 Immunomodulazione**

### **Strategie mirate al sistema immunitario innato**

Le risposte immunitarie innate costituiscono la prima linea di difesa contro gli agenti patogeni. Le terapie mirate all'immunità innata sfruttano principalmente l'efficacia antivirale diretta delle citochine (TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$  e IL-1 $\beta$ ), ma mirano anche a indurre l'immunità adattativa<sup>61</sup>. La terapia con IFN- $\alpha$  è efficace in una minoranza di pazienti cronici (circa il 5-10%), nei quali induce una vera e propria guarigione funzionale. Il meccanismo d'azione si basa sia sull'effetto antivirale diretto sia sulla capacità dell'IFN- $\alpha$  di potenziare la risposta delle cellule NK<sup>92-95</sup>. In un modello animale (marmotta) è stato dimostrato che l'effetto immunomodulante di IFN $\alpha$  era direttamente legato alla stimolazione delle cellule NK e delle cellule T<sup>96</sup>. Inoltre la terapia con citochine antivirali oltre a ridurre la replicazione dell'HBV, potrebbe anche eliminare il cccDNA. *In vitro* si è osservato che l'IFN-

$\alpha$  aumenta l'espressione di APOBEC3, un enzima che provoca la deaminazione del DNA virale e può provocarne la degradazione; quest'osservazione ha portato a una notevole discussione sulla possibilità di ridurre i livelli di cccDNA negli epatociti infetti senza ucciderli<sup>97</sup>. Lo stesso gruppo ha dimostrato che, come IFN- $\alpha$  e linfotossina- $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  potrebbero essere implicati nella perdita di cccDNA attraverso la deaminazione<sup>98</sup>. L'attivazione dell'immunità innata nei pazienti cronici può essere ottenuta anche con agonisti dei recettori Toll-like (TLR) o RIG-I; questi fanno parte della superfamiglia dei "recettori che riconoscono profili molecolari" (Pattern Recognition Receptors PRR) che innescano la produzione di fattori pro-infiammatori, come le citochine, da parte delle cellule immunitarie. Un agonista di RIG-I (Inarigivir) ha indotto una riduzione dose-dipendente dei livelli di HBV DNA e HBsAg nelle marmotte. Negli studi sull'uomo, riduce in modo dose-dipendente i livelli di HBV DNA (diminuzione di 0,58-1,54 log) e i livelli di RNA, in particolare nei pazienti HBeAg-negativi. Inoltre, il 26% dei pazienti risponde alla cura mostrando una riduzione di 0,5 log dei livelli di HBsAg<sup>99</sup>. Studi in scimpanzè e in marmotte hanno evidenziato una risposta antivirale sostenuta da parte dell'agonista di TLR7, GS-9620<sup>100,101</sup>. In uno studio clinico di fase I/II, GS-9620 non ha avuto effetti collaterali, ma ha avuto anche una scarsa efficacia antivirale, probabilmente a causa della bassa dose utilizzata nei pazienti (4 mg per paziente rispetto a 1 mg per kg negli scimpanzè)<sup>102</sup>. Il GS-9620 aumenta l'espressione di ISG15 (*Interferon-stimulated gene 15*) oltre che incrementare l'attivazione delle cellule NK e la risposta delle cellule T HBV-specifiche<sup>103</sup>. Tuttavia, non si verifica una riduzione significativa dei livelli sierici di HBsAg. Per altri agonisti del TLR7: RO7020531, RG7795 (ANA773), e RG7854 (Roche©) sono attualmente in corso studi clinici di fase I<sup>59</sup>. Sono in fase di sviluppo anche nuovi composti con attività TLR8; gli agonisti del TLR8 attivano in modo robusto la produzione intraepatica di citochine, in particolare IL-12 e IL-18, che sono secrete dai monociti e/o dalle cellule dendritiche intraepatiche<sup>104</sup>. Queste due citochine innescano poi la produzione di IFN $\gamma$  dalle cellule NK intraepatiche e dalle cellule T NK<sup>105</sup>. Inoltre, poiché l'IL-12 può recuperare parzialmente le cellule T HBV-specifiche esaurite, gli agonisti del TLR8 potrebbero agire non solo attraverso la soppressione diretta della replicazione dell'HBV, mediata dall'IFN $\gamma$ , ma anche

potenziando l'attività delle cellule T intraepatiche HBV-specifiche<sup>106</sup>. Una nota di cautela riguardo a queste strategie di attivazione innata è che l'IFN $\alpha$  e l'IL-12 possono anche attivare direttamente le cellule NK, che hanno effetti sia positivi che negativi nell'infezione da HBV. Le cellule NK colpiscono direttamente gli epatociti infettati dall'HBV, ma possono anche lisare le cellule T HBV-specifiche per l'HBV<sup>107</sup>. La possibilità che gli attivatori dell'immunità innata possano sopprimere l'immunità HBV-specifica, pertanto, deve essere presa in considerazione.

### **Strategie rivolte alla immunità adattativa**

L'immunità virus-specifica in corso di epatite cronica B risulta disfunzionale, e può essere ripristinata grazie all'utilizzo di inibitori di alcuni *checkpoint* (come le terapie anti-PD1 o anti-CTLA-4) o da vaccini terapeutici. In particolare gli anticorpi che bloccano l'interazione PD1-PDL1 possono parzialmente ripristinare le risposte difettose delle cellule T e B specifiche per l'HBV<sup>108-110</sup>. La terapia anti-PD1 ha un'attività antivirale limitata ed è richiesta una selezione dei pazienti in base alle loro caratteristiche virologiche e cliniche; inoltre la migliore dose di anti-PD1 sono ancora da determinare<sup>111</sup>. Sono stati condotti diversi studi di terapie vaccinali in pazienti cronici. Attualmente, l'unico studio di vaccinazione terapeutica che ha mostrato una buona efficacia è stato un piccolo studio di vaccinazione in combinazione con un'infusione di anticorpi anti-PD1 nelle marmotte<sup>112</sup>. La scarsa efficacia degli approcci immunoterapeutici progettati per potenziare l'immunità anti-HBV nei pazienti cronici è probabilmente dovuta alle caratteristiche della risposta anti-HBV: le cellule T HBV-specifiche sono rare, e mostrano un fenotipo esaurito<sup>108</sup> con alterazioni metaboliche<sup>113,114</sup>. Queste caratteristiche sono particolarmente presenti nei pazienti adulti con epatite cronica attiva, elevati livelli di HBsAg e replicazione virale. Inoltre, per recuperare le cellule B HBV-specifiche, non solo è necessaria l'interazione PD1-PDL1, ma devono essere presenti altre citochine<sup>110</sup>. Per aggirare questo ostacolo, sono stati sviluppati diversi metodi per ingegnerizzare cellule T HBV-specifiche. Le cellule T sono state ingegnerizzate con un recettore chimerico dell'antigene che contiene un dominio anticorpale anti-HBsAg specifico o con i recettori canonici per le cellule T recettori delle

cellule T (TCR)<sup>115-117</sup>. Queste cellule T ingegnerizzate riconoscono *in vitro* i bersagli infettati dall'HBV e i dati ricavati da modelli animali sono incoraggianti<sup>117-119</sup>. Sono state sviluppate anche cellule T specifiche per l'HBV con una funzione citolitica limitata ma con efficaci proprietà antivirali<sup>120</sup>. Tuttavia, esiste una difficoltà pratica nell'implementazione di tali cellule per l'uso clinico, poiché la produzione di grandi quantità di cellule T ingegnerizzate è strettamente regolamentata, macchinosa e richiede personale altamente qualificato<sup>121</sup>. Per questi motivi, sono state proposte strategie che utilizzano anticorpi con specificità simili a quelle dei TCR o dei TCR solubili, che possono reindirizzare le cellule T endogene verso gli epatociti infetti<sup>122,123</sup>. Gli anticorpi e i TCR solubili sono progettati per indurre le cellule T endogene ad accumularsi specificamente in determinati organi e possono essere iniettati direttamente nei pazienti. Questa strategia è stata utilizzata con successo per trattare le infezioni da HIV (TCR solubile)<sup>124</sup> e HBV<sup>125</sup>.

## **6. Immunopatogenesi dell'infezione da virus dell'epatite B**

L'esito dell'infezione da HBV dipende da una complessa interazione tra fattori virali e immunitari, sia innati che acquisiti. La replicazione dell'HBV non causa danni alle cellule epatiche in un breve periodo di tempo, ma la risposta immunitaria antivirale dell'ospite contro l'HBV può causare infiammazione epatica e danni agli epatociti, e questo ha un impatto importante sulla progressione clinica e sull'esito dell'epatite B (**Figura 4**).

### **Immunità innata**

Il sistema immunitario innato è la prima linea di difesa contro l'infezione da HBV. Le attuali conoscenze sui meccanismi immunitari anti-HBV, e in particolare sui meccanismi della risposta innata, sono ancora scarse a causa di limitazioni tecniche. Risulta complicato, infatti, reclutare pazienti nella fase presintomatica dell'infezione acuta, inoltre gli studi *in vitro* risultano difficili per la scarsità di linee cellulari adatte all'infezione e alla replicazione di HBV. Anche i modelli animali adatti a questo scopo sono scarsi, e il loro utilizzo è limitato a causa di problemi etici, economici

(per esempio nel mantenimento degli scimpanzé), e tecnici, per mancanza di reagenti adatti all'analisi di eventi immunologici<sup>126</sup>. Alcuni studi *in vivo* su scimpanzé e marmotta hanno indicato una debole attivazione della risposta immunitaria intracellulare durante le fasi precoci dell'infezione da HBV, che sembra essere debolmente percepita dall'immunità innata. Altri studi in marmotte hanno dimostrato, al contrario, l'attivazione dell'espressione intraepatica di geni coinvolti nella risposta immunitaria innata subito dopo l'infezione; tale risposta risulta essere tuttavia transitoria e stimolata in seguito a inoculi con elevate concentrazioni di virus. L'andamento tipico dell'infezione acuta da HBV inizia con un lungo periodo di latenza seguito da un picco di replicazione virale; si è osservato, però, che i livelli di viremia si abbassano prima che compaiano danni tissutali e prima che aumentino i livelli delle transaminasi. Questo controllo precoce dell'infezione origina dagli epatociti infettati, che sono in grado di produrre e rilasciare Interferoni di tipo I (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ) in seguito a stimolazione dei recettori TLR<sup>127</sup>. Studi *in vivo* hanno dimostrato che l'infezione virale innesca l'induzione di interferoni di tipo I (ad esempio, IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ) e di altre citochine proinfiammatorie attraverso due distinte vie di segnalazione<sup>128</sup>. Un *pathway* è attivato attraverso i Toll-like receptor (TLR 3,7,8,9) localizzati nelle membrane endosomiali degli epatociti infettati e delle cellule dendritiche plasmacitoidi (pDCs). I TLR riconoscono gli acidi nucleici di HBV e attraverso proteine chinasi, permettono all'NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor kappa B) di entrare nel nucleo e attivare la trascrizione di una vasta gamma di geni coinvolti nelle risposte immunitarie e infiammatorie<sup>129</sup>. L'RNA virale è riconosciuto anche da RIG-I (*retinoic acid-inducible gene 1*) nel citoplasma. Il legame di RIG-I all'RNA, attiva le vie di segnalazione a valle in modo dipendente dalla proteina adattatrice mitocondriale di segnalazione antivirale (MAVS); questo porta all'induzione dell'espressione genica di IFN di tipo I e III e di citochine infiammatorie<sup>130</sup>. Questi Interferoni hanno attività antivirale diretta e sono in grado di destabilizzare i capsidi virali, inibire la sintesi di nuovi capsidi e possono degradare l'HBV RNA preformato. Inoltre IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  reclutano e attivano cellule APC come le cellule di Kupffer (macrofagi residenti nel fegato) e le cellule dendritiche. Queste cellule mediante il rilascio di IL-12 e IL-18 attivano i macrofagi e le cellule NK che agiscono

attraverso due meccanismi: con un'attività citotossica diretta sulle cellule infettate e producendo citochine pro-infiammatorie come IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ .

Tuttavia durante questa prima fase dell'infezione si osserva una risposta innata debole rispetto ad altre infezioni virali. Pertanto, il ruolo delle risposte innate nel controllo iniziale della replicazione dell'HBV è ancora oggetto di dibattito, ma l'opinione prevalente è che il virus dell'HBV abbia sviluppato strategie specifiche per eludere il riconoscimento da parte dell'immunità innata, tra cui l'uso del cccDNA come template per la trascrizione relegato nel nucleo e invisibile al meccanismo di riconoscimento dell'immunità innata<sup>131</sup>. Inoltre l'HBV è in grado di inibire attivamente la risposta immunitaria innata, tramite le sue proteine non strutturali. Per esempio la polimerasi virale e la proteina X, possono inibire la produzione di IFN di tipo I, bloccando l'attività di IRF (fattore di regolazione dell'interferone), o interferire con la segnalazione mediata da RIG-I<sup>126</sup>. In aggiunta è stato dimostrato che le proteine virali HBsAg e HBeAg possono modulare l'espressione dei TLR e inibire la risposta mediata da essi<sup>131</sup>.

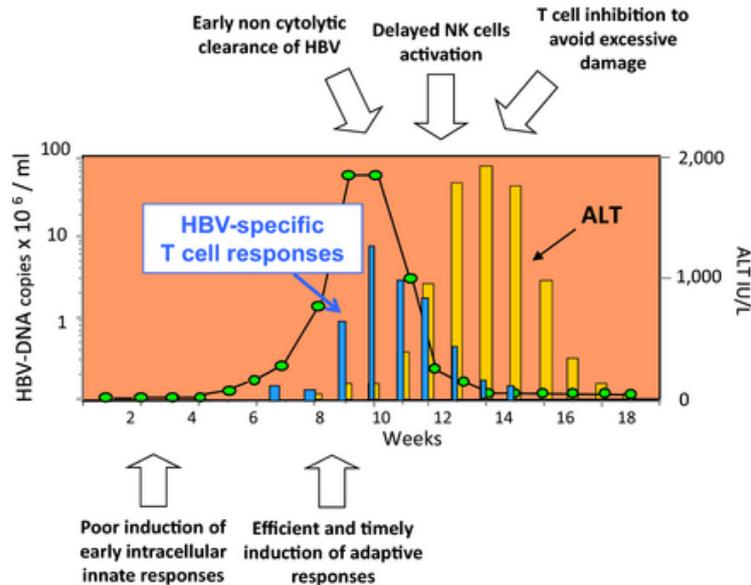
### **Immunità adattativa**

Mentre il ruolo svolto dall'immunità innata nel controllo iniziale dell'infezione da HBV è ancora dibattuto, l'immunità adattativa ha un ruolo centrale nella risoluzione dell'infezione da epatite B, ed è sostenuta da una complessa rete di cellule effettrici. I linfociti T CD4 sono indispensabili per la maturazione dei linfociti T CD8 citotossici e per la produzione di anticorpi da parte dei linfociti B. Le cellule T CD8 eliminano gli epatociti infettati attraverso meccanismi citolitici e non citolitici<sup>132</sup>, mentre gli anticorpi prodotti dalle cellule B neutralizzano le particelle virali e prevengono le reinfezioni<sup>133</sup>. In corso di epatiti acute auto-limitanti la risposta mediata dalle cellule CD4 (T helper) e CD8 (citotossiche) è rilevabile all'aumento esponenziale della replicazione virale, 4-7 settimane dopo l'infezione. I livelli di HBV-DNA diminuiscono del 90% entro 2-3 settimane dopo il picco di replicazione virale prima che il danno epatico sia rilevabile; infatti la risposta immunitaria è

sostenuta da meccanismi non citopatici controllati da IFN- $\gamma$  e TNF- $\beta$ <sup>134,135</sup>. Il reclutamento intraepatico dei linfociti T citotossici è facilitato dalla secrezione di chemochine e dall'attivazione delle piastrine<sup>136</sup>, e porta all'uccisione degli epatociti infetti. In seguito vengono reclutate le cellule antigene-asicifiche (cellule NK e NKT, linfociti T e B, monociti, macrofagi, cellule dendritiche) che amplificano il danno cellulare. Nella fase successiva al picco replicativo il 95% delle cellule T CD8 effettrici muore per apoptosi, e le restanti si differenziano in cellule della memoria. Mentre l'esito generale delle infezioni acquisite in età adulta è la risoluzione spontanea, la maggior parte delle infezioni acquisite alla nascita o perinatali diventano croniche. La persistenza cronica del virus è associata a una risposta estremamente debole delle cellule T HBV-specifiche, e ad una mancata differenziazione in cellule T della memoria<sup>133</sup>. I linfociti Natural Killer (NK) contribuiscono a controllare le fasi iniziali dell'infezione, attraverso la produzione di IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Tuttavia, studi longitudinali su pazienti al momento della prima rilevazione dell'HBsAg e dell'HBV-DNA hanno rivelato un imminente aumento di cellule NK circolanti<sup>137,138</sup>, ma la loro attivazione e funzione effettrice viene soppressa con l'aumento della carica virale e raggiunge un picco solo dopo la risoluzione della viremia<sup>139</sup> e l'inibizione dell'attivazione delle cellule NK, è stata associata agli elevati livelli intraepatici di IL-10. In contrasto con questi dati, i risultati ottenuti nelle marmotte infettate con il virus dell'epatite della marmotta (WHV) mostrano un'attivazione di un gene legato all'attivazione delle cellule NK subito dopo l'infezione<sup>140</sup>. Inoltre, in pazienti con infezioni acute subcliniche e con bassi livelli di viremia l'attivazione delle cellule NK e le funzioni effettrici sono state facilmente rilevabili subito dopo l'infezione, prima dell'espansione delle cellule T virus-specifiche<sup>137</sup>. Le cellule NK svolgono un ruolo anche nell'infezione cronica da HBV<sup>131</sup>. La loro funzionalità sembra soppressa dalla presenza di diverse citochine immunomodulanti, come IL-10 o TGF- $\beta$ <sup>141</sup>, mentre altri dati hanno una maggiore capacità citotossica e un coinvolgimento nel danno epatico.

La risposta immunitaria è controllata da meccanismi regolatori, quali l'arginasi rilasciata dalle cellule epatiche necrotiche. Infatti al momento del picco di ALT, le cellule T HBV-specifiche sono

attivate ma funzionalmente inibite<sup>142</sup>. Questa inibizione funzionale è solo transitoria, poiché la risoluzione dell'infezione è associata a una diminuzione delle cellule T attivate, ad un aumento dell'espressione delle molecole CD127, un declino di PD-1,<sup>108,143</sup> e un ripristino della funzione delle cellule T con la maturazione di risposte della memoria. Le risposte delle cellule T della memoria sono mantenute dalla persistenza occulta dell'HBV, che non viene mai totalmente eliminato dall'ospite infetto, anche in seguito ad una risoluzione positiva dell'epatite acuta<sup>144,145</sup>.



**Figura 4: Cinetica della sequenza di eventi immunologici che avvengono durante un'infezione acuta autolimitata da HBV, contratta in età adulta.**

Nonostante la debole induzione da parte di HBV della risposta immunitaria innata, la risposta T linfocitaria HBV-specifica si attiva in modo efficiente e tempestivo subito dopo l'esordio della replicazione virale, la quale ha generalmente inizio dopo alcune settimane dal momento in cui l'infezione è stata contratta.

Fonte: Ferrari C. HBV and the immune response. *Liver International*. 2014; 35: 121–128.

## 7. Exhaustion

Nei pazienti che cronicizzano l'infezione da HBV si osserva un'elevata replicazione virale ma bassi livelli di linfociti T HBV-specifici, sia nel sangue periferico che nell'ambiente intraepatico<sup>146</sup>. I linfociti T HBV-specifici perdono progressivamente le loro funzioni antivirali in un processo noto come "exhaustion" e il loro grado di disfunzione dipende in parte dai livelli di viremia e antigenemia<sup>147</sup>. I primi dati sul fenomeno dell'exhaustion si sono ottenuti studiando le risposte T CD8 virus-specifiche durante l'infezione cronica da virus della Coriomeningite Linfocitaria (LCMV) nel modello murino, ma questa risposta disfunzionale si può osservare in corso di diverse infezioni croniche causate da diversi tipi di virus quali, HBV, HCV, HIV e neoplasie<sup>148</sup>, e interessa sia le risposte dei linfociti CD4 sia dei CD8. I linfociti T CD8 "exhausted" presentano caratteristiche distintive: a) presentano un profilo

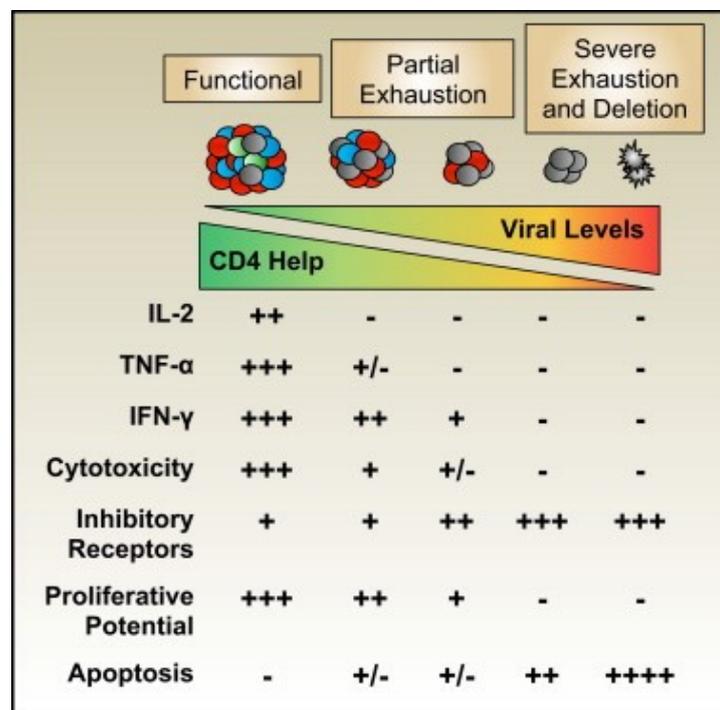
metabolico che favorisce la glicolisi rispetto la fosforilazione ossidativa b) presentano una risposta alterata alle citochine (ad esempio non esprimono il recettore per l'IL-2) c) mostrano caratteristiche di senescenza d) sovraesprimono recettori inibitori e) presentano un profilo trascrizionale ed epigenetico distintivo rispetto alle normali cellule effettrici. Durante la prima fase dell'infezione, quando la carica virale è ancora modesta, la prima funzione persa è la capacità di produrre IL-2, seguita da difetti nella produzione di TNF- $\alpha$ <sup>149,150</sup>. Difetti nella produzione dell'IFN- $\gamma$  si osservano in stadi più gravi di esaurimento e sono correlati allo stadio terminale delle cellule T<sup>150</sup>. Lo stadio finale dell'esaurimento è noto come "*deletion*" che consiste nell'apoptosi della cellula stessa (**Figura 5**). Un tratto distintivo delle cellule T *exhausted* è l'up-regolazione dei recettori inibitori quali TIM-3, CTLA4, 2B4 e PD-1 al termine della risposta immunitaria, e tra questi il più studiato è il PD-1. Il legame del recettore da parte dei suoi ligandi, PD-L1 e PD-L2, porta alla sua fosforilazione e al reclutamento della fosfatasi SHP-2 in grado di regolare negativamente i pathways a valle; in questo modo PD-1 riduce la segnalazione tramite TCR e inibisce l'attivazione dei linfociti T. Inoltre, recenti studi hanno dimostrato che SHP-2 è implicata nella defosforilazione di CD28, una proteina importante per l'attivazione linfocitaria<sup>151</sup>. Il blocco dei *checkpoint* inibitori è stato ampiamente studiato come strategia di ripristino immunitario nell'infezione cronica da HBV e molti studi *in vitro* hanno dimostrato che il blocco di PD-1/PD-L1, da solo o in combinazione con altri composti, può indurre livelli variabili di miglioramento delle risposte delle cellule T e B<sup>108-110,152-156</sup>. Una riduzione dell'espressione della molecola pro-apoptotica Bim a un aumento della produzione di citochine da parte delle cellule T CD8, sono stati osservati con il blocco di CTLA-4 e la manipolazione delle vie 2B4 e Tim-3<sup>155-157</sup>. Tutti i diversi approcci di modulazione del *checkpoint*, tuttavia, non sono esenti da tossicità o da eventi avversi immuno-correlati, come riportato nei pazienti oncologici<sup>158,159</sup>. L'*exhaustion* linfocitaria è caratterizzato inoltre da un'alterato metabolismo, perdita dei marcatori di memoria, e l'up-regolazione di fattori trascrizionali come EOMES e BLIMP-1<sup>160</sup>. Non solo l'espressione di Eomes ma anche la localizzazione cellulare influenza il grado di *exhaustion*; quando presente nel nucleo regola l'espressione di PD-1, poiché compete con Tbet per il legame con le

sequenze Tbox. Pertanto, un rapporto Eomes:Tbet elevato incrementa l'espressione di PD-1, poiché Eomes è un repressore di PD-1 più debole rispetto a Tbet<sup>161</sup>. Anche i meccanismi epigenetici sono cruciali per la differenziazione linfocitaria e nei linfociti T *exhausted* il profilo trascrizionale ed epigenetico risulta alterato. Rispetto alle cellule T effettrici e di memoria mostrano l'up-regolazione di regolatori negativi della trascrizione e una configurazione chiusa della cromatina<sup>114</sup>.

Durante l'infezione acuta le cellule T CD8 passano dalla fosforilazione ossidativa all'attivazione della via glicolitica necessaria per mantenere la fase effettrice linfocitaria; questa riprogrammazione metabolica, nota come effetto Warburg, è necessaria per sostenere la proliferazione iniziale ed è dovuta alle vie di segnalazione della fosfoinositide 3-chinasi (PI3K) ed mTOR, innescate dalla co-stimolazione del TCR e del CD28<sup>162</sup>. Dopo il completamento della fase effettrice, le cellule T della memoria in via di sviluppo devono passare nuovamente al metabolismo ossidativo guidato dalla degradazione mitocondriale degli acidi grassi. Durante l'infezione virale cronica, i profili trascrizionali e funzionali delle cellule T esauste in via di sviluppo mostrano alterazioni metaboliche, tra cui la soppressione delle funzioni glicolitiche, la riduzione della respirazione cellulare e la diminuzione dell'assorbimento di glucosio, con un declino finale marcato nella generazione di ATP<sup>163</sup>. I meccanismi molecolari che causano l'*exhaustion* linfocitaria non sono ancora del tutto compresi, ma sono stati ugualmente identificati diversi fattori che contribuiscono alla sua insorgenza e gravità. In generale sembrano essere importanti tre condizioni:

1. l'esposizione prolungata all'antigene che causa l'iper-attivazione dei linfociti T seguita dall'espressione di numerosi recettori inibitori.
2. i recettori inibitori stimolano negativamente i linfociti T, impedendo alla cellula di svolgere efficacemente la propria funzione.
3. i mediatori pro-infiammatori rilasciati dalle cellule infettate e dalle cellule APC promuovono il rilascio di citochine ad azione soppressiva come TGF- $\beta$  e IL-10.

Altri parametri che influenzano il decorso e il mantenimento dello stato di *exhaustion* linfocitaria sono la disponibilità e l'efficacia dei linfociti T CD4+, l'intensità di risposta delle cellule NK, il carattere e la qualità delle popolazioni di cellule presentanti l'antigene<sup>164</sup>. Studi recenti hanno dimostrato che l'*exhaustion* è un fenomeno reversibile, e per questo i meccanismi precedentemente citati costituiscono un target per future immunoterapie, finalizzate ad implementare la risposta immunitaria dell'ospite, per favorire il controllo virale durante le infezioni croniche<sup>151</sup>.



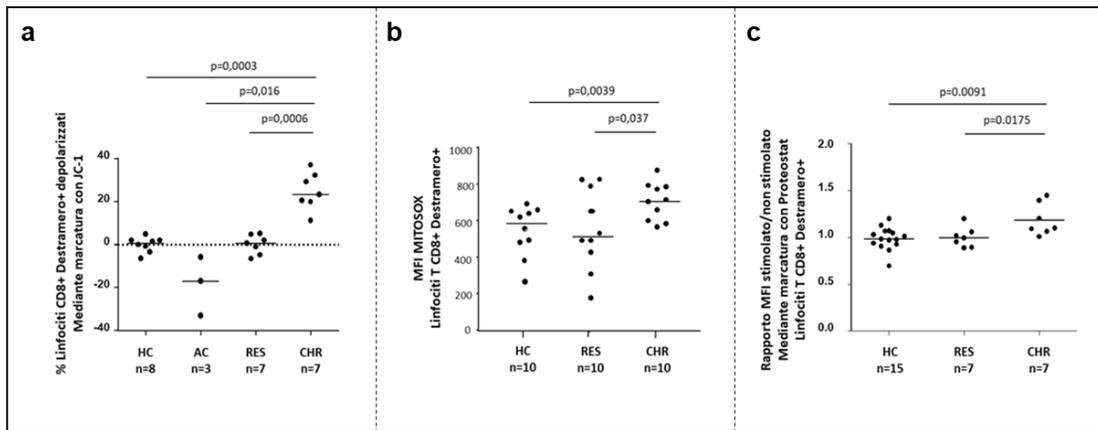
**Figura 5: Progressivo esaurimento funzionale dei linfociti T CD8+ durante un'infezione virale cronica.**

Fonte: Kahan SM, Wherry EJ, Zajac AJ, T cell *exhaustion* during persistent viral infections.

*Virology*. 2015; 479-480: 180-193.

## DATI PRELIMINARI

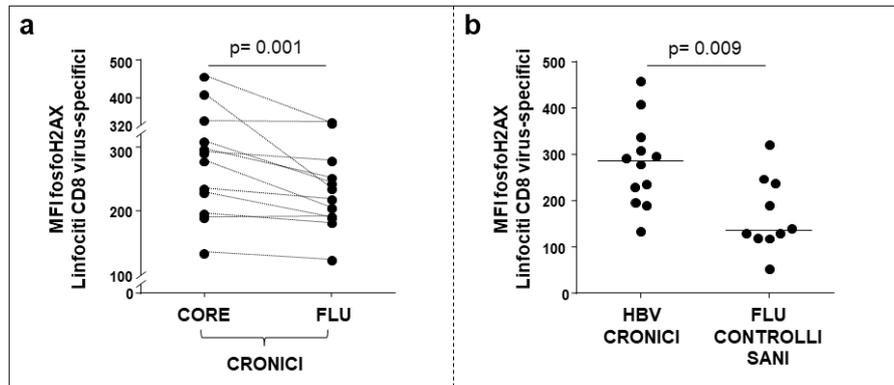
La conoscenza sempre più avanzata dei meccanismi cellulari e molecolari che regolano il processo dell'*exhaustion* linfocitaria, ha permesso di identificare molteplici *pathways* che possono essere utilizzati come *targets* per prevenire, o recuperare, la perdita di responsività dei linfociti T durante l'infezione cronica da HBV<sup>164</sup>. Presso il Laboratorio di Immunopatologia Virale dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma, sono stati precedentemente analizzati i profili trascrizionali dei linfociti T HBV-specifici *exhausted* di pazienti con epatite cronica, al confronto con i profili di espressione genica di linfociti che mantengono la loro funzionalità, isolati da pazienti in fase di acuzie, pazienti che hanno risolto spontaneamente l'infezione e, inoltre, con linfociti T CD8 influenza-specifici derivati da donatori sani<sup>114</sup>. Tale studio ha evidenziato la tendenza alla *down-regolazione* di molti *pathways* cellulari nei linfociti T HBV-specifici derivati da pazienti cronici. Tra questi, maggiormente down-regolati sono quelli coinvolti nei processi mitocondriali, nella regolazione del proteasoma, nel sistema di risposta al danno del DNA, e nella regolazione della trascrizione genica<sup>114</sup>. Data l'importanza sia del mitocondrio che del proteasoma per la funzionalità linfocitaria, sono state fatte ulteriori prove finalizzate a validare i dati di trascrittomica. Mediante esperimenti in citofluorimetria si è osservato che, in seguito a stimolazione, un'alta percentuale di linfociti HBV-specifici da pazienti cronici, confrontati con soggetti guariti spontaneamente dall'infezione e controlli sani, va incontro a depolarizzazione, cioè ad un crollo del potenziale di membrana mitocondriale (**Figura 6a**). Inoltre, è stato registrato un eccessivo contenuto di ROS nell'ambiente mitocondriale (**Figura 6b**)<sup>114</sup>, condizione che può causare stress ossidativo e morte cellulare. Nei pazienti cronici è stato poi evidenziato un maggiore accumulo di aggregati proteici rispetto ai soggetti guariti e ai controlli sani, suggerendo una disfunzione nel sistema ubiquitina-proteasoma (**Figura 6c**)<sup>114,165</sup>.



**Figura 6:** Validazione funzionale dell'alterazione mitocondriale e proteasomale nei linfociti T CD8 *exhausted*. **(a)** Percentuale di linfociti depolarizzati in seguito a stimolo con anti-CD3, valutati mediante marcatura con la sonda JC-1. Per i controlli sani (HC) sono stati analizzati i linfociti CD8+ FLU-specifici e i linfociti CD8+ HBV-specifici per pazienti acuti (Ac), guariti (Res) e cronici (Chr). **(b)** Livelli di anione superossido mitocondriale misurati mediante sonda MITOSOX, nei linfociti virus-specifici di controlli sani (HC), pazienti guariti spontaneamente (RES) e pazienti con epatite B cronica (CHR). **(c)** Quantificazione degli aggregati proteici presenti nei linfociti T CD8+ FLU-specifici di controlli sani (HC) e nei linfociti T CD8+ HBV-specifici di pazienti guariti (Res) e cronici (Chr) attraverso la marcatura con la sonda Proteostat. Per ogni valore è rappresentato il rapporto tra la mediana di intensità di fluorescenza della sonda ProteoStat nel campione stimolato con anti-CD3 rispetto al non stimolato.

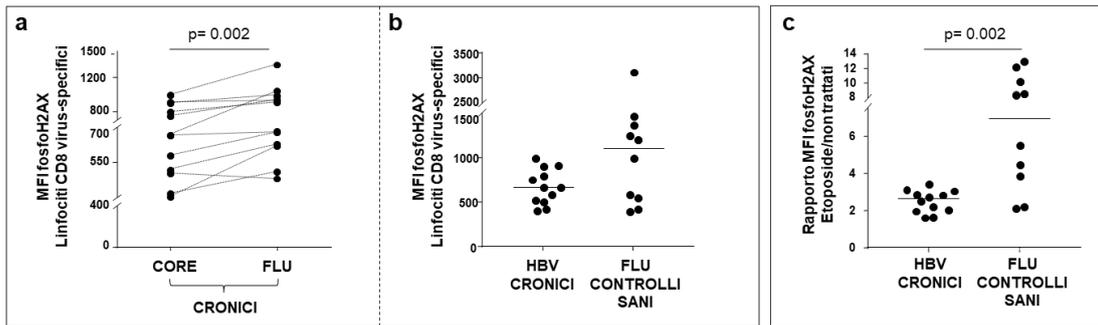
L'elevata produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) mitocondriali può danneggiare il DNA, e attivare i meccanismi di riparazione del DNA. Tuttavia, nelle cellule T CD8 HBV-specifiche l'analisi ha evidenziato una profonda down-regolazione dei trascritti codificanti per proteine coinvolte nella riparazione del DNA. Per questo mediante studi di citofluorimetria, è stata analizzata la risposta al danno del DNA nei linfociti HBV-specifici isolati dai pazienti con epatite B cronica. Sono stati analizzati i livelli di fosforilazione della serina 139 sull'istone H2AX (fosfoH2AX) in quanto marker del danno del DNA<sup>166</sup>. *In vivo* i livelli di fosfo-H2AX sono risultati significativamente più elevati nei linfociti HBV-specifici di pazienti con infezione cronica rispetto alle cellule T influenza (FLU)-

specifiche degli stessi pazienti (**Figura 7a**) e rispetto a quelle T FLU-specifiche dei controlli sani (**Figura 7b**). Questo indica che in corso di infezione cronica i linfociti CD8 HBV-specifici accumulano danno al DNA.



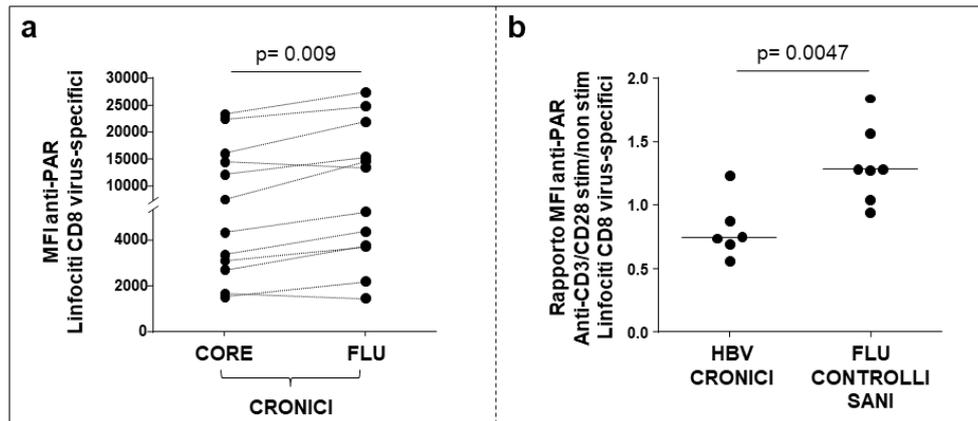
**Figura 7:** Confronto dei livelli di fosforilazione dell'istone H2AX nei linfociti T CD8 HBV- e influenza (FLU)- specifici dei pazienti con epatite B cronica (cronici) (test di Wilcoxon per dati appaiati) (**a**) e tra linfociti T CD8 HBV- e influenza (FLU)- specifici di soggetti sani di controllo (test U di Mann-Whitney) (**b**).

Per valutare la capacità di risposta al danno del DNA nei linfociti virus-specifici, sono stati misurati i livelli di fosfoH2AX in seguito a trattamento con Etoposide, un agente genotossico che causa rotture nella doppia elica del DNA<sup>167</sup>. La mediana di intensità di fluorescenza (MFI) di fosfoH2AX risulta up-regolata nelle cellule T CD8 FLU-specifiche dei pazienti sia cronici che sani (**Figura 8a, 8b**), rispetto alle cellule CD8 HBV-specifiche dei pazienti HBV-cronici. Di conseguenza, il rapporto MFI di fosfoH2AX tra campioni trattati e non trattati con Etoposide è significativamente più basso nelle cellule CD8 HBV-specifiche dei pazienti con epatite cronica, evidenziando che i meccanismi di riparazione del danno al DNA sono meno efficienti nelle cellule *exhausted* (**Figura 8c**).



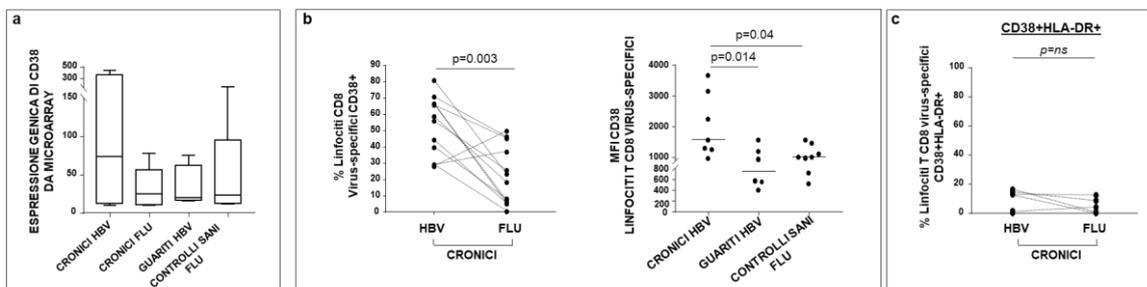
**Figura 8:** (a) Mediana di intensità di fluorescenza (MFI) di fosfo-H2AX in seguito a trattamento con Etoposide, linfociti T CD8 HBV- e influenza (FLU)- specifici dei pazienti con epatite B cronica (cronici) (test di Wilcoxon per dati appaiati) (b) e tra linfociti T CD8 HBV- e influenza (FLU)- specifici di soggetti sani di controllo (test U di Mann-Whitney). (c) Incremento della fosforilazione di H2AX, riportato come rapporto tra il valore di MFI nelle cellule trattate con Etoposide rispetto alle stesse cellule non trattate (test U di Mann-Whitney).

Altri mediatori precoci della risposta al danno del DNA sono le poli-ADP-ribosio polimerasi, enzimi NAD-dipendenti che catalizzano la formazione di catene di poli-ADP-ribosio per reclutare altri enzimi di riparazione in corrispondenza del sito di lesione del DNA<sup>168</sup>. I livelli di parilazione nelle cellule HBV-specifiche sono risultati significativamente più bassi rispetto alle cellule FLU-specifiche degli stessi pazienti. Inoltre, in seguito a stimolazione anti-CD3/anti-CD28, si sono osservati livelli di parilazione più bassi nei pazienti cronici rispetto ai controlli (Figura 9a,9b).



**Figura 9: (a)** Il grafico mostra i livelli di poli(ADP)ribosilazione (parilazione) nei linfociti CD8 HBV- e FLU- specifici di pazienti cronici (test di Wilcoxon per dati appaiati). **(b)** Il grafico 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).

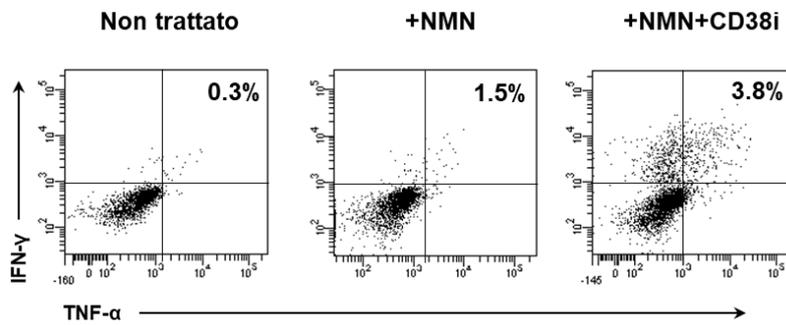
L'aumento del danno del DNA, può determinare l'iperattivazione di PARP, con consumo e deplezione di NAD (nicotinamide adenina dinucleotide). Il NAD oltre ad essere coinvolto nel metabolismo energetico della cellula, è un importante cofattore in altri processi cellulari e gli enzimi responsabili del suo utilizzo si possono suddividere in tre classi: sirtuine (SIRT), Poli ADP-ribosio polimerasi (PARP) e le Ciclo-ADP-ribosio sintasi (cADPR, in particolare CD38). Per studiare se la mancanza di NAD possa rappresentare un meccanismo alla base della disfunzione dei linfociti T CD8 virus-specifici nell'epatite cronica B, è stata valutata l'espressione di CD38, una glicoproteina multifunzionale responsabile del maggior consumo di NAD all'interno della cellula<sup>169</sup>. Il CD38 è risultato up-regolato sia a livello di espressione genica (**Figura 10a**) che a livello proteico nelle cellule HBV-specifiche dei pazienti cronici, rispetto ai gruppi di controllo e anche alle cellule CD8 FLU-specifiche degli stessi pazienti (**Figura 10b**). Poiché l'espressione di CD38 è associata all'attivazione T linfocitaria, è stata valutata la co-espressione con il marcatore di attivazione HLA-DR. Come si può osservare nel grafico (**Figura 10c**) la media della percentuale di linfociti positivi sia per CD38 che per HLA-DR è minima (7,87 %), 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*<sup>170,171</sup>



**Figura 10: (a)** Espressione genica di CD38 ottenuta da 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)** Percentuale di linfociti che esprimono rispettivamente HLA-DR e CD38 in campioni appaiati di linfociti T CD8 HBV- e FLU-specifici di pazienti cronici (Test di Wilcoxon per dati appaiati).

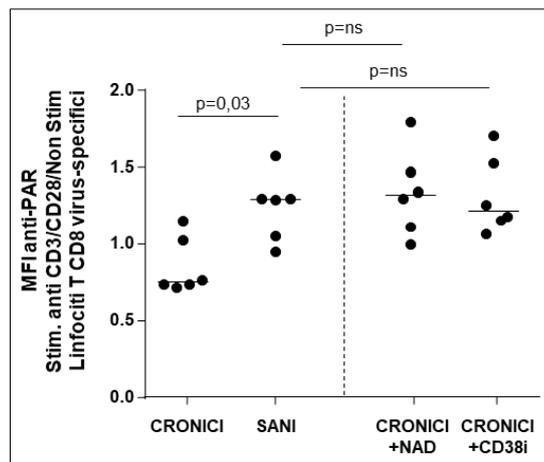
Dopo aver ipotizzato che la deplezione di NAD sia alla base della disfunzione, è stato testato *in vitro* un precursore del NAD, la Nicotinamide Mononucleotide (NMN), per verificarne la capacità nel ripristinare i *pathway* cellulari disfunzionali individuati in precedenza. I risultati hanno confermato che l'uso di NMN è in grado di migliorare la funzionalità mitocondriale, la risposta al danno del DNA, la proteostasi cellulare, e di potenziare la funzionalità T linfocitaria antivirale. Effetto questo ulteriormente potenziato dall'aggiunta di un inibitore dell'attività NADasica del CD38 (78c o CD38i)

**(Figura 11).**



**Figura 11:** Dot plots di un paziente rappresentativo, che mostrano la percentuale linfociti T CD8 che producono IFN $\gamma$ -TNF $\alpha$  in assenza di trattamento (a sinistra) con il solo trattamento NMN (al centro) e con NMN+CD38i (a destra).

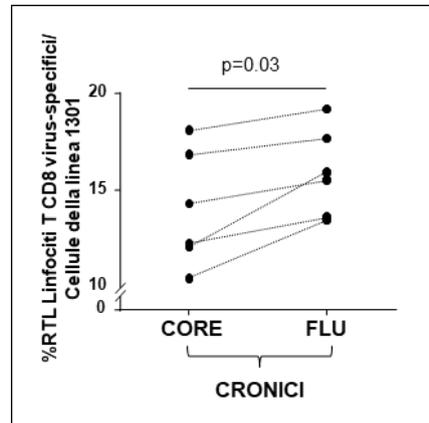
Inoltre in seguito una breve incubazione con NAD esogeno o con CD38i, ha permesso il miglioramento significativo della funzionalità degli enzimi PARP (**Figura 12**), confermando che una carenza di NAD a livello intracellulare può essere una delle cause della disfunzione linfocitaria.



**Figura 12:** Rapporto tra l'MFI dell'anticorpo anti-PAR, tra i campioni stimolati e non stimolati con anti-CD3/CD28, nei linfociti virus-specifici di pazienti cronici (CRONICI) e dei soggetti sani (SANI) in assenza di trattamento, e nei linfociti T HBV-specifici isolati dai pazienti cronici, in presenza di trattamento con NAD (CRONICI +NAD) e in presenza di CD38i (CRONICI +CD38i) (test di Mann-Whitney).

Infine, è stata analizzata la lunghezza dei telomeri nei linfociti HBV-specifici, che è risultata significativamente inferiore rispetto alle cellule FLU-specifiche degli stessi pazienti cronici (**Figura 13**), confermando dati di letteratura che descrivono un'associazione tra l'espressione di CD38, la

disfunzione mitocondriale, il declino di NAD e la senescenza cellulare. Inoltre, l'accumulo di ROS e un sistema di riparazione del DNA inefficace, provocano un accumulo di danno al DNA sia telomerico che non telomerico<sup>172-174</sup>.



**Figura 13:** 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).

## SCOPO DELLO STUDIO

In corso di infezione cronica da HBV la risposta linfocitaria risulta fortemente compromessa, mostra limitata capacità antivirale e contribuisce alla persistenza del virus nell'ospite<sup>131</sup>. Le analisi trascrizionali, svolte sui linfociti isolati da pazienti con infezione cronica da HBV, hanno evidenziato che tra i processi cellulari maggiormente compromessi rientrano quelli relativi a mitocondrio, proteasoma e risposta al danno del DNA<sup>114</sup>. La correzione della loro funzionalità potrebbe rappresentare una strategia di ripristino efficace, per i molteplici ruoli da essi svolti nel metabolismo cellulare e nell'attivazione, differenziamento e funzione dei linfociti T. A partire dai dati di trascrittomici, è stato possibile validare la disfunzione mitocondriale, della proteostasi e della riparazione del danno al DNA. L'elevato contenuto di ROS può danneggiare le proteine e gli organelli cellulari e con conseguente accumulo di aggregati intracellulari e compromissione della proteostasi cellulare<sup>165</sup>. Inoltre è stato osservato che lo stress ossidativo mantiene il danno al DNA e di conseguenza l'attivazione persistente dei meccanismi di riparazione, come la parilazione catalizzata dagli enzimi PARP che dipendono dal NAD per la loro attività, e possono indurre la deplezione. Anche il CD38 catalizza l'idrolisi del NAD per svolgere la sua attività di ADP-ribosil-ciclastasi, ed è risultato up-regolato nei linfociti T CD8 dei pazienti cronici, sia a livello genico che proteico. Il trattamento *in vitro* dei linfociti T CD8 isolati dai pazienti cronici, con Nicotinamide Mononucleotide (NMN) da sola o in associazione con 78c, un inibitore del CD38, ha permesso di osservare il ripristino della parilazione e della funzionalità linfocitaria, avvalorando l'ipotesi che le disfunzioni cellulari osservate siano correlate alla deplezione di NAD. Considerando che diversi modelli di senescenza cellulare sono caratterizzati dalla sovraespressione di CD38, da accumulo di ROS e deplezione di NAD<sup>175,176</sup>, si è ipotizzato che la stimolazione antigenica persistente potesse portare alla senescenza cellulare nelle cellule CD8 HBV-specifiche. Questa possibile correlazione è stata confermata mediante analisi della lunghezza dei telomeri, da cui è emerso che nei linfociti HBV-specifici quest'ultima è significativamente inferiore rispetto alle cellule FLU-specifiche degli

stessi pazienti cronici. Queste osservazioni preliminari, hanno permesso di identificare un *network di pathways* intracellulari disfunzionali e interconnessi che portano alla deplezione di NAD, e che a sua volta mantiene la disfunzione degli stessi *pathways*.

Da letteratura è noto che la carenza di NAD intracellulare può compromettere l'attività delle sirtuine (SIRT), enzimi con azione deacetilasi NAD-dipendente. Inoltre, può indurre la conversione del piruvato in lattato causando una diminuita formazione di Acetil-CoA disponibile per il ciclo di Krebs, e per l'acetilazione istonica. Questo può contribuire alla condensazione della cromatina e di conseguenza al silenziamento genico<sup>177,178</sup>.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di approfondire ulteriormente la conoscenza dei *pathways* disfunzionali alla base dell'*exhaustion* linfocitaria e la loro interconnessione. Partendo dai dati precedentemente descritti che dimostrano che la deplezione di NAD è uno dei meccanismi alla base della disfunzione dei linfociti T CD8 HBV-specifici dei pazienti cronici, l'obiettivo di questa tesi è stato quello di studiare:

- Il ruolo dello stress ossidativo nell'accorciamento dei telomeri, e il ripristino della loro lunghezza in seguito al trattamento *in vitro* con NMN+CD38i.
- La correlazione dell'espressione del CD38 con l'*exhaustion* linfocitario.
- Il ripristino dei *pathways* disregolati, a livello trascrizionale in seguito a trattamento *in vitro* con NMN+CD38i.
- Gli effetti della deplezione di NAD sui livelli di acetilazione dell'istone H3.
- Il confronto dell'efficacia del trattamento con NMN+CD38i e del trattamento con Entinostat, farmaco epigenetico inibitore delle deacetilasi istoniche, nel ripristinare l'attività antivirale.
- La risposta al danno del DNA nei linfociti T CD8 HBV-specifici che riconoscono epitopi virali mutati.

Il ripristino della risposta antivirale tramite trattamento con NMN+CD38i nei linfociti T specifici per diversi epitopi virali, descritti in letteratura per avere diversi livelli di esaurimento funzionale, inclusi epitopi mutanti.

## 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:

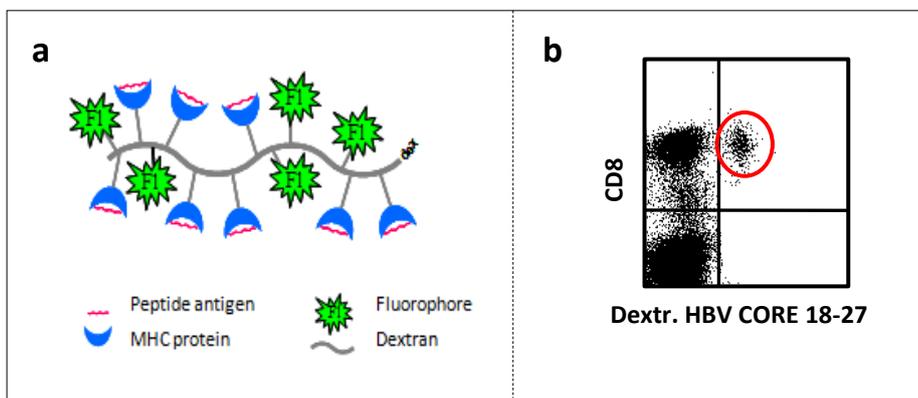
- 57 pazienti con epatite cronica attiva da HBV, nessuno dei quali era mai stato sottoposto a terapia. La diagnosi si è basata su livelli elevati di alanina aminotransferasi (ALT) mantenuti per più di sei mesi e positività per HBsAg, anti-HBc, anti-HBe e HBV DNA. Di questi, 23 pazienti erano HLA-A2 positivi. Lo screening per HLA-A2 è stato realizzato mediante marcatura delle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) con l'anticorpo fluorescente anti-HLA A2.01 (BD Biosciences, San Jose, CA) e successiva analisi citofluorimetrica.
- 9 soggetti HLA-A2+ guariti spontaneamente dall'infezione acuta da HBV risultati negativi per HBsAg e positivi per anti-HBs.
- 6 soggetti sani HLA-A2+ disponibili come gruppo di controllo.

Tutti i pazienti arruolati sono risultati negativi per la ricerca di 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 destramerici 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 e della polimerasi 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 *wild-type* (aa. 18-27: FLPSDFFPSV), della polimerasi (aa. 455-463: GLSRYVARL) 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 peptidi sintetici corrispondenti agli epitopi HLA-A2-ristretti della proteina CORE 18-27 (Genotipo D) mutati (aa 18-27: FLPQDFFPSV, FLPTDFFPSA, FLPNDFFPSI, FLPNDFFPSA, FLPADFYPSV, FLPSDFYPSV, FLPSDFFPV, FLPSDFFAV, FLPSDFFPSI, FLPSDFFPSA) sono stati acquistati da Mimotopes (Regno Unito). I complessi destramerici peptide-HLA di classe I coniugati con i fluorocromi PE o APC (**Figura 14**), contenenti i peptidi del CORE 18-27 *wild-type*, e mutati (aa. 18-27: FLPTDFFPSA, FLPSDFFAV, FLPSDFFPSI, FLPQDFFPSV), della polimerasi e dell'influenza 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, PD1 PE-Cy7 (Biolegend), Goat Anti-mouse IgG3 Alexa 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- $\gamma$  APC-R700, IL-2-APC, forniti da Becton-Dickinson (BD), e TNF- $\alpha$ -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).



**Figura 14:** (a) I complessi destramerici utilizzati per lo studio presentano la struttura riportata nel pannello A. Sono costituiti da una catena di destrano alla quale sono coniugate più molecole di HLA di classe I legate a corti (9-10 aa) peptidi sintetici HLA-A2 ristretti. Sono inoltre presenti molecole di fluorocromo coniugate alla catena di destrano. Grazie alla sua particolare struttura, associando l'epitopo virale con molecole di HLA, il destramero mima la funzione delle cellule APC e consente l'identificazione dei linfociti T CD8 specifici per l'epitopo antigenico d'interesse tramite analisi citofluorimetrica. (b) Visualizzazione tramite citometria a flusso dei linfociti T CD8+ specifici per l'epitopo 18-27 della proteina CORE di HBV identificati utilizzando la tecnologia del destramero.

### 3. Isolamento dei linfociti del sangue periferico

Le cellule linfomononucleate del sangue periferico (Peripheral Blood Mononuclear, PBMCs) sono state ottenute a partire da sangue fresco eparinato mediante centrifugazione su gradiente di densità Ficoll-Hypaque. Brevemente, 20 ml di sangue eparinato sono stati stratificati su 12 ml di Ficoll e centrifugati a 2200 rpm per 20 minuti. L'anello di PBMCs, formatosi all'interfaccia tra Ficoll e plasma, è stato quindi raccolto e sottoposto a due lavaggi con soluzione HBSS (Hank's Balanced Salt Solution). La vitalità delle cellule recuperate è stata determinata mediante colorazione vitale con Türk e conta utilizzando la camera di Neubauer. In seguito le PBMCs 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 per gli esperimenti.

#### **4. Sequenziamento del DNA sierico per la ricerca di epitopi mutati**

Gli estratti di DNA sierico sono stati amplificati mediante PCR, utilizzando primer oligonucleotidici specifici per le sequenze di HBV DNA che fiancheggiano l'intera regione genomica preC/C (HBV1F, 5'-AAGACTGGGAGGAGTTGGG - 3' e HBV2R, 5'-ACCTTATGAGTCCAAGGAATACTAACA-3') e con il sistema Expand High Fidelity PCR (Roche Diagnostics) secondo le istruzioni del produttore. Le sequenze nucleotidiche dei prodotti di PCR sono state determinate utilizzando il kit BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Thermo Fisher Scientific) secondo le istruzioni del produttore. I prodotti di sequenziamento sono stati rilevati da un sequenziatore automatico di DNA (ABI PRISM 3500 Dx Genetic Analyzer; Thermo Fisher Scientific).

#### **5. Marcatura CD38 e PD1**

Le cellule CD8 virus-specifiche sono state incubate per 15 minuti a temperatura ambiente con i complessi detramericici specifici per la proteina CORE 18-27. In seguito a marcatura con anticorpi di superficie: anti-CD3, anti-CD8, anti-CD38 e anti-PD1, i campioni sono stati lavati con PBS 1X, e sono stati analizzati mediante citofluorimetro a otto colori (FACS-Canto, Becton Dickinson, CA, USA) utilizzando il software FACS-DIVA.

## 6. Acetilazione dell'istone H3

Per valutare l'acetilazione dell'istone H3 sono state analizzate cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) di pazienti cronici, e soggetti guariti spontaneamente da un'infezione acuta da HBV. Le cellule sono state incubate overnight alla temperatura di 37°C, distribuendole equamente tra pozzetti a cui è stato fatto precedentemente adsorbire, mediante coating, l'anticorpo anti-CD3 (10 µg/ml anti-CD3 mAb) e ai quali è stato aggiunto in sospensione l'anticorpo anti-CD28 (2 µg/ml anti-CD28 mAb) e pozzetti privi di anti-CD3 e di anti-CD28. Dopo la marcatura con la sonda di vitalità LIVE/DEAD, le cellule sono state incubate per 10 minuti a temperatura ambiente con i destrameri, poi tramite il kit "BD Phosflow™" (BD Biosciences) sono state fissate con Fix Buffer I (10 minuti a 37°C) e permeabilizzate con due lavaggi in Perm/Wash Buffer I. Il 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 PBS1X prima dell'acquisizione a citofluorimetro.

## 7. Valutazione della risposta al danno del DNA

### 7.1 Marcatura di fosfoH2AX

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 µM, Sigma, MO, USA). In seguito allo scongelamento e dopo un'ora di trattamento le PBMC di pazienti cronici e di soggetti sani sono state lavate, risospese in PBS1X 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 relativi all'epitopo CORE 18-27 *wild type* o agli epitopi CORE 18-27 mutati. Il kit "BD Phosflow™" è stato usato per fissare e permeabilizzare le cellule, come precedentemente descritto. In seguito le cellule sono state incubate 30 minuti a temperatura ambiente con anticorpi di superficie (anti-CD3 e anti-CD8) e con l'anticorpo "Mouse Anti-H2AXPE-CF594" (BD). Dopo

opportuni lavaggi con PBS 1X i campioni sono stati acquisiti ed analizzati mediante citofluorimetro a flusso a otto colori (FACSCanto, Becton-Dickinson, CA, USA) utilizzando il software FACS-DIVA.

## **7.2 Poli-ADP-ribosilazione (PARilazione)**

I campioni sono stati marcati direttamente *ex vivo*. Le cellule sono state marcate con la sonda di vitalità LIVE/DEAD, poi incubate a 37° C per 15 minuti con i destrametri relativi all'epitopo CORE 18-27 *wild type* o agli epitopi CORE 18-27 mutati e gli anticorpi di superficie anti-CD3 e anti-CD8; in seguito le PBMC sono state fissate e permeabilizzate con il kit eBioscience™ Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer (ThermoFisher). Per marcare le catene di poli-ADP-Ribosio (PAR) i campioni sono stati poi incubati per 30 minuti a 4°C con l'anticorpo monoclonale anti-Poly-(ADP-ribose) (anti-PAR), non coniugato ad alcun tracciante fluorescente. Dopo lavaggio con la soluzione permeabilizzante (Perm) del kit 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.

## **8. Espansione *in vitro* dei linfociti T**

Le cellule mononucleate isolate dal sangue periferico (PBMC) e crioconservate in azoto liquido, sono state scongelate, sottoposte a lavaggio in HBSS e risospese in terreno 60 completo (RPMI 1640 supplementato con 40 µg/ml di Gentamicina, 2,5 µg/ml di Fungizone, 0,05 mM di 2Mercaptoetanololo, 1X NEA e 8% siero umano). In seguito, le PBMC sono state distribuite equamente in piastre a 96 pozzetti con fondo tondo e stimolate con le miscele di peptidi virali precedentemente descritte. Le cellule sono state incubate alla temperatura di 37°C per 10 giorni in presenza o assenza di trattamento. Al terzo giorno di coltura cellulare è stata aggiunta l'IL-2 alla concentrazione di 50 U/ml, la quale promuove la proliferazione dei linfociti T. Per alcuni esperimenti, è stata stimolata l'intera popolazione linfocitaria CD3 attraverso la deposizione delle

PBMCs nei pozzetti di piastre in cui era stato fatto precedentemente adsorbire (coating) l'anticorpo anti-CD3 alla concentrazione di 10 µg/ml in PBS1X. In questo caso le cellule sono state incubate a 37°C per 6 giorni in presenza o assenza di trattamento. I trattamenti usati sono: Nicotinamide Mononucleotide (NMN, 10, 100 o 500 µM, Sigma, Missouri, USA), l'inibitore di CD38 o 78c (1 o 5 nM, Sigma), Mitoquinone (MitoQ, 0.1 µM CliniSciences), Piperidina-Nitrossido (MITO-TEMPO, 10 µM, Sigma), Entinostat (ENT, 0.05 o 0.1 µM Selleck Chemicals, Huston, USA).

### **9. Lunghezza dei telomeri in seguito ad espansione *in vitro***

Lo studio della lunghezza dei telomeri è stato realizzato sui linfociti T dopo 10 giorni di espansione *in vitro* in presenza e assenza di trattamento (MitoQ, MitoTempo, NMN+CD38i tramite il Kit Prime Flow RNA Assay (Thermo-Fisher), che si basa sulla tecnica Flow-FISH<sup>179</sup>). Le linee cellulari dei pazienti sono state messe a confronto con le linee di cellule T umane leucemiche 1301, note per avere telomeri insolitamente lunghi. Queste sono state aggiunte a ciascun campione e quindi trattate con il medesimo protocollo. L'esperimento è suddiviso in due giornate. Il primo giorno le cellule sono state marcate con la sonda di vitalità LIVE/DEAD a temperatura ambiente per 10 minuti. Successivamente le cellule sono state marcate a 4 °C per 30 minuti con destrameri e con gli anticorpi superficie (anti-CD3, anti-CD8, anti-PD1, anti-CD38) insieme a 50 µL di Brilliant Buffer (BD), un buffer utile per tenere separati i fluorocromi in Brilliant Violet. In seguito le cellule sono state fissate a 4 °C per 30 minuti, e poi risospese nel PrimeFlow RNA Permeabilization Buffer con un inibitore delle RNasi. Dopo il lavaggio con PBS 1X sono state nuovamente fissate per 1 ora a temperatura ambiente. Le cellule sono state incubate per due ore al buio con la sonda del telomero (Homo sapiens telomere, Thermo Fisher) e la sonda RPL13A come controllo interno (Thermo-Fisher) in un termoblocco precedentemente riscaldato a 40 °C. I campioni sono stati poi lavati con Wash Buffer e RNasi inhibitor e lasciati *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 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 PBS1x e acquisiti a citofluorimetro LSRFortessa™ (BD) (Figura 15).

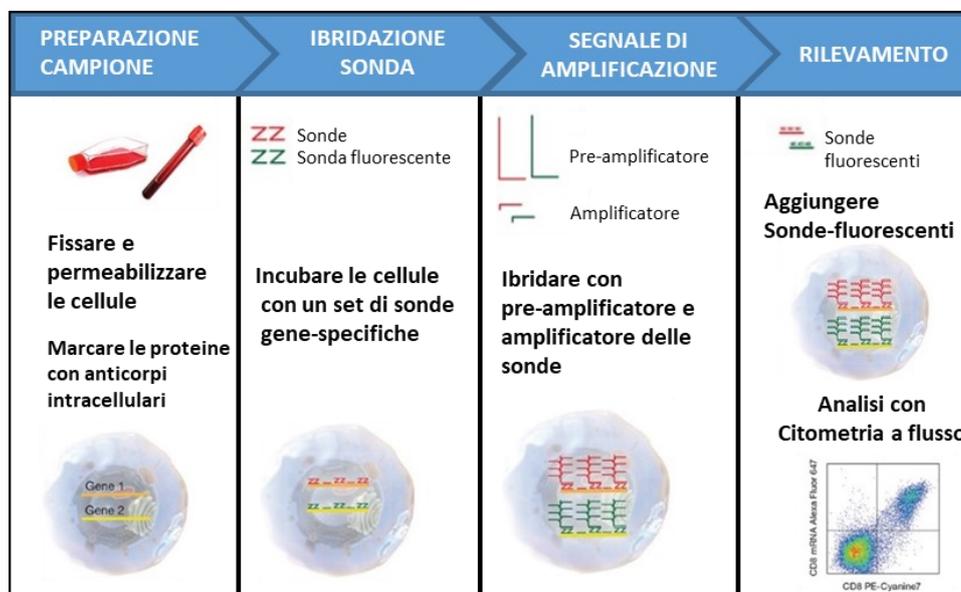


Figura 15: Passaggi schematizzati della metodica FLOW-FISH

## 10. Valutazione del potenziale di membrana mitocondriale in seguito ad espansione *in vitro*

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* in presenza e assenza di Entinostat, 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.

### **11. Rilevazione degli aggregati proteici in seguito ad espansione *in vitro***

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* in presenza e assenza di Entinostat. 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.

### **12. Acetilazione dell’istone H3 in seguito ad espansione *in vitro***

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+CD38i, Entinostat. 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.

### **13. Valutazione della produzione di citochine intracellulari (ICS)**

Lo studio della produzione di citochine intracellulari è stato realizzato sui linfociti T dopo 10 giorni di espansione *in vitro*. Le cellule sono state incubate in presenza di peptidi virali (alla concentrazione finale di 1  $\mu$ M) e anticorpo anti-CD107a per un’ora a 37°C. L’aggiunta del peptide virale ha la funzione di ristimolare i linfociti T virus-specifici. Successivamente sono stati aggiunti 10  $\mu$ g/ml di Brefeldina-A per ulteriori 3 ore di incubazione, al fine di bloccare la secrezione delle citochine prodotte da parte delle cellule. Al termine, le cellule stimolate con i peptidi, accuratamente lavate con PBS 1X sono state incubate con gli opportuni marcatori di superficie (Destramero MHC di Classe

I, anti-CD3, anti-CD8, anti-CD4). Le cellule sono state poi trattate con medium A e medium B per il fissaggio e la permeabilizzazione, (Nordic MUBio, Susteren Olanda) per consentire la reazione delle citochine intracellulari con gli anticorpi monoclonali anti-IFN- $\gamma$ , anti-TNF- $\alpha$  e anti-IL-2 incubati con le cellule per 15 minuti a temperatura ambiente. Dopo opportuno lavaggio con PBS 1X, si è proceduto all'analisi mediante citometria a flusso.

#### **14. Strategie di gating per citometria a flusso**

L'analisi citofluorimetrica, svolta mediante il Software di FACSDiva, prevede la costruzione di gate utili a selezionare le cellule di interesse. Primariamente, in base al diametro cellulare (Forward Scatter FSC) e in base alla granularità e complessità interna (Side Scatter, SSC), è stata separata la popolazione linfocitaria dalle altre cellule PBMC e dai detriti cellulari. Tramite marcatore di vitalità e gli opportuni anticorpi di superficie è stato possibile individuare i linfociti vitali appartenenti alle popolazioni cellulari di interesse, CD3, CD4 e CD8 e i linfociti virus-specifici marcati con i complessi destramerici sopra descritti.

#### **15. Isolamento dei linfociti T CD8 antigene-specifici tramite "single cell" sorting**

I linfociti T CD8 virus-specifici sono stati isolati sia *ex vivo* da PBMC scongelate, sia dopo espansione *in vitro* in presenza e assenza di NMN+CD38i. In seguito alla marcatura con i complessi destramerici e la marcatura di superficie (anti-CD3, anti-CD8) le cellule sono marcate con il marcatore di vitalità 7AAD e sono state risospese in 500 $\mu$ L di Pre Sort Buffer (BD). Attraverso analisi citofluorimetrica 60 cellule per campione sono state separate dalle restanti cellule mediante sorting elettrostatico utilizzando FACSria III Cell Sorter (BD Biosciences). Le cellule sono state direttamente raccolte e risospese nel CDS Sorting Solution, composto di un buffer di lisi, un inibitore dell'RNasi, i 3' SMART-

Seq CDS Primer II, e acqua priva di nucleasi (Takara-Bio, Giappone) per la successiva analisi di espressione genica. Ogni passaggio è stato compiuto alla temperatura di 4°C.

## 16. Sequenziamento dell'mRNA

Lo studio di sequenziamento dell'mRNA è stato eseguito sia in linfociti T CD8 virus-specifici isolati *ex vivo* da PBMC scongelate, sia in linfociti T CD8 virus-specifici espansi *in vitro* in presenza e assenza di NMN+CD38i. Le librerie di mRNA sono state preparate mediante il kit SMART-Seq HT PLUS (Takara-Bio, Giappone), secondo le istruzioni del produttore. Brevemente, 60 (*ex vivo*) o 100 (linee) cellule sono state lisate nel CDS Sorting Solution come precedentemente descritto. Ad ogni singolo campione è stata aggiunta la One-Step-Master Mix composta dagli oligonucleotidi, la DNA polimerasi e la trascrittasi inversa oltre che da un apposito buffer (One-Step buffer), da acqua priva di nucleasi e l'inibitore dell'RNasi. La sintesi e l'amplificazione del cDNA è stata eseguita con 16 cicli di PCR tramite Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler (ThermoFisher). Il cDNA è stato purificato con il kit Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter) e ne è stata valutata la qualità con un saggio D5000-HS utilizzando la TapeStation 4200 (Agilent Technologies) e poi è stato quantificato con un saggio Qubit DNA-HS (ThermoFisher Scientific). Le librerie di cDNA sono state normalizzate a 5 nM e sottoposte a preparazione delle librerie secondo il protocollo suggerito. Le librerie finali sono state amplificate e indicizzate (indici unici-duali) con 14 cicli di PCR, purificate e quantificate con il Qubit DNA-HS Assay. Il controllo qualità finale è stato eseguito con un saggio TapeStation 4200 D1000-HS. Le singole librerie sono state normalizzate a 10 nM, raggruppate e sequenziate su una cella a flusso NovaSeq6000 S1 (Illumina) come letture a 50 paired-end (**Figura 16a, 16b**).

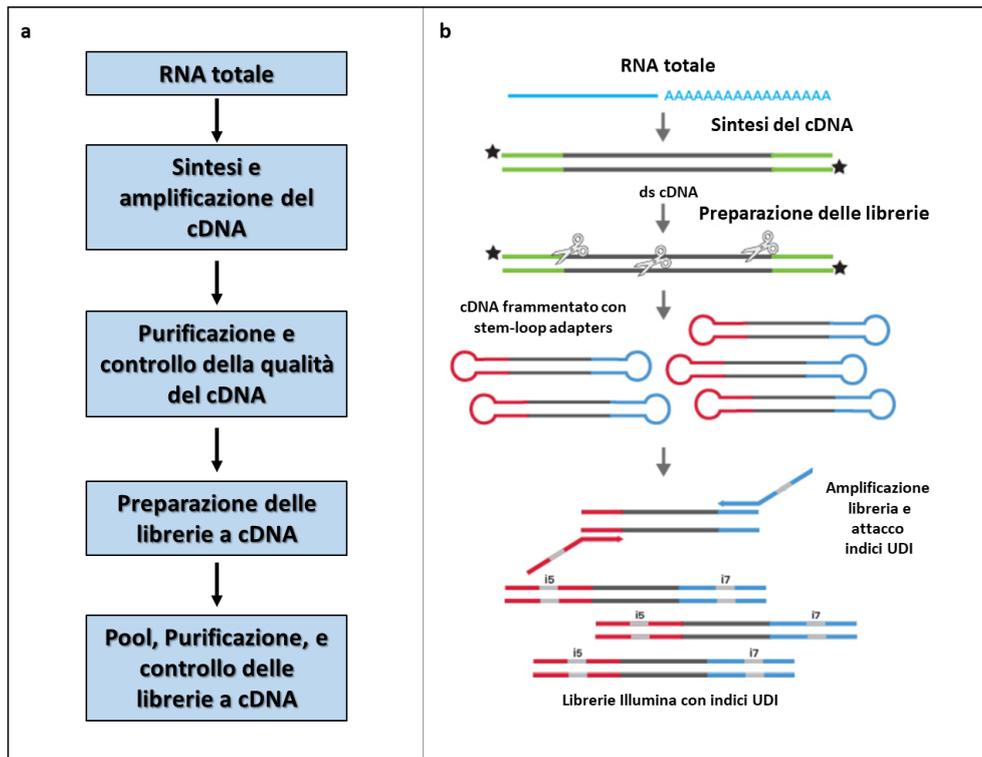


Figura 16: Metodica schematica dell'RNA-Seq (Takara Bio)

## 17. Analisi statistiche

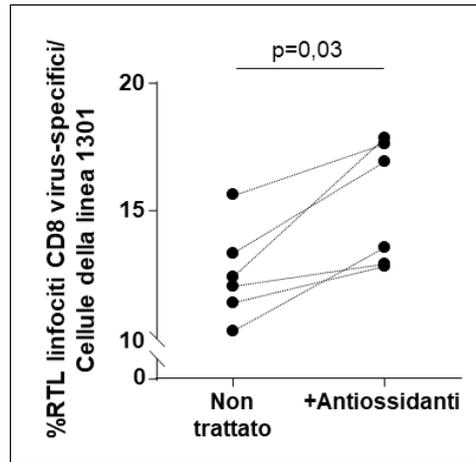
Le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando il software GraphPad Prism. Il test U di Mann-Whitney è stato utilizzato per confrontare gruppi per confrontare i livelli di espressione di Sirt3 tra pazienti cronici e soggetti guariti, per confrontare i livelli di parilazione in due diversi gruppi di pazienti cronici e per confrontare l'acetilazione istonica tra pazienti cronici e soggetti sani. 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 inoltre utilizzato per confrontare i campioni trattati e non trattati negli esperimenti di ripristino e per confrontare l'MFI di H2AX nei linfociti T CD8 virus-specifici per l'epitopo CORE *wild type* con quelli specifici per l'epitopo CORE mutato. 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. La correlazione di Spearman è stata

applicata per valutare la correlazione dell'espressione del CD38 con quella di PD1 e con la produzione di IFN $\gamma$ , e la correlazione tra i livelli di parilazione in due gruppi di pazienti cronici e l'espressione di CD38 e la produzione di IFN $\gamma$ . Inoltre è stata utilizzata per correlare l'espressione genica tra i linfociti T CD8 virus-specifici dei pazienti cronici e quelli di pazienti guariti spontaneamente. L'analisi delle curve ROC è stata eseguita con il software jamovi, e applicata a 12 pazienti per distinguerli in due sottogruppi in base all'espressione di CD38 e alla produzione di IFN $\gamma$ . Per analizzare i dati prodotti dal sequenziamento dell'RNA i file.bcl grezzi sono stati demultiplexati con il software bcl2fastq v2.20.0.422 (Illumina) e processati con FastQC v0.11.9 (Illumina). Per l'analisi di qualità è stato utilizzato fastp v 0.22.0 (*complexity\_threshold* 10-Q-f3-F3). Le letture *trimmed* sono state allineate con STAR v2.7.10a al genoma umano (GRCh38.p13). I conteggi delle *reads* sono stati prodotti con STAR `-quantMode GeneCounts` utilizzando i file gtf GRCh38.p13\_rel40/gencode.v40.annotation.gtf. L'analisi dell'espressione differenziale è stata eseguita con DESeq2 v1.34.0 dopo aver rimosso i campioni outlier dei linfociti T HBV-specifici per l'epitopo CORE, per l'epitopo POL dei pazienti cronici e dei linfociti T HBV-specifici (CORE e POL) dei pazienti guariti spontaneamente dall'infezione acuta. Le liste di geni relative al DNA repair utilizzate sono: DNA Repair (GO:0006281) ottenuta da AmiGO, HALLMARK\_UV\_RESPONSE\_UP (M5941) e HALLMARK\_UV\_RESPONSE\_DN (M5942) ottenute da GSEA, P53 Pathway By Glucose Deprivation (P04397) ottenute da PANTHER 2016.

## RISULTATI

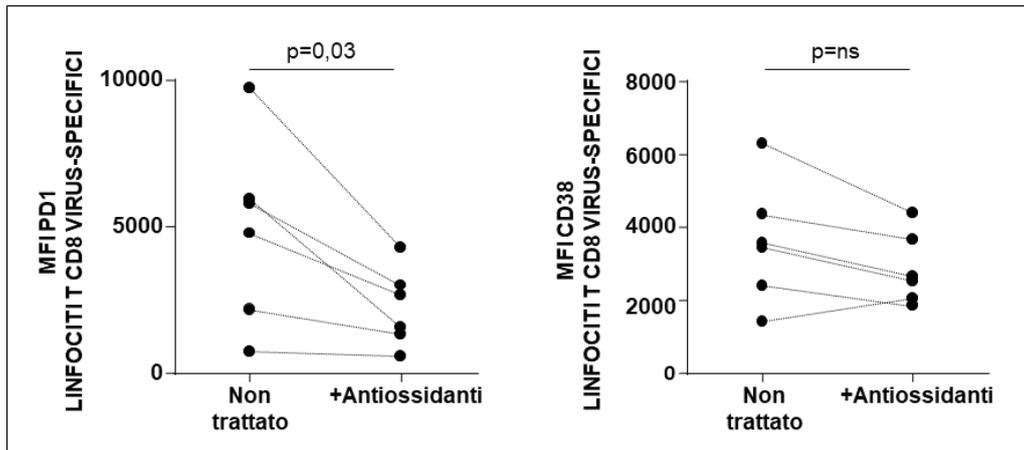
### 1. Lo stress ossidativo è una causa dell'accorciamento dei telomeri e dell'up-regolazione di CD38 e PD1

In seguito all'osservazione che i linfociti CD8 HBV-specifici *exhausted* hanno telomeri più corti rispetto ai linfociti funzionali specifici per l'influenza degli stessi pazienti cronici, abbiamo verificato l'ipotesi che questo fenomeno fosse associato allo stress ossidativo precedentemente descritto, analizzando l'effetto del trattamento con composti antiossidanti sulla lunghezza dei telomeri. Le cellule mononucleate isolate dal sangue periferico (PBMC) di pazienti HLA-A2+ con infezione cronica sono state stimulate *in vitro* per 10 giorni con il peptide corrispondente all'epitopo HBV-CORE 18-27 in presenza o assenza di trattamenti antiossidanti specifici per il mitocondrio quali Mitoquinone (MitoQ) e Mitotempo. In seguito, mediante la marcatura con i destrameri MHC di classe I di restrizione HLA-A2 sono stati individuati i linfociti virus specifici e tramite la tecnica FLOW-FISH<sup>179</sup> abbiamo misurato la lunghezza dei telomeri nei linfociti HBV-specifici e abbiamo osservato un ripristino significativo della lunghezza in seguito a trattamento con antiossidanti (**Figura 17**). Questo indica che nei linfociti T CD8 HBV-specifici, in corso di infezione cronica lo stress ossidativo è implicato nell'accorciamento dei telomeri e quindi nella senescenza cellulare.



**Figura 17:** Confronto della lunghezza dei telomeri in linfociti T CD8 HBV-specifici di pazienti cronici in presenza/assenza di antiossidanti (Mitoquinone o MitoTempo), 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).

Inoltre nei linfociti CD8 HBV-specifici *exhausted*, è stato precedentemente osservato che il recettore inibitorio PD-1 e il CD38 risultano up-regolati. In seguito al trattamento con i composti antiossidanti, è possibile osservare che i valori di mediana di intensità di fluorescenza (MFI) di PD-1 diminuiscono significativamente rispetto ai relativi campioni non trattati, mentre per l'espressione di CD38 si osserva una tendenza al decremento nella maggior parte dei campioni, ma non in tutti (**Figura 18**).

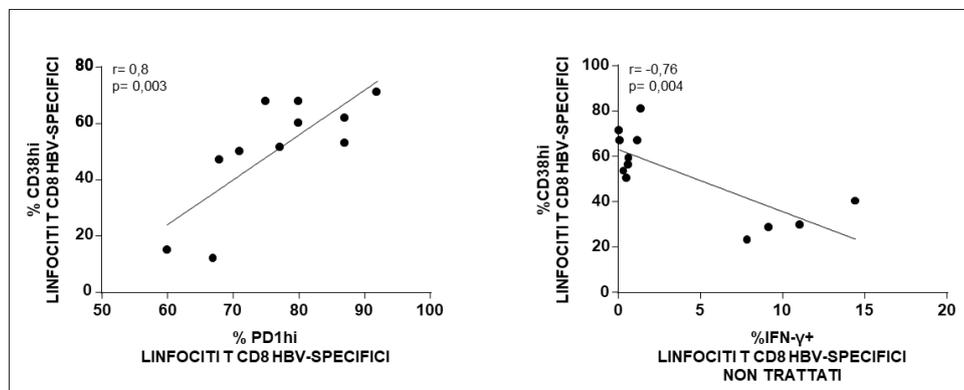


**Figura 18:** Valori di intensità mediana di fluorescenza (MFI) di PD1 (sinistra) e CD38 (destra) nei linfociti T CD8 HBV-specifici dei pazienti cronici in assenza o in presenza del trattamento con antiossidanti (Mitoquinone, MitoTempo). La significatività statistica dei dati è relativa al test di Wilcoxon per dati appaiati.

## 2. L'up-regolazione di CD38 sui linfociti T CD8 HBV-specifici correla con il grado di *exhaustion* linfocitaria

In diversi modelli di infezione cronica e nel cancro l'aumento di espressione di CD38 è stata associata all'*exhaustion* linfocitaria<sup>171,180,181</sup>; tuttavia l'espressione di questa glicoproteina è notoriamente associata anche all'attivazione dei linfociti T<sup>182</sup>. In precedenza, nel nostro laboratorio, è stato dimostrato che nei linfociti T virus-specifici *exhausted*, CD38 è up-regolato sia a livello genico sia a livello proteico, e che la sua espressione si sovrappone solo in minima parte con quella del marcatore di attivazione cellulare HLA-DR. Per confermare che l'*over*-espressione di CD38 sia associata allo stato di *exhaustion* linfocitaria, e poterlo considerare quindi un marcatore di esaurimento funzionale nel modello dell'infezione cronica da HBV, abbiamo confrontato i livelli di espressione di CD38 con quelli di PD-1, considerato marcatore di *exhaustion* e con la produzione di interferone- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), come indicatore della funzionalità linfocitaria dei linfociti HBV-specifici di pazienti con epatite B cronica<sup>183</sup>. Come mostrato nei grafici (**Figura 19**) la percentuale di linfociti virus-specifici con alti livelli di CD38 (CD38hi) correla significativamente con la percentuale di

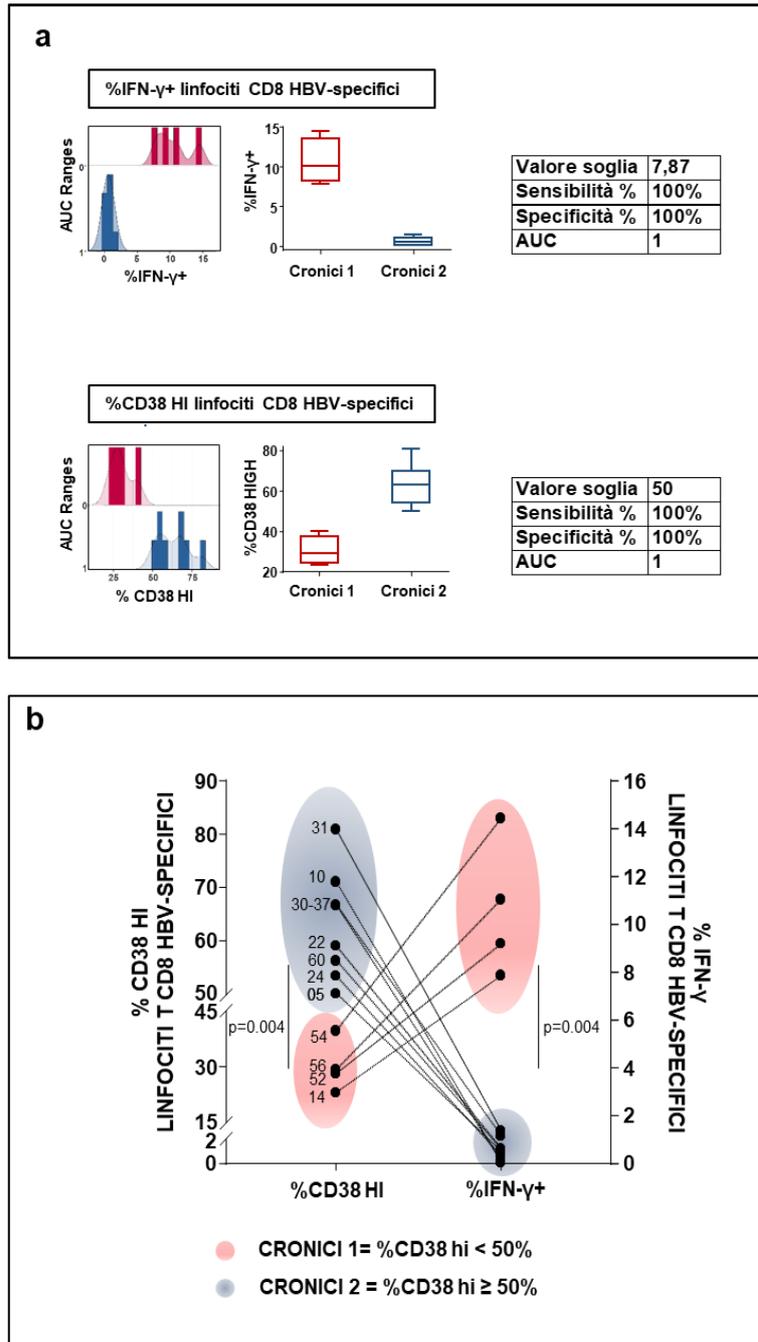
linfociti PD1hi e correla inversamente con la produzione di IFN- $\gamma$  in cellule espansse *in vitro* per 10 giorni con uno stimolo peptidico HBV-specifico.



**Figura 19:** Correlazione tra la percentuale di linfociti HBV-specifici CD38hi con la percentuale di linfociti HBV-specifici PD1hi (grafico a sinistra) e con la percentuale di IFN- $\gamma$  prodotto dai linfociti T CD8 in risposta ad uno stimolo peptidico HBV-specifico (grafico a destra) in seguito ad espansione *in vitro* di 10 giorni dei PBMC isolati da pazienti con infezione cronica da HBV (coefficiente di correlazione di Spearman).

Dal grafico di correlazione tra IFN- $\gamma$  e CD38hi si può osservare che i campioni si distribuiscono in due distinte sotto-popolazioni. Per validare questa osservazione abbiamo applicato un'ulteriore analisi statistica. La percentuale di linfociti T CD8 IFN- $\gamma$ (+) e la percentuale di linfociti CD38hi dei 12 pazienti sono stati analizzati mediante il test statistico di classificazione binario delle curve ROC. Questo ci ha permesso di calcolare un valore *cutpoint*, rispetto al quale si distinguono due popolazioni secondo i criteri di accuratezza, sensibilità e specificità dei valori analizzati. È possibile osservare che i 12 pazienti presi in esame si suddividono in due sottogruppi secondo un valore soglia di 7,87% per quanto riguarda i valori di produzione di IFN- $\gamma$ , e di 50% relativamente alla percentuale di linfociti CD38hi; entrambe le analisi esprimono massimi valori di accuratezza, sensibilità e specificità (**Figura 20a**). Analizzando nel dettaglio le due sottopopolazioni è emerso che nel primo sottogruppo, chiamato per semplicità "CRONICI 1", la percentuale di linfociti virus-specifici con elevati livelli di CD38 è inferiore al 50% e in questi stessi pazienti la produzione di IFN- $\gamma$  è maggiore rispetto al valore di *cutpoint* calcolato con le curve ROC. Al contrario nei "CRONICI 2"

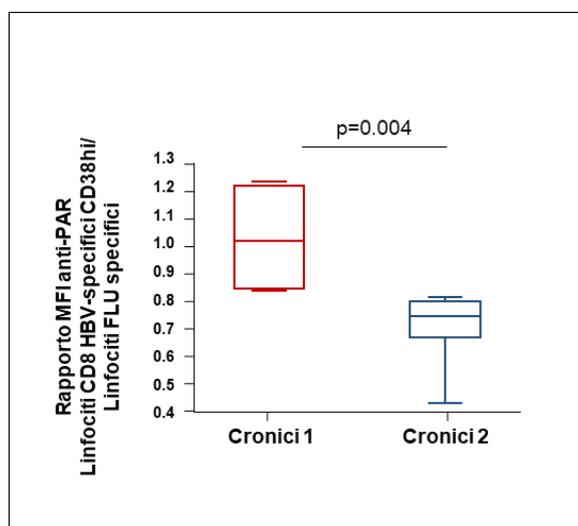
la percentuale di linfociti virus-specifici con elevati livelli di CD38 è maggiore del 50% e i valori di IFN- $\gamma$  sono nettamente inferiori al valore soglia (**Figura 20b**). Questo risultato indica che nei linfociti virus-specifici che esprimono alti livelli di CD38 la funzionalità antivirale, misurata come capacità di produrre IFN- $\gamma$ , risulta maggiormente compromessa, e quindi maggiormente esaurita, rispetto alla popolazione in cui la percentuale di CD38<sup>hi</sup> risulta più bassa.



**Figura 20: (a)** Distribuzione dei valori della percentuale di IFN- $\gamma$  (sopra) e di CD38hi (sotto) nei linfociti HBV-specifici, secondo il sistema di classificazione binario delle curve ROC. La distribuzione è riportata sia in forma di istogramma sia come box plot. A destra sono riportati il valore soglia, la sensibilità, la specificità e l'area sotto la curva (AUC) che misura l'accuratezza del test con valori compresi tra 0.5 e 1.0. Per tale motivo maggiore è l'area sotto la curva e tanto maggiore è il potere discriminante del test. **(b)** Il grafico mostra per ogni paziente la percentuale dei linfociti CD8 HBV-specifici CD38hi e la rispettiva percentuale di IFN- $\gamma$ +, sulla seconda asse delle ordinate. Per entrambi

i parametri i 12 pazienti sono suddivisi in due sottogruppi, chiamati per comodità “CRONICI 1” e “CRONICI 2”, significativamente differenziati secondo il test di Mann-Whitney.

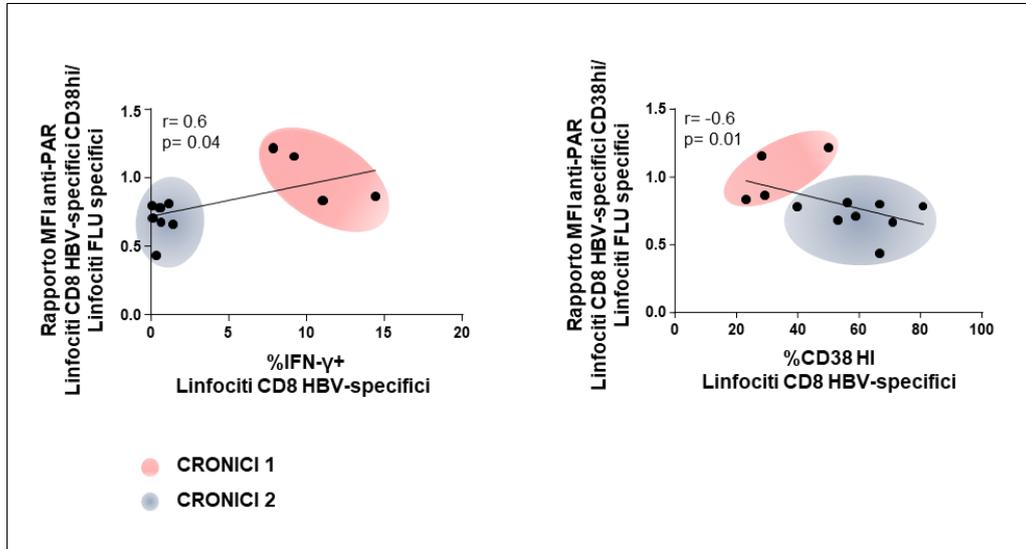
CD38 è un enzima noto per essere uno dei maggiori consumatori di NAD, seguito dagli enzimi poli-ADP-riboso-polimerasi (PARP) e dalle sirtuine (SIRT). Come anticipato nella sezione “Dati preliminari” è già stato dimostrato che nei linfociti HBV-specifici la formazione di polimeri di ADP-riboso (parilazione) risulta disfunzionale e che un breve trattamento con una molecola inibitoria del CD38 (CD38i) può in parte ripristinare questa risposta al danno del DNA<sup>184</sup>. Ci siamo quindi chiesti quali fossero i livelli di parilazione nei due sottogruppi individuati. Nel grafico (**Figura 21**) è mostrato per ogni campione il rapporto tra la mediana di intensità di fluorescenza (MFI) dell’anticorpo anti-PAR nei linfociti HBV-specifici CD38hi rispetto ai linfociti FLU-specifici degli stessi pazienti, e tale rapporto è risultato significativamente differente nei due sottogruppi. In particolare, i “CRONICI 1” hanno mostrato livelli di parilazione più alti rispetto ai “CRONICI 2”, indicando che lo stato di esaurimento è meno marcato nei pazienti che esprimono livelli più bassi di CD38.



**Figura 21:** Box plot che riportano il rapporto tra la mediana di intensità di fluorescenza (MFI) dell’anticorpo anti-PAR nei i linfociti HBV-specifici CD38hi rispetto ai linfociti FLU-specifici degli stessi pazienti (test Mann-Whitney).

Infine il rapporto MFI anti-PAR appena descritto mostra una correlazione diretta significativa con la produzione di IFN- $\gamma$  e inversa con la percentuale di CD38hi (**Figura 22**) confermando che i livelli di

CD38 nei linfociti HBV-specifici sono associati ai livelli di funzionalità antivirale e di risposta al danno del DNA.

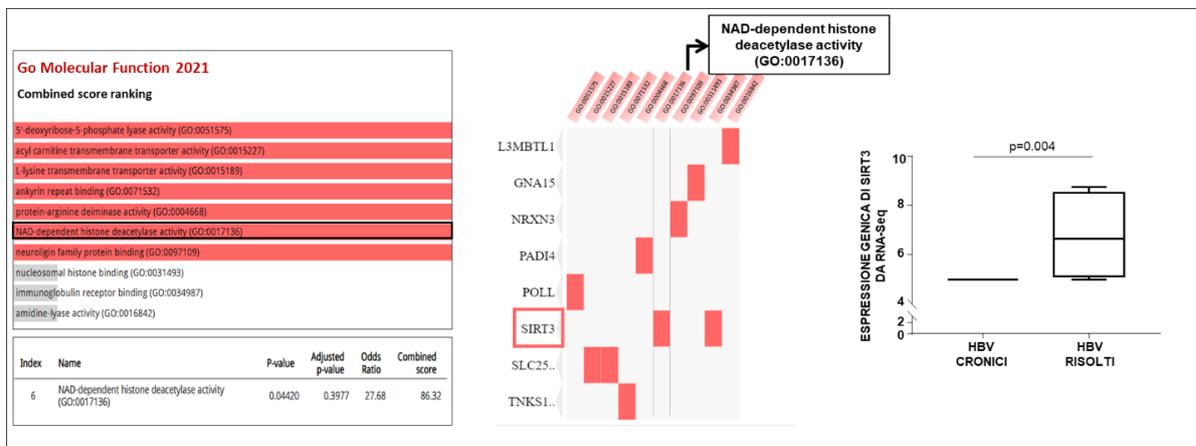


**Figura 22:** Correlazione tra il rapporto MFI anti-PAR linfociti HBV CD38hi/Linfociti FLU-specifici con la percentuale di IFN- $\gamma$  (sinistra) e con la percentuale CD38hi (destra) degli stessi linfociti HBV-specifici (coefficiente di correlazione di Spearman).

### 3. La Sirtuina 3 risulta *down-regolata* nei linfociti T HBV-specifici

Al fine di caratterizzare ulteriormente i linfociti T CD8 HBV-specifici di pazienti con epatite B cronica è stato eseguito uno studio di sequenziamento dell'RNA (RNA-seq). I linfociti HBV specifici per l'epitopo CORE 18-27 sono stati individuati mediante analisi citofluorimetrica e per ciascun campione sono state isolate 60 cellule mediante sorting elettrostatico. In seguito è stato utilizzato il kit SMART-Seq HT PLUS (Takara bio inc.) per generare librerie di cDNA da basse quantità iniziali di RNA per il successivo sequenziamento Illumina. Dall'analisi è emerso che diversi set di geni risultano differenzialmente espressi (*adjusted p value* < 0,1) nei linfociti dei pazienti cronici rispetto ai controlli guariti. Dall'analisi di arricchimento Gene Ontology (GO), eseguita mediante il software Enricher, è emerso che nei linfociti virus specifici diversi processi biologici risultano disfunzionali:

tra questi risulta down-regolata l'attività di istoni deacetilasi NAD-dipendenti (GO: 0017136), come le sirtuine. Tra i geni differenzialmente espressi, la Sirtuina 3 (SIRT3) è risultata significativamente *down*-regolata nei pazienti cronici, rispetto ai controlli guariti (**Figura 23**). La Sirtuina 3 è localizzata prevalentemente nel mitocondrio, protegge dallo stress ossidativo, dall'apoptosi ed è importante per il mantenimento della funzione mitocondriale<sup>185</sup>. Tra i bersagli della Sirtuina 3 troviamo infatti il fattore di trascrizione FOXO3α coinvolto nel metabolismo e nella risposta allo stress, e nell'inibizione dell'apoptosi regolata da Bax<sup>186</sup>. Per quanto riguarda i fattori che regolano l'espressione di *SIRT3* (gene che codifica per la Sirtuina 3), la Sirtuina 1 è nota per indurre la trascrizione tramite l'attivazione di PGC1α, sia direttamente che indirettamente attraverso Nrf2 e ERRA; pertanto, la *down*-regolazione di SIRT3 nei linfociti HBV-specifici può rappresentare un'ulteriore conseguenza della deplezione di NAD intracellulare, come precedentemente descritto<sup>187–189</sup>.

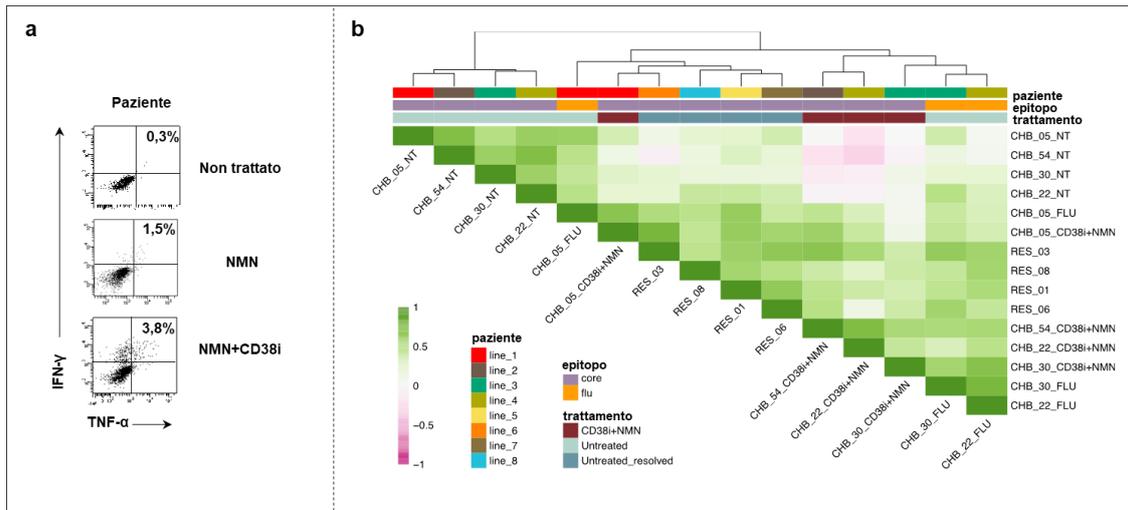


**Figura 23:** analisi di arricchimento Gene Ontology (GO) sui geni differenzialmente espressi (adjusted p value < 0,1). A sinistra è riportato il grafico a barre dei processi biologici risultati differenzialmente espressi rispetto ai controlli. Al centro gli stessi *pathway* e i relativi geni sono riportati in un grafico a *cluster*. A destra è riportata l'espressione di SIRT3 nei linfociti T HBV-specifici dei pazienti cronici a confronto con i controlli guariti (Mann-Whitney).

#### 4. Il trattamento con NMN+CD38i ripristina i linfociti HBV-specifici *exhausted* a livello trascrizionale

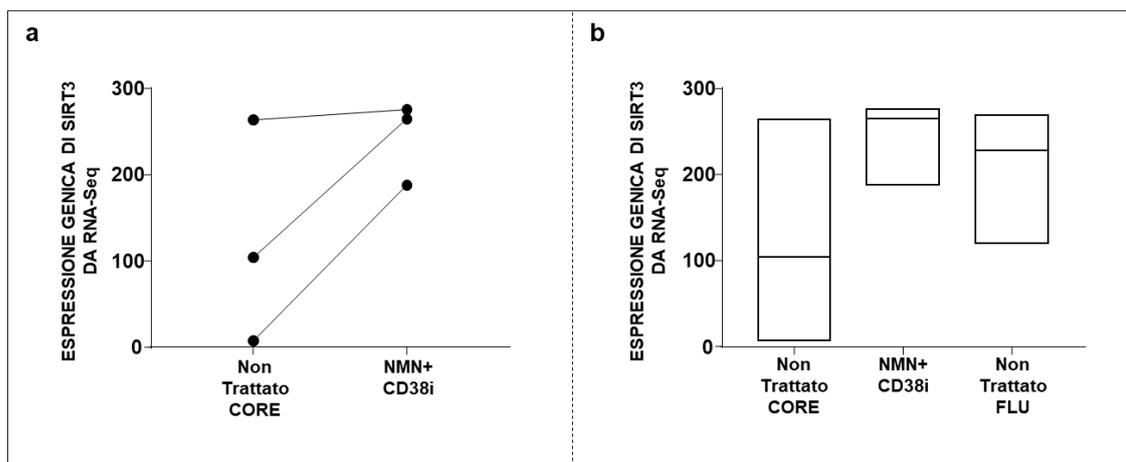
In seguito all'osservazione che la deplezione di NAD concorre alla disfunzione dei linfociti T, è stato testato l'effetto della supplementazione di nicotinamide mononucleotide (NMN)<sup>190</sup>, molecola precursore del NAD, nelle colture di linfociti isolati da pazienti con infezione cronica da HBV. In seguito al trattamento abbiamo precedentemente riscontrato un ripristino della funzione mitocondriale, proteasomale, dei meccanismi di risposta al danno del DNA e infine dell'attività linfocitaria antivirale. Per verificare la possibilità di migliorare ulteriormente la capacità di produrre citochine in risposta ad uno stimolo HBV specifico, abbiamo valutato l'efficacia dell'aggiunta dell'inibitore di CD38 (78c, CD38i) ad NMN (NMN+CD38i)<sup>191</sup>. Questo trattamento ha permesso di osservare un aumento nei livelli di proliferazione e una miglior produzione citochinica rispetto al trattamento singolo con NMN (Vedi Dati preliminari) (**Dot plots in Figura 24a**). Abbiamo quindi eseguito uno studio di sequenziamento dell'RNA in linfociti derivati da quattro pazienti coltivati *in vitro* e trattati con NMN+CD38i. Le PBMC sono state stimolate *in vitro* per 10 giorni con l'epitopo CORE 18-27 in presenza o assenza del trattamento o con l'epitopo FLU in assenza di trattamento, come termine di controllo. Come ulteriore controllo sono stati espansi *in vitro* allo stesso modo i linfociti HBV-specifici di quattro controlli guariti spontaneamente dall'infezione acuta. Tramite sorting abbiamo isolato le cellule virus-specifiche, abbiamo quindi estratto l'RNA e prodotto le librerie di cDNA mediante il kit SMART-Seq HT. L'*heatmap* in (**Figura 24b**) mostra la correlazione di Spearman tra i singoli campioni analizzati e il loro raggruppamento in base al grado di espressione dei geni differenzialmente espressi ( $|\log_2 \text{ fold change}| > 1$ , adjusted p-value < 0.1). È possibile osservare che i linfociti dei pazienti cronici specifici per l'epitopo CORE 18-27 non trattati (CHB NT) mostrano un indice di correlazione basso con i controlli, espansi *in vitro* nelle stesse condizioni, rappresentati sia dai linfociti influenza (FLU)-specifici degli stessi pazienti cronici (CHB FLU), sia dai linfociti HBV-specifici di pazienti che hanno risolto spontaneamente un'epatite B acuta (RES).

Invece in seguito a trattamento i linfociti dei pazienti cronici trattati (CHB CD38i+NMN) *clusterizzano* insieme ai controlli e mostrano un indice di correlazione negativo con i CHB NT. Questo indica che anche a livello trascrizionale il trattamento combinato NMN+CD38i induce un ripristino significativo nei linfociti CD8 virus-specifici dei pazienti cronici.



**Figura 24: (a)** Dot plots rappresentativi dell'incremento di produzione di IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  in campioni trattati con il solo NMN o con NMN+CD38i. **(b)** Heatmap che mostra il coefficiente di correlazione di Spearman delle linee di linfociti T generate dalla stimolazione peptidica in presenza/assenza di NMN+CD38i. Le cellule T HBV-specifiche non trattate di pazienti cronici (CHB NT) sono confrontate con campioni trattati (CHB CD38i+NMN), con cellule T FLU-specifiche non trattate degli stessi pazienti cronici (CHB FLU) e con cellule T HBV-specifiche di pazienti che hanno risolto spontaneamente un'infezione acuta (RES).

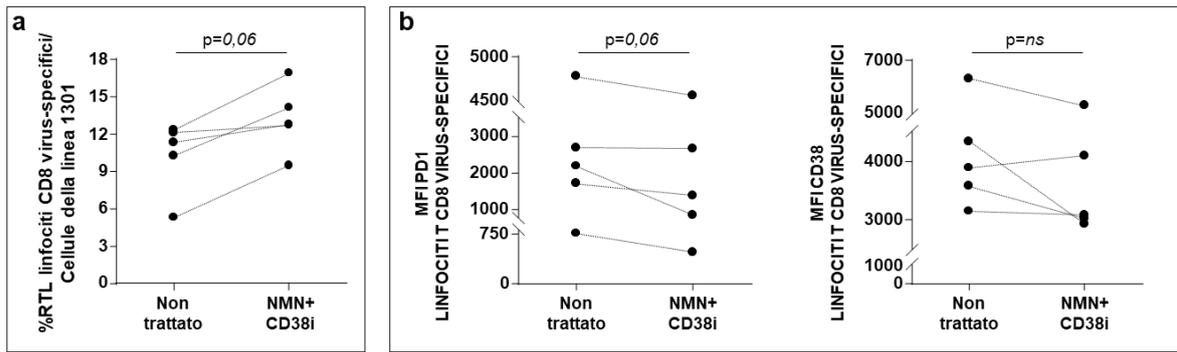
In particolare è interessante notare che nei campioni trattati l'espressione genica di *SIRT3* mostra un *trend* in aumento rispetto ai corrispondenti campioni non trattati (**Figura 25a**) e che i valori di espressione sono paragonabili a quelli riscontrati nei linfociti FLU-specifici degli stessi pazienti cronici (**Figura 25b**).



**Figura 25:** (a) Espressione genica di SIRT3 nei linfociti T CD8 HBV specifici stimolati *in vitro* per 10 giorni con l'epitopo CORE 18-27 in presenza o assenza di trattamento NMN+CD38i, mostrati come dati appaiati. (b) Box plot che mostrano l'espressione genica di SIRT3 nelle linee HBV-specifiche trattate o non trattate e nelle linee FLU-specifiche non trattate. Le analisi statistiche sono state eseguite applicando il test di Wilcoxon per dati appaiati.

## 5. Il trattamento *in vitro* con NMN+CD38i contrasta l'accorciamento dei telomeri e regola l'espressione di PD1 nei pazienti con epatite B cronica

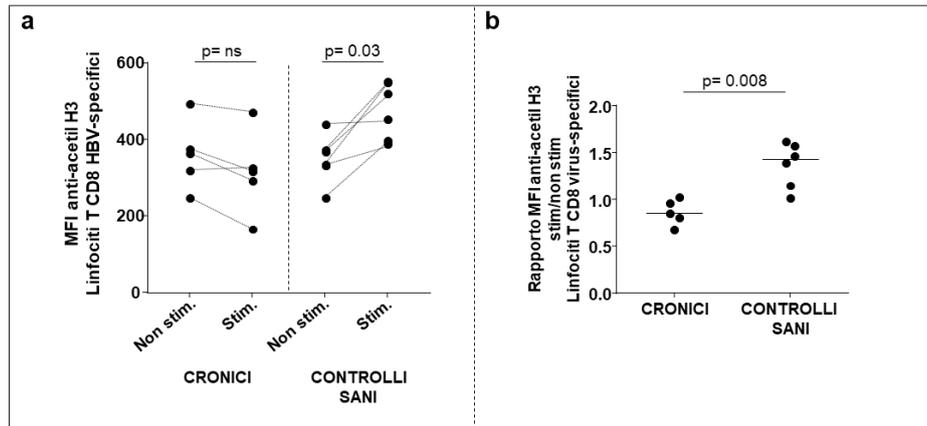
Abbiamo successivamente saggiato l'effetto del trattamento combinato NMN+CD38i sulla lunghezza dei telomeri e sull'espressione del CD38 e del PD1. In seguito all'espansione *in vitro* dei linfociti HBV-specifici di pazienti cronici in presenza o assenza di trattamento, la lunghezza dei telomeri è stata misurata tramite la tecnica FLOW-FISH; oltre alla marcatura di superficie con destrameri che permettono di identificare i linfociti virus-specifici, sono stati utilizzati anche gli anticorpi anti-CD38 e anti-PD1. È possibile osservare (**Figura 26a**) che in seguito a trattamento la lunghezza dei telomeri tende ad aumentare in tutti i campioni testati, e che l'espressione di PD1 risulta tendenzialmente inferiore rispetto ai corrispondenti campioni non trattati (**Figura 26b**), mentre CD38 in seguito a trattamento diminuisce in alcuni campioni, ma non in tutti. Questi dati indicano che il trattamento con NMN+CD38i è efficace per ripristinare la lunghezza dei telomeri e correggere l'espressione di PD1 nei linfociti T *exhausted* dei pazienti con epatite B cronica.



**Figura 26: (a)** Lunghezza dei telomeri in linfociti T CD8 HBV-specifici di pazienti cronici in presenza/assenza di NMN+CD38i 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). **(b)** Valori di MFI di PD1 (sinistra) e CD38 (destra) nei linfociti T CD8 HBV-specifici dei pazienti cronici in assenza o presenza del trattamento. La significatività statistica dei dati è stata analizzata applicando il test di Wilcoxon per dati appaiati.

## 6. Nei linfociti T CD8 *exhausted* dei pazienti con epatite B cronica l'acetilazione dell'istone H3 risulta disfunzionale

La deplezione di NAD può contribuire alla disfunzione di diversi meccanismi cellulari, tra cui anche il controllo epigenetico della trascrizione. Infatti un rapporto NAD/NADH ridotto può indurre la conversione preferenziale del piruvato in lattato e ridurre così i livelli di Acetil-CoA per l'acetilazione istonica, con conseguente silenziamento genico<sup>192</sup>. I meccanismi epigenetici hanno un ruolo importante nell'esaurimento funzionale linfocitario<sup>151</sup>, per questo abbiamo studiato i livelli di acetilazione dell'istone H3 nei linfociti T CD8 virus-specifici in corso di infezione cronica, a confronto con linfociti isolati da soggetti sani. Per farlo i linfociti sono stati marcati con l'anticorpo anti-acetil-H3 in seguito a incubazione *overnight* con o senza stimolo anti-CD3 e anti-CD28. In seguito a stimolazione è possibile osservare **(Figura 27a, 27b)** l'up-regolazione dell'acetilazione istonica nei linfociti FLU-specifici dei soggetti sani, ma non nei linfociti HBV-specifici dei pazienti cronici, rivelando così una scarsa capacità di acetilare gli istoni nei linfociti HBV-specifici *exhausted*.

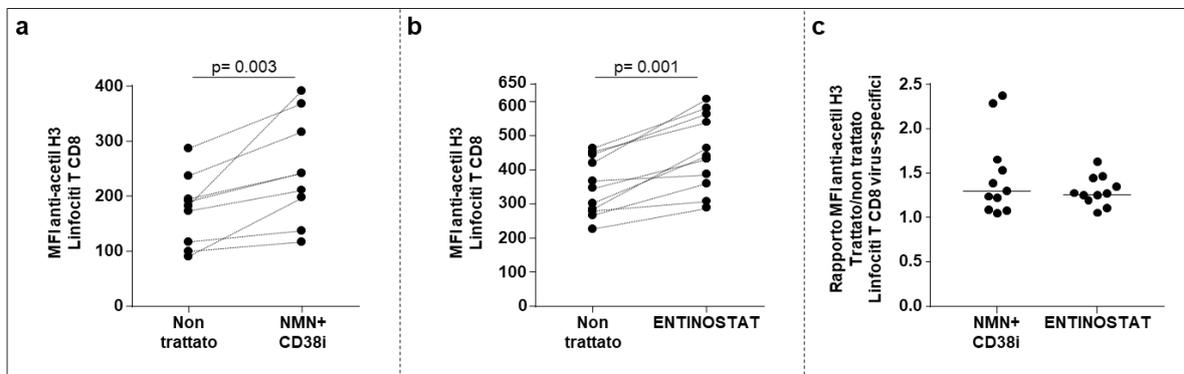


**Figura 27: (a)** Mediana di intensità di fluorescenza (MFI) dell'anticorpo anti-acetil-H3 in linfociti T CD8 HBV-specifici di pazienti cronici e FLU-specifici di soggetti sani mostrati come dati appaiati tra campioni stimolati e non stimolati in seguito a stimolo *overnight* con anti-CD3/CD28 (test di Wilcoxon per dati appaiati). **(b)** Valori di incremento di MFI di anti-acetyl-H3 in seguito a stimolo anti-CD3/CD28, calcolato come rapporto tra il valore nel campione stimolato/non stimolato (test di Mann-Whitney).

## 7. La supplementazione con NMN+CD38i, ed Entinostat ripristina i livelli di acetilazione istonica nei linfociti HBV-specifici

In seguito all'analisi dell'acetilazione dell'istone H3, sono stati testati diversi composti per ripristinare tale funzione. Abbiamo scelto di valutare l'effetto dell'NMN in associazione con il CD38i, e infine dell'Entinostat (ENT o MS-275) un inibitore delle istone deacetilasi di classe I (come HDAC1). Questo composto è stato scelto poiché nei linfociti HBV-specifici esauriti HDAC1 è risultato up-regolato<sup>114</sup>, e perché mostra un effetto immunomodulatorio sui linfociti T<sup>193</sup>. Le PBMC dei pazienti cronici sono state stimolate *in vitro* con una miscela di peptidi sintetici corrispondenti all'intera sequenza della proteina CORE di HBV e coltivate per 10 giorni in presenza o in assenza dei trattamenti. Entrambi i trattamenti scelti hanno permesso di osservare un incremento significativo dell'acetilazione dell'istone H3 nei linfociti T CD8 dei pazienti cronici (**Figura 28a, 28b**). Il trattamento con NMN+CD38i ripristina l'acetilazione in modo comparabile all'Entinostat (**Figura**

**28c).** Questo indica che l'eccessivo contenuto di ROS e la deplezione di NAD, hanno un ruolo importante nella regolazione epigenetica della trascrizione nei linfociti T HBV-specifici *exhausted*.

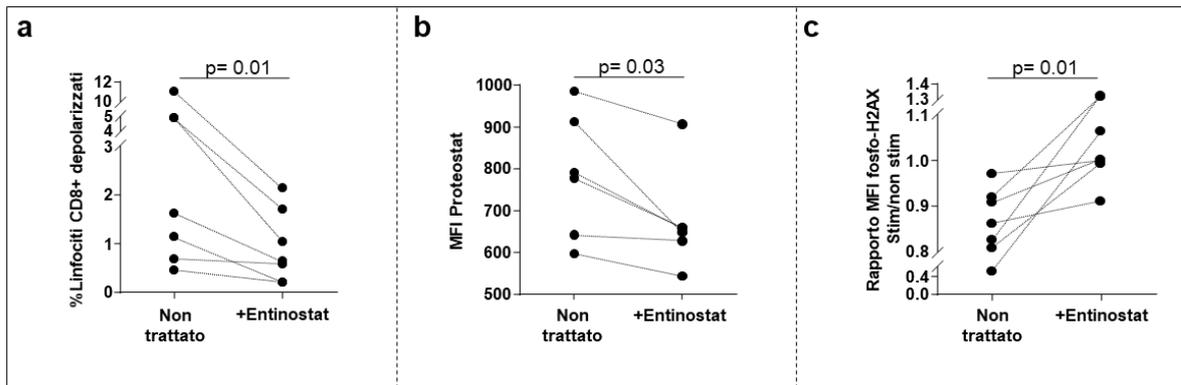


**Figura 28:** Acetilazione dell'istone H3 riportata come valore MFI dell'anticorpo anti-acetyl-H3, rilevata in colture non trattate e trattate, NMN+CD38i **(a)**, Entinostat **(b)**. Statistiche secondo test di Wilcoxon per dati appaiati. **(c)** Valori di incremento di MFI di anti-acetyl-H3 in seguito ad espansione *in vitro* con NMN+CD38i od Entinostat stimolo anti-CD3/CD28, calcolato come rapporto tra il valore nel campione stimolato / non stimolato (test di Mann-Whitney).

## 8. Il trattamento con Entinostat corregge le disfunzioni intracellulari e la funzionalità antivirale nei linfociti T HBV-specifici

I linfociti T *exhausted* presentano un profilo epigenetico alterato e capirne i meccanismi di regolazione può rivelare nuove opportunità terapeutiche. Per questo abbiamo deciso di testare la capacità dell'Entinostat nel ripristinare i *pathways* alterati, individuati con lo studio di trascrittomico<sup>114</sup> e la funzionalità antivirale nei linfociti T CD8 espansi *in vitro* in presenza o assenza di trattamento. Il trattamento con Entinostat ha ridotto la percentuale di linfociti con membrana mitocondriale depolarizzata **(Figura 29a)**. Tramite la sonda Proteostat, che lega gli aggregati proteici intracellulari, è possibile osservare una riduzione degli aggresomi intracellulari, ad indicare un miglioramento della funzionalità proteasomale **(Figura 29b)**. Infine per valutare la risposta al danno del DNA abbiamo misurato i livelli dell'istone H2AX fosforilato (fosfoH2AX) in seguito alla stimolazione dei linfociti<sup>194</sup>. Dopo 10 giorni di coltura le cellule sono state suddivise equamente in

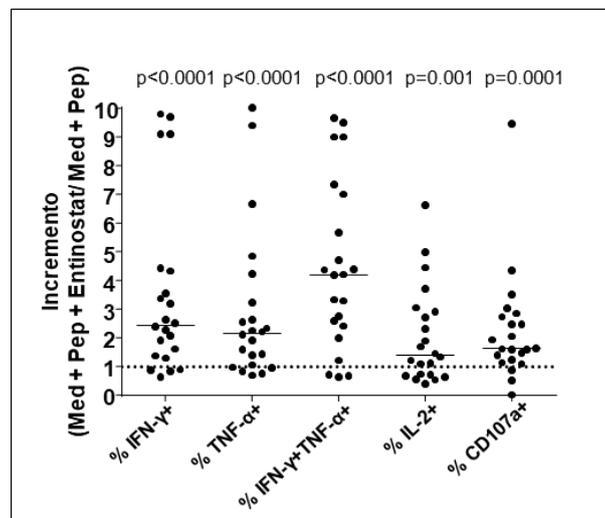
due parti, e soltanto una di queste è stata ri-stimolata per due ore con la miscela di peptidi della proteina CORE di HBV. L'incremento di fosfo-H2AX è espresso come rapporto tra la mediana dell'intensità di fluorescenza (MFI) dell'anticorpo nei campioni stimolati rispetto ai corrispondenti campioni non stimolati, ed è possibile apprezzare che la risposta al danno viene ripristinata in seguito al trattamento con Entinostat, in quanto il rapporto tra campione stimolato e non stimolato aumenta rispetto ai corrispondenti campioni non trattati (**Figura 29c**).



**Figura 29:** Effetto di Entinostat sulla funzionalità mitocondriale, la proteostasi e la risposta al danno del DNA in linfociti T CD8 di pazienti cronici espansi *in vitro* per 10 giorni in seguito a stimolazione con peptidi HBV, in assenza (non trattato) e in presenza di Entinostat (+Entinostat). **(a)** Percentuale di linfociti T CD8+ di pazienti cronici caratterizzati da depolarizzazione della membrana mitocondriale (valutata mediante marcatura con JC-1). **(b)** La variazione nella quantità di aggregati proteici intracellulari è stata misurata come mediana di intensità di fluorescenza (MFI) della sonda Proteostat. **(c)** La variazione di fosforilazione è espressa come rapporto tra la mediana dell'intensità di fluorescenza (MFI) dell'anticorpo anti-phospho-H2AX (Ser139) dei campioni ri-stimolati. Statistiche secondo test di Wilcoxon per dati appaiati. In basso, in ciascun pannello sono riportati esempi rappresentativi.

Per quanto riguarda la funzionalità antivirale, in seguito all'incubazione per dieci giorni con peptidi 15-meri corrispondenti all'intera proteina Core di HBV in assenza o presenza di trattamento, abbiamo testato la capacità di produrre citochine e l'up-regolazione di CD107a, come marcatore di citotossicità. Al decimo giorno le cellule sono state stimolate nuovamente con i peptidi HBV-specifici per 4 ore ed è stata eseguita la marcatura intracellulare delle citochine (ICS) prima

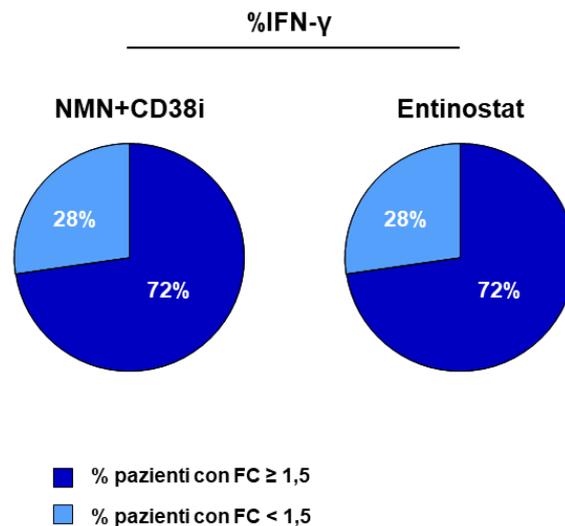
dell'analisi citofluorimetrica. Il grafico (**Figura 30**) riporta l'incremento della produzione citochinica da parte dei linfociti T CD8+, calcolato come rapporto tra la percentuale di cellule che esprimono IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ +TNF $\alpha$ , IL-2 e CD107a nei campioni trattati rispetto a quelli non trattati. Nelle colture trattate con Entinostat si è registrato un incremento significativo di produzione di citochine da parte dei linfociti CD8, con un incremento medio pari a 3,5- 2,9- 2,03- per IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL2 rispettivamente. Anche i linfociti CD8 positivi sia per IFN $\gamma$  che per TNF $\alpha$ , valutati come indice di polifunzionalità, aumentano significativamente in presenza del trattamento, con un incremento medio di 4,4 volte, come pure l'attività citotossica dei linfociti T CD8, misurata dalla up-regolazione di CD107a.



**Figura 30:** Recupero della risposta antivirale nei linfociti T CD8 di pazienti cronici in seguito a trattamento con Entinostat. Per ciascun campione è riportato l'incremento nei livelli di citochine e di CD107a nei linfociti T CD8, calcolato come rapporto tra la produzione di citochine rilevate nelle colture trattate, rispetto alle corrispondenti colture non trattate. Nei grafici è riportata la mediana corrispondente ai valori di incremento. L'analisi statistica è stata effettuata applicando il test dei ranghi di Wilcoxon, confrontando i valori di fold change con il valore teorico di 1, che indica assenza di effetto.

## 9. Confronto fra l'efficacia del trattamento con Entinostat e quella di NMN+CD38i

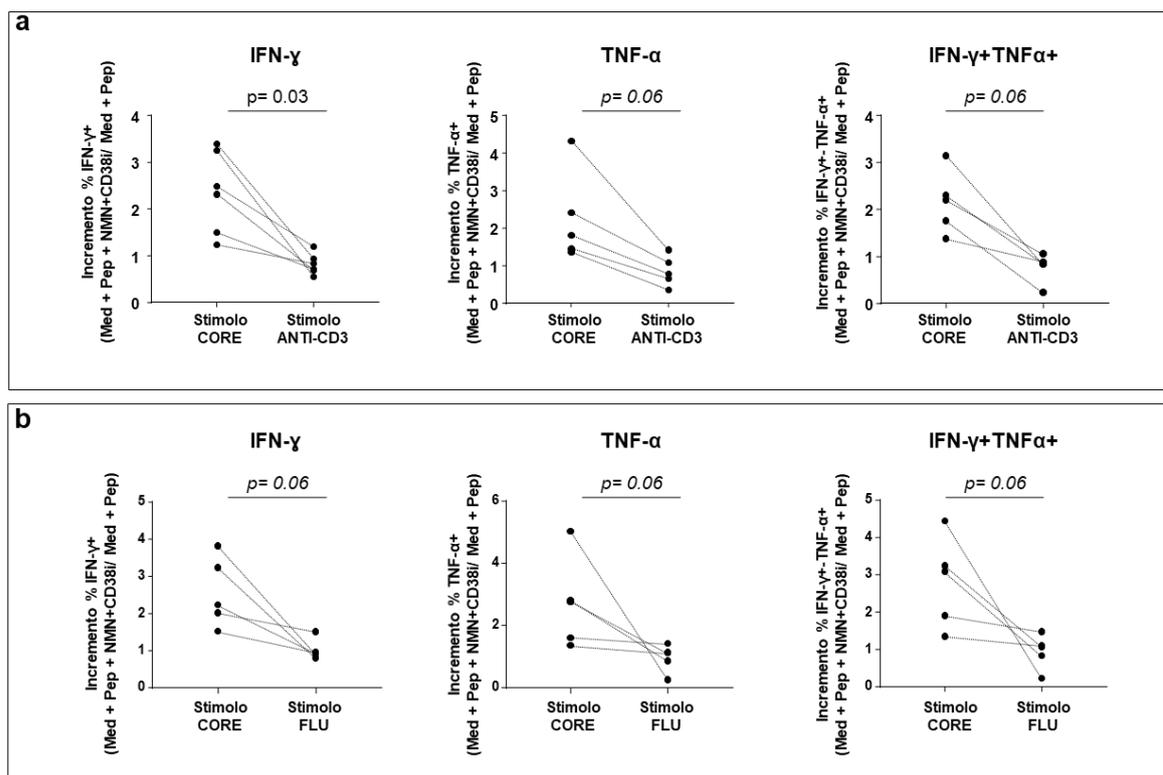
Ci siamo chiesti se i trattamenti con NMN+CD38i e con Entinostat siano confrontabili per il ripristino dell'attività antivirale. Le PBMCs di pazienti con epatite cronica sono state stimolate con peptidi sintetici corrispondenti alla proteina CORE di HBV, e coltivate *in vitro* per 10 giorni, in presenza o assenza di Entinostat o NMN+CD38i. Al decimo giorno di incubazione è stata valutata la produzione di citochine in risposta a stimolazione con i peptidi HBV-specifici, attraverso marcatura intracellulare delle citochine (ICS) e successiva analisi citofluorimetrica. Nella **Figura 31** è riportata la percentuale dei pazienti risultati responsivi ai trattamenti, selezionando i campioni che presentano valori di fold change  $\geq 1,5$  per la produzione di IFN- $\gamma$ . Si può osservare che la percentuale di pazienti responsivi al trattamento con NMN+CD38i (72%) è uguale alla percentuale di pazienti responsivi al trattamento con Entinostat (72%), indicando che l'efficacia dei due trattamenti è comparabile. La prospettiva futura è quella di identificare composti da proporre come *trials* clinici da soli o in combinazioni con altri farmaci, e poiché l'efficacia di NMN+CD38i è comparabile all'Entinostat, abbiamo scelto di approfondire lo studio dell'efficacia di NMN+CD38i in quanto ci aspettiamo minori effetti collaterali rispetto ad un farmaco epigenetico.



**Figura 31:** Percentuali di pazienti con infezione cronica, responsivi ai trattamenti con NMN+CD38i (a sinistra), ed Entinostat (a destra). La figura riporta le percentuali, calcolate sui linfociti T CD8+, di pazienti responsivi ai trattamenti, che presentano un valore di “fold change” (FC)  $\geq 1,5$  per la produzione di IFN $\gamma$ .

## 10. Specificità dell'efficacia dei trattamenti con NMN+CD38i

Con l'obiettivo di determinare se l'efficacia del trattamento con NMN+CD38i sia specifica per le cellule T CD8 HBV-specifiche *exhausted*, ne abbiamo valutato l'effetto sia sull'intera popolazione di linfociti T, stimolata globalmente mediante anticorpo anti-CD3, che sulla popolazione linfocitaria virus-specifica stimolata con peptidi HBV. Le cellule mononucleate isolate dal sangue periferico (PBMC) di 6 pazienti con infezione cronica sono state stimolate *in vitro* per 6 giorni con l'anticorpo anti-CD3 o con la miscela di peptidi sintetici corrispondenti alla proteina CORE di HBV, in presenza o assenza di trattamento NMN+CD38i. Abbiamo quindi quantificato la produzione di IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  da parte dei linfociti T CD8, mediante marcatura intracellulare delle citochine (ICS). Nei grafici l'incremento della produzione delle citochine è riportato come rapporto tra citochine prodotte nel campione trattato e campione non trattato. È possibile notare che l'effetto del trattamento è minimo sull'intera popolazione di linfociti T CD8 stimolata con l'anticorpo anti-CD3, mentre è molto più efficace sulla popolazione linfocitaria stimolata con peptidi HBV-specifici (**Figura 32a**). La specificità di risposta è stata valutata anche confrontando la produzione citochinica nei linfociti HBV-specifici rispetto ai linfociti FLU-specifici degli stessi pazienti. Si può osservare (**Figura 32b**) che il ripristino funzionale interessa in modo significativamente maggiore i linfociti HBV-specifici rispetto ai controlli FLU. Globalmente, i risultati dimostrano che il trattamento combinato è particolarmente efficace sui linfociti T *exhausted*, mentre il suo effetto si riduce in caso di cellule che mantengono la loro funzionalità antivirale.



**Figura 32:** Effetto del trattamento con NMN+CD38i sui linfociti T CD8+ stimolati *in vitro* per 10 giorni con peptidi HBV-specifici o anticorpo anti-CD3 **(a)** o con i peptidi HLA-A2 ristretti corrispondenti rispettivamente all'epitopo core 18-27 o alla influenza- (FLU) **(b)** in presenza o assenza di trattamento combinato NMN + inibitore CD38 (CD38i). I grafici rappresentano la produzione di INF $\gamma$  (a sinistra) e TNF $\alpha$  (al centro) e IFN $\gamma$ +TNF $\alpha$  (a destra) come rapporto tra campione trattato con NMN+CD38i e campione non trattato. Test di Wilcoxon per dati appaiati.

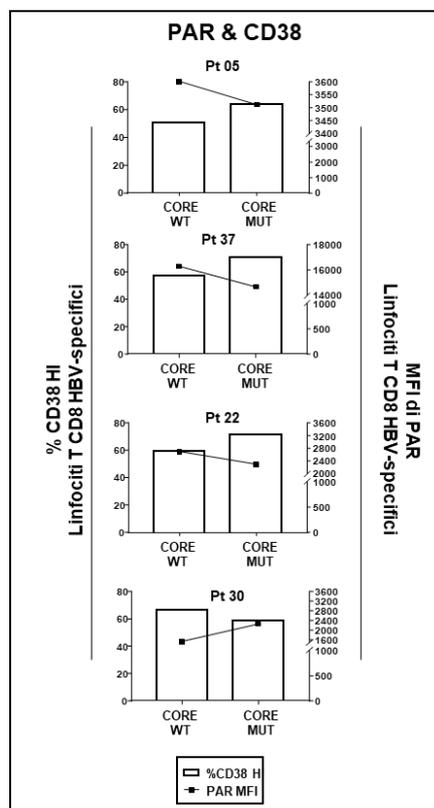
### 11. Studio dei meccanismi di risposta al danno del DNA e di ripristino funzionale nei linfociti T CD8 specifici per gli epitopi mutati CORE 18-27

Le mutazioni amminoacidiche nelle proteine di HBV possono essere causate dalle pressioni evolutive delle risposte immunitarie dell'ospite, dagli effetti di vaccini e farmaci, oltre che da una mancata attività di *proofreading* della DNA polimerasi virale<sup>6,195</sup>. L'impatto dell'evasione virale sul fenotipo delle cellule T virus-specifiche è stato ben documentato per l'HCV<sup>196,197</sup>, mentre è meno noto per l'infezione da HBV. La comprensione dell'impatto delle varianti di HBV costituisce una

risorsa importante per studiare l'evoluzione dell'infezione cronica da HBV, oltre che la risposta ai trattamenti. Specifiche mutazioni sono state associate alla resistenza ai farmaci antivirali, all'evasione immunitaria, allo sviluppo della fibrosi epatica e alla tumorigenesi. Per questo abbiamo deciso di studiare alcuni aspetti dell'*exhaustion* linfocitaria nei linfociti T CD8 HBV-specifici che riconoscono gli epitopi CORE 18-27 mutati. In particolare ci siamo focalizzati sulla risposta al danno del DNA, e sul ripristino della risposta antivirale in seguito al trattamento con NMN+CD38i. L'epitopo Core 18-27 di HBV è stato sequenziato in 10 pazienti HLA-A-02 positivi affetti da infezione cronica da HBV (**Tabella 1, Figura 38**), e per quattro pazienti sono stati prodotti complessi destramerici peptide-HLA di classe I corrispondenti all'epitopo CORE mutato (CORE MUT) e all'epitopo CORE *wild type* di genotipo D (CORE WT). Per la risposta al danno del DNA abbiamo valutato la parilazione, riportata come valore MFI, e la percentuale di CD38hi nei linfociti HBV-specifici per il CORE *wild type* e per il CORE mutato. Non abbiamo osservato una differenza significativa della parilazione nei linfociti HBV-specifici per il CORE mutato rispetto ai linfociti *wild type*. È interessante notare che la percentuale di CD38hi è più alta nei linfociti virus-specifici che presentano livelli di parilazione più bassi e viceversa, confermando il risultato esposto in precedenza secondo il quale i livelli di CD38 riflettono il grado di disfunzione di risposta al danno (**Figura 38**).

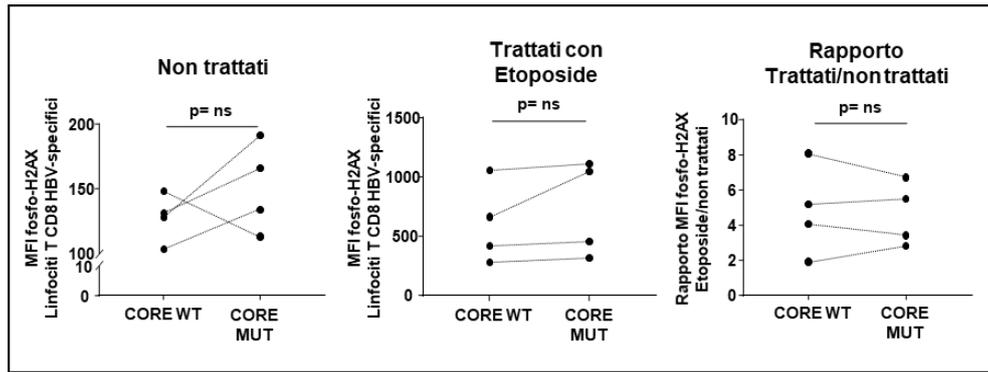
**Tabella 1**

Paziente	Genotipo	Peptide
Wilde Type	D	FLPSDFFFPSV
PT 37	D	FLP <u>Q</u> DFFFPSV
PT 05	D	FLP <u>I</u> DFFFPS <u>A</u>
PT 34	A	FLPN <u>D</u> FFPS <u>I</u>
PT 39	D	FLPN <u>D</u> FFPS <u>A</u>
PT 56	D	FLP <u>A</u> DFYPSV
PT 54	D	FLPSDFYPSV
PT 07	D	FLPSDFFP <u>P</u> V
PT 22	D	FLPSDFFP <u>A</u> V
PT 30	D	FLPSDFFFPS <u>I</u>
PT 63	D	FLPSDFFFPS <u>A</u>



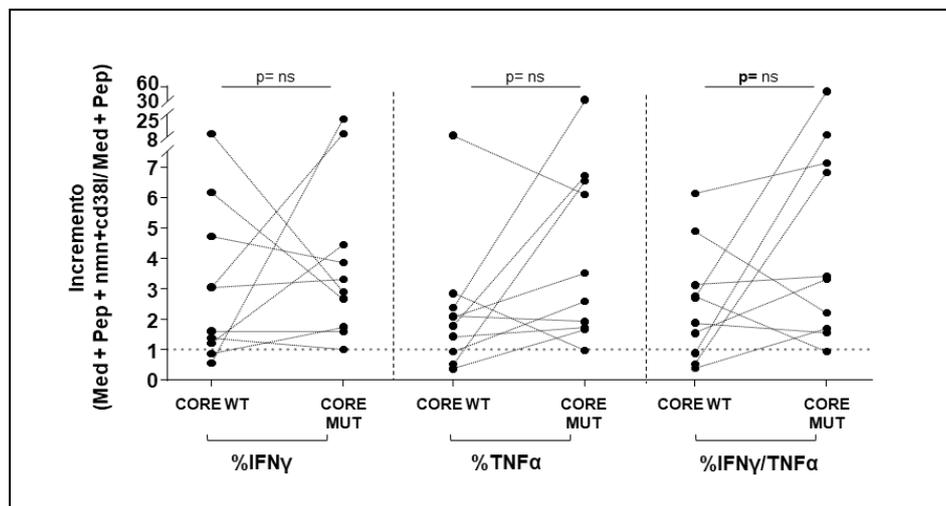
**Figura 38:** La tabella a sinistra mostra i pazienti in cui è stato rilevato nel siero l'epitopo mutato; la sequenza *wilde type* di riferimento è l'epitopo CORE 18-27 (genotipo D). Per ogni paziente sono riportati il genotipo e la sequenza con l'aminoacido mutato sottolineato. A sinistra sono riportati i grafici relativi ai livelli di parilazione, e la percentuale di linfociti con alti livelli di CD38. Quattro pazienti sono stati studiati con i complessi destramerici peptide-HLA di classe I corrispondenti agli epitopi HBV-core *wild-type* (WT) e mutati (MUT). I singoli grafici mostrano la percentuale di CD38hi (negli istogrammi) e l'MFI anti-PAR in cellule T CD8 specifiche per HBV CORE WT e CORE MUT di pazienti cronici.

Abbiamo poi valutato i livelli di fosfo-H2AX (Ser 139), espresso come valore MFI, in condizioni basali e in seguito a trattamento con l'inibitore della topoisomerasi II, etoposide, un agente genotossico che danneggia la doppia elica del DNA<sup>167</sup>. Anche in questo caso non abbiamo riscontrato differenze significative tra i linfociti HBV-specifici CORE *wild type* e CORE mutato (**Figura 39**).



**Figura 39:** MFI di fosfoH2AX nelle cellule CD8 non trattate (a sinistra), trattate con etoposide (al centro) e il rapporto tra MFI di fosfoH2AX nelle cellule trattate con etoposide e non trattate (a destra) in linfociti specifici per il CORE-WT rispetto a CORE MUT degli stessi pazienti cronici (test Wilcoxon per dati appaiati).

In seguito abbiamo valutato il ripristino della funzione linfocitaria previa espansione in linea delle PBMC di dieci pazienti, stimulate con gli epitopi CORE WT o gli epitopi CORE MUT in presenza o assenza di trattamento NMN+CD38i. È possibile osservare che il ripristino della funzione antivirale dopo il trattamento con NMN+CD38i interessa sia i linfociti che riconoscono gli epitopi mutati, sia i linfociti che riconoscono gli epitopi conservati, senza una differenza statisticamente significativa tra le due specificità (**Figura 40**).



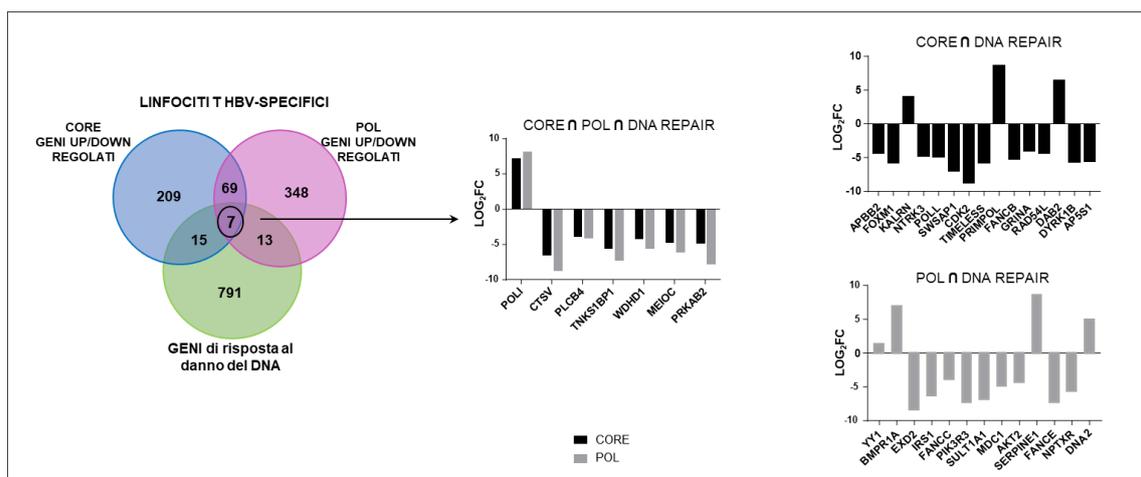
**Figura 40:** Le PBMC di pazienti con epatite B cronica sono state stimulate *in vitro* per 10 giorni con peptidi HBV CORE-WT o CORE-MUT in presenza/assenza di NMN+CD38i. I risultati sono espressi come incremento della produzione di IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ -TNF $\alpha$ , espresso come rapporto tra i campioni trattati e non trattati (test Wilcoxon per dati appaiati).

## **12. Confronto dei linfociti HBV-specifici per l'epitopo CORE 18-27 con i linfociti HBV-specifici per l'epitopo POL 455-463**

In corso di infezione cronica da HBV, è stato riportato che diversi livelli di esaurimento funzionale interessano i linfociti virus-specifici che riconoscono diversi epitopi virali, in particolare i linfociti CD8 specifici per l'epitopo della polimerasi virale 455-463 sono stati descritti come più profondamente esauriti rispetto a quelli che riconoscono l'epitopo core 18-27<sup>198</sup>. Abbiamo cercato di caratterizzare i linfociti CD8 HBV-specifici per l'epitopo POL 455-463 a confronto con i linfociti CORE 18-27-specifici. Mediante analisi citofluorimetrica abbiamo individuato le cellule virus-specifiche per gli epitopi CORE 18-27 e POL 455-463, e per ciascun paziente sono state isolate 60 cellule mediante sorting elettrostatico. Abbiamo quindi utilizzato il kit SMART-Seq HT PLUS (Takara bio inc.) per generare librerie di cDNA da basse quantità di RNA ("low input"), e sequenziare l'RNA dei linfociti virus-specifici. Come controllo sono stati sequenziati i linfociti virus-specifici, per entrambi gli epitopi, di pazienti guariti spontaneamente da un'infezione acuta. Per entrambe le specificità, sono stati individuati i geni differenzialmente espressi (adjusted p value < 0,1) nei linfociti dei pazienti cronici rispetto ai controlli guariti di cui è riportato il numero nel diagramma di Venn (**Figura 41**). Ci siamo focalizzati quindi sui geni che codificano per proteine che intervengono nella risposta al danno del DNA, e tra questi è stato possibile individuare sette geni che risultano up-regolati o down-regolati consensualmente sia nei linfociti HBV-specifici per il CORE che per la POL. Il grafico a barre (**Figura 41**) riporta il logaritmo in base due del rapporto tra l'espressione genica nei pazienti cronici rispetto ai relativi controlli guariti. È interessante notare che i geni individuati risultano prevalentemente down-regolati nei pazienti cronici rispetto ai controlli. Tra questi il gene *TNKS1BP1* codifica per una proteina che fa parte delle poli(ADP-ribosio) polimerasi (PARP), e svolge un ruolo centrale nella riparazione del danno del DNA, promuovendo l'associazione della proteina chinasi DNA-dipendente (DNA-PKcs) e PARP-1<sup>199</sup>; inoltre è coinvolta nel

mantenimento della lunghezza dei telomeri e nella regolazione della progressione mitotica<sup>200,201</sup>. Al contrario il gene *POLI* risulta up-regolato. Questo gene codifica per la DNA polimerasi iota (Pol  $\iota$ ), una polimerasi coinvolta nella sintesi del DNA translesionale(TLS). Dove sorgono delle lesioni del DNA, comunemente la replicazione si blocca. Pol  $\iota$  è una polimerasi specializzata che permette di superare questo blocco, incorporando nucleotidi opposti alle lesioni del DNA. Tuttavia questa polimerasi mostra una bassa precisione di sintesi del DNA e può introdurre mutazioni, perciò l'elevata attività di questo enzima è stata associata a una maggiore instabilità cromosomica<sup>202</sup>.

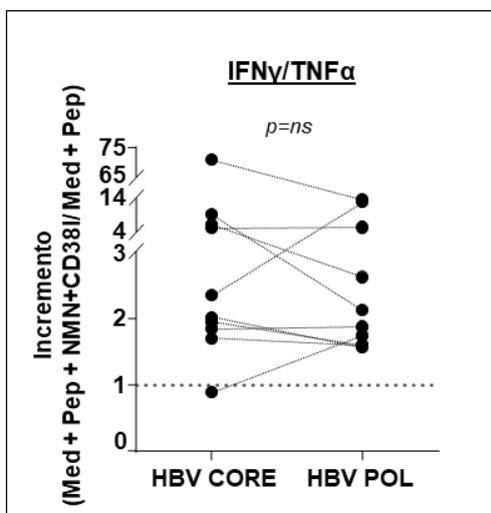
Complessivamente, linfociti CD8 specifici per entrambi gli epitopi virali esprimono un numero confrontabile di geni con espressione alterata (prevalentemente down-regolata) relativi alla funzione di risposta al danno del DNA, alcuni dei quali sono in comune.



**Figura 41:** A sinistra è riportato il diagramma di Venn dei geni differenzialmente espressi nei linfociti HBV-specifici per l'epitopo CORE (blu) e nei linfociti HBV-specifici per l'epitopo POL (rosa), intersecati con i geni relativi alla risposta al danno del DNA (verde). Al centro è riportato il grafico a barre di sette geni relativi alla risposta al danno del DNA, che risultano up-regolati o down-regolati nei linfociti HBV-specifici per il CORE e per la POL. È riportato il logaritmo in base due del rapporto tra l'espressione genica nei pazienti cronici rispetto ai relativi controlli guariti (Log<sub>2</sub>FC). In particolare il rapporto è stato calcolato tra la media dell'espressione genica di ciascun gene nei linfociti (CORE o POL) dei pazienti cronici rispetto ai linfociti dei controlli guariti. Nei controlli, per lo stesso gene abbiamo considerato i valori di espressione genica osservati nei linfociti CD8 CORE-specifici insieme ai valori relativi ai linfociti POL-specifici. A destra i grafici a barre rappresentano i

valori di Log2FC dei geni differenzialmente espressi che codificano per proteine della riparazione del danno del DNA, nei linfociti HBV CORE-specifici (in alto) e POL-specifici (in basso).

Infine abbiamo valutato il ripristino della funzionalità antivirale in seguito a stimolazione *in vitro* con i due epitopi virali, e anche con peptidi 15meri che ricoprono l'intera sequenza della proteina Core e Polimerasi di HBV in presenza e assenza di NMN+CD38i. In **Figura 42** è riportato l'incremento della percentuale di linfociti CD8 positivi per IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$ ; è possibile osservare che per ciascun paziente il ripristino linfocitario interessa entrambe le popolazioni linfocitarie. Possiamo concludere che: i) i linfociti T HBV-specifici per l'epitopo POL 455-463 mostrano un profilo trascrizionale alterato rispetto ai controlli guariti; ii) alcuni geni relativi al DNA repair sono alterati sia nei linfociti HBV-specifici per il CORE che per la POL, e risultano prevalentemente down-regolati iii) che il trattamento con NMN+CD38i risulta efficace per entrambe le popolazioni linfocitarie.



**Figura 42:** Incremento della produzione di IFN $\gamma$ -TNF $\alpha$  espresso come rapporto tra i campioni trattati e non trattati, nelle PBMC di pazienti con epatite B cronica, stimulate *in vitro* per 10 giorni con gli epitopi virali (HBV CORE 18-27 o POL 455-463) e anche con peptidi 15meri che ricoprono l'intera sequenza della proteina Core e Polimerasi di HBV, in presenza/assenza di NMN+CD38i.

## DISCUSSIONE

L'epatite B è un'infezione epatica potenzialmente letale causata dal virus dell'epatite B (HBV). Se contratta in età perinatale, l'infezione cronicizza nel 90% dei pazienti, ed è associata ad un elevato rischio di morte per cirrosi e cancro al fegato<sup>10</sup>. La terapia attualmente in uso con analoghi nucleos(t)idici (NUC) sopprime la replicazione virale in modo duraturo nella maggioranza dei pazienti trattati; tuttavia la riduzione dei livelli sierici di HBsAg è molto lenta e la sieroconversione anti-HBs (che corrisponde alla guarigione completa) avviene in una percentuale limitata di pazienti, quindi la terapia anti-virale deve essere somministrata per tutta la vita<sup>43</sup>. Per questo è urgente sviluppare nuove strategie terapeutiche, da affiancare ai NUC, per abbreviare la durata della terapia ed eradicare completamente il virus. In corso di infezione cronica da HBV le risposte T linfocitarie virus-specifiche risultano compromesse e si ritiene che questo contribuisca alla persistenza virale<sup>131</sup>. L'esposizione cronica ad alte concentrazioni virali e antigeniche rappresenta la causa principale della perdita progressiva e gerarchica delle funzioni antivirali e della morte per apoptosi. Tale fenomeno di compromissione funzionale è noto anche come "exhaustion"<sup>164</sup>. La conoscenza approfondita dei meccanismi sottostanti l'*exhaustion* linfocitaria è essenziale per potere sviluppare strategie immunoterapeutiche per il trattamento dei pazienti con infezione cronica. Studi sperimentali in modelli animali di infezione cronica hanno permesso di identificare il ruolo di recettori inibitori, tra cui il recettore co-inibitorio PD-1, e di conseguenza il blocco di questi come strategia per il ripristino immunitario<sup>203</sup>. Anche nei pazienti con epatite B cronica è stato osservato un certo livello di recupero funzionale dei linfociti T virus-specifici in seguito a blocco del signaling inibitorio PD1/PDL1, ma si tratta di un miglioramento parziale, che si verifica solo in una frazione di pazienti<sup>165</sup>. Uno studio di analisi trascrizionale, svolto negli anni scorsi presso il Laboratorio di Immunopatologia Virale dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma, ha permesso di individuare i *pathways* disfunzionali nei linfociti T CD8 HBV-specifici *exhausted* isolati da pazienti con infezione cronica attiva da HBV. I geni più significativamente *down*-regolati sono risultati essere

quelli coinvolti nei processi mitocondriali, nella regolazione del proteasoma, nei sistemi di riparazione del DNA e nella trascrizione genica. Inoltre è stata osservata l'up-regolazione di enzimi repressori della trascrizione, tra cui l'istone deacetilasi 1 (HDAC1)<sup>114</sup>. Gli esperimenti hanno poi evidenziato un'eccessiva produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) a livello mitocondriale e un accumulo di aggregati proteici dovuto ad una riduzione della proteostasi cellulare<sup>114</sup>. Sebbene livelli moderati di ROS siano necessari per la corretta regolazione dei linfociti T, un eccessivo accumulo di ROS può causare gravi danni ossidativi, soprattutto a carico del DNA<sup>204</sup>. Infatti nei linfociti T CD8 *exhausted*, è stato precedentemente osservato un aumento significativo della fosforilazione della serina 139 dell'istone H2AX (fosfoH2AX), un marcatore che riflette la presenza di rotture della doppia elica del DNA<sup>166,205</sup>. Al contrario, in seguito all'induzione esogena del danno con etoposide, i livelli di fosfoH2AX risultavano ridotti rispetto ai linfociti influenza-specifici dei controlli sani o degli stessi pazienti cronici, dimostrando da una parte un alto livello basale di danno al DNA, dall'altra una scarsa efficienza dei meccanismi di riparazione. I dati preliminari mostravano anche una ridotta attività degli enzimi della famiglia poli-(ADP-ribosio) polimerasi (PARP), enzimi che utilizzano nicotinamide adenina dinucleotide (NAD) come substrato per formare i monomeri di APD-ribosio in prossimità del sito di danno alla doppia elica e quindi reclutare diversi fattori di riparazione del DNA (parilazione)<sup>206</sup>. È interessante sottolineare che la parilazione è necessaria anche per attivare efficacemente la chinasi ATM che a sua volta fosforila H2AX in seguito a danno della doppia elica del DNA<sup>207</sup>.

Lo stress ossidativo dovuto alla disfunzione mitocondriale e l'alterazione dei meccanismi di riparazione del DNA sono stati osservati anche in alcune patologie genetiche e sono correlate alla deplezione di NAD e alla precoce senescenza cellulare. Infatti, l'incremento del danno del DNA, può determinare l'iperattivazione di PARP, e questo può portare ad un consumo eccessivo di NAD<sup>174,208,209</sup>. Per questo si è ipotizzato che le disfunzioni precedentemente osservate nei linfociti T *exhausted* in corso di infezione cronica fossero una conseguenza della carenza di NAD. Non è stato possibile determinare direttamente il consumo cellulare di NAD in quanto le tecniche attualmente

disponibili necessitano della disponibilità di un elevato numero di cellule, mentre i linfociti HBV-specifici sono presenti in frequenza estremamente bassa nel sangue periferico dei pazienti con infezione cronica. Si sono quindi raccolte evidenze indirette della carenza di NAD, come l'osservazione in seguito a trattamento con NAD esogeno, di un miglioramento significativo della parilazione nei linfociti T CD8 HBV-specifici dei pazienti cronici, oltre ad un miglioramento della funzionalità antivirale.

Anche l'espressione di CD38, risultata up-regolata nei linfociti T CD8 HBV-specifici, rimanda ad un aumentato consumo di NAD. CD38 è un ectoenzima multifunzionale presente sulla membrana plasmatica e a livello degli organelli intracellulari, espresso in risposta alla stimolazione di citochine, endotossine e interferone<sup>210</sup>. Uno studio *in vivo* ha dimostrato che il CD38 è il maggiore consumatore di NAD all'interno della cellula, seguito dagli enzimi PARP e dalle Sirtuine (Sirt)<sup>169,176</sup>, e la sua up-regolazione e l'eccessivo consumo di NAD che ne consegue sono stati associati alla disfunzione mitocondriale e all'invecchiamento cellulare<sup>210</sup>.

La senescenza cellulare è tipicamente associata all'accorciamento di telomeri<sup>211</sup>. Tramite la tecnica Flow-FISH<sup>179</sup>, è stato possibile osservare un significativo accorciamento dei telomeri nei linfociti T HBV-specifici rispetto ai linfociti specifici per l'influenza degli stessi pazienti cronici. Questo è in linea con i dati di trascrittomiche che riportano la down-regolazione del gene che codifica per TERF2IP (*telomeric-repeat-binding-factor 2-interacting protein*) una proteina che svolge un ruolo chiave nell'attività protettiva dei telomeri, ed è in accordo con i dati di letteratura che descrivono la suscettibilità dei telomeri allo stress ossidativo<sup>212</sup>. In questo lavoro abbiamo confermato un ruolo dei ROS nell'accorciamento dei telomeri in quanto il trattamento con antiossidanti ne contrasta l'accorciamento. In base a queste osservazioni l'*exhaustion* T linfocitaria presenta quindi caratteristiche in comune con la senescenza cellulare e risulta fortemente associata ai livelli di espressione di CD38. Infatti, abbiamo osservato che l'espressione di CD38 correla direttamente con quella del recettore co-inibitorio PD1, e inversamente con la capacità antivirale, valutata in termini di produzione di IFN- $\gamma$ . Inoltre i linfociti che esprimono alti livelli di CD38 mostrano un difetto più

marcato della parilazione, suggerendo che l'elevata attività NADasica di CD38 possa compromettere i meccanismi di riparazione del danno del DNA. Questa correlazione è in linea anche con uno studio condotto *in vivo* che riporta livelli di parilazione più alti in topi knock-out per CD38 rispetto ai topi wild type<sup>213</sup>. Inoltre diversi studi nel campo delle infezioni croniche o del cancro, confermano l'over-espressione di CD38 in associazione all'*exhaustion* linfocitaria<sup>171,180</sup>, oltre ad alterazioni dell'omeostasi mitocondriale e della risposta al danno del DNA<sup>214</sup>. E' stato riportato anche che l'over-espressione di CD38 comporta la soppressione della fosforilazione ossidativa a favore del metabolismo glicolitico, induce l'apoptosi e comporta una sensibilità più elevata allo stress ossidativo a causa di una minore espressione di trascritti, e quindi proteine, con funzione antiossidante e di risposta al danno del DNA<sup>113,214,215</sup>.

Tra gli enzimi che consumano NAD rientrano anche le Sirtuine, istone deacetilasi NAD-dipendenti di classe III. Attualmente, sono state descritte nell'uomo sette sirtuine, che svolgono diverse funzioni all'interno della cellula tra cui la regolazione della trascrizione genica, la riparazione del DNA e la protezione contro il danno ossidativo<sup>216</sup>. La sirtuina 1 (SIRT1) è quella maggiormente descritta nel contesto della regolazione immunitaria contro varie infezioni, ed è ampiamente coinvolta nella regolazione della senescenza cellulare grazie alla regolazione di diversi substrati. Tra questi rientra anche PGC-1 $\alpha$ , un co-attivatore trascrizionale che regola la biogenesi mitocondriale e attiva la trascrizione della sirtuina 3 (SIRT3), a sua volta importantissima per la regolazione dei processi metabolici a livello mitocondriale<sup>185,189,217</sup>. È interessante notare che dai dati di RNA-Seq il trascritto della sirtuina 3 (SIRT3) risulta significativamente *down-regolato* nelle cellule T CD8 HBV-specifiche. Si può quindi ipotizzare che la riduzione di NAD non permetta il corretto funzionamento di SIRT1 e che questo comporti un'espressione alterata di SIRT3, con conseguenze sulla funzionalità mitocondriale e sulla risposta allo stress ossidativo.

La deplezione di NAD oltre a compromettere l'attività degli enzimi NAD-dipendenti può poi contribuire alla disfunzione di diversi meccanismi cellulari, tra cui anche il controllo epigenetico della trascrizione. Le cellule T *exhausted* mostrano un profilo epigenetico unico, riscontrato in corso

di diverse infezioni croniche tra cui quella da HIV e da virus della Coriomeningite Linfocitaria murina (LCMV)<sup>218</sup>. In particolare nel modello animale è stato dimostrato che l'incapacità di produrre IFN $\gamma$  e IL-2 da parte dei linfociti T CD8 *exhausted* è correlata a un basso livello di acetilazione dell'istone H3<sup>219</sup>. In linea con tali risultati, anche il presente studio ha confermato una scarsa acetilazione dell'istone H3 nei linfociti T CD8 HBV-specifici dei pazienti cronici. Infatti un rapporto NAD/NADH ridotto può indurre la conversione preferenziale del piruvato in lattato e ridurre così i livelli di Acetil-CoA per l'acetilazione istonica, con conseguente silenziamento genico<sup>192</sup>.

In precedenza, abbiamo potuto osservare un certo livello di correzione della disfunzione T linfocitaria grazie alla somministrazione *in vitro* del precursore del NAD nicotinamide mononucleotide (NMN). Inoltre, per modulare l'attività di CD38 abbiamo testato l'effetto *in vitro* di una piccola molecola inibitoria, il 78c (o CD38i), disegnata per terapie mirate alla ricostituzione del pool cellulare di NAD e con un buon profilo farmacocinetico per la somministrazione orale<sup>184</sup>. Un breve trattamento con questo composto ha permesso di osservare un miglioramento significativo dei livelli di parilazione, potenziando la funzionalità T linfocitaria antivirale nelle cellule che avevano risposto debolmente al singolo trattamento con nicotinammide-mononucleotide. Inoltre, il trattamento combinato di NMN+CD38i ha permesso di osservare un ripristino della lunghezza dei telomeri nei linfociti T CD8 HBV-specifici dei pazienti cronici. Grazie a uno studio di sequenziamento dell'RNA (RNA-Seq) è emerso inoltre che i linfociti HBV-specifici trattati con NMN+CD38i mostrano un generale recupero a livello trascrizionale e un indice di correlazione positivo con linfociti funzionali di controllo FLU-specifici o isolati da pazienti guariti spontaneamente da infezione acuta da HBV.

Tale trattamento ha permesso anche il ripristino dei livelli di acetilazione dell'istone H3, con efficacia paragonabile a quella di un farmaco epigenetico inibitore delle deacetilasi nel ripristinare sia l'acetilazione istonica sia la funzionalità antivirale dei linfociti T HBV-specifici. Infatti, considerata l'up-regolazione dell'istone deacetilasi 1 (HDAC1), abbiamo testato anche l'effetto della somministrazione *in vitro* dell'Entinostat (MS-275), un composto che inibisce selettivamente le

HDAC di classe I, e in particolare HDAC1<sup>220</sup>. In diversi modelli di tumore il trattamento con Entinostat migliora la risposta immunitaria potenziando la risposta T citotossica e compromettendo l'accumulo e la funzionalità di cellule soppressorie come le cellule T regolatorie (Treg) e le cellule di derivazione mieloide (MDSC)<sup>221-223</sup>. I dati da trial clinici di fase II riportano che gli inibitori delle HDAC sono ben tollerati e con buoni profili di tossicità rispetto alle attuali terapie antitumorali; tuttavia sono riportati diversi effetti collaterali quali affaticamento, nausea, disidratazione, diarrea, trombocitopenia, linfopenia e neutropenia<sup>224,225</sup>. Inoltre la modulazione delle HDAC di classe I non ha un effetto selettivo sull'acetilazione dell'istone H3 dal momento che interferisce anche con proteine non istoniche<sup>226</sup>. Abbiamo quindi scelto di approfondire lo studio dell'efficacia di NMN+CD38i in quanto, nella prospettiva di un potenziale futuro trattamento *in vivo*, ci aspettiamo minori effetti collaterali rispetto ad un farmaco epigenetico.

Abbiamo osservato che il trattamento con NMN+CD38i ripristina la funzionalità linfocitaria anche nei linfociti T CD8 che riconoscono epitopi virali diversi da CORE 18-27, quali epitopi CORE mutati ed epitopi della polimerasi virale. La comprensione dell'impatto delle varianti di HBV costituisce una risorsa importante per studiare l'evoluzione dell'infezione cronica, oltre che la risposta ai trattamenti, poiché specifiche mutazioni sono state associate alla resistenza ai farmaci antivirali, all'evasione immunitaria, allo sviluppo della fibrosi epatica e alla tumorigenesi<sup>227</sup>. Nell'epatite B, la comparsa di mutazioni virali è stata segnalata per la prima volta molti anni fa nell'epitopo immunodominante CORE 18-27 con restrizione HLA-A-02<sup>228</sup>. In questo studio è stato messo in luce che linfociti che riconoscono epitopi CORE 18-27 mutati mostrano alterazione nella riparazione del danno del DNA, quali parilazione e fosforilazione dell'istone H2AX, come riscontrato per i linfociti *exhausted* che riconoscono la sequenza *wild type*.

Per quanto riguarda i linfociti che riconoscono l'epitopo della polimerasi virale 455-463, sono stati descritti in letteratura come più profondamente *exhausted* rispetto a quelli che riconoscono l'epitopo CORE 18-27<sup>229</sup>. Quindi si ritiene che il ripristino della risposta dei linfociti T CD8 specifici per la polimerasi costituisca un nuovo e valido approccio per la cura dell'infezione da HBV<sup>230</sup>. Nel

nostro laboratorio abbiamo iniziato a caratterizzare in modo più approfondito la popolazione dei linfociti T specifici per la polimerasi tramite esperimenti di RNA-Seq. I dati che abbiamo osservato mostrano un profilo trascrizionale alterato rispetto ai linfociti di pazienti guariti da un'infezione acuta, e la prevalente *down*-regolazione di geni che codificano per proteine coinvolte nella riparazione del danno del DNA. Tra questi è emerso che sette geni risultano up-regolati o down-regolati consensualmente sia nei linfociti HBV-specifici per il CORE che per la polimerasi. Tra questi, di particolare interesse è il gene *TNKS1BP1* che codifica per una proteina che fa parte delle poli(ADP-ribosio) polimerasi (PARP), e svolge un ruolo centrale nella riparazione del danno del DNA, promuovendo l'associazione della proteina chinasi DNA-dipendente (DNA-PKcs) e PARP-1<sup>199</sup>; inoltre è coinvolta nel mantenimento della lunghezza dei telomeri e nella regolazione della progressione mitotica<sup>200,201</sup>.

In conclusione, la presente tesi ha permesso di approfondire ulteriormente la conoscenza dei meccanismi alla base dell'*exhaustion* linfocitaria. Le diverse disfunzioni cellulari, incluso l'accorciamento dei telomeri e la ridotta proliferazione, risultano interconnesse e correlate all'esaurimento del NAD, suggerendo una somiglianza fenotipica tra *exhaustion* dei linfociti T e senescenza cellulare. La carenza di NAD, oltre a compromettere la funzione degli enzimi NAD-dipendenti, può ridurre anche la disponibilità di Acetil-CoA per l'acetilazione istonica, portando alla condensazione della cromatina e quindi al silenziamento genico. Tra i responsabili della deplezione di NAD abbiamo identificato l'enzima CD38, la cui over-espressione in corso di infezione cronica è associata ad *exhaustion* dei linfociti virus-specifici. L'identificazione dei meccanismi deregolati ci ha permesso di identificare strategie mirate al recupero delle funzioni antivirali. Nello specifico, la correzione delle funzioni intracellulari deregolate mediante la supplementazione di NAD in associazione all'inibizione di CD38 è stata in grado di ripristinare la funzionalità antivirale dei linfociti T CD8 antivirali indipendentemente dall'epitopo riconosciuto e anche in caso di mutanti virali. Tale trattamento rappresenta quindi una potenziale strategia terapeutica per un'immunoterapia finalizzata alla cura dell'infezione cronica da HBV.

## BIBLIOGRAFIA

1. Seeger, C. & Mason, W. S. Molecular biology of hepatitis B virus infection. *Virology* **479–480**, 672–686 (2015).
2. Sunbul, M. Hepatitis B virus genotypes : Global distribution and clinical importance. **20**, 5427–5434 (2014).
3. Tsukuda, S. & Watashi, K. Hepatitis B virus biology and life cycle. *Antiviral Res.* **182**, 104925 (2020).
4. Slagle, B. L. & Bouchard, M. J. Hepatitis B Virus X and Regulation of Viral Gene Expression. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **6**, a021402 (2016).
5. Yan, H. *et al.* Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *Elife* **2012**, 1–28 (2012).
6. Karayiannis, P. Hepatitis B virus: virology, molecular biology, life cycle and intrahepatic spread. *Hepatol. Int.* **11**, 500–508 (2017).
7. Pollicino, T. & Caminiti, G. HBV-Integration Studies in the Clinic: Role in the Natural History of Infection. *Viruses* **13**, (2021).
8. Rivière, L., Ducroux, A. & Buendia, M. A. The Oncogenic Role of Hepatitis B Virus. in *Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progres dans les recherches sur le cancer* vol. 193 59–74 (2014).
9. 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).
10. *Global progress report on HIV , viral hepatitis and sexually transmitted infections , 2021.* (2021).

11. Nguyen, M. H., Wong, G., Gane, E., Kao, J.-H. & Dusheiko, G. Hepatitis B Virus: Advances in Prevention, Diagnosis, and Therapy. *Clin. Microbiol. Rev.* **33**, (2020).
12. Iqbal, K. *et al.* Epidemiology of Acute Hepatitis B in the United States From Population-Based Surveillance, 2006–2011. *Clin. Infect. Dis.* **61**, 584–592 (2015).
13. Kew, M. C. Épidémiologie de l'hépatite B, du carcinome hépatocellulaire et du carcinome hépatocellulaire lié au virus de l'hépatite B. *Pathol. Biol.* **58**, 273–277 (2010).
14. Shi, Y. H. & Shi, C. H. Molecular characteristics and stages of chronic hepatitis B virus infection. *World J. Gastroenterol.* **15**, 3099–3105 (2009).
15. Franco, E., Meleleo, C., Serino, L., Sorbara, D. & Zaratti, L. Hepatitis A: Epidemiology and prevention in developing countries. *World J. Hepatol.* **4**, 68–73 (2012).
16. Liaw, Y.-F. Natural History of Chronic Hepatitis B Virus Infection. in *Viral Hepatitis* 143–153 (John Wiley & Sons, Ltd, 2013). doi:10.1002/9781118637272.ch10.
17. 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).
18. Kramvis, A. *et al.* A roadmap for serum biomarkers for hepatitis B virus: current status and future outlook. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **0123456789**, (2022).
19. Vachon, A. & Osioy, C. Novel Biomarkers of Hepatitis B Virus and Their Use in Chronic Hepatitis B Patient Management. *Viruses* **13**, 951 (2021).
20. Butler, E. K. *et al.* Hepatitis B Virus Serum DNA and RNA Levels in Nucleos(t)ide Analog-Treated or Untreated Patients During Chronic and Acute Infection. *Hepatology* **68**, 2106–2117 (2018).
21. van Campenhout, M. J. H. *et al.* Host and viral factors associated with serum hepatitis B virus RNA levels among patients in need for treatment. *Hepatology* **68**, 839–847 (2018).

22. 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).
23. Fan, R. *et al.* Association Between Negative Results From Tests for HBV DNA and RNA and Durability of Response After Discontinuation of Nucleos(t)ide Analogue Therapy. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **18**, 719-727.e7 (2020).
24. 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).
25. 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).
26. Maasoumy, B. *et al.* Hepatitis B core-related antigen (HBcrAg) levels in the natural history of hepatitis B virus infection in a large European cohort predominantly infected with genotypes A and D. *Clin. Microbiol. Infect.* **21**, 606.e1-606.e10 (2015).
27. Wong, G. L.-H., Wong, V. W.-S. & Chan, H. L.-Y. Virus and Host Testing to Manage Chronic Hepatitis B. *Clin. Infect. Dis.* **62**, S298–S305 (2016).
28. Zhang, Z.-Q. *et al.* Measurement of the hepatitis B core-related antigen is valuable for predicting the pathological status of liver tissues in chronic hepatitis B patients. *J. Virol. Methods* **235**, 92–98 (2016).
29. Wong, G. L.-H. Risk prediction of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma in the era of antiviral therapy. *World J. Gastroenterol.* **19**, 6515 (2013).
30. Honda, M. *et al.* Hepatitis B Virus (HBV) Core-Related Antigen During Nucleos(t)ide Analog Therapy Is Related to Intra-hepatic HBV Replication and Development of Hepatocellular

- Carcinoma. *J. Infect. Dis.* **213**, 1096–1106 (2016).
31. Rodella, A. *et al.* Quantitative analysis of HBsAg, IgM anti-HBc and anti-HBc avidity in acute and chronic hepatitis B. *J. Clin. Virol.* **37**, 206–212 (2006).
  32. Yuen, M.-F. *et al.* HBsAg Seroclearance in chronic hepatitis B in Asian patients: replicative level and risk of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* **135**, 1192–1199 (2008).
  33. Pfefferkorn, M. *et al.* Quantification of large and middle proteins of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) as a novel tool for the identification of inactive HBV carriers. *Gut* **67**, 2045–2053 (2018).
  34. Coffin, C. S., Zhou, K. & Terrault, N. A. New and Old Biomarkers for Diagnosis and Management of Chronic Hepatitis B Virus Infection. *Gastroenterology* **156**, 355-368.e3 (2019).
  35. 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).
  36. 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).
  37. 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).
  38. Raimondo, G. *et al.* Occult hepatitis B virus in liver tissue of individuals without hepatic disease. *J. Hepatol.* **48**, 743–746 (2008).
  39. Hu, H.-H. *et al.* Level of Hepatitis B (HB) Core Antibody Associates With Seroclearance of HBV DNA and HB Surface Antigen in HB e Antigen-Seronegative Patients. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **17**, 172-181.e1 (2019).

40. 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).
41. 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).
42. Rajbhandari, R. & Chung, R. T. Treatment of Hepatitis B: A Concise Review. *Clin. Transl. Gastroenterol.* **7**, e190 (2016).
43. Suk-Fong Lok, A. Hepatitis B Treatment: What We Know Now and What Remains to Be Researched. *Hepatol. Commun.* **3**, 8–19 (2018).
44. Lau, D. T. Y. & Bleibel, W. Review: Current status of antiviral therapy for hepatitis B. *Therap. Adv. Gastroenterol.* **1**, 61–75 (2008).
45. Chien, R.-N. & Liaw, Y.-F. Current Trend in Antiviral Therapy for Chronic Hepatitis B. *Viruses* **14**, (2022).
46. Lau, G. K. K. *et al.* Peginterferon Alfa-2a, lamivudine, and the combination for HBeAg-positive chronic hepatitis B. *N. Engl. J. Med.* **352**, 2682–2695 (2005).
47. Scaglione, S. J. & Lok, A. S. F. Effectiveness of Hepatitis B Treatment in Clinical Practice. *Gastroenterology* **142**, 1360-1368.e1 (2012).
48. Hsu, Y.-C. *et al.* Incidences and Determinants of Functional Cure During Entecavir or Tenofovir Disoproxil Fumarate for Chronic Hepatitis B. *J. Infect. Dis.* **224**, 1890–1899 (2021).
49. Wong, G. L. H., Gane, E. & Lok, A. S. F. Review How to achieve functional cure of HBV : Stopping NUCs , adding interferon or new drug development ? *J. Hepatol.* **76**, 1249–1262 (2022).
50. Fukano, K., Tsukuda, S., Watashi, K. & Wakita, T. Concept of Viral Inhibitors via NTCP. *Semin.*

- Liver Dis.* **39**, 78–85 (2019).
51. 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).
  52. Volz, T. *et al.* The entry inhibitor Myrcludex-B efficiently blocks intrahepatic virus spreading in humanized mice previously infected with hepatitis B virus. *J. Hepatol.* **58**, 861–867 (2013).
  53. 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).
  54. Zhao, K. *et al.* Upregulation of HBV transcription by sodium taurocholate cotransporting polypeptide at the postentry step is inhibited by the entry inhibitor Myrcludex B. *Emerg. Microbes Infect.* **7**, 186 (2018).
  55. Nkongolo, S. *et al.* Cyclosporin A inhibits hepatitis B and hepatitis D virus entry by cyclophilin-independent interference with the NTCP receptor. *J. Hepatol.* **60**, 723–731 (2014).
  56. 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).
  57. Blank, A. *et al.* First-in-human application of the novel hepatitis B and hepatitis D virus entry inhibitor myrcludex B. *J. Hepatol.* **65**, 483–489 (2016).
  58. Uhl, P. *et al.* A liposomal formulation for the oral application of the investigational hepatitis B drug Myrcludex B. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **103**, 159–166 (2016).
  59. Prifti, G. *et al.* Recent Advances in Hepatitis B Treatment. **14**, 1–27 (2021).
  60. 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).
61. Fanning, G. C., Zoulim, F., Hou, J. & Bertoletti, A. Therapeutic strategies for hepatitis B virus infection: towards a cure. *Nat. Rev. Drug Discov.* **18**, 827–844 (2019).
  62. Seeger, C. & Sohn, J. A. Complete Spectrum of CRISPR/Cas9-induced Mutations on HBV cccDNA. *Mol. Ther.* **24**, 1258–1266 (2016).
  63. Kostyushev, D. *et al.* Orthologous CRISPR/Cas9 systems for specific and efficient degradation of covalently closed circular DNA of hepatitis B virus. *Cell. Mol. Life Sci.* **76**, 1779–1794 (2019).
  64. Uddin, F., Rudin, C. M. & Sen, T. CRISPR Gene Therapy: Applications, Limitations, and Implications for the Future. *Front. Oncol.* **10**, 1387 (2020).
  65. 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).
  66. 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).
  67. Seeger, C. Control of viral transcripts as a concept for future HBV therapies. *Curr. Opin. Virol.* **30**, 18–23 (2018).
  68. Decorsière, A. *et al.* Hepatitis B virus X protein identifies the Smc5/6 complex as a host restriction factor. *Nature* **531**, 386–389 (2016).
  69. 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).
  70. 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).

71. Belloni, L. *et al.* IFN- $\alpha$  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).
72. 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).
73. 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).
74. 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).
75. Grimm, D., Thimme, R. & Blum, H. E. HBV life cycle and novel drug targets. *Hepatol. Int.* **5**, 644–653 (2011).
76. Lopatin, U. Drugs in the Pipeline for HBV. *Clin. Liver Dis.* **23**, 535–555 (2019).
77. Lok, A. S., Zoulim, F., Dusheiko, G. & Ghany, M. G. Hepatitis B cure: From discovery to regulatory approval. *J. Hepatol.* **67**, 847–861 (2017).
78. Soriano, V. *et al.* Advances in hepatitis B therapeutics. *Ther. Adv. Infect. Dis.* **7**, 204993612096502 (2020).
79. Chi, X., Gatti, P. & Papoian, T. Safety of antisense oligonucleotide and siRNA-based therapeutics. *Drug Discov. Today* **22**, 823–833 (2017).
80. Billioud, G. *et al.* In vivo reduction of hepatitis B virus antigenemia and viremia by antisense oligonucleotides. *J. Hepatol.* **64**, 781–789 (2016).
81. 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).
82. Ko, C., Michler, T. & Protzer, U. Novel viral and host targets to cure hepatitis B. *Curr. Opin. Virol.* **24**, 38–45 (2017).
  83. 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).
  84. 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).
  85. 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).
  86. 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).
  87. Lahlali, T. *et al.* Novel Potent Capsid Assembly Modulators Regulate Multiple Steps of the Hepatitis B Virus Life Cycle. *Antimicrob. Agents Chemother.* **62**, (2018).
  88. Sheng, L. *et al.* Safety, Tolerability and Pharmacokinetics of Single and Multiple Ascending Doses of Benfotiamine in Healthy Subjects. *Drug Des. Devel. Ther.* **Volume 15**, 1101–1110 (2021).
  89. 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).

90. 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).
91. 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).
92. Watashi, K. *et al.* Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Trigger Restriction of Hepatitis B Virus Infection via a Cytidine Deaminase Activation-induced Cytidine Deaminase (AID). *J. Biol. Chem.* **288**, 31715–31727 (2013).
93. Puro, R. & Schneider, R. J. Tumor Necrosis Factor Activates a Conserved Innate Antiviral Response to Hepatitis B Virus That Destabilizes Nucleocapsids and Reduces Nuclear Viral DNA. *J. Virol.* **81**, 7351–7362 (2007).
94. 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).
95. 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).
96. Fletcher, S. P. *et al.* Intrahepatic Transcriptional Signature Associated with Response to Interferon- $\alpha$  Treatment in the Woodchuck Model of Chronic Hepatitis B. *PLOS Pathog.* **11**, e1005103 (2015).
97. Xia, Y., Lucifora, J., Reisinger, F., Heikenwalder, M. & Protzer, U. Response to Comment on “Specific and nonhepatotoxic degradation of nuclear hepatitis B virus cccDNA”. *Science (80-. ).* **344**, 1237–1237 (2014).

98. Xia, Y. *et al.* Interferon- $\gamma$  and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Produced by T Cells Reduce the HBV Persistence Form, cccDNA, Without Cytolysis. *Gastroenterology* **150**, 194–205 (2016).
99. Yuen, M.-F. *et al.* GS-12-Ascending dose cohort study of inarigivir - A novel RIG I agonist in chronic HBV patients: Final results of the ACHIEVE trial. *J. Hepatol.* **70**, e47–e48 (2019).
100. 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).
101. Menne, S. *et al.* Sustained efficacy and seroconversion with the toll-like receptor 7 agonist GS-9620 in the woodchuck model of chronic hepatitis B. *J. Hepatol.* **62**, 1237–1245 (2015).
102. Gane, E. J. *et al.* The oral toll-like receptor-7 agonist GS-9620 in patients with chronic hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* **63**, 320–328 (2015).
103. 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).
104. Jo, J. *et al.* Toll-Like Receptor 8 Agonist and Bacteria Trigger Potent Activation of Innate Immune Cells in Human Liver. *PLoS Pathog.* **10**, e1004210 (2014).
105. Tang, X.-Z. *et al.* IL-7 Licenses Activation of Human Liver Intrasinusoidal Mucosal-Associated Invariant T Cells. *J. Immunol.* **190**, 3142–3152 (2013).
106. Schurich, A. *et al.* The Third Signal Cytokine IL-12 Rescues the Anti-Viral Function of Exhausted HBV-Specific CD8 T Cells. *PLoS Pathog.* **9**, e1003208 (2013).
107. Maini, M. K. & Peppas, D. NK Cells: A Double-Edged Sword in Chronic Hepatitis B Virus Infection. *Front. Immunol.* **4**, 57 (2013).
108. Boni, C. *et al.* Characterization of Hepatitis B Virus (HBV)-Specific T-Cell Dysfunction in

- Chronic HBV Infection. *J. Virol.* **81**, 4215–4225 (2007).
109. Fiscaro, 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).
  110. 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).
  111. Lei, Q., Wang, D., Sun, K., Wang, L. & Zhang, Y. Resistance Mechanisms of Anti-PD1/PDL1 Therapy in Solid Tumors. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, (2020).
  112. 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).
  113. 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).
  114. Fiscaro, 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).
  115. Bohne, F. *et al.* T Cells Redirected Against Hepatitis B Virus Surface Proteins Eliminate Infected Hepatocytes. *Gastroenterology* **134**, 239–247 (2008).
  116. 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).
  117. 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).
  118. Kah, J. *et al.* Lymphocytes transiently expressing virus-specific T cell receptors reduce hepatitis B virus infection. *J. Clin. Invest.* **127**, 3177–3188 (2017).

119. 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).
120. 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).
121. 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).
122. 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).
123. Oates, J., Hassan, N. J. & Jakobsen, B. K. ImmTACs for targeted cancer therapy: Why, what, how, and which. *Mol. Immunol.* **67**, 67–74 (2015).
124. 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).
125. Ji, C. *et al.* Targeted delivery of interferon- $\alpha$  to hepatitis B virus-infected cells using T-cell receptor-like antibodies. *Hepatology* **56**, 2027–2038 (2012).
126. Bertoletti, A. & Ferrari, C. Innate and adaptive immune responses in chronic hepatitis B virus infections: Towards restoration of immune control of viral infection. *Postgrad. Med. J.* **89**, 294–304 (2013).
127. Ratnam, D. & Visvanathan, K. New concepts in the immunopathogenesis of chronic hepatitis B: The importance of the innate immune response. *Hepatol. Int.* **2**, 12–18 (2008).
128. Megahed, F. A. K., Zhou, X. & Sun, P. The Interactions Between HBV and the Innate Immunity of Hepatocytes. *Viruses* **12**, 285 (2020).

129. Tu, D. *et al.* Structure and Ubiquitination-Dependent Activation of TANK-Binding Kinase 1. *Cell Rep.* **3**, 747–758 (2013).
130. 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).
131. Ferrari, C. HBV and the immune response. *Liver Int.* **35**, 121–128 (2015).
132. Chisari, F. V. Cytotoxic T cells and viral hepatitis. *J. Clin. Invest.* **99**, 1472–1477 (1997).
133. Tan, A., Koh, S. & Bertoletti, A. Immune Response in Hepatitis B Virus Infection. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **5**, a021428 (2015).
134. Guidotti, L. G. *et al.* Viral Clearance Without Destruction of Infected Cells During Acute HBV Infection. *Science (80-. ).* **284**, 825–829 (1999).
135. Guidotti, L. G. & Chisari, F. V. IMMUNOBIOLOGY AND PATHOGENESIS OF VIRAL HEPATITIS. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **1**, 23–61 (2006).
136. Iannacone, M. *et al.* Platelets mediate cytotoxic T lymphocyte-induced liver damage. *Nat. Med.* **11**, 1167–1169 (2005).
137. Fisicaro, P. *et al.* Early kinetics of innate and adaptive immune responses during hepatitis B virus infection. *Gut* **58**, 974–982 (2009).
138. Webster, G. Incubation Phase of Acute Hepatitis B in Man: Dynamic of Cellular Immune Mechanisms. *Hepatology* **32**, 1117–1124 (2000).
139. Dunn, C. *et al.* Temporal Analysis of Early Immune Responses in Patients With Acute Hepatitis B Virus Infection. *Gastroenterology* **137**, 1289–1300 (2009).
140. 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).
141. Peppas, D. *et al.* Blockade of Immunosuppressive Cytokines Restores NK Cell Antiviral Function in Chronic Hepatitis B Virus Infection. *PLoS Pathog.* **6**, e1001227 (2010).
  142. Sandalova, E. *et al.* Contribution of Herpesvirus Specific CD8 T Cells to Anti-Viral T Cell Response in Humans. *PLoS Pathog.* **6**, e1001051 (2010).
  143. 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).
  144. Penna, A. *et al.* Long-lasting memory T cell responses following self-limited acute hepatitis B. *J. Clin. Invest.* **98**, 1185–1194 (1996).
  145. Ji, C. *et al.* Targeted delivery of interferon- $\alpha$  to hepatitis B virus-infected cells using T-cell receptor-like antibodies. *Hepatology* **56**, 2027–2038 (2012).
  146. Jefferson, T. & Traversa, G. Viral determinants and host immune responses in the pathogenesis of HBV infection. *J. Med. Virol.* **67**, 454–457 (2002).
  147. Rehermann, B. Pathogenesis of chronic viral hepatitis: differential roles of T cells and NK cells. *Nat. Med.* **19**, 859–868 (2013).
  148. 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).
  149. Fuller, M. J. & Zajac, A. J. Ablation of CD8 and CD4 T Cell Responses by High Viral Loads. *J. Immunol.* **170**, 477–486 (2003).
  150. 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).

151. 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).
152. 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).
153. 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).
154. 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).
155. 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).
156. 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).
157. Raziorrouh, B. *et al.* The immunoregulatory role of CD244 in chronic hepatitis B infection and its inhibitory potential on virus-specific CD8+ T-cell function. *Hepatology* **52**, 1934–1947 (2010).
158. Hao, C. *et al.* Efficacy and safety of anti-PD-1 and anti-PD-1 combined with anti-CTLA-4 immunotherapy to advanced melanoma. *Medicine (Baltimore)*. **96**, e7325 (2017).
159. Shah, N. J. *et al.* Safety and efficacy of immune checkpoint inhibitors (ICIs) in cancer patients with HIV, hepatitis B, or hepatitis C viral infection. *J. Immunother. Cancer* **7**, 353 (2019).

160. 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).
161. 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).
162. Jacobs, S. R. *et al.* Glucose Uptake Is Limiting in T Cell Activation and Requires CD28-Mediated Akt-Dependent and Independent Pathways. *J. Immunol.* **180**, 4476–4486 (2008).
163. 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).
164. Kahan, S. M., Wherry, E. J. & Zajac, A. J. T cell exhaustion during persistent viral infections. *Virology* **479–480**, 180–193 (2015).
165. 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).
166. Kuo, L. J. & Yang, L.-X. Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo* **22**, 305–9 (2008).
167. 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).
168. Pascal, J. M. The comings and goings of PARP-1 in response to DNA damage. *DNA Repair (Amst)*. **71**, 177–182 (2018).
169. 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).
170. Bengsch, B. *et al.* Epigenomic-Guided Mass Cytometry Profiling Reveals Disease-Specific

- Features of Exhausted CD8 T Cells. *Immunity* **48**, 1029-1045.e5 (2018).
171. Chatterjee, S. *et al.* CD38-NAD<sup>+</sup> Axis Regulates Immunotherapeutic Anti-Tumor T Cell Response. *Cell Metab.* **27**, 85-100.e8 (2018).
  172. Chini, C. C. S., Zeidler, J. D., Kashyap, S., Warner, G. & Chini, E. N. Evolving concepts in NAD<sup>+</sup> metabolism. *Cell Metab.* **33**, 1076–1087 (2021).
  173. KAWANISHI, S. & OIKAWA, S. Mechanism of Telomere Shortening by Oxidative Stress. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1019**, 278–284 (2004).
  174. Ponnappan, S. & Ponnappan, U. Aging and Immune Function: Molecular Mechanisms to Interventions. *Antioxid. Redox Signal.* **14**, 1551–1585 (2011).
  175. Chini, C. C. S. *et al.* CD38 ecto-enzyme in immune cells is induced during aging and regulates NAD<sup>+</sup> and NMN levels. *Nat. Metab.* **2**, 1284–1304 (2020).
  176. 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).
  177. Xie, N. *et al.* NAD<sup>+</sup> metabolism: pathophysiologic mechanisms and therapeutic potential. *Signal Transduct. Target. Ther.* **5**, 227 (2020).
  178. Bradshaw, P. C. Acetyl-CoA Metabolism and Histone Acetylation in the Regulation of Aging and Lifespan. *Antioxidants* **10**, 572 (2021).
  179. 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).
  180. Hoffmann, M. *et al.* Exhaustion of Activated CD8 T Cells Predicts Disease Progression in

- Primary HIV-1 Infection. *PLOS Pathog.* **12**, e1005661 (2016).
181. 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).
  182. Li, W., Liang, L., Liao, Q., Li, Y. & Zhou, Y. CD38: An important regulator of T cell function. *Biomed. Pharmacother.* **153**, 113395 (2022).
  183. Jubel, J. M., Barbati, Z. R., Burger, C., Wirtz, D. C. & Schildberg, F. A. The Role of PD-1 in Acute and Chronic Infection. *Front. Immunol.* **11**, (2020).
  184. 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).
  185. Zhang, J. *et al.* Mitochondrial Sirtuin 3: New emerging biological function and therapeutic target. *Theranostics* **10**, 8315–8342 (2020).
  186. Jacobs, K. M. *et al.* SIRT3 interacts with the daf-16 homolog FOXO3a in the Mitochondria, as well as increases FOXO3a Dependent Gene expression. *Int. J. Biol. Sci.* **4**, 291–299 (2008).
  187. 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.
  188. Satterstrom, F. K. *et al.* Nuclear respiratory factor 2 induces <scp>SIRT</scp> 3 expression. *Aging Cell* **14**, 818–825 (2015).
  189. Kong, X. *et al.* Sirtuin 3, a New Target of PGC-1 $\alpha$ , Plays an Important Role in the Suppression of ROS and Mitochondrial Biogenesis. *PLoS One* **5**, e11707 (2010).
  190. Reiten, O. K., Wilvang, M. A., Mitchell, S. J., Hu, Z. & Fang, E. F. Preclinical and clinical

- evidence of NAD<sup>+</sup> precursors in health, disease, and ageing. *Mech. Ageing Dev.* **199**, 111567 (2021).
191. Tarragó, M. G. *et al.* A Potent and Specific CD38 Inhibitor Ameliorates Age-Related Metabolic Dysfunction by Reversing Tissue NAD<sup>+</sup> Decline. *Cell Metab.* **27**, 1081-1095.e10 (2018).
  192. 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).
  193. Kato, Y. *et al.* Combination of HDAC inhibitor MS-275 and IL-2 increased anti-tumor effect in a melanoma model via activated cytotoxic T cells. *J. Dermatol. Sci.* **75**, 140–147 (2014).
  194. Podhorecka, M., Skladanowski, A. & Bozko, P. H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy. *J. Nucleic Acids* **2010**, 1–9 (2010).
  195. Shen, K., Shen, L., Wang, J., Jiang, Z. & Shen, B. Understanding Amino Acid Mutations in Hepatitis B Virus Proteins for Rational Design of Vaccines and Drugs. in *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* 131–153 (2015). doi:10.1016/bs.apcsb.2015.03.006.
  196. Bengsch, B. *et al.* Coexpression of PD-1, 2B4, CD160 and KLRG1 on Exhausted HCV-Specific CD8<sup>+</sup> T Cells Is Linked to Antigen Recognition and T Cell Differentiation. *PLoS Pathog.* **6**, e1000947 (2010).
  197. Kasproicz, V. *et al.* Hepatitis C Virus (HCV) Sequence Variation Induces an HCV-Specific T-Cell Phenotype Analogous to Spontaneous Resolution. *J. Virol.* **84**, 1656–1663 (2010).
  198. Schuch, A. *et al.* Phenotypic and functional differences of HBV core-specific versus HBV polymerase-specific CD8<sup>+</sup> T cells in chronically HBV-infected patients with low viral load. *Gut* **68**, 905–915 (2018).
  199. Zou, L.-H. *et al.* TNKS1BP1 functions in DNA double-strand break repair through facilitating DNA-PKcs autophosphorylation dependent on PARP-1. *Oncotarget* **6**, 7011–7022 (2015).

200. Dregalla, R. C. *et al.* Regulatory roles of tankyrase 1 at telomeres and in DNA repair: suppression of T-SCE and stabilization of DNA-PKcs. *Aging (Albany, NY)*. **2**, 691–708 (2010).
201. Boehler, C. *et al.* Poly(ADP-ribose) polymerase 3 (PARP3), a newcomer in cellular response to DNA damage and mitotic progression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 2783–2788 (2011).
202. Shilkin, E. S. *et al.* Translesion DNA Synthesis and Carcinogenesis. *Biochem.* **85**, 425–435 (2020).
203. Wherry, E. J. T cell exhaustion. *Nat. Immunol.* **12**, 492–499 (2011).
204. Srinivas, U. S., Tan, B. W. Q., Vellayappan, B. A. & Jeyasekharan, A. D. ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biol.* **25**, 101084 (2019).
205. Mah, L.-J., El-Osta, A. & Karagiannis, T. C.  $\gamma$ H2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia* **24**, 679–686 (2010).
206. 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).
207. 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).
208. Fang, E. F. *et al.* Nuclear DNA damage signalling to mitochondria in ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**, 308–321 (2016).
209. Covarrubias, A. J., Perrone, R., Grozio, A. & Verdin, E. NAD<sup>+</sup> metabolism and its roles in cellular processes during ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **22**, 119–141 (2021).
210. 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).

211. 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).
212. 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).
213. Long, A. *et al.* CD38 Knockout Mice Show Significant Protection Against Ischemic Brain Damage Despite High Level Poly-ADP-Ribosylation. *Neurochem. Res.* **42**, 283–293 (2017).
214. 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).
215. Kanayama, M. & Luo, J. CD38-Induced Apoptosis and Mitochondrial Damage is Restored by Nicotinamide in Prostate Cancer. *Front. Mol. Biosci.* **9**, 890402 (2022).
216. Lingappa, N. & Mayrovitz, H. N. Role of Sirtuins in Diabetes and Age-Related Processes. *Cureus* **14**, e28774 (2022).
217. Nemeth, Z., Kiss, E. & Takacs, I. The Role of Epigenetic Regulator SIRT1 in Balancing the Homeostasis and Preventing the Formation of Specific “Soil” of Metabolic Disorders and Related Cancers. *Front. Biosci.* **27**, 253 (2022).
218. 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).
219. Zhang, F. *et al.* Epigenetic Manipulation Restores Functions of Defective CD8+ T Cells From Chronic Viral Infection. *Mol. Ther.* **22**, 1698–1706 (2014).
220. Wightman, F. *et al.* Entinostat is a histone deacetylase inhibitor selective for class 1 histone deacetylases and activates HIV production from latently infected primary T cells. *AIDS* **27**, 2853–2862 (2013).

221. McCaw, T. R. *et al.* Class I histone deacetylase inhibition promotes CD8 T cell activation in ovarian cancer. *Cancer Med.* **10**, 709–717 (2021).
222. Truong, A. S. *et al.* Entinostat induces antitumor immune responses through immune editing of tumor neoantigens. *J. Clin. Invest.* **131**, (2021).
223. McCaw, T. R., Randall, T. D., Forero, A. & Buchsbaum, D. J. Modulation of antitumor immunity with histone deacetylase inhibitors. *Immunotherapy* **9**, 1359–1372 (2017).
224. Tofilon, P. J. & Camphausen, K. HDAC inhibitors in cancer care. *Oncology (Williston Park)*. **24**, 180–5 (2010).
225. Rasheed, W., Bishton, M., Johnstone, R. W. & Prince, H. M. Histone deacetylase inhibitors in lymphoma and solid malignancies. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **8**, 413–432 (2008).
226. Milazzo, G. *et al.* Histone Deacetylases (HDACs): Evolution, Specificity, Role in Transcriptional Complexes, and Pharmacological Actionability. *Genes (Basel)*. **11**, 556 (2020).
227. Gao, S. Clinical relevance of hepatitis B virus variants. *World J. Hepatol.* **7**, 1086 (2015).
228. Bertoletti, A. *et al.* Natural variants of cytotoxic epitopes are T-cell receptor antagonists for antiviral cytotoxic T cells. *Nature* **369**, 407–410 (1994).
229. 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* **68**, 905–915 (2019).
230. Heim, K., Neumann-Haefelin, C., Thimme, R. & Hofmann, M. Heterogeneity of HBV-Specific CD8+ T-Cell Failure: Implications for Immunotherapy. *Front. Immunol.* **10**, (2019).

## **RINGRAZIAMENTI**

Vorrei ringraziare il mio tutor Prof. Carlo Ferrari per la sua guida e il suo supporto che mi hanno permesso di completare questo progetto. Un particolare ringraziamento è rivolto alla Dott.ssa Paola Fiscaro per non avermi mai fatto mancare il suo aiuto e per avermi sempre guidato e supportato durante questi anni di dottorato.

Infine voglio ringraziare i miei colleghi passati e presenti per aver condiviso con me le gioie e i dolori di questo intenso percorso.