

Vaccini Covid-19 basati sul vettore adenovirale e SARS-CoV-2 basati su mRNA: possibile integrazione nel genoma umano - I geni adenovirali sono espressi nei vaccini basati su vettori?

Virus Research 302(2021)198466
Contents lists available at ScienceDirect

Walter Doerfler
Istituto di genetica, Università di Colonia, D-50674 Colonia, Germania

Istituto di virologia, Università Friedrich-Alexander (FAU) Erlangen-Nürnberg, D-91054 Erlangen, Germania

I vigorosi programmi di vaccinazione contro il Covid-19 che causa SARS-CoV-2 sono la principale opportunità per combattere questa terribile pandemia. I vaccini attualmente somministrati dipendono dai vettori del DNA dell'adenovirus o dall'mRNA di SARS-CoV-2 che potrebbe essere retrotrascritto nel DNA, anche se raramente. In alcune società, le persone si sono sensibilizzate contro i potenziali effetti collaterali a breve o lungo termine dell'iniezione di DNA estraneo negli esseri umani.

Nel mio laboratorio, il destino del DNA estraneo nelle cellule e negli organismi di mammiferi (umani) è stato studiato per molti anni. In questa rassegna verrà presentata una sintesi dei risultati ottenuti. Questa sinossi è stata inserita nel contesto evolutivo delle inserzioni di retrotrasposoni nei genomi preumani milioni di anni fa. Inoltre, verranno descritti studi sul DNA basato su vettori di adenovirus, sul destino del DNA ingerito dal cibo e sulla persistenza a lungo termine dell'RNA/DNA di SARS-CoV-2.

L'effettiva integrazione delle molecole di DNA virale e del DNA vettore di adenovirus saranno probabilmente eventi casuali la cui frequenza e le cui conseguenze epigenetiche non possono essere valutate con certezza. La revisione affronta anche i problemi dell'espressione genica adenovirale residua nei vettori a base di adenovirali e il loro ruolo negli effetti collaterali dei vaccini.

Alla fine, si scenderà a soppesare i possibili rischi di inserimenti genomici di DNA estraneo associato al vaccino e livelli sconosciuti di espressione genica adenovirale trasportata da vettori rispetto alla protezione contro i pericoli di Covid-19. Una decisione a favore della vaccinazione contro le malattie potenzialmente letali appare prudente. Informare il pubblico sulle complessità della biologia sarà una guida affidabile quando si devono prendere decisioni personali sulle vaccinazioni.

1. Contesto

Molti dei vaccini attualmente approvati contro la SARS-Coronavirus-2 (AstraZeneca/Oxford University, Janssen COVID-19 Vaccine di Johnson & Johnson e Sputnik V) si basano su vettori di DNA di adenovirus come vettori per le informazioni genetiche per SARS-COV-2 glicoproteina spike. I vaccini prodotti da BioNTech/Pfizer o Moderna contengono l'RNA messaggero (mRNA) per la sintesi di questa proteina. Dopo l'iniezione del vaccino, l'mRNA attiverà direttamente la sintesi della proteina spike virale nei vaccinati. Pertanto, l'interesse pubblico per il destino del DNA estraneo (adenovirale o SARS-CoV-2 a trascrizione inversa) nelle cellule e negli organismi di mammiferi (umani) è diventato acuto e diffuso. Le preoccupazioni delle persone sono state espresse in incontri personali occasionali come: "il vaccino entra nei miei geni"? L'autore sostiene il concetto che il pubblico ha diritto a tutte le informazioni scientifiche su questi temi. Il resoconto qui

presentato di precedenti lavori sperimentali sull'integrazione del DNA estraneo e le sue conseguenze fornirà un utile aggiornamento su questi temi di interesse pubblico. Questa sinossi descrive il destino del DNA estraneo nelle cellule di mammifero, la sua possibile integrazione nel genoma ospite e le potenziali conseguenze per le cellule transgenomiche (Doerfler, 2000; Doerfler et al., 2018). Di fronte alla pandemia mondiale di SARS-CoV-2 ancora in espansione, queste informazioni devono essere controbilanciate rispetto ai benefici di un vaccino basato su un vettore di DNA di adenovirus o di un vaccino mRNA contro il Covid-19 potenzialmente letale (malattia del coronavirus). 2019). Non ci sono prove che gli adenovirus umani siano coinvolti causalmente nella tumorigenesi umana, ma nemmeno questa possibilità può essere categoricamente esclusa, in particolare per i vaccini basati su vettori.

Inoltre, nei tumori di criceto indotti da Ad12, la persistenza del genoma di Ad12 nelle cellule tumorali non è richiesta per il mantenimento dello stato trasformato dei tumori indotti da Ad12 (Kuhlmann et al., 1982). Come discusso di seguito, i fattori epigenetici potrebbero svolgere un ruolo importante nella tumorigenesi dell'adenovirus e perché il loro effetto domini, la persistenza di lunga data del transgenoma non è essenziale (Doerfler et al., 2018; Heller et al., 1995). Le possibili sequele a lungo termine del DNA del vettore adenovirale o dell'integrazione dell'RNA messaggero SARS-CoV-2 a trascrizione inversa per la funzionalità e la sopravvivenza delle cellule transgeniche vettoriali non possono essere previste con certezza nei singoli casi. Tuttavia, in questa fase della pandemia di Covid-19, le nostre attività dovranno essere concentrate sulla lotta alla pandemia con vaccini adeguati e future misure terapeutiche.

2. Background evolutivo – elementi trasponibili nel genoma umano

Quasi il 50% del genoma umano di 3×10^9 coppie di nucleotidi rappresenta elementi trasponibili e l'8% costituisce genomi retrovirali endogeni. Il significato di questo fatto genetico non è stato attivamente riflesso nella ricerca sulla genetica molecolare. Apparentemente, una parte importante del genoma umano di oggi è stata inserita gradualmente durante i tempi evolutivi mediante l'integrazione di DNA estraneo o di DNA retrotrascritto da genomi retrovirali di RNA. Analisi più recenti hanno rivelato che gli elementi ripetitivi potrebbero ammontare al 66%-69% del genoma umano (De Koning et al 2011). Le sequenze di DNA estraneo sono diventate frequentemente inattivate attraverso meccanismi epigenetici, i. e. da metilazione del DNA estraneo e strategie di metilazione dell'istone alterate. Si stima che questi antichi eventi di integrazione risalgano a >60-70 milioni di anni fa, forse più a lungo. La loro esistenza e la loro massiccia estensione supportano l'idea che l'inserimento di DNA estraneo nei genomi stabiliti sia stato facilitato da un meccanismo elementare emerso nei primi tempi dell'evoluzione e molto probabilmente ha svolto un ruolo importante nel guidare l'evoluzione. Ancora oggi si possono trascrivere parti selezionate di queste antiche integrazioni, e vi sono differenze interindividuali quanto all'estensione dei loro livelli di espressione. Inoltre, gli elementi regolatori presenti negli elementi retrovirali endogeni e nei siti di riconoscimento per le interazioni DNA-proteina svolgono funzioni poco conosciute. La loro importanza per l'organismo umano può essere solo ipotizzata. Alcune parti delle sequenze retrovirali endogene possono diventare sovraespresse nei tumori umani e nelle malattie autoimmuni, nonché nelle infezioni virali, comprese quelle da SARS-CoV-2. Ci sono prove che gli elementi retrovirali endogeni vengono deregolati durante l'invecchiamento. Di recente è stata presentata una panoramica sulla biologia di queste sequenze che spesso sono state erroneamente sottovalutate come DNA spazzatura (Geis e Goff, 2020).

3. Sinossi delle analisi precedenti

Il lavoro su e con i vettori di adenovirus si basa sull'affermazione non dimostrata che questi vettori sono sicuri perché il DNA di adenovirus "non si integrerebbe" nei genomi delle cellule riceventi.

Non ci sono prove concrete per questa interpretazione. Quindi, la seguente sinossi del nostro lavoro e di quello di altri mette in discussione questa nozione (Doerfler et al., 1984). I problemi incontrati nelle procedure terapeutiche geniche del passato (Samanathan et al, 2020) e attualmente con i vaccini SARS-CoV-2 basati su vettori di adenovirus richiederanno un'approfondita rivalutazione degli svantaggi che comportano i sistemi di vettori di adenovirus. Naturalmente, il destino del DNA adenovirale intatto e quello del DNA vettore parzialmente difettoso è diverso per alcuni aspetti, sebbene entrambi siano soggetti agli stessi meccanismi di ricombinazione integrativa cellulare. Inoltre, le quantità di DNA vettore di adenovirus somministrate nei programmi di vaccinazione (circa 2,5 μ) sono inferiori a quelle nelle procedure di terapia genica. Si pensa che il DNA vettore dell'adenovirus raggiunga principalmente le cellule del fegato (Stephen et al, 2010) e probabilmente penetri anche nelle cellule del sistema immunitario.

3.1. Adenovirus tipo 12 genomi nel tumore del criceto e nelle cellule trasformate

L'adenovirus umano di tipo 12 (Ad12) induce neoplasie neuroectodermiche primitive nel 70-90% dei criceti siriani neonati inoculati con virus, *Mesocricetus auratus* (Trentin et al. 1962; Hohlweg et al. 2003). Il DNA di Ad12 nella linea cellulare tumorale di criceto indotta da Ad12 T637 è stato integrato mediante ricombinazione eterologa in 10-12 copie, spesso in un sito genomico selezionato casualmente (Fig. 1A, freccia verde, bianca). Non vi è, tuttavia, alcuna prova che nessuno degli adenovirus umani sia implicato nella tumorigenesi umana. • In 58 tumori di criceto indotti indipendentemente da Ad12, copie multiple di DNA virale sono state integrate in un sito di integrazione cellulare scelto a caso, sebbene le posizioni genomiche di questi siti differissero tra i singoli tumori di origine clonale. In altri due tumori, gli integratori di DNA Ad12 sono stati localizzati ciascuno in due diversi siti nel genoma delle cellule tumorali. In ogni tumore, il DNA integrato di Ad12 era diventato de novo CpG-metilato (Hilger-Eversheim e Doerfler, 1997). • Grande enfasi nelle analisi delle cellule tumorali di criceto trasformate da adenovirus o indotte da Ad12 è stata posta sul clonaggio molecolare e sul sequenziamento di numerosi siti di giunzione tra il DNA dell'adenovirus integrato e il DNA cellulare adiacente per accertare il legame covalente tra il DNA virale e cellulare degli integratori (Deuring et al., 1981a; Stabel, Doerfler, 1982; Gahlmann et al. 1982; (Deuring et al., 1983) Doerfler et al., 1984; Schulz et al., 1987). Il meccanismo di inserimento sembrava simile o identico a quello della ricombinazione non omologa. Esistevano omologie di sequenza brevi e spesso irregolari tra i terminali del DNA dell'adenovirus e la sequenza cellulare mirata nei siti di inserimento adiacenti. In alcuni casi, la sequenza di DNA cellulare ricevente adiacente al DNA virale integrato era trascrizionalmente attiva (Schulz et al. 1987). In uno studio pilota, la ricombinazione inserzionale tra DNA virale e cellulare è stata ricostruita in un sistema privo di cellule da estratti nucleari di criceto utilizzando una sequenza di DNA cellulare pre-inserimento precedentemente identificata e segmenti di DNA di adenovirus terminali come partner di ricombinazione (Jessberger et al. 1989). I prodotti di ricombinazione sono stati analizzati dopo il riclonaggio dalla reazione e hanno mostrato caratteristiche simili a quelle delle cellule trasformate da adenovirus (Tatzelt et al. 1992).

3.2. Un sistema modello per studiare l'integrazione del DNA di Ad12 nelle cellule di criceto infettate in modo abortivo

Il sistema tumorale del criceto Ad12 è stato riconosciuto all'epoca come un potente modello per studiare le interazioni delle cellule ospiti Ad12. Ad12 infetta in modo abortivo le cellule di criceto con un blocco completo della replicazione del DNA virale e una scarsità di genomi virali che raggiungono i nuclei delle cellule (Doerfler, 1969; Zock e Doerfler, 1990, 1995; Hochstein et al., 2008). blocco nella replicazione del DNA virale e nell'espressione genica tardiva, Ad12 non era in grado di replicarsi nelle cellule di criceto, il che soddisfaceva una condizione essenziale per l'integrazione del DNA virale e la tumorigenesi. In una serie di esperimenti modello [Doerfler, 1968,

1970], cellule di criceto con 5- Il DNA cellulare pre-marcato con bromodeoxuridina (5-BU) è stato infettato con enormi inoculi di virus Ad12 marcato con 3H-timidina-DNA. Mediante centrifugazione alcalina (pH >13) CsCl-equilibrio galleggiante in gradiente di densità, DNA leggero Ad12 e 5-BU il DNA cellulare pesante marcato potrebbe essere fisicamente separato. A partire da circa 12 ore dopo l'infezione, Ad12 marcato con 3H-timidina-DNA ha iniziato a spostarsi dalla posizione di densità leggera del DNA Ad12 alla posizione di DNA cellulare pesante, e progressivamente così con tempo dopo la morte azione. L'autenticità di Ad12 del DNA con spostamento di densità è stata accertata mediante ibridazione DNA-DNA. Inoltre, il trattamento ad ultrasuoni del DNA da cellule di criceto infettate da Ad12 ha interrotto il legame stabile agli alcali (pH 13) tra il DNA di criceto cellulare pesante con tag 3H-timidina Ad12 e 5-BU. Il DNA Ad12 marcato con 3H si è quindi spostato verso o vicino alla posizione di densità virale, indicando che il DNA Ad12 marcato con 3H è stato rilasciato dal suo legame al DNA cellulare 5-Bu-pesante. Questi risultati sono stati i primi a documentare l'integrazione ricombinatoria tra Ad12 e DNA di cellule di mammifero (Doerfler, 1968, 1970).

3.3. Cosa succede nelle cellule umane infettate in modo produttivo da adenovirus?

- Sono state studiate le infezioni delle cellule umane con adenovirus di tipo 2 (Ad2) o Ad12. Ci sono prove che il DNA dell'adenovirus umano è in grado di ricombinarsi con il DNA cellulare anche nelle cellule umane infette in modo produttivo, sebbene le vere integrazioni siano difficili da documentare poiché nessuna delle cellule umane infette sopravvive alle infezioni da adenovirus produttive. Una forma di DNA virale a rapida sedimentazione, pH >13 alcali-stabile - presunti ricombinanti tra adenovirus e DNA cellulare - è stata documentata da esperimenti sequenziali di ibridazione DNA-DNA, prima con DNA Ad12 autentico seguito da ibridazione con DNA cellulare umano (Schick et al. 1976).

- Inoltre, in cellule umane infettate da Ad12, è stato scoperto un ricombinante simmetrico naturale (SYREC) tra i 2.081 nucleotidi terminali di sinistra del DNA Ad12 e un considerevole palindromo di DNA cellulare, come documentato dalle analisi della sequenza nucleotidica. La presenza del segnale di confezionamento dell'adenovirus nel frammento terminale di DNA Ad12 nella molecola ibrida ha facilitato l'incapsidazione nelle particelle virali. Questa scoperta ha fornito un supporto inequivocabile per la formazione di ricombinanti tra Ad12 e DNA cellulare anche in cellule umane infette in modo produttivo (Deuring et al., 1981b, Deuring e Doerfler 1983). La struttura del DNA SYREC Ad12 – molecola di DNA palindromo cellulare è servita da guida su come dovevano essere costruite le molecole del vettore di adenovirus senza viscere con carichi utili elevati.

- In altri laboratori, prove da esperimenti di ibridazione in situ hanno dimostrato che il DNA di adenovirus umano persisteva nelle cellule adenoidi umane cronicamente infette (Neumann et al. 1987). Inoltre, nelle linee cellulari di linfociti umani infettati da adenovirus latente, persistevano anche i genomi di adenovirus (Zhang et al. 2010). Tuttavia, in nessuno dei due sistemi è stato ulteriormente studiato lo stato molecolare dei genomi virali persistenti.

3.4. Il DNA Ad12 integrato diventa de novo CpG metilato - correlazioni inverse tra i livelli di metilazione del DNA Ad12 e le attività genetiche dei geni virali

- Nelle cellule tumorali di criceto indotte da Ad12 e nelle cellule di criceto trasformate da Ad2 o Ad12, il DNA virale integrato diventa de novo CpG-metilato in modelli specifici (Sutter et al. 1978) che tendono a diffondersi attraverso l'integrazione virale in uno specifico modo (Toth et al. 1989). La dimostrazione di correlazioni inverse tra i livelli di metilazione del DNA e le attività genetiche di specifiche regioni dei genomi integrati Ad2 o Ad12 è stata tra le prime in letteratura e ha segnato l'inizio di un impegno a lungo termine della nostra ricerca per chiarire le funzioni biologiche di

CpG Metilazione del DNA nelle cellule di mammifero (Sutter e Doerfler, 1980; Vardimon et al. 1980; Doerfler, 1983). Questa interrelazione inversa tra silenziamento genetico e modelli specifici di metilazione del promotore CpG è stata successivamente confermata in molti sistemi eucariotici di importanza generale.

3.5. La metilazione del promotore porta al silenziamento del promotore

- In una serie di esperimenti con diversi promotori eucariotici e geni indicatori, abbiamo documentato che la metilazione del promotore specifico ha causato l'inattivazione di questi promotori (Vardimon et al. 1982; Kruczek e Doerfler, 1983; Langner et al. 1984). Inoltre, specifici pattern di metilazione di CpG nei genomi dei mammiferi possono essere interpretati come segnali di inattivazione genica a lungo termine (Doerfler, 1983; 2006). Una descrizione più dettagliata di questa ricerca non verrà presentata qui, perché trasgredirebbe lo scopo di questa recensione.

3.6. Conseguenze dell'integrazione di DNA estraneo per genomi cellulari

- È stato spesso sostenuto che l'integrazione di DNA estraneo nei genomi dell'ospite potrebbe portare alla distruzione dei geni nel cromosoma ospite e quindi potrebbero verificarsi mutazioni. Indubbiamente, questa è una possibilità che è stata effettivamente descritta in alcuni casi. Tuttavia, considerando che il genoma umano trasporta l'1,1% di esoni, il 24% di introni e il 75% di DNA intergenico (Venter et al. 2001), l'integrazione di DNA estraneo ha una probabilità di circa 1/100 di colpire geni funzionali. Al contrario, nelle nostre analisi delle conseguenze dell'inserimento di DNA estraneo, abbiamo posto l'accento sul ruolo degli effetti epigenetici che coinvolgono siti sia vicini che lontani dal locus di integrazione (vedi sotto). Questo aspetto delle sequele dell'integrazione del DNA estraneo è stato oggetto di precedenti lavori del nostro laboratorio (Heller et al, 1995; Weber et al., 2015, 2016; Doerfler et al, 2018).

- Nei siti di inserimento del DNA virale, il livello di metilazione del DNA CpG nel DNA cellulare adiacente è diminuito. Quindi l'integrazione di DNA estraneo è stata in grado di alterare i segnali epigenetici del DNA cellulare in cis, immediatamente nel sito di inserimento (Lichtenberg et al. 1988).

- Ma alterazioni possono verificarsi anche in trans. Nelle cellule di criceto trasformate in Ad12 che trasportano da 10 a 12 copie di DNA virale integrato genomicamente in un sito cromosomico [verde in Fig. 1A, evidenziato da una freccia bianca], i livelli di metilazione di CpG nelle circa 900 copie di particelle A intracitoplasmatiche cellulari (IAP) il DNA retrotrasposonico [rosa in Fig. 1A] era notevolmente aumentato rispetto alle cellule di criceto non trasformate e alle cellule di criceto infettate da Ad12 (Fig. 1B; Heller et al. 1995). A causa dell'aumento dei livelli di metilazione del DNA CpG nelle sequenze IAP, il loro DNA si è dimostrato resistente alla scissione con endonucleasi di restrizione sensibili alla metilazione come HpaII e HhaI e non è riuscito a migrare nell'analisi elettroforetica dei prodotti di scissione (Fig. 1B). Le sequenze IAP sono distribuite su molti cromosomi e sono frequentemente localizzate sui loro bracci corti [segnali rosa in Fig. 1A]. Questa scoperta di un effetto trans della metilazione del DNA CpG nelle cellule di criceto transgeniche per il DNA Ad12 ci ha spinto a indagini pre-progettate sulle conseguenze delle inserzioni di DNA estraneo nelle cellule umane (vedi sotto)

- È importante sottolineare che negli esperimenti descritti in Fig. 1B, l'effetto transgenomico sui profili di metilazione IAP CpG non dipendeva dalla continua presenza dei transgenomi Ad12 ma persisteva nella linea cellulare TR3, sebbene avesse perso tutti i precedenti genomi Ad12 integrati

(Fig. 1B; Heller et al. 1995). Quindi non si può sostenere che la mancanza di trovare genomi di adenovirus, ad es. nelle cellule tumorali umane o nelle cellule di individui con disturbi cronici, implicherebbe necessariamente che l'integrazione del DNA dell'adenovirus o di qualsiasi altro DNA estraneo non abbia giocato un ruolo importante nella patogenesi di queste malattie. La persistenza del DNA transgenomico non è un presupposto necessario per il mantenimento degli effetti trans, ad es. qui dello stato trasformato dei genomi e delle cellule riceventi [meccanismo mordi e fuggi].

- Per ulteriori indagini sugli effetti trans epigenetici nelle cellule umane transgenomiche, è stata avviata la seguente serie di esperimenti pilota. In linee clonali di cellule umane transgenomiche per un plasmide batterico di 5,6 kbp, i modelli di trascrizione e metilazione di CpG sono stati confrontati tra cloni cellulari transgenomici e non transgenomici utilizzando sistemi di microarray di chip genici. Nel 4,7% dei 28.869 segmenti genici analizzati, le attività trascrizionali sono state regolate in modo differenziato verso l'alto o verso il basso nei cloni transgenomici. La profilazione dell'intero genoma ha dimostrato una metilazione differenziale in 3791 di >480.000 siti CpG che sono stati esaminati in cloni cellulari transgenomici rispetto a quelli non transgenomici. Questi dati hanno indicato che l'inserimento di DNA estraneo in un genoma umano stabilito può alterare notevolmente la metilazione del DNA CpG cellulare e i profili di trascrizione. In effetti, sembravano essersi evoluti diversi tipi di cellule (Weber et al. 2015; Doerfler et al. 2018). Consideriamo questi effetti epigenetici dell'inserimento di DNA estraneo di grande importanza poiché riguardano la stabilità epigenetica e la funzione dell'intero genoma (umano). Poiché molti approcci sperimentali in biologia e medicina ricorrono allo studio di cellule o organismi transgenomici, gli effetti epigenetici spesso insospettiti sulla scia dell'inserimento di DNA estraneo dovranno essere presi in considerazione in un'interpretazione realistica dei dati sperimentali.

- L'effetto trans sopra descritto sembrava essere specifico, in quanto non interessava tutte le parti del genoma umano. I profili di metilazione nelle sequenze retrovirali umane endogene (HERV), che costituiscono circa l'8% del genoma umano, sono rimasti inalterati negli stessi cloni cellulari (Weber et al. 2016) che hanno rivelato distinti cambiamenti di metilazione in altre parti dei loro genomi (Weber et al. 2015). I modelli di metilazione del DNA dell'HERV nelle cellule transgeniche e di controllo esposte agli stessi protocolli sperimentali erano quasi identici (Weber et al. 2016).

- Ampliando gli studi sul ruolo del DNA estraneo nell'ambiente, abbiamo esplorato il destino del DNA estraneo isolato che era stato somministrato a topi di laboratorio. Il DNA estraneo ingerito dal cibo costituisce probabilmente l'incontro più abbondante e regolare di organi umani con DNA estraneo. Il batteriofago M13 DNA, il gene della proteina fluorescente verde (GFP) clonato con plasmide o il gene codificato dal DNA nucleare specifico della pianta per la ribulosio-1, 5-bisfosfato carbossilasi (Rubisco) sono stati somministrati per via orale a topi in un gran numero di differenti esperimenti. Circa l'1% del DNA nutrito è sopravvissuto al passaggio attraverso il tratto gastrointestinale murino in forma frammentata e potrebbe essere rintracciato in quantità ancora inferiori a diversi sistemi di organi, in particolare la milza e il fegato degli animali. In un esperimento, è stato possibile dimostrare che il DNA del test recuperato dalle cellule della milza era collegato a un segmento di DNA di 80 nt con un'omologia del 70% con il gene del recettore delle IgE di topo (Schubert et al. 1997). La linea germinale dei topi sembrava essere protetta dall'invasione del DNA ingerito dal cibo [(Hohlweg e Doerfler, 2001)]. Quindi sembra probabile che l'esposizione al DNA ingerito dal cibo sia una sfida continua alla stabilità del genoma nelle cellule stocasticamente coinvolte dell'organismo dei mammiferi. Non abbiamo informazioni su questo problema negli esseri umani.

3.7. Integrazione del vettore DNA dell'adenovirus

•Il laboratorio di Stefan Kochanek presso l'Università di Ulm in Germania ha condotto uno studio pilota per indagare se il DNA del vettore di adenovirus potesse integrarsi cromosomicamente a seguito del trasferimento genico mediato dal vettore di adenovirus nei topi [Stephen et al. 2010]. I vettori di adenovirus carenti di replicazione che trasportano diversi transgeni sono stati iniettati per via endovenosa nei topi. Negli epatociti che esprimono il transgene, sono stati trovati costrutti vettoriali integrati nel genoma del topo. L'analisi dei siti di giunzione tra il vettore e il DNA cellulare ha rivelato un legame covalente dei terminali del vettore al DNA cellulare del topo mediante ricombinazione eterologa a una frequenza di $6,7 \cdot 10^{-5}$ epatociti trasdotti. Ricombinanti omologhi sono stati identificati a frequenze cento volte inferiori (Stephen et al. 2010). Nella valutazione di questi risultati gli autori hanno suggerito che la frequenza della ricombinazione del DNA del vettore adenovirale eterologo con il genoma ricevente fosse paragonabile a quella delle mutazioni spontanee nelle cellule di mammifero. Naturalmente, è una questione aperta quali fattori inducano "mutazioni spontanee". Tra le altre cause, la ricombinazione del DNA umano con DNA estraneo potrebbe svolgere un ruolo importante nella generazione di mutazioni spontanee. Infine, la quantità di DNA del vettore di adenovirus confezionato con virione che viene abitualmente somministrato per via intramuscolare, ad es. con il vaccino AstraZeneca (50×10^9 virioni per dose di vaccino, equivalenti a circa $2,5 \mu\text{g}$ di DNA vettore di adenovirus per dose), è inferiore a quello di molti regimi di terapia genica. Per i dettagli vedere [https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/963928/UKPAR_COVID_19_Vaccine_AstraZeneca_23.02.2021.PDF].

3.8. RNA SARS-CoV-2 retroscritto e integrato nel genoma?

Motivato dai rapporti sulla diffusione prolungata dell'RNA SARS-CoV-2 e sui continui test RT-PCR positivi tra i sopravvissuti a Covid-19, Zhang et al. ha studiato se l'RNA di SARS-CoV-2 potesse essere retroscritto in DNA che a sua volta potrebbe integrarsi nel genoma dell'ospite e continuare a essere trascritto nell'RNA (Zhang et al., 2021).

Mediante analisi della sequenza nucleotidica, gli autori hanno osservato copie di DNA SARS-CoV-2 nei genomi di circa il 10-20% dei pazienti Covid-19. Questo DNA SARS-CoV-2 era affiancato da duplicazioni del sito bersaglio e sequenze di riconoscimento dell'endonucleasi LINE-1 di consenso. Queste ultime due caratteristiche non sono state sempre osservate. Quindi erano concepibili anche meccanismi indipendenti da LINE-1 per l'integrazione del DNA di SARS-CoV-2. È stato sottolineato che sono state trovate integrate solo parti subgenomiche del DNA di SARS-CoV-2. Questo tipo di integrazione preclude la possibilità che il virus infettivo venga prodotto da coloro che trasportano DNA virale SARS-CoV-2 frammentato. Le parti integrate del DNA di SARS-CoV-2 sono state frequentemente trascritte.

Gli autori hanno concluso che l'infezione da SARS-CoV-2 potrebbe portare alla sintesi di trascritti inversi codificati da retrotrasposoni LINE-1 endogene. Questi enzimi hanno generato retrotrascrizioni del DNA. Forse solo frammenti di questo DNA sono stati inseriti nei genomi umani e trascritti nell'RNA SARS-CoV-2. Questa scoperta potrebbe avere implicazioni nel contesto delle sequele a lungo termine delle infezioni da SARS-CoV-2 per i genomi dei pazienti Covid-19.

Inoltre, i vaccini a base di RNA, secondo quanto riferito, impiegati con successo in tutto il mondo dovranno essere esaminati anche in questo senso. Reperti imprevisti come quelli qui descritti dovranno essere riprodotti da altri. Probabilmente, i risultati qui descritti stimoleranno le indagini su meccanismi simili che influenzano ulteriori patogeni virali a RNA (Zhang et al., 2021).

3.9. Commenti sul vettore adenovirus scimpanzé utilizzato nel vaccino AstraZeneca SARS-CoV-2 ChAdOx1

I dettagli sulla struttura e sulla trascrizione della spina dorsale virale del vettore adenovirus scimpanzé che è stato utilizzato nella progettazione del vaccino AstraZeneca SARS-CoV-2 ChAdOx1, sono stati recentemente pubblicati (Almuqrin et al. 2021). In questo vettore, una parte non specificata della regione E1 del genoma adenovirale è stata sostituita dalla sequenza codificante della proteina spike SARS-CoV-2. Quindi il costrutto vettoriale è difettoso nella replicazione. L'espressione della glicoproteina spike SARS-CoV-2 nel costrutto vettoriale è stata posta sotto il controllo del promotore CMV [citomegalovirus] sensibile a Tet (Loew et al. 2010), uno dei forti promotori eucariotici. Il vettore, tuttavia, trasporta ancora 28 kbp, in particolare dei geni adenovirus tardivi degli scimpanzé (Almuqrin et al. 2021). La loro attività trascrizionale potrebbe essere ancora sotto il controllo remoto dei segmenti della regione E1 che probabilmente sono rimasti nel costrutto. A seconda della linea cellulare umana che è stata infettata dal controllo con il vettore, i geni della spina dorsale virale adenovirale sono stati trovati espressi a diversi livelli. Al momento non è noto quali geni dell'adenovirus dello scimpanzé siano effettivamente espressi nei vaccinati umani e come i profili di espressione adenovirale varino tra i diversi destinatari del vaccino. Finora, il contributo causale dei prodotti del gene tardivo adenovirale agli effetti collaterali del vaccino che sono stati osservati in tutto il mondo, non è stato studiato e non può essere escluso. Quindi, oltre ai possibili problemi a lungo termine derivanti dall'uso di vettori adenovirali dovuti alla loro integrazione e alle sequele epigenetiche (vedi sopra), i vettori adenovirus rimangono problematici poiché esprimono ancora prodotti genici virali (Almuqrin et al. 2021) il cui ruolo nel suscitare pericolosi effetti collaterali nei vaccinati umani non è stata valutata in modo critico. Non sono state presentate informazioni sull'entità e sulla natura dell'espressione del gene adenovirale ChAdOx1 nei vaccinati umani. In assenza delle funzioni transattivanti della regione ChAdOx1 E1, i transattivatori cellulari negli organismi dei vaccinati potrebbero facilitare l'espressione dei geni virali tardivi ChAdOx1. Le omologie a sequenza breve in questi geni ChAdOx1 con i geni dell'adenovirus umano potrebbero essere sufficienti per suscitare risposte immunitarie di memoria nei vaccinati con forza diversa individualmente. Quest'ultimo potrebbe essere accentuato nei giovani che sono ancora più vicini alle loro esperienze infantili con le infezioni adenovirali umane. Le giovani donne che forniscono la maggior parte dell'assistenza ai pazienti e agli anziani nella società potrebbero quindi essere colpite in modo preferenziale da queste reazioni immunologiche eccessive, quindi questi vaccinati potrebbero essere colpiti più frequentemente da reazioni avverse alla vaccinazione. Il motivo per cui i trombociti dovrebbero essere specificamente presi di mira da questo tipo di risposte immunitarie della memoria resta da indagare. In questo contesto sarà d'obbligo ricordare che la trombocitopenia è stata riscontrata anche nei riceventi di costrutti adenovirus-vettoriali nel corso di applicazioni terapeutiche geniche (Lopez-Gordo et al, 2017). I ricercatori che lavorano sui vettori adenovirali sono stati a conoscenza dell'incidente di Jesse Gelsinger nel 1999 [https://en.wikipedia.org/wiki/Jesse_Gelsinger]. A quel tempo, un maschio di 18 anni che soffriva di una malattia metabolica genetica legata all'X, deficit di ornitina transcarbamilasi del fegato, fu il primo destinatario di un regime terapeutico genico basato sul vettore adenovirale e morì pochi giorni dopo l'applicazione del adenovirus ricombinante. I possibili fattori coinvolti nell'esito fatale sono stati studiati al momento, ma non è stato possibile identificare chiaramente. L'incidente ha interrotto per lungo tempo l'uso di vettori di adenovirus nella terapia genica. Molto recentemente, un'indagine dettagliata, apparentemente continua, su questo incidente fatale lo ha attribuito alla generazione di complessi adenovirus-anticorpo che hanno contribuito a "l'infiammazione sistemica letale" nell'organismo del ricevente (Somanathan et al. 2020). Naturalmente, il vettore di adenovirus umano di tipo 5 (Ad5) che è stato impiegato nella misura terapeutica genica del 1999 non può essere direttamente confrontato con il vettore di adenovirus di scimpanzé utilizzato nel vaccino SARS-CoV-2 nel 2021. I vettori derivati da Ad5 sono, tuttavia, parte di altri vaccini SARS-CoV-2. Pertanto, è necessario prestare estrema cautela quando si iniettano vettori adenovirali nell'uomo. Si spera che le esperienze catastrofiche del passato non riemergano con i vettori di oggi che, tuttavia, non sono poi così diversi da quelli problematici più vecchi. A lungo termine e dopo una più attenta

considerazione, i vaccini convenzionali basati sulla proteina spike ricombinante avrebbero potuto essere una scelta più sicura.

4. Conclusioni

La vita si è sviluppata in un DNA, molto probabilmente preceduto da un RNA, mondo. Viviamo tutti in questo mondo del DNA a partire dai nostri cortili quando scaviamo la terra con innumerevoli microrganismi e il loro DNA sepolto in detriti secolari di resti di animali e piante in decomposizione. Considera solo il fogliame annuale. Con la nostra alimentazione quotidiana assumiamo DNA estraneo in enormi quantità che non viene momentaneamente digerito in mononucleotidi ma persiste transitoriamente sotto forma di frammenti che sono in grado di entrare nell'organismo umano e distribuirsi in diversi sistemi di organi umani. Il DNA è una molecola molto stabile. In minuscole schegge di ossa di individui della popolazione di Neanderthal di circa 50.000 anni fa, i frammenti di DNA di Neanderthal sono persistiti fino ad oggi. Nei campioni di osso scavati di Neanderthal, che Svante Pääbo e i suoi colleghi hanno studiato, il DNA di Neanderthal rappresentava solo circa lo 0,5% del DNA dei campioni ossei che hanno analizzato (Prüfer et al. 2017). Quando si è presentata l'occasione, il DNA estraneo e la sua capacità di sopravvivere e ricombinarsi con il DNA di organismi viventi potrebbero aver giocato un ruolo importante nell'evoluzione. Mentre stiamo lottando con la pandemia di Covid-19 sul pianeta Terra, il rover Perseverance sta scavando alla ricerca di tracce di decadimento organico sul pianeta Marte.

Questa breve recensione è stata presentata qui per facilitare una discussione indipendente e più equilibrata sui potenziali rischi dovuti alla presenza di DNA vettore adenovirus (AstraZeneca, Johnson & Johnson, Sputnik V e altri) o RNA SARS-CoV-2 (BioNTech/Pfizer, Moderna) nei vaccini che dovrebbero proteggere dal Covid-19. Naturalmente, le iniezioni di vaccini basati su vettori nel muscolo deltoide umano sono una questione diversa dai rari eventi casuali che portano a eventi di ricombinazione tra DNA estraneo e umano nei sistemi sperimentali come descritto sopra. Inoltre, al momento non è possibile valutare realisticamente né il tipo né la frequenza delle conseguenze di eventi di integrazione di vettori rari. Al contrario, i risultati recentemente pubblicati sui benefici della protezione contro il Covid-19 offerti dai vaccini BioNTech/Pfizer sono incoraggianti (Dagan et al. 2021). Certo, la giuria è ancora fuori fino a che punto uno qualsiasi dei vaccini proteggerà contro le nuove varianti SARS-CoV-2 più pericolose dal Regno Unito, Sud Africa, Brasile, India (ora denominate α , β , γ , δ , rispettivamente) o contro varianti sconosciute che potrebbero sorgere in futuro dati i livelli scarsamente controllati di replicazione virale in tutto il mondo (Weber et al., 2021). Infine, ignoriamo la protezione vaccinale contro lo sviluppo di sintomi prolungati e ad insorgenza tardiva di Covid-19.

Le informazioni presentate in questa recensione aiuteranno i futuri vaccinati a valutare una valutazione del rischio rispetto al beneficio, vale a dire gli eventi di integrazione del vettore adenovirus o del DNA della trascrizione inversa dell'RNA SARS-CoV-2 a bassa frequenza rispetto, si spera, all'elevata efficacia e protezione del vaccino. Inoltre, poiché l'infezione da SARS-CoV-2 di per sé può essere associata all'integrazione delle trascrizioni inverse dell'RNA virale (Zhang et al., 2021), questa serie di eventi potrebbe diventare inevitabile in qualsiasi infezione da SARS-CoV-2. Infine, la misura in cui i prodotti del gene adenovirale potrebbero essere co-espressi con la glicoproteina spike SARS-CoV-2 dopo l'iniezione di un vaccino vettoriale nei muscoli deltoidei umani rimane non studiata. Al momento non possiamo misurarne i possibili effetti sull'organismo umano, se effettivamente espressi. Opportunità e rischi, allo stesso tempo, rimangono al di là delle nostre aspettative di controlli assoluti perché la vita e l'evoluzione probabilmente sono state influenzate da "meccanismi casuali" fin dall'inizio. Osservazioni cliniche su risultati positivi di lunga durata del test RT-PCR che implicano l'integrazione del DNA SARS-CoV-2 nel genoma umano nel corso di alcuni casi di Covid-19, rendono irrealistiche le apprensioni sugli eventi di

integrazione associati al vaccino, se confrontati con l'auspicato per i benefici della vaccinazione contro il Covid-19. La popolazione umana del 2021 affronta una crisi biomedica di dimensioni senza precedenti, negli ultimi tempi, e dovrà accettare le migliori contromisure attualmente disponibili contro il Covid-19: la vaccinazione.

4.1. Nota aggiunta nella revisione

Al culmine di una pandemia senza precedenti, il rapido sviluppo di efficaci vaccini SARS-CoV-2 è stato accolto con sollievo e ammirazione per la scienza sperimentale (Sahin et al., 2021). Tuttavia, dal punto di vista medico si dimostrerà convincente considerare possibili sequele di iniezioni di vaccini in miliardi di esseri umani. Secondo quanto riferito, una dose da 0,5 ml di adenovirus ricombinante ChAdOx1-S di AstraZeneca contiene 5×10^{10} particelle di adenovirus 26 di scimpanzé (Ad26) (https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/963928/UKPAR_COVID_19_Vaccine_AstraZeneca_23.02.2021.pdf) che trasportano un equivalente di circa 2,5 µg di DNA ricombinante di scimpanzé Ad26.

Le particelle di adenovirus probabilmente vengono assorbite dalle cellule del sistema linfatico e del fegato e il loro DNA verrà trasportato ai nuclei delle cellule. In questa recensione, sono state presentate le prove per l'inserimento del DNA di adenovirus nei genomi del ricevente e le sue conseguenze.

(i) I vaccini basati sul vettore di adenovirus possono portare all'integrazione del DNA di adenovirus a frequenza sconosciuta e con conseguenze epigenetiche imprevedibili. È concepibile che gli effetti epigenetici possano essere notati solo anni dopo la vaccinazione.

(ii) I geni adenovirali ancora presenti nel DNA vettore dell'adenovirus potrebbero diventare trans-attivati da fattori cellulari e portare a reazioni di memoria immunitaria variabili individualmente che sono vissute dai vaccinati come sintomi transitori post-vaccinazione. Gli esiti fatali dovuti a reazioni immunitarie estreme sono stati fortunatamente eventi molto rari.

(iii) L'RNA di SARS-CoV-2 o suoi segmenti, come il gene spike, può essere retrotrascritto dalle trascrittasi inverse codificate da LINE-1 o da altri fattori, e il DNA così sintetizzato può integrarsi a frequenze e posizioni sconosciute nei genomi dei vaccinati. Naturalmente, lo stesso vale per tutte le infezioni da SARS-CoV-2. Pertanto, il rischio di eventi di integrazione indesiderati delle trascrizioni inverse dell'RNA SARS-CoV-2 in caso di infezioni da SARS-CoV-2 sembra simile a quello della vaccinazione con il vaccino Covid-19 a base di mRNA.

Questi meccanismi della biologia di base devono essere considerati nel contesto dei programmi di vaccinazione di massa degli esseri umani in tutto il mondo. Se e come questi meccanismi giocheranno un ruolo predominante in medicina in futuro dovranno essere seguite da meta-analisi critiche. Al momento non esiste un'alternativa praticabile alla vaccinazione di miliardi di esseri umani. La popolazione umana attualmente partecipa all'esposizione al DNA estraneo in un enorme esperimento. Dopo il completamento delle vaccinazioni in tutto il mondo, dovrebbe essere istituito un programma sentinella post-vaccinazione per monitorare l'esacerbazione di disturbi umani inaspettati, forse nuovi, negli individui vaccinati.