

Vaccini a mRNA sintetico e disregolazione trascrittonica: Evidenze di nuovi eventi avversi e tumori post-vaccinazione

Natalia Lidmar Von Ranke, Wei Zhang, Philipp Anokhin, Nicolas Hulscher, Kevin McKernan, Peter McCullough, John Catanzaro

Tipo di specialità: Medicina, ricerca e sperimentale

Provenienza e peer review: Articolo non richiesto; revisione esterna

Modello di peer review: Singolo cieco

Classificazione del rapporto di peer review:

Qualità scientifica: Grado C

Novità: Grado D

Creatività o innovazione: Grado D

Significato scientifico: Grado D

P-Reviewer: D'Agostino S, PhD, Postdoc, Italia

Ricevuto: 5 settembre 2025

Rivisto: 1 ottobre 2025

Accettato: 24 ottobre 2025

Pubblicato online: 20 dicembre 2025

Tempo di elaborazione: 105 giorni e 14,4 ore

Affiliazioni degli autori:

Natalia Lidmar Von Ranke, Wei Zhang, Philipp Anokhin, John Catanzaro, Sviluppo di R e D, Neo7Bioscience, Dallas, TX 75032, Stati Uniti

Nicolas Hulscher, Dipartimento di Epidemiologia, McCullough Foundation, Dallas, TX 75032, Stati Uniti

Kevin McKernan, Sviluppo di R e D, Medicinal Genomics, Beverly, MA 01915, Stati Uniti

Peter McCullough, Sviluppo di R e D, McCullough Foundation, Dallas, TX 75032, Stati Uniti

Autore corrispondente: John Catanzaro, MD, PhD, Sviluppo di R e D, Neo7Bioscience, 2500 Summer Lee Dr, Rockwall, Dallas, TX 75032, Stati Uniti
john.catanzaro@neo7bioscience.com

Abstract

BACKGROUND

I vaccini a messaggero RNA (mRNA) sintetico hanno sollevato preoccupazioni riguardo all'espressione prolungata della proteina spike, all'attivazione immunitaria e ai potenziali effetti off-target.

AIM

Indagare le alterazioni trascrittomiche in individui con nuovi eventi avversi o cancro a seguito della vaccinazione mRNA contro la malattia da coronavirus 2019.

METHODS

Il sequenziamento RNA bulk è stato eseguito su sangue periferico da due gruppi di pazienti: (1) Individui con nuovi eventi avversi non maligni; e (2) Individui con nuova diagnosi di cancro post-vaccinazione. Un gruppo di controllo di individui normali è stato utilizzato per il confronto. L'espressione genica differenziale è stata analizzata utilizzando DESeq2, e l'analisi di arricchimento dei geni è stata condotta utilizzando il database MSigDB e set di geni personalizzati.

RESULTS

Entrambi i gruppi di pazienti vaccinati hanno mostrato una diffusa disregolazione trascrittonica. Nel gruppo con eventi avversi non maligni, gli arricchimenti hallmarch includevano disfunzione mitocondriale, stress mediato dal proteasoma, instabilità trascrittonica e infiammazione sistemica. Il gruppo con cancro ha mostrato ulteriori hallmarch di instabilità genomica e riprogrammazione epigenetica. Il decadimento mediato da nonsense, stress ribosomale e attivazione dell'oncogene mielocitomatosi erano prominenti in entrambi i gruppi, mentre la segnalazione immunitaria tramite recettori toll-like e interferoni di tipo I era particolarmente elevata nei pazienti oncologici. I profili trascrittomici osservati indicano risposte allo stress cellulare, disfunzione mitocondriale e disregolazione immunitaria a seguito dell'esposizione ai vaccini mRNA, potenzialmente in individui suscettibili.

CONCLUSION

Le firme molecolari condivise e distinte in entrambe le coorti dimostrano meccanismi sottostanti che contribuiscono alla sintomatologia post-vaccinica e alle complicanze, inclusa l'oncogenesi e/o la progressione di malattie maligne. Questi risultati sottolineano la necessità di un'indagine più approfondita sulla sicurezza a lungo termine dei vaccini mRNA e sulla variabilità della risposta dell'ospite.

Parole chiave: Malattia da coronavirus; Vaccino; RNA-seq; Disregolazione immunitaria; Cancro

©The Author(s) 2025. Pubblicato da Baishideng Publishing Group Inc. Tutti i diritti riservati.

Core Tip

Questo studio dimostra che gli individui che manifestano nuovi eventi avversi o cancro dopo la vaccinazione con messaggero RNA (mRNA) contro la malattia da coronavirus 2019 mostrano una diffusa disregolazione trascrittonica. Il sequenziamento RNA bulk ha rivelato hallmarch di disfunzione mitocondriale, infiammazione sistemica, stress del proteasoma e ribosomale, e decadimento mediato da nonsense, con ulteriore instabilità genomica e riprogrammazione epigenetica nei pazienti oncologici. Notevolmente, sono state osservate l'attivazione dell'oncogene mielocitomatosi e una segnalazione immunitaria rafforzata tramite recettori toll-like e interferoni di tipo I. Questi risultati evidenziano firme molecolari condivise e distinte, sottolineando la necessità di ulteriori indagini sulla sicurezza a lungo termine dei vaccini mRNA e sulla variabilità dell'ospite.

CITATION

Von Ranke NL, Zhang W, Anokhin P, Hulscher N, McKernan K, McCullough P, Catanzaro J. Synthetic messenger RNA vaccines and transcriptomic dysregulation: Evidence from new-onset adverse events and cancers post-vaccination. *World J Exp Med* 2025; 15(4): 113869

URL: <https://www.wjgnet.com/2220-315x/full/v15/i4/113869.htm>

DOI: <https://dx.doi.org/10.5493/wjem.v15.i4.113869>

INTRODUZIONE

I vaccini a messaggero RNA (mRNA) sintetico rappresentano una piattaforma di immunizzazione innovativa che consegna mRNA chimicamente modificato, incapsulato in nanoparticelle lipidiche (LNP), per codificare ed esprimere antigeni virali nelle cellule umane. Lo sviluppo accelerato dei vaccini mRNA è stato principalmente guidato dall'urgenza della pandemia di malattia da coronavirus 2019 (COVID-19), supportato da autorizzazioni di emergenza, produzione basata su piattaforma e la conduzione parallela piuttosto che sequenziale delle fasi degli studi clinici. Sebbene inizialmente promossi per la loro rapida produzione e forte immunogenicità, un crescente corpo di evidenze ha identificato una serie di eventi avversi, tra cui miocardite, trombosi, accidenti cerebrovascolari, amiloidogenesi, artralgia, disturbi mestruali, preoccupazioni riproduttive e nuove neoplasie maligne[1-5]. Questi eventi hanno sollecitato un rinnovato scrutinio dei meccanismi molecolari attivati dalle costruzioni mRNA sintetiche e del loro destino intracellulare[6,7].

A differenza dell'mRNA endogeno, i trascritti derivati dai vaccini incorporano caratteristiche non naturali come la sostituzione N1-metilpseudouridina (m1Ψ), code poli(A) estese e regioni non tradotte ottimizzate per migliorare stabilità ed efficienza di traduzione. Queste stesse modifiche possono alterare il metabolismo e la sorveglianza dell'RNA, contribuendo all'infedeltà ribosomale, allo spostamento del frame +1 e alla ripiegamento difettoso delle proteine[8]. Studi indipendenti hanno riportato la trascrizione inversa dell'mRNA vaccinale in DNA tramite elementi endogeni LINE-1 (long interspersed nuclear element-1), evidenziando problemi di integrazione genomica ed espressione persistente[8,10]. Analisi recenti dei flaconcini del vaccino BNT162b2 hanno rivelato residui di DNA plasmidico, incluso l'enhancer SV40 e geni di resistenza agli antibiotici, sollevando preoccupazioni sul potenziale rischio oncogenico dall'esposizione genomica non intenzionale[11-15]. Inoltre, ricerche recenti hanno dimostrato che la proteina spike tradotta dai vaccini mRNA può persistere nella circolazione per periodi estesi, ben oltre le aspettative farmacocinetiche iniziali, potenzialmente mantenendo la segnalazione infiammatoria e l'attivazione immunitaria[16-18]. Infine, alcuni studi suggeriscono che il coronavirus 2 della sindrome respiratoria acuta grave (SARS-CoV-2) porta firme molecolari coerenti con l'assemblaggio del genoma sintetico, sollevando ulteriori preoccupazioni sulle piattaforme RNA ingegnerizzate e le loro potenziali conseguenze biologiche impreviste[19]. Queste caratteristiche collettivamente sollevano preoccupazioni riguardo alle conseguenze cellulari non intese dell'esposizione all'mRNA sintetico.

Per colmare questa lacuna, abbiamo condotto un'analisi trascrittometrica comparativa utilizzando dati di sequenziamento RNA bulk da sangue intero di pazienti con nuovi eventi avversi (gruppo 1) e pazienti con nuovi tumori (gruppo 2) a seguito della vaccinazione COVID-19 mRNA, insieme a controlli normali. L'analisi dell'espressione differenziale e l'analisi di arricchimento dei set di geni (GSEA) sono state eseguite per identificare pathway molecolari specifici perturbati in ciascun gruppo. Confrontando questi due profili, questo studio mira a evidenziare le perturbazioni trascrittometriche potenziali associate alla patologia correlata ai vaccini e esplorare se firme molecolari distinte o condivise possano sottendere diverse traiettorie cliniche post-vaccinazione.

MATERIALI E METODI

Caratteristiche della popolazione di pazienti e raccolta dei campioni

Abbiamo reclutato partecipanti adulti (≥ 18 anni) che hanno sviluppato nuovi sintomi a seguito della somministrazione di vaccini COVID-19 basati su mRNA [BNT162b2 (Pfizer) o mRNA-1273 (Moderna)]. Tutti i partecipanti hanno fornito consenso informato scritto prima dell'inclusione.

La popolazione dello studio è stata suddivisa in due gruppi: (1) Gruppo 1: Costituito da tre individui che hanno sperimentato eventi avversi non maligni post-vaccinazione con sintomi emergenti entro un mese dalla vaccinazione; e (2) Gruppo 2: Comprendente sette individui diagnosticati con nuove malignità entro un anno dalla vaccinazione. Nessun partecipante in entrambi i gruppi aveva una storia precedente di malattie croniche o predisposizione genetica nota prima della vaccinazione e dell'insorgenza dei sintomi. Le manifestazioni cliniche di ciascun paziente sono riassunte nella Tabella 1. Come riferimento, i dati RNA-seq da 803 individui non vaccinati sono stati recuperati dal dataset GTEx[20]. Questi campioni di controllo sono stati raccolti prima dello sviluppo dei vaccini COVID-19, assicurando che tutti gli individui di controllo fossero non vaccinati[21].

I campioni di sangue periferico sono stati raccolti da infermieri autorizzati presso siti clinici affiliati a Neo7Bioscience, seguendo protocolli di biosicurezza istituzionali. La venipuntura è stata eseguita utilizzando tecnica sterile standard, e il sangue intero è stato prelevato in provette streck etichettate e conservato a 4°C . I campioni dal gruppo 1 (gruppo con sintomi post-vaccinazione) sono stati trasportati lo stesso giorno in contenitori raffreddati al Genomics Center presso l'Università del Texas del Nord per l'elaborazione. I campioni dal gruppo 2 (gruppo con malignità post-vaccinazione) sono stati raccolti in provette PAXgene Blood RNA (Qiagen) e trasportati a temperatura controllata a Psomagen-Multiomics per i servizi di analisi dei dati e l'elaborazione a valle.

Estrazione dell'RNA

L'RNA totale è stato estratto dal sangue intero utilizzando flussi di lavoro di purificazione basati su colonna compatibili con l'RNA-seq a valle. Per il gruppo 1, l'RNA è stato estratto con il kit Quick-DNA/RNA Viral (Zymo Research), incluso trattamento DNasi su colonna per rimuovere la contaminazione da DNA genomico. Per il gruppo 2, l'RNA è stato estratto dall'intero volume di sangue di una singola provetta PAXgene Blood RNA utilizzando il kit PAXgene Blood RNA (Qiagen), seguendo il protocollo del produttore. L'RNA estratto è stato quantificato e conservato a -20°C fino all'uso. Per entrambi i gruppi, la qualità dell'RNA è stata valutata mediante profilo elettroforetico (Agilent TapeStation 4200 o equivalente), e solo i campioni che soddisdevano le soglie di qualità (ad esempio, numero di integrità dell'RNA ≥ 7.0 o metriche QC equivalenti) sono stati avanzati alla preparazione delle librerie.

Preparazione delle librerie e sintesi del DNA complementare e sequenziamento ad alta throughput

Le librerie RNA-seq sono state generate utilizzando protocolli specifici per il filamento con deplezione dell'RNA ribosomale (rRNA) per massimizzare il rilevamento dei trascritti codificanti. Per il gruppo 1, le librerie sono state preparate utilizzando il kit Illumina TruSeq Stranded Total RNA con chimica di deplezione Ribo-Zero (Illumina). L'RNA è stato frammentato enzimaticamente, trascritto inversamente in DNA complementare (cDNA), riparato alle estremità, con coda A, ligato agli adapter e amplificato mediante reazione a catena della polimerasi (PCR). Le librerie sono state quantificate fluorimetricamente, le dimensioni dei frammenti sono state verificate mediante elettroforesi, e il sequenziamento è stato eseguito su Illumina NextSeq 550 (High Output v2.5, 300 cicli) con letture paired-end di 150 bp.

Per il gruppo 2, le librerie sono state preparate utilizzando il kit Illumina Stranded Total RNA Ribo-Zero Plus (Illumina), incorporando deplezione dell'rRNA e sintesi del cDNA specifica per il filamento. L'RNA è stato frammentato enzimaticamente, trascritto inversamente in cDNA a filamento singolo, convertito in cDNA a doppio filamento, riparato alle estremità, adenilata, ligata agli adapter specifici di Illumina e amplificata mediante PCR. La qualità delle librerie e la distribuzione delle dimensioni dei frammenti sono state valutate utilizzando D5000 ScreenTape su Agilent TapeStation 4200. Le librerie sono state conservate a -20°C prima del sequenziamento. Le librerie normalizzate e raggruppate sono state sequenziate sulla piattaforma Illumina NovaSeq X (kit NovaSeq x Series 25B Reagent, 300 cicli), generando letture paired-end di 151 bp con una resa target di 3,02 Gb per campione (circa 20 milioni di letture). PhiX è stato aggiunto all'1% come controllo interno, e le metriche di qualità del sequenziamento (punteggi Q30, %PF) sono state monitorate in tempo reale utilizzando il visualizzatore di analisi del sequenziamento di Illumina.

Prelaborazione dei dati, controllo qualità e allineamento

I dati grezzi di sequenziamento, sotto forma di file fastq paired-end, sono stati prima organizzati per campione e tipo di lettura (R1 e R2). Questi file fastq sono stati memorizzati in una directory dedicata, e il comando cat è stato utilizzato per raggrupparli in base ai loro identificatori campione. I file R1 e R2 per ciascun campione sono stati poi fusi in un singolo file per ogni tipo di lettura, risultando in file fusi forward e reverse pronti per l'analisi a valle.

I controlli di qualità sono stati eseguiti prima della fase di allineamento per assicurare l'integrità dei dati. Le letture di sequenziamento sono state allineate al genoma di riferimento umano (hg38) utilizzando STAR[22], un allineatore ampiamente utilizzato per i dati di sequenziamento RNA. STAR gestisce efficacemente l'allineamento delle letture in un ambiente multi-thread, ottimizzando il tempo di elaborazione. Le letture allineate sono state poi emesse come file BAM, ordinati per coordinata, che è la pratica standard per le fasi successive dell'analisi.

****Tabella 1** Riassunto dei partecipanti allo studio, manifestazioni cliniche e raggruppamenti diagnostici**

ID Paziente	Gruppo	Condizione/sintomi
P1	1: Eventi avversi non maligni	Brain fog e stanchezza cronica
P2	1: Eventi avversi non maligni	Lesione cardiovascolare, trombosi e stanchezza cronica
P3	1: Eventi avversi non maligni	Lesione cardiovascolare, trombosi e stanchezza cronica
P4	2: Cancro	Glioblastoma multiforme
P5	2: Cancro	Adenocarcinoma della prostata
P6	2: Cancro	Tumore alla vescica
P7	2: Cancro	Linfoma follicolare
P8	2: Cancro	Cancro alla prostata
P9	2: Cancro	Glioblastoma multiforme
P10	2: Cancro	Linfoma follicolare

Analisi dell'espressione differenziale e visualizzazione del volcano plot

Per investigare le alterazioni trascrittomiche associate agli esiti correlati ai vaccini mRNA, abbiamo eseguito due analisi distinte dell'espressione differenziale, ciascuna confrontando un gruppo di pazienti con un pool comune di controlli normali (n=803)[20]. Il primo confronto includeva individui dal gruppo 1, che hanno sviluppato nuovi sintomi non maligni a seguito della vaccinazione mRNA (n=3), mentre il secondo comprendeva individui dal gruppo 2, diagnosticati con cancro come nuova condizione poco dopo la vaccinazione (n=7). Per entrambe le analisi, i conteggi genici grezzi generati da Salmon[23] sono stati inseriti in DESeq2[24], che ha applicato la normalizzazione interna e modellato la dispersione utilizzando la distribuzione binomiale negativa. La riduzione delle variazioni logaritmiche (log2 fold change) è stata

eseguita utilizzando il metodo "apeglm" per migliorare la stima della dimensione dell'effetto, in particolare per i geni con conteggi di lettura bassi.

Per visualizzare i pattern globali dell'espressione genica, sono stati generati volcano plot per ogni confronto. In questi grafici, l'asse x rappresenta il log2 fold change, e l'asse y rappresenta il negativo del log10 del valore P aggiustato. I geni con log2 fold change maggiore di +1 e un valore P aggiustato (Padj) inferiore a 0,05 sono stati considerati significativamente sovraespressi e sono stati colorati in rosso, mentre quelli con log2 fold change inferiore a -1 e Padj<0,05 sono stati considerati significativamente sottoespressi e sono stati colorati in blu. Tutti i geni rimanenti che non soddisfacevano questi criteri sono stati visualizzati in grigio.

GSEA

Per investigare le perturbazioni trascrittomiche associate all'esposizione ai vaccini mRNA, abbiamo analizzato i dati RNA-seq da due gruppi di casi: (1) Gruppo 1: Comprendente tre individui che hanno sviluppato nuovi effetti avversi correlati ai vaccini; e (2) Gruppo 2: Costituito da sette individui diagnosticati con nuovo cancro a seguito della vaccinazione mRNA COVID-19. Entrambi i gruppi sono stati confrontati con una coorte di riferimento condivisa di 803 individui in un gruppo di controllo normale, i cui dati RNA-seq sono stati recuperati dal dataset GTEx[20]. L'analisi dell'espressione genica differenziale è stata condotta utilizzando DESeq2[24], e i geni sono stati classificati per log2 fold change per generare il file di input per l'analisi di arricchimento.

Abbiamo poi eseguito GSEA utilizzando la modalità preranking dello strumento GSEA 4.4.0 del Broad Institute[25]. Questo approccio è stato selezionato a causa dello squilibrio significativo delle classi (3 campioni vs 803 campioni), poiché migliora la stabilità e l'interpretabilità dei risultati di arricchimento. La statistica di arricchimento "weighted" è stata applicata per incorporare sia la classificazione dei geni che l'entità dell'espressione, aumentando la sensibilità alle perturbazioni biologicamente rilevanti. Abbiamo utilizzato 1000 permutazioni dei set di geni per stimare la significatività statistica e selezionato l'opzione "no collapse" per mantenere i simboli genici senza mappatura degli alias.

La GSEA è stata condotta sistematicamente attraverso multiple collezioni MSigDB[26]: (1) H (Hallmark); (2) C2 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes e REACTOME); (3) C5 (Processi biologici dell'ontologia genica); (4) C7 (firme immunologiche); e (5) Set di geni personalizzati inclusi Gavish e firme di espressione derivate dall'estratto di semi d'uva curate. I risultati dell'arricchimento sono stati interpretati basandosi sul Normalized Enrichment Score (NES) e sul tasso di scoperta falsi (FDR) (q value), selezionando i set di geni che erano fortemente arricchiti (NES positivo) o soppressi (NES negativo), che indicavano rispettivamente funzioni biologiche sovraregolate o sottoregolate. Per l'analisi a valle, sono stati mantenuti solo i set di geni con FDR<0,25 e NES assoluto $\geq 1,5$. I set di geni arricchiti e soppressi principali sono stati manualmente raggruppati in categorie di pathway molecolari di ordine superiore relative ai sintomi del gruppo di pazienti.

Per migliorare la rilevanza biologica, abbiamo escluso i set di geni associati a tessuti non sanguigni (ad esempio, cervello, retina, pelle) e sviluppo embrionale, poiché è improbabile che riflettano l'attività trascrittionale nel sangue periferico. Questo filtraggio ha minimizzato il rumore e focalizzato l'analisi sui pathway rilevanti per le risposte immunitarie, infiammatorie e sistemiche.

Mappa di interazione proteina-proteina

Per costruire le reti di interazione proteina-proteina (PPI), le informazioni di interazione dei geni espressi differenzialmente dallo strumento di ricerca per il recupero di geni/proteine interagenti (STRING) sono state caricate sulla piattaforma software Cytoscape[27,28]. Il database STRING è una risorsa online completa che compila e prevede le PPI attraverso numerosi organismi[29,30]. Integra associazioni note e previste derivate da dati sperimentali, metodi di previsione computazionale, analisi di co-espressione, text mining e database curati. Ogni interazione è punteggiata e visualizzata in una rete interattiva, aiutando i ricercatori a esplorare

associazioni funzionali tra proteine all'interno di pathway cellulari o processi biologici[31]. La rete può essere visualizzata all'interno di STRING o può essere esportata direttamente su Cytoscape. Cytoscape combina reti di interazione biomolecolare con dati di espressione ad alta throughput e altri stati molecolari in un modello di rete concettuale integrato.

RISULTATI

Per caratterizzare l'impatto trascrittoriale globale della vaccinazione mRNA in individui con esiti avversi post-vaccinazione, abbiamo condotto analisi dell'espressione genica differenziale confrontando ciascun gruppo di pazienti con la coorte di controllo normale. Come mostrato nella Figura 1, i volcano plot visualizzano la distribuzione dei cambiamenti dell'espressione genica sia per il gruppo 1, nuovi sintomi non maligni post-vaccinazione (Figura 1A), che per il gruppo 2, nuove diagnosi di cancro (Figura 1B). In entrambi i gruppi, è osservato uno spostamento trascrittomico chiaro, con centinaia di geni che mostrano disregolazione significativa. Notevolmente, il gruppo con cancro mostra una distribuzione più ampia di geni sottoespressi, incluse diverse variazioni con entità estreme, suggerendo una profonda soppressione dei pathway regolatori chiave.

La GSEA è stata eseguita separatamente per entrambi i gruppi dello studio: (1) Gruppo 1: Comprendente individui con nuovi eventi avversi a seguito della vaccinazione mRNA COVID-19; e (2) Gruppo 2: Comprendendo individui diagnosticati con nuovo cancro dopo la vaccinazione, per caratterizzare le perturbazioni trascrittomiche associate all'esposizione al vaccino. La GSEA è stata condotta utilizzando le collezioni di set di geni predefinite MSigDB, e i set di geni arricchiti sono stati sistematicamente raggruppati secondo la loro rilevanza per i pathway hallmarch molecolari di ordine superiore (Tabelle 2 e 3). Questo raggruppamento basato sui pathway ha permesso l'interpretazione integrativa delle alterazioni trascrittomiche attraverso i domini della biologia dei sistemi.

Nel gruppo 1, i set di geni arricchiti principali si sono raggruppati in sei categorie hallmarch chiave: (1) Disfunzione del trasporto elettronico mitocondriale e specie reattive dell'ossigeno (ROS); (2) Stress della degradazione proteica mediata dal proteasoma; (3) Instabilità trascrittomica e stress tradizionale; (4) Risposta infiammatoria e immunitaria sistemica; (5) Disfunzione dell'endotelio; e (6) Segnalazione proliferativa e controllo tumorale soppresso. In contrasto, il gruppo 2 ha mostrato un pattern di arricchimento distinto ma sovrapposto. Gli hallmarch identificati in questo gruppo includono: (1) Instabilità trascrittomica e stress tradizionale; (2) Risposta infiammatoria e immunitaria sistemica; (3) Disfunzione dell'endotelio; (4) Segnalazione proliferativa e controllo tumorale soppresso; e (5) Instabilità genomica e spostamento epigenetico. Come mostrato nella Tabella 1, molteplici set di geni all'interno di ciascuna categoria hallmarch hanno dimostrato forti punteggi di arricchimento ($\text{NES} > 1,5$ o $< -1,5$) e valori q di FDR statisticamente significativi ($\text{FDR} < 0,25$), supportando la presenza di disregolazione molecolare coordinata. Le curve rappresentative dei punteggi di arricchimento sono fornite nelle Figure Supplementari 1 e 2 per illustrare la distribuzione dei ranghi genici che contribuiscono a ciascun hallmarch. Inoltre, le Tabelle Supplementari 1 e 2 forniscono i nomi standard, i nomi sistematici e i collegamenti esterni o le pubblicazioni sorgente per tutti i set di geni arricchiti.

Per esplorare ulteriormente il panorama molecolare associato alle perturbazioni trascrittomiche indotte dal vaccino, l'analisi della rete PPI è stata condotta per i geni più significativamente disregolati in ciascun gruppo dello studio. Come mostrato nella Figura 2, la mappa PPI per il gruppo 1 (individui con nuovi eventi avversi post-vaccinazione) e la Figura 3 mostra la mappa PPI per il gruppo 2 (individui con nuovo cancro a seguito della vaccinazione).

Tabella 2 Risultati dell'arricchimento dei set di geni per il gruppo 1 categorizzati per pathway molecolare

Pathway molecolari	Nome standard MSigDB	NES	FDR
Disfunzione del trasporto elettronico mitocondriale e ROS			
	KEGG_MEDICUS_REFERENCE_MITOCHONDRIAL_COMPLEX_I_IN_THERMOGENESIS	1,86	0,11
	KEGG_MEDICUS_VARIANT_MUTATION_INACTIVATED_PINK1_TO_ELECTRON_TRANSFER_IN_COMPLEX_I		
1,73	0,10		
KEGG_MEDICUS_VARIANT_MUTATION CAUSED_ABERRANT_ABETA_TO_ELECTRON_TRANSFER_IN_COMPLEX			
_I	1,69	0,09	
KEGG_MEDICUS_VARIANT_MUTATION CAUSED_ABERRANT_SNCA_TO_ELECTRON_TRANSFER_IN_COMPLEX_I			
1,66	0,09		
	HALLMARK_OXIDATIVE_PHOSPHORYLATION	1,78	>0,001
	KEGG_MEDICUS_REFERENCE_ELECTRON_TRANSFER_IN_COMPLEX_I	1,43	>0,001
Stress della degradazione proteica mediata dal proteasoma			
KEGG_MEDICUS_VARIANT_MUTATION CAUSED_ABERRANT_ABETA_TO_26S_PROTEASOME_MEDIATED_PROT			
EIN_DEGRADATION	1,74	0,12	
KEGG_MEDICUS_VARIANT_MUTATION INACTIVATED_VCP_TO_26S_PROTEASOME_MEDIATED_PROTEIN_DEG			
RADATION	1,73	0,13	
KEGG_MEDICUS_VARIANT_MUTATION CAUSED_ABERRANT_SOD1_TO_26S_PROTEASOME_MEDIATED_PROT			
EIN_DEGRADATION	1,72	0,09	
Instabilità trascrittomico e stress traduzionale			
	GOBP_PROTEIN_CONTAINING_COMPLEX_REMODELING	-2,11	>0,001
	REACTOME_EUKARYOTIC_TRANSLATION_INITIATION	3,11	>0,001
	REACTOME_SRP_DEPENDENT_CO_TRANSLATIONAL_PROTEIN_TARGETING_TO_MEMBRANE	3,08	>0,001
	REACTOME_NONSENSE_MEDIATED_DECAY_NMD	2,90	>0,001
	KEGG_MEDICUS_REFERENCE_TRANSLATION_INITIATION	3,00	>0,001
	GOBP_CYTOPLASMIC_TRANSLATION	2,60	>0,001
	GOBP_RIBOSOMAL_SMALL_SUBUNIT_BIOGENESIS	2,35	>0,001
	GOBP_RIBOSOMAL_LARGE_SUBUNIT_BIOGENESIS	2,34	>0,001
Risposta infiammatoria e immunitaria sistemica			
	GSE22886_NAIVE_TCELL_VS_DC_UP	2,43	>0,001
	GSE2405_0H_VS_9H_A_PHAGOCYTOSIS_STIMULATED_NEUTROPHILS_UP	2,36	>0,001
	GSE7400_CTRL_VS_CSF3_IN_VIVO_TREATED_PBMC_UP	2,27	>0,001
	GSE7400_CTRL_VS_CSF3_IN_VIVO_TREATED_PBMC_DN	-1,93	>0,001
	GSE6269_E_COLI_VS_STREP_PNEUMO_INF_PBMC_DN	-1,90	>0,001
	GOBP_ANTIMICROBIAL_HUMORAL_RESPONSE	-1,95	>0,001
	GOBP_HUMORAL_IMMUNE_RESPONSE	-1,91	0,006
Disfunzione dell'endotelio			
	HALLMARK_ANGIOGENESIS	-1,94	>0,001
Segnalazione proliferativa e controllo tumorale soppresso			
	HALLMARK_MYC_TARGETS_V1	1,64	>0,001
	GAVISH_3CA_MALIGNANT_METAPROGRAM_3_CELL_CYCLE_HM_RICH	1,77	0,005
	HALLMARK_KRAS_SIGNALING_DN	-1,68	>0,001
	HALLMARK_P53_PATHWAY	-1,50	0,038
	KEGG_MEDICUS_REFERENCE_WNT_SIGNALING_MODULATION_WNT_INHIBITOR	-1,56	0,89

La Tabella 2 visualizza i set di geni principali all'interno di ciascuna categoria, insieme ai loro identificatori MSigDB corrispondenti, Normalized Enrichment Score (NES) e valore q del tasso di scoperta falsi (FDR). I valori NES positivi indicano sovraregolazione, mentre i valori NES negativi indicano sottoregolazione dei set di geni nei campioni vaccinati (gruppo 1) rispetto ai controlli. I set di geni sono stati selezionati basandosi sulla rilevanza biologica e NES>1,5 con FDR q<0,25. Il gruppo 1 include pazienti con nuovi eventi avversi a seguito della vaccinazione messaggero RNA contro la malattia da coronavirus 2019 (n=3), confrontati con controlli normali (n=803 individui non vaccinati dal dataset GTEx).

****Tabella 3** Risultati dell'arricchimento dei set di geni per il gruppo 2 categorizzati per pathway molecolare**

Pathway molecolari	Nome standard MSigDB	NES	FDR
<hr/>			
Instabilità trascrittonica e stress traduzionale			
REACTOME_SIRT1_NEGATIVELY_REGULATES_RRNA_EXPRESSION	3,08	>0,001	
REACTOME_RNA_POLYMERASE_I_PROMOTER_ESCAPE	2,61	>0,001	
REACTOME_TRANSCRIPTIONAL_REGULATION_BY_SMALL_RNAS	2,63	>0,001	
REACTOME_B-WICH_COMPLEX_POSITIVELY_REGULATES_RRNA_EXPRESSION	2,60	>0,001	
REACTOME_POSITIVE_EPIGENETIC_REGULATION_OF_RRNA_EXPRESSION	2,54	>0,001	
<hr/>			
Risposta infiammatoria e immunitaria sistemica			
REACTOME_RRNA_MODIFICATION_IN_THE_NUCLEUS_AND_CYTOSOL	2,03	0,027	
KEGG_MEDICUS_REFERENCE_TYPE_I_INTERFERON_TO_JAK_STAT_SIGNALING_PATHWAY	2,00	0,006	
KEGG_MEDICUS_PATHOGEN_HIV_TAT_TO_TLR2_4_NFKB_SIGNALING_PATHWAY	2,64	>0,001	
KEGG_MEDICUS_REFERENCE_TYPE_I_IFN_SIGNALING_PATHWAY	2,73	>0,001	
KEGG_MEDICUS_REFERENCE_RIG_I_TO_NFKB_SIGNALING_PATHWAY	2,64	>0,001	
KEGG_MEDICUS_REFERENCE_TLR3_IRF7_SIGNALING_PATHWAY	2,54	>0,001	
KEGG_MEDICUS_REFERENCE_TLR7_8_9_IRF5_SIGNALING_PATHWAY	2,46	>0,001	
KEGG_MEDICUS_REFERENCE_TLR7_9_IRF7_SIGNALING_PATHWAY	2,29	>0,001	
KEGG_MEDICUS_REFERENCE_MDA5_IRF7_3_SIGNALING_PATHWAY	2,27	>0,001	
KEGG_MEDICUS_REFERENCE_IFN_RIPK1_3_SIGNALING_PATHWAY	2,00	0,006	
KEGG_MEDICUS_REFERENCE_RIG_I_IRF7_3_SIGNALING_PATHWAY	2,00	0,007	
<hr/>			
Disfunzione dell'endotelio			
GAVISH_3CA_METAPROGRAM_CD8_T_CELLS_CHROMATIN	1,78	0,068	
GOBP_NEGATIVE_REGULATION_OF_ENDOTHELIAL_CELL_PROLIFERATION	-1,98	0,0017	
<hr/>			
Segnalazione proliferativa e controllo tumorale soppresso			
GOBP_NEGATIVE_REGULATION_OF_COAGULATION	-1,98	0,0017	
REACTOME_ASSEMBLY_OF_THE_ORC_COMPLEX_AT_THE_ORIGIN_OF_REPLICATION	2,93	>0,001	
<hr/>			
Instabilità genomica e spostamento epigenetico			
REACTOME_DNA METHYLATION	3,18	>0,001	
REACTOME_CONDENSATION_OF_PROPHASE_CHROMOSOMES	2,93	>0,001	
KEGG_MEDICUS_REFERENCE_CGAS_STING_SIGNALING_PATHWAY	2,43	>0,001	
GAVISH_3CA_MALIGNANT_METAPROGRAM_4_CHROMATIN	1,91	0,05	
GOBP_NUCLEOSOME_ORGANIZATION	2,33	0,01	

La Tabella 3 visualizza i set di geni principali all'interno di ciascuna categoria, insieme ai loro identificatori MSigDB corrispondenti, Normalized Enrichment Score (NES) e valore q del tasso di scoperta falsi (FDR). I valori NES positivi indicano sovraregolazione, mentre i valori NES negativi indicano sottoregolazione dei set di geni nei campioni vaccinati rispetto ai controlli. I set di geni sono stati selezionati basandosi sulla rilevanza biologica e NES>1,5 con FDR q<0,25. Il gruppo 2 include pazienti con nuovi cancri diagnosticati poco dopo la vaccinazione messaggero RNA contro la malattia da coronavirus 2019 (n=7), confrontati con controlli normali (n=803 individui non vaccinati dal dataset GTEx).

DISCUSSIONE

Il rapido lancio globale dei vaccini COVID-19 basati su RNA ha introdotto una piattaforma terapeutica innovativa che coinvolge mRNA sintetico e sistemi di consegna LNP. Sebbene inizialmente dispiegati per mitigare la diffusione del SARS-CoV-2, gli effetti biologici a lungo termine erano sconosciuti. A differenza dei vaccini convenzionali, queste formulazioni inducono le cellule ospiti a esprimere una glicoproteina spike virale da template mRNA esogeni, sollevando preoccupazioni sulle risposte cellulari non intese[32]. I rapporti clinici emergenti di sintomi persistenti dopo la vaccinazione, incluse perturbazioni neurologiche, cardiovascolari e immunitarie, hanno sollecitato uno scrutinio scientifico sui meccanismi molecolari potenzialmente attivati dall'esposizione prolungata all'mRNA sintetico, ai suoi prodotti di traduzione e all'attivazione immunitaria associata[2,3,33,34]. Per investigare queste preoccupazioni, abbiamo eseguito GSEA su dati trascrittomici da due coorti distinte di pazienti: (1) Individui con nuovi effetti avversi post-vaccinazione (gruppo 1); e (2) Pazienti che hanno sviluppato cancro a seguito della vaccinazione mRNA (gruppo 2). Un riassunto delle alterazioni trascrittomiche osservate in ciascun gruppo è illustrato nella Figura 4.

Nella coorte del gruppo 1, l'arricchimento dei set di geni relativi al trasporto elettronico mitocondriale indica perturbazione trascrittoriale nei componenti fondamentali della fosforilazione ossidativa, particolarmente al complesso I. La presenza di arricchimenti varianti che coinvolgono la putrescina chinasi 1 indotta da PTEN (PINK1), la beta-amiloide e l'alfa-sinucleina suggerisce convergenza associata a mitofagia compromessa, neurodegenerazione e flusso elettronico difettoso. Questi risultati suggeriscono che l'infiammazione mediata dalla proteina spike perturba l'omeostasi mitocondriale. Infatti, studi precedenti indicano che la proteina spike altera le dinamiche di fusione-fissione mitocondriale, sopprimendo la biogenesi dei suoi regolatori (fattori respiratori nucleari 1/2, coattivatore 1-alfa del recettore gamma attivato dai proliferatori perossisomali, fattore di trascrizione mitocondriale A), e aumentando il danno mitocondriale[35]. Inoltre, numerosi studi hanno indipendentemente riportato la disfunzione mitocondriale persistente come hallmarch del long COVID[36-38], supportando ulteriormente un legame meccanico tra l'esposizione alla proteina spike e lo squilibrio bioenergetico. Gli spostamenti del trasporto elettronico mitocondriale e ROS-correlati sono raffigurati nella rete PPI (Figura 2D), evidenziando i geni hub chiave interconnessi.

Nella coorte del gruppo 1, l'arricchimento dei set di geni associati al proteasoma ha indicato l'attivazione dei componenti del sistema ubiquitin-proteasoma. Proteine sovraesegolate come la proteina ribosomale 40S S27a (RPS27A), la subunità 26S proteasoma SEM1, la poliubiquitina-B (UBB) e la proteina ribosomale 60S L40 (UBA52), insieme a diverse subunità fondamentali dei complessi proteasoma 20S e 19S, inclusi PSMA2-5, PSMA8, PSMC1 e PSMD7, riflettono una richiesta trascrittoriale aumentata per la macchinaria di degradazione delle proteine, probabilmente in compensazione per proteine mal ripiegate o aggregate. L'arricchimento dei set di geni varianti associati alla proteina contenente valinosi (VCP) e alla disfunzione della superossido dismutasi 1 supporta ulteriormente la convergenza con la perturbazione della proteostasi, un fenomeno comunemente osservato nelle condizioni neurodegenerative e associate alle proteinopatie. Un potenziale driver di questa attivazione proteasomale sostenuta è la presenza prolungata dell'mRNA sintetico in circolazione, che è stato dimostrato persistere oltre la traduzione iniziale e può stimolare continuamente la produzione di proteina spike o prodotti di traduzione aberranti[16-18]. Inoltre, la persistenza dell'RNA derivato dai vaccini è stata dimostrata in campioni umani, incluso il tessuto placentare fino a 10 giorni post-vaccinazione[39] e il plasma fino a 28 giorni[40,41]. È stata identificata la persistenza dell'RNA derivato dai vaccini nel tessuto cardiaco umano fino a 30 giorni post-vaccinazione[42], dimostrata la ritenzione all'interno dei nodi linfatici per un massimo di 60 giorni, e Ota et al[43] hanno recentemente riportato il rilevamento di mRNA nelle arterie cerebrali 17 mesi post-vaccinazione[44]. Collettivamente, questi risultati sottolineano che l'mRNA sintetico e i suoi sottoprodotto possono persistere in diversi tessuti per periodi prolungati, coinvolgendo continuamente i pathway di sorveglianza proteostatica e immunitaria. Inoltre, evidenze emergenti suggeriscono che la proteina spike del SARS-CoV-2 contiene domini simili ai prioni che sono inclini al mal ripiegamento e all'aggregazione. Queste proprietà possono essere amplificate nell'espressione



indotta dal vaccino, portando a stress proteotossico persistente e profili trascrittionali simili a quelli neurodegenerativi[8].

L'instabilità trascrittoriale e lo stress traduzionale sono stati un hallmark dominante in entrambi i gruppi di pazienti. La stabilizzazione dell'mRNA, l'inizio della traduzione e i tassi di sintesi proteica sono nodi regolatori distinti ma interconnessi. La stabilizzazione dell'mRNA controlla l'emivita del substrato, determinando la finestra di opportunità per la traduzione. Al contrario, l'inizio della traduzione, spesso il passaggio limitante, coinvolge l'assemblaggio del ribosoma e dei fattori di inizio (ad esempio, il fattore di inizio eucariotico 4F) al cappuccio 5' ed è altamente responsivo alla segnalazione cellulare e allo stress. Questi processi possono essere disaccoppiati; un mRNA stabile e longevo può essere tradotto male se l'inizio è bloccato, mentre la sintesi rapida può esaurire mRNA di breve vita. In definitiva, l'output proteico complessivo è un prodotto sia della disponibilità dell'mRNA che dell'efficienza della macchinaria traduzionale[45-47]. L'arricchimento dei set di geni relativi all'inizio della traduzione, alla biogenesi dei ribosomi e alla sorveglianza dell'mRNA suggerisce attivazione sostenuta della macchinaria di sintesi proteica. Nel gruppo 1, i pathway sovrapponibili come l'inizio della traduzione, la traduzione citoplasmatica e la biogenesi delle subunità ribosomali indicano coinvolgimento persistente dei ribosomi e dell'apparato traduzionale, probabilmente guidato dall'espressione prolungata della proteina spike dall'mRNA sintetico stabilizzato[8,16,18]. L'arricchimento dei geni relativi al decadimento mediato da nonsense (NMD) nei pazienti con nuovi eventi avversi associati ai vaccini contrasta con i risultati precedenti che il virus SARS-CoV-2 sopprime l'NMD per proteggere il suo genoma RNA[48,49]. Questo suggerisce che, a differenza del genoma virale, l'mRNA sintetico utilizzato nella vaccinazione può invece provocare un'attivazione compensatoria dei meccanismi di sorveglianza dell'RNA, potenzialmente a causa della traduzione persistente o dell'accumulo di trascritti aberranti. I pattern opposti della regolazione dell'NMD in questi due contesti puntano a risposte cellulari distinte e warrantano ulteriore indagine. Nel gruppo 2, come nel primo gruppo, abbiamo osservato significativo arricchimento nei set di geni relativi alla biogenesi ribosomale, alla traduzione citoplasmatica e alla sorveglianza dell'mRNA. Tuttavia, il gruppo con cancro ha mostrato attivazione più pronunciata dei pathway di stress ribosomale, particolarmente quelli legati all'evasione del promotore dell'RNA Polimerasi I, alla maturazione dell'rRNA e alla regolazione epigenetica positiva dell'espressione dell'rRNA, indicando iperattivazione delle funzioni nucleolari e throughput traduzionale elevato. Mentre questi programmi trascrittionali sono classicamente associati alle cellule tumorali per supportare la proliferazione non controllata[50-52], il loro rilevamento nei campioni di sangue periferico riflette probabilmente conseguenze sistemiche della malignità sottostante, come alterazioni immunitarie sistemiche o risposte allo stress indotte dall'infiammazione e dalla segnalazione tumorale[53-55]. Mentre il gruppo con eventi avversi da vaccino ha mostrato attivazione dei pathway NMD, il gruppo con cancro ha mostrato segnali aggiuntivi relativi alla regolazione trascrizionale mediata da piccoli RNA e alla repressione epigenetica dell'attività genica ribosomale. La coesistenza del silenziamento trascrizionale e della produzione aumentata di rRNA può riflettere stress trascrizionale sottostante che squilibra l'equilibrio cellulare.

Gli arricchimenti relativi all'hallmark della risposta infiammatoria e immunitaria sistemica sono stati identificati in entrambi i gruppi analizzati in questo lavoro. Nel gruppo 1, i geni sovrapponibili più altamente connessi nella rete PPI includevano LOX, CD28, CCR7 e SELL. Risultati recenti dimostrano che l'uso di m1Ψ nelle costruzioni mRNA può indurre lo spostamento del frame ribosomale +1, risultando nella produzione di proteine off-target che possono elicitare risposte immunitarie cellulari non intese[9]. Questa produzione aberrante di antigeni può rappresentare un meccanismo nuovo che contribuisce all'infiammazione sistemica e alla disregolazione immunitaria. Inoltre, evidenze emergenti suggeriscono che la frammentazione citoplasmatica dell'mRNA derivato dai vaccini può generare sequenze RNA corte con proprietà simili a miRNA capaci di ibridare trascritti immunitari dell'ospite, come interferoni e regolatori antinfiammatori. Questa interferenza post-trascrizionale non intesa potrebbe contribuire alla disregolazione immunitaria sistemica e alle risposte infiammatorie, particolarmente in individui con comorbidità predisponenti o pathway di degradazione dell'RNA compromessi[56]. Inoltre, numerosi studi hanno precedentemente dimostrato l'attività infiammatoria delle LNP mRNA[57-59]. Rispetto al gruppo 1, dove lo squilibrio immunitario era più sbilanciato verso l'attivazione cellulare aberrante e la soppressione umorale, il gruppo 2 ha mostrato un

pattern distinto di attivazione immunitaria innata. La GSEA ha rivelato la sovregolazione dei pathway che coinvolgono interferoni di tipo I, recettori toll-like e segnalazione infiammatoria guidata dal fattore nucleare kappa B (NF- κ B). L'arricchimento dell'asse RIG-I/MDA5-IRF7, TLR3/7/8/9-IRF5/7 e della cascata interferon JAK-STAT suggerisce coinvolgimento persistente dei meccanismi di rilevamento dell'RNA e dei loro programmi trascrizionali pro-infiammatori a valle. Mentre queste risposte sono centrali per l'immunità antivirale, la loro attivazione cronica nel sangue periferico dei pazienti oncologici potrebbe essere correlata all'infiammazione, all'esaurimento immunitario e all'editing immunitario tumorale[60-62]. Queste alterazioni immunitarie sono coerenti con i risultati precedenti sia nei destinatari anziani dei vaccini che nei pazienti autoimmuni, dove l'iperattivazione IFN-JAK-STAT e la segnalazione RIG-I sono state ripetutamente identificate come firme dominanti, sottolineando che la nostra infiammazione sistemica osservata riflette un pattern riproducibile attraverso le coorti vaccinate[63].

Per il gruppo 1, un NES negativo per l'hallmark dell'angiogenesi suggerisce sottoregolazione trascrizionale o inibizione post-trascrizionale dei mediatori angiogenici chiave. Questo può essere collegato all'ipotesi della frammentazione dell'RNA supportata dal lavoro di Demongeot e Fougère[56], dove frammenti simili a miRNA derivati dall'mRNA vaccinale clonato si ibridano con i trascritti endoteliali, sopprimendo la loro traduzione e contribuendo alla disfunzione endoteliale sistemica e alla riparazione vascolare compromessa. Nel gruppo con cancro, l'analisi trascrittomica ha rivelato significativa sottoregolazione dei set di geni coinvolti nella regolazione negativa della proliferazione delle cellule endoteliali e nella regolazione negativa della coagulazione. La soppressione di questi pathway regolatori può indicare attivazione endoteliale non controllata o uno spostamento vascolare pro-trombotico, condizioni che possono essere collegate agli eventi avversi della proteina spike e alla progressione tumorale[64-67]. Lo stress della degradazione proteica mediato dal proteasoma, contrassegnato da pathway ubiquitin-proteasoma e autofagia compromessi, contribuisce all'accumulo di proteine mal ripiegate o danneggiate che sostengono l'infiammazione e la disfunzione cellulare. Si ritiene che questo stress proteotossico persistente contribuisca alla stanchezza cronica, alla disfunzione neurologica e ai sintomi multi-organico nei pazienti vaccinati[68,69].

Per entrambi i gruppi 1 e 2, potremmo notare un arricchimento nelle firme dei geni dell'hallmark della segnalazione proliferativa e del controllo tumorale soppresso. Per il gruppo 1, l'arricchimento positivo nei set di geni regolati dall'oncogene mielocitomatosi (MYC) suggerisce un programma trascrizionale oncogenico attivo che favorisce la crescita tumorale e l'adattamento. Questo bias proliferativo è composto dalla sottoregolazione dei pathway soppressori tumorali, incluso il firma inibita da KRAS, le reti regolatorie p53 e gli inibitori del pathway Wnt. La Figura 2A raffigura la rete PPI per questi hallmark nel gruppo 1, evidenziando i geni chiave interconnessi che guidano questi processi. Questi risultati suggeriscono un microambiente favorevole all'espansione cellulare non controllata, alla perdita della sorveglianza apoptotica e alla diminuita responsività ai segnali anti-proliferativi. Notevolmente, molti studi precedenti hanno riportato che la proteina spike può attivare il pathway mitogenico, attraverso la sottoregolazione dell'espressione dell'enzima convertitore dell'angiotensina 2 (ACE2), che promuove una cascata di segnalazione mediata dal recettore dell'angiotensina II tipo 1 (AT1R), inducendo le molecole regolatorie trascrizionali NF- κ B e attivatore della proteina 1/c-Fos attraverso l'attivazione delle proteine chinasi attivate dai mitogeni[70-72]. In conformità con questo pathway molecolare, i nostri pazienti indagati dal gruppo 1 e dal gruppo 2 hanno anche presentato un'espressione ACE2 molto sottoregolata rispetto al controllo normale (variazione log: -4,3 e -4,8, rispettivamente). In relazione a questo hallmark, il gruppo 2 ha mostrato arricchimento dei pathway coinvolti nel processo di replicazione del DNA, specificamente l'assemblaggio del complesso ORC all'origine della replicazione, riflettendo stress replicativo aumentato e proliferazione non controllata potenzialmente guidata da effetti sistemicci tumorali o attivazione immunitaria prolungata[60-62].

Solo il gruppo 2 ha presentato arricchimenti relativi all'hallmark dell'instabilità genomica e dello spostamento epigenetico. I pathway chiave arricchiti mostrano regolazione aberrante della modifica istone, dell'impacchettamento del DNA e del silenziamento epigenetico, che sono comunemente osservati negli eventi oncogenici. In parallelo, l'arricchimento del pathway di segnalazione cGAS-STING indica il riconoscimento immunitario dei frammenti di DNA citoplasmatico, un marker ben stabilito del danno al DNA



e dell'instabilità cromosomica[73]. Questo pathway è associato all'infiammazione che promuove i tumori e all'editing immunitario[60-62]. Importante, uno studio longitudinale recente della vaccinazione mRNA negli ottuagenari ha dimostrato che la somministrazione di BNT162b2 ha elicitato l'attivazione del pathway cGAS-STING insieme a robuste risposte immunitarie e anticorpali, supportando ulteriormente i nostri risultati trascrittomici[63]. L'instabilità genomica persistente aumenta la probabilità di acquisire mutazioni somatiche negli oncogeni chiavi e nei geni soppressori tumorali, un processo che può cumulativamente guidare la trasformazione maligna. Questo è coerente con evidenze precliniche e in vitro che dimostrano che l'esposizione al vaccino mRNA BNT162b2 può modulare l'attività della trascrittasi inversa endogena (LINE-1), facilitare la trascrizione inversa dell'mRNA vaccinale in DNA e alterare la localizzazione nucleare delle proteine LINE-1[74], eventi che potrebbero, in linea di principio, contribuire alla mutagenesi insertionale e alle perturbazioni genomiche nel tempo. Analisi indipendenti hanno corroborato queste preoccupazioni identificando la contaminazione residua da DNA plasmidico sia nei vaccini mRNA Pfizer che Moderna[75].

CONCLUSIONE

Questo studio fornisce evidenze trascrittomiche di perturbazioni molecolari in due popolazioni di pazienti, quelli con nuovi eventi avversi non maligni e quelli con cancri di nuova diagnosi. Utilizzando l'analisi dell'espressione differenziale e la GSEA, abbiamo identificato firme hallmarch di disfunzione mitocondriale, stress tradizionale, disregolazione immunitaria, disturbo endoteliale e segnalazione proliferativa attraverso entrambe le coorti. Notevolmente, mentre entrambi i gruppi hanno condiviso perturbazioni trascrittionali nei pathway immunitari e tradizionali, il gruppo con cancro ha mostrato firme aggiuntive di instabilità genomica e rimodellamento epigenetico.

L'espressione persistente della proteina spike, l'attività prolungata dell'mRNA sintetico e le modifiche dell'RNA come m1Ψ sembrano contribuire all'attività ribosomale aberrante sostenuta, allo stress proteostatico e all'attivazione immunitaria. I nostri risultati evidenziano anche segnali trascrittionali indicativi di condizioni che promuovono i tumori, incluse reti p53 sopprese, bersagli MYC attivati e segnalazione interferon alterata, particolarmente nel contesto della disregolazione epigenetica nella coorte oncologica. Queste osservazioni suggeriscono che la riprogrammazione trascrittonica indotta dal vaccino può differenzialmente influenzare gli individui, geneticamente o immunologicamente, su un lungo periodo di tempo dopo la vaccinazione. Nonostante la dimensione campionaria più piccola a causa dei vincoli di risorse (gruppo 1 n=3 vs n=7 nel gruppo 2), i risultati aprono una via importante per comprendere le risposte biologiche post-vacciniche e sottolineano il valore di espandere studi futuri con coorti più ampie.

RINGRAZIAMENTI

Ringraziamo il Genomics Center presso l'Università del Texas del Nord per il supporto al sequenziamento, Neo7Bioscience per l'assistenza nell'interpretazione dei dati e la McCullough Foundation per la collaborazione scientifica. Riconosciamo anche i partecipanti che hanno reso possibile questo studio.

NOTE A PIÙ DI PAGINA

Contributi degli autori: Von Ranke NL e Zhang W hanno guidato l'interpretazione dei risultati; Anokhin P ha preparato i set di dati per l'analisi; Hulscher N, McKernan K e McCullough P hanno fornito supporto scientifico e supervisione della ricerca; Catanzaro J è servito come investigatore principale per questo studio e ha supervisionato e concepito la ricerca; tutti gli autori hanno rivisto e approvato il manoscritto finale.



****Dichiarazione del comitato di revisione istituzionale:**** Lo studio è stato esaminato e approvato dal Neo7Bioscience SpikeX Institutional Review Board (No. IRB00014606), che è registrato presso gli Stati Uniti, Dipartimento della Salute e dei Servizi Umani. L'approvazione è stata concessa sotto il numero di protocollo Neo7-RB-2024-001 il 15 gennaio 2025.

****Dichiarazione del consenso informato:**** Tutti i partecipanti allo studio sono stati informati che la partecipazione è volontaria, coinvolge la fornitura di un campione di sangue per l'analisi trascrittomatica, i dati de-identificati possono essere utilizzati nella ricerca scientifica e nelle pubblicazioni. Il consenso informato è stato ottenuto da tutti i soggetti coinvolti nello studio, e tutti i dati sono stati de-identificati prima dell'analisi.

****Dichiarazione di conflitto di interessi:**** Questo studio è stato finanziato da Neo7Bioscience, che è stata coinvolta nella progettazione dello studio, raccolta dei dati, analisi e preparazione del manoscritto. Natalia Lidmar Von Ranke, Wei Zhang e Philipp Anokhin, che hanno elaborato e analizzato i dati, ricevono supporto salariale da Neo7Bioscience. John Catanzaro, che ha concepito lo studio e ha servito come Principal Investigator, è il CEO e azionista di Neo7Bioscience e riceve anche supporto salariale dalla società. Neo7Bioscience è un'azienda biotecnologica privata specializzata nello sviluppo di peptidi terapeutici personalizzati. Nicolas Hulscher, che ha fornito input scientifico, riceve supporto salariale dalla McCullough Foundation. Peter McCullough, che ha fornito supervisione della ricerca, è il fondatore della McCullough Foundation ma non riceve compenso dall'organizzazione. La McCullough Foundation è un'entità no-profit dedicata all'avanzamento della ricerca indipendente sulla salute pubblica, l'etica medica e le politiche basate sulle evidenze. Kevin McKernan, che ha anche fornito supporto scientifico, è il fondatore, Chief Scientific Officer e azionista di Medicinal Genomics, un'azienda che fornisce servizi genomici al settore agricolo.

****Dichiarazione sulla condivisione dei dati:**** I dati trascrittomici de-identificati sono stati depositati in repository aperte e sicure per far avanzare la conoscenza scientifica, in conformità con le linee guida istituzionali ed etiche. I set di dati generati e analizzati durante lo studio corrente sono pubblicamente disponibili nel NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) sotto il codice di accesso GSE304973 (GEO Accession viewer). I dati RNA-seq di controllo utilizzati per il confronto sono stati ottenuti dal dataset GTEx (GTEx Portal).

****Dichiarazione STROBE:**** Gli autori hanno letto la dichiarazione STROBE, lista di controllo degli elementi, e il manoscritto è stato preparato e rivisto secondo la dichiarazione STROBE, lista di controllo degli elementi.

****Open Access:**** Questo articolo è un articolo ad accesso aperto che è stato selezionato da un editore interno e completamente sottoposto a revisione paritaria da revisori esterni. È distribuito secondo la licenza Creative Commons Attribuzione NonCommercial (CC BY-NC 4.0), che permette ad altri di distribuire, rielaborare, adattare e costruire su questo lavoro non commercialmente, e di concedere in licenza le loro opere derivate su termini diversi, a condizione che il lavoro originale sia correttamente citato e l'uso sia non commerciale. Vedere: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

****Paese di origine:**** Stati Uniti

****Numeri ORCID:****

Natalia Lidmar Von Ranke 0000-0003-0045-9252
Wei Zhang 0009-0005-2954-0179
Nicolas Hulscher 0009-0008-0677-7386
Kevin McKernan 0000-0002-3908-1122
Peter McCullough 0000-0002-0997-6355
John Catanzaro 0000-0002-0710-2929

****S-Editor:**** Luo ML

L-Editor: A
P-Editor: Zhao S

RIFERIMENTI

- 1 Acevedo-Whitehouse K, Bruno R. Potential health risks of mRNA-based vaccine therapy: A hypothesis. *Med Hypotheses* 2023; 171: 111015 [RCA] [PMID: 36718314 DOI: 10.1016/j.mehy.2023.111015] [FullText] [Full Text(PDF)]
- 2 Li YE, Wang S, Reiter RJ, Ren J. Clinical cardiovascular emergencies and the cellular basis of COVID-19 vaccination: from dream to reality? *Int J Infect Dis* 2022; 124: 1-10 [RCA] [PMID: 36075372 DOI: 10.1016/j.ijid.2022.08.026] [FullText] [Full Text(PDF)]
- 3 Mohseni Afshar Z, Tavakoli Pirzaman A, Liang JJ, Sharma A, Pirzadeh M, Babazadeh A, Hashemi E, Deravi N, Abdi S, Allahgholipour A, Hosseinzadeh R, Vaziri Z, Sio TT, Sullman MJM, Barary M, Ebrahimpour S. Do we miss rare adverse events induced by COVID-19 vaccination? *Front Med (Lausanne)* 2022; 9: 933914 [RCA] [PMID: 36300183 DOI: 10.3389/fmed.2022.933914] [FullText]
- 4 Yasmin F, Najeeb H, Naeem U, Moeed A, Atif AR, Asghar MS, Nimri N, Saleem M, Bandyopadhyay D, Krittawong C, Fadelallah Eljack MM, Tahir MJ, Waqar F. Adverse events following COVID-19 mRNA vaccines: A systematic review of cardiovascular complication, thrombosis, and thrombocytopenia. *Immun Inflamm Dis* 2023; 11: e807 [RCA] [PMID: 36988252 DOI: 10.1002/iid3.807] [FullText] [Full Text(PDF)]
- 5 Yoon D, Jeon HL, Noh Y, Choe YJ, Choe SA, Jung J, Shin JY. A Nationwide Survey of mRNA COVID-19 Vaccinee's Experiences on Adverse Events and Its Associated Factors. *J Korean Med Sci* 2023; 38: e170 [RCA] [PMID: 37272559 DOI: 10.3346/jkms.2023.38.e170] [FullText]
- 6 Nyström S, Hammarström P. Amyloidogenesis of SARS-CoV-2 Spike Protein. *J Am Chem Soc* 2022; 144: 8945-8950 [RCA] [PMID: 35579205 DOI: 10.1021/jacs.2c03925] [FullText] [Full Text(PDF)]
- 7 Manniche V, Fürst T, Schmeling M, Gilthorpe JD, Hansen PR. Rates of successful conceptions according to COVID-19 vaccination status: Data from the Czech Republic. *Int J Risk Saf Med* 2025; 9246479251353384 [RCA] [PMID: 40534497 DOI: 10.1177/09246479251353384] [FullText] [Full Text(PDF)]
- 8 Seneff S, Kyriakopoulos AM, Nigh G, McCullough PA. A Potential Role of the Spike Protein in Neurodegenerative Diseases: A Narrative Review. *Cureus* 2023; 15: e34872 [RCA] [PMID: 36788995 DOI: 10.7759/cureus.34872] [FullText]
- 9 Stiving AQ, Roose BW, Tubbs C, Haverick M, Gruber A, Rustandi RR, Kuiper J, Schombs M, Schuessler H, Li X. Functionality and translation fidelity characterization of mRNA vaccines using platform based mass spectrometry detection. *NPJ Vaccines* 2025; 10: 38 [RCA] [PMID: 39988579 DOI: 10.1038/s41541-025-01082-4] [FullText]
- 10 Lim S, Yocum RR, Silver PA, Way JC. High spontaneous integration rates of end-modified linear DNAs upon mammalian cell transfection. *Sci Rep* 2023; 13: 6835 [RCA] [PMID: 37100816 DOI: 10.1038/s41598-023-33862-0] [FullText]
- 11 Šenigl F, Soikkeli AI, Prost S, Schatz DG, Slavková M, Hejnar J, Alinikula J. The SV40 virus enhancer functions as a somatic hypermutation-targeting element with potential tumorigenic activity. *Tumour Virus Res* 2024; 18: 200293 [RCA] [PMID: 39490533 DOI: 10.1016/j.tvr.2024.200293] [FullText] [Full Text(PDF)]

12 Dean DA, Dean BS, Muller S, Smith LC. Sequence requirements for plasmid nuclear import. *Exp Cell Res* 1999; 253: 713-722 [RCA] [PMID: 10585295 DOI: 10.1006/excr.1999.4716] [FullText]

13 Kämmerer U, Schulz V, Steger K. BioNTech RNA-Based COVID-19 Injections Contain Large Amounts of Residual DNA Including an SV40 Promoter/Enhancer Sequence. *Sci Public Health Policy Law* 2024; v5.2019-2024

14 Drayman N, Ben-Nun-Shaul O, Butin-Israeli V, Srivastava R, Rubinstein AM, Mock CS, Elyada E, Ben-Neriah Y, Lahav G, Oppenheim A. p53 elevation in human cells halt SV40 infection by inhibiting T-ag expression. *Oncotarget* 2016; 7: 52643-52660 [RCA] [PMID: 27462916 DOI: 10.18632/oncotarget.10769] [FullText] [Full Text(PDF)]

15 Strayer D, Branco F, Zern MA, Yam P, Calarota SA, Nichols CN, Zaia JA, Rossi J, Li H, Parashar B, Ghosh S, Chowdhury JR. Durability of transgene expression and vector integration: recombinant SV40-derived gene therapy vectors. *Mol Ther* 2002; 6: 227-237 [RCA] [PMID: 12161189 DOI: 10.1006/mthe.2002.0657] [FullText]

16 Patterson BK, Yogendra R, Francisco EB, Guevara-Coto J, Long E, Pise A, Osgood E, Bream J, Kreimer M, Jeffers D, Beaty C, Vander Heide R, Mora-Rodríguez RA. Detection of S1 spike protein in CD16+ monocytes up to 245 days in SARS-CoV-2-negative post-COVID-19 vaccine syndrome (PCVS) individuals. *Hum Vaccin Immunother* 2025; 21: 2494934 [RCA] [PMID: 40358138 DOI: 10.1080/21645515.2025.2494934] [FullText] [Full Text(PDF)]

17 Boros LG, Kyriakopoulos AM, Brogda C, Piscopo M, McCullough PA, Seneff S. Long-lasting, biochemically modified mRNA, and its frameshifted recombinant spike proteins in human tissues and circulation after COVID-19 vaccination. *Pharmacol Res Perspect* 2024; 12: e1218 [RCA] [PMID: 38867495 DOI: 10.1002/prp2.1218] [FullText]

18 Yonker LM, Swank Z, Bartsch YC, Burns MD, Kane A, Boribong BP, Davis JP, Loiselle M, Novak T, Senussi Y, Cheng CA, Burgess E, Edlow AG, Chou J, Dionne A, Balaguru D, Lahoud-Rahme M, Ardit M, Julg B, Randolph AG, Alter G, Fasano A, Walt DR. Circulating Spike Protein Detected in Post-COVID-19 mRNA Vaccine Myocarditis. *Circulation* 2023; 147: 867-876 [RCA] [PMID: 36597886 DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.122.061025] [FullText]

19 Karikari AA, McFleider RL, Ribechini E, Blum R, Bruttel V, Knorr S, Gehmeyr M, Volkmann J, Brotchie JM, Ahsan F, Haack B, Monoranu CM, Keber U, Yeghiazaryan R, Pagenstecher A, Heckel T, Bischler T, Wischhusen J, Koprich JB, Lutz MB, Ip CW. Neurodegeneration by α -synuclein-specific T cells in AAV-A53T- α -synuclein Parkinson's disease mice. *Brain Behav Immun* 2022; 101: 194-210 [RCA] [PMID: 35032575 DOI: 10.1016/j.bbi.2022.01.007] [FullText]

20 GTEx Consortium. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. *Nat Genet* 2013; 45: 580-585 [RCA] [PMID: 23715323 DOI: 10.1038/ng.2653] [FullText]

21 Anders S, Huber W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol* 2010; 11: R106 [RCA] [PMID: 20979621 DOI: 10.1186/gb-2010-11-10-r106] [FullText] [Full Text(PDF)]

22 Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 2013; 29: 15-21 [RCA] [PMID: 23104886 DOI: 10.1093/bioinformatics/bts635] [FullText]

23 Patro R, Duggal G, Love MI, Irizarry RA, Kingsford C. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nat Methods* 2017; 14: 417-419 [RCA] [PMID: 28263959 DOI: 10.1038/nmeth.4197] [FullText] [Full Text(PDF)]

24 Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 2014; 15: 550 [RCA] [PMID: 25516281 DOI: 10.1186/s13059-014-0550-8] [FullText] [Full Text(PDF)]

25 Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 15545-15550 [RCA] [PMID: 16199517 DOI: 10.1073/pnas.0506580102] [FullText]

26 Liberzon A, Birger C, Thorvaldsdóttir H, Ghandi M, Mesirov JP, Tamayo P. The Molecular Signatures Database (MSigDB) hallmark gene set collection. *Cell Syst* 2015; 1: 417-425 [RCA] [PMID: 26771021 DOI: 10.1016/j.cels.2015.12.004] [FullText]

27 Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Roth A, Santos A, Tsafou KP, Kuhn M, Bork P, Jensen LJ, von Mering C. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res* 2015; 43: D447-D452 [RCA] [PMID: 25352553 DOI: 10.1093/nar/gku1003] [FullText] [Full Text(PDF)]

28 Rao VS, Srinivas K, Sujini GN, Kumar GN. Protein-protein interaction detection: methods and analysis. *Int J Proteomics* 2014; 2014: 147648 [RCA] [PMID: 24693427 DOI: 10.1155/2014/147648] [FullText] [Full Text(PDF)]

29 Bebek G. Identifying gene interaction networks. *Methods Mol Biol* 2012; 850: 483-494 [RCA] [PMID: 22307715 DOI: 10.1007/978-1-61779-555-8_26] [FullText]

30 Hanes R, Zhang F, Huang Z. Protein Interaction Network Analysis to Investigate Stress Response, Virulence, and Antibiotic Resistance Mechanisms in *Listeria monocytogenes*. *Microorganisms* 2023; 11: 930 [RCA] [PMID: 37110353 DOI: 10.3390/microorganisms11040930] [FullText] [Full Text(PDF)]

31 Szklarczyk D, Kirsch R, Koutrouli M, Nastou K, Mehryary F, Hachilif R, Gable AL, Fang T, Doncheva NT, Pyysalo S, Bork P, Jensen LJ, von Mering C. The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Res* 2023; 51: D638-D646 [RCA] [PMID: 36370105 DOI: 10.1093/nar/gkac1000] [FullText] [Full Text(PDF)]

32 Speicher DJ, Rose J, Gutschi LM, Wiseman DM, McKernan K. DNA fragments detected in monovalent and bivalent Pfizer/BioNTech and Moderna mRNA COVID-19 vaccines from Ontario, Canada: Exploratory dose response relationship with serious adverse events. 2023 Preprint. Available from: OSF [DOI: 10.31219/osf.io/mjc97] [FullText]

33 Trougakos IP, Terpos E, Alexopoulos H, Politou M, Paraskevis D, Scorilas A, Kastritis E, Andreakos E, Dimopoulos MA. Adverse effects of COVID-19 mRNA vaccines: the spike hypothesis. *Trends Mol Med* 2022; 28: 542-554 [RCA] [PMID: 35537987 DOI: 10.1016/j.molmed.2022.04.007] [FullText] [Full Text(PDF)]

34 Fang L, Tang T, Hu M. Identification of Differentially Expressed Genes in COVID-19 and Integrated Bioinformatics Analysis of Signaling Pathways. *Genet Res (Camb)* 2021; 2021: 2728757 [RCA] [PMID: 35002537 DOI: 10.1155/2021/2728757] [FullText] [Full Text(PDF)]



35 Chang X, Ismail NI, Rahman A, Xu D, Chan RWY, Ong SG, Ong SB. Long COVID-19 and the Heart: Is Cardiac Mitochondria the Missing Link? *Antioxid Redox Signal* 2023; 38: 599-618 [RCA] [PMID: 36053670 DOI: 10.1089/ars.2022.0126] [FullText]

36 Molnar T, Lehoczki A, Fekete M, Varnai R, Zavori L, Erdo-Bonyar S, Simon D, Berki T, Csecsei P, Ezer E. Mitochondrial dysfunction in long COVID: mechanisms, consequences, and potential therapeutic approaches. *Geroscience* 2024; 46: 5267-5286 [RCA] [PMID: 38668888 DOI: 10.1007/s11357-024-01165-5] [FullText] [Full Text(PDF)]

37 Rurek M. Mitochondria in COVID-19: from cellular and molecular perspective. *Front Physiol* 2024; 15: 1406635 [RCA] [PMID: 38974521 DOI: 10.3389/fphys.2024.1406635] [FullText]

38 Cao X, Nguyen V, Tsai J, Gao C, Tian Y, Zhang Y, Carver W, Kiaris H, Cui T, Tan W. The SARS-CoV-2 spike protein induces long-term transcriptional perturbations of mitochondrial metabolic genes, causes cardiac fibrosis, and reduces myocardial contractile in obese mice. *Mol Metab* 2023; 74: 101756 [RCA] [PMID: 37348737 DOI: 10.1016/j.molmet.2023.101756] [FullText]

39 Gonzalez VJ, Li L, Buarpung S, Prahl M, Robinson JF, Gaw SL. Minimal mRNA uptake and inflammatory response to COVID-19 mRNA vaccine exposure in human placental explants. *iScience* 2023; 26: 107549 [RCA] [PMID: 37664582 DOI: 10.1016/j.isci.2023.107549] [FullText] [Full Text(PDF)]

40 Castruita JAS, Schneider UV, Mollerup S, Leineweber TD, Weis N, Bukh J, Pedersen MS, Westh H. SARS-CoV-2 spike mRNA vaccine sequences circulate in blood up to 28 days after COVID-19 vaccination. *APMIS* 2023; 131: 128-132 [RCA] [PMID: 36647776 DOI: 10.1111/apm.13294] [FullText] [Full Text(PDF)]

41 Krauson AJ, Casimero FVC, Siddiquee Z, Stone JR. Duration of SARS-CoV-2 mRNA vaccine persistence and factors associated with cardiac involvement in recently vaccinated patients. *NPJ Vaccines* 2023; 8: 141 [RCA] [PMID: 37758751 DOI: 10.1038/s41541-023-00742-7] [FullText]

42 Röltgen K, Nielsen SCA, Silva O, Younes SF, Zaslavsky M, Costales C, Yang F, Wirz OF, Solis D, Hoh RA, Wang A, Arunachalam PS, Colburg D, Zhao S, Haraguchi E, Lee AS, Shah MM, Manohar M, Chang I, Gao F, Mallajosyula V, Li C, Liu J, Shoura MJ, Sindher SB, Parsons E, Dashdorj NJ, Dashdorj ND, Monroe R, Serrano GE, Beach TG, Chinthurajah RS, Charville GW, Wilbur JL, Wohlstadter JN, Davis MM, Pulendran B, Troxell ML, Sigal GB, Natkunam Y, Pinsky BA, Nadeau KC, Boyd SD. Immune imprinting, breadth of variant recognition, and germinal center response in human SARS-CoV-2 infection and vaccination. *Cell* 2022; 185: 1025-1040.e14 [RCA] [PMID: 35148837 DOI: 10.1016/j.cell.2022.01.018] [FullText] [Full Text(PDF)]

43 Ota N, Itani M, Aoki T, Sakurai A, Fujisawa T, Okada Y, Noda K, Arakawa Y, Tokuda S, Tanikawa R. Expression of SARS-CoV-2 spike protein in cerebral Arteries: Implications for hemorrhagic stroke Post-mRNA vaccination. *J Clin Neurosci* 2025; 136: 111223 [RCA] [PMID: 40184822 DOI: 10.1016/j.jocn.2025.111223] [FullText]

44 Mueed A, Shariq A, Ashar M. Critical appraisal of: "expression of SARS-CoV-2 spike protein in cerebral arteries: implications for hemorrhagic stroke post-mRNA vaccination". *J Clin Neurosci* 2025; 136: 111270 [RCA] [PMID: 40267596 DOI: 10.1016/j.jocn.2025.111270] [FullText]

45 Holcik M, Sonenberg N. Translational control in stress and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6: 318-327 [RCA] [PMID: 15803138 DOI: 10.1038/nrm1618] [FullText]

46 Darnell JC, Richter JD. Cytoplasmic RNA-binding proteins and the control of complex brain function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012; 4: a012344 [RCA] [PMID: 22723494 DOI: 10.1101/cshperspect.a012344] [FullText]

47 Sonenberg N, Hinnebusch AG. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* 2009; 136: 731-745 [RCA] [PMID: 19239892 DOI: 10.1016/j.cell.2009.01.042] [FullText] [Full Text(PDF)]

48 Mallick M, Boehm V, Xue G, Blackstone M, Gehring NH, Chakrabarti S. Modulation of UPF1 catalytic activity upon interaction of SARS-CoV-2 Nucleocapsid protein with factors involved in nonsense mediated-mRNA decay. *Nucleic Acids Res* 2024; 52: 13325-13339 [RCA] [PMID: 39360627 DOI: 10.1093/nar/gkae829] [FullText]

49 Nuccetelli V, Mghezzi-Habellah M, Deymier S, Roisin A, Gérard-Baraggia F, Rocchi C, Coureux PD, Gouet P, Cimarelli A, Mocquet V, Fiorini F. The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein interferes with the full enzymatic activation of UPF1 and its interaction with UPF2. *Nucleic Acids Res* 2025; 53: gkaf010 [RCA] [PMID: 39831305 DOI: 10.1093/nar/gkaf010] [FullText]

50 Pitts S, Laiho M. Regulation of RNA Polymerase I Stability and Function. *Cancers (Basel)* 2022; 14: 5776 [RCA] [PMID: 36497261 DOI: 10.3390/cancers14235376] [FullText]

51 Ferreira R, Schneekloth JS Jr, Panov KI, Hannan KM, Hannan RD. Targeting the RNA Polymerase I Transcription for Cancer Therapy Comes of Age. *Cells* 2020; 9: 266 [RCA] [PMID: 31973211 DOI: 10.3390/cells9020266] [FullText] [Full Text(PDF)]

52 López J, Blanco S. Exploring the role of ribosomal RNA modifications in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2024; 86: 102204 [RCA] [PMID: 38759459 DOI: 10.1016/j.gde.2024.102204] [FullText]

53 Abusanad A. Utilizing peripheral blood inflammatory biomarker (PBI) to predict response to systemic therapy in patients with breast cancer. *J Family Med Prim Care* 2023; 12: 3368-3373 [RCA] [PMID: 38361878 DOI: 10.4103/jfmpc.jfmpc_1125_23] [FullText] [Full Text(PDF)]

54 Huai Q, Luo C, Song P, Bie F, Bai G, Li Y, Liu Y, Chen X, Zhou B, Sun X, Guo W, Gao S. Peripheral blood inflammatory biomarkers dynamics reflect treatment response and predict prognosis in non-small cell lung cancer patients with neoadjuvant immunotherapy. *Cancer Sci* 2023; 114: 4484-4498 [RCA] [PMID: 37731264 DOI: 10.1111/cas.15964] [FullText] [Full Text(PDF)]

55 Xie Y, Yu Q, Zhu Y, Wu W, Xiao R, Wang N, Zhu L, Li P, Chen T. The value of peripheral blood inflammation markers in risk assessment and prediction of lung cancer. *Future Sci OA* 2025; 11: 2476870 [RCA] [PMID: 40079245 DOI: 10.1080/20565623.2025.2476870] [FullText]

56 Demongeot J, Fougère C. mRNA COVID-19 Vaccines-Facts and Hypotheses on Fragmentation and Encapsulation. *Vaccines (Basel)* 2022; 11: 40 [RCA] [PMID: 36679885 DOI: 10.3390/vaccines11010040] [FullText]

57 Kiaie SH, Majidi Zolbanin N, Ahmadi A, Bagherifar R, Valizadeh H, Kashanchi F, Jafari R. Recent advances in mRNA-LNP therapeutics: immunological and pharmacological aspects. *J Nanobiotechnology* 2022; 20: 276 [RCA] [PMID: 35701851 DOI: 10.1186/s12951-022-01478-7] [FullText] [Full Text(PDF)]

58 Parry PI, Lefringhausen A, Turni C, Neil CJ, Cosford R, Hudson NJ, Gillespie J. 'Spikeopathy': COVID-19 Spike Protein Is Pathogenic, from Both Virus and Vaccine mRNA. *Biomedicines* 2023; 11: 2287 [RCA] [PMID: 37626783 DOI: 10.3390/biomedicines11082287] [FullText] [Full Text(PDF)]

59 Sharma P, Hoorn D, Aitha A, Breier D, Peer D. The immunostimulatory nature of mRNA lipid nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev* 2024; 205: 115175 [RCA] [PMID: 38218350 DOI: 10.1016/j.addr.2023.115175] [FullText]

60 Hu A, Sun L, Lin H, Liao Y, Yang H, Mao Y. Harnessing innate immune pathways for therapeutic advancement in cancer. *Signal Transduct Target Ther* 2024; 9: 68 [RCA] [PMID: 38523155 DOI: 10.1038/s41392-024-01765-9] [FullText] [Full Text(PDF)]

61 Maiorino L, Daßler-Plenker J, Sun L, Egeblad M. Innate Immunity and Cancer Pathophysiology. *Annu Rev Pathol* 2022; 17: 425-457 [RCA] [PMID: 34788549 DOI: 10.1146/annurev-pathmechdis-032221-115501] [FullText]

62 Yi M, Li T, Niu M, Mei Q, Zhao B, Chu Q, Dai Z, Wu K. Exploiting innate immunity for cancer immunotherapy. *Mol Cancer* 2023; 22: 187 [RCA] [PMID: 38008741 DOI: 10.1186/s12943-023-01885-w] [FullText] [Full Text(PDF)]

63 Lee HK, Knabl L, Moliva JI, Knabl L Sr, Werner AP, Boyoglu-Barnum S, Kapferer S, Pateter B, Walter M, Sullivan NJ, Furth PA, Hennighausen L. mRNA vaccination in octogenarians 15 and 20 months after recovery from COVID-19 elicits robust immune and antibody responses that include Omicron. *Cell Rep* 2022; 39: 110680 [RCA] [PMID: 35395191 DOI: 10.1016/j.celrep.2022.110680] [FullText] [Full Text(PDF)]

64 Blann AD. Endothelial cell activation markers in cancer. *Thromb Res* 2012; 129 Suppl 1: S122-S126 [RCA] [PMID: 22682122 DOI: 10.1016/S0049-3848(12)70031-2] [FullText]

65 Smeda M, Przyborowski K, Stojak M, Chlopicki S. The endothelial barrier and cancer metastasis: Does the protective facet of platelet function matter? *Biochem Pharmacol* 2020; 176: 113886 [RCA] [PMID: 32113813 DOI: 10.1016/j.bcp.2020.113886] [FullText]

66 Zheng Y, Zhao J, Li J, Guo Z, Sheng J, Ye X, Jin G, Wang C, Chai W, Yan J, Liu D, Liang X. SARS-CoV-2 spike protein causes blood coagulation and thrombosis by competitive binding to heparan sulfate. *Int J Biol Macromol* 2021; 193: 1124-1129 [RCA] [PMID: 34743814 DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.10.112] [FullText] [Full Text(PDF)]

67 Becker RC, Tantry US, Khan M, Gurbel PA. The COVID-19 thrombus: distinguishing pathological, mechanistic, and phenotypic features and management. *J Thromb Thrombolysis* 2025; 58: 15-49 [RCA] [PMID: 39179952 DOI: 10.1007/s11239-024-03028-4] [FullText]

68 Menezes F, Palmeira JDF, Oliveira JDS, Argañaraz GA, Soares CRJ, Nóbrega OT, Ribeiro BM, Argañaraz ER. Unraveling the SARS-CoV-2 spike protein long-term effect on neuro-PASC. *Front Cell Neurosci* 2024; 18: 1481963 [RCA] [PMID: 39744674 DOI: 10.3389/fncel.2024.1481963] [FullText] [Full Text(PDF)]

69 Peppercorn K, Edgar CD, Kleffmann T, Tate WP. A pilot study on the immune cell proteome of long COVID patients shows changes to physiological pathways similar to those in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome. *Sci Rep* 2023; 13: 22068 [RCA] [PMID: 38086949 DOI: 10.1038/s41598-023-49402-9] [FullText]

70 Valdes Angues R, Perea Bustos Y. SARS-CoV-2 Vaccination and the Multi-Hit Hypothesis of Oncogenesis. *Cureus* 2023; 15: e50703 [RCA] [PMID: 38234925 DOI: 10.7759/cureus.50703] [FullText]

71 Patra T, Meyer K, Geerling L, Isbell TS, Hoft DF, Brien J, Pinto AK, Ray RB, Ray R. SARS-CoV-2 spike protein promotes IL-6 transsignaling by activation of angiotensin II receptor signaling in epithelial cells. *PLoS Pathog* 2020; 16: e1009128 [RCA] [PMID: 33284859 DOI: 10.1371/journal.ppat.1009128] [FullText] [Full Text(PDF)]



72 Suzuki YJ, Gychka SG. SARS-CoV-2 Spike Protein Elicits Cell Signaling in Human Host Cells: Implications for Possible Consequences of COVID-19 Vaccines. *Vaccines (Basel)* 2021; 9: 36 [RCA] [PMID: 33440640 DOI: 10.3390/vaccines9010036] [FullText] [Full Text(PDF)]

73 Kwon J, Bakhoun SF. The Cytosolic DNA-Sensing cGAS-STING Pathway in Cancer. *Cancer Discov* 2020; 10: 26-39 [RCA] [PMID: 31852718 DOI: 10.1158/2159-8290.CD-19-0761] [FullText]

74 Aldén M, Olofsson Falla F, Yang D, Barghouth M, Luan C, Rasmussen M, De Marinis Y. Intracellular Reverse Transcription of Pfizer BioNTech COVID-19 mRNA Vaccine BNT162b2 In Vitro in Human Liver Cell Line. *Curr Issues Mol Biol* 2022; 44: 1115-1126 [RCA] [PMID: 35723296 DOI: 10.3390/cimb44030073] [FullText] [Full Text(PDF)]

75 Chakraborty S. The bloodstream of mRNA vaccinated individuals (both Pfizer and Moderna) shows DNA expression vector contamination, including SV40 and kanamycin-resistant gene sequences. 2024 Preprint. Available from: OSF [DOI: 10.31219/osf.io/hzyn3] [FullText]