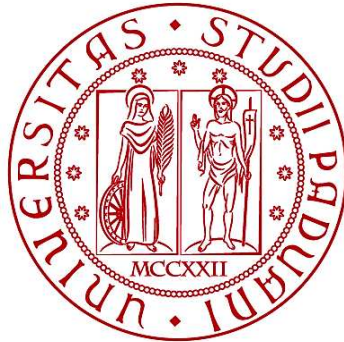


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia Molecolare



ELABORATO DI LAUREA

**Aumento dell'espressione del CD38 in cellule endoteliali a seguito
dell'infezione da parte di SARS-CoV-2 nel modello animale di macaco
*Cynomolgus***

Tutor: Prof.ssa Cristina Parolin
Dipartimento di Medicina Molecolare

Laureanda: Cecilia Frasca

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

Indice

Abstract	2
1. Stato dell'arte	3
1.1 SARS-CoV-2	
1.2 Ruolo biologico di CD38	
1.3 Ruolo delle cellule endoteliali nella risposta all'infezione	
2. Approccio sperimentale	5
2.1 Dichiarazione del comitato etico	
2.2 Modello animale: macaco <i>Cynomolgus</i>	
2.3 Esame istologico	
Colorazione ematossilina-eosina	
Colorazione Carstairs	
2.4 Colorazione immunohistochimica	
2.5 Colorazione in immunofluorescenza	
2.6 RT-PCR quantitativa	
2.7 ELISA	
2.8 Colture di cellule endoteliali (HUVEC)	
2.9 Trattamento siRNA per il CD38	
2.10 Apoptosis detection assay	
2.11 Analisi statistica	
3. Risultati e discussione	10
3.1 Attivazione delle cellule endoteliali nei macachi <i>Cynomolgus</i> infettati da SARS-CoV-2	
3.2 Aumento dei livelli di espressione di CD38 e degli enzimi per la biosintesi del NAD nelle cellule endoteliali dei polmoni e del cuore di macachi <i>Cynomolgus</i> infettati da SARS-CoV-2	
3.3 Espressione di CD38 nelle cellule endoteliali umane (HUVEC) a seguito di stimolazione con plasma di macachi infettati e IL-6 + IL-6R	
3.4 Ruolo protettivo di CD38 nelle HUVEC dopo la stimolazione con IL-6 + IL-6R	
3.5 Discussione	
4. Conclusione	15
5. Bibliografia	15
6. Appendice	16

Abstract

Il COVID-19 è una patologia respiratoria acuta, il cui agente eziologico è SARS-CoV-2. L'esordio è caratterizzato da un'infezione delle vie respiratorie, ma nelle forme più gravi può presentarsi come una patologia multi-sistemica. Queste manifestazioni cliniche sembrano essere dovute ad una disfunzione endoteliale causata dal virus, che risulta determinante nell'insorgenza di complicazioni vascolari e sintomi gravi. In questo studio è stato utilizzato, come organismo modello, il macaco *Cynomolgus*, è stata analizzata l'attivazione delle cellule endoteliali e sono state valutate le modificazioni nel metabolismo della nicotinammide adenina dinucleotide (NAD) a seguito dell'infezione virale. Particolare attenzione è stata data alla molecola CD38, un enzima coinvolto nella degradazione del NAD nella risposta infiammatoria all'infezione, che subisce una sovra regolazione a seguito dell'aumento del trans-signaling dell'interleuchina 6 (IL-6) virus-indotta. I risultati di questo studio suggeriscono il metabolismo del NAD come potenziale target per il trattamento dell'infezione da parte di SARS-CoV-2. Inoltre, è stato compreso che il CD38 svolge un ruolo protettivo per le cellule endoteliali nella fase iniziale dell'infezione piuttosto che un ruolo causale nella disfunzione delle stesse.

Key words: SARS-CoV-2, macaco *Cynomolgus*, CD38, disfunzione endoteliale, nicotinammide adenina dinucleotide (NAD), *trans*-signaling dell'interleuchina 6

1. Stato dell'arte

La disfunzione endoteliale causata da SARS-CoV-2 risulta decisiva nel promuovere l'evoluzione dell'infezione verso forme clinicamente più gravi e l'insorgenza di complicanze vascolari, come tromboembolia venosa e vasculite sistemica. Le complicazioni cardiovascolari sono rapidamente apparse come una delle principali minacce per i pazienti affetti da COVID-19, accanto ai problemi respiratori. Per questo motivo è emerso un crescente interesse verso i cambiamenti metabolici nelle cellule endoteliali durante la malattia. In particolare, il metabolismo del NAD è stato indicato come un possibile bersaglio terapeutico per il trattamento del COVID-19.

1.1 SARS-CoV-2

Il SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus 2*) è l'agente eziologico della patologia COVID-19. Questo virus appartiene alla famiglia *Coronaviridae* e presenta un genoma a ssRNA con polarità positiva di circa 29,9 kb (Fig.1).

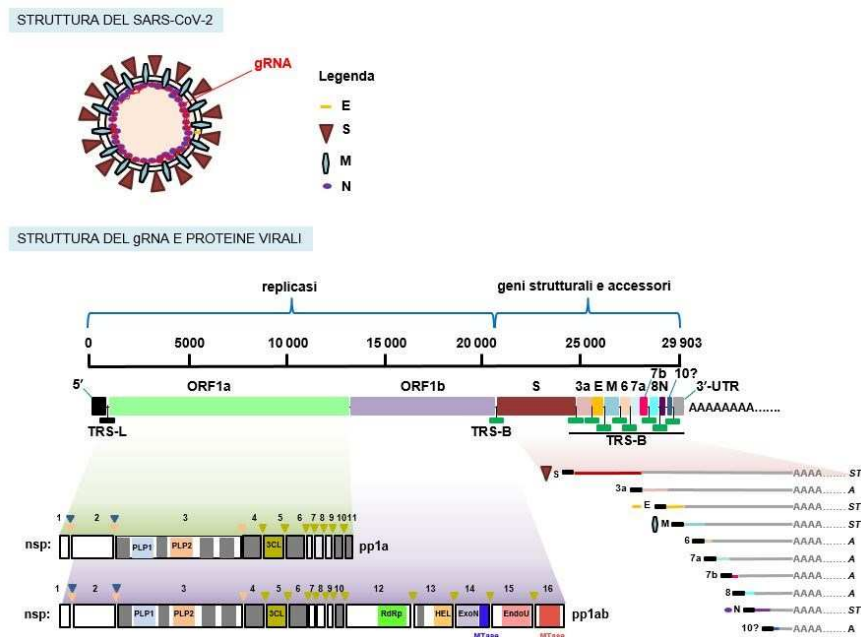


Figura 1: genoma di SARS-CoV-2

Il genoma è organizzato in ORF, con ORF1a e ORF1b che occupano la maggior parte di esso e codificano 16 proteine non strutturali (nsp), ma essenziali per la replicazione dell'RNA genomico e la produzione di mRNA sub-genomici virali. La porzione prossima alla terminazione 3' presenta, invece, 4 ORFs che codificano le proteine strutturali:

- proteina N: proteina del nucleocapside che contiene il genoma, coinvolta nel legame e nell'impacchettamento del genoma dell'RNA e responsabile della sua stabilità;
- proteina M: proteina di membrana, in grado di attraversare l'envelope e di interagire con il genoma virale;

- proteina E: proteina dell'envelope che costituisce il rivestimento del virione e permette l'attacco alla membrana della cellula ospite;
- proteina S: la proteina spike forma le proiezioni presenti sulla superficie del virus che conferiscono ad esso la sua caratteristica forma a corona. Questa proteina risulta determinante per la specificità del virus che in questo modo è in grado di legare le cellule epiteliali del tratto respiratorio.

Queste proteine, in quanto strutturali, sono essenziali per la formazione di nuovi virioni, mentre, i restanti 5 ORFs codificano proteine accessorie che contribuiscono alla virulenza ed alla replicazione.

1.2 Ruolo biologico di CD38

CD38 è una glicoproteina con funzioni recettoriali ed enzimatiche. Come recettore è espresso su leucociti, come i linfociti T, dove è coinvolto nell'attivazione e nella proliferazione, e sui neutrofilo, dove regola la risposta immunitaria innata attraverso la produzione di molecole di segnalazione del calcio che segnalano la chemiotassi. La sua attività enzimatica è duplice: ha sia attività di ADP-ribosil ciclasi che di NAD(P)+idrolasi; tuttavia, è stato visto che la seconda attività sia quella predominante, mentre la prima presenta un ruolo nella segnalazione di Ca²⁺. CD38 è, quindi, strettamente coinvolto nel controllo dei livelli di NAD.

CD38 è espressa in risposta a segnali infiammatori e questo contribuisce al declino del NAD, osservato anche nelle infezioni da SARS-CoV-2. Questo porta alla produzione di una risposta iperinflammatoria, rendendo CD38 un potenziale bersaglio farmacologico. Alcuni studi, infatti, hanno dimostrato come la somministrazione di precursori del NAD possa migliorare la risposta immunitaria.

1.3 Ruolo delle cellule endoteliali in risposta all'infezione

Le cellule endoteliali costituiscono il tessuto endoteliale (endotelio), un tessuto epiteliale pavimentoso non stratificato che riveste la superficie interna dei vasi sanguigni, dei vasi linfatici e del cuore. Queste cellule sono suscettibili ad alterazioni chimiche e fenotipiche quando vengono sottoposte a stimolazione meccanica esterna. In condizioni omeostatiche sono quiescenti e anti-aterogene, rallentando la formazione di placche aterosclerotiche e prevenendo, quindi, complicazioni trombotiche. Se, però, vengono colpite da infezione, stress, ipertensione etc., subiscono cambiamenti che ne determinano una disfunzione. La disfunzione permette la secrezione di citochine e chemochine che portano al reclutamento di cellule immunitarie, generando una risposta infiammatoria acuta che può culminare in un'inflammatione cronica, se i meccanismi di riparazione non sono operativi. L'endotelio danneggiato e disfunzionale sembra avere un ruolo attivo nel promuovere l'evoluzione dell'infezione verso le forme clinicamente più gravi. Risulta quindi molto probabile l'associazione tra una disfunzione endoteliale e COVID-19. Il danno citopatico prodotto dal virus e l'attivazione della risposta infiammatoria contro l'infezione facilitano l'attivazione delle cellule endoteliali

oltre che la perdita dell'integrità endoteliale e l'aumento della permeabilità vascolare, promuovendo l'extravasazione leucocitaria. A livello polmonare questo si traduce nell'insorgenza di microtrombosi capillare e danno alla barriera alveolo-capillare, questo genera una polmonite interstiziale e può portare alla comparsa di addensamenti bilaterali multifocali e ARDS. A livello dell'apparato cardiovascolare la disfunzione endoteliale può concretizzarsi in danno miocardico acuto. Inoltre, le complesse alterazioni a livello dell'endotelio possono determinare un'aumentata suscettibilità a manifestazioni tromboemboliche arteriose e venose, in particolare il tromboembolismo venoso si presenta con frequenza nei pazienti ospedalizzati per infezione da SARS-CoV-2 (10-15% dei casi) e ancor di più in coloro che accedono alla terapia intensiva (20-30% dei casi). È possibile, inoltre, che siano coinvolti altri distretti, tra cui reni e intestino, a livello dei quali l'incapacità funzionale del microcircolo può comportare insufficienza renale acuta e infarto intestinale. Risulta, quindi, estremamente utile lo sviluppo di indicatori della disfunzione endoteliale per effettuare la prognosi e una valutazione della gravità della patologia. Inoltre, è di grande interesse valutare la disfunzione endoteliale come possibile bersaglio terapeutico.

2. Approccio sperimentale

2.1 Dichiarazione del comitato etico

Lo studio è stato condotto in conformità con le “Linee guida per l'allevamento e la gestione degli animali da laboratorio” del Research Centre for Animal Life Science dell'Università di medicina di Shiga e con le “Norme relative alla cura e fondamentali e le linee guida per la corretta conduzione degli esperimenti sugli animali e relativi accorgimenti per le attività in istituti di ricerca accademica” sotto la giurisdizione del Ministero dell'Istruzione, della Cultura, dello Sport, della Scienza e della Tecnologia del Giappone. I protocolli sperimentali sugli animali sono stati approvati dal Comitato Etico per gli esperimenti sugli animali dell'Università di Medicina di Shiga (autorizzazione n. 2020-4-2, 2020-6-20 e 1-1-2021). Inoltre, sono stati forniti una regolare assistenza veterinaria ed un monitoraggio costante per alleviare la sofferenza, oltre ad una nutrizione adeguata ed un arricchimento ambientale.

Al termine dell'analisi i macachi sono stati soppressi utilizzando ketamina (5 mg/kg) e xilazina (1 mg/kg) e, in seguito, è stata eseguita un'iniezione endovenosa di pentobarbital (200 mg/kg). Giornalmente è stato valutato il punteggio clinico, riportato nella tabella, ed è stata effettuata l'eutanasia quando gli organismi raggiungevano il punteggio di 15, che corrisponde al punto di fine umana.

Parameter	Degree of parameter	Possible score
Fever	Normal (< 39°C)	0
	Elevated temperature (39 - 40°C)	3
	High temperature (> 40°C)	5
Posture	Piloerection of body hair	1
	Decreased activity, decreased normal behavior/Occasionally lying down, huddled, active when people in room	2
	Huddled on camera, active when people in room/Lying down, getting up when approached, using cage for support	3
	Huddled when people in room, shaking, toes and hands clenched/Lying down, not getting up when approached or prompted	5
Respiration	Increased or decreased; mild cough and clear nasal discharge	3
	Labored breathing through mouth; severe cough and severe nasal discharge	5
Appetite	Slightly decreased	1
	Decreased	2
	Severely decreased	5
Skin	Flushed appearance	2
	Visible rash	2
	Bleeding	5

Tabella 1: tabella per la valutazione del punteggio clinico

2.2 Modello animale: macaco *Cynomolgus*

Il modello animale di macaco *Cynomolgus* è stato scelto per la sua somiglianza immunologica all'uomo, rappresentando un modello idoneo per studiare le risposte endoteliali all'infezione da SARS-CoV-2. In questo esperimento sono stati utilizzati campioni raccolti da macachi *Cynomolgus* infettati da SARS-CoV-2. I campioni di controllo sono stati estratti da macachi sani. Il plasma è stato raccolto nei giorni indicati e conservato a - 80 °C fino al suo utilizzo. I tessuti estratti sono stati fissati in formalina neutra al 10% ed inclusi in paraffina, per ottenere i tessuti FFPE. Questo metodo permette la conservazione a lungo termine dei tessuti, necessaria per la diagnosi istopatologica. Per stabilizzare e conservare l'RNA il campione di tessuto è stato immerso in una soluzione di RNAlater™ e conservato a - 25 °C o - 80 °C.

2.3 Esame istologico

Colorazione ematossilina-eosina

La colorazione con ematossilina-eosina è molto utilizzata sia in campo istologico che in campo patologico perché consente un'osservazione morfologica di tessuti e organi. È una colorazione progressiva che prevede l'uso sequenziale di due soluzioni coloranti, l'ematossilina (colorante basico che conferisce una colorazione blu-violetta ai nuclei e ai vari componenti acidi del citoplasma, come ad esempio i ribosomi) e l'eosina (colorante acido che colora di rosa il citoplasma). Tramite questa colorazione è stato possibile visualizzare, a livello delle cellule endoteliali dei vasi nelle sezioni polmonari, un rigonfiamento morfologico e determinare il livello di rilevazione, un parametro statistico, tramite un sistema di punteggi: 0 = non rilevato; 1 = centrale; 2 = intermedio; 3 = diffuso. Per l'assegnazione del punteggio è stata utilizzata una sezione del lobo polmonare inferiore destro di

ciascun macaco infetto e come confronto è stata utilizzata una sezione di un lobo polmonare estratto da un macaco non infettato.

Colorazione Carstairs

La colorazione Carstairs è una tecnica istologica utilizzata principalmente per identificare componenti dei coaguli come fibrina, piastrine, collagene, muscolatura e globuli rossi. I livelli alti di queste componenti indicano un maggiore rischio di sviluppare trombi. Per la valutazione sono state utilizzate sezioni di 3 µm del lobo polmonare inferiore destro di macachi infettati. Le sezioni sono state trattate con solfato ferrico ammonico al 5% per 5 minuti e con ematosilina per 5 minuti e poi colorate con una soluzione di acido picrico G arancione diluita 10 volte per 30-60 minuti. Poi, è stato eseguito il trattamento con una soluzione contenente xilidina ponceau, acido fucsina e azophloxina per 5 minuti, con una soluzione di acido fosfotungstico idrato per 5 minuti e infine con una soluzione di anilina per 5 minuti, infine è stato contato il numero di vasi con fibrina (rosso vivo).

2.4 Colorazione immunoistochimica

La colorazione immunoistochimica (HIC) è ampiamente usata per visualizzare e localizzare alcune proteine all'interno di sezioni di tessuto. Questo metodo sfrutta l'uso di anticorpi specifici che si legano selettivamente agli antigeni bersaglio, consentendo quindi una visualizzazione della distribuzione delle proteine di interesse all'interno di tessuti o cellule. Per questa analisi sono state utilizzate le sezioni polmonari spesse 3 µm precedentemente deparaffinizzate. Gli antigeni sono stati recuperati e l'attività endogena della perossidasi è stata bloccata con perossido di idrogeno all'1% in metanolo per 13 minuti. L'antigene non specifico è stato bloccato con il 10% di siero di capra per 30 minuti. I tessuti sono stati incubati con anticorpi primari a 4 °C durante la notte e poi con un anticorpo secondario per 60 minuti a temperatura ambiente e trattato con 3,3'-diaminobenzidina. Le sezioni sono state controcolorate con ematosilina. Come controllo negativo, una sezione di tessuto è stata colorata con anticorpo di controllo dell'isotipo policlonale IgG di coniglio e/o controllo dell'isotipo IgG1 di topo e non è stato osservato alcun segnale positivo sulle EC (dati non mostrati). Il livello di rilevamento dei vasi con CD38+, LDH+ (la latticodeidrogenasi, un enzima citoplasmatico che si trova nella maggior parte delle cellule dell'organismo e viene rilasciato nel sangue quando le cellule sono danneggiate); IDO+ (indoleamina 2,3-diossigenasi, enzima intracellulare coinvolto nell'immunotolleranza sistemica e nel controllo delle infezioni); NAPRT+ (nicotinato fosforibosiltransferasi, converte la vitamina B3 in NAD+); NMNAT+ nelle sezioni polmonari è stato valutato mediante un sistema di punteggio basato sulla frequenza di rilevamento dei vasi positivi per ciascun marcatore: 0, non rilevato; 1, centrale; 2, intermedio; e 3, diffuso.

2.5 Colorazione in immunofluorescenza

L'immunofluorescenza (IF) è una tecnica che consente la visualizzazione di molti componenti in un dato tessuto o tipo di cellula. Questa capacità è ottenuta attraverso

combinazioni di anticorpi specifici marcati con fluorofori. La fissazione è una fase preliminare essenziale nella colorazione in IF al fine di prevenire l'autolisi e preservare la morfologia mantenendo l'antigenicità, immobilizzando gli antigeni bersaglio e consentendo quindi l'accesso agli anticorpi. Nella fase iniziale, le sezioni di tessuto fissate in formalina ed incluse in paraffina sono state deparaffinizzate con un metodo standard con xilene ed etanolo, per rendere accessibile il tessuto ai reagenti successivi. In seguito, siccome durante il processo di fissazione molti antigeni vengono mascherati, è necessario effettuare il recupero dell'antigene. Questo prevede il trattamento delle sezioni con calore in un tampone a pH appropriato. I siti di legame aspecifici vengono bloccati grazie all'incubazione con siero di capra per 30 minuti. Seguono poi le incubazioni con gli anticorpi. Si aggiunge il primo anticorpo primario (anti-IDO, NAPRT o LDH) e si lascia in incubazione tutta la notte. Il giorno seguente si procede con l'incubazione con l'anticorpo secondario marcato con fluorocromo PhenoVue Fluor 647 anti-topo o anti-coniglio per 60 minuti. Successivamente si esegue il lavaggio delle sezioni, si bloccano nuovamente i siti di legame aspecifici con siero di capra e poi si aggiunge il secondo anticorpo primario (anti-CD38) per una notte e con il secondo anticorpo secondario anti-coniglio FITC. Si procede poi con la rimozione dell'auto fluorescenza tramite il kit di Quenching dell'auto fluorescenza Vector TrueVIEW® (seguendo le istruzioni del produttore). Infine, le sezioni sono state contro colorate e montate con il reagente anti-dissolvenza Prolong Gold con DAPI (Invitrogen), per la colorazione del nucleo e poi osservate al microscopio. Come controllo negativo, una sezione di tessuto è stata colorata con anticorpo di controllo dell'isotipo policlonale IgG di coniglio e/o controllo dell'isotipo IgG1 di topo e non è stato osservato alcun segnale positivo, confermando in questo modo la buona riuscita dell'analisi.

2.6 RT-PCR quantitativa

La RT-PCR permette l'analisi e l'amplificazione di RNA grazie ad una precedente retrotrascrizione che permette la generazione di cDNA, usato poi come template della reazione. Inizialmente si effettua l'estrazione di RNA tramite il mini-kit RNeasy® Plus della Qiagen; l'RNA viene estratto sia dai campioni di macaco sia dai campioni di cellule HUVEC. L'RNA viene poi mescolato con primer casuali, primer Oligo d(T)15 e mix di dNTP e la miscela viene poi riscaldata a 65°C per 5 minuti per denaturare l'RNA e favorire il legame dei primer. Si procede poi con la reazione con la trascrittasi inversa, la miscela viene trattata con SuperScript™ IV trascrittasi inversa, buffer SuperScript™ IV, DTT e inibitore della RNasi ricombinante. La reazione viene eseguita in un termociclatore Bio-Rad T100™ con le seguenti condizioni: 25°C per 10 minuti; 42°C per 10 minuti; 72°C per 10 minuti. Si procede poi con i cicli di PCR quantitativa. Il cDNA viene mescolato al SYBR Green e poi vengono eseguiti 45 cicli, ognuno dei quali costituito da una denaturazione a 95°C per 10 secondi, annealing a 52°C per 10 secondi ed estensione a 72°C per 20 secondi. La quantità relativa di RNA per ciascun gene è espressa

come: $\Delta Ct = Ct$ (gene di interesse) - Ct (GAPDH), dove Ct rappresenta la soglia del ciclo. I cambiamenti relativi rispetto al controllo vengono calcolati con il metodo $2^{-\Delta\Delta Ct}$, dove: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (campione infettato o trattato) – ΔCt (campione non infettato o non trattato).

2.7 ELISA

I livelli di D-dimero, vWF, PAI-1 e protrombina F1+2 nel plasma di macaco il giorno 0 prima dell'infezione ed il giorno 3 dopo l'infezione sono stati misurati dai seguenti kit ELISA: D-dimero, fattore di von Willebrand; Serpin E1/ PAI-1 e Protrombina F1+2. La concentrazione di ciascun marcatore è stata calcolata utilizzando un calcolatore ELISA a quattro parametri disponibile sul sito di Arigo (<https://www.arigobio.com/ELISA-calcolatrice>).

2.8 Colture di cellule endoteliali (HUVEC)

Sono stati utilizzate HUVEC nei passaggi da 5 a 10. Le cellule sono state coltivate in terreno Bulletkit™ EGM-2™ in piastre a 24 pozzetti e mantenute in un incubatore umidificato a 37 °C e 5% di CO₂. Quando le cellule hanno raggiunto la confluenza sono state stimolate con la proteina IL-6 umana ricombinante (una versione sintetica dell'interleuchina 6, una citochina prodotta dalle cellule immunitarie, che svolge un ruolo cruciale nella risposta immunitaria e infiammatoria) e con la proteina IL-6R α (la subunità α del recettore per l'interleuchina 6, proteina quindi necessaria per il legame con IL-6).

2.9 Trattamento siRNA per il CD38

Le HUVEC sono state trattate con siRNA specifico per CD38 e come controllo negativo è stato utilizzato un siRNA di controllo. Il siRNA è stato somministrato usando Lipofectamine™ RNAiMAX, un reagente specifico per la trasfezione di siRNA, sul terreno sierico ridotto Opti-MEM. Dopo 24 ore, il terreno è stato cambiato con un mezzo contenente IL-6 e IL-6R, per stimolare le cellule. L'efficienza del knockdown è stata calcolata quantificando i livelli di mRNA di CD38 tramite RT-PCR, i dati sono stati poi normalizzati rispetto a GAPDH (gene di riferimento) ed in relazione al controllo negativo usando la formula:

$$100 \times (1 - 2^{-\Delta\Delta Ct})$$

2.10 Apoptosis detection assay

Cellule HUVEC trattate con CD38 siRNA e/o IL-6 + IL-6R per 48 ore sono state raccolte usando una soluzione di tripsina-EDTA per distaccarle dalla superficie della piastra. La rilevazione delle cellule morte è stata fatta con l'utilizzo del Trypan blu, in grado di colorare selettivamente le cellule morte, e di un contatore automatizzato (Bio-Rad TC20™). Poi le cellule sono state colorate con Annexin V coniugata PE e 7AAD mediante un kit per la rilevazione dell'apoptosi, Annexin V è in grado di identificare le cellule in fase iniziale di apoptosi, legandosi alla fosfatidilserina esposta sulla membrana cellulare; 7AAD penetra nelle cellule morte

o in fase avanzata di apoptosi. Le cellule colorate sono state acquisite con un citometro a flusso Beckmann Coulter CytoFLEX S ed analizzate con il software CytExpert versione 2.4. sono state quindi valutate le percentuali di cellule Annexin V-positive e 7AAD-positive.

2.11 Analisi statistica

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando un t-test di Student a due code per confronti non accoppiati di macachi infettati da SARS-CoV-2 e macachi non infettati, grazie a GraphPad Software. La significatività statistica è stata fissata a $p < 0,05$. I grafici sono stati creati da GraphPad Software.

3. Risultati e discussione

3.1. Attivazione delle cellule endoteliali nei macachi *Cynomolgus* infettati da SARS-CoV-2

È stato dimostrato che l'infezione da SARS-CoV-2 modifica significativamente la morfologia delle EC nei pazienti umani. In questo studio sono state analizzate le EC di macaco a tre giorni dall'infezione, momento nel quale i macachi mostravano una variazione della temperatura corporea ed una polmonite, evidenziata da un'analisi radiografica.

Nei polmoni di macachi infettati sono state osservate EC rotondeggianti con citoplasma chiaro, prova di un'attivazione cellulare. Al contrario, nei macachi di controllo, non infettati, non troviamo cellule rotondeggianti, come possiamo vedere, grazie alla colorazione ematossilina-eosina, nella Fig.2 e dal grafico di sinistra nella Fig.3. Inoltre, è stato registrato un aumento del numero medio di coaguli di fibrina intravascolari nei polmoni di macachi infettati, come possiamo vedere grazie alla colorazione Carstairs nella Fig.2 in basso e dal grafico a destra nella Fig.3.

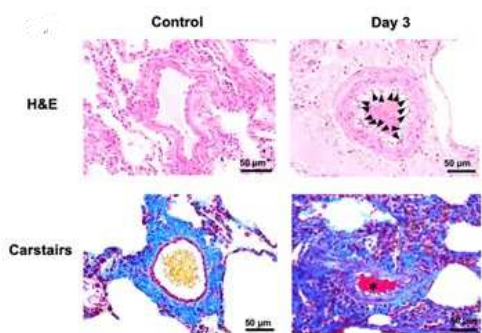


Figura 2: nel pannello di sinistra è mostrato il controllo, mentre in quello di destra è riportato il campione nel giorno 3 dopo l'infezione. i campioni sono stati sottoposti a due differenti colorazioni. In alto vediamo la colorazione ematossilina-eosina, in basso la colorazione Carstairs.

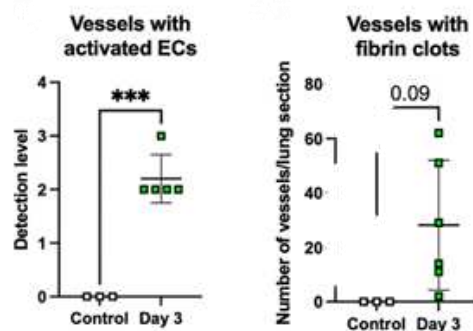


Figura 3: a sinistra il grafico con il livello di rilevamento di vasi con cellule endoteliali attivate; a destra il grafico con il numero di vasi che presentano fibrina intravascolare.

È stata visualizzata una upregolazione dei marcatori di attivazione VCAM-1 e E-selectina, nei campioni prelevati al giorno 3 di infezione, sia nel tessuto polmonare sia nel tessuto cardiaco, come possiamo vedere dai grafici della Fig.4.

Dall'analisi del plasma sono stati osservati importanti aumenti di D-dimero e di fattore von Willebrand (vWF), come si può evincere nella Fig.5. Sono stati analizzati anche i livelli di PAI-1 e prototrombina F1+2, ma questi non hanno mostrato cambiamenti significativi. In sintesi, 3 giorni dopo l'infezione, le EC sono state attivate con un aumento della trombogenesi intravascolare, un processo di formazione di trombi (coaguli di sangue) all'interno dei vasi sanguigni.

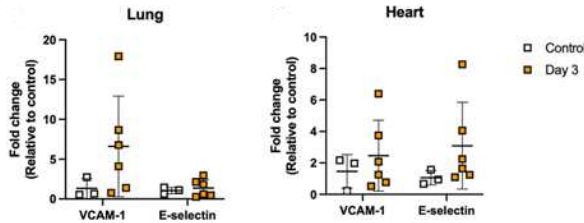


Figura 4: livelli di VCAM-a e E-selectina in polmoni e cuore

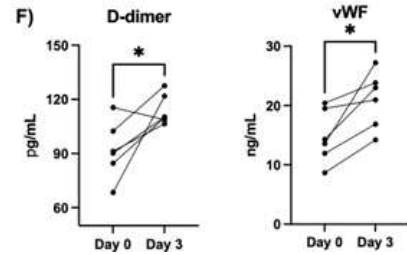


Figura 5: livelli di D-dimero (a sinistra) e di vWF (a destra)

3.2. Aumento dei livelli di espressione di CD38 e degli enzimi per la biosintesi del NAD nelle cellule endoteliali dei polmoni e del cuore di macachi *Cynomolgus* infettati da SARS-CoV-2

In questo studio sono stati esaminati i cambiamenti nel metabolismo del NAD, potenzialmente associati alle complicazioni date dal COVID-19. In particolar modo sono stati analizzati i livelli di espressione degli enzimi per la biosintesi del NAD, coinvolti nei diversi pathway di regolazione, rappresentati nella Fig.6.

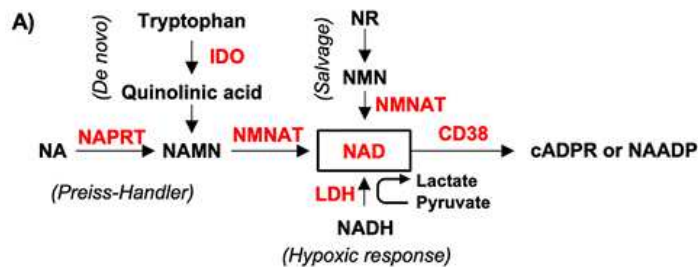


Figura 6: pathways di biosintesi del NAD

È stata valutata l'espressione di CD38, IDO, NAPRT, NMNAT e LDH nelle EC sia di cuore che di polmoni di macachi infettati. Il CD38 è risultato positivo nelle cellule infettate e negativo nelle cellule di controllo. Per IDO e LDH è stata visualizzata una distribuzione diffusa e la loro espressione non è stata riscontrata in cellule non infettate. Anche la rilevazione di NAPRT e NMNAT era abbastanza frequente anche se non così come gli altri enzimi. Rispetto ai livelli di espressione dell'mRNA nei polmoni di macaco non infettati, i livelli di espressione dell'mRNA

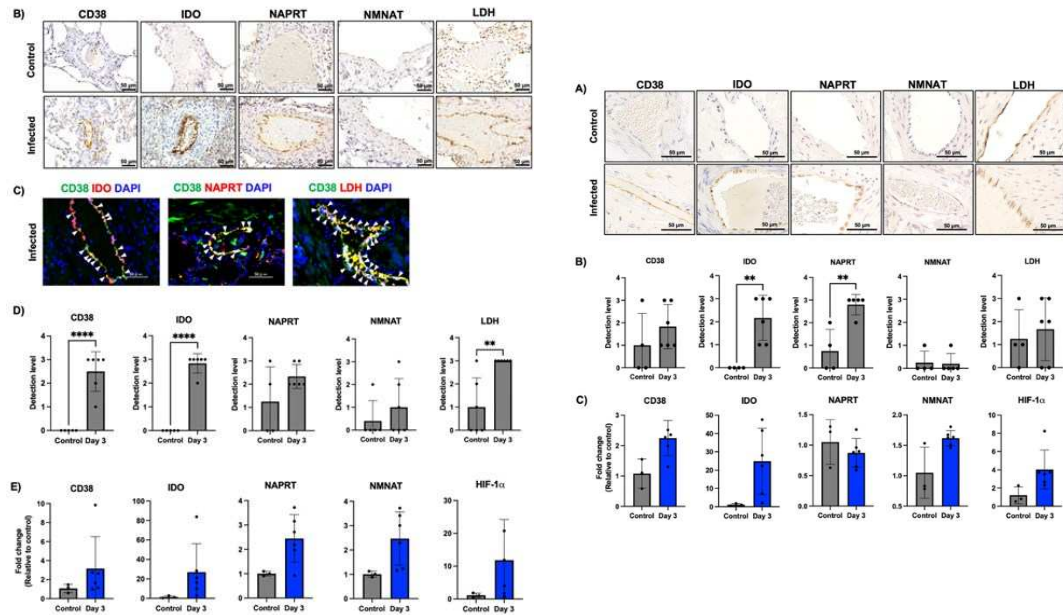


Figura 7: aumento dell'espressione di CD38 e degli enzimi per la biosintesi di NAD nel tessuto polmonare (a sinistra) e nel tessuto cardiaco (a destra)

di CD38, IDO, NAPRT, NMNAT (enzimi di biosintesi NAD) e HIF-1 (fattore inducibile dall'ipossia, un regolatore della risposta ipossica) sono aumentati nei polmoni di macaco infettati da SARS-CoV-2. Anche nel tessuto cardiaco sono stati trovati gli stessi risultati, a parte il livello di NMNAT che in questo caso non risulta upregolato. Nella Fig.7 possiamo confrontare i livelli degli enzimi biosintetici nel tessuto polmonare ed in quello cardiaco. Questi livelli sono poi stati analizzati anche in uno stadio più tardivo dell'infezione ed è stato riscontrato il mantenimento di un'alta espressione di CD38. Queste osservazioni suggeriscono un'alterazione del consumo di NAD da parte di CD38 e della biosintesi del NAD nelle EC durante le fasi avanzate del COVID-19.

3.3. Espressione di CD38 nelle cellule endoteliali umane (HUVEC) a seguito di stimolazione con plasma di macachi infettati e IL-6 + IL-6R

Osservando l'aumento dell'espressione di CD38 nei tessuti, polmonare e cardiaco, dopo l'infezione, ma non rilevando l'antigene virale N, si è ipotizzato che i responsabili dell'attivazione delle EC potessero fattori solubili, come ad esempio le citochine.

Le HUVEC sono state coltivate in presenza di plasma ottenuto da macachi infetti a diversi tempi dall'infezione (giorni 0,1,3,7) e, successivamente, sono stati analizzati i livelli di VCAM-1, E-selectina, IL-6 e CD38. Nel giorno successivo all'infezione vengono rilevati i valori più alti e sono stati riportati aumenti dei livelli solubili di IL-6 e IL-6R nel plasma di pazienti COVID-19 gravi, oltre ad un ruolo del *trans*-signaling di IL-6 nell'attivazione delle EC. È stato valutato il ruolo di CD38 nelle cellule HUVEC, che esprimono gp130 e non esprimono IL-6R sulla membrana cellulare, in uno studio in vitro dopo stimolazione con una combinazione di IL-6 e IL-6R. Sei ore dopo la stimolazione con IL-6 + IL-6R, sono stati osservati aumenti significativi dei livelli di mRNA di IL-6 e E-selectina. L'aumento di IL-6 è calato

nel tempo mentre l'espressione di E-selectina, CD38 e VCAM-1 ha continuato a crescere fino a 72 ore.

Pertanto, le cellule HUVEC sono state attivate tramite il *trans*-signaling di IL-6 e hanno mostrato una sovraregolazione del CD38 72 ore dopo la stimolazione. I risultati ottenuti *in vitro* erano coerenti con il rilevamento nei macachi *Cynomolgus* infettati da SARS-CoV-2, dell'espressione di CD38 nelle EC polmonari il giorno 3 dopo l'infezione. Analizzando, tuttavia, i livelli di espressione degli enzimi coinvolti nella biosintesi del NAD non è stato visto un aumento di espressione; al contrario i livelli di HIF-1 α , un regolatore indotto dall'ipossia, erano aumentati a 6 ore dall'infezione, ma poi diminuiti a 72 ore. Questo suggerisce che la biosintesi del NAD possa essere mantenuta dal metabolismo ipossico nelle EC stimulate con IL-6 + IL-6R.

Sono stati valutati anche i geni correlati alla sopravvivenza cellulare ed alle disfunzioni mitocondriali, poiché un'over espressione di CD38 potrebbe comportare un aumento della suscettibilità agli stimoli ed allo stress nelle EC. I complessi IL-6 e IL-6R non hanno indotto una sovra regolazione dell'espressione dei geni di sopravvivenza, p16, p21, p53, Bax e Bcl2 nelle EC attivate fino a 72 ore dopo la stimolazione. Al contrario, è stata rilevata una sovra regolazione dell'espressione dell'mRNA di geni correlati alla disfunzione mitocondriale, tra cui la GTPasi mitocondriale dinamina simile (OPA-1) e la proteina 1 correlata alla dinamina (DRP-1). Pertanto, la stimolazione con IL-6 potrebbe modificare la biosintesi del NAD e causare disfunzione mitocondriale nelle EC attivate.

3.4. Ruolo protettivo di CD38 nelle HUVEC dopo la stimolazione con IL-6 + IL-6R

È stato esaminato l'eventuale ruolo protettivo di CD38, andando a silenziare la sua espressione tramite siRNA. È stato visto che questo non ha cambiato la morfologia delle cellule non stimulate. Quando le HUVEC sono state stimulate con IL-6 + IL-6R, queste hanno evidenziato una upregolazione di IL-6, E-selectina e HIF-1 α , nelle cellule silenziate con mRNA CD38 rispetto al siRNA negativo e alle cellule di controllo simulate, mostrando una risposta infiammatoria più intensa. Inoltre, dall'analisi con Trypan blue è stato visualizzato un aumento della morte cellulare, confermato dall'aumento di cellule positive all'Annexin V e 7AAD.

Senza la stimolazione, il trattamento con siRNA CD38 ha indotto solo un aumento significativo del numero di cellule di annessina V e le cellule 7AAD+ non hanno mostrato un cambiamento coerente, indicando uno stato pre-apoptotico ma non apoptotico. Quindi, il silenziamento dell'mRNA CD38 ha mantenuto le cellule in uno stato di apoptosi precoce in una condizione non stimolata, e il trattamento con IL-6 + IL-6R ha promosso la morte cellulare per apoptosi dopo 48 ore di coltura. Invece, il CD38 ha svolto un ruolo vitale nella protezione delle EC dall'apoptosi durante la stimolazione della tras-segnalazione IL-6.

3.5 Discussione

Questo studio ha dimostrato come l'attivazione delle EC rappresenti un processo chiave nella patogenesi dell'infezione da SARS-CoV-2. La scelta dei macachi *Cynomolgus*, come modello di studio non è casuale: questi primati condividono numerose similarità con l'essere umano, tra cui la biochimica e la genetica di CD38, rendendoli ottimi modelli per analizzare la disfunzione endoteliale e per valutare potenziali strategie terapeutiche.

Le analisi condotte hanno evidenziato significativi cambiamenti morfologici nelle EC, accompagnati da un aumento dei markers trombotici, quali il D-dimero, fattore di von Willebrand (vWF) e PAI-1. Il D-dimero è prodotto dalla degradazione dei coaguli dell'organismo, costituito da reticoli di fibrina e piastrine, che svolgono un ruolo cruciale nel bloccare il sanguinamento in caso di danno. La presenza di D-dimero in livelli elevati, indica un'attivazione anomala della coagulazione e, la misurazione, consente di identificare precocemente eventuali complicanze (trombosi venosa profonda, embolia polmonare, infarto etc). Il fattore di von Willebrand (vWF), una proteina plasmatica essenziale per la coagulazione del sangue e l'emostasi, prodotto principalmente dalle cellule endoteliali. infine, il PAI-1 è una proteina che regola la fibrinolisi, il processo biologico che dissolve i coaguli. L'aumento di questi marker trombotici riflette la stretta interazione tra infiammazione e coagulazione, portando allo sviluppo di complicazioni tromboemboliche.

In parallelo, è stato evidenziato un aumento nell'espressione di enzimi coinvolti nella biosintesi del NAD, in particolar modo degli enzimi IDO, NAPRT e NMNAT, nei tessuti polmonare e cardiaco di macachi infettati. Questo dato suggerisce che, in risposta a un aumento del consumo di NAD mediato dall'attività di CD38, le cellule cerchino di compensare attraverso un'attivazione maggiore delle vie biosintetiche. Gli enzimi presi in considerazione contribuiscono, infatti, alla sintesi di NAD. IDO catalizza la conversione del triptofano in chinureina e altri metaboliti, che, attraverso una serie di reazioni, contribuiscono alla formazione del NAD. L'enzima NAPRT catalizza la conversione della nicotinamide in nicotinamide mononucleotide (NMN), un precursore del NAD, in condizioni di infiammazione o danno cellulare l'attività di questo enzima viene potenziata per il mantenimento dei livelli di NAD. NMNAT catalizza la conversione di NMN in NAD.

Un altro aspetto che emerge è quello della presenza di una risposta ipossica, testimoniata dall'aumento di HIF-1 α 3 giorni dopo l'infezione. L'infezione da SARS-CoV-2 e la stimolazione con IL-6 trans-signaling inducono un aumento dell'espressione di HIF-1 α , il fattore inducibile dell'ipossia, che stimola il metabolismo del NAD in condizioni di ipossia e infiammazione. I risultati attuali suggeriscono che una risposta ipossica contribuisce principalmente al ripristino di NAD nelle EC durante l'infiammazione. La stabilizzazione della risposta ipossica ha prevenuto il danno alle cellule epiteliali e i sintomi respiratori nell'infezione da SARS-CoV-2. Pertanto, una terapia che stabilizzi la risposta ipossica in

combinazione con precursori del NAD potrebbe ottimizzare il livello di NAD durante l'infezione.

Invece, il ruolo di CD38 durante l'infiammazione risulta ancora controverso. Sebbene l'inibizione di CD38 abbia dimostrato effetti benefici in alcuni contesti, come la riduzione dello stress ossidativo e dell'iper-infiammazione, il silenziamento dell'mRNA di CD38, in questo caso, ha portato a un'aumentata attivazione delle EC e all'apoptosi, dopo la stimolazione con IL-6 + IL-6R. Ciò suggerisce che CD38 possa svolgere un ruolo protettivo nelle prime fasi dell'infezione.

4. Conclusione

Questi risultati aprono prospettive interessanti per il trattamento delle complicanze endoteliali da SARS-CoV-2. Molti gruppi di ricerca hanno focalizzato la loro attenzione sugli effetti provocati dal dismetabolismo del NAD, valutando eventuali trattamenti che mirino all'ottimizzazione del NAD. Il trattamento con niacinamide (vitamina B3) o NMN ha migliorato il tasso di sopravvivenza del 30%. Un altro approccio promettente prevede l'utilizzo di NAD-boost, in particolare sono state sviluppate tre metodiche per aumentare i livelli di NAD⁺: l'integrazione con precursori del NAD⁺, l'attivazione degli enzimi biosintetici del NAD e l'inibizione della degradazione del NAD⁺.

Invece, il ruolo ancora controverso di CD38 non permette lo sviluppo di terapie mirate, ma si pensa che un'inibizione selettiva dell'attività catabolica del CD38 possa avere risultati promettenti nel controllo dell'iperinfiammazione.

Risulta, tuttavia, evidente che siano necessarie ulteriori ricerche per poter sviluppare trattamenti più mirati e sicuri.

5. Bibliografia

Varga Z. et al., 2020. *Endothelial cell infection and endothelitis in COVID-19*. Lancet, 395(10234):1417-1418

Jung F. et al., 2020. *COVID-19 and the endothelium*. Clin. Hemorheol. Microcirc. 75(1):7-11

Horenstein A.L., Faini A.C. and Malvasi F., 2021. *CD38 in the age of COVID-19: a medical perspective*. Physiol Rev. 101(4):1457-1486

Hu Y. et al., 2014. *Overexpression of CD38 Decreases Cellular NAD Levels and Alters the Expression of Proteins Involved in Energy Metabolism and Antioxidant Defense*. J. Proteome Res. 13, 786-795

Boslett J. et al., 2018. *Characterization of CD38 in the major cell types of the heart: endothelial cells highly express CD38 with activation by hypoxia-*

reoxygenation triggering NAD(P)H depletion. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 314(3): C297-C309

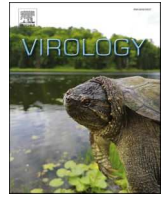
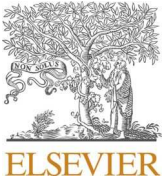
Chang R. et al., 2020. *SARS-CoV-2 Mediated Endothelial Dysfunction: The Potential Role of Chronic Oxidative Stress.* Front. Physiol. 11, 605908.

Rajman R., Chawalek K. and Sinclair D., 2018. *Therapeutic potential of NAD-boosting molecules: the in vivo evidence.* Cell Metab, 27(3):529-547.

Goshua G. et al., 2020. *Endotheliopathy in COVID-19-associated coagulopathy: evidence from a single-centre, cross-sectional study.* Lancet Hematol., 7(8):e575-e582.

Kang S. and Kishimoto T., 2021. *Interplay between interleukin-6 signaling and the vascular endothelium in cytokine storms.* Ex. Mol. Med. 53(7):1116-1123

6.Appendice



Increased expression of CD38 on endothelial cells in SARS-CoV-2 infection in cynomolgus macaques

Cong Thanh Nguyen^a, Misako Nakayama^a, Hirohito Ishigaki^a, Yoshinori Kitagawa^b, Akemi Kakino^c, Marumi Ohno^{d,e}, Masashi Shingai^d, Yasuhiko Suzuki^{d,f}, Tatsuya Sawamura^c, Hiroshi Kida^d, Yasushi Itoh^{a,g,*}

^a Division of Pathogenesis and Disease Regulation, Department of Pathology, Shiga University of Medical Science, Otsu, Japan

^b Division of Microbiology and Infectious Diseases, Department of Pathology, Shiga University of Medical Science, Otsu, Japan

^c Department of Molecular Pathophysiology, School of Medicine, Shinshu University, Matsumoto, Japan

^d International Institute for Zoonosis Control, Hokkaido University, Sapporo, Japan

^e One Health Research Center, Hokkaido University, Sapporo, Japan

^f Institute for Vaccine Research and Development, Hokkaido University, Sapporo, Japan

^g Central Research Laboratory, Shiga University of Medical Science, Otsu, Japan

ARTICLE INFO

Handling Editor: Dr. Jasmine Tomar

Keywords:

SARS-CoV-2

Cynomolgus macaques

Nicotinamide adenine dinucleotide

Interleukin-6 *trans*-signaling

Endotheliopathy

CD38

ABSTRACT

SARS-CoV-2 infection causes activation of endothelial cells (ECs), leading to dysmorphology and dysfunction. To study the pathogenesis of endotheliopathy, the activation of ECs in lungs of cynomolgus macaques after SARS-CoV-2 infection and changes in nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) metabolism in ECs were investigated, with a focus on the CD38 molecule, which degrades NAD in inflammatory responses after SARS-CoV-2 infection. Activation of ECs was seen from day 3 after SARS-CoV-2 infection in macaques, with increases of intravascular fibrin and NAD metabolism-associated enzymes including CD38. *In vitro*, upregulation of CD38 mRNA in human ECs was detected after interleukin 6 (IL-6) *trans*-signaling induction, which was increased in the infection. In the presence of IL-6 *trans*-signaling stimulation, however, CD38 mRNA silencing induced significant IL-6 mRNA upregulation in ECs and promoted EC apoptosis after stimulation. These results suggest that upregulation of CD38 in patients with COVID-19 has a protective role against IL-6 *trans*-signaling stimulation induced by SARS-CoV-2 infection.

1. Introduction

Endothelial cell (EC) dysfunction in COVID-19 is a key determinant of vascular complications and severe disease outcome (Kang et al., 2020). Lung endothelial morphology is significantly changed with disruption of intercellular junctions, cell swelling, and a loss of contact with the basal membrane after SARS-CoV-2 infection (Ackermann et al., 2020). COVID-19 causes EC-related complications such as venous thromboembolism and systemic vasculitis (Martinez-Salazar et al., 2022). The overproduction of proinflammatory cytokines including interleukin-6 (IL-6) in COVID-19 patients is known to lead to the vascular endotheliopathy (Kang and Kishimoto, 2021). Once endotheliopathy occurs, ongoing endotheliopathy persists until the convalescent stage (Fogarty et al., 2022). COVID-19 vulnerable patients are those older than 60 years of age or with health conditions including heart

disease and diabetes mellitus (Zhou et al., 2020), which include cellular dysmetabolism in ECs (Song et al., 2020). In addition, an immune-metabolic imbalance and apoptosis related to mitochondrial dysfunction in ECs were reported in the pathogenesis of COVID-19 (Liu et al., 2021). Therefore, cellular alterations of ECs, especially metabolic changes in ECs during the disease, need more detailed investigation.

Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) is an important molecule that controls hundreds of key processes from energy metabolism to cell survival (Rajman et al., 2018). It has been suggested that SARS-CoV-2 infection alters NAD-related metabolism and mitochondrial function (Horenstein et al., 2021; Zheng et al., 2022; Yuan et al., 2023). Dysregulation of the genes associated with NAD metabolism was reported in mice, and treatment with nicotinamide mononucleotide (NMN, an intermediate product of the salvage pathway) improved the mouse survival rate during SARS-CoV-2 infection (Jiang et al., 2022). In addition, it has recently been reported that knockdown of enzymes producing

* Corresponding author. Division of Pathogenesis and Disease Regulation, Department of Pathology, Shiga University of Medical Science, Otsu, Japan.

E-mail address: yasushii@belle.shiga-med.ac.jp (Y. Itoh).

<https://doi.org/10.1016/j.virol.2024.110052>

Received 17 November 2023; Received in revised form 21 February 2024; Accepted 6 March 2024

Available online 14 March 2024

0042-6822/© 2024 Elsevier Inc. All rights reserved.

Abbreviations

COVID-19	Coronavirus Disease 2019
cADPR	cyclic Adenosine 5'-Diphosphate Ribose
IDO	Indoleamine 2,3-dioxygenase
LDH	Lactate dehydrogenase
NAD	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NAADP	Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate
NAPRT	Nicotinate phosphor-ribosyl-transferase
NMNAT	Nicotinamide mononucleotide adenylyl-transferase
PARP	poly (ADP-ribose) polymerases SARS-CoV-2: Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2

NAD⁺ increased bacterial replication, indicating that NAD⁺ metabolism is a key modulator of bacterial respiratory infections (Klabunde et al., 2023). The expression of pentose phosphate pathway-related genes for NADPH production and the expression of PARP family genes for NAD degradation are increased in various diseases (Xie et al., 2020). These findings suggest the potential of targeting NAD metabolism for SARS-CoV-2 treatment. Endotheliopathy caused by SARS-CoV-2 infection directly contributes to the disease outcome in both acute and convalescent phases, and further studies on NAD dysmetabolism in ECs are extremely important for preventing complications. However, the link between endotheliopathy and altered NAD dysmetabolism in SARS-CoV-2 infection has not been elucidated.

NAD downregulation and CD38 upregulation were found in high-risk COVID-19 populations including elderly individuals and patients with heart disease or diabetes mellitus, and those changes in NAD and CD38 might increase susceptibility to infection (Barbosa et al., 2007; Boslett et al., 2018; Hogan et al., 2019; Wu et al., 2016; Zheng et al., 2022). CD38 is an enzyme in NAD metabolism with products of cADPR and NAADP, and it mediates intracellular calcium release in ECs and other cell types in response to inflammation (Amici et al., 2018; Chatterjee et al., 2018; Gan et al., 2021; Guerreiro et al., 2020; Kim et al., 2010; Lee et al., 2015; Rajman et al., 2018; Takaso et al., 2020). CD38-overexpressing cells showed low NAD and antioxidant protein levels, leaving them more susceptible to oxidative stress (Hu et al., 2014). Oxidative stress in ECs by overloading intracellular calcium via the NAD/CD38 axis was proposed to be associated with COVID-19 complications (Chang et al., 2020; Horenstein et al., 2021). In contrast, CD38 knock-out mice showed an increased susceptibility to infection (Lischke et al., 2013). The role of CD38 remains controversial and no evidence of NAD/CD38-related alterations of ECs after SARS-CoV-2 infection has been reported. Here we evaluated CD38 expression and its role in endotheliopathy in SARS-CoV-2 infection.

In the present study, a cynomolgus macaque model was used to detect early changes in ECs *in vivo* after SARS-CoV-2 infection. The NAD metabolism of ECs was then evaluated with a focus on CD38 molecule expression in cynomolgus macaque lungs after SARS-CoV-2 infection. It was found that ECs were significantly activated from day 3 after SARS-CoV-2 infection, with increases of intravascular fibrinogenesis, plasma D-dimer, von Willebrand factor (vWF), and PAI-1, in cynomolgus macaques. The expression of CD38 increased significantly in the ECs in macaque lungs after SARS-CoV-2 infection, suggesting a possible increased NAD consumption. Since IL-6 could be a cause of EC dysfunction after SARS-CoV-2 infection, human umbilical venous endothelial cells (HUVECs) with IL-6 *trans*-signaling stimulation were also used to investigate the function of the CD38 molecule in ECs *in vitro*. The *in vitro* experiment showed that IL-6 stimulation increased the expression of the CD38 molecule; CD38 depletion by a siRNA led to excessive activation of HUVECs and induced EC apoptosis following the stimulation. The results indicated that CD38 plays a cellular protective

role for ECs in the early stage of SARS-CoV-2 infection rather than a causative role in EC dysfunction.

2. Methods and materials

2.1. Ethics statement

This study was carried out in strict accordance with the “Guidelines for the Husbandry and Management of Laboratory Animals” of the Research Center for Animal Life Science at Shiga University of Medical Science and with the “Standards Relating to the Care and Fundamental Guidelines for Proper Conduct of Animal Experiments and Related Activities in Academic Research Institutions” under the jurisdiction of the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan. The animal experimental protocols were approved by the Ethics Committee of Animal Experiments of the Shiga University of Medical Science Animal Experiment Committee (Permit Nos. 2020-4-2, 2020-6-20, and 2021-1-1). Regular veterinary care and monitoring, balanced nutrition, and environmental enrichment were provided by personnel of the Research Center for Animal Life Science at Shiga University of Medical Science. The macaques were euthanized at the endpoint (3, 7, and 28 days after SARS-CoV-2 virus inoculation) using ketamine (5 mg/kg) plus xylazine (1 mg/kg) followed by intravenous injection of pentobarbital (200 mg/kg). The animals were monitored every day during the study for the calculation of clinical scores (Supplementary Table 1) and underwent daily veterinary examinations intended to help alleviate suffering. The animals were euthanized if their clinical score reached 15 (a humane endpoint).

2.2. Macaque samples

The samples used in the present study were collected from cynomolgus macaques infected with SARS-CoV-2 JP/TY/WK-521/2020 (WK-521, GenBank Sequence Accession: LC522975, kindly provided by Drs. Masayuki Saijo, Mutsuyo Takayama-Ito, Masaaki Sato, and Ken Maeda, National Institute of Infectious Disease) as previously described (Ishigaki et al., 2021, 2022). Data for the infected macaques are shown in Supplementary Table 2. The control macaque samples were collected from healthy macaques without infection. Plasma was collected on the indicated days and stored at -80°C until use. For paraffin-embedded formalin-fixed tissues, the tissues were sectioned and immersed in 10% neutral formalin immediately after autopsy. For tissue RNA storage, a small piece of tissue was immersed in an RNA stabilization solution (RNAlater™, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) and stored at -25°C or -80°C .

2.3. Histological examination

The formalin-fixed tissues were embedded in paraffin following a standard protocol. The detection level of vessels with activated ECs defined by morphological swelling (swollen ECs, Fig. 1A) in lung sections stained with hematoxylin and eosin was determined by a scoring system: 0, not detected; 1, focal; 2, intermediate; and 3, diffuse. One section of the right lower lung lobe of each infected macaque was used for evaluation, and one section of a randomly selected lung lobe of each non-infected macaque was used for comparison.

2.4. Carstairs staining

Lung sections of 3 μm in thickness were de-paraffinized in xylene and ethanol. The sections were treated with 5% ferric ammonium sulfate for 5 min and with hematoxylin for 5 min and then stained with a 10-fold-diluted orange G picric acid solution (Muto Pure Chemicals Co., Ltd., Tokyo, Japan) for 30–60 min. Next, the sections were treated with a solution containing ponceau xylydine, fuchsin acid, and azophloxine (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan) for 5 min,

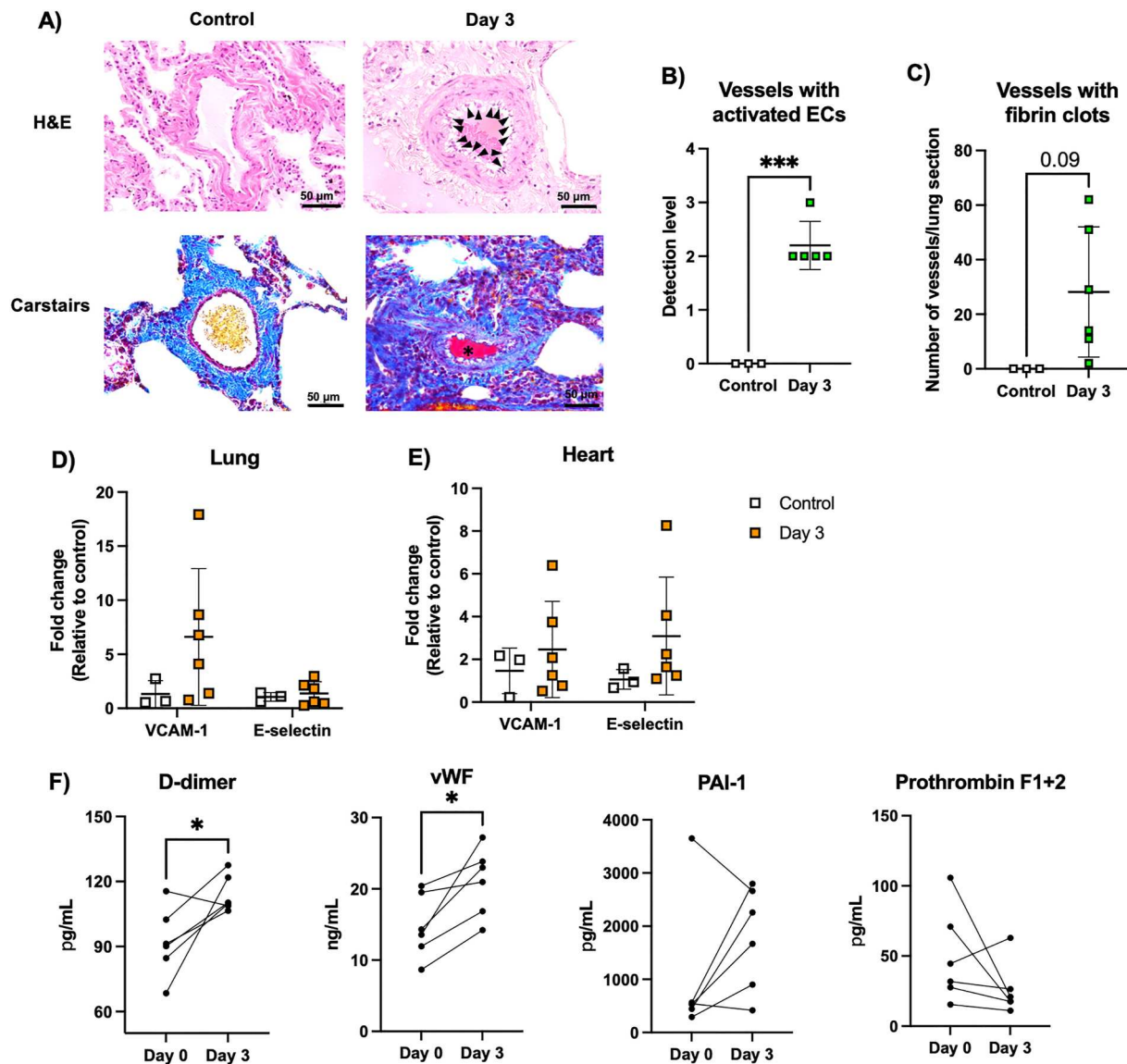


Fig. 1. Activation of endothelial cells in cynomolgus macaques infected with SARS-CoV-2. (A) Representative images of lung vessels with activated endothelial cells (black arrowhead) and intravascular fibrin (bright red color by Carstairs staining, asterisk) in non-infected control macaques ($n = 3$) and macaques infected with SARS-CoV-2 on day 3 ($n = 5-6$). (B) Detection level of vessels with activated endothelial cells. The detection levels of lung vessels with activated endothelial cells in each right lower lung lobe/each macaque were evaluated as follows: 0, not detected; 1, focal; 2, intermediate; and 3, diffuse. (C) The number of vessels with intravascular fibrin clots in the right lower lung lobe of each macaque is shown. (D, E) VCAM-1 and E-selectin mRNA in (D) lungs and (E) hearts on day 3 after infection ($n = 6$) relative to those in non-infected control macaque lungs and hearts ($n = 3$). (F) Concentrations of D-dimer, von Willebrand factor, PAI-1, and prothrombin F1+2 in macaque plasma on day 0 (before virus inoculation) and on day 3 after infection ($n = 6$). The averages and standard deviations are shown in the graphs. Statistics: unpaired Student's *t*-test. *: $P < 0.05$, ***: $P < 0.001$.

with a phosphotungstic acid hydrate solution (Muto Pure Chemicals Co., Ltd.) for 5 min, and finally with an aniline solution (Muto Pure Chemicals Co., Ltd.) for 5 min. The number of vessels with fibrin (bright red) was counted. One section of the right lower lung lobe of each infected macaque was used for evaluation.

2.5. Immunohistochemical staining

The 3- μ m-thick lung sections were de-paraffinized in xylene and ethanol. Antigens were retrieved as indicated in [Supplemental Table 3](#) and endogenous peroxidase activity was blocked with 1% hydrogen peroxide in methanol for 13 min. Non-specific antigen was blocked with 10% goat serum for 30 min. The tissues were then incubated with primary antibodies at 4 °C overnight. Details of antigen retrieval and primary antibodies are shown in [Supplemental Table 3](#). Sections were

incubated with a secondary antibody (anti-mouse/rat antibody; host: goat; Nichirei Biosciences Co.) for 60 min at room temperature and treated with 3,3'-diaminobenzidine (Nichirei Biosciences Inc., Tokyo, Japan). Sections were then counterstained with hematoxylin. As a negative control, a tissue section was stained with rabbit IgG polyclonal isotype control antibody (Ab37415) (Abcam, Cambridge, UK) and/or mouse IgG1 isotype control (X0931) (Dako, Agilent, Santa Clara, CA), and no positive signal on ECs was observed (data not shown). The detection level of vessels with CD38⁺, IDO⁺, NAPRT⁺, MNMAT⁺, or LDH⁺ ECs in the lung sections was evaluated by a scoring system based on the detection frequency of vessels positive for each marker: 0, not detected; 1, focal; 2, intermediate; and 3, diffuse. One section of the right lower lung lobe of each infected macaque was used for evaluation.

2.6. Immunofluorescence staining

Formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections of 3 μm in thickness were deparaffinized by a standard method with xylene and ethanol. Antigen retrieval was done by heat in an appropriate pH buffer (Supplemental Table 3). Next, nonspecific antibody binding was blocked with goat serum for 30 min, and the first primary antibody (anti-IDO, NAPRT, LDH) was added. After overnight incubation, the sections were incubated with PhenoVue Fluor 647 goat anti-mouse secondary antibody (2GXM647C1) (PerkinElmer, Co., Waltham, MA) or PhenoVue Fluor 647 goat anti-rabbit secondary antibody (2GXRB647C1) for 60 min. After washing, the sections were blocked with goat serum for 30 min and stained with a second primary antibody (anti-CD38) overnight and then incubated with an FITC F(ab')₂-goat polyclonal anti-rabbit IgG (H + L) secondary antibody (11-4839-81) (eBioscience, Thermo Fisher Scientific Inc.) for 60 min. Next, autofluorescence was removed by a Vector TrueVIEW® autofluorescence quenching kit (SP-8400) (Vector Laboratories), following the manufacturer's instructions. Finally, sections were counterstained and mounted with Prolong Gold antifade reagent with DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole; Invitrogen, P36935) and then observed under a microscope (BX-X710; Keyence, Osaka, Japan). As a negative control, a tissue section was stained with rabbit IgG polyclonal isotype control antibody (Abcam, Ab37415) and/or mouse IgG1 isotype control (Dako, X0931), and no positive signal was observed (data not shown). One section of the right lower lung lobe of each infected macaque was used for evaluation.

2.7. Quantitative RT-PCR

Macaque tissue RNA or HUVEC RNA was extracted by using the RNeasy® Plus Mini Kit (Qiagen, 74134). For reverse transcription, 1000–2000 g total RNA in each macaque sample or 100–200 ng total RNA in each HUVEC sample was mixed with random primers (Invitrogen, 58875), Oligo d(T)15 primer (Promega, C110A), and dNTP mix (Invitrogen, 18427–013) and then left at 65 °C for 5 min. The mixture was then treated with SuperScript™ IV Reverse Transcriptase (Invitrogen, 18090050), SuperScript™ IV buffer (Invitrogen), DTT (Invitrogen), and recombinant RNase Inhibitor (TOYOBO) at 25 °C for 10 min, at 72 °C for 10 min, and at 42 °C for 10 min in a Bio-Rad T100™ thermal cycler. The cDNA was stored at –80 °C. For quantitative RT-PCR, 3.125 ng cDNA in each sample was mixed with Lightcycler®480 SYBR® Green I Master (Roche, 04707516001) and specific primers listed in Supplemental Table 4. The reaction was performed with 45 cycles of denaturation at 95 °C for 10 s, annealing at 52 °C for 10 s, and extension at 72 °C for 20 s by the CFX96™ Real-Time system. The relative amount of RNA was expressed as $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}(\text{gene of interest}) - \text{Ct}(\text{GAPDH})$. Fold changes relative to the control were calculated as $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ with $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}(\text{infected or treated}) - \Delta\text{Ct}(\text{uninfected or untreated})$.

2.8. ELISA

Levels of D-dimer, vWF, PAI-1, and Prothrombin F1+2 in macaque plasma on day 0 before infection and day 3 after infection were measured by the following ELISA kits: D-dimer (MyBioSource, MBS046309); von Willebrand factor (Abcam, Ab223864); Serpin E1/PAI-1 (R&D systems, DSE100); and Pro-thrombin F1+2 (Abbexa, abx358731). The concentration was calculated by using a four-parametric arigo's ELISA calculator on <https://www.arigobio.com/ELISA-calculator>.

2.9. HUVEC culture

HUVECs at passages 5 to 10 were used. The cells were cultured in 500 μL EGM-2™ Bulletkit™ medium (Lonza, CC-3162) in a humidified incubator at 37 °C and 5% CO₂ in 24-well plates. The cells at confluence were stimulated with recombinant human IL-6 protein (20 ng/mL, R&D

systems, 206-IL-010) and IL-6R alpha protein (100 ng/mL, R&D systems, 227-SR-025/CF) (Kang et al., 2020).

2.10. CD38 siRNA treatment

HUVECs at passages 5 to 10 were treated with pre-designed CD38 siRNA (Thermo Fisher Scientific; s119605) or negative siRNA (Negative Control #1 siRNA: Ambion Inc., Austin, TX, USA) at concentrations of 10 nM using Lipofectamine™ RNAiMAX (Invitrogen, 13778–075) in Opti-MEM reduced serum medium (Gibco, 31985–070) following the manufacturer's instructions. After 24 h, the medium was changed to a medium containing IL-6 and IL-6R, as described above. Knockdown efficiency was calculated as the abundance of CD38 mRNA, normalized to GAPDH and relative to the negative control as: $100 \times (1 - 2^{-(\Delta\Delta\text{Ct})})$.

2.11. Apoptosis detection assay

HUVECs treated with CD38 siRNA and/or IL-6 + IL-6R for 48 h were collected after treatment with trypsin-EDTA solution (Nacalai Tesque, 35554–64). The dead cells were detected with trypan blue by a Bio-Rad TC20™ Automated Cell Counter. The cells were then stained with PE-conjugated Annexin V and 7AAD by an Apoptosis detection kit (BD Pharmingen™, 559763) following the manufacturer's instructions. The stained cells were acquired with a Beckmann Coulter CytoFLEX S flow cytometer and analyzed with CytExpert software version 2.4. Singlets gated by FSC-H and FSC-A were used for evaluating percentages of Annexin V+ cells and 7AAD+ cells.

2.12. Statistics

Statistical analysis was performed using a two-tailed Student's t-test for unpaired comparisons of SARS-CoV-2-infected macaques and non-infected macaques by GraphPad Software (version 9.1; San Diego, CA). Significance was set at $p < 0.05$ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Graphs were created by GraphPad Software.

3. Results

3.1. Activation of endothelial cells in cynomolgus macaques infected with SARS-CoV-2

Since it was shown that SARS-CoV-2 infection significantly changed EC morphology in human patients (Ackermann et al., 2020), the morphology of ECs was examined in cynomolgus macaques early after infection. Cynomolgus macaques were infected with the early strain of SARS-CoV-2 Japan/TY/WK521/2020, and lung tissue samples were collected on day 3 after virus infection, at which time the infected macaques showed body temperature change and radiographic pneumonia, as described previously (Ishigaki et al., 2021). In macaque lungs, round ECs with a clear cytoplasm (swollen ECs), indicating cell activation, were observed on day 3 after SARS-CoV-2 infection, whereas swollen ECs were rarely found in the lungs of non-infected control macaques (Fig. 1A and B). The mean number of intravascular fibrin clots increased in the infected macaque lungs on Carstairs staining (Fig. 1A and C). Upregulation of EC activation markers VCAM-1 and E-selectin mRNA was detected in the lungs of four and three SARS-CoV-2-infected macaques, respectively (Fig. 1D). A tendency for increased VCAM-1 and E-selectin mRNA, indicating EC activation, was detected in the heart tissues of infected macaques on day 3 (Fig. 1E). Significant increases of D-dimer and vWF in plasma of SARS-CoV-2-infected macaques were detected on day 3 (Fig. 1F). The PAI-1 level in plasma was increased and the prothrombin F1+2 level in plasma was decreased on day 3 after infection, but the differences were not significant. Therefore, ECs were activated with increased intravascular thrombogenesis in the cynomolgus macaques on day 3 after SARS-CoV-2 infection.

3.2. Increased expression levels of CD38 and NAD biosynthesis enzymes in endothelial cells of the lungs and hearts of cynomolgus macaques infected with SARS-CoV-2

Next, changes in NAD metabolism, which may be associated with EC-related COVID-19 complications, were examined (Chang et al., 2020; Horenstein et al., 2021). Since NAD would be further consumed by CD38 overexpression (Fig. 2A), NAD production and consumption in ECs were indirectly estimated by changes in the expression levels of NAD

biosynthesis enzymes. The expression levels of CD38, IDO, NAPRT, NMNAT, and LDH in ECs of the lungs and hearts of SARS-CoV-2-infected macaques were examined. CD38 was positive in ECs of lung vessels of SARS-CoV-2-infected macaques on day 3 after virus infection, whereas CD38 was not detected in the ECs of vessels of non-infected macaques (Fig. 2B–D). A diffuse distribution of ECs positive for IDO and LDH was seen in SARS-CoV-2-infected macaques but not in non-infected macaques. Lung vessels with ECs positive for NAPRT were also more frequently found in SARS-CoV-2-infected macaques but not as

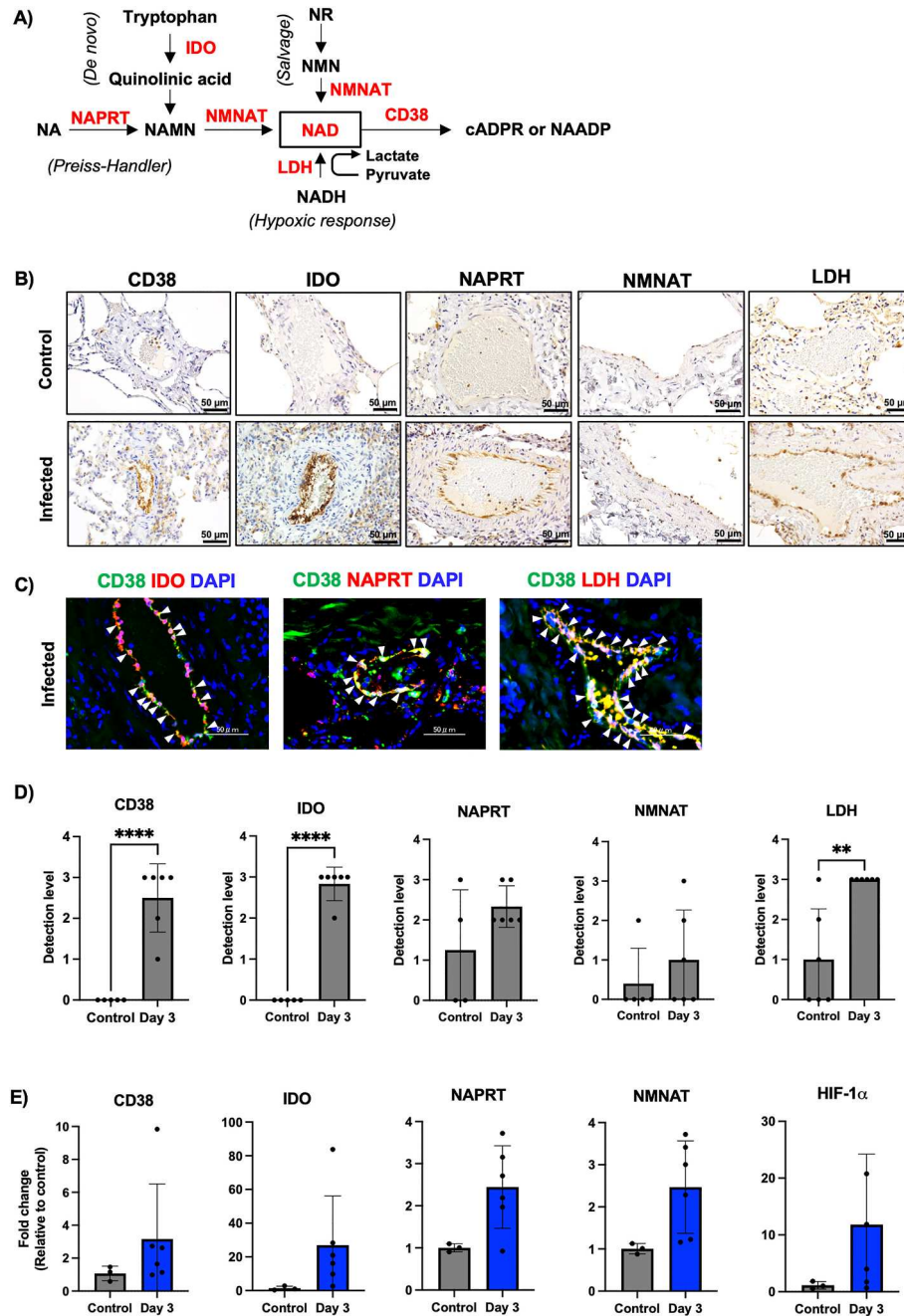


Fig. 2. Increased expression levels of CD38 and NAD biosynthesis enzymes in lung endothelial cells of cynomolgus macaques infected with SARS-CoV-2. (A) NAD biosynthesis pathways including *de novo*, salvage, and Preiss-Handler pathways and a hypoxic response. (B) Representative images of immunohistochemical staining of CD38, IDO, NAPRT, NMNAT, and LDH in lung tissues of a non-infected control and a SARS-CoV-2-infected macaque. (C) Representative images of double immunostaining of CD38 with IDO, NAPRT, and LDH in lung tissues of infected macaques on day 3. (D) Detection levels of CD38, IDO, NAPRT, NMNAT, and LDH in endothelial cells of lung tissues from non-infected controls ($n = 4-5$) and SARS-CoV-2-infected macaques ($n = 6$). The detection levels of endothelial cells expressing CD38, IDO, NAPRT, NMNAT, and LDH in the right lower lung lobes were evaluated as follows: 0, not detected; 1, focal; 2, intermediate; and 3, diffuse. (E) CD38, IDO, NAPRT, NMNAT, and HIF-1 α mRNA in lung tissues on day 3 after infection ($n = 6$) relative to those in non-infected macaque lungs ($n = 3$). The averages and standard deviations are shown in the graphs. Statistics: unpaired Student's *t*-test. **: $P < 0.01$, ****: $P < 0.0001$.

frequently as than IDO and LDH. CD38 molecules were co-expressed with IDO, NAPRT, and LDH on ECs (Fig. 2C). Compared to the mRNA expression levels in non-infected macaque lungs, the mRNA expression levels of CD38, IDO, NAPRT, NMNAT (NAD biosynthesis enzymes) and HIF-1 α (hypoxia-inducible factor, a regulator of hypoxic response) were increased in SARS-CoV-2-infected macaque lungs (Fig. 2E).

The expression levels of NAD biosynthesis enzymes in hearts of SARS-CoV-2-infected macaques were examined. As in lung tissues, vessels with ECs positive for CD38, IDO, and NAPRT were observed more frequently in the hearts of SARS-CoV-2-infected macaques than in the hearts of non-infected macaques, although the difference in CD38 expression levels was not significant (Fig. 3A and B). LDH-positive ECs were detected slightly more frequently in the infected macaques than in the non-infected macaques (Fig. 3B). Upregulation of CD38, IDO,

NMNAT, and HIF-1 α mRNA, but not NAPRT mRNA, was found in SARS-CoV-2-infected macaque heart tissues (Fig. 3C). Therefore, the expression of NAD synthetic enzymes in the *de novo* and Preiss-Handler pathways and in hypoxia response and the expression of the NAD converting enzyme increased in ECs of macaque lungs and hearts after infection, with a more pronounced upregulation in the lungs. These observations indirectly suggest that NAD consumption and biosynthesis increase in ECs early in SARS-CoV-2 infection.

The expression levels of CD38 and NAD biosynthesis enzymes on lung ECs in macaques infected with SARS-CoV-2 were examined in the later stage (on days 7 and 28) (Ishigaki et al., 2021, 2022). Similar to the findings on day 3, lung vessels positive for CD38 in ECs of SARS-CoV-2-infected macaques were diffusely observed on days 7 and 28 (Supplemental Fig. 1). Although the inoculum virus amount in the

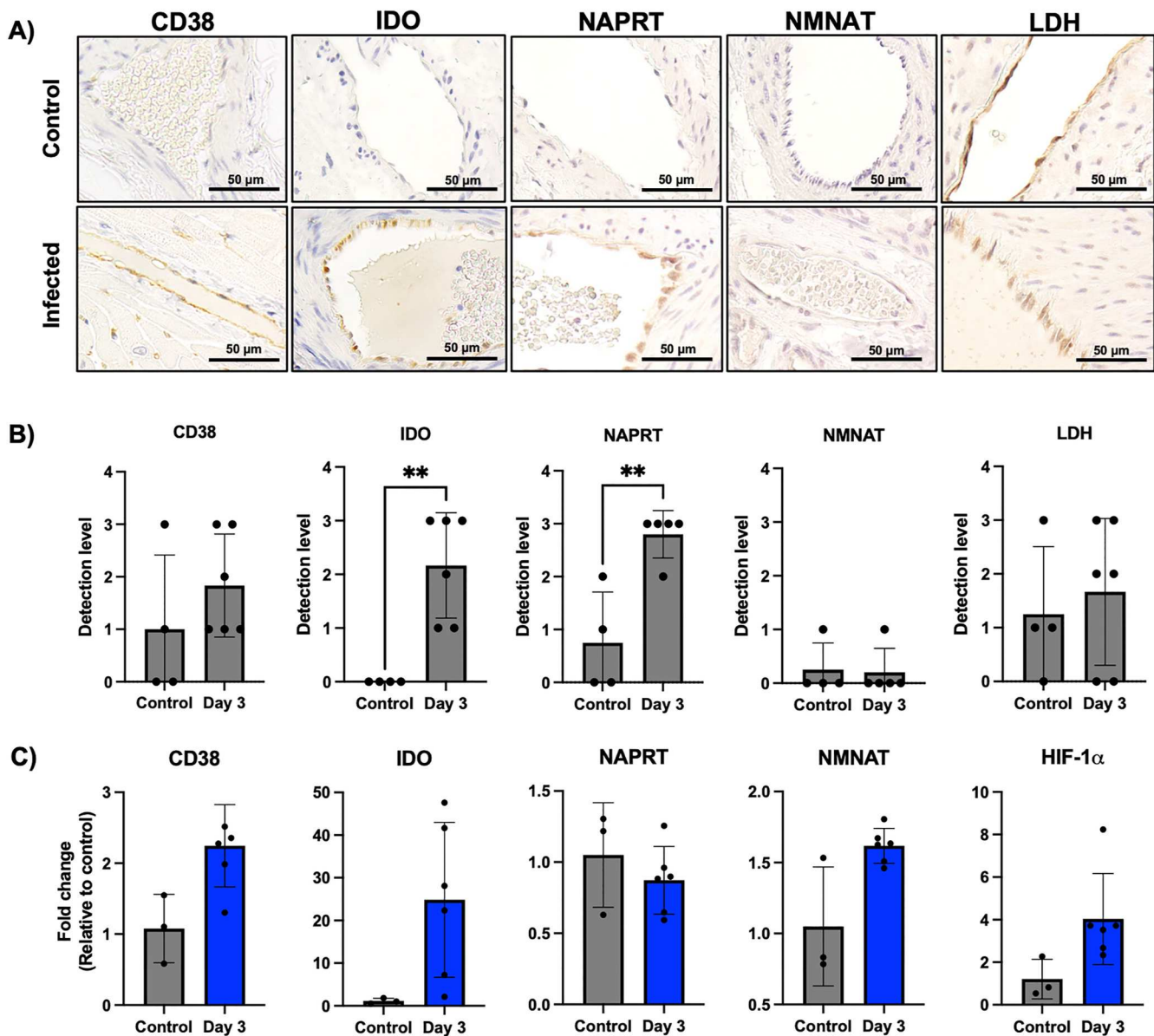


Fig. 3. Increased expression levels of CD38 and NAD biosynthesis enzymes in heart endothelial cells of cynomolgus macaques infected with SARS-CoV-2. (A) Representative images of immunohistochemical staining of CD38, IDO, NAPRT, NMNAT, and LDH in heart tissues from a non-infected control and a SARS-CoV-2-infected macaque. (B) Detection levels of CD38, IDO, NAPRT, NMNAT, and LDH in vascular endothelial cells of heart tissues from non-infected control ($n = 4-5$) and SARS-CoV-2-infected macaques ($n = 6$). The detection levels of endothelial cells expressing CD38, IDO, NAPRT, NMNAT, and LDH in heart sections were evaluated as follows: 0, not detected; 1, focal; 2, intermediate; and 3, diffuse. (C) CD38, IDO, NAPRT, NMNAT, and HIF-1 α mRNA in heart tissues on day 3 after infection ($n = 6$) relative to those in non-infected macaque hearts ($n = 3$). The averages and standard deviations are shown in the graphs. Statistics: unpaired Student's *t*-test. **: $P < 0.01$.

macaques autopsied on day 28 (2×10^6 TCID₅₀/mL) was smaller than that in the macaques autopsied on day 3 and day 7 (2×10^7 TCID₅₀/mL) (Supplemental Table 2), increased CD38 expression was induced even by the lower inoculum virus concentration and remained until day 28. In addition, macaque lung vessels with ECs positive for IDO, NAPRT, NMNAT, and LDH showed peak detection on day 3 and were then modestly observed on days 7 and 28 after SARS-CoV-2 infection (Supplemental Fig. 1). Therefore, these observations suggest an imbalance of NAD consumption by CD38 and NAD biosynthesis in ECs at the later stage of COVID-19.

3.3. Expression of CD38 on HUVECs after stimulation with SARS-CoV-2-infected macaque plasma and IL-6 + IL-6R

Since ECs showed increased expression of CD38 in the lungs and hearts on day 3 and SARS-CoV-2 N antigen was not detected in ECs (Supplemental Fig. 2A), we hypothesized that soluble factors such as cytokines in the macaque plasma might activate ECs after virus infection. HUVECs were cultured in 10% plasma collected from macaques

infected with SARS-CoV-2 on days 0, 1, 3, and 7 after infection. Levels of VCAM-1, E-selectin, IL-6, and CD38 mRNA in the macaque plasma on day 1 was higher than those on day 0, although the upregulation was at a modest level (Supplemental Fig. 2B). Since levels of cytokines including IL-6 were high in the cynomolgus macaque plasma on day 1 after infection (Ishigaki et al., 2021), and increased soluble IL-6 and IL-6R levels in plasma of severe COVID-19 patients were reported in addition to a role of IL-6 *trans*-signaling in EC activation (Kang et al., 2020; Koutsakos et al., 2021), the expression of CD38 and the role of CD38 in the HUVECs, which express gp130 and do not express IL-6R on the cell membrane (Kang et al., 2020), were examined in an *in vitro* study after stimulation with a combination of IL-6 and IL-6R. Six hours after IL-6 + IL-6R stimulation, significant increases in the levels of IL-6 and E-selectin mRNA were observed (Fig. 4A). Then IL-6 upregulation in activated ECs decreased and E-selectin mRNA upregulation continued to increase until 72 h. CD38 mRNA showed significant upregulation 72 h after stimulation, as did VCAM-1 mRNA. Thus, HUVECs were activated via IL-6 *trans*-signaling and showed CD38 upregulation 72 h after stimulation. The *in vitro* results were consistent with the detection in

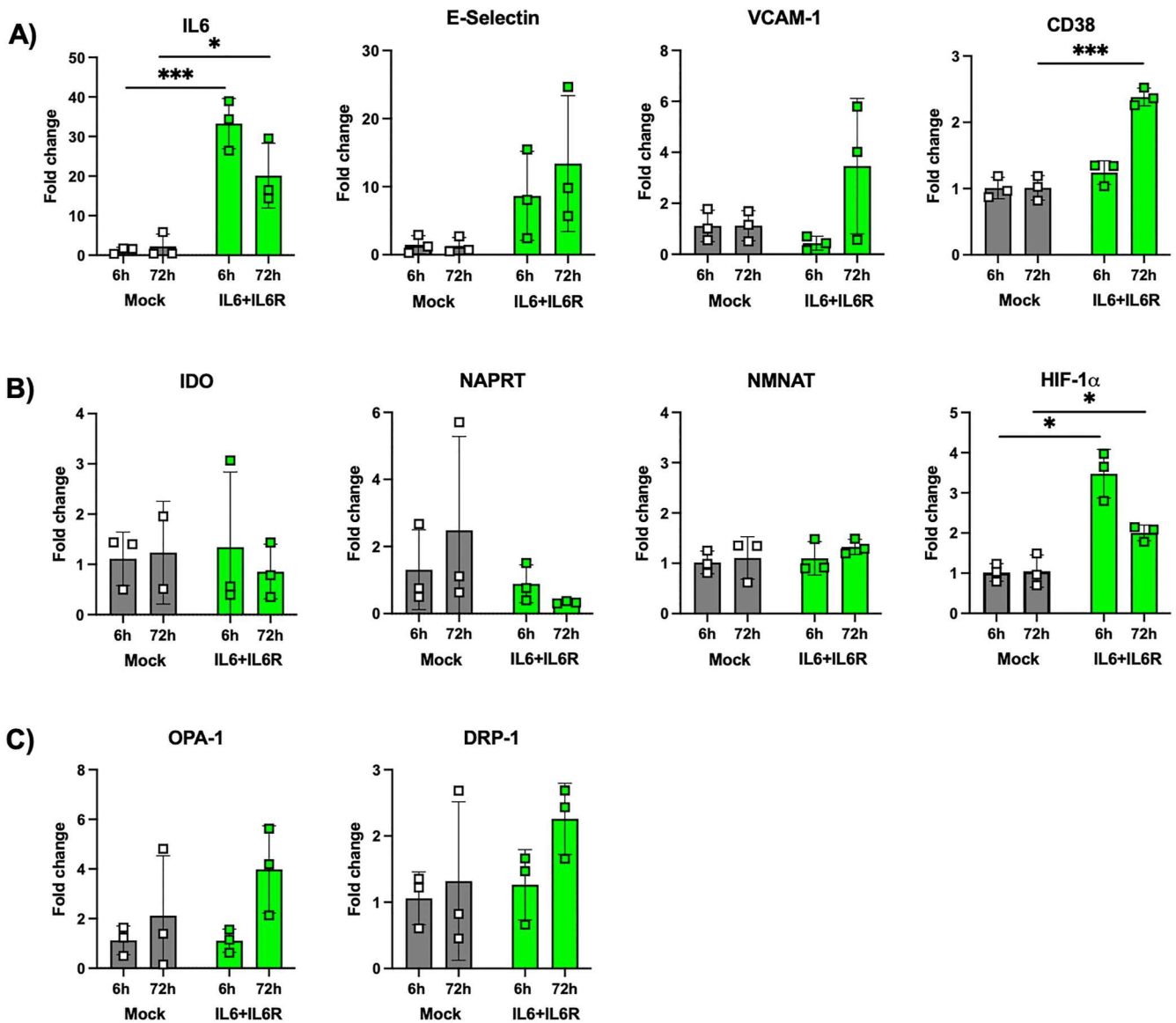


Fig. 4. Expression levels of NAD biosynthesis enzymes in HUVECs after IL-6 + IL-6R stimulation. (A–C) mRNA expression at 6 h and 72 h after stimulation and no treatment (mock) at the same time point. The averages and standard deviations of three independent experiments are shown in the graphs. Statistics: unpaired Student's *t*-test. *: $P < 0.05$, ***: $P < 0.001$.

SARS-CoV-2-infected cynomolgus macaques of CD38 expression in lung ECs on day 3 after infection (Fig. 2).

The mRNA expression of NAD biosynthesis enzymes was examined in HUVECs activated by IL-6 *trans*-signaling. The mRNA expression of NAD biosynthesis enzymes including IDO, NAPRT, and NMNAT was not upregulated 72 h after stimulation (Fig. 4B). The mRNA level of HIF-1 α , which was induced at a low oxygen concentration and increased NAD

(Cheng et al., 2014), was significantly upregulated early at 6 h and was then decreased at 72 h. Thus, NAD biosynthesis might be maintained by the hypoxia metabolism in ECs after IL-6 + IL-6R stimulation. Since the upregulation of CD38 in activated ECs might increase cellular susceptibility to stimulants and increase mitochondrial oxidative stress (Hu et al., 2014; Ogura et al., 2020), the expression of cellular survival-related genes and the expression of mitochondrial

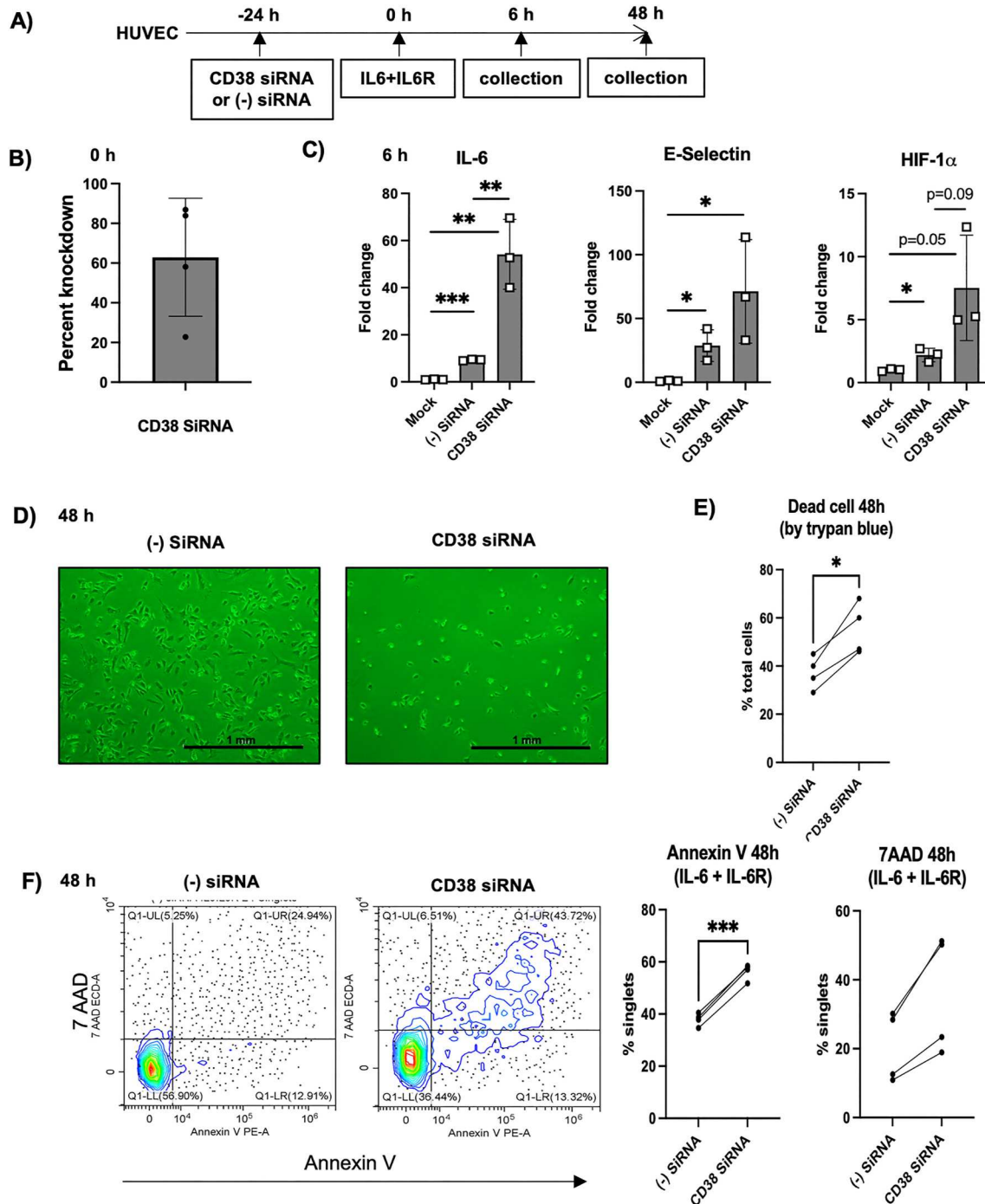


Fig. 5. Effects of CD38 siRNA treatment in HUVECs stimulated with IL-6 + IL-6R. (A) Experimental designs. (B) Knockdown efficiency of CD38 mRNA was calculated as the amount of the target normalized to GAPDH and relative to the negative control: $100 \times (1 - 2^{-\Delta\Delta Ct})$ (%) before infection (four independent experiments). (C) mRNA expression at 6 h after stimulation relative to no treatment (mock) (three independent experiments). (D) Representative images of cells treated with negative control siRNA or CD38 siRNA at 48 h after IL-6 + IL-6R stimulation (representative of three independent experiments). (E) Percentages of dead cells detected by trypan blue. (F) Percentages of annexin V⁺ cells and 7AAD⁺ cells in the HUVECs treated with negative control siRNA/CD38 siRNA and cultured for 48 h with IL-6 + IL-6R stimulation. The averages and standard deviations are shown in the graphs. Statistics: unpaired Student's *t*-test. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$.

dysfunction-related genes were also evaluated. The IL-6 and IL-6R complex did not induce upregulation of the expression of survival genes, p16, p21, p53, Bax and Bcl2 in activated ECs until 72 h after stimulation (Supplemental Fig. 3). On the other hand, upregulation of the mRNA expression of mitochondrial dysfunction-related genes, including mitochondrial dynamin-like GTPase (OPA-1) and dynamin-related protein 1 (DRP-1) (mitochondrial fusion-related and fission-related genes) (Hoffmann et al., 2013), was detected 72 h after IL-6 + IL-6R treatment (Fig. 4C). Therefore, IL-6 stimulation might change NAD biosynthesis and cause mitochondrial dysfunction in activated ECs.

3.4. Protective role of CD38 for HUVECs after IL-6 + IL-6R stimulation

Next, to examine the role of CD38 expression on the ECs stimulated with IL-6 + IL-6R, the expression of CD38 mRNA was suppressed by siRNA (Fig. 5A). CD38 siRNA treatment of HUVECs reduced CD38 mRNA expression by an average of 60% compared to that in negative siRNA controls (Fig. 5B). CD38 siRNA treatment did not affect the cellular morphology under the unstimulated condition (Supplemental Fig. 4B). Six hours after IL-6 *trans*-signaling stimulation, there was significantly higher upregulation of mRNA of IL-6, E-selectin, and HIF-1 α in CD38 mRNA-silenced cells than in the negative siRNA and mock control cells (Fig. 5C). Large numbers of trypan blue-positive dead cells were seen in the culture of CD38 mRNA-silenced cells 48 h after IL-6 + IL-6R treatment (Fig. 5D and E). CD38 mRNA-silenced cells showed an apoptotic state with a significant increase in the number of annexin V⁺ cells and a tendency for a consistently increasing number of 7AAD⁺ cells after IL-6 stimulation (Fig. 5F). Without the stimulation, CD38 siRNA treatment only induced a significant increase in the number of annexin V⁺ cells, and 7AAD⁺ cells did not show a consistent change, indicating a pre-apoptotic but not apoptotic state (Supplemental Fig. 4C). Hence, silencing CD38 mRNA kept the cells in an early apoptosis state in a non-stimulated condition, and IL-6 + IL-6R treatment promoted cell death by apoptosis after 48 h of culture. Instead, CD38 played a vital role in protecting the ECs from the apoptosis during IL-6 *trans*-signaling stimulation.

4. Discussion

In the present study, EC activation was demonstrated in cynomolgus macaques infected with SARS-CoV-2, as seen in human patients with COVID-19. Increased expression levels of CD38, IDO, NAPRT, and LDH, which are NAD catabolizing and biosynthesizing enzymes, were found in the ECs of SARS-CoV-2-infected macaque lungs and hearts. These findings proved that CD38/NAD axis metabolism was altered in ECs during SARS-CoV-2 infection together with EC activation. The *in vitro* results suggest that the increased CD38 expression protects ECs from apoptosis induced by IL-6 *trans*-signaling stimulation at the early stage of SARS-CoV-2 infection.

Cynomolgus macaques showed EC activation with morphological change and increases of EC-related thrombogenesis markers, D-dimer, vWF and PAI-1, in plasma 3 days after SARS-CoV-2 infection, similar to the observations in COVID-19 patients (Ackermann et al., 2020). In addition, we also observed CD38 expression on ECs in the lungs of the cynomolgus macaques. Cynomolgus macaque CD38 is known to have high genetic and biochemical similarities with human CD38 (Lee et al., 2015). Therefore, the cynomolgus macaque model could be a useful model for the study of EC activation and dysmetabolism at the early stage of SARS-CoV-2 infection when the efficacy of therapies targeting EC dysfunction following viral infection could be evaluated (Kawakami et al., 2023), whereas the study of EC activation and dysmetabolism was potentially limited in postmortem human studies.

CD38 expression on ECs might contribute to NAD dysmetabolism during SARS-CoV-2 infection. CD38 expression on HUVECs *in vitro* and heart ECs was shown to be induced by factors secreted from senescent

cells and hypoxia-reoxygenation (Boslett et al., 2018; Chini et al., 2019). In the present study, CD38 mRNA and protein expression levels increased in ECs after SARS-CoV-2 infection in macaque experiments and after stimulation with IL-6 + IL-6R *in vitro*. Increased CD38 expression might consume NAD, inducing an increase in NAD biosynthesis in ECs at the early stage of SARS-CoV-2 infection. This is supported by the results showing that IDO, NAPRT, and LDH were significantly positive in ECs on day 3 compared to those in uninfected macaques. Lung vessels with CD38-positive ECs were diffusely found in SARS-CoV-2-infected macaques on day 28, whereas blood vessels with IDO, NAPRT, NMNAT, and LDH-positive ECs were modestly observed. Thus, a dynamic change in NAD consumption and biosynthesis in ECs might cause an NAD imbalance and EC dysfunction during SARS-CoV-2 infection.

NAD dysmetabolism has shown an association with COVID-19 severity and long-term complications. In SARS-CoV-2-infected mice, NMN treatment improved the survival rate by 30% (Jiang et al., 2022). In addition, treatment with niacinamide (a form of vitamin B3, material for NAD synthesis via the Preiss Handler pathway) prevented COVID-19-related acute kidney injury (Raines et al., 2021). Therefore, several clinical trials have been testing the efficacy of vitamin B3 in long COVID-19 treatment (NCT04751604 and NCT04809974). Since decreased NAD expression is related to the pathogenesis of aging, NAD dysmetabolism might contribute to accelerated senescence in COVID-19 patients (Cao et al., 2022). These results indicate that NAD dysmetabolism contributes to the pathogenesis of SARS-CoV-2 infection and also indicate the potential of NAD-boost therapy for COVID-19 treatment (Consonni et al., 2023; Fang et al., 2023).

A hypoxic response also induces NAD synthesis from its reduced form NADH. Significant LDH expression in lung ECs after SARS-CoV-2 infection on day 3 showed an increase in HIF-1 α , indicating the induction of a hypoxic response. After being stimulated with IL-6 *trans*-signaling, HIF-1 α mRNA expression, but not mRNA expression of the other NAD synthesis enzymes, was quickly upregulated in HUVECs at 6 h. This indicates that the hypoxic response in ECs started very early after IL-6-stimulation and possibly after SARS-CoV-2 infection. In macaque lungs and hearts, IDO and NAPRT expression levels were increased in ECs on day 3 after infection, but they did not increase in *in vitro* experiments. Therefore, an additional factor such as interferon- γ , IL-1 β , or TNF- α might contribute to the EC activation *in vivo* (Liang et al., 2019; Mako et al., 2010). Both *in vivo* and *in vitro* experiments showed a hypoxic response in ECs, although the expression of the enzyme NMNAT necessary for three other NAD biosynthesis pathways did not increase. Since cells engage in glycolysis when demand for NAD increases (Luengo et al., 2021), the present results suggest that a hypoxic response contributes mainly to NAD depletion in ECs during inflammation. Stabilization of hypoxia-inducible factor signaling prevented epithelial cell damage and respiratory symptoms in SARS-CoV-2 infection (Wing et al., 2021). Therefore, a therapy stabilizing the hypoxic response in combination with NAD precursors might optimize the NAD level during SARS-CoV-2 infection.

CD38 inhibition may also contribute to NAD repletion, but the role of CD38 during inflammation remains controversial. CD38 expression indicates oxidative stress conditions associated with the level of reactive oxidative species in ECs and other cells during stress; CD38 inhibition reduced oxidative stress and protected cellular function (Boslett et al., 2018; Ogura et al., 2020). Inhibition of CD38 enzymatic activity reduced hyperinflammation by the respiratory syncytial virus in monocyte-derived dendritic cells (Schivavoni et al., 2018). Significant CD38 expression was observed on ECs of SARS-CoV-2-infected macaque lungs and hearts and in HUVECs 72 h after IL-6 + IL-6R stimulation *in vitro*. However, CD38 mRNA silencing induced IL-6, E-selectin, and HIF-1 α mRNA upregulation at 6 h and induced apoptosis 48 h after IL-6 *trans*-signaling stimulation. This observation demonstrated that CD38 expression interfered with the positive feedback loop of IL-6 *trans*-signaling stimulation. CD38-knockout mice showed high susceptibility

to infection (Lischke et al., 2013). However, quercetin, a substance that can inhibit CD38, showed a positive effect in preventing immune overactivation during SARS-CoV-2 infection (Di Pierro et al., 2022; Escande et al., 2013). Therefore, a method that only inhibits NAD catabolic function in multifunctional CD38 would be helpful for NAD optimization during infectious diseases.

In the present study, we examined the protein and gene expression levels of CD38 and other enzymes related to NAD metabolism in samples of macaques and ECs. This means that the enzymatic activity of CD38 and the other proteins related to NAD metabolism was not directly determined. In addition, we did not measure the levels of NAD⁺ in samples of macaques and ECs. However, high NAD⁺ levels in CD38 gene knockout mice (Chatterjee et al., 2018) and in cells with knocked-down CD38 mRNA (Escande et al., 2013) indicate that the expression and quantity of CD38 protein are related to the enzymatic activity for NAD⁺ degradation, allowing us to speculate NAD metabolism by the expression of the proteins and the genes.

5. Conclusion

Significantly activated ECs together with increased expression levels of CD38, IDO, NAPRT, and LDH were observed in locally inflamed lung and heart tissues at the early stage of SARS-CoV-2 infection in cynomolgus macaques. The findings indicated that there was a systemic alteration in NAD metabolism in ECs after infection, and a more significant change was found in locally inflamed lung tissues. Observations of the change in NAD metabolism in ECs might contribute to a deeper insight into the metabolomic pathogenesis of COVID-19 and the development of an optimal NAD-targeting therapy for infectious diseases.

CRedit authorship contribution statement

Cong Thanh Nguyen: Conceptualization, Formal analysis, Funding acquisition, Methodology, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Misako Nakayama:** Formal analysis, Methodology, Writing – review & editing. **Hirohito Ishigaki:** Methodology, Writing – review & editing. **Yoshinori Kitagawa:** Methodology, Writing – review & editing. **Akemi Kakino:** Methodology, Resources, Writing – review & editing. **Marumi Ohno:** Conceptualization, Writing – review & editing. **Masaki Shingai:** Methodology, Writing – review & editing. **Yasuhiko Suzuki:** Funding acquisition, Methodology, Resources, Writing – review & editing. **Tatsuya Sawamura:** Conceptualization, Funding acquisition, Methodology, Resources, Supervision, Writing – review & editing. **Hiroshi Kida:** Conceptualization, Funding acquisition, Supervision, Writing – review & editing. **Yasushi Itoh:** Conceptualization, Formal analysis, Funding acquisition, Methodology, Supervision, Writing – original draft, Writing – review & editing.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgment

The authors would like to thank Naoko Kitagawa, Hideaki Ishida, Takako Sasamura, Hinata So, and Chikako Kinoshita for their assistance in the experiment and Hideaki Tsuchiya, Iori Itagaki, Takahiro Nakagawa, and Ikuo Kawamoto for animal care. This research is partly supported by the Japan Agency for Medical Research and Development (AMED) under Grant Nos. JP19fk0108172, JP20nk0101615, JP20fk0108276, JP20fk0108410, JP20fk0108538, JP23fa627005, and JP23fa627008 and Japan Society for the Promotion of Science (JSPS) Grants-in-Aid for Research Activity Start-up Grant number 21K20757. Cong Thanh Nguyen and Misako Nakayama were supported by the Sato

Yo International Scholarship Foundation and the Naito Foundation, respectively.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.virol.2024.110052>.

References

- Ackermann, M., Verleden, S.E., Kuehnel, M., Haverich, A., Welte, T., Laenger, F., Vanstapel, A., Werlein, C., Stark, H., Tzankov, A., Li, W.W., Li, V.W., Mentzer, S.J., Jonigk, D., 2020. Pulmonary vascular endothelialitis, thrombosis, and angiogenesis in covid-19. *N. Engl. J. Med.* 383, 120–128.
- Amici, S.A., Young, N.A., Narvaez-Miranda, J., Jablonski, K.A., Arcos, J., Rosas, L., Papenfuss, T.L., Torrelles, J.B., Jarjour, W.N., Guerau-de-Arellano, M., 2018. CD38 is robustly induced in human macrophages and monocytes in inflammatory conditions. *Front. Immunol.* 9, 1593.
- Barbosa, M.T., Soares, S.M., Novak, C.M., Sinclair, D., Levine, J.A., Aksoy, P., Chini, E.N., 2007. The enzyme CD38 (a NAD glycohydrolase, EC 3.2.2.5) is necessary for the development of diet-induced obesity. *Faseb. J.* 21, 3629–3639.
- Boslett, J., Hemann, C., Christofi, F.L., Zweier, J.L., 2018. Characterization of CD38 in the major cell types of the heart: endothelial cells highly express CD38 with activation by hypoxia-reoxygenation triggering NAD(P)H depletion. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 314, C297–C309.
- Cao, X., Li, W., Wang, T., Ran, D., Davalos, V., Planas-Serra, L., Pujol, A., Esteller, M., Wang, X., Yu, H., 2022. Accelerated biological aging in COVID-19 patients. *Nat. Commun.* 13, 2135.
- Chang, R., Mamun, A., Dominic, A., Le, N.T., 2020. SARS-CoV-2 mediated endothelial dysfunction: the potential role of chronic oxidative stress. *Front. Physiol.* 11, 605908.
- Chatterjee, S., Daenthanasamak, A., Chakraborty, P., Wyatt, M.W., Dhar, P., Selvam, S., Fu, J., Zhang, J., Nguyen, H., Kang, I., Toth, K., Al-Homrani, M., Husain, M., Beeson, G., Ball, L., Helke, K., Husain, S., Garrett-Mayer, E., Hardiman, G., Mehrotra, M., Nishimura, M.I., Beeson, C.C., Bupp, M.G., Wu, J., Ogretmen, B., Paulos, C.M., Rathmell, J., Yu, X.Z., Mehrotra, S., 2018. CD38-NAD⁺ axis regulates immunotherapeutic anti-tumor T cell response. *Cell Metabol.* 27, 85–100.
- Cheng, S.C., Quintin, J., Cramer, R.A., Shephardson, K.M., Saeed, S., Kumar, V., Giamarellos-Bourboulis, E.J., Martens, J.H., Rao, N.A., Aghajani, F.A., Manjeri, G.R., Li, Y., Ifrim, D.C., Arts, R.J., van der Veer, B.M., Deen, P.M., Logie, C., O'Neill, L.A., Willems, P., van de Veerdonk, F.L., van der Meer, J.W., Ng, A., Joosten, L.A., Wijmenga, C., Stunnenberg, H.G., Xavier, R.J., Netea, M.G., 2014. mTOR- and HIF-1 α -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. *Science* 345, 1250684.
- Chini, C., Hogan, K.A., Warner, G.M., Tarrago, M.G., Peclat, T.R., Tchkonja, T., Kirkland, J.L., Chini, E., 2019. The NADase CD38 is induced by factors secreted from senescent cells providing a potential link between senescence and age-related cellular NAD⁺ decline. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 513, 486–493.
- Consonni, F.M., Durante, B., Manfredi, M., Bleva, A., Pandolfo, C., Garlatti, V., Vanella, V.V., Marengo, E., Barberis, E., Bottazzi, B., Bombace, S., My, I., Condorelli, G., Torri, V., Sica, A., 2023. Immunometabolic interference between cancer and COVID-19. *Front. Immunol.* 14, 1168455.
- Di Pierro, F., Khan, A., Iqtadar, S., Mumtaz, S.U., Chaudhry, M.N.A., Bertuccioli, A., Derosa, G., Maffioli, P., Togni, S., Riva, A., Allegrini, P., Recchia, M., Zerbini, N., 2022. Quercetin as a possible complementary agent for early-stage COVID-19: concluding results of a randomized clinical trial. *Front. Pharmacol.* 13, 1096853.
- Escande, C., Nin, V., Price, N.L., Capellini, V., Gomes, A.P., Barbosa, M.T., O'Neill, L., White, T.A., Sinclair, D.A., Chini, E.N., 2013. Flavonoid apigenin is an inhibitor of the NAD⁺ ase CD38: implications for cellular NAD⁺ metabolism, protein acetylation, and treatment of metabolic syndrome. *Diabetes* 62, 1084–1093.
- Fang, J., Chen, W., Hou, P., Liu, Z., Zuo, M., Liu, S., Feng, C., Han, Y., Li, P., Shi, Y., Shao, C., 2023. NAD⁺ metabolism-based immunoregulation and therapeutic potential. *Cell Biosci.* 13, 81.
- Fogarty, H., Ward, S.E., Townsend, L., Karampini, E., Elliott, S., Conlon, N., Dunne, J., Kiersey, R., Naughton, A., Gardiner, M., Byrne, M., Bergin, C., O'Sullivan, J.M., Martin-Loeches, I., Nadarajan, P., Bannan, C., Mallon, P.W., Curley, G.F., Preston, R. J.S., Rehill, A.M., Baker, R.I., Cheallaigh, C.N., O'Donnell, J.S., Irish, C.-V.S.I., 2022. Sustained VWF-ADAMTS-13 axis imbalance and endotheliopathy in long COVID syndrome is related to immune dysfunction. *J. Thromb. Haemostasis* 20, 2429–2438.
- Gan, L., Liu, D., Liu, J., Chen, E., Chen, C., Liu, L., Hu, H., Guan, X., Ma, W., Zhang, Y., He, Y., Liu, B., Tang, S., Jiang, W., Xue, J., Xin, H., 2021. CD38 deficiency alleviates Ang II-induced vascular remodeling by inhibiting small extracellular vesicle-mediated vascular smooth muscle cell senescence in mice. *Signal Transduct. Targeted Ther.* 6, 223.
- Guerreiro, S., Privat, A.L., Bressac, L., Toulorge, D., 2020. CD38 in neurodegeneration and neuroinflammation. *Cells* 9, 471.
- Hoffmann, R.F., Zarrintan, S., Brandenburg, S.M., Kol, A., de Bruin, H.G., Jafari, S., Dijk, F., Kalicharan, D., Kelders, M., Gosker, H.R., Ten Hacken, N.H., van der Want, J.J., van Oosterhout, A.J., Heijink, I.H., 2013. Prolonged cigarette smoke exposure alters mitochondrial structure and function in airway epithelial cells. *Respir. Res.* 14, 97.

- Hogan, K.A., Chini, C.C.S., Chini, E.N., 2019. The multi-faceted ecto-enzyme CD38: roles in immunomodulation, cancer, aging, and metabolic diseases. *Front. Immunol.* 10, 1187.
- Horenstein, A., Faini, A.C., Malavasi, F., 2021. CD38 in the age of covid-19: a medical perspective. *Physiol. Rev.* 101, 1457–1486.
- Hu, Y., Wang, H., Wang, Q., Deng, H., 2014. Overexpression of CD38 decreases cellular NAD levels and alters the expression of proteins involved in energy metabolism and antioxidant defense. *J. Proteome Res.* 13, 786–795.
- Ishigaki, H., Nakayama, M., Kitagawa, Y., Nguyen, C.T., Hayashi, K., Shiohara, M., Gotoh, B., Itoh, Y., 2021. Neutralizing antibody-dependent and -independent immune responses against SARS-CoV-2 in cynomolgus macaques. *Virology* 554, 97–105.
- Ishigaki, H., Yasui, F., Nakayama, M., Endo, A., Yamamoto, N., Yamaji, K., Nguyen, C.T., Kitagawa, Y., Sanada, T., Honda, T., Munakata, T., Higa, M., Toyama, S., Kono, R., Takagi, A., Matsumoto, Y., Koseki, A., Hayashi, K., Shiohara, M., Ishii, K., Saeki, Y., Deguchi, S., Vallee, S., McQuade, S., Islam, R., Natarajan, M., Ishigaki, H., Nakayama, M., Nguyen, C.T., Kitagawa, Y., Wu, Y., Mori, K., Hishiki, T., Takasaki, T., Itoh, Y., Takayama, K., Nio, Y., Takebe, T., 2023. Complement factor D targeting protects endotheliopathy in organoid and monkey models of COVID-19. *Cell Stem Cell* 30, 1315–1330.
- Kim, S.Y., Cho, B.H., Kim, U.H., 2010. CD38-mediated Ca²⁺ signaling contributes to angiotensin II-induced activation of hepatic stellate cells: attenuation of hepatic fibrosis by CD38 ablation. *J. Biol. Chem.* 285, 576–582.
- Klabunde, B., Wesener, A., Bertrams, W., Beinborn, I., Paczia, N., Surmann, K., Blankenburg, S., Wilhelm, J., Serrania, J., Knoops, K., Elsayed, E.M., Laakmann, K., Jung, A.L., Kirschbaum, A., Hammerschmidt, S., Alshaar, B., Gisch, N., Abu Mraheil, M., Becker, A., Volker, U., Vollmeister, E., Benedikter, B.J., Schmeck, B., 2023. NAD⁺ metabolism is a key modulator of bacterial respiratory epithelial infections. *Nat. Commun.* 14, 5818.
- Koutsakos, M., Rowntree, L.C., Hensen, L., Chua, B.Y., van de Sandt, C.E., Habel, J.R., Zhang, W., Jia, X., Kedziński, L., Ashhurst, T.M., Putri, G.H., Marsh-Wakefield, F., Read, M.N., Edwards, D.N., Clemens, E.B., Wong, C.Y., Mordant, F.L., Juno, J.A., Amanat, F., Audsley, J., Holmes, N.E., Gordon, C.L., Smibert, O.C., Trubiano, J.A., Hughes, C.M., Catton, M., Denholm, J.T., Tong, S.Y.C., Doolan, D.L., Kotsimpos, T.C., Jackson, D.C., Krammer, F., Godfrey, D.I., Chung, A.W., King, N.J.C., Lewin, S.R., Wheatley, A.K., Kent, S.J., Subbarao, K., McMahon, J., Thevarajan, I., Nguyen, T.H.O., Cheng, A.C., Kedzierska, K., 2021. Integrated immune dynamics define correlates of COVID-19 severity and antibody responses. *Cell Rep Med* 2, 100208.
- Lee, S., Paudel, O., Jiang, Y., Yang, X.R., Sham, J.S., 2015. CD38 mediates angiotensin II-induced intracellular Ca²⁺ release in rat pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 52, 332–341.
- Liang, Y., Yu, Z., Song, Y., Wang, T., Xiao, B., 2019. Indoleamine 2,3-dioxygenase activation by interferon gamma in vascular endothelial rat cells requires noncanonical NF-kappaB signaling. *Transplant. Proc.* 51, 2141–2145.
- Lischke, T., Heesch, K., Schumacher, V., Schneider, M., Haag, F., Koch-Nolte, F., Mittrucker, H.W., 2013. CD38 controls the innate immune response against *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 81, 4091–4099.
- Liu, Y., Garron, T.M., Chang, Q., Su, Z., Zhou, C., Qiu, Y., Gong, E.C., Zheng, J., Yin, Y. W., Ksiazek, T., Brasel, T., Jin, Y., Boor, P., Comer, J.E., Gong, B., 2021. Cell-type apoptosis in lung during SARS-CoV-2 infection. *Pathogens* 10, 509.
- Luengo, A., Li, Z., Gui, D.Y., Sullivan, L.B., Zagorulya, M., Do, B.T., Ferreira, R., Naamati, A., Ali, A., Lewis, C.A., Thomas, C.J., Spranger, S., Matheson, N.J., Vander Heiden, M.G., 2021. Increased demand for NAD⁺ relative to ATP drives aerobic glycolysis. *Mol. Cell.* 81, 691–707.
- Mako, V., Czucz, J., Weiszhar, Z., Herczenik, E., Matko, J., Prohászka, Z., Cervenak, L., 2010. Proinflammatory activation pattern of human umbilical vein endothelial cells induced by IL-1 β , TNF- α , and LPS. *Cytometry* 77, 962–970.
- Martinez-Salazar, B., Holwerda, M., Studle, C., Piragyte, I., Mercader, N., Engelhardt, B., Rieben, R., Doring, Y., 2022. COVID-19 and the vasculature: current aspects and long-term consequences. *Front. Cell Dev. Biol.* 10, 824851.
- Ogura, Y., Kitada, M., Xu, J., Monno, I., Koya, D., 2020. CD38 inhibition by apigenin ameliorates mitochondrial oxidative stress through restoration of the intracellular NAD⁺/NADH ratio and Sirt3 activity in renal tubular cells in diabetic rats. *Aging (Albany NY)* 12, 11325–11336.
- Raines, N.H., Ganatra, S., Nissaisorakarn, P., Pandit, A., Morales, A., Asnani, A., Sadrolashrafi, M., Maheshwari, R., Patel, R., Bang, V., Shreyder, K., Brar, S., Singh, A., Dani, S.S., Knapp, S., Poyan Mehr, A., Brown, R.S., Zeidel, M.L., Bhargava, R., Schlondorff, J., Steinman, T.I., Mukamal, K.J., Parikh, S.M., 2021. Niacinamide may be associated with improved outcomes in COVID-19-related acute kidney injury: an observational study. *Kidney* 360 (2), 33–41.
- Rajman, L., Chwalek, K., Sinclair, D.A., 2018. Therapeutic potential of NAD-boosting molecules: the in vivo evidence. *Cell Metabol.* 27, 529–547.
- Schiavoni, I., Scagnolari, C., Horenstein, A.L., Leone, P., Pierangeli, A., Malavasi, F., Ausiello, C.M., Fedele, G., 2018. CD38 modulates respiratory syncytial virus-driven proinflammatory processes in human monocyte-derived dendritic cells. *Immunology* 154, 122–131.
- Song, J.W., Lam, S.M., Fan, X., Cao, W.J., Wang, S.Y., Tian, H., Chua, G.H., Zhang, C., Meng, F.P., Xu, Z., Fu, J.L., Huang, L., Xia, P., Yang, T., Zhang, S., Li, B., Jiang, T.J., Wang, R., Wang, Z., Shi, M., Zhang, J.Y., Wang, F.S., Shui, G., 2020. Omics-Driven systems interrogation of metabolic dysregulation in COVID-19 pathogenesis. *Cell Metabol.* 32, 188–202.
- Takaso, Y., Noda, M., Hattori, T., Roboon, J., Hatano, M., Sugimoto, H., Brenner, C., Yamamoto, Y., Okamoto, H., Higashida, H., Ito, M., Yoshizaki, T., Hori, O., 2020. Deletion of CD38 and supplementation of NAD⁺ attenuate axon degeneration in a mouse facial nerve axotomy model. *Sci. Rep.* 10, 17795.
- Wing, P.A.C., Keeley, T.P., Zhuang, X., Lee, J.Y., Prange-Barczynska, M., Tsukuda, S., Morgan, S.B., Harding, A.C., Argles, I.L.A., Kurlekar, S., Noerenberg, M., Thompson, C.P., Huang, K.A., Balfe, P., Watashi, K., Castello, A., Hinks, T.S.C., James, W., Ratcliffe, P.J., Davis, I., Hodson, E.J., Bishop, T., McKeating, J.A., 2021. Hypoxic and pharmacological activation of HIF inhibits SARS-CoV-2 infection of lung epithelial cells. *Cell Rep.* 35, 109020.
- Wu, J., Jin, Z., Zheng, H., Yan, L.J., 2016. Sources and implications of NADH/NAD⁺ redox imbalance in diabetes and its complications. *Diabetes Metab. Syndr. Obes* 9, 145–153.
- Xie, N., Zhang, L., Gao, W., Huang, C., Huber, P.E., Zhou, X., Li, C., Shen, G., Zou, B., 2020. NAD⁺ metabolism: pathophysiological mechanisms and therapeutic potential. *Signal Transduct. Targeted Ther.* 5, 227.
- Yuan, F., Ren, J., Liao, H., Guo, W., Chen, L., Feng, K., Huang, T., Cai, Y.D., 2023. Identification of whole-blood DNA methylation signatures and rules associated with COVID-19 severity. *Front. Biosci. (Landmark Ed.)* 28, 284.
- Zheng, M., Schultz, M.B., Sinclair, D.A., 2022. NAD⁺ in COVID-19 and viral infections. *Trends Immunol.* 43, 283–295.
- Zhou, F., Yu, T., Du, R., Fan, G., Liu, Y., Liu, Z., Xiang, J., Wang, Y., Song, B., Gu, X., Guan, L., Wei, Y., Li, H., Wu, X., Xu, J., Tu, S., Zhang, Y., Chen, H., Cao, B., 2020. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet* 395, 1054–1062.