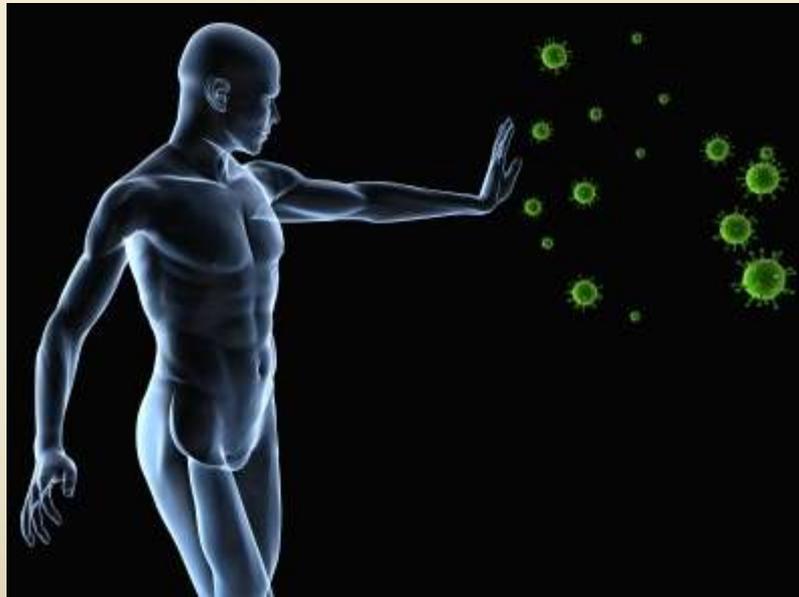


DIFESE ANTIVIRALI



DIFESE DELL'ORGANISMO

L'organismo ha essenzialmente 3 tipi di difese, disposte "sequenzialmente", che il patogeno deve superare:

Difese di
Superficie



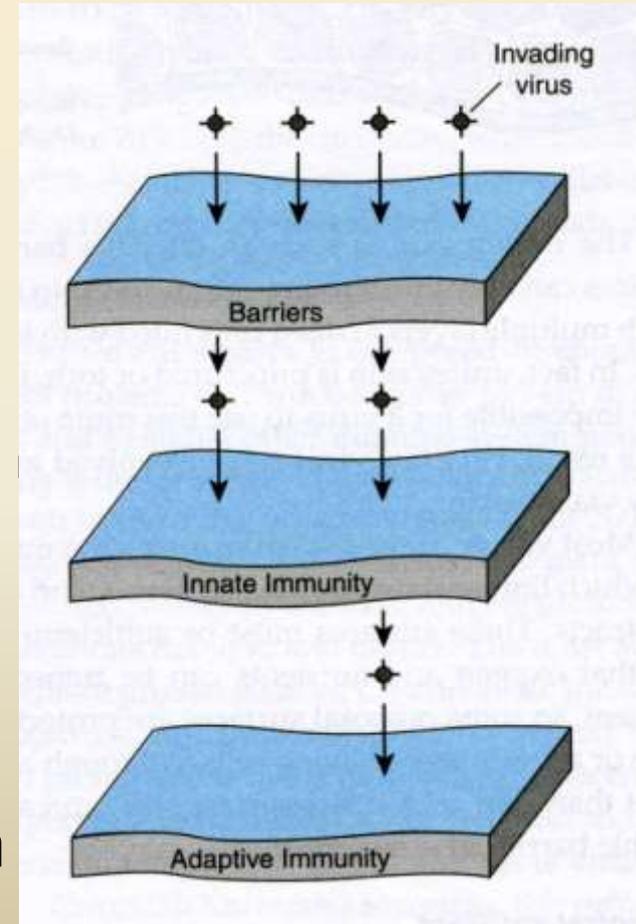
❖ Barriere fisiche

Difese
sistemiche

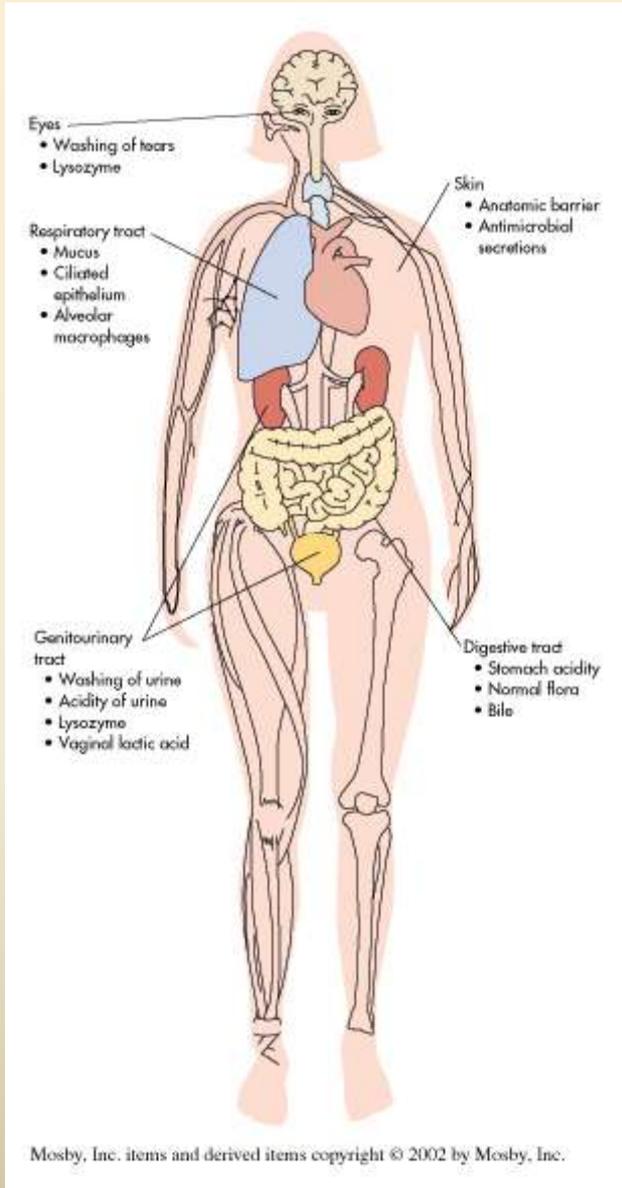
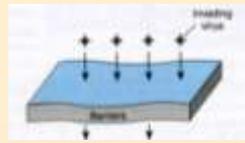


❖ Risposta innata

❖ Risposta adattativa



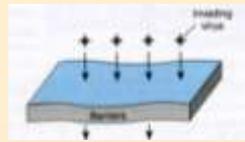
1. DIFESE DI SUPERFICIE



Mosby, Inc. items and derived items copyright © 2002 by Mosby, Inc.

- Barriere fisiche: cute, mucose
- Meccanismi di rimozione dei microrganismi: desquamazione cutanea, lacrime, muco, motilità ciliare, tosse, salivazione, deglutizione, peristalsi, defecazione, minzione
- Competizione da parte della flora normale: resistenza alla colonizzazione, interferenza
- Inibitori chimici: secrezione acida gastrica, acido lattico, acidi grassi, sali biliari, ecc.
- Sostanze antimicrobiche: lisozima, IgA secretorie, lattoferrine, ecc.

BARRIERE FISICHE



1. La **CUTE** è una barriera quasi impenetrabile per un virus, a causa della presenza dello strato cheratinizzato, formato da cellule morte.

2. Le **BARRIERE MUCOSALI** sono costituite da pochi strati di cellule vive e molti virus riescono a penetrare nonostante le difese:

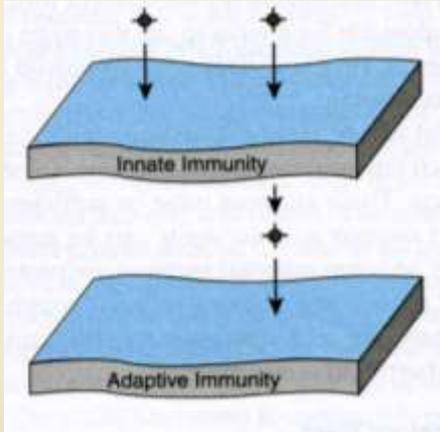
2a. Mucosa respiratoria - presenza di **MUCO** che ricopre le cellule e impedisce l'attacco al recettore

2b. Mucosa digestiva – presenza di: **SALIVA** (contiene sostanze antivirali), secrezione **ACIDA** dello stomaco, **ENZIMI** digestivi, **SALI BILIARI** (envelope).

2c. Mucosa riproduttiva - presenza di pH **ACIDO** (batteri ~pH5): molti virus sono pH-sensibili; presenza di epitelio **STRATIFICATO** (vaginale) di cellule non proliferanti (i virus replicano meglio in cellule attive): i virus che infettano la m. vaginale sfruttano piccole lesioni che consentono di raggiungere le cellule proliferanti degli strati inferiori.

2. DIFESE SISTEMICHE

Immunità INNATA (aspecifica):
comprende le difese *non immunitarie*:
infiammazione, febbre, fagocitosi, ecc.



Immunità ADATTATIVA (specifica):

Interferoni

Fattori infiammatori: proteina C reattiva, fattori chemiotattici, ecc.

Sistema del complemento

Sistema fagocitario: fagociti circolanti (monociti, granulociti neutrofili, eosinofili, basofili); fagociti fissi (a livello alveolare, epatico, splenico, midollare, linfonodale, cerebrale, ecc)

Cellule NK, mastociti, DC

Immunità umorale: Linfociti B, plasmacellule, immunoglobuline

Immunità cellulo mediata: Linfociti T, citochine



Immunità **INNATA: ANTIGENE-INDIPENDENTE**. Costitutiva, meccanismo di difesa preesistente all'incontro con l'antigene, rappresenta la prima linea di difesa dell'organismo e viene attivata da molecole espresse solo dal patogeno (e non dall'ospite) e da segnali di stress.

E' caratterizzata da:

- ASSENZA DI SPECIFICITÀ: è attiva contro un largo spettro di microorganismi;
- ASSENZA DI MEMORIA;
- VELOCITÀ DI RISPOSTA;

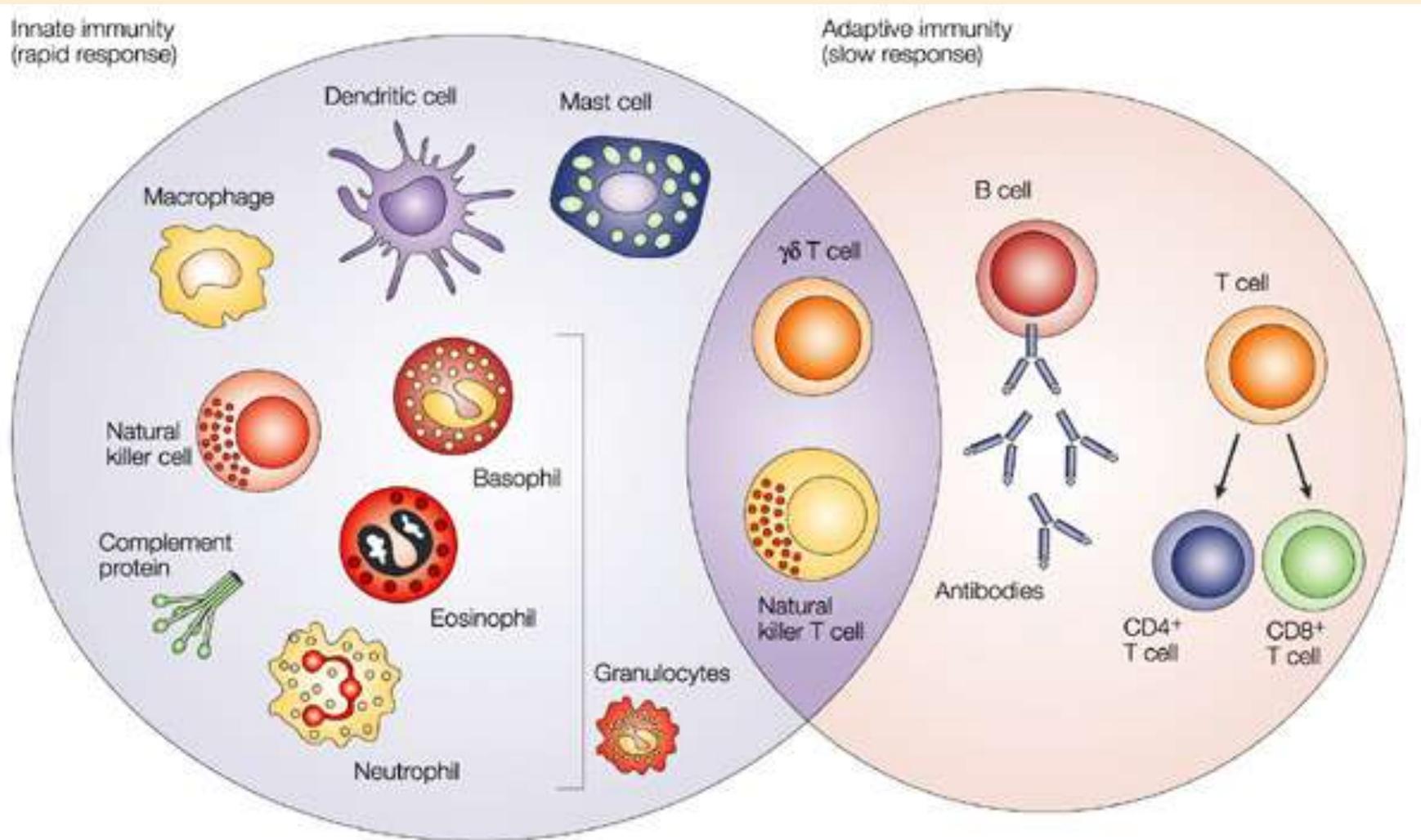


Immunità **ACQUISITA: ANTIGENE-DIPENDENTE**. Inducibile, adattativa, è l'espressione della risposta dell'individuo al contatto con antigeni, verso i quali è specifica. E' caratterizzata da:

- SPECIFICITÀ
- MEMORIA

L'I.I. è importante non solo per combattere l'infezione, ma anche perchè innesca e prepara molte risposte dell'immunità adattativa.

Cellule associate all'immunità innata e a quella adattativa

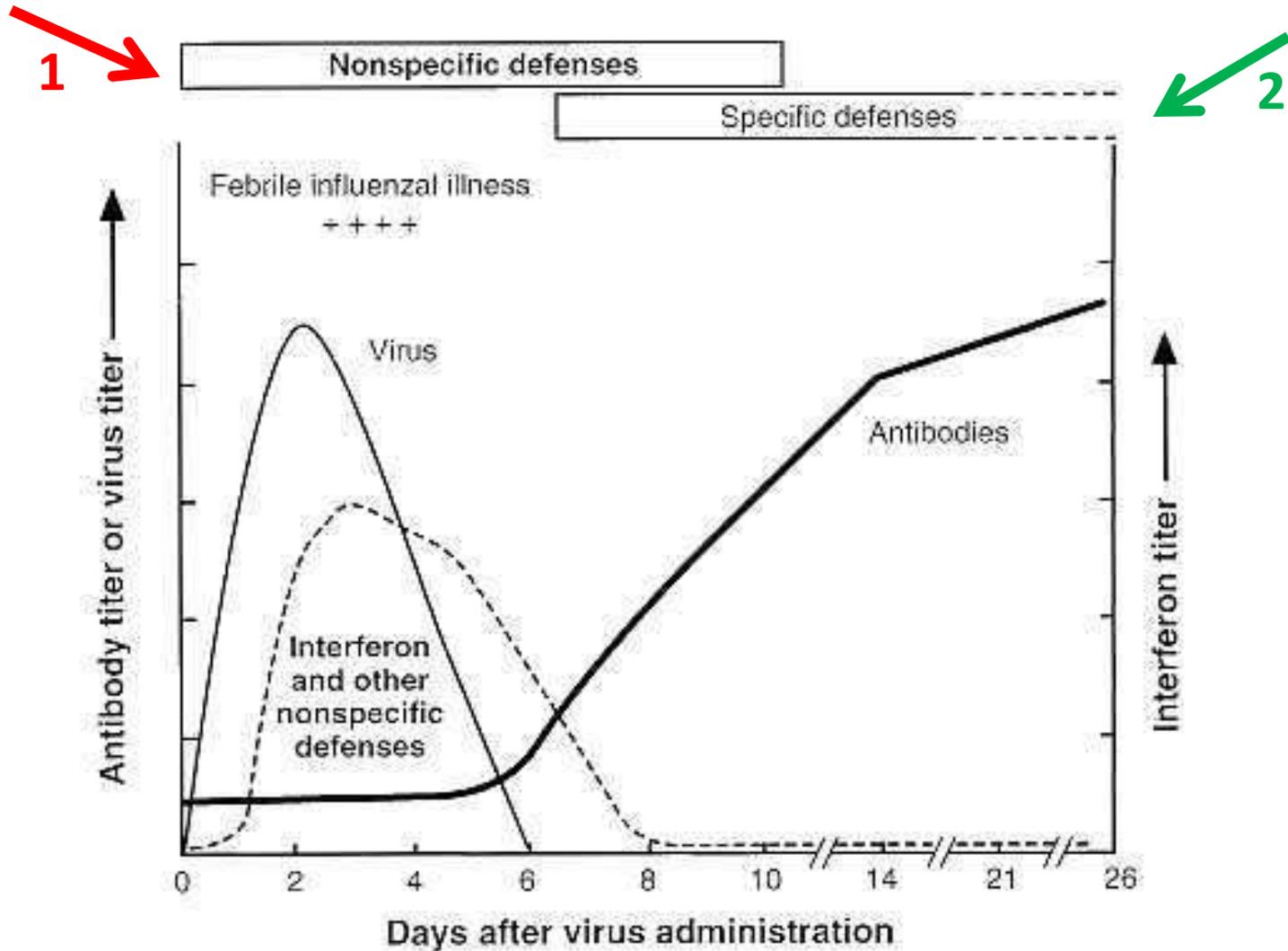


RISPOSTA CONTRO I VIRUS

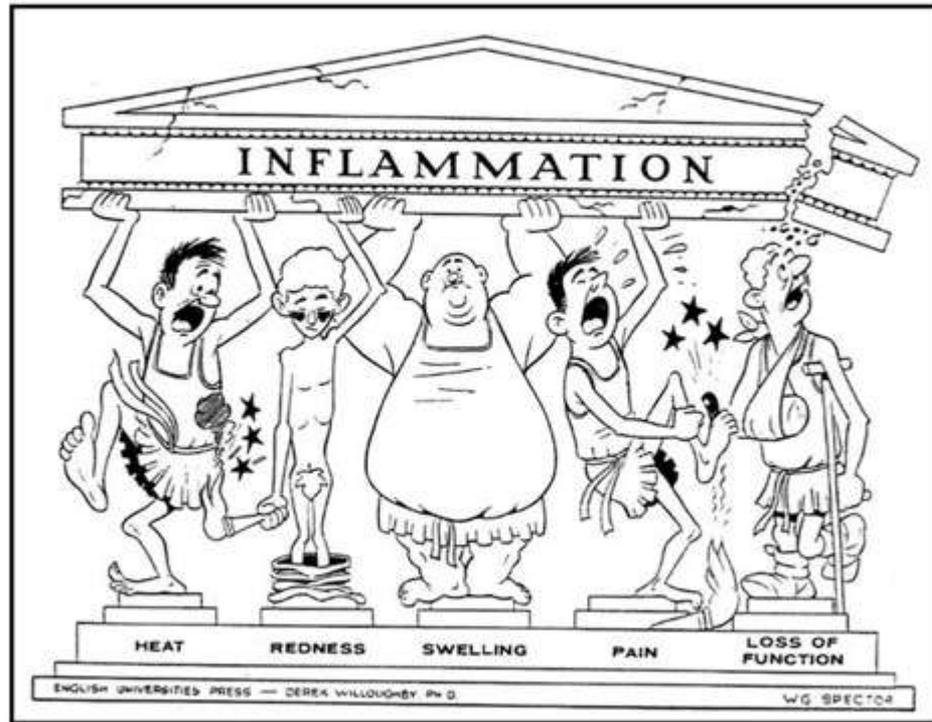
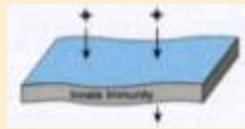
N.B.

La risposta immunitaria è il
migliore e in alcuni casi l'unico
mezzo per controllare
un'infezione virale.

Ruolo sequenziale delle diverse difese

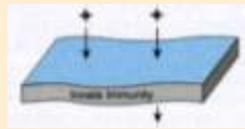


RISPOSTA INNATA: INFIAMMAZIONE



Più correttamente si parla di risposta di difesa innata NON immunitaria.

IMMUNITA' INNATA



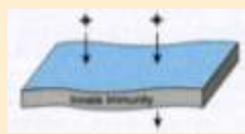
I mammiferi hanno evoluto sistemi di “sensori” per riconoscere gli agenti infettivi ed innescare risposte di difesa.

Tali sensori sono i **TLRs** (Toll-like receptors).

Le risposte dell’immunità innata vengono innescate dal riconoscimento da parte dei TLR di specifici gruppi di molecole, che sono assenti nelle cellule dell’ospite, dette **PAMPs** (*Pathogen Associated Molecular Patterns*).



IMMUNITA' INNATA: PAMPs e TLRs



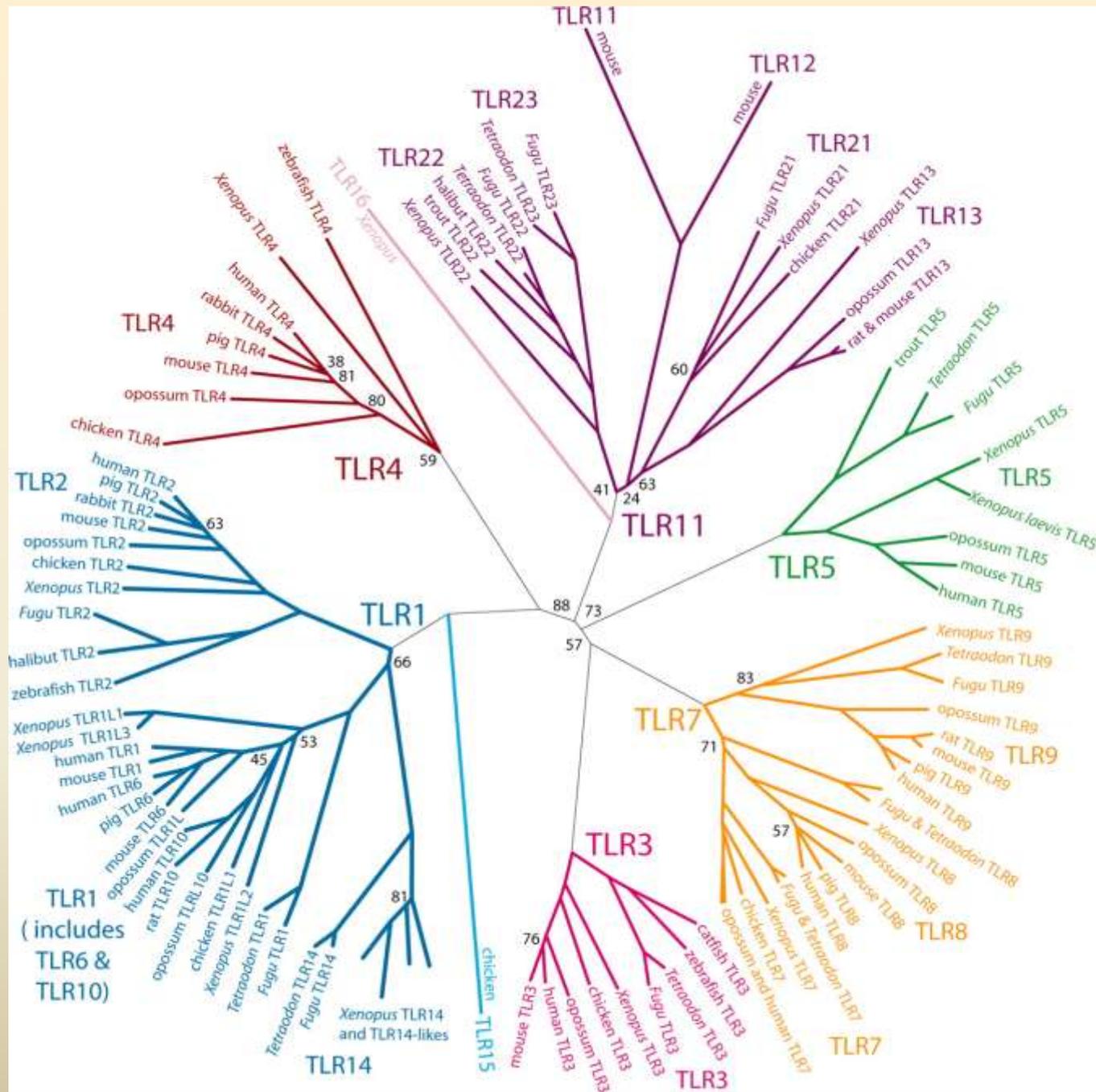
La risposta viene innescata da **PAMPs** che si legano ai **TLRs**, specifici recettori espressi sulle membrane esterne (citoplasmatica) o interne (endosomi, ER) delle cellule effettrici.

TLR	Cellular localization	Viral ligands	Bacterial ligands
1	Plasma membrane		Lipoproteins, peptidoglycans
2	Plasma membrane	Envelope proteins	Lipoproteins, peptidoglycans
3	Endosomes	ds RNA	
4	Plasma membrane	Envelope proteins	Lipopolysaccharide
5	Plasma membrane		Flagellin
6	Plasma membrane		Lipoproteins, peptidoglycans
7	Endosomes	ssRNA	
8	Endosomes	ssRNA	
9	Endosomes	Unmethylated CpG	Unmethylated CpG
10	Plasma membrane	Unknown (2005)	Unknown (2005)
11	Plasma membrane		Uropathogenic bacteria

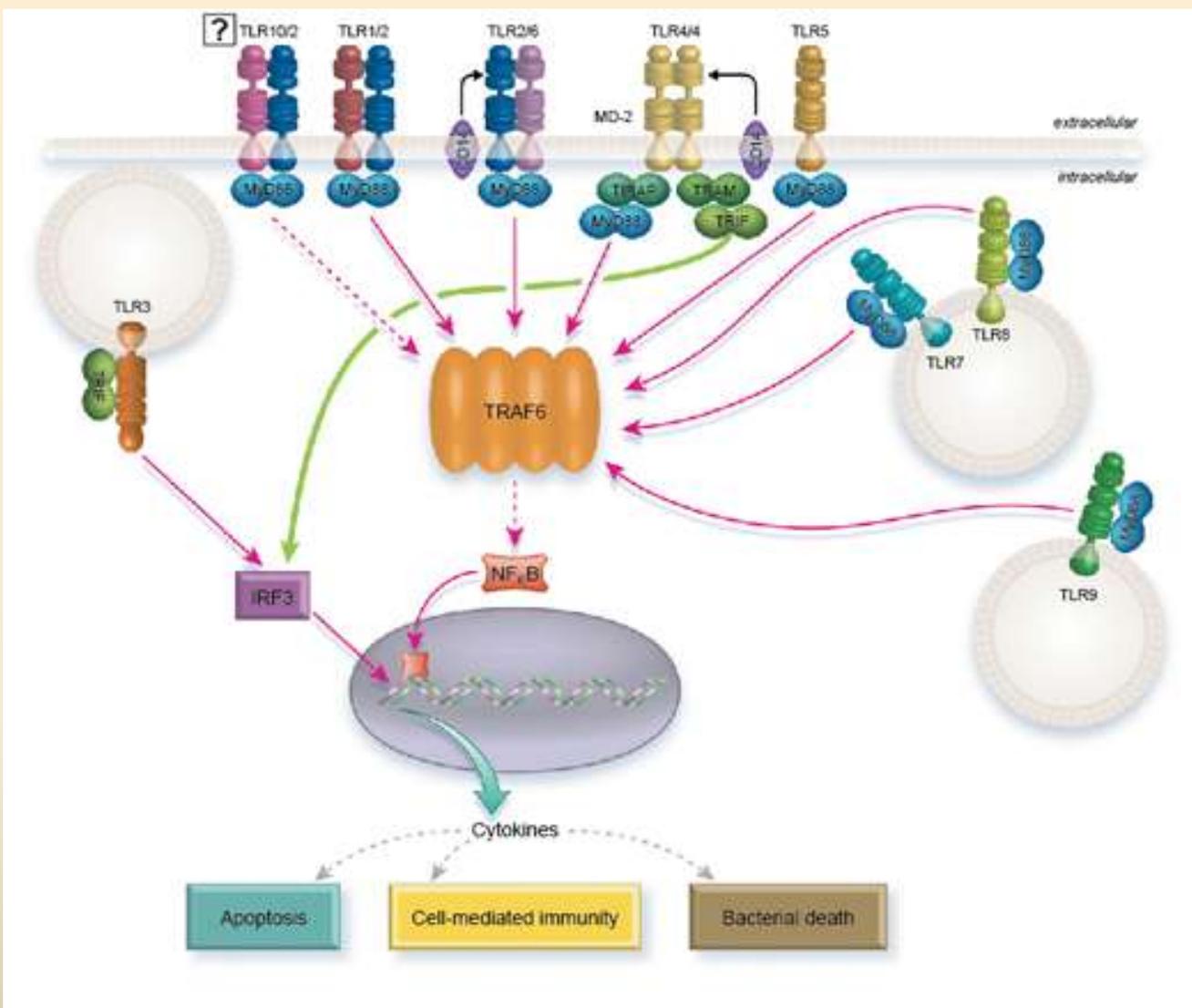
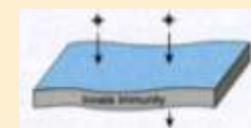
NB-Recentemente, sono stati scoperti nel topo 2 nuovi TLRs (**TLR12 e TLR13**), di cui ancora non si sa niente.

Molecular tree of the vertebrate TLR.
Branches of each major family are shown in a unique color.

Roach J C et al. PNAS 2005



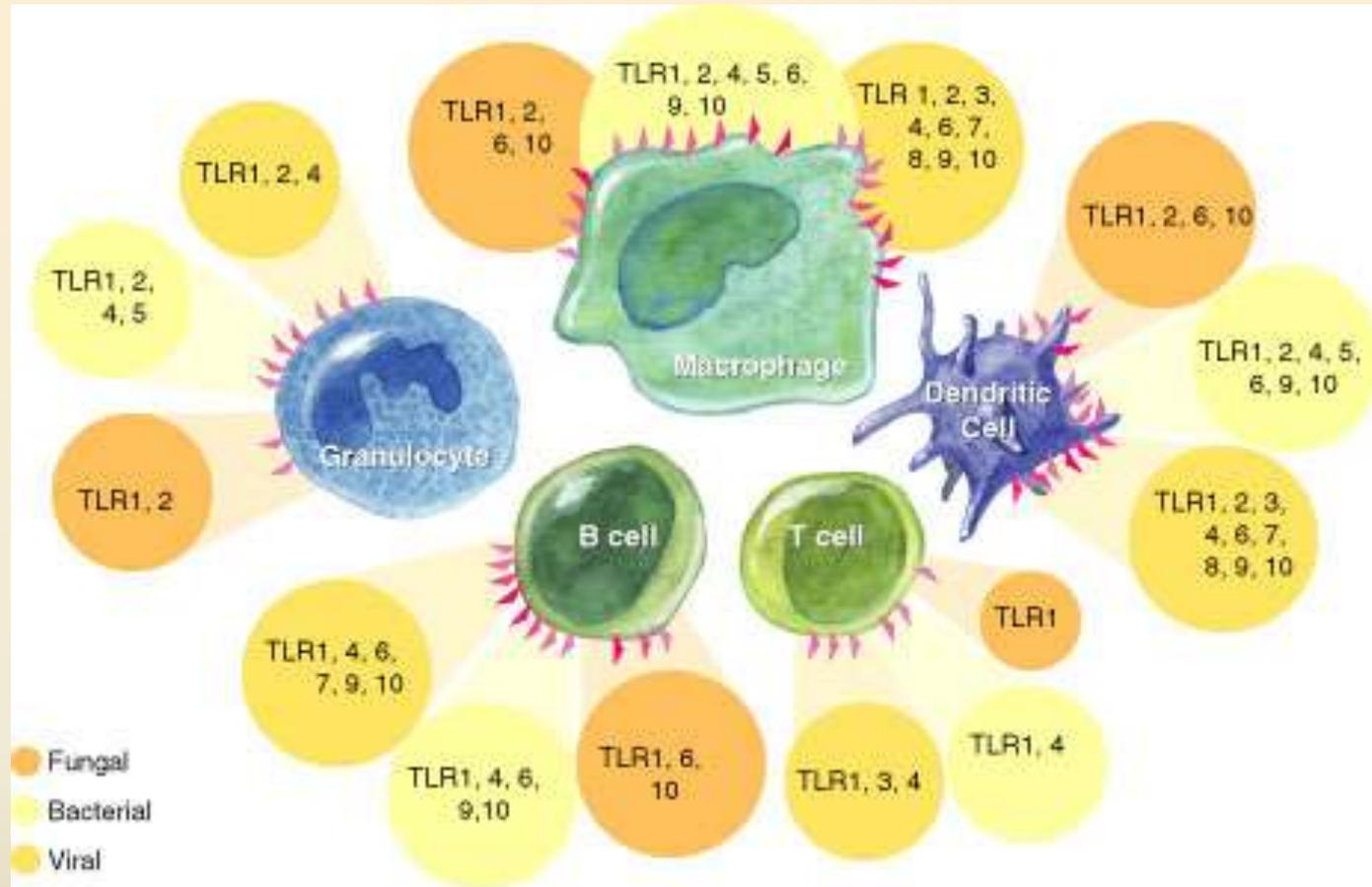
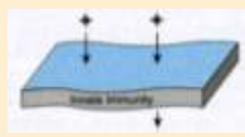
STRUTTURA dei TLRs



Tutti i TLR sono **proteine transmembrana di Tipo 1**, contenenti un numero variabile di repeats N-terminali ricchi in leucina (LRRs) seguiti da un domain ricco in cisteina, un domani transmembrana (TM), e un domain intracellulare Toll/IL-1 receptor (TIR).

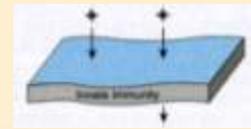
NB - Mentre i TLRs che riconoscono batteri e miceti sono sulla membrana esterna, quelli che riconoscono gli acidi nucleici virali sono di solito sulle membrane intracellulari.

DISTRIBUZIONE dei TLRs



Ogni TLR è espresso in differenti subset di leucociti, e ogni TLR riconosce differenti subset di patogeni, consentendo una efficace sorveglianza da parte del sistema immunitario.

NB – Cell dendritiche e M ϕ esprimono tutti i TLR per PAMPs virali.

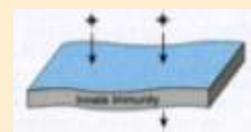


Cosa avviene quando un PAMP si lega al TLR?

Si innesca un signalling intracellulare che porta a:

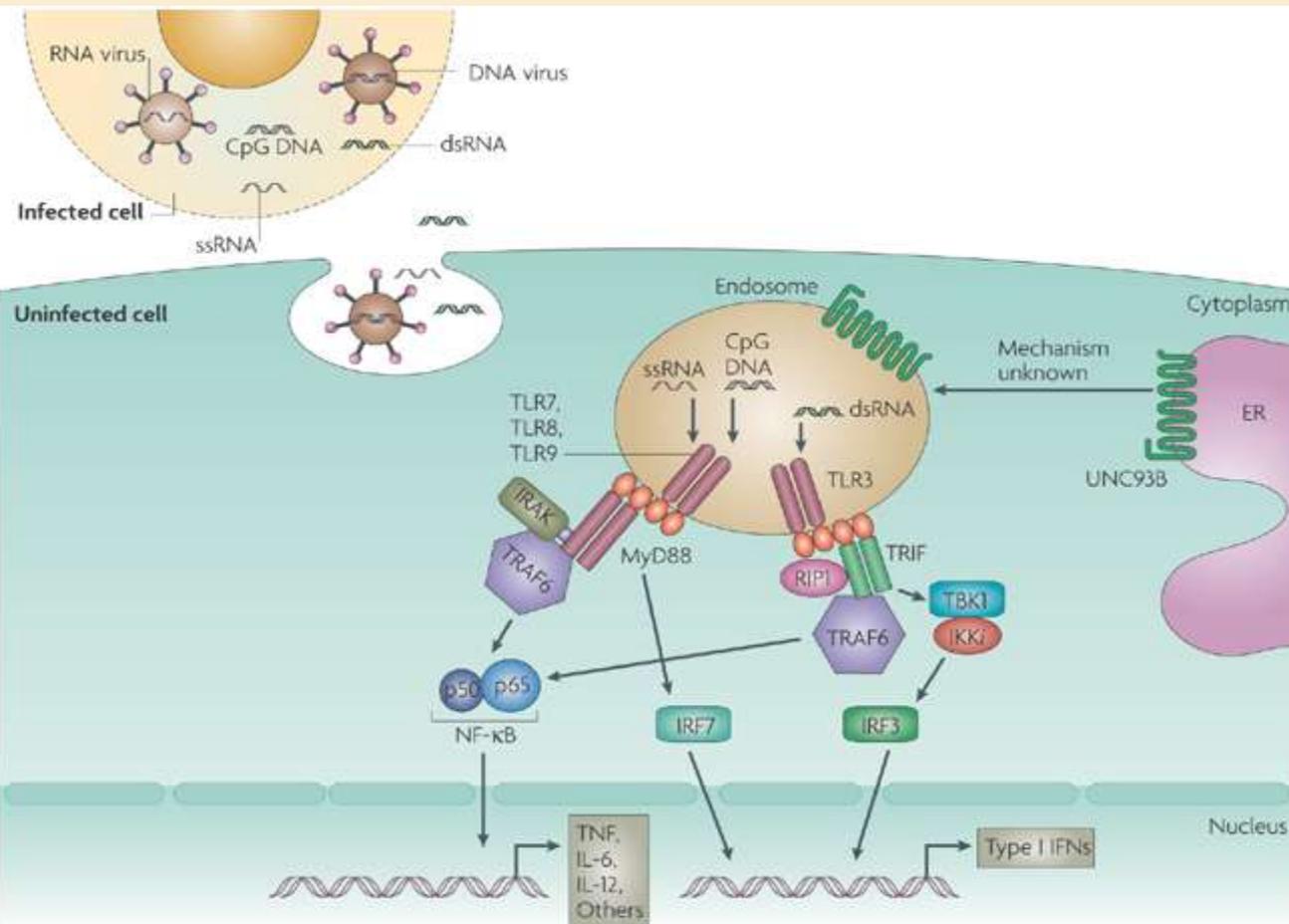
- ❖ **Attivazione di cellule dendritiche**
- ❖ **Fagocitosi**
- ❖ **Chemiotassi e infiammazione**
- ❖ **Secrezione di citochine (IL-1, -6, -8, -12, TNFa, ecc.)**
- ❖ **Produzione di molecole costimolatorie necessarie per l'attivazione di cellule T (CD80, CD86)**
- ❖ **Produzione di defensine**
- ❖ **Produzione di IFN**

Pathway dei TLRs: SIGNALLING intracellulare



Il signalling è complesso e diversificato a seconda dei TLR stimolati.

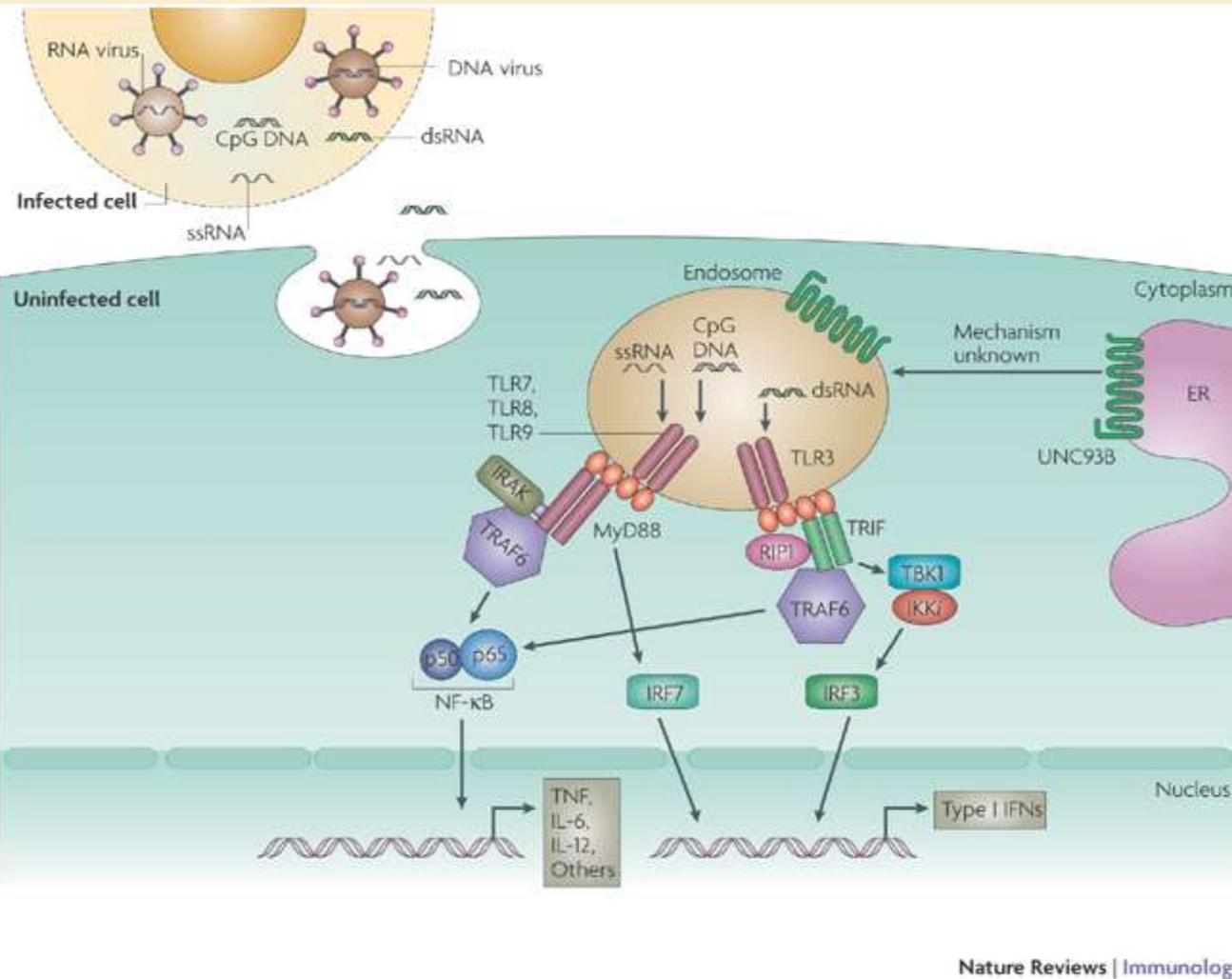
Per i virus sono di solito coinvolti **MyD88** (myeloid differentiation primary-response gene 88) e **TRIF** (TIR Toll/IL-1 receptor-domain-containing adaptor protein inducing interferon).



UNC93B è una multiple-transmembrane-spanning protein localizzata nell'ER, che si associa ai TLR endosomali ed è richiesta per il loro signalling.

SIGNALLING TLRs VIRALI

TRIF recluta **TRAF6** (tumour-necrosis factor receptor (TNFR)-associated factor 6) e **RIP1** (receptor-interacting protein 1), **TBK1** (TANK-binding kinase 1) e **IKKi** (inducible inhibitor of NF- κ B kinase), e attiva **IRF3** (interferon-regulatory factor 3) e NF κ B.



MyD88 recluta **TRAF6** e **IRAK** (IL-1R-associated kinase) e attiva **IRF7** e **NF κ B**.

Anche TLR4 riconosce il virus, producendo signalling in risposta a specifiche proteine virali, mediante MyD88, TRIF e/o TRAM (TRIF-related adaptor molecule).

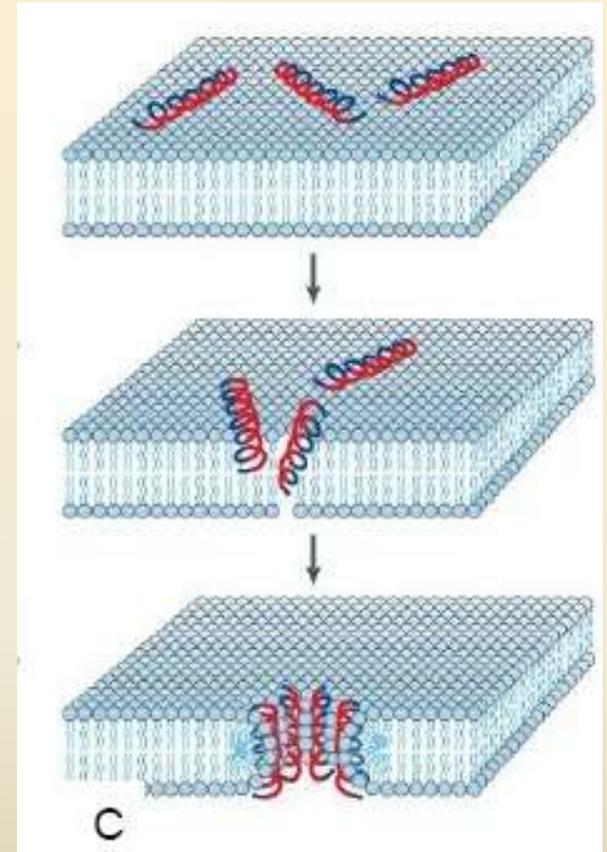
NF κ B, IRF7 e IRF3 traslocano al nucleo per indurre la trascrizione dei geni codificanti citochine (TNF, IL-6) e IFNs tipo 1.

DEFENSINE

Sono **piccole proteine cationiche** ricche in cisteina, si trovano sia nei vertebrati che negli invertebrati (e sono anche state riportate nelle piante). Sono attive contro virus, batteri e funghi. Sono peptidi di 18-45 aa, contenenti 6-8 residui di cisteina.

La maggior parte delle defensine agisce legando il microrganismo e provocando la formazione di pori che portano alla lisi del microrganismo.

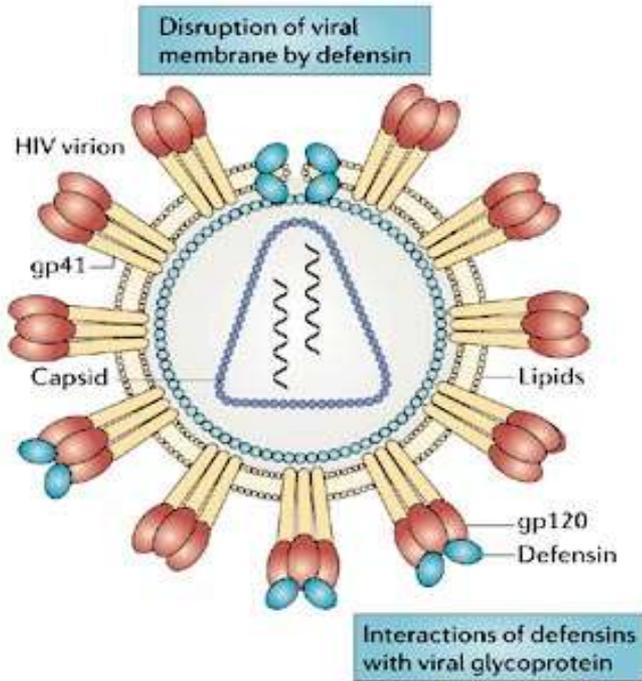
Si trovano spesso aumentate in situazioni di infiammazione cronica, tumori, infezioni.



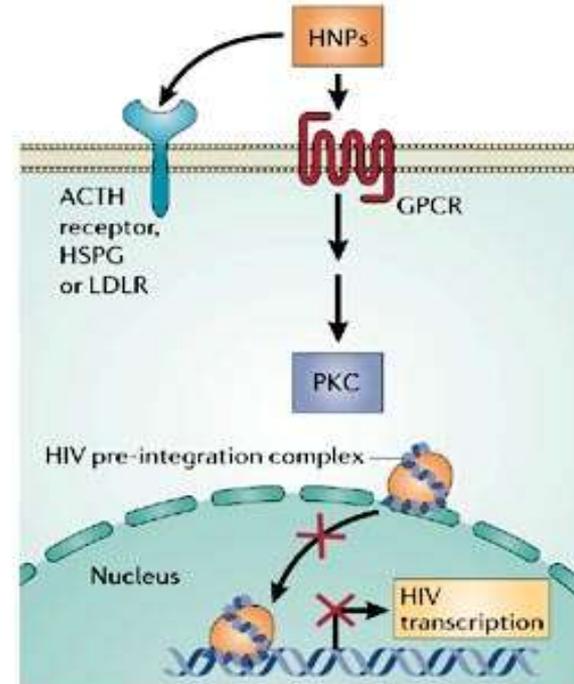
DEFENSINE

Prodotte da leucociti, NK e cellule epiteliali, in seguito a vari stimoli (fra cui anche attivazione di TLR). Nelle difese antivirali agiscono sia sul virus che sulla cellula.

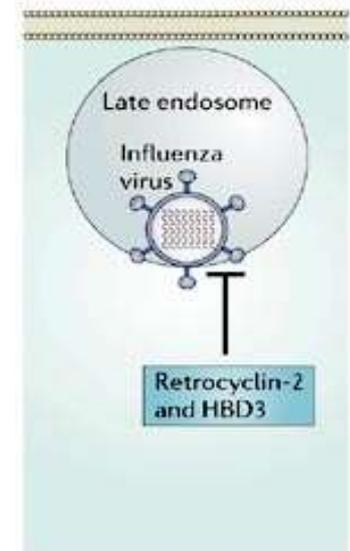
a Effect on the virion



b Effect on HIV-infected cell



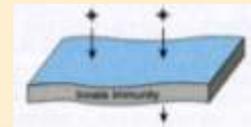
c Effect on influenza-virus-infected cell



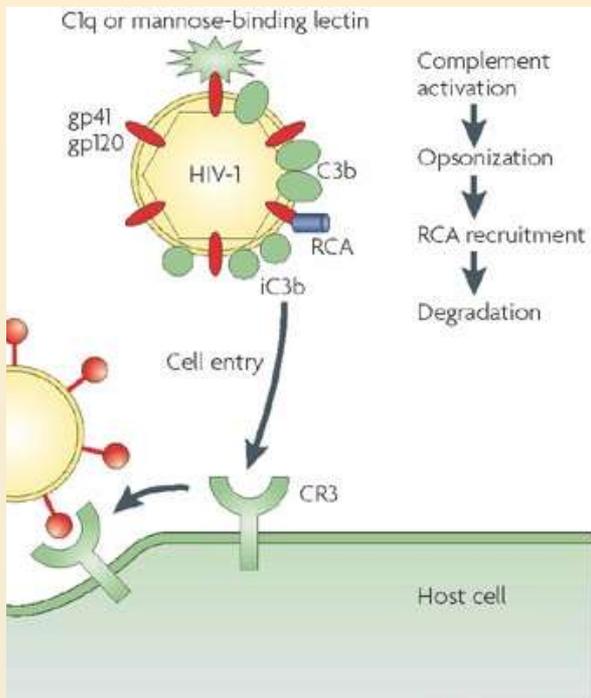
a. Inattivano virus con involuppo, rompendo le membrane o interagendo con le glicoproteine (es. gp120 di HIV)

b. Interagiscono con R di membrana e alterano il signalling intracellulare, con diversi effetti: es. bloccano la trascrizione dell'RNA virale o il trasferimento dell'ac. nucleico virale nel nucleo

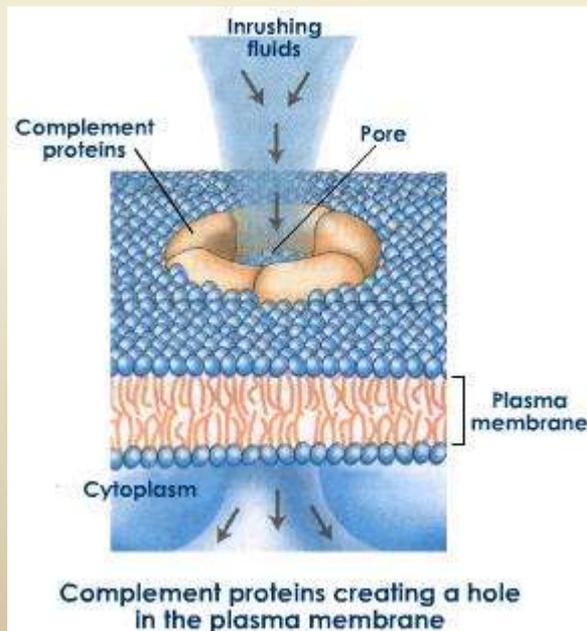
c. In diversi virus (es influenza) bloccano il processo di spoliatura negli endosomi



COMPLEMENTO



Nature Reviews | Microbiology

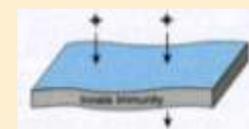


Fra tutte le proteine di questo sistema, hanno particolare importanza le componenti C1q e C3b. Queste si possono legare alla superficie del virus, con 2 effetti:

1) **OPSONIZZAZIONE**: i fagociti hanno recettori per il C, ed i virus legati al C vengono fagocitati più facilmente

2) per i virus con involuppo, il legame di C3b innesca reazioni biochimiche che portano alla formazione di pori sulla membrana, inattivando il virus (**VIROLISI**).

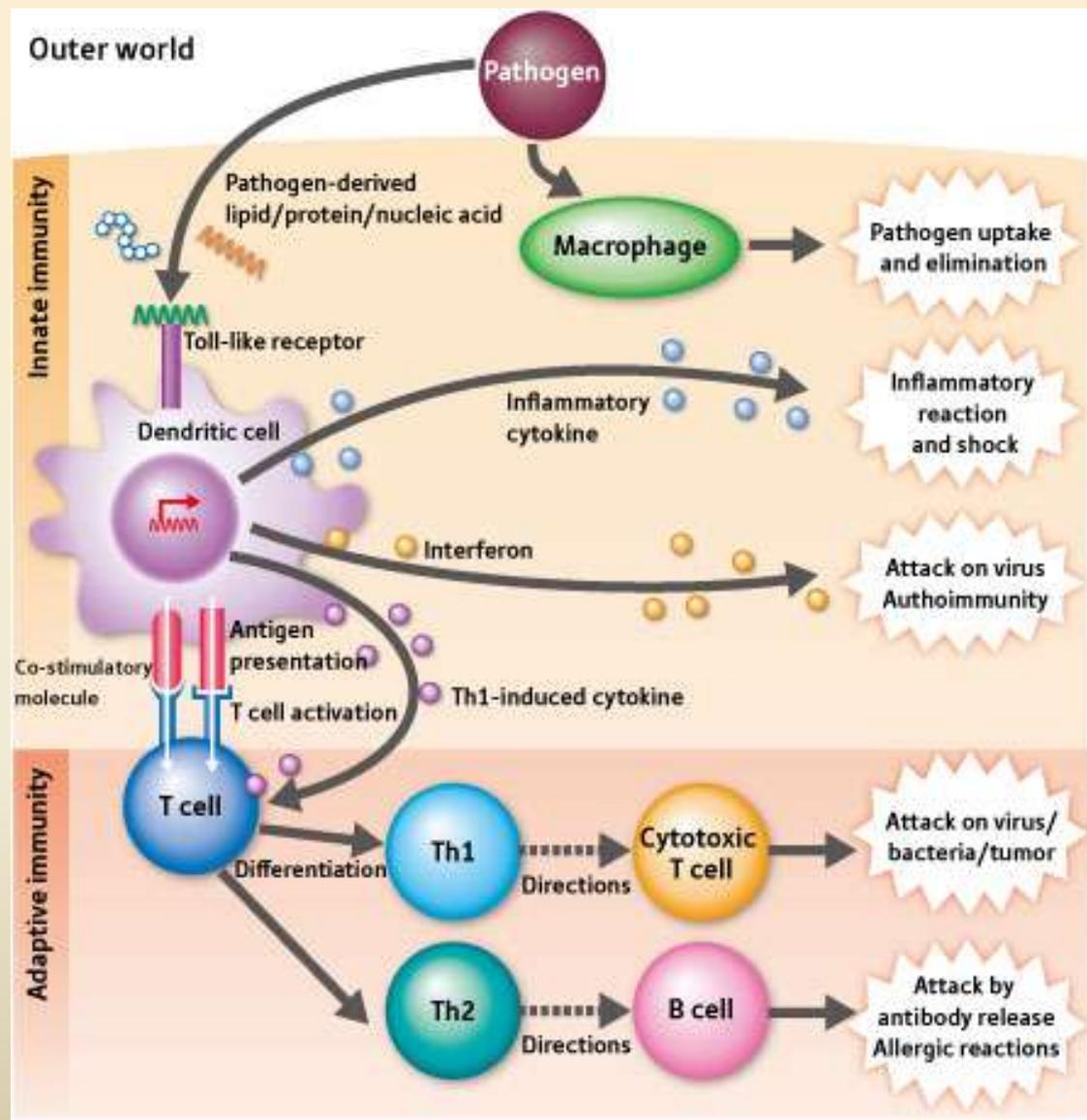
IMMUNITA' INNATA: CELLULE



La risposta innata è effettuata principalmente dalle cellule esprimenti i TLR:

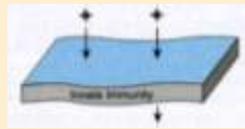
1. **macrofagi** → fagocitosi
2. **cellule dendritiche** → azione sia diretta (produzione IFN e citochine), che indiretta (APC, attivano le cellule T dell'immunità adattativa)

Importanti effettori della risposta innata sono anche le **cellule NK**.



Schema del ruolo delle cellule dendritiche nell'I.I.

Le cellule NK non hanno TLRs, ma altri recettori.

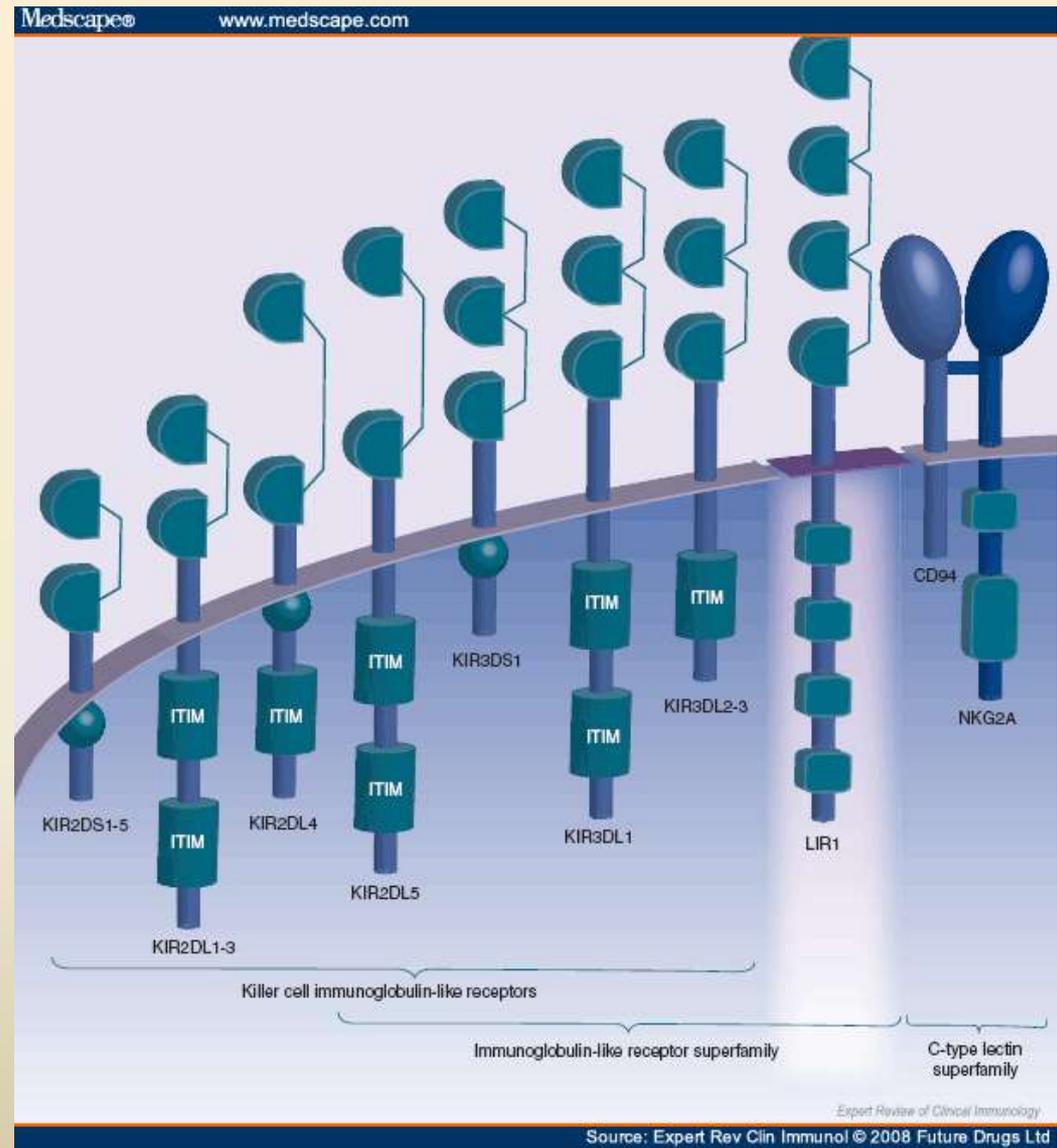


Le cellule NK hanno recettori che possono inibire o attivare il killing NK.

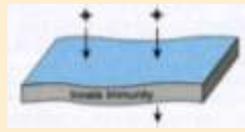
I recettori **KIR** appartengono alla superfamiglia delle Ig e possono avere 2 o 3 domain extracellulari.

Riconoscono specificamente gli alleli del MHC-I (HLA-A, HLA-B, HLA-C). Funzionalmente possono essere INIBITORI o ATTIVATORI.

Gli eterodimeri **CD94/NKG2** (presenti anche su CTL) appartengono alla superfamiglia delle lectine Tipo-C. Solo CD94/NKG2A è inibitore, tutti gli altri sono attivatori. Cloni di NK hanno recettori diversi.

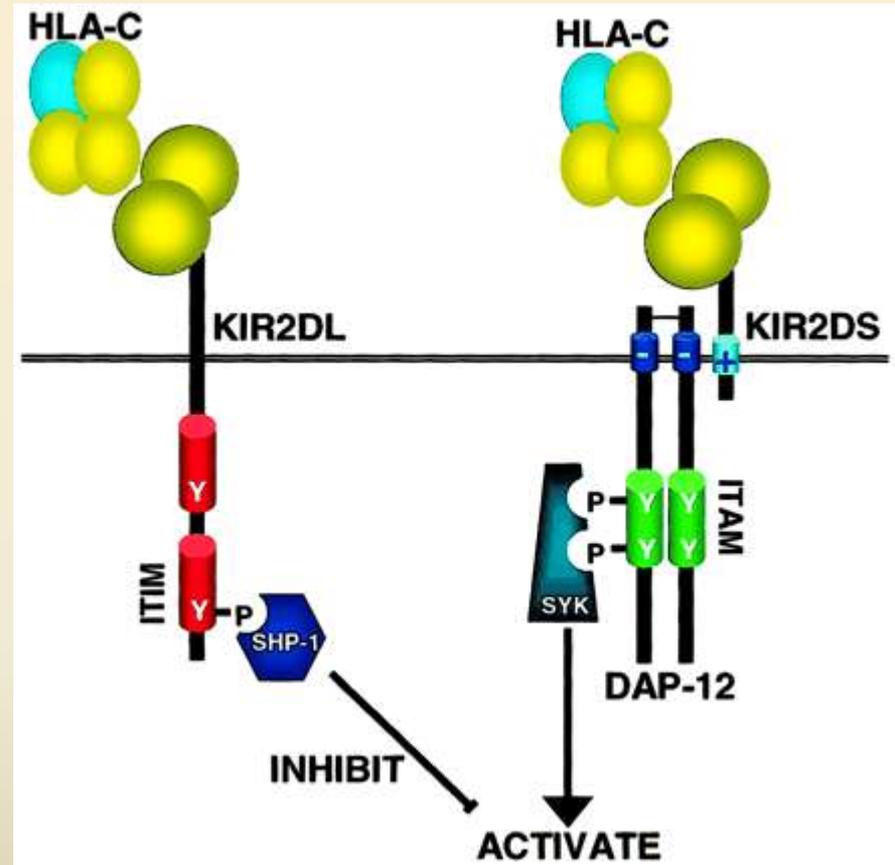


Come agiscono i KIR?

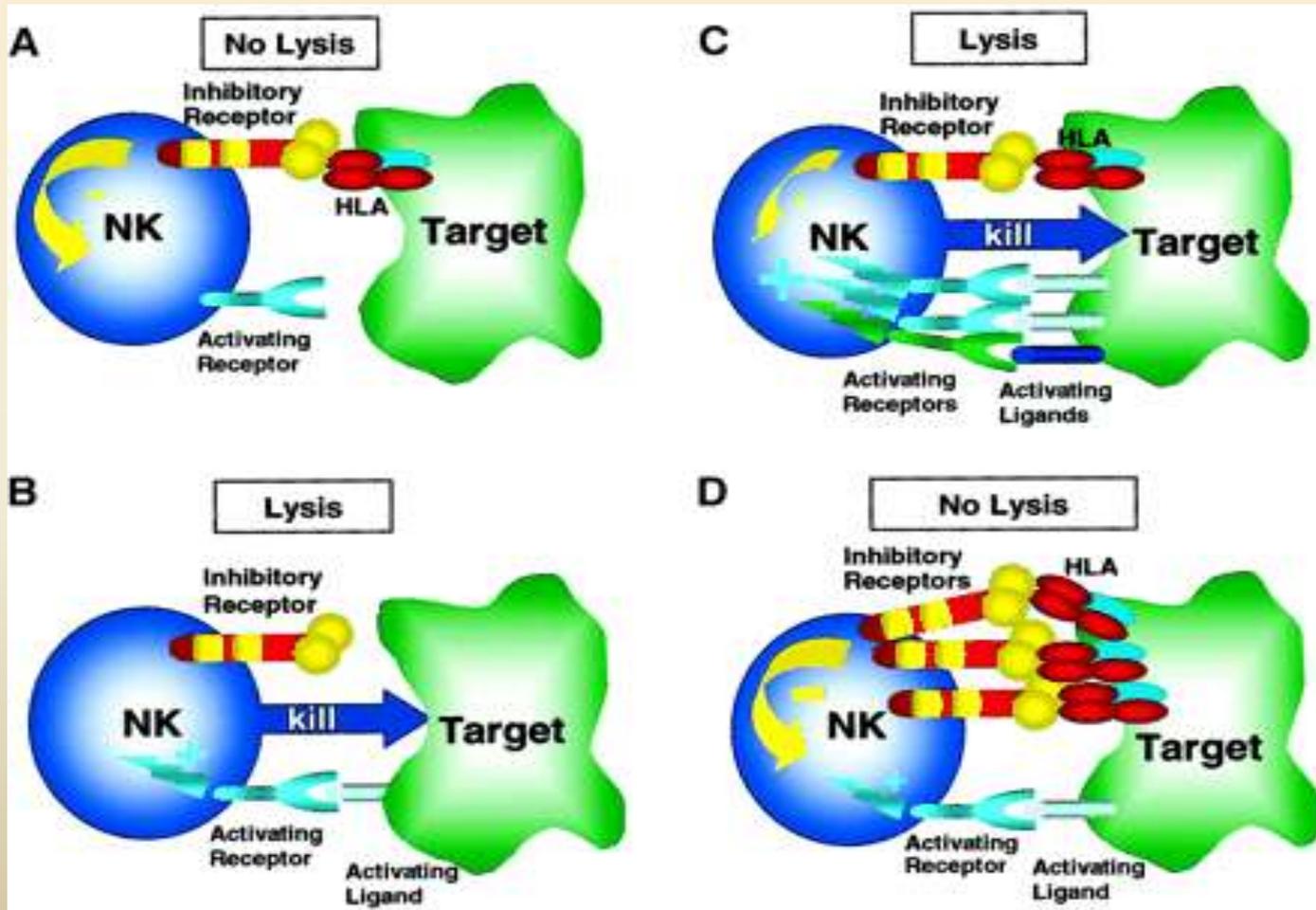
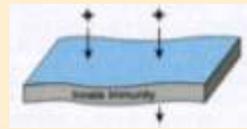


Quando un KIR inibitore lega HLA, si origina un signalling intracellulare (fosforilazione di ITIM) che inibisce l'attivazione della cellula NK. Viceversa, quando un KIR attivatore trova il proprio ligando, il segnale intracellulare (fosforilazione di ITAM) porta all'attivazione cellulare.

Poichè i KIR inibitori hanno una maggiore affinità per MHC-I, il contemporaneo legame di KIR attivatori e inibitori ha come risultato netto un segnale negativo, e non si attiva l'azione citotossica NK.

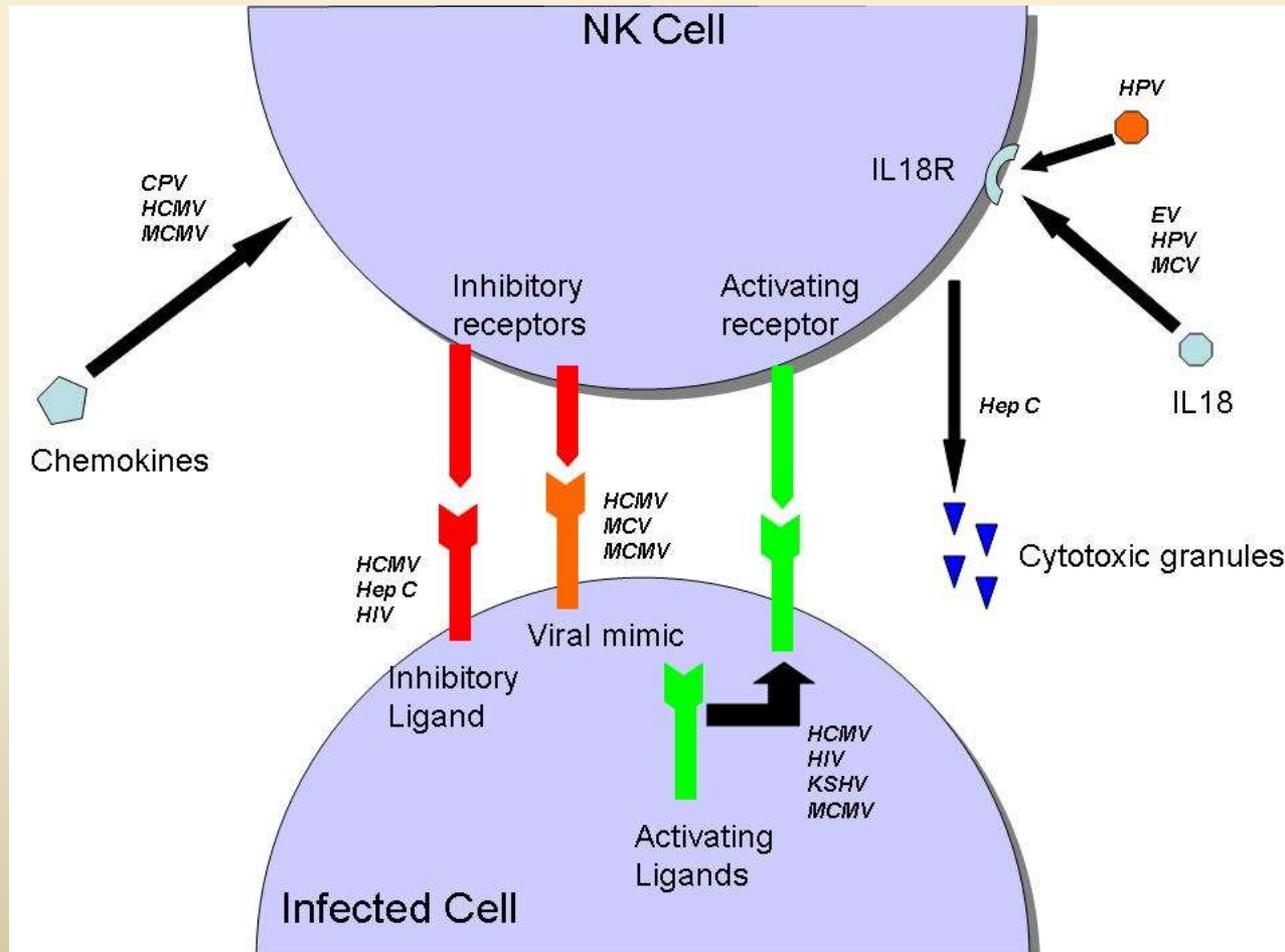


I recettori INIBITORI (inhibitory KIR, CD94/NKG2A) riconoscono e legano i propri ligandi (MHC class I molecules) e inducono un segnale INIBITORE del killing. I recettori ATTIVATORI (activating KIR, CD94/NKG2C, NKG2D) legano altri ligandi sulla superficie della cellula target e inducono attivazione delle NK e lisi cellulare.

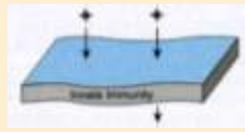


L'infezione virale spesso provoca down-regulation di MHC-1, con conseguente lisi delle cellule infettate.

I virus hanno evoluto vari sistemi per eludere questo meccanismo: produzione di chemiokine che inibiscono le NK, legame alla IL-18 (attivatore NK), mantenimento di HLA, produzione di molecole HLA-simili (mimicry), ecc



INTERFERONE



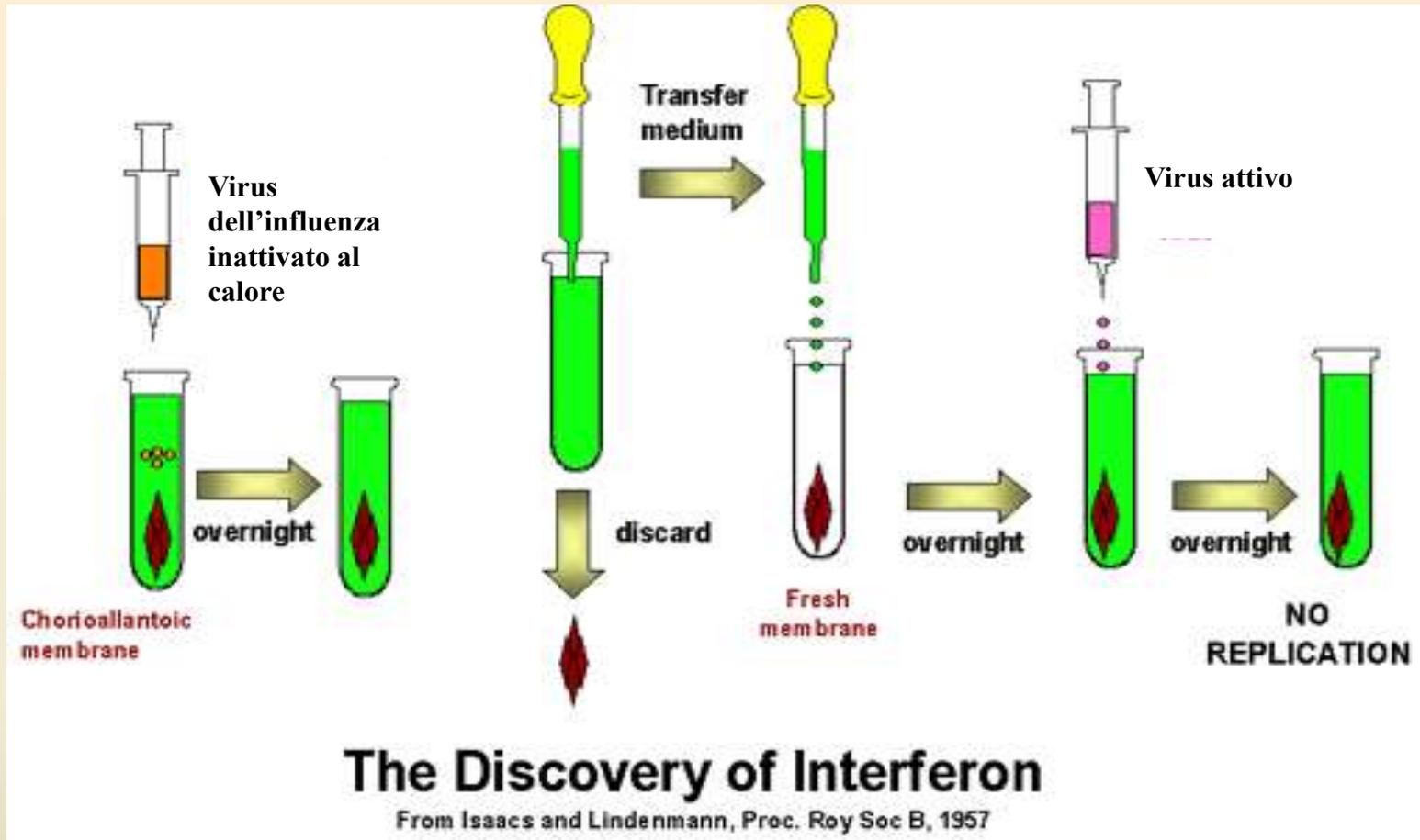
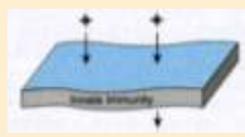
Descritto per primo da Isaac e Lindemann come fattore capace di “interferire” con la replicazione dei virus.

Componente fondamentale della risposta innata, è la prima difesa attiva nei confronti dell’infezione:

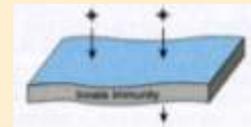
- 1. Attiva la difesa antivirale delle cellule bersaglio**
- 2. Attiva la risposta immunitaria**

L’IFN è una difesa molto importante ma contemporaneamente è la causa dei sintomi come malessere, mialgie, brividi e febbre (sintomi non specifici simil-influenzali) che si associano a molte infezioni virali.

Scoperta dell'interferone



Fattore che “interferisce” con la replicazione virale, costituisce la prima difesa attiva dell’organismo contro le infezioni virali, ha anche azione antitumorale

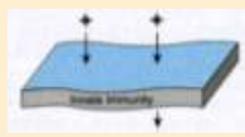


L'IFN è in realtà una Famiglia di proteine: α, β, γ

Caratteristiche della famiglia degli IFN:

1. Sono aspecifici
2. Specificità di specie
3. Sono proteine glicosilate
4. Non hanno azione diretta
5. Limitata persistenza

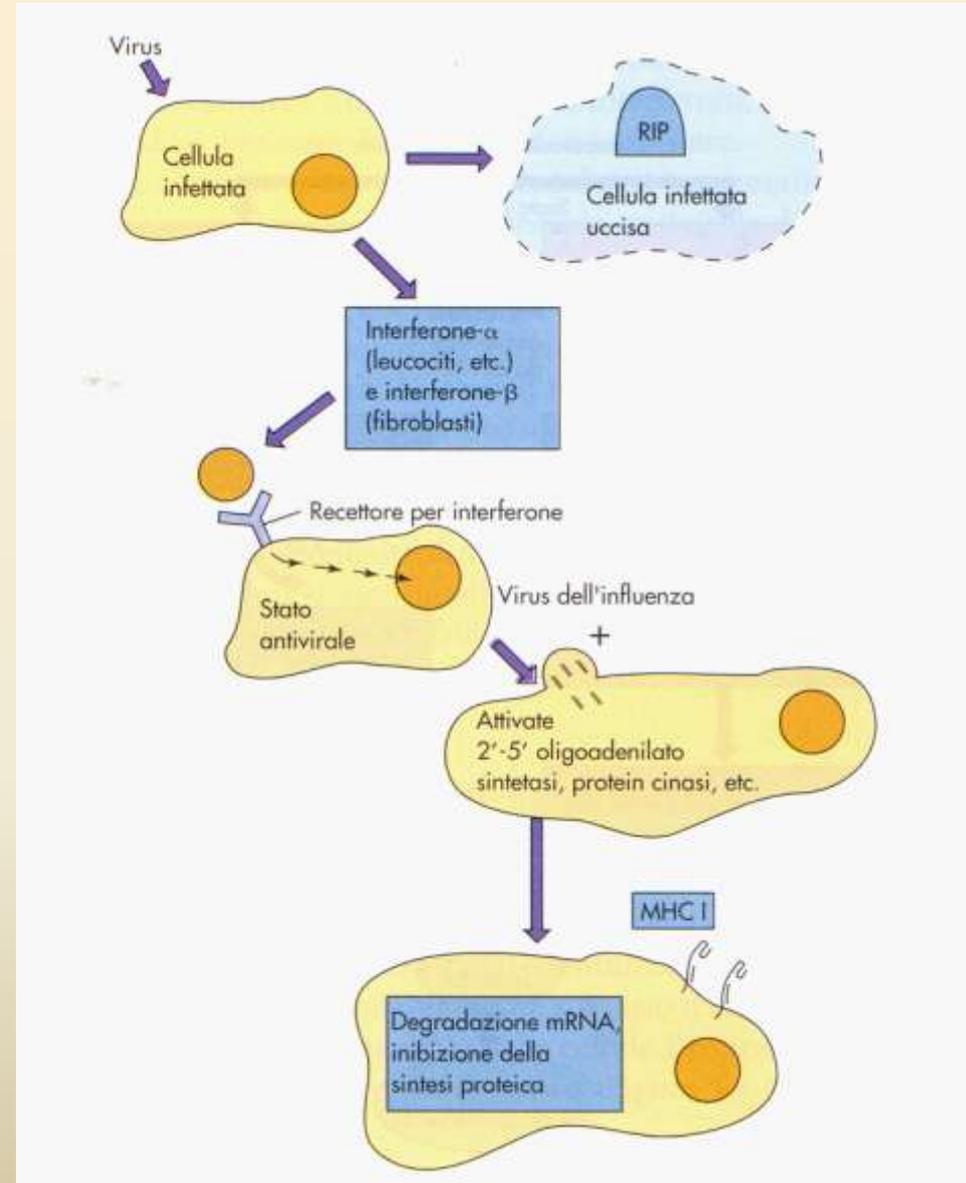
IFNs



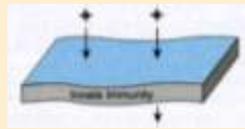
Proteine sintetizzate in risposta all'infezione virale (+ altri stimoli).

Hanno un **effetto TRANSIENTE**, anche in presenza continua dello stimolo induttore.

Gli IFNs non producono il loro effetto direttamente, e non agiscono sulle cellule già infettate, ma sono secreti e inducono le cellule NON INFETTATE a produrre una serie di proteine (**STATO ANTIVIRALE**) che a loro volta, se attivate dal contatto con il virus, causano gli effetti che hanno come risultato la protezione della cellula nei confronti dell'infezione



Caratteristiche dell'IFN



Gli IFNs sono **SPECIE-SPECIFICI**, ma **NON VIRUS-SPECIFICI**.
Effetto è limitato nel tempo (1-2 giorni).

RIQUADRO 14-6. Interferoni

Induzione

Acido ribonucleico a doppio filamento (dsRNA) (ad esempio, RNA intermedio virale)
Inibizione virale della sintesi proteica cellulare
Interazione dei virus con envelope con le cellule dendritiche immature

Meccanismo d'azione

Le cellule inizialmente infettate rilasciano interferone
L'interferone si lega ad uno specifico recettore sulla superficie di un'altra cellula
L'interferone induce uno "stato antivirale":
Sintesi di protein-chinasi R (PKR), 2'-5' oligoadenilato sintetasi, ribonucleasi L
L'infezione virale della cellula attiva questi enzimi
L'RNA messaggero (mRNA) viene degradato e la sintesi proteica inibita per bloccare la replicazione virale
Degradazione di RNA (2'-5' oligoadenilato sintasi e RNAsi L)
Inibizione dell'assemblaggio ribosomiale (PKR)
Inizio della risposte antivirali innate e immuni

Oltre che dai virus, gli IFNs sono indotti da:

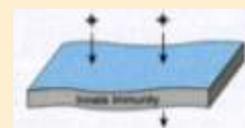
- Microrganismi intracellulari (batteri, miceti, protozoi)
- Attivatori dei TLRs o mitogeni
- Polimeri sintetici (polifosfati, ecc.)
- Antibiotici (es. kanamicina)
- vari composti sintetici a basso PM

Ci sono **due tipi di IFN**, con funzioni diverse:

Tipo 1, stimolato dall'infezione virale, viene prodotto da molti tipi cellulari all'inizio dell'infezione, è può essere indotto anche da batteri e parassiti; i più importanti sono IFN- α e IFN- β

Tipo 2, o IFN- γ (immune) fa parte sia delle risposte innate che adattative, è prodotto da linf T e NK, in risposta a citochine, soprattutto IL-12 (prodotta da M Φ e DC in seguito alla presentazione dell'Ag): attiva la risposta immunitaria e aumenta il riconoscimento della cellula infetta da parte dei linf T

Type	Cell source	Stimulus	Class	No. of subtypes	Chromosome
Type 1	All cells	Virus infection, dsRNA	α	12	9
			β	1	9
			ϵ	1	9
			κ	1	9
			ω	1	9
Type 2	T lymphocytes NK cells	IL-12 antigen	γ	1	12



Caratteristiche essenziali degli IFN

Differenti specie e caratteristiche essenziali degli Interferon (IFN).

Caratteristiche	Interferon		
	Alfa (IFN- α)	Beta (IFN- β)	Gamma (IFN- γ)
Altre denominazioni	IFN leucocitario IFN tipo I	IFN fibroblastico IFN tipo I	IFN immune IFN tipo II
N° di geni codificanti	> 20	1	1
Stabilità a pH 2.0	Stabile	Stabile	Labile
Induttori principali	Virus (RNA > DNA)	Virus (RNA > DNA)	Antigeni Mitogeni
Principali tipi di cellule produttrici	Leucociti (linfociti, monociti, cellule dendritiche circolanti ¹)	Fibroblasti Cellule epiteliali	Linfociti TH CD4

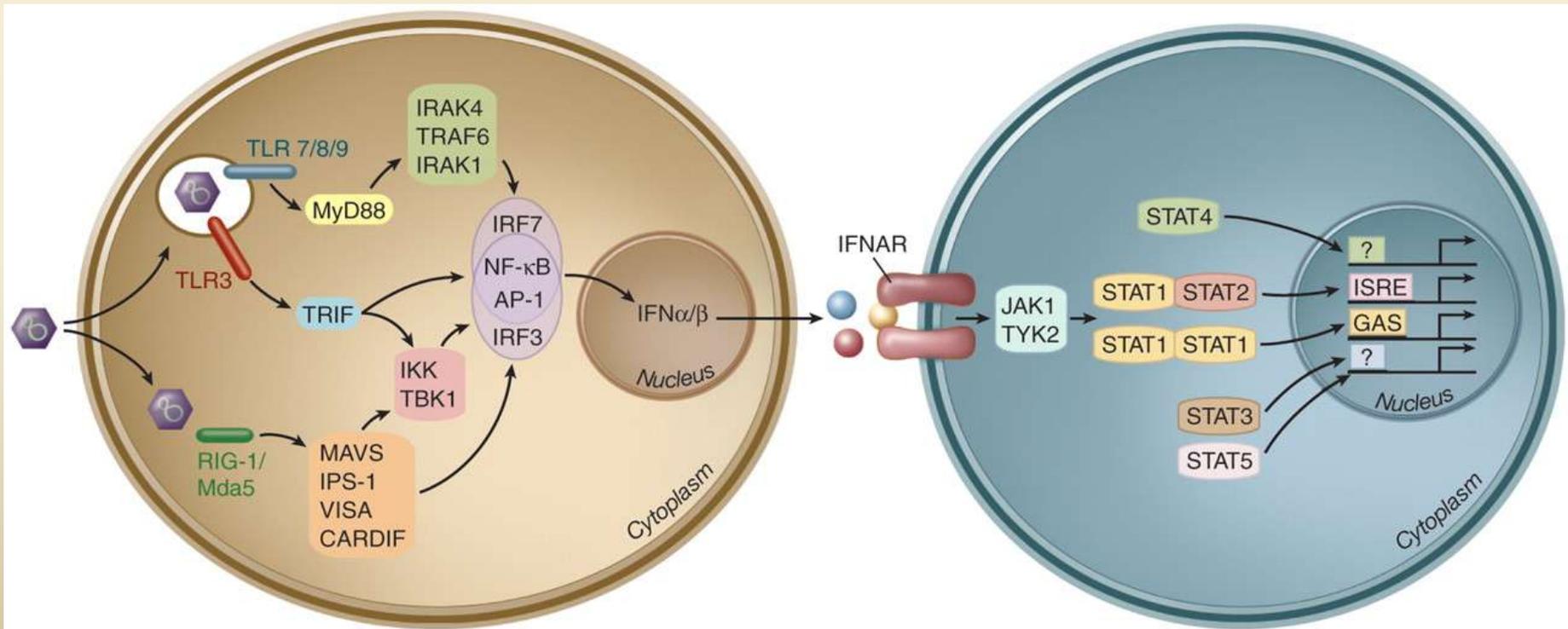
¹ Una quota di rilievo dell'IFN- α prodotto *in vivo* si deve ad alcune cellule dendritiche appartenenti ad un peculiare subset (cellule dendritiche plasmocitoidi) che, pur essendo relativamente rare (~0.1% delle cellule mononucleate del sangue periferico), producono IFN- α con una particolare efficienza (~10 pg IFN per cellula).

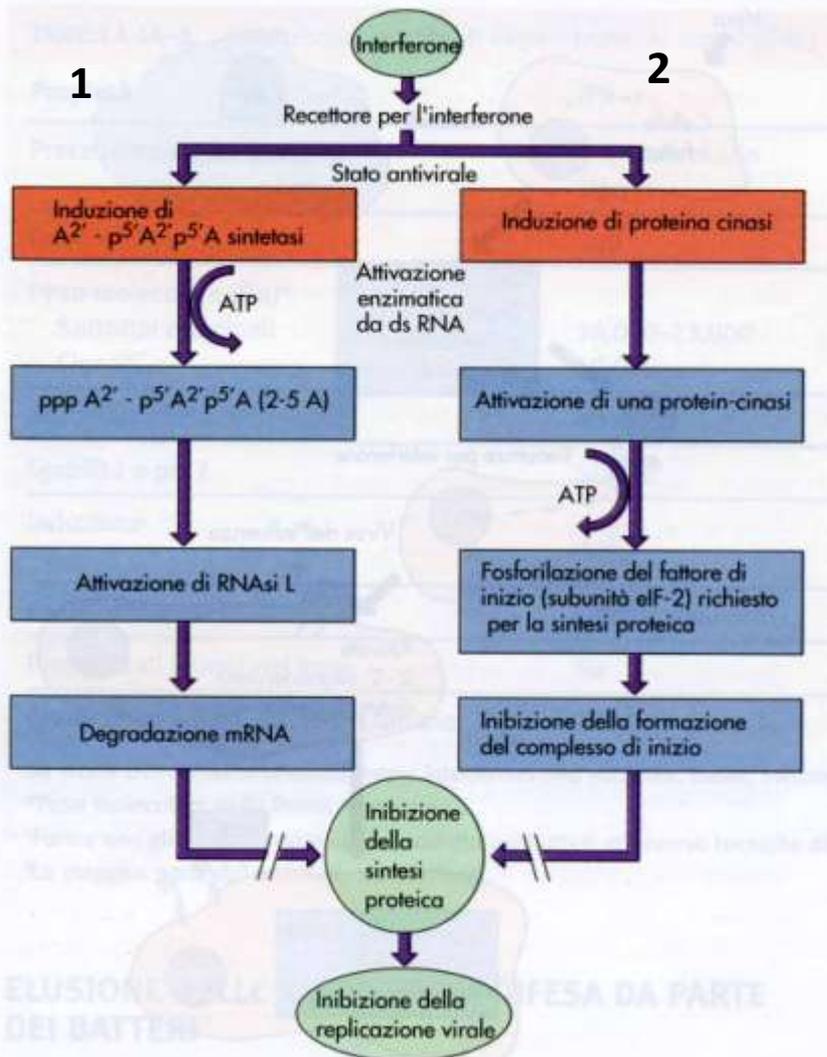
RISPOSTA a IFN Tipo1: pathway

Nelle cellule non infettate, il legame degli IFN ai propri recettori induce signalling attraverso l'attivazione del pathway **JAK/STAT**.

Il segnale intracellulare attiva una tirosinkinasi (JAK), la quale fosforila un attivatore trascrizionale (STAT).

STAT fosforilato migra nel nucleo dove promuove la trascrizione di specifici geni.





L'attivazione **JAK/STAT** da parte degli IFNs di tipo 1 induce oltre 100 proteine, con molti effetti finali.

I due principali effetti antivirali sono: l'induzione di **2'-5' oligoadenilato sintetasi** e di **protein chinasi R**.

1) La 2'-5' OA sintetizza delle adenine anomale, che attivano RNAsi che degradano l'mRNA.

2) La PKR fosforila e inattiva eIF-2, un importante fattore di inizio ribosomiale.

Viene così bloccata la SINTESI PROTEICA.

FIGURA 14-9. Le due vie principali di inibizione della sintesi proteica virale da parte dell'interferone. Un meccanismo coinvolge l'induzione di una particolare polimerasi (2'-5' oligoadenilato sintetasi [2-5A]) che è attivata da RNA a doppia elica (ds RNA). L'enzima attivato sintetizza un adenin-nucleotide anomalo con un legame 2',5'-fosfodiesterico. L'oligomero attiva una RNasi L che degrada l'RNA messaggero (mRNA). L'altro meccanismo coinvolge l'induzione di una protein-chinasi (PKR) R che inattiva il fattore di iniziazione eucariotico (eIF-2 α) mediante fosforilazione di una delle subunità per prevenire l'inizio della sintesi proteica. ATP, Adenosina trifosfato.

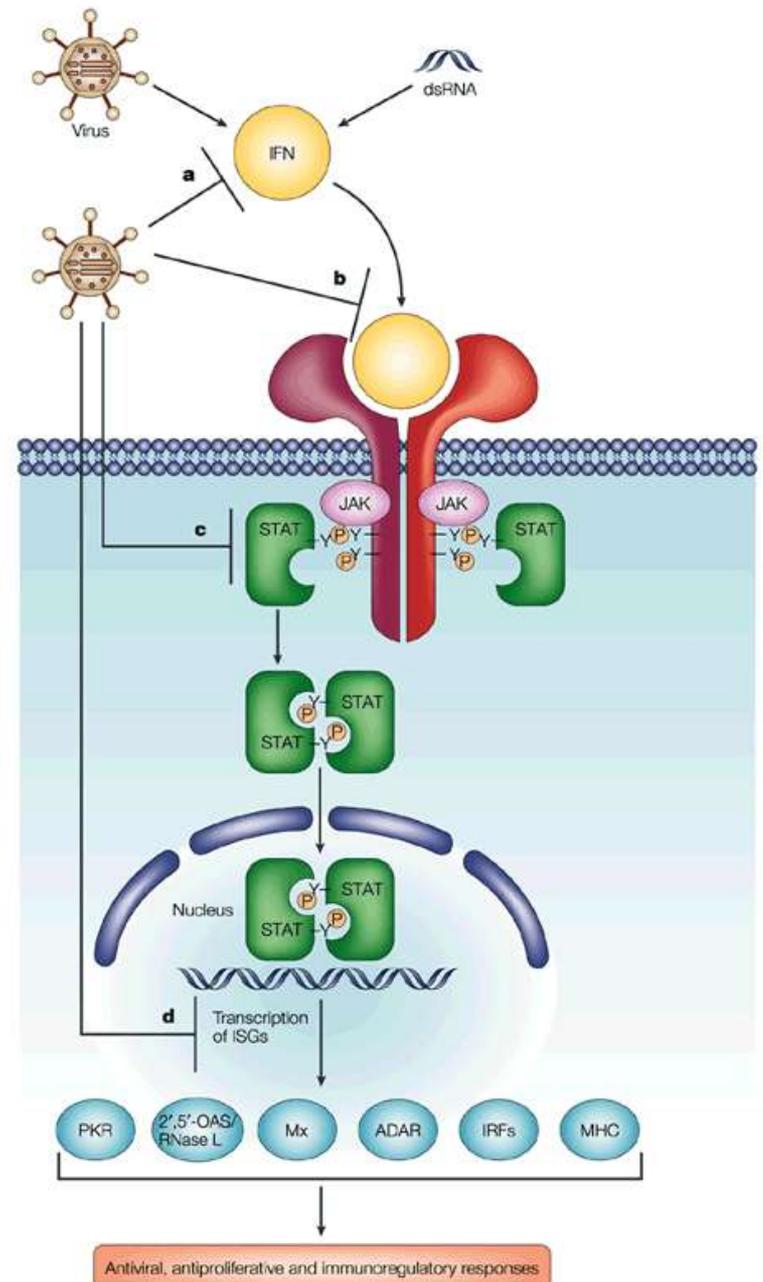
L'attivazione del pathway **JAK/STAT** induce molti altri ISGs (IFN regulated genes), tra cui:

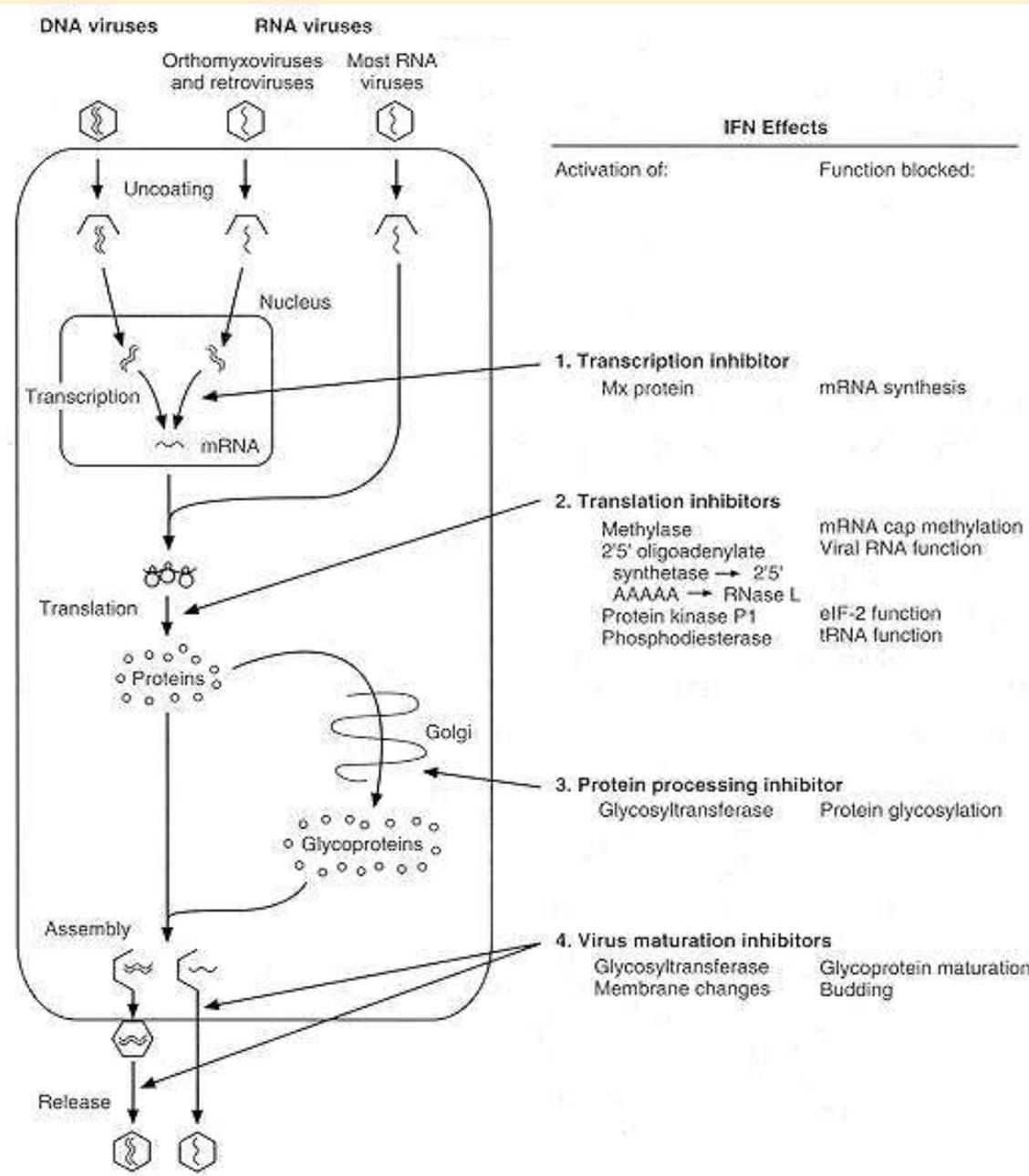
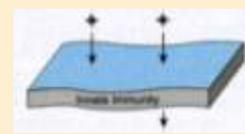
➤ **proteine Mx**: GTPasi che interferiscono con la replicazione virale in stadi diversi a seconda del virus (Es. v. influenza: Mx inibisce il trasporto nucleare del complesso ribonucleoproteico e la trascrizione)

➤ **ADAR** (RNA-specific adenosine deaminase)

➤ **famiglia di geni** (ISG56: P56, P54, P60, ecc.) che inibiscono le funzioni di eIF-3, un importante fattore di inizio della traduzione

➤ aumento espressione **MHC -I**, con incremento della capacità della cellule di presentare l'Ag, e quindi maggiore attività T citotossica.





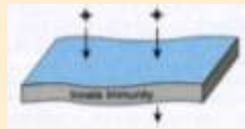
Meccanismi di blocco/inibizione della replicazione virale da parte di alcuni fattori indotti da IFN Tipo 1.

➤ **Proteine Mx:** inibizione trascrizione

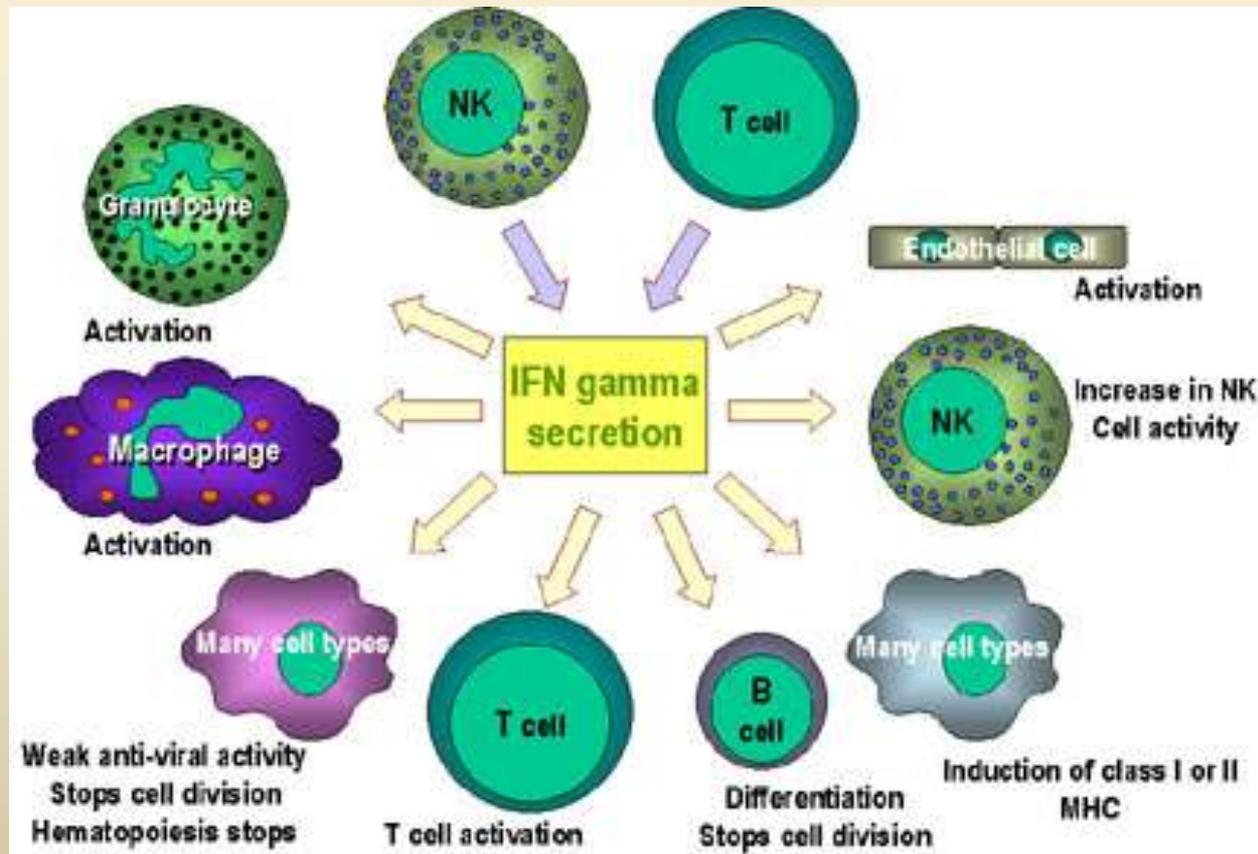
➤ **2'5'-OA, fosfodiesterasi, metilasi, PKP1:** inibizione traduzione

➤ **Glicosiltransferasi:** inibizione glicosilazione proteine. Inibizione maturazione

IFN- γ (IMMUNE)

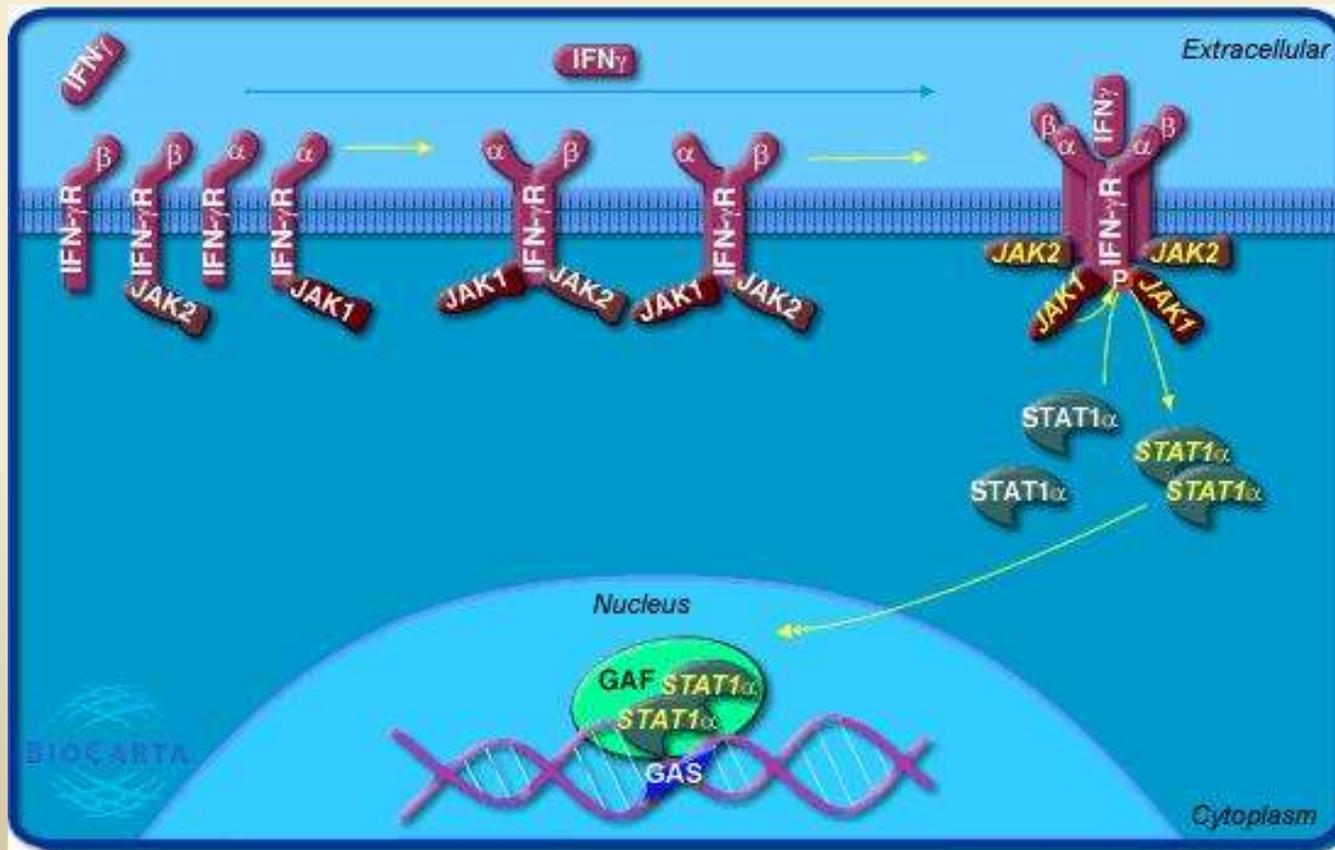


Secreto da cellule Th1 CD4+, cellule Th0, CTL CD8+ e NK attivate.
Modesto induttore di attività antivirale, ma potenzia diversi meccanismi dell'immunità **CELLULO-MEDIATA**, inclusa l'attività antiproliferativa tumorale.
Attiva le NK, favorisce la fagocitosi e la produzione di CK, e regola la proliferazione, differenziazione e risposta dei diversi subset di linfociti.

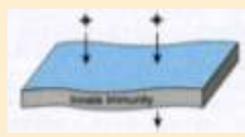


RISPOSTA a IFN γ : pathway

In seguito al legame di IFN al suo recettore, si attiva un signalling intracellulare mediato dalla attivazione del pathway **JAK/STAT**, che porta alla attivazione trascrizionale dei geni regolati.



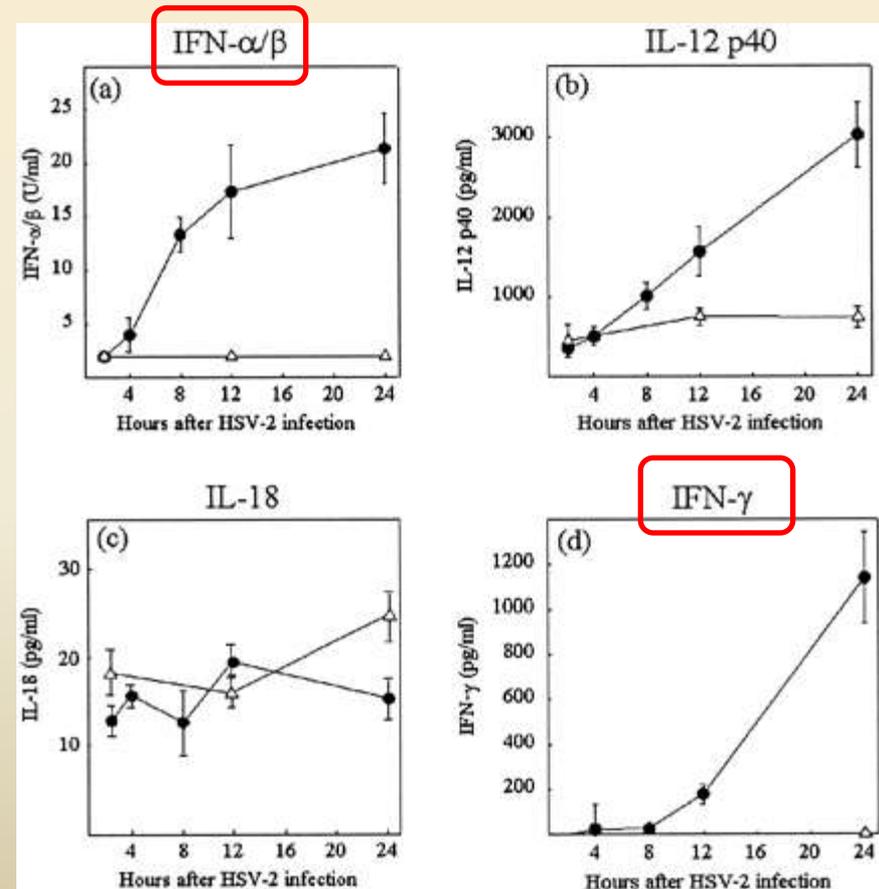
Azione sequenziale degli IFNs



1. **IFN- β** , prodotto da cellule epiteliali e fibroblasti, diffonde scarsamente dalla sede di produzione, e raggiunge facilmente alte concentrazioni locali, efficaci nel proteggere le cellule vicine a quella infettata.

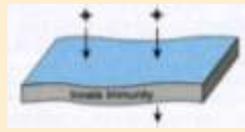
2. Se l'infezione progredisce e raggiunge il circolo, può venire in contatto con i diversi tipi leucocitari che producono **IFN- α** : è molto diffusibile, raggiunge tutti gli organi e contrasta efficacemente la diffusione dell'infezione.

3. Continuando l'infezione, si attiva la risposta adattativa con la produzione di **IFN- γ** , che potenzia la risposta cellulo-mediata.

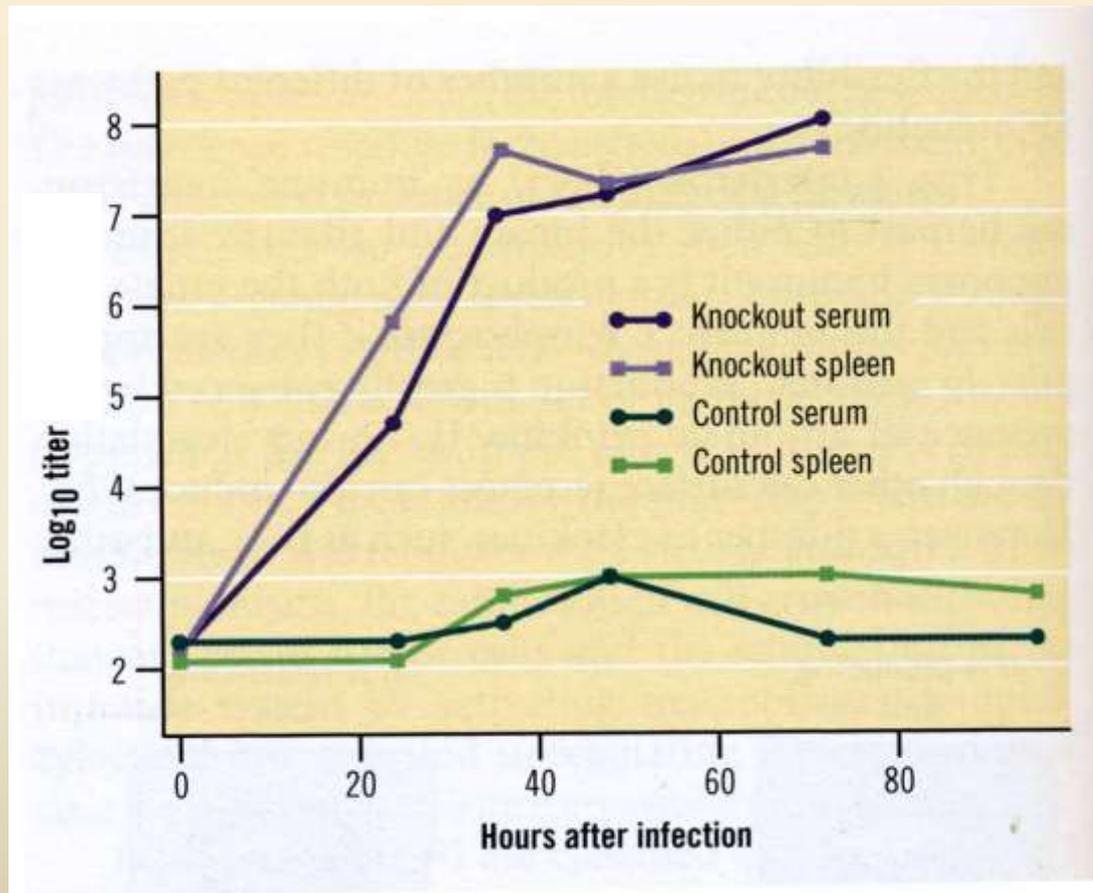


Esperimento in topi infettati con HSV-2

Importanza dell'IFN

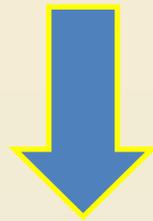


Topi knockout senza il recettore per IFN Tipo 1 sono estremamente suscettibili all'infezione da virus.

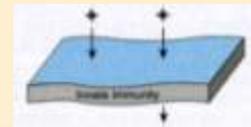


I topi sono stati infettati con bassa carica (100 PFU) di virus Sindbis.

**IMMUNITA' INNATA:
ALTRI MECCANISMI DI
INTERFERENZA**



Interferenza da RNA: RNAi



RNA interference: RNAi

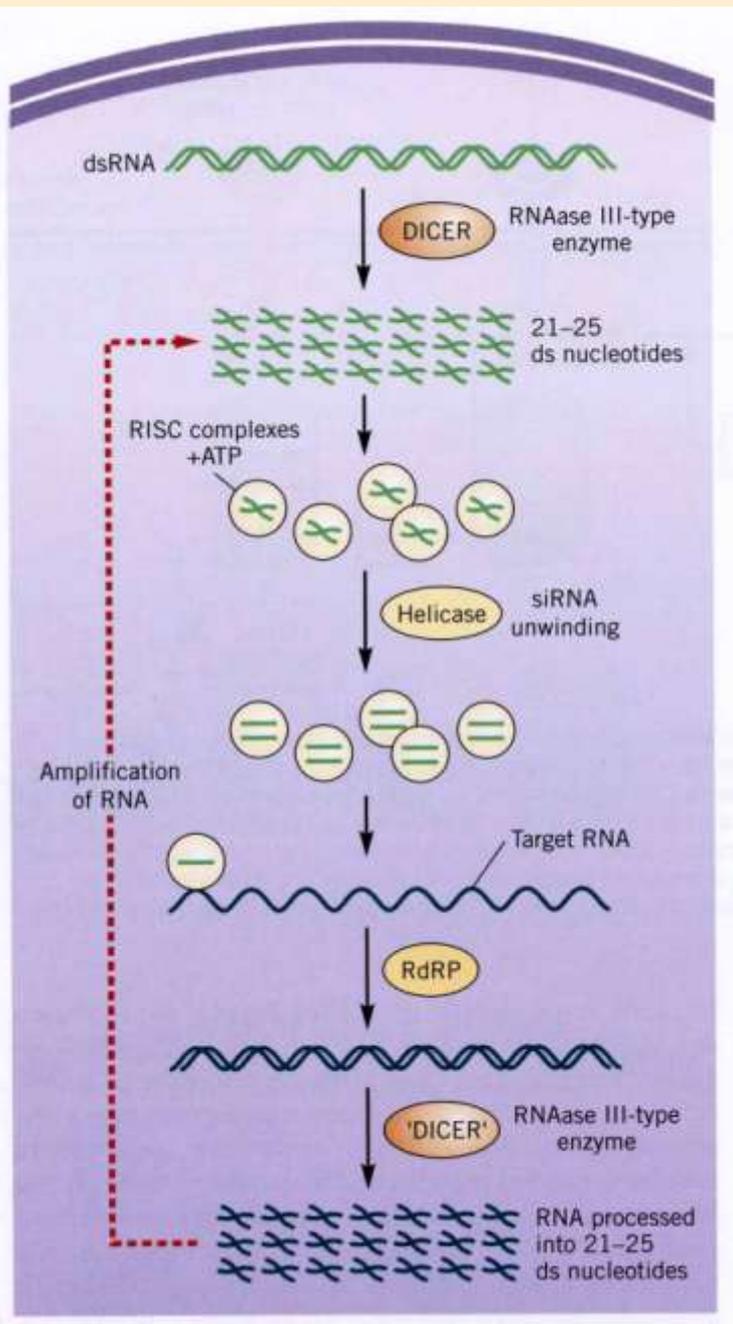
Il **dsRNA** può provocare la degradazione degli mRNA con sequenze nucleotidiche omologhe.

Le cellule eucariote hanno infatti una **RNAasi III** (**DICER**) che taglia il dsRNA in corti oligonucleotidi di 19-25 basi.

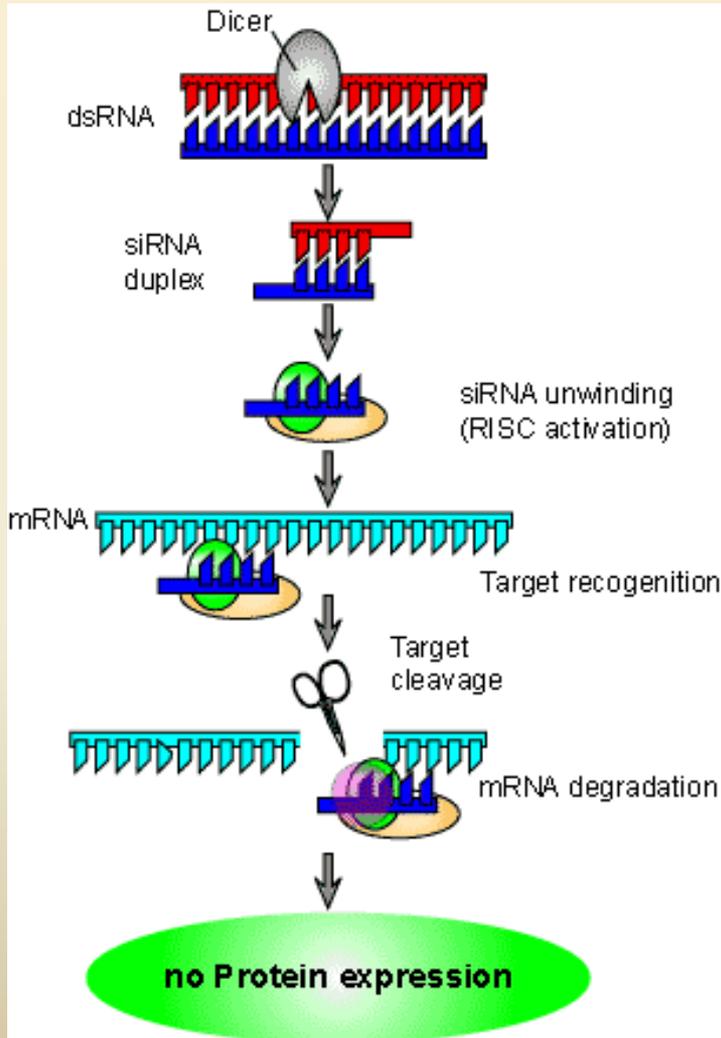
Gli oligo prodotti agiscono come small interfering RNAs (siRNAs).

I siRNAs vengono srotolati e ridotti a ssRNA, si legano all'RNA virale **OMOLOGO**, viene sintetizzato dsRNA, che viene degradato.

L'applicazione dei siRNA mediante biotecnologia è attualmente molto usata per silenziare geni eucariotici.



Scoperta dell'RNAi



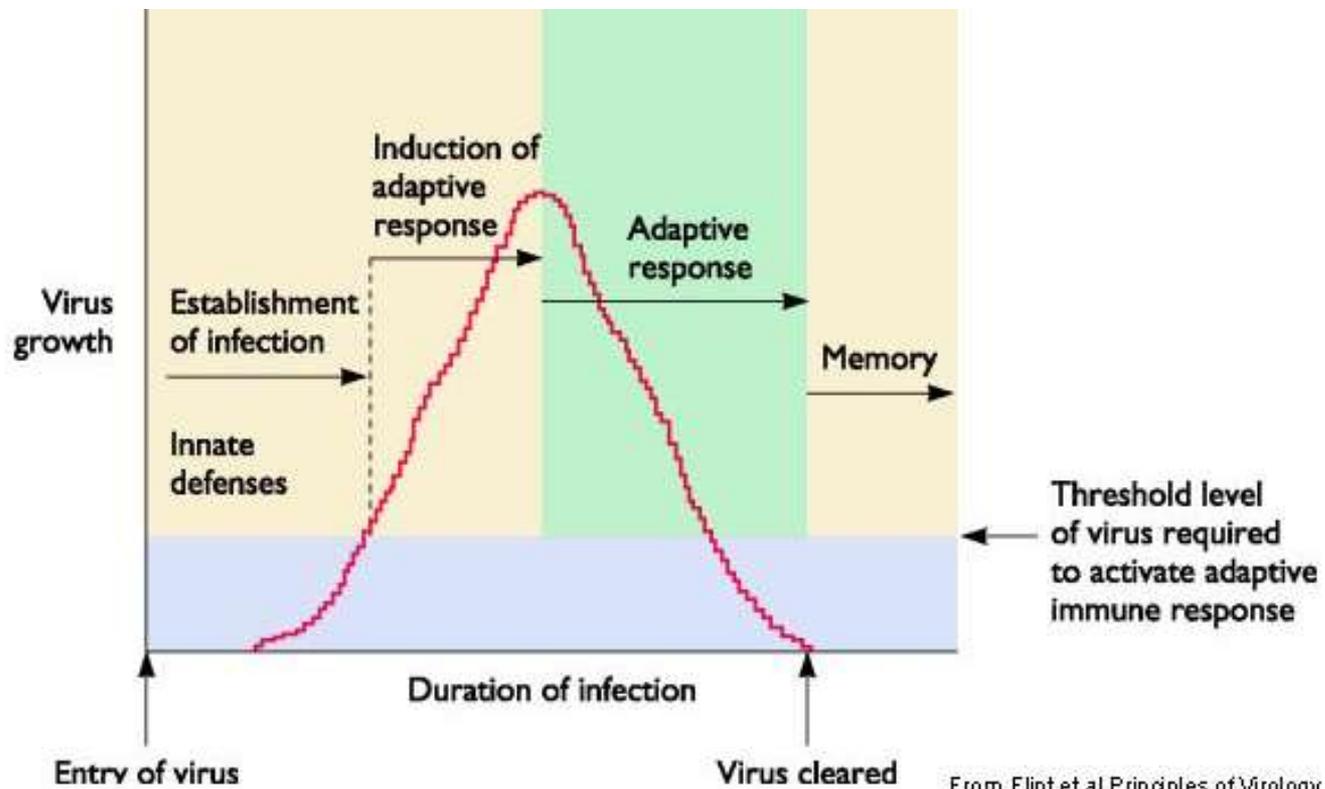
Nel 1998 gli americani Andrew Fire e Craig C. Mello iniettarono dsRNA all'interno di *Caenorhabditis elegans*, un verme nematode, individuando un potente effetto di silenziamento. Il termine **RNA interference** fu coniato in questa occasione.

Nel 2006 Fire e Mello hanno vinto il premio Nobel per i loro lavori nel campo della RNAi.

DICER = lett. "produttore di cubetti"
RISC = RNA Induced Silencing Complex



Decorso di una tipica infezione virale acuta e sequenza temporale delle risposte indotte

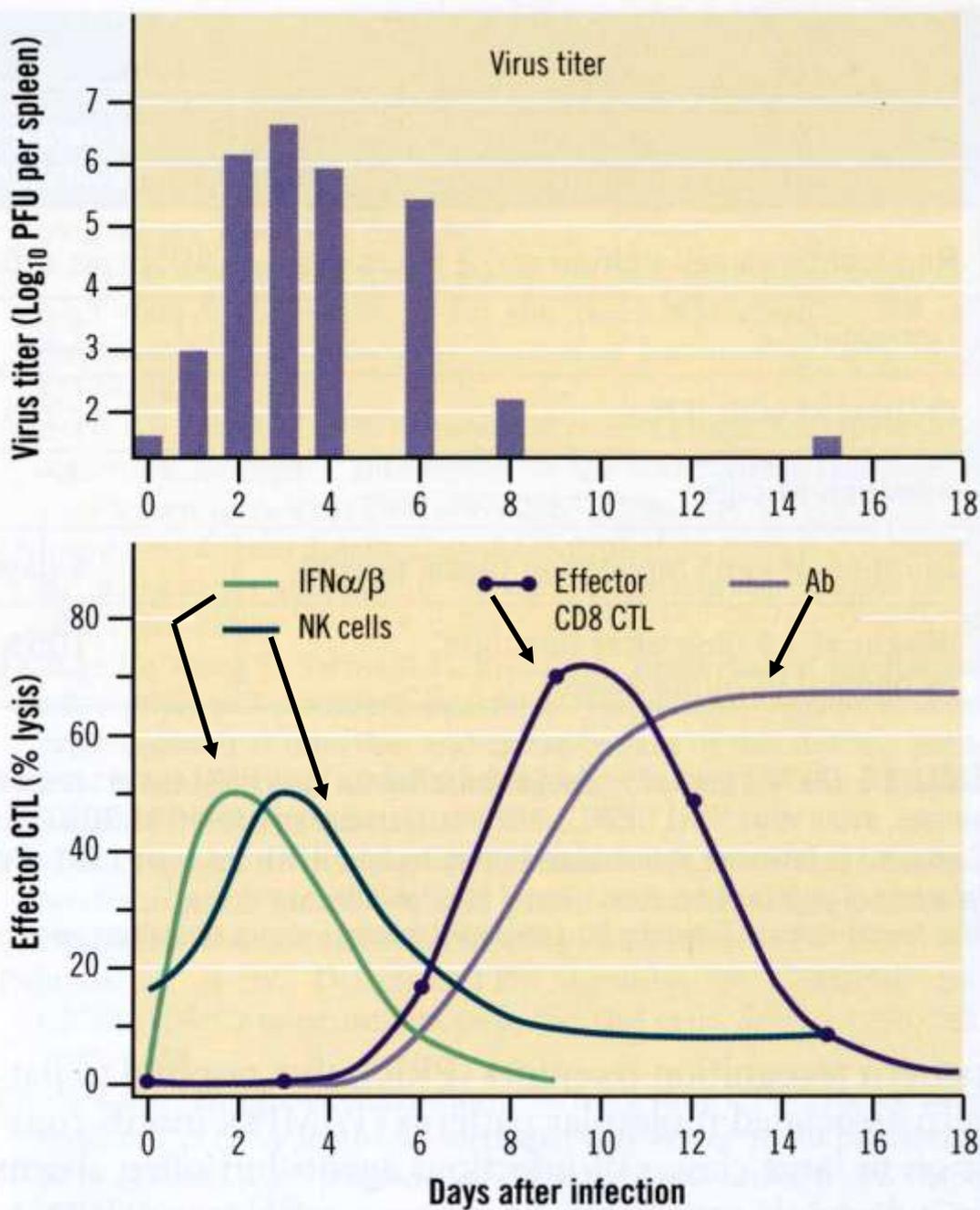


Cinetica delle risposte all'infezione virale (Es: CMLV)

Le risposte **INNATE** non specifiche precedono l'induzione delle risposte **ADATTATIVE** antigenespecifiche.

Le due risposte agiscono in modo sinergico e complementare.

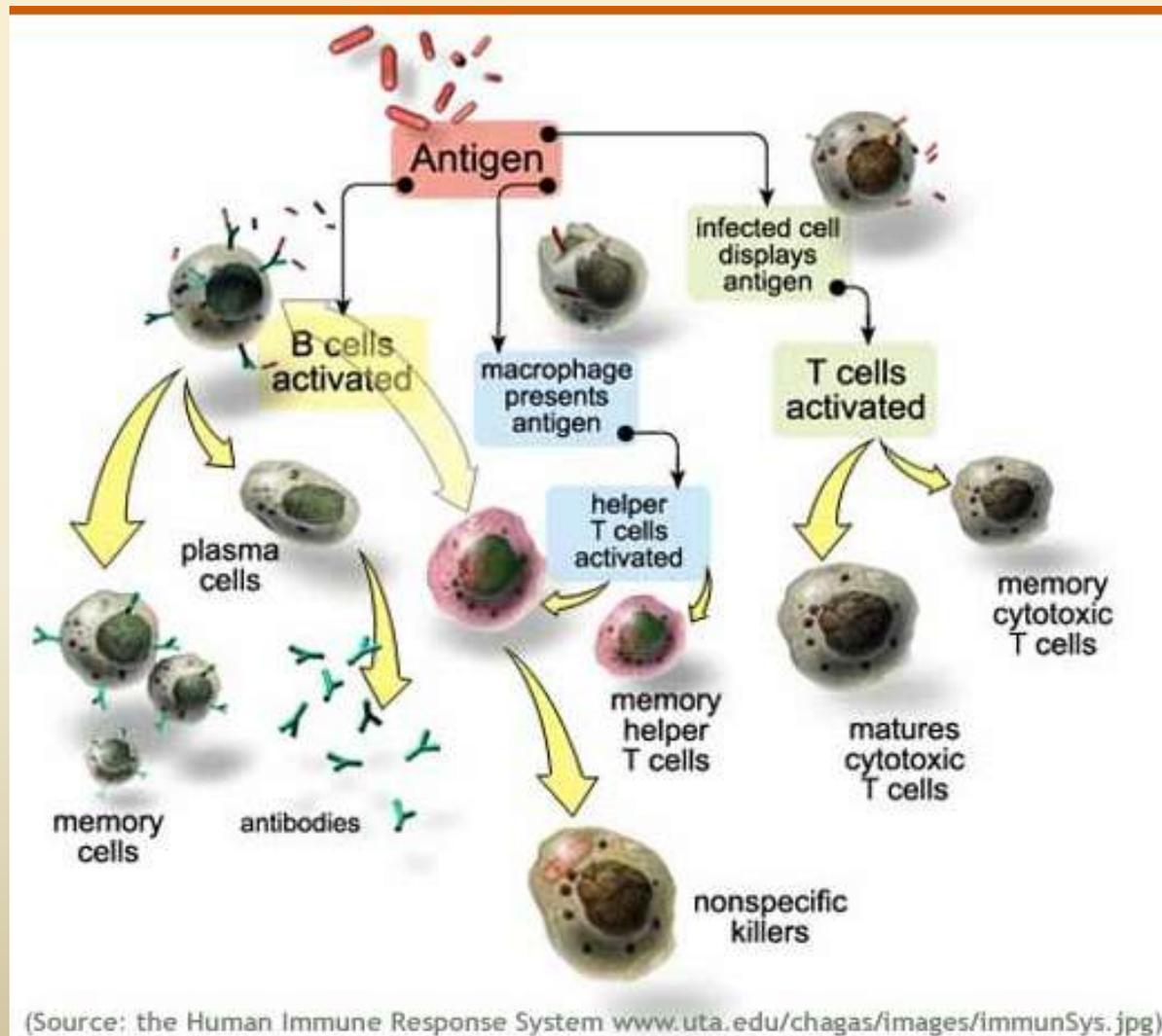
Il diagramma mostra la sequenza della comparsa di **IFN**, attività **NK**, **CTL** virus-specifici e **anticorpi** (infezione col virus murino della coriomeningite linfocitaria).

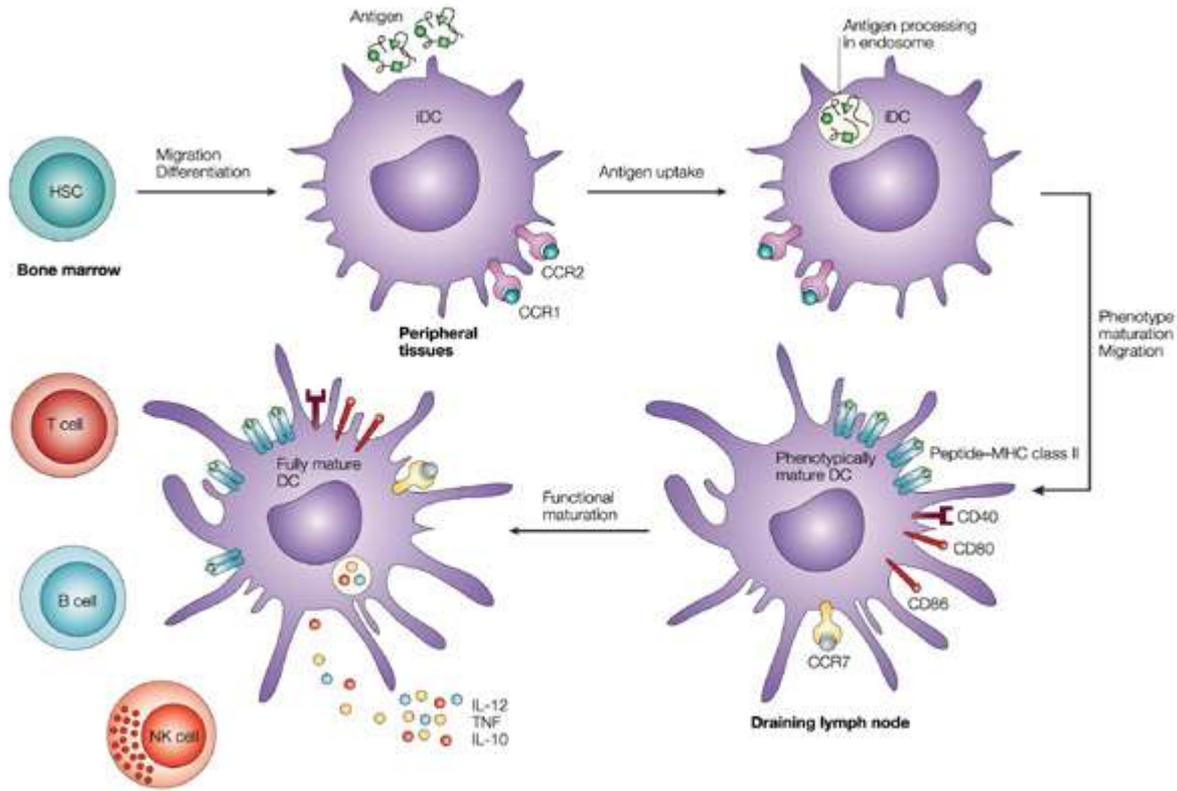


IMMUNITA' ADATTATIVA

Comprende risposta **UMORALE** e **CELLULO-MEDIATA**.

Le APC/DCs "direzionano" il tipo di risposta, interagendo con i linfociti Th.





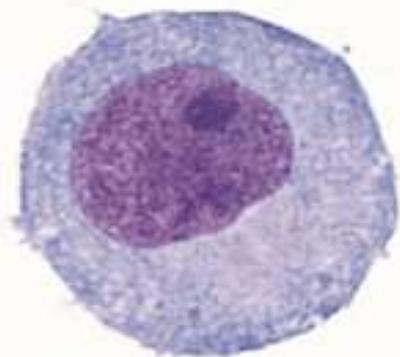
Le **DC immature** incontrano e internalizzano Ag → processing mediante la via endosomiale.

Nell'Ag processing le DC migrano al linfonodo drenante e **maturano** fenotipicamente, esprimendo **CD40**, **CD80**, **CD86**, **MHC-II** e **CCR7** (CC-chemokine receptor 7).

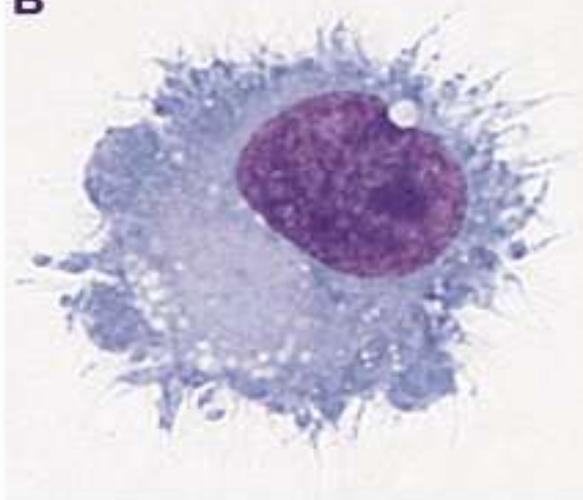
Gli Ag vengono poi presentati in un pathway MHC-II ristretto ai linfociti.

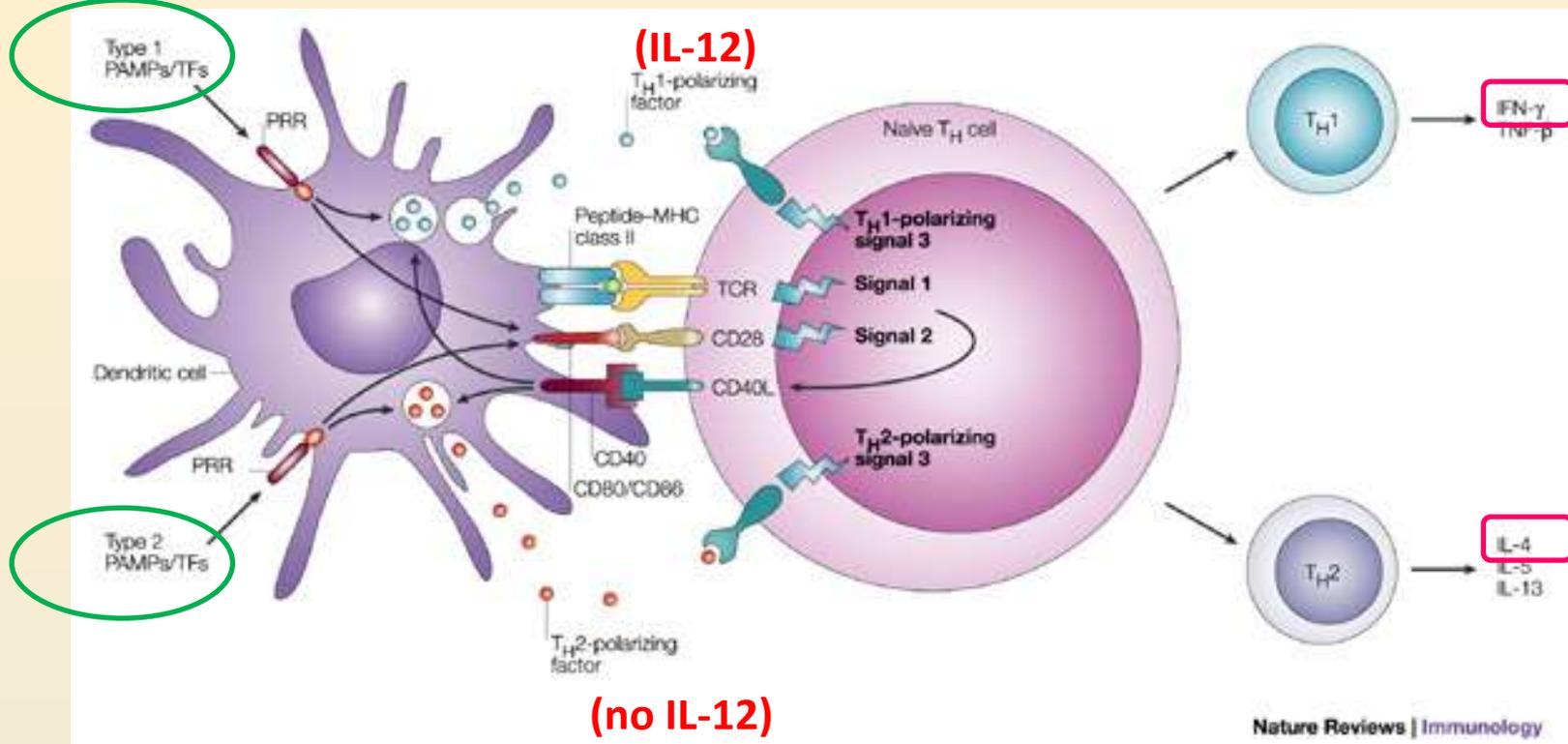
A seconda della natura dell'Ag, le DC producono CK, come **IL-12** e **TNF**, che **POLARIZZANO LA RISPOSTA**.

A



B

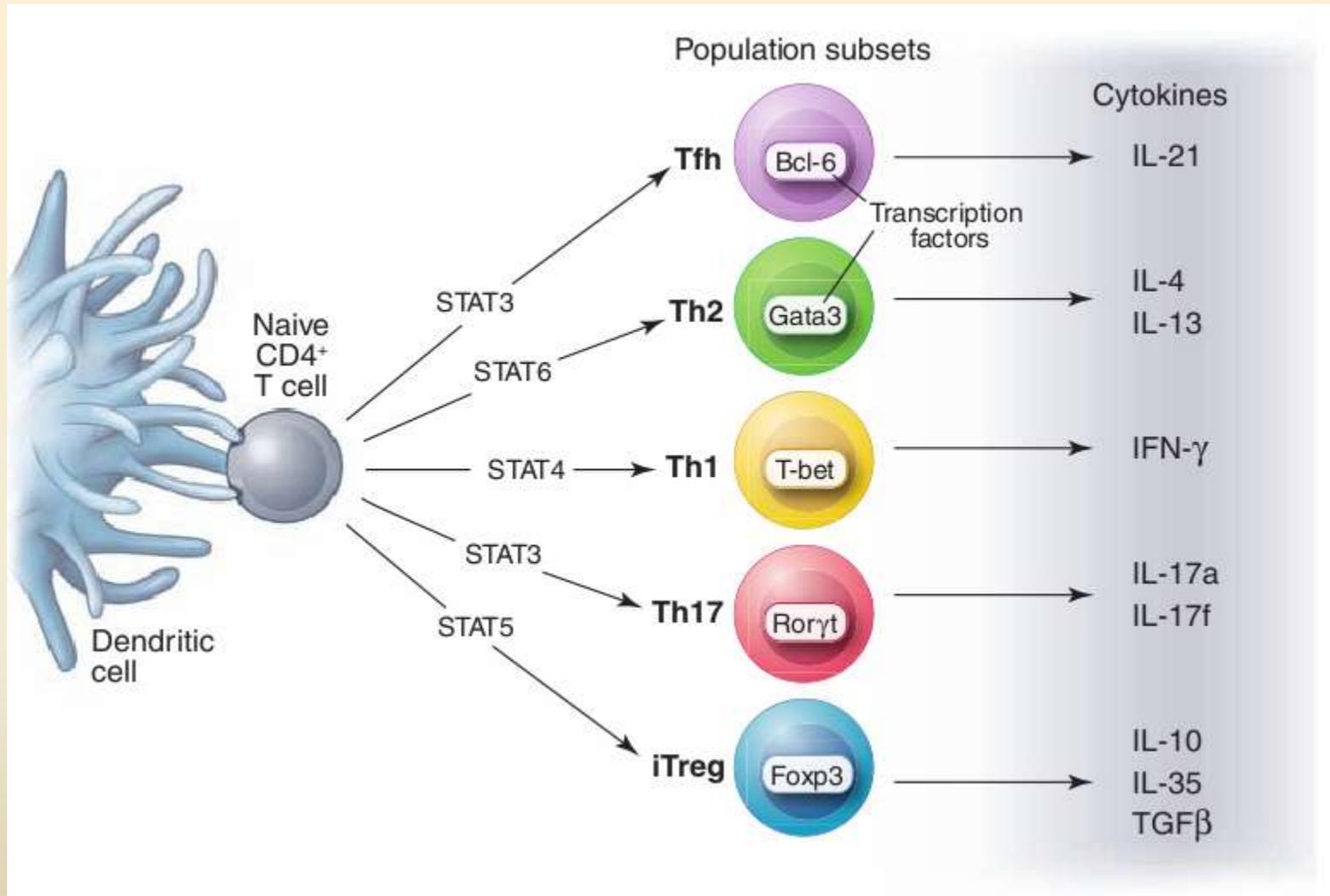




Per interagire con i linf Th, la APC usa **3 segnali**: 1) **segnale Ag-specifico**: Ag-MHC II interagisce con lo specifico TCR; 2) **segnale costimolatorio**, CD28 (linf T) si lega a CD80/CD86 (espressi sulle DC mature in seguito a stimolazione dei TLR); 3) **segnale “polarizzante”**, mediato da fattori solubili o di membrana, come IL-12 e CCL2 (CC-chemokine ligand 2), che promuovono lo sviluppo rispettivamente di cellule T_H1 o T_H2.

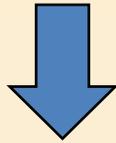
Il tipo di segnale polarizzante dipende dal tipo di PAMPs: i PAMPs possono essere definiti di tipo 1 o tipo 2 a seconda che inducano le DC ad essere T_H1-polarizing o T_H2-polarizing. Il profilo dei fattori polarizzanti è indirizzato dai PAMPs, ma la sua espressione ottimale richiede anche il legame del CD40 (DC) al CD40L (CD40 ligand) espresso sulle cellule T dopo l’attivazione da parte dei segnali 1 e 2.

In realtà la situazione è più complessa, e le popolazioni di cellule T che possono essere indotte sono più numerose...

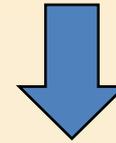


NB-Alcuni segnali costimolatori possono portare a signalling negativo, stimolando Treg e inducendo anergia cellulare, perdita di capacità proliferativa e riduzione di produzione di CK.

Th 1



Th 2



TIPO DI

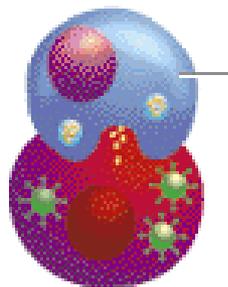
RISPOSTA IMMUNITARIA ADATTATIVA

IMMUNITA' MEDIATA DA CELLULE



Cellula del sistema immunitario: linfocita T-helper

Linfociti T-helper: stimolano la formazione di nuove cellule di linfociti T-killer



Linfocita T-killer: produce molecole capaci di disgregare e neutralizzare le cellule infettate dai patogeni

AGENTE PATOGENO



Antigene

Virus
Batteri
Protozoi
Funghi

Cellule cancerogene
Cellule di tessuti trapiantati
Cellule infettate da virus

IMMUNITA' UMORALE

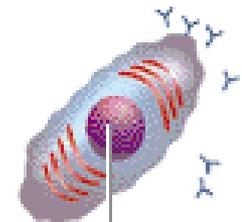


Cellula del sistema immunitario: linfocita B

I linfociti B si differenziano

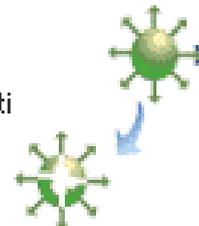


Cellula della memoria: è attivata in successive esposizioni al patogeno



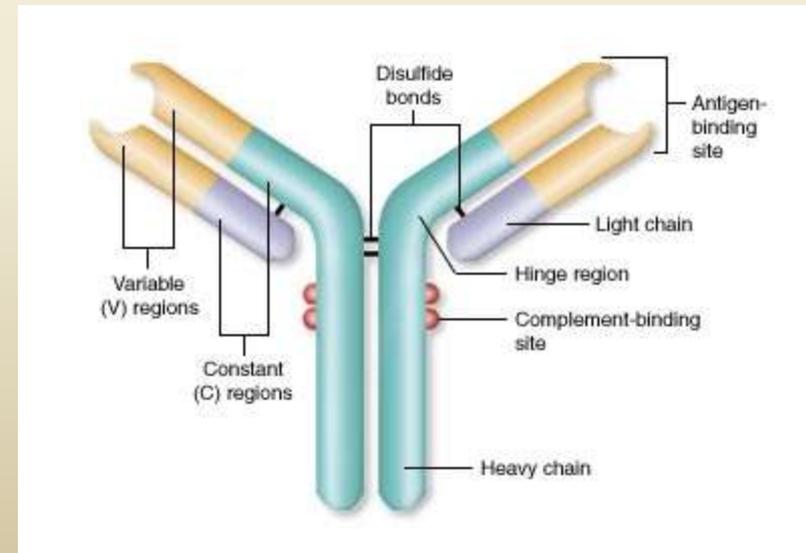
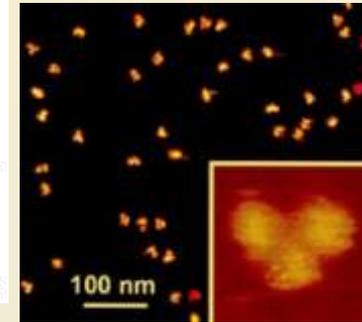
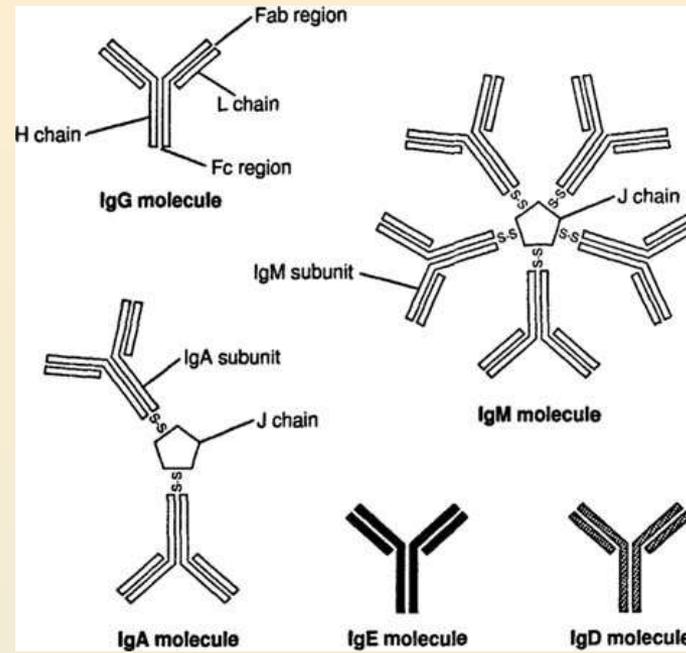
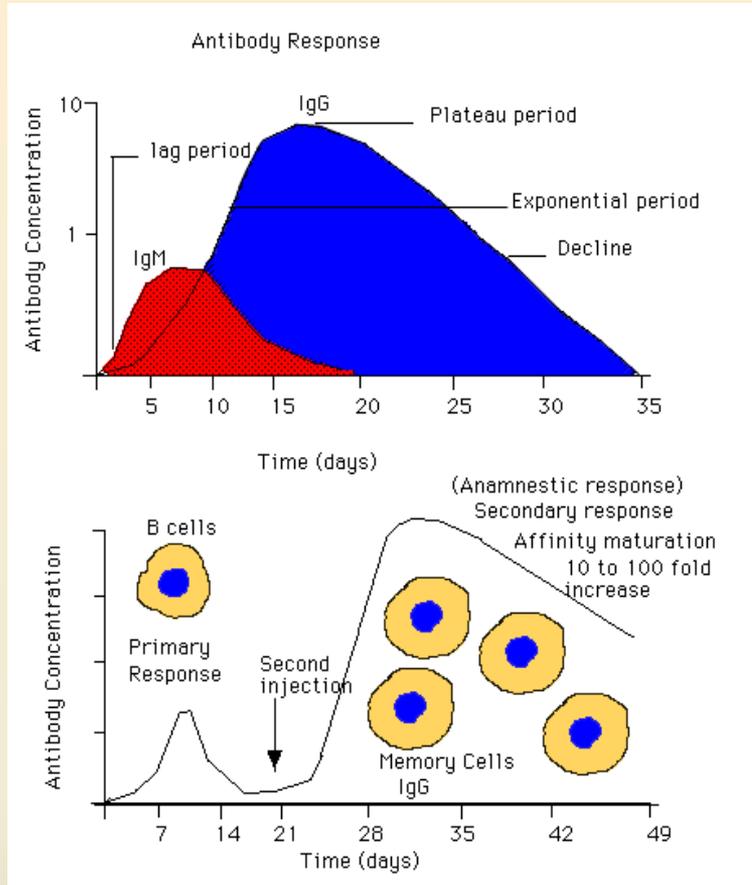
Plasmacellula: in presenza dell'agente patogeno secerne anticorpi

Anticorpi o immunoglobuline



Anticorpi: riconoscono gli antigeni, vi si legano, e disgregano l'agente patogeno

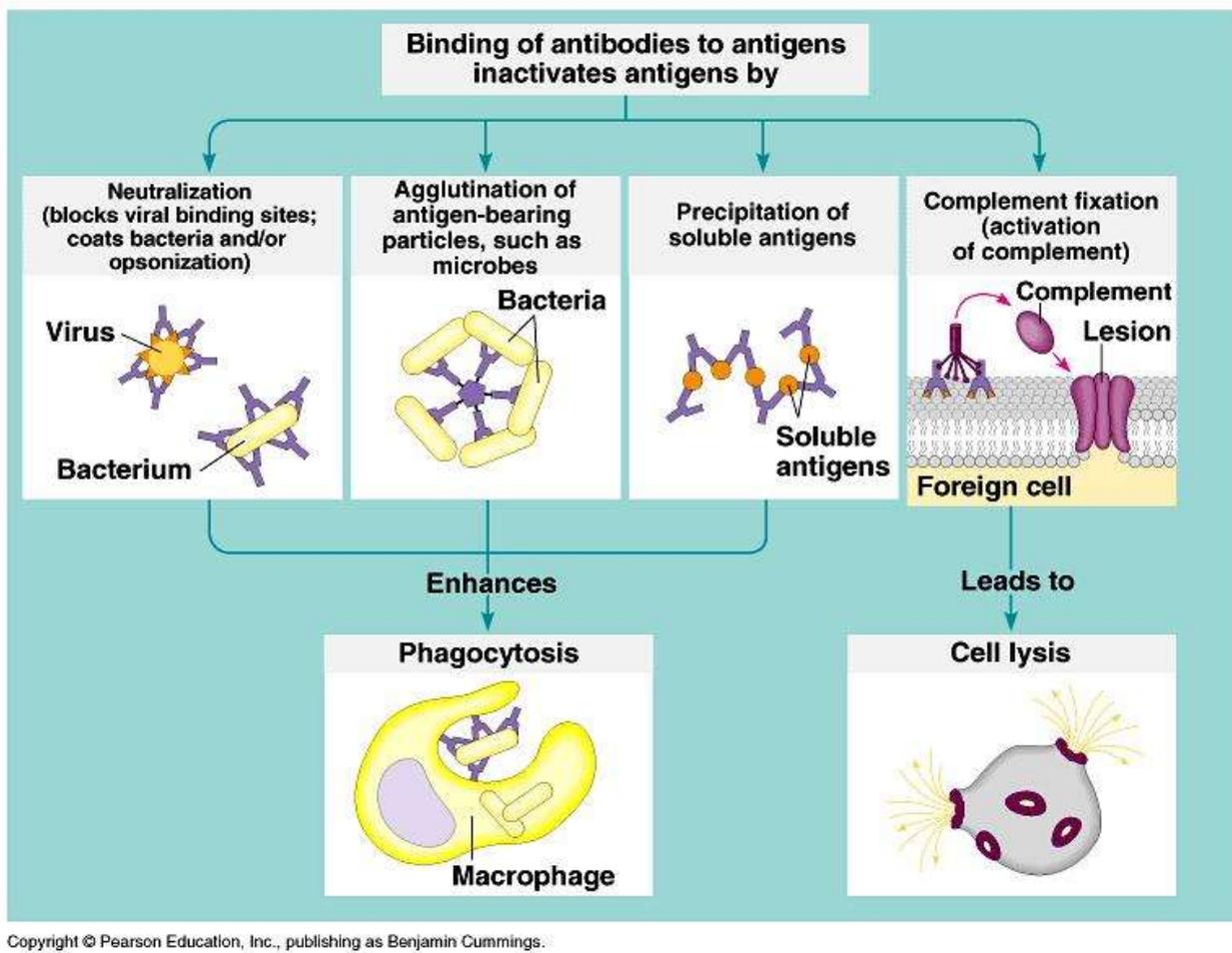
Immunità Adattativa UMORALE



Risposta PRIMARIA e SECONDARIA.

Immunità Adattativa UMORALE

Gli anticorpi antivirali specifici hanno diverse azioni:



❖ **Ab NEUTRALIZZANTI**: legano il virione e lo “neutralizzano” rendendolo non infettante (è impedito l’assorbimento ai recettori) (NB: non tutti gli anticorpi sono neutralizzanti, e non sempre l’attività neutralizzante in vivo correla con quella in vivo)

❖ **Legano il complemento**, attivando la cascata e causando la lisi del virione

❖ **Legano i recettori Fc** presenti sui macrofagi, aumentando la fagocitosi dei complessi Ag/Ab

❖ **Mediano la ADCC** (Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity) operata dalle NK, che distruggono cellule che esprimono antigeni virali

Un piccolo virus è di poco più grande delle molecole di anticorpo



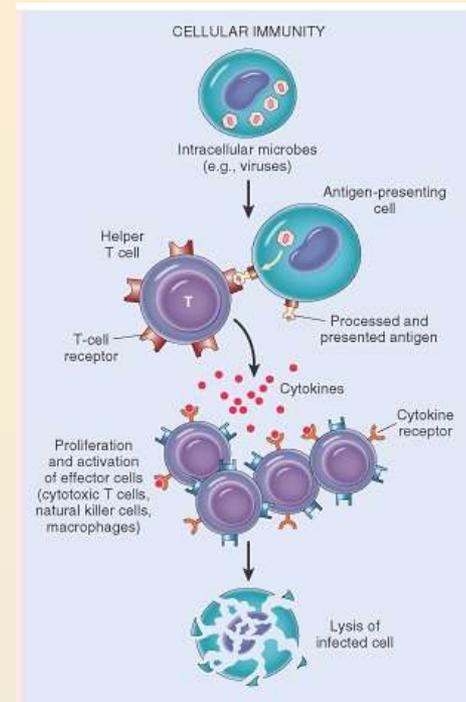
Immunità Adattativa CELLULO-MEDIATA

Th1 → svolta dalle cellule
effettrici citotossiche:

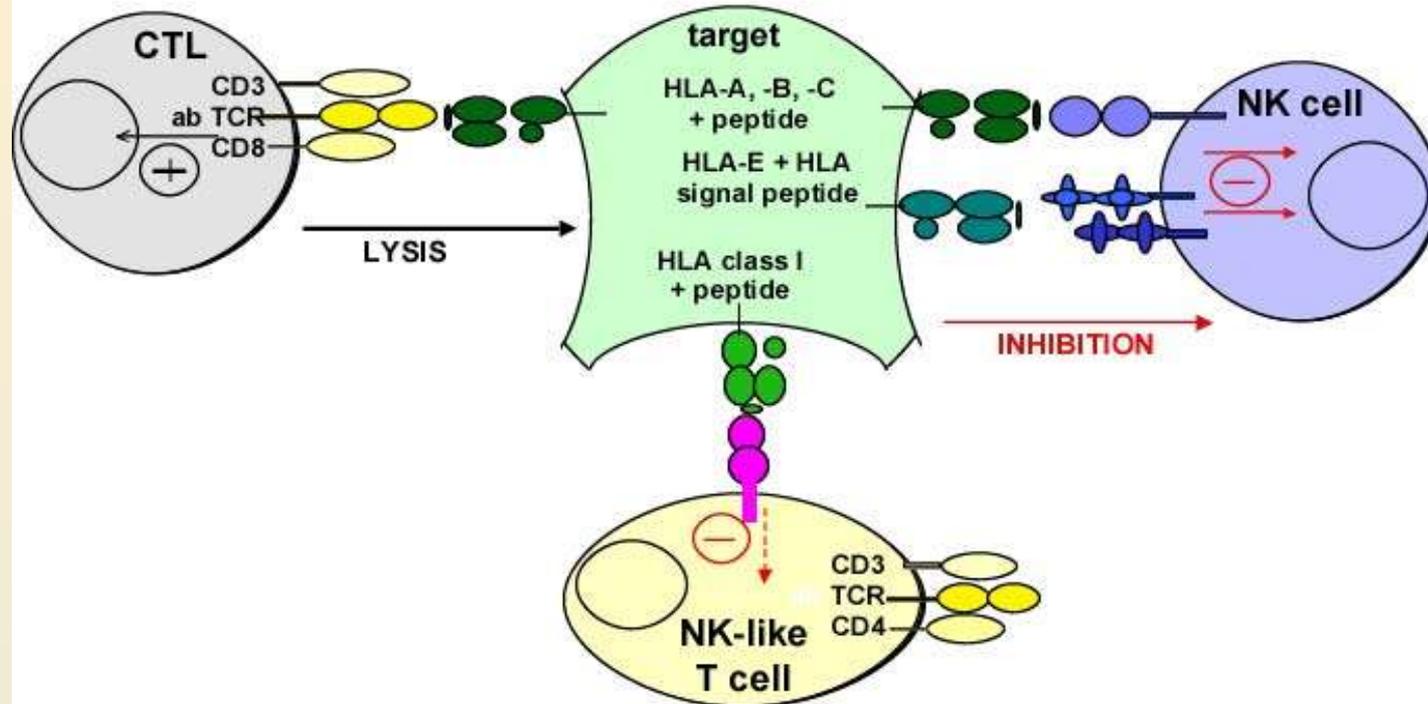
1. CTL

2. NK

3. NK-T



Three Different Types of Cytotoxic Effector Cells: CTL, NK Cells and NK-like T Cells



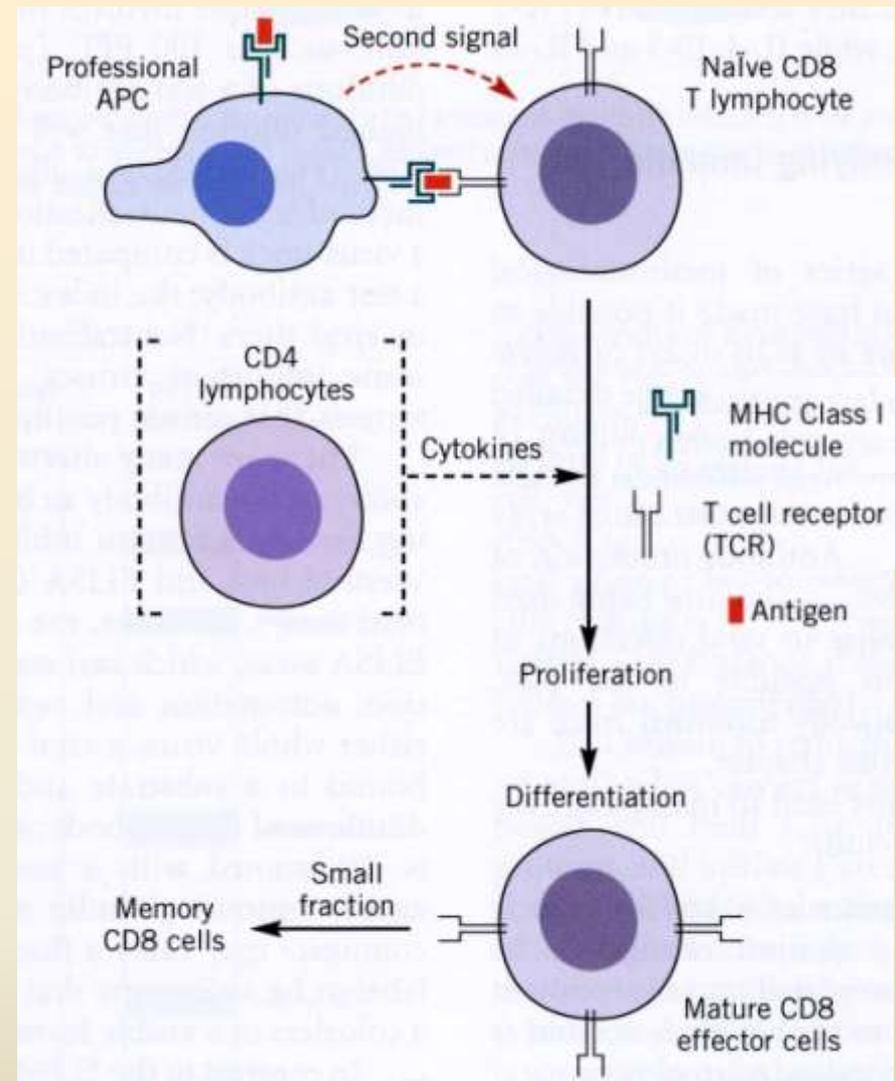
Cellule effettrici citotossiche: 1. i **CTL** sono attivati dall'interazione TCR/HLA-I/peptide, che porta alla lisi della cellula bersaglio.

Il legame di HLA-I a recettori inibitori come i KIR o CD94/NKG2A sulle cellule **NK** porta invece all'inibizione della citotossicità NK.

Le cellule **NK-T** sono il 3° tipo di cellule effettrici, sono CD3+, CD4+, TCR+, ma hanno una specificità NK: l'interazione di un recettore inibitore con HLA-I porta al blocco della citotossicità analogamente a quanto avviene nelle NK.

Immunità Adattativa CELLULO-MEDIATA

I CTL lisano le cellule bersaglio e secernono citochine.
Quando sono attivati dall'interazione con le APC, rilasciano **perforina**, che produce pori nelle cellule bersaglio (=che esprimono l'Ag presentato ai CD8+). Secernono anche **serin-esterasi** che innescano l'apoptosi della cellula bersaglio. Producono inoltre **citochine** ($\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, IL-2) che possono indurre apoptosi, e mediare risposte infiammatorie.



Schema semplificato dell'induzione dei CD8 citotossici. Una APC espone sulla superficie l'Ag presentato da MHC classe I. Il CD8 "naive" lega il peptide attraverso il TCR e, attraverso ulteriori segnali, prolifera. Poi differenzia in CD8 maturo capace di riconoscere e uccidere le cellule che espongono lo stesso Ag esposto originariamente dalla APC.

Immunità mucosale

Particolarmente importante, visto che le mucose sono uno dei migliori siti di entrata per i virus. E' importante soprattutto nelle reinfezioni, e **utilizza sia le risposte umorali che cellulo-mediate**. Le mucose contengono molte plasmacellule, che secernono **IgA**. Sono presenti anche IgG, che escono per diffusione dai capillari.

Le mucose contengono anche cellule **CD4** e **CD8**, in grado di montare riposta cellulo-mediata con diversa distribuzione di attività CTL rispetto alla presentazione sistemica, che sembra proteggere meglio

NB:

Immunopatogenesi virale

NB - Le risposte immunitarie che servono per difenderci, controllando ed eliminando l'infezione virale, a volte possono essere responsabili della patologia.

Elusione virale delle risposte immunitarie - 1

Un fattore importante della virulenza di un virus è la sua capacità di sfuggire all'eliminazione da parte del sistema immunitario

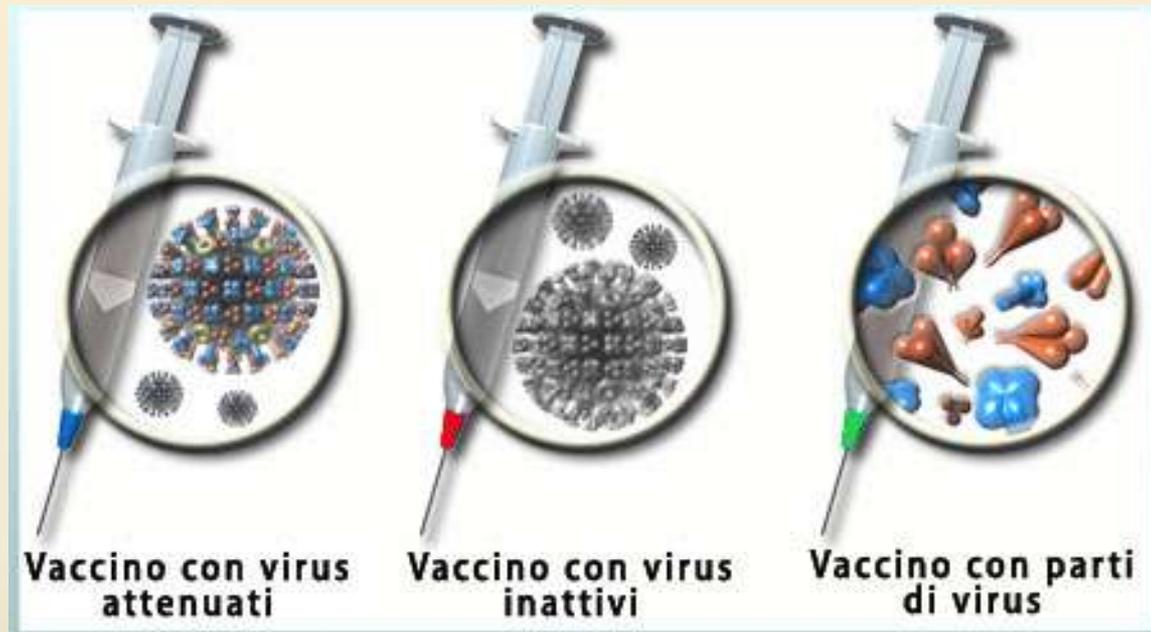
TABELLA 14-4. Meccanismi con cui i virus eludono le risposte immunitarie dell'ospite

Meccanismo	Esempi di virus	Azione
Risposta umorale		
Nascosti dagli anticorpi	Herpesviruses, retroviruses	Infezione latente
	Herpes simplex virus, varicella-zoster virus, paramyxoviruses, human immunodeficiency virus	Infezione diretta cellula-cellula (formazione di sincizi)
Variazioni antigeniche	Lentiviruses (human immunodeficiency virus)	Variazione genetica dopo l'infezione
	Virus influenzali	Variazioni genetiche annuali
Produzione di antigeni bloccanti	Virus dell'epatite B	Antigene di superficie dell'epatite B
Decadimento del complemento	Herpes simplex virus	Glicoproteina C, che lega e promuove il calo di C3
Interferone		
Blocco della produzione	V. influenzale	Proteina NS1 lega dsRNA e lo rende irrecognoscibile a PKR
	Virus dell'epatite B Virus di Epstein-Barr	Inibizione della trascrizione di IFN L'analogo di IL-10 (BRCF-1) blocca la produzione di interferone- γ

Elusione virale delle risposte immunitarie - 2

Blocco dell'azione	Adenovirus	Inibizione dell'induzione dell'espressione di MHC; VA1 RNA, blocca l'attivazione da RNA ds della proteina-cinasi indotte dall'interferone (PKR)
	Herpes simplex virus	Inattiva PKR e attiva le fosfatasi (PP1) a invertire l'inattivazione dei fattori di inibizione per la sintesi proteica
Immunità cellulo-mediata		
Ridotta funzionalità delle cellule dendritiche (DC)	Virus del morbillo, Virus dell'epatite C	Induzione di IFN- β , che inibisce la funzionalità delle cellule dendritiche
Ridotta funzionalità linfocitaria	Herpes simplex virus HIV Virus del morbillo	Previene la citolisi CD8-mediata Uccide i linfociti CD4 e altera i macrofagi Soppressione delle cellule NK, Te B
Fattori di immunosoppressione	Virus Epstein-Barr	BCRF-1 (simile a IL-10) soppressione della risposta T-cellulari CD4 helper TH1
Ridotta presentazione dell'antigene		
Ridotta espressione MHC classe I	Adenovirus 12	Inibizione della trascrizione di molecole MHC di classe I La proteina di 19-kDa (gene E3) lega la catena pesante delle molecole di classe I dell'MHC bloccando la traslocazione in superficie
	Cytomegalovirus	La proteina H301 blocca l'espressione in superficie della β_2 -microglobulina e delle molecole di classe I dell'MHC
	Herpes simplex virus	ICP47 blocca TAP, prevenendo il legame del peptide a molecole MHC di classe I
Inibizione dell'infiammazione		
	Poxvirus, adenovirus	Blocco dell'azione di IL-1 e del fattore di necrosi tumorale

VACCINI



Patogeno attenuato

- Il patogeno attenuato si riproduce all'interno dell'ospite umano e fornisce uno stimolo antigenico continuo.
- Il vaccino fornisce una immunità prolungata (anni di vita), in genere dopo una singola dose.
- Spesso il vaccino fornisce una immunità cellulo-mediata.

Patogeno ucciso

- Il patogeno ucciso non si moltiplica nell'ospite umano; la risposta immunitaria è determinata dal numero di antigeni contenuto nel vaccino.
- Sono necessarie dosi molteplici del vaccino, con successive dosi di richiamo.
- Il vaccino induce una modesta immunità cellulo-mediata.
- Il vaccino è somministrato per iniezione.

Estratti microbici o prodotti del patogeno

- Invece di usare microrganismi integri, i vaccini possono essere composti da molecole antigeniche estratte dal patogeno, da un filtrato acellulare (non infettante) del terreno di coltura in cui è stato cresciuto il microrganismo, o prodotti mediante le tecniche del DNA ricombinante.
- Vaccini possono essere allestiti con tossoidi (o anatossine, derivati delle esotossine). Questi sono utilizzati quando la patogenicità del microrganismo è dovuta alla tossina secreta.

MALATTIA O COMPONENTI DEL VACCINO

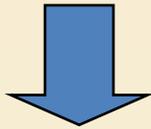
	PATOGENO ATTENUATO	PATOGENO UCCISO	ESTRATTI MICROBICI O PRODOTTI DEI PATOGENI
MALATTIE BATTERICHE	Febbre tifoide	Pertosse Colera Peste Febbre tifoide Febbre Q	Pertosse acellulare (antigene di <i>B. pertussis</i>) Carbonchio (filtrato non infettante di coltura) Difterite (tossoidi) Infezioni da <i>Haemophilus influenzae</i> di tipo b Malattia di Lyme (vaccino ricombinante) Infezioni meningococciche Infezioni pneumococciche Tetano (tossoidi)
MALATTIE VIRALI	Morbillo Parotite Poliomielite (Sabin) Varicella-zoster Infezioni da adenovirus Febbre gialla Rosolia Vaiolo	Poliomielite (Salk) Epatite A Influenza (virus intero) Rabbia Encefalite giapponese	Epatite B (antigene di superficie inattivato; antigene ricombinante) HPV

Vaccini polisaccaridici coniugati

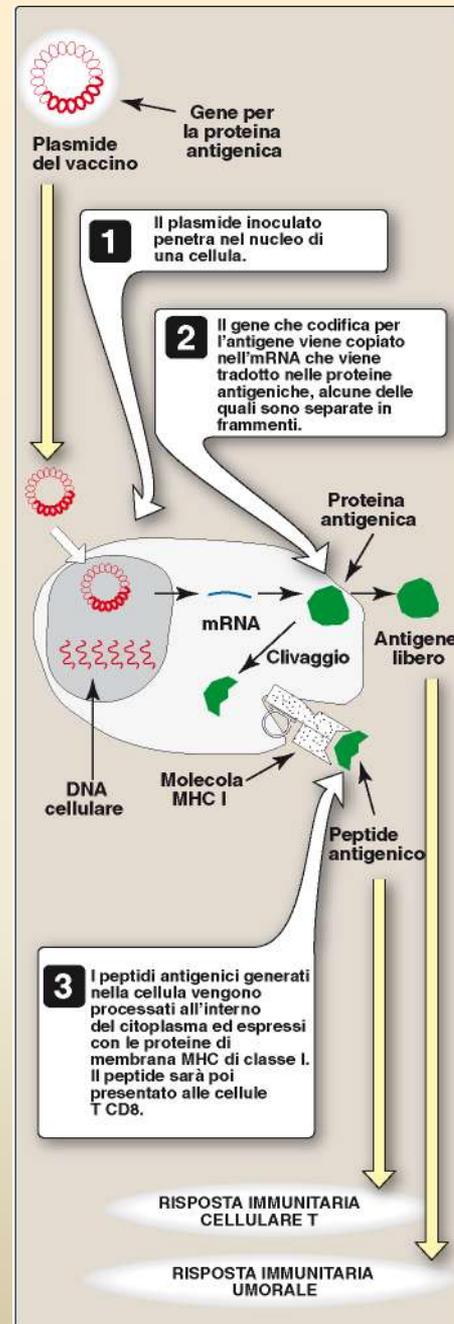
- Il legame covalente (coniugazione) di un polisaccaride antigenico a una proteina potenzia la risposta immunitaria verso questi vaccini, in particolare nei bambini di età inferiore ai 2 anni.

VACCINAZIONE

A DNA



Immunizzazione attiva con DNA: il DNA introdotto esprime gli antigeni contro cui viene sviluppata la risposta immune.



Le vaccinazioni in Italia

Abolita:	vaccinazione antivaaiolosa (1888-1977), per la eradicazione dell'infezione
Obbligatorie nella prima infanzia:	poliomielite, tetano, difterite, HBV
Consigliate nella prima infanzia:	morbillo, pertosse, parotite, <i>Haemophilus influenzae di tipo b</i> (meningite) e rosolia (soggetti di sesso femminile in età prepuberale)
Previste per alcune categorie di lavoratori e/o soggetti esposti:	tifo, meningococco, tubercolosi (BCG), rabbia, varicella pneumococco, leptospirosi
Utili in particolari circostanze:	influenza (alla comparsa di varianti antigeniche significative e nei soggetti anziani, cardiopatici, etc.), epatite A, febbre gialla, colera, rabbia (viaggiatori in Paesi con infezione endemica)

Papillomavirus