

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA "La Sapienza"

Dottorato di ricerca in Medicina Sperimentale- XVII ciclo (2001-2005)

Coordinatore: Prof.ssa Maria Rosaria Torrisi

Titolo tesi:

IL VIRUS DELLA SINDROME ACUTA RESPIRATORIA SEVERA
E IL SISTEMA INTERFERON: CAPACITA' DI INDUZIONE ED
ATTIVITA' ANTIVIRALE

CANDIDATA:

D.ssa Carolina Scagnolari - Dipartimento di Medicina Sperimentale e

Patologia, sezione di Virologia

Università degli studi di Roma "La Sapienza"

SUPERVISORE:

Prof. Guido Antonelli- Dipartimento di Medicina Sperimentale e

Patologia, sezione di Virologia

Università degli studi di Roma "La Sapienza"

Sommario	pg 5
INTRODUZIONE	pg 8
<i>Coronaviridae</i>	pg 12
Classificazione	pg 13
Struttura e composizione	pg 14
Replicazione	pg 16
<i>Virus della Sindrome Acuta Respiratoria Severa</i>	pg 18
Notizie storiche	pg 18
Morfologia, genoma e replicazione	pg 19
Recettori del SARS-CoV	pg 22
Ospite naturale	pg 23
Patogenesi	pg 25
Terapia	pg 27
<i>Sistema Interferon</i>	pg 29
Induzione e produzione di IFNs	pg 32
Induzione della trascrizione di IFNs	pg 33
Meccanismo d'azione degli IFNs	pg 37
Azione antivirale dell'IFN	pg 39
Proteina chinasi dipendente da dsRNA	pg 40
2'-5' Oligoadenilato sintetasi	pg 41
Proteine di resistenza ai Mixovirus	pg 41
Deaminasi di adenosina RNA-specifica-1	pg 43
P56	pg 43
Azione immunomodulante dell'IFN	pg 44
Meccanismi di evasione dei virus dall'IFN	pg 46

L'IFN in terapia	pg 49
IFN e virus della SARS	pg 50
SCOPO DEL LAVORO	pg 52
MATERIALI E METODI	pg 55
Cellule, virus e IFNs	pg 56
Titolazione dei virus	pg 57
Titolazione degli IFNs	pg 59
Valutazione dell'attività antivirale degli IFNs nei confronti della replicazione di SARS-CoV, EMCV, VSV e NDV	pg 60
Valutazione dell'attività antivirale di miscele degli IFNs di tipo I e II nei confronti della replicazione di SARS-CoV	pg 61
RT-TaqMan per gli mRNAs delle proteine MxA, ADAR-1, 2'-5'OAS e P56	pg 62
RT-TaqMan per gli mRNAs degli IFNs di tipo I	pg 65
Analisi statistica	pg 67
RISULTATI	pg 68
Attività antivirale degli IFNs alfa, beta e gamma nei confronti del SARS-CoV	pg 69
Attività antivirale delle miscele di IFNs di tipo I e II nei confronti del SARS-CoV	pg 77

Espressione degli mRNAs di MxA, ADAR-1, 2'-5'OAS e P56 in cellule Vero trattate con i diversi tipi di IFNs	pg 83
Valutazione dell'attività antivirale nei supernatanti di linfomonociti infettati con il SARS-CoV	pg 87
Caratterizzazione degli IFNs prodotti dai linfomonociti infettati con il SARS-CoV	pg 89
DISCUSSIONE	pg 92
BIBLIOGRAFIA	pg 105

SOMMARIO

La sindrome acuta respiratoria severa (SARS) è una malattia infettiva causata da un virus, recentemente identificato, appartenente alla famiglia *Coronaviridae*. Il quadro clinico della SARS, a differenza delle comuni infezioni umane da coronavirus, può comportare una grave compromissione del tessuto polmonare, che in una certa percentuale dei casi, può essere associata ad esito fatale. Attualmente, nonostante numerosi agenti antivirali siano in fase di sperimentazione, non esiste una terapia efficace per il trattamento delle infezioni da coronavirus e sono scarse le informazioni relative agli aspetti terapeutici e patogenetici associati all'infezione del coronavirus associato alla SARS (SARS-CoV).

Alla luce di tali evidenze abbiamo ritenuto utile intraprendere uno studio che si prefigge di raggiungere i seguenti obiettivi:

- esaminare, *in vitro*, la sensibilità del SARS-CoV agli interferoni (IFNs) usati singolarmente o in combinazione su cellule di rene di scimmia verde africana (Vero);
- valutare e caratterizzare l'induzione del sistema IFN dopo infezione, *in vitro*, dei linfomonociti con SARS-CoV.

La valutazione dell'attività antivirale degli IFNs nei confronti del virus della SARS è stata effettuata infettando le cellule Vero con il virus della SARS [molteplicità di infezione (MOI): 0,1 TCID₅₀/cellula; il ceppo utilizzato è l'HSR1 isolato nell'Aprile 2003 a Milano da un paziente proveniente dall'Asia] e misurando il valore della dose inibente il 50% (IC₅₀) della replicazione virale. Esperimenti analoghi sono stati eseguiti con il virus dell'encefalomiocardite (EMCV), il virus della stomatite vescicolare (VSV) e il virus della malattia di Newcastle (NDV) al fine di paragonare la sensibilità agli IFNs del SARS-CoV con altri virus IFN-sensibili. I risultati indicano che gli IFNs presentano, *in vitro*, una attività antivirale verso il SARS-CoV, sebbene le concentrazioni di IFN alfa, beta e gamma necessarie per ottenere l'inibizione della replicazione virale siano significativamente maggiori rispetto a quelle utilizzate per i virus IFN-sensibili. L'IFN beta sembra essere più efficace nell'inibire la replicazione del SARS-CoV rispetto agli altri IFNs saggiati [IFN alfa2 ricombinante (r), IFN alfa naturale e IFN gamma]. In particolare, facendo riferimento alle Unità Internazionali

(UI) di IFN utilizzate sperimentalmente, risulta che sono necessarie 4000 UI/ml di IFN beta per inibire il 90% della replicazione virale mentre per ottenere lo stesso effetto impiegando IFN alfa naturale e IFN gamma occorrono concentrazioni molto più elevate: rispettivamente, di 2 e 12 volte superiori a quella impiegata per l'IFN beta. E' interessante osservare che l'rIFN alfa2 non presenta una significativa attività antivirale nei confronti di SARS-CoV nemmeno a concentrazioni >100.000 UI/ml. I risultati complessivamente non cambiano anche quando viene considerata l'attività specifica delle diverse preparazioni di IFNs utilizzate nei confronti del SARS-CoV. Infatti esprimendo le IC₅₀ in ng/ml si evidenzia che l'IFN beta ha un'attività antivirale superiore (IC₅₀: 6,25 ng/ml) nei confronti di SARS-CoV rispetto all'IFN alfa naturale (IC₅₀: 32,5 ng/ml), all'IFN gamma (IC₅₀: 100 ng/ml) e all'rIFN alfa2 (IC₅₀: 1500 ng/ml).

L'analisi delle proteine associate all'attività antivirale dell'IFN nello stesso sistema sperimentale rivelano che l'espressione degli mRNAs di MxA, ADAR-1, 2'-5' OAS e P56 non correla con l'attività anti-SARS-CoV degli IFNs usati singolarmente.

Considerando che gli IFNs di tipo I (IFN alfa e IFN beta) e l'IFN di tipo II (IFN gamma), agendo separatamente, hanno un effetto moderatamente inibente nei confronti della replicazione di SARS-CoV quando si impiegano a basse concentrazioni e che, come è noto, essi agiscono legando recettori differenti sulla membrana cellulare, abbiamo, successivamente, valutato la possibilità che gli IFN di tipo I e II possano agire in maniera sinergica nei confronti di SARS-CoV. I risultati di questi esperimenti indicano che impiegando una miscela contenente IFN alfa naturale (o beta) e IFN gamma la resa virale di SARS-CoV viene significativamente diminuita rispetto a quella che si ottiene utilizzando gli stessi IFNs separatamente. L'interazione di tipo sinergico tra l'IFN di tipo I e IFN gamma nei confronti del SARS-CoV è stata ulteriormente dimostrata applicando il metodo di Chou e Talalay con il quale è stato possibile valutare che l'indice di combinazione (IC) tra i due tipi di IFNs risulta sempre inferiore a 1.

La capacità di induzione di IFNs da parte di SARS-CoV è stata valutata in seguito all'infezione con il virus della SARS (MOI: 0,1 TCID₅₀/cellula) di linfomonociti prelevati da soggetti sani. In particolare l'analisi è stata condotta a 24 e 48 ore dalla infezione *in vitro* dei linfomonociti. E' stato valutato il contenuto di IFNs, misurato come attività antivirale, nel supernatante cellulare. E' stata inoltre valutata l'espressione

genica dei diversi IFN di tipo I (alfa1, alfa2, alfa5, alfa6, alfa8, alfa10, alfa13, alfa17, alfa21 e beta). I risultati di questa analisi sono stati successivamente paragonati con quelli ottenuti eseguendo gli stessi esperimenti con virus noti in letteratura per la loro capacità di indurre IFN e cioè l'NDV e il VSV. I risultati ottenuti indicano che dopo l'infezione dei linfomonociti di soggetti sani con SARS-CoV si assiste, a 24 e 48 ore, ad una induzione del sistema IFN. In particolare l'IFN rilasciato dai linfomonociti infettati con SARS-CoV nel supernatante possiede una attività antivirale pari a 165 ± 70 UI/ml nel sistema EMCV-cellule di carcinoma polmonare umano e 280 ± 50 UI/ml nel sistema VSV-cellule di rene bovino e raggiunge un livello massimo di espressione a 48 ore dalla infezione virale. Dai risultati inoltre si osserva una induzione variabile dell'espressione genica di alcuni sottotipi di IFN alfa (alfa1, alfa2, alfa5, alfa6, alfa8, alfa10, alfa13, alfa17, alfa21) e dell'IFN beta. Tuttavia i risultati evidenziano che il VSV e l'NDV inducono livelli maggiori di IFNs rispetto al virus della SARS.

In conclusione nell'insieme i risultati documentano la relativa resistenza di SARS-CoV all'azione antivirale degli IFNs e la modesta capacità del SARS-CoV di attivare il sistema IFN rispetto a virus noti in letteratura per essere forti induttori di IFN quali il VSV e l'NDV. Il significato biologico e clinico-terapeutico di tali osservazioni è ancora oggetto di studio, tuttavia, considerando che l'IFN di tipo I svolge un ruolo chiave nell'immunità innata dell'ospite alle infezioni virali, i dati, indirettamente, suggeriscono che il virus possa diffondere nell'organismo come conseguenza della sua resistenza all'IFN.

INTRODUZIONE

La scoperta negli ultimi anni di tre nuovi virus appartenenti alla famiglia dei *Coronaviridae* [coronavirus associato alla Sindrome Acuta Respiratoria Severa (SARS-CoV), coronavirus NL63 (NL63-CoV) e coronavirus HKU1 (HKU1-CoV)] e le recenti emergenze epidemiche di influenza aviaria hanno confermato alla comunità scientifica, e alla opinione pubblica in generale, il considerevole pericolo costituito dalle infezioni da virus respiratori. E' noto, infatti, che le infezioni da virus respiratori (SARS-CoV e altri coronavirus, metapneumovirus, rhinovirus, influenza A e B, adenovirus, i virus parainfluenzali, virus respiratorio sinciziale) per l'entità del loro impatto socio-economico, misurabile in termini di morbilità e mortalità, costituiscono un serio problema sanitario pubblico.

La SARS è una grave infezione respiratoria individuata alla fine del 2002 nella Cina del Sud. L'agente eziologico della SARS è stato identificato alla fine di Marzo 2003 quando, in alcuni laboratori di Hong Kong, Stati Uniti e Germania, è stata dimostrata la presenza di un nuovo coronavirus in pazienti che avevano manifestato tale malattia.

Il quadro clinico della SARS, a differenza delle comuni infezioni da coronavirus della specie umana, che interessano in genere le vie respiratorie superiori e causano affezioni simili al comune raffreddore, presenta una grave compromissione del tessuto polmonare che in alcuni casi può essere fatale.

La prova definitiva dell'associazione tra il nuovo coronavirus e la sintomatologia della SARS è stata ottenuta mediante diversi tipi di indagini, quali l'isolamento del virus in coltura cellulare (figura 1), l'osservazione al microscopio elettronico dell'espettorato di pazienti affetti da SARS, la dimostrazione della presenza di sequenze genomiche del virus

negli stessi materiali e l'evidenza di una risposta umorale specifica nel siero dei pazienti affetti da SARS (Ksiazek et al., 2003).

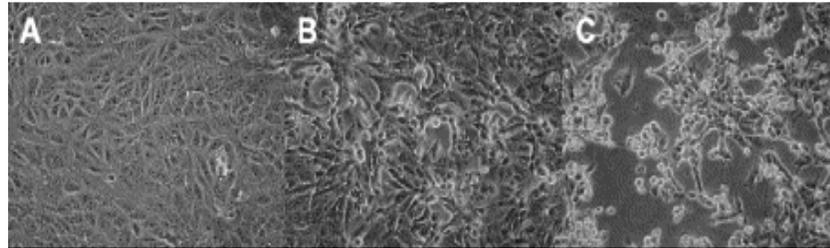


Figura 1. Effetto citopatico del coronavirus della sindrome acuta respiratoria severa in cellule di rene di scimmia verde africana. A) 0 ore (B) 24 ore, e (C) 48 ore dopo l'infezione. Immagine tratta da Berger et al., 2004.

La relazione di causalità tra il nuovo coronavirus e la SARS è stata stabilita e diffusa dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) sulla base della dimostrazione che il virus risponde ai postulati di Koch, qui di seguito elencati.

Il patogeno:

1. deve essere presente in tutti i casi della malattia;
2. deve poter essere isolato dall'ospite malato ed essere propagato in coltura;
3. deve riprodurre la malattia originale quando introdotto in un ospite suscettibile;
4. deve poter essere isolato dall'ospite infettato sperimentalmente.

Per verificare la rispondenza ai postulati, il virus isolato da un caso fatale di SARS è stato coltivato in cellule di rene di scimmia verde africana (Vero). Successivamente il virus propagato è stato inoculato in un gruppo di scimmie che hanno sviluppato una polmonite interstiziale simile alla SARS. Il virus è stato poi isolato dalle secrezioni respiratorie di questi

animali e il genoma è stato amplificato mediante una reazione di retrotrascrizione e reazione di amplificazione a catena della polimerasi (RT-PCR). Questo ha permesso di osservare che il virus isolato nelle scimmie è identico al virus inoculato (Fouchier et al., 2003).

CORONAVIRIDAE

I coronavirus vengono così chiamati, perché, osservati al microscopio elettronico, hanno l'aspetto di una corona solare (le proiezioni sulla superficie). La famiglia *Coronaviridae* (ordine *Nidovirales*) comprende due generi coronavirus e torovirus. I torovirus sono molto diffusi tra gli ungulati e sembrano essere associati alla diarrea. I coronavirus costituiscono invece la seconda più importante causa del comune raffreddore nella specie umana. Le osservazioni al microscopio elettronico hanno permesso, inoltre, di correlare i coronavirus alla gastroenterite nei bambini e negli adulti. Inizialmente i ceppi patogeni, noti per l'uomo, erano l'OC43 e il 229E. Tuttavia nel novembre 2002 una insolita sindrome acuta respiratoria severa, denominata SARS, radiologicamente assimilabile alle polmoniti interstiziali ma caratterizzata da un'elevata gravità e da una non trascurabile letalità si diffuse nel mondo, assumendo i caratteri di una vera e propria pandemia. Dopo gli iniziali tentativi di associazione della SARS con i principali microorganismi che penetrano per via respiratoria (*Mycoplasma pneumoniae*, *Clamidia pneumonite*, paramixovirus, virus respiratorio sinciziale, adenovirus), il 19 aprile 2003, l'Organizzazione mondiale della sanità (OMS) annunciò ufficialmente che l'agente eziologico della sindrome acuta respiratoria severa era un virus appartenente alla famiglia dei *Coronaviridae* che possedeva caratteristiche inusuali di patogenicità e virulenza rispetto ai coronavirus fino a quel tempo identificati nell'uomo e negli animali. Recentemente, a causa della crescente attenzione, da parte dei ricercatori di tutto il mondo, sulla famiglia dei coronavirus, suscitata dalla scoperta del virus della SARS, sono stati identificati altri due coronavirus in grado di infettare l'uomo, il

HCoV-NL63 nei Paesi Bassi e il HCoV-HKU1 in Cina. Entrambi i coronavirus causano affezioni all'apparato respiratorio di modesta entità, soprattutto in bambini e adulti immunocompromessi (Bastien et al., 2005; Woo et al., 2005).

CLASSIFICAZIONE

La famiglia *Coronaviridae* è solitamente suddivisa in tre gruppi, originariamente sulla base della cross-reattività sierologica e più recentemente sulla base dell'omologia delle sequenze genomiche.

- Al Gruppo 1 appartengono i coronavirus responsabili della peritonite infettiva felina (FIPV) e canina (CCoV), il coronavirus respiratorio e della gastroenterite contagiosa del maiale (PrCoV e TGEV), il coronavirus del coniglio (RbCoV), il coronavirus umano 229E (HCoV-229E) e il NL63 (HCoV-NL63) (Hofmann et al., 2005).
- Del Gruppo 2 fanno parte il coronavirus dell'epatite murina (MHV) e bovina (BHV), il coronavirus del ratto (RCoV) e i coronavirus umani OC43 (HCoV-OC43) e HKU1 (Casas & Pozo, 2005).
- Il Gruppo 3 comprende soltanto coronavirus aviari, tra i quali il virus della bronchite infettiva (IBV) aviaria e il coronavirus del tacchino.

L'agente eziologico della SARS non appartiene a nessuno dei gruppi di coronavirus noti, inclusi i 2 gruppi che comprendono i 4 coronavirus umani, HCoV-OC43, HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-HKU1 ai quali è solo parzialmente correlato (Casas & Pozo, 2005). Esso mostra maggiore somiglianza con i coronavirus murini, bovini, suini ed umani del gruppo 2 e il coronavirus aviario IBV del gruppo 3.

E' stato dunque proposto che il nuovo virus costituisca un quarto gruppo di coronavirus (Figura 2).

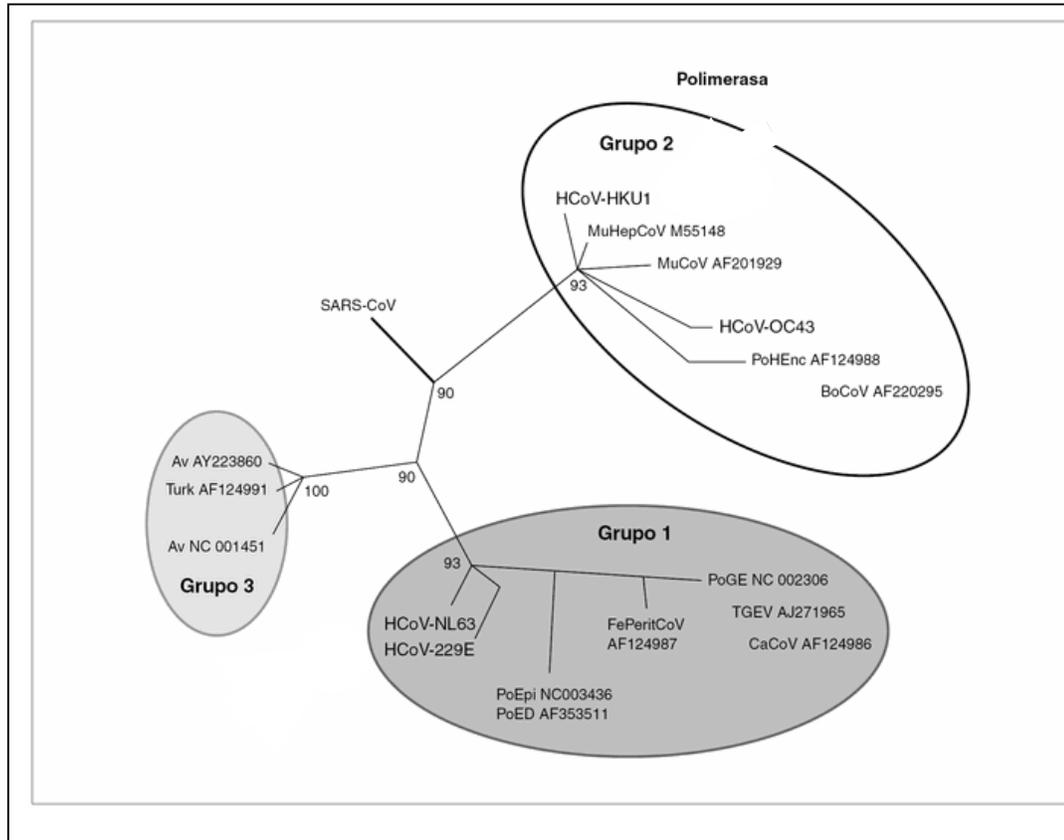


Figura 2. Albero filogenetico dei coronavirus. Immagine tratta da Casas & Pozo, 2005

STRUTTURA E COMPOSIZIONE

I coronavirus sono costituiti da particelle munite di involucro, con diametro di 80-220 nm, contenenti un genoma di RNA non segmentato, a singolo filamento, senso positivo (20-30 kb; PM $5-6 \times 10^6$); si tratta del genoma più grande fra i virus ad RNA (figura 3). Il filamento di RNA ha un *cap* metilato all'estremità 5' e una sequenza poli-A all'estremità 3'. Il nucleocapside a elica ha un diametro di 9-11 nm. Sulla superficie dell'involucro si trovano proiezioni (aculei o peplomeri) a forma di clava o

Nella fase di adsorbimento il virus si attacca al recettore cellulare attraverso le due glicoproteine di superficie S ed M, penetra all'interno della cellula per via endocitotica e in seguito l'*envelope* si fonde con la membrana dell'endosoma.

L'emagglutinina, se presente, si attacca ai residui di acido neuraminico della membrana cellulare e, grazie alla sua attività acetilsterasica, permette al virione di staccarsi dal recettore liberandolo nel citoplasma.

La replicazione virale avviene dunque nel citoplasma della cellula ospite.

Inizialmente, dalle prime 20 kb disposte nella regione 5' del genoma viene trascritto un mRNA per la sintesi della polimerasi virale, che a sua volta trascrive un filamento intermedio di RNA a polarità negativa della lunghezza dell'intero genoma.

Tale RNA viene usato come stampo per produrre una serie di mRNAs con una identica sequenza leader non trascritta di 72 nucleotidi al 5' e una sequenza terminale poliadenilata coincidente al 3'. Gli mRNAs sono monocistronici e i geni al 5' vengono trascritti a partire dall' mRNA di maggiori dimensioni.

Ogni gene è separato da una sequenza intergenica ripetuta, -UCUAAAC-, che interagisce con la RNA polimerasi, e con fattori cellulari per creare la sequenza *leader* all'inizio di ciascuna "*open reading frame*" (ORF). I virioni si assemblano nel reticolo endoplasmatico e nell'apparato di Golgi e successivamente vengono trasportati in vescicole fino alla membrana e rilasciati all'esterno attraverso un meccanismo di gemmazione.

VIRUS DELLA SINDROME ACUTA RESPIRATORIA SEVERA

NOTIZIE STORICHE

La “*Severe Acute Respiratory Sindrome*” (SARS) è una grave affezione respiratoria ad eziologia virale, individuata inizialmente nella provincia cinese del Guangdong. I primi casi vennero registrati nel novembre 2002 ma a partire dal febbraio 2003, in seguito ad un caso letale, che contagiò gli ospiti di un albergo di Hong Kong, l’infezione si diffuse anche ad Hong Kong, Toronto, Singapore e Vietnam (Tsang et al., 2003). Da allora nel giro di pochi mesi si ebbero casi di SARS in 29 stati diversi sparsi nei 5 continenti grazie anche alla rapidità e all’elevato numero di viaggi aerei internazionali. Le nazioni maggiormente colpite furono la Cina (comprese Hong Kong e Taiwan), Singapore, Canada (area di Toronto), Vietnam e Filippine (Figura 5).



Figura 5. Diffusione nel mondo del coronavirus della sindrome acuta respiratoria severa (SARS-CoV) durante l’epidemia del 2002-2003. Immagine tratta da Peiris et al., 2004.

L'epidemia causò l'infezione di 8098 persone portandone alla morte 774 con una mortalità quindi del 9,6%. L'organizzazione sanitaria mondiale dichiarò la fine dell'epidemia mondiale di SARS nel luglio 2003 (Fujii et al., 2004).

Nel 2004 furono registrati solo alcuni casi sporadici di infezione da SARS-CoV in Cina. I pazienti ebbero una manifestazioni più lieve della sindrome acuta respiratoria severa rispetto a quanto osservato durante l'epidemia di SARS nel 2003 (Zhong, 2004). Nel 2005 non è stata documentata nel mondo nessuna nuova infezione da SARS-CoV.

MORFOLOGIA, GENOMA E REPLICAZIONE

L'osservazione al microscopio elettronico dei campioni clinici e dei sovranatanti di coltura cellulare infetta da SARS-CoV rivela particelle pleiomorfe fornite di rivestimento esterno simil-coronavirus, con un diametro tra 60 e 130 nm (Ksiazek et al., 2003; Peiris et al., 2003).

L'esame di sezioni sottili di cellule infette, mette in evidenza particelle simil-coronavirus all'interno di vacuoli citoplasmatici rivestiti da una membrana e all'interno delle cisterne del reticolo endoplasmatico rugoso. Le particelle extracellulari appaiono frequentemente raggruppate sulla superficie della membrana citoplasmatica.

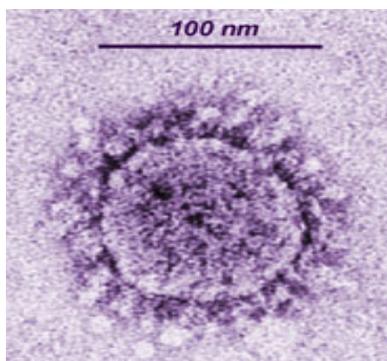


Figura 6. Fotografia al microscopio elettronico di una particella simil-coronavirus.

Immagine tratta da Ksiazek et al., 2003.

Il genoma di SARS-CoV è costituito da un filamento di RNA poliadenilato di circa 29.700 nucleotidi e presenta una elevata frequenza di guanidina o citidina (41%). L'RNA virale contiene circa 14 ORFs che codificano per tre classi di proteine: due grandi proteine, denominate pp1a and pp1ab, quattro proteine strutturali [le glicoproteine delle proiezioni cellulari esterne “*Spikes*” (S), del rivestimento esterno “*Envelope*” (E) e di membrana (M), e la proteina del nucleocapside (N)] e otto proteine accessorie (Bartlam et al., 2005).

Il gene che codifica per la glicoproteina HE caratteristico di alcuni coronavirus in SARS-CoV sembra essere assente.

Le ORF1a e 1b, in analogia agli altri coronavirus, occupano 2/3 del genoma virale in posizione 5' e vengono tradotte in due grandi proteine, pp1a e pp1ab. Il taglio proteolitico delle due proteine diversamente dagli altri coronavirus è mediato da due proteasi virali ricche di cisteina, chiamate PL2PRO e 3CLPRO, e produce circa 16 proteine non strutturali che intervengono nella replicazione dell'RNA virale (una RNA polimerasi RNA dipendente; una RNA elicasi, una 3'-5' esonucleasi e delle proteine accessorie).

Le rimanenti ORFs occupano 1/3 del genoma e codificano per le proteine strutturali (S, M, E, N) e per una serie di proteine accessorie.

La proteina S è costituita da due domini, HR1 e HR2, altamente idrofobici. La funzione della proteina S è permettere il legame specie-specifico tra il virus e i recettori della cellula ospite ed avviare la fusione tra l'*envelope* virale e la membrana cellulare. La proteina S è inoltre il principale antigene virale che stimola la produzione di anticorpi neutralizzanti nell'ospite.

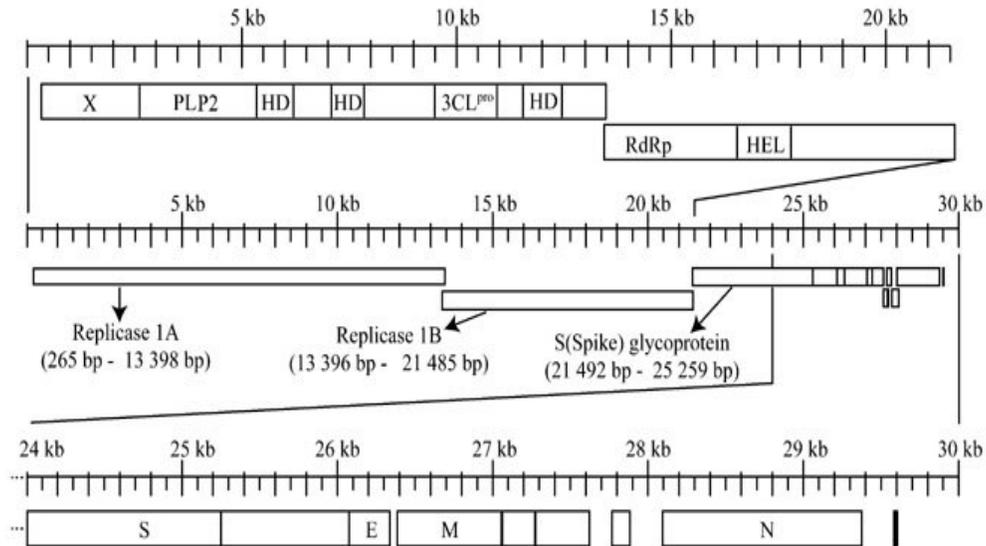


Figura 7. Mappa genomica del coronavirus della sindrome acuta respiratoria severa. Immagine tratta da Wang & Chi, 2003.

La proteina M è il maggior componente del pericapside. Determina la morfogenesi del virione selezionando la proteina S da inserire nei virioni durante la fase di assemblaggio. Si pensa che sia la stessa proteina M a dirigere l'incorporazione del genoma nel virione.

La proteina E è coinvolta insieme alla proteina M nell'assemblaggio del virione. Entrambe le proteine sembrano non stimolare una risposta umorale durante l'infezione con SARS-CoV.

La proteina N viene sintetizzata in abbondanza in cellule Vero E6 infettate con SARS-CoV e numerosi studi hanno riportato che nel 90% dei pazienti affetti da SARS sono presenti anticorpi che riconoscono la proteina N. La proteina N è coinvolta nella fase di assemblaggio del virione: sembra infatti possedere una sequenza segnale che riconosce il filamento di RNA e lo lega formando il nucleocapside.

Tra i geni strutturali sono comprese altre ORFs che codificano per diverse proteine di cui non è nota la funzione.

Per quanto riguarda il ciclo replicativo di SARS-CoV si conosce ancora poco. Gli mRNA sub-genomici vengono trascritti mediante un processo discontinuo non del tutto chiarito, a partire dal filamento negativo neosintetizzato.

Sono stati condotti degli esperimenti sulle cellule Vero E6 che hanno dimostrato un comportamento di SARS-CoV analogo a quello degli altri coronavirus, ad eccezione dei tempi di adsorbimento, eclissi e assemblaggio che risultano essere relativamente diversi. L'effetto citopatico emerge dopo 16-24 ore dall'infezione ed è totale intorno a 72 ore (Ng et al., 2003).

RECETTORI DEL SARS-CoV

Il primo recettore identificato per SARS-CoV è stato la metallopeptidasi ACE-2 (da "*Angiotensin Convertine Enzyme 2*") (Kuhn et al., 2004). Si tratta di una carbosipeptidasi, importante componente del sistema renina-angiotensina che controlla la pressione sanguigna e l'attività cardiaca. La metalloproteina è espressa sulla membrana di cellule Vero e si è osservato che, quando queste cellule sono infettate con SARS-CoV, ACE-2 si lega ad un dominio (S1) di approssimativamente 300-510 aminoacidi in posizione NH terminale della glicoproteina S di SARS-CoV determinando la formazione di sincizi tra le cellule. Inoltre è stato dimostrato che gli anticorpi anti- ACE-2 sono in grado di bloccare l'infezione da SARS-CoV. Recentemente è stato osservato che anche il coronavirus umano NL63, sebbene strettamente correlato al HCoV-229E, usa come recettore cellulare la metalloproteina ACE-2 (Hofmann et al., 2005).

ACE-2 è stata identificata sulla superficie dei pneumociti di tipo I e II, degli enterociti dell'intestino tenue e delle cellule del tubulo prossimale del rene. Queste osservazioni sembrano spiegare il tropismo tessutale di

SARS-CoV nei polmoni e nel tratto gastrointestinale oltre al suo isolamento nelle urine dei pazienti con SARS (Peiris et al., 2004).

Tuttavia ACE-2 è espressa anche in altri tessuti che non vengono infettati da SARS-CoV (cellule endoteliali di arterie e vene, tessuto muscolare liscio del tratto intestinale). Alla luce di queste osservazioni è stata valutata la possibilità dell'esistenza di altri recettori di SARS-CoV indipendenti dall'espressione di ACE-2.

Direttamente collegata a questo aspetto, è la recente identificazione di una glicoproteina transmembrana di tipo II della famiglia delle lectine di tipo C, denominata CD 209L (Jeffers et al., 2004), in grado sia di legare la glicoproteina S di SARS-CoV che di rendere, se espressa mediante trasfezione, cellule non permissive suscettibili all'infezione da SARS-CoV. La proteina CD 209L è espressa nelle cellule alveolari di tipo II del polmone umano e nelle cellule endoteliali, che, come è noto, sono potenziali bersagli del virus della SARS.

OSPITE NATURALE

La spiegazione più plausibile per l'emergere di questa infezione nella popolazione umana sembra essere la trasmissione interspecie animale-uomo.

Infatti ricercatori di Hong Kong e Shenzhen hanno individuato diversi ceppi di coronavirus strettamente correlati dal punto di vista genetico al coronavirus della SARS in animali selvatici in vendita per il consumo umano in un mercato nel sud della Cina. Gli studiosi hanno isolato il virus in sei tipi di Zibetto (*Paguma larvata*), un piccolo animale appartenente alla famiglia dei *Viverridi*, simile ad un grosso gatto, con la pelliccia di colore grigiastro a macchie scure, righe nere sul collo, zampe corte e nere, e una caratteristica cresta nera (figura 8).



Figura 8. Lo zibetto (*Paguma Larvata*). Immagine tratta da Peiris et al., 2004.

Il siero di questi animali si è dimostrato in grado di inibire la crescita in coltura cellulare di SARS-CoV isolato dall'uomo. Viceversa, il siero umano di pazienti affetti da SARS inibisce la crescita di SARS-CoV isolato dagli stessi animali.

Lo studio del genoma di SARS-CoV isolato dallo zibetto, ha dimostrato che, con l'eccezione di una piccola frazione aggiunta di sequenza genomica, è identico al SARS-CoV umano (Enserink, 2003). Già a maggio del 2003, in seguito al ritrovamento del virus nei tessuti e nelle feci dei sei esemplari esaminati, alcuni ricercatori dell'Università di Hong Kong avevano ipotizzato che all'origine della malattia potesse esserci questo piccolo mammifero.

Due furono le ipotesi formulate sulle modalità di infezione di questi animali: potevano aver contratto il virus mangiando cibo offerto loro al mercato, oppure tramite le feci umane utilizzate nei fertilizzanti. L'uomo potrebbe essere stato a sua volta contagiato macellando le carni dell'animale. In realtà non ci sono prove certe del passaggio del virus

dall'animale all'uomo e della sua successiva mutazione per adattarsi all'organismo umano. Nonostante le incertezze, il solo sospetto ha determinato la scelta da parte delle autorità cinesi di vietare la vendita degli zibetti.

Recentemente tuttavia è stato proposto che il pipistrello della specie *Rhinolophus* sia il vero ospite naturale del SARS-CoV attraverso il quale il virus infetta l'uomo e gli zibetti (figura 9). Infatti è stato osservato che l'80% dei campioni di siero raccolti dai pipistrelli presentano anticorpi verso il SARS-CoV e che nel 40% dei tamponi fecali sono presenti particelle simili al SARS-CoV (Dobson, 2005).



Figura 9. Il pipistrello *Rhinolophus*. Immagine tratta da Dobson, 2005.

PATOGENESI

Non diversamente da altri coronavirus, il SARS-CoV penetra nell'organismo sia per via inalatoria che orofaringea. Ad una prima fase di replicazione virale, segue quella viremica primaria, per mezzo della quale il virus raggiunge gli organi bersaglio.

La carica virale è maggiore nelle basse vie respiratorie che in quelle alte, ed è bassa nei primi 4 giorni di infezione, mentre inizia ad aumentare fino a

raggiungere il massimo a circa 10 giorni dall'infezione. Questo spiega la bassa trasmissibilità dell'infezione nelle prime fasi della malattia. Tra i 10 e i 15 giorni dall'instaurarsi dell'infezione, un alto titolo virale nell'aspirato nasofaringeo, feci e siero, oltre alla presenza del virus in diversi siti anatomici sono predittivi di un esito clinico sfavorevole.

Nel tessuto polmonare si evidenzia un danneggiamento diffuso degli alveoli con infiltrati alveolari, edema polmonare e presenza di cellule multinucleate anche in sincizi. Nella genesi del danno tessutale concorrono gli effetti citopatici specifici, l'attivazione della risposta reticoloistiocitaria e il rilascio di citochine infiammatorie, in concomitanza ad alterazioni della coagulazione ematica.

Il SARS-CoV sembra in grado di infettare numerosi tipi di cellule presenti in organi diversi. In particolare l'RNA del SARS-CoV e il virus stesso sono stati ritrovati in pazienti, morti a causa della SARS, nei linfociti e monociti di sangue periferico, nei linfonodi, in cellule epiteliali del tratto respiratorio, in cellule della mucosa dell'intestino, nell'epitelio dei tubuli renali distali, nei neuroni del cervello e nei macrofagi (Lu et al., 2005).

E' stato inoltre osservato che il SARS-CoV è in grado di indurre il processo di apoptosi, accelerando la distruzione di alcune cellule del sistema immunitario. In uno studio immunoistochimico condotto su tessuti di pazienti affetti da SARS è stata infatti riscontrata una forte attivazione di macrofagi (in milza e linfonodi), associata a un evidente decremento di linfociti T e di cellule natural killer [NK (nei polmoni)], i quali vanno incontro a un processo di apoptosi significativo, tale da indicare proprio in questo fenomeno il principale meccanismo patogenetico dell'infezione (Yang et al., 2004; Yan et al., 2004). L'apoptosi sembra essere indotta nelle cellule polmonari, renali e di fegato dalla proteina 3a di SARS-CoV attraverso il processo che coinvolge la famiglia delle caspasi (Tan et al., 2004).

TERAPIA

Attualmente, nonostante numerosi agenti antivirali siano stati o siano tuttora in fase di sperimentazione, non esiste una terapia efficace per il trattamento dell' infezione da SARS-CoV.

I farmaci più utilizzati durante i primi mesi dell'epidemia di SARS del 2003 furono la ribavirina e gli steroidi. La ribavirina, agente antivirale ad ampio spettro, è un analogo nucleosidico della guanosina. Il farmaco è attivo verso numerosi virus a RNA, e viene utilizzato in combinazione con l'interferone alfa (IFN) nel trattamento dell'epatite cronica da virus C (HCV). Gli steroidi sono una classe di farmaci antinfiammatori di origine glucocorticoidea.

L'utilizzo della ribavirina in combinazione con gli steroidi si dimostrò inefficace nei pazienti affetti da SARS (Lee et al., 2003; Poutanen et al., 2003; Tsang et al., 2003) nonostante alcuni ricercatori di Hong Kong descrissero una riduzione della mortalità del 50% nei pazienti trattati con ribavirina in associazione al farmaco antiretrovirale Kaletra. Successivamente numerosi esperimenti, *in vitro*, dimostrarono che, anche ad alte concentrazioni, la ribavirina non era in grado di inibire la replicazione del virus della SARS (Stroher et al., 2004). Inoltre, l'osservazione che la carica virale, in alcuni pazienti, raggiunge il picco dopo 14 giorni di terapia con ribavirina, contribuì ad indicare la poca efficacia del farmaco nei confronti di SARS-CoV. In uno studio canadese, l'uso della ribavirina fu associato alla comparsa di numerosi effetti collaterali. In particolare in seguito all'assunzione della ribavirina, il 49% dei pazienti presentò una riduzione significativa dell'emoglobina mentre il 76% dei pazienti mostrò segni di emolisi (Booth et al., 2003). L'anemia emolitica, osservata nel 90% dei pazienti trattati con ribavirina aggravò il quadro clinico e portò ad un incremento della mortalità (Avendano et al., 2003). Di conseguenza, nel Maggio 2003 i funzionari della Sanità canadese

decisero la sospensione della somministrazione di ribavirina nel trattamento delle infezioni da SARS-CoV.

E' noto che gli IFNs, una classe di proteine appartenenti alla famiglia delle citochine, esplicano sia un'azione antivirale diretta sulla replicazione della maggior parte dei virus animali, sia un'azione indiretta potenziando la risposta immunitaria (sia innata che adattativa) dell'organismo attivata nell'ospite al momento dell'infezione virale.

Dal momento che il virus della SARS e gli IFNs rappresentano l'oggetto di tesi, viene di seguito riportata una più approfondita descrizione del sistema IFN.

SISTEMA INTERFERON

L'IFN descritto alla fine degli anni '50 come proteina secreta da fibroblasti, in seguito ad infezione virale, è stato successivamente caratterizzato come un complesso gruppo di proteine, denominato oggi sistema interferon perché composto da proteine diverse dal punto di vista strutturale e funzionale. Esso partecipa attivamente alla risposta immune dell'organismo ed in particolare alla risposta alle infezioni virali. Oltre alla ben nota attività antivirale, ad esso sono state attribuite numerosissime attività biologiche quali un'attività immunomodulante, un'attività differenziante, un'attività inibente la crescita di cellule tumorali ed un'attività inibente l'angiogenesi. Le proteine del sistema IFN possiedono le seguenti caratteristiche comuni:

- non possiedono attività antivirale diretta, ma sono capaci di indurre nelle cellule con cui vengono a contatto uno stato di resistenza antivirale legato alla produzione di altre proteine, dette effettrici;
- la loro azione non è specifica per il virus inducente, essendo capaci di agire su virus differenti da quelli che ne hanno indotto la produzione;
- sono dotate di specificità di specie, cioè sono capaci di inibire la replicazione virale solo in cellule della stessa specie o molto vicine.

Originariamente le proteine del sistema sono state classificate, in base alla provenienza cellulare, in IFN leucocitario, IFN fibroblastico ed IFN immune. La nomenclatura attuale, basandosi sulla struttura primaria delle proteine, distingue gli IFNs in due tipi:

IFN di tipo I: IFN alfa, IFN beta, IFN delta, IFN epsilon, IFN kappa, IFN tau, IFN omega;

IFN di tipo II: IFN gamma.

Questa classificazione tiene conto della scoperta di quattro nuove citochine che sembrano essere strettamente correlate da un punto di vista strutturale e funzionale agli IFNs di tipo I. Queste sono state chiamate limitina (presente solo nel topo) e IFN lambda1 o IL-28A, lambda2 o IL-28B e lambda3 o IL-29 (Sheppard et al., 2003; Vilcek, 2003). Gli IFNs lambda si legano a un recettore diverso da quello degli IFN di tipo I, costituito da due catene denominate IL-28R/LICR2 e IL-10R beta (Dumoutier et al., 2004). Per tale motivo, non è chiaro se gli IFNs lambda siano una classe distinta di IFN o siano piuttosto più strettamente correlati alle interleuchine.

I geni degli IFNs alfa, beta, epsilon, kappa, omega e lambda sono presenti nell'uomo e negli animali mentre i geni degli IFNs delta e tau e della limitina sono presenti rispettivamente nei maiali, nei ruminanti e nel topo.

Gli IFN di tipo I sono molecole acido resistenti (a pH 2), il cui processo di induzione è prevalentemente di tipo virale e quindi rapidissimo. E' infatti sufficiente un solo minuto di contatto tra la molecola di IFN ed il recettore perché si inizi a sintetizzare l'mRNA necessario per la sintesi delle proteine effettrici.

L'IFN di tipo II è invece acido sensibile e il processo di induzione è prevalentemente di tipo immunologico e quindi lento. Occorrono ore per la sintesi delle proteine effettrici che non vengono indotte direttamente ma richiedono una fase intermedia nella quale la cellula non ha ancora acquisito lo stato di resistenza.

- L'IFN alfa, un tempo conosciuto come IFN leucocitario, è rappresentato da una vasta famiglia, composta da diversi sottotipi, denominati con un ordine numerico crescente (IFN alfa-1, IFN alfa -2, ecc). Queste proteine costituite da 165-166 aminoacidi, hanno un peso molecolare di 19-24 KDa, e risultano stabili fino ad una temperatura di 56°C. Sono stati identificati almeno 14 geni distinti non allelici che codificano per gli IFN alfa,

localizzati sul braccio corto del cromosoma umano 9. L'IFN alfa viene prodotto prevalentemente da linfociti B e macrofagi in risposta ad un'infezione virale, a prodotti microbici, polimeri organici e al contatto con cellule eterologhe (Pestka, 1986). Le maggiori produttrici di IFNs di tipo I sono le cellule dendritiche (DC) plasmacitoidi chiamate anche *Interferon-producing cells* (IPC). Queste cellule che, non esprimono il recettore delle Immunoglobuline e il recettore dei linfociti T (TCR), si trovano prevalentemente nel sangue e negli organi linfoidei secondari e rappresentano nell'uomo lo 0,2%-0,8% delle cellule mononucleate del sangue periferico (Colonna et al., 2002; Liu, 2005).

- L'IFN beta, noto anche come IFN fibroblastico, viene prodotto da cellule di tipo fibro-epiteliale, presenti nelle mucose, in seguito alla stimolazione da parte di virus, acidi nucleici virali e polinucleotidi sintetici. E' instabile a 56°C (Pestka, 1986) e viene codificato da geni che si trovano sul braccio corto del cromosoma 9.

-L'IFN kappa, è espresso nei cheratinociti dell'epidermide ed è strettamente correlato agli IFNs alfa (LaFleur et al., 2001)

-L'IFN epsilon, sebbene non sia stato caratterizzato in dettaglio, è espresso in maniera costitutiva nella placenta e nei tessuti ovarici dei topi e sembra intervenire nel processo di riproduzione dei mammiferi (Hardy et al., 2004).

- L'IFN omega, precedentemente chiamato IFN alfa II, è strettamente correlato all'IFN alfa e come quest'ultimo è un IFN leucocitario. Esso si lega agli stessi recettori degli IFN alfa e beta e media effetti biologici simili.

- L'IFN tau, caratterizzato fino ad ora solo nei ruminanti ungulati, è denominato fattore trofoblastico perché viene secreto dall'epitelio dell'embrione prima dell'annidamento e ha la funzione di preservare il corpo luteo al fine di permettere l'avvio della gravidanza (Parmar & Platanius, 2003).

- L'IFN gamma è una glicoproteina costituita da due monomeri, ciascuno con 166 aminoacidi, per un peso molecolare complessivo di 45 KDa, codificata da un solo gene localizzato sul cromosoma 12. La presenza di una rilevante percentuale di aminoacidi basici nella sua formula di composizione gli conferisce una instabilità a pH inferiore a 4. Possiede solo una modesta attività antivirale e la sua funzione principale è quella di mediare i meccanismi effettori della risposta immunitaria.

INDUZIONE E PRODUZIONE DI IFNs

Nel corso di un'infezione virale gli IFNs sono prodotti immediatamente in quantità elevate. Nel caso di una infezione virale *in vivo* si può ipotizzare che il primo tipo di IFN, prodotto da cellule fibroblastiche o epiteliali delle mucose, sia l'IFN beta. Nei casi in cui il virus dal tessuto d'impianto raggiunga il sistema linfatico e venga a contatto con le cellule linfoidi può indurre la produzione di IFN alfa. Se l'infezione virale procede, l'attivazione dei meccanismi immunitari specifici determina la produzione di IFN gamma da parte dei linfociti T, precedentemente sensibilizzati verso gli antigeni virali. Al contrario degli IFNs di tipo I che possono essere prodotti in limitate quantità da molte cellule, la produzione di IFN gamma è ristretta solo ai linfociti T e alle cellule NK. Tra i differenti tipi di linfociti T, le cellule CD4⁺ a fenotipo Th1 e le cellule CD8⁺ sono i maggiori

produttori di questa citochina, che è anche la principale attivatrice dei macrofagi.

INDUZIONE DELLA TRASCRIZIONE DI IFNs

Sono stati identificati numerosi fattori di trascrizione, che legandosi al promotore degli IFNs, sono coinvolti nell'attivazione e modulazione dell'espressione dei geni degli IFNs.

In particolare la trascrizione di IFN alfa o beta sembra essere controllata da due proteine, che appartengono alla famiglia dei fattori di regolazione dell'IFN [IRF (da "*Interferon regulatory element*")], denominate IRF3 e IRF7 (Malmgaard, 2004). La famiglia delle proteine IRFs svolge un ruolo chiave nell'attivazione dell'immunità innata dell'ospite. Tutti i membri della famiglia sono caratterizzati dalla presenza di un dominio, di circa 120 aminoacidi in posizione amminoternale, che riconosce delle sequenze simili di DNA, denominate ISRE (da "*Interferon-stimulated response element*"). E' stato dimostrato, che dopo l'infezione con un virus, gli intermedi replicativi di RNA a doppia elica (dsRNA) virali presenti all'interno delle cellule, interagiscono con fattori citoplasmatici che a loro volta attivano alcune proteine chinasi. Le proteine chinasi successivamente attivano la proteina IRF-3, mediante fosforilazione di un residuo di serina in posizione carbossiterminale. La proteina IRF-3 è espressa generalmente in maniera costitutiva in numerosi tipi di cellule e si trova nel citoplasma delle cellule sotto forma di monomero inattivo. Una volta attivata, la proteina IRF3, forma un omodimero e insieme alla proteina CBP/p300 (da "*cAMP-response element binding protein (CREB)-binding protein*"), trasloca dal citoplasma al nucleo della cellula dove si lega a delle sequenze specifiche del promotore dell'IFN beta, attivandone la trascrizione. Nel processo di induzione genica dell'IFN beta sono inoltre coinvolti i fattori di trascrizione NF- κ b (da "*nuclear factor κ B*"), cJUN/ATF-2 (da "*c-JUN*

activated transcription factor”) e AP-1 (da *activator protein-1*), che si legano, insieme alla proteina IRF-3, al promotore dell’IFN beta e garantiscono una efficiente produzione di IFN beta. Una volta prodotto, l’IFN beta agisce in maniera autocrina e paracrina e legandosi al recettore dell’IFN di tipo I induce la sintesi della proteina IRF-7, normalmente presente in limitate quantità nelle cellule dei tessuti linfoidei, e di numerose proteine ad attività antivirale. Successivamente la proteina IRF-7 induce una forte attivazione della trascrizione dei geni dell’IFN di tipo I.

All’induzione della trascrizione dell’IFN di tipo I partecipa inoltre la proteina chinasi dipendente da RNA bicatenario (PKR) che, in seguito al legame dei dsRNA, attiva il fattore di trascrizione NF- κ b (Nato & Williams, 2000).

I dsRNA, comunque, non risultano essere l’unico mezzo mediante il quale i virus inducono la produzione di IFNs. Nei leucociti mononucleati, ad esempio, la sintesi di IFNs può essere indotta anche dal contatto della superficie cellulare con le glicoproteine dell’involucro virale (De Maeyer & De Maeyer-Guignard, 1998).

Recentemente è stato sottolineato il ruolo svolto dalla famiglia dei *Toll like receptors* (TLR) nei meccanismi molecolari che regolano l’induzione della trascrizione degli IFN di tipo I (Takeuchi et al., 2004). Come è noto l’espressione dei TLRs consegue al riconoscimento da parte delle cellule infiammatorie e del sistema immunitario di alcune molecole associate ai patogeni (PAMPs da “*pathogen-associated microbial patterns*”) e attiva le risposte immunitarie innate. Attualmente sono stati identificati 11 TLRs e sembra che ogni recettore sia in grado di riconoscere solo un pannello molto ristretto di componenti o di molecole prodotte dai batteri, virus, funghi e protozoi (vedi tabella 1).

TOLL LIKE RECEPTORS (TLRs)	LIGANDI
1, 2	Lipoproteine dei batteri o delle spirochete
2,6	Lipoproteine dei batteri
2	Peptidoglicano
3	RNA a doppio filamento
4	Lipopolisaccaride e alcune proteine virali
5	Flagellina dei batteri
7	RNA a singolo filamento
8	RNA a singolo filamento
9	DNA con motivi di CpG
10	Sconosciuto
11	Batteri Uropatogeni

I TLRs sono recettori transmembrana espressi sulla membrana plasmatica o all'interno dei compartimenti endosomiali della cellula. Sono costituiti da un dominio extracellulare ricco di ripetizioni di leucina e da un dominio citoplasmatico chiamato motivo TIR (da "*Toll IL-1 receptor resistance*"). I TLRs utilizzano numerose proteine adattatrici che riconoscono il motivo TIR e attivano distinte cascate del segnale all'interno delle cellule. In particolare l'attivazione della maggior parte dei TLRs, coinvolge il legame

della proteina MyD88 (da “*myeloid differentiation factor-88*”) al dominio intracellulare TIR. Tuttavia sono state identificate altre proteine che possono partecipare alla trasduzione del segnale dei TLRs quali la proteina TIRAP (da “*TIR domain-containing adapter protein*”) anche chiamata MAL (da “*MyD88-adapter-like*”), la proteina TRIF (da “*Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFNbeta*”), e la proteina TRAM (da “*Toll-receptor-associated molecule*”). L’attivazione dei TLRs avviene in risposta al legame di molecole prodotte dai microorganismi e induce, mediante i fattori di trascrizione NF- κ B e i membri della famiglia IRFs, l’espressione di citochine proinfiammatorie, di IFNs e di molecole ad attività costimolatoria. E’ noto che solo i TLR 3, 4, 7 e 9 sono in grado di indurre la sintesi di IFN. In particolare il legame di dsRNA virali al TLR3 o del lipopolissacaride dei batteri al TLR4 attiva la cascata del segnale che coinvolge TRIF e induce la sintesi di IFN beta mediante la fosforilazione di IRF-3 e l’attivazione di NF- κ B. Il TLR3 tuttavia, a differenza di TLR4 che induce unicamente la trascrizione di IFN beta, attiva anche l’espressione dei geni degli IFNs alfa (Honda et al., 2005). Il TLR7 e il TLR9 invece, in seguito al legame di molecole di RNA a singolo filamento o di sequenze di DNA non metilate con motivi di CpG, trasducono un segnale, mediante la proteina Myd88, che porta alla fosforilazione di IRF7, alla sua traslocazione nel nucleo e all’induzione di IFNs. Interessante è stata l’osservazione che sia il TLR7 che il TLR9 a differenza del TLR3 e del TLR 4 sono espressi sulle cellule plasmacitoidi DCs. Al contrario le cellule mieloidi dendritiche esprimono i TLR2, 4, 5 e 8 sulla superficie ma non il TLR7 e 9. Queste osservazioni contribuiscono a dimostrare come il segnale di induzione dell’IFN sia alquanto complesso e diverso in base al tipo di cellula che viene presa in considerazione.

L'IFN gamma viene invece indotto dall'IL-2, dall'IL-18, dall' IFN alfa e beta e dalla stimolazione del TCR e dei recettori delle cellule NK attraverso l'attivazione dei fattori di trascrizione NFAT (da “*nuclear factor activating transcription*”), STATs (da “*signal transducer and activator of transcription*”) e NF- κ b (Malmgaard, 2004).

MECCANISMO D'AZIONE DEGLI IFNs

Gli IFNs esercitano la loro attività legandosi su specifici recettori disposti sulla membrana cellulare e attivandoli. Ciò determina una cascata di eventi che si conclude con la trasduzione del segnale e la produzione di proteine effettrici che hanno la funzione di rendere la cellula resistente alle infezioni virali. Il numero dei recettori dell'IFN varia da cellula a cellula e da ciò potrebbe dipendere il grado di sensibilità di una cellula all'IFN.

Per l'IFN alfa e l'IFN beta l'attivazione di tale processo è molto rapida: dopo un solo minuto di contatto tra IFN e recettore si avvia il processo di induzione che si completa, circa 30 minuti più tardi, con la produzione di mRNAs per le proteine effettrici. Il livello massimo di produzione viene raggiunto dopo 5-8 ore.

Sia l'IFN alfa che l'IFN beta utilizzano il medesimo recettore cellulare, denominato recettore dell'IFN di tipo I. Diversamente, il recettore dell'IFN gamma è di tipo II e mostra una distribuzione più limitata rispetto ai recettori di tipo I.

Sia i recettori di tipo I che quelli di tipo II sono glicoproteine transmembrana costituite da due catene polipeptidiche tra loro correlate, IFNR1 e IFNR2. Essi hanno domini extracellulari con siti attivi deputati al legame con l'IFN e domini citoplasmatici associati a membri della famiglia di proteine chinasi Jak (da “*Janus Kinase*”). Le subunità dei recettori di tipo I, IFNAR1 e IFNAR2, sono codificate da geni collocati sul cromosoma umano 21. IFNAR1 è legata costitutivamente ad una tirosina chinasi, Tyk2,

e IFNAR2 è associata alla proteina Jak1 appartenente alla famiglia delle proteine Janus Kinase.

Le subunità dei recettori di tipo II, IFNGR1 e IFNGR2, sono associate a due proteine chinasi, rispettivamente Jak1 e Jak2.

L'insieme degli eventi che porta alla trasduzione del segnale è mediato dalla via JAK/STAT.

Il legame degli IFN di tipo I al proprio recettore determina l'attivazione delle proteine Tyk2 e JAK1 per transfosforilazione. In seguito Jak1, grazie alla sua attività chinasi, fosforila residui di tirosina presenti nella porzione intracellulare del recettore in modo che vengano riconosciuti dai domini SH2 delle proteine STATs (da "*Signal Transducers and activators of transcription*"), trasduttori del segnale e attivatori della trascrizione (STAT1, STAT2, STAT3 e STAT5). Le proteine STAT, presenti nel citoplasma in forma monomeriche, si associano così al recettore e vengono a loro volta fosforilate dalla chinasi JAK1 adiacente.

Nel caso dei recettori di tipo II si impiega principalmente STAT1 come attivatore trascrizionale. L'importanza delle proteine STAT nella via di trasduzione degli IFN di tipo I è stata confermata mediante differenti studi *in vitro* condotti negli ultimi quindici anni (Samuel, 2001). In particolare, è stato visto che STAT1 è richiesta per la successione di eventi mediati dall'IFN alfa e dall'IFN gamma. STAT1 e STAT2 legano una proteina di 48 Kda (p48) e formano il complesso ISGF-3 (fattore-3 del gene stimolato e indotto dall'IFN) che migra nel nucleo e lega una regione specifica dei promotori di alcuni geni stimolati dall'IFN, detti elementi di risposta stimolati dall'IFN, e ne determina l'attivazione per la trascrizione. In associazione al complesso ISGF-3, possono formarsi anche altri complessi indotti dall'IFN di tipo I coinvolgendo altre proteine STATs (STAT1, STAT3, STAT5) sia in forma omodimerica che eterodimerica.

Sia per gli IFN di tipo I che di tipo II, affinché il processo trascrizionale risulti completo, oltre alla fosforilazione dei residui tirosinici è necessaria la fosforilazione di alcune serine. Recenti studi hanno individuato la proteina chinasi C (PKC)- δ come responsabile della fosforilazione della serina 727 in risposta all'IFN alfa e all'IFN gamma (Uddin et al., 2002). Rimane da scoprire quali altre isoforme della PKC siano coinvolte in questo processo.

Come precedentemente accennato, le attività biologiche degli IFNs sono numerose, noi riserveremo un maggiore approfondimento sulla attività antivirale e immunomodulante che possono essere coinvolte più direttamente nella risposta dell'ospite all'infezione da SARS-CoV.

AZIONE ANTIVIRALE DEGLI IFNs

Grande attenzione è stata rivolta alla comprensione dei meccanismi mediante i quali l'IFN impedisce la replicazione virale. In base al tipo di cellula e al tipo di virus, l'IFN opera in modo diverso sulle varie fasi del ciclo replicativo: penetrazione, scapsidazione, replicazione del genoma, trascrizione, traduzione, assemblaggio e rilascio della progenie virale. Ciò comporta che esso sia attivo contro la maggior parte dei virus; tuttavia la sua azione non è assolutamente selettiva e ciò comporta la possibilità di compromissione del metabolismo cellulare.

L'attività antivirale è il risultato finale dei molteplici effetti sia diretti che indiretti espletati dagli IFNs.

Gli effetti indiretti si concretizzano in vario modo:

1. tramite le proteine effettrici indotte;
2. per trasferimento dello stato di resistenza antivirale alle cellule circostanti;
3. per attivazione dei leucociti dell'ospite e conseguente aumento della loro azione fagocitica o citocida sulle cellule infette o trasformate.

Gli effetti indiretti sono mediati dalle citochine indotte dagli stessi IFNs.

Alcuni autori reputano che almeno 100 proteine vengano sintetizzate in risposta all'interazione dell'IFN con il recettore cellulare, comunque solo alcune di queste sembrano essere associate alla resistenza antivirale indotta dall'IFN.

Tra queste le più studiate sono:

- PKR
- 2'-5'oligoadenilato sintetasi (2'-5' OAS);
- Ribonucleasi L;
- Proteine di resistenza ai Mixovirus (Mx);
- Deaminasi di adenosina RNA-specifica (ADAR-1);
- P56

PKR

Conosciuta anche come chinasi P68, P1 o dsI, la PKR è stata studiata nell'ambito dello stato antivirale dell'IFN e il suo ruolo è stato suggerito dalla scoperta di numerosi inibitori di questo enzima che vengono codificati o indotti da virus differenti. La stimolazione della sintesi dell'enzima proteina chinasi rappresenta uno dei meccanismi fondamentali tramite i quali l'IFN determina la condizione intracellulare di resistenza ai virus (Hovanessian, 1991). Questo enzima deve essere attivato da un dsRNA che, in questo caso, è strettamente correlato agli acidi nucleici del virus. E' interessante sottolineare che l'interazione con tali fattori è un processo reversibile. Ogni molecola di dsRNA può, quindi, attivare numerose proteine chinasi, le quali agiscono direttamente sulle sequenze regolatrici dei geni dell'IFN. L'effetto derepressore esercitato su queste sequenze consente la trascrizione dei geni e la loro successiva traduzione a livello ribosomiale. Il legame tra la PKR e il dsRNA porta ad una

autofosforilazione dell'enzima che, in tal modo, risulta attivato. Una volta attivato l'enzima blocca il fattore iniziatore eIF-2, necessario alla traduzione dell'mRNA a livello ribosomiale, fosforilandone una subunità. In particolare la fosforilazione blocca il complesso di inizio formato da l'eIF-2, la guanosina trifosfato (GTP) e la Met-tRNA con l'unità ribosomiale 40S e l'mRNA. Poiché l'eIF-2 non può essere riciclato, la sintesi proteica è inibita o arrestata e questo si traduce nell'inibizione della replicazione virale attraverso il blocco della sintesi di nuove catene polipeptidiche del virus.

2'-5' oligoadenilato sintetasi e ribonucleasi L

La 2'-5'OAS comprende una famiglia di enzimi, indotti dall'IFN, che possono essere raggruppati in tre classi di proteine codificate da tre distinti gruppi di geni e caratterizzate da differenti pesi molecolari (Hovanessian, 1991).

In seguito all'attivazione da parte del dsRNA, sintetizzano un oligonucleotide di adenina, contenente tre o più nucleotidi con un insolito legame fosfodiesterico 2'-5'A tra i residui di ribosio (Hovanessian, 1991). L'oligonucleotide, a sua volta, attiva una endoribonucleasi, denominata ribonucleasi L, capace di idrolizzare ogni tipo di RNA a singola elica. Questo enzima scinde le molecole di mRNA prima che vengano tradotte a livello dei ribosomi. In questo modo si assiste ad un blocco della traduzione delle proteine virali. L'azione enzimatica ha un tempo limitato perché gli oligoadenilati, idrolizzati dalla fosfodiesterasi, hanno vita breve e pertanto la cellula può riprendere la propria sintesi proteica.

Proteine di resistenza ai Mixovirus

Le proteine Mx fanno parte di una famiglia di proteine ad attività GTPasica (Staeheli et al., 1993), indotte unicamente dagli IFNs di tipo I e

in grado di inibire la moltiplicazione di molti virus a RNA quali, ad esempio, il virus della stomatite vescicolare, gli ortomyxovirus, i paramixovirus e i bunyavirus (Haller et al., 1998). Inizialmente sono state caratterizzate nel topo, (es. Mx1 murina), e, successivamente, sono state identificate in moltissime altre specie animali (Horisberger et al., 1983; Horisberger & Gunst, 1991). Nell'uomo, sono state identificate due proteine, MxA ed MxB, con peso molecolare rispettivamente di 76 kDa e 73 kDa.

I geni delle proteine Mx sono collocati, nell'uomo, sul cromosoma 21 e vengono trascritti in seguito alla stimolazione con IFN. Tuttavia, solo la proteina MxA presenta un'attività antivirale (Haller & Kochs, 2002).

Le proteine Mx presentano tre sequenze omologhe a quelle di proteine leganti il GTP, nella regione amino-terminale e ciò gli conferisce un'intrinseca attività GTP-asi. Vi sono, inoltre, delle sequenze che presentano delle omologie con altre proteine. In particolare sono stati osservati diversi gradi di omologia con le "dinamine", proteine che nei vertebrati e in *Drosophila* sono coinvolte nel meccanismo dell'endocitosi (Chen et al., 1991) e con due proteine presenti nei lieviti: VPS1, coinvolta nell'esocitosi delle proteine cellulari (Rothman et al., 1990), e MGM1, necessaria per il mantenimento del genoma mitocondriale (Jones & Fangman, 1992). Nella regione carbossiterminale delle proteine Mx è presente un dominio conservato, ricco di leucine (dominio "leucine-zipper"), al quale sembra essere attribuita la capacità di formare aggregati nel citoplasma cellulare. In particolare, studi recenti hanno dimostrato che, nelle cellule trattate con IFN, sono presenti delle forme aggregate di MxA associate al reticolo endoplasmatico liscio (Accola et al., 2002).

Deaminasi di adenosina RNA-specifica-1

La proteina ADAR-1 è una adenosina deaminasi RNA-specifica che catalizza la conversione delle adenosine in inosine. Queste modificazioni destabilizzano le molecole di RNA virali e cellulari, impedendo il corretto appaiamento delle basi dei nucleotidi nelle strutture secondarie. Inoltre le molecole di RNA modificate spesso non sono più in grado di codificare l'esatta sequenza aminoacidica della proteina che avrebbero specificato in quanto l'inosina viene riconosciuta come una guanosina dal macchinario di traduzione della cellula. Nell'uomo esistono due forme della proteina ADAR-1 derivate da un meccanismo di *splicing* alternativo dello stesso gene: una proteina inducibile dall'IFN sia di tipo I che di tipo II con un peso molecolare di 150 kDA presente nel nucleo e nel citoplasma cellulare; una proteina costitutivamente espressa di 110 kDA espressa unicamente nel citoplasma (Samuel, 2001)

Un'altra proteina ADAR denominata ADAR-2 è presente nelle cellule e non viene indotta dagli IFNs (Samuel, 2001).

P56

Le proteina P56 o IFIT1 appartiene ad una famiglia di proteine strutturalmente correlate che vengono indotte dagli IFNs, dalle molecole di dsRNA e da numerosi virus. La P56 è caratterizzata dalla presenza di motivi multipli tetratricopeptidici (TPR) che assumono una conformazione elica-giro-elica e che mediano specifiche interazioni proteina-proteina. P56 probabilmente lega eIF-3 (subunità del fattore 3 di inizio di trascrizione negli eucarioti) inattivandolo, portando così all'inibizione della sintesi proteica (Sarkar et al., 2004).

AZIONE IMMUNOMODULANTE DELL'IFN

Tutti gli IFNs, ed in particolare l'IFN gamma, si sono dimostrati in grado di esercitare un effetto modulante positivo o negativo sulla risposta immunitaria. La loro azione influenza sia la risposta umorale che la risposta cellulo-mediata. Essi sono in grado di potenziare l'attività dei macrofagi, delle cellule NK, dei linfociti T *helper* e T citotossici.

Ognuna di queste cellule, infatti, esplica un'azione precisa nei confronti di microorganismi o di cellule tumorali.

I macrofagi svolgono una funzione di primaria importanza nella difesa contro malattie neoplastiche e virali in virtù di tre proprietà fondamentali: fagocitosi, attività citotossica e produzione di citochine. In presenza di IFN, in particolare di IFN gamma, si assiste ad un potenziamento di tutte queste attività. L'aumento della fagocitosi e dell'attività citocida sono legate ad un aumento del metabolismo ossidativo di queste cellule e ad un aumento dell'espressione dei recettori tramite i quali i macrofagi si legano al frammento cristallizzabile (Fc) degli anticorpi (IgG) legati ad antigeni estranei. Inoltre i macrofagi attivati inibiscono la replicazione di numerosi microorganismi intracellulari come *Mycobacterium tuberculosis*, *Leishmania donovani* e *Toxoplasma condii*. L'inibizione del ciclo replicativo dei microorganismi avviene, probabilmente, attraverso l'induzione dell'espressione dell'indoleamina-2,3-diossigenasi che converte il triptofano a N-formilchinurenina promuovendo la degradazione di questo aminoacido.

L'IFN agisce sulle cellule pre-NK immature stimolandone la differenziazione in cellule NK mature e dotate di attività citotossica, aumentandone, altresì, l'attività (Reiter, 1993). Un ulteriore aumento dell'attività di questi elementi cellulari può dipendere, inoltre, dagli effetti che l'IFN esercita sui linfociti T soppressori. E' stato, infatti, documentato che la presenza di IFN causa una notevole riduzione del numero di tali

linfociti ed un'inibizione degli effetti soppressori di questi nei confronti delle cellule NK (Saksela, 1981). Occorre sottolineare che gran parte dei fenomeni immunomodulatori attribuiti all'IFN è legata alla sua capacità di modulare l'espressione degli antigeni di istocompatibilità coinvolti nei fenomeni di citotossicità (classe I) e di presentazione antigenica (classe II). In particolare, quest'ultimo evento risulta di fondamentale importanza per l'avvio della risposta immunitaria. Tutti gli IFNs sono in grado di aumentare l'espressione cellulare di molecole di MHC di classe I. Per quanto riguarda le molecole MHC di classe II, gli IFN alfa e beta sono in grado di ridurre l'espressione mentre l'IFN gamma la aumenta. Inoltre gli IFNs, in particolare l'IFN gamma, sono capaci di modulare l'espressione di diversi recettori, quali il recettore dell'IL-2, il recettore del TNF alfa (da "*Tumor Necrosis Factor*").

Oltre alla regolazione della risposta cellulo-mediata, l'IFN è in grado di modulare la risposta anticorpale. Gli effetti sulla produzione di anticorpi possono essere di tipo inibitorio, o di potenziamento, a seconda delle dosi e dei tempi di somministrazione. E' stato dimostrato che la produzione di anticorpi viene inibita se l'IFN viene a contatto con i linfociti B contemporaneamente all'antigene, mentre viene potenziata quando il contatto si verifica dopo un intervallo di 48-72 ore dal contatto dei linfociti con l'antigene (Dianzani et al., 1990). Sembra che l'effetto di potenziamento derivi da un processo di inibizione della proliferazione e dell'attività dei linfociti T soppressori oltre che dall'aumento dell'espressione degli antigeni MHC sui linfociti B. L'inibizione, invece, sembra essere in relazione all'effetto negativo che le cellule NK, attivate dall'IFN, esercitano sui linfociti B.

MECCANISMI DI EVASIONE DEI VIRUS DALL'IFN

La maggior parte dei virus hanno a disposizione sofisticati meccanismi per bloccare le attività inibitorie esplicate dagli IFNs sulla replicazione virale, e indispensabili per superare questa linea di difesa dell'ospite. In natura, tuttavia, la capacità patogena dei virus e l'efficienza dei meccanismi del sistema IFN tendono a equilibrarsi a vantaggio sia del parassita che dell'ospite. E' infatti evidente che se l'azione antivirale degli IFNs eradicasse completamente l'infezione impedirebbe all'ospite di attivare le difese specifiche, più lente ad entrare in funzione ma che possono talvolta durare per tutta la vita del soggetto proteggendolo da successive reinfezioni. Al contrario una modesta attivazione del sistema IFN sarebbe accompagnata da una infezione grave e letale che porterebbe alla mancata diffusione del virus nella specie umana.

Le numerose strategie di evasione dall'IFN, che vengono utilizzate dai virus, mirano a bloccare principalmente le diverse componenti del sistema IFN quali il segnale dei recettori TLRs, la sintesi di IFN, il legame al recettore cellulare, la cascata del segnale JAK/STAT, l'induzione e l'attivazione delle proteine IFN-indotte (figura 10) (Sen, 2001; Weber et al., 2004).

Recentemente è stato osservato che sia le proteine A46R e A52R del virus vaccinico che la proteina NS3-4a del virus HCV legano TRIF bloccando, in questa maniera, la cascata del segnale indotta dal TLR3 (Schroder & Bowie, 2005).

Inoltre è noto che numerosi virus codificano proteine che inibiscono la sintesi di IFNs di tipo I: la oncoproteina E6 di HPV16 lega IRF-3 bloccandone la capacità di attivare il gene dell'IFN beta; la proteina NS1 del virus dell'influenza A blocca l'attivazione di IRF-3 inibendo la produzione di IFNs.

I virus possono sottrarsi alla azione biologica dell'IFN anche mediante la sintesi di proteine virali che legano le molecole di dsRNA, rendendole, in questo modo, non più disponibili per attivare le proteine effettrici dell'attività antivirale dell'IFN.

Infine un'altra strategia è quella di bloccare direttamente l'attivazione di specifiche proteine IFN-indotte che interferiscono con la replicazione del virus. Degli esempi sono la proteina NS5A di HCV che si lega alla PKR e ne impedisce la sua attivazione per dimerizzazione; lo stesso meccanismo d'azione è proprio anche della proteina P58 del virus dell'influenza.

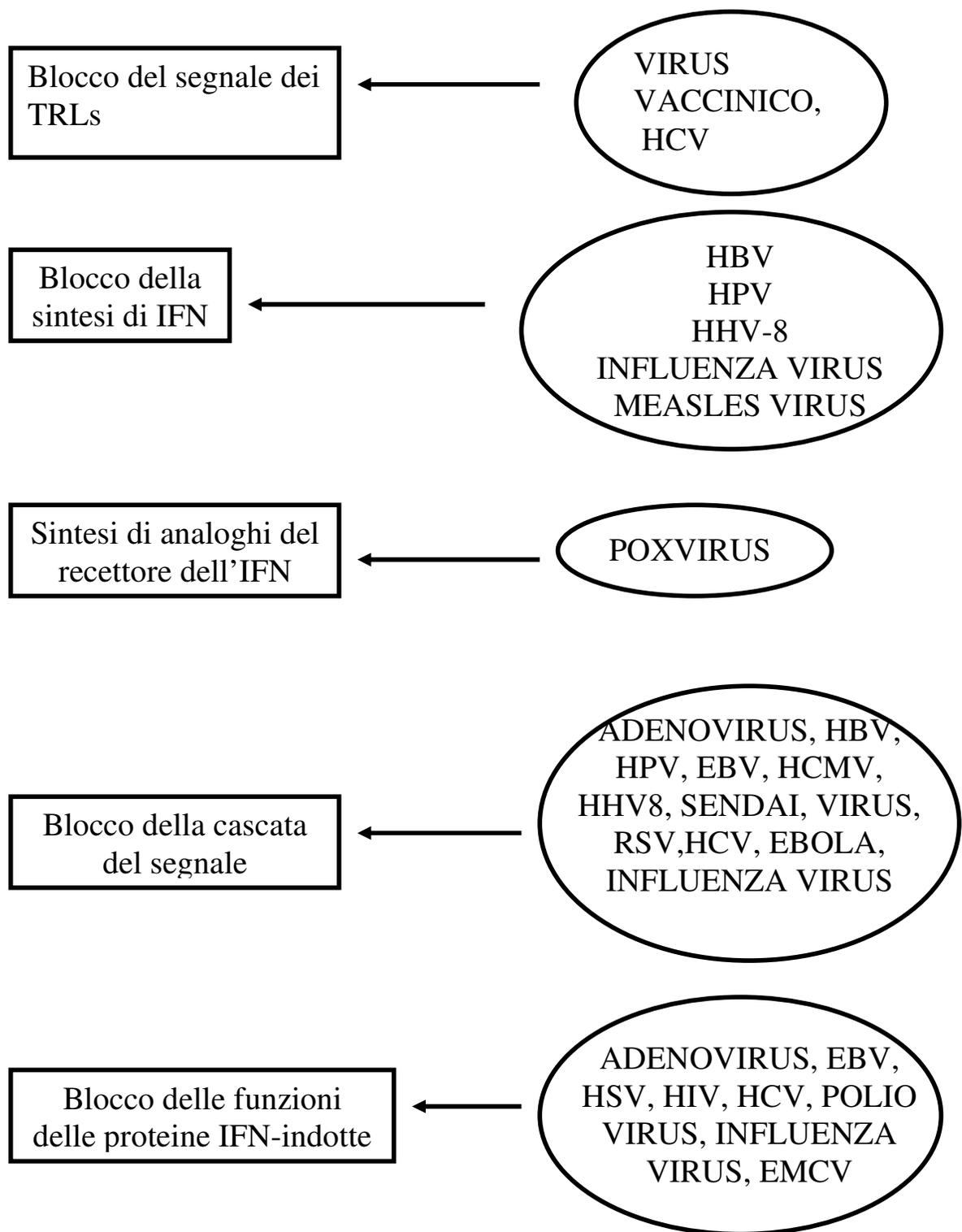


Figura 10. Meccanismi di interferenza dei virus con il sistema IFN. Alcuni virus che bloccano le principali componenti del sistema IFN.

L'IFN IN TERAPIA

Le sperimentazioni animali avviate subito dopo la scoperta dell'IFN, documentarono ben presto che la somministrazione di IFN esogeno in animali da esperimento poteva migliorare il decorso di molte infezioni virali. I risultati di questi studi incoraggiarono quindi il successivo utilizzo dell'IFN nella terapia di diverse patologie. Attualmente gli IFNs hanno trovato applicazione in numerose infezioni virali croniche; in alcuni tumori solidi, e in alcune neoplasie ematologiche. L'utilizzo dell'IFN nel trattamento delle infezioni virali manifesta la più valida efficacia solo nei confronti delle forme croniche nelle quali la produzione endogena dell'IFN è insufficiente, la replicazione del virus avviene ad un ritmo contenuto e gli antigeni virali compaiono in grande quantità sulla membrana cellulare. Nelle infezioni virali acute è stata dimostrata invece solo una sua possibile azione preventiva. Gli IFNs sono ampiamente impiegati nel trattamento delle infezioni virali, con risultati consolidati nella terapia dell'epatite cronica di virus C e B e nel trattamento di papillomi laringei, condilomi acuminati e crioglobulinemia mista.

Accanto a queste indicazioni dell'IFN può essere ricordato anche l'utilizzo di alcuni tipi di IFNs nella profilassi dell'infezione da rinovirus o nella terapia delle infezioni da herpesvirus o papovavirus. Non ultimo in ordine di importanza è l'utilizzo dell'IFN alfa in combinazione con altri farmaci nella terapia dell'infezione da virus dell'immunodeficienza umana (HIV) o dell'IFN gamma nella terapia della malattia granulomatosa cronica. La novità più significativa e del tutto recente in tema di trattamento dell'HCV è la disponibilità dell'IFN *consensus* e dell'IFN peghilato.

L'attività antitumorale degli IFNs si manifesta invece su forme tumorali diverse, indipendentemente dalla specifica eziopatogenesi. Benché i meccanismi d'azione attraverso i quali gli IFNs svolgono la loro attività

antineoplastica siano ancora poco conosciuti, è fondato ritenere che tale attività sia la risultante di una serie di effetti diretti antiproliferativi e differenziativi sulle cellule tumorali, nonché di effetti indiretti di immunoregolazione sulle cellule effettrici citotossiche e sui macrofagi. Le forme neoplastiche nelle quali è stata documentata una reale e consistente efficacia terapeutica dell'IFN sono: carcinoma renale; melanoma; sarcoma di Kaposi associato ad AIDS; tricoleucemia; leucemia mieloide cronica; linfoma non-Hodgkin (Moschos et al., 2005). Recentemente l'IFN è stato introdotto nel trattamento della sclerosi multipla (Javed & Reder, 2005).

IFN E VIRUS DELLA SARS

Numerosi studi hanno riportato che gli IFNs esercitano una significativa attività antivirale verso i coronavirus animali (Kato et al., 1986; Pei et al., 2001) e umani (Sperber & Harden, 1989).

Per quanto riguarda l'utilizzo degli IFNs come agenti antivirali nel trattamento dell'infezione da SARS-CoV l'argomento è invece al centro di una accesa discussione. Infatti i risultati ottenuti *in vitro* sulla valutazione della sensibilità del SARS-CoV all'azione antivirale dell'IFN alfa, beta e gamma sono piuttosto controversi. Infatti mentre alcuni autori asseriscono che il virus della SARS è sensibile all'azione antivirale dell' IFN beta e dell'IFN alfa giustificando un utilizzo clinico degli IFNs nell'infezione da SARS-CoV (Hensley et al., 2004; Stroher et al., 2004), in altri lavori si evidenzia che il virus della SARS è moderatamente sensibile all'azione dell'IFN beta e relativamente resistente all'azione antivirale degli IFN alfa e gamma se paragonato al virus della stomatite vescicolare, noto in letteratura per essere sensibile all'IFN (Cinatl et al., 2003).

E' inoltre importante sottolineare che la maggior parte dei dati riportati in letteratura (Zheng et al., 2004; Stroher et al., 2004; Hensley et al., 2004)

sull'attività antivirale degli IFN sulla SARS fanno riferimento alle unità internazionali di IFN senza prendere in considerazione l'attività specifica degli IFN che viene espressa come rapporto tra unità e peso (U/mg). E' noto infatti che le preparazioni di IFN alfa, beta e gamma possiedono una diversa attività specifica. In particolare l'IFN alfa possiede una attività specifica maggiore o uguale a quella dell'IFN beta, mentre l'IFN gamma possiede una attività specifica minore rispetto a quella delle preparazioni di IFN di tipo I.

La discussione sull'utilizzo degli IFNs per la terapia di pazienti colpiti da SARS è tuttora accesa anche a causa della discordanza dei risultati clinici.

Infatti mentre da una parte è stato osservato che il trattamento di pazienti affetti da SARS con IFN alfacon-1 e corticosteroidi porta alla riduzione dell'entità di alcuni sintomi quali gli anormali livelli di creatina chinasi e la diminuzione della saturazione dell'ossigeno (Loufty et al., 2003); dall'altra è stato dimostrato che la somministrazione di IFN alfa peghilato in macachi infettati con SARS-CoV riduce in maniera significativa la replicazione virale e il danneggiamento polmonare, rispetto ai macachi non trattati, solo se l'IFN è impiegato come profilassi. Infatti la somministrazione di IFN alfa peghilato dopo l'esposizione al virus della SARS determina nei macachi una diminuzione dei sintomi meno evidente (Haagmans et al., 2004; Enserink, 2004).

SCOPO DEL LAVORO

La SARS (acronimo di “*severe acute respiratory syndrome*”) è una malattia infettiva causata da un nuovo membro della famiglia *Coronaviridae* (SARS-CoV). Attualmente, nonostante i rapidi successi raggiunti nella caratterizzazione molecolare dell’agente eziologico, sono scarse le informazioni relative agli aspetti terapeutici e patogenetici associati all’infezione da SARS-CoV.

Il sistema IFN, come è noto, costituisce la prima linea di difesa dell’ospite ad una infezione virale. Esso esercita numerose attività biologiche all’interno dell’organismo; tra queste si possono annoverare l’attività antivirale, immunomodulante e antiproliferativa.

Gli IFNs vengono ampiamente impiegati nel trattamento delle infezioni virali, con risultati consolidati nella terapia di infezioni di virus ad RNA a polarità positiva, quali il virus dell’epatite cronica di tipo C e il coronavirus umano 229E (Sperber & Harden, 1989).

Alla luce di tali evidenze lo studio che abbiamo affrontato si prefigge di raggiungere i seguenti obiettivi:

- esaminare, *in vitro*, la sensibilità del SARS-CoV agli IFN alfa, beta e gamma;
- valutare, *in vitro*, la possibilità che gli IFNs di tipo I e II possano agire in maniera sinergica nei confronti di SARS-CoV;
- valutare, *in vitro*, l’esistenza di una correlazione tra i livelli di alcune proteine IFN-indotte e l’attività antivirale delle diverse preparazioni di IFNs utilizzate da sole o in combinazione verso il SARS-CoV;
- valutare e caratterizzare l’induzione del sistema IFN dopo infezione, *in vitro*, dei linfomonociti con SARS-CoV.

La valutazione dell’attività antivirale degli IFNs usati da soli o in combinazione nei confronti del virus della SARS è stata effettuata

infettando le cellule di rene di scimmia verde africana (Vero) con il virus della SARS [ceppo HSR1 isolato nei laboratori dell'Università Vita-Salute "S. Raffaele" di Milano, nell'Aprile del 2003 (Vicenzi et al., 2004)] e misurando le concentrazioni di IFN in grado di inibire il 50% (IC₅₀) della replicazione virale. Esperimenti analoghi sono stati eseguiti con il virus dell'encefalomiocardite (EMCV), il virus della stomatite vescicolare (VSV) e il virus della malattia del Newcastle (NDV) al fine di paragonare la sensibilità di SARS-CoV agli IFNs con virus noti in letteratura per essere molto sensibili all'attività antivirale degli IFNs.

Il livello dell'espressione di mRNAs che codificano alcune proteine indotte dall'IFN (MxA, ADAR-1, 2'-5'OAS e P56) è stato valutato mediante la metodica TaqMan in cellule Vero pre-trattate con gli IFNs. Successivamente i risultati ottenuti sono stati messi in relazione con quelli relativi alla valutazione della sensibilità del SARS-CoV agli IFNs.

La capacità di induzione di IFNs da parte di SARS-CoV, è stata invece valutata in seguito all'infezione, con il virus della SARS, di linfomonociti prelevati da soggetti sani. In particolare l'analisi è stata condotta a 24 e 48 ore dalla infezione, *in vitro*, dei linfomonociti. E' stato valutato il contenuto di IFN, misurato come attività antivirale, nel supernatante cellulare. E' stata inoltre valutata l'espressione genica dei diversi IFNs di tipo I (alfa1, alfa2, alfa5, alfa6, alfa8, alfa10, alfa13, alfa17, alfa21 e beta) mediante la metodica TaqMan.

I risultati di questa analisi sono stati successivamente paragonati con quelli ottenuti eseguendo gli stessi esperimenti con virus noti in letteratura (Aoki & Kawakita, 1996; Lam et al., 2005; Trottier et al., 2005) per la loro capacità di indurre IFNs e cioè l'NDV e il VSV.

MATERIALI E METODI

Gli esperimenti sul virus della SARS sono stati eseguiti presso il laboratorio di classe BL3 dell'Università Centro-Vita "S. Raffaele" di Milano e dell'Ospedale "Sandro Pertini" di Roma.

CELLULE, VIRUS E IFNs

Cellule di rene di scimmia verde africana (Vero) sono state mantenute in coltura ad una temperatura di 37°C, 90% di umidità e 5% di CO₂, in terreno "*minimum essential medium*" (MEM; Sigma Spa, Milano) contenente 10% di siero fetale bovino (FCS, HyClone, Perbio Science, Erembodegem-Aalst, Belgio), L-glutamina (Sigma Spa) ad una concentrazione di 2mM e 50µg/ml di gentamicina (Sigma Spa). La linea Vero è sensibile alla replicazione del virus del SARS-CoV, del EMCV, del VSV e dell' NDV.

Cellule di carcinoma polmonare umano (A549) sono state mantenute in coltura ad una temperatura di 37°C, 90% di umidità e 5% di CO₂, in terreno "*Dulbecco's modified Eagle's medium*" (D-MEM; Sigma Spa) contenente 10% di FCS, L-glutamina ad una concentrazione di 2 mM, 50 µg/ml di gentamicina e 2,5 mM di HEPES (Sigma Spa). La linea A549 è suscettibile alla replicazione virale del EMCV, del VSV e dell'NDV.

Cellule di rene bovino (MDBK) sono state mantenute in coltura ad una temperatura di 37°C, 90% di umidità e 5% di CO₂, in terreno MEM contenente 10% di FCS, L-glutamina ad una concentrazione di 2mM e 50µg/ml di gentamicina.

Il ceppo HSR1 di SARS-CoV (Vicenzi et al., 2004) è stato ottenuto inoculando su cellule Vero un campione di espettorato isolato da un paziente Italiano affetto da una forma atipica di polmonite, riscontrata al ritorno da un viaggio in Vietnam nel Marzo 2003. In seguito il virus è stato

propagato sulle cellule Vero e l'intero genoma è stato amplificato e sequenziato. Le sequenze genomiche di HSR1 sono conservate nella Banca del Gene con numero di accesso AY32397.

Sono stati impiegati i seguenti tipi di IFNs:

- IFN alfa2 ricombinante umano [(rIFNalfa2), Intron[®], Schering Corporation; attività specifica 200 MIU/mg];
- IFN alfa naturale [(nIFN alfa), IFN leucocitario, ALFA WASSERMAN; attività specifica 200 MIU/mg];
- IFN beta1b ricombinante [(Betaferon), Schering; attività specifica 32 MIU/mg];
- IFN gamma ricombinante [(Imukin[®]), Boehringer Ingelheim; attività specifica 20 MIU/mg];
- alcuni sottotipi dell'IFN alfa quali: IFN alfa 1b, alfa 5, alfa 6, alfa 8b, alfa 10a, alfa 14a, alfa 17a, alfa 21a, (PBL Biomedical Laboratories, New Brunswick, NJ; attività specifica compresa tra 50 e 250 MIU/mg).

TITOLAZIONE DEI VIRUS

Per la titolazione dei virus è stato utilizzato il metodo della diluizione limite. In particolare cellule Vero sono state seminate ($2,5 \times 10^4$ cellule/pozzetto) con terreno MEM al 10% di FCS, in piastre da 96 pozzetti (Falcon, Necton Dickinson Labware, Lincoln Parck, NJ) e incubate a 37°C. Dopo 24 ore, a monostrato confluento, le cellule sono state infettate eseguendo diluizioni seriali del virus (SARS-CoV o EMCV o VSV o NDV) in ragione 3. Sono stati dispensati 180µl di virus al primo pozzetto di tutte le file della piastra (eccetto due, adibite al controllo delle cellule) e 120µl di terreno MEM al 2% di FCS negli altri pozzetti ed in seguito sono

stati effettuati passaggi seriali di 60µl dal primo all'ultimo pozzetto. La piastra è stata incubata 1 ora a 37°C. Successivamente sono stati eseguiti due lavaggi con il terreno MEM per rimuovere il virus non adsorbito. La piastra, quindi, è stata incubata con 100µl di terreno MEM al 2% in ciascun pozzetto per un tempo necessario all'ottenimento di un effetto citopatico (CPE) visibile al microscopio ottico (24 ore per EMCV e VSV, 48 ore NDV e 72 ore per SARS-CoV). Il titolo virale è stato calcolato con il metodo di Reed e Muench (Reed & Muench, 1938) che viene di seguito illustrato.

Per ogni prova sperimentale eseguita in piastra si considera l'intervallo di diluizione entro il quale viene rilevata la dose infettante il 50% delle cellule (TCID₅₀). Successivamente si considerano le intere colonne comprese nell'intervallo e si calcola con un metodo statistico il quoziente di mortalità (rapporto tra il numero totale delle cellule vive e il numero totale delle cellule morte) assumendo che la proporzione di cellule morte vari linearmente con il logaritmo (Log) della diluizione. Il valore di TCID₅₀ viene ricavato per interpolazione ed è dato dalla seguente espressione:

$$\frac{h \text{ (\% di cellule morte alla diluizione superiore al 50\% - 50\%)}}{\text{(\% di cellule morte alla diluizione superiore al 50\% - \% di cellule morte alla diluizione inferiore al 50\%)}}$$

Nella formula h è il logaritmo dell'intervallo di diluizione. Il valore interpolato viene quindi aggiunto aritmeticamente al logaritmo della diluizione immediatamente superiore al 50% delle cellule morte per ottenere il logaritmo della TCID₅₀ da cui ricavare il titolo del virus.

TITOLAZIONE DEGLI IFNs

Il titolo dei vari IFNs è stato determinato mediante il saggio di inibizione del ciclo replicativo di EMCV nelle cellule A549.

Le unità di misura per il titolo degli IFNs sono state espresse come Unità Internazionali calcolate in base agli *standard* degli IFNs forniti dall'NIH (National Institutes of Health, Bethesda, MD codice Gg23-901-530; Gb23-902-531; Ga23-901-532).

Il saggio prevede la semina delle cellule A549 in piastre da 96 pozzetti ad una concentrazione di 3×10^4 cellule/pozzetto. Il giorno successivo, a monostrato confluyente, gli IFNs sono stati diluiti serialmente in ragione di 3 ed incubati a 37°C in atmosfera di CO₂ al 5%. Dopo 18-24 ore le cellule sono state lavate e infettate con 100µl del virus EMCV ad una molteplicità di infezione di 0,1 (MOI: 0,1 TCID₅₀/cellula). La piastra così trattata è stata incubata nuovamente a 37°C per 24 ore. In ogni piastra è prevista una serie di pozzetti per controllo della vitalità cellulare e per il controllo della replicazione virale. Dopo l'incubazione, è stata valutata l'attività antivirale degli IFNs (IFN alfa, IFN beta e IFN gamma) tramite lettura dell'effetto citopatico rilevabile dopo colorazione con una soluzione contenente lo 0,2% di cristal-violetto, il 20% di etanolo e il 3% di gluteraldeide (soluzione al 25%). Le cellule così fissate sono state eluite con acido acetico al 33% che permette la solubilizzazione del colorante. E' stata poi eseguita la lettura spettrofotometrica, delle piastre eluite, alla lunghezza d'onda di 570 nm. In base alla determinazione spettrofotometrica è stata calcolata la diluizione corrispondente al 50% dell'inibizione dell'effetto citopatico che corrisponde ad 1 unità (U) di IFN. I valori sono stati riportati in termini di Unità Internazionali.

VALUTAZIONE DELL'ATTIVITA' ANTIVIRALE DEGLI IFNs NEI CONFRONTI DELLA REPLICAZIONE DI SARS-CoV, EMCV, VSV E NDV

La valutazione dell'attività antivirale degli IFNs nei confronti di SARS-CoV è stata eseguita sulle cellule Vero. In particolare il saggio prevede la semina delle cellule Vero in piastre da 96 pozzetti ad una concentrazione di $2,5 \times 10^4$ cellule/pozzetto. Dopo 24 ore le cellule sono state trattate con i differenti tipi di IFNs (0-1.000.000 UI/ml di IFN alfa, IFN beta e IFN gamma) diluiti in ragione 3. Dopo 18-24 ore le cellule sono state lavate e infettate con 100µl del virus della SARS ad una molteplicità di infezione di 0,1 (MOI: 0,1 TCID₅₀/cellula). La piastra così trattata è stata incubata nuovamente a 37°C per 72 ore. In ogni piastra è prevista una serie di pozzetti per controllo della vitalità cellulare e per il controllo della replicazione virale.

Dopo 72 ore il supernatante è stato raccolto e titolato come illustrato precedentemente. Il titolo del virus è stato calcolato mediante il metodo di Reed e Muench ed è stato espresso in termini di TCID₅₀/ml. Le piastre sono state colorate con una soluzione contenente lo 0,2% di cristal-violetto, il 20% di etanolo e il 3% di gluteraldeide (soluzione al 25%). Le cellule così fissate sono state eluite con acido acetico al 33% che permette la solubilizzazione del colorante. E' stata poi eseguita la lettura spettrofotometrica, delle piastre eluite, alla lunghezza d'onda di 570 nm. L'attività antivirale dell'IFN è stata espressa, in log TCID₅₀/ml, come la riduzione del titolo del SARS-CoV, ottenuta confrontando il titolo del virus prodotto dalle cellule trattate con IFN con quello prodotto dalle cellule senza IFN, secondo la seguente formula:

$\frac{\log \text{TCID}_{50}/\text{ml} (-\text{IFN})}{\log \text{TCID}_{50}/\text{ml} (+\text{IFN})}$

Le stesse procedure sono state eseguite per l'EMCV, il VSV e l'NDV. I tempi necessari per osservare un CPE evidente al microscopio ottico sono stati 24 ore (EMCV e VSV) e 48 ore (NDV).

VALUTAZIONE DELL'ATTIVITA' ANTIVIRALE DI MISCELE DEGLI IFNs DI TIPO I E DI TIPO II SULLA REPLICAZIONE DI SARS-CoV

Per stabilire la presenza di una interazione di tipo sinergico, additivo oppure antagonista tra gli IFN di tipo I (IFN alfa o IFN beta) e l'IFN gamma è stato utilizzato un metodo sviluppato da Chou e Talalay (Chou & Talalay, 1984)

In particolare differenti diluizioni di IFN gamma (1-1000 UI/ml), sono state aggiunte a differenti concentrazioni di IFN beta o IFN alfa naturale (1-1000 UI/ml). Le miscele di IFNs sono state dispensate in una piastra con 96 pozzetti di cellule Vero ($2,5 \times 10^4$ cellule/pozzetto) e incubate per 24 ore. In seguito, le cellule sono state infettate con SARS-CoV, ad una MOI di 0,1. Dopo 72 ore il supernatante è stato raccolto e la resa virale è stata misurata in termini di TCID₅₀/ml, secondo il metodo di Reed e Muench.

L'indice di combinazione (IC), invece, è stato calcolato mediante la seguente equazione:

$$IC = (D_1/D_{x1}) + (D_2/D_{x2}) + \alpha[(D_1)(D_2)]/[(D_{x1})(D_{x2})] .$$

Il significato dei simboli utilizzati nell'equazione è il seguente:

- D_1 : indica la quantità di IFN 1 da somministrare alle cellule per ottenere una riduzione x della resa virale in combinazione con l'IFN 2 ;
- D_2 : indica la quantità di IFN 2 da somministrare alle cellule per ottenere una riduzione x della resa virale in combinazione con l'IFN 1;

- Dx_1 : indica la concentrazione dell'IFN 1 che, somministrato singolarmente, determina una percentuale x di riduzione;
- Dx_2 : indica la concentrazione dell'IFN 2 che, somministrato singolarmente, determina una percentuale x di riduzione;
- α : coefficiente che determina se i due IFN sono esclusivi.

Se $\alpha=0$ i due IFN hanno un'azione tra loro esclusiva, se $\alpha=1$ i due IFN hanno un'azione tra loro non esclusiva.

Per stabilire il tipo di relazione che sussiste tra i due tipi di IFNs è necessario, dunque, calcolare l'IC:

se $IC > 1$ i due farmaci (in questo caso gli IFNs) sono antagonisti;

se $IC = 1$ i due farmaci determinano un effetto additivo;

se $IC < 1$ i due farmaci sinergizzano.

RT-TAQMAN PER GLI mRNAs DELLE PROTEINE MxA, ADAR-1, 2'-5'OAS E P56

La tecnologia della Real Time PCR basata sul saggio fluorogenico 5' nucleasico (TaqMan) è stata impiegata per quantificare i livelli degli mRNAs delle proteine MxA, 2'-5 OAS, ADAR-1 e P56. In particolare cellule Vero sono state trattate con 5 ng/ml di IFN alfa, IFN beta o IFN gamma, e con delle miscele di IFN beta o IFN alfa (5 ng/ml) + IFN gamma (5 ng/ml) e incubate a 37°C in atmosfera di CO₂ al 5%. Dopo 24 ore l'RNA totale è stato estratto da 5x10⁶ cellule Vero utilizzando il metodo della guanidina isotiocianato (TRIZOL, Gibco BRL, NY, USA). L'RNA estratto è stato risospeso in 50µl di acqua sterile priva di RNAsi ed è stato incubato ad una temperatura di 60°C per 10 minuti in modo da eliminare le strutture secondarie presenti nell'RNA.

Per la retrotrascrizione 10µl dei campioni di RNA sono stati aggiunti a 10µl di una miscela contenente deossiribonucleotidi trifosfato [(dNTP), Roche, Milano, Italia] ad una concentrazione finale di 0,5 mM, 0,8 U/µl di inibitore dell'RNasi (Roche), 300 nM del primer antisenso specifico per ciascuna proteina (tabella 2), 0,8 U/µl di Trascrittasi Inversa [Moloney Murine Leukaemia Virus (M-MuLV), Roche] e una soluzione per la reazione contenente 50 mM di Tris-HCl, 40 mM di KCl, 6 mM di MgCl₂ e 10 mM di ditioeritritolo (Applied Biosystem, Monza, Italia).

Le condizioni per la reazione di RT sono state: 1 ora a 42°C e 15 minuti a 65°C.

Successivamente, le reazioni TaqMan sono state eseguite in apposite piastre a reazione ottica da 96 pozzetti (Applied Biosystem) nelle quali sono state dispensate 25µl di una Mastermix Universale per il TaqMan (Applied Biosystem), 20µl di cDNA, 300nM di ciascun primer senso (tabella 2) e 100 nM di sonda fluorogenica specifica per ciascuna proteina (tabella 3). Il volume finale di 50µl è stato ottenuto mediante aggiunta di acqua distillata. Lo strumento ABI Prism 7000 (Applied Biosystem) è stato impostato per eseguire i seguenti cicli: 50°C per 2 minuti ; 95°C per 10 minuti , seguiti da 45 cicli a 95°C per 15 secondi, e 60°C per 1 minuto.

Proteina	Tipo di primer	Sequenza del primer
MxA	senso	5'-CTGCCTGGCAGAAAACTTAC-3'
	antisenso	5'-CTCTGTTATTCTCTGGTGAGTCTCCTT-3'
2'-5'OAS	senso	5'-TCAGCGAGGCCAGTAATCTTG-3'
	antisenso	5'-TCAGCCATTGCCAGCATATTT-3'
ADAR-1	senso	5'-AATCTGTCACATTGGGTTACCTTTT-3'
	antisenso	5'-AATGCACTCCCATCTCTTGTC-3'
P56	senso	5'-TGAAGAAGCTCTAGCCAACATGTC-3'
	antisenso	5'-GAGCTTTATCCACAGAGCCTTTTC -3'

Tabella 2. Primers di MxA, 2'-5'OAS, ADAR-1, P56 (MWG Biotech AG) utilizzati per la reazione di retrotrascrizione e la metodica TaqMan. La sequenza nucleotidica dei primers del GAPDH non è stata indicata perché la sequenza è stata fornita direttamente dall'Applied Biosystems ("Assay on demand").

Proteina	Sequenza della sonda
MxA	6-carbossifluoresceina (6-FAM)-5'- CATCACACATATCTGTAAATCTCTGCCCTGTTAGA-3'- tetrametilrodamina (TAMRA)
2'-5'OAS	6-FAM- TCCAGTTGACCCAACCAATAATGTGAGTGG-TAMRA
ADAR-1	6-FAM-5'-AGCCAAGGGCATCTGACCCGTG-3'- TAMRA
P56	6-FAM-5'-TATGTCTTTCGATATGCAGCCAAGTTTACCG-3'- TAMRA

Tabella 3. Sonde dell'MxA, 2'-5' OAS, ADAR-1, P56 utilizzate per la metodica TaqMan (MWG Biotech AG). La sequenza nucleotidica della sonda del GAPDH non è stata indicata perché la sonda è stata fornita direttamente dall'Applied Biosystems ("Assay on demand").

A causa della possibile variabilità, associata alla fase di estrazione dell'RNA dalle cellule, si è reso necessario eseguire una reazione TaqMan per la rilevazione dell'mRNA della gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH), (proteina il cui gene viene espresso in modo costitutivo nell'ambito di uno stesso tipo cellulare).

La quantificazione relativa degli mRNAs di ciascuna proteina analizzata, normalizzata con il gene della GAPDH, è data dalla seguente formula:

$$2^{-\Delta\Delta C}$$

dove $\Delta\Delta C = \Delta C_{T,q} - \Delta C_{T,cb}$ dove ΔC_T è la differenza, in cicli soglia, tra il gene considerato e quello di riferimento; q e cb sono due diverse condizioni di analisi (condizione -IFN, condizione + IFN).

RT-TAQMAN PER GLI mRNAs DEGLI IFNs DI TIPO I

Cellule mononucleate di sangue periferico (PBMCs) sono state separate dal plasma di donatori sani e risospese in terreno RPMI 1640 medium (Sigma Spa) con FCS al 10%. Sono state poi infettate con SARS-CoV, VSV o NDV per 24 e 48 ore ad una MOI di 0,1. Successivamente l'RNA totale è stato estratto da 2×10^6 PBMCs utilizzando il TRIZOL (Gibco BRL, NY, USA). L'RNA estratto è stato risospeso in 50 μ l di acqua sterile priva di RNAsi ed è stato incubato ad una temperatura di 60°C per 10 minuti in modo da eliminare le strutture secondarie presenti nell'RNA.

L'RNA estratto è stato sottoposto ad una reazione di retrotrascrizione e successivamente ad una reazione TaqMan seguendo il protocollo precedentemente riportato. Per la quantificazione relativa degli mRNAs degli IFN alfa -1, -2, -5, -6, -8, -10, -13, -17,-21 e dell'IFN beta, sono stati utilizzati i primers e le sonde riportate nelle tabelle 4 e 5.

I livelli di mRNAs degli IFNs sono stati normalizzati con i livelli di espressione del GAPDH, come descritto precedentemente nel testo.

TIPI DI IFNs	Tipo di primer	Sequenza del primer
alfa2	senso	5'-CTTGAAGGACAGACATGACTTTGGA-3'
	antisenso	5'-GGATGGTTTCAGCCTTTTGGGA-3'
alfa6	senso	5'-TCCATGAGGTGATTCAGCAGAC-3'
	antisenso	5'-GCTGCTGGTAAAGTTCAGTATAGAGTTT-3'
alfa8	senso	5'-CCTTCTAGATGAATTCTACATCGAACTTG-3'
	antisenso	5'-ACTCTATCACCCCCACTTCCTG-3'
alfa13/1	senso	5'-CTTCAACCTCTTTACCACAAAAGATTC-3'
	antisenso	5'-TGCTGGTAGAGTTCGGTGCA-3'
alfa 5,-10,-17,-21	senso	5'-GAAGAATCTCTCCTTTCTCCTGCC-3'
	antisenso	5'-ATGGAGGACAGAGATGGCTTG-3'

Tabella 4. Primers degli IFN alfa1, -2, -5, -6, -8, -10, -13, -17,-21 (MWG Biotech AG) utilizzati per la reazione di retrotrascrizione e la metodica TaqMan La sequenza nucleotidica dei primers dell'IFN beta non è stata indicata perché la sequenza è stata fornita direttamente dall'Applied Biosystems ("Assay on demand").

TIPI DI IFNs	Sequenza della sonda
alfa 2	6-carbossifluoresceina(6-FAM) -5'-TTCCCCAGGAGGAGTTGGCAACC-3'- tetrametilrodamina (TAMRA)
alfa 6	6-FAM -5'-CTGTTGCTTGGGATGAGAGGCTTCTAGAC-3'- TAMRA
alfa 8	6-FAM-5'-CAGCTGAATGACCTGGAGTCCTGTGTG-3'- TAMRA
alfa 13/1	6-FAM-5'-TGCTTGGGATGAGGACCTCCTAGACA-3'- TAMRA
alfa 5,-10,-17,-21	6-FAM-5'-AGGAGTTTGATGGCAACCAGTTCCAGAAG-3'- TAMRA

Tabella 5. Sonde degli IFN alfa1, -2, -5, -6, -8, -10, -13, -17,-21 e di IFN beta utilizzate per la metodica TaqMan (MWG Biotech AG) La sequenza nucleotidica della sonda dell'IFN beta non è stata indicata perché la sonda è stata fornita direttamente dall' Applied Biosystems (“Assay on demand”).

ANALISI STATISTICA

Tutti i risultati sono stati riportati come la media \pm la deviazione standard.

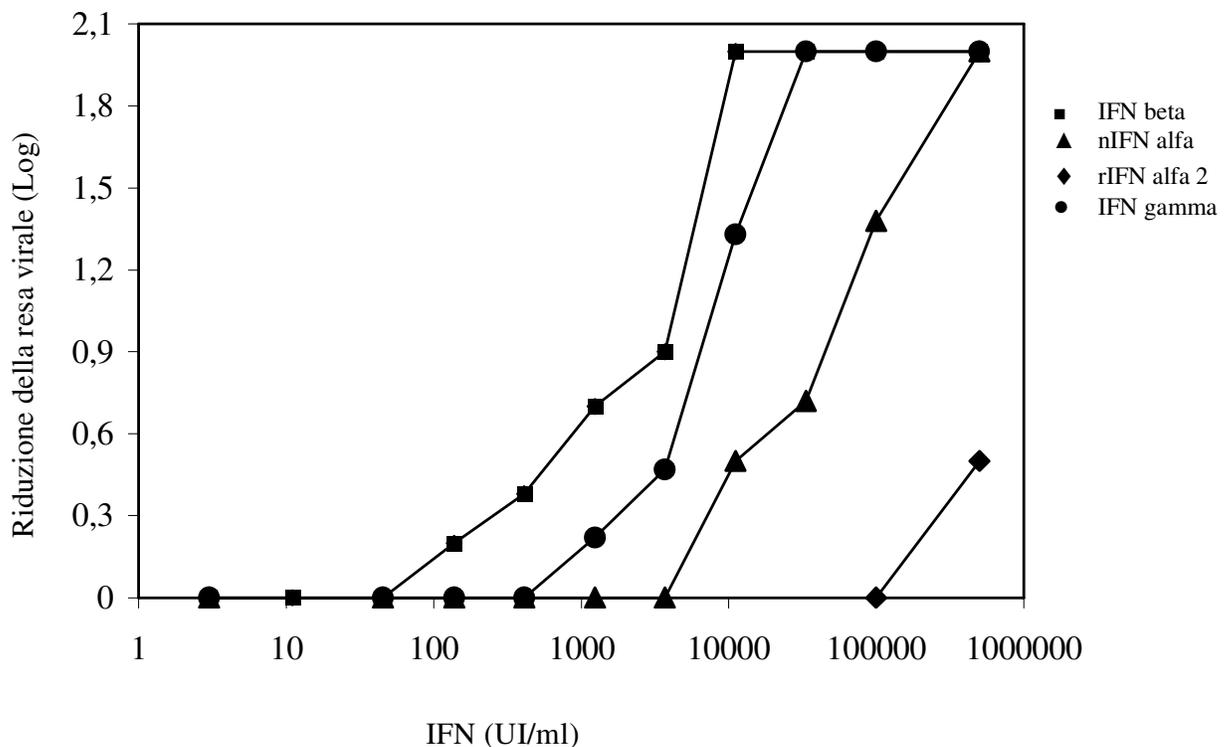
La significatività statistica è stata determinata con il t-test di Student.

RISULTATI

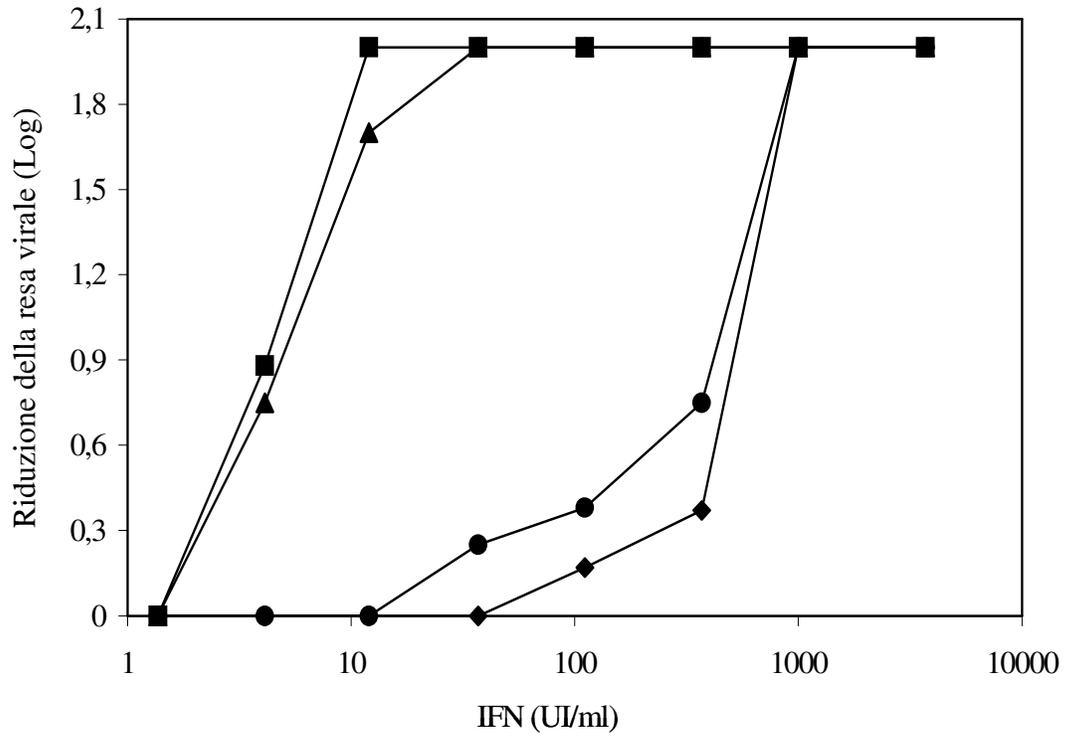
ATTIVITÀ ANTIVIRALE DEGLI IFNs ALFA, BETA E GAMMA NEI CONFRONTI DEL SARS-COV

Gli esperimenti di valutazione dell'attività antivirale dell'IFN alfa naturale (nIFN alfa) e ricombinante (rIFN alfa2), dell'IFN beta (rIFN beta1b) e dell'IFN gamma (rIFN gamma) nei confronti di SARS-CoV sono stati eseguiti in cellule Vero. In particolare le cellule Vero sono state trattate con differenti concentrazioni di IFNs (1-100.000 UI/ml) per 20 ore. Successivamente le cellule sono state infettate con SARS-CoV (il ceppo HSR1) ad una MOI di 0,1 TCID₅₀/cellula. Trascorse 72 ore dall'infezione è stato raccolto il supernatante cellulare ed il titolo di SARS-CoV è stato misurato in termini di TCID₅₀/ml, secondo il metodo di Reed e Muench. I risultati di un singolo esperimento rappresentativo sono illustrati nella figura 11 (pannello A).

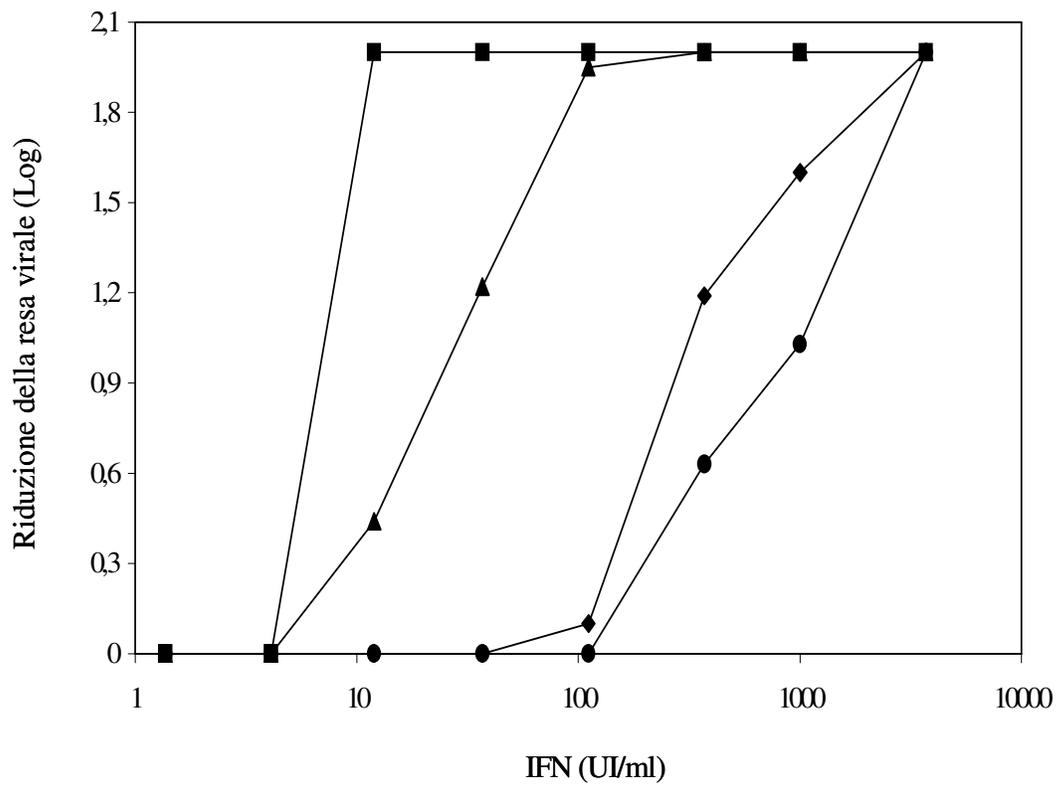
Pannello A-SARS-CoV



Pannello B- EMCV



Pannello C-VSV



Pannello D-NDV

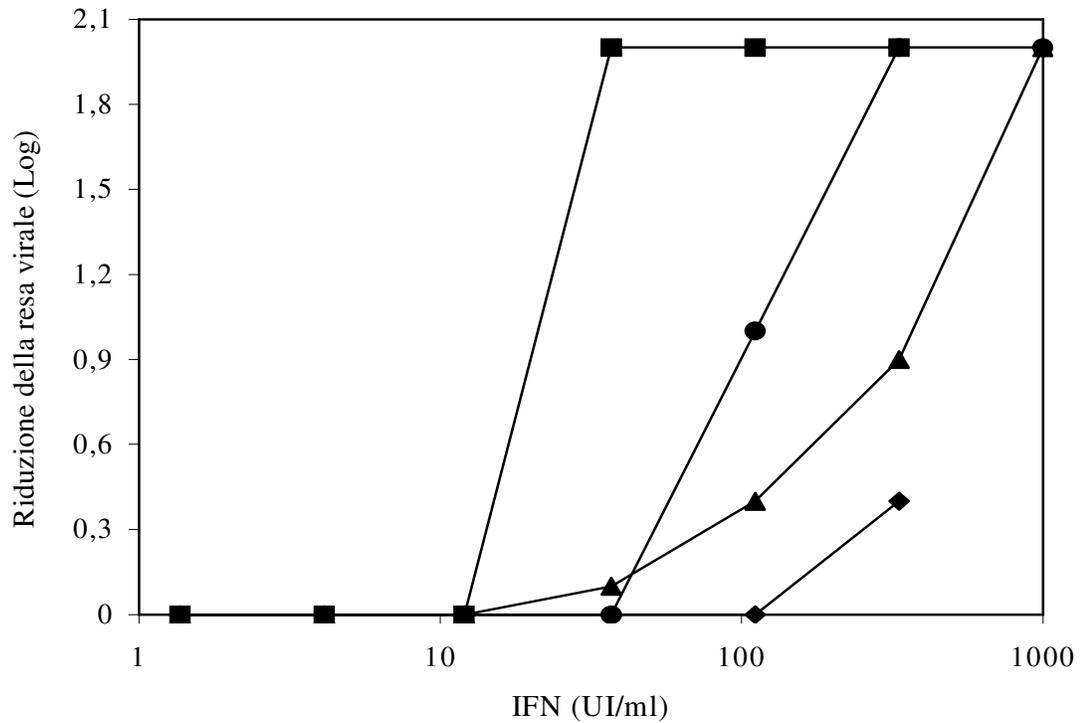


Figura 11. Resa virale del coronavirus della sindrome acuta respiratoria severa [SARS-CoV (pannello A)], del virus dell'encefalomiocardite [EMCV (pannello B)], del virus della stomatite vescicolare [VSV (pannello C)], del virus della malattia di New Castle [NDV (pannello D)] in seguito al pre-trattamento di cellule Vero con differenti concentrazioni di IFN beta, IFN alfa naturale (n), IFN alfa2 ricombinante (r) e IFN gamma per un tempo di 20 ore. In seguito le cellule sono state infettate con SARS-CoV, EMCV, VSV e NDV (MOI: 0,1 TCID₅₀/cellula). La riduzione del titolo virale, in seguito al pre-trattamento delle cellule Vero con gli IFNs, è stata espressa in logaritmo (Log) TCID₅₀/ml ed è stata determinata come il rapporto tra la resa virale (-IFN) e la resa virale (+IFN).

Come si può osservare l'IFN beta sembra essere più efficace nell'inibire la replicazione di SARS-CoV rispetto agli altri IFNs saggiati (nIFN alfa, rIFN alfa2, IFN gamma). In particolare, quando le cellule Vero vengono trattate con 4000 UI/ml di IFN beta si osserva una riduzione della resa virale di SARS-CoV del 90%. Per ottenere lo stesso effetto impiegando nIFN alfa e IFN gamma occorrono, invece, concentrazioni più elevate, rispettivamente di 2 e 12 volte rispetto alla concentrazione impiegata per l'IFN beta. E' interessante osservare che rIFN alfa2 anche a concentrazioni >100.000 UI/ml non presenta una significativa attività antivirale nei confronti di SARS-CoV.

Successivamente è stato valutato un parametro molto importante dal punto di vista applicativo, ovvero, l'attività specifica dei differenti tipi di IFNs, espressa in termini di concentrazione inibente il 50% della replicazione virale (IC_{50}), calcolata in ng/ml (tabella 6).

Tabella 6. Sensibilità del SARS-CoV all'azione antivirale degli IFNs. I risultati sono espressi come media \pm deviazione standard di tre distinte determinazioni. (IFN, interferone, SARS-CoV, coronavirus della sindrome acuta respiratoria severa, EMCV, virus dell'encefalomiocardite, VSV, virus della stomatite vescicolare, NDV, virus della malattia di New Castle; IC₅₀, dose inibente il 50% della replicazione virale).

Tipo di IFNs	IFN beta		rIFN alfa2		nIFN alfa		IFN gamma	
	UI/ml	ng/ml	IU/ml	ng/ml	IU/ml	ng/ml	IU/ml	ng/ml
SARS-CoV	200,01 \pm 42,11	6,25 \pm 1,31	3 x 10 ⁵ \pm 10 ⁵	1500 \pm 500	6500,01 \pm 930,21	32,51 \pm 4,62	2000,02 \pm 240,44	100,11 \pm 12,30
EMCV	3,01 \pm 0,71	0,09 \pm 0,02	400,11 \pm 150,02	2,00 \pm 0,75	2,81 \pm 0,31	0,012 \pm 0,0015	80,25 \pm 39,52	4,45 \pm 1,95
VSV	4,21 \pm 0,98	0,12 \pm 0,03	220,42 \pm 20,31	1,10 \pm 0,12	15,12 \pm 0,82	0,075 \pm 0,004	270,14 \pm 50,15	13,50 \pm 2,51
NDV	15,11 \pm 4,21	0,46 \pm 0,13	300,31 \pm 140,12	1,51 \pm 0,72	75,23 \pm 20,14	0,37 \pm 0,11	60,12 \pm 28,21	3,05 \pm 1,42

I risultati ottenuti indicano che l'IFN beta (IC_{50} : 6,25 ng/ml) ha una attività antivirale maggiore verso il SARS-CoV rispetto all'nIFN alfa (IC_{50} : 32 ng/ml) e all'IFN gamma (IC_{50} : 100 ng/ml). Concentrazioni più elevate di l'rIFN alfa2 sono inoltre necessarie per inibire del 50% la replicazione del SARS-CoV (IC_{50} : 1500 ng/ml) rispetto all'IFN beta.

Parallelamente è stata valutata l'attività antivirale degli IFNs nei confronti di virus noti in letteratura per essere sensibili all'attività antivirale dell'IFN quali il EMCV, il VSV e l'NDV.

I risultati ottenuti indicano che il EMCV (Figura 11 pannello B) e il VSV (Figura 11 pannello C) sono sensibili all'azione antivirale dell'IFN alfa, beta e gamma. In particolare per inibire del 50% la replicazione di EMCV sono necessarie 3 UI/ml di IFN beta o di nIFN alfa. Al contrario concentrazioni più elevate di IFN gamma e di rIFN alfa2, rispettivamente 80 UI/ml e 400 UI/ml, sono necessarie per inibire del 50% la replicazione di EMCV su cellule Vero. Risultati analoghi sono stati ottenuti valutando l'attività antivirale delle diverse preparazioni di IFNs nei confronti del VSV. Infatti concentrazioni di IFN beta (4 UI/ml) e di nIFN alfa (15 UI/ml) inferiori rispetto alle concentrazioni di IFN gamma (270 UI/ml) e di rIFN alfa2 (280 UI/ml) sono necessarie per inibire la replicazione del VSV del 50%.

E' stato infine valutata la sensibilità dell' NDV all'azione antivirale degli IFNs, perché caratterizzato, analogamente a quanto osservato per il SARS-CoV, da una lenta cinetica di replicazione su cellule Vero.

I risultati indicano che il pre-trattamento di cellule Vero con le diverse preparazioni di IFNs (rIFN alfa2, nIFN alfa, IFN beta e IFN gamma) comporta una significativa riduzione della resa virale di NDV (figura 11 pannello D).

Analogamente a quanto osservato per il EMCV e il VSV, sia l'IFN beta che l'nIFN alfa sono gli IFNs più efficaci nell'inibire la replicazione dell'NDV mentre l'attività antivirale della preparazione di rIFN alfa2 risulta significativamente più debole.

Confrontando i valori delle IC₅₀ delle diverse preparazioni di IFNs ottenute per il SARS-CoV, il EMCV, il VSV e il NDV si osserva che sono necessarie concentrazioni significativamente maggiori di IFN alfa, beta e gamma per inibire la replicazione di SARS-CoV rispetto a quelle necessarie per inibire la replicazione di virus IFN-sensibili. In particolare dai risultati, espressi come media e deviazione standard di tre distinte determinazioni, si evince che i valori della IC₅₀ delle diverse preparazioni di IFNs sono comprese tra 6,25 ng/ml (per l'IFN beta) e 1500 ng/ml (per l'rIFN alfa2) nei confronti nel virus della SARS e tra 0,01 ng/ml (per nIFN alfa) e 13,5 ng/ml (per IFN gamma) nei confronti di EMCV, VSV e NDV (tabella 6).

Avendo osservato che la preparazione di IFN alfa naturale esercita nei confronti di SARS-CoV una attività antivirale maggiore rispetto alla preparazione ricombinante abbiamo valutato, successivamente, la possibilità che alcuni dei sottotipi di IFNs alfa, di cui è costituita la miscela dell'nIFN alfa, fossero più efficaci rispetto ad altri nell'inibire la replicazione del virus della SARS su cellule Vero.

In particolare l'attività antivirale di alcuni sottotipi di IFN alfa (IFN alfa -1, -5, -6, -7a, -8b, -10a, -17a e -21a), disponibili nel nostro laboratorio, è stata valutata qualitativamente nei confronti di SARS-CoV, EMCV, VSV e NDV.

I risultati ottenuti evidenziano che sono necessarie concentrazione dei sottotipi di IFN alfa -1, -5, -6, -7a, -8b, -10a, -17a e -21a maggiori di 1×10^5 UI/ml o di 0,81 µg/ml per inibire la replicazione di SARS-CoV su

cellule Vero (tabella 7). Al contrario, analogamente a quanto osservato per le preparazioni di IFN alfa (naturale e ricombinante), beta e gamma, i sottotipi di IFNs alfa inibiscono la replicazione dei virus IFN sensibili (EMCV, VSV e NDV).

Tabella 7. Sensibilità del SARS-CoV all'azione antivirale di alcuni sottotipi di IFNs alfa. (IFN, interferone, SARS-CoV, coronavirus della sindrome acuta respiratoria severa, EMCV, virus dell'encefalomiocardite, VSV, virus della stomatite vescicolare, NDV, virus della malattia di New Castle).

SOTTOTIPI DI IFNs ALFA	DOSE MASSIMA DI IFN SAGGIATA (UI/ml)	INIBIZIONE DELLA FORMAZIONE DELL'EFFETTO CITOPATICO			
		SARS-CoV	EMCV	VSV	NDV
IFN alfa 1	1 x10 ⁵	no	sì	sì	sì
IFN alfa 5	1 x10 ⁵	no	sì	sì	sì
IFN alfa 6	1 x10 ⁵	no	sì	sì	sì
IFN alfa 7a	1 x10 ⁵	no	sì	sì	sì
IFN alfa 8b	1 x10 ⁵	no	sì	sì	sì
IFN alfa 10a	1 x10 ⁵	no	sì	sì	sì
IFN alfa 17a	1 x10 ⁵	no	sì	sì	sì
IFN alfa 21a	1 x10 ⁵	no	sì	sì	sì

ATTIVITA' ANTIVIRALE DELLE MISCELE DI IFNs DI TIPO I II NEI CONFRONTI DEL SARS-COV

Considerando che gli IFNs di tipo I (IFN alfa e IFN beta) e l'IFN di tipo II (IFN gamma), hanno un effetto antivirale modesto nei confronti della replicazione di SARS-CoV su cellule Vero quando si impiegano a basse concentrazioni, e che, come è noto, essi agiscono legando recettori differenti sulla membrana cellulare, abbiamo valutato se l'impiego di una miscela di IFN di tipo I e II aumentasse l'attività antivirale degli IFNs nei confronti del virus della SARS.

In particolare differenti diluizioni di IFN gamma (1-1000 UI/ml), sono state aggiunte a differenti concentrazioni di IFN beta o nIFN alfa (1-1000 UI/ml). Successivamente gli IFNs usati in combinazione sono stati distribuiti sul monostrato confluyente di cellule Vero per un tempo di 20 ore. In seguito le cellule sono state infettate con SARS-CoV ad una MOI di 0,1 TCID₅₀/cellula e trascorse 72 ore il supernatante è stato raccolto e il prodotto virale è stato retrotitolato.

I risultati indicano che quando 100 UI/ml di IFN gamma vengono aggiunte a concentrazioni crescenti di IFN beta si ottiene una diminuzione significativa della resa virale SARS-CoV (Figura 12).

In particolare, quando le cellule Vero vengono trattate con 137 UI/ml di IFN beta in combinazione a 100 UI/ml di IFN gamma il prodotto virale di SARS-CoV è ridotto del 99%.

Al contrario se le stesse concentrazioni di IFN beta o gamma vengono impiegate separatamente la resa virale viene inibita rispettivamente del 43% e dello 0%.

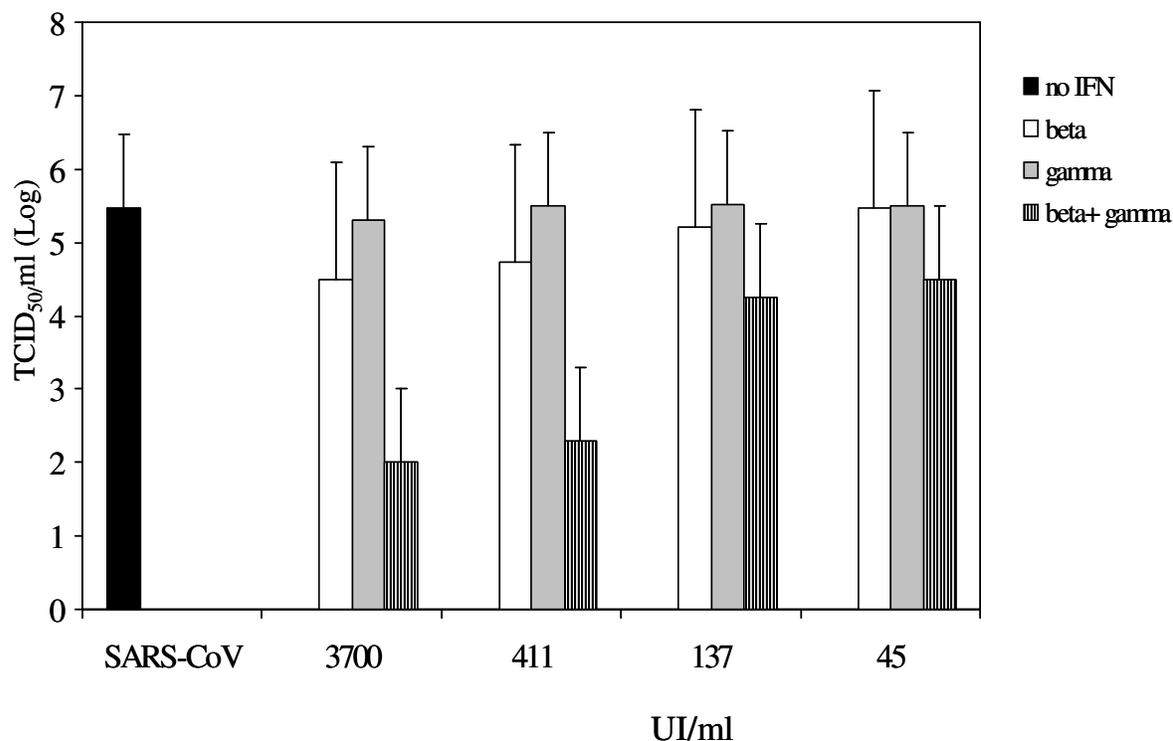


Figura 12. Effetto della combinazione degli IFN beta e gamma sulla replicazione del coronavirus della sindrome acuta respiratoria severa (SARS-CoV). Cellule Vero in monostrato sono state trattate con IFN beta e IFN gamma separatamente o in combinazione e incubate per 24 ore. In seguito sono state infettate con SARS-CoV (MOI: 0,1 TCID₅₀/cellula). Il virus è stato raccolto a 72 ore dall'infezione e la resa virale è stata determinata come descritto nel testo. Il titolo di SARS-CoV è espresso come il Log TCID₅₀/ml.

IFN beta + gamma vs IFN beta $p < 0,05$;

IFN beta + gamma vs IFN gamma $p < 0,05$.

Risultati analoghi sono stati ottenuti anche utilizzando la preparazione di nIFN alfa in combinazione con quella di IFN gamma (figura 13). Infatti quando le cellule Vero sono state trattate con una miscela contenenti 137 UI/ml di nIFN alfa e 100 UI/ml di IFN gamma la resa virale è ridotta del 99%.

Al contrario se le stesse unità di nIFN alfa o gamma vengono somministrate separatamente la replicazione di SARS-CoV non viene inibita affatto.

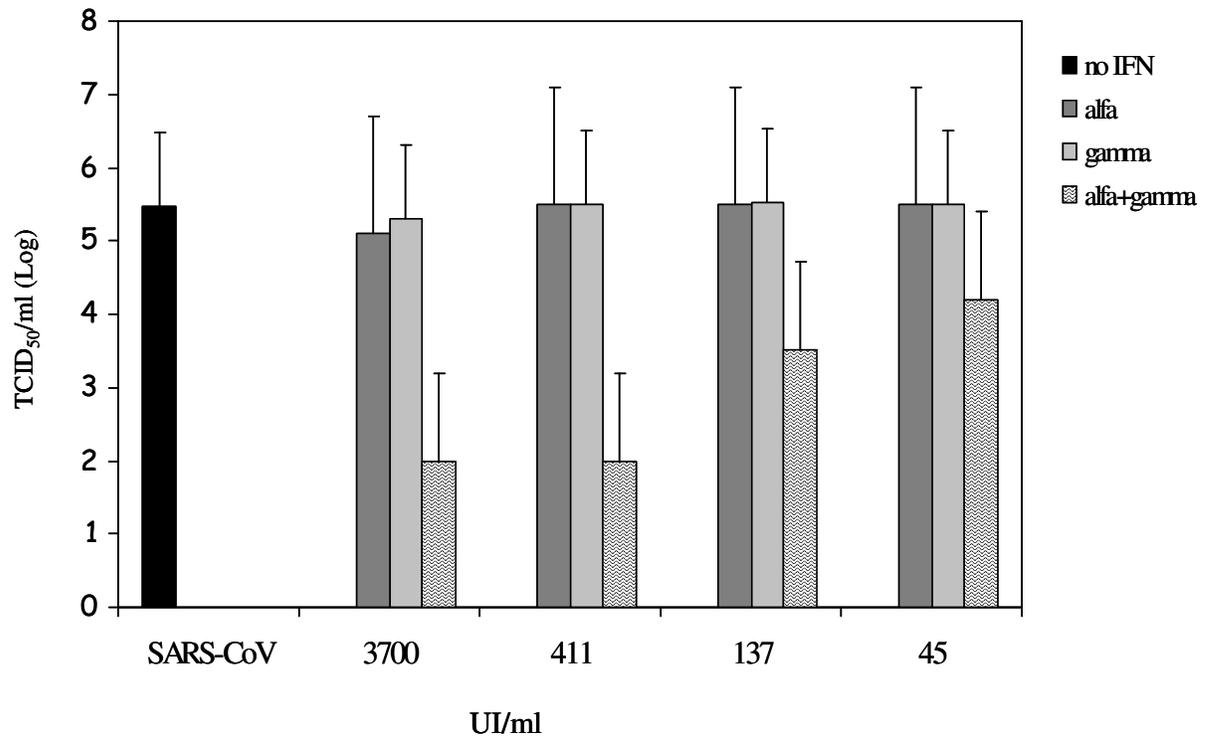


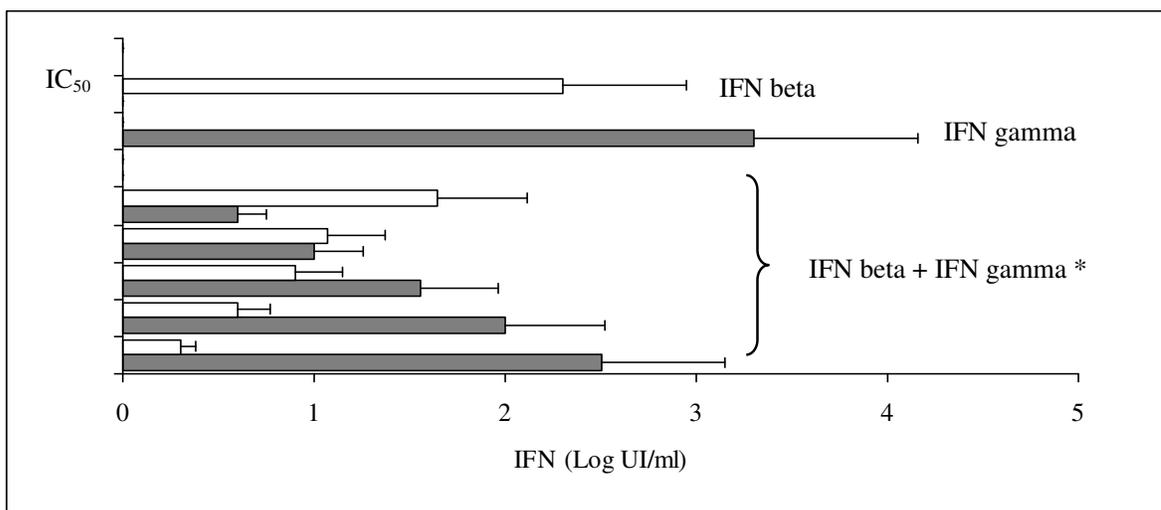
Figura 13. Effetto della combinazione degli IFN alfa e gamma sulla replicazione del coronavirus della sindrome acuta respiratoria severa (SARS-CoV). Cellule Vero in monostrato sono state trattate con IFN alfa naturale e IFN gamma separatamente o in combinazione e incubate per 24 ore. In seguito sono state infettate con SARS-CoV (MOI: 0,1 TCID₅₀/cellula). Il virus è stato raccolto a 72 ore dall'infezione e la resa virale è stata determinata come descritto nel testo. Il titolo di SARS-CoV è espresso come il Log TCID₅₀/ml.

IFN alfa + gamma vs IFN alfa p<0,05;

IFN alfa + gamma vs IFN gamma p<0,05

L'aumento della sensibilità del virus della SARS agli IFNs di tipo I e II usati in combinazione risulta ancora più evidente quando si analizzano i valori delle IC_{50} delle diverse preparazioni di IFNs verso SARS-CoV come è schematizzato nei grafici sotto riportati (figure 14).

Pannello A



Pannello B

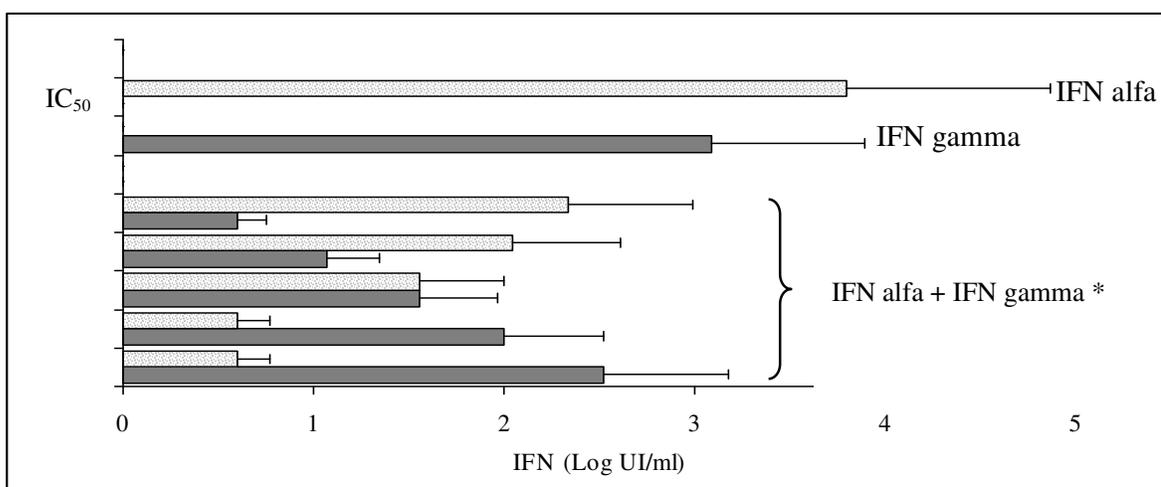


Figura 14. Effetto della combinazione degli IFNs di tipo I [beta (pannello A) e alfa (pannello B)] e gamma (pannello A e B) sulla replicazione del coronavirus della

sindrome acuta respiratoria severa (SARS-CoV). Cellule Vero in monostrato sono state trattate con gli IFNs di tipo I e l'IFN gamma separatamente o in combinazione e incubate per 24 ore. In seguito sono state infettate con SARS-CoV (MOI:0.1 TCID₅₀/cellula). Il virus è stato raccolto a 72 ore dall'infezione e il titolo del virus è stata determinata come descritto nel testo. I dati sono espressi in termini di IC₅₀ e rappresentano la media ± la deviazione standard di tre distinte determinazioni.

*: p<0,05 confrontato con i valori degli IC₅₀ degli IFN di tipo I e gamma somministrati singolarmente.

In particolare il calcolo dei valori di IC₅₀ rivela un aumento significativo dell'attività antivirale degli IFN di tipo I e II usati in combinazione nei confronti di SARS-CoV. Infatti le IC₅₀ delle preparazioni di IFN alfa, beta e gamma usate singolarmente sono più elevate se paragonate alle IC₅₀ di IFN beta o alfa usate in combinazioni all'IFN gamma (p<0,05).

Succesivamente siamo andati a caratterizzare che tipo di interazione (additiva o sinergica) esistesse tra i due tipi di IFN nei confronti del virus della SARS. A tale scopo abbiamo applicato il metodo di Chou and Talalay (Chou & Talalay, 1984) con il quale è stato possibile calcolare l'indice di combinazione (IC) tra gli IFN di tipo I (nIFN alfa e IFN beta) e l'IFN gamma.

Secondo questo metodo:

se IC >1 i due farmaci (in questo caso molecole di IFN) sono antagonisti;

se IC =1 i due farmaci determinano un effetto additivo;

se IC <1 i due farmaci sinergizzano.

L'analisi dei valori degli IC verso SARS-CoV evidenzia che gli IC relativi alle diverse concentrazioni degli IFNs di tipo I e II sono sempre inferiori a 1 (Tabelle 8 e 9).

Tabelle 8-9. Indice di combinazione per le miscele di IFNs di tipo I (beta e alfa) e IFN gamma nei confronti della replicazione di SARS-CoV nelle cellule Vero. (IC, indice di combinazione, IFN, interferone, SARS-CoV, coronavirus della sindrome acuta respiratoria severa).

IFN beta (ng/ml)	IFN gamma (ng/ml)	Indice di combinazione
0,13	50	0,06
0,007	16,65	0,13
0,014	5,55	0,7
0,13	1,85	0,2

nIFN alfa (ng/ml)	IFN gamma (ng/ml)	Indice di combinazione
0,18	50	0,01
0,02	16,65	0,07
0,13	5,55	0,2
0,18	1,85	0,4

^aL'indice di combinazione è stato calcolato attraverso il Calcsyn software (Biosoft, Ferguson, MO) che utilizza il metodo di Chou e Talalay. Valori di IC < 1, =1, e > 1 indicano rispettivamente sinergismo, effetto additivo ed effetto antagonistico. IC <0,1 indica un elevato livello di sinergismo

In conclusione, i risultati nel loro insieme indicano che, sebbene gli IFNs di tipo I (nIFN alfa e IFN beta) e l'IFN gamma, agendo separatamente, non

riescano ad esplicare un'azione efficace contro la replicazione di SARS-CoV, qualora usati in combinazione sinergizzano inducendo uno stato antivirale molto significativo.

ESPRESSIONE DEGLI mRNAs DI MxA, ADAR-1, 2'-5' OAS E P56 IN CELLULE VERO TRATTATE CON I DIVERSI TIPI DI IFNs

Allo scopo di caratterizzare l'azione antivirale dei differenti tipi di IFNs verso il SARS-CoV, abbiamo valutato se i livelli di espressione genica di alcune proteine IFN indotte (MxA, ADAR-1, 2'-5'OAS e P56) correlassero con la diversa attività antivirale degli IFN alfa, IFN beta e l'IFN gamma, quando usati singolarmente o in combinazione, verso il SARS-CoV.

In particolare cellule Vero sono state trattate per 20 ore con 5 ng/ml di IFN alfa, IFN beta e l'IFN gamma separatamente o con miscele di IFN alfa o beta e IFN gamma (5ng/ml). Successivamente i livelli di espressione degli mRNAs di MxA, ADAR-1, 2'-5'OAS e P56 sono stati valutati mediante la metodica TaqMan.

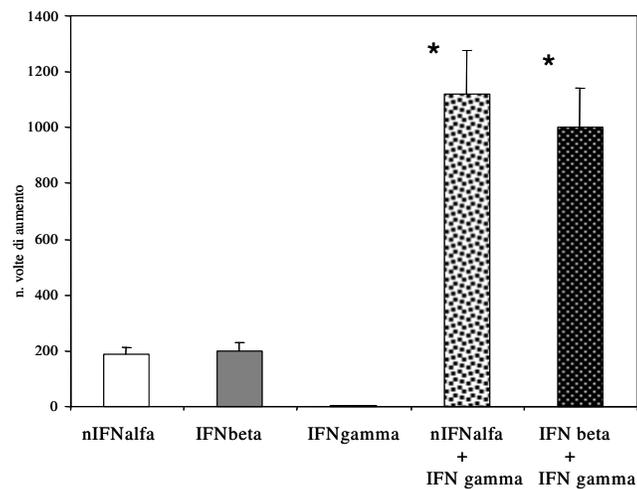
I risultati ottenuti indicano che tutte le proteine esaminate, ad eccezione dell'MxA-mRNA, vengono indotte nelle cellule Vero dagli nIFN alfa, beta e gamma. In particolare è stato osservato che l'IFN gamma non induce la sintesi della proteina MxA a differenza degli IFNs di tipo I.

Dagli esperimenti condotti è stato interessante osservare che l'nIFN alfa, sebbene possieda una antivirale significativamente minore rispetto all'IFN beta nei confronti del SARS-CoV (tabella 6); induce nelle cellule Vero la trascrizione di una quantità di copie di mRNAs per le proteine MxA, ADAR-1, 2'-5'OAS e P56 paragonabile a quella che si ottiene dopo trattamento con l'IFN beta.

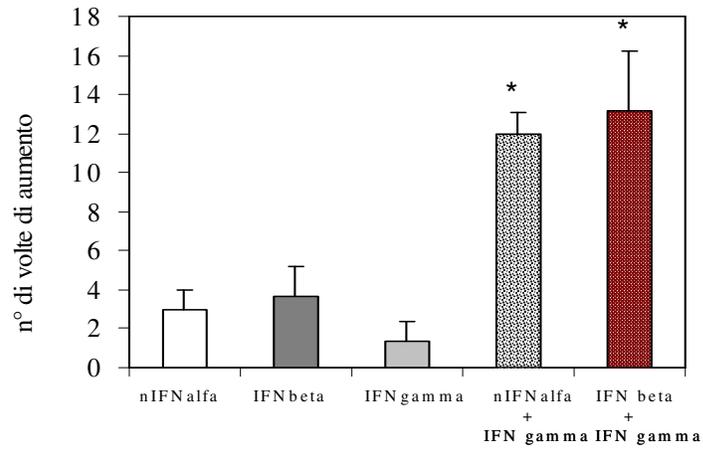
Successivamente abbiamo valutato l'induzione di MxA, ADAR-1, 2'-5'OAS e P56 dopo trattamento delle cellule Vero con miscele di un IFN di tipo I (nIFN alfa o IFN beta) e IFN gamma. I risultati indicano che il trattamento delle cellule Vero con una miscela di un IFN di tipo I e IFN gamma induce maggiori livelli di mRNAs per le proteine MxA, ADAR-1, 2'-5'OAS e P56, rispetto a quelli che si ottengono trattando le stesse cellule con gli IFNs alfa, beta e gamma separatamente (figura 15).

In conclusione i risultati indicano che il livello di induzione di MxA, ADAR-1, 2'-5'OAS e P56, in seguito a pretrattamento delle cellule Vero con IFNs, non correla in maniera significativa con la differente attività antivirale di nIFN alfa, IFN beta e IFN gamma nei confronti del SARS-CoV.

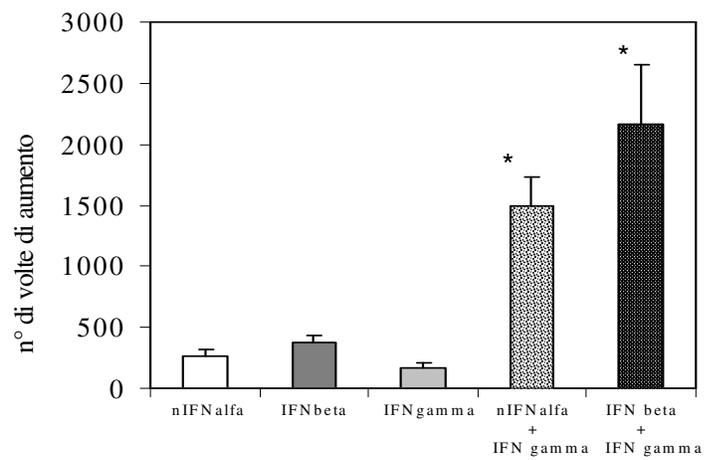
Pannello A-MxA-mRNA



Pannello B-ADAR-1-mRNA



Pannello C-2'-5'-OAS mRNA



Pannello D- P56 mRNA

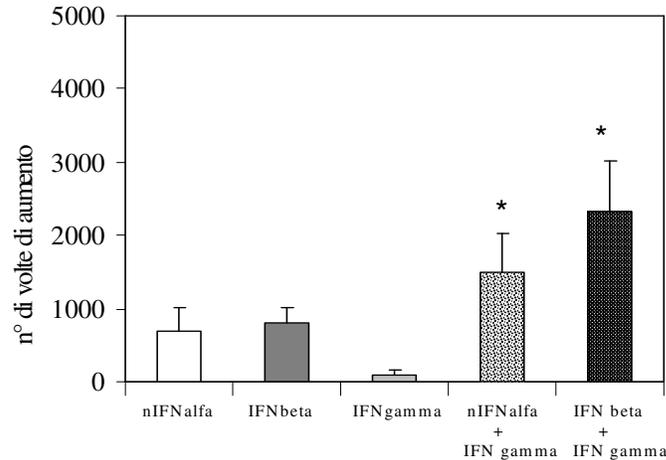


Figura 14. Effetto degli IFNs sull'induzione degli mRNAs che codificano per le proteine MxA (pannello A), ADAR-1 (pannello B), 2'-5' OAS (pannello C) e P56 (pannello D) nelle cellule Vero. Cellule Vero sono state trattate con 5ng/ml di IFN alfa naturale (n), 5ng/ml di IFN beta, 5ng/ml di IFN gamma, oppure con una miscela di IFN di tipo I (alfa naturale o beta) e IFN gamma (5ng/ml per ciascuno tipo di IFNs) per un tempo di 24 ore. L'RNA totale è stato estratto da 5×10^6 cellule Vero e successivamente sono stati determinati i livelli di mRNAs che codificano per le proteine MxA, ADAR-1, 2'-5' OAS e P56 mediante la metodica TaqMan. I dati sono espressi come aumenti dei livelli dell'espressione degli mRNAs di ciascuna proteina confrontato con i valori basali di espressione degli stessi trascritti ottenuti dalle cellule Vero non trattate con IFN. I livelli di mRNAs sono stati normalizzati usando, come gene di riferimento, il gene della gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi. L'aumento dei trascritti delle proteine MxA, ADAR-1, 2'-5' OAS e P56, espressi come n. di volte di aumento, sono stati determinati utilizzando la formula $2^{-\Delta\Delta C}$ (vedi "materiali e metodi").

Per ciascuna proteina sono state fatte tre determinazioni riportate come media \pm la deviazione standard .

*: $p < 0,05$ confrontato con l'aumento dei livelli degli mRNAs che codificano per le proteine MxA, ADAR-1, 2'-5' OAS e P56 nelle cellule Vero trattate con nIFN alfa, IFN beta e IFN gamma separatamente

VALUTAZIONE DELL'ATTIVITA' ANTIVIRALE NEI SUPERNATANTI DI LINFOMONOCITI INFETTATI CON IL SARS-CoV

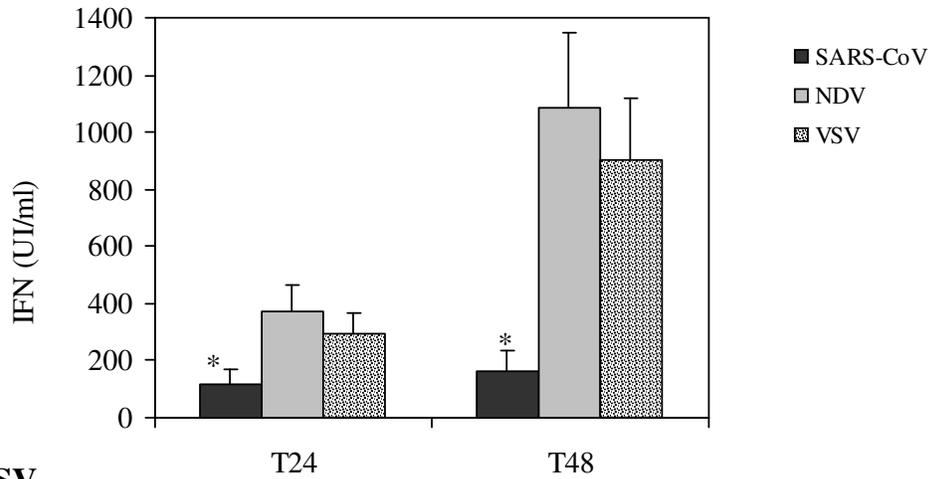
Come già ricordato la seconda parte dello studio è stata dedicata alla valutazione e caratterizzazione dell'attivazione del sistema IFN da parte del SARS-CoV. In particolare i linfomonociti provenienti da soggetti sani sono stati infettati con SARS-CoV (MOI: 0,1 TCID₅₀/cellula) ed è stata determinata la presenza di IFN nel supernatante cellulare, raccolto 24 e 48 ore dopo l'infezione, valutandone l'attività antivirale nei confronti sia del virus dell'EMCV in cellule di adenocarcinoma polmonare umano (A549) sia del VSV in cellule di rene bovino (MDBK). Esperimenti analoghi sono stati eseguiti infettando i linfomonociti con i virus VSV o NDV, noti in letteratura per la loro capacità di indurre IFN (Aoki & Kawakita, 1996; Lam et al., 2005; Trottier et al., 2005).

I risultati ottenuti indicano che il virus della SARS induce a 24 e 48 ore la sintesi di IFNs nei linfomonociti provenienti da soggetti sani, raggiungendo un livello massimo di espressione a 48 ore (figura 15). In particolare la quantità di IFN prodotta è 165 ± 70 UI/ml nel sistema EMCV-A549 e 280 ± 50 UI/ml nel sistema VSV-MDBK.

I risultati inoltre indicano che il VSV e l' NDV, analogamente a quanto osservato per il SARS-CoV, inducono la sintesi di IFN a 24 e 48 ore con un picco massimo di induzione a 48 ore. In particolare a 48 ore nel supernatante dei linfomonociti infettati con VSV si osserva una attività antivirale di 900 ± 220 UI/ml nel sistema EMCV-A549 e di 790 ± 160 UI/ml nel sistema VSV-MDBK, mentre in quello dei linfomonociti infettati con NDV l'attività antivirale è di 1080 ± 260 UI/ml nel sistema EMCV-A549 e di 960 ± 170 UI/ml nel sistema VSV-MDBK.

I risultati indicano che i virus VSV e NDV inducono una maggiore sintesi di IFN rispetto al virus della SARS ($p < 0,05$).

A549-EMCV



MDBK-VSV

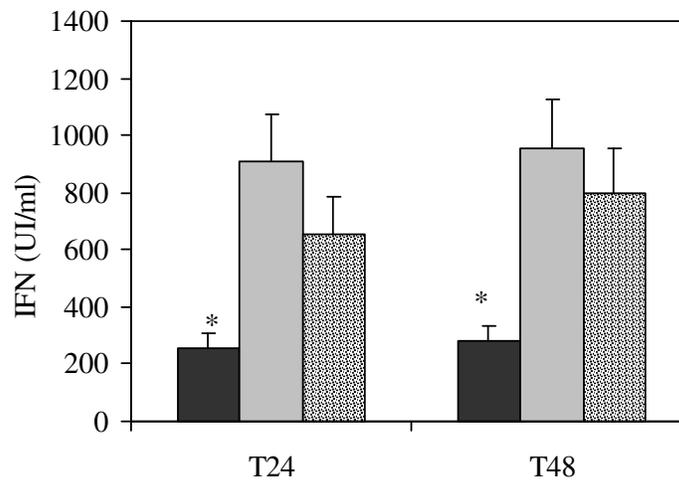


Figura 15. Attività antivirale del supernatante proveniente dai linfomonociti infettati con il coronavirus della sindrome acuta respiratoria severa (SARS-CoV), il virus della stomatite vescicolare (VSV) o il virus della malattia di New Castle (NDV). In particolare i linfomonociti sono stati infettati con SARS-CoV, NDV o VSV (MOI: 0,1 TCID₅₀/cellula) e la presenza di IFN nel supernatante cellulare è stata determinata, a 24 e 48 ore dopo l'infezione, valutandone l'attività antivirale nei confronti sia del virus EMCV in cellule di carcinoma polmonare umano (A549) sia del VSV in cellule di rene di bovino (MDBK).

*:p<0,05 confrontato con l'attività antivirale del supernatante proveniente dai linfomonociti infettati con VSV o NDV.

CARATTERIZZAZIONE DEGLI IFNs PRODOTTI DAI LINFOMONOCITI INFETTATI CON IL SARS-CoV

Avendo osservato la presenza di attività antivirale nel supernatante dei linfomonociti infettati con il virus della SARS, successivamente abbiamo caratterizzato quali tipi di IFNs di tipo I venivano indotti.

In particolare mediante la metodica TaqMan abbiamo valutato l'espressione genica di alcuni sottotipi di IFNs alfa (-1, -2, -5, -6, -8, -10, -13, -17,-21) e dell'IFN beta nei linfomonociti infettati con SARS-CoV per 24 o 48 ore. Parallelamente abbiamo confrontato i dati ottenuti con quelli relativi a linfomonociti infettati con il VSV o l'NDV.

Come si può osservare dal grafico (figura 16), il virus della SARS induce l'espressione degli mRNAs di IFNs alfa (-1, -2, -5, -6, -8, -10, -13, -17,-21) e dell'IFN beta sia a 24 che a 48 ore. In particolare il sottotipo di IFN alfa maggiormente indotto, sia a 24 che a 48 ore dall'infezione dei linfomonociti con SARS-CoV, è il sottotipo di IFN alfa -2. Al contrario gli mRNAs degli IFNs prodotti in quantità minore sono i sottotipi di IFN alfa -5,-10,-17,-21.

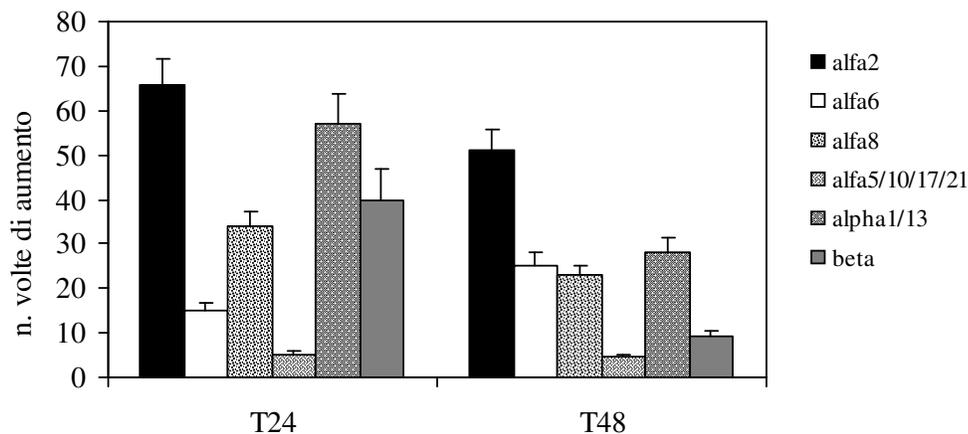


Figura 16. Livelli di espressione degli mRNAs che codificano per gli IFNs di tipo I prodotti dai linfomonociti in seguito all'infezione con il coronavirus della sindrome respiratoria acuta severa (SARS-CoV). L'RNA totale, estratto dai linfomonociti infettati

con SARS-CoV per 24 o 48 ore, è stato analizzato mediante la metodica TaqMan. I livelli di mRNAs degli IFNs sono stati normalizzati usando come gene di riferimento il gene della gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi. L'aumento degli mRNAs degli IFNs, espressi come n. di volte di aumento, sono stati determinati utilizzando la formula $2^{-\Delta\Delta C}$ (vedi "materiali e metodi").

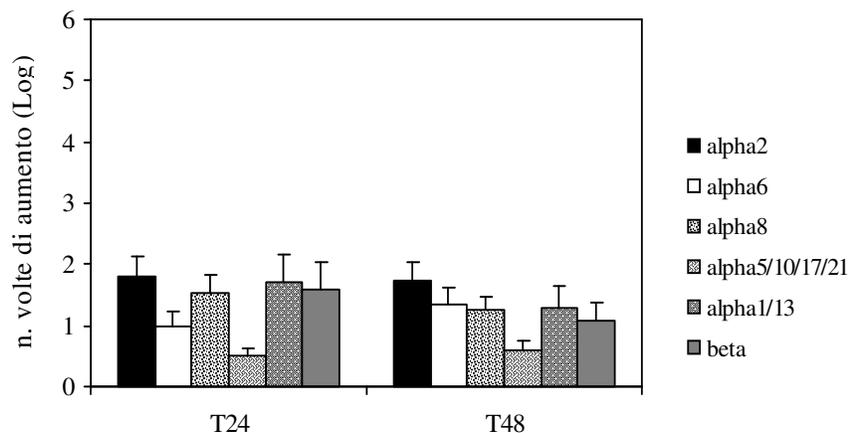
Risultati analoghi sono stati ottenuti analizzando l'espressione genica degli IFN di tipo I nei linfomonociti infettati con VSV o NDV per 24 o 48 ore.

Dal confronto dei livelli di espressione di alcuni sottotipi di IFNs alfa e dell' IFN beta indotti nei linfomonociti in seguito all'infezione con SARS-CoV, VSV o NDV (figura 17), si evince che il profilo di induzione degli IFNs di tipo I è diverso e specifico per ciascun virus.

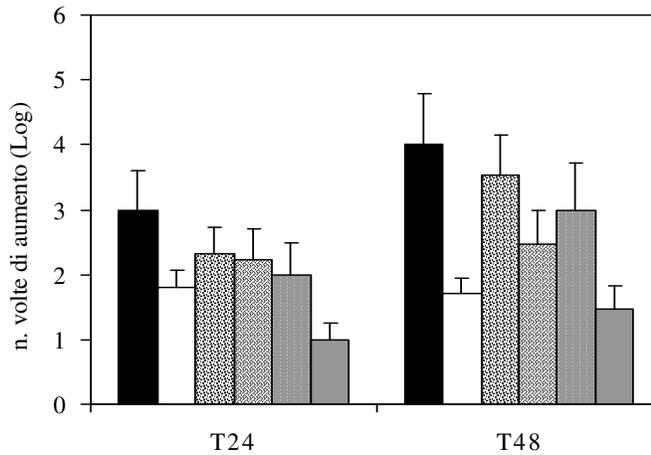
Interessante è stata l'osservazione che il VSV e NDV inducono una maggiore sintesi dei sottotipi di IFNs alfa e dell' IFN beta rispetto al SARS-CoV ($p < 0,05$).

In conclusione i risultati nel loro insieme indicano che il virus della SARS induce l'attivazione genica di alcuni sottotipi di IFNs alfa e dell'IFN beta. Tuttavia il livello degli mRNAs degli IFNs indotti dal SARS-CoV sono inferiori rispetto a quelli indotti dall'NDV e dal VSV.

Figura 17. Pannello A-SARS-CoV



Pannello B-NDV



Pannello C-VSV

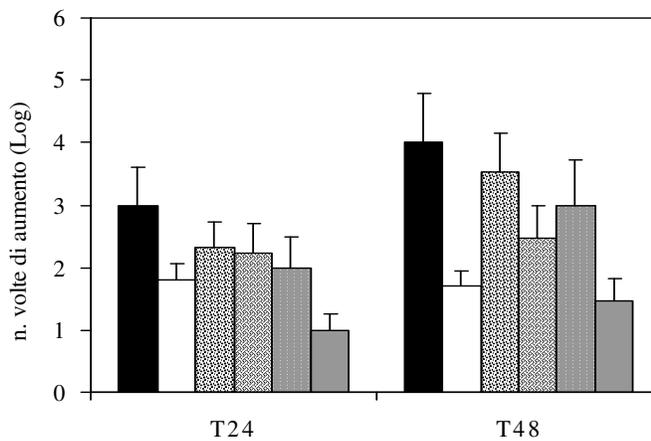


Figura 17. Livelli di mRNAs di alcuni sottotipi di IFNs alfa e dell'IFN beta nei linfomonociti infettati con il coronavirus della sindrome respiratoria acuta severa (SARS-CoV-pannello A), il virus della malattia di New Castle (NDV-pannello B) e il virus della stomatite vescicolare (VSV-pannello C) L'RNA totale, estratto dai linfomonociti infettati con SARS-CoV, NDV o VSV per 24 o 48 ore, è stato analizzato mediante la metodica TaqMan. I livelli di mRNAs sono stati normalizzati usando, come gene di riferimento, il gene della gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi. L'aumento degli mRNAs degli IFNs, espressi come n. di volte di aumento, sono stati determinati utilizzando la formula $2^{-\Delta\Delta C}$ (vedi "materiali e metodi").

DISCUSSIONE

La “Sindrome Acuta Respiratoria Severa” (SARS) è una patologia infettiva che si è diffusa inizialmente nel sud della Cina alla fine del 2002 e che ha destato molta preoccupazione in vari paesi del mondo a causa dell’esito letale a cui è associata.

L’agente eziologico della SARS è stato identificato in maniera definitiva solo alla fine di Marzo 2003 in alcuni laboratori di Hong Kong, Stati Uniti e Germania, dopo la sua comparsa in Hong Kong, Toronto, Singapore e Vietnam. L’agente infettivo della SARS è un virus appartenente alla famiglia *Coronaviridae*. Si tratta di un coronavirus nuovo rispetto agli altri, da tempo noti, come causa di malattie infettive nell’uomo e negli animali (Ksiazek et al., 2003).

La notizia riguardo alla relazione di causalità tra il nuovo membro della famiglia dei coronavirus (SARS-CoV) e la SARS è stata stabilita e diffusa dall’Organizzazione Mondiale della Sanità sulla base della dimostrazione che l’infezione risponde ai postulati di Koch.

Da quando l’OMS ha dichiarato la fine dell’epidemia mondiale di SARS nel luglio 2003 (Fujii et al., 2004) sono stati registrati solo alcuni casi sporadici di SARS tra il 2003 e 2004 che, a differenza dei casi del 2002-2003, non hanno portato alla diffusione rapida del virus nella popolazione umana (Zhong, 2004).

La mancanza di conoscenze dettagliate relative alla patogenesi dell’infezione da virus della SARS ha, tuttavia, reso quanto mai urgente l’individuazione di agenti antivirali specifici per il trattamento dell’infezione da SARS-CoV. Attualmente, infatti, non è nota una terapia efficace nei confronti di SARS-CoV.

Nel primo periodo della diffusione dell’epidemia i farmaci maggiormente impiegati sono stati gli antinfiammatori steroidei e alcuni agenti antivirali

quali la Ribavirina e il Kaletra, quest'ultimo assunto esclusivamente in associazione alla ribavirina.

In particolare è stato osservato che gli steroidi, per mostrare effetti efficaci nei confronti di SARS-CoV, devono essere assunti a dosi elevate. Inoltre è stato osservato che la ribavirina, se non somministrata in associazione con gli steroidi o con il Kaletra, non manifesta effetti anti-SARS-CoV evidenti (Fujii et al., 2004; Stroher et al., 2004). Alcuni studi (Booth et al., 2003; Avendano et al., 2003) hanno anche dimostrato che la ribavirina determina effetti collaterali importanti, quali l'insorgenza di un'anemia emolitica e una riduzione considerevole dell'emoglobina, associati ad una significativa tossicità e ad un conseguente aggravamento del quadro clinico dei pazienti. Questo ha comportato, nel Maggio del 2003, l'invito alla sospensione della sua somministrazione nel trattamento della SARS, formulato dal Ministero della Sanità Canadese.

Gli IFNs vengono ampiamente impiegati nel trattamento delle infezioni virali, con risultati consolidati nella terapia di infezioni di virus ad RNA a polarità positiva, quali il virus dell'epatite cronica di tipo C e i coronavirus umani e animali (Sperber & Harden, 1989; Jordan & Derbyshire, 1995; Uetsuka et al., 1996; Pei et al., 2001).

Come noto, infatti, il sistema IFN, costituito da una classe di proteine appartenenti alla famiglia delle citochine, esplica sia un'azione antivirale diretta sulla replicazione della maggior parte dei virus animali, sia un'azione indiretta potenziando la risposta immunitaria (sia innata che adattativa) dell'organismo attivata nell'ospite al momento dell'infezione virale. Questo processo inizia con il legame delle proteine IFNs a uno specifico recettore sulla membrana citoplasmatica della cellula; gli IFNs di tipo I usano il medesimo recettore, mentre l'IFN gamma si lega a un recettore differente. Il legame degli IFNs al recettore cellulare attiva la cascata del segnale JAK/STAT che porta all'espressione di varie proteine

effettrici, quali la PKR, la 2'-5'-OAS e la RNAsi L, responsabili dello stato di resistenza virale.

Gli esperimenti di valutazione della sensibilità del SARS-CoV all'azione antivirale degli IFN alfa, beta e gamma sono stati condotti utilizzando la linea cellulare Vero, in quanto sensibile agli IFNs e permissiva all'infezione da SARS-CoV.

Esperimenti analoghi sono stati eseguiti con il virus dell'encefalomiocardite (EMCV), il virus della stomatite vescicolare (VSV) e il virus della malattia del New Castle (NDV) al fine di paragonare la sensibilità agli IFNs del SARS-CoV con altri virus per i quali è nota la sensibilità all'IFN.

I risultati che abbiamo ottenuto hanno messo in luce la relativa resistenza di SARS-CoV ai differenti tipi di IFNs, suggerendo che esso è resistente all'azione antivirale dell'IFN alfa e dell'IFN gamma, mentre, risulta debolmente sensibile all'IFN beta.

In particolare è stato osservato che gli IFNs presentano, *in vitro*, una diversa attività antivirale verso il SARS-CoV: l'IFN beta sembra essere più efficace nell'inibire la replicazione del SARS-CoV rispetto agli altri IFNs saggiati (IFN alfa2 ricombinante, IFN alfa naturale, IFN gamma).

Tuttavia dalla valutazione del valore della dose inibente il 50% della replicazione virale (IC_{50}) degli IFNs nei confronti del SARS-CoV e EMCV, VSV, NDV risulta che le IC_{50} degli IFNs alfa (naturale e ricombinante), beta e gamma relative al virus della SARS sono significativamente più elevate rispetto a quelle calcolate per i virus IFN-sensibili.

La concentrazione di IFN beta necessaria per inibire la replicazione del SARS-CoV è paragonabile a quelle che sono state riportate in letteratura (Cinatl et al., 2003; Zheng et al., 2004; Hensley et al., 2004; Dahl et al., 2004). Le differenze relative ai valori delle IC_{50} delle diverse preparazioni

di IFNs che si possono riscontrare con i diversi studi in letteratura sono attribuibili sia all'utilizzo di *standard* diversi per definire le unità internazionali (UI) di IFN che all'utilizzo di condizioni sperimentali diverse. In particolare le cellule sono state infettate con MOI diverse di SARS-CoV (da 0,1 a 0,001), l'IFN è stato aggiunto alle cellule in tempi diversi (1 o 18 ore prima dell'infezione o anche solo dopo l'infezione), sono state utilizzate cellule diverse [Vero, Vero E6, Caco2 (di adenocarcinoma del colon) o FRhK4 (fetali di rene di scimmia "*rhesus*")] e diversi ceppi di SARS-CoV.

Interessante è stata anche l'osservazione che la preparazione di IFN alfa naturale presenta una maggiore attività antivirale rispetto alla preparazione di IFN alfa ricombinante nei confronti del SARS-CoV.

Alla luce di questa osservazione abbiamo valutato la possibilità che alcuni sottotipi di IFNs alfa, disponibili nel nostro laboratorio, di cui è costituita la miscela dell'IFN alfa naturale, fossero più efficaci rispetto ad altri nell'inibire la replicazione del virus della SARS su cellule Vero. I risultati ottenuti hanno evidenziato sia che nessuno dei sottotipi di IFNs alfa analizzati possiede una significativa attività antivirale verso il SARS-CoV, sia che il SARS-CoV è resistente all'azione antivirale dei sottotipi di IFNs alfa -1, -5, -6, -7a, -8b, -10a, -17a e -21a rispetto a EMCV, VSV e NDV.

Bisogna, tuttavia, considerare che la maggiore attività antivirale della preparazione di IFN alfa naturale rispetto alla ricombinate verso il SARS-CoV potrebbe essere dovuta sia all'azione antivirale di altri sottotipi di IFNs alfa presenti nella preparazione di IFN alfa naturale, sia all'azione antivirale sinergica di alcuni sottotipi di IFNs alfa, come è stato riportato in letteratura (Yamamoto et al., 2002). E' stato infatti dimostrato che l'utilizzo di una miscela di due sottotipi di IFN alfa, quali IFN alfa2 e IFN alfa8, aumenta in maniera significativa l'attività antivirale e

antiproliferativa degli IFNs rispetto a quando i sottotipi di IFNs alfa si utilizzano separatamente.

Successivamente la nostra attenzione è stata rivolta alla valutazione dei livelli di espressione degli mRNAs di MxA, ADAR, P56 e 2'-5' OAS che, come è noto, sono proteine specificamente indotte dall'IFN di tipo I e II, in seguito all' infezione virale della cellula. Lo scopo che ci siamo prefissati è stato quello valutare, *in vitro*, l'esistenza di una correlazione tra i livelli di alcune proteine IFN-indotte e l'attività antivirale delle diverse preparazioni di IFNs utilizzate da sole o in combinazione verso il SARS-CoV.

Considerando questo aspetto è stato proposto che il livello di espressione dell' MxA, che risulta maggiore nelle cellule trattate con l'IFN beta rispetto alle cellule trattate con l'IFN alfa, possa correlare con l'attività antivirale degli IFNs nei confronti del virus della SARS (Cinatl et al., 2003).

I risultati che abbiamo ottenuto, tuttavia, non hanno evidenziato l'esistenza di una correlazione tra l'espressione degli mRNAs di MxA, ADAR-1, 2'-5' OAS e P56 e la diversa attività antivirale delle preparazioni di IFN alfa, beta e gamma. Infatti i livelli di MxA, ADAR-1, 2'-5' OAS e P56 indotti dalla preparazione di IFN alfa naturale sono paragonabili a quelli indotti dall'IFN beta, nonostante le due preparazioni di IFN di tipo I abbiano una diversa attività antivirale verso il SARS-CoV.

I dati ottenuti relativamente alla valutazione dell'espressione dell'MxA sembrano confermare quanto riportato in un recente articolo (Spiegel et al., 2004). In particolare, Spiegel e collaboratori, infettando con il virus della SARS, cellule Vero, precedentemente transfettate con la proteina MxA, non hanno osservato alcuna riduzione della replicazione di SARS-CoV e hanno pertanto concluso che non vi è alcuna correlazione tra l'espressione di MxA e l'induzione dello stato antivirale dell'IFN nei confronti del SARS-CoV.

Considerando che gli IFN di tipo I (IFN alfa e IFN beta) e di tipo II (IFN gamma), usati singolarmente, hanno un effetto moderatamente inibente nei confronti della replicazione di SARS-CoV qualora si impieghino a basse concentrazioni e che, come è noto, essi agiscono legandosi su recettori differenti della membrana cellulare, successivamente abbiamo condotto degli esperimenti per valutare la possibilità che gli IFNs di tipo I e II possano agire in maniera sinergica nei confronti di SARS-CoV.

In particolare, considerando la maggiore attività antivirale dell'IFN alfa naturale e dell'IFN beta rispetto alle preparazioni di IFN alfa ricombinante nei confronti di SARS-CoV, abbiamo valutato l'attività antivirale della preparazione di IFN alfa naturale o di IFN beta in combinazione all'IFN gamma in cellule Vero.

I risultati indicano che trattando le cellule Vero con una combinazione di IFN di tipo I (alfa o beta) e di IFN gamma si osserva una significativa azione sinergica degli IFNs sull'inibizione della replicazione di SARS-CoV. Infatti impiegando delle miscele, contenenti diverse concentrazioni di IFN alfa o beta in combinazione con l'IFN gamma, la resa virale di SARS-CoV diminuisce in maniera significativa rispetto a quando si utilizzano gli IFNs singolarmente.

I dati che abbiamo ottenuto sull'attività sinergica dell'IFN tipo I e IFN gamma confermano quanto si può leggere in letteratura (Sainz et al., 2004; Castelletti et al., 2005). Tuttavia è interessante osservare che i nostri risultati indicano in particolare che l'interazione di tipo sinergico tra l'IFN di tipo I e II nei confronti del SARS-CoV si esplica anche a concentrazioni minori di 100 UI/ml di IFNs.

L'aumento dell'attività antivirale degli IFNs a causa di un'interazione di tipo sinergico tra gli IFNs di tipo I e II nei confronti del virus della SARS non è, tuttavia, un fenomeno nuovo. In passato è stato dimostrato che miscele di IFN gamma e IFN alfa o beta producono un effetto inibitorio di

tipo sinergico sulla replicazione del virus herpes simplex sia *in vivo* che *in vitro* (Sainz & Halford, 2002). Recentemente è stato inoltre osservato che la somministrazione contemporanea di IFN alfa e gamma, in topi infettati con il tipo 2 del virus dell'epatite (MHV-2), aumenta significativamente l'attività antivirale degli IFNs (Fuchizaki et al., 2003).

Il meccanismo responsabile dell'aumento dell'attività biologica degli IFNs per una interazione di tipo sinergico tra gli IFN di tipo I e II non è stato attualmente chiarito, tuttavia sono state identificate alcune componenti del sistema IFN, che sembrano subire dei cambiamenti rilevanti in presenza dei due tipi di IFNs.

In particolare è stato riportato che l'interazione tra IFN alfa e IFN gamma induce un aumento significativo sia dei livelli di una subunità del complesso di trascrizione ISGF-3 (Levy et al., 1990) che del recettore degli IFN di tipo I (Mizukoshi et al., 1999) rispetto a quelli indotti dagli IFNs separatamente.

Direttamente collegati a queste osservazioni i nostri risultati indicano che, in seguito al pre-trattamento di cellule Vero con miscele di IFN alfa o beta e gamma, i livelli di mRNAs di alcune proteine IFN-indotte, quali l'MxA, l'ADAR-1, la P56 e la 2'-5' OAS, vengono maggiormente indotti rispetto a quelli osservati quando gli IFNs vengono usati singolarmente. L'aumento dei livelli degli mRNAs di alcune delle proteine effettrici della attività antivirale dell'IFN potrebbe, pertanto, essere dovuto all'incremento della sintesi del complesso ISGF-3 e del recettore degli IFN di tipo I indotto dagli IFNs di tipo I e II. Infatti come è noto il complesso di trascrizione ISGF-3, si attiva in seguito al legame degli IFNs al recettore cellulare, e migra nel nucleo, legandosi ad una regione specifica dei promotori di alcuni geni stimolati dall'IFN, e ne determina l'attivazione per la trascrizione.

Tuttavia, l'osservazione che l'espressione delle medesime proteine non correla con la diversa attività antivirale delle varie preparazioni di IFNs nei confronti del SARS-CoV, sottolinea come il fenomeno dell'interazione di tipo sinergico tra gli IFN di tipo I e II sia un processo complesso che richiederà maggiori attenzioni di tipo sperimentale.

E' importante sottolineare che la discussione sull'utilizzo degli IFN per la terapia di pazienti colpiti da SARS rimane tuttora accesa a causa della discordanza dei risultati sperimentali ottenuti *in vitro*. Infatti mentre alcuni autori asseriscono che il virus della SARS sia sensibile all'azione antivirale dell' IFN beta e dell'IFN alfa giustificando un utilizzo clinico degli IFNs nell'infezione da SARS-CoV (Hensley et al., 2004; Stroher et al., 2004), in altri lavori si evidenzia che il virus della SARS è relativamente resistente all'azione antivirale degli IFN alfa e gamma e moderatamente sensibile all'azione dell'IFN beta se paragonato a virus IFN sensibili (Cinatl et al, 2003).

Analogamente a quanto osservato *in vitro* anche i risultati clinici sull'utilizzo di IFN nell'infezione da SARS-CoV mostrano una certa contraddittorietà.

Infatti da una parte il trattamento di pazienti affetti da SARS con IFN alfacon-1 e corticosteroidi ha mostrato una certa efficacia dal punto di vista clinico (Loufty et al., 2003); dall'altra la somministrazione di IFN alfa peghilato, dopo l'esposizione al virus della SARS, non ha mostrato nei macachi una diminuzione dei sintomi della patologia (Haagmans et al., 2004). Alla luce di queste considerazioni è evidente che, allo stato attuale delle conoscenze, non è chiaro se, e in quale misura, gli IFNs potranno essere utilizzati nel trattamento di nuove infezioni da SARS-CoV.

I nostri risultati in sostanza indicano che gli IFNs da soli non hanno potenzialità terapeutiche in quanto i valori di IC₅₀ sono troppo elevati e

difficilmente raggiungibili *in vivo*. Nel contempo tuttavia porgono le basi per speculare per il loro possibile utilizzo terapeutico in combinazione.

Nella seconda parte dello studio abbiamo valutato l'attivazione del sistema IFN nell'ospite in risposta all'infezione da SARS-CoV. L'analisi di questa componente della risposta immunitaria innata dell'ospite riveste un ruolo rilevante nella comprensione della patogenesi di SARS-CoV in quanto la presenza o l'assenza di un'attivazione del sistema IFN nell'ospite si accompagna ad una diversa evoluzione dell'infezione virale.

Questo aspetto è stato ampiamente documentato nell'infezione con il virus dell'immunodeficienza umana (HIV). In particolare è stata osservata una riduzione nella produzione di IFN alfa da parte dei linfomonociti in pazienti affetti da HIV che correla con il progredire della malattia (Chehadeh et al., 1999). Il virus dell'HIV sembra, infatti, indurre una deplezione progressiva e selettiva delle cellule, denominate IPCs, che sono note per la loro abilità di produrre grosse quantità di IFN di tipo I in seguito ad una infezione virale (Soumelis et al., 2001).

Alla luce di queste considerazioni abbiamo quindi valutato e caratterizzato l'induzione del sistema IFN dopo stimolazione, *in vitro*, dei linfomonociti, con il virus della SARS.

Dai nostri risultati si evince che il SARS-CoV induce la produzione di IFNs, in accordo con quanto recentemente riportato in letteratura (Castilletti et al., 2005). Infatti in linfomonociti stimolati con SARS-CoV si osserva la produzione, a 24 e 48 ore, di diversi sottotipi di IFNs alfa (-1, -2, -5, -6, -8, -10, -13, -17, -21) e dell' IFN beta.

Tuttavia è interessante sottolineare che, allo stato attuale delle conoscenze, non è stato ancora completamente chiarito se il virus della SARS sia in grado di replicarsi all'interno dei linfomonociti. Infatti mentre alcuni autori riportano la presenza dell'RNA di SARS-CoV nei linfomonociti di sangue periferico (Castilletti et al., 2005), altri lavori mostrano solo una limitata

replicazione del SARS-CoV e una esigua produzione di progenie virale nella linea monocito/macrofagica (Yilla et al., 2005).

Queste osservazioni sono particolarmente interessanti e potranno contribuire in futuro ad identificare il meccanismo di attivazione del sistema IFN da parte del SARS-CoV: in particolare se l'attivazione avvenga per interazione del virus con alcuni recettori presenti sulla superficie cellulare o se sia necessaria la presenza all'interno della cellula dei dsRNA di SARS-CoV che attivano direttamente le cascate del segnale dei TLRs e della proteina PKR.

Interessante è stata l'osservazione che il virus della SARS induce una modesta sintesi di IFNs di tipo I rispetto a virus noti in letteratura per essere forti induttori di IFN, quali il VSV e l'NDV. Questa osservazione è in accordo con dei dati riportati in letteratura (Yilla et al., 2005; Ziegler et al., 2005). Infatti è stato riportato sia che l'infezione con il SARS-CoV di cellule della linea monocito-macrofagica induce una produzione di IFN alfa, pari o inferiore a 8 UI/ml (Yilla et al., 2005) sia che il SARS-CoV non induce l'espressione genica di IFN alfa e beta e di MxA in cellule di carcinoma polmonare umano, nei macrofagi e nelle cellule dendritiche. Il virus della SARS sembrerebbe pertanto essere un induttore poco efficiente di IFN a differenza di altri coronavirus umani ed animali (Baudoux et al., 1998; Cheung et al., 2005).

Alle luce di queste osservazioni il virus della SARS potrebbe aver sviluppato delle strategie per interferire con l'attività delle principali componenti del sistema IFN.

E' noto che i virus hanno a disposizione sofisticati meccanismi per bloccare le attività inibitorie esplicate dagli IFNs sulla replicazione virale. Le strategie utilizzate dai virus per contrastare l'attività biologica dell'IFN mirano principalmente a bloccare le diverse componenti del sistema IFN quali il segnale dei recettori TLRs, la sintesi di IFN, il legame al recettore

cellulare, la cascata del segnale JAK/STAT, l'induzione e l'attivazione delle proteine IFN-indotte (Sen, 2001; Weber et al., 2004).

L'attivazione genica degli IFNs di tipo I, in particolare dell'IFN beta, rappresenta la prima risposta dell'ospite ad una infezione virale. Nel processo di attivazione della sintesi di IFN beta, una proteina della famiglia delle IRFs, denominata IRF-3, in seguito ad una infezione con un virus, viene attivata da alcune chinasi cellulari e trasloca, sottoforma di dimero, dal citoplasma al nucleo della cellula dove si lega, insieme ad altri fattori di trascrizione, al promotore dell'IFN beta, attivando la sintesi di mRNA di IFN beta.

Collegata a tale aspetto è la dimostrazione che il SARS-CoV blocca la sintesi di IFN beta.

In particolare è stato dimostrato che il virus della SARS induce un accumulo a livello nucleare della proteina IRF-3 solo durante la fase precoce dell'infezione. Infatti nella fase tardiva dell'infezione la proteina IRF-3 si ritrova unicamente nel citoplasma delle cellule sotto forma inattiva (Spiegel et al., 2005). L'immediato trasferimento di IRF-3 dal citoplasma al nucleo, in seguito all'infezione con SARS-CoV, e la mancata attivazione di IRF-3, sembrerebbe bloccare la sintesi di IFN beta.

Questa strategia di inibizione della sintesi di IFN beta sembra essere peculiare del SARS-CoV. Infatti i meccanismi di inibizione della sintesi di IFN beta che sono stati proposti per le diverse famiglie di virus comprendono l'inibizione della fosforilazione IRF-3, il legame diretto di proteine virali alla proteina IRF-3, la sintesi di proteine virali omologhe alla proteina IRF-3 e il sequestro di proteine che partecipano nel processo di attivazione di IRF-3.

L'inibizione della sintesi di IFN beta non sembra, tuttavia, essere l'unica strategia adottata da SARS-CoV per sovvertire l'attivazione del sistema IFN.

E' stato infatti osservato che, in pazienti affetti da SARS-CoV, durante la fase acuta della malattia sono presenti livelli ridotti sia di alcune proteine IFN indotte quali PKR, GBP-1e -2, CXCL-10 e -11, che di alcuni componenti della cascata del segnale JAK/STAT (Yu et al., 2005).

Allo stato attuale delle conoscenze non è noto se sia direttamente il virus della SARS ad inibire la cascata del segnale JACK/STAT dell'IFN o piuttosto sia l'espressione di alcune citochine pro-infiammatorie quali IL-1, IL-6 or IL-8 (Khabar et al., 1997; Tian et al., 2000; Polyak et al., 2001), indotte durante l'infezione da SARS-CoV, ad interferire con il segnale dell'IFN.

In conclusione possiamo affermare che i dati ottenuti in questo studio potrebbero avere delle implicazioni sia terapeutiche che patogenetiche sull'infezione da SARS-CoV. Essi, infatti, documentano la resistenza del virus della SARS all'azione antivirale degli IFNs e la presenza di una significativa attività antivirale di tipo sinergico tra gli IFNs di tipo I e II a concentrazioni compatibili con un impiego clinico per il trattamento dell'infezione da SARS-CoV. Considerando che gli IFNs vengono prodotti generalmente nella prima fase di un'infezione virale, indirettamente i dati suggeriscono che SARS-CoV potrebbe diffondersi nell'organismo proprio grazie alla sua resistenza agli IFNs.

Inoltre la considerazione che nei linfomonociti l'infezione con SARS-CoV induce solo una modesta attivazione del sistema IFN avvalorata l'ipotesi che il SARS-CoV possa essere resistente agli IFNs.

Se e in quale grado la relativa resistenza di SARS-CoV agli IFN influenzi la patogenesi dell'infezione da SARS-CoV non è ancora noto e riteniamo, pertanto, che possa essere oggetto di studi futuri.

BIBLIOGRAFIA

Accola M.A., Huang B., Al Masri A. & McNiven M.A., 2002. The antiviral dynamin family member, MxA, tubulates lipids and localizes to the smooth endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 277: 21829-21835.

Aoki K. & Kawakita M., 1996. Differential sensitivity of two related viruses, Newcastle disease virus and Sendai virus, to interferon in mouse Had-2 cells: selective inhibition of translation of NDV mRNA. *Arch Virol* 141: 1847-1862.

Avendano M., Derkach P. & Swan S., 2003. Clinical course and management of SARS in health care workers in Toronto: a case series. *CMAJ* 168: 1649-1660.

Bartlam M., Yang H. & Rao Z., 2005. Structural insights into SARS coronavirus proteins. *Curr Opin Struct Biol*. IN PRESS.

Bastien N., Robinson J.L., Tse A., Lee B.E., Hart L. & Li Y., 2005. Human coronavirus NL-63 infections in children: a 1-year study. *J Clin Microbiol* 43: 4567-4573.

Baudoux P., Besnardeau L., Carrat C., Rottier P., Charley B. & Laude H., 1998. Interferon alpha inducing property of coronavirus particles and pseudoparticles. *Adv Exp Med Biol* 440: 377-386.

Berger A., Drosten C., Doerr H.W., Sturmer M. & Preiser W., 2004. Severe acute respiratory syndrome (SARS)--paradigm of an emerging viral infection. *J Clin Virol* 29:13-22.

Booth C.M., Matukas L.M., Tomlinson G.A., Rachlis A.R., Rose D.B., Dwosh H.A., Walmsley S.L., Mazzulli T., Avendano M., Derkach P., Ephtimios I.E., Kitai I., Mederski B.D., Shadowitz S.B., Gold W.L., Hawryluck L.A., Rea E., Chenkin J.S., Cescon D.W., Poutanen S.M. & Detsky A.S., 2003. Clinical features and short-term outcomes of 144 patients with SARS in the greater Toronto area. *JAMA* 289: 2801-2809.

Casas I. & Pozo F., 2005. SARS, avian influenza, and human metapneumovirus infection. *Enferm Infec Microbiol Clin* 23: 438-447.

Castilletti C., Bordi L., Lalle E., Rozera G., Poccia F., Agrati C., Abbate I. & Capobianchi M.R., 2005. Coordinate induction of IFN- α and $-\gamma$ by SARS-CoV also in the absence of virus replication. *Virology* 341:163-169

Chehadeh W., Hober D., Chieux V., Alm G., Harvey J., Lion G., Mouton Y. & Wattré P., 1999. Biological properties of interferon-alpha produced Ex vivo by whole blood of patients infected by human immunodeficiency virus-1. *Scand J Immunol* 49: 660-666.

Chen M.S., Obar R.A., Schroeder C.C., Austin T.W., Poodry C.A., Wadsworth, S.C. & Vallee R.B., 1991. Multiple forms of dynamin are encoded by shibire, a *Drosophila* gene involved in endocytosis. *Nature* 351: 583-596.

Cheung C.Y., Poon L.L., Ng I.H., Luk W., Sia S.F., Wu M.H., Chan K.H., Yuen K.Y., Gordon S., Guan Y. & Peiris J.S., 2005. Cytokine responses in severe acute respiratory syndrome coronavirus-infected macrophages in vitro: possible relevance to pathogenesis. *J Virol* 79:7819-7826.

Chou T.C. & Talalay P., 1984. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* 22: 27-55.

Cinatl J., Morgenstern B., Bauer G., Chandra P., Rabenau H. & Doerr H.W., 2003. Treatment of SARS with human interferons. *Lancet* 362: 293-294.

Colonna M., Krug A. & Cella M., 2002. Interferon-producing cells: on the front line immune responses against pathogens. *Curr Opin Immunol* 14: 373-379.

Dahl H., Linde A. & Strannegard O., 2004. In vitro inhibition of SARS virus replication by human interferons. *Scand J Infect Dis* 36: 829-831.

De Maeyer E. & De Maeyer-Guignard J., 1998. Type I interferons. *Int Rev Immunol* 17: 53-73.

Dianzani F., Antonelli G. & Capobianchi M.R., 1990. Biological activity of gamma interferon. *Ann Ist Super Sanita* 26: 255-261.

Dobson A.P., 2005. *Virology*. What links bats to emerging infectious diseases? *Science* 310: 628-629.

Dumoutier L., Tounsi A., Michiels T., Sommereyns C., Kolenko S.V. & Renauld J.C., 2004. Role of the interleukin (IL)-28 receptor tyrosine residues for antiviral and antiproliferative activity of IL-29/interferon-

lambda 1: similarities with type I interferon signalling. *J Biol Chem* 279: 32269-32274.

Enserink M., 2003. Infectious diseases. Clues to the animal origins of SARS. *Science* 300: 1351.

Enserink M., 2004. SARS treatment. Interferon shows promise in monkeys. *Science* 303: 1273-1275.

Fouchier R.A., Kuiken T., Schutten M., van Amerongen G., van Doornum G.J., van den Hoogen B.G., Peiris M., Lim W., Stohr K. & Osterhaus A.D., 2003. Aetiology: Koch's postulates fulfilled for SARS virus. *Nature* 423: 240.

Fuchizaki U., Kaneko S., Nakamoto Y., Sugiyama Y., Imagawa K., Kikuchi M. & Kobayashi K., 2003. Synergistic antiviral effect of a combination of mouse interferon-alpha and interferon-gamma on mouse hepatitis virus. *J Med Virol* 69: 188-194.

Fujii T., Nakamura T. & Iwamoto A., 2004. Current concepts in treatment. *J Infect Chemother* 10: 1-7.

Haagmans B.L., Kuiken T., Martina B.E., Fouchier R.A.M., Rimmelzwaan G.F., van Amerongen G., van Riel D., de Jong T., Itamura S., Chan K.H., Tashiro M. & Osterhaus A.D.M.E., 2004. Pegylated interferon- α protects type 1 pneumocytes against SARS coronavirus infection in macaques. *Nature medicine* 10: 290-293.

Haller O. & Kochs G., 2002. Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. *Traffic* 3: 710-717.

Haller O., Frese M. & Kochs G., 1998. Mx proteins: mediators of innate resistance to RNA viruses. *Rev Sci Technical* 17: 220-230.

Hardy M.P., Owczarek C.M., Jermin L.S., Ejdeback M. & Hertzog P.J., 2004. Characterization of the type I interferon locus and identification of novel genes. *Genomics* 84: 331-345.

Hensley L.E., Fritz E.A., Jahrling P.B., Karp C.L., Huggins J.W. & Geisbert T.W., 2004. Interferon- β 1a and SARS Coronavirus Replication. *Emerging Infectious Diseases* 10: 317-319.

Hofmann H., Pyrc K., van der Hoek L., Geier M., Berkhout B. & Pohlmann S., 2005. Human coronavirus NL63 employs the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor for cellular entry. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 7988-7993.

Honda K., Hideyuki Y., Takaoka A. & Taniguchi T., 2005. Regulation of the type I IFN induction: a current view. *International Immunology* 17: 1367-1378.

Horisberger M.A., Staeheli P. & Haller O., 1983. Interferon induces a unique protein in mouse cells bearing a gene for resistance to influenza virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 1910-1914.

Horisberger M.A. & Gunst, M.C., 1991. Interferon-induced proteins: identification of Mx proteins in various mammalian species. *Virology* 180: 185-190.

Hovanessian A.G., 1991. Interferon-induced and double-stranded RNA-activated enzymes: a specific protein kinase and 2',5'-oligoadenylate synthetases. *J Interferon Res* 11: 199-205.

Javed A. & Reder A.T., 2005. Therapeutic role of beta-interferons in multiple sclerosis. *Pharmacol Ther.* IN PRESS.

Jeffers S.A., Tusell S.M., Gillim-Ross L., Hemmila E.M., Achenbach J.E., Babcock G.J., Thomas W.D. Jr, Thackray L.B., Young M.D., Mason R.J., Ambrosino D.M., Wentworth D.E., Demartini J.C. & Holmes K.V., 2004. CD209L (L-SIGN) is a receptor for severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 15748-15753.

Jones B.A. & Fangman W.L., 1992. Mitochondrial DNA maintenance in yeast requires a protein containing a region related to the GTP-binding domain of dynamin. *Genes Dev* 6: 380-389.

Jordan L.T. & Derbyshire J.B., 1995. Antiviral action of interferon-alpha against porcine transmissible gastroenteritis virus. *Vet Microbiol* 45: 59-70.

Kato Y., Noda Y., Unoura M., Tanaka N., Kobayashi K., Hattori N., Hatano K. & Kobayashi S., 1986. Effect of exogenous mouse interferon on murine fulminant hepatitis induced by mouse hepatitis virus type 2. *Dig Dis Sci* 31: 177-180.

Khabar K.S., Al-Zoghaibi F., Al-Ahdal M.N., Murayama T., Dhalla M., Mukaida N., Taha M., Al-Sedairy S.T., Siddiqui Y., Kessie G. & Matsushima K., 1997. The alpha chemokine, interleukin 8, inhibits the anti-viral action of interferon alpha. *J Exp Med* 186: 1077-1085.

Ksiazek T.G., Erdman D., Goldsmith C.S., Zaki S.R., Peret T., Emery S., Tong S., Urbani C., Comer J.A., Lim W., Rollin P.E., Dowell S.F., Ling A.E., Humphrey C.D., Shieh W.J., Guarner J., Paddock C.D., Rota P., Fields B., DeRisi J., Yang J.Y., Cox N., Hughes J.M., LeDuc J.W., Bellini W.J., Anderson L.J. & SARS Working Group, 2003. A novel Coronavirus associated with Severe Acute Respiratory Syndrome. *New Eng J Med* 348: 1953-1966.

Kuhn J.H., Li W., Choe H. & Farzan M., 2004. Angiotensin-converting enzyme 2: a functional receptor for SARS coronavirus. *Cell Mol Life Sci* 61: 2738-2743.

LaFleur D.W., Nardelli B., Tsareva T., Mather D., Feng P., Semenuk M., Taylor K., Buergin M., Chinchilla D., Roshke V., Chen G., Ruben S.M., Pitha P.M., Coleman T.A. & Moore P.A., 2001. Interferon-kappa, a novel type I interferon expressed in human keratinocytes. *J Biol Chem* 276: 39765-39771.

Lam V., Duca K.A. & Yin J., 2005. Arrested spread of vesicular stomatitis virus infections in vitro depends on interferon-mediated antiviral activity. *Biotechnol Bioeng* 90: 793-804.

Lee N., Hui D., Wu A., Chan P., Cameron P., Joynt G.M., Ahuja A., Yung M.Y., Leung C.B., To K.F., Lui S.F., Szeto C.C., Chung S. & Sung J.J.,

2003. A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *N Engl J Med* 348: 1986-1994.

Levy D.E., Lew D.J., Decker T., Kessler D.S. & Darnell J.E. Jr., 1990. Synergistic interaction between interferon-alpha and interferon-gamma through induced synthesis of one subunit of the transcription factor ISGF3. *EMBO J* 9: 1105-1111.

Liu Y.J., 2005. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol* 23: 275-306.

Loufty M.R., Blatt L.M., Siminovitch K.A., Ward S., Wolff B., Lho H., Pham D.H., Deif H., LaMere E.A., Chang M., Kain K.C., Farcas G.A., Ferguson P., Latchford M., Levy G., Dennis J.W., Lai E.K.Y. & Fish E.N., 2003. Interferon Alfacon-1 Plus Corticosteroids in Severe Acute Respiratory Syndrome. *JAMA* 290: 3222-3228.

Lu Y., Gong E.C., Zhang Q.Y., Gu J., Li X.W., Zhang B., Hou L., Shao H.Q., Gao Z.F., Zheng J., Fang W.G. & Zhong Y.F., 2005. Expression of SARS-CoV in various types of cells in lung tissues Beijing Da Xue Xue Bao 37: 453-457.

Malmgaard L., 2004, Induction and regulation of IFNs during viral infections. *J Interferon Cytokine Res* 24: 439-454.

Mizukoshi E., Kaneko S., Yanagi M., Ohno H., Matsushita E. & Kobayashi K., 1999. Upregulation of type I interferon receptor by IFN-gamma. *J Interferon Cytokine Res* 19: 1019-1023.

Moschos S., Varanasi S. & Kirkwood J.M., 2005. Interferons in the treatment of solid tumors. *Cancer Treat Res* 126: 207-241.

Nato J.A. & Williams B.R., 2000. NF-kappa B activation by double-stranded-RNA-activated protein kinase is mediated through NF-kappaB-inducing kinase and IkappaB kinase. *Mol Cell Biol* 20: 1278-1290.

Ng M.L., Tan S.H., See E.E., Ooi E.E. & Ling A.E., 2003. Proliferative growth of SARS Coronavirus in Vero E6 cells. *J Gen Virol* 84: 3291-3303.

Parmar S. & Plataniias L.C., 2003. Interferons: mechanisms of action and clinical applications. *Curr Opin Oncol* 15: 431-439.

Pei J., Sekellick M.J., Marcus P.I., Choi I.S. & Collisson E.W., 2001. Chicken interferon type I inhibits infectious bronchitis virus replication and associated respiratory illness. *J Interferon Cytokine Res* 21: 1071-1077.

Peiris J.S.M., Chu C.M., Cheng V.C.C., Chan K.S., Hung I.F.N., Poon L.L.M., Law K.I., Tang B.S.F., Hon T.Y.W., Chan C.S., Chan K.H., Ng J.S.C., Zheng B.J., Ng W.L., Lai R.W.M., Guan Y., Yuen K.Y. & members of the HKU/UCH SARS Study Group, 2003. Clinical progression and viral load in a community outbreak of Coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study. *Lancet* 361: 1767-1772.

Peiris J.S.M., Guan Y. & Yuen K.Y., 2004. Severe acute respiratory syndrome. *Nature medicine* 10: S89-S97.

Pestka S., 1986. Interferon: a decade of accomplishments, foundation of the feature in research and therapy. *Semin Hematol* 23: 27-37.

Polyak S.J., Khabar K.S., Paschal D.M., Ezelle H.J., Duverlie G., Barber G.N., Levy D.E., Mukaida N. & Gretch D.R., 2001. Hepatitis C virus nonstructural 5A protein induces interleukin-8, leading to partial inhibition of the interferon-induced anti-viral response. *J Virol* 75: 6095-6106.

Poutanen S.M., Low D.E., Henry B., Finkelstein S., Rose D., Green K., Tellier R., Draker R., Adachi D., Ayers M., Chan A.K., Skowronski D.M., Salit I., Simor A.E., Slutsky A.S., Doyle P.W., Krajden M., Petric M., Brunham R.C., McGeer A.J., National Microbiology Laboratory, Canada & Canadian Severe Acute Respiratory Syndrome Study Team, 2003. Identification of severe acute respiratory syndrome in Canada. *N Engl J Med* 348: 1995-2005.

Reed, L.J. & Muench, H., 1938. A simple method of estimating fifty percent end-points. *Am J Hyg* 27: 493-497.

Reiter Z., 1993. Interferon—a major regulator of natural killer cell-mediated cytotoxicity. *J Interferon Res* 13: 247-258.

Rothman J.H., Raymond C.K., Gilbert T., O'Hara P.J. & Stevens T.H., 1990. A putative GTP binding protein homologous to interferon-inducible Mx proteins performs an essential function in yeast protein sorting. *Cell* 61: 1063-1074.

Sainz B. Jr & Halford W.P., 2002. Alpha/Beta interferon and gamma interferon synergize to inhibit the replication of herpes simplex virus type 1. *J Virol* 76: 11541-11550.

Sainz B. Jr, Mossel E.C., Peters C.J. & Garry R.F., 2004. Interferon-beta and interferon-gamma synergistically inhibit the replication of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV). *Virology* 329: 11-17.

Samuel C.E., 2001. Antiviral action of Interferon. *Clinical Microbiology Reviews* 14: 778-809.

Saksela E., 1981. Interferon and natural killer. *Duodecim* 96: 1061-1064.

Sarkar S.N. & Sen G.C., 2004. Novel functions of proteins encoded by viral stress-inducible genes. *Pharmacol Ther* 103: 245-259.

Schroder M. & Bowie A.G., 2005. TLR3 in antiviral immunity: key player or bystander? *Trends Immunol* 26: 462-468.

Sen G.C., 2001. Viruses and interferons. *Annu Rev Microbiol* 55: 255-281.

Sheppard P., Kindsvogel W., Xu W., Henderson K., Schlutsmeyer S., Whitmore T.E., Kuestner R., Garrigues U., Birks C., Roraback J., Ostrander C., Dong D., Shin J., Presnell S., Fox B., Haldeman B., Cooper E., Taft D., Gilbert T., Grant F.J., Tackett M., Krivan W., McKnight G., Clegg C., Foster D. & Klucher K.M., 2003. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol* 4: 63-68.

Soumelis V., Scott I., Gheyas F., Bouhour D., Cozon G., Cotte L., Huang L., Levy J.A. & Liu Y.J., 2001. Depletion of circulating natural type 1

interferon-producing cells in HIV-infected AIDS patients. *Blood* 98: 906-912.

Sperber S.J. & Hayden F.G., 1989. Comparative susceptibility of respiratory viruses to recombinant interferons-alpha 2b and -beta. *J Interferon Res* 9: 285-293.

Spiegel M., Pichlmair A., Martinez-Sobrido L., Cros J., Garcia-Sastre A., Haller O. & Weber F., 2005. Inhibition of Beta interferon induction by severe acute respiratory syndrome coronavirus suggests a two-step model for activation of interferon regulatory factor 3. *J Virol* 79: 2079-2086.

Spiegel M., Pichlmair A., Muhlberger E., Haller O. & Weber F., 2004. The antiviral effect of interferon-beta against SARS-coronavirus is not mediated by MxA protein. *J Clin Virol* 30: 211-213.

Staehele P., Pitossi F. & Pavlovic J., 1993. Mx proteins: Gtpases with antiviral activity. *Trends Cell Biol* 3: 268-272.

Stroher U., DiCaro A., Li Y., Strong J.E., Aoki F., Plummer F., Jones S.M. & Feldmann H., 2004. Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus Is Inhibited by Interferon- α . *J Infectious Diseases* 189: 1164-1167.

Takeuchi O., Hemmi H. & Akira S., 2004. Interferon response induced by Toll-like receptor signaling. *J Endotoxin Res* 10: 252-256.

Tan Y.J., Fielding B.C., Goh P.Y., Shen S., Tan T.H., Lim S.G. & Hong W., 2004. Overexpression of 7a, a protein specifically encoded by the

severe acute respiratory syndrome coronavirus, induces apoptosis via a caspase-dependent pathway. *J Virol* 78: 14043-14047.

Tian Z., Shen X., Feng H. & Gao B., 2000. IL-1 beta Attenuates IFN-alpha beta -induced anti-viral activity and STAT1 activation in the liver: involvement of proteasome-dependent pathway. *J Immunol* 165: 3959-3965.

Trottier M.D. Jr, Palian B.M. & Shoshkes Reiss C., 2005. VSV replication in neurons is inhibited by type I IFN at multiple stages of infection. *Virology* 333: 215-225.

Tsang K.W., Ho P.L., Ooi G.C., Yee W.K., Wang T., Chan-Yeung M., Lam W.K., Seto W.H., Yam L.Y., Cheung T.M., Wong P.C., Lam B., Ip M.S., Chan J., Yuen K.Y. & Lai K.N., 2003. A cluster of cases of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *N Engl J Med* 348: 1977-1985.

Uddin S., Sassano A., Deb D.K., Verma A., Majchrzak B., Rahman A., Malik A.B., Fish E.N. & Platanias L.C., 2002. Protein kinase C-delta (PKC-delta) is activated by type I interferons and mediates phosphorylation of Stat1 on serine 727. *J Biol Chem* 277: 14408-14416.

Uetsuka, K., Nakayama, H. & Goto N., 1996. Protective effect of recombinant interferon (IFN)-alpha/beta on MHV-2cc-induced chronic hepatitis in athymic nude mice. *Exp Anim* 45: 293-297.

Vicenzi E., Canducci F., Pinna D., Mancini N., Carletti S., Lazzarin A., Bordignon C., Poli G. & Clementi M., 2004. Coronaviridae and SARS-

associated Coronavirus Strain HSR1. *Emerging Infectious Diseases* 10: 413-418.

Vilcek J., 2003. Novel interferons. *Nat Immunol* 4: 8-9.

Wang C.Z. & Chi C.W., 2003. The biological characteristics of SARS virus and its related coronaviruses. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao* 35: 495-502.

Weber F., Kochs G. & Haller O., 2004. Inverse interference: how viruses fight the interferon system. *Viral Immunol* 17: 498-515.

Woo P.C., Lau S.K., Tsoi H.W., Huang Y., Poon R.W., Chu C.M., Lee R.A., Luk W.K., Wong G.K., Wong B.H., Cheng V.C., Tang B.S., Wu A.K., Yung R.W., Chen H., Guan Y., Chan K.H. & Yuen K.Y., 2005. Clinical and Molecular Epidemiological Features of Coronavirus HKU1-Associated Community-Acquired Pneumonia. *J Infect Dis* 192: 1898-1907.

Yamamoto S., Yano H., Sanou O., Ikegami H., Kurimoto M. & Kojiro M., 2002. Different antiviral activities of IFN-alpha subtypes in human liver cell lines: synergism between IFN-alpha2 and IFN-alpha8. *Hepatol Res* 24: 99.

Yan H., Xiao G., Zhang J., Hu Y., Yuan F., Cole D. K., Zheng C. & Gao G.F., 2004. SARS Coronavirus Induces Apoptosis in Vero E6 Cells. *J Medical Virology* 73: 323-331.

Yang M., Li C.K., Li K., Hon K.L., Ng M.H., Chan P.K. & Fok T.F., 2004. Hematological findings in SARS patients and possible mechanisms. *Int J Mol Med* 14: 311-315.

Yilla M., Harcourt B.H., Hickman C.J., McGrew M., Tamin A., Goldsmith C.S., Bellini W.J. & Anderson L.J., 2005. SARS-coronavirus replication in human peripheral monocytes/macrophages. *Virus Research* 107: 93-101.

Yu S.Y., Hu Y.W., Liu X.Y., Xiong W., Zhou Z.T. & Yuan Z.H., 2005. Gene expression profiles in peripheral blood mononuclear cells of SARS patients. *World J Gastroenterol* 11: 5037-5043.

Zheng B., He M.L., Wong K.L., Lum C.T., Poon L.L., Peng Y., Guan Y., Lin M.C. & Kung H.F., 2004. Potent inhibition of SARS-associated coronavirus (SCOV) infection and replication by type I interferons (IFN-alpha/beta) but not by type II interferon (IFN-gamma). *J Interferon Cytokine Res* 24: 388-390.

Zhong N.S. & Wong G.W., 2004. Epidemiology of severe acute respiratory syndrome (SARS): adults and children. *Paediatr Respir Rev* 5: 270-274.

Ziegler T., Matikainen S., Ronkko E., Osterlund P., Sillanpaa M., Siren J., Fagerlund R., Immonen M., Melen K. & Julkunen I., 2005. Severe acute respiratory syndrome coronavirus fails to activate cytokine-mediated innate immune responses in cultured human monocyte-derived dendritic cells. *J Virol* 79: 13800-13805.