



UNIVERSITÀ DI PARMA

DOTTORATO DI RICERCA IN

“SCIENZE MEDICO-VETERINARIE”

CICLO XXX

***GENERAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI UN VETTORE
BASATO SU BoHV-4 CHE VEICOLA LA GLICOPROTEINA DI
SUPERFICIE DEL VIRUS EBOLA***

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. ATTILIO CORRADI

Relatore:

Chiar.mo Prof. GAETANO DONOFRIO

Dottorando:

Dr. ALFONSO ROSAMILIA

Anni 2014/2017

A mia madre

La ricerca riportata in questa tesi di dottorato è stata pubblicata sulla rivista internazionale
"Journal Translation Medicine":

BoHV-4-based vector delivering Ebola virus surface glycoprotein

Alfonso Rosamilia, Sarah Jacca, Giulia Tebaldi, Silvia Tiberti, Valentina Franceschi,
Francesca Macchi, Sandro Cavirani, Gary Kobinger, Donald Patrick Knowles and Gaetano
Donofrio

Rosamilia *et al.*, J Transl Med (2016) 14:325. DOI 10.1186/s12967-016-1084-5

Tre mesi del dottorato (1 Maggio 2016/31 Luglio 2016) li ho trascorsi presso l'*Institute of Life
Science* alla *Swansea University*, sotto la supervisione del Prof. I.M. Sheldon e del Dr. J.G.
Cronin.

RIASSUNTO

Il virus dell'Ebola (EBOV) è un patogeno di categoria A, membro della famiglia *Filoviridae*, responsabile di una malattia emorragica molto grave, spesso ad esito letale che colpisce l'uomo e la scimmia. Negli anni intercorsi fra il 1976 ed oggi, si sono verificate numerose epidemie della malattia in Africa occidentale. Il gran numero di casi e l'elevato tasso di mortalità, unitamente alla mancanza di trattamenti approvati, hanno creato la necessità di una nuova terapia e, ancor più, di un vaccino protettivo. Inoltre, uno dei limiti principali di lavorare con un virus come l'EBOV è la necessità di operare in strutture di contenimento molto costose.

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di esplorare una nuova strategia basata sull'utilizzo di Bovine Herpesvirus 4 (BoHV-4) come vettore virale a fini vaccinali. BoHV-4 è un *Gammaherpesvirus* caratterizzato da una bassa patogenicità e un ampio spettro d'ospite, sia *in vitro* che *in vivo*; inoltre, esso non sembra avere nessun potenziale oncogenico. Il genoma di BoHV-4 è stato clonato come Cromosoma Artificiale Batterico (BAC) e mostra, quindi, la potenzialità di trasportare geni codificanti antigeni di patogeni differenti; lo stesso ad oggi è stato già testato su diversi modelli animali, mostrando una buona attivazione della risposta immunitaria.

Nel nostro studio è stato generato un gene sintetico, syEBOVgD106, codificante per la glicoproteina immunodominante (GP) di EBOV, ed è stato inserito mediante ricombinazione omologa all'interno del BAC di BoHV-4. Il BAC è stato in seguito trasfettato in cellule permissive per la ricostituzione del virus. Nelle cellule infettate con BoHV-4-syEBOVgD106ΔTK l'EBOV GP è stata abbondantemente espressa senza evidenti cambiamenti nella cinetica di replicazione virale. Negli esperimenti realizzati *in vivo*, mediante inoculo del virus in un modello animale come la capra, è stata confermata la stimolazione di una buona risposta anticorpale attraverso un test ELISA. Le capre immunizzate con BoHV-4-syEBOVgD106ΔTK hanno prodotto alti titoli di anticorpi anti-EBOV GP, conferendo una risposta immunitaria di tipo umorale rilevabile persino oltre sei mesi

dall'inoculo del virus. BoHV-4-syEBOVgD106ΔTK non ha dato viremia e neppure una localizzazione secondaria del virus negli animali immunizzati.

La strategia vaccinale, basata sull'utilizzo di geni sintetici e di una piattaforma vaccinale derivata dal virus BoHV-4, rappresenta un sistema alternativo di espressione di un antigene per la sperimentazione di vaccini verso patogeni di categoria A. Inoltre, l'elevato titolo anticorpale, rilevato fino a sei mesi dopo la prima vaccinazione nelle capre, così come la sicurezza e l'efficienza del vettore stesso, rendono BoHV-4 un eccellente candidato nell'immunizzazione sperimentale delle capre, che possono essere utilizzate come animali siero-produttori.

ABSTRACT

Ebola virus (EBOV) is a Category A pathogen, a member of the *Filoviridae* family responsible for a very serious haemorrhagic disease, often with a lethal outcome affecting human and monkey. In the years between 1976 and today, there have been several epidemics of disease in West Africa. The large number of cases and the high mortality rate along with the lack of approved treatments have created the need of new therapies and even more of protective vaccines. Moreover, one of the main limitations of working with virus such as EBOV is the need to operate in very costly containment structures.

The purpose of this paper was to explore a new therapeutic strategy based on Bovine Herpesvirus 4 (BoHV-4) as a viral vector for vaccine applications. BoHV-4 is a *Gammaherpesvirus* characterized by low pathogenicity and a broad spectrum of hosts, both *in vitro* and *in vivo*. Moreover, it does not seem to have any oncogenic potential. The BoHV-4 genome has been cloned as an Bacterial Artificial Chromosome (BAC) with the potential to carry antigen-encoding genes of different pathogens and has already been tested on several animal models, showing a good activation of the immune response.

In our study a synthetic gene syEBOVgD106, coding for EBOV immunogenic glycoprotein (GP), was developed and inserted by homologous recombination within BoHV-4 BAC. The BoHV-4 BAC was subsequently transfected into permissive cells for the reconstitution of the virus. BoHV-4-syEBOVgD106 Δ TK EBOV infected cells abundantly expressed the GP without detrimental effects on viral replication. Experiments were carried out *in vivo*, by inoculating the virus into a large animal model, stimulation of a good antibody response was confirmed by means of an ELISA assay. Goats immunized with BoHV-4-syEBOVgD106 Δ TK produced high titres of anti-EBOV GP antibodies, giving a humoral immune response detectable up to six months from the inoculum of the virus. No BoHV-4-syEBOVgD106 Δ TK viremia or even secondary location of the virus was detected in immunized animals.

This vaccinal strategy exploiting synthetic genes using a BoHV-4-based vaccine platform is an alternative antigen delivery system to test vaccines against Category A pathogens.

Moreover, high antibody titre, detected up to six months after the first goat vaccination, as well as safety and efficacy, make BoHV-4 an excellent candidate for experimental goat immunization, which can be used as serum-producing animals.

Keywords: Ebolavirus; Bovine Herpesvirus 4; Vaccine platform; Viral vector; Recombination.

INDICE

CAPITOLO 1 - STATO DELL'ARTE.....	10
EBOLA VIRUS.....	10
<i>Classificazione e struttura.....</i>	<i>13</i>
<i>Ciclo replicativo.....</i>	<i>16</i>
<i>Funzione e struttura delle glicoproteine.....</i>	<i>18</i>
<i>Patogenesi.....</i>	<i>20</i>
<i>Sintomatologia nell'uomo.....</i>	<i>24</i>
<i>Vaccini.....</i>	<i>26</i>
BOVINE HERPESVIRUS 4.....	30
<i>Genoma.....</i>	<i>31</i>
<i>Struttura.....</i>	<i>36</i>
<i>Spettro d'ospite in vitro.....</i>	<i>38</i>
<i>Replicazione in vitro.....</i>	<i>39</i>
<i>Spettro d'ospite in vivo.....</i>	<i>41</i>
<i>Patogenesi.....</i>	<i>42</i>
<i>Trasmissione e replicazione.....</i>	<i>43</i>
<i>Risposta immunitaria, profilassi e diagnosi.....</i>	<i>44</i>
<i>BoHV-4 come vettore.....</i>	<i>46</i>
<i>Clonazione del genoma di BoHV-4 come cromosoma artificiale batterico.....</i>	<i>48</i>

CAPITOLO 2 - SCOPO DEL LAVORO E PARTE SPERIMENTALE	52
MATERIALI E METODI	54
RISULTATI	74
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	87
BIBLIOGRAFIA	92
APPENDICE	102

CAPITOLO 1 - STATO DELL'ARTE

EBOLA VIRUS

Nel 1976 occorsero in Africa, in modo indipendente ma quasi simultaneo, due epidemie a diffusione locale: una nel Nord dello Zaire (oggi Repubblica Democratica del Congo) e l'altra nel Sudan del Sud, a quasi 500 chilometri di distanza. Cronologicamente il primo episodio avvenne in Sudan, ma l'evento accaduto in Zaire è più conosciuto, in quanto avvenuto nei pressi del locale fiume Ebola, che ha dato il nome al virus (EBOV, *ebolavirus*) (Brès, 1978). Epicentro del contagio in Zaire fu un piccolo ospedale di una missione cattolica nel villaggio di Yambuku, nel distretto chiamato Bumba Zone. Verso la metà di settembre del 1976 si presentò nell'ambulatorio dell'ospedale un turista al quale fu diagnosticata una forma acuta di malaria e fu sottoposto a un'iniezione di "clorochina". I primi giorni d'ottobre l'ospedale chiuse i battenti per un tragico motivo: quasi tutti quelli che vi lavoravano erano deceduti. Fu accertato che la maggiore responsabilità della diffusione del contagio era da attribuire all'uso multiplo di aghi non sterilizzati. Fra il primo settembre e il 31 ottobre furono registrati 318 casi certi di malattia da virus Ebola (EVD, *Ebola Virus Disease*) di cui 280 letali (Burke *et al.*, 1978).

Nel frattempo si era scoperto che il patogeno era un virus, isolato dopo aver spedito campioni prelevati *in loco* al Centers for Disease Control and Prevention (CDC); esso mostrava caratteristiche simili al virus Marburg (MARV), altro virus letale identificato nel 1967. Il microscopio elettronico rivelò una struttura virale filamentosa e contorta. I test di laboratorio mostrarono che EBOV era sufficientemente differente da MARV per essere considerato un virus a sé stante. Questi due virus filamentosi, EBOV e MARV, sarebbero stati raggruppati come «filovirus» nella nuova famiglia *Filoviridae* (Pattyn *et al.*, 1977).

Il focolaio insorto pochi mesi prima in Sudan coinvolse 284 persone e inizialmente avvenne a Nazara, una piccola città costituita da gruppi di case situate in una zona boschiva confinante con la foresta equatoriale africana. L'epidemia ebbe una notevole espansione nel focolaio che

insorse in un ospedale di Maridi, tra gli operai di un cotonificio. In quell'occasione la percentuale più elevata d'infezione si ebbe fra gli addetti all'assistenza dei pazienti affetti da EVD, che occupavano gran parte dei locali dell'ospedale (Deng et al., 1978). In seguito, quel virus ha ricevuto nella sistematica il nome scientifico *Sudan ebolavirus*. Il ceppo scoperto a Yambuku, invece, prese il nome di *Zaire ebolavirus*.

Passarono dieci anni prima che un filovirus riapparisse sulla scena in un'altra forma e in un luogo impreveduto: Reston, in Virginia, USA. Presso il Reston Primate Quarantine Unit erano arrivati in aereo dalla città di Calamba nelle Filippine dei macachi cinomolghi (*Macaca fascicularis*) evidentemente portando con sé il virus. Dopo la morte di molte di queste scimmie scattò l'allarme e l'agente infettivo fu identificato: era un EBOV, di tipo non ancora noto. Le analisi di laboratorio rivelarono che il virus era sufficientemente diverso da essere definito *Reston ebolavirus* (Jahrling, 1990). Molti impiegati del Reston risultarono sieropositivi, ma nessuno mostrava i sintomi dell'EVD.

Nel novembre 1992 vi fu un'alta mortalità di scimpanzé nel Parco nazionale di Tai, riserva situata ai confini tra la Costa d'Avorio e la Liberia. Un gruppo di queste scimmie era oggetto di studi sul campo e verso la fine del 1994 furono ritrovate otto carcasse di scimmia nel volgere di un breve periodo; due furono dissezionate e una risultò positiva per EBOV. Nel corso dell'operazione, una dottoranda svizzera contrasse il virus. Il settimo giorno la donna fu caricata su un'aeroambulanza e rimpatriata. Divenne il primo caso riconosciuto al mondo di contagio da «Ebola Côte d'Ivoire», poi ribattezzato «Tai Forest ebolavirus» (Le Guenno et al., 1995).

Verso la fine del 2007 comparve un altro ceppo di EBOV, questa volta nell'Uganda occidentale. Il 5 novembre 2007 al Ministero della Salute ugandese arrivò un dispaccio in cui si denunciava la morte di venti persone a Bundibugyo, remota località di montagna situata lungo il confine con la Repubblica Democratica del Congo. Il 28 novembre il CDC comunicò che si trattava di EBOV, ma di un tipo diverso che fu denominato *Bundibugyo ebolavirus*. A fine epidemia, si contarono 116 casi di cui trentanove mortali. Il primo autore dell'articolo Jonathan Towner, asserì: «I genomi delle varie specie divergono almeno di un 30-40 per cento, un fattore elevato che riflette

le diverse nicchie ecologiche occupate da ciascuna di esse e le diverse storie evolutive» (Towner *et al.*, 2008).

Infine, nel corso del 2013 un'epidemia di EVD (Fig. 1) si diffuse in tutta la Guinea (soprattutto Guinea Konacry) e, oltre i confini di questa nazione, nell'Africa occidentale (Sierra Leone, Liberia e Repubblica Democratica del Congo). Tale epidemia è stata la più grave nella storia di questa malattia, sia per numero di casi sia per i decessi registrati (CDC, 2014). Due varianti di *Zaire ebolavirus* sono state la causa delle epidemie che hanno causato almeno 28.657 casi sospetti e 11.325 morti confermati. I due virus sono stati chiamati "Makona", come il fiume Makona, vicino al confine tra Liberia, Guinea e Sierra Leone (virus Ebola/H.sapiens/2014/Makona), e "Lomela", come il fiume Lomela, nella Repubblica Democratica del Congo (Virus Ebola/H.sapiens/2014/Lomela) (Kuhn *et al.*, 2014). Negli ultimi trenta anni, il notevole lavoro sul campo ha chiarito che gli EBOV sono presenti all'interno dell'ecosistema dell'Africa equatoriale, coinvolgendo specie diverse di pipistrelli della frutta, additati come ospite serbatoio del virus e coinvolti nel riemergere di nuove epidemie di EVD (Baseler *et al.*, 2017).

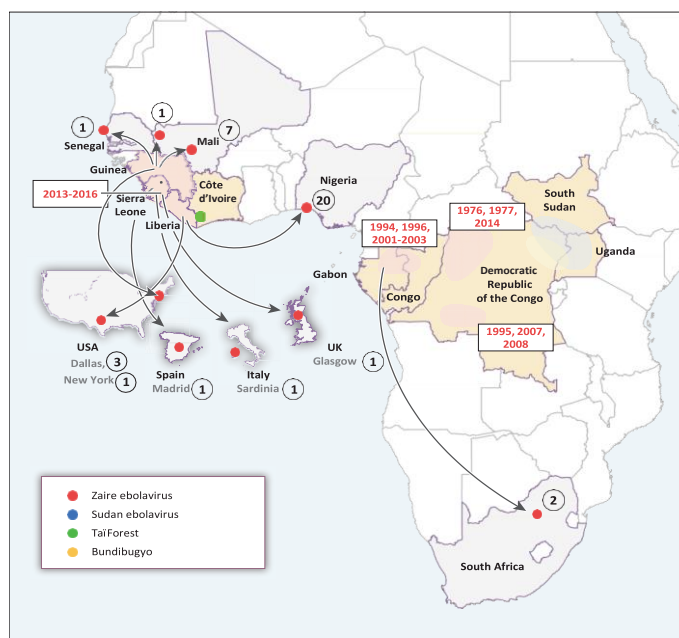


FIGURA 1. Localizzazione geografica degli episodi di EVD dal 1976 al 2016. La mappa mostra tutti i focolai umani associati alle diverse specie di EBOV nel continente africano. I numeri cerchiati indicano i casi di EVD derivanti dal contatto con persone con EBOV provenienti da diversi Stati africani (Baseler *et al.*, 2017).

Classificazione e struttura

La famiglia *Filoviridae*, recentemente riesaminata (Burk *et al.*, 2016), è inclusa nell'ordine *Mononegavirales* e comprende tre generi: *Ebolavirus*, *Marburgvirus* e *Cuevavirus* (<http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>); il genere *Ebolavirus* è, inoltre, suddiviso in cinque specie, ciascuna delle quali è rappresentata da un unico tipo di virus: *Tai Forest ebolavirus* (TAFV), *Reston ebolavirus* (RESTV), *Sudan ebolavirus* (SUDV), *Bundibugyo ebolavirus* (BDBV) e *Zaire ebolavirus* (EBOV). Esistono diversi ceppi di EBOV, tra cui *Mayinga EBOV*, lo storico ceppo isolato nell'epidemia del 1976, e *Makona EBOV*, il ceppo dell'ultima epidemia diffusasi in Africa occidentale nel 2013-2015. Il virus Marburg (MARV) e il virus Ravn (RAVV) sono virus strettamente correlati appartenenti all'unica specie *Marburg marburgvirus*; il virus di Lloviu (LLOV) appartiene alla specie *Lloviu cuevavirus* nel genere *Cuevavirus*, ma devono ancora essere isolati. Le sequenze di *Cuevavirus* sono state osservate nei pipistrelli spagnoli, ma l'associazione con la malattia umana non è nota (Negredo *et al.*, 2011).

I filovirus appaiono polimorfi, potendosi presentare come lunghi filamenti, talvolta ramificati, oppure come filamenti piuttosto corti ripiegati a forma di "U" (Fig. 2) (Feldmann, *et al.*, 2003). Il virus ha un diametro uniforme, pari a 80 nm, ma varia notevolmente in lunghezza (fino a 14.000 nm) (Geisbert and Jahrling, 1990).

Il genoma è costituito da una molecola lineare di RNA monocatenario, di senso negativo, di circa 19 kb (Mahanty and Bray, 2004). Il genoma mostra la seguente struttura (Fig. 3): 3'-leader → gene nucleoproteina (NP) → gene proteina virale (VP) 35 → gene VP 40 → gene glicoproteina (GP) → gene VP30 → gene VP24 → gene polimerasi (L) → 5'-trailer. Ogni gene è affiancato da regioni non tradotte (UTRs, *untranslated region*), inclusi segnali di avviamento e di stop trascrizionali. Tutti i geni sono monocistronici ad eccezione del gene della GP, che codifica un totale di tre glicoproteine. Il prodotto primario è la GP solubile (sGP, *secreted GP*). Attraverso l'elaborazione dell'RNA eseguita dal complesso virale della polimerasi, gli *ebolavirus* riducono l'espressione della GP transmembrana e producono una seconda piccola glicoproteina solubile (ssGP). Questo editing dell'RNA è una caratteristica che distingue gli *ebolavirus* dai

marburgvirus (Feldman *et al.*, 2013). Entrambe le glicoproteine solubili sono proteine non strutturali e sono secrete dalle cellule infette.

La struttura nucleare delle particelle dei filovirus è composta dal genoma a RNA e dalle proteine NP, VP35, VP30 e L ed è, inoltre, associata con la VP24. La VP40 è la proteina della matrice associata alla membrana, forma la struttura filamentosa delle particelle virali e collega il nucleocapside con la membrana lipidica dell'ospite. L'estremità carbossiterminale della GP è inserita nella membrana virale come una glicoproteina transmembrana di tipo I (Hoenen *et al.*, 2014).

Le proteine di EBOV hanno funzioni distinte nel ciclo di replicazione (Feldman *et al.*, 2013; Kuhn *et al.*, 2014). La nucleoproteina NP incapsula il genoma, protegge l'RNA dalla degradazione ed è la componente principale del complesso ribonucleoproteico virale (RNP). La VP35 è un cofattore della polimerasi, una fosfoproteina equivalente agli altri mononegavirales. La VP30 è un attivatore trascrizionale che supporta la trascrizione e l'editing dell'RNA. L'RNA polimerasi-RNA dipendente s'identifica con la proteina L e porta i domini funzionali per la trascrizione e la replicazione del genoma. Queste quattro proteine virali formano il RNP e sono sufficienti per guidare la replicazione e la trascrizione del genoma. La VP24 svolge un ruolo importante nell'assemblaggio del RNP e la VP40 medierà il rilascio delle particelle virali dalla cellula infetta. La GP media l'entrata del virus attraverso il legame e la fusione del recettore all'interno dell'endosoma. La VP35 e la VP24 sono, rispettivamente, forti inibitori della produzione di interferone e della segnalazione per gli interferoni. La VP35 ha molteplici funzioni aggiuntive che interferiscono con la risposta immunitaria innata dell'ospite (Messaoudi *et al.*, 2015). Le funzioni delle sGP e ssGP rimangono sconosciute. La sGP è stato ipotizzato agisse come esca ("decoy") per gli anticorpi che altrimenti si legherebbero alla GP (Basler, 2015).

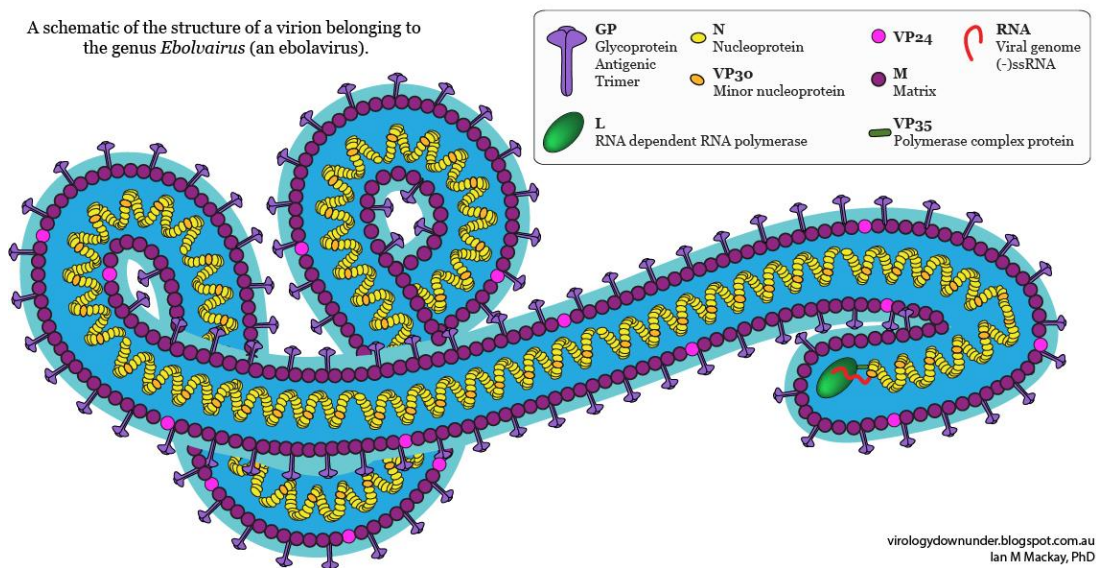


FIGURA 2. Rappresentazione schematica di EBOV.
(<https://virologydownunder.blogspot.it/2015/02/ebola-virus-disease-obliterating.html>)

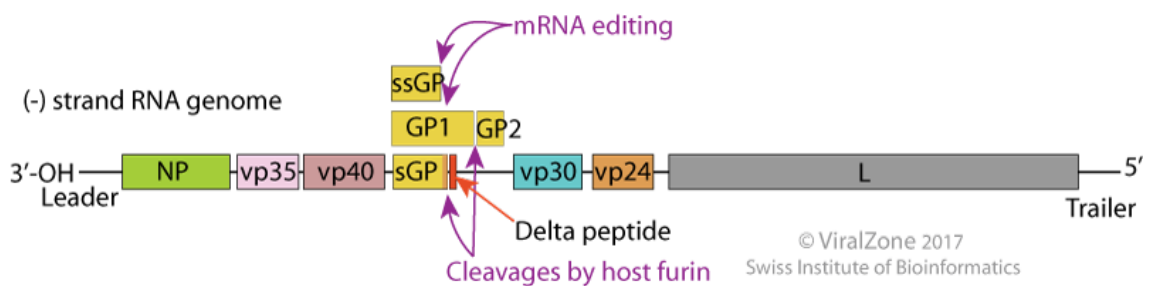


FIGURA 3. Organizzazione del genoma di EBOV. GP = glicoproteina; NP = nucleoproteina; VP = proteina virale; L = grande proteina (RNA-polimerasi RNA dipendente)
(<https://virologydownunder.blogspot.it/2015/02/ebola-virus-disease-obliterating.html>).

Ciclo replicativo

EBOV infetta le cellule attaccandosi a una varietà di molecole cellulari. Dopo l'adsorbimento attraverso l'interazione tra alcune proteine plasmatiche superficiali della cellula (lectine tipo C, DC-SIGN, L-SIGN, integrine, TIM-1, Axl) e le glicoproteine dell'envelope ricche di mucina, i virioni penetrano nella cellula mediante un processo di macropinosi (**Fig. 4**) e in misura minore, di endocitosi mediata dalla clatrina (Alvarez *et al.*, 2002; Simmons *et al.*, 2003; Takada *et al.*, 2004).

La macropinosi è seguita dalla fusione dell'envelope con la membrana endosomale cellulare e, dopo l'acidificazione della vescicola entro cui si trovano inglobati i virioni, la glicoproteina dell'envelope (GP₀) è scissa dalle proteasi endosomiali catepsina B e catepsina L nella forma attiva GP₁ (Brecher *et al.*, 2012; Chandran *et al.*, 2005). Questa scissione rimuove una regione fortemente glicosilata di GP₀ (*cap*) ed espone un dominio che le consente di interagire con la proteina endosomale/lisosomiale Niemann-Pick C1 (NPC1). Il legame è sufficiente ad attivare la fusione delle membrane virali e cellulari e rilasciare l'RNP nel citoplasma, dove è avviata la trascrizione primaria (Miller *et al.*, 2012).

In seguito EBOV deve sintetizzare la sua RNA-polimerasi-RNA-dipendente (RdRP) in modo che possa avviare la trascrizione e la replicazione. La proteina L è la RdRP, che dovrà essere impacchettata nei virioni svolgendo pertanto tutte le funzioni catalitiche richieste per la replicazione e la trascrizione, come poliadenilazione, polimerizzazione, metilazione e attività guanilil-transferasica necessarie ad aggiungere il *cap* all'estremità 5' del mRNA virale (Muhlberger, 2007). Un complesso di replicazione composto dalla VP30, VP35 e RdRP genera sette mRNA monocistronici e copia il genoma per la sintesi di una catena di RNA di senso positivo (antigenoma), che a sua volta funge da stampo per la catena di RNA a polarità negativa. La fosforilazione della VP30 porta alla dissociazione del complesso VP35/proteina L, dopo di che dalla trascrizione si passa alla replicazione del genoma. Dopo la trascrizione del genoma virale di senso negativo, da un intermedio di senso positivo, i genomi nascenti sono impacchettati dalle proteine nucleocapsidiche e dalla proteina L con l'RNP tramite la VP35. Il

processo di duplicazione del genoma è terminato quando non sono più disponibili le proteine capsidiche; a questo punto riprende la trascrizione che s'interromperà di nuovo quando il numero delle proteine capsidiche sarà sufficientemente elevato perché possa riprendere la duplicazione del genoma (molecole della progenie). L'accumulo dei nuovi genomi associati alla nucleoproteina e alla VP30 per formare i nucleocapsidi nel citoplasma si traducono con la comparsa d'inclusioni cellulari, la cui presenza può essere rilevata attraverso l'osservazione dei preparati al microscopio ottico, applicando la metodica dell'immunofluorescenza oppure servendosi del microscopio elettronico. Non appena si raggiunge un'adeguata concentrazione di nucleocapsidi a polarità negativa e di proteine dell'envelope, tutti questi componenti si addossano alla membrana citoplasmatica e in misura minore alle membrane dei vacuoli intracellulari. L'assemblaggio dei nuovi virioni avviene sulla superficie interna della membrana plasmatica, quando i nucleocapsidi legano le code citoplasmatiche di GP_{1,2} legate alla membrana. La proteina "matrice" VP40 faciliterebbe la fase di gemmazione. Infatti, recluta il complesso proteico cellulare ESCRT (*Endosomal sorting complexes required for transport*) per creare l'invaginazione della membrana e permettere la gemmazione dei virioni maturi (Pleat et al., 2017).

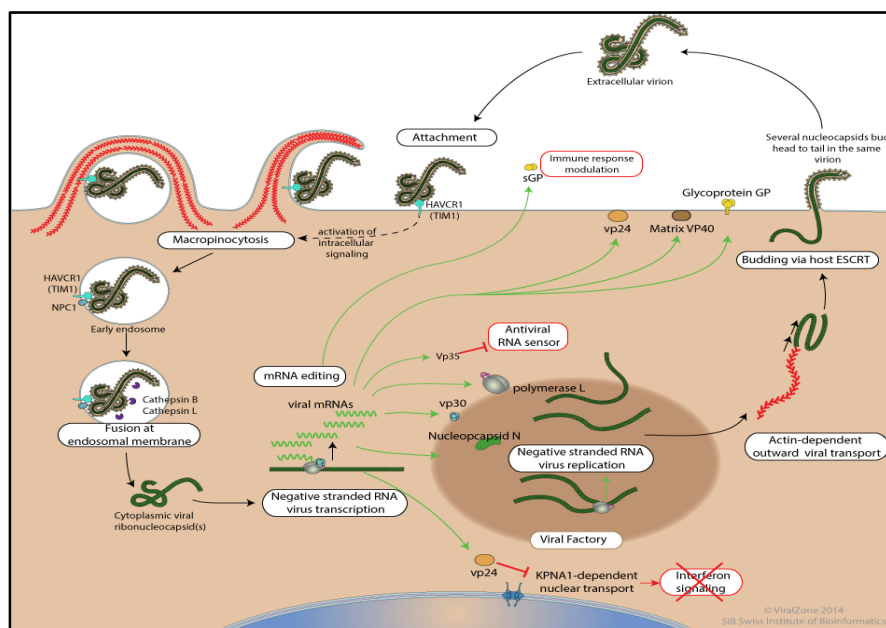


FIGURA 4. Ciclo replicativo di EBOV (<http://viralzone.expasy.org/5016>).

Funzione e struttura delle glicoproteine

L'ingresso di EBOV nella cellula è un processo in varie fasi costituito da: attacco alla cellula ospite, internalizzazione negli endosomi e fusione con le membrane endosomiali; la sola proteina del virus responsabile di questi processi è la glicoproteina GP_{1,2}. La trascrizione e la traduzione del Gene 4 (gene codificante la GP) danno origine a diversi prodotti durante l'infezione. Il principale prodotto dell'*open reading frame* (ORF) è il trascritto pre-sGP (80%). Questo si traduce in proteine pre-sGP, che vengono poi scisse dalla furina nella sGP e in un piccolo frammento C-terminale, denominato peptide "delta" (Δ) (Volchkova *et al.*, 1998). Considerando che la proteina si ritrova a concentrazioni elevate nel sangue di pazienti colpiti dall'infezione in forma acuta, la sGP potrebbe svolgere un ruolo nell'evasione della risposta immunitaria umorale assorbendo gli anticorpi formati, e si pensa giochi un ruolo antinfiammatorio attraverso il recupero funzionale della barriera endoteliale, come osservato nei casi più gravi della malattia (Wahl-Jensen *et al.*, 2005).

La restante ORF del gene codifica per la forma di GP legata alla membrana (Sanchez *et al.*, 1996) e una piccola glicoproteina secreta (ssGP); tuttavia, questo piccolo monomero non è stato dimostrato in corso d'infezione da EBOV (Volchkov *et al.*, 1995). Il trascritto della GP è inizialmente tradotto come un precursore (GP₀), il quale è poi scisso dalla Furina (Fig. 5) nell'apparato del Golgi in due subunità: una di superficie, GP₁, e una transmembrana, GP₂ (Volchkov *et al.*, 1998). Queste subunità restano unite attraverso un legame di cisteina (Jeffers *et al.*, 2002) e sono associate non-covalentemente con altri due eterodimeri in un complesso trimerico superiore a costituire la GP, che sarà in seguito incorporata durante la gemmazione dei virioni (Sanchez *et al.*, 1998). Oltre all'ancoraggio della glicoproteina alla membrana, la GP₂ è coinvolta nel trasporto del complesso ribonucleico nel citosol (Weissenhorn *et al.*, 1998). La subunità di GP₁ è responsabile dell'adesione e dell'entrata del virus nella cellula. Questa subunità ospita il RBD (*receptor-binding domain*), il quale si lega sulla superficie delle cellule sensibili. Inoltre, all'estremità carbossiterminale della GP₁ sono presenti due domini altamente glicosilati: il *glycan cap* e il *mucin-like domain* (MLD). La glicosilazione è, infatti, la caratteristica

principale della GP (Dube *et al.*, 2009). La EBOV GP contiene 17 siti glicosilati, di cui 8 si trovano nel dominio mucinico. Le modificazioni post-traduzionali della GP₁ sono necessarie per conferirle tossicità e l’N-glicosilazione la protegge dagli anticorpi siero-neutralizzanti (Lennemann *et al.*, 2014). Anche se la glicosilazione è eterogenea, in generale i glicani sulla sGP subiscono più elaborazioni e modifiche rispetto a quelli della GP. Grandi quantità di sGP e della forma troncata di GP sono state rilevate nel sangue dei pazienti infetti e degli animali infettati sperimentalmente. Il rilascio della sGP è spiegato attraverso il percorso classico di secrezione proteica per la mancanza di un’ancora transmembrana. La scissione della GP di superficie, invece, in un sito prossimale all’ancora transmembrana, avviene per opera della metalloproteasi cellulare TACE (enzima convertitore il TNF-alfa), un membro della famiglia delle ADAM (una disintegrina e metalloproteasi) proteinasi (Dolnik *et al.*, 2004).

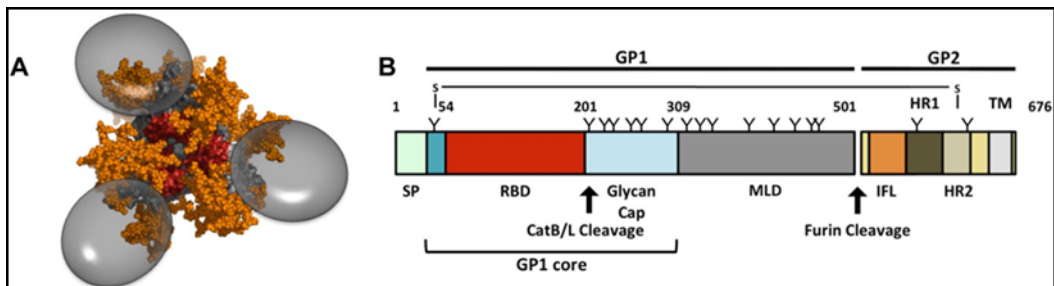


FIGURA 5. Schema dell'EBOV GP. (A) Modello molecolare della GP₁/GP₂ mostrato in una vista dall'alto. I complessi glicosilici sono mostrati in arancione; la GP in grigio chiaro; l'RBD in rosso e il MLD è rappresentato dalle sfere grigie. **(B)** Modello lineare di EBOV GP. È indicato il legame disolfuro tra GP₁ e GP₂, così come le posizioni degli N-glicani (contrassegnati con la "Y") nei domini GP₁ e GP₂ e sono noti i siti di scissione della proteasi. SP, segnal peptide; RBD, receptor-binding domain; MLD, dominio mucino; IFL, loop interno di fusione; HR1 e 2, heptad repeats 1 e 2; TM, dominio transmembrana (modificata da Lennemann *et al.*, 2014).

Patogenesi

Negli esseri umani e nei primati non umani (NHPs), gli alti livelli di replicazione di EBOV, associati alla diffusione sistemica a carico di varie tipologie cellulari, produce una complessa patogenesi caratterizzata sia dalla soppressione sia dall'iper-reattività della risposta immunitaria, da un disordine della coagulazione e un danno tissutale, dovuti agli effetti diretti del virus e indiretti mediati dall'ospite. In mancanza di un adeguato supporto, questi processi terminano spesso con il collasso organico e la morte sopraggiunge in circa dieci giorni dall'insorgenza dei primi sintomi (**Fig. 6**) (Baseler *et al.*, 2017).

Dopo l'ingresso nell'organismo dell'ospite attraverso le mucose, le abrasioni cutanee o tramite l'introduzione accidentale con aghi contaminati, EBOV colpisce le cellule dendritiche (DCs) e altre cellule della linea monocitica/macrofagica (Geisbert *et al.*, 2003). EBOV è in grado di infettare e uccidere un'ampia varietà di cellule oltre quelle già citate: le cellule del Kupffer del fegato, i fibroblasti, gli epatociti, le cellule della ghiandola surrenale, le cellule endoteliali e le cellule epiteliali. Le cellule del sistema fagocitario infettate dal virus viaggiano attraverso i vasi linfatici arrivando ai linfonodi e alle catene linfatiche, in cui si ha un'abbondante replicazione e diffusione del virus, che avviene prima dell'insorgenza dei sintomi. Nei primi tre giorni dopo l'inizio dei sintomi, la carica virale, valutata attraverso una reazione a catena della polimerasi di tipo quantitativo (q-RT PCR), aumenta esponenzialmente nel sangue da livelli non rilevabili ad oltre 10^5 particelle virali per ml (Lanini *et al.*, 2015); in questo modo EBOV supera i meccanismi di controllo immunitario per diffondendosi ampiamente nel flusso sanguigno (Davis *et al.*, 1997). All'inizio del processo infettivo, molti organi vengono così rapidamente infettati, in particolare il fegato e la milza.

I linfociti sembrano essere un tipo cellulare resistente all'infezione virale (Martines *et al.*, 2015). La replicazione e l'estesa diffusione di EBOV sono basate sull'efficace evasione delle risposte immunitarie dell'ospite. EBOV utilizza diversi meccanismi per raggiungere quest'obiettivo, incluso l'antagonismo alla risposta dell'interferone (IFN) di tipo I, mediata dalle proteine strutturali VP24 e VP35 (Yen *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2012).

La VP24 blocca la segnalazione all'IFN impedendo la dimerizzazione delle tirosin-chinasi, la traslocazione nucleare del trasduttore di segnale e dell'attivatore della trascrizione 1 (STAT1) (Reid *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2012). Il dominio inibitore dell'IFN (IID) di VP35 lega il dsRNA nella cellula ospite e impedisce di legarsi al recettore citoplasmatico *retinoic acid-inducible gene-1* (RIG-I) e al *melanoma differentiation-associated gene 5* (MDA-5). Ciò compromette la fosforilazione del fattore di regolazione dell'IFN (IRF) -3 e dell'IRF-7, inibendo così l'espressione dell'IFN di tipo I (Cardenas *et al.*, 2006; Leung *et al.*, 2010). Inoltre, la VP35 inibisce la maturazione delle DCs interferendo con il percorso di segnalazione di RIG-I: impedisce l'*up-regulation* del complesso maggiore d'istocompatibilità (MHC) -I e MHC II e delle molecole co-stimolatrici CD40, CD80 e CD86, compromettendo così la presentazione degli antigeni alle cellule T CD8+ e CD4+ e l'attivazione delle cellule T (Jin *et al.*, 2010; Yen *et al.*, 2014) e bloccando così il collegamento della risposta immunitaria innata con quella adattativa. La sGP, una proteina virale abbondantemente rilasciata durante la fase acuta della malattia e circolante a livelli elevati nel siero, funge da esca ("*decoy*"), legando gli anticorpi neutralizzanti diretti contro l'EBOV GP compromettendo l'esito della risposta immunitaria umorale (Ito *et al.*, 2001). S'ipotizza che la glicosilazione della GP possa ostacolare in modo efficace il legame degli anticorpi neutralizzanti (Francica *et al.*, 2010), come avviene per un certo numero di virus non correlati. Sebbene i linfociti non siano infettati da EBOV, la loro apoptosi provoca linfopenia precoce e l'esaurimento delle cellule linfoidi nella milza e nei linfonodi, influenzando ulteriormente le risposte immunitarie adattative (Geisbert *et al.*, 2003; Sanchez *et al.*, 2004). Il meccanismo sottostante l'apoptosi linfocitaria non è ben compreso, anche se s'ipotizza il coinvolgimento di percorsi apoptotici intrinseci ed estrinseci (Wauquier *et al.*, 2010).

Il danno tissutale negli individui infetti da EBOV è causato da meccanismi multipli, che includono gli effetti diretti virus-indotti, indiretti causati dalle risposte infiammatorie dell'ospite, dalla disfunzione endoteliale e da fenomeni coagulativi disordinati. Studi *in vitro* hanno dimostrato che gli effetti citopatici, tra i quali l'arrotondamento e il distacco cellulare, sono mediati dalla GP virale (Yang *et al.*, 2000). Tecniche di Immunoistochimica (IHC) hanno

dimostrato la co-localizzazione della necrosi tissutale e dell'antigene virale nei casi fatali di malattia (Zaki *et al.*, 1999). Le citochine e le chemochine pro-infiammatorie come il fattore di necrosi tumorale (TNF) α , l'interleuchina (IL) -1, IL-6, la proteina chemoattrattante i monociti (MCP) -1, la proteina infiammatoria dei macrofagi (MIP) -1 α e MIP-1 β , e il *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) e l'espressione e produzione di ossido nitrico (NO), sono stati osservati in modo evidente nelle infezioni fatali da EBOV e contribuiscono al danno tissutale (Sanchez *et al.*, 2004; Wauquier *et al.*, 2010). Le citochine pro-infiammatorie e le chemochine reclutano, infatti, i leucociti nei tessuti infetti per limitare la disseminazione del virus e uccidere le cellule infettate dal virus, contribuendo così ai danni tissutali (Topham *et al.*, 2009). L'NO rilasciato dai macrofagi attivati può innescare l'apoptosi delle cellule parenchimali o la necrosi (Wei *et al.*, 2000). Studi *in vitro* suggeriscono che l'aumentata espressione di TRAIL e le interazioni aumentate di Fas-Fas possono innescare l'apoptosi linfocitaria, portando a una severa deplezione linfocitaria nella linfa e nei linfonodi (Gupta *et al.*, 2007). L'infezione di EBOV dei fagociti mononucleari e l'attivazione del sistema immunitario contribuiscono, inoltre, ad aumentare l'espressione del fattore tissutale sui monociti/macrofagi (Geisbert *et al.*, 2003). Il fattore tissutale innesca il percorso di coagulazione estrinseca che porta alla formazione di trombi di fibrina. Il TNF- α può diminuire i livelli di trombomodulina e la lesione epatica può compromettere la produzione di proteine C e S; tutti questi effetti concorrono alla diminuzione degli effetti anticoagulanti. La susseguente coagulopatia che s'instaura in corso d'infezione da EBOV è caratterizzata da trombocitopenia, formazione e deposizione di trombi di fibrina e aumentati prodotti di degradazione della fibrina (Geisbert *et al.*, 2003; Twenhafel *et al.*, 2013). I trombi microvascolari della fibrina contribuiscono all'ischemia tissutale e alla necrosi; il consumo del fattore della coagulazione predispone l'individuo infetto a sanguinamenti all'interno dei tessuti e dalle superfici della mucosa (Taylor *et al.*, 2001). Si ritiene che i segni classici dell'EVD, incluse emorragie congiuntivali, gengivali, da orifizi e siti di venipunzione, rappresentino il risultato della coagulazione intravascolare disseminata (DIC). EBOV infetta anche le cellule endoteliali; gonfiore, necrosi e perdita di cellule endoteliali sono state, infatti,

riportati in alcuni casi fatali e probabilmente contribuiscono alla permeabilità vascolare e alla coagulazione intravascolare (Martines *et al.*, 2015). *In vitro*, l'EBOV GP causa arrotondamenti, distacco e perdita delle cellule endoteliali, compromettendo potenzialmente le giunzioni intercellulari e portando ad una maggiore permeabilità vascolare (Yang *et al.*, 2000). Il rilascio di NO da parte delle cellule endoteliali e monociti/macrofagi e di TNF- α dai monociti/macrofagi induce la vasodilatazione e aumenta la permeabilità vascolare, contribuendo così all'esaurimento del volume intravascolare e allo shock ipovolemico (Jerca *et al.*, 2002).

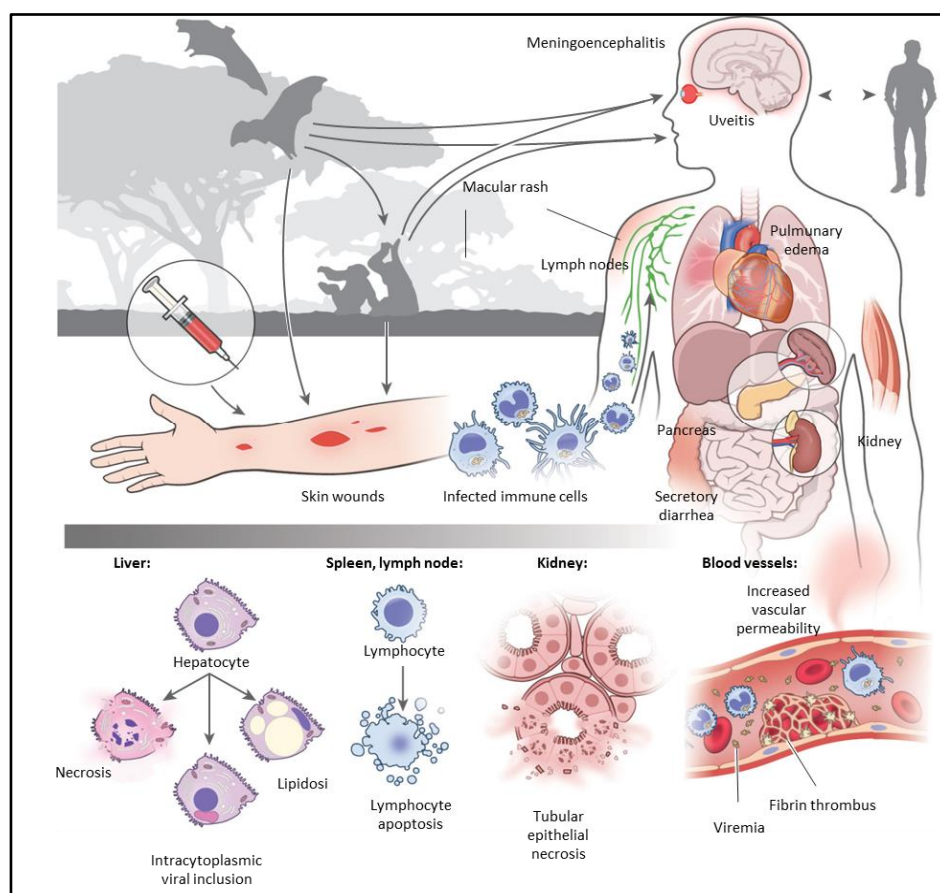


FIGURA 6. La trasmissione e la patogenesi dell'infezione da EBOV. La trasmissione zoológica, nosocomiale e tramite contatto diretto da persona a persona di EBOV. I fagociti mononucleari trasportano il virus ai linfonodi regionali. La replicazione del virus è seguita da viremia e diffusione virale, che porta a danni tissutali e vascolari (Baseler *et al.*, 2017).

Sintomatologia nell'uomo

Il periodo d'incubazione è tipicamente di 3-9 giorni e i primi sintomi non sono specifici dell'EVD e comprendono malessere generale, affaticamento, mialgia che precedono o concorrono all'insorgenza della febbre (>38°C) (Bwaka *et al.*, 1999). Questi primi sintomi non possono differenziare in modo affidabile l'EVD da altre infezioni osservate regolarmente in Africa, quale la malaria, la leptospirosi, l'influenza, la febbre gialla, la dengue e infezioni virali o batteriche intestinali.

I primi sintomi precedono la presenza di RNA virale nel sangue (**Fig. 7**) e tipicamente i soggetti che giungono a morte sono anche quelli con i livelli più alti di RNA virale rispetto ai soggetti che sopravvivono (Lanini *et al.*, 2015). Nella prima settimana di malattia i sintomi principali sono nausea, vomito e diarrea intensa e acquosa (Chertow *et al.*, 2014). Durante questo periodo i pazienti sono altamente infettivi. La profonda diarrea acquosa raggiunge i 5-10 litri al giorno, con feci simili a quelle osservate in corso di colera, inizia intorno al quinto giorno e può durare sette o più giorni prima di scomparire (Lyon *et al.*, 2014). Le ulcere orali, la disfagia e gli attacchi ricorrenti di emesi possono ridurre l'assunzione di liquidi per via orale. Senza un'adeguata reidratazione con soluzioni elettrolitiche, le perdite, esacerbate dalla febbre possono portare a una grave disidratazione e allo shock ipovolemico, contribuendo alla morte (Chertow *et al.*, 2014). La seconda settimana di EVD è caratterizzata dalla presenza di RNA virale stabile o in declino nel sangue e in alcuni casi è associata con la massima disfunzione organica che porta alla morte. Chi sopravvive sviluppa risposte immunitarie protettive (Ksiazek *et al.*, 1999). L'interessamento del sistema nervoso centrale (SNC) è caratterizzato da meningoencefalite e diminuzione dello stato di coscienza, mioclonie e un'iper-reflessia (Chertow *et al.*, 2016). Il delirio nell'EVD può derivare da ipoglicemia, uremia e iperammonemia causata da gravi danni al fegato. La debolezza neuromuscolare può anche contribuire all'insufficienza respiratoria (Chertow *et al.*, 2016). Altri sintomi neurologici includono neuropatia periferica, convulsioni e coma (Schieffelin *et al.*, 2014). Nell'EVD si osservano frequentemente lesioni acute del rene, che possono progredire verso un'insufficienza renale con oliguria e anuria (Hunt *et al.*, 2015).

Durante la malattia acuta sono stati descritti disturbi oculari, incluse iniezioni congiuntivali, uveite con visione offuscata (Kibadi *et al.*, 1999). Durante la prima settimana dell'EVD può apparire un'eruzione maculopapulare diffusa, non pruriginosa ed eritematosa. Durante la seconda settimana l'eruzione diventa confluyente, manifestandosi come eritroderma diffusa, che si risolve con desquamazione (Kortepeter *et al.*, 2011). L'EVD produce un'elevata mortalità materna e perinatale, con la maggior parte delle gravidanze che terminano nell'aborto spontaneo o nella morte neonatale (Mupapa *et al.*, 1999). La risoluzione della viremia consente la riparazione delle lesioni tissutali. Inoltre, i sopravvissuti da EVD presentano sequele che possono persistere per un anno o più (Mattia *et al.*, 2016). La persistenza virale nel seme dei sopravvissuti maschi ha raggiunto i 531 giorni dall'infezione (Jacobs *et al.*, 2016).

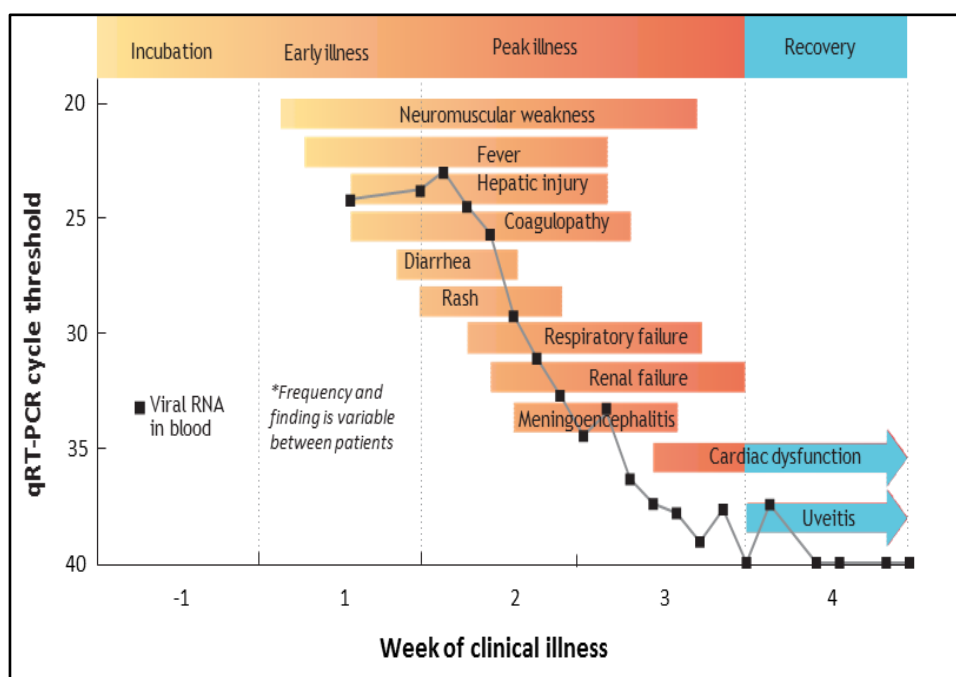


FIGURA 7. Decorso clinico dell'EVD. La rivelazione di RNA virale nel sangue mediante qRT-PCR (grafico della linea), ritenuta rappresentativa della quantità di virioni infettivi, avviene dopo l'insorgenza della malattia clinica. Mentre l'EVD progredisce, la disfunzione organica si verifica nonostante l'RNA virale diminuisce nel sangue (Chertow *et al.*, 2016).

Vaccini

Nonostante siano trascorsi più di quattro decenni dalla scoperta dei filovirus, ad oggi nessun vaccino è stato ancora approvato per EBOV. Tuttavia, sono state sviluppate diverse strategie vaccinali che offrono una protezione completa sia nei modelli murini sia nei NHPs (Geisbert *et al.*, 2010).

La prima piattaforma vaccinale verso EBOV è stata sperimentata nel 1980, utilizzando un vaccino inattivato. Il metodo d'inattivazione del virus permise la protezione totale delle cavie inoculate (Lupton *et al.*, 1980). Da allora è stato proposto lo sviluppo di una varietà di differenti piattaforme vaccinali (Fig. 8).

La prima piattaforma vaccinale che ha protetto efficacemente i NHPs dall'EVD, è stata l'adenovirus sierotipo 5 (rAd5) ricombinante, esprime l'EBOV GP e lo stesso rAd5 combinato con un plasmide che codifica per la GP e la NP di EBOV, la GP di SEBOV e la GP di TAFV (Taï Forest). Questi approcci hanno indotto un miglioramento dei livelli di anticorpi anti-GP circolanti ed hanno generato una risposta delle cellule T CD4+ e CD8+ negli animali immunizzati (Pratt *et al.*, 2010; Sullivan *et al.*, 2003). Tuttavia, la piattaforma vaccinale basata sull'utilizzo dell'adenovirus mostra un problema considerevole: il vaccino rAd5 si basa sull'adenovirus (Ad) - 5, verso cui gran parte delle persone è sieropositiva. Dunque, il tasso di risposta alla vaccinazione è più basso nei soggetti sieropositivi. Per aggirare l'immunità preesistente ai vettori rAd5 umani sono stati utilizzati l'Ad26 e l'Ad35 (Geisbert *et al.*, 2011). L'Ad35 si è dimostrato essere poco efficiente, a differenza dell'Ad26 che è stato in grado di eludere l'immunità preesistente per l'Ad5. Il vaccino è stato ben tollerato in tutti i partecipanti e i titoli anticorpali hanno raggiunto un livello simile a quello osservato nei NHPs (Ledgerwood *et al.*, 2017). L'unico problema che riguarda questi vaccini è stato la durata delle risposte immunitarie protettive, poiché i titoli degli anticorpi cominciavano a diminuire sei mesi dopo la vaccinazione (De Santis *et al.*, 2016). Recentemente, un gruppo ha aggiornato il precedente vaccino rAd5-EBOV per esprimere la GP dell'ultimo ceppo epidemico EBOV-Makona, che ha dimostrato la completa protezione nei NHPs (Wu *et al.*, 2016).

Altra tipologia di vaccini in fase di studio è quella a subunità; questi possono essere divisi in vaccini classici a subunità, che utilizzano proteine virali ricombinanti e le particelle virus-simili (VLPs), nelle quali le proteine si auto-assemblano (Hoenen *et al.*, 2012). Recentemente, il dominio extracellulare della GP è stato fuso al frammento Fc dell'IgG1 umana ed è stata testata nei topi. Questo vaccino a subunità ha mostrato una parziale protezione nei topi (Konduru *et al.*, 2011), mentre nelle cavie, dove si utilizzava un adiuvante, è stata osservata una protezione del 100% (Konduru *et al.*, 2016).

I vaccini a base di VLPs sono molto promettenti. Le VLPs sono state prodotte dall'espressione di due geni virali, la proteina VP40 e la GP, in cellule di mammifero e d'insetti (Swenson *et al.*, 2008; Warfield *et al.*, 2007). Considerata la sicurezza e la capacità d'indurre un'immunità umorale e cellulare, le VLPs sono una piattaforma promettente per la messa a punto di un vaccino per EBOV (Reynolds and Marzi, 2017).

Simile al sistema delle VLPs è quello delle *virus-like replicon particle* (VRP), che sono generate utilizzando come vettore un flavivirus o un alphavirus; queste VRPs sono limitate a un solo ciclo replicativo attraverso la cancellazione di alcune proteine strutturali. Un esempio è stato l'utilizzo del virus dell'encefalite equina venezuelana (VEEV). I geni strutturali del VEEV sono stati sostituiti con quelli dell'EBOV GP e il risultante replicone è stato espresso da un vettore a RNA e confezionato nelle particelle virali, fornendo le proteine strutturali di VEEV *in trans*. Le VRPs risultanti infettano la cellula e determinano la produzione di ampie quantità della proteina desiderata. Le VRPs sono state utilizzate per immunizzare i topi e le cavie, conferendo protezione, ma non erano protettive nei NHPs (Pushko *et al.*, 2000).

Una strategia vaccinale, recentemente sperimentata, è quella messa a punto dal gruppo di Halfmann e coll. che utilizza un EBOV deficitario, che presenta una replicazione incompleta (Halfmann *et al.*, 2009). Il vaccino EBOV Δ VP30 è costituito dal ceppo *Mayinga*, dove la regione che codifica per la VP30 è stata eliminata (Halfmann *et al.*, 2008). EBOV Δ VP30 può infettare le cellule VERO (*African green monkey cells*) che esprimono la VP30, ma non produrre una progenie infettiva. Il virus è stato in grado di proteggere il 100% dei topi e delle cavie (Halfmann

et al., 2009). Nonostante i dati che ne attestino la sicurezza, ci sono ancora perplessità a riguardo. Per tale motivo EBOV Δ VP30 è stato trattato con il perossido d'idrogeno (H_2O_2), che è in grado di inattivare EBOV, e inoculato nei NHPs proteggendoli dall'EVD. Il mantenimento dell'antigenicità anche dopo inattivazione con H_2O_2 apre la strada alla preparazione di questo tipo di vaccino in laboratori di bio-sicurezza di tipo (BSL, *Biosafety level*) -3 (*Reynolds and Marzi*, 2017).

Una delle prime strategie di vaccinazione adoperate in grado di proteggere i NHPs è stato un vaccino a DNA con un vettore rAd5 (*Sullivan et al.*, 2000), progredendo nello studio clinico di fase I. Tutte le persone vaccinate hanno mostrato una risposta delle cellule T così come degli anticorpi diretti verso l'EBOV GP e verso gli antigeni NP; la vaccinazione è stata ben tollerata e considerata sicura (*Martin et al.*, 2006). I vaccini a DNA presentano diversi vantaggi: sono sicuri da usare, sono facili da produrre, la sintesi della proteina nelle cellule ospiti consente la presentazione dell'antigene desiderato e, infine, lo stesso DNA fornito con il vaccino può indurre una risposta immunitaria (*Sullivan et al.*, 2000).

Una delle strategie vaccinali più promettenti contro EBOV si basa sull'utilizzo del vaccino ricombinante del virus della stomatite vescicolare (rVSV). Come il virus della rabbia, il VSV appartiene alla famiglia *Rhabdoviridae* e il genoma è costituito da un filamento di RNA a polarità negativa che codifica per cinque proteine. Rose e coll. hanno sviluppato un sistema che consente la facile manipolazione del VSV e un'ottima espressione degli antigeni (*Rose et al.*, 2000). VSV è stato dimostrato essere un forte induttore della risposta immunitaria innata e adattativa (*Rose et al.*, 2001). VSV infetta naturalmente il bestiame e vari animali, dando nell'uomo una malattia rara e asintomatica. Se si verifica un'immunità preesistente è diretta contro la proteina superficiale VSV G. Alla fine di eludere le complicazioni legate alla presenza di VSV G, Garbutt e coll. hanno generato un vettore rVSV in cui la glicoproteina superficiale è stata sostituita dalla GP di EBOV *Mayinga* (*Garbutt et al.*, 2004). Il vettore generato è stato chiamato rVSV Δ G/EBOVgp o rVSV/ZEBOV-GP. Jones e coll. hanno eseguito i primi studi di

efficacia vaccinale utilizzando una singola dose di rVSVΔG/EBOV, che ha protetto il 100% dei NHPs da una dose letale di EBOV, ventotto giorni dopo la vaccinazione (Jones *et al.*, 2005).

Attualmente la sperimentazione clinica è nella fase III in Guinea ed ha mostrato un'efficacia del 100% dopo dieci giorni dalla vaccinazione senza nuovi casi di malattia (Henao-Restrepo *et al.*, 2015; 2017).

Un altro virus utilizzato con successo contro EBOV è il virus ricombinante parainfluenzale umano di tipo 3 (*Human parainfluenza virus type 3*, HPIV3), appartenente alla famiglia dei *Paramyxoviridae*. Questo virus è stato utilizzato per tentare la vaccinazione tramite le vie respiratorie, che sono efficaci nell'indurre entrambe le risposte immunitarie, mucosale e sistemica (Bukreyev *et al.*, 2007). Il virus ricombinante rHPIV3/GP è stato generato attraverso l'inserimento dell'EBOV GP tra i geni P e M di HPIV3, con l'esposizione della GP sulla superficie del virus ricombinante. Tuttavia, un'alta percentuale della popolazione mostra un'immunità preesistente verso HPIV3, quindi è stato generato un vaccino rHPIV3 di seconda generazione con la delezione delle proteine superficiali HN ed E (Bukreyev *et al.*, 2009). L'induzione di una forte produzione d'immunoglobuline (IgG) sistemiche e di IgA specifiche fa di questo vaccino un efficace vettore nella protezione di EBOV (Reynolds and Marzi, 2017).

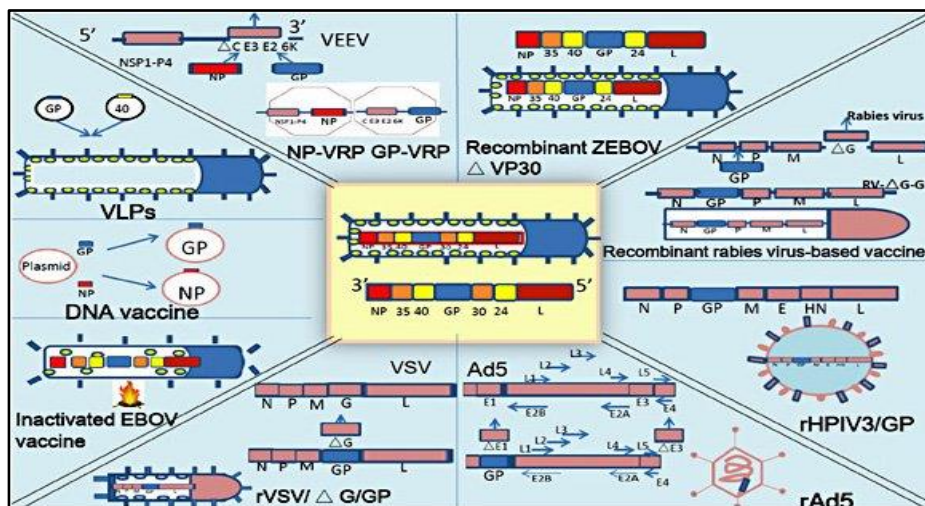


FIGURA 8. Struttura dei vettori vaccinali utilizzati per EBOV. Nell'immagine sono mostrate le piattaforme vaccinali utilizzate per EBOV (al centro), incluso il vaccino inattivato, il vaccino a DNA, le VLPs, il VEEV, l'EBOVΔVP30, l'rHPIV3, l'rAd5 e l'rVSV ricombinante. I geni e le proteine di EBOV sono mostrate in diversi colori. I geni e le proteine dei vettori vaccinali sono mostrati in rosa (modificata da Wu *et al.*, 2015).

BOVINE HERPESVIRUS 4

Bovine Herpesvirus 4 (BoHV-4) appartiene alla famiglia dei *Gammaherpesvirus* e, come altri herpesvirus aventi come ospite il bovino, è studiato per limitare le perdite economiche che arreca alle vacche da latte. È stato isolato per la prima volta nel 1963 da Bartha e coll. (ceppo *Movar 33-63*) in Ungheria, in vitelli che mostravano segni clinici respiratori e congiuntivali (Bartha *et al.*, 1966). Inizialmente, gli è stato attribuito un nome diverso, a seconda del luogo in cui è stato isolato, come "*orphan Herpesvirus*", "*Movar-type Herpesvirus*", "*Bovine cytomegalovirus*" e "*Bovine Herpesvirus-4*".

Per superare questa confusione, Bartha diede a tutti questi isolati, che condividevano le stesse caratteristiche, il nome di "*Bovine Herpesvirus-4*" (BoHV-4) (Bartha *et al.*, 1987). Il comitato internazionale sulla tassonomia dei virus decise allora di adottare il nome ufficiale di BoHV-4 nel 2000 (Fauquet, 2005). Il BoHV-4 è stato classificato all'interno della famiglia *Herpesviridae*, per le sue caratteristiche morfologiche visualizzate in microscopia elettronica. All'inizio è stato incluso tra i *betaherpesvirinae* a causa di alcune somiglianze con il citomegalovirus in colture cellulari *in vitro*, tra le quali la presenza di corpi inclusi presenti sia all'interno del citoplasma che del nucleo delle cellule infette, come anche la presenza di cellule infette di grandi dimensioni (*giant cells*), oltre che per la lentezza nel ciclo replicativo (Storz *et al.*, 1984). Dopo diversi studi condotti sul genoma, BoHV-4 è stato inserito nella sottofamiglia *Gammaherpesvirinae*. Infatti, il genoma di BoHV-4 presenta una struttura del DNA caratteristica degli herpesvirus e definita di tipo B, caratterizzata dalla presenza di una lunga regione unica (LUR, *long unique region*) fiancheggiata da un numero variabile di sequenze terminali ripetute (prDNA, *polyrepetitive DNA*) (Roizman, 2001). Alcuni dei suoi geni sono omologhi a quelli di altri herpesvirus, come HHV-8 e SaHV-2 (Bublout *et al.*, 1992; Goltz *et al.*, 1994), e il suo genoma contiene anche il gene della timidina chinasi (TK) (Kit *et al.*, 1986), come la maggior parte degli herpesvirus. Più tardi, fu definito appartenere al genere gamma-2, chiamato anche *rhadinovirus* (Kit *et al.*, 1986); a tale genere appartengono anche *Alcelaphine Herpesvirus 1* (AIHV-1), *Ovine Herpesvirus 2* (OvHV-2), *Bovine lymphotropic Herpesvirus* (BLHV) e *Caprine Herpesvirus 2*

(CpHV-2). BoHV-4 non è filogeneticamente correlato a nessuno di questi virus (McGeoch *et al.*, 2005). A oggi, più di quaranta ceppi di BoHV-4 sono stati isolati nel mondo e possono essere raggruppati all'interno di tre diversi ceppi: europeo (*Movar 33-63*), americano e del Bufalo africano (Dewals *et al.*, 2006).

Genoma

Sia il genoma del ceppo europeo V-test (Palmeira *et al.*, 2011) che quello nordamericano (ceppo 66-p-347) (Zimmermann *et al.*, 2001) sono stati completamente sequenziati. Come già descritto in precedenza, BoHV-4 ha un'organizzazione genomica di tipo 2. Ha un DNA lineare a doppio filamento di circa 144 kb, costituito da una LUR centrale di ~ 110 kb con un elevato contenuto in G+C fiancheggiata da prDNA (Fig. 9). Il numero di ripetizioni in *tandem* varia a seconda del ceppo ed hanno una dimensione variabile tra i 1450 e 2850 bp, ma il numero complessivo di ripetizioni di solito è costante (Ehlers *et al.*, 1985). Queste regioni ripetute non contengono nessuna sequenza codificante e la loro importanza è stata messa in luce durante la replicazione virale (Chang and Van Santen, 1992). *Pac1* e *pac2* sono i due siti, identificati in tutti gli herpesvirus, indispensabili per la scissione e l'assemblaggio dei virioni (Broll *et al.*, 1999). *Pac-1* consiste in una regione ricca di T-A situata vicino all'estremità sinistra e *pac-2* è in un *T-motif* vicino all'estremità destra. Alcuni *Gammaherpesvirus* usano questi prDNA anche durante la fase di latenza, come punto di ancoraggio per episomi virali (Fejer *et al.*, 2003); possono, inoltre, contenere un'origine di replicazione associata alla latenza (*OriP*), come nel caso di SaHV-2 (Collins *et al.*, 2002). La LUR di BoHV-4 di entrambi i ceppi 66-p-347 e V-test mostra un'identità del 99,1%, non escludendo allo stesso tempo una grande variabilità genomica. Il primo presenta una LUR di 108.873 bp, con un contenuto in G+C del 41,4% (Zimmermann *et al.*, 2001); il secondo è costituito da una LUR di 108,241 bp con un contenuto medio di G+C del 41,21%. I geni dei *Gammaherpesvirus* sono di solito disposti in blocchi ben conservati, il cui numero e l'organizzazione variano in base al virus. Il genoma di BoHV-4 è suddiviso in cinque blocchi conservati (da 1 a 5 in direzione 5'-3') e le ORF all'interno di essi hanno in genere la

stessa organizzazione e orientamento (Bublot *et al.*, 1990; 1992). I blocchi 1, 2 e 4 includono i geni del "nucleo", conservati in tutti gli *Herpesviridae* e probabilmente derivanti da un antenato comune, coinvolti nella formazione dei capsidi virali, nella replicazione virale, nell'incapsidamento del DNA e nel rilascio dei capsidi dal nucleo. Le ORF nei blocchi 3 e 5 sono specifiche dei *Gammaherpesvirus*. Ci sono alcune regioni, chiamate "inter-block", in grado di codificare geni tipici di ciascuna specie. Due regioni delle prDNA sono state identificate all'interno della LUR e chiamate R1 e R2. R1 è costituita da diverse ripetizioni complete e incomplete di 23, 25 e 65 bp; la sua lunghezza e la sequenza sono diverse tra i vari ceppi; R2 è, invece, costituita da due differenti tratti ripetuti, R2a e R2b. R2a è costituita da 28 ripetizioni perfette e tre imperfette di 22-23 bp, mentre R2b contiene anche diverse ripetizioni differenti, da 8 a 68 bp, oltre ad una ripetizione invertita. A valle del tratto R2 ricco in G+C, parzialmente sovrapposta ai geni Bo11 e Bo12, è stato identificato un *Ori Lyt*, che presenta molte similarità con quella di altri herpesvirus. L'analisi del genoma di BoHV-4 ha rivelato la presenza di almeno 79 ORFs, 62 omologhe ad altri *rhadinovirus*, mentre 17 sono univoche per il BoHV-4 (Fig. 10). Le ORF tipiche di BoHV-4 sono denominate con un numero da Bo1 a Bo17, secondo la loro posizione nel genoma da 5' a 3', ad eccezione di Bo5, che ha un gene corrispondente in SaHV-2. BoHV-4 ha alcuni tratti genomici peculiari che lo rendono diverso da tutti gli altri herpesvirus. Ad esempio, il BoHV-4 non ha geni che codificano per le citochine, recettori delle citochine (come il SaHV-2, l'HHV-8 e l'EHV-2), interleuchine (al contrario di SaHV-2, HHV-8, MuHV-68 ed EHV-2), chemochine o proteine infiammatorie dei macrofagi (come nel caso di HHV-8) (Lomonte *et al.*, 1995). BoHV-4 manca anche di geni che codificano la ciclina D, la proteina di regolazione del complemento, la deidrofolato reductasi e la timidilato sintetasi, presenti sia nel SaHV-2 sia nel HHV-8. Sebbene il BoHV-4 sia in grado di codificare le proteine coinvolte nel ciclo cellulare e nella sopravvivenza, quali *v-Bcl-2* (ORF 16) e *V-FLIP* (ORF 17), in grado di prevenire l'apoptosi, a oggi non esiste alcuna prova di una relazione tra il virus e alcuni disturbi linfoproliferativi o della capacità di trasformazione, di solito associata ad altri herpesvirus come

HHV-8 o MuHV-68. Tuttavia, è stato dimostrato che il BoHV-4 può indurre l'apoptosi in una fase tardiva d'infezione in cellule permissive (Sciortino *et al.*, 2000).

Le ORF, Bo4 e Bo5 fanno parte del gene Immediato Precoce Maggiore (IE1, *Major Immediate Early 1*), come descritto da van Santen (1991). È stato dimostrato che questo gene, anche se è uno dei primi a essere trascritti dopo l'infezione, non è essenziale per la replicazione virale e che la rimozione possa influire sulla replicazione rispetto al virus parentale (Franceschi *et al.*, 2015). La ORF Bo8 si sovrappone parzialmente al gene tardivo di 1,7 kb descritto da Bermudez-Cruz e coll. (1997).

La sequenza L1.7 è unica e non sono state trovate sequenze omologhe tra i *rhadinovirus*. È interessante notare che l'mRNA di L1.7 non contiene ORF che codificano per proteine funzionali (Capocefalo *et al.*, 2013). Bo10 codifica una proteina virale dell'envelope, la gp180, che regola il tropismo virale, interagendo anche con i glicosaminoglicani (GAG). Sono stati creati due virus mutanti per Bo10 e si è dimostrato che la gp180 è indispensabile per la stabilizzazione e il mantenimento della latenza *in vivo*. Inoltre, la gp180 sembra essere altamente glicosilata e la rimozione dei O-glicani dai virioni li ha sensibilizzati alla neutralizzazione (Machiels *et al.*, 2011). La gp180 sembra anche nascondere parzialmente diversi epitopi di gB, gH e gL, fornendo uno scudo in grado di nasconderli.

Machiels e coll. hanno dimostrato che il Bo11 è in grado di produrre uno *splicing* alternativo del gene Bo10, al fine di avere distinte popolazioni virali che si comportano diversamente in base alla cellula infettata. Questo significa che la quantità di gp180 prodotta può essere differente in base alla cellula in cui il virus si replica e che questo interruttore molecolare promuove da un lato la sua diffusione nell'organismo, dall'altro la sua trasmissione tra gli ospiti (Machiels *et al.*, 2013). Bo17 codifica una β -1,6-N-acetilglucosaminiltransferasi (β -1,6GnT), con un'omologia dell'81,1% con quella umana, coinvolta nella differenziazione cellulare e nei processi immunologici; è interessante notare che il BoHV-4 è l'unico virus in cui questo gene è stato identificato (Vanderplasschen *et al.*, 2000). Non solo Bo5, Bo10 e Bo11 sono sottoposti a

splicing, ma anche ORF29, 50 e 57: ORF29 codifica per una terminasi ed è presente uno *splicing* in tutti gli herpesvirus sequenziati finora.

Il prodotto della ORF50 è un trans-attivatore, codificato dallo *splicing* del gene IE2. L'introne del trascritto di IE2 contiene la ORF49 completa, che codifica per una proteina di 299 aa, conservata all'interno di tutti gli herpesvirus (van Santen, 1991; 1993). Infine, la ORF57 è responsabile della produzione di un trans-attivatore post-trascrizionale. BoHV-4 ha, inoltre, anche un gene codificante per la TK, che si è dimostrato non essere essenziale per la sua replicazione e per questo motivo è stato scelto come gene target per l'inserimento di DNA eterologo (Donofrio *et al.*, 2008). Il gene TK è coinvolto nel metabolismo biosintetico delle pirimidine, in particolare nella via di salvataggio delle pirimidine (Lomonte *et al.*, 1992). Questo gene è codificato dalla ORF21 ed è trans-attivato dal prodotto genetico IE2 (Zhang and van Santen, 1995). Questa proteina non è stata rilevata tra le proteine del virione mentre, negli altri herpesvirus, la TK è espressa come una proteina tegumentale (Lete *et al.*, 2012).

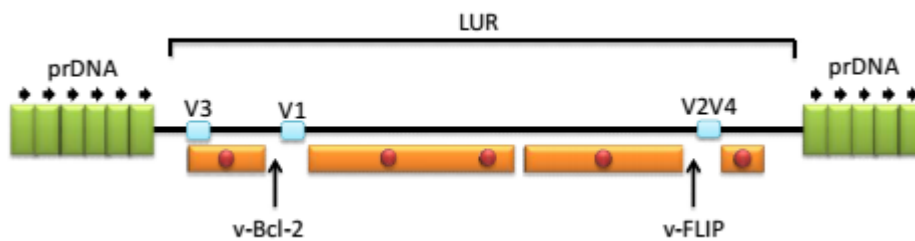


FIGURE 9. Organizzazione genomica del BoHV-4. Le barre arancioni rappresentano i 5 blocchi conservati all'interno della LUR; V1-V4 sono le regioni variabili tra i ceppi (Moran *et al.*, 2015).

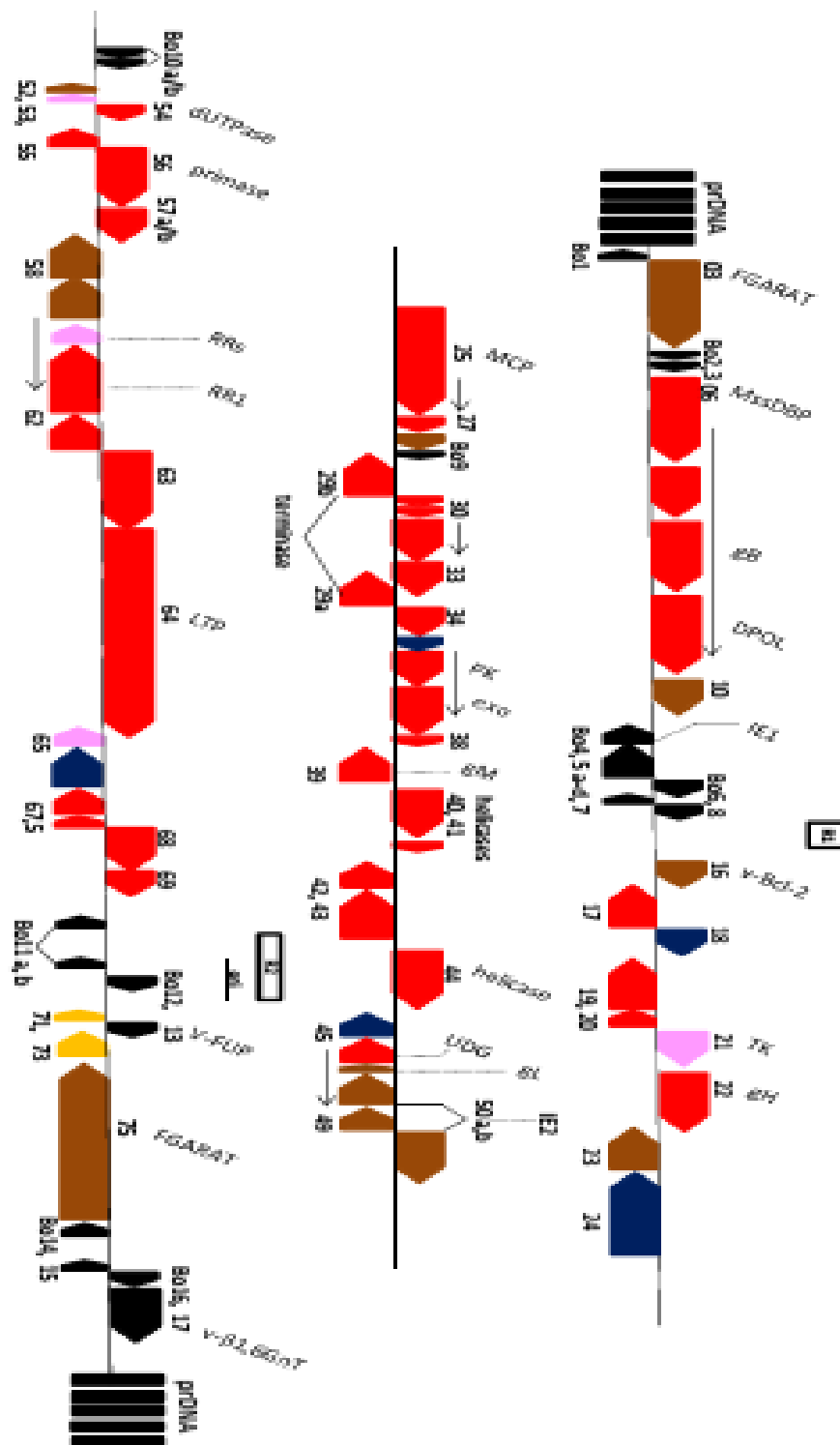


FIGURA 10. Organizzazione genomica di BoHV-4. Le ORF comuni a tutti gli herpesvirus sono rappresentate in rosso; in blu quelle comuni ai β e γ ; in rosa quelle comuni agli α e γ ; in marrone quelle esclusive dei γ herpesvirus. Le ORF dei $\gamma 2$ herpesviruses sono in giallo; il gene unico per BoHV-4 è in nero (rappresentazione non in scala, adattata da [Zimmermann et al., 2001](#)).

Struttura

BoHV-4 possiede un capsidico icosaedrico, costituito da 150 esameri e 12 pentameri. Il nucleocapsidico e il virione sono di circa di 90-100 nm e 200 nm, rispettivamente. Il nucleocapsidico è immerso all'interno del tegumento ed è circondato da un envelope contenente diverse glicoproteine virali coinvolte nell'attacco, nella penetrazione, nella gemmazione e nella diffusione delle particelle virali (**Fig. 11**). Il tegumento di BoHV-4 contiene, invece, circa 15 proteine. Tra queste, c'è il prodotto genico della ORF52, che codifica per una piccola proteina di circa 20 kDa (Lete *et al.*, 2012). Dall'analisi strutturale di questa proteina è emerso come sia funzionale sotto forma dimerica e la sua α -elica N-terminale sia coinvolta nell'interazione con altri componenti. Ad esempio, la proteina ORF52 interagisce con la pORF33, pORF75, gM e gN del virus del Sarcoma di Kaposi umano (KSHV). Altre proteine del tegumento sono prodotte da ORF6, Bo5, ORF10, ORF16, ORF36, ORF46, ORF54, ORF57, ORF59 e ORF60 (Lete *et al.*, 2012). Tra le proteine dell'envelope, esistono 5 glicoproteine molto conservate in tutti gli herpesvirus: queste sono la gB, gH, gL, gM e gN. In particolare, BoHV-4 possiede 29 polipeptidi glicosilati sull'envelope (Dubuisson *et al.*, 1989). Il principale complesso proteico dell'envelope di BoHV-4 è costituito dal complesso gp6/gp10/gp17 (150kDa/120kDa/51kDa); le proteine gp10-gp17 sono unite da legami disolfuro e la gp6 da legami non covalenti. L'eterodimero gp10-gp17 deriva dalla scissione proteolitica del prodotto genico della gB ed è conservato in tutti gli herpesvirus risultando essenziale per la penetrazione della cellula ospite (Dubuisson *et al.*, 1989; Goltz *et al.*, 1994). La proteina gB di BoHV-4 è fondamentale per la vita e la replicazione virale, e non può essere sostituita con una proteina omologa proveniente da altri *Gammaherpesvirus* o con una proteina eterologa di altri herpesvirus (Franceschi *et al.*, 2013). Un altro complesso è caratterizzato dalla gp11/VP24 (120 kDa/16,5 kDa) in cui la gp11 glicosilata è legata alla VP24, non glicosilata, attraverso un legame non covalente; in questo complesso sono stati identificati sei epitopi neutralizzanti (Dubuisson *et al.*, 1989). L'altra glicoproteina dell'envelope è la gp8 (135 kDa), coinvolta nel contatto con le molecole di "heparin-like" presenti sulla superficie cellulare. Questa proteina tardiva è poco glicosilata e la

sua forma secreta può interferire con la risposta immunitaria umorale dell'ospite (Dubuisson *et al.*, 1992). Molti studi hanno dimostrato che la proteina identificata come gp8 in realtà è un'altra forma della proteina gp6/gp10/gp17. L'ultima importante proteina caratterizzata è la gp1 (>300kDa), una proteina tardiva (Dubuisson *et al.*, 1991). Altre proteine dell'envelope di BoHV-4 sono la gp110, corrispondente alla glicoproteina gH e la gp31-35 o gp45-65, corrispondente alla proteina gL. La proteina gH è importante per la fusione dell'envelope virale con la membrana dell'ospite. Il ruolo della gL è strettamente legato alla glicoproteina gH, poiché è stato dimostrato che il BoHV-4 privato della gL presenta un'alterata glicosilazione e incorporazione della gH, anche se il virus rimane infettivo (Lete *et al.*, 2012). BoHV-4 ricombinante privo della glicoproteina gL ha mostrato anche una scarsa crescita associata a un deficit di endocitosi (Lete *et al.*, 2012). Infine, è presente la gp21 (26-27 kDa), descritta nei sieri degli animali infetti. La gM e la gN non sono molto studiate nei *Gammaherpesvirus* e la loro funzione non è mai stata del tutto chiarita. BoHV-4 non presenta la glicoproteina gD, che è l'immunogeno principale di BoHV-1, o la gE, che è utilizzata come marcatore nel vaccino contro il virus BoHV-1. È stato anche dimostrato che il BoHV-4 rileva alcune proteine dall'ospite per costituire componenti del virione. Tra queste proteine, l'actina, la cofilina-1 e l'annexina-2 sono particolarmente abbondanti. In particolare, l'annexina-2 è associata al capsido di BoHV-4 e ad altre specie virali (Lete *et al.*, 2012).

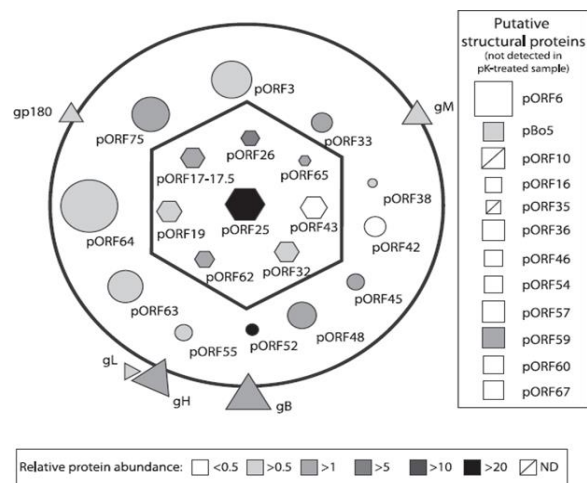


FIGURE 11. Rappresentazione schematica della composizione proteica dei virioni di BoHV-4 (Lete *et al.*, 2012).

Spettro d'ospite *in vitro*

BoHV-4 è in grado di replicare sia nelle cellule primarie bovine sia in quelle immortalizzate provenienti da diversi tessuti (reni, testicoli, polmoni, pelle, ghiandola mammaria, turbinati nasali, cellule endoteliali, linfociti B e T, cellule della linea macrofagica, istiociti, cellule della tiroide, cellule primarie tracheali dell'embrione, midollo osseo di feto bovino, linfosarcoma del timo di vitello) e anche nelle linee continue di rene (MDBK, *Madin Darby Bovine Kidney*; GBK, *Georgia Bovine Kidney*; BEK, *Bovine Embryonic Kidney*) o derivate dal polmone (EBL, *Embryonic Bovine Lung*). BoHV-4 può, inoltre, stabilire un'infezione persistente nei macrofagi bovini (BoMac) (Donofrio and van Santen, 2001). È stato dimostrato che BoHV-4 può infettare e replicare anche nelle linee cellulari derivanti da diverse specie animali, tra le quali il bufalo, pecora, capra, maiale, gatto, cane, coniglio, visone, tacchino, furetto, cavallo, ratto, topo, criceto (Bartha *et al.*, 1966; Egyed, 2000; Markine-Goriaynoff *et al.*, 2003), ma anche alcune linee cellulari umane (Donofrio *et al.*, 2000; Egyed and Bartha, 1998; Gillet *et al.*, 2004). La capacità di BoHV-4 di infettare le cellule umane è stata considerata di particolare interesse, per il potenziale uso di BoHV-4 come vettore virale per scopi terapeutici, vaccinali, e al fine della terapia oncolitica e genica. Infatti, la potenzialità di BoHV-4 come virus oncolitico è stata dimostrata nel trattamento del glioma nei topi e ratti (Redaelli *et al.*, 2010). Il fatto che il BoHV-4 possieda un ampio spettro d'ospite, non comune agli altri *Gammaherpesvirus*, è probabilmente legato alla sua interazione con le strutture di "heparan-like" della cellula ospite, che solitamente sono presenti sulla superficie della maggior parte delle cellule dei vertebrati (Vanderplasschen *et al.*, 1993). Quest'osservazione può condurre all'ipotesi che una trasmissione inter-specie sia possibile, tra gli animali e anche con gli esseri umani, anche se fino ad oggi non sono stati riportati casi d'infezione umana da BoHV-4. I ricercatori hanno dimostrato che il siero umano neutralizza efficacemente BoHV-4 attraverso l'attivazione del complemento di anticorpi naturali prodotti contro epitopi derivanti dai virioni che hanno infettato le cellule ospiti (Machiels *et al.*, 2007).

Replicazione *in vitro*

Il ciclo di replicazione di BoHV-4 è strettamente associato alla fase S del ciclo cellulare (Vanderplasschen *et al.*, 1995); il virus è dotato di una crescita lenta (Storz *et al.*, 1984), che potrebbe essere dovuta a una ritardata induzione della TK nelle cellule infettate (Kit *et al.*, 1986). La cinetica di replicazione delle particelle virali extracellulari e intracellulari prodotte dimostra che BoHV-4 è un virus strettamente cellula-associato (Storz *et al.*, 1984). Di solito, l'effetto citopatico (CPE, *cytopathic effect*) inizia a essere evidente 48-72 ore dopo l'infezione cellulare e si caratterizza per la comparsa di cellule arrotondate nel monostrato cellulare, senza la formazione di placche molto evidenti, al contrario di altri herpesvirus. Solitamente i geni di BoHV-4 sono suddivisi in tre classi cinetiche a seconda della loro espressione. Sono cronologicamente espressi come proteine *immediate early* (IE o alfa), *early* (E o beta) e *late* (L o gamma). Le proteine *immediate early* sono espresse dopo il rilascio del genoma virale dal capsido nel nucleo. L'espressione delle proteine E avviene dopo la sintesi della proteina IE, mentre l'espressione della proteina L è l'ultima a essere eseguita. BoHV-4 interagisce con le strutture di eparan-solfato della cellula ospite attraverso la proteina dell'envelope gB. Subito dopo l'attacco, l'involucro si fonde con la membrana plasmatica e le proteine dell'involucro così come il nucleocapside sono rilasciate nel citoplasma e trasportate al nucleo attraverso l'interazione con i microtubuli. Il DNA virale è rilasciato nel nucleo che passa attraverso un poro nucleare. Dopo la circolarizzazione del DNA, alcune proteine dell'involucro interagiscono con il sistema trascrizionale della cellula ospite per indurre la trascrizione dei geni IE attraverso l'RNA polimerasi II dell'ospite. Le proteine IE1 e IE2 sono le due principali proteine *immediate early* di BoHV-4. Migrano nel nucleo dove bloccano l'espressione del gene IE e attivano uno dei geni E e L. I geni E sono espressi da 4 a 8 ore dopo l'infezione e sono coinvolti nel metabolismo dei nucleotidi e nella replicazione del DNA. Tra i geni *late* (γ), si distinguono γ 1 (*parzial late*), la cui espressione è accelerata dalla sintesi del DNA, e γ 2 (*real late*). Le proteine γ sono di solito costituite da proteine strutturali, utili per l'assemblaggio dei nuovi capsidi. La replicazione del DNA virale inizia da un'*Ori*, attraverso un meccanismo detto "*rolling circle*", che produce

concatameri che saranno incapsidati all'interno dei nuovi capsidi. I capsidi di nuova formazione sono poi trasportati alla periferia del nucleo e il passaggio, attraverso il reticolo endoplasmatico e le vescicole del Golgi, fornisce il precursore o le proteine dell'envelope. BoHV-4 è in grado di stabilire infezioni latenti e litiche, di solito avviate in rare occasioni. BoHV-4 possiede tre principali proteine trans-attivanti, trascritte da geni *immediate early*, in grado di avviare il ciclo litico. Queste proteine sono ORF50 (proteina Rta/IE2), ORF57 (Mta/IE1) e Bo4/5. L'attivazione del promotore ha anche un forte effetto sulla sintesi del DNA dell'Ori della replicazione litica. Di conseguenza, i virioni sono generati e rilasciati dalle cellule infette in abbondanza (Ackermann, 2006). I corpi inclusi appaiono nel citoplasma da 48 a 72 ore dopo l'infezione e sono composti da particelle virali a differenti stadi di maturità, con capsidi vuoti o pieni, avvolti o non avvolti. Al contrario, l'assenza di replicazione in genere caratterizza la latenza. Di solito, l'inizio di un'infezione latente è in comune con quella litica, ma quando il DNA virale arriva al nucleo, non inizia la classica cascata di trascrizione genica, attraverso l'espressione di geni alfa e beta. Durante la latenza del BoHV-4, il genoma virale persiste nel nucleo come episoma, una forma circolare di DNA virale, che è distribuita alle nuove cellule formate grazie alla proteina LANA (*latency associated nuclear antigen*) codificata da ORF73. LANA lega la cromatina cellulare con il suo N-terminale e interagisce con sequenze diverse in prDNA con il suo C-terminale. In questo modo inizia la replicazione virale ed è consentito l'ancoraggio dell'episoma ai cromosomi cellulari. L'eliminazione della ORF73 non influenza la replicazione del virus *in vitro*, ma influenza la persistenza del virus *in vitro* e impedisce l'infezione latente *in vivo* nel coniglio (Thirion *et al.*, 2010). È stato dimostrato che, nelle cellule BoMac persistentemente infettate con un BoHV-4 ricombinante che trasporta il gene di resistenza alla neomicina e selezionate con geneticina, il DNA virale può trovarsi come episoma o essere integrato nel DNA cellulare, in siti casuali. Questo conferma che l'infezione persistente di BoHV-4 è compatibile con la sopravvivenza e la replicazione cellulare (Donofrio and van Santen, 2001). La capacità di stabilire un ciclo litico è davvero importante per capire il tipo d'infezione, che può caratterizzare una linea cellulare. In realtà, una cellula è di solito definita "suscettibile" all'infezione quando possiede sulla sua

superficie il recettore richiesto per l'attacco e l'ingresso del virus; una cellula può diventare anche "permissiva" all'infezione quando è in grado di supportare un ciclo completo d'infezione produttiva. Ci sono alcuni casi caratterizzati da infezioni non produttive: l'infezione latente, che può essere solitamente riattivata da diversi stimoli esogeni in un'infezione produttiva; l'infezione abortiva, in cui la replicazione virale è bloccata irreversibilmente, evolvendo nella morte cellulare o a un'infezione totalmente inopportuna. È stato osservato che un'over-espressione della proteina *immediate early 2* (IE2) è stata in grado di indurre la replicazione del virus in linee cellulari non permissive (Donofrio *et al.*, 2004).

Spettro d'ospite *in vivo*

Anche se la specie bovina è considerata l'ospite naturale di BoHV-4, tale virus è stato isolato in diverse specie animali. Ad esempio, nel bufalo africano (*Syncerus caffer*) è stata osservata una prevalenza superiore a quella dei bovini; ciò significa che il bufalo africano potrebbe essere la specie originaria di BoHV-4 e che, altre specie, inclusi i bovini domestici, hanno acquisito il virus in seguito (Dewals *et al.*, 2006). BoHV-4 è stato isolato anche nel bisonte americano (*Bison bison*), nello zebù (*Bos indicus*) (Moreno-Lopez *et al.*, 1989), nella pecora e nella capra. Alcuni felini sono suscettibili all'infezione da BoHV-4: leoni (Egyed *et al.*, 1997) o gatti affetti da urolitiasi (Fabricant *et al.*, 1971), causando gravi patologie, che variano da congiuntivite a polmonite, spesso con prognosi letale (Egyed *et al.*, 1997). Un ceppo di BoHV-4 è stato isolato dal rene di una scimmia apparentemente sana (*Aotus trivirgatus*) (Bublott *et al.*, 1991); nelle scimmie questo virus non è né patogeno, né oncogenico, nonostante sia stata dimostrata una prevalenza del 42%. Un herpesvirus correlato al BoHV-4 potrebbe circolare, inoltre, tra gli animali esotici come gli elefanti asiatici (*Elephas maximus*), che hanno presentato anticorpi (Metzler *et al.*, 1990) contro BoHV-4 e nei rinoceronti neri (*Diceros bicornis*), in cui è stata identificata una DNA polimerasi strettamente correlata a quella di BoHV-4. Il coniglio può essere infettato con il BoHV-4 ed è considerato un buon modello animale per studiare la biologia del virus. Infatti, può sostenere la replicazione di BoHV-4 e l'instaurarsi della

persistenza virale (Egyed *et al.*, 1997; 2000; Egyed and Baska, 2003). Il sito d'infezione virale è il tessuto linfoide, ma il virus è stato isolato anche dai tamponi congiuntivali e dalla milza o, durante la latenza, nel midollo osseo, nel polmone, nel rene, nelle ghiandole salivari e nel fegato.

Patogenesi

BoHV-4 è stato isolato sia in animali apparentemente sani sia con segni clinici evidenti. L'infezione da BoHV-4 è associata innanzitutto a malattie oculari e respiratorie; infatti, è stato isolato da animali con cherato-congiuntivite e malattie respiratorie, con secrezioni nasali, tosse, dispnea e lesioni polmonari (Bartha *et al.*, 1966). Lo sviluppo di malattie genitali, come la metrite ed endometrite, vaginite o aborto, è anche legato alle infezioni da BoHV-4. Il ruolo svolto dal virus in relazione a questo tipo di patologie è di solito associato alla co-presenza di altri agenti patogeni, come virus, ad esempio il virus della Diarrea Virale Bovina (BVD) in caso di aborto (Reed *et al.*, 1979), o batteri, nel caso della metrite post-parto e dell'endometrite. BoHV-4 è stato isolato, come patogeno secondario, nei casi di mastite, nella frazione cellulare del latte (Donofrio *et al.*, 2000), nelle lesioni cutanee, nella mammillite ulcerosa o dermatite pustolosa mammaria, malattie enteriche e altre patologie, ad esempio le malattie neoplastiche, come il linfosarcoma, carcinoma oculare, linfoma delle cellule T (Toho *et al.*, 1985). È stato osservato che l'inoculo sperimentale del virus nei bovini o negli animali da sperimentazione non produce segni clinici, per cui la sua patogenicità non è ancora chiara. Ad esempio, l'inoculo intra-nasale ed intra-tracheale di BoHV-4 è in grado di riprodurre quasi tutti i sintomi respiratori, portando talvolta alla morte del bestiame anche se, in alcuni casi, la *Pasteurella multocida* è stata isolata dallo stesso animale (Mohanty *et al.*, 1972). L'inoculo del virus nel feto causa la morte, circa a tre o quattro mesi di gestazione (Park and Kendrick, 1973); quello intra-nasale e intra-mammaria riproducono la mastite subclinica (Wellenberg *et al.*, 2002), mentre quello intradermico nella mammella produce solamente lesioni vescicolari (Osorio and Reed, 1983); l'infezione sperimentale può, infine, indurre una risposta febbrile se si usa un ceppo

virale di BoHV-4 isolato da una dermatite pustolosa mammaria, ma i sintomi enterici non sono mai stati riprodotti nei bovini.

Trasmissione e replicazione

La trasmissione di BoHV-4 avviene tramite contatto diretto attraverso la via respiratoria, inspirando aria o il virus sotto forma di aerosol, o attraverso il tratto genitale o alimentare. Infatti, BoHV-4 è solitamente rilevato dal tratto respiratorio superiore o dal tratto genitale, anche se la trasmissione genitale non è ancora completamente stata chiarita; è stata, invece, dimostrata la trasmissione verticale al feto ([Deim et al., 2007](#)). Dagli animali apparentemente sani il virus è rilevato nei leucociti presenti nel sangue, nella milza e nei linfonodi per mesi ([Osorio et al., 1982](#)). In generale, BoHV-4 replica nel sito d'ingresso dell'organismo, ad esempio il percorso oronasale, e poi si diffonde attraverso le cellule mononucleate del sangue, solitamente nelle cellule della linea monocitica/macrofagica; infatti, le cellule endoteliali sono sensibili all'infezione da BoHV-4 e probabilmente il virus si diffonde dalle cellule mononucleate del sangue alle cellule endoteliali, aprendo la strada all'infezione dei tessuti e degli organi. Il virus si replica anche nelle cellule epiteliali dell'intestino, della laringe, della trachea e dei bronchioli, causando lievi sintomi catarrali e febbre, così che la malattia è di solito il risultato della distruzione cellulare e può causare anche un'infezione specifica di un organo. La presenza del DNA virale nel sangue di un animale infetto è rilevabile dal decimo al trentesimo giorno dopo l'instaurarsi dell'infezione, ma non è sempre evidenziabile e può riapparire in momenti differenti ([Egyed et al., 1999](#)). Di solito, la congiuntiva, la mucosa del tratto respiratorio superiore e la mucosa genitale sono considerati siti di moltiplicazione primaria e secondaria, causando escrezione oculare, nasale e vaginale. I conigli sperimentalmente infettati mostrano una replicazione attiva di BoHV-4 nella milza come nei macrofagi, che possono rappresentare il sito d'infezione acuta e latente; l'identificazione di BoHV-4 in cellule non-T, non-B situate nella zona marginale della milza di bovini e conigli infettati persistentemente ha implicato che le cellule della linea monocitica/macrofagica sono un sito di persistenza di BoHV-4 ([Donofrio et](#)

al., 2005; Osorio et al., 1982; 1985). Per questi motivi, anche se diversi tipi di tessuti sono stati proposti come un probabile sito di latenza di BoHV-4, è stato stabilito che i macrofagi splenici potrebbero essere il sito principale per la persistenza virale (*Lopez et al., 1996*). È stato osservato che gli animali soppressi più di un anno dopo l'infezione sperimentale presentavano il genoma virale nei linfonodi, nel midollo, nel midollo spinale e nel ganglio del trigemino, sostenendo l'ipotesi che anche il SNC potrebbe essere un sito di latenza (*Asano et al., 2003*). Gli organi linfoidi e le cellule mononucleate del sangue sono state suggerite come luogo di latenza virale anche nei bovini. Gli stimoli esterni, naturali come il parto o il trattamento sperimentale con il desametasone, possono riattivare il BoHV-4 dalla forma latente (*Dubuisson et al., 1989*).

Risposta immunitaria, profilassi e diagnosi

All'infezione da parte di BoHV-4 è solitamente associata una blanda risposta immunitaria, che può derivare dall'esposizione minima del virus al sistema immunitario a causa della sua stretta associazione cellulare e della sua capacità di indurre latenza. Dopo l'infezione nei bovini, l'alta titolazione di anticorpi anti-BoHV-4 può essere identificata attraverso immunofluorescenza indiretta (IFI) (*Storz et al., 1984*); ma può essere osservata una produzione debole o nulla di anticorpi sieroneutralizzanti. Quando è rilevabile una risposta, gli anticorpi sieroneutralizzanti appaiono da 22 a 34 giorni dopo l'infezione. Mohanty e coll. (*1972*) hanno segnalato l'assenza di anticorpi nei vitelli infetti da BoHV-4 ma, quando sono stati reinfettati con il virus otto settimane dopo l'infezione primaria, i vitelli sopravvissuti sono stati trovati immuni al virus. Oggi, nessun vaccino è prodotto contro l'infezione di BoHV-4. Poiché è stata osservata una variazione di patogenicità dei diversi isolati di BoHV-4 (*Castrucci et al., 1987*), potrebbe essere possibile generare un vaccino basato sull'utilizzo d'isolati non patogeni. Tuttavia, il controllo dell'infezione è ora possibile solo attuando misure igieniche o tramite l'identificazione e separazione degli animali con infezioni latenti. Le vacche sieropositive, nel periodo post-partum, devono essere monitorate, poiché possono fungere da untori, per lunghi periodi attraverso l'essudato uterino (*Thiry et al., 2000*). A oggi non sono disponibili molti test per

l'identificazione degli animali positivi da BoHV-4; di solito, l'isolamento del virus dai tessuti o dagli espianti è adottato con successo e la replicazione virale può essere apprezzata attraverso la semina in colture cellulari. Per studi di sierologia sono stati utilizzati: la fissazione del complemento, l'immunoblotting, la siero-neutralizzazione del virus, IFI e i test ELISA (Naeem and Goyal, 1990); è stata osservata anche un'alta conversione sierica dopo l'infezione primaria così come la reinfezione o la riattivazione virale. Durante l'infezione, anche la neutralizzazione complemento-dipendente può essere utilizzata con successo, anche se il virus suscita una scarsa risposta agli anticorpi neutralizzanti. Questo test è stato utilizzato per dimostrare l'efficienza negli animali immunizzati con un virus ricombinante, decto per il gene Bo10, responsabile di mascherare gli epitopi siero-neutralizzanti di gB e gH/gL (Machiels et al., 2011). BoHV-4 può essere rilevato anche mediante PCR, con *primers* progettati per identificare la sequenza gB (Boerner et al., 1999) o il gene TK (Wellenberg et al., 2001). Altre tecniche includono l'ibridazione in situ o l'analisi degli enzimi di restrizione, che è in grado di distinguere i diversi isolati BoHV-4 (Ludwig, 1982).

BoHV-4 come vettore

Diverse caratteristiche hanno reso BoHV-4 un potenziale vettore virale: 1) la capacità di stabilire un'infezione persistente, sia nell'ospite naturale, i bovini, sia nell'ospite sperimentale, il coniglio, mantenendo il genoma virale in forma episomica, 2) la mancanza di una comprovata oncogenicità, 3) la possibilità di eliminare anche il 30% del genoma virale conservando intatte le capacità replicative virali, 4) l'elevata capacità di introdurre DNA esogeno, 5) la disponibilità di due ceppi completamente sequenziati, 6) la possibilità di manipolare il suo genoma come un cromosoma artificiale batterico (BAC, *Bacterial artificial chromosome*), 7) nessuna correlazione diretta con l'insorgenza di alcuna patologia, ad eccezione delle malattie uterine dei bovini come patogeno secondario, 8) e l'ampio spettro d'ospite sia *in vitro* sia *in vivo*.

La possibilità di manipolare il genoma di BoHV-4 sotto forma di BAC ha reso possibile la generazione di diversi virus ricombinanti, esprimenti differenti proteine antigeniche esogene, sia per scopi vaccinali sia per scopi terapeutici e oncolitici. Ad esempio, è stata dimostrata l'efficacia di BoHV-4 nel trattamento del glioma in modelli murini e di ratto: partendo dalla valutazione della suscettibilità *in vitro* della linea cellulare di glioma F98 del ratto all'infezione con BoHV-4, il virus è stato iniettato nel cervello del ratto e si è osservato come le cellule del glioma siano state indotte a una morte non apoptotica, senza la presenza di alcun segno clinico. Per tutte queste ragioni, il BoHV-4 potrebbe essere considerato un buon vettore per la terapia del glioma (Redaelli *et al.*, 2010). Infatti, è stato osservato anche che un BoHV-4 ricombinante, esprimente la "Enhanced Green Fluorescent Protein" (EGFP), è in grado di infettare solo le cellule del glioma, essendo sicuro per il SNC (Redaelli *et al.*, 2010). Con queste informazioni, un nuovo BoHV-4 ricombinante, che esprimeva il gene della TK di HSV-1 (TK-HSV-1), è stato iniettato nel glioma di ratto in combinazione con il ganciclovir, un pro-farmaco convertito in un composto tossico dal prodotto del gene della TK; è stata osservata un'elevata riduzione del glioma, senza conseguenze per il ratto (Redaelli *et al.*, 2010).

La possibilità di utilizzare BoHV-4 come un vettore virale per scopi vaccinali è stata testata in modo efficiente nei topi (Franceschi *et al.*, 2011), ratti (Donofrio *et al.*, 2006), e altri animali,

come conigli ([Donofrio et al., 2009](#)), suini ([Donofrio et al., 2011](#)), capre, pecore ([Donofrio et al., 2013](#)), vacche ([Donofrio et al., 2007](#)) e polli ([Donofrio et al., 2008](#)).

Ad esempio, vettori di BoHV-4 ricombinante, che esprimevano diverse glicoproteine del virus di Monkeypox (MPXV), A29L, M1R e B6R, sono stati studiati in termini di protezione da un'iniezione letale di MPXV nei topi *knockout* per STAT1 (-/-). BoHV-4-A-CMV-A29LgD106ΔTK, BoHV-4-A-EF1α-M1RgD106ΔTK e BoHV-4-A-EF1α-B6RgD106ΔTK sono stati costruiti con successo mediante ricombinazione omologa e la loro capacità di esprimere il transgene è stata dimostrata con efficacia. Un challenge con una dose letale di virus è stato eseguito e tutti e tre i virus ricombinanti sono apparsi sicuri, senza la comparsa di evidenti effetti collaterali. È stato, inoltre, dimostrato che il BoHV-4-A-EF1α-M1RgD106ΔTK è in grado di proteggere, da solo o in combinazione con il BoHV-4-A-CMV-A29LgD106ΔTK e il BoHV-4-A-EF1α-B6RgD106ΔTK, il 100% e l'80% rispettivamente, i topi STAT1 (-/-) contro la morbilità e la mortalità ([Franceschi et al., 2015](#)).

Un altro studio ha verificato le potenzialità di BoHV-4 come vettore per l'immunizzazione DNA-mediata nel contesto del tumore al seno; sono stati, infatti, generati tre virus ricombinanti, esprimenti varie porzioni del recettore TK Her-2, sovra-espresso in una consistente percentuale di questa tipologia tumorale. Nel caso della vaccinazione dei topi con la variante chimerica ratto-uomo (RhuT) è stata osservata un'elevata sopravvivenza in termini di formazione del tumore ed una maggiore produzione anticorpale, aprendo la strada all'utilizzo di BoHV-4 nella terapia del tumore al seno ([Jacca et al., 2015](#)).

BoHV-4 è stato anche utilizzato con successo come vettore al fine di generare anticorpi anti CCR5; CCR5 è, infatti, un importante target terapeutico perché, la presenza di una sua forma mutata, conferisce un'elevata resistenza all'infezione da parte di HIV. È stato generato un virus ricombinante, BoHV-4-CMV-CCR5ΔTK, in grado di veicolare efficientemente il gene per il recettore per le chemochine CCR5; l'inoculo di tale ricombinante negli animali modello, i conigli, ha portato alla produzione di anticorpi anti-CCR5, in grado di reagire con il recettore CCR5 esposto sulla superficie di cellule HEK 293T attraverso il riconoscimento specifico di una

porzione ammino-terminale della proteina, validando l'utilizzo di BoHV-4 per la vaccinazione contro CCR5 (Verna *et al.*, 2017).

Clonazione del genoma di BoHV-4 come cromosoma artificiale batterico

Il genoma di BoHV-4 è stato clonato come BAC per la prima volta nel 2005 da Gillet e coll. (2005) (Fig. 12). I BAC sono vettori ad alta capacità trasmessi come copia singola derivante dal plasmide F di *Escherichia Coli*; sono molecole circolari di circa 100 kb, in grado di persistere in forma episomica o di integrarsi sotto forma di cromosomi batterici. I vettori derivanti da tale plasmide hanno un'elevata capacità di veicolare DNA esogeno poiché contengono il sistema di replicazione e di partizione del plasmide F, che assicurano un basso numero di copie e un'appropriata segregazione del BAC nelle cellule figlie. La tipica cassetta di espressione utilizzata per generare un BAC è di circa 10 kb e include un *Ori*, così come alcuni geni essenziali per la replicazione del BAC, come *redF* e *repE*, e per controllare il tasso di replicazione, come *parA* e *parB*, che assicurano la presenza di un solo BAC per cellula. All'interno della cassetta BAC è stato anche inserito un gene marker di resistenza a un antibiotico, nel caso di BoHV-4 il cloramfenicolo, per consentirne la selezione metabolica. La cassetta del BAC deve, inoltre, essere fiancheggiata da due sequenze di 500-1000 bp, omologhe alla sequenza bersaglio dove è inserito il vettore BAC; per la generazione del BAC di BoHV-4 sono state scelte le regioni intergeniche Bo2 e Bo3. L'inserimento di altri marker selezionabili, come ad es. la β -galattosidasi o l'EGFP, è utile e necessario per isolare i BAC contenenti i genomi ricombinanti desiderati e per visualizzare facilmente le cellule infettate mediante l'analisi microscopica a fluorescenza. Per avere la possibilità di ricostituire il genoma *wild type* del virus, la cassetta BAC è stata fiancheggiata da due siti *loxP*, due siti palindromi di 13 pb sfruttando il sistema *Cre-loxP*. La cassetta BAC, fiancheggiata dalle sequenze virali, viene solitamente trasfettata nelle cellule, con conseguente inserzione della cassetta BAC nel genoma virale mediante ricombinazione omologa. Durante il ciclo di replicazione, BoHV-4 forma alcuni intermedi circolari che possono essere estratti dalle cellule e utilizzati per trasformare *E. Coli*; in questo modo, viene costituito

un vettore shuttle contenente il genoma virale clonato come BAC, e in seguito può essere manipolato in cellule batteriche. Il clone BAC, così purificato, può essere trasfettato in cellule eucariotiche permissibili BEK *fincre* (*Bovine embryo kidney cells*) che esprimono in modo costitutivo la *ricombinasi cre* per ricostituire il virus ricombinante, in grado di escindere in modo selettivo il DNA che è contenuto tra due siti *loxP*, che sono presenti alle estremità della cassetta del BAC (Gillet *et al.*, 2005). Negli E. Coli sono stati impiegati sistemi di ricombinazione mediati dalla proteina *RecA* o da alcuni geni del Fago *Lambda* (λ) *Red. Exo* e *Beta* sono, infatti, due geni fagici in grado di generare ricombinanti in completa assenza di *RecA*, attraverso un processo chiamato *single strand annealing*. Se due sequenze di DNA omologhe ricevono una rottura in entrambi i filamenti, il prodotto genico del gene *Exo* è in grado di degradare l'estremità esposta in 5' esponendo un'estremità protrudente in 3', che può essere legata dalla proteina *Beta*, che lega i due filamenti generando ricombinanti. Il terzo gene coinvolto nella ricombinazione è *Gam*, che codifica un inibitore dell'esonucleasi *RecBCD* e protegge la cassetta di DNA-targeting dalla degradazione mediata da *RecBCD*. Questi tre geni possono essere espressi da un profago λ difettivo stabilmente integrato; in questo sistema fagico *exo*, *bet* e *gam* sono posti sotto il controllo trascrizionale del promotore forte fagico *pL*, a sua volta sottoposto a un forte controllo da parte del repressore sensibile alla temperatura, *cI857*. In questo sistema *exo*, *bet* e *gam* non sono espressi quando i batteri sono mantenuti a 32°C; al contrario, l'esposizione a 42°C per 15 minuti induce rapidamente l'espressione a un alto livello di questi geni e la ricombinazione omologa è eseguita in modo efficiente. Le metodiche d'ingegneria genetica che sfruttano corte sequenze di omologia, fino a 50 pb, tramite utilizzo dei geni codificati dai fagi, è denominata "*Recombineering*", un termine convenzionale usato per descrivere l'ingegnerizzazione genetica ricombinazione-mediata. (Warming *et al.*, 2005).

Warming e coll. (2005) hanno descritto un nuovo sistema di selezione basato sul gene della galattosidasi (*Galk*), per la manipolazione dei BAC in cellule batteriche E. Coli ceppo SW102. L'operone del galattosio di E. Coli è, infatti, costituito da quattro geni, *GalE*, *GalT*, *Galk* e *GalM*, necessari per utilizzare il galattosio come unica fonte di carbonio. Il gene *Galk* è il primo gene

dell'operone del galattosio e codifica per la galattosidasi, un'enzima in grado di convertire il galattosio in galattosio-1-fosfato, ed è anche in grado di catalizzare la fosforilazione di un analogo del galattosio, il 2-deoxy-galactose (DOG), in un composto tossico per la cellula. Il ceppo di *E. Coli* SW102 è *Galk* negativo, e non è in grado di utilizzare il galattosio come unica fonte di carbonio; permette, quindi, di poter eseguire una selezione positiva dei cloni ricombinanti in un medium arricchito con galattosio e quella negativa in un mezzo arricchito con DOG. Donofrio e coll. hanno aggiunto un'altra fase di selezione, affiancando il gene che conferisce resistenza alla kanamicina alla cassetta *Galk* (**Fig. 13**); la possibilità di una selezione negativa su liquido complementato con kanamicina riduce così il numero di colonie da testare rispetto a quelle che crescono durante la fase di selezione metabolica. La cassetta di espressione *KanaGalk* è stata inserita tramite ricombinazione omologa all'interno del gene TK di BoHV-4, perché è stato dimostrato che questo gene non è essenziale per la replicazione virale e che la sua interruzione e/o delezione non influenza la cinetica di replicazione virale *in vitro* (Donofrio *et al.*, 2002). Recentemente, è stato osservato anche che un vettore virale attenuato potrebbe essere generato interrompendo il gene tardivo che codifica per un RNA di 1.7 kb (L1.7). Infatti, il ricombinante BoHV-4-A-KanaGalk Δ L1.7 ha mostrato un'attenuazione nella ricostituzione dei virioni infettivi, nella replicazione virale e nella dimensione delle placche rispetto al virus parentale. È stata anche testata la capacità del BoHV-4-A-KanaGalk Δ L1.7 di veicolare ed esprimere un antigene eterologo, ad esempio la cassetta di espressione della glicoproteina del virus della stomatite vescicolare (VSVg), sostituendo la cassetta *KanaGalk* e generando il virus BoHV-4-A-EF1 α VSVg Δ L1.7. Le cellule infettate da tale ricombinante virale hanno espresso la VSVg, confermando che l'alterata replicazione virale risultante dalla disfunzione del gene L1.7 non impediva la diffusione e l'espressione del gene eterologo (Capocefalo *et al.*, 2013).

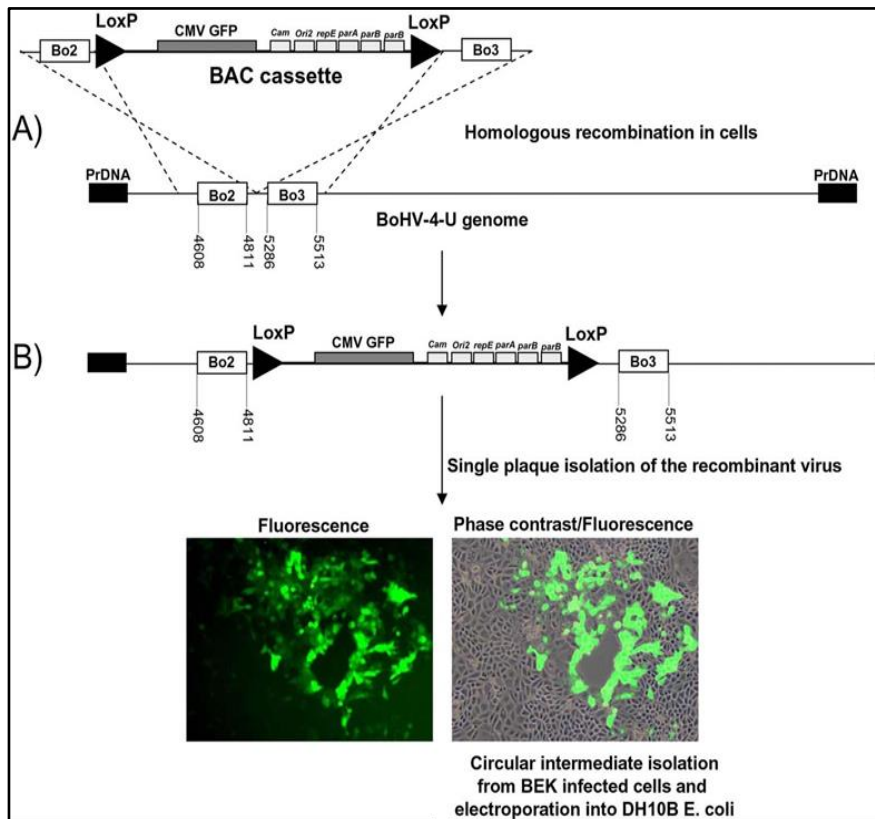


FIGURA 12. Diagramma che rappresenta la strategia utilizzata per generare il pBAC-BoHV-4-U. (A) Ricombinazione omologa ottenuta co-trasfettando in cellule eucariotiche, la cassetta BAC CMV-GFP con i siti *loxP* (indicati dai triangoli), fiancheggiata da due regioni di omologia di BoHV-4-U (Bo2 e Bo3) e la regione intergenica del genoma di BoHV-4 (basata sulla sequenza di Zimmermann); (B) Diagramma del BoHV-4-U ricombinante e immagini di una placca che esprime l'EGFP (Fluorescenza a contrasto di fase, 10 ×) (modificata da Donofrio *et al.*, 2009).

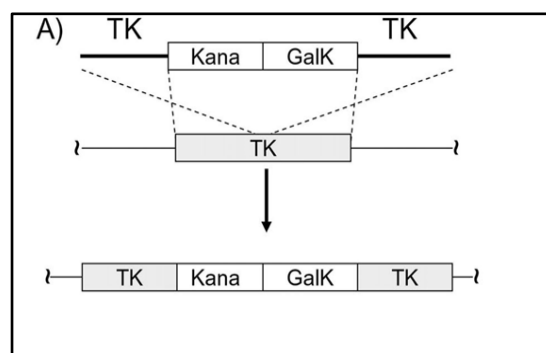


FIGURA 13. (A) Cassetta di resistenza alla kanamicina (*Kana*) con adiacente la cassetta della galattosidasi (*GalK*), entrambe fiancheggiata dalle sequenze del gene della TK di BoHV-4; sono introdotte nel gene TK del genoma di BoHV-4-U clonato come BAC-BoHV-4-U mediante ricombinazione omologa indotta dal calore negli *E. coli* SW 102. Dopo una selezione positiva su piastre in agar contenenti galattosio come l'unica fonte di carbonio e una selezione in mezzo liquido contenente kanamicina (modificata da Donofrio *et al.*, 2009).

CAPITOLO 2 - SCOPO DEL LAVORO E PARTE SPERIMENTALE

EBOV è l'agente patogeno responsabile dell'EBV nei Paesi africani, tra cui l'ultima epidemia, conclusasi con più di 11.300 morti. La produzione e la disponibilità di vaccini è strettamente dipendente da fattori commerciali. Infatti, non è una coincidenza se i vaccini disponibili per malattie endemiche nei Paesi sottosviluppati, sono meno diffusi rispetto a quelli per le malattie dei Paesi industrializzati. Nei recenti focolai di EBOV sono state colpite persone provenienti da zone boschive e persone provenienti da grandi città. L'epidemia ha raggiunto dimensioni globali e i contagiati da EBOV sono stati ospedalizzati non solo in Africa, ma anche negli USA e in Europa. Questo fenomeno ha catturato l'attenzione della comunità scientifica internazionale. Tuttavia, l'attività di ricerca in questo campo è ostacolata dalla necessità di strutture di contenimento molto costose, che sono il vero limite per trattare questi tipi di patogeni, per i quali sono disponibili pochi vaccini e nessun trattamento efficace.

Finora solo una dozzina di vaccini si è dimostrata protettiva da un'infezione letale di EBOV e diversi sono in fase di sperimentazione. Molti gli approcci basati sui vettori virali, in grado di veicolare ed esprimere l'EBOV GP. Differenti tipi di vettori virali derivanti da diverse classi di virus sono in fase di studio ed ognuno di loro possiede particolari caratteristiche. È, quindi, difficile stabilire quale virus possa raggiungere al meglio l'obiettivo prepostogli. Di conseguenza, sarebbe di grande interesse esplorare nuove piattaforme vaccinali utilizzando virus differenti da quelli già in fase di studio.

BoHV-4 è un vettore virale di nuova generazione appartenente alla famiglia dei *Gammaherpesvirus*; il suo genoma è stato clonato come BAC e, come tale, è in grado di trasportare ORF codificanti per antigeni di diversi patogeni che hanno dimostrato essere funzionali e protettivi nelle differenti specie animali immunizzate.

Scopo di questo studio è stato quello di sfruttare il vettore virale BoHV-4 unitamente all'approccio del gene sintetico in fase solida, per sviluppare una piattaforma vaccinale che permettesse l'espressione dell'EBOV GP, considerata il bersaglio ideale per la progettazione di

vaccini contro EBOV. Questo sistema è stato testato anche perché potrebbe rappresentare uno strumento efficace e innovativo per testare antigeni sconosciuti di patogeni di classe A.

MATERIALI E METODI

Estrazione e purificazione del DNA

Al termine della corsa elettroforetica è possibile recuperare dal gel le bande di DNA al fine di verificarne la sequenza e di compiere dei sub-clonaggi.

Nel nostro studio è stato utilizzato il kit di estrazione "GEL EXTRACTION" di Eurogold:

1. La banda d'interesse è stata escissa dal gel con l'aiuto di un bisturi, eliminando la maggior parte del gel in eccesso. La banda è stata in seguito pesata.
2. Il frammento di gel è stato trasferito in una provetta da 1,5 ml e sono stati aggiunti 100 µl di tampone di solubilizzazione XP2 per ogni 100 mg di gel (tale tampone contiene NaClO₄ concentrato, sodio acetato e solubilizzante TBE).
3. Sono stati in seguito aggiunti tre volumi di buffer QG per ciascun volume di gel (100 mg di gel corrispondono a 100 µl di soluzione).
4. Le provette sono state incubate a 40°C per almeno 10 minuti, agitando ogni 2-3 minuti fino al completo scioglimento del gel; è stato, inoltre, monitorato il pH della miscela dopo il discioglimento del gel, poiché la resa in DNA è diminuita se il pH supera 8. Il colore della miscela deve tendere al giallo chiaro, se vira verso l'arancio o il rosso, è necessario aggiungere 5 µl di acetato di sodio per alzare il pH.
5. La colonnina del kit è stata posta in una provetta da 2 ml.
6. Il campione è stato trasferito nella colonnina, 750 µl alla volta, e centrifugato a 10.000 rpm per 1 minuto, al fine di favorire il legame del DNA alla resina silicea presente sulla colonnina.
7. Dopo l'eliminazione dello scarto la colonnina è stata riposta nella stessa provetta.
8. Per lavare il DNA legato alla resina, sono stati aggiunti 750 µl di Wash Buffer SPW (contenente etanolo, NaCl, EDTA e Tris/HCl); la colonnina è stata, quindi, centrifugata per 1 minuto a 10.000 rpm.
9. Gli step 7 e 8 sono stati ripetuti per un'altra volta.

10. Dopo l'eliminazione dello scarto, la colonnina è stata centrifugata per 3 minuti alla velocità massima. Questa nuova fase di centrifugazione è definita "asciugatura" ed è volta alla rimozione di tutte le tracce di etanolo, che potrebbero inibire le reazioni enzimatiche successive.
11. La colonnina è stata, infine, trasferita in una provetta pulita da 1,5 ml.
12. Il DNA è stato eluito aggiungendo 50 µl di acqua filtrata sterile, in precedenza riscaldata, direttamente al centro della matrice di silice. Dopo un'incubazione di 2 minuti la colonnina è stata centrifugata a 5.000 rpm per 1 minuto e l'eluato contenente il DNA recuperato nella provetta sottostante la colonnina.
13. La resa della purificazione è stata valutata attraverso corsa elettroforetica su gel d'agarosio. I campioni così purificati possono essere utilizzati per successive fasi di purificazione o digestione enzimatica.

Purificazione del DNA plasmidico

Il tipo di purificazione effettuata (Miniprep, Midiprep o Maxiprep) dipende dalla quantità di DNA che si desidera ottenere: in condizioni ottimali, partendo da 200 ml di coltura liquida confluyente, la Maxiprep consente di ottenere fino a 1 mg di plasmide, risultando una procedura idonea a preparare uno stock molto concentrato (come 1 µg/µl). La Miniprep ha una resa molto inferiore: da 5 ml di coltura si recuperano 0,5-5 µg di plasmide e appare perciò utile per una rapida caratterizzazione del clone attraverso una PCR o un'analisi di restrizione enzimatica.

Nel nostro laboratorio sono state utilizzate le seguenti concentrazioni di antibiotici per selezionare i batteri che trasportano il plasmide ricombinante: ampicillina 100 µg/ml, 50 µg/ml kanamicina, 20 µg/ml cloramfenicolo.

Miniprep

Per la purificazione plasmidica è stato utilizzato il kit "PLASMID KIT MINIPREP" di Eurogold:

1. 1,5 ml della coltura batterica liquida confluyente sono stati pellettati in una provetta da 1,5 ml centrifugando per 30 secondi a temperatura ambiente (RT, *room temperature*) alla velocità massima consentita dalla microcentrifuga.
2. Il surnatante è stato eliminato e la provetta è stata appoggiata capovolta su un foglio di carta per farla asciugare dal terreno di coltura. La fase di centrifugazione-pellettamento può essere ripetuta più volte se il pellet batterico è troppo piccolo.
3. Il pellet batterico è stato risospeso in 250 µl della soluzione di risospensione (Solution I: 25 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNasi A, da conservare a 4°C).
4. Sono stati, quindi, aggiunti 250 µl della soluzione di lisi (Solution II: 200 mM NaOH, 1% SDS) e delicatamente la provetta è stata mescolata per inversione, senza vortexare. Per favorire la lisi batterica il campione è stato incubato per 4 minuti a RT.
5. In seguito sono stati aggiunti 350 µl della soluzione di neutralizzazione (Solution III: acetato di potassio 3 M pH 4,8), mescolando delicatamente la provetta per inversione fino a rendere omogenea la soluzione.
6. Per liberare il DNA plasmidico nella fase acquosa il lisato è stato centrifugato a 14.000 rpm per 10 minuti a RT.
7. Il precipitato dovrebbe formare un pellet e il surnatante deve essere chiaro. La fase liquida è stata trasferita su una colonnina HiBind Miniprep e posta in una provetta da 2 ml.
8. Il campione è stato centrifugato per 1 minuto a 12.000 rpm per far passare il lisato attraverso la membrana al fine di far legare il DNA alla resina silicea.
9. Dopo l'eliminazione dello scarto la colonnina è stata riposta nella provetta di raccolta. Sono stati aggiunti 750 µl di Wash Buffer completato con etanolo assoluto per lavare il DNA legato alla resina.
10. Il campione è stato centrifugato a 12.000 rpm per 1 minuto a RT.

11. Lo scarto è stato eliminato e lo step 9 ripetuto utilizzando 750 µl di Wash Buffer.
12. Lo step 10 è stato ripetuto nuovamente.
13. Lo scarto è stato eliminato per inversione ed è stata eseguita una nuova centrifugazione di 3 minuti a 12.000 rpm per eliminare eventuali tracce di etanolo dalla resina.
14. La colonnina è stata poi collocata in una nuova provetta da 1,5 ml.
15. L'eluizione del DNA è stata ottenuta aggiungendo 50-100 µl di acqua filtrata sterile direttamente al centro della matrice di silice e centrifugando la provetta a 6.000 rpm per 2 minuti.

Maxiprep

Per questa procedura è stato utilizzato il kit "JETSTAR PLASMID MAXI KIT" della Genomed:

1. I batteri trasformati sono stati fatti crescere overnight (O/N) a 37°C in agitazione in 250 ml di terreno LB antibiotato.
2. Il giorno successivo la coltura batterica è stata raccolta in un prozettone da 250 ml e centrifugata a 2.500 rpm per 45 minuti a 4°C.
3. Al termine della centrifuga il surnatante è stato scartato, le tracce di medium sono state rimosse e il pellet batterico è stato risospeso in 10 ml di soluzione E1 (50 mM Tris/HCl a pH 8, 10 mM EDTA e RNAsi A 100 µg/ml).
4. La sospensione è stata poi trasferita in una falcon da 50 ml e sono stati aggiunti 10 ml di soluzione di lisi E2 (200 mM NaOH, 1% SDS). La falcon è stata delicatamente mescolata per inversione ed è stata incubata 4 minuti a RT.
5. Infine, sono stati aggiunti 10 ml di soluzione di neutralizzazione E3 (3,1 M di acetato di potassio) al lisato, mescolando delicatamente per inversione fino ad ottenere una sospensione omogenea.
6. Per pellettare il lisato batterico e liberare in soluzione il DNA plasmidico, il campione è stato centrifugato a 10.000 rpm per 10 minuti.

7. Per pre-equilibrare l'apposita colonna fornita dal kit, 30 ml di soluzione di equilibratura E4 (600 mM NaCl, 100 mM acetato di sodio, 0,15% Triton X/100) sono stati aggiunti alla colonna e fatti passare nella resina in essa presente.
8. Il surnatante è stato trasferito nella colonna per permettere il legame del DNA plasmidico alla resina.
9. La colonna è stata in seguito lavata con 60 ml di soluzione di lavaggio E5 (800 mM NaCl, 100 mM acetato di sodio).
10. Al termine del lavaggio la colonna è stata trasferita su una nuova falcon da 50 ml.
11. La colonna è stata caricata con 15 ml di buffer di eluizione E6 (1.500 mM NaCl, 100 mM Tris).
12. All'eluato sono stati aggiunti 10,5 ml d'isopropanolo per precipitare il DNA ora presente in soluzione, ed è stato centrifugato a 10.000 rpm per 30 minuti a 4°C.
13. Il surnatante è stato scartato per inversione e il pellet lavato con 500 µl di etanolo al 70%.
14. Il pellet è stato trasferito in una provetta da 1,5 ml e centrifugata a 14.000 rpm per 2-3 minuti.
15. Il surnatante è stato in seguito rimosso e centrifugato nuovamente alla velocità massima per 30 secondi.
16. Le tracce di etanolo sono state rimosse asciugando all'aria il pellet che, una volta ben asciutto, è stato risospeso in acqua sterile.
17. Il DNA è stato quantificato misurando l'assorbanza a 260 nm con uno spettrofotometro. La soluzione di DNA è stata diluita portandola ad una concentrazione di 1 µg/µl.

Polymerase Chain Reaction

La tecnica nota come reazione a catena della DNA polimerasi (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) consente l'amplificazione e la rivelazione di frammenti di acido nucleico. Richiede l'uso di una coppia d'innesci (*primers*), che si appaieranno a sequenze localizzate a entrambi i lati della regione che si vuole amplificare. La DNA polimerasi sintetizzerà nuovi filamenti di DNA a partire da ciascun *primer*.

Un'applicazione per facilitare il clonaggio è l'aggiunta di siti di restrizione alle estremità dei prodotti di PCR. Per fare ciò, le estremità 5' delle sequenze dei *primers* sono modificate affinché incorporino l'opportuno sito di restrizione. Per ottenere un gene clonato privo di errori si possono utilizzare DNA polimerasi, che possiedono l'attività di correzione di bozze (*proofreading activity*, es. *Pfu*, *Herculase II*), ed ottenere sequenze corrette per poi eseguirne il clonaggio.

TABELLA 1. Lista dei *primers* utilizzati.

PRIMER	SEQUENZA 5' - 3'
<i>NheI</i> EBOGP sense	GGG GCT AGC CCA CCA TGG GCG TG
<i>SalI</i> EBOGP antisense	GGG GTC GAC CTG GCG CCA GCC GGT CCAC CAG TT

Colture cellulari

Nel nostro studio sono state utilizzate diverse linee cellulari: cellule di rene bovino embrionale [(BEK, *Bovine Embryonic Kidney*), per gentile concessione della Dr. M. Ferrari, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia, Italia; (BS CL-94)] cellule BEK esprimenti la *ricombinasi cre* (BEK/*cre*) (Donofrio *et al.*, 2008) e cellule di rene embrionale umano [(HEK 293T, *Human embryonic kidney 293T*) ATCC: CRL-11268]. Le cellule sono state coltivate in *Eagle's minimum essential medium* (EMEM, Lonza) con l'aggiunta del

10% di siero fetale bovino (FBS, *fetal bovine serum*, Lonza), 2 mM di L-glutammina (SIGMA), 100 UI/ml di penicillina (SIGMA), 100 µg/ml di streptomina (SIGMA) e 2,5 µg/ml di Anfotericina B (SIGMA) e poste a 37°C in un incubatore con un ambiente al 5% di CO₂.

Elettroporazione

A causa delle diverse caratteristiche delle cellule eucariotiche e procariotiche, i protocolli per l'elettroporazione variano per pochi aspetti, poiché sono di primaria importanza per l'esito della trasformazione, dipendendo sia dalla presenza nei batteri di una parete cellulare sia dalle condizioni di coltura completamente diverse.

Generazione di batteri elettrocompetenti (DH10B e HS996)

1. Un'aliquota di batteri stoccata a -80°C è stata scongelata lentamente in ghiaccio.
2. Sono stati inoculati 500 µl di batteri in 50 ml di LB e lasciati O/N a 37°C in agitazione in assenza di antibiotici. Un controllo è stato compiuto aggiungendo 500 µl di batteri in 50 ml di LB con 20 µg/ml di cloramfenicolo.
3. Sono stati trasferiti 10 ml della coltura confluyente in 300 ml di LB fresco senza antibiotici e lasciati a 37°C in agitazione fino al raggiungimento di un OD₆₀₀ compreso tra 0,5 e 0,6, indice di un'ottimale fase di crescita logaritmica dei batteri.
4. I batteri sono stati riposti in ghiaccio e centrifugati a 7.000 rpm a 0°C per 5 minuti.
5. Il surnatante è stato eliminato e risospeso il pellet in 50 ml di acqua sterile in precedenza raffreddata; il pellet è stato risospeso agitando delicatamente la falcon in ghiaccio fino a completo discioglimento del pellet stesso.
6. I batteri sono stati centrifugati a 7.000 rpm a 0°C per 5 minuti.
7. Gli step 5 e 6 sono stati ripetuti.
8. Il surnatante è stato eliminato e il pellet risospeso in 50 ml di acqua sterile raffreddata con il 10% di glicerolo.
9. I batteri sono stati ulteriormente centrifugati a 7.000 rpm a 0°C per 10 minuti.

10. Il surnatante è stato, infine, eliminato e il pellet risospeso in 1 ml di acqua sterile raffreddata con il 10% di glicerolo.
11. Sono state realizzate aliquote da 50 µl di batteri in provette da 0,2 ml da PCR; le provette sono state dapprima immerse in un bagno di azoto liquido per circa 10 secondi e, infine, stoccate a -80°C fino all'uso. Le cellule elettrocompetenti erano preparate come descritto da [Sambrook and Russell, 2001](#).

Protocollo di elettroporazione dei batteri elettrocompetenti

1. Un'aliquota di batteri elettrocompetenti stoccata a -80°C è stata scongelata in ghiaccio.
2. La soluzione di DNA è stata aggiunta alla provetta (1 o 2 µl, a seconda della concentrazione plasmidica) oltre a 100 µl di acqua bidistillata ed è stata mescolata dolcemente con una pipetta.
3. La sospensione è stata trasferita in una cuvetta di elettroporazione in precedenza raffreddata in ghiaccio.
4. La cuvetta è stata posta nell'elettroporatore (Equibio Apparatus) e sottoposta alla scarica elettrica. I parametri utilizzati sono: 2,5 kVolts, 25 µFarad, 201 Ohm. In caso di elevata impedenza 1 µl di PBS diluito è stato aggiunto nella cuvetta.
5. Al termine della scarica elettrica 1 ml di terreno LB è stato velocemente aggiunto ai batteri. È molto importante aggiungere il terreno di coltura dopo la scarica elettrica per ridurre la tossicità della stessa sulle cellule batteriche.
6. I batteri sono stati trasferiti in una provetta da 15 ml e incubati a 37°C per 1 ora in agitazione per permettere il recupero dell'integrità di membrana dei batteri e l'espressione del marcatore presente nel plasmide.
7. Infine, sono state seminate 250 µl di sospensione batterica su piastre selettive (antibiotate) e incubate O/N a 37°C.

Protocollo di elettroporazione delle cellule di mammifero

1. Le cellule sono state raccolte da una fiasca confluyente attraverso tripsinizzazione e contate con una camera di Burker al fine di elettroporare l'esatta quantità di cellule in una provetta da 15 ml.
2. Le cellule sono state centrifugate a 1.000 rpm per 2 minuti.
3. Il terreno di coltura è stato rimosso e il pellet lavato con 700 µl di Dulbecco's modified essential medium (DMEM-high) con elevata percentuale di glutammina e piruvato e 20 µg/ml di gentamicina in assenza di FBS.
4. Il lavaggio è stato eseguito centrifugando a 1.000 rpm per 1 minuto e le cellule sono state risospese in 600 µl di DMEM senza FBS.
5. La quantità desiderata di DNA è stata aggiunta alle cellule e il contenuto della provetta trasferito in una cuvetta di elettroporazione per cellule di mammifero.
6. La cuvetta è stata posta nell'elettroporatore e la scarica elettrica avviata. I parametri differivano in base alle linee cellulari impiegate; per le cellule BEK e BEK/cre sono stati utilizzati questi parametri: 270 Volts e 1500 µFarad; mentre per le cellule HEK 293T: 186 Volt e 1500 µFarad.
7. Al termine della scossa elettrica è stato velocemente aggiunto alle cellule 1 ml di EMEM con il 10% di FBS.
8. La sospensione è stata trasferita in una nuova fiasca (da 25 cm² o 75 cm² secondo la quantità iniziale di cellule) e sono stati aggiunti 10-15 ml di EMEM con il 10% di FBS.
9. La fiasca è stata poi incubata a 37°C in atmosfera umidificata con il 5% di CO₂ fino a completa adesione alla fiasca.
10. Il terreno di coltura è stato sostituito e la fiasca nuovamente incubata a 37°C in atmosfera umidificata con il 5% di CO₂.

Elettroporazione delle cellule e ricostituzione del virus ricombinante

Le cellule BEK e BEK/cre sono state mantenute in monostrato cellulare in terreno EMEM contenente il 10% di FBS, 2 mM di L-glutammina, 100 UI/ml di penicillina e 100 mg/ml di streptomina. Raggiunta la sub-confluenza (70-90%) le cellule sono state passate in una nuova fiasca (circa ogni 3-5 giorni) e incubate a 37°C in atmosfera umidificata con il 5% di CO₂. Il DNA del BAC (5 µg) è stato miscelato alle cellule in 600 µl di DMEM senza siero ed elettroporato (Equibio Apparatus, 270 Volts, 960 µFarad, cuvette da 4 mm) nelle BEK e BEK/cre provenienti da una fiasca di 25 cm² confluyente. Le cellule elettroporate sono state incubate a 37°C in atmosfera umidificata con il 5% di CO₂ e dopo 24 ore il terreno sostituito con terreno fresco e le cellule passate 1:2 nel caso raggiungessero la confluenza. Le cellule sono state lasciate crescere fino al manifestarsi del CPE.

Virus e replicazione virale

I virus BoHV-4-syEBOVgD106ΔTK e BoHV-4-A sono stati propagati infettando monostrati cellulari confluenti di BEK alla *Multiplicity of infection* (MOI) di 0,5 dosi citopatiche 50 (TCID₅₀) per cellula, e queste mantenute in EMEM al 10% di FBS e incubate per 2 ore a 37°C in atmosfera umidificata con il 5% di CO₂. Il terreno è stato rimosso e sostituito con EMEM fresco contenente il 10% di FBS. Quando il CPE si manifestava interessando la maggior parte del monostrato cellulare (circa 72 ore dopo l'infezione colpendo circa l'80% delle cellule), il virus è stato stoccato a -80°C. Per far rilasciare il virus dall'interno delle cellule sono stati necessari tre cicli di congelamento e scongelamento, quindi il surnatante è stato raccolto e chiarificato tramite centrifugazione a bassa velocità, 2.000 rpm per 5 minuti a 4°C, per eliminare i detriti cellulari. I surnatanti raccolti sono stati posti nei tubi da ultracentrifuga (Beckman) ed è stato generato un gradiente di saccarosio al 30%. Per pellettare i virus i surnatanti sono stati centrifugati a 35.000 rpm per 2 ore a 4°C. Il pellet è, quindi, stato risospeso in EMEM freddo in assenza di FBS o in acqua sterile, se era necessario procedere con l'estrazione virale del DNA. Il

titolo virale, indicato con le $TCID_{50}$, è stato determinato attraverso un saggio di titolazione classica sulle cellule BEK.

Curve di crescita virale

Le cellule BEK sono state infettate con i virus BoHV-4-A e BoHV-4syEBOVgD106ΔTK alla MOI di 0,1 $TCID_{50}$ per cellula e incubate a 37°C per 4 ore in atmosfera umidificata con il 5% di CO_2 . Le cellule infettate sono state in seguito lavate con EMEM in assenza di FBS e poi fatte crescere in terreno completo EMEM contenente il 10% di FBS. I surnatanti delle colture infette sono stati raccolti a 24, 48, 72 e 96 ore e la quantità di virus presente è stata stimata attraverso il saggio di titolazione sulle cellule BEK.

Ricombinazione omologa e selezione dei BAC

La ricombinazione omologa è stata eseguita come descritto da Warming e coll. (2005) apportando alcune modifiche al protocollo. In 25 ml di terreno di coltura LB con cloramfenicolo (12,5 mg/ml) (SIGMA) sono stati inoculati 500 μ l di una coltura di E. Coli SW102 contenenti il BAC BoHV-4-A-Kana-GalKΔTK cresciuti O/N a 30°C, trasferiti in una boccetta conica da 50 ml e lasciati crescere a 30°C in bagno d'acqua in agitazione fino a raggiungere una densità ottica (O.D.) 0,6 misurata ad una lunghezza d'onda di 600 nm. In seguito, 12,5 ml sono stati trasferiti in un'altra boccetta conica da 50 ml e sottoposti a induzione al calore scaldandoli a 42°C per 15 minuti in un bagno d'acqua in agitazione. La coltura rimanente è stata lasciata a 32°C come controllo non indotto. Dopo 15 minuti i due campioni, indotti e non indotti, sono stati raffreddati in ghiaccio e poi trasferiti in due provette da 15 ml e pellettati a 5.000 rpm a 0°C per 5 min. Il surnatante è stato eliminato e il pellet risospeso in 1 ml di acqua bidistillata fredda ruotando delicatamente le provette sul ghiaccio. In seguito, sono stati aggiunti 9 ml di acqua bidistillata fredda e i campioni nuovamente pellettati. Questa fase è stata ripetuta ancora una volta, il surnatante è stato rimosso e il pellet (50 μ l ciascuno) mantenuto in ghiaccio fino alla successiva fase di elettroporazione del plasmide da ricombinare. Il plasmide

pINT2CMVsyEBOVgD106 è stato in precedenza linearizzato con *XhoI* (Fermentas), purificato e quantificato su gel.

Un'aliquota di 200 ng di plasmide linearizzato è stato elettroporato in 25 µl di batteri indotti in una cuvetta da 1 mm, e usati i seguenti parametri di elettroporazione: 25 µFarad, 2,5 kVolts e 201 Ohm. Dopo l'elettroporazione, per la fase di selezione, i batteri sono stati recuperati, messi in 10 ml di LB in una boccetta conica da 50 ml e incubati a 30°C per 4,5 ore in un bagno d'acqua in agitazione. Al termine delle ore d'incubazione 1,5 ml di batteri sono stati pellettati e lavati per due volte consecutive in terreno M9 (6 g Na₂HPO₄, 3 g KH₂PO₄, 1 g NH₄Cl, 0,5 g NaCl in 1 l di acqua bidistillata), al fine di eliminare le tracce di medium residuo presente. Diluizioni seriali dei batteri sono state seminate su piastre agarizzate contenenti il medium minimo M63 completato con 15 g/l di agar, 0,2% di glicerolo, 1 mg/l di D-biotina, 45 mg/l di L-leucina, 0,2% di 2-deossigalattosio e 12,5 mg/ml di cloramfenicolo (SIGMA). Le piastre sono state incubate per 3-5 giorni a 30°C; diverse colonie discrete sono state raccolte, piastrate su piastre McConkey (Difco, BD Biosciences) contenenti 12,5 g/ml di cloramfenicolo e incubate a 30°C per 3 giorni fino a quando è stato possibile osservare la crescita delle colonie bianche. Le colonie bianche sono state coltivate in duplicato per 5-8 ore in 1 ml di LB contenente 50 mg/ml di kanamicina (SIGMA) o 12,5 mg/ml di cloramfenicolo. Solo le colonie kanamicina negative e cloramfenicolo positive sono state in seguito coltivate O/N in 5 ml di LB contenenti 12,5 mg/ml di cloramfenicolo. Il DNA del BAC è stato purificato e analizzato attraverso digestione enzimatica con l'enzima *HindIII* (Fermentas). Il DNA è stato separato tramite elettroforesi su gel di agarosio all' 1% colorato con bromuro di etidio e visualizzato con luce UV.

I protocolli dettagliati per la ricombinazione possono essere scaricati dal sito (<http://recombineering.ncifcrf.gov>).

Purificazione del BAC

I BAC sono i più grandi tra i plasmidi comunemente usati e la loro purificazione richiede maggiore attenzione al fine di evitarne la degradazione.

Protocollo di estrazione del BAC descritto da Warming e coll. (2005):

1. I batteri contenenti il BAC sono stati fatti crescere O/N: in 5 ml di LB antibiotato a 30°C in agitazione. La temperatura di crescita è strettamente limitante e deve essere compresa tra i 30-32°C.
2. La coltura è stata centrifugata a 7.000 rpm per 5 minuti a 4°C.
3. Una volta rimosso il surnatante, la provetta è stata capovolta su carta assorbente per rimuovere tutte le tracce del terreno di coltura.
4. Il pellet è stato in seguito risospeso in 250 µl di soluzione di risospensione (50 mM Tris/HCl pH 8, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A) e trasferito in una provetta da 1,5 ml.
5. Sono stati aggiunti 250 µl di soluzione di lisi (200 mM NaOH, 1% SDS) e la provetta è stata mescolata invertendola più volte. E' stata incubata per 4 minuti a RT.
6. Sono stati aggiunti 250 µl di acetato di sodio per bloccare la reazione di lisi; il campione è stato mescolato con delicatezza e incubato in ghiaccio o a -80°C per 15 minuti.
7. Dopo centrifugazione a 14.000 rpm per 5 minuti il surnatante è stato trasferito in una provetta pulita da 1,5 ml.
8. Lo step 7 è stato ripetuto un'altra volta al fine di eliminare eventuali residui di flocculato batterico.
9. Sono stati, infine, aggiunti 750 µl d'isopropanolo per precipitare il DNA; dopo il mescolamento per inversione, la soluzione è stata incubata in ghiaccio oppure a -80°C per 10 minuti.
10. Le provette sono state centrifugate a 14.000 rpm per 10 minuti a 4°C.
11. Rimosso il surnatante invertendo la provetta, il pellet è stato lavato con 0,5 ml di etanolo al 70%.
12. Le eventuali tracce di etanolo sono state rimosse e il pellet lasciato asciugare all'aria.

13. Dopo l'asciugatura il pellet è stato risospeso in 50 µl di acqua filtrata sterile.

Southern Blot

Un'ulteriore conferma sulla natura dell'inserito è stata ottenuta utilizzando una metodica d'ibridazione detta "Southern Blot". Una caratteristica fondamentale dell'ibridazione degli acidi nucleici è che la sonda (DNA o RNA) è marcata in modo che sia possibile identificarla dopo ibridazione.

Il metodo di marcatura della sonda utilizzato nel nostro studio ha previsto l'incorporazione di nucleotidi coniugati con digossigenina e poi rilevati con anticorpi specifici (Arnold *et al.*, 1992).

Viene di seguito riportato il protocollo utilizzato per produrre sonde marcate con digossigenina e quello utilizzato per il Southern Blot (Sambrook and Russell, 2001).

TABELLA 2. Marcatura della sonda tramite PCR.

5 µl di dNTPs mix 10X (2mM)
5 µl di Taq buffer 10X (from Invitrogen)
5 µl di primer 10X (2,5 µM ciascuno)
1 µl di templatò (~1 µg di plasmide o frammento amplificato)
1 µl di Digoxigenin-11-dUTP alkaline labile (Roche)
2 µl di Taq polimerase 1U/µl (Invitrogen)
H ₂ O fino a 50 µl

In questo studio un amplicone di 1967 bp marcato con digossigenina (*EBO digoxigenin-labeled probe*) è stato generato tramite PCR utilizzando i *primers* riportati nella **Tab. 1**.

La reazione di PCR è stata eseguita in un volume finale di 50 µl contenente 10 mM di Tris-HCl, pH 8,3, 0,2 mM di dideossinucleotidi trifosfati (dNTP), 1 U di Taq polimerasi (Thermoscientific), 0,02 mM di digossigenina-dUTP (ROCHE), 3 mM di MgCl₂, 50 mM di KCl e 0,25 µM di ogni primer per 35 cicli.

Ogni ciclo comprende una fase di denaturazione a 94°C per 1 minuto, una fase di annealing a 60°C per 1 minuto e una fase di estensione a 72°C per 2 minuti.

L'incorporazione della digossigenina-dUTP nel DNA comporta un aumento del peso molecolare dell'amplicone rispetto a quello del DNA non marcato, visualizzabile tramite elettroforesi su gel.

Protocollo utilizzato per il Southern Blot:

1. Dopo la separazione dei frammenti di DNA mediante elettroforesi, il gel d'agarosio è stato capovolto e posizionato in un contenitore contenente 250 ml di soluzione di depurazione (0,25 M HCl) e posto in agitazione in un bagnetto d'acqua. La soluzione di depurazione rimuove le purine dal DNA, preservando il deossiribosio fosfato e facilitando il trasferimento del DNA sulla membrana. La membrana è stata incubata per 15 minuti o fino a quando il colore blu del tampone di caricamento è virato al giallo.
2. La soluzione di depurazione è stata rimossa e sostituita con 250 ml di soluzione di denaturazione (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) e riposta in agitazione in bagnetto d'acqua per 15 minuti o fino a quando il colore non è ritornato blu.
3. La soluzione di denaturazione è stata rimossa e sostituita con 250 ml di soluzione di neutralizzazione (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris pH 7,5, 1 mM EDTA) e lasciata incubare per almeno 20 minuti.
4. Il gel d'agarosio è stato messo in contatto con la membrana di nylon (ROCHE).
5. L'SSC 20X aveva la seguente composizione: 3 M NaCl e 0,3 M citrato di sodio. Il buffer SSC è aspirato per capillarità dal contenitore nel quale è immersa la carta, che permette il trasferimento del DNA dal gel alla membrana.
6. La membrana è stata trasferita in un forno a raggi ultravioletti e cross-linkato il DNA in modo da permettere il legame covalente alla membrana.
7. La membrana è stata posta in un tubo di vetro e sono stati aggiunti 50 ml di soluzione di pre-ibridazione (7% SDS, 0,5 M Na₂HPO₄) incubando a 65°C per 30 minuti in rotazione (Techna Instruments).

8. In seguito in una provetta da 2 ml sono stati aggiunti 5 μ l della sonda marcata con digossigenina a 500 μ l di acqua filtrata sterile. La sonda è stata fatta bollire ponendola in acqua in ebollizione per 5 minuti per denaturare il DNA, quindi raffreddata immediatamente ponendola in ghiaccio.
9. La sonda è stata trasferita in 50 ml di soluzione d'ibridazione (7% SDS, 0,5 M Na_2HPO_4 , 1 mM EDTA).
10. La soluzione di pre-ibridazione è stata rimossa dal tubo di vetro e sostituita con la soluzione d'ibridazione incubando O/N a 65°C in rotazione.
11. La soluzione d'ibridazione è stata di seguito rimossa.
12. La membrana è stata lavata con 100 ml di soluzione di lavaggio 1 (0,5X SSC, 0,1% SDS) per 15 minuti a 65°C in rotazione, ripetendo tale lavaggio per due volte consecutive.
13. La soluzione di lavaggio 1 è stata rimossa e sono stati aggiunti 100 ml di soluzione di lavaggio 2 (40 mM PO_4^{3-} pH 7,2, 0,05% SDS) incubando per 15 minuti a 65°C in rotazione per due lavaggi consecutivi.
14. La soluzione di lavaggio 2 è stata rimossa ed estratta la membrana dal tubo. La membrana è stata in seguito equilibrata con la soluzione di lavaggio 3 (100 mM acido maleico, 150 mM NaCl, 0,3% Tween20) per 1 minuto a RT in agitazione.
15. Dopo la rimozione della soluzione di lavaggio 3 la membrana è stata incubata con la soluzione di blocking per 30-60 minuti in agitazione (100 mM acido maleico, 150 mM NaCl e 1% blocking reagent da ROCHE) a RT.
16. L'anticorpo anti-digossigenina è coniugato con la fosfatasi alcalina (Fab fragment 150U/200 μ l, ROCHE) ed è stato diluito 1/15.000 in 50 ml della blocking solution. La blocking solution è stata rimossa e la membrana incubata per 30 minuti nella soluzione anticorpale.
17. Dopo la rimozione dell'anticorpo la membrana è stata lavata delicatamente due volte, per 15 minuti con 100 ml della soluzione di lavaggio 3.

18. La soluzione di lavaggio 3 è stata rimossa e la membrana equilibrata nel buffer di sviluppo (100 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA pH 9,5) per 2 minuti.
19. La membrana è stata posta tra due fogli di acetato: il foglio superiore è stato sollevato e con una pipetta il substrato chemiluminescente (CSPD, ROCHE) è stato fatto gocciolare sulla membrana, spargendo le gocce sull'intera superficie. La membrana è stata poi coperta con il foglio superiore di plastica e sono state rimosse tutte le bolle presenti sotto il foglio.
20. La membrana è stata esposta su una lastra per raggi X e sviluppata. Il tempo di esposizione dipende dall'intensità del segnale rilevato.

Trasfezione transiente

La trasfezione consiste nel trasferimento di molecole di DNA esogeno in cellule riceventi. Il DNA, una volta trasfettato, è mantenuto per un limitato periodo come DNA extracromosomiale e il prodotto della sua espressione è stabile per due o tre giorni (trasfezione transiente). Come veicolo di trasfezione è stata utilizzata la polietilenimmina (PEI), una molecola carrier nel cui scheletro sono presenti gruppi amminici facilmente protonabili. A pH neutro essa è dotata di un'elevata carica cationica, che permette di legare il DNA con alta efficienza; questo consente al DNA di entrare per endocitosi nella cellula grazie al legame con i proteoglicani cellulari, garantendo ai complessi formati di non degradarsi.

Il giorno precedente la trasfezione, le cellule HEK 293T confluenti sono state seminate in multiwell da 6 pozzetti (3×10^5 cellule/pozzetto) e incubate a 37°C con il 5% di CO₂; quando le cellule hanno raggiunto lo stato di sub-confluenza, il terreno di coltura è stato rimosso e le cellule trasfettate con pINT2CMVsyEBOVgD106 utilizzando il reagente di trasfezione PEI (Polysciences, Inc.). Sono stati miscelati 3 µg di DNA con 7,5 µg di PEI (1 mg/ml) (rapporto 1:2,5 DNA-PEI) in 200 µL di DMEM ad elevata percentuale di glucosio (Euroclone) senza FBS. Dopo 15 minuti d'incubazione a RT, necessari per la formazione dei complessi DNA-PEI, sono stati aggiunti 800 µL di DMEM senza FBS e la soluzione di trasfezione è stata delicatamente trasferita

sulle cellule e lasciata agire per 6 ore in incubatore a 37°C in atmosfera umidificata con il 5% di CO₂. La miscela di trasfezione è stata in seguito sostituita con terreno fresco EMEM completo al 10% di FBS e le cellule incubate per 24 ore a 37°C in atmosfera umidificata con il 5% di CO₂.

Le cellule HEK 293T seminate in fiasche da 175 cm² sono state trasfettate come sopra ma utilizzando quantità di DNA e PEI proporzionalmente maggiori (52 µg di DNA mescolati con 130 µg di PEI in 3,5 ml di DMEM). La miscela di trasfezione è stata sostituita con terreno fresco DMEM/F12 senza siero e incubato per 48 ore a 37°C in atmosfera umidificata con il 5% di CO₂.

Estrazione proteica

Per l'estrazione delle proteine è richiesto un buffer di estrazione denominato RIPA Buffer. Per il nostro lavoro è stato utilizzato un buffer di estrazione modificato nella composizione rispetto al RIPA tradizionale; contiene: 250 mM di NaCl, 50 mM di Tris/HCl a pH 7,4, 2 mM di EDTA e 1% di NP-40.

Il Buffer di estrazione non contiene inibitori delle proteasi, quindi deve essere aggiunto un cocktail d'inibitori delle proteasi [1:100 (Alpha Diagnostic International)] e il Phenylmethane Sulfonyl fluoride (PMSF), in rapporto 1:100 rispetto al volume finale. Il PMSF e gli inibitori delle proteasi devono essere stoccati a -20°C.

Protocollo di estrazione proteica (per una fiasca da 75 cm²):

1. Le cellule sono state staccate dalla fiasca con una spatola (scraper), raccolte e centrifugate a 1.500 rpm per 10 minuti a 4°C.
2. E' stato rimosso il surnatante e il pellet risospeso in 10 ml di PBS 1X è stato centrifugato a 2.000 rpm per 5 minuti a 4°C.
3. E' stato rimosso il surnatante e il pellet rimanente è stato centrifugato a 3.000 rpm per 1-2 minuti a 4°C.
4. Il surnatante residuo è stato rimosso con una pipetta e il pellet risospeso in 250 µl del buffer di estrazione.

5. L'estratto proteico è stato incubato per almeno 30 minuti in ghiaccio e in seguito centrifugato a 14.000 rpm per 15 minuti a 4°C.
6. Il surnatante è stato recuperato (circa 200 µl) ed è stato aggiunto 1/5 di Laemmli 5X (50 µl).
7. Le proteine estratte sono state denaturate a 56°C per almeno 15 minuti.

Il Laemmli 5X è composto da: 1,5 g di Sodio Dodecil Solfato (SDS), 3,75 ml Tris/HCl 1M, pH 6,8, 0,015 g di blu di bromofenolo, 0,8 ml 2-β-mercaptoetanololo e 7,5 ml glicerolo; e infine portato al volume finale di 15 ml con acqua bidistillata (tutti i componenti del Laemmli sono stati acquistati da SIGMA). Le proteine sono state denaturate grazie all'azione dell'agente 2-β-mercaptoetanololo, presente nel Laemmli, in grado di rompere i ponti disolfuro intra- e intermolecolari tra i residui di cisteine nelle proteine, responsabili delle strutture secondarie delle proteine.

Western Blot

Gli estratti proteici cellulari sono stati ottenuti: (a) da una multiwell a 6 pozzetti con seminate le cellule HEK 293T trasfettate con pINT2CMVsyEBOVgD106 e, (b) da fiasche confluenti di BEK infettate con il virus ricombinante BoHV-4 syEBOVgD106ΔTK, aggiungendo 100 µl di Buffer di estrazione (50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl e 1% NP-40, pH 8). L'elettroforesi su gel denaturante di SDS-PAGE al 10% è stata utilizzata per analizzare 50 µg di proteina totale. Dopo il trasferimento delle proteine sulla membrana di nylon mediante elettroblotting, questa è stata incubata con un anticorpo monoclonale anti glicoproteina D di BoHV-1 (clone 1B8-F11, VRMD, Inc., Pullman, WA), diluito 1:15.000. Per finire, è stato utilizzato un anticorpo secondario sviluppato contro le immunoglobuline di topo marcato con la perossidasi (anti mouse IgG whole molecule, SIGMA), e diluito 1:10.000, e la reazione visualizzata con il Kit ECL Pierce.

Il surnatante cellulare ottenuto dalle HEK 293T trasfettate con pCMVEBOsecgD106 è stato raccolto in diversi momenti dalla trasfezione (16, 24, 40, 48, 50, 60 e 70 ore), chiarificato a bassi

rpm e denaturato con il calore in presenza di Laemmli e, infine, analizzato come sopra descritto tramite SDS-PAGE.

Raccolta dei campioni e procedura ELISA

I campioni di sangue sono stati raccolti nei tempi stabiliti in Golden Vac-Tube, rivestiti di un particolare film siliconico per favorire la formazione del coagulo (Gong Dong Medical Technology) e lasciati sierare a temperatura ambiente al fine di recuperare il siero per il successivo test ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*). La micropiastra (Microlon high binding) è stata adsorbita O/N a 4°C con il surnatante contenente la proteina secreta EBOsecgD106; tale secreto è stato ottenuto trasfettando cellule HEK 293T in fiasche da 175 cm² con pCMVEBOsecgD106. In ogni pozzetto della piastra sono stati disposti 50 ng della proteina secreta, diluita in tampone carbonato/bicarbonato 0,1 M a pH 9,6. Dopo la fase di bloccaggio dei siti di legame aspecifico effettuato con l'1% di BSA, i campioni di siero sono stati testati a diverse diluizioni (1/10, 1/100, 1/1.000 e 1/10.000) e incubati per 1 ora a RT. Dopo tre lavaggi con 200 µl di PBS/Tween (10 mM phosphate buffer pH 7,4, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20), in ciascun pozzetto sono stati aggiunti 50 µl di anticorpo prodotto in asino (anti Immunoglobuline di capra), coniugato con la perossidasi di rafano (donkey anti-goat IgG-HRP, SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, Germany) diluito 1:1.000 in PBS all'1% di BSA e la piastra è stata incubata 1 ora a RT. Dopo l'ultima fase di lavaggio è stato aggiunto il cromogeno, 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) 50 µl per pozzetto e dopo un'incubazione di 10 minuti la reazione è stata stoppata con 50 µl di 0,2 M H₂SO₄. La reazione cromogenica è stata letta con uno spettrofotometro misurando l'assorbanza a 450 nm.

RISULTATI

Progettazione *in silico* della ORF della EBOV GP

La sequenza della GP della variante virale *Mayinga Zaire Ebolavirus* (EBOV/May), identica alla variante *Gabon-94*, è altamente conservata e identica alle nuove varianti isolate negli ultimi focolai della malattia (numero di accesso: KJ660346.2, KJ660347, KJ660348); per tale ragione è stata utilizzata come modello per ottenere la sequenza nucleotidica complementare mediante traduzione inversa partendo dalla sequenza amminoacidica riportata in GenBank (**Fig. 14 A**).

La ORF sintetica della GP ottenuta è stata taggata al carbossiterminale con il peptide gD106 ([Capocefalo et al., 2010](#)) e sintetizzata da Eurofins (Genomics) subclonata nel vettore commerciale pUC57 generando pUC57syEBOVgD106.

Inoltre, all'estremità 5' della ORF sintetica, è stata aggiunta prima del codone d'inizio ATG la sequenza di *Kozak* (CCACC), l'equivalente eucariotico della sequenza di *Shine-Dalgarno*, che identifica il sito di aggancio del ribosoma all'mRNA e migliora la traduzione; come anche dei siti di restrizione per delle endonucleasi: all'estremità 5' *SmaI* [(CCC/GGG) ThermoScientific] e *NheI* [(G/CTAGC) ThermoScientific] e all'estremità 3' *SmaI* (CCC/GGG), che hanno facilitato i successivi clonaggi (**Fig. 14 B**). Pertanto la ORF sintetica è stata denominata "syEBOVgD106".

Il frammento EBOV secreto, "*EBOVsec*", privato del dominio trans-membrana, è stato ottenuto mediante reazione di amplificazione partendo dal template pINT2CMVsyEBOVgD106 ed utilizzando i *primers* riportati nella **Tab. 1**. Il frammento così generato *NheI-EBOsec-Sall*, di 1967 bp, è stato inserito all'interno del vettore plgkE2gD106 ([Donofrio et al., 2013](#)) a sua volta digerito con *NheI/Sall* per ottenere, infine, il costrutto pCMVEBOsecgD106.

A) Zaire Ebola virus Mayinga strain glycoprotein (GP) sequence

MGVTGILQLPRDRFKRTSFFLWVILFQRTFSIPLGVIHNSLQVSDVDKLVCRDKLSST
 NQLRSVGLNLEGNVATDVP SATKRWGF RSGVPPKVVNYEAGEWAENCYNLEIKKPDGSE
 CLPAAPDGI RGFPRCRYVHKVSGTGPCAGDFAFHKEGAFFLYDRLASTVIYRGTTF AEGV
 VAF LILPQAKKDF FSSHPLREPVNATEDPSSGYSTTIRYQATGFGTNETEYLFVNDLIT
 YVQLESRF TPQFLLQLNETIYTS GKRSNTTGKLIWKVNPEIDTTIGEWAFWETKKNLTRK
 IRSEELSFTVVSNGAKNISGQSPARTSSDPGTNTTTE DHKIMASENSSAMVQVHSQGREA
 AVSHLTTLATISTSPQSLTTKPGPDNSTHNTPVYKLDI SEATQVEQHRRRTDNDSTASDT
 PSATTAAGPPKAENTNTSKSTDFLDPATTTSPQNHSETAGNNNTHHQDTGEESASSGKLG
 LI TNTIAGVAGLITGGRRT RREAIVNAQPKCNPNLHYWTTQDEGAAI GLAWI PYFGPAAE
 GIYIEGLMHNQDGLICGLRQLANETTQALQLFLRATTELRTFSILNRKAI DFLLRWGGT
 CHILGDCCIEPHDWTKNITDKIDQI IHDFVDKTL PDQGDNDNWWTGW RQWIPAGIGVTG
 VIIAVIALFCICKFVE

B) Reverse translated, human codon usage adapted and tagged ORF

SmaI NheI KS
 cccggggttagc ccacc ATGGGCGTGACGGGCATCCTGCAGCTGCCCCGCGACCGCTTCA
 AGCGCACCAGCTTCTTCCTGTGGGTGATCATCCTGTTCCAGCGCACCTTCAGCATCCCC
 TGGGCGTGATCCACAACAGCACCCCTGCAGGTGAGCGACGTGGACAAGCTGGTGTGCCGCG
 ACAAGCTGAGCAGCACC AACCAGCTGCGCAGCGTGGGCCTGAACCTGGAGGGCAACGGCG
 TGGCCACCGACGTGCCAGCGCCACCAAGCGCTGGGGCTTCCGCAGCGGGCTGCCCCCCA
 AGGTGGTGAAC TACGAGGCGCGGAGTGGGCGGAGAACTGCTACAACCTGGAGATCAAGA
 AGCCCGACGGCAGCGAGTGCCTGCCCGCCGCCCGACGGCATCCGCGGCTTCCCCCGCT
 GCGCTACGTGCACAAGGTGAGCGGCACCGGCCCTGCGCCGGCGACTTCGCCTTCCACA
 AGGAGGGCGCCTTCTTCTGTACGACCGCTGGCCAGCACCGTGATCTACCGCGGCACCA
 CCTTCGCCGAGGGCGTGGTGGCCTTCTGATCCTGCCCCAGGCCAAGAAGGACTTCTTCA
 GCAGCCACCCCTGCGCGAGCCCGTGAACGCCACCGAGGACCCAGCAGCGGCTACTACA
 GCACCACCATCCGCTACCAGGCCACCGGCTTCGGCACCAACGAGACCGAGTACCTGTTTCG
 AGGTGGACAACCTGACCTACGTGCAGCTGGAGAGCCGCTTACCCCCCAGTTCCTGTCTGC
 AGCTGAACGAGACCATCTACACCAGCGGCAAGCGCAGCAACACCACCGGCAAGCTGATCT
 GGAAGGTGAACCCCGAGATCGACACCACCATCGGGCAGTGGGCTTCTGGGAGACCAAGA
 AGAACCTGACCCGCAAGATCCGCGAGCGAGGAGCTGAGCTTACCGTGGTGGAGCAACGGCG
 CCAAGAACATCAGCGGCCAGAGCCCCGCCGACCAGCAGCGACCCCGGCACCAACACCA
 CCACCGAGGACCACAAGATCATGGCCAGCGAGAACAGCAGCGCCATGGTGCAGGTGCACA
 GCCAGGGCCGCGAGGCCGCGTGAACACCTGACCACCTGGCCACCATCAGCACCAGCC
 CCCAGAGCCTGACCACCAAGCCCGGCCCGGCAACAGCACCCACCAACACCCCGGTACA
 AGCTGGACATCAGCGAGGCCACCCAGGTGGAGCAGCACCCCGCCGACCCGACAACGACA
 GCACCGCCAGCGACACCCCGAGCGCCACCCCGCCGCGGCCCGCCCAAGGCCGAGAACA
 CCAACACCAGCAAGAGCACCGACTTCTGGACCCCGCCACCACCAGCCCCAGAAC
 ACAGCGAGACCCCGGCAACAACAACACCACCACCAGGACACCGGCGAGGAGAGCGCCA
 GCAGCGCAAGCTGGGCTGATCACCAACACCATCGCCGGCGTGGCCGGCTGATCACCG
 GCGGCCCGCCAGCCGCGGAGGCCATCGTGAACGCCAGCCAAAGTGAACCCCAACC
 TGC ACTACTGGACCACCCAGGACGAGGGCGCCGATCGGCTGGCTGGATCCCC TACT
 TCGGCCCGCCGCGGAGGGCATCTACATCGAGGGCTGATGCACAACCAGGACGGCCTGA
 TCTGCGGCCCTGCGCCAGCTGGCCAACGAGACCACCCAGGCCCTGCAGCTGTTCTTCTGCGG
 CCACCACCGAGCTGCGCACCTTCAGCATCCTGAACCGCAAGGCCATCGACTTCTTCTGCTGC
 AGCGCTGGGGCGGCACCTGCCACATCCTGGGCCCGGACTGCTGCATCGAGCCCCACGACT
 GGACCAAGAACATCACCAGCAAGATCGACCAGATCATCCAGACTTCGTGGACAAGACCC
 TGCCCCGACCAGGGCGACAACGACAAC TGGTGGACCGGCTGGCGCCAGTGGATCCCCCGCG
 GCATCGGCGTGACCGGCGTGATCATCGCCGTGATCGCCCTGTTCTGCATCTGCAAGTTCG
 TGTTCTgtgactactggttcatgogccacggggggtggttccgccgtattttgaggagt
 cgaagggttacgagccgcccgtgcgcgatgggggttccccctaa cccggg
 SmaI

FIGURA 14. Progettazione *in silico* della ORF sintetica dell'EBOV GP. **A)** Sequenza amminoacidica della GP di EBOV/May e sequenza nucleotidica dedotta **B)**, con l'aggiunta di un peptide "tag" (gD 106, evidenziato in rosso), la sequenza di Kozak (KS, evidenziata in grigio), e i siti degli enzimi di restrizione (*SmaI* e *NheI*, evidenziati in giallo) indispensabili per il sub-clonaggio.

Generazione ed espressione della cassetta syEBOVgD106

La ORF sintetica syEBOVgD106, attraverso una doppia digestione *NheI/SmaI* usata per isolare il frammento di 2153 bp, è stata tagliata ed escissa dal plasmide commerciale pUC57syEBOVgD106 e sub-clonata nel vettore shuttle pINT2EGFP (Donofrio *et al.*, 2002), contenente una cassetta di espressione per l'EGFP, posta sotto il controllo trascrizionale del promotore del gene precoce del Citomegalovirus Umano (pCMV). La ORF dell'EGFP è stata sostituita dalla cassetta di espressione syEBOVgD106, tramite doppia digestione enzimatica con *NheI/SmaI* (Fig. 15).

Il risultante costrutto pINT2CMV-syEBOVgD106 presenta due sequenze di omologia per il gene della TK di BoHV-4 che fiancheggiano la cassetta di espressione CMV-syEBOVgD106, sottoposta al controllo trascrizionale del promotore di CMV e della sequenza di poliadenilazione dell'ormone della crescita bovina (Fig. 15 A).

L'espressione della proteina, associata al costrutto generato pINT2CMV-syEBOVgD106, è stata convalidata *in vitro* mediante un saggio di trasfezione transiente in cellule HEK 293T, seguito da immunoblot. Come auspicato, la glicoproteina syEBOVgD106 è stata molto ben espressa nelle cellule HEK 293T trasfettate col plasmide pINT2CMV-syEBOVgD106 (Fig. 16 B). Inoltre, la presenza di syEBOVgD106 è stata riscontrata anche nel sovranatante delle cellule trasfettate (Fig. 16 C,D; Fig. 17 A,B), come giustificato dalla scissione della GP di superficie ad opera dell'enzima cellulare della metalloproteasi TACE (TNF-enzima di conversione), un membro delle ADAM proteinasi (una disintegrina facente parte della famiglia delle metalloproteinasi) e furina (Escudero-Perez *et al.*, 2014; Dolnik *et al.*, 2015).

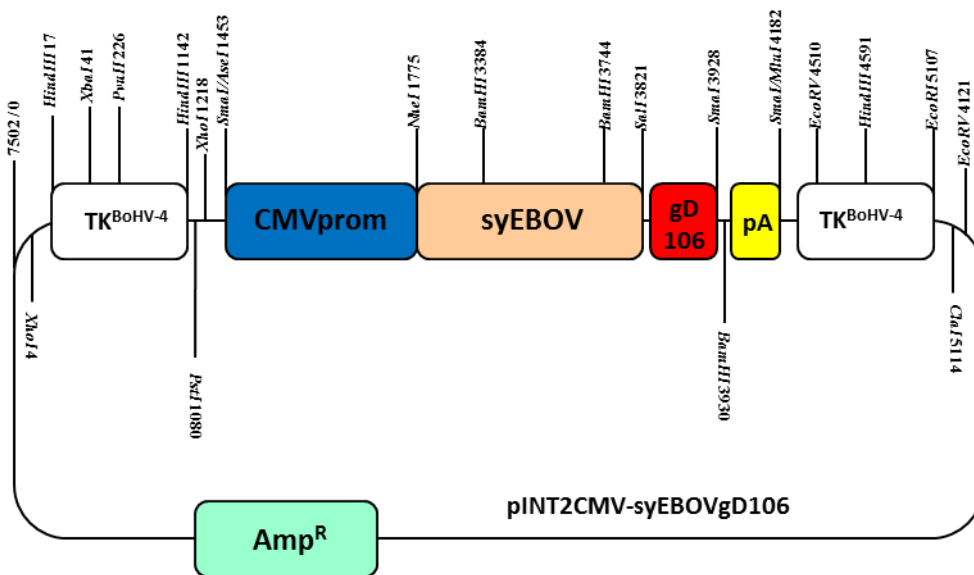


FIGURA 15. Diagramma (non in scala) del vettore pINT2CMV-syEBOVgD106. Sono indicati i siti di restrizione utilizzati per il sub-clonaggio (*NheI* 1775 bp e *SmaI* 4182 bp) e il marcatore di selezione ampicillina (Amp^R).

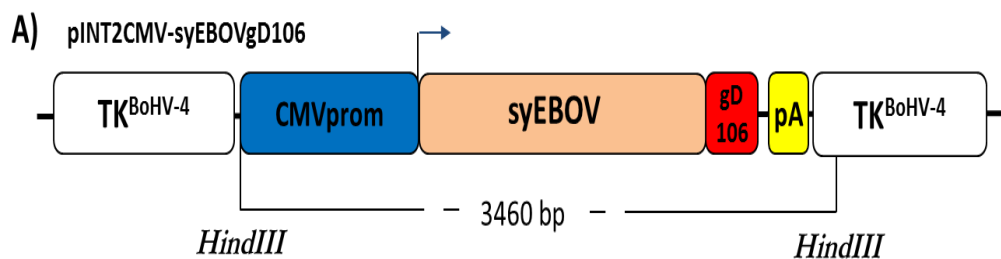


FIGURA 16 A. Diagramma (non in scala) del vettore utilizzato per il *retargeting*. pINT2CMV-syEBOVgD106 veicola la cassetta di espressione taggata, syEBOVgD106 ORF (syEBOV, arancio; gD106, rosso), sotto il controllo trascrizionale del promotore CMV (CMV, in blu) e del segnale di poliadenilazione dell'ormone della crescita bovina (PA, in giallo). La cassetta di espressione CMV-syEBOVgD106 è affiancata da due sequenze omologhe di TK (in bianco) del BoHV-4 TK.

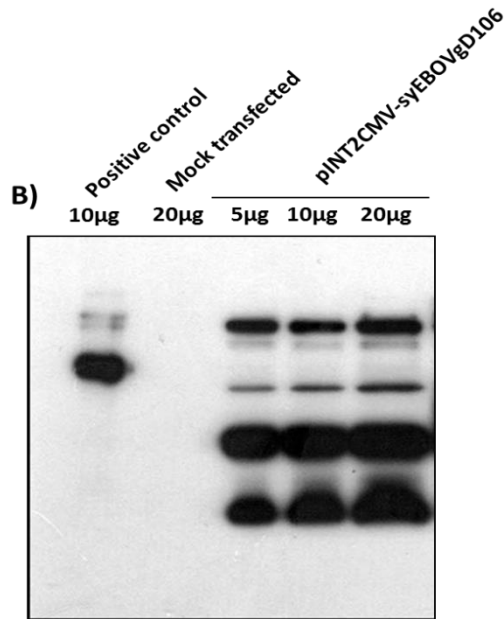


FIGURA 16 B. Immunoblotting degli estratti di cellule HEK 293T trasfettate con il pINT2CMV-syEBOVgD106. I pozzetti (*Lane*) sono stati caricati con diverse quantità di estratto proteico cellulare (5, 10 e 20 µg); le cellule trasfettate con il pEGFPC-1 sono state utilizzate come controllo negativo (Mock).

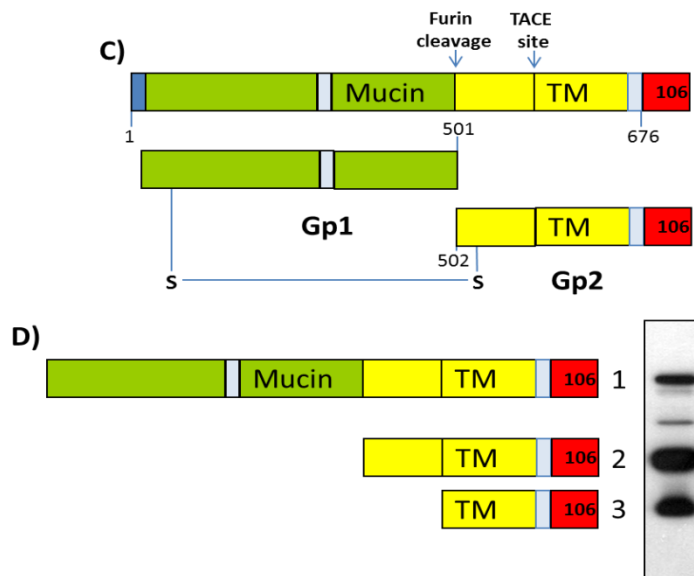


FIGURA 16 C, D. Il particolare pattern di bandeggio immunitario è il risultato dell'elaborazione proteica della syEBOVgD106 da parte della Furina e della proteasi TACE, come rivelato dall'anticorpo monoclonale anti-gD106 diretto contro i tre peptidi previsti e rilevati (1, non clivato; 2, clivato solo dalla proteasi Furina; 3, clivata dalle proteasi Furina e TACE).

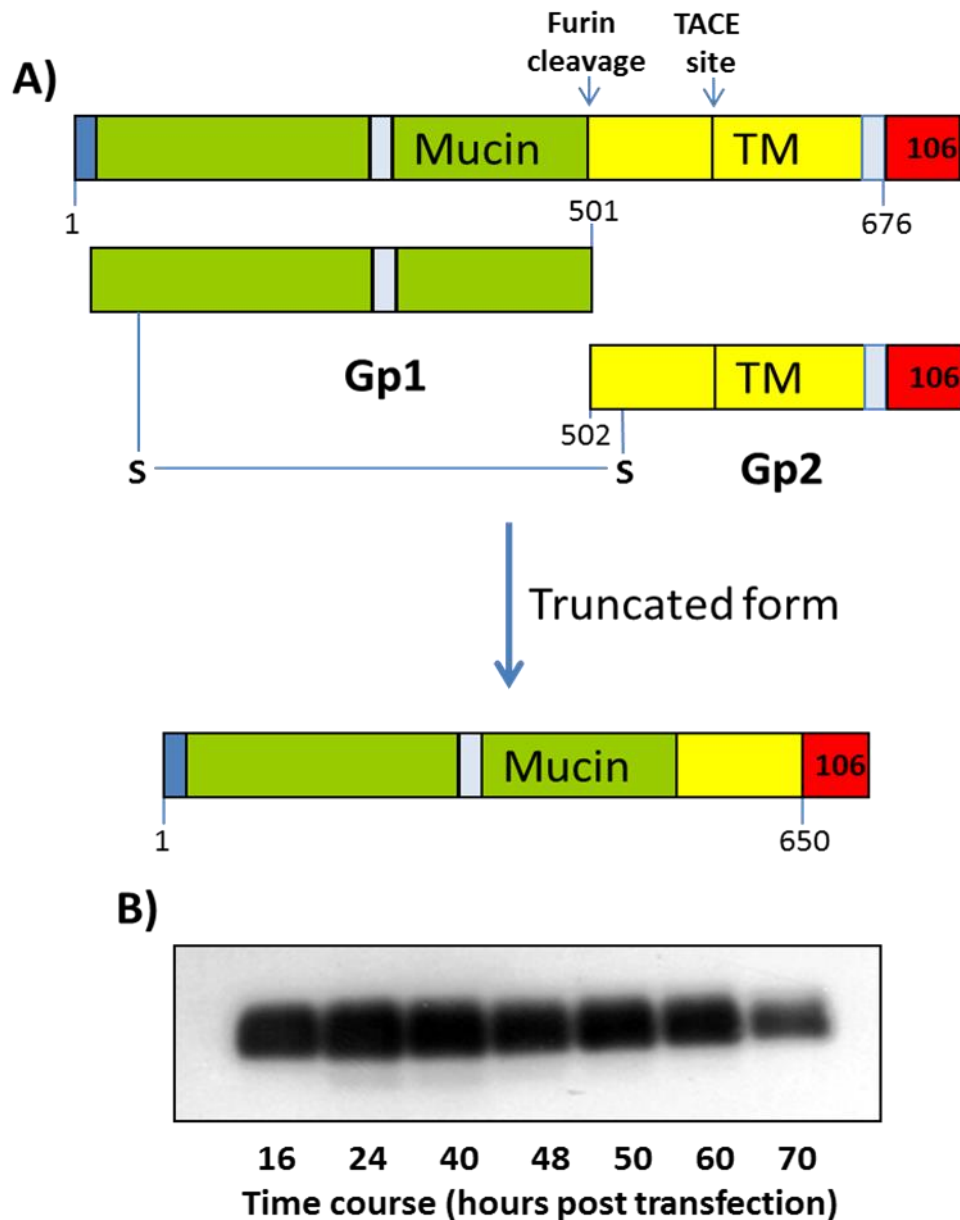


FIGURA 17. Strategia utilizzata per la clonazione e l'espressione dell'EBOV GP come forma secreta. **A)** Diagramma (non in scala) che mostra la struttura del tag gD106 (in rosso) della EBOV GP. L'EBOsecgD106 è stata ottenuta eliminando il dominio transmembrana (TM). Il peptide EBOsecgD106 è stato ottenuto raccogliendo il sovrantante delle cellule HEK 293T trasfettate con pCMVEBOsecgD106. **B)** *Time course* per valutare l'espressione della EBOsecgD106 nel sovrantante, a diversi tempi dalla trasfezione e analizzato mediante immunoblotting. Ventiquattro ore è stata considerata il miglior tempo dalla trasfezione per raccogliere il sovrantante delle cellule.

Ricombinazione della cassetta syEBOVgD106 nel vettore virale basato su

BoHV-4

In una prima fase di ricombinazione del BAC di BoHV-4, una cassetta di *targeting*, che veicola i geni per la resistenza alla kanamicina e la ORF della galattosidasi (*Galk*), è stata introdotta nel locus della TK di BoHV-4 attraverso ricombinazione omologa (Donofrio *et al.*, 2009; Kit *et al.*, 1986), generando il BAC-BoHV-4-A-KanaGalk Δ TK. L'integrità del gene TK non è fondamentale per il ciclo replicativo di BoHV-4, motivo per il quale tale gene è stato identificato come un possibile sito di ricombinazione per l'inserzione di DNA eterologo al fine della produzione di un vettore basato su BoHV-4 (Donofrio *et al.*, 2002).

A seguito, nella seconda fase di *retargeting*, il plasmide shuttle pINT2CMV-syEBOVgD106 è stato elettroporato nei batteri E. Coli SW102 contenenti il BAC-BoHV-4-A-KanaGalk Δ TK indotti dal calore e, attraverso il processo di ricombinazione omologa, il frammento Kana/Galk di 2650 bp è stato sostituito con quello proveniente dal plasmide shuttle pINT2CMV-syEBOVgD106 di 3449 bp, in precedenza linearizzato con *XhoI* (Fig. 18 A) per facilitare il processo di ricombinazione.

Dopo selezione negativa su piastre complementate con 2-deoxy-galactose (DOG), le colonie batteriche Kana/Galk negative sono state amplificate in terreni liquidi e il loro rispettivo BAC estratto e analizzato mediante l'enzima di restrizione *HindIII*. La stabilità del pBAC-BoHV-4-syEBOVgD106 Δ TK è stata valutata attraverso passaggi batterici seriali (oltre 20) e l'assenza di ricombinazione aberrante è stata rilevata mediante estrazione del BAC ad ogni passaggio e successiva digestione enzimatica (dati non mostrati). Per confermare ulteriormente i nostri risultati, è stato eseguito un Southern Blot utilizzando una specifica sonda di 1967 bp marcata con digossigenina diretta verso la ORF di EBOV GP (Fig. 18 B).

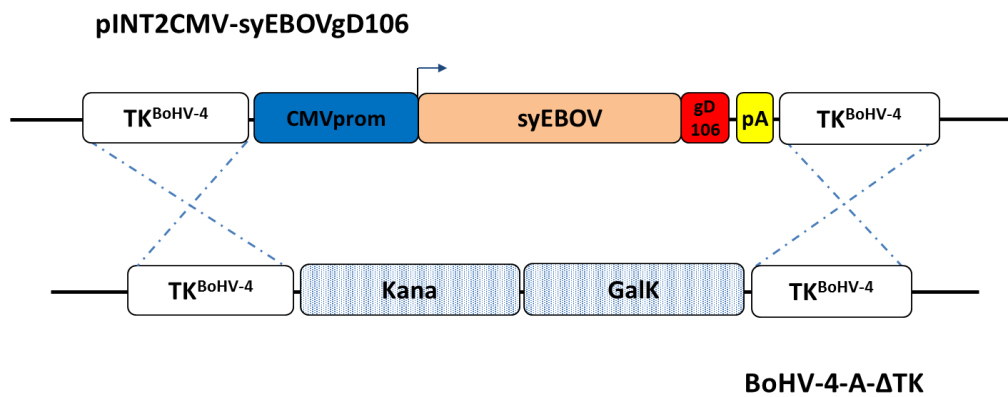


FIGURA 18 A. Diagramma (non in scala) che illustra l'evento di *retargeting* (la sostituzione della cassetta Kana/GalK con la cassetta CMV-syEBOVgD106) ottenuta mediante ricombinazione omologa indotta dal calore negli E. Coli SW102 contenenti il pBAC-BoHV-4-A-TK-KanaGalK-TK.

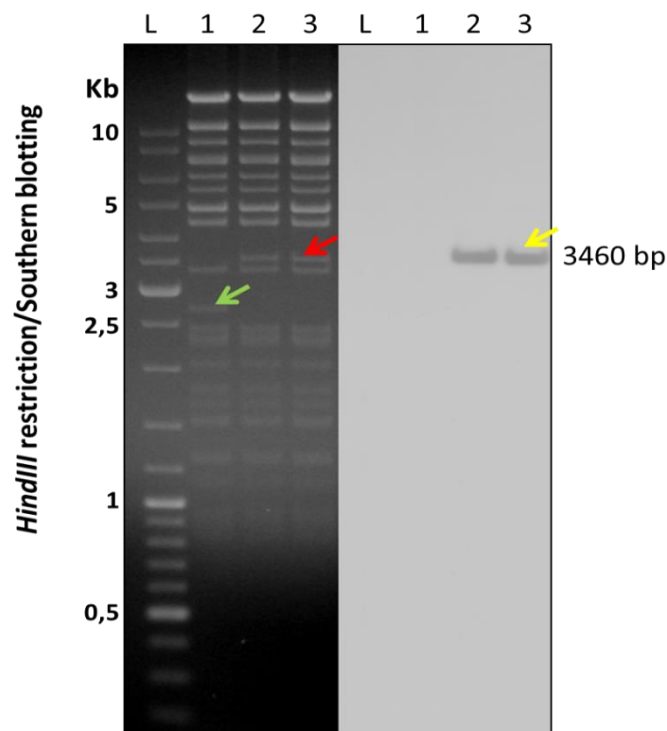


FIGURA 18 B. Rappresentazione delle colonie resistenti al 2-deoxy-galattosio, testate mediante digestione enzimatica utilizzando l'enzima *HindIII* e southern blotting eseguite con una sonda specifica per la ORF di syEBOVgD106. La banda di 2650 bp (indicata da una freccia verde) corrispondente al controllo di pBAC-BoHV-4-A-TK-KanaGalK-TK non ricombinato (corsia 1) che viene sostituita dalla banda di 3460 bp (indicata da una freccia rossa) nel pBAC-BoHV-4-syEBOVgD106ΔTK (corsie 2 e 3).

Ricostituzione del virus ricombinante BoHV-4-sEBOVgD106ΔTK e sua caratterizzazione

Le particelle virali infettive di BoHV-4-syEBOVgD106ΔTK sono state ottenute trasfettando, tramite elettroporazione, cellule BEK e cellule BEK esprimenti la proteina *cre ricombinasi* (BEK/cre), un'enzima in grado di escindere la cassetta del BAC associata al genoma di BoHV-4-sEBOVgD106ΔTK (Donofrio *et al.*, 2008).

In entrambi i casi, è stato generato il virus BoHV-4-syEBOVgD106 con produzione di un tipico CPE a placche caratteristiche del BoHV-4 *wild type*, anche se il BoHV-4-syEBOVgD106ΔTK prodotto nelle BEK/cre perde l'espressione dell'EGFP a causa della rimozione della cassetta di espressione per l'EGFP, che è associata al *back bone* del BAC (Fig. 19 A).

In seguito, le cinetiche di crescita virale di BoHV-4-syEBOVgD106ΔTK sono state confrontate con quelle del virus BoHV-4-A *wild type* e non sono state osservate differenze (Fig. 19 B).

Inoltre, le cellule infettate dal virus ricombinante BoHV-4-syEBOVgD106ΔTK sono state in grado di esprimere la GP di syEBOVgD106 (Fig. 19 C). Poiché l'EBOV GP è una tipica glicoproteina di membrana di tipo 1, è stata studiata la sua capacità di essere incorporata nei virioni maturi di BoHV-4. Una preparazione del virus è stata a tal fine purificata in gradiente di saccarosio e analizzata tramite immunoblotting (Fig. 19 D). Come previsto, il segnale EBOV GP è stato rilevato solo nei virioni BoHV-4-syEBOVgD106ΔTK, ma non nei virioni *wild type* di BoHV-4, indicando così l'avvenuta incorporazione della sequenza sintetica syEBOVgD106 e la sua espressione proteica nelle particelle di BoHV-4.

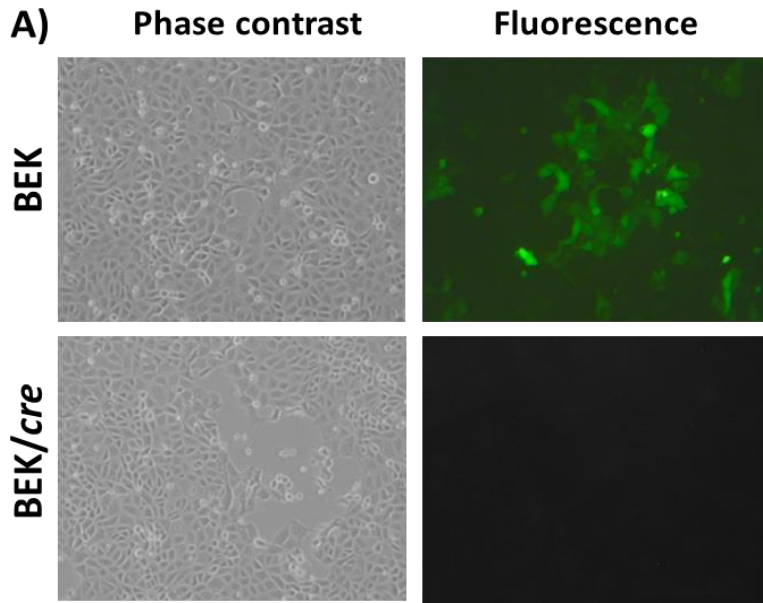


FIGURA 19 A. Immagini di microscopia in contrasto di fase e fluorescenza delle placche formatesi dalla ricostituzione del virus ricombinante BoHV-4-syEBOVgD106 Δ TK dopo elettroporazione dei cloni di DNA BAC in cellule BEK e BEKcre (ingrandimento, $\times 10$).

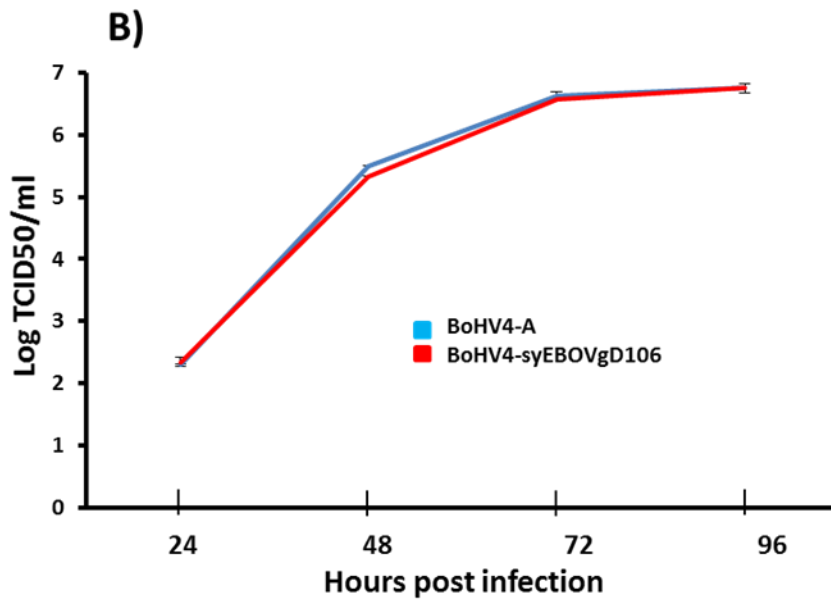


FIGURA 19 B. Tasso di replicazione del virus ricombinante BoHV-4-syEBOVgD106 Δ TK coltivato in cellule BEK e confrontato con il virus BoHV-4-A *wild type*. I dati riportati derivano dalla ripetizione degli esperimenti per tre volte e le medie rappresentate mostrano la barra dell'errore medio standard ($P > 0,05$ per tutti i *time-points*; test della *t* di Student).

C)

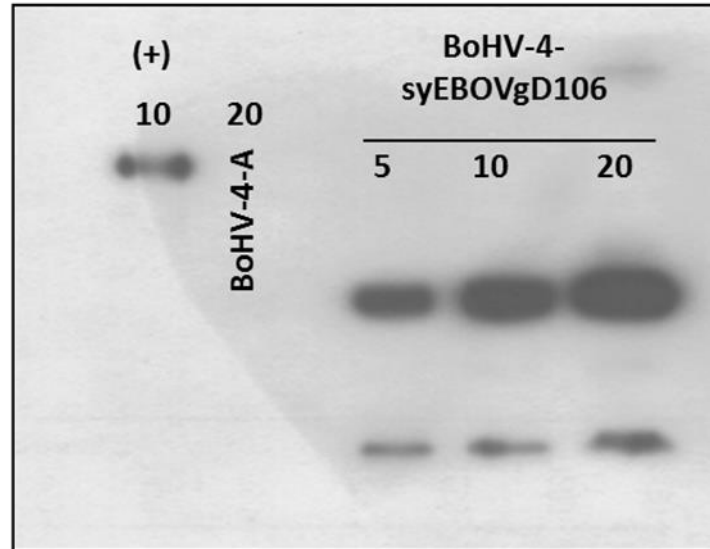


FIGURA 19 C. Immunoblotting condotto su estratti di cellule infettate con il BoHV-4-syEBOVgD106 Δ TK (i numeri indicano i microgrammi di estratto proteico caricato). Le cellule infettate con il BoHV-4-A sono state utilizzate come controllo negativo.

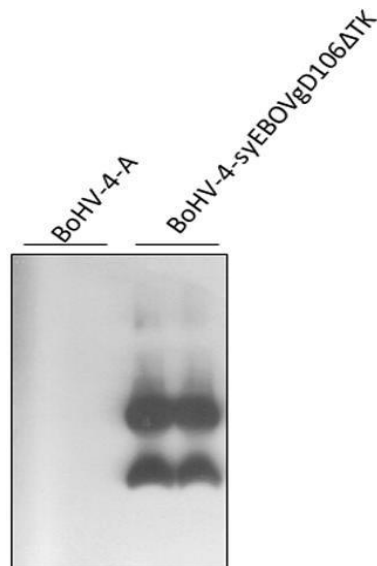


FIGURA 19 D. Incorporazione dell'EBOV GP nelle particelle di BoHV-4 ricombinanti. Estratti di virus purificati (BoHV-4-A e BoHV-4-syEBOVgD106) e analizzati mediante immunoblotting.

Immunizzazione delle capre e analisi della risposta immunitaria di tipo umorale

Per testare la capacità di BoHV-4-syEBOVgD106ΔTK ad indurre una risposta immunitaria umorale in un modello animale come le capre, è stato condotto uno studio di vaccinazione pilota su animali adulti. In accordo con l'attuale legislazione sulla sperimentazione animale, che suggerisce di ridurre al minimo il numero di animali impiegati, dopo la raccolta del siero pre-immune, tre capre sono state inoculate per via sottocutanea con 1 ml contenente 10^6 TCID₅₀ di BoHV-4-syEBOVgD106ΔTK. Una seconda inoculazione con una dose identica di BoHV-4-syEBOVgD106ΔTK è stata eseguita due settimane dopo la prima inoculazione. I campioni di sangue sono stati raccolti a due settimane, poco prima del secondo inoculo e a cinque settimane dal primo inoculo (**Fig. 20 A**). I campioni di siero sono stati analizzati mediante test ELISA e tutte e tre le capre hanno sviluppato una buona risposta anticorpale, producendo elevati titoli anticorpali (**Fig. 20 B, C**). Come descritto in un precedente studio in cui è stato utilizzato un vaccino basato su BoHV-4 nelle capre ([Donofrio et al., 2013](#)), una singola dose di BoHV-4-syEBOVgD106ΔTK è stata in grado di generare una risposta immunitaria umorale due settimane dopo l'inoculazione. Inoltre, il titolo anticorpale non è diminuito quando è stato valutato sei mesi dopo l'inoculo del virus ricombinante (dati non mostrati), mostrando un'immunizzazione di lunga durata.

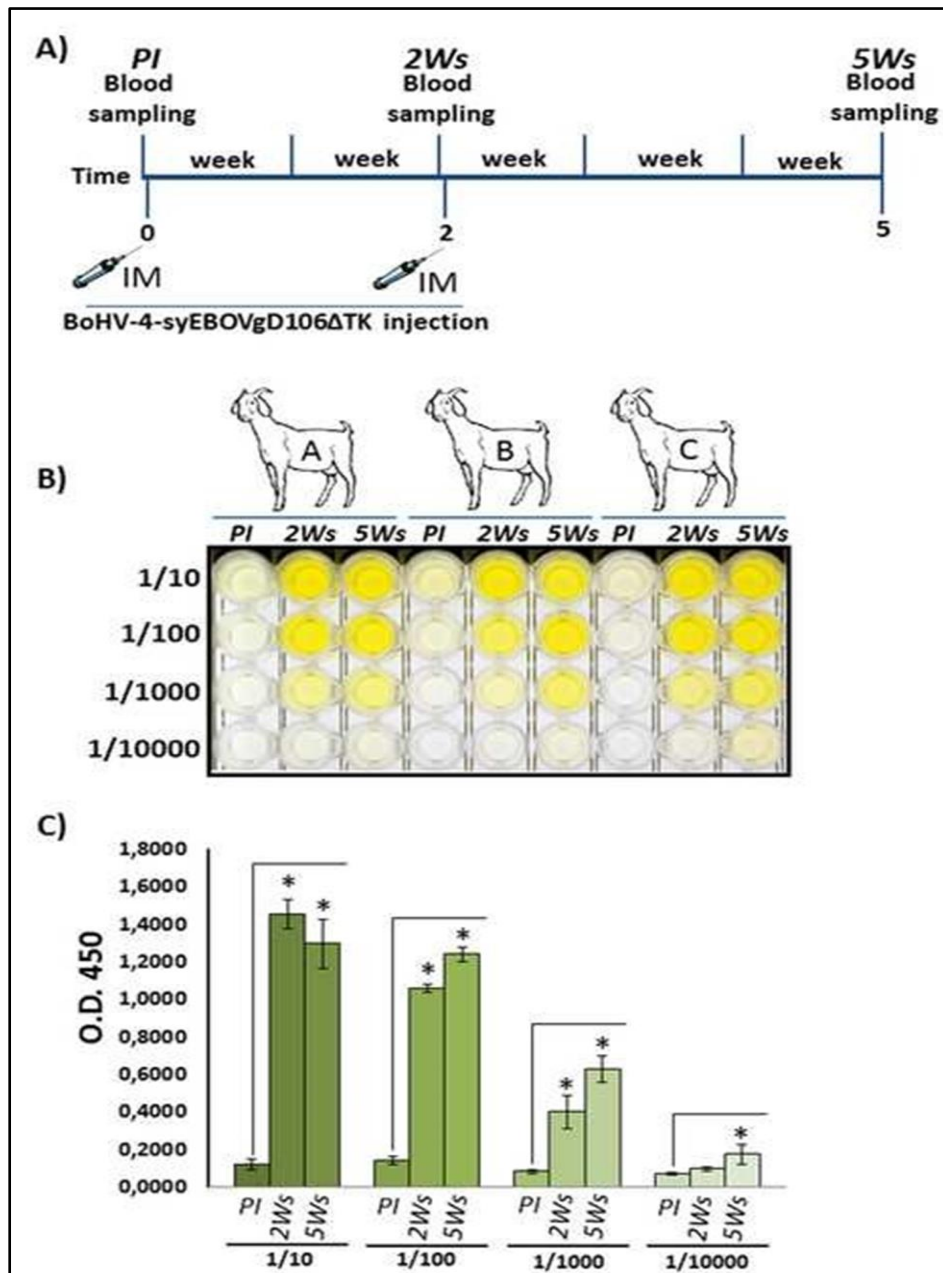


FIGURA 20. Cinetica della risposta immunitaria umorale delle capre immunizzate con BoHV-4-syEBOVgD106ΔTK. **A)** Nel diagramma è mostrato lo schema di vaccinazione e di campionamento del sangue delle capre. **B)** I sieri sono stati diluiti (1/10, 1/100, 1/1.000 e 1/10.000) e raccolti a due e a cinque settimane (2 W, 5 W) da tre capre inoculate con BoHV-4-syEBOVgD106ΔTK (A, B e C). I risultati dei due prelievi sono stati confrontati con i sieri pre-immuni (PI) raccolti, e analizzati attraverso un saggio ELISA per gli anticorpi anti-GP. **C)** Gli anticorpi rilevati sono stati espressi come densità ottica a 450 nm e ogni valore rappresenta la risposta media dei tre sieri di capra, \pm la media dell'errore standard, alla stessa diluizione e raccolti allo stesso tempo. Le differenze di risposta tra i sieri pre e post-immuni sono stati misurati con il test della t di Student (* $P \leq 0.005$).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

In questo studio è stato dimostrato come BoHV-4 possa essere utilizzato come un vettore vaccinale efficace e sicuro, nella produzione di un antigene virale proveniente da EBOV. È stata, infatti, generata una piattaforma vaccinale basata su BoHV-4, in grado di trasportare la sequenza completa di un antigene di un patogeno che normalmente richiede un BSL-4, evitando tutti i requisiti di sicurezza ed economici necessari per la manipolazione di questi tipi di patogeni. Inoltre, la piattaforma vaccinale generata è stata in grado di indurre negli animali immunizzati una forte risposta anticorpale di tipo umorale. Questi risultati sono stati ottenuti partendo da un approccio di tipo sintetico, basato sulla sintesi del DNA in fase solida, che consente il clonaggio completo di una molecola di DNA a doppio filamento senza limiti nella sequenza e nel numero di nucleotidi.

Come modello è stato scelto EBOV per diversi motivi: innanzitutto, perché si è verificata nel corso del 2014-2015 un'epidemia della malattia in Africa occidentale, momento in cui non era ancora disponibile un vaccino affidabile e l'unica possibilità di prevenire la malattia era la rigida osservanza delle norme di profilassi sanitaria previste nei confronti di questa particolare sindrome morbosa. In aggiunta, EBOV è stato classificato dal *National Institute of Allergy and Infectious Diseases* (NIAID), insieme al vaiolo, il virus di Marburg e la dengue, come un agente patogeno di Categoria A e dal CDC come un possibile agente di bioterrorismo.

Per le malattie infettive per le quali non è disponibile alcun trattamento, l'immunizzazione attiva rappresenta la più importante ed efficace misura di prevenzione. Tuttavia, per tali generi di malattie, come nel caso dell'EVD, in cui le epidemie sono geograficamente e temporaneamente imprevedibili e sporadiche, è quasi impossibile identificare una popolazione ad alto rischio sulla quale testare un vaccino in un breve periodo.

EBOV appartiene all'ordine dei *Mononegavirales*, famiglia *Filoviridae*; il suo genoma è costituito da una molecola lineare di RNA monocatenario a polarità negativa che codifica per sette proteine strutturali, tra le quali la GP di superficie che rappresenta l'unità peptidica responsabile dell'adsorbimento del virus alla cellula. Le indagini biochimiche hanno rivelato, inoltre, che l'EBOV GP appartiene alla categoria delle proteine transmembrana di tipo I e presenta una sequenza codificante per 676 aminoacidi, derivante da un trascritto che subisce particolari modifiche trascrizionali (Volchkov *et al.*, 1995). È stato dimostrato come l'intera sequenza di EBOV GP sia responsabile dell'induzione di una risposta immunitaria umorale protettiva nei soggetti infetti (Mire *et al.*, 2015). Oltre alle proteine strutturali, i filovirus, limitatamente al genere *Ebolavirus*, sintetizzano anche una proteina non strutturale (sGP) che s'identifica come una glicoproteina di ridotte dimensioni, generata dal clivaggio della GP di superficie per opera della metalloproteasi cellulare denominata TACE (enzima convertitore il TNF-alfa) (Escudero-Perez *et al.*, 2014).

L'intera sequenza sintetica della ORF della GP è stata dapprima espressa con successo in cellule eucariotiche con l'uso di un opportuno vettore di espressione e poi integrata nel genoma del BAC di BoHV-4 tramite ricombinazione omologa. Il risultante virus ricombinante BoHV-4-syEBOVgD106ΔTK mostra una cinetica di replicazione nelle colture cellulari identica al virus di campo, dimostrando come l'inserimento di DNA estraneo all'interno del genoma del BoHV-4 *wild type* non vada ad interferire con la replicazione virale. Nonostante l'ospite naturale di BoHV-4 sia tradizionalmente considerato il bovino, il virus è stato isolato anche da altri ruminanti come lo zebù (*Bos indicus*), il bisonte americano (*Bison bison*), i bufali africani (*Syncerus caffer*) e le pecore. Come altri herpesvirus, BoHV-4 è in grado di stabilire infezioni persistenti nelle cellule della linea monocito/macrofagica (Osorio *et al.*, 1982; 1985) e in una linea cellulare di macrofagi bovini (BoMAC) (Donofrio and van Santen, 2001). Inoltre, l'inoculazione sperimentale di BoHV-4 nel coniglio ha

dimostrato come i macrofagi e la milza siano il sito principale della persistenza virale (Lopez *et al.*, 1996). A causa della mancanza di una correlazione diretta tra l'infezione da BoHV-4 e la comparsa di lesioni o patologie specifiche, BoHV-4 non è considerato un agente patogeno primario e il suo genoma è stato, dunque, clonato come BAC e sfruttato come un vettore in grado di veicolare geni eterologhi per scopi d'immunizzazione e oncolisi. BoHV-4 ricombinanti veicolanti antigeni eterologhi sono stati ampiamente utilizzati per immunizzare topi (Franceschi *et al.*, 2011), ratti (Donofrio *et al.*, 2006), conigli (Donofrio *et al.*, 2009), pecore (Donofrio *et al.*, 2013), suini (Donofrio *et al.*, 2011), vacche (Donofrio *et al.*, 2007) e capre (Donofrio *et al.*, 2013) senza dare segni clinici associati o patologie evidenti correlate all'inoculazione. Sebbene le capre non siano suscettibili all'infezione da EBOV, l'immunizzazione di BoHV-4-syEBOVgD106ΔTK è stata eseguita in capre adulte poiché si sono rivelate un modello animale adeguato per l'immunizzazione con tale vettore (Donofrio *et al.*, 2013). Inoltre, le capre possono essere sfruttate come fonte di produzione di anticorpi per scopi terapeutici nel trattamento post-esposizione della malattia di EBOV.

Studi pubblicati di recente hanno testato la validità di una terapia con anticorpi policlonali di ovino (pAb) nei confronti dell'EVD (Dowall *et al.*, 2016a; 2016b). Dowall e coll. hanno dimostrato l'efficacia protettiva nei guinea pig (*Cavia porcellus*) e nei NHPs (Dowall *et al.*, 2017), che sono in grado di riprodurre le caratteristiche lesioni e il peculiare tropismo virale di EBOV (Reynolds and Marzi, 2017). Questi risultati sono importanti poiché i pAb ovini conferiscono diversi vantaggi rispetto alle terapie a base di anticorpi monoclonali (mAb): (i) i costi di produzione sono bassi (Kelley, 2009) e, poiché l'EVD si verifica prevalentemente in aree in via di sviluppo, il costo dei trattamenti è una caratteristica importante per terapie che si dimostrano efficaci; (ii) i pAb sono costituiti da una serie di anticorpi che coprono una varietà di epitopi e questo riduce il rischio di mutanti di EBOV, la cui comparsa è possibile quando si

utilizzano terapie a base di mAb (Qiu *et al.*, 2012); (iii) i pAb possono essere prodotti rapidamente in meno di sei mesi (Dowall *et al.*, 2016); (iiii) le preparazioni a base di pAb sono da tempo utilizzate in Africa nella sieroprofilassi dei morsi di serpenti, come ad esempio l'EchiTab utilizzato per trattare più di 40.000 persone, ed è una delle terapie, adesso disponibili, più efficaci e meno costose. (Habib *et al.*, 2013). Dunque, per queste motivazioni un trattamento post-esposizione per EBOV con pAb ovini sarebbe vantaggioso.

La somministrazione sottocutanea del vettore BoHV-4 è stata dimostrata facilitare la produzione di antigeni, nonostante la replicazione virale avvenga solo nel sito d'inoculo (Donofrio *et al.*, 2013), senza diffondersi al resto dell'organismo. Infatti, i virus ricombinanti BoHV-4-A-gDcp-gD106ΔTK (esprimente la gD caprina di CpHV-1 e una frazione antigenica della gD di BoHV-1) e BoHV-4-CMV-IgK-gE2gD-TM (esprimenti la gE2 di BVBV e la gD di BoHV-1), utilizzati per la vaccinazione delle capre, non sono stati isolati né dal sangue e neppure dai liquidi secreti dagli animali inoculati (Donofrio *et al.*, 2013). Negli animali inoculati non è stata, infatti, rilevata alcuna viremia da BoHV-4-syEBOVgD106ΔTK (dati non mostrati), anche se tutti gli animali vaccinati sono stati immunizzati con successo e sono stati rilevati alti titoli anticorpali verso l'EBOV GP.

In studi precedenti effettuati su diversi modelli animali, il titolo anticorpale minimo nei confronti dell'EBOV GP, determinato mediante ELISA, associato ad un elevato livello di protezione immunitaria, è stato di 1:3.700, (Sullivan *et al.*, 2009). In questo scenario, i titoli specifici di anticorpi verso EBOV GP, ottenuti dopo vaccinazione sperimentale in diversi animali, rappresentano un buon indicatore per prevedere l'efficacia di un vaccino sperimentale (Sobarzo *et al.*, 2012; Sullivan *et al.*, 2009). La capacità di BoHV-4-syEBOVgD106ΔTK di trasdurre in modo efficiente le cellule cutanee di capra, esprimenti la proteina GP in grandi quantità, è coerente con il titolo degli anticorpi determinato attraverso il test ELISA (Donofrio *et al.*, 2013). Non è

stata, comunque, dimostrata l'efficacia di tale vettore virale in un appropriato modello animale per EBOV. Infatti, non è stato dimostrato come l'immunizzazione passiva, mediante anticorpi prodotti in capre immunizzate con il virus ricombinante BoHV-4syEBOVgD106ΔTK, producesse realmente una protezione contro l'EVD. Tuttavia, sulla base di studi precedenti che hanno dimostrato la capacità dei vettori basati su BoHV-4 di proteggere efficacemente contro un agente di Categoria A, quale il virus Monkeypox ([Franceschi et al., 2015](#)), si può supporre che l'uso della piattaforma generata, basata su BoHV-4, possa rappresentare uno strumento efficace per testare antigeni sconosciuti di patogeni di classe A. In questo studio è stata dimostrata la possibilità di generare un vettore BoHV-4 ricombinante, basato su un antigene immunodominante di EBOV, in grado di produrre un'adeguata risposta anticorpale nelle capre immunizzate.

BIBLIOGRAFIA

1. ACKERMANN M, (2006). *Pathogenesis of Gammaherpesvirus infections*. Vet Microbiol 113(3-4): 211-222.
2. ALVAREZ CP, LASALA F, CARRILLO J, MUNIZ O, CORBI AL, et al. (2002). *C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN mediate cellular entry by Ebola virus in cis and in trans*. J Virol 76(13): 6841-6844.
3. ARNOLD N, SEIBL R, KESSLER C, WIENBERG J, (1992). *Nonradioactive in situ hybridization with digoxigenin labeled DNA probes*. Biotech Histochem 67(2) pp. 59-62.
4. ASANO A, INOSHIMA Y, MURAKAMI K, IKETANI Y, YAMAMOTO Y, et al. (2003). *Latency and persistence of bovine herpesvirus type 4, strain B11-41, in bovine nervous tissues*. J Vet Med Sci. 65(1):87-93.
5. BARTHA A, JUHASZ M, LIEBERMANN H, (1966). *Isolation of a bovine herpesvirus from calves with respiratory disease and keratoconjunctivitis. A preliminary report*. Acta Vet Acad Sci Hung 16(3): 357-358.
6. BARTHA A, FADOL AM, LIEBERMANN H, LUDWIG H, MOHANTY SB, et al. (1987). *Problems concerning the taxonomy of the 'Movar-type' bovine herpesviruses*. Intervirology. 28(1):1-7.
7. BASELER L, CHERTOW DS, JOHNSON KM, FELDMANN H, MORENS DM, (2017). *The Pathogenesis of Ebola Virus Disease*. Annu Rev Pathol. 24;12:387-418.
8. BASLER CF, (2015). *Innate immune evasion by filoviruses*. Virology 479–80:122–30.
9. BERMUDEZ-CRUZ R, ZHANG L, VAN SANTEN VL, (1997). *Characterization of an abundant, unique 1.7-kilobase bovine herpesvirus 4 (BHV-4) late RNA and mapping of a BHV-4 IE2 transactivator-binding site in its promoter-regulatory region*. J Virol. 71(1):527-38.
10. BOERNER B, WEIGELT W, BUHK HJ, CASTRUCCI G, LUDWIG H, (1999). *A sensitive and specific PCR/Southern blot assay for detection of bovine herpesvirus 4 in calves infected experimentally*. J Virol Methods 83(1-2): 169-180.
11. BRECHER M, SCHORNBERG KL, DELOS SE, FUSCO ML, SAPHIRE EO, et al. (2012). *Cathepsin cleavage potentiates the Ebola virus glycoprotein to undergo a subsequent fusion-relevant conformational change*. J Virol 86(1): 364-372.
12. BRÈS P, (1978). *The epidemic of Ebola haemorrhagic fever in Sudan and Zaire, 1976: introductory note*. Bull World Health Organ.;56(2):245.
13. BROLL H, BUHK HJ, ZIMMERMANN W, GOLTZ M, (1999). *Structure and function of the prDNA and the genomic termini of the gamma2-herpesvirus bovine herpesvirus type 4*. J Gen Virol 80(Pt 4): 979-986.
14. BUBLLOT M, VAN BRESSEM MF, THIRY E, DUBUISSON J, PASTORET PP, (1990). *Bovine herpesvirus 4 genome: cloning, mapping and strain variation analysis*. J Gen Virol. 71 (Pt 1):133-42.
15. BUBLLOT M, DUBUISSON J, VAN BRESSEM MF, DANYI S, PASTORET PP, THIRY E, (1991). *Antigenic and genomic identity between simian herpesvirus aotus type 2 and bovine herpesvirus type 4*. J Gen Virol. 72 (Pt 3):715-9.
16. BUBLLOT M, LOMONTE P, LEQUARRE AS, ALBRECHT JC, NICHOLAS J, et al. (1992). *Genetic relationships between bovine herpesvirus 4 and the Gammaherpesviruses Epstein-Barr virus and herpesvirus saimiri*. Virology 190(2): 654-665.
17. BUKREYEV A, ROLLIN PE, TATE MK, YANG L, ZAKI SR, et al. (2007). *Successful topical respiratory tract immunization of primates against Ebola virus*. J Virol 81(12): 6379-6388.
18. BUKREYEV A, MARZI A, FELDMANN F, ZHANG L, YANG L, et al. (2009). *Chimeric human parainfluenza virus bearing the Ebola virus glycoprotein as the sole surface protein is immunogenic and highly protective against Ebola virus challenge*. Virology 383(2): 348-361.
19. BURK R, BOLLINGER L, JOHNSON JC, WADA J, RADOSHITZKY SR, et al. (2016). *Neglected filoviruses*. FEMS Microbiol. Rev. 40:1–26.
20. BURKE J, DECLERQ R, GHYSEBRECHTS G, PATTYN S, PIOT P, et al. (1978). *EBOLA HEMORRHAGIC-FEVER IN ZAIRE, 1976-REPORT OF AN INTERNATIONAL-COMMISSION*. Bulletin of the World Health Organization 56(2): 271-293.
21. BWAKA MA, BONNET MJ, CALAIN P, COLEBUNDERS R, DE ROO A, et al. (1999). *Ebola hemorrhagic fever in Kikwit, Democratic Republic of the Congo: clinical observations in 103 patients*. J Infect Dis. 179 Suppl 1:S1-7.
22. CÁRDENAS WB, LOO YM, GALE M JR, HARTMAN AL, KIMBERLIN CR, et al. (2006). *Ebola virus VP35 protein binds double-stranded RNA and inhibits alpha/beta interferon production induced by RIG-I signaling*. J Virol. 80(11):5168-78.
23. CAPOCEFALO A, FRANCESCHI V, MERTENS PP, CASTILLO-OLIVARES J, CAVIRANI S, et al. (2010). *Expression and secretion of*

- Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8)VP2 outer capsid protein by mammalian cells. J Virol Methods 169(2): 420-424.*
24. **CAPOCEFALO A, MANGIA C, FRANCESCHI V, JACCA S, VAN SANTEN VL, et al. (2013).** *Efficient heterologous antigen gene delivery and expression by a replication-attenuated BoHV-4-based vaccine vector. Vaccine. 31(37):3906-14.*
 25. **CASTRUCCI G, FRIGERI F, FERRARI M, PEDINI B, ALDROVANDI V, et al. (1987).** *Reactivation in calves of latent infection by Bovid herpesvirus-4. Microbiologica. 10(1):37-45.*
 26. **CENT. DIS. CONTROL PREV. MMWR Ebola Reports.**
https://www.cdc.gov/mmwr/ebola_report_s.html.
 27. **CHANDRAN K, SULLIVAN NJ, FELBOR U, WHELAN SP, CUNNINGHAM JM, (2005).** *Endosomal proteolysis of the Ebola virus glycoprotein is necessary for infection. Science. 308(5728):1643-5. Epub 2005 Apr 14.*
 28. **CHANG LY, VAN SANTEN VL, (1992).** *Immediate-early, early, and late RNAs in bovine herpesvirus-4-infected cells. Virology. 191(2):909-20.*
 29. **CHERTOW DS, KLEINE C, EDWARDS JK, SCAINI R, GIULIANI R, et al. (2014).** *Ebola virus disease in West Africa—clinical manifestations and management. N. Engl. J. Med. 371:2054–57.*
 30. **CHERTOW DS, NATH A, SUFFREDINI AF, DANNER RL, REICH DS, et al. (2016).** *Severe Meningoencephalitis in a Case of Ebola Virus Disease: A Case Report. Ann Intern Med. 165(4):301-4.*
 31. **COLLINS CM, MEDVECZKY MM, LUND T, MEDVECZKY PG, (2002).** *The terminal repeats and latency-associated nuclear antigen of herpesvirus saimiri are essential for episomal persistence of the viral genome. J Gen Virol. 83(Pt 9):2269-78.*
 32. **DAVIS KJ, ANDERSON AO, GEISBERT TW, STEELE KE, GEISBERT JB, et al. (1997).** *Pathology of experimental Ebola virus infection in African green monkeys. Involvement of fibroblastic reticular cells. Arch Pathol Lab Med. 121(8):805-19.*
 33. **DEIM Z, SZEREDI L, EGYED L, (2007).** *Detection of bovine herpesvirus 4 DNA in aborted bovine fetuses. Can J Vet Res. 71(3):226-9.*
 34. **DENG I, DUKU O, GILLO A, IDRIS A, LOLIK P, et al. (1978).** *EBOLA HEMORRHAGIC-FEVER IN SUDAN, 1976-REPORT OF A WHO INTERNATIONAL STUDY TEAM. Bulletin of the World Health Organization 56(2): 247-270.*
 35. **DE SANTIS O, AUDRAN R, POTHIN E, WARPELIN-DECRAUSAZ L, VALLOTTON L, et al. (2016).** *Safety and immunogenicity of a chimpanzee adenovirus-vectored Ebola vaccine in healthy adults: a randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-finding, phase 1/2a study. Lancet Infect Dis. 16(3):311-20.*
 36. **DEWALS B, THIRION M, MARKINE-GORAYNOFF N, GILLET L, DE FAYS K, et al. (2006).** *Evolution of Bovine herpesvirus 4: recombination and transmission between African buffalo and cattle. J Gen Virol. 87(Pt 6):1509-19.*
 37. **DOLNIK O, VOLCHKOVA V, GARTEN W, CARBONNELLE C, BECKER S, et al. (2004).** *Ectodomain shedding of the glycoprotein GP of Ebola virus. EMBO J. 23(10):2175-84.*
 38. **DOLNIK O, VOLCHKOVA VA, ESCUDERO-PEREZ B, LAWRENCE P, KLENK HD, et al. (2015).** *Shedding of Ebola Virus Surface Glycoprotein Is a Mechanism of Self-regulation of Cellular Cytotoxicity and Has a Direct Effect on Virus Infectivity. Journal of Infectious Diseases 212 Suppl 2: S322-328.*
 39. **DONOFRIO G, CAVIRANI S, VAN SANTEN VL, (2000).** *Establishment of a cell line persistently infected with bovine herpesvirus-4 by use of a recombinant virus. J Gen Virol 81(Pt 7): 1807-1814.*
 40. **DONOFRIO G, VAN SANTEN VL, (2001).** *A bovine macrophage cell line supports bovine herpesvirus-4 persistent infection. J Gen Virol 82(Pt 5): 1181-1185.*
 41. **DONOFRIO G, CAVIRANI S, SIMONE T, VAN SANTEN VL, (2002).** *Potential of bovine herpesvirus 4 as a gene delivery vector. J Virol Methods 101(1-2): 49-61.*
 42. **DONOFRIO G, CAVIRANI S, TADDEI S, FLAMMINI CF, (2004).** *Activation of bovine herpesvirus 4 lytic replication in a non-permissive cell line by overexpression of BoHV-4 immediate early (IE) 2 gene. J Virol Methods. 116(2):203-7.*
 43. **DONOFRIO G, CAVIRANI S, VAN SANTEN V, FLAMMINI CF, (2005).** *Potential secondary pathogenic role for bovine herpesvirus 4. J Clin Microbiol 43(7): 3421-3426.*
 44. **DONOFRIO G, SARTORI C, RAVANETTI L, CAVIRANI S, GILLET L, et al. (2007).** *Establishment of a bovine herpesvirus 4 based vector expressing a secreted form of the bovine viral diarrhoea virus structural glycoprotein E2 for immunization purposes. BMC Biotechnol 7: 68.*
 45. **DONOFRIO G, MANAROLLA G, RAVANETTI L, SIRONI G, CAVIRANI S, et al. (2008).** *Assessment of bovine herpesvirus 4 based vector in chicken. J Virol Methods. 148(1-2):303-6.*
 46. **DONOFRIO G, SARTORI C, FRANCESCHI V, CAPOCEFALO A, CAVIRANI S, et al. (2008).**

- Double immunization strategy with a BoHV-4-vectorialized secreted chimeric peptide BVDV-E2/BoHV-1-gD. Vaccine* 26(48): 6031-6042.
47. DONOFRIO G, FRANCESCHI V, CAPOCEFALO A, TADDEI S, SARTORI C, et al. (2009). Cellular targeting of engineered heterologous anti-gens is a determinant factor for bovine herpesvirus 4-based vaccine vector development. *Clin Vaccine Immunol* 16(11): 1675-1686.
 48. DONOFRIO G, TADDEI S, FRANCESCHI V, CAPOCEFALO A, CAVIRANI S, et al. (2011). Swine adipose stromal cells loaded with recombinant bovine herpesvirus 4 virions expressing a foreign antigen induce potent humoral immune responses in pigs. *Vaccine* 29(5): 867-872.
 49. DONOFRIO G, FRANCESCHI V, LOVERO A, CAPOCEFALO A, CAMERO M, et al. (2013). Clinical protection of goats against CpHV-1 induced genital disease with a BoHV-4-based vector expressing CpHV-1 gD. *PLoS One* 8(1): e52758.
 50. DOWALL SD, CALLAN J, ZELTINA A, AL-ABDULLA I, STRECKER T, et al. (2016a). Development of a Cost-effective Ovine Polyclonal Antibody-Based Product, EBOTAb, to Treat Ebola Virus Infection. *J Infect Dis.* 213(7):1124-33.
 51. DOWALL SD, BOSWORTH A, RAYNER E, TAYLOR I, LANDON J, et al. (2016b). Post-exposure treatment of Ebola virus disease in guinea pigs using EBOTAb, an ovine antibody-based therapeutic. *Sci Rep.* 28;6:30497.
 52. DOWALL SD, JACQUOT F, LANDON J, RAYNER E, HALL G, et al. (2017). Post-exposure treatment of non-human primates lethally infected with Ebola virus with EBOTAb, a purified ovine IgG product. *Sci Rep.* 7(1):4099.
 53. DUBE D, BRECHER MB, DELOS SE, ROSE SC, PARK EW, et al. (2009). The primed ebolavirus glycoprotein (19-kilodalton GP1,2): sequence and residues critical for host cell binding. *J Virol.* 83(7):2883-91.
 54. DUBUISSON J, THIRY E, BUBLLOT M, THOMAS I, VAN BRESSEM MF, et al. (1989). Experimental infection of bulls with a genital isolate of bovine herpesvirus-4 and reactivation of latent virus with dexamethasone. *Vet Microbiol.* 21(2):97-114.
 55. DUBUISSON J, THIRY E, BUBLLOT M, SNEYERS M, BOULANGER D, et al. (1989). Production and characterization of monoclonal antibodies to bovid herpesvirus-4. *Vet Microbiol.* 19(4):305-15.
 56. DUBUISSON J, BUBLLOT M, WELLEMANS G, PASTORET PP, THIRY E, (1991). Bovine herpesvirus 4 isolates: a comparison of three major glycoproteins. *Vet Microbiol.* 29(3-4):251-9.
 57. DUBUISSON J, KOROMYSLOV I, PASTORET PP, THIRY E, (1992). Proteins of bovine herpesvirus type 4 released into the culture medium of productively infected cells: identification of a 135K glycoprotein involved in viral attachment. *J Gen Virol.* 73 (Pt 1):189-94.
 58. EGYED L, KLUGE JP, BARTHA A, (1997). Histological studies of bovine herpesvirus type 4 infection in non-ruminant species. *Vet Microbiol.* 57(2-3):283-9.
 59. EGYED, L. AND A. BARTHA (1998). PCR studies on the potential sites for latency of BHV-4 in calves. *Vet Res Commun* 22(3): 209-216.
 60. EGYED L, BERENCSI G, BARTHA A, (1999). Periodic reappearance of bovine herpesvirus type 4 DNA in the sera of naturally and experimentally infected rabbits and calves. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 22(3):199-206.
 61. EGYED L, (2000). Bovine herpesvirus type 4: a special herpesvirus (review article). *Acta Vet Hung* 48(4): 501-513.
 62. EGYED L, BASKA F, (2003). Histological lesions in vascular tissues of bovine herpes virus type 4-infected rabbits. *Vet Microbiol* 91(1): 1-10.
 63. EHLERS B, BUHK HJ, LUDWIG H, (1985). Analysis of bovine cytomegalovirus genome structure: cloning and mapping of the monomeric polyreplicative DNA unit, and comparison of European and American strains. *J Gen Virol* 66(Pt 1): 55-68.
 64. ESCUDERO-PEREZ B, VOLCHKOVA VA, DOLNIK O, LAWRENCE P, VOLCHKOV VE, (2014). Shed GP of Ebola virus triggers immune activation and increased vascular permeability. *PLoS Pathog* 10(11): e1004509.
 65. FABRICANT CG, KING JM, GASKIN JM, GILLESPIE JH, (1971). Isolation of a virus from a female cat with urolithiasis. *J Am Vet Med Assoc.* 1971 Jan 15;158(2):200-1.
 66. FAUQUET CM, FARGETTE D, (2005). International Committee on Taxonomy of Viruses and the 3,142 unassigned species. *Virology* 16;2:64.
 67. FELDMANN H, JONES S, KLENK HD, SCHNITTLER HJ, (2003). Ebola virus: from discovery to vaccine. *Nature Reviews Immunology* 3(8): 677-685.
 68. FEJÉR G, MEDVECZKY MM, HORVATH E, LANE B, CHANG Y, et al. (2003). The latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus interacts preferentially with the terminal repeats of the genome in vivo and this

- complex is sufficient for episomal DNA replication. *J Gen Virol.* 84(Pt 6):1451-62.
69. FELDMANN H, SANCHEZ A, GEISBERT T, (2013). *Filoviridae: Marburg and Ebola virus.* Fields virology 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins 923-956.
 70. FRANCESCHI V, CAPOCEFALO A, CALVOPINILLA E, REDAELLI M, MUCIGNAT-CARETTA C, et al. (2011). Immunization of knock-out alpha/beta interferon receptor mice against lethal bluetongue infection with a BoHV-4-based vector expressing BTV-8 VP2 antigen. *Vaccine* 29(16): 3074-3082.
 71. FRANCESCHI V, CAPOCEFALO A, CAVIRANI S, DONOFRIO G. (2013). Bovine herpesvirus 4 glycoprotein B is indispensable for lytic replication and irreplaceable by VSVg. *BMC Vet Res.*, vol.9 pp. 6.
 72. FRANCESCHI V, PARKER S, JACCA S, CRUMP RW, DORONIN K, et al. (2015). BoHV-4-Based Vector Single Heterologous Antigen Delivery Protects STAT1(-/-) Mice from Monkeypoxvirus Lethal Challenge. *PLoS Negl Trop Dis* 9(6): e0003850.
 73. FRANCICA JR, VARELA-ROHENA A, MEDVEC A, PLESA G, RILEY JL, et al. (2010). Steric shielding of surface epitopes and impaired immune recognition induced by the ebola virus glycoprotein. *PLoS Pathog.* 6(9):e1001098.
 74. GARBUTT M, LIEBSCHER R, WAHL-JENSEN V, JONES S, MÖLLER P, et al. (2004). Properties of replication-competent vesicular stomatitis virus vectors expressing glycoproteins of filoviruses and arenaviruses. *J Virol.* 78(10):5458-65.
 75. GEISBERT TW, JAHRLING PB, (1990). Use of immunoelectron microscopy to show Ebola virus during the 1989 United States epizootic. *J Clin Pathol.* 43(10):813-6.
 76. GEISBERT TW, YOUNG HA, JAHRLING PB, DAVIS KJ, KAGAN E, et al. (2003). Mechanisms underlying coagulation abnormalities in ebola hemorrhagic fever: overexpression of tissue factor in primate monocytes/macrophages is a key event. *J Infect Dis* 188(11): 1618-1629.
 77. GEISBERT TW, BAUSCH DG, FELDMANN H, (2010). Prospects for immunisation against Marburg and Ebola viruses. *Rev Med Virol.* 2010 Nov;20(6):344-57.
 78. GEISBERT TW, BAILEY M, HENSLEY L, ASIEDU C, GEISBERT J, et al. (2011). Recombinant adenovirus serotype 26 (Ad26) and Ad35 vaccine vectors bypass immunity to Ad5 and protect nonhuman primates against Ebolavirus challenge. *J Virol* 85(9): 4222-4233.
 79. GILLET L, MINNER F, DETRY B, FARNIR F, WILLEMS L, et al. (2004). Investigation of the susceptibility of human cell lines to bovine herpesvirus 4 infection: demonstration that human cells can support a non permissive persistent infection which protects them against tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *J Virol* 78(5): 2336-2347.
 80. GILLET L, DAIX V, DONOFRIO G, WAGNER M, KOSZINOWSKI UH, et al. (2005). Development of bovine herpesvirus 4 as an expression vector using bacterial artificial chromosome cloning. *Journal of General Virology* 86(4): 907-917.
 81. GOLTZ M, BROLL H, MANKERTZ A, WEIGELT W, LUDWIG H, et al. (1994). Glycoprotein B of bovine herpesvirus type 4: its phylogenetic relationship to gB equivalents of the herpesviruses. *Virus Genes.* 9(1):53-9.
 82. GUPTAM, SPIROPOULOU C, ROLLIN PE, (2007). Ebola virus infection of human PBMCs causes massive death of macrophages, CD4 and CD8 T cell subpopulations in vitro. *Virology* 364:45-54.
 83. HABIB AG. (2013). Public health aspects of snakebite care in West Africa: perspectives from Nigeria. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 19:27.
 84. HALFMANN P, KIM JH, EBIHARA H, NODA T, NEUMANN G, et al. (2008). Generation of biologically contained Ebola viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(4): 1129-1133.
 85. HALFMANN P, EBIHARA H, MARZI A, HATTA Y, WATANABE S, et al. (2009). Replication-deficient Ebolavirus as a vaccine candidate. *J Virol* 83(8): 3810-3815.
 86. HENAO-RESTREPO AM, LONGINI IM, EGGER M, DEAN NE, EDMUNDS WJ, et al. (2015). Efficacy and effectiveness of an rVSV-vectored vaccine expressing Ebola surface glycoprotein: interim results from the Guinea ring vaccination cluster-randomised trial. *Lancet* 386(9996): 857-866.
 87. HENAO-RESTREPO AM, CAMACHO A, LONGINI IM, WATSON CH, EDMUNDS WJ, et al. (2017). Efficacy and effectiveness of an rVSV-vectored vaccine in preventing Ebola virus disease: final results from the Guinea ring vaccination, open-label, cluster-randomised trial (Ebola Ça Suffit!). *Lancet.* 389(10068):505-518.
 88. HOENEN T, GROSETH A, FELDMANN H, (2012). Current ebola vaccines. *Expert opinion on biological therapy* 12(7): 859-872.
 89. HOENEN T, FELDMANN H, (2014). Reverse genetics systems as tools for the development of novel therapies against filoviruses. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 12:1253-63
 90. HUNT L, GUPTA-WRIGHT A, SIMMS V, TAMBA F, KNOTT V, et al. (2015). *Clinical*

- presentation, biochemical, and haematological parameters and their association with outcome in patients with Ebola virus disease: an observational cohort study. *Lancet Infect. Dis.* 15:1292–99
91. ITO H, WATANABE S, TAKADA A, KAWAOKA Y, (2001). Ebola virus glycoprotein: proteolytic processing, acylation, cell tropism, and detection of neutralizing antibodies. *J Virol.* 2001 Feb;75(3):1576-80.
 92. JACCA S, ROLIH V, QUAGLINO E, FRANCESCHI V, TEBALDI G, et al. (2015). Bovine herpesvirus 4-based vector delivering a hybrid rat/human HER-2 oncoantigen efficiently protects mice from autochthonous Her-2+ mammary cancer. *Oncolmmunology* 2015. doi:10.1080/2162402x.2015.1082705.
 93. JACOBS M, RODGER A, BELL DJ, BHAGANI S, CROPLEY I, et al. (2016). Late Ebola virus relapse causing meningoencephalitis: a case report. *Lancet* 388:498–503.
 94. JAHRLING PB, GEISBERT TW, DALGARD DW, JOHNSON ED, KSIAZEK TG, et al. (1990). Preliminary report: isolation of Ebola virus from monkeys imported to USA. *Lancet* 335(8688): 502-505.
 95. JEFFERS SA, SANDERS DA, SANCHEZ A, (2002). Covalent modifications of the ebola virus glycoprotein. *J Virol.* 76(24):12463-72.
 96. JERCA L, JERCA O, MANCAS G, CONSTANTINESCU I, LUPUSORU R, (2002). Mechanism of action and biochemical effects of nitric oxide (NO). *J. Prev. Med.* 10:35–45.
 97. JIN H, YAN Z, PRABHAKAR BS, FENG Z, MA Y, et al, (2010). The VP35 protein of Ebola virus impairs dendritic cell maturation induced by virus and lipopolysaccharide. *J Gen Virol.* 91(Pt 2):352-61.
 98. JONES SM, FELDMANN H, STROHER U, GEISBERT JB, FERNANDO L, et al. (2005). Live attenuated recombinant vaccine protects nonhuman primates against Ebola and Marburg viruses. *Nat Med* 11(7): 786-790.
 99. KELLEY B. (2009). Industrialization of mAb production technology: the bioprocessing industry at a crossroads. *mAbs.* 1:443–452.
 100. KIBADI K, MUPAPA K, KUVULA K, MASSAMBA M, NDABEREY D, et al. (1999). Late ophthalmologic manifestations in survivors of the 1995 Ebola virus epidemic in Kikwit, Democratic Republic of the Congo. *J. Infect. Dis.* 179(Suppl. 1):S13–14.
 101. KIT S, ICHIMURA H, KIT M, CRANDELL R, MCCONNELL S, (1986). Induction of thymidine kinase activity by viruses with group B DNA genomes: bovine cytomegalovirus (bovine herpesvirus 4). *Virus Res* 4(2): 197-212.
 102. KORTEPETERMG, BAUSCH DG, BRAY M. (2011). Basic clinical and laboratory features of filoviral hemorrhagic fever. *J. Infect. Dis.* 204(Suppl. 3):S810–16.
 103. KONDURU K, BRADFUTE SB, JACQUES J, MANANGEESWARAN M, NAKAMURA S, et al. (2011). Ebola virus glycoprotein Fc fusion protein confers protection against lethal challenge in vaccinated mice. *Vaccine.* 2011 Apr 5;29(16):2968-77.
 104. KONDURU K, SHURTLEFF AC, BRADFUTE SB, NAKAMURA S, BAVARI S, et al. (2016). Ebolavirus Glycoprotein Fc Fusion Protein Protects Guinea Pigs against Lethal Challenge. *PLoS One.* 11(9):e0162446.
 105. KSIAZEK TG, ROLLIN PE, WILLIAMS AJ, BRESSLER DS, MARTIN ML, et al. (1999). Clinical virology of Ebola hemorrhagic fever (EHF): virus, virus antigen, and IgG and IgM antibody findings among EHF patients in Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995. *J Infect Dis* 179 Suppl 1: S177-187.
 106. KUHN JH, LOFTS LL, KUGELMAN JR, SMITHER SJ, LEVER MS, et al. (2014). Reidentification of Ebola Virus E718 and ME as Ebola Virus/H.sapiens-tc/COD/1976/Yambuku-Ecran. *Genome Announc.* 2(6). pii: e01178-14.
 107. LANINI S, PORTELLA G, VAIRO F, KOBINGER GP, PESENTI A, et al, (2015). Blood kinetics of Ebola virus in survivors and nonsurvivors. *J Clin Invest.* 125(12):4692-8.
 108. LE GUENNO B, FORMENTY P, WYERS M, GOUNON P, WALKER F, et al. (1995). Isolation and partial characterisation of a new strain of Ebola virus. *Lancet.* 345(8960):1271-4.
 109. LEDGERWOOD JE, DEZURE AD, STANLEY DA, COATES EE, NOVIK L, et al. (2017). Chimpanzee Adenovirus Vector Ebola Vaccine. *N Engl J Med.* 376(10):928-938.
 110. LENNEMANN NJ, RHEIN BA, NDUNGO E, CHANDRAN K, QIU X, et al. (2014). Comprehensive functional analysis of N-linked glycans on Ebola virus GP1. *MBio.* 5(1):e00862-13.
 111. LEUNG DW, SHABMAN RS, FARAHBAKSH M, PRINS KC, BOREK DM, et al. (2010). Structural and functional characterization of Reston Ebola virus VP35 interferon inhibitory domain. *J Mol Biol.* 399(3):347-57.
 112. LÉTÉ C, MACHIELS B, STEVENSON PG, VANDERPLASSCHEN A, GILLET L, (2012). Bovine herpesvirus type 4 glycoprotein L is nonessential for infectivity but triggers virion endocytosis during entry. *J Virol.*

- 86(5):2653-64.
113. LÉTÉ C, PALMEIRA L, LEROY B, MAST J, MACHIELS B, et al. (2012). *Proteomic characterization of bovine herpesvirus 4 extracellular virions*. J Virol. 86(21):11567-80.
 114. LOMONTE P, BUBLLOT M, PASTORET PP, THIRY E, (1992). *Location and characterization of the bovine herpesvirus type 4 thymidine kinase gene; comparison with thymidine kinase genes of other herpesviruses*. Archives of Virology 127(1-4): 327-337.
 115. LOMONTE P, BUBLLOT M, VAN SANTEN V, KEIL GM, PASTORET PP, et al. (1995). *Analysis of bovine herpesvirus 4 genomic regions located outside the conserved gammaherpesvirus gene blocks*. J Gen Virol. 76 (Pt 7):1835-41.
 116. LOPEZ OJ, GALEOTA JA, OSORIO FA, (1996). *Bovine herpesvirus type-4 (BHV-4) persistently infects cells of the marginal zone of spleen in cattle*. Microb Pathog 21(1): 47-58.
 117. LUDWIG H, (1982). *Bovine herpesviruses. In the herpesviruses*. Plenum Press, New York. Vol. 2: 135-214.
 118. LUPTON HW, LAMBERT RD, BUMGARDNER DL, MOE JB, EDDY GA, (1980). *Inactivated vaccine for Ebola virus efficacious in guinea pig model*. Lancet 2(8207): 1294-1295.
 119. LYON GM, MEHTA AK, VARKEY JB, BRANTLY K, PLYLER L, et al. (2014). *Clinical care of two patients with Ebola virus disease in the United States*. N Engl J Med. 371(25):2402-9.
 120. MACHIELS B, GILLET L, NASCIMENTO BRITO SD, DRION P, DELFORGE C, et al. (2007). *Natural antibody complement dependent neutralization of bovine herpesvirus 4 by human serum*. Microbes Infect 9(14-15): 1530-1537.
 121. MACHIELS B, LÉTÉ C, GUILLAUME A, MAST J, STEVENSON PG, ET AL. (2011). *Antibody evasion by a gammaherpesvirus O-glycan shield*. PLoS Pathog. 7(11):e1002387.
 122. MACHIELS B, STEVENSON PG, VANDERPLASSCHEN A, GILLET L, (2013). *A gammaherpesvirus uses alternative splicing to regulate its tropism and its sensitivity to neutralization*. PLoS Pathog. 9(10):e1003753.
 123. MAHANTY S, BRAY M, (2004). *Pathogenesis of filoviral haemorrhagic fevers*. Lancet Infect Dis 4(8): 487-498.
 124. MARKINE-GORIAYNOFF N, MINNER F, DEFAYS K, GILLET L, THIRY E, et al. (2003). *L'Herpesvirus Bovin (BoHV-4)*. Ann Med Vet 147: 173-205.
 125. MARTIN JE, SULLIVAN NJ, ENAMA ME, GORDON IJ, ROEDERER M, et al. (2006). *A DNA vaccine for Ebola virus is safe and immunogenic in a phase I clinical trial*. Clin Vaccine Immunol 13(11): 1267-1277.
 126. MARTINES RB, NG DL, GREER PW, ROLLIN PE, ZAKI SR, (2015). *Tissue and cellular tropism, pathology and pathogenesis of Ebola and Marburg viruses*. J Pathol. 235(2):153-74. doi: 10.1002/path.4456.
 127. MATTIA JG, VANDY MJ, CHANG JC, PLATT DE, DIERBERG K, et al. (2016). *Early clinical sequelae of Ebola virus disease in Sierra Leone: a cross-sectional study*. Lancet Infect. Dis. 16:331–38.
 128. MCGEOCH DJ, GATHERER D, DOLAN A, (2005). *On phylogenetic relationships among major lineages of the Gammaherpesvirinae*. J Gen Virol. 86(Pt 2):307-16.
 129. MELLQUIST-RIEMENSCHNEIDER JL, GARRISON AR, GEISBERT JB, SAIKH KU, HEIDE-BRINK KD, et al. (2003). *Comparison of the protective efficacy of DNA and baculovirus-derived protein vaccines for EBOLA virus in guinea pigs*. Virus Res 92(2): 187-193.
 130. MESSAOUDI I, AMARASINGHE GK, BASLER CF, (2015). *Filovirus pathogenesis and immune evasion: insights from Ebola virus and Marburg virus*. Nat Rev Micro 13(11): 663-676.
 131. METZLER AE, OSSENT P, GUSCETTI F, RÜBEL A, LANG EM, (1990). *Serological evidence of herpesvirus infection in captive Asian elephants (Elephas maximus)*. J Wildl Dis. 26(1):41-9.
 132. MILLER EH, OBERNOSTERER G, RAABEN M, HERBERT AS, DEFFIEU MS, et al. (2012). *Ebola virus entry requires the host-programmed recognition of an intracellular receptor*. Embo j 31(8): 1947-1960.
 133. MIRE CE, MATASSOV D, GEISBERT JB, LATHAM TE, AGANS KN, et al. (2015). *Single-dose attenuated Vesiculovax vaccines protect primates against Ebola Makona virus*. Nature 520(7549): 688-691.
 134. MOHANTY SB, LILLIE MG, INGLING AL, HAMMOND RC, (1972). *Effects of an experimentally induced herpesvirus infection in calves*. J Am Vet Med Assoc. 161(9):1008-11.
 135. MORÁN PE, PÉREZ SE, ODEÓN AC, VERNA AE, (2015). *[Bovine herpesvirus 4 (BoHV-4): general aspects of the biology and status in Argentina]*. Rev Argent Microbiol. 47(2):155-66.
 136. MORENO-LOPEZ J, GOLTZ M, REHBINDER C, VALSALA KV, LUDWIG H, (1989). *A bovine herpesvirus (BHV-4) as passenger virus in ethmoidal tumours in Indian cattle*. Zentralbl Veterinarmed B. 36(7):481-6.
 137. MUHLBERGER E, (2007). *Filovirus*

- replication and transcription. *Future Virol* 2(2): 205-215.
138. MUPAPA K, MUKUNDU W, BWAKA MA, KIPASA M, DE ROO A, et al. (1999). Ebola hemorrhagic fever and pregnancy. *J. Infect. Dis.* 179(Suppl. 1):S11-12.
 139. NAEEM K, GOYAL SM, (1990). A dot immunobinding assay on nitrocellulose for the detection of bovid herpesvirus-4 antibodies. *J Vet Diagn Invest* 2(2): 107-110.
 140. NEGREDO A, PALACIOS G, VÁZQUEZ-MORÓN S, GONZÁLEZ F, DOPAZO H, et al. (2011). Discovery of an ebolavirus-like filovirus in Europe. *PLOS Pathog.* 7:e1002304.
 141. OSORIO FA, REED DE, ROCK DL, (1982). Experimental infection of rabbits with bovine herpesvirus-4: acute and persistent infection. *Vet Microbiol* 7(6): 503-513.
 142. OSORIO FA, REED DE, (1983). Experimental inoculation of cattle with bovine herpesvirus-4: evidence for a lymphoid-associated persistent infection. *Am J Vet Res* 44(6): 975-980.
 143. OSORIO FA, ROCK DL, REED DE, (1985). Studies on the pathogenesis of a bovine cytomegalolike virus in an experimental host. *J Gen Virol* 66(Pt 9): 1941-1951.
 144. PALMEIRA L, MACHIELS B, LÉTÉ C, VANDERPLASSCHEN A, GILLET L, (2011). Sequencing of bovine herpesvirus 4 v. test strain reveals important genome features. *Virol J.* 8:406.
 145. PARK JB, KENDRICK JW, (1973). The isolation and partial characterization of a herpesvirus from a case of bovine metritis. *Arch Gesamte Virusforsch* 41: 211-215.
 146. PATTYN S, VAN DER GROEN G, JACOB W, PIOT P, COURTEILLE G, (1977). Isolation of Marburg-like virus from a case of haemorrhagic fever in Zaire. *Lancet.* 1(8011):573-4.
 147. PHOOLCHAROEN W, DYE JM, KILBOURNE J, PIENSOOK K, PRATT WD, et al. (2011). A nonreplicating subunit vaccine protects mice against lethal Ebola virus challenge. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(51): 20695-20700.
 148. PLEET ML, DE MARINO C, LEPENE B, AMAN MJ, KASHANCHI F, (2017). The Role of Exosomal VP40 in Ebola Virus Disease. *DNA Cell Biol.* 36(4):243-248.
 149. PRATT WD, WANG D, NICHOLS DK, LUO M, WORARATANADHARM J, et al. (2010). Protection of Nonhuman Primates against Two Species of Ebola Virus Infection with a Single Complex Adenovirus Vector. *Clin Vaccine Immunol* 17(4): 572-581.
 150. PUSHKO P, BRAY M, LUDWIG GV, PARKER M, SCHMALJOHN A, et al. (2000). Recombinant RNA replicons derived from attenuated Venezuelan equine encephalitis virus protect guinea pigs and mice from Ebola hemorrhagic fever virus. *Vaccine* 19(1): 142-153.
 151. QIU X, AUDET J, LV M, HE S, WONG G, et al. (2016). Two-mAb cocktail protects macaques against the Makona variant of Ebola virus. *Science Translational Medicine* Vol. 8, Issue 329, pp. 329ra33.
 152. REDAELLI M, MUCIGNAT-CARETTA C, CAVAGGIONI A, CARETTA A, D'AVELLA D, et al. (2010). Bovine herpesvirus 4 based vector as a potential oncolytic-virus for treatment of glioma. *Virol J* 7: 298.
 153. REED DE, LANGPAP TJ, BERGELAND ME, (1979). Bovine abortion associated with mixed Movar 33/63 type herpesvirus and bovine viral diarrhoea virus infection. *Cornell Vet.* 69(1):54-66.
 154. REID SP, LEUNG LW, HARTMAN AL, MARTINEZ O, SHAW ML, et al. (2006). Ebola virus VP24 binds karyopherin alpha1 and blocks STAT1 nuclear accumulation. *J Virol.* 80(11):5156-67.
 155. REYNOLDS P, MARZI A, (2017). Ebola and Marburg virus vaccines. *Virus Genes.* 53(4):501-515.
 156. ROIZMAN BPE, (2001). The family herpesviridae: a brief introduction. *Fields Virology:* 2381-2397.
 157. ROSE NF, ROBERTS A, BUONOCORE L, ROSE JK, (2000). Glycoprotein exchange vectors based on vesicular stomatitis virus allow effective boosting and generation of neutralizing antibodies to a primary isolate of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 74(23):10903-10.
 158. ROSE NF, MARX PA, LUCKAY A, NIXON DF, MORETTO WJ, et al. (2001). An effective AIDS vaccine based on live attenuated vesicular stomatitis virus recombinants. *Cell.* 106(5):539-49.
 159. SAMBROOK JF, RUSSELL DW, (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
 160. SANCHEZ A, TRAPPIER SG, MAHY BW, PETERS CJ, NICHOL ST, (1996). The virion glycoproteins of Ebola viruses are encoded in two reading frames and are expressed through transcriptional editing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(8): 3602-3607.
 161. SANCHEZ A, YANG ZY, XU L, NABEL GJ, CREWS T, et al. (1998) Biochemical analysis of the secreted and virion glycoproteins of Ebola virus. *J Virol.* 72(8):6442-7.
 162. SANCHEZ A, LUKWIYA M, BAUSCH D, MAHANTY S, SANCHEZ AJ, et al. (2004). Analysis of human peripheral blood samples from fatal and nonfatal cases of Ebola (Sudan) hemorrhagic fever: cellular responses, virus load, and nitric oxide

- levels. *J Virol.* 78(19):10370-7.
163. SANCHEZ A, WAGONER KE, ROLLIN PE, (2007). *Sequence-based human leukocyte antigen-B typing of patients infected with Ebola virus in Uganda in 2000: identification of alleles associated with fatal and nonfatal disease outcomes.* *J Infect Dis.* 15;196 Suppl 2:S329-36.
 164. SCIORTINO MT, PERRI D, MEDICI MA, FOTI M, ORLANDELLA BM, et al. (2000). *The gamma-2-herpesvirus bovine herpesvirus 4 causes apoptotic infection in permissive cell lines.* *Virology.* 277(1):27-39.
 165. SCHIEFFELIN JS, SHAFFER JG, GOBA A, GBAKIE M, GIRE SK, et al. (2014). *Clinical illness and outcomes in patients with Ebola in Sierra Leone.* *N. Engl. J. Med.* 371:2092–100.
 166. SIMMONS G, REEVES JD, GROGAN CC, VANDENBERGHE LH, BARIBAUD F, et al. (2003). *DC-SIGN and DC-SIGNR bind ebola glycoproteins and enhance infection of macrophages and endothelial cells.* *Virology* 305(1): 115-123.
 167. SOBARZO A, PERELMAN E, GROSETH A, DOLNIK O, BECKER S, et al. (2012). *Profiling the native specific human humoral immune response to Sudan Ebola virus strain Gulu by chemiluminescence enzyme-linked immunosorbent assay.* *Clin Vaccine Immunol* 19(11): 1844-1852.
 168. STORZ J, EHLERS B, TODD WJ, LUDWIG H, (1984). *Bovine cytomegaloviruses: identification and differential properties.* *J Gen Virol* 65 (Pt 4): 697-706.
 169. SULLIVAN NJ, SANCHEZ A, ROLLIN PE, YANG ZY, NABEL GJ, (2000). *Development of a preventive vaccine for Ebola virus infection in primates.* *Nature* 408(6812): 605-609.
 170. SULLIVAN NJ, GEISBERT TW, GEISBERT JB, XU L, YANG ZY, et al. (2003). *Accelerated vaccination for Ebola virus haemorrhagic fever in non-human primates.* *Nature* 424(6949): 681-684.
 171. SULLIVAN NJ, MARTIN JE, GRAHAM BS, NABEL GJ, (2009). *Correlates of protective immunity for Ebola vaccines: implications for regulatory approval by the animal rule.* *Nat Rev Microbiol* 7(5): 393-400.
 172. SWENSON DL, WANG D, LUO M, WARFIELD KL, WORARATANADHARM J, et al. (2008). *Vaccine to confer to nonhuman primates complete protection against multistrain Ebola and Marburg virus infections.* *Clin Vaccine Immunol.* 15(3):460-7.
 173. TAKADA A, FUJIOKA K, TSUIJI M, MORIKAWA A, HIGASHI N, et al. (2004). *Human macrophage C-type lectin specific for galactose and N-acetylgalactosamine promotes filovirus entry.* *J Virol.* 78(6):2943-7.
 174. TAXONOMY-INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV). (2016) <http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>.
 175. TAYLOR FB JR., TOH CH, HOOTSWK, WADA H, LEVI M, (2001). *Towards definition, clinical and laboratory criteria, and a scoring system for disseminated intravascular coagulation.* *Thromb. Haemost.* 86:1327–30.
 176. THIRION M, MACHIELS B, FARNIR F, DONOFRIO G, et al. (2010). *Bovine herpesvirus 4 ORF73 is dispensable for virus growth in vitro, but is essential for virus persistence in vivo.* *J Gen Virol.* 91(Pt 10):2574-84.
 177. THIRY E, MARKINE-GORIAYNOFF N, MINNER F, PASTORET PP, VANDERPLASSCHEN A, (2000). *L'herpesvirus bovin de type 4: virus pathogene ou passager?* *Le point Vet.* 31: 49-55.
 178. TOHO T, KANAYA K, OKI Y, (1985). *Experimental transmission to calf and goat of the virus associated with the cultured T-cell lymphoma cell line from the calf type of bovine leukosis. I. Detection of antibodies to BTLA by immunofluorescence assay.* *Bull. Nipp. Vet. Zootech. Coll.* 34: 23-26.
 179. TOPHAM NJ, HEWITT EW, (2009). *Natural killer cell cytotoxicity: How do they pull the trigger?* *Immunology* 128:7–15.
 180. TOWNER JS, SEALY TK, KHRISTOVA ML, ALBARIÑO CG, CONLAN S, et al. (2008). *Newly discovered ebola virus associated with hemorrhagic fever outbreak in Uganda.* *PLoS Pathog.* 4(11):e1000212.
 181. TWENHAFEL NA, MATTIX ME, JOHNSON JC, ROBINSON CG, PRATT WD, et al. (2013). *Pathology of experimental aerosol Zaire ebolavirus infection in rhesus macaques.* *Vet Pathol.* 2013 May;50(3):514-29.
 182. VANDERPLASSCHEN A, BUBLOT M, DUBUISSON J, PASTORET PP, THIRY E, (1993). *Attachment of the Gammaherpesvirus bovine herpesvirus 4 is mediated by the interaction of gp8 glycoprotein with heparin like moieties on the cell surface.* *Virology* 196(1): 232-240.
 183. VANDERPLASSCHEN A, GOLTZ M, LYAKU J, BENARAF A, BUHK HJ, et al. (1995). *The replication in vitro of the Gammaherpesvirus bovine herpesvirus 4 is restricted by its DNA synthesis dependence on the S phase of the cell cycle.* *Virology* 213(2): 328-340.
 184. VANDERPLASSCHEN A, MARKINE-GORIAYNOFF N, LOMONTE P, SUZUKI M, HIRAOKA N, et al. (2000). *A multipotential beta-1,6-N-acetylglucosaminyl-transferase is encoded by bovine*

- herpesvirus type 4*. Proc Natl Acad Sci U S A. 97(11):5756-61.
185. VAN SANTEN VL, (1991). Characterization of the bovine herpesvirus 4 major immediate-early transcript. J Virol 65(10): 5211-5224.
 186. VAN SANTEN VL, (1993). Characterization of a bovine herpesvirus 4 immediate-early RNA encoding a homolog of the Epstein-Barr virus R transactivator. J Virol. 67(2):773-84.
 187. VERNA AE, FRANCESCHI V, TEBALDI G, MACCHI F, MENOZZI V, et al. (2017). Induction of anti-human CCR5 antibodies by a Bovine Herpesvirus type-4 based vector. Front. Immunol. doi: 10.3389/fimmu.2017.01402).
 188. VOLCHKOV VE, BECKER S, VOLCHKOVA VA, TERNOVOJ VA, KOTOV AN, et al. (1995). GP mRNA of Ebola virus is edited by the Ebola virus polymerase and by T7 and vaccinia virus polymerases. Virology 214(2): 421-430.
 189. VOLCHKOV VE, FELDMANN H, VOLCHKOVA VA, KLENK HD, (1998). Processing of the Ebola virus glycoprotein by the proprotein convertase furin. Proc Natl Acad Sci U S A. 95(10):5762-7.
 190. VOLCHKOV VE, VOLCHKOVA VA, MUHLBERGER E, KOLESNIKOVA LV, WEIK M, et al. (2001). Recovery of infectious Ebola virus from complementary DNA: RNA editing of the GP gene and viral cytotoxicity. Science 291: 1965-1969.
 191. VOLCHKOVA VA, FELDMANN H, KLENK HD, VOLCHKOV VE, (1998). The nonstructural small glycoprotein sGP of Ebola virus is secreted as an antiparallel-orientated homodimer. Virology 250(2): 408-414.
 192. WAHL-JENSEN VM, AFANASIEVA TA, SEEBACH J, STROHER U, FELDMANN H, et al. (2005). Effects of Ebola virus glycoproteins on endothelial cell activation and barrier function. J Virol 79(16): 10442-10450.
 193. WARFIELD KL, SWENSON DL, OLINGER GG, KALINA WV, AMAN MJ, et al. (2007). Ebola virus-like particle-based vaccine protects nonhuman primates against lethal Ebola virus challenge. J Infect Dis 196 Suppl 2: S430-437.
 194. WARMING S, COSTANTINO N, COURT DL, JENKINS NA, COPELAND NG, (2005). Simple and highly efficient BAC recombineering using galk selection. Nucleic Acids Res 33(4): e36.
 195. WAUQUIER N, BECQUART P, PADILLA C, BAIZE S, LEROY EM, (2010). Human fatal Zaire Ebola virus infection is associated with an aberrant innate immunity and with massive lymphocyte apoptosis. PLOS Negl. Trop. Dis. 4:e837.
 196. WEI T, CHEN C, HOU J, XIN W, MORI A, (2000). Nitric oxide induces oxidative stress and apoptosis in neuronal cells. Biochim. Biophys. Acta 1498:72-79.
 197. WELLENBERG GJ, VERSTRATEN ER, BELÁK S, VERSCHUREN SB, RIJSEWIJK FA, et al. (2001). Detection of bovine herpesvirus 4 glycoprotein B and thymidine kinase DNA by PCR assays in bovine milk. J Virol Methods. 97(1-2):101-12.
 198. WELLENBERG GJ, BRUSCHKE CJ, WISSELINK HJ, BARKEMA HW, VAN OIRSCHOT JT, (2002). Simultaneous intramammary and intranasal inoculation of lactating cows with bovine herpesvirus 4 induce subclinical mastitis. Vet Microbiol. 86(1-2):115-29.
 199. WEISSENHORN W, CARFÍ A, LEE KH, SKEHEL JJ, WILEY DC, (1998). Crystal structure of the Ebola virus membrane fusion subunit, GP2, from the envelope glycoprotein ectodomain. Mol Cell. 2(5):605-16.
 200. WU S, KROEKER A, WONG G, HE S, HOU L, et al. (2016). An Adenovirus Vaccine Expressing Ebola Virus Variant Makona Glycoprotein Is Efficacious in Guinea Pigs and Nonhuman Primates. J Infect Dis. 2016 Oct 15;214(suppl 3):S326-S332.
 201. WU XX, Yao HP, Wu NP, Gao HN, Wu HB, et al. (2015). Ebolavirus Vaccines: Progress in the Fight Against Ebola Virus Disease. Cell Physiol Biochem. 37(5):1641-58.
 202. YANG ZY, DUCKERS HJ, SULLIVAN NJ, SANCHEZ A, NABEL EG, et al. (2000). Identification of the Ebola virus glycoprotein as the main viral determinant of vascular cell cytotoxicity and injury. Nat Med 6(8): 886-889.
 203. YEN B, MULDER LC, MARTINEZ O, BASLER CF, (2014). Molecular basis for ebolavirus VP35 suppression of human dendritic cell maturation. J Virol. 88(21):12500-10.
 204. ZAKI SR, SHIEH WJ, GREER PW, GOLDSMITH CS, FEREBEE T, et al. (1999). A novel immunohistochemical assay for the detection of Ebola virus in skin: implications for diagnosis, spread, and surveillance of Ebola hemorrhagic fever. Commission de Lutte contre les Epidémies à Kikwit. J Infect Dis. 1999 Feb;179 Suppl 1:S36-47.
 205. ZHANG L, VAN SANTEN VL, (1995). Interaction of bovine herpesvirus 4 (BHV-4) immediate early 2 gene product with BHV-4 thymidine kinase promoter-regulatory region. J Gen Virol 76 (Pt 10): 2433-2445.
 206. ZHANG AP, ABELSON DM, BORNHOLDT ZA, LIU T, WOODS VL JR, et al. (2012). The ebolavirus VP24 interferon antagonist: know your enemy. Virulence. 3(5):440-5.
 207. ZIMMERMANN W, BROLL H, EHLERS B, BUHK HJ, ROSENTHAL A, et al. (2001).

*Genome sequence of bovine herpesvirus
4, a bovine Rhadinovirus, and*

*identification of an origin of DNA
replication. J Virol 75(3): 1186-1194.*

APPENDICE

Lista dei contributi scientifici pubblicati su riviste internazionali nel corso del dottorato di ricerca in "Scienze Medico Veterinarie":

BoHV-4 immediate early 1 gene is a dispensable gene and its product is not a bone marrow stromal cell antigen 2 counteracting factor

Franceschi V, Capocefalo A, Jacca S, [Rosamilia A](#), Cavarani S, Xu f, Qiao W, Donofrio G.
BMC Veterinary Research, doi: 10.1186/s12917-015-0540-4

Bovine herpesvirus 4-based vector delivering a hybrid rat/human HER-2 oncoantigen efficiently protects mice from autochthonous Her-2+ mammary cancer

Jacca S, Rolih V, Quaglino E, Franceschi V, Tebaldi G, Bolli E, [Rosamilia A](#), Ottonello S, Cavallo F, Donofrio G.
Oncoimmunology, <http://dx.doi.org/10.1080/2162402X.2015.1082705>.

Virus-mediated Metalloproteinase 1 induction revealed by trascryptome Bovine herpesvirus 4-infected bovine endometrial stromal cells

Tebaldi G, Jacca S, Montanini B, Capra E, [Rosamilia A](#), Sala A, Stella A, Castiglioni B, Ottonello S, Donofrio G.
Biology Reproduction, doi:10.1095/biolreprod.116.139097.

Hepatitis E virus: a cross-sectional serological and virological study in pigs and humans at zoonotic risk within a high density pig farming area

Caruso C, Peletto S, [Rosamilia A](#), Modesto P, Chiavacci L, Sona B, Balsamelli F, Valeria G, Acutis PL, Pezzoni G, Brocchi E, Vitale N, Masoero L.
Transboundary and Emerging Disease, doi: 10.1111/tbed.12533.

BoHV-4 based vector delivering Ebola virus surface glycoprotein

[Rosamilia A](#), Jacca S, Tebaldi G, Tiberti G, Franceschi V, Macchi F, Cavarani S, Kobinger DP, Knowles D, Donofrio G.
Journal of Traslational Medicine, doi: 10.1186/s12967-016-1084-5.

Genome sequence of Canine Adenovirus Type 1 isolated from wolf (*Canis lupus*) in Southern Italy

Pizzurro F, Marcacci M, Zaccaria G, Orsini M, Cito F, [Rosamilia A](#), Di Renzo L, Malatesta D, di Sabatino D, Lorusso A.
Genome Announcement, doi.org/10.1128/genomeA.00225-17.

Coordinated role of TLR3 and RIG-I in the innate response of bovine endometrial cells to virus

Carneiro LC, Bedford C, Jacca S, [Rosamilia A](#), de Lima VF, Donofrio G, Sheldon IM, Cronin JG.
Frontiers Immunology, doi: 10.3389/fimmu.2017.00996.