

UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA  
DIPARTIMENTO DI MEDICINA MOLECOLARE

---

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOMEDICINA  
XXVII CICLO

**ATTIVITÀ ANTIVIRALE DI AMIODARONE SUL VIRUS EBOLA:  
INTERFERENZA SULL'INGRESSO DEL VIRUS NELLE CELLULE  
BERSAGLIO**

**Direttore della Scuola:** Prof. Riccardo Manganelli

**Supervisore:** Dott.ssa Arianna Calistri

**Dottorando:** Dott. Denis Munegato



# INDICE

<b>SOMMARIO</b>	pag. I
<b>SUMMARY</b>	pag. III
<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>pag. 1</b>
<b>1.1 IL VIRUS EBOLA</b>	pag. 1
1.1.1 MALATTIA DA VIRUS EBOLA	pag. 2
1.1.1.1 ECOLOGIA	pag. 2
1.1.1.2 PATOGENESI	pag. 3
1.1.1.3 EPIDEMIOLOGIA	pag. 6
1.1.1.4 SINTOMATOLOGIA CLINICA	pag. 11
1.1.1.5 DIAGNOSI	pag. 11
1.1.1.6 TRATTAMENTO	pag. 12
1.1.2 STRUTTURA DEL VIRUS EBOLA	pag. 14
1.1.2.1 PROTEINE ASSOCIATE AL PERICAPSIDE	pag. 14
1.1.2.2 PROTEINE ASSOCIATE AL NUCLEOCAPSIDE	pag. 21
1.1.3 CICLO REPLICATIVO	pag. 22
1.1.3.1 INGRESSO	pag. 22
1.1.3.2 SINTESI PROTEICA E REPLICAZIONE DEL GENOMA	pag. 27
1.1.3.3 ASSEMBLAGGIO E GEMMAZIONE	pag. 28
1.1.3.4 PICCOLE MOLECOLE ANTI-EBOLA	pag. 30
<b>1.2 AMIODARONE</b>	pag. 32
1.2.1 FARMACOCINETICA E FARMACODINAMICA	pag. 32
1.2.2 EFFETTI CELLULARI DI AMIODARONE	pag. 33
<b>2. SCOPO</b>	<b>pag. 37</b>
<b>3. MATERIALI E METODI</b>	<b>pag. 39</b>
MATERIALI	pag. 39
<b>3.1 LINEE CELLULARI</b>	pag. 39
<b>3.2 PLASMIDI</b>	pag. 39
<b>3.3 VIRUS</b>	pag. 41
<b>3.4 ANTICORPI</b>	pag. 41
<b>3.5 COMPOSTI CHIMICI DI SINTESI</b>	pag. 41

METODI	pag. 43
<b>3.6 TECNICHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE</b>	pag. 43
3.6.1 QUANTIFICAZIONE DEL DNA PLASMADICO	pag. 43
3.6.2 COMPETENZA E TRASFORMAZIONE BATTERICA	pag. 43
3.6.3 PREPARAZIONE DEL DNA PLASMIDICO	pag. 44
<b>3.7 TECNICHE DI BIOLOGIA CELLULARE E VIROLOGICHE</b>	pag. 44
3.7.1 TRASFEZIONE DI CELLULE DI MAMMIFERO	pag. 44
3.7.2 PSEUDOTIPIZZAZIONE DI PARTICELLE LENTIVIRALI	pag. 45
3.7.3 PREPARAZIONE E TITOLAZIONE DELLO <i>STOCK</i> DI VSVΔG-GFP PSEUDOTIPIZZATO DALLA GLICOPROTEINA DI <i>ZAIRE EBOLAVIRUS</i>	pag. 46
3.7.4 PREPARAZIONE E TITOLAZIONE DELLE PARTICELLE SIMIL-VIRALI DEL VIRUS EBOLA	pag. 46
3.7.5 SAGGI CON IL VSVΔG-GFP PSEUDOTIPIZZATO DALLA GLICOPROTEINA DI ZEBOV E CON EBOVLP	pag. 47
3.7.6 SAGGIO DI <i>BINDING</i> DELLE VLP	pag. 47
3.7.7 <i>TRAFFICKING</i> DELLE EBOVLP	pag. 48
3.7.8 SAGGIO DI FUSIONE	pag. 48
3.7.9 SDS-GEL ELETTROFORESI	pag. 49
3.7.10 <i>IMMUNOBLOTTING</i>	pag. 50
3.7.11 PROTEOLISI <i>IN VITRO</i> DELLA GP DI ZEBOV	pag. 50
<b>3.8 ANALISI STATISTICA</b>	pag. 50
<b>4. RISULTATI</b>	pag. 53
<b>4.1 PREMESSA</b>	pag. 53
<b>4.2 PRODUZIONE DEI SISTEMI MOLECOLARI PER LO STUDIO DELLA FASE DI INGRESSO DEL VIRUS EBOLA NELLA CELLULA BERSAGLIO</b>	pag. 54
<b>4.3 AMIODARONE INIBISCE L'INGRESSO GP-MEDIATO</b>	pag. 60
<b>4.4 AMIODARONE INTERFERISCE CON IL LEGAME DELLE VLP DI EBOLA ALLA SUPERFICIE CELLULARE</b>	pag. 65
<b>4.5 AMIODARONE RALLENTA IL <i>TRAFFICKING</i> DELLE EBOVLP LUNGO IL <i>PATHWAY</i> ENDOCITICO</b>	pag. 66
<b>4.6 AMIODARONE INIBISCE LA FUSIONE GP-MEDIATA CON LA MEMBRANA ENDOSOMIALE AGENDO SULL'ATTIVAZIONE DELLA GP</b>	pag. 67
<b>4.7 AMIODARONE ED IL SUO METABOLITA PRINCIPALE MDEA INIBISCONO L'INFETTIVITÀ DEL VSVΔG-GP A CONCENTRAZIONI CLINICAMENTE RILEVANTI</b>	pag. 72

**4.8 RUOLO DEI DIFFERENTI GRUPPI STRUTTURALI DI AMIODARONE  
SULL'ATTIVITÀ ANTIVIRALE** pag. 73

**5. DISCUSSIONE** pag. 77

**6. BIBLIOGRAFIA** pag. 87

**7. ABBREVIAZIONI** pag. 101

**8. PUBBLICAZIONI** pag. 103



# SOMMARIO

Il virus Ebola (EBOV) è la causa di una febbre emorragica nell'uomo, nota come malattia da virus Ebola (EVD), che presenta un tasso di mortalità medio pari al 73 % con picchi fino al 90 %. L'epidemia di EVD tuttora in corso in Africa occidentale è la più vasta nella storia di questa malattia, e si osserva un tasso di mortalità attorno al 60 %. Per la sua diffusione rapida ed incontrollata con 21924 persone infette ed 8737 morti (al 26 gennaio 2015), è stata dichiarata dall'Organizzazione Mondiale della Sanità e dalle Nazioni Unite come il più grave problema sanitario del XXI secolo, evidenziando il problema della mancanza di trattamenti preventivi e/o terapeutici specifici. Alcuni trattamenti sono attualmente in sperimentazione sui pazienti delle regioni interessate dall'epidemia grazie ad una accelerazione delle procedure di autorizzazione necessarie per la sperimentazione umana previste dalla regolamentazione internazionale.

Le scoperte recenti sul meccanismo molecolare alla base dell'ingresso di EBOV nella cellula bersaglio hanno consentito lo sviluppo di piccole molecole in grado di bloccare l'infezione agendo proprio a questo livello. Alcune delle molecole identificate con saggi *in vitro* hanno dimostrato una buona efficacia anche *in vivo* consentendone l'inclusione nei *trial* clinici.

Molecole come U18666A e la desipramina, che agiscono da inibitori dell'infezione da EBOV *in vitro*, sono state importanti per l'identificazione di fattori cellulari richiesti per l'ingresso del virus nelle cellule bersaglio.

Il ciclo replicativo virale ha inizio con il legame della glicoproteina virale GP a fattori cellulari di adesione e/o recettori localizzati in punti particolari della membrana plasmatica, i *raft* lipidici. Queste zone sono particolarmente ricche di sfingomieline (SM) la cui presenza è importante sia per l'adesione del virus che per la sua internalizzazione per macropinosi. Quest'ultimo processo è promosso dall'attività enzimatica della sfingomielinasi acida lisosomiale (L-aSMasi) che idrolizza la SM a ceramide. È proprio la presenza di ceramide che permette la curvatura della membrana, modificandone la fluidità, così da macropinosare la particella virale di EBOV adesa sulla superficie cellulare. Una volta all'interno della cellula questa procede lungo il *pathway* endocitico attraverso gli endosomi precoci per arrivare negli endosomi tardivi (LE) dove hanno luogo i processi chiave per l'instaurarsi dell'infezione. Il primo di questi è il processamento sequenziale della GP da parte delle catipsine L e B che porta all'esposizione del sito di legame sulla subunità 1 con il recettore intracellulare, il trasportatore del colesterolo NPC-1. Successivamente, il legame che si instaura mette in atto una serie di cambiamenti conformazionali a carico della subunità 2 necessari all'inserimento del peptide fusogeno nella membrana endosomiale, all'avvicinamento del pericapside alla membrana endosomiale e alla formazione del poro di fusione fino alla completa fusione delle due membrane e liberazione del nucleocapside nel citoplasma.

Il nostro gruppo ha recentemente studiato gli effetti cellulari di amiodarone, un farmaco antiaritmico largamente usato nella pratica clinica, che è in grado di indurre alterazioni a livello del *pathway* endocitico cellulare, non correlate con l'attività antiaritmica. In particolare ha dimostrato che altera la morfologia dei LE, la localizzazione di NPC-1 e porta ad un accumulo della SM inibendo la L-aSMasi, quindi agendo su fattori cellulari necessari per l'internalizzazione

del virus EBOV nella cellula bersaglio. E' stato inoltre dimostrato che amiodarone ha attività antivirale contro il virus della *Severe Acute Respiratory Syndrome* (SARS) e contro il virus dell'epatite C.

Considerando le conoscenze sul meccanismo molecolare di ingresso di EBOV nella cellula bersaglio e le alterazioni cellulari indotte da amiodarone siamo andati ad analizzare l'effetto di questo farmaco sull'ingresso di EBOV. Quindi, lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare l'azione antivirale di amiodarone sul virus Ebola con la finalità di fornire le basi biologiche per un suo possibile utilizzo nel trattamento della EVD.

Al fine di studiare gli effetti di amiodarone sull'ingresso di Ebola, sono stati adottati due sistemi ricombinanti che consentono di lavorare in condizioni di biosicurezza di livello 2 senza dover usare direttamente il virus, che richiederebbe una struttura di biosicurezza di livello 4. Il primo modello è basato sul virus della Stomatite Vesicolare (VSV) nel quale il gene codificante la glicoproteina VSV-G è stato sostituito con il gene *reporter* codificante la *green fluorescent protein* (GFP). Questo virus è stato pseudotipizzato con la glicoproteina GP di EBOV (VSVΔG-GP). Il secondo modello utilizzato è quello delle particelle simil-virali di EBOV (EBOVLP) fluorescenti, costituite dalla proteina di matrice VP40 di EBOV fusa alla GFP e contenenti la GP di EBOV sul pericapside.

Con questi sistemi è stato osservato che l'ingresso GP-mediato è inibito in maniera dose-dipendente da amiodarone a concentrazioni riscontrabili nel plasma dei pazienti trattati per via orale, confermando quanto recentemente pubblicato da Gehring e colleghi. Analizzando l'effetto di amiodarone addizionato a vari tempi rispetto l'infezione, è emerso che amiodarone agisce nelle fasi precoci dell'infezione come ipotizzato. In particolare, amiodarone agisce su diverse fasi del processo di ingresso di EBOV: i) diminuisce il legame GP-mediato per la sua inibizione sulla L-αSMasi; ii) rallenta il *trafficking* delle EBOVLP lungo il *pathway* endocitico; iii) blocca la fusione GP-mediata influenzando il processamento della GP da parte delle catepsine endosomiali. Inoltre, abbiamo dimostrato che amiodarone in combinazione con il suo principale metabolita MDEA inibisce più efficientemente l'infezione di EBOV che se usato singolarmente ai dosaggi riscontrati nel siero dei pazienti. Questi risultati sono stati confermati utilizzando il virus EBOV *wild-type* grazie alla collaborazione con il Prof. Mirazimi dell'Agenzia di Sanità Pubblica della Svezia. In tale contesto è stato dimostrato che amiodarone non solo ha un effetto sull'efficienza di infezione delle cellule bersaglio ma diminuisce il rilascio della progenie virale infettiva, fino quasi ad azzerarla alla massima concentrazione ritrovabile nel plasma dei pazienti trattati per via endovenosa. Questi dati confermano un'effettiva azione antivirale del farmaco supportando anche quanto osservato con i sistemi ricombinanti.

Grazie a questi dati Emergency ha avviato alla fine dello scorso anno una sperimentazione con somministrazione compassionevole di amiodarone in Sierra Leone e a novembre 2014 è stata annunciata la programmazione di un *trial* clinico per la valutazione dell'efficacia di amiodarone nel trattamento della EVD.

# SUMMARY

The Ebola virus disease (EVD) is caused by the Ebola virus (EBOV), and has an average mortality rate of 73 % with peaks up to 90 %. The 2014 EVD outbreak in West Africa is the largest one in the history of this disease with a mortality rate roughly of 60 %. At 26 January 2015 the CDC has estimated 21924 infected people of which 8737 died. This outbreak was declared by the World Health Organization and the United Nations as the most serious health problem of the XXI century. It was due to its rapid and uncontrolled viral spread, highlighting the problem of lack of preventive and/or therapeutic treatments. For these reasons the WHO accelerated the procedures required for the human experimentation and some clinical trials are currently ongoing on patients in the regions of the outbreak.

The new findings on the molecular mechanism of EBOV entry into target cells have allowed the development of small molecules that can block viral infection at this level. Some of these molecules identified *in vitro* studies have shown good efficacy *in vivo* allowing its use in clinical trials.

Molecules such as U18666A and desipramine, which act as inhibitors of EBOV infection *in vitro*, have been important for the identification of cellular factors required for EBOV entry into target cells. The first step of viral replication cycle is the binding of the viral glycoprotein GP to adhesion cellular factors and/or to cell surface receptors which are localized at the lipid rafts. These lipid rafts are rich in sphingomyelin (SM) that is required for viral particles adhesion and internalization by micropinocytosis. The lysosomal acid sphingomyelinase (L-aSMase) catalytic activity promotes the internalization process hydrolyzing SM to ceramide affecting membrane fluidity. In fact, the presence of ceramide allows the curvature of the membrane. Inside the cell viral particles proceed along the endocytic pathway through early endosomes to late endosomes (LE). At this level the EBOV GP is proteolitically processed by endosomal cathepsins L and B, leading to the exposure of the binding site, in the GP subunit 1, that allows the interaction with the intracellular receptor, the cholesterol transporter NPC-1. Subsequently the GP1-NPC-1 interaction a series of conformational changes in the GP subunit 2 are required for the fusion between the viral envelope and the endosomal membrane. In this way the nucleocapsid is released into the cytoplasm for the establishment of infection.

Our group has recently studied the cellular effects of the amiodarone, an antiarrhythmic drug widely used in the clinical practice, that is able to induce cellular alterations at the level of endocytic pathway. In particular, it has been shown that it affects the LE morphology, the NPC-1 intracellular localization and it leads to an accumulation of SM by inhibition of the L-aSMase activity. Then amiodarone acts on cellular factors required for the EBOV internalization into the target cells. It has been also demonstrated that amiodarone has antiviral activity against the Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) virus and the hepatitis C virus.

Considering the knowledge on the molecular mechanism of EBOV entry and the cellular alterations induced by amiodarone, the aim of this work was to evaluate the effect of

amiodarone on the EBOV entry into target cells providing evidence to consider the possibility to employ amiodarone as a treatment for the EVD.

In order to study the effects of amiodarone on EBOV entry, two recombinant systems were adopted to analyze this step under biosafety level 2 conditions. The first system is based on the Vesicular Stomatitis Virus (VSV) with the gene encoding the VSV-G glycoprotein replaced with the reporter gene encoding the green fluorescent protein GFP (VSVΔG-GFP). This virus was pseudotyped by the *Zaire ebolavirus* glycoprotein GP (GP pseudotyped virus). The second system is based on the fluorescent EBOV Virus-Like Particles (EBOVLP), that are made by the EBOV matrix protein VP40 fused to GFP, and the EBOV GP on their envelope.

With these two systems it has been observed that the GP-mediated entry is inhibited by amiodarone in a dose-dependent manner. The inhibition is achieved at amiodarone concentrations found in plasma of patients orally treated, confirming the results recently published by Gehring and colleagues. Interestingly, this study demonstrate that amiodarone acts at four GP-mediate entry levels: i) decreases the GP-mediated binding by inhibit the L-aSMase activity; ii) slows down the VLP trafficking along the endocytic pathway; iii) affects the GP processing; iv) blocks GP-mediated fusion. However, other amiodarone effects on subsequent replication cycle steps cannot be excluded.

Furthermore, we demonstrated the synergic effect of amiodarone and its major metabolite MDEA to inhibit GP-mediated infection. In collaboration with Prof. Mirazimi Public Health Agency of Sweden these results were confirmed on the *Sudan ebolavirus* infection. In this context, amiodarone had an effect on the infection of target cells efficiency. Interestingly, amiodarone strongly affect the infectious viral progeny release at the highest concentration found in the plasma of patients intravenous treated. These data confirm the antiviral effect of amiodarone on EBOV infection.

With these information, the Italian non-governmental organization Emergency announced in November 2014 the start of amiodarone randomized controlled trial on Ebola patients in Sierra Leone, to evaluate the efficacy of amiodarone in the EVD treatment.

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 IL VIRUS EBOLA

Con il termine di virus Ebola ci si riferisce ad un virus della specie *Zaire ebolavirus* appartenente al genere *Ebolavirus*, famiglia *Filoviridae* e ordine *Mononegavirales*. Come dice il nome, i virus appartenenti ai tre generi di questa famiglia, *Ebolavirus*, *Marburgvirus* e *Cuevavirus*, sono accomunati dalla forma filamentosa (Fig. 1). Sono virus dotati di un pericapside lipidico, proveniente dalla cellula ospite, che racchiude un nucleocapside nucleoproteico con un genoma ad RNA a singolo filamento a polarità negativa [1,2].

Il genere *Ebolavirus* comprende 5 specie virali che prendono il nome dalla regione geografica in cui sono state identificate: *Bundibugyo ebolavirus*, *Reston ebolavirus*, *Sudan ebolavirus*, *Tai Forest ebolavirus* (originariamente *Côte d'Ivoire ebolavirus*), e *Zaire ebolavirus* [2].

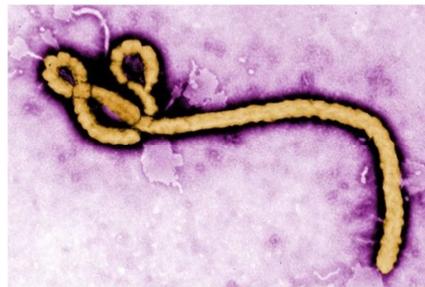


Figura 1. Micrografia in microscopia elettronica del virus Ebola.

Il virus Ebola si propaga attraverso un *reservoir* naturale, probabilmente i pipistrelli della frutta, ed è l'agente eziologico di una zoonosi febbre emorragica, la malattia da virus Ebola (EVD) nell'uomo (ma anche in altri primati e mammiferi con diverso grado di sintomatologia e mortalità) con una mortalità che ha raggiunto anche il 90 % dei casi, e per il quale non esiste un trattamento validato. Per questo motivo i filovirus, tranne il genere *Cuevavirus* che è ristretto solo ai pipistrelli ed indentificato in Spagna nel corso del 2014, sono classificati dal Centro per la prevenzione e il controllo delle malattie (CDC) e dalla direttiva 90/679/EEC del 26 Novembre 1990 del Consiglio Europeo come agenti biologici di rischio di classe 4, su una scala da 1 a 4, e come agenti di bioterrorismo di categoria A. Gli agenti di classe 4 sono definiti agenti pericolosi ed esotici che presentano un elevato rischio di trasmissione di infezione alla comunità, agenti che causano gravi malattie mortali in esseri umani per le quali non sono disponibili vaccini o altri trattamenti. La loro manipolazione richiede, pertanto, strutture altamente specializzate, con personale addestrato e che rispondano a tutta una serie di normative, i laboratori di biosicurezza di livello 4 [2].

## 1.1.1 MALATTIA DA VIRUS EBOLA

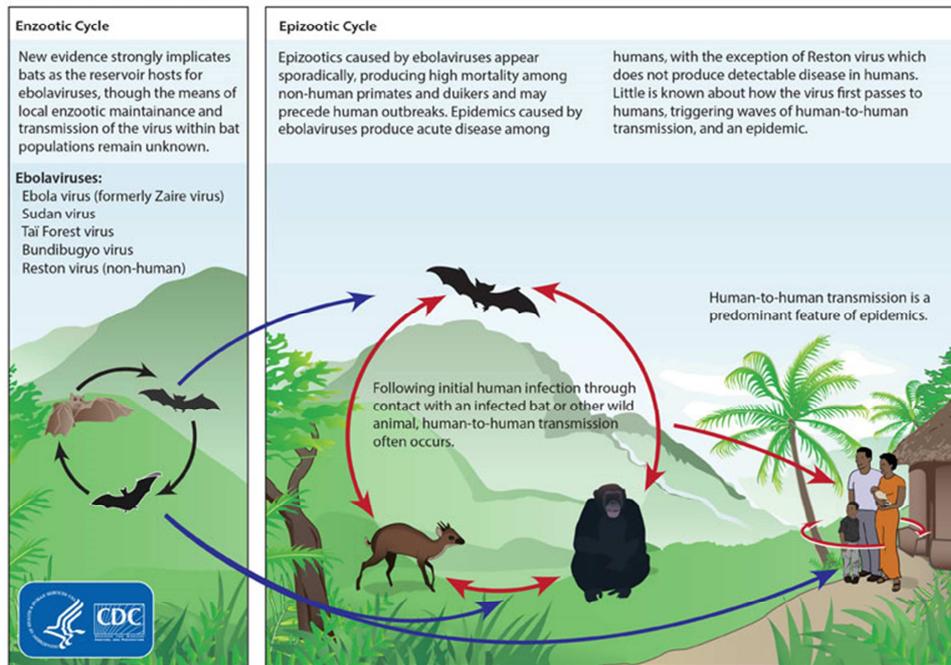
Come appena accennato, il virus Ebola è in grado di causare nell'uomo e in altri primati una febbre emorragica definita malattia da virus Ebola (EVD) con caratteristiche comuni a quelle causate dagli altri virus definiti, appunto, virus delle febbri emorragiche. Queste patologie sono raggruppate in febbri emorragiche virali, caratterizzate dall'essere patologie sistemiche, avere un esordio improvviso, essere accompagnate da manifestazioni emorragiche ed essere spesso letali [3].

### 1.1.1.1 ECOLOGIA

Il virus Ebola è mantenuto e propagato dal suo *reservoir* naturale che vive nelle aree endemiche dell'Africa equatoriale. L'uomo e gli altri primati, così come le altre specie di mammifero suscettibili all'infezione, sono soltanto ospiti occasionali del ciclo vitale del virus (Fig. 2).

Non è ancora stato identificato con certezza il *reservoir* naturale in grado di veicolarlo, ma dopo vari studi si propende sempre di più per pipistrelli della frutta ed alcuni roditori. L'evidenza che il pipistrello della frutta potrebbe essere l'ospite naturale di questo virus è stata la rilevazione dell'RNA virale e di anticorpi specifici in tre specie di pipistrello della frutta: *Hypsignathus monstrosus*, *Epomops franqueti* e *Myonycteristorquata*, anche se il virus non è mai stato isolato da questi pipistrelli. Da un'altra specie invece è stato isolato il virus Marburg, questo supporta l'idea che i pipistrelli della frutta siano il *reservoir* comune di tutti i filovirus. Nei pipistrelli il virus Ebola persiste in uno stato asintomatico o come infezione subclinica e saltuariamente viene attivato da stimoli come lo stress, la co-infezione, il cambiamento nella dieta alimentare o la gravidanza. Questo spiegherebbe il fatto che i focolai si scatenino periodicamente e a natura sporadica nelle zone endemiche di questo animale [2,3].

## Ebolavirus Ecology



**Figura 2. Ciclo vitale del virus Ebola.** Il ciclo enzoootico del virus Ebola vede i pipistrelli della frutta come *reservoir* per le diverse specie di ebolavirus. Nel ciclo epizootico i pipistrelli della frutta possono contagiare direttamente l'uomo o animali che ne vengono in contatto. Questi animali contagiati sono in grado di trasmettere l'infezione all'uomo [4].

### 1.1.1.2 PATOGENESI

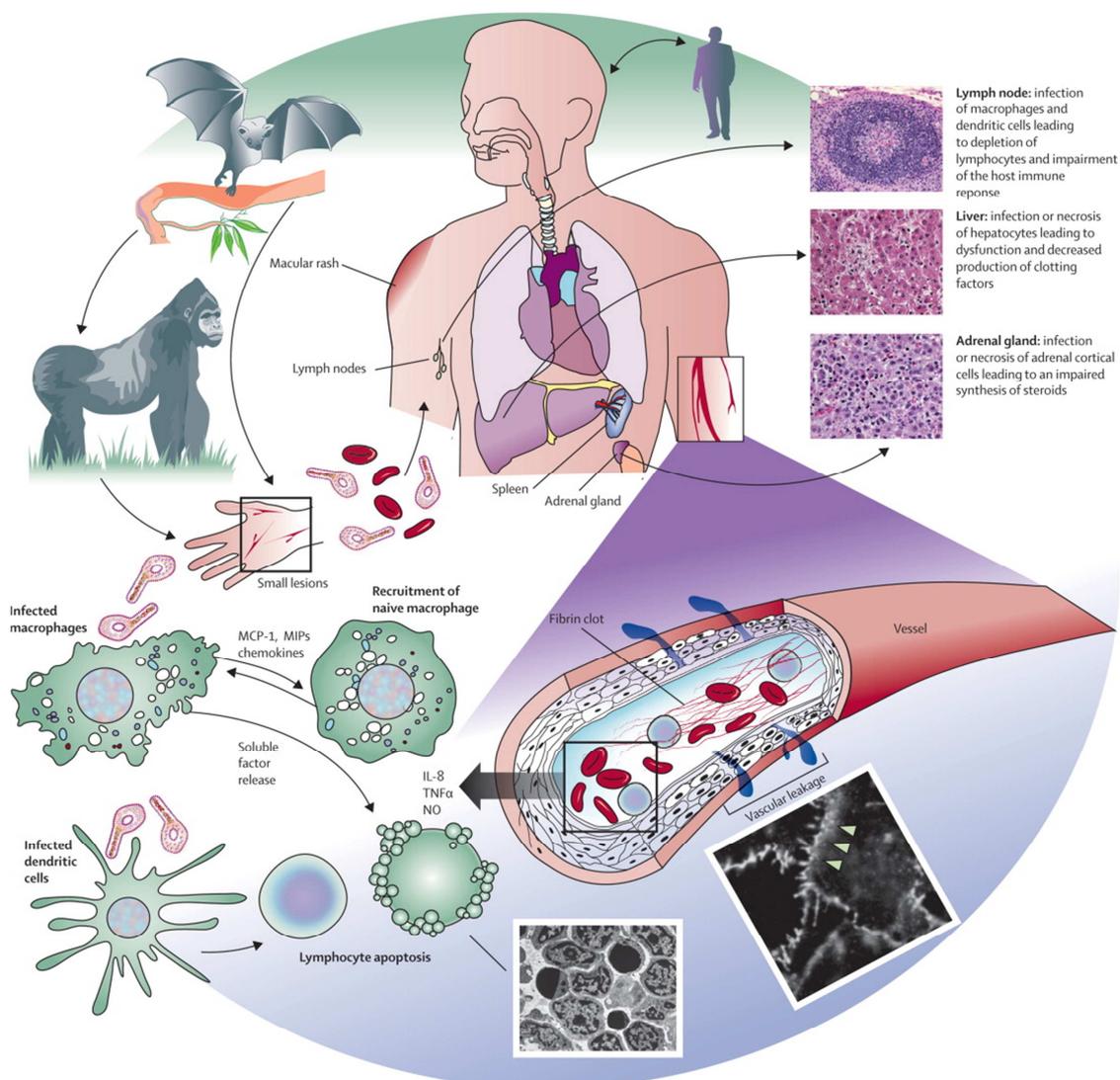
Poco si conosce della patogenesi dell'EVD nell'uomo, invece molti studi sono stati fatti su roditori e primati non umani, sebbene lo sviluppo della malattia non sia paragonabile.

Normalmente la via di trasmissione all'uomo è il contatto diretto con l'ospite naturale, o con altri animali infetti, e il contatto con fluidi biologici (Fig. 3). Durante le epidemie la via di trasmissione principale è il contatto con pazienti infetti o con cadaveri, attraverso sangue, tessuti ed organi, secrezioni e altri fluidi corporei, come anche il contatto con oggetti contaminati. Per quanto riguarda l'esposizione nei laboratori ci sono stati casi di infezione attraverso siringhe e sangue, ma anche la trasmissione da un animale di laboratorio infetto.

Oltre a queste vie, nelle zone endemiche è molto rilevante anche l'ingestione di cibo contaminato dall'ospite naturale così come in alcune zone del Congo viene consumata carne cruda di pipistrello quando la cottura del cibo inattiverebbe il virus. Non è stata osservata trasmissione via aerosol all'uomo. Solo per la specie Reston è stata dimostrata la trasmissione via aerosol ma ristretta a primati non umani [2,3].

Comunque il virus Ebola rimane contagioso attraverso materiale liquido ed essiccato anche per molti giorni.

Il virus può entrare nell'ospite attraverso superfici mucosali, ferite e abrasioni della pelle, o per via parenterale (Fig. 3). Una volta all'interno dell'ospite ha un ampio tropismo di infezione ma le cellule bersaglio primario dell'infezione *in vivo* sono principalmente monociti, macrofagi e cellule dendritiche che rimangono comunque i siti preferenziali della replicazione virale durante l'infezione. Queste cellule hanno un ruolo centrale nella disseminazione e nella diffusione del virus dai siti primari di infezione ai linfonodi, attraverso il sistema linfatico, e al fegato e alla milza, attraverso il torrente sanguigno. Monociti, macrofagi e cellule dendritiche infetti sono anche in grado di migrare al di fuori di milza e linfonodi per disseminare l'infezione agli altri tessuti (Fig. 3). Infatti, con l'evolversi dell'infezione il virus diffonde negli epatociti, in cellule endoteliali, fibroblasti, cellule dello strato corticale delle ghiandole surrenali e molti altri tipi di cellule epiteliali, tutte permissive alla replicazione del virus [2,3].



**Figura 3. Modello della patogenesi del virus Ebola.** Il virus si diffonde dal sito iniziale di infezione, come piccole lesioni, a linfonodi regionali, fegato e milza. Sebbene il virus Ebola non infetti linfociti, una peculiarità di questa malattia è la linfopenia per apoptosi. La diretta interazione dei linfociti con le proteine virali ha un ruolo nella loro diminuzione, ma la riduzione sostanziale si ha a causa dei fattori rilasciati da monociti e macrofagi ed, in seguito all'infezione, all'indebolimento delle cellule dendritiche. I fattori solubili rilasciati dalle cellule infette contribuiscono

all'indebolimento del sistema vascolare, come dimostrato in colture di cellule endoteliali (punte di freccia bianche), che porta ad emorragie diffuse. La diffusione sistemica del virus, la disregolazione della risposta immunitaria dell'ospite, l'anormale coagulazione, l'indebolimento del sistema vascolare e l'ipotensione portano tutti ad una sindrome da *shock* sistemico e danni multiorgano [3].

Nonostante l'endotelio abbia un ruolo chiave nella patogenesi i meccanismi molecolari non sono ancora stati chiariti. Si pensa che la glicoproteina di superficie del virus (GP) possa avere un ruolo preponderante nel determinare i danni strutturali alla vascolarizzazione contribuendo alle emorragie negli stadi terminali della patologia. Un altro determinante delle emorragie sembra essere la diminuita concentrazione dei fattori coagulativi e di altre proteine del plasma per mancata sintesi negli epatociti, anch'essi infettati dal virus. Inoltre, l'infezione con indebolimento della funzionalità delle ghiandole surrenali porta alla diminuzione nella secrezione di enzimi precursori degli steroidi con conseguente ipotensione, perdita di sodio ed ipovolemia [3].

Durante l'infezione si ha una forte linfopenia in particolare nei decorsi letali di EVD. La diminuzione dei linfociti è causata sia dall'avvio della cascata apoptotica che dalla deplezione del tessuto linfoide. L'avvio dell'apoptosi è stimolato da molecole di segnalazione rilasciate in seguito all'infezione di altre cellule, attraverso la via di induzione dell'apoptosi del TNF (TRAIL) e il *pathway* del recettore Fas, la diminuzione di funzionalità delle cellule dendritiche infettate, l'abnorme rilascio di mediatori solubili proapoptotici, o la diretta interazione dei linfociti con proteine virali (Fig. 3) [3].

Il virus Ebola infettando monociti, macrofagi e cellule dendritiche ne innesca il rilascio di vari mediatori dell'infiammazione quali interferone (IFN), interleuchina 2, 6, 8 e 10, proteine chemoattraenti per i monociti, RANTES, TNF- $\alpha$ , specie reattive dell'ossigeno (ROS) e ossido nitrico (NO) (Fig. 3) [5]. Una simile risposta infiammatoria è stata osservata anche in altri tipi cellulari *in-vitro*. Tutto ciò porta all'alterazione della risposta infiammatoria con abnorme attivazione della stessa. In particolare si osserva:

- l'inibizione della risposta all'IFN-I che è il punto chiave della patogenesi dell'EVD per garantire la replicazione e disseminazione del virus. Infatti il virus codifica esso stesso delle proteine (VP35 e VP24) in grado di inibire direttamente questa via di segnalazione come riportato nel paragrafo 1.1.2.1, [6,7];
- altro ruolo importante ce l'hanno i ROS e i NO (Fig. 3). L'aumento di concentrazione di NO nel sangue è associato a molti disordini patologici come l'apoptosi dei linfociti, danno tissutale, perdita dell'integrità vascolare ed è un mediatore dell'ipotensione.
- il difetto della coagulazione del sangue, si manifesta durante la malattia con petecchie, ecchimosi, emorragie mucosali, congestione e sanguinamento anormale in seguito ad una lieve ferita. Nonostante il volume di sangue perso per questi eventi non sia determinante nella progressione fatale. Da parecchi studi di laboratorio sembra che la riduzione della coagulazione sia causata anche dal sequestro dei fattori di coagulazione in determinati distretti a seguito di eventi di coagulazione intravascolare disseminata, oltre alla diminuita sintesi negli epatociti come suddetto [8]. L'insorgere di questi disordini non è ancora noto, ma sembrano essere coinvolti fattori tissutali rilasciati dai monociti e dai macrofagi infetti [8].

- il rilascio di citochine proinfiammatorie, chemochine e altri mediatori delle cellule presentanti antigeni virali portano all'alterazione vascolare e all'alterazione della coagulazione con conseguenti danni multiorgano e ad una sindrome simile allo shock settico (Fig. 3).

Tutti i dati nel complesso indicano che la diminuita ed inefficiente risposta dell'ospite all'infezione e l'infiammazione super attivata siano importanti nella progressione dell'EVD.

### 1.1.1.3 EPIDEMIOLOGIA

Il primo caso di febbre emorragica da filovirus riportato è stato nel 1967 in Germania e nella all'ora Jugoslavia, e l'agente eziologico è stato indentificato come virus Marburg.

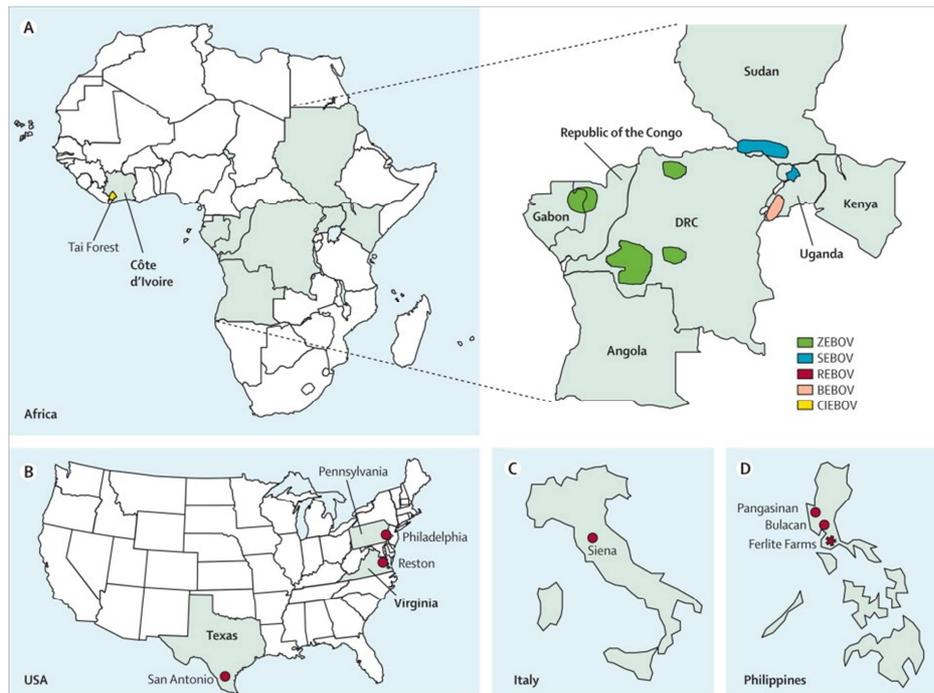
Le due specie maggiormente responsabili delle epidemie da filovirus verificatesi nel corso degli anni sono *Zaire ebolavirus* e *Sudan ebolavirus* (Fig. 4 A e 5).

1. *Zaire ebolavirus* (ZEBOV) ha il più alto tasso di mortalità tra le specie del genere *ebolavirus*, raggiunge anche il 90 % in alcune epidemie e in media si attesta attorno al 73 %. E' anche il principale responsabile delle epidemie di virus Ebola. La prima si scatenò il 26 agosto 1976 in Yambuku (Zaire) con il paziente zero Mabalo Lokela, un'insegnante di 44 anni, e fu scambiato per un caso di malaria, vista la somiglianza dei sintomi iniziali tra le due patologie. Dal paziente zero si diffuse in ambito nosocomiale attraverso gli strumenti medici non correttamente sterilizzati e lo stretto contatto interpersonale. Mentre l'ultima epidemia provocata da questo virus è in corso in Africa occidentale [2].
2. *Sudan ebolavirus* (SEBOV) inizialmente diffuso tra i lavoratori dei campi di cotone del Sudan e nel giugno 1976 si riporta il primo caso di un lavoratore venuto in contatto con un animale infetto. Anche in questo caso l'epidemia si diffuse in ambito nosocomiale per la noncuranza delle corrette procedure di sterilizzazione degli strumenti medici. Invece, l'epidemia più recente risale al 2004 in Sudan. Il tasso di mortalità di questa specie si attesta in media attorno al 54 % [2].

L'agente eziologico delle due epidemie fu all'ora classificato come nuova specie del genere *Marburgvirus* e successivamente, il comitato internazionale per la tassonomia dei virus lo ha classificato in un nuovo genere, appunto *Ebolavirus*, che deve il suo nome al fiume Ebola presente nella Repubblica Democratica del Congo (all'ora Zaire). Con l'avvento delle nuove tecnologie molecolari sono stati studiati i virus isolati nei due focolai del 1976 classificandoli come due specie distinte: *Zaire* e *Sudan ebolavirus*, le cui sequenze nucleotidiche differivano per più del 30 % [9].

La terza specie di ebolavirus, *Costa d'Avorio* o *Tai Forest ebolavirus*, è stata isolata ed identificata nel 1994 su un etnologo infettatosi mentre lavorava su uno scimpanzé morto per l'infezione da virus Ebola nella Tai Forest in Costa d'Avorio (Fig. 4 A). L'ultima specie identificata patogena per l'uomo è *Bundibugyo ebolavirus*, scoperta nell'Africa equatoriale (Fig. 4 A).

Un'altra specie, *Reston ebolavirus*, è stata scoperta e descritta per la prima volta nel 1989, isolata da un macaco proveniente dalle Filippine e messo in quarantena a Reston negli USA (Fig. 4 B e D). In rare occasioni ci sono stati altri focolai nelle Filippine, e ne è stata documentata l'infezione anche di maiali.



**Figura 4. Focolai ed epidemie di *ebolavirus* dal 1976 al 2012.** (A) Regioni dell’Africa con casi riportati di EVD causate dalle tre specie *Zaire* (ZEBOV) *Sudan* (SEBOV) e *Bundibugyo* (BEBOV), e un unico caso della specie *Costa d’Avorio* (CIEBOV). (B) La specie *Reston* (REBOV) originariamente presente nelle Filippine (D) ed importata negli USA e in Italia con macachi infetti (C). E’ stato osservato anche un focolaio a Pangasinan nelle Filippine nei maiali (D).

La EVD rimane una piaga per la popolazione dell’Africa equatoriale con un aumento del numero di focolai dal 2000, fino alla recente e più devastante epidemia registrata che si è manifestata nell’Africa occidentale nel corso dei primi mesi del 2014 e tuttora in corso (Fig. 5).

Year	Country	Ebolavirus species	Cases	Deaths	Case fatality
2012	Democratic Republic of Congo	Bundibugyo	57	29	51%
2012	Uganda	Sudan	7	4	57%
2012	Uganda	Sudan	24	17	71%
2011	Uganda	Sudan	1	1	100%
2008	Democratic Republic of Congo	Zaire	32	14	44%
2007	Uganda	Bundibugyo	149	37	25%
2007	Democratic Republic of Congo	Zaire	264	187	71%
2005	Congo	Zaire	12	10	83%
2004	Sudan	Sudan	17	7	41%
2003 (Nov-Dec)	Congo	Zaire	35	29	83%
2003 (Jan-Apr)	Congo	Zaire	143	128	90%
2001-2002	Congo	Zaire	59	44	75%
2001-2002	Gabon	Zaire	65	53	82%
2000	Uganda	Sudan	425	224	53%
1996	South Africa (ex-Gabon)	Zaire	1	1	100%
1996 (Jul-Dec)	Gabon	Zaire	60	45	75%
1996 (Jan-Apr)	Gabon	Zaire	31	21	68%
1995	Democratic Republic of Congo	Zaire	315	254	81%
1994	Cote d'Ivoire	Tai Forest	1	0	0%
1994	Gabon	Zaire	52	31	60%
1979	Sudan	Sudan	34	22	65%
1977	Democratic Republic of Congo	Zaire	1	1	100%
1976	Sudan	Sudan	284	151	53%
1976	Democratic Republic of Congo	Zaire	318	280	88%

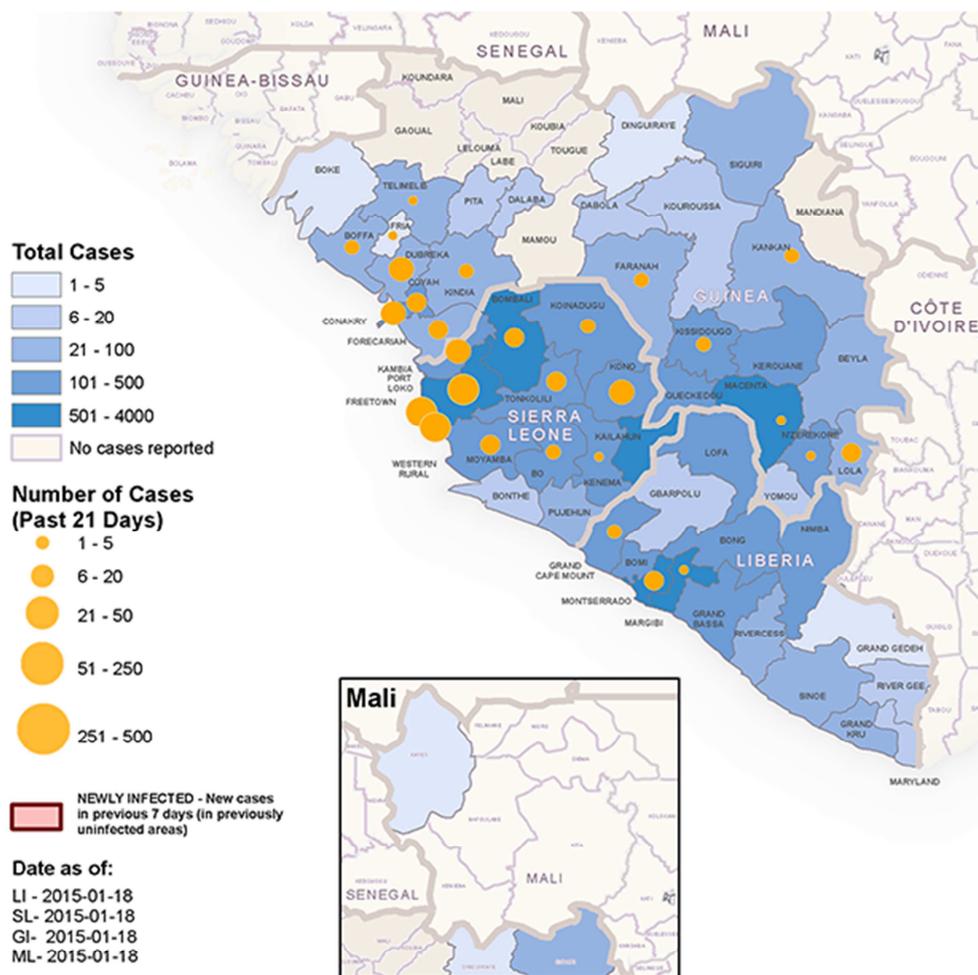
**Figura 5. Epidemiologia delle specie di ebolavirus nell'Africa equatoriale [10].**

L'epidemia di EVD del 2014 in Africa occidentale è stata definita dal centro di prevenzione e controllo delle malattie (CDC) degli Stati Uniti, e dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) come la più vasta e devastante epidemia di EVD della storia con una distribuzione geografica ed un numero di casi senza precedenti (Fig. 6). Inoltre ci sono stati casi al di fuori dei confini africani: si contano 4 casi negli Stati Uniti (di cui uno morto), 1 caso in Spagna, e 1 caso nel Regno Unito [4,10].

Tra i fattori che ne determinano la gravità ci sono la rapida diffusione dell'infezione tra la popolazione dovuta anche ad un minor tasso di mortalità che si attesta sul 60 %. La diminuzione

del tasso di mortalità rispetto alla media delle precedenti epidemie ha portato ad una maggior diffusione della malattia, congiuntamente alle scarse condizioni igienico-sanitarie delle zone colpite e alla scarsa collaborazione delle popolazioni locali con le autorità sanitarie. Dall'altro lato la possibilità di identificare rapidamente e con sicurezza i pazienti infetti e il loro monitoraggio ha consentito una stima più veritiera del numero di casi rispetto ai focolai del secolo scorso. È stato anche identificato il paziente zero che è un bambino di Meliandoua (Guinea) morto il 6 dicembre 2013 che aveva probabilmente mangiato un frutto contaminato dai pipistrelli della frutta. Lo stretto contatto con i familiari e la mancanza di attrezzature sanitarie specifiche ha dato il via al contagio.

La gravità di questa epidemia ha mobilitato le autorità mondiali verso lo sviluppo pressante di farmaci e vaccini per contrastarne la diffusione. Infatti nuove molecole (descritte nel par. 1.1.1.6) e miscele di anticorpi sono in fase di *trial* clinico sull'uomo nelle aree colpite dall'epidemia.



Country	Data as of	Case definition	Number of cases		Number of deaths	
			Cumulative	Cumulative	Cumulative	Cumulative
Guinea	24 January 2015	Confirmed	2559		1574	
		Probable	332		332	
		Suspected	18		Not available	
		<b>Total</b>	<b>2909</b>		<b>1906</b>	
Liberia	20 January 2015	Confirmed	3136		Not available	
		Probable	1854		Not available	
		Suspected	3534		Not available	
		<b>Total</b>	<b>8524</b>		<b>3636</b>	
Sierra Leone	24 January 2015	Confirmed	7963		2829	
		Probable	287		208	
		Suspected	2241		158	
		<b>Total</b>	<b>10 491</b>		<b>3195</b>	
<b>All countries</b>		<b>Total</b>	<b>21 924</b>		<b>8737</b>	

Figura 6. Distribuzione geografica e numerica aggiornata al 26 gennaio 2015 dell'epidemia di febbre emorragica da Ebola in corso [10].

#### 1.1.1.4 SINTOMATOLOGIA CLINICA

Il periodo di incubazione dell'EVD che va dall'infezione alla comparsa dei sintomi varia da 2 a 21 giorni, in media 4-10 giorni, e l'esordio è improvviso. Le manifestazioni emorragiche caratterizzate dalla fuoriuscita di sangue dalle varie mucose sono state osservate solo nel 41 % dei pazienti, e spesso non compaiono nelle evoluzioni fatali. Le prime manifestazioni cliniche sono aspecifiche: febbre, cefalea, dolori muscolari, nausea e vomito. Successivamente si aggiungono sintomi indicanti l'interessamento multisistemico come sistema nervoso con prostrazione e depressione mentale, gastrointestinale con anoressia, grave diarrea e dolore addominale, respiratorio con dolore toracico, difficoltà respiratorie e tosse, vascolare con emorragia alla congiuntiva ipotensione ed edema.

Dopo 4-7 giorni dalla comparsa dei primi sintomi si ha la fase acuta con *rash* maculo-papulare seguito da desquamazione, petecchie ed ecchimosi.

A questo stadio della malattia possono insorgere le manifestazioni emorragiche caratterizzate da sanguinamento dalla congiuntiva, epistassi, perdita di sangue dall'apparato digerente. Nello stadio terminale i pazienti sviluppano un sensibile aumento della frequenza respiratoria, anuria, shock diffuso e diminuzione considerevole della temperatura corporea. Il decorso fatale è anche caratterizzato da shock, perdita dei fluidi e coagulazione intravascolare disseminata.

A 10-12 giorni può scomparire la febbre con un netto miglioramento del quadro clinico fino alla guarigione del paziente. In altri casi si può aggravare la situazione di convalescenza con la ripresa delle febbre per infezioni batteriche secondarie o per la persistenza del virus.

Il virus è rilevabile dalla comparsa dei sintomi in tutti i fluidi corporei e permane anche dopo la loro scomparsa [3,11].

#### 1.1.1.5 DIAGNOSI

La diagnosi della EVD non può essere basata solamente sull'osservazione della sintomatologia poiché è molto simile a quella di altre patologie, soprattutto nelle zone endemiche per la malaria, per la febbre di Lassa e per altre febbri emorragiche.

La diagnosi di laboratorio è condotta in centri di riferimento, e quindi i campioni vanno inviati a questi centri con un'apposita procedura per il trasporto dei campioni potenzialmente infettivi per la presenza del virus Ebola.

La diagnosi di laboratorio si basa essenzialmente su:

1. test sierologici per la valutazione della risposta immunitaria specifica dell'ospite;
2. ricerca di particelle virali o porzioni di esse.

Per quanto riguarda la valutazione della risposta immunitaria vengono quantificate le immunoglobuline IgG e IgM con il saggio immunoenzimatico ELISA. Le IgG compaiono tra i 6 e i 18 giorni dalla comparsa dei sintomi e persistono per molti anni, mentre le IgM compaiono più precocemente, a 2 giorni dalla comparsa dei sintomi, ma spariscono tra 30 e 160 giorni

dall'infezione. Questi test hanno il vantaggio che possono essere condotti su campioni in cui il virus è stato inattivato con raggi gamma o con il calore.

I test più usati sono l'RT *Real Time* PCR per la ricerca dell'RNA virale, e il saggio ELISA che quantifica gli antigeni virali. Gli antigeni e gli acidi nucleici virali possono essere rilevati da 3 a 7-16 giorni dopo la comparsa dei sintomi, e nel caso della rilevazione degli acidi nucleici è possibile rendere il campione non infettivo.

I test di conferma sono:

- l'isolamento virale, che rimane il *gold-standard*, ma non di facile utilizzo poiché servono strutture di biosicurezza di livello 4,
- microscopia elettronica e immunoistochimica da tessuti,
- *western blot* ed immunofluorescenza indiretta con siero per rilevare gli anticorpi.

Il grosso problema della diagnosi nelle zone endemiche è che i focolai compaiono in zone remote dell'Africa di difficile monitoraggio e raggiungimento, così come vi sono ostacoli culturali che non consentono ai medici di prestare assistenza e diagnosticare la patologia.

### 1.1.1.6 TRATTAMENTO

Il contenimento dell'infezione si basa principalmente sull'isolamento dei pazienti con l'uso di barriere fisiche e con personale correttamente addestrato, così da regolamentare il contatto con i pazienti infetti ed impedire la trasmissione negli ospedali. Nei paesi africani il rischio di contagio deriva anche dai cadaveri se non manipolati e tumulati adeguatamente.

Negli ultimi anni con il ritorno in auge del virus Ebola è aumentato l'interesse da parte del governo americano a trovare un modo per combattere l'infezione, visto che il virus potrebbe essere usato anche come arma bioterroristica [12]. I trattamenti disponibili prima dell'epidemia in corso erano basati esclusivamente su terapie di supporto per alleviare i sintomi. Tra questi ritroviamo il trattamento con analgesici, con anti-piretici e il reintegro di liquidi, e in ogni caso si trattano specificatamente i singoli sintomi man mano che compaiono. Vengono soprattutto usati anti-malarici e antibiotici a largo spettro per contrastare le infezioni opportunistiche. Inoltre, si cerca di mantenere costante il volume sanguigno e il livello elettrolitico. Tutto questo comunque aumenta la sopravvivenza dei pazienti infetti [3].

I trattamenti vengono somministrati prima della conferma di laboratorio dell'infezione da virus Ebola, che nelle zone endemiche non sempre è disponibile.

Recentemente sono stati proposti una serie di trattamenti potenziali per il controllo della EVD. Tra i vari trattamenti attualmente in validazione diretti contro il virus Ebola si annoverano:

- i trattamenti basati sull'RNA per interferire con la trascrizione e la replicazione virale. Questi sistemi hanno dato risultati promettenti in roditori e primati non umani infettati con la specie *Zaire ebolavirus* [13]. Tuttavia bisogna conoscere la sequenza della specie responsabile del focolaio in corso, quindi non possono essere messi in atto prima dell'identificazione della specie virale causa di un determinato focolaio. A livello di

silenziamento genico troviamo l'AVI-7537 basato su oligomeri di morfolino contro la proteina virale VP24 [14-16]. Mentre è stata bloccata la sperimentazione del TKM-Ebola per l'insorgenza di effetti collaterali, ed era basato su *small interfering* RNA specifici contro gli mRNA delle proteine virali L, VP24 e VP35 [10];

- piccole molecole interferenti con la replicazione e la trascrizione, Favipiravir e BCX-4430, che sono analoghi nucleosidici descritti nel paragrafo 1.1.3.4 [14,16];
- sangue o siero di persone guarite dall'infezione ma l'efficacia è dibattuta quindi si usa in combinazione con altre tipologie di trattamento [17,18]. Tuttavia il trattamento con il siero prelevato dai pazienti guariti spontaneamente durante l'epidemia in corso è stato approvato dall'OMS per trattare i nuovi casi [19];
- anticorpi ricombinanti, tra i quali lo ZMapp che è una combinazione di tre anticorpi monoclonali umanizzati, prodotti in piante di tabacco geneticamente modificate, e riconosce tre diversi epitopi della proteina virale di superficie GP. Questo trattamento è stato testato su macachi che mostravano segni clinici avanzati dando ottimi risultati, ed è attualmente in *trial* clinico [20].

Progressivamente si sta aprendo la strada all'uso di qualsiasi trattamento che abbia ottenuto buoni risultati *in vivo* o solo *in vitro* per cercare di fermare in qualche modo questa devastante epidemia.

Per quanto riguarda la prevenzione della malattia, il basso interesse delle industrie farmaceutiche e i costi di questa tipologia di ricerca non hanno promosso lo sviluppo di vaccini. Anche per i vaccini, come per gli trattamenti i crescenti casi negli ultimi dieci anni, il rischio di esposizione in laboratorio e il potenziale impiego del virus come arma bioterroristica hanno cambiato lo scenario dello sviluppo di vaccini. Solo pochi vaccini hanno passato la validazione in due modelli animali, tra cui primati non umani, e saranno quindi sottoposti a *trial* clinici. Questi vaccini sono basati su virus inattivati, virus vivi ma attenuati e particelle simil-virali (VLP).

- Tra i virus inattivati troviamo i vettori adenovirali di tipo 5 esprimenti le glicoproteine GP delle diverse specie di virus Ebola [21,22]. Un vaccino di questo tipo e codificante la GP della specie *Zaire ebolavirus* ha dato ottimi risultati in primati non umani, quindi l'OMS ne ha approvato l'uso nell'epidemia in corso [19,23]. Più recente è l'ingegnerizzazione con la *reverse genetics* del virus Ebola che viene inattivato eliminando un gene essenziale per la replicazione, ma la sua sicurezza è ancora in corso di valutazione [24].
- Per quanto riguarda i virus vivi attenuati sono più potenti nell'attivazione della risposta immunitaria ma non sono fattibili per questo virus vista la sua pericolosità. Sono stati quindi sviluppati virus ricombinanti basati sul VSV, altamente efficaci in primati non umani, sia come profilassi che come trattamento post-esposizione, e sul virus parainfluenzale umano [25,26]. Per quanto riguarda i vaccini basati sul VSV, è in sperimentazione un vaccino prodotto dalla Glaxo Smith & Kline [19,27].
- Particelle-simil virali (VLP) (descritte nel paragrafo 1.1.2.1) composte dalla proteina di matrice VP40 e dalla GP e sono già state testate in roditori e primati non umani nei quali inducono fortemente la risposta immunitaria [22]. Su questo approccio si basano vaccini

già largamente usati tra cui uno dei più recenti è utilizzato contro il papilloma virus umano (Gardasil).

## 1.1.2 STRUTTURA DEL VIRUS EBOLA

Il virus Ebola è un virus provvisto di pericapside lipidico di forma filamentosa la cui lunghezza può arrivare fino ad 1  $\mu\text{m}$ , ed un diametro di 80 nm. Nel virione maturo troviamo la glicoproteina GP inserita nel pericapside lipidico e, procedendo verso l'interno, la matrice formata in gran parte dalla proteina VP40 ed in minor quantità dalla proteina VP24, a circondare il nucleocapside. Il nucleocapside è un complesso ribonucleoproteico costituito principalmente dalla proteina NP e dalle proteine VP30, VP35 ed L (Fig. 7). Il genoma è costituito da un'unica molecola di RNA a singolo filamento a polarità negativa di circa 19 kb, anche se in alcuni virioni sono state trovate più copie del genoma, virioni poliploidi.

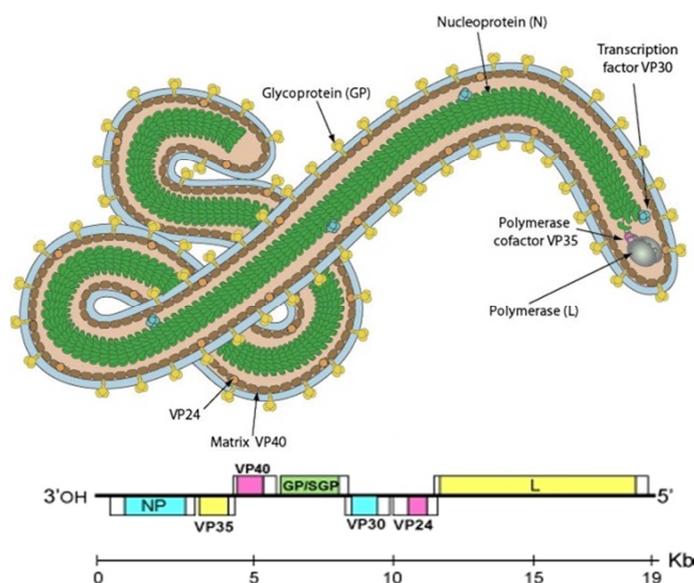


Figura 7. Struttura della particella virale e organizzazione del genoma.

### 1.1.2.1 PROTEINE ASSOCIATE AL PERICAPSIDE

#### LA GLICOPROTEINA GP

La glicoproteina virale GP è una glicoproteina transmembrana di classe I che si trova sulla superficie del virione costellandola di peplomeri di GP inseriti nel pericapside lipidico.

La GP è essenziale sia nel ciclo replicativo virale che nella patogenesi per il suo ruolo nell'avviare l'infezione della cellula ospite, la sua influenza sulla patogenesi, la sua antigenicità e le sue proprietà immunogeniche utili allo sviluppo di vaccini.

È una proteina altamente N- ed O-glicosilata e le specie di ebolavirus (EBOV) ne codificano due forme, una strutturale transmembrana e una non strutturale solubile, originate da due *open-reading frames* (ORF). Questa è una peculiarità delle specie EBOV, mentre la specie *marburgvirus* (MARV) codifica soltanto la forma strutturale. Inoltre, solo in EBOV, il prodotto primario dell'ORF *gp* non è la forma strutturale che troviamo sul pericapside virale ma la forma solubile non strutturale della GP, sGP, nell'80 % dei casi.

La GP strutturale (GP) è espressa solo in seguito ad una modifica trascrizionale a livello di 7 nucleotidi adeninici contigui a formare una forcina [28]. Su questa struttura secondaria la polimerasi L fatica a procedere con la trascrizione ed inserisce un'adenina nel trascritto. Lo slittamento del *frame* di lettura porta ad un allungamento del trascritto dell'ORF originaria con un prodotto di 676 aminoacidi, il precursore della GP (pre-GP o GP<sub>0</sub>) [28,29]. Per questo motivo la GP e la sGP, hanno una regione conservata di 295 aminoacidi all'N-terminale ma, come risultato del *frameshift*, differenti C-termini (Fig. 8). La differenza nella porzione C-terminale porta a diverse proprietà strutturali tra cui la mancanza della porzione transmembrana, in questo modo la sGP non è ancorata alla membrana ma è solubile nel citosol, e si ritrova come omodimero per un diverso *pattern* di legami disolfuro [28]. Questo meccanismo per l'espressione di una proteina virale è già stato osservato per la fosfoproteina P dei paramyxovirus ma mai per una glicoproteina [30].

Recentemente è stato osservato anche l'inserimento di 2 adenine, nel 5 % dei casi, portando ad un ulteriore slittamento del *frame*, con espressione di un'altra forma non strutturale della GP, la forma piccola solubile della GP (ssGP) (Fig. 8) [31,32].

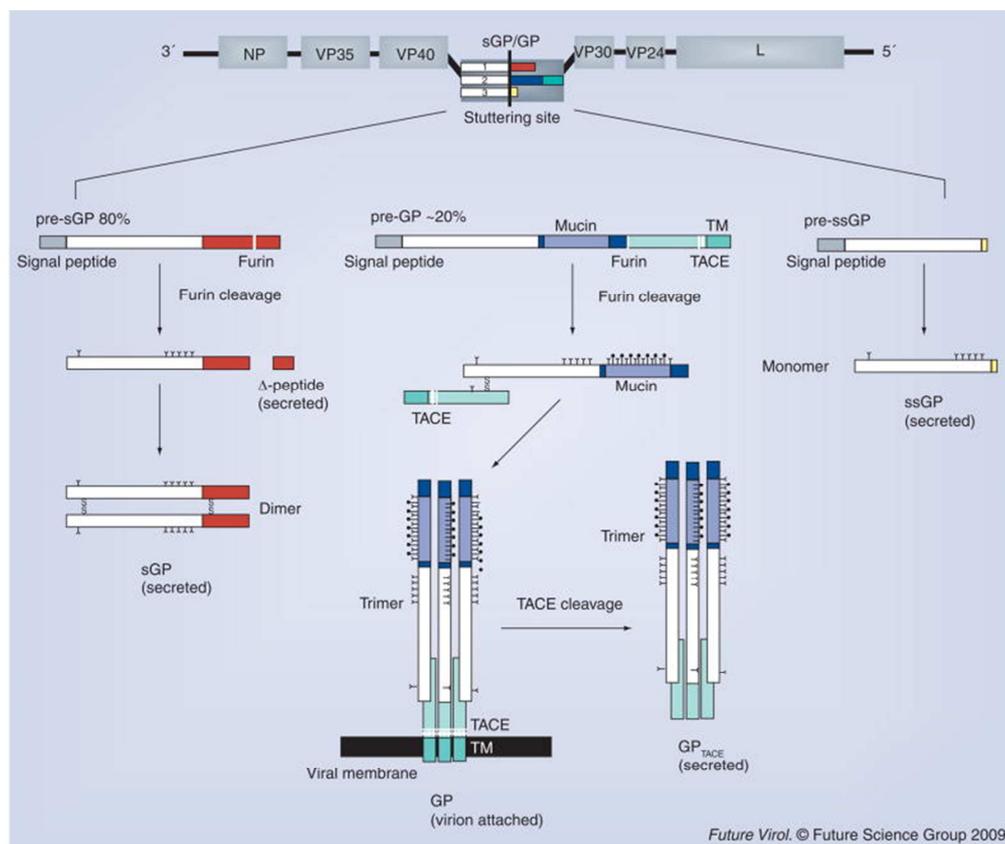


Figura 8. Diverse forme della GP del virus Ebola [28].

La GP<sub>0</sub> *neo* sintetizzata è traslocata al reticolo endoplasmatico da una sequenza segnale sita all’N-terminine, ed ancorata nella membrana da un dominio transmembrana sito vicino al C-terminine mostrandone una porzione citoplasmatica C-terminale molto corta (3 residui amminoacidici per EBOV e 7 residui per MARV). La GP<sub>0</sub> è quindi trasportata attraverso il reticolo endoplasmatico e l’apparato di Golgi dove va incontro a modifiche post-traduzionali: N- ed O-glicosilazione, quest’ultima soprattutto a livello di una regione particolare della sequenza amminoacidica, la regione simil-mucina (MLR) descritta successivamente in questo paragrafo (Fig. 9). Un’altra modifica post-traduzionale a cui va incontro la GP<sub>0</sub> è il taglio proteolitico catalizzato dalla proteasi cellulare furina, nel *trans-Golgi network*, a livello di un motivo amminoacidico basico in prossimità dell’estremità carbossilica. Questo taglio porta alla liberazione di due subunità: GP<sub>1</sub>, la più grande, di 130 kDa e comprendente la porzione amino-terminale, e GP<sub>2</sub>, la più corta, di 24 kDa e comprendente la porzione carbossi-terminale (Fig. 8 e 9). Le due subunità rimangono associate da legami ponti disolfuro a formare un eterodimero di 150 kDa. La GP matura è infine trasportata alla membrana plasmatica dove si inserisce preferenzialmente a livello dei *raft* lipidici [33]. Ciascuna subunità ha una sua specifica funzione: la GP<sub>1</sub> media l’adesione alla cellula ospite ed è coinvolta nelle fasi di internalizzazione, la subunità GP<sub>2</sub> è invece la porzione fusogena contenendo la regione che andrà ad inserirsi nella membrana endosomiale della cellula ospite [34]. L’eterodimero GP<sub>1</sub>-GP<sub>2</sub> si associa in trimeri di 450 kDa, grazie alla presenza di un motivo di trimerizzazione presente nella GP<sub>2</sub>, formando così i complessi glicoproteici presenti sul pericapside virale. L’enzima cellulare TACE è in grado di tagliare i trimeri di GP a livello di un motivo amminoacidico vicino alla regione transmembrana, in questo modo si ha il rilascio nell’ambiente extracellulare della porzione extracellulare, chiamata *shed* GP (Fig. 8) [31,35].

La GP<sub>1</sub> matura consta di tre domini (Fig. 9):

1. la regione putativa di legame al recettore (RBR) che media il legame con il recettore sulla cellula ospite. La regione RBR è altamente conservata tra le diverse specie di EBOV mentre è poco conservata tra EBOV e MARV sebbene competano per gli stessi recettori [36].
2. il cappuccio glicanico N-glicosilato,
3. la regione simil-mucina (MLR) altamente O-glicosilata.

La GP<sub>2</sub> è formata da quattro regioni (Fig. 9):

1. *loop* fusogeno (IFL) sito vicino l’N-terminine,
2. regioni ripetute HR1 e HR2,
3. regione idrofobica transmembrana,
4. coda citoplasmatica.

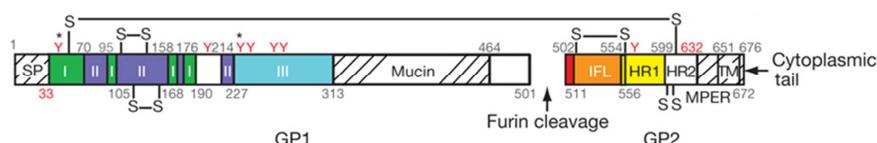


Figura 9. Struttura primaria della GP [37].

Dal momento che la GP è l'unica glicoproteina virale espressa sulla superficie del virus ha un importante ruolo nel determinare il tropismo virale. Infatti l'ampio tropismo di questo virus è conferito dalla capacità della GP di legare un ampio spettro di recettori presenti sulla superficie di molti tipi cellulari.

Recentemente, con un approccio bioinformatico, è stato dimostrato che la proteina TIM-1 potrebbe essere la candidata come recettore di superficie per i filovirus, suffragato dalle evidenze sperimentali che: TIM-1 è in grado di legare il dominio RBR della GP di Ebola, la sua espressione ectopica in cellule poco permissive ne aumenta l'infezione, la sua diminuzione in membrana inibisce l'infezione in cellule altamente permissive [36]. Comunque TIM-1 non è l'unico fattore cellulare richiesto per l'infezione di cellule permissive, infatti è stato dimostrato che il legame del dominio RBR della GP al trasportatore del colesterolo NPC-1, localizzato nella membrana degli endosomi tardivi, è responsabile dell'avvio della sequenza di eventi che culmina con la fusione della particella virale con l'endosoma e la penetrazione del virus [38,39], come descritto in dettaglio nel paragrafo 1.1.3.1.

Sia la GP di EBOV che di MARV è altamente glicosilata a livello della regione MLR con legami N- ed O-glicosidici, ma il *pattern* di catene glicaniche dipende dal ceppo virale e dalla linea cellulare usata per la propagazione. La regione MLR è altamente variabile e proprio questo fatto potrebbe determinare l'alta variabilità di glicosilazione. Tuttavia la delezione della regione MLR non inficia l'infezione *in vitro* anzi, sembrerebbe aumentarne l'efficienza. Una possibile spiegazione è che l'MLR nasconderebbe l'RBR come osservato con la risoluzione della struttura cristallografica della GP. Infatti la GP deleta nell'MLR è stata usata negli studi per identificare il recettore. Invece, la glicosilazione dell'MLR ha un ruolo chiave per l'infezione delle cellule bersaglio coinvolte nella patogenesi della febbre emorragica [34]. Infatti un fattore cellulare coinvolto nell'adesione del virus alla cellula sono le lectine di tipo C (come DC-SIGN e L-SIGN) leganti proprio la regione MLR, e queste sono presenti sulle cellule bersaglio dell'infezione *in vivo*, non sulle linee cellulari comunemente usate in laboratorio. Un'altra funzione del dominio MLR è la *down*-modulazione di diverse proteine cellulari di superficie che comporta la perdita di adesione della cellula infettata *in vitro*, e per bloccare il meccanismo antivirale della cellula [40]. Tra i vari *target* c'è anche la glicoproteina transmembrana teterina (BST-2), un fattore cellulare antivirale la cui espressione è indotta in risposta all'IFN- $\alpha$ . La sua funzione è quella di ritenere sulla membrana plasmatica le particelle virali di differenti virus, tra cui retrovirus ed alcuni herpesvirus, che stanno gemmando dalla cellula infetta. In questo modo vengono ri-endocitate portando alla diminuzione del rilascio complessivo di particelle virali. La forma immatura della GP non ancora completamente glicosilata nel dominio MLR interagisce con BST-2 impedendo che quest'ultima si localizzi in membrana plasmatica neutralizzandone così il ruolo antivirale [41]. È stato osservato che la GP, in cellule che esprimono solo questa proteina virale, è in grado di essere rilasciata dalla cellula ospite in forma trimerica in vescicole amorfe ma non è ancora chiaro il meccanismo alla base di questo fenomeno ed il suo eventuale ruolo nella patogenesi [42].

Per quanto riguarda la GP<sub>2</sub> è essenziale nello *step* finale dell'ingresso del virus nella cellula ospite come descritto nel paragrafo 1.1.3.1. Il suo *loop* fusogeno garantisce l'ancoraggio della GP alla membrana endosomiale della cellula ospite grazie ad una sequenza di aminoacidi idrofobici che ne consente l'inserimento nel doppio strato lipidico. Mentre le regioni epta-ripetute HR1 e HR2 della GP<sub>2</sub> sono molto importanti per la loro struttura secondaria, infatti sono proprio le

variazioni nel loro stato che portano all'avvicinamento delle due membrane con la sequenziale fusione delle stesse [28].

Il prodotto primario dell'ORF GP è altamente conservato tra le diverse specie di EBOV e codifica la sGP, proteina non strutturale di 364 aminoacidi altamente N- ed O-glicosilata, che invece non è presente nei MARV. Post-traduzionalmente il precursore pre-sGP va anch'esso incontro al taglio proteolitico catalizzato dalla furina, con liberazione di un piccolo frammento secreto dalla cellula chiamato peptide  $\Delta$  altamente O-glicosilato (Fig. 8). Monomeri di sGP si associano parallelamente con ponti disolfuro formando un omodimero di 110 kDa secreto dalla cellula infetta (Fig. 8) [28]. Gli omodimeri di sGP secreti nel torrente circolatorio hanno un ruolo chiave nella patogenesi dell'EVD in quanto:

- sequestrano anticorpi neutralizzanti la GP avendo una porzione in comune,
- hanno un ruolo nella regolazione dell'infiammazione e della funzionalità endoteliale dei vasi sanguigni,
- inattivano i neutrofili,
- inducono l'apoptosi dei linfociti [43].

La ssGP comprende i primi 295 aminoacidi N-terminali della sGP e della GP ma differisce per l'estremità carbossilica. Anch'essa è secreta dalla cellula infetta. È altamente N-glicosilata e, come per la sGP, si trova in forma dimerica per la presenza di legami ponte disolfuro (Fig. 8). Da evidenze sperimentali non condivide le funzioni antinfiammatorie della sGP ma non è ancora noto il suo ruolo nella patogenesi dell'EVD [32].

## LA PROTEINA DI MATRICE VP40

La proteina maggiore di matrice VP40 è la proteina più abbondante nel virione del virus Ebola che assieme alla VP24 va a costituire la matrice (Fig. 7).

VP40 è una proteina di 326 aminoacidi e si suddivide in due domini strutturalmente simili, collegati da una regione flessibile, che interagiscono tra loro per stabilizzare la struttura monomerica (Fig. 10) [33]. Sia la VP40 di MARV che la VP40 di EBOV si associano saldamente alle membrane cellulari, in particolare alla fosfatidil serina di cui ne sono ricchi i *raft* lipidici, grazie ad motivo di 18 aminoacidi sito nel dominio C-terminale [44]. Scianimanico e colleghi hanno osservato che il legame della VP40 con il doppio strato lipidico innesca la sua auto-oligomerizzazione, attraverso la destabilizzazione dei legami interni al monomero tra i suoi due domini a favore del legame con altre VP40, e che proprio il dominio N-terminale è coinvolto nell'oligomerizzazione [45]. La forma citosolica si trova quindi come monomero, mentre la forma oligomerica si ritrova associata a livello dei *raft* lipidici. Tuttavia all'interno del virione non si ritrovano le forme oligomeriche indicandone il ruolo transiente durante il ciclo replicativo e non un ruolo strutturale nel virione maturo [46]. È stato osservato in molti altri virus, come il virus del morbillo ed il virus Nipah, che anche in questi la proteina di matrice tende ad oligomerizzare sebbene l'implicazione nel ciclo replicativo rimanga tuttora sconosciuta [45]. Principalmente i monomeri di VP40 si autoassociano in omoesameri e omoottameri a partire da omodimeri (Fig. 10).

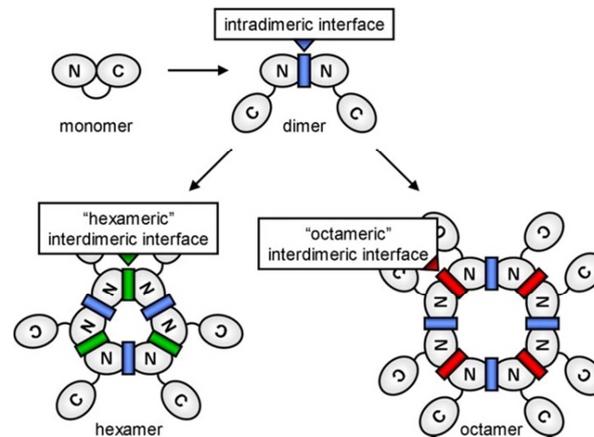


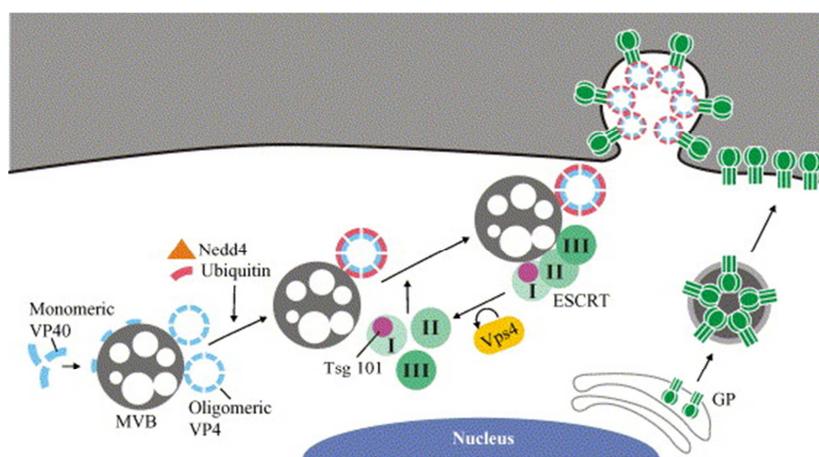
Figura 10. Oligomerizzazione della VP40 [47].

La forma esamerica è coinvolta nell'assemblaggio delle particelle virali, così come nell'incorporazione del nucleocapside, conferendo a questa forma un ruolo importante nell'assemblaggio delle nuove particelle virali [45,48]. Mentre la forma ottamerica è in grado di legare l'RNA virale indispensabile nel ciclo replicativo del virus Ebola e precisamente nella regolazione della trascrizione genica virale. Infatti in presenza di mutanti della VP40 che non legano più l'RNA non vengono prodotte particelle [47]. L'interazione con l'acido ribonucleico non si verifica invece per la VP40 di MARV, rimanendo quindi una peculiarità di EBOV [33].

La VP40 funge anche da regolatore negativo della replicazione del genoma ma indipendentemente dal suo stato di oligomerizzazione [45,49].

Oltre alla regolazione delle fasi interne del ciclo replicativo la VP40 è essenziale anche per la morfogenesi delle particelle virali: assemblaggio e gemmazione delle particelle dalla membrana plasmatica della cellula ospite (Fig. 11). Infatti la sua espressione in cellule di mammifero è in grado di originare particelle simil-virali (VLP) dotate di pericapside che gemmano dalla membrana plasmatica senza richiedere l'ausilio di altre proteine virali, sebbene queste ne potenzino la produzione come nel caso della presenza della GP [50-52]. Questo indica che la VP40 è il determinante morfologico primario della formazione delle particelle, e tutte le informazioni richieste risiedono nella sua sequenza proteica. Per garantire questo processo, la VP40 oligomerica si associa a livello dei *raft* lipidici, piattaforme implicate nell'assemblaggio e gemmazione di molti virus tra cui Ebola, dove si localizza anche la GP trimerica neo-sintetizzata e ha luogo la gemmazione delle particelle virali. La proprietà della VP40 nel costituire da sola VLP che gemmano dalla membrana plasmatica è derivata dalla presenza nella sua sequenza aminoacidica di un piccolo motivo tetraminoacidico ricco in prolina definito *late domain*, presente anche in proteine di molti altri virus, come i retrovirus a livello del Gag che possiedono anch'essi la capacità di formare VLP [53]. La VP40 di MARV e di EBOV contengono il *late domain* PPXY al loro N-terminale ma EBOV possiede anche un altro *late domain*, il motivo PTAP. Il motivo PTAP di EBOV si ritrova sovrapposto con il PPXY a formare la sequenza PTAPPEY, costituendo così il più forte *late domain* conosciuto. Infatti la delezione completa di questa sequenza blocca completamente il rilascio di VLP. Questo motivo esercita la sua funzione interagendo con proteine della cellula ospite riconosciuto da specifici domini: il PPXY interagisce con il dominio WW dell'ubiquitina ligasi Nedd4, mentre il PTAP con il dominio UEV di Tsg101, componente del complesso di *sorting* delle proteine agli endosomi (ESCRT). Rispetto all'interazione con Nedd4

che avviene solo con la forma oligomerica, l'interazione tra VP40 e Tsg101 avviene sia con la forma oligomerica che con la forma monomerica, anche se poi è la sola forma oligomerica che esercita il ruolo funzionale (Fig. 11) [54]. Importante per la funzionalità di VP40 nella gemmazione delle particelle è anche la sua ubiquitinazione catalizzata da Nedd4 aiutando a stabilizzare il legame con Tsg101 in grado di legare anche l'ubiquitina (Fig. 11) [55]. Tsg101 è un componente del complesso ESCRT-I che, assieme agli altri 2 complessi ESCRT, ESCRT-II ed ESCRT-III, fisiologicamente avviano alla degradazione lisosomiale proteine transmembrana marcate con l'ubiquitina [56]. Mentre il virus Ebola, come molti altri virus, usurpa questo macchinario cellulare per l'assemblaggio e gemmazione di nuove particelle virali (Fig. 11) [53]. Infine, l'ATPasi Vps4 catalizza la dissociazione dei complessi ESCRT alla fine del processo richiesta nel rilascio delle VLP di Ebola (Fig. 11) [54].



**Figura 11. Modello della gemmazione del virus Ebola mediata dalla VP40.** La forma monomerica della VP40 si lega attraverso l'estremità carbossilica ai lipidi di membrana, tra cui le membrane dei MVB dove, in seguito all'associazione con la membrana, auto-oligomerizza. Nedd4 lega il motivo PPXY della VP40 catalizzandone la monoubiquitinazione. Tsg101, assieme agli altri componenti del complesso ESCRT-I, riconosce e lega la monoubiquitinazione, processo favorito anche dal motivo PTAP. Il complesso ESCRT-II, già associato sulla membrane dei MVB, recluta il complesso ESCRT-III. Alla membrana plasmatica il complesso VP40/MVB/ESCRT è direzionato a livello dei *raft* lipidici dove è localizzata anche la GP trimerica. ESCRT-III induce la curvatura e la strozzatura della membrana per rilasciare le particelle virali. A questo punto l'ATPasi Vps4 induce la dissociazione dei complessi ESCRT dalla membrana plasmatica per essere nuovamente utilizzati [30].

Recentemente è stato osservato che la VP40 è in grado di penetrare nella regione idrofobica della membrana plasmatica, ed indurre la curvatura della stessa. In questo modo favorirebbe la curvatura indotta dal complesso ESCRT-III [57].

La proteina VP40 ha anche un ruolo secondario nell'avvio e coordinazione della formazione del nucleocapside assieme alla VP24 interagente con la proteina NP [33,48,50]. Inoltre direziona il trasporto alla membrana plasmatica dei nucleocapsidi *neo* formati interagendo con i microtubuli [58].

### 1.1.2.2 PROTEINE ASSOCIATE AL NUCLEOCAPSIDE

La proteina **VP35**:

- funge principalmente da co-fattore per la polimerasi virale L prendendo quindi parte alla sintesi dell'RNA virale [59];
- è anche in grado di legare l'RNA a doppio filamento, infatti proprio grazie a questa sua capacità va ad inibire la trascrizione del gene dell'IFN- $\beta$  sopprimendo in questo modo la risposta antivirale della cellula ospite [6];
- recentemente è stato osservato il suo ruolo nell'assemblaggio del nucleocapside promuovendo l'interazione tra le proteine virali NP e VP30 [60].

La proteina **L**:

- è la componente catalitica della RNA polimerasi virale RNA-dipendente;
- ha attività di *capping* e metiltransferasica;
- lega l'RNA templato, i ribonucleosidi trifosfati e catalizza il legame fosfodiesterico;
- assieme alla VP35 presiede l'attività di trascrivere e replicare il genoma virale [61].

La nucleoproteina maggiore **NP**:

- è la componente di base del nucleocapside virale, assieme alle proteine VP30 e VP24 [62];
- è in grado di autoassemblarsi formando così delle strutture simili al nucleocapside [63];
- è in grado di legare l'RNA virale a singolo filamento, andando a costituire i corpi di inclusione perinucleari caratteristici delle cellule infettate. Infatti, riconoscendo specifici motivi sull'RNA ne guida l'incapsidazione del genoma all'interno della particella virale in formazione [60].

La nucleoproteina minore **VP30**:

- ha un ruolo strutturale andando a formare il nucleocapside assieme alle altre proteine virali;
- funge da attivatore trascrizionale dell'RNA virale;
- promuove la replicazione del genoma virale aumentando la stabilità del complesso sia interagendo con la polimerasi che con l'RNA virale [64,65].

La proteina minore di matrice **VP24**:

- possiede proprietà di una proteina integrale di membrana e oligomerizza in omotetrameri [33];
- prende parte all'assemblaggio del nucleocapside, assieme alla VP40, e all'indirizzamento al sito di gemmazione anche se il meccanismo non è noto [30,62,66,67];
- ha un'azione regolatoria negativa sulla trascrizione e replicazione del genoma [49];

- agisce in sinergia con la VP35 per reprimere la via di *signalling* attivata dall'interferone [7].

### 1.1.3 IL CICLO REPLICATIVO

Il ciclo replicativo del virus Ebola non è ancora ben chiaro, soprattutto le fasi che avvengono dopo la fusione della particella virale fino all'assemblaggio e gemmazione (Fig. 12).

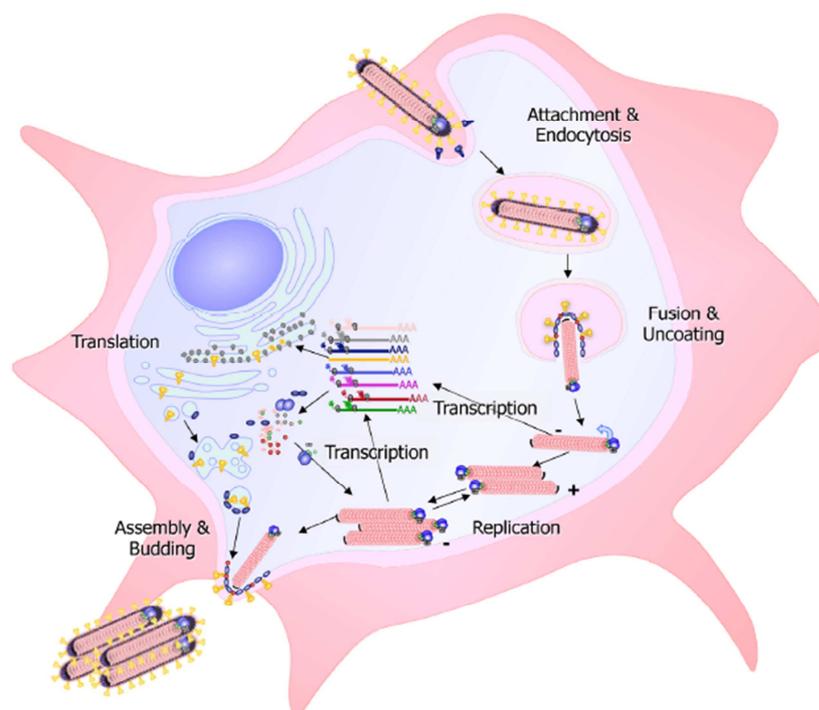


Figura 12. Ciclo replicativo del virus Ebola [68].

#### 1.1.3.1 INGRESSO

Il primo *step* del ciclo replicativo è il legame del virus alla superficie della cellula ospite. Le cellule bersaglio dell'infezione del virus Ebola *in vivo* sono principalmente monociti-macrofagi e cellule dendritiche, tuttavia il virus presenta un ampio tropismo per molti tipi cellulari che sono infettati nel corso della progressione della febbre emorragica. E' stato dimostrato *ex-vivo* ed *in vivo* che le cellule permissive all'infezione comprendono, oltre alle cellule del sistema immunitario suddette, cellule endoteliali, fibroblasti, epatociti e cellule epiteliali [3].

I virus richiedono fattori cellulari di legame e/o recettori cellulari per legarsi alla cellula ospite: un fattore di legame serve solo per lo *step* di adesione, mentre i recettori sono definiti come

molecole sulla superficie cellulare che promuovono l'internalizzazione della particella virale, o che inducono la penetrazione e rilascio del genoma nel citoplasma della cellula. Il virus Ebola è in grado di interagire con molti fattori di legame come DC-SIGN, L-SIGN e integrine  $\beta 1$  (Fig. 13) [34,69]. Queste molecole hanno il ruolo di aumentare l'adesività del virus alla cellula ma non fungono da recettore che promuove l'internalizzazione del virus, infatti, se espresse in cellule non suscettibili all'infezione non consentono la penetrazione virale nella cellula [40,70]. Nuove evidenze indicano che TIM-1 potrebbe essere il recettore coinvolto nell'infezione delle cellule epiteliali, ma non è ancora chiaro come sia in grado di promuovere l'internalizzazione [71]. Come spiegato nel paragrafo 1.1.3.1 la proteina virale deputata al riconoscimento del fattore di legame e del recettore è la glicoproteina GP, in particolare grazie al suo dominio RBR (*receptor-binding domain*).

Recentemente è stato osservato che esiste un ulteriore meccanismo di internalizzazione delle particelle virali che non richiede la glicoproteina virale, ed è mediato dai recettori cellulari della fosfatidil serina, detti *PtdSer-mediated virus entry enhancing receptors* (PVEER). Questo meccanismo prevede che la fosfatidil serina nel doppio strato lipidico del pericapside virale sia riconosciuta dai recettori PVEER allo stesso modo dei corpi apoptotici, e che quindi le particelle virali siano internalizzate dalla cellula. TIM-1 è stato identificato e caratterizzato come uno di questi PVEER, in aggiunta al suo funzionamento come recettore per EBOV descritto nel paragrafo 1.1.2.1 [72]. Questo nuovo meccanismo è di fatto indipendente dalla glicoproteina virale e dalla presenza o meno della stessa, e quindi dal tipo di virus. Il virus sarebbe in questo modo in grado di bypassare una prima barriera all'infezione e cioè la presenza o meno del suo specifico recettore [72].

Un altro meccanismo di internalizzazione del virus indipendente dal tipico legame con il recettore/co-recettore è l'ADE (*antibodies-dependent enhancement*) ma in questo caso vede coinvolta la GP, in particolare la regione MLR. Attraverso l'ADE molti virus usano gli anticorpi, che dovrebbero contrastare la loro infezione, per essere efficientemente internalizzati dalla cellula ospite. Nel caso del virus Ebola questo è possibile con anticorpi anti-GP non neutralizzanti che riconoscono epitopi localizzati soprattutto nella regione MLR. Questi anticorpi da un lato riconoscono la GP e dall'altro si legano al recettore cellulare per la porzione Fc (FcR) o alla componente del complemento C1q che successivamente si lega al suo specifico recettore cellulare C1qR, consentendo così il legame del virus alla cellula e la sua successiva internalizzazione. L'FcR è espresso solo in cellule del sistema immunitario tra cui monociti-macrofagi, mentre il C1qR è stato identificato in molti altri tipi cellulari, suggerendo un ampliamento del tropismo virale grazie all'ingresso GP dipendente mediato dall'ADE [34].

In seguito al legame con la superficie cellulare i virioni vengono internalizzati attraverso un meccanismo di macropinosi, proseguono lungo il *pathway* endocitico, e giungono a livello degli endosomi tardivi (LE) [73,74]. Il processo di internalizzazione inizia con la formazione di increspature della membrana plasmatica, guidate dall'actina, fino ad inglobare in vescicole grossi volumi di matrice extracellulare. Molti fattori cellulari e vie di trasduzione del segnale sono coinvolti nella regolazione dell'avvio della macropinosi del virus Ebola come il membro della famiglia del recettore Tyrosin chinasi Axl, il fosfatidil inositolo 3 fosfato (PI3K) e Akt, e la presenza di sfingomielina [75-78]. Il recettore Axl è stato dimostrato non interagire direttamente con la GP per mediare l'endocitosi del virus (Fig. 13) nonostante la sua espressione aumenti l'efficienza di infezione in cellule permissive proprio stimolando la macropinosi [36]. La via di

trasduzione del segnale del PI3K e Akt viene attivata dalla GP nelle fasi precoci dell'infezione, infatti i recettori attivati in questa via di segnalazione sono stati dimostrati essere i fattori di ingresso per questo virus [79]. L'attivazione della via di trasduzione è richiesta per la corretta internalizzazione delle particelle virali e la sua inibizione porta all'accumulo aberrante di particelle nel citoplasma [76].

## SFINGOMIELINA E SFINGOMIELINASI ACIDA LISOSOMIALE

La sfingomielina (SM) è un lipide di membrana che si associa preferenzialmente con il colesterolo a costituire i *raft* lipidici. Il livello omeostatico di questo lipide è mantenuto dalla sintesi *ex novo*, dalla sua esocitosi in membrana, e dalla degradazione nei lisosomi ad opera dell'isoforma lisosomiale della sfingomielinasi acida (L-aSMasi). La sfingomielinasi acida è presente in due isoforme: la L-aSMasi e la forma secretoria (S-aSMasi) a seconda della localizzazione cellulare, L- nel lisosoma e S- secreta dalla cellula. Entrambe hanno come substrato il lipide SM catalizzandone l'idrolisi a ceramide e fosfocolina in ambiente acido, la forma lisosomiale forma in questo modo regioni ricche di ceramide sul lato esterno delle membrane [80,81]. È stato osservato che il locale arricchimento di ceramide promuove alterazioni fisiche della membrana per supportare la fusione e curvatura della stessa, come l'invaginazione della membrana cellulare con conseguente promozione della formazione del macropinosoma (Fig. 13), ma anche la segregazione di recettori cellulari a livello dei *raft* lipidici [80]. Grazie a queste due proprietà la ceramide è necessaria per l'internalizzazione di patogeni intracellulari come la *Neisseria gonorrhoea*, il *Trypanosoma cruzi* e il virus del Morbillo [80,82,83]. Quindi l'alterazione del livello omeostatico di ceramide può essere uno *step* su cui agire per bloccare l'infezione di questi patogeni.

La L-aSMasi è attivata in risposta a varie vie di trasduzione del segnale tra cui la via del DC-SIGN, che oltre ad attivarla ne promuove il *trafficking* dai lisosomi alla membrana plasmatica. L'attivazione transiente porta in questo modo all'accumulo di ceramide in membrana plasmatica. Infatti il virus del morbillo lega e attiva la via del DC-SIGN per promuovere la propria internalizzazione all'interno delle cellule dendritiche [80]. Il virus Ebola si lega alla membrana delle cellule in regioni ricche di SM ed induce la traslocazione della L-aSMasi dai lisosomi alla membrana plasmatica per aumentare l'efficienza di internalizzazione del virus [84].

Una volta che la particella virale è stata internalizzata nella cellula e giunge nel macropinosoma, il suo *trafficking* prosegue lungo la via endocitica attraverso gli endosomi precoci (EE) fino ai LE, positivi ai marcatori LAMP1 e Rab7, sede della fusione del virus [78]. Questo processo è guidato dalla rete dei microtubuli e dalla rete di actina (Fig. 12 e 13) [74,85]. Gli EE fondono con organelli acidi, i LE, e questo processo è controllato dalle proteine ORP1L-RILP, che assieme alla dineina e al complesso HOPS costituiscono il motore molecolare. Infatti è stato dimostrato che disaccoppiando questo complesso si può inibire l'ingresso del virus Ebola, e il complesso HOPS è uno dei fattori cellulari identificati per l'infezione del virus (Fig. 13) [38,86]. La proteina ORP1L è sensibile al livello del colesterolo locale nella membrana esterna endosomiale, se questo è basso si disaccoppia il sistema ORP1L-RILP-dineina-HOPS e non si ha la corretta fusione degli EE con i LE [86]. Nella patologia Niemann-Pick di tipo C, caratterizzata dalla perdita di funzionamento

dell'esportatore del colesterolo NPC-1 con conseguente accumulo del colesterolo all'interno dei LE, è stato osservato ha un ingrossamento e accumulo in *cluster* dei LE con conseguente alterazione del corretto *turnover* e del traffico dei LE guidato dal complesso ORP1L-RILP [87].

All'interno del LE con l'acidificazione del pH luminale si ha l'attivazione delle proteasi cellulari catepsina B e catepsina L (Fig. 13). Queste due proteasi sono essenziali per esporre il sito di legame presente sulla subunità 1 della GP (GP<sub>1</sub>) di Ebola per il suo recettore intracellulare [88]. Quindi i due fattori chiave per la penetrazione e la replicazione del virus sono il pH acido del lume endosomiale ed il taglio proteolitico della GP catalizzato dalle due catepsine, perché garantisce il legame della GP al suo recettore intracellulare e avvia la sequenza di eventi che culmina con la fusione [88,89]. Le catepsine B ed L sono cistein-proteasi endosomiali con pH ottimale attorno a 5 coinvolte nell'ingresso di altri virus come il Reovirus, mentre la sola catepsina L è richiesta per l'ingresso del coronavirus della SARS, di retrovirus come il MoMLV, e di paramyxovirus come il virus Hendra e Nipah [90-93]. Il ruolo chiave delle catepsine B ed L nell'infezione del virus Ebola è stato dimostrato con l'uso di inibitori della loro attività catalitica e con l'uso di *short interfering* RNA che ne aboliscono l'espressione [88,89]. Inoltre, il coinvolgimento nel processamento della GP<sub>1</sub> è stato confermato andando a preattivare la GP<sub>1</sub>, e quindi il virus, con la termolisina *in vitro*. Questa proteasi batterica processa la GP<sub>1</sub> ottenendo lo stesso prodotto dell'azione delle due catepsine. La preattivazione consente quindi di bypassare il blocco sulle catepsine portando ad un *rescue* dell'infezione [89]. Il processamento della GP<sub>1</sub> nell'endosoma tardivo avviene in due processi sequenziali catalizzati dalle due catepsine separatamente: primo la catepsina L taglia la GP<sub>1</sub> da 130 kDa a 50 kDa, ed infine a 20 kDa rimuovendo prima il dominio simil-mucina e poi la glicosilazione, secondo la catepsina B origina la forma finale di 19 kDa [89]. In questo modo viene esposto il sito di legame per il recettore, l'RBR. I dati di Schornberg e colleghi, e Dermody e colleghi dimostrano che il virus Ebola ha evoluto un complesso meccanismo per sfruttare le integrine, ampiamente espresse sulla superficie cellulare, per promuovere l'arrivo nei LE contenenti le catepsine attive. Oltre a regolare il legame e la trasduzione del segnale necessario per l'ingresso del virus, le integrine agiscono su *step* successivi controllando l'espressione e la preattivazione delle catepsine B ed L [89].

Nel 2011 Carette e colleghi hanno dimostrato che il recettore del virus Ebola è intracellulare, come anticipato sopra, ed è il trasportatore del colesterolo NPC-1 localizzato a livello della membrana dei LE (Fig. 13).

### **NPC-1**

Il trasportatore NPC-1 è una proteina transmembrana che media l'uscita del colesterolo da endosomi tardivi/lisosomi (LE/LY) regolandone l'omeostasi cellulare. La mutazione con perdita di funzione di questa proteina provoca la patologia di Niemann-Pick di tipo C (NPC), con effetti soprattutto a carico del sistema nervoso dove i livelli lipidici sono molto importanti soprattutto per la guaina mielinica [94].

L'ipotesi che NPC-1 funga da recettore per il virus Ebola è stata confermata dal fatto che cellule in cui è difettivo, come cellule derivanti da pazienti affetti dalla patologia NPC, sono resistenti all'infezione da Ebola, oltre che da studi di co-localizzazione tra le particelle virali

ed NPC-1, e da studi di co-immunoprecipitazione [38,39,91]. L'aver finalmente scoperto il recettore utilizzato dal virus Ebola per penetrare nel citoplasma della cellula ospite ha avviato lo studio di molecole che, interferendo con il legame o con la localizzazione del recettore, vanno ad inibire efficacemente e specificatamente l'infezione di questo virus [38,39]. Una di queste molecole è l'U18666A che blocca l'ingresso del virus nelle cellule bersaglio e quindi l'infezione, *in vitro*. L'U18666A è utilizzato come induttore del fenotipo NPC perché blocca l'uscita del colesterolo dai LE attraverso il trasportatore NPC-1, causandone l'accumulo all'interno degli stessi, aspetto fenotipico caratteristico di questa patologia, con ripercussioni sul corretto trasporto e localizzazione della proteina NPC-1 [95]. L'effetto dell'U18666A nelle cellule determina il blocco del ciclo replicativo anche di virus non direttamente correlati a NPC-1 come il virus Dengue, il virus dell'epatite C ed il virus dell'immunodeficienza umana di tipo 1 (HIV-1) [36,96,97].

Cotè e colleghi hanno dimostrato che la GP preattivata è in grado di legare NPC-1 e, utilizzando molecole che ne prevengono il legame, si blocca l'ingresso del virus [39]. Allo stato delle attuali conoscenze sono stati ipotizzati tre possibili meccanismi per avviare la fusione del pericapside virale con la membrana dell'endosoma:

1. il legame della GP<sub>1</sub> con NPC-1 insieme al pH acido sono l'innescò del cambiamento conformazionale della GP<sub>2</sub> che culmina con l'esposizione del *loop* fusogeno (IFL) e conseguente avvio della fusione;
2. il legame NPC-1-GP<sub>1</sub> è necessario ma non sufficiente ad avviare la fusione, e sono richiesti ulteriori fattori cellulari;
3. il legame NPC-1-GP<sub>1</sub> serve solo per far avvicinare la particella virale alla membrana endosomiale, dove altri fattori entrano in gioco per operare il cambiamento conformazionale della GP<sub>2</sub> e avviare la fusione.

Per alcuni virus, come il virus dell'influenza e i flavivirus, la protonazione di specifici residui aminoacidici dovuta al pH acido causa i cambiamenti conformazionali necessari all'esposizione dell'IFL che si andrà ad inserire nella membrana. Per altri virus invece, come HIV-1, questi riarrangiamenti sono innescati dal legame con il co-recettore. In altri ancora, come il virus della leucosi aviaria A, richiede sia il pH che il legame al recettore [28].

La fusione tra la membrana virale e la membrana limitante l'endosoma inizia con l'inserimento dell'IFL della GP<sub>2</sub> all'interno della membrana endosomiale, dopodiché avvengono una serie di cambiamenti conformazionali a carico della GP<sub>2</sub> che portano all'avvicinamento delle due membrane. In seguito, passando per uno stato di emifusione, si ha la formazione del poro e il suo allargamento fino a consentire il passaggio del nucleocapside al citoplasma (Fig. 13) [91]. È stato dimostrato che l'IFL non si inserisce casualmente nella membrana endosomiale ma preferenzialmente in regioni ricche di fosfatidil inositolo e colesterolo, e i cambiamenti conformazionali della GP<sub>2</sub> richiesti per i vari *step* di avvicinamento e fusione delle membrane sono calcio-dipendenti [98].

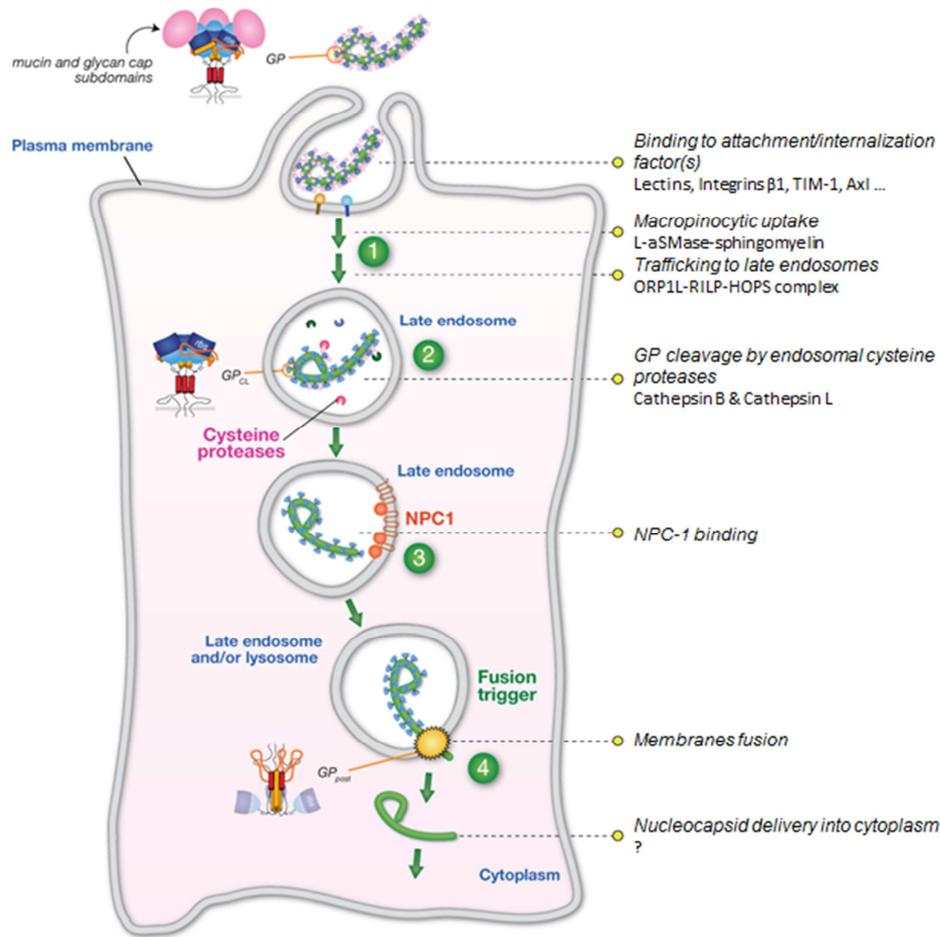


Figura 13. Fasi dell'ingresso del virus Ebola nella cellula ospite modificata da [78].

### 1.1.3.2 SINTESI PROTEICA E REPLICAZIONE DEL GENOMA

Non è ancora ben chiaro il meccanismo attraverso il quale il nucleocapside è liberato nel citoplasma ed, essendo un virus con un genoma ad RNA a polarità negativa, il primo processo che avviene nel citoplasma è la trascrizione del genoma incapsidato dalla proteina NP legante VP30, VP24 e VP35 con L, ma i meccanismi che la avviano non sono noti. Usando il genoma come template vengono prodotti mRNA monocistronici poliadenilati in direzione 3'-5' in un processo di start e stop dell'attività del complesso della polimerasi virale (L e VP35) seguendo i siti conservati di start, terminazione e poliadenilazione lungo il genoma. Le molecole di mRNA dei filovirus sono caratterizzate da lunghe regioni non codificanti alle estremità 3' e/o 5' importanti nella stabilità del trascritto, ad esempio l'estremità 5' è in grado di formare strutture secondarie a forcina coinvolte nella stabilità e nella traduzione del trascritto [2]. Infatti l'attività promuovente la trascrizione della proteina VP30 è relazionata proprio al legame di queste strutture secondarie, regolata a sua volta dallo stato di fosforilazione della proteina (se defosforilata è in grado di legare l'RNA) [99,100].

Dopo la trascrizione, l'mRNA virale viene tradotto dal macchinario cellulare e le proteine virali di nuova sintesi si accumulano a formare i corpi inclusi dove prendono parte alla replicazione del genoma [101].

La replicazione del genoma di Ebola è temporalmente e spazialmente separata dalla trascrizione, infatti inizia successivamente alla trascrizione quando è raggiunto un livello di trascritti, e quindi di proteine virali, tale da far partire la replicazione, e ha sede nei corpi inclusi citoplasmatici [101]. Con l'accumulo di proteine virali neosintetizzate, soprattutto l'aumento del livello di NP, si innesca lo *switch* dalla trascrizione alla replicazione. La replicazione ha inizio a partire dal promotore all'estremità 3' del genoma, in questo modo si ha la sintesi dell'RNA *full-length* antigenomico, a polarità positiva (Fig. 12). Le estremità del genoma virale sono complementari e portano alla formazione di strutture a forcina a ciascuna delle estremità dell'RNA genomico e antigenomico, strutture coinvolte nel processo di replicazione, come accade per altri virus ad RNA a polarità negativa non segmentati [2]. L'antigenomico così sintetizzato funge da stampo per sintetizzare nuovo RNA genomico virale ed è rapidamente incapsidato in strutture elicoidali dalle proteine virali VP24, NP e VP35 in un rapporto finemente regolato (Fig. 14). In questo *step* di incapsidazione non vi è differenza tra RNA genomico ed antigenomico, tuttavia le particelle contenenti l'antigenomico non saranno infettive [42,102]. L'accumulo di RNA *full-length* e proteine virali va a formare i corpi inclusi che compaiono 10 ore dopo l'infezione e sono caratteristici delle cellule infettate [101].

Il livello di trascrizione e replicazione è mantenuto in equilibrio dalla quantità di proteine del nucleocapside: con la loro diminuzione perché sequestrate dall'RNA *full-length* per la replicazione e per formare nuovi nucleocapsidi si ha un ritorno alla trascrizione, di contro la sintesi di nuove proteine porta alla replicazione del genoma aumentando così la quantità di trascritti prodotti (Fig. 12).

### 1.1.3.3 ASSEMBLAGGIO E GEMMAZIONE

L'assemblaggio e la gemmazione avvengono a livello dei *raft* lipidici che sono ricchi in colesterolo e sfingolipidi conferendo una diversa fluidità alla membrana plasmatica rispetto alle regioni circostanti.

Le glicoproteine GP neosintetizzate sono trasportate alla membrana plasmatica ed accumulate proprio in queste piattaforme dove hanno un'affinità maggiore alla membrana dei *raft* lipidici dovuta alla palmitoilazione della sequenza di ancoraggio alla membrana plasmatica [103]. La palmitoilazione è una modifica post-traduzionale già osservata nella glicoproteina gp160 del pericapside di HIV-1 necessaria anche in questo caso per l'associazione con i *raft* lipidici [104].

Il processamento post-traduzionale ed il *trafficking* intracellulare localizzano la VP40 neosintetizzata sulla membrana plasmatica. Come descritto nel paragrafo 1.1.2.1, la VP40 si autoassembla in particelle simil-virali (VLP) dotate di pericapside che gemmano da cellule di mammifero [33,50].

Quando si raggiunge un livello sufficiente di nucleocapsidi con RNA genomico, ma anche antigenomico, e di proteine associate al pericapside, sono trasportati a livello della membrana plasmatica, anch'essi ai *raft* lipidici, ma in minor misura anche in prossimità delle membrane interne (Fig. 12 e 14 D). Questo *trafficking* ai *raft* lipidici è guidato dall'interazione dei

nucleocapsidi con le proteine VP40 che si associano ai microtubuli (Fig. 12 e 14 D) [50,58]. È stato dimostrato che l'interazione tra la NP e la VP40 è l'unica responsabile dell'incorporazione del nucleocapside nelle particelle virali gemmanti [42].

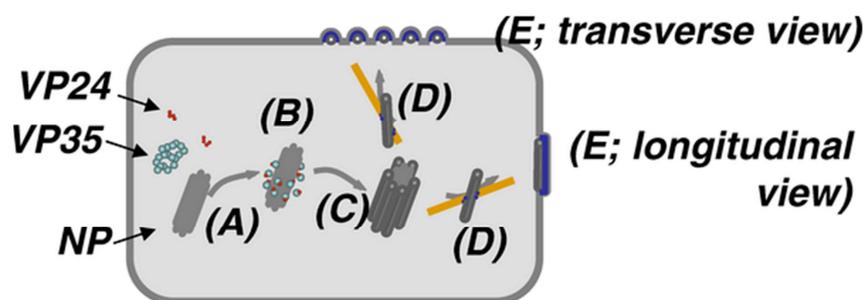
Le varie componenti strutturali del virione (nucleocapside, VP40 e GP) si localizzano a livello dei *raft* lipidici della membrana plasmatica dove può avere luogo la gemmazione delle nuove particelle virali (Fig. 12 e 14). Oltre al virus Ebola, altri virus usano i *raft* lipidici come piattaforma per l'assemblaggio finale delle particelle virali e la loro gemmazione dalla cellula ospite, come il virus del morbillo e HIV-1 [105,106].

Il meccanismo della gemmazione delle particelle virali neo-formate avviene in due differenti modalità (Fig. 14 E):

1. rilascio verticale, come avviene anche per altri virus con particelle a morfologia filamentosa quali il virus dell'influenza ed il virus respiratorio sinciziale;
2. rilascio orizzontale formando un'ordinata rete di virioni sulla membrana che gemmano parallelamente alla stessa.

Tuttavia a livello di singola cellula la gemmazione avviene solo in un modo o nell'altro [42]. La modalità preferenziale è la gemmazione orizzontale, osservata nell'80 % delle cellule infettate con il virus Ebola, ed è determinata dalle interazioni con il nucleocapside. A supporto di questa ipotesi le VLP formate dalla sola VP40 gemmano verticalmente dalla cellula, mentre le particelle contenenti anche il nucleocapside gemmano orizzontalmente in una percentuale prossima al 100 % [50]. Questo sta ad indicare che la gemmazione è influenzata sia dalla proteina di matrice VP40 che dal nucleocapside, come è già stato osservato per altri virus ad RNA a polarità negativa tra cui paramyxovirus e il virus della stomatite vescicolare (VSV) [50,107].

Noda e colleghi hanno suggerito un modello di come avviene l'assemblaggio dei virioni riportato nella figura 14.



**Figura 14. Modello dell'assemblaggio e gemmazione dei virioni del virus Ebola.** (A) NP si autoassembla a formare strutture elicoidali. (B) VP35 e VP24 interagiscono con le strutture elicoidali di NP formando il nucleocapside (C). (D) i nucleocapsidi sono trasportati alla membrana plasmatica attraverso i microtubuli guidati dalla VP40. (E) i nucleocapsidi vengono incorporati nei virioni grazie all'interazione VP40 ed NP producendo particelle filamentose che gemmano dalla superficie cellulare orizzontalmente [42].

### 1.1.3.4 PICCOLE MOLECOLE ANTI-EBOLA

Le sempre maggiori conoscenze dei meccanismi molecolari del ciclo replicativo del virus Ebola hanno aiutato la ricerca nella identificazione e/o sviluppo di piccole molecole che, interferendo con alcune fasi del ciclo replicativo, sono in grado di impedire l'infezione della cellula bersaglio (Fig. 15).

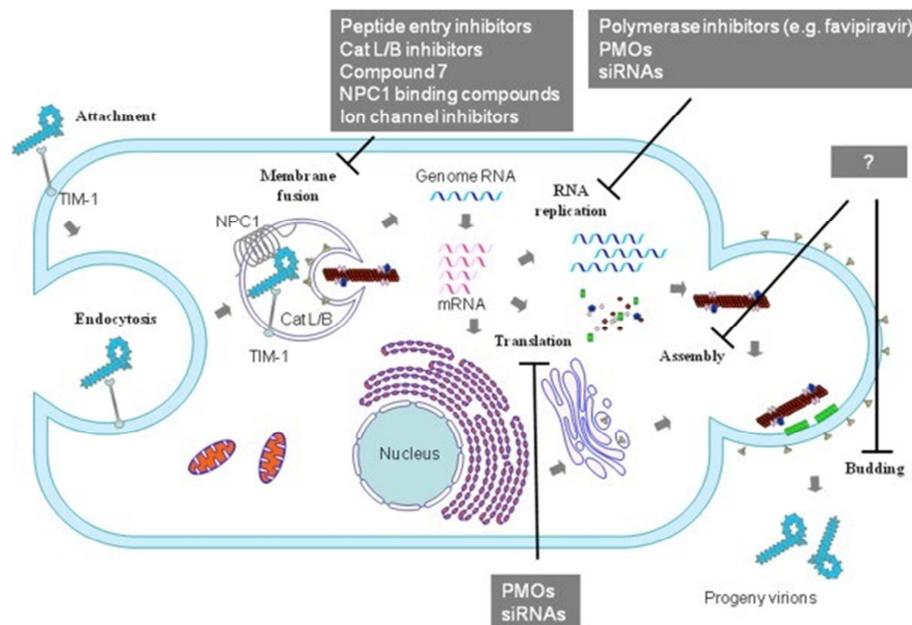


Figura 15. Composti attivi contro l'infezione del virus Ebola e loro *target* d'azione [108].

Inibitori dell'ingresso del virus (Fig. 15):

- la piccola molecola LJ0001 si intercala all'interno delle membrane virali così da interferire con l'ingresso delle particelle virali nelle cellule bersaglio, attiva contro diverse famiglie di virus dotati di pericapside oltre a filovirus, [109];
- il composto 7 sembra legarsi direttamente alla GP contrastando l'infezione del virus [110];
- l'inibitore 3.47 interferisce direttamente con il legame GP-NPC-1 [39];
- i CAD inducono nella cellula un fenotipo simil-Niemann Pick di tipo C (NPC), patologia approfondita nel paragrafo 1.1.3.1 [111]. Tra i CAD troviamo clomifene e toremifene, modulatori selettivi del recettore per l'estrogeno (SERM). L'azione antivirale contro il virus Ebola è indipendente dalla modulazione del recettore dell'estrogeno per cui sono già usati in clinica, ma non è noto l'esatto meccanismo d'azione. La loro efficacia contro il virus Ebola è stata testata *in vivo* su topi con ottimi risultati [112];
- le molecole 5705213 e 7402683 sono inibitori della catepsina L, quindi sono attive anche contro altri virus che usano questo enzima cellulare nelle fasi di ingresso nella cellula bersaglio, come il virus della SARS, il virus Hendra ed il virus Nipah [113].

A livello della replicazione e della sintesi proteica troviamo (Fig. 15):

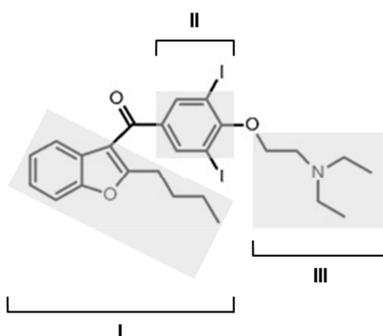
- gli analoghi nucleosidici BCX4430, che inibisce l'attività della RNA polimerasi virale di vari virus ad RNA a polarità negativa e ha dato risultati promettenti *in vivo* su primati non umani [114], ed il favipiravir, che induce mutazioni letali durante la replicazione del genoma virale che sarà poi incorporato nei nuovi virioni divenendo così non infettivi, già noto per l'azione antivirale contro il virus dell'influenza, arenavirus e bunyavirus sia *in vitro* che *in vivo*, e contro norovirus e flavivirus *in vitro* [115,116];
- l'oligomero fosforamidato di morfolino (PMO) AVI-7537 è specifico per il trascritto della VP24 il quale viene riconosciuto e legato per impedirne il processamento e la traduzione, efficace *in vitro* e *in vivo* in topi infettati [15];
- lo *short interfering* RNA (siRNA) TKM-Ebola specifico contro le proteine virali L, VP24 e VP35 [108];
- gli zuccheri iminici inibiscono le glucosidasi del reticolo endoplasmatico necessarie per la maturazione delle glicoproteine virali. Si sono dimostrati efficaci *in vivo* nei topi contro i filovirus ed altri virus delle febbri emorragiche per la loro azione cellulare [117].

## 1.2 AMIODARONE

Amiodarone è un farmaco antiaritmico usato nel trattamento delle aritmie ventricolari e sopraventricolari. Questo farmaco è stato sviluppato negli anni '60 per il trattamento dell'*angina pectoris* ed, in modo del tutto casuale, è stata osservata la sua efficacia come antiaritmico. È stato approvato dalla *Food and Drug Administration* nel 1985 e da allora questo farmaco è uno degli antiaritmici più prescritti. Il suo meccanismo d'azione non è del tutto chiarito ma include il blocco dei canali del sodio e del potassio, l'interferenza con i recettori  $\beta$ -adrenergici e con il flusso degli ioni calcio [118].

### 1.2.1 FARMACOCINETICA E FARMACODINAMICA

La sua farmacocinetica è peculiare: dopo assorbimento intestinale o somministrazione endovenosa, lascia il compartimento ematico con un'emivita da 10 a 20 ore e si accumula estensivamente nei tessuti periferici (tessuto adiposo, muscoli, fegato, polmoni e cute) [119]. Due caratteristiche sembrano importanti nel determinare la sua distribuzione nel corpo: l'idrofobicità estrema (Fig. 16 I), che potrebbe spiegare l'accumulo preferenziale nelle strutture ricche di lipidi, e la presenza del gruppo dietil-amino- $\beta$ -etossico che potrebbe favorire l'associazione agli organelli acidi (Fig. 16 III).



**Figura 16. Struttura chimica di amiodarone.** Porzione idrofobica formata dal benzofurano con un gruppo laterale butilico (I), gruppo diiodobenzoilico (II), gruppo dietilamino- $\beta$ -etossico con ammina terziaria (III) [120].

Amiodarone viene metabolizzato nel fegato ed eliminato principalmente per via epatica, mentre l'eliminazione a livello renale è molto ridotta. Il maggior metabolita di amiodarone è il mono-N-desetil amiodarone (MDEA), anch'esso con proprietà antiaritmiche, ed entrambi si trovano nel torrente circolatorio a concentrazione plasmatica di circa 2  $\mu$ M. La completa eliminazione dall'organismo del farmaco richiede un tempo variabile tra 25 e 100 giorni per amiodarone e

circa 36 giorni per l'MDEA [121]. Amiodarone tuttavia ha numerosi effetti collaterali: nausea, vomito e altri disturbi digestivi, minimizzabili assumendo il farmaco a stomaco pieno. La presenza di due atomi di iodio nella molecola di amiodarone (Fig. 16 II) può portare, in alcuni casi di trattamenti cronici, ad alterazioni della funzionalità tiroidea con ipertiroidismo o ipotiroidismo. In rarissimi casi può provocare disturbi alla vista dovuti a microdepositi corneali e neurite ottica, può causare un'augmentata sensibilità alla luce del sole e, ancor più raramente, può causare tossicità polmonare o epatica e disturbi neuropsichiatrici (tremori, atassia, insonnia, disturbi della memoria e delirio) [122].

## 1.2.2 EFFETTI CELLULARI DI AMIODARONE

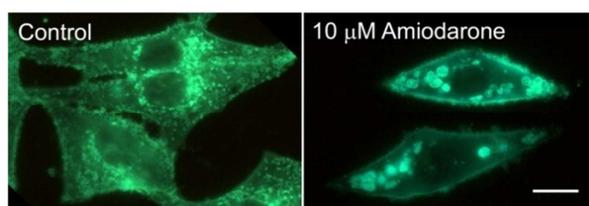
Esistono diverse evidenze a sostegno della tesi che amiodarone provoca una serie di alterazioni all'interno della cellula a carico degli endosomi tardivi (LE) e dei lisosomi (LY), formando una serie di vacuolizzazioni [123,124]. In particolare altera la distribuzione del *marker* dei LE CD63 ma non dei *marker* degli endosomi precoci (EE); riduce le dimensioni dei compartimenti lisosomiali; inibisce la proteolisi, dimostrato con la mancata degradazione della proteina surfactante-A (SP-A), una lectina calcio dipendente fagocitata dai macrofagi alveolari e degradata nei LY che induce un'alcalinizzazione del pH luminale dei LE/LY. Invece amiodarone non esercita alcun effetto su EE, né sul traffico di vescicole tra questi e il *trans-Golgi network* (TGN). [123-125].

L'osservazione che i pazienti trattati con amiodarone accumulano acido lisobisfosfatidico (LBPA) nei LE ed è intimamente connesso al colesterolo non esterificato, suggerisce che questo farmaco potrebbe alterare la distribuzione anche di altri lipidi, come si riscontra nella patologia Niemann-Pick di tipo C (NPC). Questa patologia è caratterizzata da mutazioni a carico delle proteine NPC, tra cui NPC-1 (come descritto nel par. 1.1.3.1), che portano ad un'interferenza generale sull'omeostasi cellulare dei lipidi. Infatti nelle cellule dei pazienti affetti da questa patologia si osserva un accumulo a livello dei LE di colesterolo non esterificato, glicosfingolipidi, sfingosina, LBPA e sfingomieline (SM). Un simile fenotipo è inducibile *in vitro* dalla molecola U18666A [126]. Inoltre la patologia NPC è caratterizzata dall'alterata omeostasi del calcio e da difetti nel *trafficking*, così come osservato con amiodarone [127]. Quindi amiodarone è in grado di indurre un fenotipo simil-NPC, seppur con un diverso meccanismo rispetto ad U18666A. Infatti non è revertibile con la rimozione del colesterolo come invece accade in cellule trattate con l'U18666A [124]. Altre differenze si riscontrano nel trattamento delle cellule con metil- $\beta$ -ciclodestrina, l'effetto di amiodarone è rinforzato mentre quello dell'U18666A è alleviato, e nella gemmazione di HIV-1 che non è inibita in cellule trattate con amiodarone mentre lo è nel caso del trattamento con U18666A così come in cellule ottenute da pazienti NPC [97]. Inoltre, una conseguenza peculiare della somministrazione di amiodarone è la formazione di vacuoli, corpi di inclusione multilamellari e depositi similcristallini in diversi tipi cellulari. Questi vacuoli sono stati dimostrati essere dei LE allargati perché positivi ai *marker* normalmente associati a questi organelli [123,124]. Questi vacuoli e corpi inclusi sono formati con diversi meccanismi come il blocco dell'endocitosi di fase fluida, l'aberrante fusione degli organelli, il collasso delle strutture luminali, l'accumulo di substrati non degradati. Tutte queste modifiche comunque non alterano

l'attività totale dei LE, e il punto di partenza sembra sia l'accumulo del farmaco a livello di LE/LY per la sua alta idrosolubilità a pH acido [124].

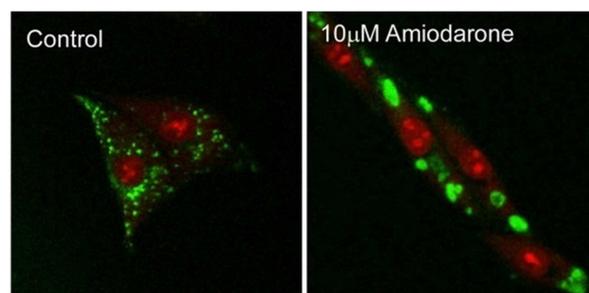
Nel dettaglio dopo 16 ore di trattamento delle cellule con 10  $\mu$ M di amiodarone si osserva:

- I) un'alterata distribuzione del colesterolo non esterificato (Fig. 17). Normalmente il colesterolo non esterificato è associato in piccole vescicole principalmente localizzate in regione perinucleare, mentre con amiodarone si associa in strutture allargate (Fig. 17). Oltre alla distribuzione, amiodarone altera anche il contenuto cellulare totale di colesterolo aumentandolo di circa il 17 % [124].



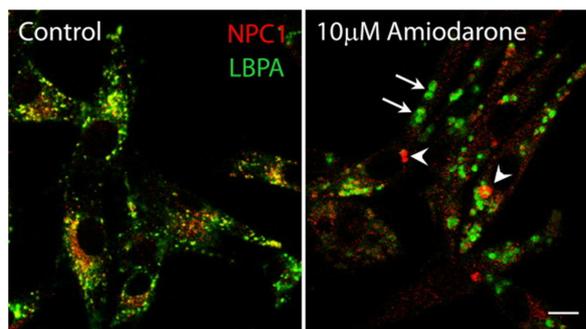
**Figura 17. Alterata distribuzione del colesterolo.** Immagine in immunofluorescenza indiretta che mostra l'alterata distribuzione del colesterolo indotta da amiodarone [124].

- II) un accumulo dell'acido lisobisfosfatidico (LBPA) (Fig. 18), un fosfolipide raro associato con le vescicole interne dei LE. Normalmente LBPA ha una distribuzione puntata in prossimità del nucleo, mentre in presenza di amiodarone si ha una diminuzione delle strutture positive ad LBPA, che di contro aumentano di dimensioni e si ritrovano alla periferia della cellula (Fig. 18) [124].



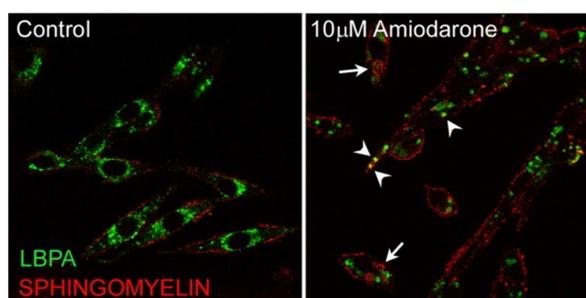
**Figura 18. Accumulo dell'acido lisobisfosfatidico (LBPA).** Immagine in immunofluorescenza indiretta che mostra l'accumulo dell'LBPA (in verde) in seguito al trattamento con amiodarone [124].

- III) un'alterata localizzazione del trasportatore NPC-1 (Fig. 19). Normalmente il trasportatore NPC-1 ha una distribuzione puntiforme nei LE/LY e co-localizza parzialmente con LBPA mentre amiodarone porta ad un accumulo spazialmente distinto da LBPA (Fig. 19) [124].



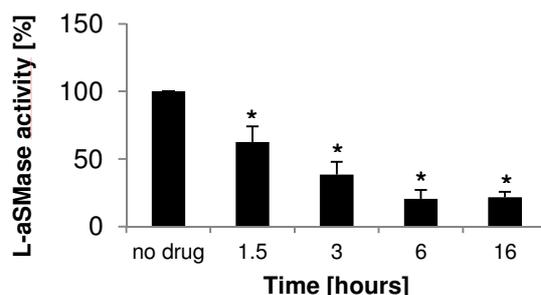
**Figura 19. Alterata localizzazione di NPC-1.** Immagine in immunofluorescenza indiretta che mostra l'aggregazione di NPC-1 e spazialmente separato dall'LBPA. Le frecce indicano gli aggregati di LBPA (in verde), le punte di freccia indicano gli aggregati di NPC-1 (in rosso), in giallo la co-localizzazione [124].

- IV) un accumulo della sfingomielina (SM) nei vacuoli indotti da amiodarone, che in alcuni casi co-localizza con LBPA (Fig. 20). Normalmente la SM è un costituente della membrana plasmatica e degli organelli in prossimità di essa, e rigorosamente separata da LBPA. Amiodarone ne altera la distribuzione portandone il raggruppamento in *clump* associati alle strutture interne, in alcuni casi co-localizza con LBPA [124].



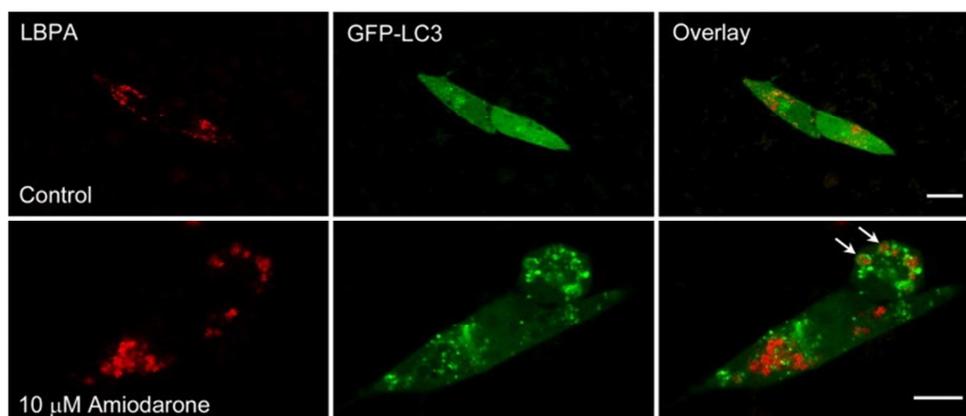
**Figura 20. Accumulo della sfingomielina.** Immagine in immunofluorescenza indiretta che mostra la diversa distribuzione della sfingomielina (in rosso) in seguito al trattamento con amiodarone. Le frecce indicano la sfingomielina associata in strutture intracellulare, le punte di freccia indicano la co-localizzazione sfingomielina ed LBPA (in verde) [124].

- V) l'inibizione dell'attività catalitica dell'enzima sfingomielinasi acida lisosomiale (L-aSMasi). L'attività enzimatica della L-aSMasi è significativamente ridotta dopo 1,5 ore di trattamento con 10 µM di amiodarone e si raggiunge il massimo livello di inibizione dopo 6 ore di trattamento (Fig. 21). Ulteriori approfondimenti sul meccanismo molecolare dell'inibizione dimostrano che amiodarone ne aumenta la degradazione [120].



**Figura 21. Inibizione della L-aSMasi.** Saggio enzimatico che dimostra come amiodarone diminuisce l'attività catalitica della L-aSMasi in maniera tempo-dipendente. "\*" indica una differenza significativa rispetto alle cellule non trattate [120].

- VI) la stimolazione dell'autofagia (Fig. 22). Oltre ad alterare la localizzazione di LBPA, amiodarone ne induce anche l'autofagocitosi, evidenziato dalle strutture ad anello di LC3 (Fig. 22) [124]. Queste strutture si osservano fisiologicamente durante la formazione dell'amfiosoma, organello intermedio dell'autofagia [128].



**Figura 22. Stimolazione dell'autofagia.** Immagine in immunofluorescenza indiretta mostrante che amiodarone induce l'autofagia degli aggregati di LBPA. Le frecce indicano strutture positive all'LC3 (in verde) che circondano gli aggregati di LBPA (in rosso) [124].

È noto che molti virus sfruttano il *pathway* endocitico sia per la loro fase di ingresso che per la loro fase di uscita dalla cellula. Infatti le modificazioni cellulari indotte da amiodarone a questo livello lo rendono attivo nell'inibire l'infezione del virus della *Severe Acute Respiratory Syndrome* (SARS), ed il virus dell'epatite C [123,129]. Il suo effetto sull'autofagia invece lo rende un ottimo candidato nel trattamento dell'epatocarcinoma cellulare associato al virus dell'epatite B [130].

## 2. SCOPO

Il virus Ebola (EBOV) è l'agente eziologico della malattia da virus Ebola (EVD), una grave febbre emorragica con un tasso di mortalità nell'uomo pari al 73 %, con picchi anche del 90 %. L'epidemia di EVD del 2014, tuttora in corso in Africa occidentale, è stata dichiarata dall'Organizzazione Mondiale della Sanità e dalle Nazioni Unite come il più grave problema sanitario del XXI secolo. La rapida diffusione del virus e il fallimento delle procedure di contenimento ha evidenziato la grave situazione dovuta all'assenza di farmaci specifici per il trattamento della EVD. Solo pochi trattamenti sono entrati nell'*iter* della sperimentazione clinica sui pazienti nelle zone colpite, grazie all'accelerazione delle procedure di approvazione dei *trial* clinici che invece richiederebbero lunghi studi *in vitro* ed *in vivo* su modelli animali prima di passare all'uomo.

Le nuove conoscenze sul meccanismo molecolare dell'ingresso di EBOV nella cellula bersaglio hanno evidenziato alcuni punti chiave per lo sviluppo di nuove terapie antivirali. Il legame della glicoproteina virale GP alla superficie cellulare e l'internalizzazione per macropinosi delle particelle virali sono dipendenti dalla sfingomieline (SM) e dall'attività della sfingomielinasi acida lisosomiale (L-aSMasi). EBOV procedendo lungo il *pathway* endocitico giunge negli endosomi tardivi (LE) dove la GP deve essere processata dalle catepsine L e B per esporre il sito di legame con il suo recettore intracellulare, il trasportatore del colesterolo NPC-1. Questo legame è essenziale per promuovere la fusione del pericapside virale con la membrana endosomiale e conseguente liberazione del nucleocapside nel citoplasma.

Recentemente abbiamo dimostrato che un farmaco già usato nella pratica clinica come antiaritmico, amiodarone, a livello del *pathway* endocitico della cellula altera la struttura dei LE, la localizzazione di NPC-1, porta all'accumulo della SM e all'inibizione della L-aSMasi. Considerando che amiodarone influenza fattori chiave per l'infezione da EBOV e che è già stato dimostrato essere in grado di inibire il ciclo replicativo del virus della *Severe Acute Respiratory Syndrome* (SARS) e del virus dell'epatite C, lo scopo di questo lavoro è di valutare se alterazioni cellulari indotte da amiodarone siano in grado di inibire l'infezione da EBOV, caratterizzandone successivamente gli effetti sul meccanismo di ingresso del virus. Le ricadute di questa ricerca riguardano la possibilità di sfruttare un farmaco, già usato in clinica, come trattamento per l'infezione di EBOV.



## 3. MATERIALI E METODI

### MATERIALI

#### 3.1 LINEE CELLULARI

**HEK293T** Cellule embrionali di rene umano, a morfologia stellata, che esprimono costitutivamente l'antigene T del virus vacuolante della scimmia (SV40) garantendo un'efficiente replicazione dei vettori plasmidici che contengono l'origine di replicazione di tale virus. Le cellule 293T sono state comprate dall'ATCC, numero del clone CRL-11268.

**VERO** Cellule di rene di scimmia verde africana, ampiamente usate per studiare i meccanismi di replicazione e di infezione di molti virus, tra cui il virus Ebola. Le cellule Vero sono state comprate dall'ATCC, numero del clone CCL-81.

Le cellule sono state coltivate in terreno di crescita DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*; Life Technologies), addizionato con il 10 % v/v di siero fetale bovino (FBS, *fetal bovine serum*; Life Technologies), inattivato a 56°C per 30 minuti.

Tutte le colture cellulari sono state mantenute alla temperatura costante di 37°C in ambiente umidificato al 5 % di anidride carbonica e sottoposte a periodici controlli per escludere contaminazioni.

#### 3.2 PLASMIDI

**pVR1012-ZEBOV-GP** codificante la glicoproteina GP della specie *Zaire ebolavirus* sotto il controllo trascrizionale del promotore/*enhancer* precocissimo del citomegalovirus umano (HCMV), la sequenza di poliadenilazione del gene dell'ormone della crescita bovino, ed il gene conferente la resistenza alla kanamicina in batteri. Gentilmente fornito dal Prof. Gary Nabel, Vaccine Research Center, NIH, Bethesda, MD, USA.

**pVSV-G** contiene il gene *vsv-g*, posto sotto il controllo trascrizionale del promotore/*enhancer* precocissimo di HCMV, codificante la glicoproteina G del pericapside del virus della stomatite vescicolare (VSV), in grado di conferire un ampio spettro di infezione. Sono presenti inoltre

l'introne e la sequenza di poliadenilazione del gene della  $\beta$ -globina umana, l'origine di replicazione batterica e il gene che conferisce la resistenza all'ampicillina [131].

**pcDNA3.1+** (Life Technologies) vettore per l'espressione di sequenze geniche in cellule di mammifero. Tale plasmide contiene a monte del sito di policlonaggio il promotore/*enhancer* precocissimo di HCMV e l'origine di SV40 che permette la replicazione episomale in linee cellulari che esprimono l'antigene T del medesimo virus. Inoltre, la presenza del gene per la resistenza alla neomicina, rende possibile la selezione di linee cellulari stabilmente trasfettate con tale costrutto.

**pVP40-GFP** codificante la proteina di matrice del virus Ebola (EBOV) VP40 fusa *in frame* alla sequenza codificante la *green fluorescent protein* (GFP) al suo N-terminale, e il gene conferente la resistenza all'ampicillina in batteri. Regalato dal Prof. Christopher Basler, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY, USA.

**pRRlsin.PPT.CMV.eGFP** vettore lentivirale di terza generazione derivato da HIV-1, Tat-indipendente, *self-inactivating*, e codificante la GFP. Precedentemente descritto [131].

**pMDLg/pRRE** plasmide le proteine capsidiche del gene *gag*, e la proteasi, la trascrittasi inversa e l'integrasi del gene *pol* di HIV-1, posti sotto il controllo trascrizionale del promotore/*enhancer* precocissimo di HCMV. Precedentemente descritto [131].

**pREV** contiene il gene *rev* di HIV-1 posto sotto il controllo trascrizionale del promotore del virus del Sarcoma di Rouss. Rev è in grado di legare la regione RRE presente nel vettore lentivirale e mediare l'esporto dei trascritti non processati dal nucleo al citoplasma. Precedentemente descritto [131].

Il mantenimento e la selezione dei plasmidi precedentemente descritti in cellule procariotiche è stato possibile grazie alla presenza in ciascun costrutto dell'origine di replicazione batterica ColE1 o pUC di *Escherichia coli* e del gene codificante la resistenza all'antibiotico ampicillina (100  $\mu$ g/ml). Per l'amplificazione dei diversi plasmidi in cellule procariotiche è stato utilizzato il ceppo di *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  [*endA1 hsdR17 (rK<sup>-</sup>mK<sup>+</sup>) glnV44thi-1 recA1 gyrA (Nal<sup>r</sup>) relA1  $\Delta$ (*lacZYA argF*)U169 deoR ( $\phi$ 80*dlac* $\Delta$ (*lacZ*)M15)] (Life Technologies). Il ceppo batterico è stato coltivato in forma liquida in terreno Luria-Bertani (LB, Bacto-triptone 1 % p/v, estratto di lievito 0.5 % p/v, NaCl 1 % p/v) in agitazione a 37°C o a 30°C a seconda del plasmide considerato. Quando necessario, il terreno è stato solidificato mediante aggiunta di agar 1.5 % p/v e reso selettivo mediante l'aggiunta dell'opportuno antibiotico.*

### 3.3 VIRUS

**VSV $\Delta$ G-GFP** ingegnerizzato a partire dal VSV con la *reverse genetics* per eliminare il gene codificante la VSV-G e sostituito con il gene *reporter* codificante la GFP. Gentilmente fornito dal Prof. Michael Whitt, Università del Tennessee, Memphis, TN, USA.

### 3.4 ANTICORPI

Sono stati usati i seguenti anticorpi primari per immunofluorescenza indiretta:

- anti-EEA1 in coniglio 1:50 (AbCam, Prodotti Gianni),
- anti-LAMP1 in coniglio 1:50 (Developmental Studies Hybridoma Bank, Università di Iowa City, IA, USA),
- anti-NPC-1 in coniglio 1:50 (Novus Biologicals, D.B.A. Italia S.R.L.),
- anti-LC3B in coniglio 1:50 (AbCam, Prodotti Gianni),
- anti-VSV-M in topo 1:7.500 (IBT Bioservices, D.B.A. Italia S.R.L.);

con il seguente anticorpo secondario per immunofluorescenza indiretta:

- anti-IgG in coniglio coniugato al fluoroforo Alexa 568 1:200 (Life Technologies).

In *immunoblotting* sono stati usati i seguenti anticorpi primari:

- anti-ZEBOV GP in coniglio 1:3000 (IBT Bioservices, D.B.A. Italia S.R.L.),
- anti-ZEBOV GP1 in coniglio 1:2000 (gentilmente fornito dal Prof. James Cunningham, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, USA),
- anti-tubulina in topo 1:3000 (Sigma-Aldrich),
- anti-VSV-M in topo 1:7.500 (IBT Bioservices, D.B.A. Italia S.R.L.);

con i seguenti anticorpi secondari:

- anti-IgG di coniglio coniugato alla perossidasi di rafano HRP 1:1000 (GE Healthcare Life Sciences),
- anti-IgG di topo coniugato alla perossidasi di rafano HRP 1:1000 (GE Healthcare Life Sciences).

### 3.5 COMPOSTI CHIMICI DI SINTESI

Amiodarone è stato comprato da Sigma-Aldrich, dronedarone è stato estratto dalla formulazione commerciale Multaq (Sanofi-Aventis) come descritto precedentemente [124]. Brevemente, una

tavoletta di Multaq è stata sciolta in 25 ml di idrossido di ammonio 1 M ed estratto per 3 volte in diclorometano. La fase organica è stata raccolta, essiccata in atmosfera riducente, dissolta in dimetilsolfossido (DMSO, Sigma-Aldrich) e la soluzione finale conservata a -20°C. La procedura di sintesi e le caratteristiche degli analoghi di amiodarone usati in questo studio (Tab. 1) sono stati precedentemente descritti [132,133].

Tutti gli analoghi sono stati sciolti in DMSO alla concentrazione di 50 mM, conservati a -20°C e usati una volta solo dopo scongelamento.

## METODI

### 3.6 TECNICHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE

#### 3.6.1 QUANTIFICAZIONE DEL DNA PLASMIDICO

Quando necessario, la quantità di DNA plasmidico è stata determinata allo spettrofotometro (*NanoDrop 1000 Spectrophotometer*, Thermo Scientific®) mediante lettura della densità ottica (DO) di diluizioni degli acidi nucleici alla lunghezza d'onda di 260 nm, corrispondente al massimo picco di assorbimento per le basi azotate.

La concentrazione del DNA è stata ricavata grazie alla legge di Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon \times l \times C$$

dove  $A$  è l'assorbanza del campione,  $\varepsilon$  è il coefficiente di estinzione molare (pari a  $6600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  per il DNA a doppio filamento e  $6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  per l'RNA a singolo filamento),  $l$  è la lunghezza del cammino ottico (pari a 0.1 cm) e  $C$  la concentrazione dell'acido nucleico in soluzione. La presenza di eventuali contaminazioni proteiche è stata rilevata analizzando la lunghezza d'onda di 280 nm, alla quale il legame peptidico presenta il picco massimo di assorbimento. Sono state considerate pure le preparazioni in cui il rapporto  $A_{260}/A_{280}$  era compreso tra i valori 1.8 e 2.0.

#### 3.6.2 COMPETENZA E TRASFORMAZIONE BATTERICA

I plasmidi sono stati utilizzati per la trasformazione di cellule di *E. coli*, ceppo DH5 $\alpha$ , rese artificialmente competenti mediante la tecnica del cloruro di calcio. Le colonie batteriche sono state fatte crescere a 37°C in 3 ml di terreno liquido LB contenente MgCl<sub>2</sub> 15 mM, in assenza di antibiotici per circa 12 ore, fino a raggiungere una densità ottica compresa tra 0.4 e 0.6 alla lunghezza d'onda di 600 nm. In seguito, l'inoculo è stato trasferito in 500 ml dello stesso terreno. Una volta raggiunta la densità ottica desiderata, la coltura è stata raffreddata rapidamente in ghiaccio per interrompere la crescita batterica; i batteri sono stati quindi sedimentati per centrifugazione a 3,500 RPM a 4°C per 15 minuti e risospesi in una soluzione fredda contenente MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 50 mM, MES [2-(*N*-morpholino) ethanesulfonic acid] 10 mM pH 6.3. I batteri sono stati poi centrifugati, risospesi delicatamente in 12.5 ml della stessa soluzione fredda addizionata di glicerolo al 15 % v/v e quindi aliquotati e conservati a -80°C. La

trasformazione batterica è stata effettuata aggiungendo a 50 µl di cellule batteriche competenti il DNA plasmidico (100-300 ng). Dopo aver lasciato incubare la miscela in ghiaccio per 30 minuti, la stessa è stata sottoposta a shock termico mediante esposizione a 37°C per 2 minuti ed immediata reintroduzione in ghiaccio. I batteri quindi sono stati incubati a 30°C o a 37°C per un'ora in 200 µl di LB, consentendo così l'espressione e la sintesi della proteina che conferisce la resistenza all'antibiotico di selezione. In seguito, tutta la sospensione è stata seminata in piastre Petri contenenti LB-Agar addizionato con ampicillina 100 µg/ml ed incubata 12 ore a 30°C o a 37°C al fine di selezionare i batteri trasformati.

### 3.6.3 PREPARAZIONE DEL DNA PLASMIDICO

Il DNA plasmidico in grande scala (*Maxi prep*) è stato estratto dal ceppo DH5α di *E. coli* con il metodo della lisi alcalina, e purificato con *QIAGEN Plasmid Kit*, un sistema QIAGEN basato sull'utilizzo di colonne a scambio anionico. Con questo procedimento il DNA plasmidico si lega alla resina della colonna e viene purificato da RNA, proteine ed impurità ad alto peso molecolare mediante eluizione con tamponi a bassa concentrazione salina. Il DNA plasmidico viene successivamente eluito dalla colonna per mezzo di tamponi a maggiore concentrazione salina. Il plasmide, una volta eluito, viene concentrato e pulito dai sali mediante precipitazione con isopropanolo e lavaggio con etanolo al 70 % v/v. Con questa tecnica si ottengono preparazioni plasmidiche ad elevato grado di purezza adatte agli esperimenti di trasfezione delle cellule eucariotiche. Nel caso di preparazioni plasmidiche in piccola scala (*Mini prep*), invece, è stato utilizzato il protocollo della lisi alcalina modificato per piccoli volumi di coltura batterica (3 ml). Il DNA ottenuto in seguito a precipitazione con etanolo al 95 % è stato risospeso in buffer TE (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8), contenente RNasi pancreatica (20 µg/ml, Roche). Il DNA ottenuto è stato quindi sottoposto a controllo mediante restrizione enzimatica e successiva migrazione elettroforetica in gel d'agarosio in tampone salino TBE 1X (Tris-borato 9 mM, EDTA 1 mM). Inoltre la quantità di acido nucleico ottenuto è stata quantificata come descritto nel paragrafo 3.6.1

## 3.7 TECNICHE DI BIOLOGIA CELLULARE E VIROLOGICHE

### 3.7.1 TRASFEZIONE DI CELLULE DI MAMMIFERO

Il trasferimento *in transient* di DNA esogeno in cellule HEK293T è stato realizzato utilizzando complessi liposomici di lipidi cationici (Lipofectamine™ 2000, Life Technologies). Il giorno

precedente la trasfezione, sono state seminate  $4,4 \times 10^6$  cellule HEK293T in una *dish* con diametro di 100 mm (BD Falcon) in DMEM con 10 % v/v di FBS, in un volume finale pari a 10 ml. Trascorse 24 ore, quando le cellule hanno raggiunto una confluenza dell'80-90 %, si è proceduto alla trasfezione *in vitro* allestendo due miscele di reazione così costituite:

- miscela 1: 1.5 ml di DMEM senza siero e 50  $\mu$ l di soluzione di liposomi,
- miscela 2: 1.5 ml di DMEM senza siero ed il DNA da trasfettare.

La quantità totale di DNA da utilizzare è 24  $\mu$ g; nel caso in cui il DNA specifico impiegato nell'esperimento fosse in quantità inferiore, è stato addizionato il plasmide pBluescript® II KS (+/-) phagemid fino a raggiungere la quantità di acido nucleico ottimale. La miscela 1, incubata per 5 minuti a temperatura ambiente, è stata quindi addizionata alla miscela 2 e incubata per 20 minuti a temperatura ambiente. Nel frattempo è stato sostituito il terreno al monostrato di cellule con 7 ml di DMEM addizionato di FBS al 10 % v/v. Successivamente, la miscela unica è stata aggiunta al monostrato di HEK293T e le cellule sono state incubate a 37°C per un intervallo di tempo richiesto (24-48 ore).

### 3.7.2 PSEUDOTIPIZZAZIONE DI PARTICELLE LENTIVIRALI

La produzione di particelle lentivirali pseudotipizzate dalla glicoproteina di *Zaire ebolavirus* (ZEBOV GP) o dalla glicoproteina del VSV (VSV-G) è stata effettuata trasfettando in cellule HEK293T oltre che con il vettore lentivirale pRRL.sin.PPT.CMV.eGFP e il vettore codificante la glicoproteina virale (pVR1012-ZEBOV-GP o pVSV-G), anche con gli elementi di *packaging* pMDLg/pRRE e pREV ovvero i costrutti che forniscono *in trans* le proteine strutturali e gli enzimi coinvolti nella generazione della particella trasducente. La trasfezione è stata condotta come descritto nel paragrafo 3.7.1 usando le seguenti quantità di DNA plasmidico:

- 10  $\mu$ g di pRRLsin.PPT.CMV.eGFP,
- 7  $\mu$ g di pMDLg/pRRE,
- 2  $\mu$ g di pREV,
- 4  $\mu$ g di pVSVG o pVR1012-ZEBOV-GP.

Le cellule trasfettate sono state incubate a 37°C in CO<sub>2</sub> e dopo 4 ore dalla trasfezione le cellule sono state lavate con buffer fosfato salino (PBS 1X, NaCl 8.18 g, KCl 0.2 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.78 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24 g e acqua milliQ per raggiungere il volume di 1 litro) il terreno contenente la miscela unica di trasfezione è stato sostituito con DMEM al 5 % v/v di FBS per un intervallo di tempo di 48 ore. Alla raccolta del soprannatante i detriti cellulari sono stati pellettati a 1,200 RPM per 7 minuti e il soprannatante è stato quindi aliquotato e stoccato a -80°C fino all'uso [131].

### 3.7.3 PREPARAZIONE E TITOLAZIONE DELLO STOCK DI VSVΔG-GFP PSEUDOTIPIZZATO DALLA GLICOPROTEINA DI ZAIRE EBOLAVIRUS

Il VSVΔG-GFP pseudotipizzato dalla glicoproteina GP di *Zaire ebolavirus* è stato prodotto trasfettando HEK293T mediante Lipofectamine™ 2000 (Life Technologies), come descritto nel paragrafo 3.7.2, con 16 µg di pVR1012-ZEBOV-GP. A 24 ore dalla trasfezione sono state infettate con il virus ricombinante VSVΔG-GFP, esprime la glicoproteina nativa VSV-G nel pericapside, alla molteplicità di infezione (MOI) di 4 *focus-forming units* (FFU)/cellula. A 24 ore post-infezione (h.p.i.) il soprnatante è stato raccolto ed i detriti cellulari sono stati rimossi per centrifugazione (1,200 RPM per 7 minuti a 4°C). Successivamente il virus è stato aliquotato e conservato a -80°C fino all'uso.

Il titolo dello *stock* virale è stato determinato infettando per 2 ore cellule Vero, seminate 24 ore prima alla densità di  $2 \times 10^5$  cellule/*well* in piastre da 6-*well* (BD Falcon), con diluizioni seriali in base 10. 24 h.p.i. le cellule sono state staccate, lavate per 3 volte in PBS freddo in centrifugazione a 1,200 RPM per 7 minuti a 4°C, quindi risospese in 500 µL e conservate in ghiaccio al buio. L'infezione è stata analizzata misurando l'espressione della GFP in citofluorimetria (FACScalibur, Beckton Dickinson). I dati ottenuti sono stati elaborati mediante il programma *Cell Quest* (FACScalibur, Beckton Dickinson) ed espressi in forma di *Histogram Plot*. Il *marker 1* (M1) quantifica definisce la percentuale di cellule positive alla GFP con valori di fluorescenza oltre il  $10^1$  infettate dai virioni ricombinanti VSVΔG-GFP. Questo valore soglia discrimina l'autofluorescenza delle cellule dalla fluorescenza prodotta dalla GFP. Dalla percentuale così ottenuta si può risalire al titolo della sospensione virale corrispondente applicando la seguente formula:

$$FFU/ml = \frac{\% \text{ cell. GFPpositive} \times n^{\circ} \text{ totale di cell. seminate} \times \text{fattore di diluizione}}{\text{volume di inoculo virale (ml)}}$$

### 3.7.4 PREPARAZIONE E TITOLAZIONE DELLE PARTICELLE SIMIL-VIRALI DEL VIRUS EBOLA

Le particelle simil virali (VLP) esprimenti nel pericapside la GP di ZEBOV (EBOVLP), o la VSV-G (VSVLP) sono state prodotte co-trasfettando HEK293T mediante Lipofectamine™ 2000 (Life Technologies), come descritto nel paragrafo 3.7.2, con 0.5 µg di pVR1012-ZEBOV-GP o pVSV-G, e 11.5 µg di pVP40-GFP. A 4 ore dalla trasfezione le cellule sono state lavate con PBS ed il terreno sostituito con DMEM al 2.5 % di FBS. A 48 ore dalla trasfezione il soprnatante è stato raccolto

ed i detriti cellulari sono stati rimossi per centrifugazione a 1,200 RPM per 7 minuti a 4°C. Successivamente il virus è stato aliquotato e conservato a -80°C fino all'uso [84].

La quantità di VLP prodotte è stata determinata incubando per 2 ore cellule Vero, seminate 24 ore prima alla densità di  $2 \times 10^5$  cellule/*well* in piastre da 6-*well* (BD Falcon), con diluizioni seriali in base 10. Al termine delle 2 ore le cellule sono state staccate, lavate per 3 volte in PBS freddo in centrifugazione a 1,200 RPM per 7 minuti a 4°C, quindi risospese in 500 µL e conservate in ghiaccio al buio. L'internalizzazione è stata analizzata misurando l'espressione della GFP in citofluorimetria (FACScalibur, Beckton Dickinson) quantificando la percentuale di cellule GFP-positive come descritto nel paragrafo 3.7.3.

$$\text{unità trasducenti/ml} = \frac{\% \text{ cell. GFPpositive} \times n^{\circ} \text{ totale di cell. seminate} \times \text{fattore di diluizione}}{\text{volume di VLP (ml)}}$$

### 3.7.5 SAGGI CON IL VSVΔG-GFP PSEUDOTIPIZZATO DALLA GLICOPROTEINA DI ZEBOV E CON EBOVLP

Per l'analisi dell'attività di amiodarone e degli altri analoghi, cellule Vero sono state seminate in piastre da 6-*well* (BD Falcon) alla densità di  $2.5 \times 10^5$  cellule/*well* 24 ore prima di essere esposte ai diversi composti per le ore indicate. Quindi, le cellule Vero sono state infettate con il virus ricombinante VSVΔG-GFP pseudotipizzato dalla GP per 2 ore alla MOI di 0.1 FFU/cellule, oppure incubate per 2 ore con le VLP a 0.1 unità trasducenti/ml. Al termine delle 2 ore le cellule infettate con il VSVΔG-GFP pseudotipizzato dalla GP sono state esposte nuovamente alle rispettive concentrazioni dei diversi composti per 24 ore dopo la rimozione dell'inoculo virale. La percentuale di cellule GFP-positive è stata valutata in citofluorimetria, come descritto nel paragrafo 3.7.3, 24 ore dopo l'infezione per il VSVΔG-GFP pseudotipizzato dalla GP e subito al termine delle 2 ore di incubazione con le VLP per questa tipologia di particelle.

### 3.7.6 SAGGIO DI BINDING DELLE VLP

Cellule Vero seminate in piastre da 6-*well* (BD Falcon) alla densità di  $2.5 \times 10^5$  cellule/*well* 24 ore dopo sono state trattate con 10 µM di amiodarone per 16 ore. Dopo il pretrattamento le cellule sono state lavate in PBS e raffreddate a 4°C, quindi incubate con le VLP per 1 ora a 4°C. Quindi le VLP non legate sono state rimosse lavando le cellule con PBS per 2 volte, quindi le cellule sono state raccolte e lavate 3 volte in PBS freddo con centrifugazioni a 1,200 RPM per 7 minuti a 4°C. successivamente le cellule sono state risospese in 500 µl di PBS freddo e la fluorescenza delle VLP legate alla membrana è stata misurata in citofluorimetria.

### 3.7.7 TRAFFICKING DELLE VLP

Cellule Vero sono fatte crescere su vetrini copri oggetto con diametro di 13 mm fino ad una confluenza dell'80 %, quindi incubate per 16 ore con 10  $\mu$ M di amiodarone. Sono state incubate per 1 ora in ghiaccio con EBOVLP, quindi è stato rimosso l'inoculo ed esposte nuovamente alla stessa concentrazione di amiodarone da 30 minuti a 5 ore, ove indicato, a 37°C. Al termine di ogni tempistica le cellule sono state lavate 3 volte con PBS, fissate con 3 % paraformaldeide (PFA, Sigma-Aldrich) p/v in PBS per 20 minuti, lavate 3 volte con PBS e l'autofluorescenza delle cellule è stata attenuata incubando le cellule per 15 minuti con 50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , lavate 3 volte con PBS, quindi permeabilizzate con 50  $\mu$ g/ml di digitonina per 5 minuti e lavate 3 volte con PBS. Le cellule sono state successivamente incubate con gli anticorpi primari EEA-1 come *marker* degli endosomi precoci, anti-LAMP1 come *marker* degli endosomi tardivi, anti-NPC-1 per il recettore di EBOV ed anti-LC3 come *marker* di autofagia (descritti nel par. 3.4), per 1 ora a 37°C. Quindi sono state lavate 3 volte con PBS ed incubate con i rispettivi anticorpi secondari anti-IgG coniugati al fluoroforo Alexa 568 (descritti nel par. 3.4) per 30 minuti a temperatura ambiente. Dopo 3 lavaggi in PB ed uno in acqua milliQ, i vetrini sono state infine montati su vetrini portaoggetto, su cui era stata precedentemente aggiunta una goccia di soluzione di montaggio (glicerolo 90 % v/v in PBS, N-propilgallato 0.2 % p/v) Vectashield H-100 (Vector Laboratories, D.B.A. Italia S.R.L.). Sono state analizzate al microscopio confocale Zeiss LSM510 con obiettivo 40X, *z-stack* impostato a 1.1  $\mu$ m. La co-localizzazione è stata calcolata usando lo strumento istogramma/co-localizzazione, il quale determina l'indice di co-localizzazione rappresentando la frazione di *pixel* positivi a VLP e ai *marker* esaminati. La concentrazione di VLP alla quale le cellule sono state esposte era tale che i *pixel* positivi alle VLP erano almeno 2 logaritmi minori dei *pixel* positivi ai *marker*.

### 3.7.8 SAGGIO DI FUSIONE

Cellule Vero sono state fatte crescere su vetrini coprioggetto di 22 mm fino ad una confluenza dell'80 %, quindi pretrattate per 16 ore con 10  $\mu$ M di amiodarone o 20  $\mu$ M di U18666A. Successivamente le cellule sono state infettate per 3 ore con il VSV $\Delta$ G-GFP pseudotipizzato dalla GP alla MOI di 20 FFU/cellula. Dopo le 3 ore le cellule sono state lavate 3 volte in PBS, fissate per 20 minuti a temperatura ambiente in 2 % p/v di PFA (Sigma-Aldrich) in PBS, lavate 3 volte sempre in PBS e permeabilizzate per 30 minuti a temperatura ambiente con Triton X-100 (Sigma-Aldrich) allo 0.1 % v/v. Sono state quindi lavate per 3 volte con PBS ed incubate con l'anticorpo primario anti-VSV-M 23H12 (Kerafast Inc., D.B.A. Italia S.R.L.) per 30 minuti a 37°C descritto nel paragrafo 3.4. Lavate nuovamente per 3 volte prima di essere incubate per 30 minuti a 37°C con il rispettivo anticorpo secondario anti-IgG di topo coniugato al fluoroforo Alexa 568 (Life Technologies), come descritti nel paragrafo 3.4. Dopo altri 3 lavaggi, il nucleo è stato marcato con DRAQ5<sup>®</sup> 1:1000 (Cell Signalling Technology, D.B.A. Italia S.R.L.). Infine i vetrini sono stati montati, dopo essere stati lavati 3 volte in PBS ed 1 volta in acqua milliQ, su vetrini portaoggetto

su cui era stata precedentemente aggiunta una goccia di soluzione di montaggio (glicerolo 90 % v/v in PBS, N-propilgallato 0.2 % p/v) Vectashield H-100 (Vector Laboratories, D.B.A. Italia S.R.L.). Quindi analizzati al microscopio confocale Nikon A1 con obiettivo 60X ad immersione.

### 3.7.9 SDS-GEL ELETTROFORESI

Le cellule Vero sono state raccolte, lavate 3 volte in PBS mediante centrifugazione a 1,200 RPM per 7 minuti a 4°C, e quindi lisate in 100 µl di buffer 1X per radioimmunoprecipitazione (RIPA, PBS 1X, NP40 1 % v/v, Sodio Deossicolato 0.5 % v/v, SDS 0.05 % v/v) contenente inibitori delle proteasi (0.1 mM N $\alpha$ -p-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone, 0.1 mM tosylsulfonyl phenylalanyl chloromethyl ketone, Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche). Prima del caricamento sono stati addizionati 100 µl di *Loading Buffer* (LB) 2X (6.25 ml di Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8, 10.03 ml di acqua milliQ, 2.25 ml di glicerolo, 5 ml di SDS 10 % p/v, 0.25 ml di blu di bromofenolo 1 % p/v e 1.22 ml di  $\beta$ -mercaptoetanololo).

Le particelle virali sono state concentrate per ultracentrifugazione attraverso cuscino di saccarosio (Sigma-Aldrich) al 20 % p/v a 28,000 RPM per 2 ore a 4 °C [134]. Quindi sono state lisate in 30 µl di RIPA 1X e 30 µl di LB2X.

I campioni sono stati incubati a 100°C per 5 minuti prima di essere caricati in gel elettroforesi con sodio dodecil solfato (SDS). Per l'analisi delle proteine sono stati preparati minigel di acrilammide dello spessore di 1.5 mm (Bio-Rad Laboratories) come di seguito descritto:

- gel di corsa al 10 % per le particelle virali, o al 12.5 % per i lisati cellulari, costituiti da 12.5 ml di Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8, 16.6 ml (20.8 ml per il gel al 12.5 %) della soluzione acrilammide/bisacrilammide 37.5:1 al 30 % p/v, 500 µl di SDS 10 % p/v, 40 µl di TEMED e 200 µl di APS 10 % p/v e portato al volume finale di 50 ml con acqua deionizzata;
- gel di impaccamento al 4,5 % p/v costituito da 4 ml di Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8, 2.4 ml della soluzione acrilammide/bisacrilammide 37.5:1 al 30 % p/v, 160 µl di SDS 10 % p/v, 20 µl di N, N, N', N'-tetra-metil-etilenediammina, TEMED, 80 µl di ammonio persolfato, APS 10 % p/v e portato al volume finale di 16.06 ml con acqua deionizzata.

La migrazione elettroforetica è stata effettuata in presenza di un tampone di corsa (3.02 g di Tris, 14.4 g di glicina, 10 ml di SDS 10 % p/v e acqua deionizzata per raggiungere il volume di 1 litro) con un'intensità di corrente costante di 100 V fino all'uscita del fronte di corsa. Tutti i reagenti utilizzati sono Bio-Rad Laboratories.

### 3.7.10 IMMUNOBLOTTING

Le proteine separate in gel elettroforesi sono state trasferite elettricamente, su di una membrana di nitrocellulosa (Hybond ECL, GE Healthcare Life Sciences), precedentemente idratata in acqua deionizzata ed equilibrata in tampone di trasferimento (tampone di corsa, privo di SDS, ma addizionato con metanolo al 20 % v/v). Il trasferimento è stato effettuato a 50 V per 2 ore in ghiaccio. Successivamente, per saturare i siti aspecifici, la membrana di nitrocellulosa è stata fatta incubare in una soluzione costituita da latte scremato 5 % p/v (Bio-Rad Laboratories) in PBS-T (Tween-20 0.1 % v/v (Sigma-Aldrich) e PBS). In seguito, la membrana è stata immersa nella soluzione di latte 5 % in PBS-Tween contenente gli anticorpi anti-GP, anti-VSV-G, anti-GP1, anti-VSV-M, anti-GFP e anti-tubulina, descritti nel paragrafo 3.4. L'anticorpo specifico per le proteine oggetto di analisi ed incubata per una notte a 4°C, in agitazione. Dopo trattamento con l'anticorpo primario, la membrana è stata sottoposta a 3 lavaggi con PBS-T, ed è stata nuovamente incubata per 2 ore con l'anticorpo secondario anti-IgG di coniglio o anti-IgG di topo, coniugato con l'enzima perossidasi di rafano (descritti nel paragrafo 3.4), in latte scremato 5 % p/v e PBS-T. Infine, dopo 3 lavaggi con PBS-T e 1 con PBS, la membrana è stata immersa in una soluzione di sviluppo utilizzando il *kit* per la rilevazione della chemiluminescenza *ECL Western Blotting Detection Reagents* (GE Healthcare Life Sciences); successivamente è stata esposta su lastra fotografica Kodak BioMax MS Film(Sigma-Aldrich). Inoltre, il gel di poliacrilammide è stato colorato con Blu di Coomassie (0.05 g di Blu di Coomassie (Sigma-Aldrich), 40 ml di metanolo, 10 ml di acido acetico e acqua deionizzata per raggiungere il volume di 100 ml) e decolorato con acqua.

### 3.7.11 PROTEOLISI *IN-VITRO* DELLA GP DI ZEBOV

Il VSVΔG-GFP pseudotipizzato dalla GP è stato trattato per 1 ora a 37°C con 0.2 mg/ml di enzima Termolisina (Sigma-Aldrich). La reazione è stata stoppata con l'aggiunta di fosforamidon (Sigma-Aldrich) 1 mM e i virioni trattati sono stati usati subito per infettare cellule Vero. Il controllo senza il trattamento è stato condotto con gli stessi buffer ma non contenenti l'enzima [134]. Il corretto processamento della GP è stato quindi confermato in *immunoblotting* dopo aver concentrato le particelle virali, come descritto sopra.

## 3.8 ANALISI STATISTICA

I dati sono stati espressi come media  $\pm$  deviazione standard (SD). I *p-value* sono stati calcolati con il test di Student a 2 code per dati non-appaiati con il software GraphPad. Per l'analisi

statistica degli indici di colocalizzazione è stato usato il test della somma dei ranghi Mann-Whitney. Il livello della significatività accettata è il 5 %.



## 4. RISULTATI

### 4.1 PREMESSA

Recentemente sono stati fatti importanti progressi sulla delucidazione dei meccanismi attraverso i quali il virus Ebola (EBOV) entra nella cellula bersaglio per instaurare l'infezione, e in particolare sono stati identificati importanti fattori cellulari coinvolti in tale processo, quali la sfingomielinasi acida lisosomiale, le catepsine L e B ed il trasportatore del colesterolo NPC-1.

La sfingomielinasi acida lisosomiale (L-aSMasi) è necessaria al virus nelle primissime fasi del ciclo replicativo [84]. Infatti, la L-aSMasi è coinvolta nel legame del virus alla cellula poiché la sua attività enzimatica promuove la formazione dei *raft* lipidici dove si raggruppano i recettori riconosciuti dal virus, quali lectine, integrine  $\beta 1$ , Axl, TIM-1 e altri non ancora identificati [34,69,71,75]. Successivamente la particella virale è internalizzata per macropinosi e anche questo processo è regolato dall'attività della L-aSMasi [84]. Infatti, l'idrolisi della sfingomielina (SM) a ceramide catalizzata da questo enzima provoca alterazioni fisiche locali della membrana plasmatica, curvatura ed invaginazione, tali da promuovere la formazione del macropinosoma [80]. Per questo motivo le regioni ricche in SM rappresentano la piattaforma di adesione delle particelle virali [84].

Le proteasi endosomiali catepsina L e catepsina B rappresentano dei fattori cellulari essenziali nel processo di infezione della cellula bersaglio [88]. Queste si trovano a livello degli endosomi tardivi (LE) dove la particella virale vi giunge progredendo nel *pathway* endocitico. Il pH acido nei LE innesca l'attivazione delle catepsine che processano proteoliticamente la subunità 1 della glicoproteina (GP) virale eliminando sequenzialmente la glicosilazione e il dominio simil-mucina [69,88]. In questo modo si espone il sito di legame al recettore intracellulare NPC-1 presente sulla subunità 1 della GP [69].

Il trasportatore NPC-1 è il recettore intracellulare che, oltre a legare la GP, unitamente al pH acido, avvia una serie di cambiamenti conformazionali nella subunità 2 della GP che culmina con la fusione del pericapside virale con la membrana endosomiale [69]. In seguito si ha il rilascio del nucleocapside nel citoplasma con l'avvio dell'infezione della cellula bersaglio.

È stato dimostrato che molecole in grado di interferire con uno di questi tre fattori inibiscono efficacemente l'infezione di EBOV. Tra questi troviamo la desipramina, un inibitore dell'attività enzimatica della L-aSMasi, e l'U18666A, che impedisce l'incontro della GP con NPC-1 nei LE [38,84].

Dall'altra parte il nostro gruppo ha recentemente chiarito una parte degli effetti cellulari indotti dal farmaco antiaritmico amiodarone. La maggior parte si manifestano proprio a livello del *pathway* endocitico sfruttato da molti virus per infettare la cellula contro cui amiodarone è stato dimostrato essere attivo, come il virus della *Severe Acute Respiratory Syndrome* (SARS) ed il virus dell'epatite C [123,129]. In particolare, amiodarone è in grado di indurre un fenotipo simil-Niemann Pick di tipo C (NPC) caratterizzato da vacuolizzazioni intracellulari, mislocalizzazione di

*marker* degli endosomi tardivi (ad esempio NPC-1) e accumulo di lipidi, oltre a promuovere la degradazione di L-aSMasi [120,124]. Tra i vari *target* cellulari influenzati da amiodarone troviamo quindi proprio l'enzima L-aSMasi e il trasportatore del colesterolo NPC-1, fattori indispensabili per l'ingresso di EBOV nelle cellule bersaglio [38,84,124].

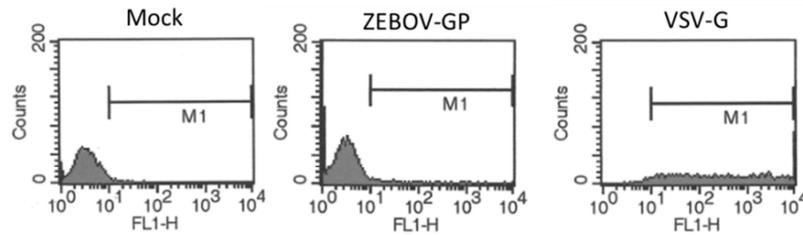
## 4.2 PRODUZIONE DEI SISTEMI MOLECOLARI PER LO STUDIO DELLA FASE DI INGRESSO DEL VIRUS EBOLA NELLA CELLULA BERSAGLIO

La GP di EBOV è necessaria e sufficiente a mediare l'ingresso del virus nella cellula bersaglio, indipendentemente dalle altre proteine virali. È stato dimostrato che è possibile farla esprimere sul pericapside di alcuni virus eterologhi (pseudotipizzazione) che possono essere manipolati in laboratori di biosicurezza di livello 2, per determinare il meccanismo di ingresso di EBOV. Per questo scopo le metodologie di pseudotipizzazione più diffuse sono basate sull'impiego di vettori lentivirali, derivati dal virus dell'immunodeficienza umana di tipo 1 (HIV-1), e dal virus della stomatite vescicolare (VSV). I vettori lentivirali di ultima generazione sono prodotti utilizzando quattro costrutti: due costrutti di *packaging*, codificanti le proteine strutturali e gli enzimi necessari a formare la particella virale, un plasmide che codifica una sequenza di RNA contenente il segnale di *packaging* per l'incorporazione nella particella virale e un gene eterologo come ad esempio un gene *reporter*, come la *green-fluorescent protein* (GFP) che consente di discriminare le cellule trasdotte, ed un costrutto codificante la glicoproteina eterologa che si vuole incorporare sul virione per attribuirne il tropismo e le modalità di internalizzazione nelle cellule suscettibili [85]. Nel caso del VSV, ci si basa sul virus ricombinante VSVΔG-GFP in cui è stata deleta la regione codificante la glicoproteina VSV-G e sostituita con il gene *reporter* codificante la GFP [135].

Le particelle pseudotipizzate prodotte sono in grado di effettuare un solo ciclo di infezione in cellule suscettibili all'infezione da EBOV.

Al fine di utilizzare i sistemi ricombinanti pseudotipizzati come strumenti per la valutazione dell'effetto di amiodarone sull'infezione *in vitro* di EBOV si è proceduto a confrontare il sistema basato su vettori lentivirali ricombinanti rispetto al sistema basato sul VSV.

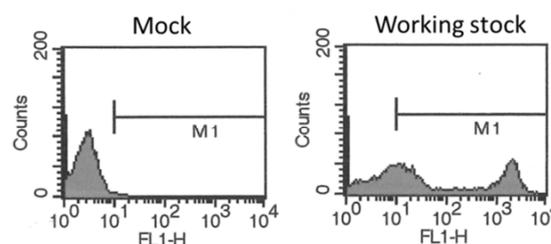
Per produrre le particelle lentivirali, cellule HEK293T sono state trasfettate con i plasmidi di *packaging* pMDL e pREV, pRRLin.PPT.CMV.eGFP e il plasmide pVR1012 ZEBOV-GP codificante la GP della specie *Zaire ebolavirus*, o il plasmide pVSV-G codificante la VSV-G utilizzato come controllo, essendo la VSV-G incorporata efficientemente sui vettori lentivirali. A 48 ore dalla trasfezione si è proceduto alla valutazione della produzione delle eventuali particelle prodotte trasducendo le cellule Vero per 1 ora con diluizioni seriali in base 10 del soprannatante raccolto dalle cellule trasfettate. A 24 ore dalla trasduzione sono state quantificate delle cellule trasdotte, positive alla GFP, mediante analisi citofluorimetrica.



**Figura 23. Pseudotipizzazione di vettori lentivirali.** Cellule HEK293T sono state trasfettate con 7  $\mu\text{g}$  di pMDLg/pRRE, 2  $\mu\text{g}$  di pREV, 10  $\mu\text{g}$  di pRRLsin.PPT.CMV.eGFP e 4  $\mu\text{g}$  di pVR1012 ZEBOV-GP codificante la GP della specie *Zaire ebolavirus*, o 4  $\mu\text{g}$  di pVSV-G codificante la VSV-G. A 48 ore dalla trasfezione le particelle lentivirali prodotte sono state raccolte e quantificate su cellule Vero trasdotte per 1 ora con diluizioni seriali in base 10 del soprannatante raccolto. 24 ore dopo la trasduzione le cellule positive alla GFP (valori di fluorescenza FL1-H oltre  $10^1$  ed identificate dal marker M1 come descritto nei materiali e metodi) sono state quantificate mediante analisi citofluorimetrica confrontandole con cellule Vero non trasdotte (*mock*).

Usando le quantità dei quattro plasmidi riportate in Dull *et al.* (10  $\mu\text{g}$  di pRRLsin.PPT.CMV.eGFP, 7  $\mu\text{g}$  di pMDLg/pRRE, 2  $\mu\text{g}$  di pREV e 4  $\mu\text{g}$  del costrutto codificante la glicoproteina eterologa) non c'è stata alcuna produzione di particelle virali pseudotipizzate dalla GP di ZEBOV (Fig. 23) [136]. Invece la pseudotipizzazione con VSV-G ha portato alla produzione di  $4.8 \times 10^6$  unità trasducenti/ml (Fig. 23). Si è quindi proceduto a ripetere la preparazione delle particelle lentivirali utilizzando diverse concentrazioni del plasmide codificante la GP per verificare se incrementando la quantità di GP vi fosse incorporazione, e quindi comparsa di fluorescenza nelle cellule successivamente trasdotte. Con tutte le concentrazioni di plasmide pVR1012-ZEBOV-GP testate (12.6, 25.2 e 37.8  $\mu\text{g}$ ) non è stato possibile rilevare alcun segnale di fluorescenza nelle cellule Vero trasdotte, a differenza di quanto osservato con i relativi controlli ottenuti dalle cellule HEK293T trasfettate con la corrispondente quantità di plasmide pVSV-G.

Nel caso del sistema basato sul VSV inizialmente è stato prodotto il *working stock* di virus ricombinante esprimente sul pericapside la glicoproteina naturale VSV-G (VSV ricombinante) [135]. Cellule HEK293T sono state trasfettate con 16  $\mu\text{g}$  di plasmide pVSV-G e 24 ore dopo la trasfezione sono state infettate con il VSV ricombinante ad una molteplicità di infezione (MOI) di 0.1 *focus forming units* (FFU)/cellula. 24 ore dopo l'infezione le particelle virali sono state raccolte e quantificate infettando cellule Vero per 2 ore con diluizioni seriali dello *stock*. Dopo un'incubazione di 24 ore, la percentuale di cellule infettate, e quindi positive alla GFP, è stata misurata al citofluorimetro.



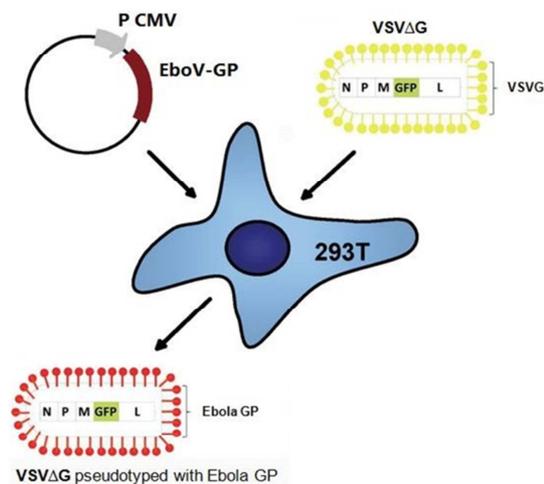
**Figura 24. Produzione del *working stock* di VSVΔG-GFP.** Cellule HEK293T sono state trasfettate con 16  $\mu\text{g}$  di pVSV-G, quindi dopo 24 ore infettate con il VSV ricombinante a 0.1 FFU/cellula. A 24 ore dall'infezione le particelle virali prodotte sono state raccolte e quantificate su cellule Vero trasdotte per 2 ore con diluizioni seriali in base 10 del

sopranatante raccolto. 24 ore dopo l'infezione le cellule positive alla GFP sono state quantificate mediante analisi citofluorimetrica confrontandole con cellule Vero non trasdotte (*mock*).

Dalla quantificazione in citofluorimetria mostrata in figura 24 è stato ottenuto in media un titolo virale di circa  $2 \times 10^6$  FFU/ml dalle varie produzioni di VSV ricombinante.

Una volta ottenuto il *working stock* si è proceduto alla ottimizzazione del protocollo di pseudotipizzazione del VSV ricombinante con la GP di ZEBOV secondo un protocollo disponibile in letteratura per la pseudotipizzazione del VSV con glicoproteine eterologhe [135]. Cellule HEK293T sono state trasfettate con il plasmide pVR1012 ZEBOV GP e 24 ore dopo la trasfezione sono state infettate con il VSV ricombinante ad una MOI di 4 o 5 FFU/cellula (Fig. 25 A). 24 ore dopo l'infezione le particelle sono state raccolte e quantificate infettando cellule Vero per 2 ore con diluizioni seriali dello *stock* (Fig. 25 B). Dopo 24 ore la percentuale delle cellule positive alla GFP è stata valutata mediante analisi citofluorimetrica (Fig. 25 C).

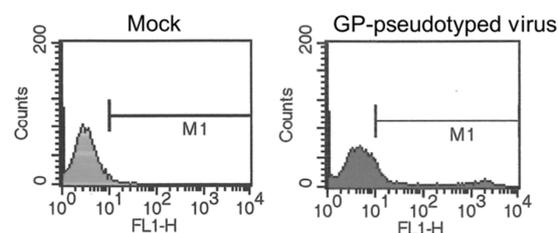
**(A) Production of VSV $\Delta$ G-GFP pseudotyped by EBOV GP on HEK293T cells**



**(B) Titration on Vero cells**



**(C) FACS analysis**

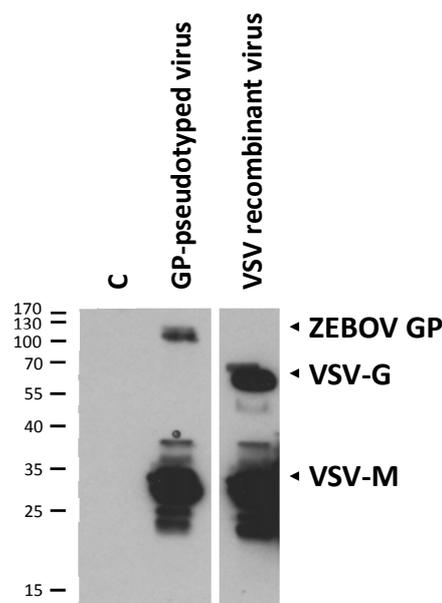


**Figura 25. Protocollo di produzione del VSV $\Delta$ G-GFP pseudotipizzato dalla GP di ZEBOV.** Cellule HEK293T a confluenza dell'80-90 % sono state trasfettate con 16  $\mu$ g del costrutto pVR1012 ZEBOV-GP. 24 ore dopo la trasfezione sono state infettate alla MOI di 4 o 5 FFU/cellula con il VSV ricombinante per 4 ore. 24 ore dopo l'infezione le particelle virali

sono state raccolte (A). (B) Le particelle sono state titolate infettando cellule Vero, seminate 24 ore prima in piastre da 6-well, con diluizioni seriali in base 10 dello *stock* per 2 ore. 24 ore dopo l'infezione le cellule sono state raccolte e lavate in buffer fosfato salino (PBS), e la percentuale di cellule infettate è stata analizzata al citofluorimetro quantificando le cellule GFP-positive confrontandola con cellule Vero non trasdotte (*mock*) (C).

Dalla titolazione in citofluorimetria (Fig. 25 C) sono stati ottenuti i titoli di  $2 \times 10^6$  FFU/ml e  $4-6 \times 10^5$  FFU/ml con le MOI 4 e 5 FFU/cellula rispettivamente. Questa differenza è stata attribuita al fatto che la MOI di infezione più alta era associata ad un maggior effetto tossico sulle cellule inficiando così la produzione delle particelle virali. Quindi si è scelto di utilizzare la MOI 4 FFU/cellula per le successive preparazioni di VSV $\Delta$ G-GFP pseudotipizzato dalla GP di ZEBOV, VSV $\Delta$ G-GP.

Al fine di dimostrare la presenza della GP sul pericapside del virus pseudotipizzato, le particelle virali sono state concentrate mediante ultracentrifugazione su cuscino di saccarosio, come descritto nei materiali e metodi, lisate, le proteine separate in SDS-PAGE e visualizzate tramite *western blot* (WB) utilizzando anticorpi in grado di riconoscere la GP di ZEBOV, la glicoproteina del VSV (VSV-G), e la proteina di matrice del VSV (VSV-M) come controllo di produzione.



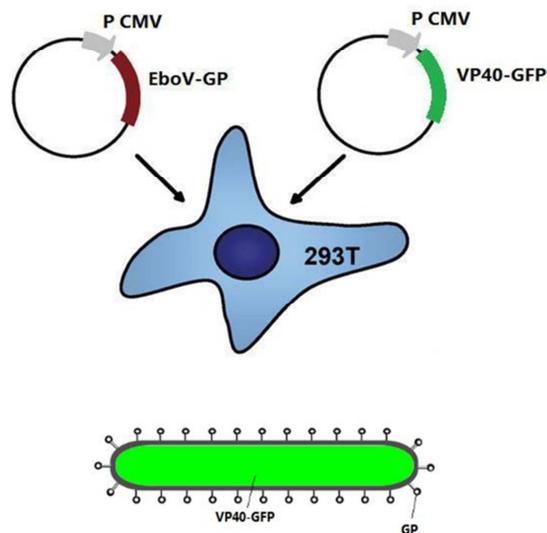
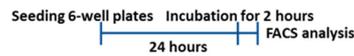
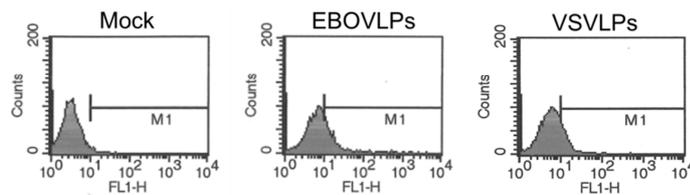
**Figura 26. Il VSV ricombinante incorpora la glicoproteina GP di ZEBOV sul pericapside.** Cellule HEK293T, trasfettate con il plasmide esprimente la GP di ZEBOV, pVR1012-ZEBOV-GP o con il plasmide pVSV-G, sono state infettate dopo 24 ore con il VSV $\Delta$ G-GFP esprimente la sua glicoproteina sul pericapside (VSV ricombinante) per 4 ore alla MOI di 4 FFU/cellula nel caso delle cellule trasfettate con pVR1012-ZEBOV-GP, o 0.1 FFU/cellula nel caso delle cellule trasfettate con pVSV-G. 24 ore dopo l'infezione le particelle virali sono state raccolte e concentrate attraverso cuscino di saccarosio 20 % p/v mediante ultracentrifugazione per 2 ore a 28,000 RPM e a 4°C, quindi sono state lisate. Le proteine sono state separate in SDS-PAGE e visualizzate in WB con anticorpi anti-GP anti-VSV-M e anti-VSV-G. "C" rappresenta il surnatante di cellule non trasfettate né infettate. A destra le punte di freccia indicano le diverse proteine visualizzate e a sinistra sono indicati i *marker* di peso molecolare (kDa).

Come visualizzabile nel WB (Fig. 26) le particelle di VSV $\Delta$ G-GP contengono sul loro pericapside la GP di ZEBOV e non è rilevabile alcuna VSV-G residua dell'infezione per la produzione dello *stock*.

Come atteso, il VSV ricombinante utilizzato come controllo presenta la glicoproteina naturale VSV-G sulla sua superficie.

Le particelle virali pseudotipizzate mantengono forma e dimensione del virus di origine, nel caso del VSVΔG-GFP 180 nm contro 1μm di EBOV [73]. Quindi per studi di *trafficking*, al fine di evitare possibili differenze nella via di internalizzazione rispetto ad EBOV *wild-type*, si usano le particelle simil-virali (VLP) basate sulla proteina di matrice VP40 di EBOV. Come descritto nel paragrafo 1.1.2.1 l'espressione in cellule di mammifero della VP40 porta alla produzione e gemmazione di VLP dotate di pericapside lipidico. La VP40 se co-espressa con la GP, o con la glicoproteina eterologa VSV-G, è in grado di formare VLP che conterranno sul pericapside la glicoproteina co-espressa: GP (EBOVLP) o VSV-G (VSVLP). Le VLP hanno una struttura filamentosa analoga a quella di EBOV indipendentemente dalla glicoproteina presente nel pericapside [50]. La sequenza codificante VP40 è stata fusa *in frame* alla sequenza della GFP rendendo così le VLP fluorescenti [84]. La fluorescenza intrinseca delle VLP viene quindi sfruttata come tracciante per monitorare in microscopia il *trafficking* delle VLP all'interno della cellula, o per quantificarne l'adesione/ingresso mediante analisi al citofluorimetro.

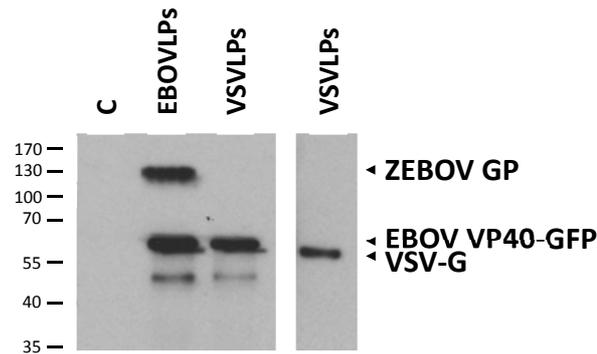
A questo scopo cellule HEK293T sono state co-trasfettate con i plasmidi esprimenti le glicoproteine di EBOV o VSV, 0.5 μg di pVR1012 ZEBOV-GP o pVSV-G rispettivamente, e il plasmide codificante la proteina di matrice VP40 di EBOV fusa *in frame* alla GFP (V40-GFP) 11.5 μg di pVP40-GFP. 48 ore dopo la trasfezione le VLP sono state raccolte (Fig. 27 A) e quantificate incubando per 2 ore cellule Vero con diluizioni seriali dello *stock* (Fig. 27 B). Al termine delle 2 ore di incubazione con le VLP fluorescenti le cellule GFP-positive sono state quantificate al citofluorimetro (Fig. 27 C).

**(A) Production of EBOVLPs on HEK293T cells****(B) Titration on Vero cells****(C) FACS analysis**

**Figura 27. Protocollo di produzione delle EBOVLP.** Cellule HEK293T a confluenza del 80-90 % sono state co-trasfettate con 0.5  $\mu\text{g}$  di pVR1012 ZEBOV-GP, o pVSV-G nel caso delle VSVLP, e 11.5  $\mu\text{g}$  di pVP40-GFP. 6 ore dopo la trasfezione le cellule sono state lavate con PBS per rimuovere i residui della trasfezione e 48 ore dopo la trasfezione le VLP sono state raccolte (A). Le particelle simil-virali sono state titolate incubando cellule Vero, seminate 24 ore prima in piastre da 6-*well*, con diluizioni seriali dello stock per 2 ore. Al termine delle 2 ore le cellule sono state raccolte e lavate in PBS, e la percentuale di cellule che hanno internalizzato le VLP è stata analizzata al citofluorimetro quantificando le cellule GFP-positive confrontandola con cellule Vero non trasdotte (*mock*).

La quantificazione delle EBOVLP ha dato titoli dell'ordine del  $10^4/10^5$  unità trasducenti/ml, e  $10^5/10^6$  unità trasducenti/ml per le VLP prodotte in cellule trasfettate con VSV-G, VSVLP (Fig. 27 C).

Come per il VSV $\Delta$ G-GFP, anche per le VLP è stata verificata l'incorporazione delle glicoproteine sul pericapside. Le VLP sono state concentrate mediante ultracentrifugazione su cuscino di saccarosio, come descritto nei materiali e metodi, sono state lisate, le proteine separate in SDS-PAGE e visualizzate tramite *western blot* utilizzando anticorpi contro la GP di ZEBOV, la VSV-G e contro la GFP della VP40-GFP come controllo di produzione.



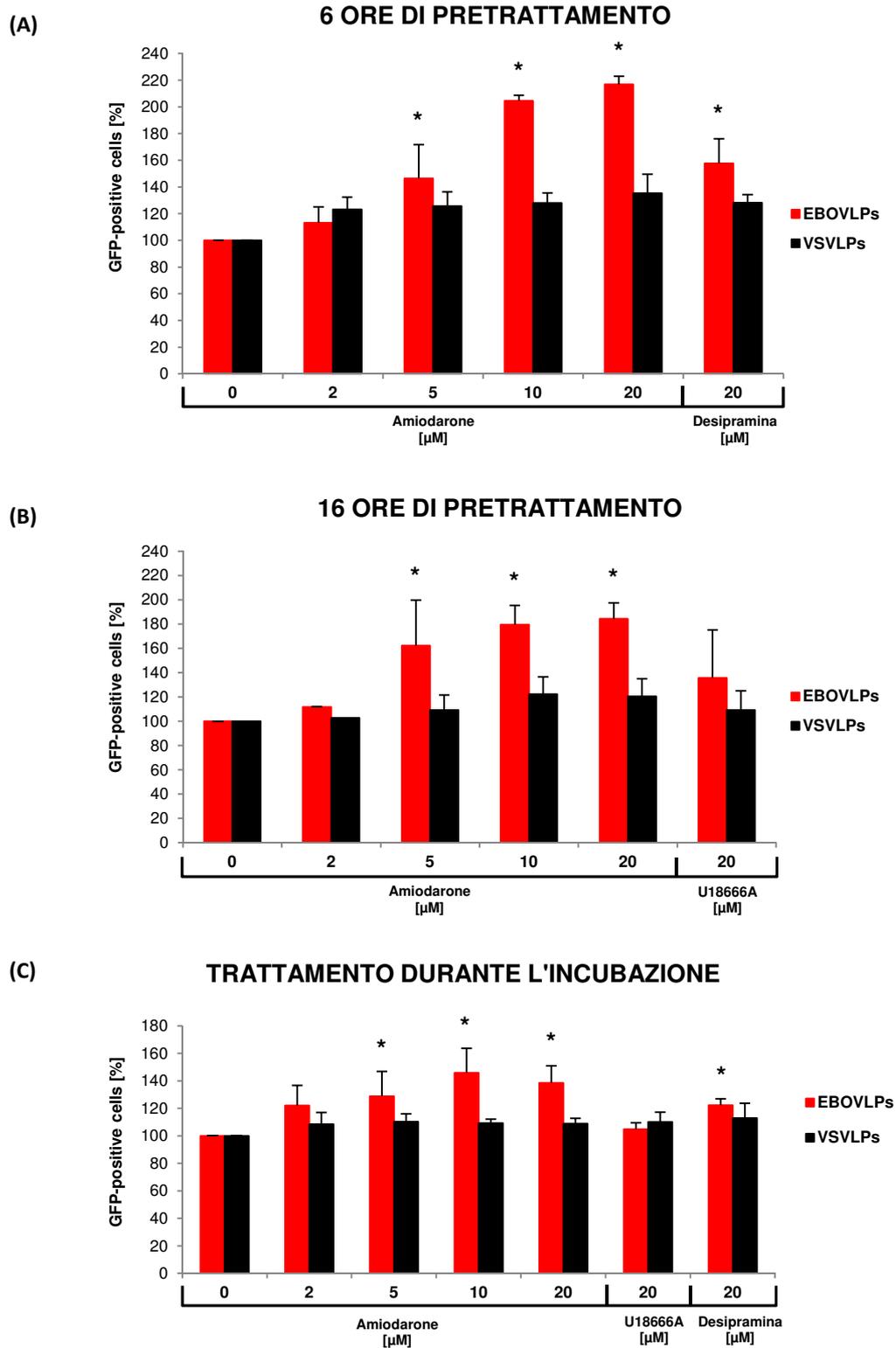
**Figura 28. Le VLP di Ebola incorporano la GP o la VSV-G nel pericapside.** Cellule HEK293T sono state co-trasfettate con il plasmide esprimente la GP di ZEBOV pVR1012-ZEBOV-GP, o con il plasmide esprimente VSV-G, pVSV-G, e il plasmide codificante la VP40-GFP pVP40-GFP. 48 ore dopo la trasfezione le VLP prodotte sono state raccolte e concentrate attraverso un cuscino di saccarosio al 20 % p/v mediante ultracentrifugazione per 2 ore a 28,000 RPM e a 4°C, quindi sono state lisate. Le proteine sono state separate in SDS-PAGE e visualizzate in WB con anticorpi anti-GP, anti-VSV-G e anti-GFP. “C” rappresenta il surnatante di cellule non trasfettate. A destra le punte di freccia indicano le diverse proteine visualizzate e a sinistra sono indicati i *marker* di peso molecolare (kDa).

Come possiamo vedere dal WB (Fig. 28) le VLP contengono correttamente sul pericapside sia ZEBOV GP (colonna 2) che VSV-G (colonna 4).

### 4.3 AMIODARONE INIBISCE L’INGRESSO GP-MEDIATO

Dopo aver messo a punto la produzione dei due sistemi per lo studio dell’ingresso di EBOV nella cellula bersaglio, VSVΔG-GP ed EBOVLP, ed aver verificato l’incorporazione sul pericapside delle glicoproteine virali testate, si è potuto valutare l’effetto di differenti concentrazioni di amiodarone sull’internalizzazione di questi due sistemi mediata dalla GP di EBOV. In un precedente lavoro era stato dimostrato che le concentrazioni di amiodarone di seguito testate non determinavano effetti citotossici sulle cellule trattate.

Le cellule Vero sono state trattate con 0-2-5-10 o 20 μM di amiodarone o 20 μM di desipramina o 20 μM di U18666A, per 6 o 16 ore, o durante l’incubazione con le VLP, e quindi incubate con le VLP a 0.1 unità trasducenti/cellula per 2 ore. Dopo le 2 ore di incubazione la fluorescenza cellulo-associata è stata misurata mediante analisi citofluorimetrica. Come controlli sono stati inseriti due inibitori dell’infezione di EBOV, l’U18666A che induce un fenotipo NPC, e la desipramina che inibisce l’attività catalitica della L-aSMase [38,84]. Come controllo di specificità dell’azione di amiodarone sono state inserite le VLP esprimenti sul pericapside la glicoproteina VSV-G del VSV (VSVLP).



**Figura 29. Effetto di amiodarone sull'internalizzazione delle EBOVLP.** Cellule Vero sono state trattate con le concentrazioni 0-2-5-10 o 20  $\mu$ M di amiodarone, 20  $\mu$ M desipramina (A e C) o 20  $\mu$ M di U18666A (B e C), 6 ore prima (A), 16 ore prima (B) o durante (C) l'incubazione di 2 ore con VLP a 0.1 unità trasducenti/cellula. Dopo le 2 ore le cellule sono state staccate, lavate in PBS e la percentuale di cellule GFP-positive è stata misurata al citofluorimetro. I dati sono rappresentati come percentuale di cellule GFP-positive rapportata a quella ottenuta in assenza di farmaco (0) posta come 100 %, e rappresentano la media  $\pm$  deviazione standard (SD) di 3 esperimenti indipendenti condotti in

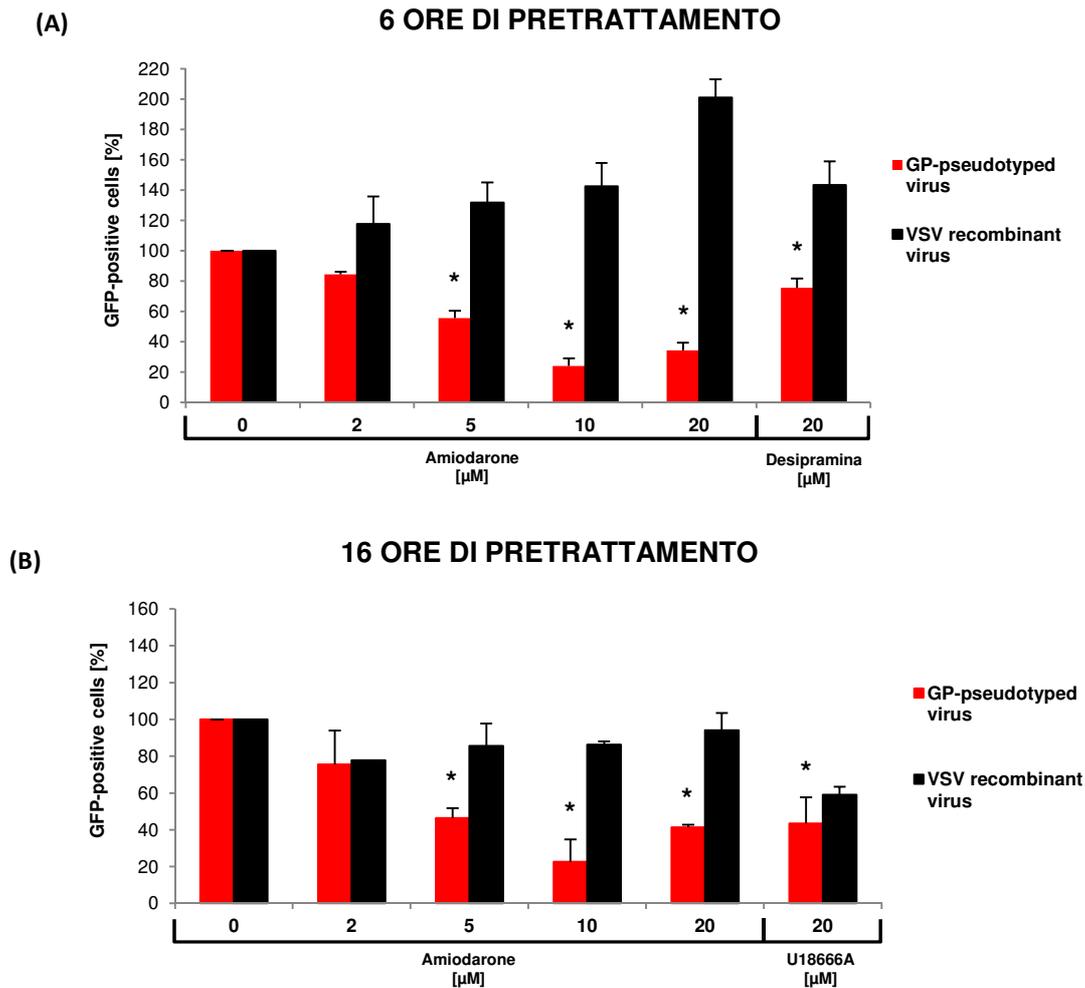
duplicato. “\*” rappresenta una differenza statisticamente significativa rispetto al controllo di cellule non trattate con il farmaco (0).

Come riportato in figura 29 si osserva che con 6 ore di pretrattamento, che determinano la massima inibizione dell'attività dell'L-aSMasi (par. 1.2.2), si ha un accumulo dose-dipendente delle EBOVLP. Mentre nel caso delle VSVLP si ha un lieve accumulo in presenza delle diverse concentrazioni di farmaco. In presenza di desipramina, si osserva che le EBOVLP accumulano in maniera paragonabile al trattamento con amiodarone 5  $\mu$ M mentre alle concentrazioni superiori aumenta l'effetto di accumulo (Fig. 29 A). Con una preincubazione delle cellule con amiodarone per 16 ore (Fig. 29 B) si osserva un accumulo delle EBOVLP quasi massimo già dalla concentrazione 5  $\mu$ M. Mentre nel caso delle VSVLP l'accumulo nelle cellule è modesto a tutte le concentrazioni di farmaco testate. Il trattamento con U18666A non causa un accumulo significativo delle EBOVLP, nonostante anche questa molecola porti allo sviluppo del fenotipo NPC completo come amiodarone (par. 1.1.3.1). Questo risultato suggerisce che amiodarone e U18666A agiscono sulle EBOVLP con meccanismo diverso.

Nel trattamento con amiodarone solo durante l'incubazione delle VLP si osserva comunque un effetto di accumulo delle EBOVLP alle diverse concentrazioni di amiodarone, indipendente dallo sviluppo del fenotipo simil-NPC (Fig. 29 C). Quasi nullo è invece l'accumulo delle VSVLP. Nel caso dei controlli solo la desipramina esplica un accumulo statisticamente significativo paragonabile a quello osservato in presenza di 2  $\mu$ M di amiodarone, comunque di minor entità rispetto alle 6 ore,  $122.3 \pm 4.7$  % contro  $157.8 \pm 18.4$  % rispettivamente.

Per confermare più chiaramente l'azione di amiodarone sull'ingresso GP-mediato, è stato utilizzato il virus VSV $\Delta$ G-GFP pseudotipizzato dalla GP di ZEBOV (VSV $\Delta$ G-GP) il quale, a differenza delle VLP, deve fondere e avviare l'infezione per esprimere la GFP, così da permettere la quantificazione della percentuale di cellule infettate. Sono state valutate nuovamente sia 6 che 16 ore di pretrattamento delle cellule con amiodarone, comparando le osservazioni con i due inibitori U18666A e desipramina, e con il VSV $\Delta$ G-GFP esprime sul pericapside la glicoproteina naturale VSV-G come controllo di specificità [38,84].

Le cellule Vero sono state pretrattate per 6 o 16 ore con diverse concentrazioni di amiodarone, 0-2-5-10 o 20, o 20  $\mu$ M di desipramina o 20  $\mu$ M di U18666A. Successivamente sono state infettate con i due tipi di VSV $\Delta$ G-GFP alla MOI di 0.1 FFU/cellula. 2 ore dopo l'infezione, l'inoculo virale è stato rimosso e le cellule sono state incubate per altre 24 ore con le rispettive concentrazioni dei composti. Infine, la fluorescenza, data dall'espressione della GFP codificata dal virus, è stata quantificata misurando le cellule GFP-positive mediante analisi citofluorimetrica.



**Figura 30. Effetto di amiodarone sull'infezione del virus VSVΔG-GFP.** Cellule Vero sono state trattate con 0-2-5-10 o 20 μM di amiodarone, 20 μM di U18666A o 20 μM di desipramina per 6 (A) o 16 ore (B) prima dell'infezione per 2 ore con il virus VSVΔG-GP (*GP-pseudotyped virus*) o VSVΔG-GFP incorporante nel pericapside la glicoproteina naturale VSV-G (*VSV recombinant virus*) a MOI 0.1 FFU/cellula. Successivamente, una volta rimosso l'inoculo virale, le cellule sono state di nuovo incubate con le rispettive concentrazioni dei diversi composti per altre 24 ore. 24 ore dopo l'infezione le cellule sono state staccate, lavate in PBS e la percentuale di cellule GFP-positiva è stata misurata al citofluorimetro. I dati sono rappresentati come percentuale di cellule GFP-positiva rapportata a quella ottenuta in assenza di farmaco (0) posta come 100 %, e rappresentano la media ± SD di 3 esperimenti indipendenti condotti in duplicato. "\*" rappresenta una differenza statisticamente significativa rispetto al controllo di cellule non trattate con il farmaco (0).

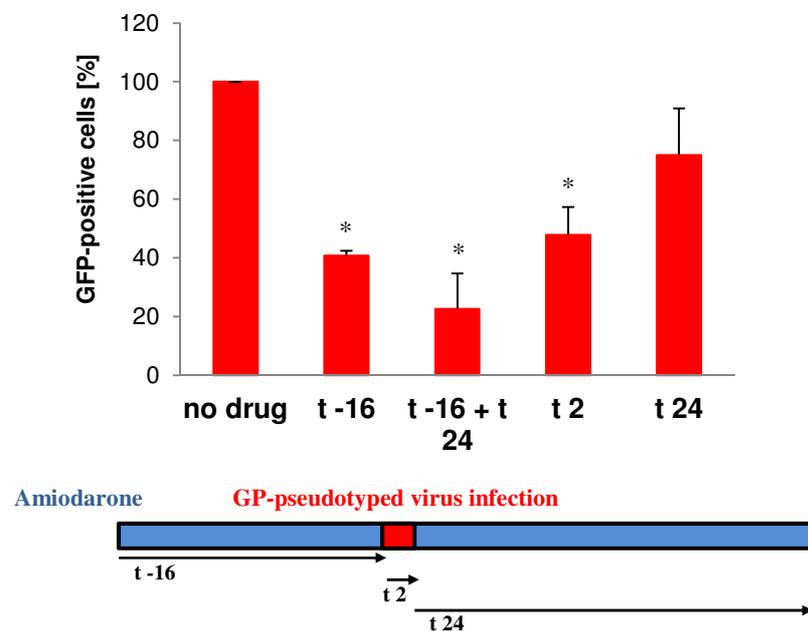
Dai grafici della figura 30 si osserva che amiodarone promuove (Fig. 30 A) o influenza solo debolmente (Fig. 30 B) l'infezione del VSV ricombinante, mentre inibisce significativamente l'infezione del VSVΔG-GP. Inoltre, sempre nel caso dell'infezione con VSVΔG-GP, si apprezza la dose-dipendenza dell'effetto sia dopo 6 che dopo 16 ore di pretrattamento. Nel caso del VSV ricombinante, dopo 6 ore di trattamento con amiodarone si osserva un aumento dell'infettività in maniera dose-dipendente, quindi le modificazioni cellulari indotte da amiodarone potrebbero promuovere l'ingresso di questo virus.

Nella maggior parte dei casi l'inibizione di amiodarone sull'infezione è maggiore di quella osservata nei controlli [38,84]. Infatti, nel caso di desipramina l'effetto di amiodarone è

maggiore alle concentrazioni 5, 10 e 20  $\mu\text{M}$ , nel caso di U18666A è simile alla concentrazione 5  $\mu\text{M}$  e maggiore a 10 e 20  $\mu\text{M}$ .

Per valutare ulteriormente l'effetto del tempo di esposizione delle cellule ad amiodarone sull'inibizione dell'infezione GP-mediata sono state testate diverse tempistiche di trattamento con 10  $\mu\text{M}$  di amiodarone.

Cellule Vero sono state incubate con amiodarone 16 ore prima (t -16), 16 ore prima e 24 ore dopo (t -16 + t 24), durante (t 2) o solo dopo (t 24) l'adesione di 2 ore con il virus VSV $\Delta$ G-GP ad una MOI di 0.1 FFU/cellula. 24 ore dopo la percentuale di cellule infettate è stata misurata al citofluorimetro.



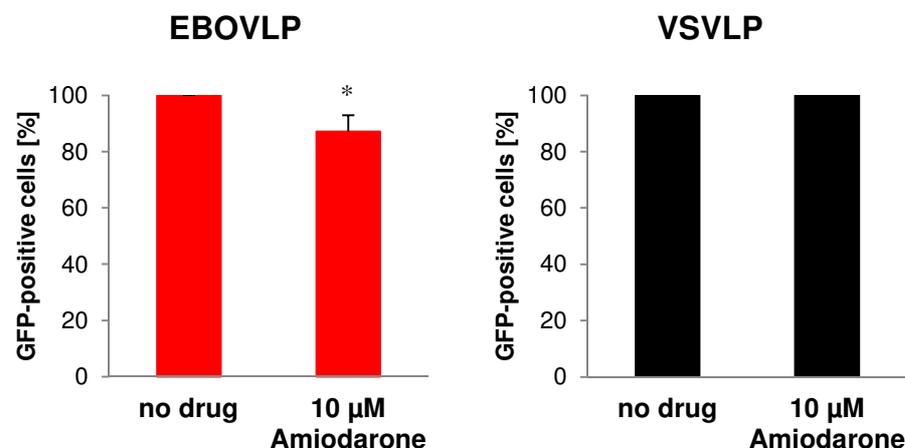
**Figura 31. Effetto di differenti incubazioni con amiodarone sull'infezione con VSV $\Delta$ G-GP.** Cellule Vero sono state trattate con 10  $\mu\text{M}$  di amiodarone 16 prima (t -16), 16 ore prima e 24 ore dopo (t -16 + t 24), durante (t 2) o solo 24 ore dopo (t 24) l'infezione con VSV $\Delta$ G-GP (GP-pseudotyped virus) a MOI 0.1 FFU/cellula per 2 ore. 24 ore dopo l'infezione le cellule sono state staccate, lavate in PBS e la percentuale di cellule infettate, positive alla GFP, è stata misurata al citofluorimetro. I dati sono rappresentati come percentuale di cellule GFP-positive rapportata a quella ottenuta in assenza di farmaco (*no drug*) posta come 100 %, e rappresentano la media  $\pm$  SD di 3 esperimenti indipendenti condotti in duplicato. "\*" rappresenta una differenza statisticamente significativa rispetto al controllo di cellule non trattate con il farmaco (*no drug*).

Come si osserva in figura 31 l'inibizione dell'infezione è dipendente dalla presenza di amiodarone prima o nelle primissime fasi dell'infezione. Infatti, l'inibizione dell'infezione raggiunge il massimo alle condizioni t -16 + t 24 (77.4  $\pm$  12.1 %) mentre è intermedia a t -16 e a t 2, 59.3  $\pm$  1.6 % e 52.2  $\pm$  9.5 % rispettivamente. Nel caso del trattamento eseguito dopo la fase di adesione (t 24) si ha una ridotta inibizione dell'infezione 25  $\pm$  15.9 %. I risultati ottenuti con i trattamenti t -16 e t 2 sono concordi a quanto precedentemente riscontrato in termini di accumulo delle EBOVLP (Fig. 29).

Complessivamente questi risultati suggeriscono che amiodarone agisca nelle fasi precoci dell'infezione virale.

#### 4.4 AMIODARONE INTERFERISCE CON IL LEGAME DELLE VLP DI EBOLA ALLA SUPERFICIE CELLULARE

L-aSMasi e SM sono richieste per un efficiente legame del virus Ebola alla membrana plasmatica delle cellule bersaglio [84]. Il nostro gruppo ha precedentemente dimostrato che amiodarone induce un accumulo intracellulare di sfingomieline [124], e, recentemente, ha osservato che amiodarone è in grado di inibire l'attività della L-aSMasi promuovendone anche la degradazione [120]. Al fine di valutare se amiodarone influenza il legame delle particelle virali alla superficie cellulare le EBOVLP sono state incubate per 1 ora a 4°C con le cellule Vero precedentemente trattate per 16 ore con 10 µM di amiodarone. A questa temperatura le VLP si legano alla superficie cellulare ma non vengono internalizzate [38,84]. Quindi la fluorescenza cellulare associata dovuta alle VLP legate alla membrana plasmatica è stata valutata in citofluorimetria.



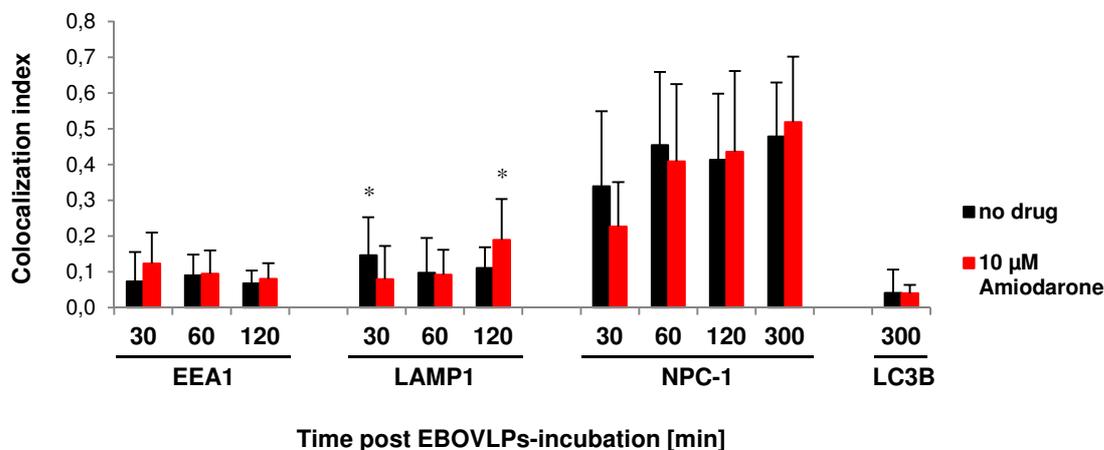
**Figura 32. Effetto di amiodarone sul legame delle EBOVLP alle cellule bersaglio.** Cellule Vero sono state trattate con 10 µM di amiodarone 16 ore prima dell'incubazione per 1 ora a 4°C con VLP a 0.1 unità trasducenti/cellula. Dopo l'ora di incubazione le cellule sono state staccate, lavate in PBS e la percentuale di cellule GFP-positive è stata misurata al citofluorimetro. I dati sono rappresentati come percentuale di cellule GFP-positive rapportata a quella ottenuta in assenza di farmaco (*no drug*) posta come 100 %, e rappresentano la media ± SD di 3 esperimenti indipendenti condotti in duplicato. "\*" rappresenta una differenza statisticamente significativa rispetto al controllo di cellule non trattate con il farmaco (*no drug*).

Dalla figura 32 si evince che amiodarone riduce specificatamente il legame delle EBOVLP alle cellule bersaglio del  $13 \pm 5.7$  %, mentre non si osserva nessun effetto sul legame delle VSVLP,  $0.07 \pm 0.51$  %. Questi valori sono in accordo con quanto precedentemente pubblicato con l'uso dell'imipramina, un analogo della desipramina, nella dimostrazione del ruolo di L-aSMasi sull'infezione di EBOV [84].

## 4.5 AMIODARONE RALLENTA IL *TRAFFICKING* DELLE EBOVLP LUNGO IL *PATHWAY* ENDOCITICO

Dopo aver analizzato l'adesione delle EBOVLP alla superficie cellulare, lo studio dell'influenza di amiodarone sull'internalizzazione GP-mediata delle particelle virali è proseguita con l'analisi del *trafficking* delle EBOVLP attraverso il *pathway* endocitico. È stato condotto uno studio di co-localizzazione delle EBOVLP con diversi *marker* cellulari di questo *pathway*: EEA1 per gli endosomi precoci e LAMP1 per i endosomi tardivi/lisosomi; oltre al recettore di EBOV NPC-1 a livello degli endosomi tardivi (LE). Dal momento che il nostro gruppo ha dimostrato in precedenza che amiodarone promuove l'autofagocitosi [124], è stato analizzato anche il contributo dell'autofagocitosi sul destino delle VLP analizzando la co-localizzazione delle EBOVLP con il *marker* degli autofagosomi LC3B.

Cellule Vero, pretrattate per 16 ore con 10  $\mu$ M di amiodarone, sono state incubate per 1 ora a 4°C con le EBOVLP. In seguito alla rimozione delle EBOVLP non legate le cellule sono state mantenute a 37°C con la stessa concentrazione di amiodarone per 30 fino a 300 minuti. Ad ogni tempistica le cellule sono state analizzate in microscopia confocale misurando la co-localizzazione delle EBOVLP con i *marker* EEA1, LAMP1, NPC-1 ed LC3B.



**Figura 33. Influenza di amiodarone sul *trafficking* delle EBOVLP.** Cellule Vero, trattate per 16 ore con 10  $\mu$ M di amiodarone, sono state incubate per 1 ora a 4°C con EBOVLP, e quindi, dopo il lavaggio delle EBOVLP non legate, sono state incubate per 30-300 minuti a 37°C nuovamente in presenza di 10  $\mu$ M di amiodarone. Alle tempistiche indicate le cellule sono state fissate e marcate per i diversi *marker* con i relativi anticorpi primari e i secondari coniugati al fluoroforo rosso Alexa 568. Le cellule sono state analizzate in microscopia confocale calcolando l'indice di co-localizzazione, come descritto nei materiali e metodi. I dati rappresentano la media  $\pm$  SD di 3 esperimenti indipendenti condotti in duplicato. "\*" rappresenta la differenza statisticamente significativa rispetto alla condizione opposta nella stessa tempistica.

Con questo esperimento si evidenzia che a 30 minuti dal legame delle EBOVLP con la superficie cellulare si ha una maggior co-localizzazione delle EBOVLP con il *marker* degli endosomi precoci ed una minor co-localizzazione con il *marker* degli endosomi tardivi LAMP1 in presenza di

amiodarone rispetto al controllo non trattato ( $0.12 \pm 0.09$  contro  $0.07 \pm 0.08$  e  $0.08 \pm 0.09$  contro  $0.15 \pm 0.11$  rispettivamente) (Fig. 33). Dall'altro lato, dopo 2 ore la co-localizzazione con il *marker* degli endosomi tardivi LAMP1 è maggiore in presenza di amiodarone ( $0.19 \pm 0.11$ ) rispetto alle cellule di controllo ( $0.11 \pm 0.06$ ) (Fig. 33). Questo sembra suggerire che amiodarone rallenta la progressione delle EBOVLP lungo il *pathway* endocitico.

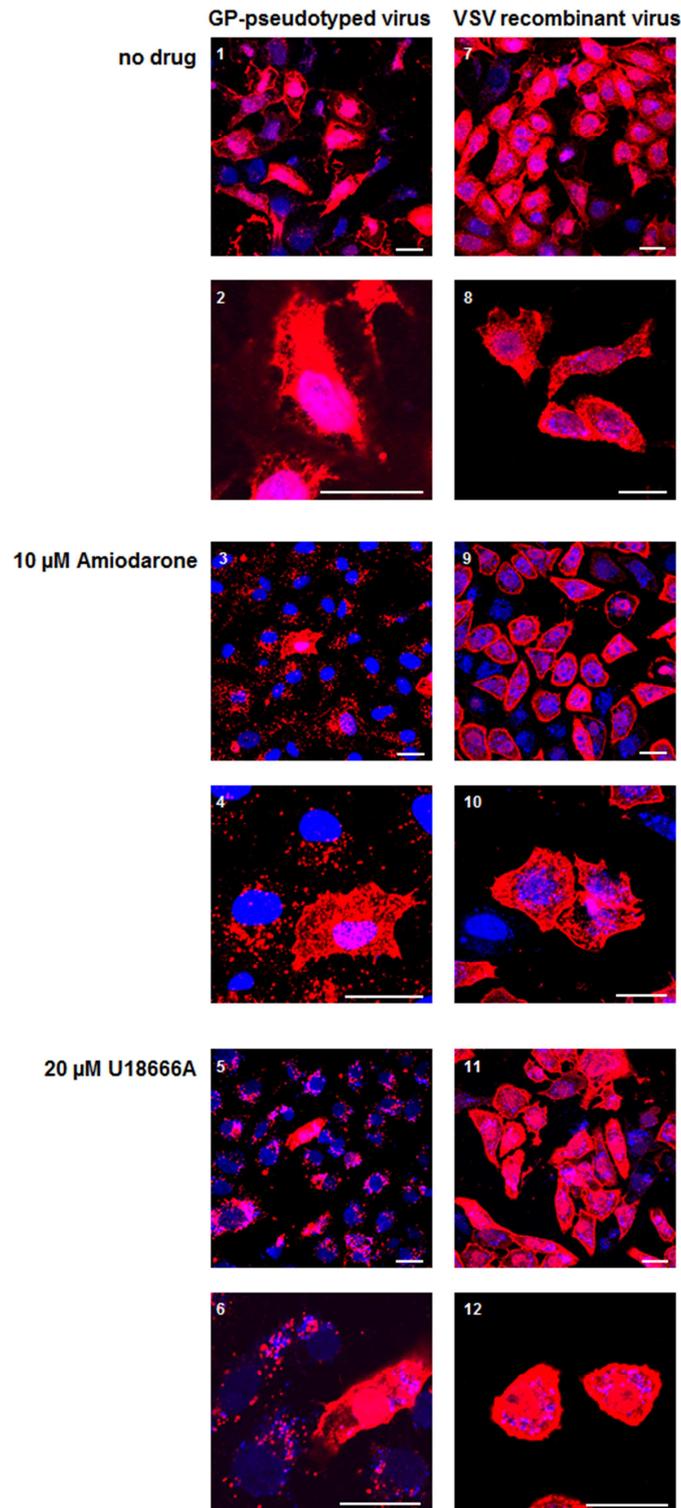
Nel caso della co-localizzazione con il recettore di EBOV NPC-1 (Fig. 33) si ha un andamento proporzionale al procedere del tempo in analisi, come è giusto che sia essendo questo il punto di arrivo delle particelle di EBOV. Inoltre, la presenza o meno di amiodarone non esercita alcuna differenza nella co-localizzazione delle EBOVLP con NPC-1 (Fig. 33), indicando che amiodarone non interferisce con il raggiungimento dei compartimenti NPC1<sup>+</sup> sede del legame GP-NPC-1 e fusione della particella, nonostante sia stato dimostrato che amiodarone ne altera la localizzazione cellulare [124].

Analizzando la co-localizzazione tra il *marker* LC3B e le EBOVLP non emergono differenze statisticamente significative tra le cellule trattate con amiodarone o meno (Fig. 33). Quindi l'aumento dell'autofagia non sembra avere un ruolo rilevante nell'effetto di amiodarone sull'ingresso GP-mediato.

## 4.6 AMIODARONE INIBISCE LA FUSIONE GP-MEDIATA CON LA MEMBRANA ENDOSOMIALE AGENDO SULL'ATTIVAZIONE DELLA GP

Finora è emerso che amiodarone inibisce il legame GP-mediato alle cellule bersaglio ed influenza la progressione delle EBOVLP lungo il *pathway* endocitico, si è quindi proceduto ad analizzare lo *step* successivo: la fusione. A livello dei LE si ha il legame della subunità 1 della GP (GP<sub>1</sub>) al suo recettore NPC-1 dopo processamento da parte delle catepsine endosomiali L e B attivate dal pH acido luminale. Il legame innesca una serie di cambiamenti conformazionali a carico della subunità 2 della GP (GP<sub>2</sub>), che portano alla fusione del pericapside virale con la membrana endosomiale [88]. Con l'intenzione di analizzare l'effetto di amiodarone sulla fusione GP-mediata è stato adottato il saggio di fusione descritto in letteratura sul virus VSVΔG-GP [38]. Questo saggio si basa sulla diffusione della proteina di matrice VSV-M nel citoplasma in seguito all'avvenuta fusione, e che questa possa essere marcata da un opportuno anticorpo così da essere visualizzata in microscopia confocale. Infatti l'indice di avvenuta fusione è una colorazione citoplasmatica diffusa dovuta al rilascio della proteina VSV-M, mentre nel caso di mancata fusione la VSV-M rimane confinata negli endosomi determinando una marcatura puntata.

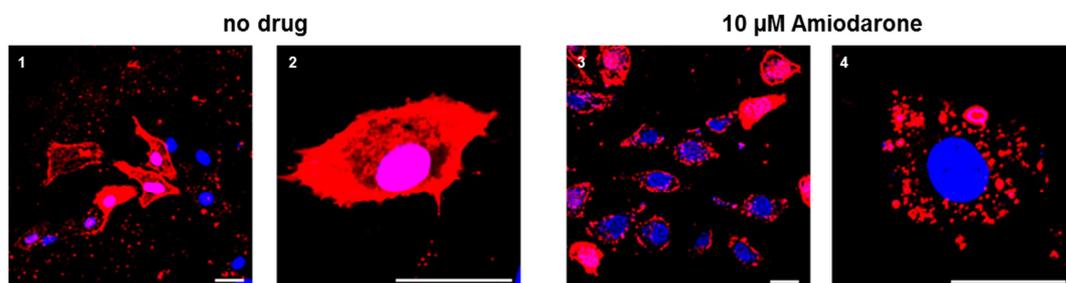
Cellule Vero, trattate per 16 ore con 10 μM di amiodarone o con 20 μM di U18666A, sono state infettate per 3 ore con il VSVΔG-GP o con il virus di controllo (VSV ricombinante) alla MOI di 20 FFU/cellula. Al termine delle 3 ore le cellule preventivamente fissate e marcate con l'anticorpo anti-VSV-M sono state analizzate mediante immunofluorescenza indiretta [38].



**Figura 34. Effetto di amiodarone sulla fusione del VSV $\Delta$ G-GP con la membrana endosomiale.** Cellule Vero sono state trattate per 16 ore con 10  $\mu$ M di amiodarone o 20  $\mu$ M di U18666A, e quindi infettate per 3 ore con VSV $\Delta$ G-GP (*GP-pseudotyped virus*, pannelli a sinistra) o con VSV ricombinante (*VSV recombinant virus*, pannelli a destra) ad una MOI di 20 FFU/cellula. 3 ore dopo l'infezione le cellule sono state fissate in paraformaldeide al 2 % p/v e permeabilizzate in Triton X-100 0.1 % v/v. La proteina di matrice VSV-M è stata quindi marcata in rosso mediante l'anticorpo primario anti-VSV-M 23H12 e il relativo anticorpo secondario Alexa 568. I nuclei sono colorati in blu con il DRAQ5<sup>®</sup>. Le immagini sono state acquisite con il microscopio confocale Nikon A1 ad ingrandimento 60X, le barre della scala rappresentano 25  $\mu$ m.

Come si osserva dalla figura 34 nelle cellule di controllo (*no drug*, pannelli 1-2 e 7-8) entrambi i virus fondono con le membrane endosomiali liberando la proteina VSV-M nel citoplasma, riconoscibile dalla colorazione rossa diffusa. In presenza di amiodarone (panelli 3-4 e 9-10) il VSV ricombinante fonde correttamente come nelle cellule non trattate, mentre nella maggioranza delle cellule infettate dal VSVΔG-GP si osserva una colorazione puntata. Questi risultati indicherebbero che la fusione GP-mediata è bloccata dal trattamento con amiodarone. A supporto di questa conclusione vi è il fenotipo determinato dal trattamento con U18666A, il quale blocca la fusione in alcune cellule infettate dal VSVΔG-GP, visibile dalla colorazione puntata (panelli 5-6), ma non esercita alcun effetto sull'infezione col VSV ricombinante (panelli 11-12).

Risultati simili sono stati ottenuti, sebbene con minor efficienza, nel caso del trattamento con amiodarone soltanto durante le 3 ore di incubazione con il virus (Fig. 35).

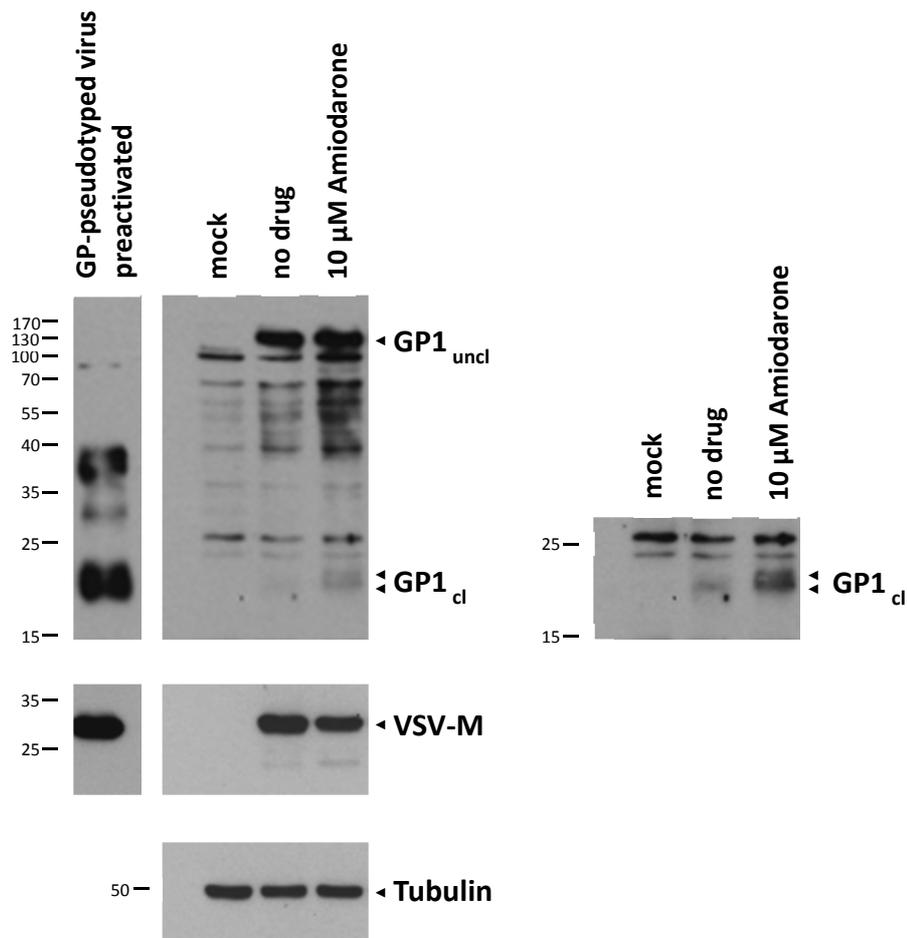


**Figura 35. Effetto sulla fusione del VSVΔG-GP con le membrane endosomiali trattando con amiodarone solamente durante l'infezione.** Cellule Vero sono state trattate con 10  $\mu$ M di amiodarone per 3 ore durante l'infezione con VSVΔG-GP ad una MOI di 20 FFU/cellula. 3 ore dopo l'infezione le cellule sono state fissate in paraformaldeide al 2 % p/v e permeabilizzate in Triton X-100 0.1 % v/v. La proteina di matrice VSV-M è stata quindi marcata in rosso mediante l'anticorpo primario anti-VSV-M 23H12 e il relativo anticorpo secondario Alexa 568. I nuclei sono colorati in blu con il DRAQ5<sup>®</sup>. Le immagini sono state acquisite con il microscopio confocale Nikon A1 ad ingrandimento 60X, le barre della scala rappresentano 25  $\mu$ m.

Questo dimostra che amiodarone esercita un'azione inibitoria sulla fusione GP-mediata anche a tempi brevi indipendentemente dallo sviluppo del fenotipo simil-NPC.

Considerando che lo *step* di fusione richiede innanzitutto il processamento della GP<sub>1</sub> dalla forma di 130 kDa alla forma di 19 kDa ad opera della catepsina endosomiale L e catepsina endosomiale B, è stato analizzato se amiodarone fosse in grado di influenzare questo processo.

Cellule Vero sono state pretrattate per 16 ore con 10  $\mu$ M di amiodarone, quindi infettate con il VSVΔG-GP a MOI di 20 FFU/cellula. Dopo le 3 ore di incubazione con il virus le cellule sono state lisate, le proteine separate in SDS-PAGE, e visualizzate tramite WB con un anticorpo anti-GP<sub>1</sub> in grado di riconoscere sia la forma nativa che la forma processata della GP<sub>1</sub>, un anticorpo anti-VSV-M come controllo di infezione, e la tubulina come controllo di caricamento.

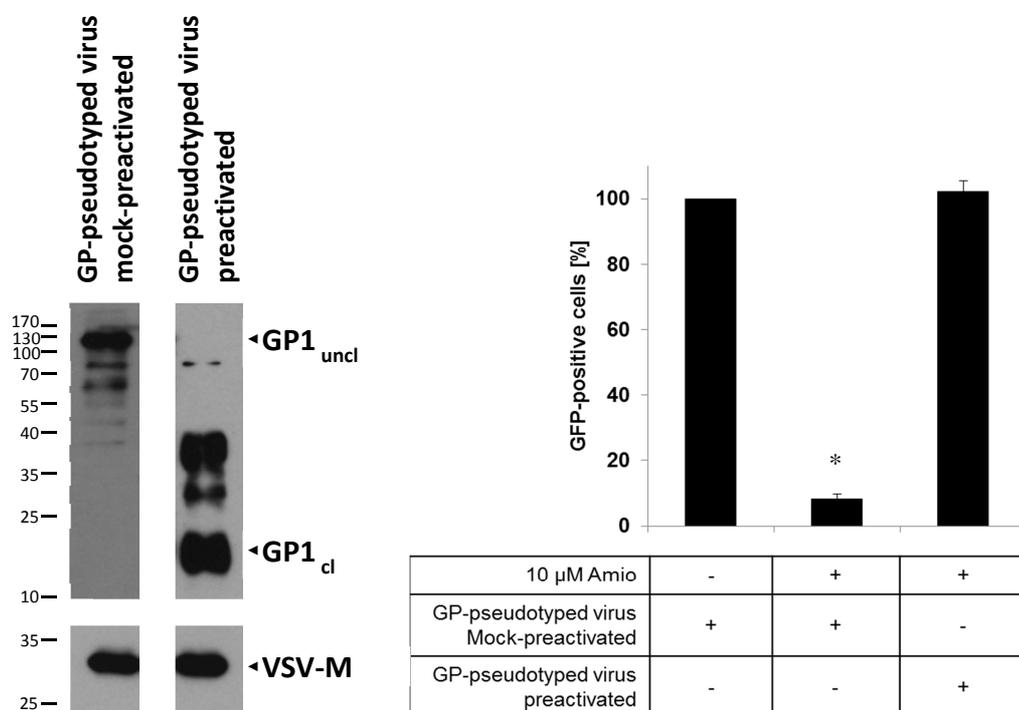


**Figura 36. Processamento intracellulare della GP<sub>1</sub> in presenza o meno di amiodarone.** Cellule Vero sono state trattate per 16 ore con 10 μM di amiodarone, o meno (*no drug*), e quindi infettate con VSVΔG-GP (*GP-pseudotyped virus*) alla MOI di 20 FFU/cellula. 3 ore dopo le cellule sono state lisate, le proteine, separate in SDS-PAGE ed evidenziate in WB con anticorpi anti-GP<sub>1</sub> sia contro la forma nativa (GP<sub>1uncl</sub>) che contro le forme processate da 20 e 19 kDa (GP<sub>1cl</sub>), anti-VSV-M e anti-tubulina. Le punte di freccia indicano le bande corrispondenti alle proteine visualizzate. Come controllo della forma processata è stato caricato il VSVΔG-GP preattivato (*GP-pseudotyped virus preactivated*), la cui GP è stata processata *in vitro* dalla termolisina come spiegato nei materiali e metodi. “Mock” indica cellule non trattate e non infettate. Il pannello a destra rappresenta una porzione del WB di sinistra con un’esposizione maggiore allo scopo di evidenziare meglio le forme processate. I numeri riportati sul lato sinistro dei WB indicano i *marker* di peso molecolare (kDa).

Il WB di figura 36 dimostra come in presenza di pretrattamento con amiodarone si ha un accumulo lieve della forma nativa di 130 kDa, e più marcato della forma parzialmente processata di 20 kDa e della forma completamente processata di 19 kDa. Inoltre le bande della proteina VSV-M evidenziano che in presenza di pretrattamento con amiodarone si ha una minor infezione (Fig. 36), in accordo con la ridotta adesione del virus alle cellule (par. 4.4). A questa tempistica la proteina VSV-M visualizzata è quella presente sul virus inoculato non di nuova sintesi.

Lo stesso risultato è stato ottenuto, nonostante l’accumulo delle diverse forme della GP<sub>1</sub> fosse minore, trattando le cellule con amiodarone soltanto durante le 3 ore di infezione con il VSVΔG-GP, quindi in assenza di un precedente accumulo all’interno della cellula.

Per confermare l'interferenza di amiodarone sul processamento della GP<sub>1</sub>, il VSVΔG-GP è stato preattivato *in vitro* con la proteasi batterica termolisina. In questo modo la GP<sub>1</sub> viene processata ottenendo la forma attiva da 19 kDa analogamente a quanto si ottiene dopo l'azione delle due catepsine endosomiali [134]. Quindi cellule Vero, trattate per 16 ore con 10 μM di amiodarone, sono state infettate per 2 ore con il VSVΔG-GP preattivato ad una MOI di 0.1 FFU/cellula. Dopo le 2 ore l'inoculo virale è stato rimosso e le cellule sono state esposte alla stessa concentrazione di farmaco per altre 24 ore al termine delle quali la percentuale di cellule infettate è stata quantificata mediante analisi citofluorimetrica delle cellule GFP-positive. La corretta proteolisi *in vitro* della GP<sub>1</sub> è stata confermata mediante analisi in WB delle proteine ottenute dai lisati delle particelle virali dopo concentrazione con ultracentrifugazione su cuscino di saccarosio, come descritto nei materiali e metodi.



**Figura 37. Processamento *in vitro* della GP<sub>1</sub>.** VSVΔG-GP è stato trattato con 0.2 mg/ml di termolisina (*GP-pseudotyped virus preactivated*) o nel solo *buffer* di reazione (*GP-pseudotyped virus mock-preactivated*) per 1 ora a 37°C. Un'aliquota delle particelle virali è stata usata per controllare il corretto processamento della GP<sub>1</sub> (pannello di sinistra) previa concentrazione attraverso un cuscino di saccarosio 20 % p/v in ultracentrifugazione per 2 ore a 28,000 RPM e a 4°C, e quindi sono state lisate. Le proteine, separate in SDS-PAGE, sono state visualizzate in WB con anticorpi anti-GP<sub>1</sub>, e anti-VSV-M come controllo di caricamento. A destra del WB le punte di freccia indicano le diverse proteine visualizzate e a sinistra sono indicati i *marker* di peso molecolare (kDa).

L'altra aliquota di particelle virali è stata usata per infettare per 2 ore a MOI di 0.1 FFU/cellula cellule Vero precedentemente esposte per 16 ore a 10 μM di amiodarone (pannello di destra). Passate le 2 ore l'inoculo virale è stato rimosso e le cellule sono state esposte per altre 24 ore alla stessa concentrazione di amiodarone prima di essere analizzate al citofluorimetro quantificandone l'infezione. I dati sono rappresentati come percentuale di cellule GFP-positive rapportata a quella ottenuta in assenza di farmaco e infettate con virus non preattivato (*GP-pseudotyped virus mock-preactivated*) posta come 100 %, e rappresentano la media ± SD di 3 esperimenti indipendenti. "\*" rappresenta una differenza statisticamente significativa rispetto al controllo di cellule non trattate con il farmaco e infettate con virus non preattivato (*GP-pseudotyped virus mock-preactivated*).

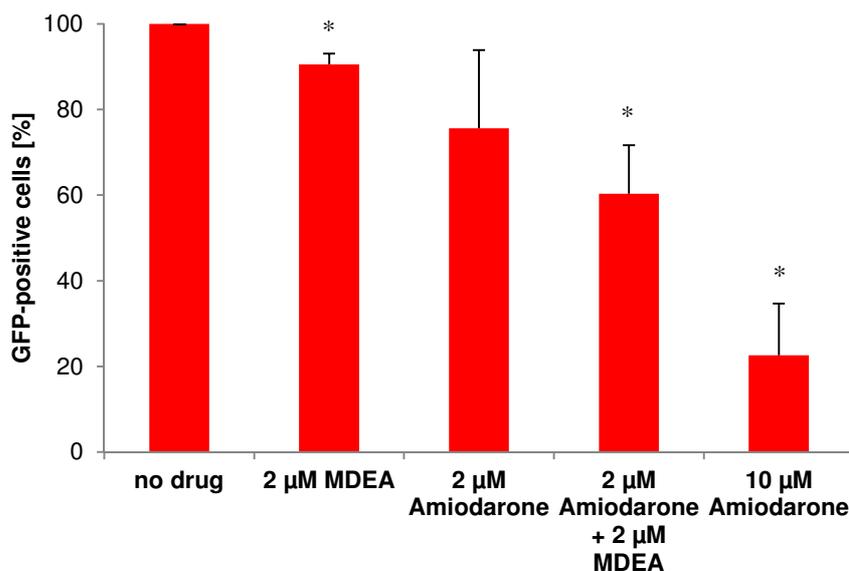
Come si osserva dal grafico di figura 37 la preattivazione con termolisina ripristina l'infettività del VSVΔG-GP in presenza di amiodarone. Infatti la percentuale di cellule infettate passa da  $8.09 \pm 1.58 \%$  con il virus non preattivato a  $102.14 \pm 3.40 \%$  con il virus preattivato, rispetto alle cellule di controllo infettate con il virus non preattivato.

## **4.7 AMIODARONE ED IL SUO METABOLITA PRINCIPALE MDEA INIBISCONO L'INFETTIVITÀ DEL VSVΔG-GP A CONCENTRAZIONI CLINICAMENTE RILEVANTI**

Nel fegato amiodarone va incontro a diverse modificazioni chimiche che danno origine a differenti metaboliti rilevabili nel torrente circolatorio, tra questi il principale è il mono-N-desetilamiodarone (MDEA), derivato da amiodarone per dealchilazione. L'MDEA contribuisce sia all'attività antiaritmica sia alla tossicità del farmaco [132]. Nei pazienti a cui sono somministrati 200 mg al giorno di amiodarone per via orale si misura una concentrazione plasmatica di amiodarone di  $1.7 \pm 0.6 \mu\text{M}$ , e di MDEA di  $1.5 \pm 0.5 \mu\text{M}$ , raggiungendo anche una concentrazione plasmatica di  $5.1 \pm 2.2$  e  $4.3 \pm 1.8 \mu\text{M}$  di amiodarone ed MDEA rispettivamente in pazienti a cui vengono somministrati 600 mg al giorno di amiodarone per via orale. Mentre con la somministrazione intravenosa si può raggiungere una concentrazione plasmatica di amiodarone di circa  $11 \mu\text{M}$  [132,137].

Siccome il nostro gruppo ha dimostrato in precedenza che la combinazione di amiodarone ed MDEA entrambi alla concentrazione  $2 \mu\text{M}$  è in grado di indurre un fenotipo simil-NPC indifferenziabile da quello indotto da amiodarone  $10 \mu\text{M}$  [124], è stato studiato se quest'azione sinergica possa essere estesa anche all'inibizione dell'infezione virale mediata dalla GP.

A questo scopo cellule Vero sono state incubate per 16 ore con 2 o  $10 \mu\text{M}$  di amiodarone,  $2 \mu\text{M}$  di MDEA, o con la combinazione di amiodarone ed MDEA entrambi alla concentrazione  $2 \mu\text{M}$ . Successivamente, le cellule sono state infettate per 2 ore con il VSVΔG-GP alla MOI di 0.1 FFU/cellula e ripristinato il terreno con l'appropriata concentrazione dei composti per altre 24 ore. L'infettività è stata misurata al citofluorimetro 24 ore dopo l'infezione.



**Figura 38. Azione di amiodarone ed MDEA sull'infezione GP-mediata.** Cellule Vero, trattate per 16 ore con 2  $\mu\text{M}$  di MDEA, 2  $\mu\text{M}$  di amiodarone, la combinazione di entrambi a 2  $\mu\text{M}$ , o 10  $\mu\text{M}$  di amiodarone, sono state infettate per 2 ore con VSV $\Delta$ G-GP alla MOI di 0.1 FFU/cellula. Le cellule sono quindi state esposte per altre 24 ore alle stesse concentrazioni dei composti e alla fine l'infezione è stata valutata misurando le cellule GFP-positive in citofluorimetria. I dati sono rappresentati come percentuale di cellule GFP-positive rapportata a quella ottenuta in assenza di farmaco (*no drug*) posta come 100 %, e rappresentano la media  $\pm$  SD di 4 esperimenti indipendenti condotti in duplicato, e "\*" rappresenta una differenza statisticamente significativa rispetto al controllo di cellule non trattate con il farmaco (*no drug*).

Dalla figura 38 si nota che amiodarone è più potente di MDEA, a parità di concentrazione, nell'inibire l'infezione con il virus pseudotipizzato,  $24.40 \pm 18.27$  % contro  $9.50 \pm 2.54$  % rispettivamente. La combinazione di entrambi,  $39.65 \pm 11.30$  %, potenzia l'effetto del singolo composto, sebbene non raggiunga l'inibizione ottenuta con amiodarone alla concentrazione di 10  $\mu\text{M}$ ,  $77.42 \pm 12.13$  % (Fig. 38).

## 4.8 RUOLO DEI DIFFERENTI GRUPPI STRUTTURALI DI AMIODARONE SULL'ATTIVITÀ ANTIVIRALE

Dimostrata l'attività inibitoria di amiodarone e della combinazione con il suo metabolita MDEA sull'ingresso mediato dalla GP si è voluto cercare di chiarire le basi strutturali di questa attività. Per fare ciò sono stati impiegati una serie di analoghi strutturali derivati da amiodarone a cui sono state apportate piccole modifiche ai gruppi laterali. In particolare è stato modificato il gruppo dietil-amino- $\beta$ -etossico in cui sono stati sostituiti gruppi laterali dell'ammina terziaria originando una serie di derivati: PIPAM, MeAMI, DDEA, B2-O-AcOH, B0 e B2 (Tab. 1), tra i quali nel B0 la molecola è stata anche deiodinata. Invece nel D2 è stato modificato il gruppo idrofobico. È stato inserito nello *screening* anche l'analogo dronedarone già in uso nella pratica clinica come antiaritmico in alternativa ad amiodarone, poiché dotato di minor tossicità

polmonare e privo di tossicità tiroidea essendo mancante degli atomi di iodio [138]. Inoltre, sono stati testati altri metaboliti oltre all'MDEA, come il di-desetil amidarone (DDEA), prodotto della dealchilazione sequenziale dell'MDEA, ed il B2-O-EtOH, prodotto della deaminazione di amidarone [133].

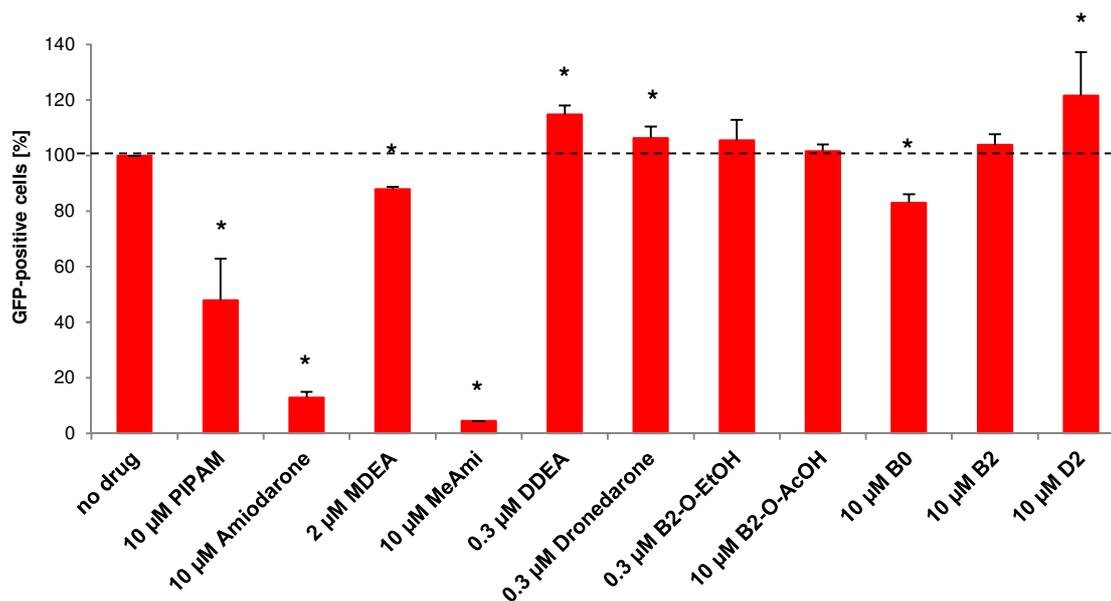
Queste molecole sono state in precedenza analizzate per la loro tossicità, per la capacità di indurre un fenotipo simil-NPC, per l'inibizione della proteolisi cellulare e per l'interferenza sull'internalizzazione nella cellula di un colorante acido-tropico [124,133,139].

Compound	Chemical Structure
PIPAM	
Amiodarone	
MDEA	
MeAmi	
DDEA	
Dronedarone	
B2-O-EtOH	
B2-O-AcOH	
B0	
B2	
D2	

**Tabella 1. Analoghi derivati da amidarone.** I composti sono derivati da modificazioni di differenti porzioni della molecola di amidarone, e sono elencati in ordine decrescente di idrofobicità.

Gli analoghi e i metaboliti sono stati testati alle concentrazioni di rilevanza clinica, come il dronedarone che raggiunge  $0.3 \mu\text{M}$  in pazienti trattati cronicamente per via orale. Nel caso in cui questo non era possibile sono state testate concentrazioni sufficienti ad indurre il fenotipo simil-NPC senza essere tossici per le cellule.

Cellule Vero sono state incubate per 16 ore con  $10 \mu\text{M}$  di amiodarone, come indice di riferimento, o con le altre molecole alle concentrazioni indicate, quindi infettate per 2 ore con il VSV $\Delta$ G-GP alla MOI di 0.1 FFU/cellula. Le cellule infettate sono state mantenute nel terreno contenente le appropriate concentrazioni delle molecole per altre 24 ore fino alla quantificazione delle cellule GFP-positive in citofluorimetria.



**Figura 39. Confronto degli analoghi strutturali e metaboliti di amiodarone sull'infezione GP-mediata.** Cellule Vero, trattate per 16 ore con le diverse molecole alle concentrazioni indicate ed infettate per 2 ore con VSV $\Delta$ G-GP alla MOI di 0.1 FFU/cellula. Le cellule sono quindi state esposte per 24 ore alle stesse concentrazioni delle molecole e alla fine l'infezione è stata valutata misurando le cellule GFP-positive in citofluorimetria. I dati sono rappresentati come percentuale di cellule GFP-positive rapportata a quella ottenuta in assenza di farmaco (*no drug*) posta come 100 %, e rappresentano la media  $\pm$  SD di 4 esperimenti indipendenti condotti in duplicato. "\*" rappresenta una differenza statisticamente significativa rispetto al controllo di cellule non trattate con il farmaco (*no drug*).

Dallo *screening* si possono ricavare alcune informazioni inerenti alla relazione tra struttura chimica e attività antivirale di amiodarone (Fig. 39). In particolare, il gruppo dietil-amino- $\beta$ -etossico, determinante dell'accumulo negli organelli acidi, è necessario per l'attività antivirale. Infatti, il B2 che manca di questo gruppo è inattivo. Tra quelli che mantengono questo gruppo, l'attività antivirale correla con la capacità di indurre un fenotipo simil-NPC, MeAmi > amiodarone > PIPAM > MDEA [124]. Per quanto riguarda la porzione idrofobica, è anch'essa richiesta per l'attività antivirale, infatti il D2 che ne è mancante è inattivo.

Il secondo metabolita di amiodarone rilevabile nel siero dei pazienti in terapia antiaritmica dopo MDEA, il DDEA, non ha attività antivirale.

Quindi l'attività antivirale di amiodarone sembra essere relazionata alle proprietà che portano ad un fenotipo di espansione del volume lisosomiale, cioè la presenza di un'ammina terziaria e di un gruppo idrofobico, l'anfilicità e la capacità di essere incorporato nelle membrane [140,141].

Da questo *screening* sembra anche emergere che la modificazione del radicale alchilico del gruppo dietil-amino- $\beta$ -etossico possa aumentare l'efficacia di amiodarone, infatti il MeAmi sembrerebbe determinare una maggiore inibizione dell'infezione rispetto ad amiodarone (Fig. 39).

## 5. DISCUSSIONE

La malattia da virus Ebola (EVD) è una delle infezioni trasmissibili all'uomo più letali, caratterizzata da un alto tasso di mortalità e da una sostanziale morbilità durante i focolai. Sebbene nel passato questa patologia sia comparsa sporadicamente, nell'ultimo decennio, in seguito alle incursioni umane nelle regioni endemiche e alle maggiori possibilità di spostamento, sono aumentati i casi di EVD facendo diventare il virus Ebola (EBOV) un problema di salute pubblica di alta priorità. Infatti, come stiamo osservando, è tuttora in corso la più grande epidemia di EBOV della storia, diffusa in Africa occidentale con casi di importazione negli Stati Uniti d'America, in Spagna e nel Regno Unito [4]. La diffusione rapida e incontrollata della malattia ha portato il Consiglio delle Nazioni Unite a dichiarare questa epidemia come una delle più devastanti crisi sanitarie del 21° secolo [142]. L'agente eziologico dell'epidemia in corso è la specie *Zaire ebolavirus*, la più letale e diffusa tra le specie di *ebolavirus*, sebbene durante questa epidemia il tasso di mortalità si sia attestato attorno al 60 % rispetto ad tasso di mortalità medio dell'73 % [4]. Ad un anno dalla suo inizio in dicembre 2013 in Guinea, questa epidemia si è diffusa anche in Sierra Leone e Liberia raggiungendo una popolarità senza precedenti, eccetto per la pandemia del virus dell'immunodeficienza umana di tipo 1 (HIV-1).

L'organizzazione mondiale della Sanità (OMS), che ha definito le linee guida per contrastare l'epidemia, ha assegnato la priorità assoluta alla ricerca e allo sviluppo di nuovi farmaci e vaccini efficaci contro l'EVD. Inoltre, l'OMS ha anche accelerato le procedure richieste nella validazione di un nuovo farmaco, dichiarando che è eticamente corretta la sperimentazione di farmaci e vaccini non ancora approvati dei quali ne è già stata comprovata l'efficacia *in vitro* o *in vivo* e vi siano informazioni preliminari in merito alla sicurezza. Tra i farmaci sperimentali approvati dall'OMS nel corso dell'epidemia troviamo il più conosciuto ZMapp, antivirali come il favipiravir e il brincidofovir o trattamenti basati sull'immunizzazione passiva con plasma proveniente da pazienti guariti da EVD durante l'epidemia [143]. Invece dal lato dei vaccini in sperimentazione sull'uomo si annoverano il rVSVΔG-EBOV-GP, il virus ricombinante della stomatite vescicolare (VSV) che codifica la GP di Ebola, ed il cAd3-EBOV basato su adenovirus [143]. Inoltre ci sono tutta una serie di altri composti in validazione negli animali modello prima di poter essere autorizzati alla sperimentazione sull'uomo [108].

Sia per la EVD che per altre patologie tropicali, prima dell'aumento dei nuovi focolai nel corso di quest'ultimo decennio non vi era alcun interesse da parte delle case farmaceutiche ad investire tempo e risorse in questo settore della ricerca, sia perché i focolai rimanevano confinati nelle zone endemiche dell'Africa equatoriale sia per le condizioni socio-economiche delle popolazioni colpite. L'aumento esponenziale dei nuovi casi di EVD con il pericolo di diffusione al di fuori delle aree endemiche, assieme alla preoccupazione da parte del governo statunitense che EBOV possa essere usato come arma bioterroristica, hanno dato la svolta importante alla ricerca sulla biologia virale [12].

EBOV è classificato come patogeno di classe 4 e richiede di essere manipolato solo in strutture di biosicurezza di livello 4, questo ha fortemente rallentato la ricerca di base. Fortunatamente negli ultimi vent'anni sono state sviluppate delle tecniche che consentono di dissezionare i vari *step*

del ciclo replicativo così da poter essere studiati in laboratori di biosicurezza di livello 2. La glicoproteina GP di EBOV è necessaria e sufficiente per la fase di ingresso del virus nella cellula bersaglio, questo ha consentito la pseudotipizzazione di virus non patogeni conferendo loro il tropismo e il meccanismo di ingresso di EBOV [85,135]. Ad esempio, il VSV $\Delta$ G-GFP si basa sul VSV nel cui genoma è stata sostituita la sequenza codificante la glicoproteina naturale VSV-G con il gene *reporter* della *green fluorescent protein* (GFP), e può essere pseudotipizzato dalla GP di ZEBOV (VSV $\Delta$ G-GP). Un altro sistema per studiare la fase di ingresso di EBOV è rappresentato dalle particelle simil-virali (VLP) fluorescenti basate sulla proteina di matrice VP40 di EBOV fusa alla GFP e sulla GP incorporata sul pericapside (EBOVLP) [50,84].

Con l'uso di questi sistemi sono stati chiariti i meccanismi attraverso i quali EBOV entra nella cellula bersaglio per instaurare l'infezione, e quali fattori cellulari svolgono un ruolo chiave in questo processo. Il ciclo replicativo di EBOV inizia con il legame della sua glicoproteina GP con fattori di adesione e/o internalizzazione cellulari, come le integrine  $\beta$ 1, le lectine DC-SIGN ed L-SIGN, ed Axl [69,75,144], mentre TIM-1 come recettore vero e proprio [71]. Questi recettori si raggruppano a livello dei *raft* lipidici per la presenza del lipide sfingomieline (SM) [80,84]. Il legame con questi fattori cellulari promuove l'internalizzazione della particella per macropinocitosi, processo nel quale è necessaria l'attività catalitica dell'enzima sfingomielinasi acida lisosomiale (L-aSMasi) [81]. Successivamente la particella virale prosegue lungo il *pathway* endocitico attraverso gli endosomi precoci per giungere agli endosomi tardivi (LE) [74,78]. Una volta all'interno dei LE il pH acido innesca l'attivazione delle 2 proteasi endosomiali catepsina L e catepsina B che processano proteoliticamente la subunità 1 della GP (GP<sub>1</sub>) per "attivarla". In questo modo viene esposto il sito di legame per il recettore intracellulare promuovendo così la fusione mediata dalla GP<sub>2</sub> [69,88,145]. Carette e colleghi hanno identificato il recettore intracellulare di EBOV nel trasportatore del colesterolo NPC-1 localizzato proprio nella membrana dei LE [38]. Il legame di GP con NPC-1 avvia una serie di cambiamenti conformazionali a carico di GP<sub>2</sub> che portano a l'inserimento del peptide fusogeno nella membrana endosomiale, l'avvicinamento del pericapside virale con la membrana endosomiale e la fusione così da rilasciare il nucleocapside nel citoplasma e avviare la replicazione [91].

Il farmaco amiodarone, approvato negli anni '80, è largamente usato in clinica come antiaritmico. Oltre all'attività antiaritmica, amiodarone è stato dimostrato essere in grado di alterare il *pathway* endocitico della cellula [123,124]. Basandosi su questa osservazione Stadler e colleghi hanno dimostrato che amiodarone inibisce il ciclo replicativo del virus della SARS [123]. Negli ultimi 2 anni è stato dimostrato essere attivo anche contro il virus dell'epatite C, interferendo con l'ingresso nella cellula, e contro la progressione dell'epatocarcinoma cellulare associato al virus dell'epatite B, per la sua promozione dell'autofagia [129,130].

Il nostro gruppo ha quindi deciso di studiare il farmaco amiodarone vista l'esperienza sul *pathway* endocitico, cercando di chiarire i meccanismi molecolari della sua azione a livello di questo *pathway* cellulare. Infatti, Piccoli e colleghi hanno recentemente confermato che amiodarone agisce a livello dei LE caratterizzando le modifiche che si osservano all'interno della cellula, riconducibili ad un fenotipo simile a quello che contraddistingue la patologia Niemann-Pick di tipo C (NPC) seppur con alcune differenze peculiari descritte nel paragrafo 1.2.2. Tra i vari effetti cellulari è stato dimostrato che altera la localizzazione del trasportatore NPC-1, induce l'accumulo di SM ed inibisce l'attività catalitica della L-aSMasi, promuovendone anche la

degradazione [120,124]. Tutti fattori cellulari coinvolti nell'ingresso di EBOV nella cellula bersaglio [38,78]. Inoltre amiodarone è anche in grado di indurre l'autofagia [124], comunque altri *target* della sua azione sulla cellula rimangono ancora da chiarire.

Basandosi sulle conoscenze del meccanismo di ingresso di EBOV nella cellula, e che alcuni dei fattori cellulari richiesti sono alterati da amiodarone, si è scelto di indagare l'influenza di amiodarone su questo virus. Svolta chiave è stato l'ottenimento dei due sistemi VSVΔG-GFP e VLP per studiare la fase di ingresso di EBOV in laboratori di biosicurezza di livello 2. Ne sono state ottimizzate le condizioni per far incorporare nel pericapside la GP della specie *Zaire ebolavirus* producendo il VSVΔG-GP e le EBOVLP, già largamente impiegati per studiare i meccanismi molecolari del ciclo replicativo di EBOV o per valutare inibitori dell'ingresso nella cellula bersaglio [22,33,38,39,44,45,47,50,52,55,70,71,73,74,76,77,79,84,88,103,109-111,134,135,145-149]. In questo modo si è potuto valutare se le modificazioni cellulari indotte da amiodarone a carico di alcuni fattori richiesti per l'ingresso di EBOV nella cellula bersaglio potessero avere ripercussioni sull'infezione GP-mediata. Successivamente si è cercato di definire il meccanismo molecolare alla base dell'inibizione di amiodarone a questo livello, ponendo l'attenzione anche sui determinanti strutturali dell'attività così da poter eventualmente migliorarne l'efficacia antivirale.

Nonostante siano riportati in letteratura differenti composti anti-Ebola, e la loro attività antivirale sia stata valutata *in vitro* o *in vivo* su modelli animali, pochi sono stati approvati per la sperimentazione nell'uomo [15,39,110-115,150] e non ci sono ancora *trial* clinici conclusi che ne valutano la sicurezza e/o l'efficacia. Considerando ciò lo scopo di questo progetto è stato dimostrare l'uso di un farmaco, già approvato dalla *Food and Drug Administration* e largamente usato in clinica, nel contrastare l'infezione di EBOV delle cellule bersaglio.

Una volta prodotte le EBOVLP e il VSVΔG-GP si è potuto procedere alla valutazione dell'effetto di diverse concentrazioni di amiodarone sull'internalizzazione delle EBOVLP e sull'infezione del VSVΔG-GP. A tal fine sono stati condotti esperimenti di trasduzione ed infezione su cellule pretrattate con amiodarone per 16 ore, richieste per lo sviluppo del fenotipo simil-NPC, o per 6 ore in modo da inibire la L-aSMasi [120,124]. Nel caso delle EBOVLP si evidenzia un loro accumulo all'interno della cellula. Importante è il fatto che l'accumulo è specifico sull'internalizzazione GP-mediata visto che nel caso delle VLP con VSV-G l'effetto è trascurabile. Nel caso dell'infezione con il VSVΔG-GFP si osserva che dopo 16 ore si ha una forte inibizione dell'infezione del VSVΔG-GP, mentre è minore, ma comunque presente, un'inibizione dell'infezione con il virus esprimente la glicoproteina naturale sul pericapside (VSV ricombinante). La specificità d'azione è invece più chiara con 6 ore di pretrattamento dove il VSV ricombinante non è inibito ma ne è promossa l'infettività mentre il VSVΔG-GP è inibito.

Gli esperimenti con questi due sistemi dimostrano che amiodarone ha un effetto specifico sull'ingresso GP-mediato, anche se le alterazioni cellulari dopo 16 ore di accumulo del farmaco sono tali che si può avere un effetto anche sull'ingresso VSV-G-mediato; e che è dose-dipendente. L'inibizione del VSVΔG-GP è anche tempo-dipendente come si osserva dalla progressivo ripristino dell'infezione ai trattamenti perpetrati per sempre minor tempo, o con trattamento dopo la fase di adesione. Inoltre, il fatto che la maggior parte dell'effetto inibitorio si osservi anche nel caso in cui il farmaco si accumuli nella cellula prima dell'infezione ma non permanga dopo l'infezione, suggerisce che l'effetto esercitato sia proprio a livello di ingresso e

non post-fusione o sull'espressione della GFP. Altro punto degno di nota è l'inibizione di circa il 50 % dell'infezione GP-mediata quando amiodarone è presente solo durante l'infezione. Questo indica che potrebbe esserci un'azione di inibizione rapida oltre a quella associata all'induzione del fenotipo simil-NPC o all'inibizione della L-aSMasi che comunque richiedono tempi più lunghi. I dati ottenuti da questi due sistemi ricombinanti sono in accordo con quanto pubblicato successivamente da Gehring e colleghi i quali hanno dimostrato che amiodarone inibisce l'infezione di particelle lentivirali pseudotipizzate dalla GP dei filovirus in diverse linee cellulari rappresentati i bersagli primari dell'infezione *in vivo* [148]. In questo lavoro di tesi si è tuttavia proseguito nel caratterizzare l'effetto di amiodarone analizzando le fasi di ingresso del virus nella cellula bersaglio. Gli esperimenti sono stati condotti su cellule di rene di scimmia suscettibili all'infezione di EBOV e largamente utilizzate in studi *in vitro* su questo virus [38-40,73,74,76,88,89,144,149].

L'analisi delle fasi di ingresso del virus è iniziata con l'osservazione del legame delle EBOVLP alla superficie cellulare, ed è emerso che amiodarone inibisce specificatamente il legame delle EBOVLP alla superficie cellulare. Un'ulteriore dimostrazione che amiodarone diminuisce il legame GP-mediato alle cellule bersaglio viene dall'analisi del *western blot* (WB) dell'infezione con il VSVΔG-GP dove la quantità della proteina di matrice del VSV, VSV-M, nelle cellule pretrattate con amiodarone è minore rispetto alle cellule di controllo. I dati ottenuti con le EBOVLP, opportunamente comparati con l'inibitore enzimatico pubblicato desipramina [84], mostrano una diminuzione del legame delle EBOVLP simile a quanto pubblicato da Miller e colleghi [84].

Considerando che amiodarone è in grado di inibire l'attività catalitica di L-aSMasi [120], richiesta per il legame di EBOV alla superficie cellulare [84], i dati di adesione delle EBOVLP alle cellule suggeriscono che un primo meccanismo dell'azione di amiodarone sull'ingresso GP-mediato sia a livello del legame del virus alla cellula. Inoltre, i dati confermano il ruolo di L-aSMasi nell'infezione di EBOV precedentemente pubblicato da Miller e colleghi [84].

Proseguendo con l'analisi dell'ingresso nella cellula bersaglio è stata evidenziata una diminuzione della progressione delle EBOVLP lungo il *pathway* endocitico: ai tempi brevi analizzati nelle cellule di controllo le EBOVLP si trovano a livello dei LE mentre nelle cellule con amiodarone sono ancora per la maggior parte localizzate a livello degli EE. Nonostante questo rallentamento e l'alterata localizzazione di NPC-1 [124], le EBOVLP si localizzano ugualmente nei LE NPC-1<sup>+</sup> permettendo di escludere che amiodarone interferisca con il legame GP-NPC-1 per un'alterata localizzazione cellulare del recettore in seguito alla induzione della formazione di vacuolizzazioni citoplasmatiche [124]. Il rallentamento nella progressione delle EBOVLP potrebbe essere ascrivibile all'effetto di amiodarone sull'omeostasi del calcio che è alla base del trasporto e della maturazione degli endosomi, e/o sul blocco dell'endocitosi di fase fluida, così come all'effetto sulle proprietà fisiche delle membrane [74,124,151,152]. Un fattore cellulare indispensabile per la fusione di EE con LE, il *turnover* dei LE, e quindi per il *trafficking* del virus Ebola, è il motore molecolare costituito dalle proteine ORP1L, RILP e dal complesso HOPS [86]. La proteina ORP1L è sensibile al livello cellulare di colesterolo, infatti nella patologia NPC, nella quale il colesterolo si accumula all'interno dei LE, si ha l'alterazione del corretto *trafficking* e *turnover* dei LE per il disaccoppiamento della proteina ORP1L dal complesso macromolecolare [86].

Un effetto di amiodarone diretto sul complesso macromolecolare ORP1L-RILP-HOPS, o un effetto indiretto attraverso l'alterazione del colesterolo che può ripercuotersi su questo complesso, rimane ancora da dimostrare. Comunque le evidenze sperimentali delle alterazioni del *pathway* endocitico, in particolare dei LE, e del livello del colesterolo indotte da amiodarone con lo sviluppo del fenotipo simil-NPC [124], congiunte con i dati in letteratura [86] sembrerebbero suggerire un secondo possibile *target* dell'azione di amiodarone sull'ingresso GP-mediato: l'interferenza sul motore molecolare ORP1L-RILP-HOPS, che sarà oggetto di future analisi.

Il successivo *step* dell'ingresso di EBOV preso in considerazione è il processamento della subunità 1 della GP ( $GP_1$ ) da parte della catepsina L e della catepsina B che origina forme distinguibili in WB per il diverso peso molecolare [69,88,89,145,149,153]. Infettando con il VSVΔG-GP, nelle cellule trattate con amiodarone osserviamo un accumulo delle diverse forme della  $GP_1$ , sia la non processata di 130 kDa che la processata di 19 kDa e la forma intermedia di 20 kDa, considerando anche che sono state internalizzate un minor numero di particelle virali come confermano le quantità di VSV-M nelle cellule trattate rispetto alle cellule di controllo. Questo ci indica una possibile inibizione del *processing* della  $GP_1$ . L'interferenza a questo livello emerge anche in mancanza dell'accumulo preventivo di amiodarone nelle cellule. Infatti, nonostante abbiamo dimostrato che l'attività della catepsina L e della catepsina B non sono influenzate da amiodarone, così come il loro contenuto cellulare [120], non possiamo escludere che a livello dei LE amiodarone possa ridurre l'efficienza dell'attività proteolitica delle due catepsine. A supporto di ciò, le catepsine sono enzimi pH-dipendenti ed è già stato dimostrato un diretto effetto di amiodarone sul pH di LE/LY [123,125]. Inoltre, è riportato che amiodarone inibisce l'attività di alcune proteasi sia *in vivo* che *in vitro* [121,124,141].

A conferma del fatto che l'inibizione del processamento della  $GP_1$  indotta da amiodarone ha ripercussioni sull'infezione GP-mediata, se la  $GP_1$  del virus pseudotipizzato dalla GP viene processata *in vitro* dalla termolisina si ha un recupero completo dell'infettività in presenza di amiodarone.

Per quanto riguarda l'accumulo della forma da 19 kDa della  $GP_1$ , nelle cellule trattate con amiodarone rispetto alle cellule di controllo, potrebbe essere dovuto ad un blocco sull'ultimo *step* di ingresso del virus: la fusione. Infatti, è stato osservato che amiodarone inibisce specificatamente la fusione GP-mediata. Questi dati suggeriscono che in presenza di amiodarone non si verifica la fusione del VSVΔG-GP. Il blocco della fusione si osserva quando amiodarone induce il fenotipo simil-NPC, ma un blocco parziale è già apprezzabile quando amiodarone è presente durante l'infezione in assenza di un accumulo preventivo all'interno della cellula. Il blocco della fusione porta quindi ad un accumulo delle particelle virali negli endosomi e questo potrebbe essere la spiegazione dell'accumulo delle EBOVLP osservato in presenza di amiodarone.

Quindi, questi esperimenti dimostrano che amiodarone blocca la fusione GP-mediata, e non possiamo escludere che sia una conseguenza dell'inibizione del processamento della  $GP_1$ , come dimostrato dal recupero dell'infettività in seguito a preattivazione del VSVΔG-GP con termolisina. Tuttavia l'alterazione del pH endosomiale indotta da amiodarone, dimostrata da Futamura e colleghi, potrebbe avere ripercussioni anche sui cambiamenti conformazionali della  $GP_2$  richiesti per la fusione del pericapside virale con la membrana endosomiale, oltre che

sull'attivazione delle catepsine endosomiali [69,125]. Infatti, altri meccanismi oltre ad un diretto effetto sul processamento della GP<sub>1</sub> non possono essere esclusi.

La collaborazione con il Prof. Mirazimi dell'Agenzia di Sanità Pubblica della Svezia ha dato la possibilità di validare l'inibizione dell'ingresso GP-mediato indotta da amiodarone impiegando il virus *Sudan ebolavirus* (SEBOV), nel laboratorio di biosicurezza di livello 4. Questi esperimenti suffragano quanto osservato con i sistemi ricombinanti sull'ingresso di EBOV e con quanto pubblicato da Gehring e colleghi [148].

Inoltre, siamo i primi ad aver mostrato gli effetti del trattamento di amiodarone anche sul rilascio della progenie virale infettiva di SEBOV, confermando che l'effetto sulla fase di ingresso di EBOV si ripercuote sul rilascio della progenie virale infettiva. Invece, nel caso del virus Dengue, un altro virus analizzato durante questo dottorato che provoca nell'uomo una febbre emorragica, amiodarone riduce l'ingresso del virus nelle cellule bersaglio ma non ne riduce la progenie infettiva rilasciata (dati non mostrati). Nel caso del trattamento con 10  $\mu$ M di amiodarone sull'infezione di SEBOV si ha lo  $0.1 \pm 0.2$  % di particelle infettive rilasciate rispetto al controllo non trattato, consentendoci così di affermare che amiodarone ha effettivamente un'attività antivirale contro il virus Ebola.

Gli effetti di amiodarone osservati negli esperimenti esposti sono massimi quando si ha lo sviluppo del fenotipo simil-NPC per l'accumulo di amiodarone all'interno della cellula. Tuttavia è stato osservato un accumulo delle EBOVLP, un'inibizione dell'infezione GP-mediata, un'interferenza sul processamento della GP<sub>1</sub> e un blocco parziale sulla fusione GP-mediata in assenza di accumulo di amiodarone all'interno della cellula ma quando il farmaco è presente solo durante l'incubazione con le VLP o durante l'adesione virale. Inoltre è stato osservato sull'infettività di SEBOV che trattando con amiodarone solamente durante l'infezione, o subito dopo l'infezione fino alla lettura del risultato, si ha una diminuzione della percentuale di cellule infettate pari a  $81 \pm 8.9$  % e  $50.1 \pm 7.9$  % rispettivamente. Queste osservazioni dimostrano che le proprietà anti-Ebola di questo farmaco non solo derivano dalle modificazioni strutturali della cellula associate all'accumulo temporale di amiodarone, ma anche da un effetto diretto del farmaco su specifici *step* dell'ingresso delle particelle. Su questo aspetto è possibile speculare che amiodarone possa influenzare la fluidità del pericapside, aumentare il pH nelle vicinanze della membrana come descritto per le catepsine, e/o interferire direttamente con i cambiamenti conformazionali e le interazioni richieste nella fusione per le sue caratteristiche chimiche e di cariche [141,152].

Ulteriori effetti a livello delle successive fasi del ciclo replicativo non posso essere esclusi. Infatti è già stato osservato che amiodarone inibisce il virus della SARS ma, nonostante la sua glicoproteina richieda anch'essa il processamento da parte della catepsina L e la fusione avvenga anche in questo caso a livello dei LE, l'effetto di amiodarone è da ricercare in una fase successiva del ciclo replicativo [123]. Un altro esempio viene dal virus dell'epatite C, infatti amiodarone interferisce nella fase di assemblaggio, oltre che nelle fasi iniziali del ciclo replicativo, poiché inibisce l'attività della proteina cellulare MTP richiesta per l'assemblaggio delle nuove particelle virali [129].

La differenza nell'infettività osservata tra VSV $\Delta$ G-GP e VSV ricombinante in presenza di amiodarone ci consente anche di ipotizzare che l'effetto di questo farmaco sia soprattutto a

livello di ingresso nella cellula bersaglio piuttosto che sulla fase di replicazione del genoma virale. L'espressione della GFP segue i meccanismi di espressione e replicazione del VSV [135], e nessuna inibizione si osserva sul virus ricombinante dopo 6 ore di pretrattamento con amiodarone mentre dopo 16 ore si osserva un'inibizione lieve (considerando le alterazioni cellulari osservabili a questa tempistica). Tenendo conto che la replicazione del VSV segue una strategia simile a quella dei filovirus, e quindi VSV può essere considerato come surrogato per lo studio di inibitori della replicazione di EBOV [154], l'analisi dei nostri dati suggerisce che non vi sia alcun effetto di amiodarone sulla replicazione di EBOV.

Tuttavia, per poter escludere con sicurezza l'azione di amiodarone in altri punti del ciclo replicativo di EBOV, oltre l'ingresso, verranno analizzate le fasi di replicazione e trascrizione del genoma virale grazie al sistema del minigenoma di EBOV, così come la gemmazione impiegando le EBOVLP.

Il sistema del minigenoma permette di quantificare la replicazione ed espressione del gene *reporter* della luciferasi governate dalle sequenze presenti nel genoma di EBOV [155]. Questo sistema è molto utile perché consente di valutare se amiodarone interferisce anche con queste due fasi del ciclo replicativo virale in condizioni di biosicurezza di livello 2. Per quanto riguarda la fase di gemmazione è possibile confrontare la produzione di EBOVLP in presenza o meno del farmaco, come precedentemente descritto nella valutazione dell'effetto di amiodarone sulla gemmazione di HIV-1 [124].

Tutti i dati finora discussi portano alla conclusione che amiodarone esercita un'attività antivirale contro EBOV, e fanno luce, almeno in parte, sul suo meccanismo d'azione.

Ipotizzando anche una possibile applicazione terapeutica di amiodarone sono state testate concentrazioni che si ritrovano nel siero dei pazienti trattati con questo antiaritmico. Infatti, in pazienti trattati con 200 mg al giorno di amiodarone somministrato per via orale si misura una concentrazione plasmatica di circa  $1.7 \pm 0.6 \mu\text{M}$  [137]. Amiodarone è metabolizzato nel fegato in diversi metaboliti, tra cui il principale è il mono-N-desetilamiodarone (MDEA) che si ritrova alla concentrazione plasmatica di  $1.5 \pm 0.5 \mu\text{M}$  [132]. Anch'esso è attivo come antiaritmico e, la combinazione di amiodarone ed MDEA entrambi alla concentrazione  $2 \mu\text{M}$  è in grado di indurre un fenotipo simil-NPC indifferenziabile da quello indotto da amiodarone  $10 \mu\text{M}$  [124], mentre è leggermente meno potente di amiodarone  $10 \mu\text{M}$  nell'inibire l'attività catalitica della L-aSMasi [120]. Nel caso di pazienti trattati con amiodarone per via endovenosa è raggiunta la concentrazione plasmatica di  $11 \mu\text{M}$  [132,137]. È stato osservato un effetto sinergico tra amiodarone ed MDEA a concentrazioni terapeutiche nell'inibire l'infezione del VSVΔG-GP. Effetto sinergico che si osserva amplificato nell'infezione con SEBOV sia sull'infettività che sulla progenie infettiva rilasciata, con una diminuzione dell'80.6 % e del 90.2 % rispettivamente. L'aumento dell'inibizione che si osserva passando dal VSVΔG-GP a SEBOV probabilmente riflette le differenze nella morfologia e biologia virale dei due sistemi, oltre a possibili ulteriori effetti post-fusione come suddetto.

Queste osservazioni sono di particolare interesse per una futura potenziale applicazione terapeutica di amiodarone nel trattamento della EVD.

Nell'ultima fase di questo studio si è valutata la relazione tra l'attività antivirale di amiodarone e la sua struttura chimica, così da poter ulteriormente potenziare l'efficacia di questo nuovo antivirale. Sono stati quindi vagliati una serie di analoghi strutturali in cui sono state introdotte piccole modifiche a livello dell'ammina terziaria del gruppo dietil-amino- $\beta$ -etossico originando PIPAM, MeAmi, DDEA, B2-O-AcOH e B2, come la deiodinazione nel B0, o a livello della catena idrofobica nel D2. Inoltre sono stati testati altri metaboliti di amiodarone oltre all'MDEA, anch'essi riscontrabili nel plasma dei pazienti trattati, e sono il DDEA ed il B2-O-EtOH [133]. È stato inserito nello *screening* il dronedarone, farmaco alternativo ad amiodarone per l'assenza di tossicità tiroidea e polmonare e già dimostrato inibire l'infettività dei filovirus [138,148]. Tra le varie molecole testate la più potente sembra essere il MeAmi con efficacia simile ad amiodarone. Nel complesso, da questo *screening* è emerso che i composti contenenti l'ammina terziaria, come amiodarone, MeAmi e PIPAM, sono più potenti di quelli che ne sono mancanti. All'interno di queste molecole con l'ammina terziaria, la più reattiva è quella in cui l'ammina è meno mascherata stericamente, cioè il MeAmi, mentre il PIPAM la cui ammina terziaria è coperta da una grossa struttura, un anello piperidinico, è la meno attiva delle tre. Quindi la presenza dell'ammina terziaria sembra avere un ruolo chiave nell'effetto antivirale di amiodarone. Oltretutto questo gruppo chimico caratterizza i farmaci cationici anfifilici (CAD), a cui appartiene amiodarone, alcuni già stati dimostrati inibire l'infezione dei filovirus come clomifene e tormifene efficaci *in vivo* in topi infettati da EBOV [111,112]. Altro ruolo critico nell'azione antivirale, lo esercita la catena idrofobica responsabile dell'interazione con le membrane [141]. Riassumendo, queste osservazioni strutturali indicano l'importanza delle caratteristiche chimico-fisiche tipiche dei cationi anfifilici come l'anfifilicità, la presenza dell'ammina terziaria ed il gruppo idrofobico necessari per l'accumulo negli organelli acidi e per l'interazione con le membrane rispettivamente, che sono anche gruppi distintivi di un fenotipo di espansione del volume lisosomiale [140], e l'induzione del fenotipo simil-NPC [111,124,148]. Inoltre, piccole modificazioni strutturali possono aumentarne la potenza antivirale, come osservato con il MeAmi, così da perfezionare lo sviluppo di una molecola ottimizzata.

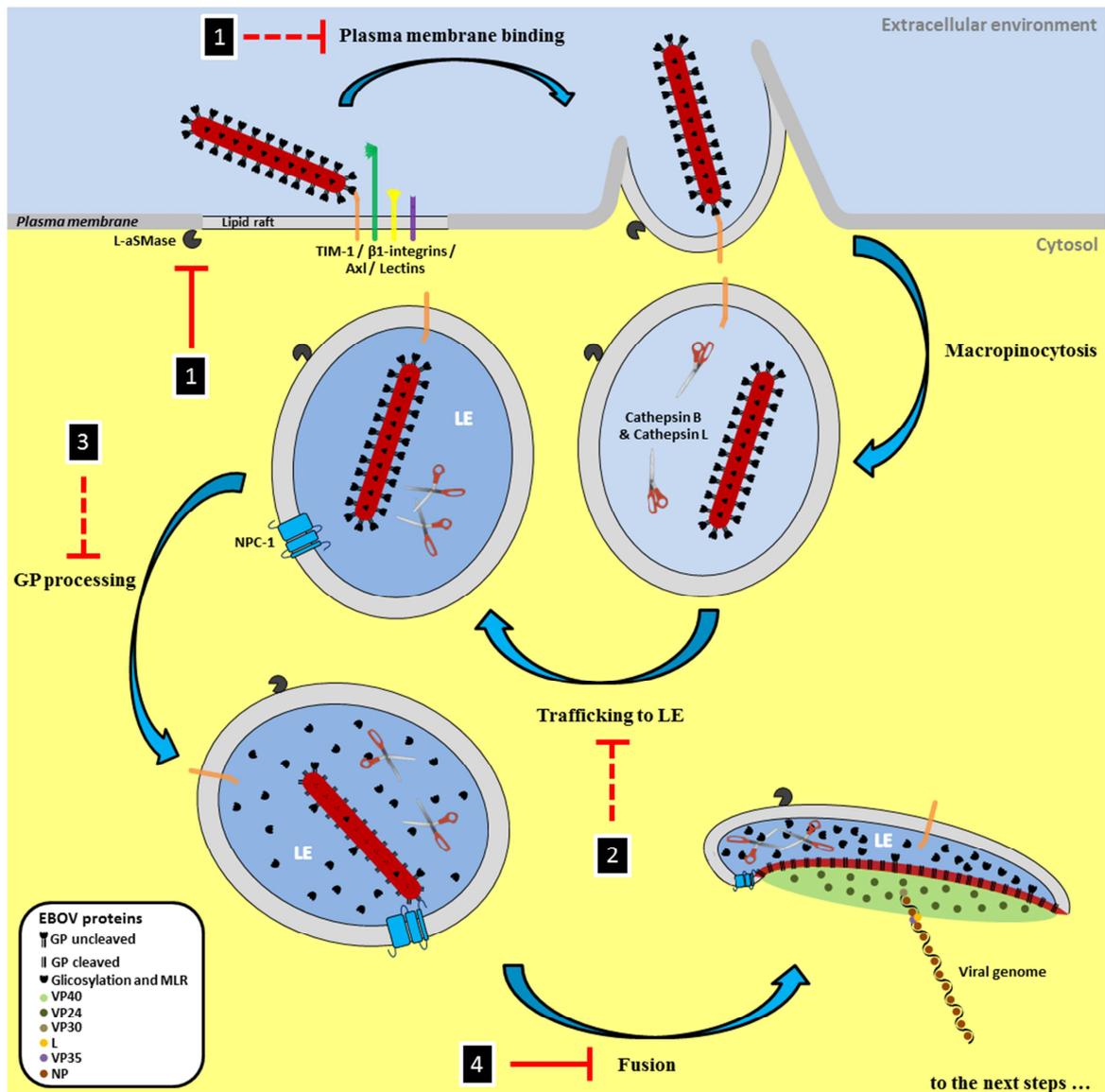
Ricapitolando i dati esposti in questa tesi dimostrano che amiodarone ha attività antivirale contro EBOV e che la sua azione è diretta contro strutture e funzioni cellulari richieste dal virus principalmente nella fase di ingresso nella cellula bersaglio. In questo contesto è stato evidenziato che amiodarone agisce con quattro distinti meccanismi sull'ingresso GP-mediato:

- I. diminuendo il legame delle particelle virali alla membrana plasmatica attraverso l'inibizione dell'attività enzimatica della L-aSMasi (Fig. 40 1);
- II. rallentando il *trafficking* lungo il *pathway* endocitico (Fig. 40 2);
- III. interferendo sul processamento della GP<sub>1</sub> (Fig. 40 3);
- IV. bloccando la fusione GP-mediata tra il pericapside virale e la membrana endosomiale (Fig. 40 4).

ma ulteriori effetti su altre fasi del ciclo replicativo non possono essere esclusi a priori.

Il fatto che amiodarone agisca su fattori cellulari e non virali esclude la possibilità di selezione di mutazioni che conferirebbero al virus la farmaco-resistenza, uno dei più grossi problemi nel trattamento delle infezioni virali. Inoltre, l'azione cellulare di amiodarone rende questo farmaco

potenzialmente attivo anche contro altri patogeni intracellulari che sfruttano meccanismi comuni con quelli descritti per EBOV. Ad esempio, la *Neisseria gonorrhoea*, il *Trypanosoma cruzi* (già dimostrato) ed il virus del Morbillo sono internalizzati per macropinocitosi e sono anch'essi dipendenti dall'attività enzimatica della L-aSMasi [80,82-84].



**Figura 40. Attività antivirale di amiodarone sul virus Ebola: interferenze sull'ingresso del virus nelle cellule bersaglio.** Amiodarone diminuisce il legame GP-mediato delle particelle virali alla membrana plasmatica attraverso l'inibizione della L-aSMasi essenziale in questo processo (1), rallenta il *trafficking* delle particelle virali lungo il *pathway* endocitico (2), interferisce con il processamento della GP catalizzato dalle catepsine endosomiali B ed L (3), blocca la fusione GP-mediata tra il pericapside virale e la membrana endosomiale (4).

Degno di nota è che amiodarone ed il suo metabolita principale MDEA inibiscono fortemente l'infezione di EBOV *in vitro* alle concentrazioni riscontrabili nei pazienti trattati con questo farmaco. Questo risultato supporta fortemente la possibilità di impiegare amiodarone, un farmaco ben tollerato e noto, nel trattamento dell'EVD, e la sua farmacocinetica ci viene in

appoggio. Infatti, dopo l'assorbimento, amiodarone lascia il circolo sanguigno con un'emivita di 10-20 ore fino ad accumulare ad alti livelli nei tessuti periferici. Quindi, in caso di somministrazione discontinua questo può lasciare i tessuti di accumulo e ritornare in circolo aumentando il tempo richiesto per la completa eliminazione dall'organismo [156]. Per questo motivo amiodarone richiede tra 25 e 100 giorni per la completa eliminazione dall'organismo [121]. Questa caratteristica suggerisce anche la potenzialità d'uso di amiodarone come trattamento preventivo soprattutto nel caso di operatori sanitari a rischio di esposizione. Inoltre la posologia di somministrazione prevede la via orale offrendo una semplice *compliance* nel trattare un grande numero di pazienti, rispetto alla somministrazione endovenosa. Il fatto che amiodarone diminuisca la progenie virale infettiva rilasciata in seguito ad infezione con SEBOV anche in trattamento contemporaneo all'infezione o post-infezione ci suggerisce la potenzialità di impiegare amiodarone anche come trattamento post-esposizione.

Amiodarone può essere applicato nella sperimentazione sull'uomo grazie alle nuove regole etiche stilate dall'OMS che consentono la sperimentazione di nuovi farmaci di efficacia comprovata *in vitro* o *in vivo*, preventivamente valutati da un organo competente. A tal proposito, grazie ai risultati qui esposti, l'organizzazione non governativa Emergency a novembre 2014 ha annunciato l'inizio di un *trial* clinico di fase 3 di amiodarone in Sierra Leone [157].

## 6. BIBLIOGRAFIA

1. Barrette RW, Xu L, Rowland JM, McIntosh MT. 2011. Current perspectives on the phylogeny of Filoviridae. *Infect Genet Evol* 11: 1514-1519.
2. Sanchez A, Geisbert TW, Feldmann F. 2007. Filoviridae: Marburg and Ebola Viruses. *Fields Virology 5th edition*: 1409-1448.
3. Feldmann H, Geisbert TW. 2011. Ebola haemorrhagic fever. *Lancet* 377: 849-862.
4. CDC. 2014. 2014 Ebola Outbreak in West Africa.  
<http://www.cdc.gov/vhf/ebola/outbreaks/2014-west-africa/index.html>.
5. Baize S, Leroy EM, Georges AJ, Georges-Courbot MC, Capron M, Bedjabaga I, Lansoud-Soukate J, Mavoungou E. 2002. Inflammatory responses in Ebola virus-infected patients. *Clin Exp Immunol* 128: 163-168.
6. Leung DW, Prins KC, Borek DM, Farahbakhsh M, Tufariello JM, Ramanan P, Nix JC, Helgeson LA, Otwinowski Z, Honzatko RB, Basler CF, Amarasinghe GK. 2010. Structural basis for dsRNA recognition and interferon antagonism by Ebola VP35. *Nat Struct Mol Biol* 17: 165-172.
7. Reid SP, Leung LW, Hartman AL, Martinez O, Shaw ML, Carbonnelle C, Volchkov VE, Nichol ST, Basler CF. 2006. Ebola virus VP24 binds karyopherin alpha1 and blocks STAT1 nuclear accumulation. *J Virol* 80: 5156-5167.
8. Geisbert TW, Young HA, Jahrling PB, Davis KJ, Kagan E, Hensley LE. 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: 1618-1629.
9. Kuhn JH, Becker S, Ebihara H, Geisbert TW, Johnson KM, Kawaoka Y, Lipkin WI, Negrodo AI, Netesov SV, Nichol ST, Palacios G, Peters CJ, Tenorio A, Volchkov VE, Jahrling PB. 2010. Proposal for a revised taxonomy of the family Filoviridae: classification, names of taxa and viruses, and virus abbreviations. *Arch Virol* 155: 2083-2103.
10. WHO. 2014. Ebola Situation report.  
<http://www.who.int/csr/disease/ebola/situation-reports/en/>.
11. Paessler S, Walker DH. 2013. Pathogenesis of the viral hemorrhagic fevers. *Annu Rev Pathol* 8: 411-440.

- 12. Cunha BA.** 2002. Anthrax, tularemia, plague, ebola or smallpox as agents of bioterrorism: recognition in the emergency room. *Clin Microbiol Infect* 8: 489-503.
- 13. Warfield KL, Swenson DL, Olinger GG, Nichols DK, Pratt WD, Blouch R, Stein DA, Aman MJ, Iversen PL, Bavari S.** 2006. Gene-specific countermeasures against Ebola virus based on antisense phosphorodiamidate morpholino oligomers. *PLoS Pathog* 2: e1.
- 14. Goeijenbier M, van Kampen JJ, Reusken CB, Koopmans MP, van Gorp EC.** 2014. Ebola virus disease: a review on epidemiology, symptoms, treatment and pathogenesis. *Neth J Med* 72: 442-448.
- 15. Iversen PL, Warren TK, Wells JB, Garza NL, Mourich DV, Welch LS, Panchal RG, Bavari S.** 2012. Discovery and early development of AVI-7537 and AVI-7288 for the treatment of Ebola virus and Marburg virus infections. *Viruses* 4: 2806-2830.
- 16. Bishop BM.** 2014. Potential and Emerging Treatment Options for Ebola Virus Disease. *Ann Pharmacother* 10.1177/1060028014561227.
- 17. Jahrling PB, Geisbert JB, Swearingen JR, Larsen T, Geisbert TW.** 2007. Ebola hemorrhagic fever: evaluation of passive immunotherapy in nonhuman primates. *J Infect Dis* 196 Suppl 2: S400-403.
- 18. Oswald WB, Geisbert TW, Davis KJ, Geisbert JB, Sullivan NJ, Jahrling PB, Parren PW, Burton DR.** 2007. Neutralizing antibody fails to impact the course of Ebola virus infection in monkeys. *PLoS Pathog* 3: e9.
- 19. Gulland A.** 2014. First Ebola treatment is approved by WHO. *BMJ* 349: g5539.
- 20. McCarthy M.** 2014. US signs contract with ZMapp maker to accelerate development of the Ebola drug. *BMJ* 349: g5488.
- 21. Swenson DL, Wang D, Luo M, Warfield KL, Woraratanadharm J, Holman DH, Dong JY, Pratt WD.** 2008. Vaccine to confer to nonhuman primates complete protection against multistrain Ebola and Marburg virus infections. *Clin Vaccine Immunol* 15: 460-467.
- 22. Warfield KL, Swenson DL, Olinger GG, Kalina WV, Aman MJ, Bavari S.** 2007. Ebola virus-like particle-based vaccine protects nonhuman primates against lethal Ebola virus challenge. *J Infect Dis* 196 Suppl 2: S430-437.
- 23. Stanley DA, Honko AN, Asiedu C, Trefry JC, Lau-Kilby AW, Johnson JC, Hensley L, Ammendola V, Abbate A, Grazioli F, Foulds KE, Cheng C, Wang L, Donaldson MM, Colloca S, Folgori A, Roederer M, Nabel GJ, Mascola J, Nicosia A, Cortese R, Koup RA, Sullivan NJ.** 2014. Chimpanzee adenovirus vaccine generates acute and durable protective immunity against ebolavirus challenge. *Nat Med* 20: 1126-1129.

24. Halfmann P, Ebihara H, Marzi A, Hatta Y, Watanabe S, Suresh M, Neumann G, Feldmann H, Kawaoka Y. 2009. Replication-deficient ebolavirus as a vaccine candidate. *J Virol* 83: 3810-3815.
25. Garbutt M, Liebscher R, Wahl-Jensen V, Jones S, Moller P, Wagner R, Volchkov V, Klenk HD, Feldmann H, Stroher U. 2004. Properties of replication-competent vesicular stomatitis virus vectors expressing glycoproteins of filoviruses and arenaviruses. *J Virol* 78: 5458-5465.
26. Bukreyev A, Yang L, Zaki SR, Shieh WJ, Rollin PE, Murphy BR, Collins PL, Sanchez A. 2006. A single intranasal inoculation with a paramyxovirus-vectored vaccine protects guinea pigs against a lethal-dose Ebola virus challenge. *J Virol* 80: 2267-2279.
27. Cohen J, Kupferschmidt K. 2014. Infectious Diseases. Ebola vaccine trials raise ethical issues. *Science* 346: 289-290.
28. Lee JE, Saphire EO. 2009. Ebolavirus glycoprotein structure and mechanism of entry. *Future Virol* 4: 621-635.
29. 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: 3602-3607.
30. Jasenosky LD, Kawaoka Y. 2004. Filovirus budding. *Virus Res* 106: 181-188.
31. Cook JD, Lee JE. 2013. The secret life of viral entry glycoproteins: moonlighting in immune evasion. *PLoS Pathog* 9: e1003258.
32. Mehedi M, Falzarano D, Seebach J, Hu X, Carpenter MS, Schnittler HJ, Feldmann H. 2011. A new Ebola virus nonstructural glycoprotein expressed through RNA editing. *J Virol* 85: 5406-5414.
33. Jasenosky LD, Neumann G, Lukashevich I, Kawaoka Y. 2001. Ebola virus VP40-induced particle formation and association with the lipid bilayer. *J Virol* 75: 5205-5214.
34. Takada A. 2012. Filovirus tropism: cellular molecules for viral entry. *Front Microbiol* 3: 34.
35. Dolnik O, Volchkova V, Garten W, Carbonnelle C, Becker S, Kahnt J, Stroher U, Klenk HD, Volchkov V. 2004. Ectodomain shedding of the glycoprotein GP of Ebola virus. *EMBO J* 23: 2175-2184.
36. Hunt CL, Lennemann NJ, Maury W. 2012. Filovirus entry: a novelty in the viral fusion world. *Viruses* 4: 258-275.

- 37. Lee JE, Fusco ML, Hessel AJ, Oswald WB, Burton DR, Saphire EO.** 2008. Structure of the Ebola virus glycoprotein bound to an antibody from a human survivor. *Nature* 454: 177-182.
- 38. Carette JE, Raaben M, Wong AC, Herbert AS, Obernosterer G, Mulherkar N, Kuehne AI, Kranzusch PJ, Griffin AM, Ruthel G, Dal Cin P, Dye JM, Whelan SP, Chandran K, Brummelkamp TR.** 2011. Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann-Pick C1. *Nature* 477: 340-343.
- 39. Cote M, Misasi J, Ren T, Bruchez A, Lee K, Filone CM, Hensley L, Li Q, Ory D, Chandran K, Cunningham J.** 2011. Small molecule inhibitors reveal Niemann-Pick C1 is essential for Ebola virus infection. *Nature* 477: 344-348.
- 40. Simmons G, Reeves JD, Grogan CC, Vandenberghe LH, Baribaud F, Whitbeck JC, Burke E, Buchmeier MJ, Soilleux EJ, Riley JL, Doms RW, Bates P, Pohlmann S.** 2003. DC-SIGN and DC-SIGNR bind ebola glycoproteins and enhance infection of macrophages and endothelial cells. *Virology* 305: 115-123.
- 41. Kaletsky RL, Francica JR, Agrawal-Gamse C, Bates P.** 2009. Tetherin-mediated restriction of filovirus budding is antagonized by the Ebola glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 2886-2891.
- 42. Noda T, Ebihara H, Muramoto Y, Fujii K, Takada A, Sagara H, Kim JH, Kida H, Feldmann H, Kawaoka Y.** 2006. Assembly and budding of Ebolavirus. *PLoS Pathog* 2: e99.
- 43. de La Vega MA, Wong G, Kobinger GP, Qiu X.** 2014. The Multiple Roles of sGP in Ebola Pathogenesis. *Viral Immunol* 10.1089/vim.2014.0068.
- 44. Stahelin RV.** 2014. Membrane binding and bending in Ebola VP40 assembly and egress. *Front Microbiol* 5: 300.
- 45. Hoenen T, Biedenkopf N, Zielecki F, Jung S, Groseth A, Feldmann H, Becker S.** 2010. Oligomerization of Ebola virus VP40 is essential for particle morphogenesis and regulation of viral transcription. *J Virol* 84: 7053-7063.
- 46. Bornholdt ZA, Noda T, Abelson DM, Halfmann P, Wood MR, Kawaoka Y, Saphire EO.** 2013. Structural rearrangement of ebola virus VP40 begets multiple functions in the virus life cycle. *Cell* 154: 763-774.
- 47. Hoenen T, Volchkov V, Kolesnikova L, Mittler E, Timmins J, Ottmann M, Reynard O, Becker S, Weissenhorn W.** 2005. VP40 octamers are essential for Ebola virus replication. *J Virol* 79: 1898-1905.
- 48. Noda T, Watanabe S, Sagara H, Kawaoka Y.** 2007. Mapping of the VP40-binding regions of the nucleoprotein of Ebola virus. *J Virol* 81: 3554-3562.

49. Hoenen T, Jung S, Herwig A, Groseth A, Becker S. 2010. Both matrix proteins of Ebola virus contribute to the regulation of viral genome replication and transcription. *Virology* 403: 56-66.
50. Noda T, Sagara H, Suzuki E, Takada A, Kida H, Kawaoka Y. 2002. Ebola virus VP40 drives the formation of virus-like filamentous particles along with GP. *J Virol* 76: 4855-4865.
51. Timmins J, Schoehn G, Ricard-Blum S, Scianimanico S, Vernet T, Ruigrok RW, Weissenhorn W. 2003. Ebola virus matrix protein VP40 interaction with human cellular factors Tsg101 and Nedd4. *J Mol Biol* 326: 493-502.
52. Harty RN, Brown ME, Wang G, Huibregtse J, Hayes FP. 2000. A PPxY motif within the VP40 protein of Ebola virus interacts physically and functionally with a ubiquitin ligase: implications for filovirus budding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 13871-13876.
53. Calistri A, Salata C, Parolin C, Palu G. 2009. Role of multivesicular bodies and their components in the egress of enveloped RNA viruses. *Rev Med Virol* 19: 31-45.
54. Licata JM, Simpson-Holley M, Wright NT, Han Z, Paragas J, Harty RN. 2003. Overlapping motifs (PTAP and PPEY) within the Ebola virus VP40 protein function independently as late budding domains: involvement of host proteins TSG101 and VPS-4. *J Virol* 77: 1812-1819.
55. Okumura A, Pitha PM, Harty RN. 2008. ISG15 inhibits Ebola VP40 VLP budding in an L-domain-dependent manner by blocking Nedd4 ligase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 3974-3979.
56. Calistri A, Munegato D, Carli I, Parolin C, Palu G. 2014. The ubiquitin-conjugating system: multiple roles in viral replication and infection. *Cells* 3: 386-417.
57. Soni SP, Adu-Gyamfi E, Yong SS, Jee CS, Stahelin RV. 2013. The Ebola virus matrix protein deeply penetrates the plasma membrane: an important step in viral egress. *Biophys J* 104: 1940-1949.
58. Ruthel G, Demmin GL, Kallstrom G, Javid MP, Badie SS, Will AB, Nelle T, Schokman R, Nguyen TL, Carra JH, Bavari S, Aman MJ. 2005. Association of ebola virus matrix protein VP40 with microtubules. *J Virol* 79: 4709-4719.
59. Prins KC, Binning JM, Shabman RS, Leung DW, Amarasinghe GK, Basler CF. 2010. Basic residues within the ebolavirus VP35 protein are required for its viral polymerase cofactor function. *J Virol* 84: 10581-10591.
60. Noda T, Kolesnikova L, Becker S, Kawaoka Y. 2011. The importance of the NP: VP35 ratio in Ebola virus nucleocapsid formation. *J Infect Dis* 204 Suppl 3: S878-883.

- 61. Trunschke M, Conrad D, Enterlein S, Olejnik J, Brauburger K, Muhlberger E.** 2013. The L-VP35 and L-L interaction domains reside in the amino terminus of the Ebola virus L protein and are potential targets for antivirals. *Virology* 441: 135-145.
- 62. Huang Y, Xu L, Sun Y, Nabel GJ.** 2002. The assembly of Ebola virus nucleocapsid requires virion-associated proteins 35 and 24 and posttranslational modification of nucleoprotein. *Mol Cell* 10: 307-316.
- 63. Watanabe S, Noda T, Kawaoka Y.** 2006. Functional mapping of the nucleoprotein of Ebola virus. *J Virol* 80: 3743-3751.
- 64. Groseth A, Charton JE, Sauerborn M, Feldmann F, Jones SM, Hoenen T, Feldmann H.** 2009. The Ebola virus ribonucleoprotein complex: a novel VP30-L interaction identified. *Virus Res* 140: 8-14.
- 65. John SP, Wang T, Steffen S, Longhi S, Schmaljohn CS, Jonsson CB.** 2007. Ebola virus VP30 is an RNA binding protein. *J Virol* 81: 8967-8976.
- 66. Han Z, Boshra H, Sunyer JO, Zwiers SH, Paragas J, Harty RN.** 2003. Biochemical and functional characterization of the Ebola virus VP24 protein: implications for a role in virus assembly and budding. *J Virol* 77: 1793-1800.
- 67. Watt A, Moukambi F, Banadyga L, Groseth A, Callison J, Herwig A, Ebihara H, Feldmann H, Hoenen T.** 2014. A novel life cycle modeling system for Ebola virus shows a genome length-dependent role of VP24 in virus infectivity. *J Virol* 88: 10511-10524.
- 68. Olejnik J, Ryabchikova E, Corley RB, Muhlberger E.** 2011. Intracellular events and cell fate in filovirus infection. *Viruses* 3: 1501-1531.
- 69. White JM, Schornberg KL.** 2012. A new player in the puzzle of filovirus entry. *Nat Rev Microbiol* 10: 317-322.
- 70. Matsuno K, Nakayama E, Noyori O, Marzi A, Ebihara H, Irimura T, Feldmann H, Takada A.** 2010. C-type lectins do not act as functional receptors for filovirus entry into cells. *Biochem Biophys Res Commun* 403: 144-148.
- 71. Kondratowicz AS, Lennemann NJ, Sinn PL, Davey RA, Hunt CL, Moller-Tank S, Meyerholz DK, Rennert P, Mullins RF, Brindley M, Sandersfeld LM, Quinn K, Weller M, McCray PB, Jr., Chiorini J, Maury W.** 2011. T-cell immunoglobulin and mucin domain 1 (TIM-1) is a receptor for Zaire Ebolavirus and Lake Victoria Marburgvirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 8426-8431.
- 72. Moller-Tank S, Maury W.** 2014. Phosphatidylserine receptors: Enhancers of enveloped virus entry and infection. *Virology* 468-470C: 565-580.

- 73. Nanbo A, Imai M, Watanabe S, Noda T, Takahashi K, Neumann G, Halfmann P, Kawaoka Y.** 2010. Ebola virus is internalized into host cells via macropinocytosis in a viral glycoprotein-dependent manner. *PLoS Pathog* 6: e1001121.
- 74. Saeed MF, Kolokoltsov AA, Albrecht T, Davey RA.** 2010. Cellular entry of ebola virus involves uptake by a macropinocytosis-like mechanism and subsequent trafficking through early and late endosomes. *PLoS Pathog* 6: e1001110.
- 75. Grimmer S, van Deurs B, Sandvig K.** 2002. Membrane ruffling and macropinocytosis in A431 cells require cholesterol. *J Cell Sci* 115: 2953-2962.
- 76. Saeed MF, Kolokoltsov AA, Freiberg AN, Holbrook MR, Davey RA.** 2008. Phosphoinositide-3 kinase-Akt pathway controls cellular entry of Ebola virus. *PLoS Pathog* 4: e1000141.
- 77. Hunt CL, Kolokoltsov AA, Davey RA, Maury W.** 2011. The Tyro3 receptor kinase Axl enhances macropinocytosis of Zaire ebolavirus. *J Virol* 85: 334-347.
- 78. Miller EH, Chandran K.** 2012. Filovirus entry into cells - new insights. *Curr Opin Virol* 2: 206-214.
- 79. Shimojima M, Ikeda Y, Kawaoka Y.** 2007. The mechanism of Axl-mediated Ebola virus infection. *J Infect Dis* 196 Suppl 2: S259-263.
- 80. Avota E, Gulbins E, Schneider-Schaulies S.** 2011. DC-SIGN mediated sphingomyelinase-activation and ceramide generation is essential for enhancement of viral uptake in dendritic cells. *PLoS Pathog* 7: e1001290.
- 81. Jenkins RW, Canals D, Idkowiak-Baldys J, Simbari F, Roddy P, Perry DM, Kitatani K, Luberto C, Hannun YA.** 2010. Regulated secretion of acid sphingomyelinase: implications for selectivity of ceramide formation. *J Biol Chem* 285: 35706-35718.
- 82. Grassme H, Gulbins E, Brenner B, Ferlinz K, Sandhoff K, Harzer K, Lang F, Meyer TF.** 1997. Acidic sphingomyelinase mediates entry of *N. gonorrhoeae* into nonphagocytic cells. *Cell* 91: 605-615.
- 83. Fernandes MC, Cortez M, Flannery AR, Tam C, Mortara RA, Andrews NW.** 2011. *Trypanosoma cruzi* subverts the sphingomyelinase-mediated plasma membrane repair pathway for cell invasion. *J Exp Med* 208: 909-921.
- 84. Miller ME, Adhikary S, Kolokoltsov AA, Davey RA.** 2012. Ebola virus requires acid sphingomyelinase activity and plasma membrane sphingomyelin for infection. *J Virol* 86: 7473-7483.

- 85. Yonezawa A, Cavrois M, Greene WC.** 2005. Studies of ebola virus glycoprotein-mediated entry and fusion by using pseudotyped human immunodeficiency virus type 1 virions: involvement of cytoskeletal proteins and enhancement by tumor necrosis factor alpha. *J Virol* 79: 918-926.
- 86. van der Kant R, Fish A, Janssen L, Janssen H, Krom S, Ho N, Brummelkamp T, Carette J, Rocha N, Neefjes J.** 2013. Late endosomal transport and tethering are coupled processes controlled by RILP and the cholesterol sensor ORP1L. *J Cell Sci* 126: 3462-3474.
- 87. Rocha N, Kuijl C, van der Kant R, Janssen L, Houben D, Janssen H, Zwart W, Neefjes J.** 2009. Cholesterol sensor ORP1L contacts the ER protein VAP to control Rab7-RILP-p150 Glued and late endosome positioning. *J Cell Biol* 185: 1209-1225.
- 88. Chandran K, Sullivan NJ, Felbor U, Whelan SP, Cunningham JM.** 2005. Endosomal proteolysis of the Ebola virus glycoprotein is necessary for infection. *Science* 308: 1643-1645.
- 89. Schornberg K, Matsuyama S, Kabsch K, Delos S, Bouton A, White J.** 2006. Role of endosomal cathepsins in entry mediated by the Ebola virus glycoprotein. *J Virol* 80: 4174-4178.
- 90. Ebert DH, Deussing J, Peters C, Dermody TS.** 2002. Cathepsin L and cathepsin B mediate reovirus disassembly in murine fibroblast cells. *J Biol Chem* 277: 24609-24617.
- 91. White JM, Delos SE, Brecher M, Schornberg K.** 2008. Structures and mechanisms of viral membrane fusion proteins: multiple variations on a common theme. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 43: 189-219.
- 92. Simmons G, Gosalia DN, Rennekamp AJ, Reeves JD, Diamond SL, Bates P.** 2005. Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 11876-11881.
- 93. Pager CT, Dutch RE.** 2005. Cathepsin L is involved in proteolytic processing of the Hendra virus fusion protein. *J Virol* 79: 12714-12720.
- 94. Yan X, Lukas J, Witt M, Wree A, Hubner R, Frech M, Kohling R, Rolfs A, Luo J.** 2011. Decreased expression of myelin gene regulatory factor in Niemann-Pick type C 1 mouse. *Metab Brain Dis* 26: 299-306.
- 95. Cenedella RJ.** 2009. Cholesterol synthesis inhibitor U18666A and the role of sterol metabolism and trafficking in numerous pathophysiological processes. *Lipids* 44: 477-487.
- 96. Poh MK, Shui G, Xie X, Shi PY, Wenk MR, Gu F.** 2012. U18666A, an intra-cellular cholesterol transport inhibitor, inhibits dengue virus entry and replication. *Antiviral Res* 93: 191-198.

97. **Tang Y, Leao IC, Coleman EM, Broughton RS, Hildreth JE.** 2009. Deficiency of niemann-pick type C-1 protein impairs release of human immunodeficiency virus type 1 and results in Gag accumulation in late endosomal/lysosomal compartments. *J Virol* 83: 7982-7995.
98. **Freitas MS, Follmer C, Costa LT, Vilani C, Bianconi ML, Achete CA, Silva JL.** 2011. Measuring the strength of interaction between the Ebola fusion peptide and lipid rafts: implications for membrane fusion and virus infection. *PLoS One* 6: e15756.
99. **Weik M, Modrof J, Klenk HD, Becker S, Muhlberger E.** 2002. Ebola virus VP30-mediated transcription is regulated by RNA secondary structure formation. *J Virol* 76: 8532-8539.
100. **Biedenkopf N, Hartlieb B, Hoenen T, Becker S.** 2013. Phosphorylation of Ebola virus VP30 influences the composition of the viral nucleocapsid complex: impact on viral transcription and replication. *J Biol Chem* 288: 11165-11174.
101. **Hoenen T, Shabman RS, Groseth A, Herwig A, Weber M, Schudt G, Dolnik O, Basler CF, Becker S, Feldmann H.** 2012. Inclusion bodies are a site of ebolavirus replication. *J Virol* 86: 11779-11788.
102. **Weidmann M, Sall AA, Manuguerra JC, Koivogui L, Adjami A, Traore FF, Hedlund KO, Lindegren G, Mirazimi A.** 2011. Quantitative analysis of particles, genomes and infectious particles in supernatants of haemorrhagic fever virus cell cultures. *Virology* 8: 81.
103. **Bavari S, Bosio CM, Wiegand E, Ruthel G, Will AB, Geisbert TW, Hevey M, Schmaljohn C, Schmaljohn A, Aman MJ.** 2002. Lipid raft microdomains: a gateway for compartmentalized trafficking of Ebola and Marburg viruses. *J Exp Med* 195: 593-602.
104. **Rousso I, Mixon MB, Chen BK, Kim PS.** 2000. Palmitoylation of the HIV-1 envelope glycoprotein is critical for viral infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 13523-13525.
105. **Manie SN, de Breyne S, Vincent S, Gerlier D.** 2000. Measles virus structural components are enriched into lipid raft microdomains: a potential cellular location for virus assembly. *J Virol* 74: 305-311.
106. **Nguyen DH, Hildreth JE.** 2000. Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts. *J Virol* 74: 3264-3272.
107. **Schmitt AP, Lamb RA.** 2004. Escaping from the cell: assembly and budding of negative-strand RNA viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 283: 145-196.
108. **Li H, Ying T, Yu F, Lu L, Jiang S.** 2014. Development of therapeutics for treatment of Ebola virus infection. *Microbes Infect* 10.1016/j.micinf.2014.11.012.

- 109. Wolf MC, Freiberg AN, Zhang T, Akyol-Ataman Z, Grock A, Hong PW, Li J, Watson NF, Fang AQ, Aguilar HC, Porotto M, Honko AN, Damoiseaux R, Miller JP, Woodson SE, Chantasirivisal S, Fontanes V, Negrete OA, Krogstad P, Dasgupta A, Moscona A, Hensley LE, Whelan SP, Faull KF, Holbrook MR, Jung ME, Lee B.** 2010. A broad-spectrum antiviral targeting entry of enveloped viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 3157-3162.
- 110. Basu A, Li B, Mills DM, Panchal RG, Cardinale SC, Butler MM, Peet NP, Majgier-Baranowska H, Williams JD, Patel I, Moir DT, Bavari S, Ray R, Farzan MR, Rong L, Bowlin TL.** 2011. Identification of a small-molecule entry inhibitor for filoviruses. *J Virol* 85: 3106-3119.
- 111. Shoemaker CJ, Schornberg KL, Delos SE, Scully C, Pajouhesh H, Olinger GG, Johansen LM, White JM.** 2013. Multiple cationic amphiphiles induce a Niemann-Pick C phenotype and inhibit Ebola virus entry and infection. *PLoS One* 8: e56265.
- 112. Johansen LM, Brannan JM, Delos SE, Shoemaker CJ, Stossel A, Lear C, Hoffstrom BG, Dewald LE, Schornberg KL, Scully C, Lehar J, Hensley LE, White JM, Olinger GG.** 2013. FDA-approved selective estrogen receptor modulators inhibit Ebola virus infection. *Sci Transl Med* 5: 190ra179.
- 113. Elshabrawy HA, Fan J, Haddad CS, Ratia K, Broder CC, Caffrey M, Prabhakar BS.** 2014. Identification of a broad-spectrum antiviral small molecule against severe acute respiratory syndrome coronavirus and Ebola, Hendra, and Nipah viruses by using a novel high-throughput screening assay. *J Virol* 88: 4353-4365.
- 114. Warren TK, Wells J, Panchal RG, Stuthman KS, Garza NL, Van Tongeren SA, Dong L, Retterer CJ, Eaton BP, Pegoraro G, Honnold S, Bantia S, Kotian P, Chen X, Taubenheim BR, Welch LS, Minning DM, Babu YS, Sheridan WP, Bavari S.** 2014. Protection against filovirus diseases by a novel broad-spectrum nucleoside analogue BCX4430. *Nature* 508: 402-405.
- 115. Oestereich L, Ludtke A, Wurr S, Rieger T, Munoz-Fontela C, Gunther S.** 2014. Successful treatment of advanced Ebola virus infection with T-705 (favipiravir) in a small animal model. *Antiviral Res* 105: 17-21.
- 116. Arias A, Thorne L, Goodfellow I.** 2014. Favipiravir elicits antiviral mutagenesis during virus replication in vivo. *Elife* 3: e03679.
- 117. Chang J, Warren TK, Zhao X, Gill T, Guo F, Wang L, Comunale MA, Du Y, Alonzi DS, Yu W, Ye H, Liu F, Guo JT, Mehta A, Cuconati A, Butters TD, Bavari S, Xu X, Block TM.** 2013. Small molecule inhibitors of ER alpha-glucosidases are active against multiple hemorrhagic fever viruses. *Antiviral Res* 98: 432-440.
- 118. Zimetbaum P.** 2007. Amiodarone for atrial fibrillation. *N Engl J Med* 356: 935-941.

119. Zipes DP, Prystowsky EN, Heger JJ. 1984. Amiodarone: electrophysiologic actions, pharmacokinetics and clinical effects. *J Am Coll Cardiol* 3: 1059-1071.
120. Salata C, Baritussio A, Munegato D, Ciminale V, Calistri A, Ha HR, Bigler L, Fabris F, Parolin C, Palu G, Mirazimi A. Amiodarone and Metabolite MDEA Inhibit Ebola Virus Infection by Interfering with Viral Entry Process. *Submitted*.
121. Baritussio A, Marzini S, Agostini M, Alberti A, Cimenti C, Bruttomesso D, Manzato E, Quaglino D, Pettenazzo A. 2001. Amiodarone inhibits lung degradation of SP-A and perturbs the distribution of lysosomal enzymes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281: L1189-1199.
122. Gill J, Heel RC, Fitton A. 1992. Amiodarone. An overview of its pharmacological properties, and review of its therapeutic use in cardiac arrhythmias. *Drugs* 43: 69-110.
123. Stadler K, Ha HR, Ciminale V, Spirli C, Saletti G, Schiavon M, Bruttomesso D, Bigler L, Follath F, Pettenazzo A, Baritussio A. 2008. Amiodarone alters late endosomes and inhibits SARS coronavirus infection at a post-endosomal level. *Am J Respir Cell Mol Biol* 39: 142-149.
124. Piccoli E, Nadai M, Caretta CM, Bergonzini V, Del Vecchio C, Ha HR, Bigler L, Dal Zoppo D, Faggini E, Pettenazzo A, Orlando R, Salata C, Calistri A, Palu G, Baritussio A. 2011. Amiodarone impairs trafficking through late endosomes inducing a Niemann-Pick C-like phenotype. *Biochem Pharmacol* 82: 1234-1249.
125. Futamura Y. 1997. Amiodarone induces two different types of disorders in mouse alveolar macrophages. *Jpn J Pharmacol* 74: 21-28.
126. Roff CF, Goldin E, Comly ME, Cooney A, Brown A, Vanier MT, Miller SP, Brady RO, Pentchev PG. 1991. Type C Niemann-Pick disease: use of hydrophobic amines to study defective cholesterol transport. *Dev Neurosci* 13: 315-319.
127. Platt FM, Boland B, van der Spoel AC. 2012. The cell biology of disease: lysosomal storage disorders: the cellular impact of lysosomal dysfunction. *J Cell Biol* 199: 723-734.
128. Klionsky DJ. 2007. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 931-937.
129. Cheng YL, Lan KH, Lee WP, Tseng SH, Hung LR, Lin HC, Lee FY, Lee SD, Lan KH. 2013. Amiodarone inhibits the entry and assembly steps of hepatitis C virus life cycle. *Clin Sci (Lond)* 125: 439-448.
130. Lan SH, Wu SY, Zuchini R, Lin XZ, Su IJ, Tsai TF, Lin YJ, Wu CT, Liu HS. 2014. Autophagy suppresses tumorigenesis of hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma through degradation of microRNA-224. *Hepatology* 59: 505-517.

- 131. Salata C, Curtarello M, Calistri A, Sartori E, Sette P, de Bernard M, Parolin C, Palu G.** 2009. vOX2 glycoprotein of human herpesvirus 8 modulates human primary macrophages activity. *J Cell Physiol* 219: 698-706.
- 132. Ha HR, Bigler L, Wendt B, Maggiorini M, Follath F.** 2005. Identification and quantitation of novel metabolites of amiodarone in plasma of treated patients. *Eur J Pharm Sci* 24: 271-279.
- 133. Quaglino D, Ha HR, Duner E, Bruttomesso D, Bigler L, Follath F, Realdi G, Pettenazzo A, Baritussio A.** 2004. Effects of metabolites and analogs of amiodarone on alveolar macrophages: structure-activity relationship. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287: L438-447.
- 134. Martinez O, Ndungo E, Tantral L, Miller EH, Leung LW, Chandran K, Basler CF.** 2013. A mutation in the Ebola virus envelope glycoprotein restricts viral entry in a host species- and cell-type-specific manner. *J Virol* 87: 3324-3334.
- 135. Whitt MA.** 2010. Generation of VSV pseudotypes using recombinant DeltaG-VSV for studies on virus entry, identification of entry inhibitors, and immune responses to vaccines. *J Virol Methods* 169: 365-374.
- 136. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, Naldini L.** 1998. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* 72: 8463-8471.
- 137. Breitenstein A, Stampfli SF, Camici GG, Akhmedov A, Ha HR, Follath F, Bogdanova A, Luscher TF, Tanner FC.** 2008. Amiodarone inhibits arterial thrombus formation and tissue factor translation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 2231-2238.
- 138. Benaim G, Hernandez-Rodriguez V, Mujica-Gonzalez S, Plaza-Rojas L, Silva ML, Parra-Gimenez N, Garcia-Marchan Y, Paniz-Mondolfi A, Uzcanga G.** 2012. In vitro anti-Trypanosoma cruzi activity of dronedarone, a novel amiodarone derivative with an improved safety profile. *Antimicrob Agents Chemother* 56: 3720-3725.
- 139. Bigler L, Spirli C, Fiorotto R, Pettenazzo A, Duner E, Baritussio A, Follath F, Ha HR.** 2007. Synthesis and cytotoxicity properties of amiodarone analogues. *Eur J Med Chem* 42: 861-867.
- 140. Logan R, Kong AC, Axcell E, Krise JP.** 2014. Amine-containing molecules and the induction of an expanded lysosomal volume phenotype: a structure-activity relationship study. *J Pharm Sci* 103: 1572-1580.
- 141. Mitterreiter S, Page RM, Kamp F, Hopson J, Winkler E, Ha HR, Hamid R, Herms J, Mayer TU, Nelson DJ, Steiner H, Stahl T, Zeitschel U, Rossner S, Haass C, Lichtenthaler SF.** 2010. Bepridil and amiodarone simultaneously target the Alzheimer's disease beta- and gamma-secretase via distinct mechanisms. *J Neurosci* 30: 8974-8983.

- 142. Council UN** (2014) Resolution 2177 (2014).
- 143. Tseng C, Chan Y.** 2014. Overview of Ebola virus disease in 2014. *J Chin Med Assoc* 10.1016/j.jcma.2014.11.007.
- 144. Takada A, Watanabe S, Ito H, Okazaki K, Kida H, Kawaoka Y.** 2000. Downregulation of beta1 integrins by Ebola virus glycoprotein: implication for virus entry. *Virology* 278: 20-26.
- 145. Dube D, Brecher MB, Delos SE, Rose SC, Park EW, Schornberg KL, Kuhn JH, White JM.** 2009. The primed ebolavirus glycoprotein (19-kilodalton GP1,2): sequence and residues critical for host cell binding. *J Virol* 83: 2883-2891.
- 146. Moller-Tank S, Albritton LM, Rennert PD, Maury W.** 2014. Characterizing functional domains for TIM-mediated enveloped virus entry. *J Virol* 88: 6702-6713.
- 147. Schornberg KL, Shoemaker CJ, Dube D, Abshire MY, Delos SE, Bouton AH, White JM.** 2009. Alpha5beta1-integrin controls ebolavirus entry by regulating endosomal cathepsins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 8003-8008.
- 148. Gehring G, Rohrmann K, Atenchong N, Mittler E, Becker S, Dahmann F, Pohlmann S, Vondran FW, David S, Manns MP, Ciesek S, von Hahn T.** 2014. The clinically approved drugs amiodarone, dronedarone and verapamil inhibit filovirus cell entry. *J Antimicrob Chemother* 69: 2123-2131.
- 149. Miller EH, Obernosterer G, Raaben M, Herbert AS, Deffieu MS, Krishnan A, Ndungo E, Sandesara RG, Carette JE, Kuehne AI, Ruthel G, Pfeffer SR, Dye JM, Whelan SP, Brummelkamp TR, Chandran K.** 2012. Ebola virus entry requires the host-programmed recognition of an intracellular receptor. *EMBO J* 31: 1947-1960.
- 150. Madrid PB, Chopra S, Manger ID, Gilfillan L, Keepers TR, Shurtleff AC, Green CE, Iyer LV, Dilks HH, Davey RA, Kolokoltsov AA, Carrion R, Jr., Patterson JL, Bavari S, Panchal RG, Warren TK, Wells JB, Moos WH, Burke RL, Tanga MJ.** 2013. A systematic screen of FDA-approved drugs for inhibitors of biological threat agents. *PLoS One* 8: e60579.
- 151. Kolter T, Sandhoff K.** 2010. Lysosomal degradation of membrane lipids. *FEBS Lett* 584: 1700-1712.
- 152. Chatelain P, Laruel R, Gillard M.** 1985. Effect of amiodarone on membrane fluidity and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase activity in rat-brain synaptic membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 129: 148-154.
- 153. Hood CL, Abraham J, Boyington JC, Leung K, Kwong PD, Nabel GJ.** 2010. Biochemical and structural characterization of cathepsin L-processed Ebola virus glycoprotein: implications for viral entry and immunogenicity. *J Virol* 84: 2972-2982.

- 154. De Clercq E.** 2015. Ebola virus (EBOV) infection: Therapeutic strategies. *Biochem Pharmacol* 93: 1-10.
- 155. Muhlberger E, Lotfering B, Klenk HD, Becker S.** 1998. Three of the four nucleocapsid proteins of Marburg virus, NP, VP35, and L, are sufficient to mediate replication and transcription of Marburg virus-specific monocistronic minigenomes. *J Virol* 72: 8756-8764.
- 156. Pollak PT, Bouillon T, Shafer SL.** 2000. Population pharmacokinetics of long-term oral amiodarone therapy. *Clin Pharmacol Ther* 67: 642-652.
- 157. Turone F.** 2014. Doctors trial amiodarone for Ebola in Sierra Leone. *BMJ* 349: g7198.

## 7. ELENCO DELLE ABBREVIAZIONI

<b>CDC</b>	dall'inglese: <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
<b>DDEA</b>	di-desetil amiodarone
<b>DMEM</b>	dall'inglese: <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
<b>DNA</b>	Acido DeossiriboNucleico
<b>EBOV</b>	virus Ebola
<b>EBOVLP</b>	particelle simil-virali del virus Ebola
<b>EE</b>	dall'inglese: <i>Early Endosomes</i>
<b>ESCRT</b>	dall'inglese: <i>Endosomal Sorting Complex Required for Transport</i>
<b>EVD</b>	dall'inglese: Ebola Virus Disease
<b>FBS</b>	dall'inglese: <i>Fetal Bovine Serum</i>
<b>FFU</b>	dall'inglese: <i>Focus Forming Units</i>
<b>GFP</b>	dall'inglese: <i>Green Fluorescent Protein</i>
<b>GP</b>	glicoproteina del virus Ebola
<b>HCMV</b>	Citomegalovirus Umano
<b>HIV-1</b>	Virus dell'Immunodeficienza Umana di tipo 1
<b>IFL</b>	dall'inglese: <i>Internal Fusion Loop</i>
<b>IgG</b>	Immunoglobulina G
<b>kDa</b>	Chilo-Dalton
<b>L-aSMasi</b>	sfingomielinasi acida lisosomiale
<b>LAMP</b>	dall'inglese: <i>Lysosomal-Associated Membrane Protein</i>
<b>LB</b>	Luria-Bertani
<b>LB</b>	dall'inglese: <i>Loading Buffer</i>
<b>LBPA</b>	acido lisobisfosfatidico
<b>LE</b>	dall'inglese: <i>Late Endosomes</i>
<b>LY</b>	dall'inglese: <i>Lysosomes</i>
<b>MARV</b>	<i>Marburgvirus</i>
<b>MDEA</b>	mono-N-desetil amiodarone
<b>MLR</b>	dall'inglese: <i>mucin-like region</i>
<b>MOI</b>	dall'inglese: <i>Multiplicity Of Infection</i>
<b>mRNA</b>	RNA messaggero
<b>MVB</b>	dall'inglese: <i>MultiVesicular Bodies</i>
<b>NPC</b>	Niemann-Pick di tipo C
<b>OMS</b>	Organizzazione Mondiale della Sanità
<b>ORF</b>	dall'inglese: <i>Open Reading Frame</i>
<b>p/v</b>	Peso/Volume
<b>PBS</b>	tampone salino fosfato
<b>PFA</b>	paraformaldeide
<b>RBR</b>	dall'inglese: <i>Receptor-Binding Region</i>
<b>RNA</b>	Acido RiboNucleico

<b>RPM</b>	Rivoluzioni Per Minuto
<b>SARS</b>	dall'inglese: <i>Severe Acute Respiratory Syndrome</i>
<b>SD</b>	dall'inglese: <i>Standard Deviation</i>
<b>SDS</b>	Sodio Dodecil Solfato
<b>SEBOV</b>	<i>Sudan ebolavirus</i>
<b>sGP</b>	dall'inglese: <i>secreted GP</i>
<b>SM</b>	sfingomieline
<b>ssGP</b>	dall'inglese: <i>small soluble GP</i>
<b>SV40</b>	Virus vacuolante della scimmia
<b>TGN</b>	<i>Trans-Golgi Network</i>
<b>Tsg101</b>	<i>Tumor Susceptibility Gene 101</i>
<b>VSV</b>	dall'inglese: <i>Vesicular Stomatitis Virus</i>
<b>VSV-G</b>	glicoproteina G del virus della stomatite vescicolare
<b>VSV-M</b>	proteina M di matrice del virus della stomatite vescicolare
<b>VSVLP</b>	particelle simil-virali del virus della stomatite vescicolare
<b>v/v</b>	Volume/Volume
<b>VLP</b>	dall'inglese: <i>virus-like particles</i>
<b>WB</b>	<i>Western Blot</i>
<b>ZEBOV</b>	<i>Zaire ebolavirus</i>

## 8. PUBBLICAZIONI

Durante il dottorato di ricerca è stato sviluppato anche un altro progetto che ha portato alla pubblicazione:

- Calistri A, **Munegato D**, Toffoletto M, Celestino M, Franchin E, Comin A, Sartori E, Salata C, Parolin C, Palù G. 2014. Functional interaction between the ESCRT-I component TSG101 and the HSV-1 tegument ubiquitin specific protease. *J. Cell. Physiol.* doi: 10.1002/jcp.24890.

Ulteriori pubblicazioni:

- Calistri A, **Munegato D**, Carli I, Parolin C, Palù G. 2014. The ubiquitin-conjugating system: multiple roles in viral replication and infection. *Cells* 3: 386-417.
- Elbadawy HM, Gailledrat M, Desseaux C, Salvalaio G, Di Iorio E, Ferrari B, Bertolin M, Barbaro V, Parekh M, Gayon R, **Munegato D**, Franchin E, Calistri A, Palù G, Parolin C, Ponzin D, Ferrari S. 2014. Gene transfer of integration defective anti-HSV-1 meganuclease to human corneas ex vivo. *Gene Therapy* 21: 272-281

