



UNIVERSITÀ DI PISA

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PISA

SCUOLA DI DOTTORATO IN FISIOPATOLOGIA CLINICA E SCIENZE DEL FARMACO

PROGRAMMA DI VIROLOGIA FONDAMENTALE E CLINICA

Direttore: Prof. Luca Ceccherini-Nelli

SSD: MED/07

“Study of an alternative gene embedded in the West Nile virus genome”

Relatore

Prof.ssa Alberta Azzi

Candidato

Alice Pomponi

Anno Accademico 2013 – 2014

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare il Col. Sa. (me) Florigio Lista per il suo impegno come capo del II Reparto del Centro Studi e Ricerche di Sanità e Veterinaria dell'Esercito Italiano di Roma, il Dott. Giovanni Faggioni per i preziosi insegnamenti e le numerose ore dedicate alla mia tesi ed il Dott. Riccardo De Santis per la costante attività di supporto durante la stesura di questo lavoro.

RIASSUNTO.....	5
ABSTRACT.....	6
Storia.....	8
Filogenesi.....	11
Epidemiologia.....	12
Ecologia e vie di trasmissione.....	15
Diffusione del virus nell'organismo ospite.....	18
Risposta immunitaria.....	20
-Risposta immunitaria innata.....	20
-Risposta immunitaria adattativa.....	22
-Risposta immunitaria nel sistema nervoso centrale.....	22
Patogenesi.....	23
Diagnosi.....	25
-Test basati sull'analisi degli acidi nucleici.....	25
-Diagnosi sierologica dell'infezione da West Nile.....	26
Prospettive di vaccinazione.....	28
Proteine codificate da schemi di lettura alternativi.....	29
SCOPO DELLA TESI.....	32
MATERIALI E METODI.....	33
Produzione delle proteine ricombinanti His-WARF4 e His-NS4B COOH-terminale.....	33
Produzione dell'anticorpo monoclonale contro la proteina WARF4.....	35
Analisi in western blot della specificità dell'anticorpo monoclonale Mab 3A12.....	35
Individuazione della regione contenente l'epitopo riconosciuto da MAb 3A12.....	36
Colture cellulari e propagazione delle linee virali.....	37

Immunofluorescenza indiretta (IFA)	37
Analisi in Western blot.....	38
Sieri umani	38
RISULTATI	41
Produzione delle proteine ricombinanti His-WARF4 e His-NS4B COOH-terminale	41
Produzione dell'anticorpo monoclonale anti-WARF4 Mab 3A12.....	41
Analisi dell' allineamento aminoacidico delle proteine WARF4 e NS4B COOH-terminale ed analisi in western blot.....	42
Identificazione della regione proteica riconosciuta da MAb3A12.....	42
Espressione della proteina N-NS4B/WARF4 in cellule infettate con il WNV linea I.....	43
Studio della cinetica di espressione di N-NS4B/WARF4 nel corso dell'infezione virale..	44
L' espressione della proteina N-NS4B/WARF4 è limitata alla linea virale I del WNV	44
Presenza di anticorpi anti-N-NS4B/WARF4 nel siero di individui infettati dal WNV con sviluppo di sintomatologia neurologica	45
DISCUSSIONE	48
CONCLUSIONI.....	55
FIGURE	56
BIBLIOGRAFIA.....	72
ATTIVITA' SVOLTE NEL CORSO DEL DOTTORATO	84

RIASSUNTO

L'analisi bioinformatica del genoma del virus West Nile (WNV) ha individuato 6 schemi di lettura alternativi, il più lungo dei quali (444bp), denominato WARF4, è presente solamente nei ceppi di WNV appartenenti alla linea virale I. Il gene alternativo è sovrapposto all'estremità 3' del gene NS4B ed in parte alla regione 5' del gene dell'NS5.

L'utilizzo di WARF4 è stato indirettamente dimostrato mediante l'individuazione di anticorpi specifici in sieri equini positivi al WNV. Poiché la sequenza di WARF4 è integrata nel gene della proteina virale NS4B, la nuova proteina è stata rinominata N-NS4B/WARF4.

Lo scopo di questo progetto è dimostrare la produzione di N-NS4B/WARF4 in colture cellulari eucariotiche infettate con il virus West Nile. A tal fine abbiamo prodotto una proteina ricombinante che include l'intera sequenza dello schema di lettura alternativo.

Questa proteina è stata utilizzata come immunogeno per la produzione di un anticorpo monoclonale anti-WARF4, chiamato MAb 3A12. E' stata inoltre prodotta una proteina ricombinante che comprende la sequenza COOH terminale del gene NS4B da utilizzare come controllo nei test di validazione dell' anticorpo.

MAb 3A12, è stato dapprima utilizzato in saggi immunoenzimatici che hanno confermato la sua specificità: in particolare è stata individuata la regione della proteina riconosciuta dall'anticorpo osservando la sua reattività in western blot con quattro peptidi sintetici che coprono tutta la sequenza aminoacidica codificata da WARF4.

L'anticorpo MAb 3A12 ha riconosciuto la nuova proteina in cellule VERO infettate con il WNV appartenente alla linea virale I sia in esperimenti di immunofluorescenza che in western blot , mentre non ha reagito con cellule infettate con la linea virale II del virus.

I risultati di analisi in western blot eseguite su lisato di cellule VERO infettate a tempi diversi dimostrano che N-NS4B/WARF4 viene espressa in quantità maggiore nella tarda fase dell'infezione.

L'espressione "*in vivo*" della proteina N-NS4B/WARF4 è stata dimostrata indirettamente, sebbene su un numero limitato di campioni, valutando la sua immunogenicità in individui infettati con il WNV.

Al momento non ci sono informazioni sperimentali circa il meccanismo di traduzione della proteina N-NS4B/WARF4, tuttavia si può supporre che la proteina venga prodotta in seguito ad uno scivolamento del ribosoma in posizione -1 durante la traduzione della poliproteina virale. Questo meccanismo di traduzione è già stato descritto per il West Nile ed è promosso da specifiche sequenze dell'RNA (slippery sequences associate a pseudoknot) rilevate dalle analisi bioinformatiche effettuate sui genomi virali analizzati. Come suggeriscono anche i dati ottenuti in western blot, in seguito allo scivolamento del ribosoma in posizione -1 la proteina codificata da WARF4 verrebbe sintetizzata come variante carbossi-terminale dell'antigene virale NS4B.

Il possibile ruolo della proteina N-NS4B/WARF4 nel corso dell'infezione da WNV resta tuttora sconosciuto, tuttavia recenti dati di letteratura sembrerebbero suggerire un ruolo nella regolazione traduzionale del genoma virale.

ABSTRACT

Bioinformatics analysis performed on West Nile virus (WNV) genome revealed the presence of six alternative open reading frames, one of which, entitled WARF4, is the longest (444 bp) and exclusively restricted to the viral lineage I.

The alternative gene is overlapping the COOH-terminal region of the NS4B gene and a small N-terminal portion of the NS5 gene. Since WARF4 is embedded in the NS4B gene, we rename the novel protein N-NS4B/WARF4.

We previously reported that N-NS4B/WARF4 is able to elicit antibodies in WNV infected horses; however, there was no direct experimental proof of the existence of this novel protein. The purpose of this study was to demonstrate the *in vitro* production of WARF4 protein following WNV infection of mammalian cultured cells.

For this purpose we produced two recombinant proteins : His- WARF4, that was used as immunogen for the production of a monoclonal antibody (MAb 3A12), and a NS4B carboxy - terminal portion protein as negative control for the evaluation of the antibody specificity.

MAb 3A12 specificity to alternative protein was confirmed by its reactivity to only one peptide among four analyzed that cover the full WARF4 amino acids sequence. This antibody detected the novel protein in WNV lineage I-infected, cultured VERO cells while it did not react with WNV lineage II infected cells. In addition, WARF4 protein was expressed in the late phase of WNV lineage I infection.

We indirectly demonstrated the “in vivo” production of N-NS4B/WARF4 by showing its immunoreactivity with human sera obtained from WNV infected patients.

We have no experimental information on N-NS4B/WARF4 protein translation, but it appears reasonable to assume that a -1 ribosomal frameshifting mechanism produces the novel protein.

This translation mechanism has already been described for West Nile.

Since the proposed model requires the presence of specific RNA structures such as slippery sequences associated with pseudoknot was carried out bioinformatics analysis that revealed these structures within the NS4B coding region.

The data obtained in western blot assays suggest that following the ribosomal frameshifting in -1 frame N-NS4B/WARF4 would be synthesized as carboxy-terminal variant of NS4B antigen.

The possible role of the protein N-NS4B/WARF4 during WNV infection is still unknown, however recent literature data seem to suggest a possible role in the translational regulation of the viral genome.

INTRODUZIONE

Storia

Il West Nile (WNV) è un virus appartenente alla famiglia *Flaviviridae*, genere *Flavivirus*. I membri di questa famiglia, di cui fanno parte anche i virus di genere *Pestivirus* ed *Hepacivirus*, hanno proprietà biologiche differenti ma mostrano analogie sia nella morfologia della particella virale che nell'organizzazione genomica e nella presunta strategia di replicazione dell'RNA (Monath 1990).

Da un punto di vista sierologico il virus è incluso nel gruppo delle encefaliti giapponesi ed è pertanto correlato ad altri patogeni umani come il virus Dengue (DENV), il virus dell'encefalite trasmessa da zecche (TBEV), il virus della febbre gialla (YFV), il virus dell'encefalite della Valle del Murray (MVEV), il virus dell'Encefalite di St. Louis (SLEV), i virus Usutu, Kunjin, Kokobera, Stratford e Alfuy ed il virus dell'Encefalite giapponese (JEV). Benché i flavivirus presentino caratteristiche comuni, quali neurotropismo e trasmissione attraverso insetti, inizialmente non erano stati riuniti in un unico genere. Verso la fine degli anni trenta e l'inizio degli anni quaranta venne dimostrata una correlazione tra encefalite giapponese, encefalite di St. Louis e il West Nile virus tramite test di neutralizzazione e test di fissazione del complemento.

Il West Nile virus fu isolato per la prima volta in Uganda nel 1937 dal sangue periferico di una donna in stato febbrile (Smithburn et al. 1940) nel corso di uno studio epidemiologico condotto sulla febbre gialla, ed è l'agente eziologico della malattia del Nilo Occidentale.

Come tutti gli altri membri del genere *Flavivirus* anche il West Nile è un agente zoonotico, e come la maggior parte di essi utilizza come vettore le zanzare, mentre altri virus appartenenti allo stesso genere vengono trasmessi dalle zecche o tramite vettori non ancora identificati.

La crescente diffusione dei flavivirus in diverse zone del mondo, verificatasi negli ultimi 2 decenni, ed il loro potenziale rapido tasso di evoluzione sono dovuti innanzitutto a fattori

climatici, poiché il progressivo innalzamento della temperatura del pianeta favorisce la sopravvivenza delle zanzare, e poi a fattori sociali, quali l'incremento dell'urbanizzazione e la maggiore mobilità. Inoltre la diminuzione dei controlli sulle zanzare determinatasi durante l'ultima parte del secolo scorso ha certamente contribuito al riemergere e al propagarsi di alcuni flavivirus con conseguenti patologie (Nathanson 1998).

Tutto questo è oggi motivo di interesse e preoccupazione: l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha pubblicato delle linee guida con l'intento di istituire appropriate misure in termini di maggiore sorveglianza, controllo della diffusione del virus e dei vettori stessi. Le singole nazioni, che vedono crescere di anno in anno il numero di infezioni dovute ai flavivirus, hanno preso le dovute precauzioni mediante campagne di sierosorveglianza messe in atto durante la stagione calda.

Struttura della particella virale ed organizzazione genomica del West Nile Virus

In base alle osservazioni al microscopio elettronico, le particelle virali sono caratterizzate da una simmetria icosaedrica, un diametro di 50 nm e l'assenza di proiezioni esterne (Figura 1) (Mukhopadhyay, et al. 2003).

Le particelle mature, a simmetria icosaedrica, sono dotate di envelope e racchiudono un genoma costituito da un filamento di RNA a polarità positiva lungo circa 11.000 paia di basi. Il genoma consiste in un singolo lungo schema di lettura aperto, fiancheggiato alle estremità 5' (che presenta un CAP) e 3' da due regioni non tradotte (UTR). Le regioni non codificanti contengono sequenze conservate che consentono la formazione di strutture secondarie dell'RNA probabilmente coinvolte nei processi di replicazione, controllo della traduzione ed impacchettamento del genoma.

La parte codificante del genoma viene tradotta in una poliproteina di circa 3000 aminoacidi che viene tagliata in 10 proteine, durante e dopo la traduzione, da proteasi sia virali che dell'ospite (Figura 2).

Tre di queste proteine sono componenti strutturali necessarie per l'assemblaggio delle particelle virali: la proteina del capsido (C) ancora l'RNA genomico alla particella virale; le proteine della matrice (M) si trovano al di sotto dell'envelope ancorandolo al capsido e impediscono la fusione dei virioni non ancora maturi con la cellula ospite; le proteine dell'envelope (E), che mediano l'attacco virale, la fusione della membrana virale con quella dell'ospite e l'assemblaggio dei virioni (Mukhopadhyay, et al. 2005).

Le altre sette proteine sono non strutturali e sono tutte necessarie per la replicazione del genoma virale. La proteina NS3 contiene una elicasi ATP-dipendente ed insieme all'NS2B, una serina proteasi, agisce nel processamento della poliproteina virale. L'NS5 è una metiltrasferasi ed una RNA polimerasi RNA-dipendente. Le altre proteine non strutturali sono piccole, generalmente idrofobiche, e svolgono diverse funzioni. L'NS1 è una glicoproteina che viene secreta dalle cellule infettate ed è coinvolta nell'attenuazione della risposta immunitaria dell'ospite (Schlesinger 2006). La proteina NS2A partecipa all'assemblaggio delle particelle virali e inibisce la risposta dell'interferone (Leung et al. 2008), come anche le proteine NS4 A e NS4B (Evans et al. 2007).

Il ciclo vitale dei flavivirus consiste in 4 fasi principali: legame/entrata nella cellula ospite, traduzione, replicazione, assemblaggio della particella virale/uscita dalla cellula ospite.

Dopo il legame, il West Nile virus entra nelle cellule mediante un processo di endocitosi clatrina dipendente mediata da recettori (Gollins and Porterfield 1985; Chu and Ng 2004) ed è trasportato negli endosomi. L'acidificazione dell'ambiente endosomale causa un cambiamento conformazionale delle proteine dell'envelope che determina la fusione delle membrane virali ed endosomali, con il conseguente rilascio del nucleocapside virale nel citoplasma (Modis et al. 2004; Mukhopadhyay et al. 2005).

L'RNA genomico si replica nel citoplasma generando un filamento di RNA a polarità negativa che servirà come template per la sintesi di un nuovo filamento a polarità positiva (Mackenzie and Westaway 2001). Questo filamento verrà impacchettato nella progenie

virale e/o utilizzato per la traduzione di altre proteine virali. Le particelle virali immature si formano quando i cores nucleocapsidici acquistano il loro rivestimento lipidico durante il processo di gemmazione dal lume del reticolo endoplasmatico. A questo rivestimento lipidico sono associate sulla superficie dei virioni immaturi le proteine prM ed E. Seguendo il trasporto attraverso la rete del trans-Golgi, il taglio mediato dalla furina della proteina prM che diventa la proteina M genera virioni maturi ed infettivi che vengono rilasciati per esocitosi (Guirakhoo et al. 1991; Elshuber et al. 2003). Alcune particelle virali rimangono immature, e benché i flavivirus siano considerati a localizzazione esclusivamente citoplasmatica, è stata descritta la presenza nel nucleoplasma cellulare sia del genoma che di diverse proteine virali nelle fasi iniziali dell'infezione (Uchil et al. 2006).

Filogenesi

Basandosi sul grado di omologia del genoma per il virus West Nile sono state identificate 7 linee virali, che presentano una divergenza nucleotidica che arriva fino al 25-30% (May et al. 2011). Solo le linee virali 1 e 2 sono ritenute responsabili di patologia negli esseri umani.

La linea 1, responsabile delle infezioni umane ed equine fino al 2006, comprende ceppi provenienti da diversi continenti: Europa, Nord America, Africa, Asia e Australia (come sottotipo Kunjin).

La linea 2, inizialmente rinvenuta soltanto nell'Africa subsahariana e in Madagascar (Lanciotti et al., 2002) è stata considerata inizialmente come meno virulenta nell'uomo. Un ceppo virale appartenente alla linea 2 è stato isolato per la prima volta in Europa nel 2004 un falco astore, diffondendosi poi rapidamente in tutta l'Europa centrale (Bakonyi et al. 2013). A partire dal 2010 è stata associata a malattie neuroinvasive (Papa et al. 2011).

Recentemente sono stati descritti per il WNV altre 5 linee virali. La linea virale 3 è rappresentata dal ceppo Rabensburg, isolato da una zanzara del genere *Culex pipiens* in

Europa centrale, più precisamente nella Repubblica Ceca. Le differenze a livello biologico e di sequenza proteica riscontrate tra un ceppo di riferimento di West Nile (Eg-101, linea 1) e ceppo Rabensburg potrebbero supportare la possibilità di considerare quest'ultimo come un nuovo virus (Bakonyi et al 2005).

La linea virale 4 è costituita dal ceppo LEIVKrnd88-190 isolato delle zecche *Dermacentor marginatus* in Russia (Lvov et al. 2004).

Gli isolati virali raccolti in India negli anni 50 ed 80 formano la linea virale 5 (Bondre et al. 2007), mentre le putative linee 6 e 7 includono, rispettivamente, un virus isolato in Spagna nel 2006 da una zanzara del genere *Culex pipiens* (Vazquez et al. 2010), strettamente correlato con la linea virale 4, ed i Koutango virus trovati in Senegal (Traore-Lamizana et al. 2001).

Il West Nile virus mostra dunque un'ampia diversità genetica e geografica all'interno dello stesso continente africano, da cui originano tutti i ceppi virali isolati nelle diverse parti del mondo. Tuttavia mentre la diffusione del West Nile in India, Australia ed America è iniziata da un singolo evento di introduzione del virus, che si è poi diffuso e differenziato nei singoli luoghi nelle diverse linee virali (May et al. 2011), in Europa ed in Medio Oriente diversi ceppi di West Nile sono stati introdotti occasionalmente dai flussi migratori degli uccelli (Zehender et al. 2011)

Epidemiologia

Dopo il primo isolamento nel 1937, il West Nile virus è indicato come causa di sporadici focolai di malattie virali in Africa, Asia occidentale ed Australia, qui presente come sottotipo Kunjin (Monath et al. 1990; Hayes 1989). Tali focolai, tutti dovuti a ceppi virali appartenenti alla linea 1, erano caratterizzati nell'uomo da sintomatologia lieve, con rare complicazioni neurologiche. Al contrario, gravi forme neurologiche sono state riportate per le epidemie verificatesi in Israele agli inizi degli anni 50 e in Francia negli anni 60.

A partire dal 1990 focolai di West Nile virus sono stati riscontrati anche in Europa e in Nord America, associati ad alti tassi di encefaliti virali ed altri sintomi di carattere neurologico (Marfin and Gubler 2001).

Nel 1996 in Romania sono stati registrati diversi casi di infezione da WNV con sintomatologia (Tsai et al., 1998).

Nell'estate del 1999 alcuni casi di encefalite a New York hanno segnato l'ingresso del West Nile in Nord America. Poiché la sequenza del genoma del ceppo di WNV isolato a New York nel 1999 è praticamente identica a quella di un ceppo isolato in Israele l'anno precedente si è supposto che il virus potesse essere stato casualmente introdotto da questa nazione negli Stati Uniti (Lanciotti et al. 2002). A partire dal primo isolamento a New York nel 1999 in soli 4 anni, alla fine del 2003, il virus era presente negli USA in 48 stati su 50 ed ogni anno continuano ad essere registrati nuovi casi di infezione. Analisi filogenetiche eseguite sul West Nile virus in Nord America indicano che il ceppo isolato a partire dal 2002, ovvero da quando l'attività del virus negli USA è aumentata in maniera significativa, differisce da quello inizialmente introdotto negli Stati Uniti per una singola sostituzione aminoacidica nel gene codificante per la proteina envelope che gli ha probabilmente conferito una maggiore virulenza (Ebel et al. 2004). Il virus ha continuato a diffondersi negli Stati Uniti ed un'altro picco epidemico di notevole importanza si è verificata nel 2012, con un'epidemia che ha fatto registrare 5674 casi di malattia da West Nile e ben 286 morti (rispetto ai 9862 casi e 264 morti registrate nel 2003); la causa è da ricercarsi, probabilmente, nelle condizioni meteorologiche estreme (un'estate insolitamente calda e secca) che hanno favorito la trasmissione del virus (Duggal et al. 2013).

Negli ultimi anni si è assistito ad un incremento della diffusione del West Nile virus nell'emisfero occidentale: infatti, la presenza del virus è stata descritta, oltre che negli Stati Uniti, anche in Canada (HealthCanada, 2011), in Giamaica (Dupuis et al. 2003),

Repubblica Dominicana (Komar Robbins et al. 2003), Guadalupe (Quirin et al. 2004), nonché in alcuni cavalli in Messico (Lorono-Pino et al. 2003), evidenziando la diffusione del virus anche ai tropici. Ai Caraibi è stato riscontrato un solo caso di West Nile nella popolazione, ma la presenza del virus nei cavalli e negli uccelli induce ad ipotizzare come probabile la diffusione nella popolazione umana (Komar and Clark 2006).

Il virus è stato identificato anche in America del Sud, ma contrariamente a quanto avvenuto in America del Nord nessun caso di malattia o decesso è stato riportato tra gli esseri umani e gli equini (Komar and Clark 2006; ProMED-mail. 2006). La ragione di tale fenomeno non è nota, ma si ipotizza una protezione acquisita in seguito ad una cross-reattività di altri flavivirus (,Yamshchikov et al. 2005) o ad una diminuzione della virulenza del ceppo circolante (LoGiudice et al. 2003).

Mentre tutti gli eventi epidemici finora descritti sono stati attribuiti al WNV linea 1, a partire dal 2008 la linea virale 2 è stata responsabile nell'Europa dell'Est di diverse epidemie nell'uomo caratterizzate da malattie neuroinvasive: in Ungheria nel 2008, in Grecia per tre anni consecutivi a partire dal 2010 , Romania e Russia (Pradier et al. 2012). Anche in Sud Africa ed Australia è stato rilevato un aumento della virulenza dei ceppi appartenenti alle linee 2 e 1b (sottotipo Kunjin) (Frost et al. 2012; Venter et al. 2010).

In Italia è stato segnalato per la prima volta nel 1998 un focolaio da West Nile linea 1 in Toscana, di conseguenza è stato adottato con Ordinanza Ministeriale del 4 Aprile 2002 un Piano di sorveglianza nazionale. Il Ministero della Salute ha in seguito emanato l'ordinanza 13-5-2004 "Piano di sorveglianza nazionale per l'encefalomielite di tipo West Nile" (Autorino et al. 2002).

Nell'agosto del 2008, dopo dieci anni di silenzio, un nuovo evento epidemico ha interessato 8 province di tre regioni del nord (Emilia Romagna, Veneto, Lombardia).

Nove casi umani di infezione da West Nile, quattro dei quali caratterizzati da sintomi neuroinvasivi sono stati rilevati nel 2008 (Rossini et al., 2008; Gobbi et al., 2009). L'analisi

filogenetica degli isolati indica una similitudine del 98,8% con i ceppi isolati in Toscana nel 1998 (Monaco et al., 2009; Savini et al., 2008). Dal 2008 ad oggi si registrano annualmente casi di West Nile in Italia, dove il virus si è diffuso dal nord est ad altre regioni del paese come la Sardegna, la Puglia, il Molise e la Sicilia (Pascarelli et al. 2014). In Italia, benché sia preponderante la presenza della linea virale 1, è stata anche rilevata la circolazione della linea 2 (Barzon et al.2013; Calzolari et al. 2013).

Nel 2014 sono stati documentati 210 casi di febbre da West Nile in Europa, 24 dei quali in Italia (Figura 3) (ECDC 2014).

La presenza del virus un Europa e nel mondo continua ad essere riportata ogni anno, evidenziando come la plasticità e la capacità di adattamento del WNV comportino il rischio continuo di infezione per l'uomo, aumentato dell'emergere di nuovi ceppi virali patogeni.

Ecologia e vie di trasmissione

Il virus West Nile è mantenuto in natura in un ciclo enzootico che coinvolge come vettore le zanzare e come ospiti gli uccelli. Benché molte specie di zanzara siano in grado di fungere da vettore, le zanzare appartenenti al genere *Culex* sembrano avere una maggiore competenza vettoriale per la trasmissione del West Nile virus in natura. Queste infatti sono i più importanti vettori di mantenimento del virus nel ciclo aviario, mentre altre specie sono state identificate come vettori ponte tra gli uccelli e gli esseri umani o i cavalli. In laboratorio diverse specie di zanzare si dimostrano vettori competenti del virus, tuttavia la loro capacità di trasmetterlo agli esseri umani è ancora sconosciuta. Il virus West Nile è stato anche isolato dalle zecche, ma la loro capacità di trasmettere il virus in natura in maniera efficiente e significativa non è chiara (Abbassy et al., 1993).

Una volta effettuato il pasto ematico infetto il virus raggiunge l'intestino della zanzara e da qui si moltiplica in tutti i tessuti, inclusi il sistema nervoso e le ghiandole salivari,

producendo un'infezione non citopatica che dura tutta la vita dell'insetto. Inoltre le zanzare trasmettono per via trans-ovarica l'infezione alla progenie (Girard et al. 2005), quindi quando le uova si schiudono in primavera le pupe maturano in insetti adulti già infetti.

Gli uccelli insettivori, soprattutto passeriformi, corvi, fringuelli, contraggono l'infezione ingerendo zanzare infette oppure tramite puntura. In tali uccelli la concentrazione del virus nel sangue (viremia) può raggiungere titoli molto elevati ($>10^{10}$ placche formanti colonie). Il verificarsi di morti improvvise in queste specie di uccelli, soprattutto passeriformi, costituisce un evento sentinella della circolazione del WNV che può essere utilizzato come indicatore della densità del virus nelle aree a rischio di trasmissione e può fungere da evento predittivo di casi nell'uomo (Guptill et al. 2003).

Gli esseri umani e gli altri mammiferi sono ospiti accidentali o "finali" del virus, in quanto la viremia in questi organismi è troppo bassa per consentire una nuova trasmissione alle zanzare (Figura 4).

Il principale sistema di perpetuazione del virus nei climi temperati durante le stagioni non favorevoli coinvolge il periodo di quiescenza che attraversano le zanzare adulte (Nasci et al. 2001). Il ciclo di trasmissione può anche iniziare tramite la reintroduzione del virus ad opera degli uccelli migratori provenienti o dai paesi in cui hanno passato l'inverno oppure dai luoghi in cui il virus può essere trasmesso tutto l'anno, o anche in seguito ad una recrudescenza a partire da basse concentrazioni del virus in tessuto aviario (Komar, Langevin et al. 2003).

Sono state documentate altre vie di trasmissione naturale del WNV, anche se sono state osservate raramente. Ad esempio è noto che il West Nile può essere trasmesso da madre a figlio sia durante la gravidanza (Centers for Disease Control and Prevention. 2002) che l'allattamento (Hinckley et al. 2007).

I dati ottenuti da uno studio condotto tra il 2003 ed il 2004 negli Stati Uniti, su un campione di donne che avevano contratto il virus durante la gravidanza, indicano come raramente il

neonato riporti danni conseguenti all'infezione, mentre sintomi o infezione o mortalità nel neonato sono associati ad infezione della madre avvenuta entro 1 mese dal parto (O'Leary et al. 2006).

La trasmissione interumana può avvenire anche mediante trasfusioni di sangue (Biggerstaff et al. 2002), trapianto di organi (Iwamoto et al 2003) o midollo osseo (Hiatt et al 2003) e dialisi (Cairolì, 2005). Sulla base di queste osservazioni si è reso necessario effettuare lo screening dei donatori allo scopo di escludere i soggetti infetti, mediante test in grado di identificare anche livelli di viremia molto bassi.

Inoltre sono stati documentati diversi casi di infezione da West Nile dovuti all'esposizione al virus per motivi occupazionali. Nel 2002 sono stati trovati positivi al West Nile i lavoratori di una fattoria in Wisconsin in cui si allevavano tacchini, il personale di altre fattorie limitrofe, gli operai che si occupavano della lavorazione della carne ed alcuni abitanti della zona: in tutti fu rilevata la presenza di anticorpi diretti contro il virus nonché un'alta incidenza di stati febbrili. Inoltre la sieroprevalenza del West Nile virus era vicina al 100% tra gli uccelli della zona. Poiché i tacchini non sviluppano una viremia sufficiente da poter servire come ospiti di amplificazione del West Nile virus per trasmetterlo alle zanzare, è possibile che sia stata responsabile della diffusione del virus una via di trasmissione che non prevede la presenza di vettori (Swayne et al. 2000), come ad esempio una esposizione al virus dovuta alla presenza di lesioni cutanee o al contatto con le feci dei tacchini. Questa scoperta ha fatto sì che le persone che lavorano in aree con alte concentrazioni di animali potenzialmente infetti venissero protette con misure di sicurezza atte a prevenire il contagio diretto, oltre a quelle già disposte al fine di evitare le punture di zanzare.

Diffusione del virus nell'organismo ospite

In coltura, il WNV è in grado di replicarsi in diversi tipi di linee cellulari immortalizzate aviarie, di mammifero, di anfibi e di insetti, suggerendo che utilizzi recettori altamente conservati per entrare nelle cellule o che, in alternativa, si serva di proteine differenti nelle differenti specie di ospiti.

Nei topi e negli esseri umani il tropismo virale interessa i monociti, i macrofagi, le cellule endoteliali, quelle dendritiche ed i neuroni (Pierson and Diamond). Le proteine che funzionano da co-recettori per il legame e l'ingresso del virione nella cellula ospite non sono state definitivamente caratterizzate né per il West Nile né per gli altri flavivirus.

Il virus West Nile si trasmette attraverso la puntura di un insetto vettore, mediante la sua saliva infetta, che penetra attraverso il derma e va a replicarsi nelle cellule dendritiche (Chambers and Diamond 2003). Le cellule dendritiche giungono poi ai linfonodi afferenti e vengono così trasportate attraverso il torrente circolatorio causando una viremia primaria (Byrne et al. 2001). Il virus entra quindi nelle cellule del sistema reticolo-endoteliale (fegato, milza, linfonodi) con conseguente lisi delle cellule stesse, che danno origine ad una seconda disseminazione nel torrente circolatorio (viremia secondaria). Il virus si riscontra nel sangue dopo un periodo di 1-2 giorni dalla puntura dell'insetto vettore infetto e la viremia persiste per circa 1 settimana.

Il termine della viremia coincide con la comparsa nel siero degli anticorpi neutralizzanti di tipo IgM. Dopo circa due settimane dall'infezione il West Nile non è più rilevabile nel siero e negli organi periferici, mentre l'infezione è osservabile nel sistema nervoso centrale.

Per infettare il sistema nervoso centrale (SNC) il virus West Nile deve superare la barriera ematoencefalica, tessuto composto principalmente da cellule endoteliali ed astrociti. Le giunzioni cellulari occludenti presenti tra le cellule endoteliali formano una barriera alla diffusione, si pongono come ostacolo per i patogeni e ne impediscono l'ingresso nel

cervello prevenendo l'infezione delle cellule neuronali, molto delicate ed in massima parte non rinnovabili (Ballabh et al. 2004).

Il meccanismo con il quale il WNV riesce ad attraversare la barriera ematoencefalica rimane tuttora sconosciuto. Alcuni dati tuttavia, suggeriscono che il superamento di tale barriera può avvenire come conseguenza di un'elevata viremia, che determina un aumento delle citochine pre-infiammatorie, come l'interleuchina 6 ed il TNF α , che sono prodotte nel corso della risposta immunitaria periferica, con conseguente rilassamento della barriera ematoencefalica. Infatti la secrezione di TNF α modula la permeabilità della barriera ematoencefalica alterando le giunzioni occludenti presenti tra le cellule endoteliali (Fiala et al. 1997; Johnson, et al. 1968).

L'attivazione di metalloproteinasi di matrice potrebbe anch'essa promuovere il flusso del West Nile attraverso la barriera ematoencefalica, degradando la matrice extracellulare di quest'ultima: studi condotti in vitro dimostrano, infatti, che il trattamento con inibitori delle metalloproteinasi prevengono la rottura delle giunzioni occludenti associate con l'infezione da WN (Verma et al. 2010).

Oltre che compromettendo l'integrità della barriera ematoencefalica, in alcuni casi, il WNV può penetrare nel SNC attraverso meccanismi aggiuntivi. I neuroni periferici sono suscettibili all'infezione da WN (Hunsperger and Roehrig 2006), quindi un trasporto assonale retrogrado può portare il West Nile nel sistema nervoso centrale, dove può avvenire la diffusione transneurone. A differenza di altri virus per il West Nile la diffusione da un neurone ad un altro richiede il rilascio di particelle virali (Samuel, et al. 2007).

Altri possibili meccanismi di entrata del WNV nel SNC includono l'infezione o il trasporto passivo attraverso le cellule epiteliali del plesso corioideo (Kramer-Hämmerle et al. 2005); un meccanismo "cavallo di Troia" in cui il virus viene trasportato da cellule del sistema immunitario infette (per esempio neutrofili o cellule T CD4+ o CD8+) attraverso la barriera

ematoencefalica (Garcia-Tapia et al. 2006); l'infezione di neuroni dell'olfatto e diffusione nel bulbo olfattivo (Monath et al. 1983); l'infezione diretta delle cellule endoteliali del microcircolo cerebrale (Verma et al. 2009).

Il preciso meccanismo di ingresso del West Nile virus nel sistema nervoso centrale negli esseri umani richiede dunque ulteriori studi ma può dipendere sia dal percorso dell'infezione che dalla patogenicità del ceppo infettante (Beasley et al. 2002).

Risposta immunitaria

Il virus West Nile è in grado di causare patologie grazie alla sua capacità di infettare le cellule e di sfuggire al sistema immunitario. Il WNV è in grado di proliferare in diverse specie animali ed in diversi tessuti, causando infezioni che si possono presentare con un'ampia varietà di manifestazioni cliniche (Yim, Posfay-Barbe et al. 2004; Hayes et al. 2005). L'azione del virus è citolitica, l'espressione in vitro della proteina NS3 o delle proteine del capsido inducono una rapida attivazione delle caspasi che provoca apoptosi (Yang, Ramanathan et al. 2002; Ramanathan, Chambers et al. 2006).

Il West Nile virus ha sviluppato strategie per evadere o modulare la risposta immunitaria dell'ospite, risultando resistente agli effetti antivirali dell'interferone dopo i primi stadi di infezione e generando, data la bassa fedeltà di replicazione dell'RNA polimerasi, una grande variabilità antigenica che contribuisce all'evasione dal sistema immunitario umorale (Jerzak, Bernard et al. 2005).

-Risposta immunitaria innata

Gli interferoni α/β e γ agiscono come importanti fattori di controllo nel sistema immunitario innato inibendo la replicazione del West Nile virus nei primi stadi dell'infezione, mentre risultano poco efficaci negli stadi più avanzati (Platanias 2005). In particolare l'interferone γ , prodotto principalmente dalle cellule T $\gamma\delta$, CD8⁺ e Natural Killer, limita la replicazione

virale, direttamente, inducendo uno stato antivirale, o, indirettamente, incrementando l'espressione delle molecole MHC di classe I (Chesler 2002; Schroder, P. J. Hertzog et al. 2004); inoltre è stato dimostrato che in vivo è in grado di limitare la diffusione del virus al sistema nervoso.

Le cellule infettate dal West Nile rispondono all'attacco del virus attraverso dei sensori dell'acido nucleico virale: il legame dell'RNA virale a tali recettori determina l'attivazione della trascrizione dei geni per l'interferone (Barton and Medzhitov 2003; Fredericksen and Gale 2006) e di quelli che codificano per l'RNasi L, un enzima che funziona come una endoribonucleasi e agisce tagliando gli RNA sia virali che dell'ospite (Scherbik, Paranjape et al. 2006).

Il sistema del complemento gioca un ruolo importante nel contrastare l'infezione virale, come dimostrato da studi effettuati sui topi, attraverso l'opsonizzazione e la citolisi delle cellule infette e modulando la funzione delle cellule B e T (Carroll 2004).

Alcuni dati sperimentali indicano che macrofagi e cellule dendritiche possono inibire direttamente l'infezione da West Nile: i primi rimuovendo il virus dai tessuti periferici, le seconde probabilmente producendo interferone α/β in stadi precoci dell'infezione e svolgendo un ruolo di cellule presentanti l'antigene (Samuel and Diamond 2006). Le cellule $T\gamma\delta$ intervengono nella risposta immunitaria precoce limitando direttamente l'infezione da West Nile (Carding and Egan 2002). Anche le cellule Natural Killer svolgono la stessa funzione tramite il riconoscimento e l'eliminazione delle cellule infettate dal virus, tuttavia essendo la loro azione transeunte si suppone che il West Nile abbia sviluppato un modo per evadere questo tipo di risposta immunitaria (Vargin and Semenov 1986). Esperimenti in vitro dimostrano che il West Nile, come altri virus, incrementa l'espressione superficiale delle molecole MHC-I mediante l'amplificazione della processazione dell'antigene di alcune cellule per evadere la risposta immunitaria. Non è chiaro se il meccanismo venga utilizzato in vivo (Liu, King et al. 1988).

-Risposta immunitaria adattativa

L'immunità umorale è un aspetto essenziale nella protezione dal West Nile virus (Camenga, Nathanson et al. 1974). Un ruolo di primaria importanza viene svolto dalle IgM, prodotte già dopo 4 giorni dall'infezione (Diamond, Sitati et al. 2003); mentre si hanno a disposizione pochi dati riguardo le IgG che vengono prodotte quando il virus scompare dai tessuti periferici e invade il sistema nervoso centrale (Samuel and Diamond 2006).

La maggior parte degli anticorpi neutralizzanti sono diretti contro i tre domini della proteina E (anche se il più immunogeno risulta il dominio III) (Beasley and Barrett 2002), mentre una piccola parte interviene contro la proteina M (Pincus, Mason et al. 1992; Falconar 1999). Tuttavia da alcuni studi è emerso che anche anticorpi diretti contro la proteina NS1 proteggono il topo dall'infezione da West Nile: sembra che questo antigene abbia la funzione di inibire l'attivazione del complemento dopo l'inizio dell'infezione attraverso il legame con proteine regolatorie: infatti l'NS1 non viene impacchettata nel virione, ma secreta nel siero per poi associarsi alla membrana cellulare mediante un meccanismo non ancora noto (Chung, Nybakken et al. 2006).

Esperimenti su modelli animali hanno dimostrato che i linfociti T sono essenziali sia nella protezione contro il West Nile virus che per sviluppare resistenza ad una eventuale seconda infezione. In seguito all'individuazione di cellule presentanti antigeni di West Nile insieme alle molecole MHC I, i linfociti T citotossici proliferano, rilasciano citochine infiammatorie ed inducono direttamente o indirettamente la lisi cellulare (Kesson, Blanden et al. 1987; Kulkarni, Mullbacher et al. 1991).

-Risposta immunitaria nel sistema nervoso centrale

Poiché il West Nile virus diffonde nel sistema nervoso centrale a seguito di una inoculazione periferica, la risposta immunitaria deve controllare la replicazione virale in entrambi i compartimenti. Gli interferoni α/β controllano la replicazione del West Nile nei

neuroni (Samuel and Diamond 2005), l'interferone γ favorisce la scomparsa del virus senza citolisi dai neuroni infettati sia in vitro che in vivo (Shrestha, Wang et al. 2006). Le citochine CXCL10 e CCL5 reclutano attraverso i loro recettori (CXCR3 e CCR5) i linfociti T CD8⁺ e CD4⁺ ed i monociti nel sistema nervoso centrale dove provvedono all'eliminazione del virus (Ransohoff, Wei et al. 2002; Klein, Lin et al. 2005).

Patogenesi

Il periodo di incubazione del virus West Nile negli esseri umani va da 2 a 14 giorni. Circa l'80% dei pazienti infettati con il West Nile non sviluppa alcuna sintomatologia mentre il 20% di essi manifesta la "febbre da West Nile" (WNF), una condizione caratterizzata sostanzialmente da febbre e mal di testa (Gea-Banacloche et al. 2004). In aggiunta a questi gli individui infettati dal WNV possono mostrare una grande varietà di sintomi, quali ad esempio debolezza muscolare, affaticamento, nausea, vomito, problemi gastrointestinali, linfadenopatia, eruzioni cutanee (Del Giudice et al. 2005). Le manifestazioni cliniche non neurologiche del West Nile includono inoltre rabdomiolisi (Jeha et al. 2003), pancreatiti (Perelman and Stern 1974), epatiti (Sampson et al. 2000), miositi, orchiti (Smith et al. 2004), corioretiniti (Khairallah et al. 2004) ed aritmie cardiache (Hayes et al. 2005).

Meno dell'1% dei pazienti contagiati con il WNV sviluppano la "malattia da West Nile" (WND) con sintomatologia neurologica come meningite, encefalite o paralisi flaccida acuta.

La meningite si presenta nel 40% dei pazienti in cui compaiono sintomi neurologici ed e' caratterizzata da febbre, mal di testa, rigidita' nucale, fotofobia e fonofobia.

Generalmente per i pazienti che sviluppano WNF o meningite la prognosi e' favorevole.

La situazione clinica degli individui infettati dal WNV e' invece critica se sviluppano encefalite, che porta spesso al coma ed ha un elevato tasso di mortalita', specialmente nei

pazienti anziani (Sejvar et al. 2006). I principali sintomi dell'encefalite da WNV sono alterato livello di coscienza o stato confusionale e cambiamenti nella personalita' (Debiasi et al. 2006). Altri sintomi dell'encefalite sono atassia, letargia, disordini del movimento, Parkinsonismo, congiuntivite, fotofobia, difficoltà nel linguaggio, convulsioni, tremori e movimenti involontari del corpo (Kramer et al. 2007). La prognosi a lungo termine per i pazienti che sviluppano l'encefalite da WN non è buona come per quelli che sviluppano meningite: alcuni di essi infatti manifestano problemi funzionali e cognitivi (Klee et al. 2004).

È interessante notare che l'encefalite da West Nile è stata riportata negli Stati Uniti nel 1952 a New York, quando il ceppo egiziano di WNV è stato utilizzato nel trattamento di alcuni tipi di cancro: l'encefalite è stata osservata nel 9.47% (nove su 95) di questi pazienti.

La poliomielite è la terza patologia che può essere sviluppata in caso di WND e si manifesta quando il West Nile infetta i motoneuroni. Ciò comporta paralisi flaccida acuta di uno o più arti (Sejvar et al. 2005). In alcuni casi, se il diaframma ed i muscoli intercostali sono coinvolti nella paralisi causando insufficienza respiratoria, i pazienti devono essere sottoposti a ventilazione meccanica (Leis et al. 2003). Sebbene ci siano stati molti casi di pazienti che presentavano paralisi flaccida a cui era stata diagnosticata la sindrome di Guillain-Barre (GBS) o malattie simili, tutti i dati elettrofisiologici hanno poi dimostrato l'assenza di una neuropatia demielinizzante (Al-Shekhlee and Katirji 2004). In caso di paralisi flaccida acuta il recupero risulta essere variabile e, in generale, la gravità iniziale della malattia non comporta necessariamente una prognosi infausta (Cao et al. 2005).

Tra i casi umani di WND, si stima che il 55-60% dei pazienti sviluppa encefalite, che provoca un tasso di mortalità di circa il 20%. Inoltre la paralisi flaccida acuta contribuisce alla mortalità dovuta al virus West Nile tra gli esseri umani tra il 10 ed il 50%. Le vittime più comuni di WNV sono i bambini, gli anziani e le persone con un sistema immunitario

soppresso o compromesso.

Diagnosi

L'infezione da West Nile virus non è sempre semplice da diagnosticare, infatti molti flavivirus, come quelli appartenenti al complesso dell'encefalite giapponese e dell'encefalite trasmessa dalle zecche, l'encefalite di St. Louis e l'encefalite della Murray Valley, possono causare meningiti, encefaliti e paralisi flaccida in tutto simili a quelle provocate dal West Nile virus: perciò una diagnosi differenziale deve essere basata su analisi effettuate sul siero o sul fluido cerebrospinale tramite PCR o mediante analisi sierologiche specifiche (Kramer et al. 2007). Inoltre in pazienti con paralisi flaccida acuta la diagnosi differenziale può includere la sindrome di Guillain-Barre, miopatia, disordini delle giunzioni neuromuscolari ed altri disturbi neuromotori collegati a virus: si può distinguere tra queste patologie esaminando la conduzione nervosa e i disturbi sensoriali presentati dai pazienti.

Ad ogni modo la possibilità di infezione da WNV dovrebbe essere considerata ogni volta che si presentano in un paziente sintomi da meningite o encefalite virale e paralisi asimmetrica acuta senza perdita di sensibilità alle parti interessate, soprattutto durante le stagioni in cui generalmente si presentano le patologie trasmesse dalle zanzare.

-Test basati sull'analisi degli acidi nucleici

Il genoma del West Nile virus è rilevabile nel sangue e negli organi periferici degli individui per circa due settimane dall'infezione, dopo si ritrova nel fluido cerebrospinale se il virus supera la barriera ematoencefalica ed infetta il sistema nervoso centrale.

I sistemi di rilevamento dell'RNA virale mediante RT-PCR Real Time sono senza dubbio i più rapidi, sensibili e specifici per la diagnosi molecolare del WNV da campioni clinici. Sono state sviluppate diverse RT-PCR Real Time per l'identificazione simultanea di

differenti flavivirus: una di esse consente di distinguere quattro di essi (febbre gialla, encefalite giapponese, encefalite di Saint Louis e West Nile Virus) (Dyer et al. 2007). Un altro saggio di questo tipo rileva encefalite di Saint Louis, encefalite trasmessa dalle zecche, WNV e Dengue (Lanciotti and Kerst 2001). Una multiplex Real Time RT-PCR identifica e quantifica i genomi virali di West Nile, Dengue e Chikungunya virus (Naze et al. 2009).

Recentemente inoltre, è stata messa a punto una RT-PCR Real Time che amplifica un frammento posto al 5' non tradotto del genoma virale che consente di rilevare ceppi di West Nile appartenenti alle linee virali 1 e 2 e di distinguere tra questi mediante l'analisi delle curve di melting (Faggioni et al. 2014).

-Diagnosi sierologica dell'infezione da West Nile

La diagnosi definitiva per patologie neuroinvasive di solito richiede un test degli anticorpi IgM positivo del siero o del fluido cerebrospinale del paziente. Ad ogni modo bisogna essere cauti nell'interpretare i risultati dei test di laboratorio in quanto va tenuta in considerazione la possibilità della presenza di anticorpi IgM a lunga durata: le IgM possono infatti perdurare fino a sedici mesi dopo l'infezione (Southern et al. 1969).

Il test di laboratorio più efficiente ed affidabile per diagnosticare un'infezione da West Nile è l'IgM antibody-capture ELISA (MAC-ELISA) per rilevare la presenza degli anticorpi IgM nel siero (Petersen and Marfin 2002). Per effettuare questa analisi i campioni di sangue raccolti tra l'ottavo ed il ventunesimo giorno dopo la comparsa dei sintomi iniziali sono quelli che hanno dato i risultati migliori: le IgM infatti sono rilevabili in qualche paziente solo 8 giorni dopo l'inizio dell'infezione (Hayes et al. 2005), di conseguenza il test effettuato su un campione di sangue prelevato troppo precocemente potrebbe dare esito negativo; inoltre dopo il ventunesimo giorno il titolo delle IgM dovrebbe diminuire. Il protocollo diagnostico sierologico prevede che vengano effettuati due prelievi a distanza di

circa 2 settimane l'uno dall'altro: in caso di recente infezione il titolo anticorpale del secondo prelievo deve aumentare di 2/4 volte rispetto al primo.

Per quanto riguarda la diagnosi delle meningiti, delle encefaliti e delle poliomieliti causate dal West Nile virus si può anche ricorrere al test delle IgM sul liquido cerebrospinale prelevato da pazienti con sintomi attinenti. Le IgM non superano facilmente la barriera emato-encefalica, quindi la loro presenza nel liquido cerebrospinale indica un'infezione del sistema nervoso centrale (Petersen et al. 2003).

Le IgG anti West Nile compaiono in circolo circa 8 giorni dopo la comparsa dei sintomi e sono utilizzate in maniera limitata nella diagnosi iniziale delle infezioni da WNV (Tardei et al. 2000).

Nei test sierologici è difficile individuare con chiarezza l'agente infettante a causa delle cross-reazioni che si verificano tra gli anticorpi prodotti dai diversi flavivirus, dunque il test di neutralizzazione per riduzione delle placche (PRNT) resta comunque il "gold-standard" usato per la diagnosi specifica dell'infezione da West Nile. Tuttavia il PRNT è un saggio piuttosto laborioso, ha bisogno di particolari strutture di biosicurezza (BSL-3) per essere eseguito, in quanto richiede l'utilizzo del virus vivo, e per ottenere i risultati dell'analisi devono trascorrere diversi giorni (Iyer et al. 2013)

Per uno screening ad alta produttività delle possibili infezioni da West Nile, richiesto anche dal progressivo diffondersi del virus a livello mondiale, negli ultimi anni sono stati sviluppate metodiche di diagnosi basate su diversi test ELISA che possono utilizzare per rilevare la presenza di anticorpi diretti contro il WNV sia l'antigene virale totale che proteine ricombinanti, disegnate su particolari epitopi WN-specifici in modo da ridurre il rischio di cross-reazioni in caso di infezione con altri flavivirus. Questi test includono ELISA indiretti per la ricerca delle IgG nel siero, IgM antibody-capture ELISA (MAC-ELISA) (Dauphin and Zientara 2007; Alonso-Padilla et al. 2010) ed epitope-blocking ELISA (Sotelo et al. 2011).

Prospettive di vaccinazione

Da quando il virus West Nile fu isolato per la prima volta circa 80 anni fa, non ha destato preoccupazione quale agente infettivo da arginare e tenere sotto controllo finché non si è diffuso in Nord America nel 1999 provocando numerosi casi di infezione con sintomi neurologici e decessi.

Attualmente non sono disponibili in commercio vaccini contro il WNV per uso umano, ma ce ne sono diversi in corso di sperimentazione negli Stati Uniti (Beasley 2011). Le ragioni principali per cui fino ad ora non è stato sviluppato alcun vaccino per uso umano contro il West Nile sono sicuramente la sostanziale mancanza di interessi economici e l'assenza di un mercato sufficientemente ampio da giustificare gli investimenti necessari alla messa a punto, produzione e commercializzazione di tale prodotto (Monath 2001).

In contrasto con l'attuale mancanza di vaccini contro il WNV per uso umano, sono stati prodotti e testati con successo diversi vaccini per uso veterinario. Tali vaccini sono stati sviluppati seguendo diversi approcci.

Il primo approccio prevede l'inattivazione del virus vivo mediante trattamento in formalina: sono stati messi a punto in questo modo almeno 2 vaccini, rivelatisi entrambi sicuri ed efficaci nel prevenire le infezioni da West Nile nei cavalli (Ng et al. 2003) ma non altrettanto efficaci se usati sugli uccelli (Nusbaum et al. 2003).

Un altro approccio è quello dei vaccini eterologhi: è stato dimostrato negli animali che la vaccinazione contro flavivirus strettamente correlati con il West Nile (come ad esempio l'encefalite giapponese, l'encefalite di Saint Louis, la Febbre Gialla o il virus Dengue) risultano parzialmente o totalmente protetti dall'infezione del West Nile virus (Price and Thind 1971; Tesh et al. 2002). Nonostante i risultati incoraggianti ottenuti in campo veterinario, purtroppo non si è verificato altrettanto in ambito medico: individui vaccinati contro la febbre gialla o la Dengue non sono risultati protetti anche contro il West Nile (Kanasa-Thanan et al. 2002).

La somministrazione di anticorpi per prevenire l'infezione da West Nile non ha dato buoni risultati né sugli animali (Engle and Diamond 2003) né sugli esseri umani (Shimoni et al. 2001; Hamdan et al. 2002; Haley et al. 2003).

In ultimo è stato realizzato un vaccino attenuato contro il virus West Nile mediante passaggi successivi di un ceppo israeliano di WN in una linea cellulare di zanzara e selezionando un mutante (WN-25A) privo della capacità di provocare disturbi neuroinvasivi: tale ceppo attenuato è stato testato nei topi con buoni risultati (Lustig et al. 2000)

Altri vaccini attenuati sono stati sviluppando sistemi chimerici tra WNV e diversi sierotipi di virus Dengue, con buoni risultati sia nelle scimmie che nei topi (Pletnev et al. 2006; Huang et al. 2005).

Proteine codificate da schemi di lettura alternativi

Generalmente il codice di lettura dell'acido nucleico ha significato solo in un modulo di lettura, cioè codifica per una sola proteina. Tuttavia diversi organismi, ed in particolare i virus, mostrano la caratteristica di codificare più di una proteina dallo stesso segmento genomico. In altre parole presentano più moduli di lettura differenti nella stessa porzione codificante. Ciò è possibile in quanto il modulo di lettura "alternativo" non presenta codoni di stop, ovvero è "aperto" (ARF, alternative reading frame)

Questi "geni sovrapposti" sembra avessero in origine la funzione di indurre diversità genetica, stessa funzione che hanno ad esempio le mutazioni, le duplicazioni ed in generale i riarrangiamenti del DNA. Il fenomeno per cui un gene codificato da uno schema di lettura alternativo viene tradotto generando variabilità genetica fu inizialmente chiamato "overprinting" (Keese and Gibbs 1992).

La presenza di geni sovrapposti è stata individuata e descritta per la prima volta nel fago fago ϕ X174 nel cui genoma, costituito da DNA a singolo filamento, alcune parti di una

singola sequenza nucleotidica sono tradotte da differenti schemi di lettura: il DNA del batteriofago codifica per nove proteine conosciute, due delle quali sono codificate da moduli di lettura alternativi (Sanger et al. 1977).

I virus a RNA a polarità positiva come alcuni virus vegetali economicamente importanti e dei patogeni umani come retrovirus (HIV-1), HBV e coronavirus (SARS), sintetizzano proteine che fanno parte del normale corredo proteico virale utilizzando moduli di lettura spostati in posizione -1 rispetto a quelli canonici (Mouzakis et al. 2013; Brierley et al. 1992)

Nel 2001, nel genoma del virus dell'epatite C, appartenente come il West Nile alla famiglia dei Flaviviridae, è stato individuato un gene sovrapposto a quello codificante per la proteina del core. Benché la funzione della proteina tradotta da questo gene alternativo non sia ancora del tutto nota, analisi eseguite tramite western blot hanno confermato la presenza di specifici anticorpi diretti contro questo antigene nel siero di pazienti affetti da HCV (Walewski et al. 2001).

Circa 25 anni fa è stata scoperta in cellule infettate con il virus dell'encefalite giapponese la presenza di una proteina virale in più rispetto alle 10 fino ad allora conosciute (Mason 1989). Questa caratteristica si è poi rivelata comune a tutti i flavivirus appartenenti al sierogruppo dell'encefalite giapponese: questo nuovo antigene, risultato essere una variante della proteina NS1, è stato chiamato NS1'. Tuttavia il meccanismo con cui la proteina NS1' viene sintetizzata è stato scoperto solo recentemente.

La presenza di un gene sovrapposto e l'effettiva espressione della proteina NS1' è stata dimostrata anche nel virus West Nile. La proteina viene prodotta in seguito ad uno scivolamento del ribosoma in posizione -1 dovuto ad un processo di scivolamento ribosomiale programmato (Programmed Ribosomal Frameshift, PRF) (Firth and Atkins 2009). Sembra che questo nuovo antigene giochi un ruolo nella capacità del virus di infettare il sistema nervoso centrale: infatti esperimenti di mutagenesi sito-specifica hanno dimostrato che l'assenza della produzione della proteina alternativa è associata ad un

fenotipo virale attenuato (Melian et al. 2010). La produzione della proteina NS1' induce una maggiore espressione delle proteine virali strutturali: ciò sembra facilitare la replicazione virale negli uccelli e nelle zanzare, ma non in vitro. Questo potrebbe consentire una più efficiente diffusione del virus nel corpo delle zanzare dopo il pasto di sangue infetto e la conseguente maggiore concentrazione di virus nella saliva, fattore in grado di facilitarne la trasmissione (Melian et al. 2014).

L'analisi bioinformatica del genoma del WNV ha evidenziato la presenza di 6 schemi di lettura alternativi di cui uno, denominato West Nile Alternativi Reading Frame 4 (WARF4), è stato riscontrato solo nella linea virale I (Figura 5). Poiché la sequenza codificante per WARF4 è sovrapposta al gene NS4B, la nuova proteina è stata in seguito rinominata N-NS4B/WARF4. L'effettiva espressione e l'immunogenicità della proteina codificata dal gene alternativo WARF4 sono state valutate mediante test immunoenzimatici su sieri equini risultati positivi al WNV (Faggioni et al.2009) .

SCOPO DELLA TESI

Lo scopo della tesi è dimostrare la produzione della proteina N-NS4B/WARF4 in colture cellulari eucariotiche infettate con il virus West Nile. Inoltre si andrà a valutare l'immunogenicità della proteina ricercando anticorpi in sieri umani positivi ad una pregressa infezione da WNV.

MATERIALI E METODI

Produzione delle proteine ricombinanti His-WARF4 e His-NS4B COOH-terminale

L'RNA genomico è stato fornito in parte dall'istituto zooprofilattico di Teramo G. Caporali [strain Eg101, an. AF260968], ed in parte è stato ottenuto tramite l'esercitazione per la ricerca del virus West Nile organizzata dalla rete europea ENIVD [strain NY 1999, an. AF260967]. Gli acidi nucleici sono stati estratti e purificati con il kit NucleoSpin RNA Virus come da istruzioni della ditta (Macherey-Nagel, Düren, Germany).

Il frammento di RNA di 444 bps comprendente l'intera sequenza alternativa sovrapposta al gene NS4B (accession number AF260967, bps 7311-7754) ed il frammento di RNA codificante la regione COOH-terminale del gene NS4B (AF260967, bps 7276-7680) sono stati retrotrascritti ed amplificati in un singolo passaggio usando il kit Superscript III One step RT-PCR, (Invitrogen) come da istruzioni. Gli oligonucleotidi sono stati forniti dalla ditta Eurofins MWG Operon. I prodotti di PCR ottenuti sono stati digeriti con gli enzimi di restrizione BamHI ed HindIII e clonati nei vettori di espressione utilizzando l'enzima T4 ligasi (Invitrogen) (Figura 6). Sono state prodotte utilizzando la procedura sopra descritta altre 3 proteine WNV ricombinanti: il dominio III della proteina dell'envelope (Env III), un frammento della proteina preM/M ed una porzione amino-terminale della proteina NS5.

Tutti i primers usati per l'amplificazione ed i vettori utilizzati per i clonaggi sono elencati nella tabella 1.

I vettori di espressione contenenti gli inserti sono stati analizzati mediante sequenziamento automatico su CEQ 8000 come da istruzioni della ditta.

Name	Position AF260967	Primer Forward	Primer Reverse	Vector
WARF4	7310-7757	5'- <u>atggcggatccaggcaatgcgctcagcccagcg</u> -3' <i>BamHI</i>	5'- tctttgaagcttctagtgaaactctctttgtc-3' <i>HindIII</i>	pRSET B
ENV	1852-2198	5'- <u>ggaaggatccagttgaagggaacaacc</u> -3' <i>BamHI</i>	5'-ctcctgaattcgtggtgtaaaggcttgcc-3' <i>EcoRI</i>	pRSET C
preM/M	464-968	5'- <u>cagcgggatcccagttaccctctctaactcc</u> -3' <i>BamHI</i>	5'-caaggggaattcaagctgtaagctggggccacc-3' <i>EcoRI</i>	pRSET C
Partial NS5	9015-9645	5'- <u>gaggcggatccgcgggggaatgtcacac</u> -3' <i>BamHI</i>	5'-ttccgaattctcaaacagccaggtcctg-3' <i>EcoRI</i>	pRSET B
Partial NS4B	7276-7680	5'- <u>tcgatggatccgacactatgcctacatgggtcc</u> -3' <i>BamHI</i>	5'-ggatcaagctttatcttttagtcctggttttc-3' <i>HindIII</i>	pRSET C

Tabella 1. La tabella mostra la sequenze degli oligonucleotidi, le rispettive posizioni relative al numero di accesso in Gene Bank ed i vettori utilizzati per il clonaggio. I siti di restrizione sono sottolineati.

Il vettore di espressione contenente il frammento WARF4 è stato utilizzato per trasformare le cellule competenti BL21 Star (DE3) pLysS. La coltura cellulare trasformata è stata fatta crescere in terreno LB selettivo per la presenza degli antibiotici ampicillina (100 µg/ml) e cloramfenicolo (34 µg/ml) fino ad una densità ottica OD = 0.4, quindi è stata indotta l'espressione proteica con l'aggiunta di 1 mM IPTG. La figura 5 rappresenta schematicamente la procedura eseguita.

Poichè il vettore contenente il frammento codificante la porzione COOH-terminale dell'NS4B è risultato tossico nel sistema di espressione procariotico, l'espressione della proteina NS4B è stata ottenuta utilizzando il sistema in vitro Rapid Translation System 100 E.coli HY (www.5PRIME.com).

Le proteine ricombinanti WARF4, Env III, NS5 e preM/M fuse all'estremità N-terminale con una coda di istidina, sono state purificate mediante il sistema di cromatografia per affinità Ni-NTA come da istruzioni della ditta (QIAGEN, Hilden, Germany), quindi visualizzate mediante colorazione con blue di Coomassie previo corsa elettroforetica su gel di poliacrilamide (NuPAGE 4-12% Invitrogen). Le proteina sono state inoltre quantificate su Agilent 2100 BioAnalyzer utilizzando il kit Protein 80 (Agilent Technologies).

La proteina NS4B COOH-terminale, fusa anch'essa all'estremità N-terminale con una coda di istidina, è stata utilizzata così come ottenuta dalla traduzione in vitro e quantificata mediante analisi densitometrica basata sull'attività perossidasi ottenuta dal riconoscimento dell'anticorpo anti-istidina.

Tutte le proteine ricombinanti sono state visualizzate mediante western blot con l'anticorpo monoclonale anti-His (Invitrogen).

Produzione dell'anticorpo monoclonale contro la proteina WARF4

I topi BALB di 4 settimane sono stati immunizzati con due successive iniezioni intraperitoneali con 25 µg di proteina His-WARF4 purificata emulsionata con l'adiuvante RIBI (RBI Immununochemical Research). I topi sono stati successivamente sottoposti ad un richiamo tramite somministrazione intravenosa di 10 µg dell'immunogeno. Tre giorni dopo i topi sono stati sacrificati e sono stati prelevati gli splenociti. Le cellule somatiche ibride (ibridomi) sono stati preparati utilizzando cellule NS-1 di mieloma di topo come precedentemente descritto (Bei et al.1996). I surnatanti delle colture degli ibridomi ottenuti sono stati selezionati per l'immunoreattività contro His-WARF4 e proteine di controllo contenenti code di istidina mediante ELISA. Le linee cellulari degli ibridomi risultati positivi sono state clonate due volte in diluizioni limite, una linea cellulare è stata selezionata e nominata Mab 3A12.

Analisi in western blot della specificità dell'anticorpo monoclonale Mab 3A12 .

La specificità dell'anticorpo monoclonale Mab 3A12 è stata valutata analizzando in western blot le proteine ricombinanti His-WARF4 e His-NS4B COOH-terminale. Sono stati preparati 3 filtri in replicato da analizzare con l'anticorpo Mab 3A12, con l'anticorpo commerciale policlonale anti-NS4B (Abcam plc, Cambridge, UK) e con l'anticorpo monoclonale anti-His. 50 ng di proteina His-WARF4 e circa 50 ng di His-NS4B COOH-

terminale sono state separate su gel di poliacrilamide 4-12%. Una ulteriore proteina virale ricombinante (His-Env III, 50 ng) è stata utilizzata come controllo negativo. Le proteine sono state trasferite su membrane di nitrocellulosa, visualizzate mediante colorazione con Ponceau (Sigma) ed incubate in una soluzione di phosphate-buffered saline (PBS) 1X e 0.1% tween-20 contenente latte alla concentrazione del 5% (no fat dry milk, SIGMA) almeno 6 ore a 4°C. Le tre repliche sono quindi state incubate per 18 ore a 4°C con gli anticorpi Mab 3A12, anti-NS4B e anti-His rispettivamente. Le membrane sono state lavate 4 volte in PBS 1X 0,1% tween-20 e quindi incubate con l'anticorpo secondario anti-mouse IgG coniugato con l'enzima perossidasi. Dopo ulteriori lavaggi in PBS 1X, tween-20 0.1% il segnale di chemiluminescenza è stato ottenuto mediante incubazione dei filtri con il substrato Lite Ablot Plus (Euroclone) e fissato su lastra radiografica.

Individuazione della regione contenente l'epitopo riconosciuto da MAb 3A12

Sono stati progettati 4 peptidi contigui nominati SP1, SP2, SP3 e SP4 che coprono l'intera regione di WARF4 e che hanno una sequenza sovrapposta di almeno 14 aminoacidi (Figura 10). I peptidi sono stati sintetizzati dalla ditta PEPSCAN (www.pepscan.com) e le sequenze aminoacidiche scelte sono:

SP1 (H-GNALSPAADSGWNHEKRCSGWHRGHGRPRIRAHHTHHAEEESWANHA),

SP2 (H-THHAEEESWANHADLGVSSCSSSEPVCEDSARSRNSDHGSSGDTLGEW),

SP3 (H-SDHGSSGDTLGEWSKLCLECNNCHRTLPHHAWGLVVMLIHNMDTHKE)

SP4 (HVVMLIHNMDTHKEHGKTRTKKRWGKGTHLGRGLERKTQPDDKRRVH).

Sono stati preparati 2 filtri di nitrocellulosa contenete ciascuno 500 ng di Sp1, SP2, SP3 e SP4; sono stati inoltre aggiunti come controlli 50 ng di His-Warf4, 200 ng di His-NS4B COOH-terminale, 500 ng di His-Env e 500 ng di BSA. Le membrane sono state incubate per 4h in una soluzione di PBS 1X e 0.1% tween-20 contenente latte alla concentrazione del 5%. I due filtri sono stati poi incubati rispettivamente con MAb 3A12, con l'anticorpo

policonale anti-NS4B. Inoltre un terzo filtro contenente le due proteine ricombinanti His-WARF4 ed His-NS4B COOH-terminale è stato testato con l'anticorpo anti-His. Le membrane sono state lavate, incubate con l'anticorpo secondario anti-mouse e sviluppate come sopra descritto.

Colture cellulari e propagazione delle linee virali

La linea cellulare Vero E6 è stata messa in coltura in Eagle's minimal essential medium (MEM) contenente il 10% di Siero Fetale Bovino (FBS), 100 U/mL di penicillina e 200 µg/mL di streptomicina in presenza del 5% di CO₂.

Il virus WN appartenete alla linea I [strain Eg101, an. AF260968] e quello appartenente alla linea II [strain B956, an. AY532665] sono stati propagati infettando il monostrato di cellule Vero E6 in MEM contenente il 1% di FBS e titolati in accordo con la formula di Reed e Muench .

Immunofluorescenza indiretta (IFA)

La linea cellulare VERO E6 è stata fatta crescere in otto pozzetti Chamber slidesTM (Nunc, USA). Il monostrato cellulare (confluente al 40-50%) è stato infettato con 200µl di sospensione virale (10^4 TCID₅₀/ml) ed incubato un'ora a 37°C, quindi è stato aggiunto MEM contenente 1%FBS. Dopo 36 ore le cellule sono state lavate 2 volte con PBS 1X e fissate con paraformaldeide al 4% per 20 minuti a temperatura ambiente, quindi sono state trattate con glicina 0,1M per 20 minuti a 25°C e con Triton X-100 allo 0,1% per 5 minuti a 25°C per permettere la permeabilizzazione. Il monostrato cellulare è stato poi incubato con MAb 3A12 o con l'anticorpo MOPC-21 usato come controllo negativo per 30 minuti a temperatura ambiente. I nuclei sono stati colorati con Hoechst 33342 (blue).

Analisi in Western blot

Le cellule VERO sono state infettate con un MOI (molteplicità di infezione) di 0.1 da 24 a 72 ore o per 96 ore a 37°C in presenza del 5% di CO₂. Le cellule sono state quindi staccate, raccolte mediante centrifugazione a 1.500 X g a 4°C e lavate con PBS preraffreddato. I lisati cellulari sono stati preparati in Staph A buffer (10 mM sodio fosfato pH 7.4, 100 mM NaCl, 5 mM EGTA, 1% Triton, 0.1% SDS, 0.5% deoxycholate) contenente 1mM PMSF ed un inibitore delle proteasi (complete Mini EDTA-free, Roche). Le proteine provenienti da lisati di cellule VERO infettate e non (50 µg/pozzetto) o la proteina ricombinante His-WARF4 purificata (10-100ng/pozzetto) o le proteine WNV ricombinanti Env III (10-100ng/pozzetto), PreM (100ng/pozzetto), NS5 (100ng/pozzetto), NS4B COOH-terminale (10ng/pozzetto) sono state separate mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide (NuPAGE 4-12% o 12% Bis-Tris gel , Invitrogen) e trasferite su membrana di nitrocellulosa (Invitrogen). Le membrane sono state incubate in una soluzione di PBS 1X e 0.1% tween-20 contenente latte alla concentrazione del 5% per 6 ore a 4°C, quindi incubate per 18 ore a 4°C con l'anticorpo MAb 3A12, anti-NS4b antibody (Abcam plc, Cambridge, UK), anti-M (Abcam plc, Cambridge, UK), o con sieri umani (dil 1:100). In seguito le membrane sono state lavate 4 volte in PBS 1X 0,1% tween-20 e quindi incubate con l'anticorpo secondario anti-mouse IgG o anti- human IgG coniugati con l'enzima perossidasi (Sigma, MI, IT). Dopo ulteriori lavaggi in PBS 1X 0,1% tween-20 il segnale di chemiluminescenza è stato ottenuto mediante incubazione dei filtri con il substrato Lite Ablot Plus (Euroclone) e fissato su lastra radiografica.

Sieri umani

I campioni di siero umano provenienti da pazienti con disturbi neuroinvasivi dovuti all'infezione del virus West Nile, risultati positivi per la presenza di IgG anti WNV in IFA e confermati mediante test di microneutralizzazione (MNTA) e sono stati forniti dal

Policlinico Sant'Orsola-Malpighi, Università di Bologna.

I sieri umani da analizzare per la presenza di anticorpi anti WNV sono stati forniti dal Policlinico di Modena (Struttura complessa Microbiologia e Virologia).

I sieri umani provenienti da donatori sani, risultati negativi per la presenza di IgG anti West Nile, sono stati usati come controlli negativi.

Tutti i sieri umani utilizzati sono stati raccolti previo consenso informato.

Ricerca di anticorpi IgG anti N-NS4B/WARF4 su sieri umani con pregressa infezione da West Nile virus asintomatica.

Per studiare l'espressione della proteina N-NS4B/WARF4 è stata avviata, in collaborazione con il Policlinico di Modena, una raccolta di sieri umani nella provincia di Modena, in quanto il virus West Nile è considerato endemico in questa zona dal 2008. Sono stati ricercati e selezionati sieri positivi agli anticorpi IgG anti-West Nile da utilizzare per la ricerca di anticorpi specifici anti N-NS4B/WARF4.

Sono stati raccolti 3000 sieri prelevati nell'anno 2012 e creati dei "pool" contenenti ciascuno sei sieri diversi. I pool sono stati analizzati mediante test ELISA indiretto per la presenza di anticorpi anti WNV. Il test è stato prodotto "in casa" utilizzando rispettivamente 100 ng e 50 ng dell' antigene ricombinante His-Env III, comprendente il dominio III della proteina "envelope", o dell'antigene ricombinante His-WARF4. Le proteine ricombinanti sono state incubate per 18 ore alla temperatura di 4°C in un tampone carbonato-bicarbonato a pH9.6. Le piastre sono state bloccate con phosphate-buffered saline (PBS) 1X e 0.1% tween-20 contenente latte alla concentrazione del 5% (no fat dry milk, SIGMA) per almeno 6 ore a 25°C. I pool di sieri diluiti 1:100 nel tampone di blocking sono stati incubati per 18 a 4°C, lavati 4 volte in PBS 1X 0,1% tween-20 e quindi incubate per 1 ora a 25°C con l'anticorpo secondario anti-human IgG coniugato con l'enzima perossidasi (Sigma, MI, IT). Dopo ulteriori lavaggi in PBS 1X 0,1% tween-20 i campioni sono stati

incubati per 20 minuti con il substrato OPD (o-Phenylenediamine dihydrochloride, Sigma) in presenza di perossido di idrogeno e la reazione è stata bloccata con l'aggiunta di HCl 6M. La densità ottica è stata misurata alla lunghezza d'onda di 490 nm utilizzando lo spettrofotometro Victor X4 (Perkin Elmer).

Analisi bioinformatiche

384 genomi completi di WNV presenti in Gene Bank sono stati allineati con il software BioNumerics (version 6.5 Applied-Maths, Belgium). Inoltre gli stessi genomi sono stati analizzati con il software KnotInFrame (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/knotinframe/>) al fine di individuare la presenza di eventuali siti che consentano lo spostamento del ribosoma in un differente schema di lettura (ribosomal -1 frameshift).

RISULTATI

Produzione delle proteine ricombinanti His-WARF4 e His-NS4B COOH-terminale

La figura 7A mostra un gel di poliacrilamide (PAGE) 4-12% colorato con blue di Coomassie dove è stata eseguita una corsa elettroforetica dell'estratto crudo delle cellule di E. coli BL21 trasformate con il vettore vuoto pRSETB (corsie 1 e 2) e con il vettore pRSETB-WARF4 (corsie 3 e 4) prima e dopo induzione con IPTG. Nella corsia 4 è visibile la proteina WARF4 prodotta dopo induzione. La figura 7B mostra la medesima preparazione purificata su resina e corsa su gel 12% per poter meglio valutare la dimensione della proteina ricombinante stimata di circa 21 kDa .

La figura 8A mostra un PAGE della reazione di traduzione in vitro ottenuta con il vettore pRSETC- NS4B COOH-terminale: nelle corsie 1, 2 e 3 sono state caricate rispettivamente la mix di reazione senza vettore (controllo negativo), un plasmide codificante una proteina fluorescente fornita dalla ditta (controllo positivo), il vettore contenente l'inserto NS4B-COOH terminale. La proteina ricombinante non è visibile alla colorazione con blue di Coomassie mentre viene individuata nel medesimo gel trasferito su filtro di nitrocellulosa e testato con l'anticorpo anti-His (figura 8B, corsia 3).

Produzione dell'anticorpo monoclonale anti-WARF4 Mab 3A12

La proteina ricombinante His-WARF4 è stata utilizzata per la produzione di un anticorpo monoclonale denominato Mab 3A12. Tale anticorpo è stato testato in western blot contro la proteina WARF4 purificata e contro un lisato crudo di E.coli trasformato con il medesimo vettore di espressione privo dell'inserto: come mostrato in figura 9 l'anticorpo individua correttamente la proteina ricombinante His-WARF4 (10 ng) mentre non produce reazioni aspecifiche con il lisato grezzo.

Analisi dell' allineamento aminoacidico delle proteine WARF4 e NS4B COOH-terminale ed analisi in western blot

WARF4 è un gene derivante da una lettura fuori frame (-1) della porzione 3' del gene NS4B e di una piccola porzione della regione 5' del gene NS5. La traduzione nello schema di lettura -1 determina la produzione di una proteina completamente differente dalla porzione NS4B COOH-terminale: la differenza nella sequenza aminoacidica di queste due proteine è mostrata nella figura 10A. Per validare le evidenze emerse dall'analisi bioinformatica, è stata eseguita un'analisi in western blot delle proteine ricombinanti His-WARF4 ed His-NS4B COOH-terminale utilizzando l'anticorpo policlonale anti-NS4B e l'anticorpo monoclonale MAb 3A12. L'anticorpo commerciale anti-NS4B riconosce un epitopo comprendente la regione tra gli aminoacidi 126-145 dell'NS4B, che si sovrappone ai primi 14 aminoacidi del frame alternativo; la proteina ricombinante His-NS4B comprende la porzione COOH terminale della proteina virale a partire dall'aminoacido 120, includendo dunque l'intera sequenza codificante dello schema di lettura alternativo. La figura 10B mostra i risultati ottenuti analizzando in western blot tre repliche di uno stesso filtro contenente le proteine ricombinanti His-WARF4, His-NS4B COOH-term ed una terza proteina usata come controllo negativo (His-Env III). Come mostrato in figura 5B, l'anticorpo anti-NS4B non riconosce la proteina ricombinante His-WARF4 (corsia 4) ma individua correttamente il controllo positivo (corsia 6) mentre l'anticorpo monoclonale MAb 3A12 riconosce la proteina His-WARF4 (corsia 7), ma non individua il frammento NS4B COOH-terminale (corsia 9).

Identificazione della regione proteica riconosciuta da MAb3A12

Al fine di provare con assoluta certezza la reattività di MAb3 A12 contro la proteina alternativa WARF4, è stata effettuata una mappatura del peptide contenente l'epitopo individuato dall'anticorpo monoclonale. Sono stati pertanto analizzati quattro peptidi

sintetici parzialmente sovrapposti progettati in modo da coprire l'intera sequenza alternativa di WARF4 (figura 11, riquadro superiore). La figura 11 (riquadro inferiore) mostra i risultati ottenuti analizzando in dot blot due repliche del medesimo filtro con rispettivamente gli anticorpi MAb 3A12 (panello A) ed anti-NS4B (panello B). L'anticorpo MAb 3A12 riconosce solamente il controllo positivo His-WARF4 ed il frammento sintetico SP2, mentre non reagisce con gli altri peptidi sintetici e gli antigeni His-Env, His-NS4B COOH-terminale e BSA. Inoltre l' anticorpo anti-NS4B riconosce solamente la proteina ricombinante His-NS4B COOH-terminale mentre non riconosce nessuno dei peptidi sintetici né l'antigene ricombinante His-WARF4. L'anticorpo anti-His è stato utilizzato come controllo positivo contro le due proteine ricombinanti His-WARF4 e His-NS4B COOH term (panello C). Questi risultati confermano in modo inequivocabile la specificità dell'anticorpo monoclonale MAb 3A12 verso WARF4 e permettono di localizzare l'epitopo riconosciuto da MAb 3A12 tra gli aminoacidi 35-80 della sequenza di WARF4.

Espressione della proteina N-NS4B/WARF4 in cellule infettate con il WNV linea I

L'espressione della proteina N-NS4B/WARF4 in colture cellulari di cellule VERO infettate con la linea I del West Nile virus è stata dimostrata tramite analisi in immunofluorescenza e western blot utilizzando l'anticorpo MAb 3A12.

La figura 12 mostra l'analisi in IFA con cui è stata testata la reattività di MAb 3A12 con cellule VERO infettate e non infettate con il WNV: l'anticorpo ha una forte immunoreattività citoplasmatica con le cellule infettate (panello b), mentre non reagisce con le cellule non infettate (panello a). L'anticorpo MOPC-21 è stato usato come controllo negativo (pannelli c e d).

Al fine di determinare l'apparente peso molecolare della proteina N-NS4B/WARF4 prodotta *in vitro* è stata eseguita un'analisi in western blot: come mostra la figura 13, MAb 3A12 riconosce nel lisato cellulare di cellule VERO infettate una proteina di peso

molecolare di circa 30kDa (corsia 3). L'anticorpo inoltre non mostra reattività con le cellule VERO non infettate (corsia 2). L'anticorpo commerciale anti-NS4B è stato usato come controllo positivo per monitorare l'infezione delle cellule VERO con il WNV (corsia 4) e per comparare l'apparente peso molecolare della proteina virale NS4B con quello di N-NS4B/WARF4. I risultati mostrano che la mobilità elettroforetica di N-NS4B/WARF4 è leggermente inferiore rispetto a quella dell'NS4B. Le proteine ricombinanti His-WARF4 (corsia 1) e His-NS4B COOH-terminale (corsia 6) sono state usate come controlli positivi.

Studio della cinetica di espressione di N-NS4B/WARF4 nel corso dell'infezione virale

L' espressione della proteina N-NS4B/WARF4 è stata valutata e comparata con quella della proteina NS4B mediante una "time-course infection" (24-72 ore). La figura 14 mostra i risultati del western blot eseguito utilizzando l'anticorpo monoclonale MAb 3A12 e l'anticorpo policlonale commerciale anti-NS4B: le due proteine presentano una cinetica di espressione simile nel corso dell'infezione del WNV appartenente alla linea virale I, mostrando entrambe il massimo livello di espressione durante la fase di infezione più avanzata.

L' espressione della proteina N-NS4B/WARF4 è limitata alla linea virale I del WNV

Per confermare le analisi bioinformatiche che indicano che N-NS4B/WARF4 è presente solo nei genomi di WNV appartenenti alla linea virale I, l'anticorpo MAb 3A12 è stato testato su lisato di cellule VERO infettate con il virus West Nile appartenente alla linea II (figura 15). Le cellule VERO sono state infettate per 72 ore con due diversi ceppi di WNV appartenenti alle linee virali I e II. L'analisi in western blot mostra che MAb 3A12 riconosce la proteina N-NS4B/WARF4 sul lisato cellulare proveniente dalle cellule infettate con la linea virale I (pannello A, corsia 3), mentre non reagisce con le cellule infettate con la linea II (pannello A, corsia 4). Per monitorare l'infezione delle cellule VERO con le linee virali I e

Il del WNV, i lisati cellulari sono stati anche testati con un anticorpo anti-M per verificare l'espressione della proteina di matrice (M) (pannello B): l'anticorpo riconosce la forma matura della proteina M, che mostra un peso molecolare di circa 8 kD, su entrambi i lisati infettati con le differenti linee virali (corsie 3 e 4). L'anticorpo riconosce inoltre la forma immatura della proteina M (preM/M). Le proteine His- WARF4 ed His-PreM/M sono state usate come controlli positivi.

Presenza di anticorpi anti-N-NS4B/WARF4 nel siero di individui infettati dal WNV con sviluppo di sintomatologia neurologica

La capacità della proteina N-NS4B/WARF4 di indurre una risposta anticorpale in individui infettati dal WNV è stata valutata mediante analisi in western blot. La reattività dei sieri umani con His-WARF4 è stata comparata con quella di altre 3 proteine ricombinanti di West Nile: Env III, un frammento di preM/M e una porzione dell'NS5 (figura 16A).

Sono stati testati 8 sieri umani (figura 16B), precedentemente analizzati in IFA e sieroneutralizzazione per la presenza di anticorpi anti-WNV, 4 dei quali sono risultati positivi per la presenza di IgG anti-WNV. I sieri già testati negativi al West Nile virus non hanno mostrato reattività con le proteine WNV ricombinanti. Al contrario, i sieri risultati positivi al WNV in IFA e sieroneutralizzazione hanno mostrato differenti reattività con le proteine ricombinanti utilizzate per l'analisi. Tra questi, due sieri sono risultati positivi per la presenza di anticorpi anti-N-NS4B/WARF4; uno dei due ha reagito anche con le proteine preM/M, NS5 ed EnvIII, mentre l'altro ha riconosciuto solo la proteina preM/M.

Studio della presenza di anticorpi anti-N-NS4B/WARF4 nel siero di individui asintomatici con pregressa infezione da West Nile virus

I sieri incorporati nei campioni "pool" risultati positivi al test ELISA indiretto eseguito con la proteina ricombinante His-EnvIII sono stati analizzati singolarmente permettendo

l'individuazione di 144 sieri positivi. Di questi 31 sieri sono stati confermati positivi mediante test di sieroneutralizzazione su piastra. I campioni positivi sono stati analizzati per la presenza di anticorpi anti His-WARF4 mediante ELISA indiretto. 4 campioni sono risultati positivi per la presenza di IgG anti His-WARF4 (Tabella 2)

Campioni analizzati	Campioni positivi ELISA His-Env III	Campioni confermati sieroneutralizzazione	Campioni positivi ELISA His-WARF4
3000	144	31	4

Tabella 2. La tabella mostra il numero di sieri umani analizzati ed i risultati ottenuti in sieroneutralizzazione e nei 2 diversi test ELISA indiretto eseguiti.

Risultati delle analisi bioinformatiche

L'analisi bioinformatica eseguita analizzando 384 genomi di West Nile virus ha identificato 368 genomi appartenenti linea virale I (figura 17). La sequenza nucleotidica di WARF4 è stata trovata in 361 di questi 368 genomi. Nel gruppo di genomi in cui è presente la sequenza di WARF4 è stata ricercata la presenza di siti di "scivolamento programmato del ribosoma" (PRF), ovvero di slippery sequences che consentono lo spostamento del ribosoma in un differente schema di lettura (ribosomal -1 frameshift) coadiuvati da strutture secondarie note come pseudoknot. Sono state trovate in modo mutualmente esclusivo 2 diversi siti PRF. Il primo, costituito da una slippery sequence (UUUUUUG) associata con una struttura pseudoknot di 80 nucleotidi (ΔG -27.8 kcal/mol) [bps 7268, an. AF260967] situata 6 nucleotidi a valle, è comune al 91% dei 368 questi genomi. Il secondo è costituito da una slippery sequence differente (CCCUUUG/T) associata ad una struttura pseudoknot di 40 nucleotidi (ΔG -14.5 kcal/mol) [bps 7174, an. AF260968] situata 8 nucleotidi a valle, è condiviso dal 5% di questi genomi. Nel 4% dei casi il sottogruppo di genomi di WNV in cui è contenuta la sequenza di WARF4 non presenta alcuna slippery

sequence.

Da notare che il primo sito PRF è stato ritrovato solo nei ceppi virali circolanti in America, mentre il secondo è stato rinvenuto solo in ceppi circolanti nel bacino del Mediterraneo.

DISCUSSIONE

La presenza di proteine codificate da schemi di lettura alternativi è documentata in alcuni virus (Mouzakis et al. 2013; Brierley et al. 1992), mentre nell'ambito della famiglia Flaviviridae sono descritte sia nel virus HCV (Walewski et al. 2001) sia nel gruppo sierologico delle encefaliti giapponesi (Mason 1989).

Recentemente è stata studiata nel West Nile virus la proteina NS1', variante proteica dell'NS1 codificata da un gene sovrapposto la cui espressione sembra avere un ruolo nella capacità neuroinvasiva del virus (Melian et al. 2010).

Analisi *in silico* condotte sul genoma del virus West Nile hanno rivelato la presenza di 6 differenti schemi di lettura alternativi. L'attenzione si è incentrata sul modulo di lettura aperto più lungo (444 paia di basi) e più conservato negli isolati virali (Figura 5). Questo gene sovrapposto è presente solo nei ceppi di WN appartenenti alla linea virale I e la proteina da esso codificata si è rivelata in grado di indurre una risposta anticorpale specifica nei cavalli infettati dal virus West Nile (Faggioni et al. 2009).

Tuttavia mancava una prova diretta dell'espressione di questo antigene nelle cellule infettate dal West Nile. Al fine di dimostrare la produzione di N-NS4B/WARF4 *in vitro* in seguito ad infezione di colture cellulari, è stato prodotto un anticorpo monoclonale diretto contro la sequenza aminoacidica codificata da WARF4, denominato MAb 3A12. L'effettiva espressione di N-NS4B/WARF4 nel corso dell'infezione del virus West Nile è stata dimostrata con due diverse metodiche. L'anticorpo MAb 3A12 reagisce in immunofluorescenza con cellule VERO infettate (Figura 12) e riconosce in western blot, eseguito sul lisato cellulare di cellule VERO infettate, una proteina di peso molecolare di circa 30kDa (Figura 13).

Dalla comparazione della sequenza aminoacidica le porzioni carbossi-terminali delle proteine virali NS4B e N-NS4B/WARF4 risultano completamente differenti (Figura 10A),

precludendo la possibilità che Mab 3A12 possa reagire aspecificamente con la porzione COOH-terminale dell'NS4B. Per confermare la specificità di Mab 3A12 è stato eseguito un western blot sugli antigeni ricombinanti prodotti. L'anticorpo MAb 3A12 non riconosce la proteina His-NS4B COOH-terminale e al contrario un anticorpo commerciale anti NS4B non reagisce con His-WARF4 (Figura 10B). Per supportare in modo incontrovertibile la specificità di Mab 3A12 e per identificare con precisione la regione di N-NS4B/WARF4 riconosciuta dall'anticorpo MAb 3A12 sono stati prodotti 4 peptidi sintetici, parzialmente sovrapposti, disegnati sulla sequenza aminoacidica completa di WARF4 e sono stati analizzati in dot blot con l'anticorpo monoclonale (Figura 11). MAb 3A12 reagisce con il secondo peptide, confermando la sua specificità e consentendo inoltre di individuare la regione riconosciuta tra gli aminoacidi 165 e 212 della sequenza di N-NS4B/WARF4. Ulteriori esperimenti sono stati eseguiti per ottenere informazioni circa la cinetica di espressione della nuova proteina. Come mostrato in figura 14, dall'analisi in western blot del lisato di cellule VERO infettate a tempi diversi si evince che N-NS4B/WARF4 viene espressa in quantità maggiore nella tarda fase dell'infezione. Inoltre, come ipotizzato in seguito all'analisi bioinformatica, l'espressione di N-NS4B/WARF4 è limitata alla sola linea virale I (Figura 15). In definitiva, i risultati dimostrano che N-NS4B/WARF4 è una nuova proteina differente dall'NS4B ed è espressa in cellule infettate con il virus West Nile linea I. L'espressione *"in vivo"* della proteina N-NS4B/WARF4 è stata dimostrata indirettamente valutando la sua immunogenicità in individui infettati con il WNV che presentavano sintomatologia neurologica: due di questi sieri reagiscono specificamente con l'antigene ricombinante His-WARF4. La diversa reattività mostrata da questi sieri verso His-WARF4 e altre 3 proteine WNV ricombinanti (Figura 16) riflette la complessa risposta immunitaria umorale indotta dal virus (Diamond et al. 2008; Nelson et al. 2008). Inoltre, è noto che le proteine tradotte da schemi di lettura alternativi sono espresse con efficienza variabile rispetto alle proteine virali canoniche (Barile et al. 2003).

Al momento non ci sono informazioni sperimentali circa il meccanismo di traduzione della proteina N-NS4B/WARF4, tuttavia l'analisi bioinformatica lascia ragionevolmente supporre che la proteina venga prodotta in seguito ad uno scivolamento del ribosoma in posizione -1 durante la traduzione della poliproteina virale. Diversi elementi oggettivi supportano tale ipotesi. Nei virus appartenenti alla famiglia Flaviviridae la traduzione avviene mediante un processo CAP-dipendente, che determina il legame dei ribosomi solo in posizione 5' promuovendo la sintesi di una singola poliproteina successivamente processata per ottenere le singole proteine strutturali e non strutturali. La sequenza di N-NS4B/WARF4 è lontano dall'estremità 5', è codificata da un modulo di lettura -1 rispetto al canonico modulo di lettura, non presenta un codone di inizio AUG e nessun sito interno di entrata del ribosoma (IRES) è stato descritto per il WNV. La sintesi di N-NS4B/WARF4 mediante uno scivolamento ribosomiale in posizione -1 appare quindi la sola spiegazione per il meccanismo di sintesi della proteina.

Poiché tale meccanismo, già descritto nel West Nile virus per la sintesi di NS1' (Melian et al. 2010), richiede la presenza di specifiche sequenze e strutture dell'RNA come "slippery sequences" associate con "pseudoknot", sono state eseguite analisi bioinformatiche per rivelare la presenza di tali sequenze nel genoma virale (Giedroc et al. 2000; Firth and Atkins 2009). Tutti i genomi completi di West Nile virus disponibili in Gene Bank sono stati allineati e classificati nelle due linee virali principali.

Il gene alternativo WARF4 non è stato riscontrato in nessuno dei genomi appartenenti alla linea virale II, inoltre 7 dei 368 genomi appartenenti alla linea virale I sono risultati privi della sequenza WARF4 a causa di una singola sostituzione nucleotidica che interrompe lo schema di lettura alternativo.

Nel gruppo di genomi appartenenti alla linea I che presentano la sequenza WARF4 sono stati trovati 2 siti di PRF diversi e mutualmente esclusivi (Figura 17). Il primo sito di PRF è il più rappresentato (91%), il più stabile (ΔG -27.8 kcal/mol) ed è associato con i ceppi

virali di WNV circolanti in America.

Il secondo sito di PRF è stato ritrovato nel 5% dei genomi analizzati, è meno stabile del primo (ΔG -14.5 kcal/mol) ed è associato ai ceppi circolanti nel bacino del Mediterraneo ed in Europa dell'Est.

Va sottolineato che entrambi i siti di PRF individuati devono essere in grado di promuovere la soppressione del codone di stop UGA posizionato subito a monte della sequenza codificante per lo schema di lettura alternativo, un processo denominato "readthrough" ed associato alla presenza di pseudoknot (Howard et al. 2005).

Il modello proposto per la traduzione della proteina N-NS4B/WARF4 spiega anche la discrepanza tra il peso molecolare di N-NS4B/WARF4 osservato (circa 30 kDa) e quello atteso (circa 20 kDa), calcolato sui 148 aminoacidi tradotti nel differente schema di lettura.

Benché questa differenza potrebbe essere determinata da modificazioni post-traduzionali subite dalla proteina il nostro modello prevede che, nel corso della traduzione del genoma virale, lo scivolamento del ribosoma in posizione -1 determini la sostituzione degli ultimi 123 aminoacidi carbossi-terminali della proteina NS4B con i 148 aminoacidi codificati dallo schema di lettura alternativo WARF4. In questo modo N-NS4B/WARF4 rappresenterebbe una variante COOH-terminale della proteina virale NS4B, spiegando anche il peso molecolare della proteina riconosciuta dall'anticorpo monoclonale MAb 3A12 in western blot sulle cellule infettate con il WNV (circa 30 kD), che risulta leggermente maggiore rispetto a quello della proteina non strutturale NS4B (circa 28 kD) (Figura 13). In ultimo, il modello proposto implica che la cinetica di espressione della proteina NS4B sia simile alla cinetica di espressione della variante N-NS4B/WARF4. I risultati ottenuti con l'analisi in western blot della "time course infection" mostra che la cinetica di espressione delle due proteine NS4B e N-NS4B/WARF4 è simile: infatti, entrambe mostrano avere il massimo livello di espressione nella fase tardiva dell'infezione (72h) (Figura 14). La misura del livello di espressione delle proteine NS4B e N-NS4B/WARF4, basata sull'analisi

densitometrica delle radiografie dell'esperimento "time-course infection", indica un rapporto quantitativo di circa 25:1. Tale rapporto è in accordo con i dati presenti in letteratura che descrivono una minor efficienza nella traduzione delle proteine codificate da schemi di lettura alternativi rispetto alle proteine canoniche. Va tuttavia sottolineato che questo rapporto è stato stimato utilizzando il ceppo virale WNV Eg101 (an.AF260968). Tale ceppo presenta una struttura di PRF meno stabile dal punto di vista termodinamico rispetto a quella riscontrata nei ceppi americani.

L'ultimo obiettivo di questo lavoro è stato quello di verificare se l'espressione di N-NS4B/WARF4 fosse associata alle forme patogenetiche più gravi di infezione o se l'espressione della proteina fosse costitutiva anche in soggetti con infezione asintomatica. Inoltre attualmente è possibile discriminare tra le due linee virali con metodi biomolecolari (Faggioni et al. 2014) ma nessuna metodica sierologica permette tale differenziazione.

Per valutare l'immunogenicità della proteina N-NS4B/WARF4 sono stati raccolti 3000 sieri nella provincia di Modena, una zona endemica per la presenza del WNV, in collaborazione con il Policlinico di Modena. Lo screening iniziale, effettuato mediante test ELISA e confermato con test di sieroneutralizzazione, ha individuato 31 campioni con pregressa infezione da WNV. Questi campioni sono stati analizzati mediante ELISA indiretto utilizzando l'antigene ricombinante His-WARF4. All'analisi, 4 campioni sono risultati positivi per le IgG anti His-WARF4. La frequenza osservata non sembrerebbe consentire l'utilizzo di questa proteina in una metodica sierologica discriminativa per le due linee virali, mentre lascia aperta una prospettiva di indagine su His-WARF4 come marcatore prognostico.

L'analisi in western blot eseguita sul siero di 4 pazienti WNV positivi che presentavano disturbi neurologici ha mostrato la presenza di anticorpi diretti contro la proteina alternativa in due di questi (Figura 16). L'esiguo numero di campioni tuttavia non permettere di avere un dato obiettivo, pertanto dovrà essere raccolto un maggior numero di sieri da individui

affetti da malattia da West Nile (WNV) per ottenere risultati statisticamente significativi.

Va infine osservato che i dati delle positività agli anticorpi anti His-WARF4 individuate nei sieri degli individui asintomatici potrebbero avere un “bias” dovuto alla contemporanea circolazione delle due linee virali. E' stata infatti documentata la presenza della linea virale II in diverse zone di Italia (Barzon, Pacenti, Franchin, Squarzon et al. 2013). Questo “bias” potrebbe essere superato analizzando campioni provenienti da zone ad esclusiva circolazione della linea virale I, come ad esempio il continente americano.

Al momento non ci sono dati circa la funzione biologica di N-NS4B/WARF4, la sequenza aminoacidica di WARF4 non presenta omologie con altre proteine conosciute. E' interessante notare che i primi 10 aminoacidi codificati nello schema di lettura alternativo costituiscono una sequenza segnale per una modifica post-traduzionale, ovvero un sito di miristilazione. Tale modifica è presente nelle protein-chinasi associate a recettori di membrana e conferirebbe una idrofobicità aggiuntiva (già in essere nell'NS4B) alla proteina N-NS4B/WARF4. La possibile vicinanza di N-NS4B/WARF4 a recettori di membrana permetterebbe ulteriori speculazioni sulla funzione biologica della nuova proteina. E' tuttavia importante sottolineare che qualsiasi eventuale funzione biologica di N-NS4B/WARF4 nella patogenesi umana non è dovuta ad un meccanismo di selezione diretto. La sequenza WARF4, presente in quasi tutti i ceppi appartenenti alla linea virale I, blocca di fatto la variabilità nucleotidica all'estremità 3' del gene NS4B. Un blocco totale della variabilità in un virus ad RNA ha senso solo se trova un vantaggio evolutivo, vantaggio che deriva da una selezione positiva. Questa selezione non può essere avvenuta in un “ospite terminale” come l'uomo, dove non si ha fitness. E' logico quindi assumere che tale selezione sia avvenuta nel vettore o nel “reservoir”. Il ruolo biologico della proteina N-NS4B/WARF4 andrebbe pertanto ricercato in questi due tipi di organismi. Un supporto a tale ipotesi viene da un lavoro scientifico (Melian et al. 2014) nel quale viene studiato il ruolo di NS1' nell'infezione da WNV e si dimostra che la produzione della

proteina alternativa determina un vantaggio nella replicazione virale. Tale vantaggio, dimostrato in vivo e non osservabile in vitro, si ha nei mammiferi, negli uccelli e in particolare nelle zanzare, dove l' aumentata progenie virale facilita la trasmissione dell'infezione. L'incremento di produzione delle particelle virali si ottiene tramite una regolazione traduzionale indotta dalla sintesi di NS1'. La traduzione nello schema di lettura alternativo di fatto blocca la sintesi delle proteine non strutturali codificate dai geni situati a valle di questo. Ciò comporta una iperproduzione di proteine strutturali che sono coinvolte nell'assemblaggio delle particelle virali. Alla luce di questi dati si può pensare ad un ruolo analogo per N-NS4B/WARF4. La traduzione fuori frame di WARF4 impedirebbe la sintesi della proteina NS5, determinando la produzione di un maggior numero di proteine non strutturali (Figura 18).

CONCLUSIONI

La proteina N-NS4B/WARF4, codificata da uno schema di lettura alternativo, viene espressa nella tarda fase dell'infezione del virus West Nile ed è in grado di indurre una risposta immunitaria in individui infettati dal WNV.

Il ceppo Eg101 (an.AF260968), analizzato in questo studio, è inserito tra quelli circolanti nel bacino del Mediterraneo. Il sito di PRF rilevato in questi ceppi virali risulta termodinamicamente meno stabile rispetto a quello ritrovato nei ceppi circolanti in America. Sarebbe quindi interessante studiare l'efficienza di espressione di N-NS4B/WARF4 e valutare la risposta anticorpale indotta da questa proteina in individui infettati da ceppi virali americani.

Benchè non ci siano prove sperimentali sul meccanismo di sintesi di N-NS4B/WARF4, né informazioni riguardo la sua funzione biologica, recenti dati di letteratura sembrerebbero suggerire un ruolo nella regolazione della traduzione del genoma virale.

FIGURE

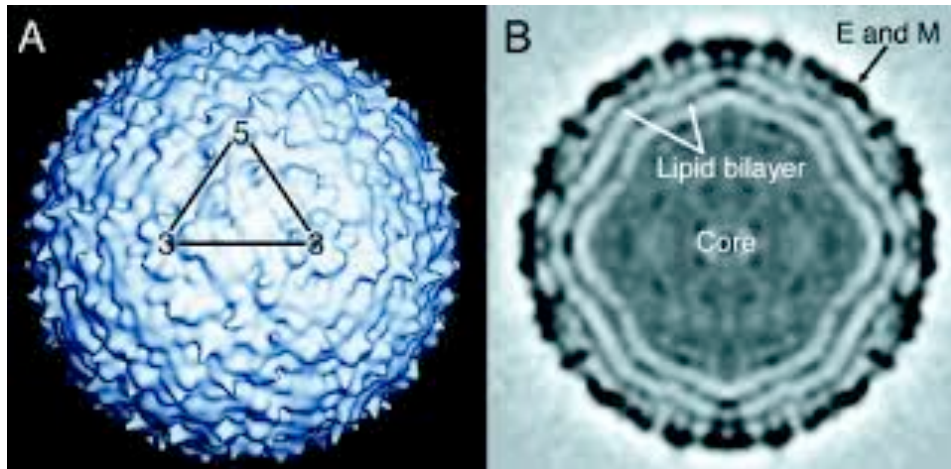


Figura 1. Particella virale del West Nile al microscopio elettronico. Sulla destra è mostrata la ricostruzione della sezione centrale con foglietti concentrici a diversa densità di massa.

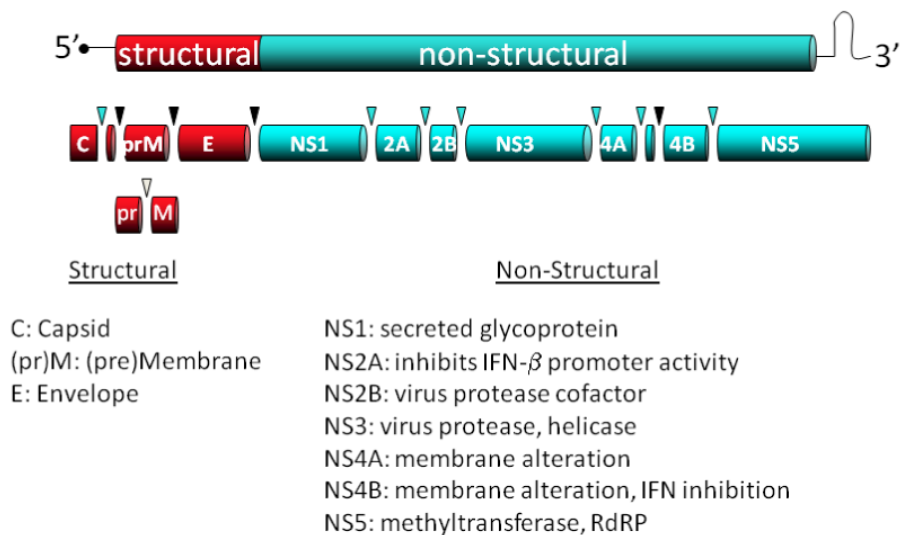


Figura 2. Organizzazione genomica del virus West Nile.

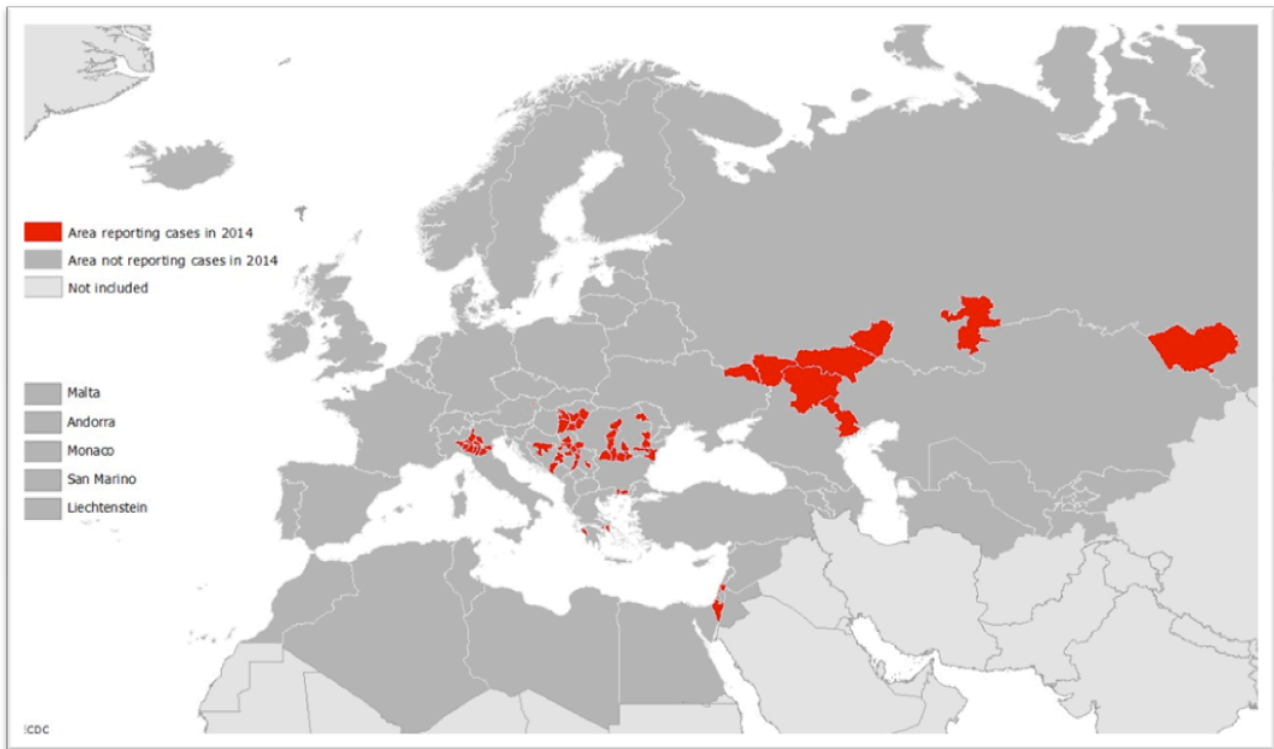


Figura 3. Distribuzione dei casi di febbre da West Nile in Europa e nel bacino del Mediterraneo nel 2014.

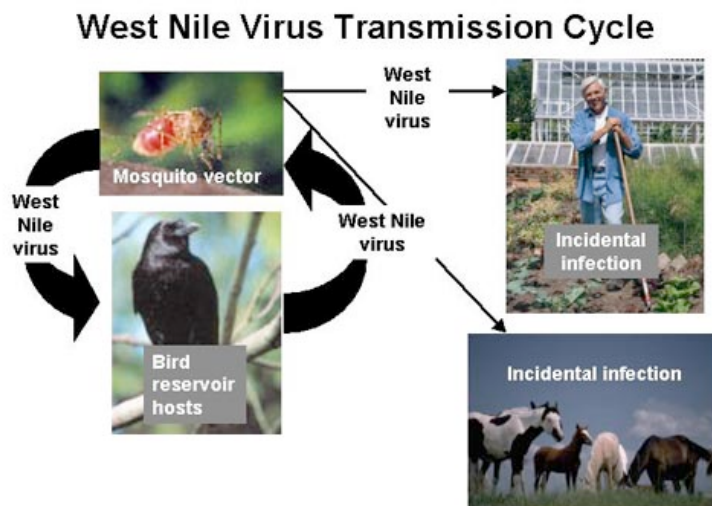


Figura 4. Rappresentazione schematica del ciclo enzootico del virus West Nile.

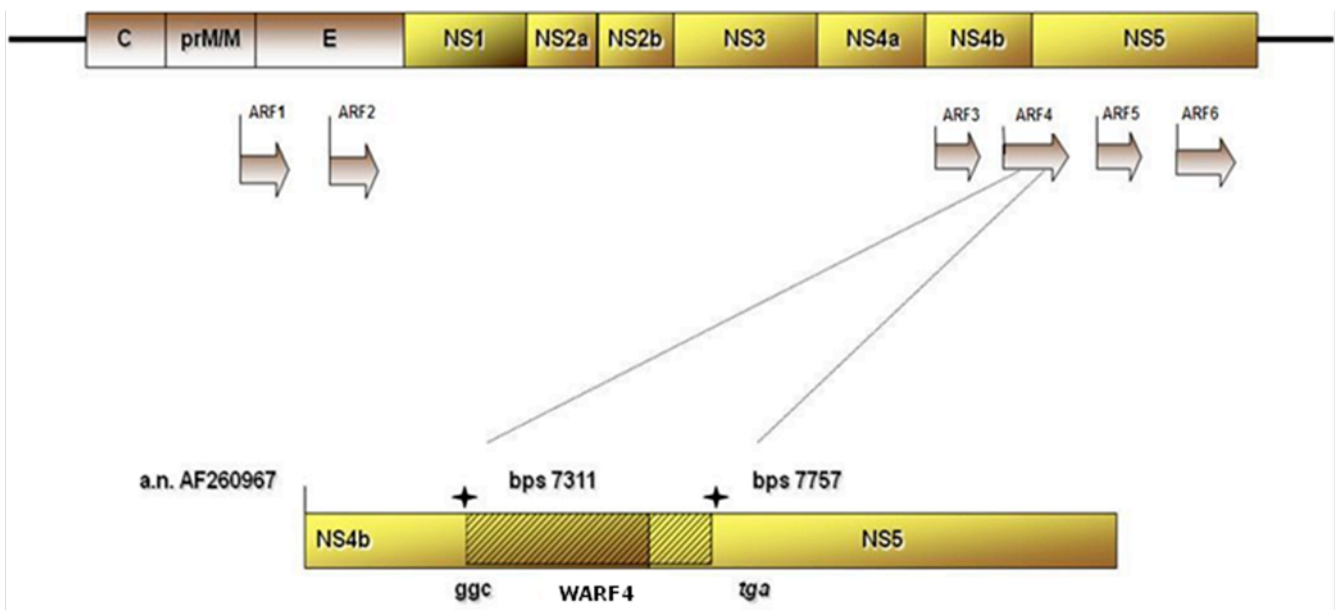


Figura 5: Schemi di lettura alternativi individuati nel genoma del West Nile virus. Le frecce indicano la posizione relativa degli schemi di lettura alternativi. In dettaglio è mostrata la sequenza WARF4.

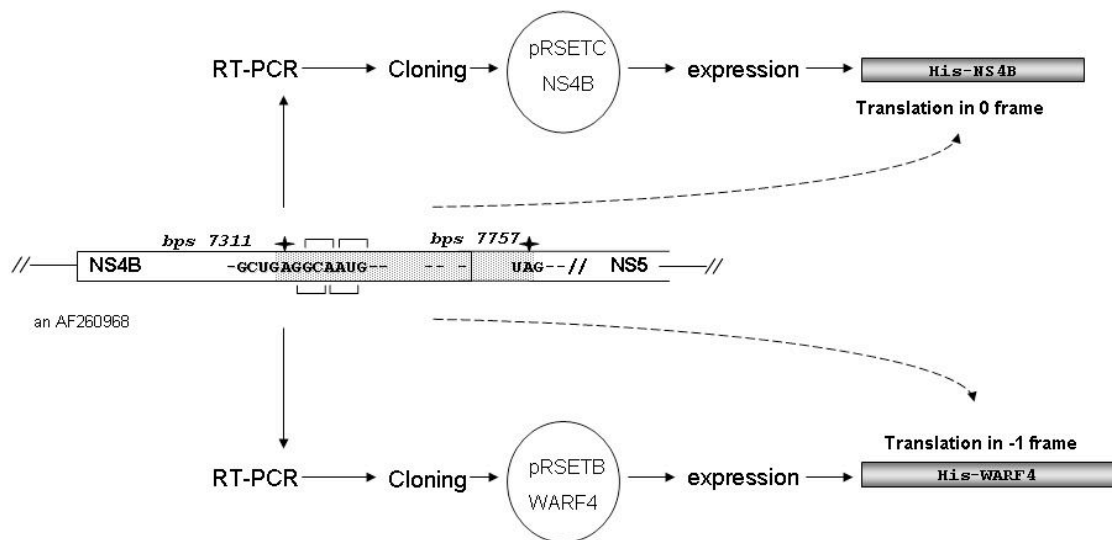


Figura 6. Rappresentazione schematica della procedura di clonaggio.

Al centro è schematizzato il gene NS4B ed una parte del gene NS5. L'ombreggiatura evidenzia lo schema di lettura alternativo codificante per la proteina WARF4 (bps 7311-7757, an. AF260968). Il frammento clonato per la produzione della porzione COOH-terminale della proteina NS4B si estende ulteriormente nell'estremità 5' del gene (7276-7680, an AF260968). I due frammenti ottenuti sono stati clonati nei rispettivi vettori di espressione in modo da avere una traduzione nello schema di lettura -1 (His-WARF4) e nello schema di lettura canonico (His-NS4B COOH-terminale).

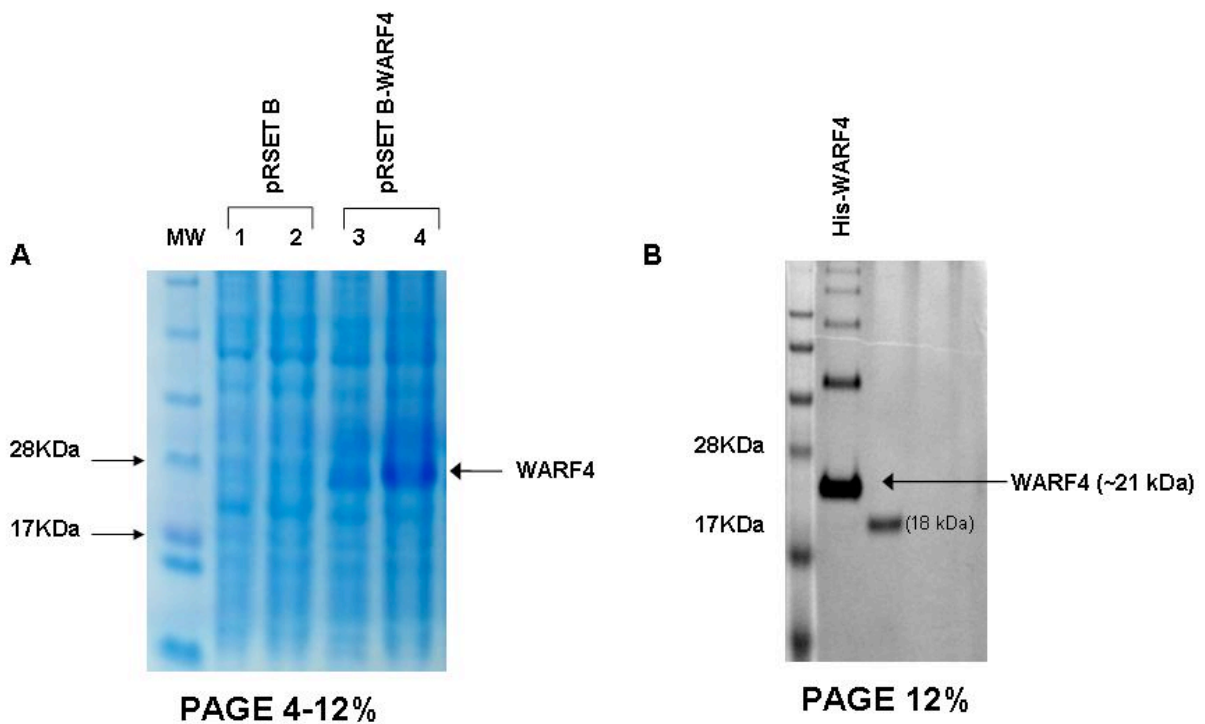


Figura 7. Espressione della proteina ricombinante His-WARF4.

Il pannello A mostra una corsa elettroforetica su gel di poliacrilamide a gradiente 4-12%. Sulle prime due corsie è stato caricato l'estratto crudo di E.coli trasformato con il vettore di clonaggio privo dell'inserto rispettivamente prima e dopo induzione con IPTG. Sulle corsie 3 e 4 è stato caricato l'estratto crudo di E.coli trasformato con lo stesso vettore contenete l'inserto codificante per WARF4 rispettivamente prima e dopo induzione con IPTG.

Il pannello B mostra un PAGE eseguito su gel di poliacrilamide al 12% su cui è stata caricata la proteina ricombinante His-WARF4 dopo purificazione ed una proteina di controllo da 18kDa.

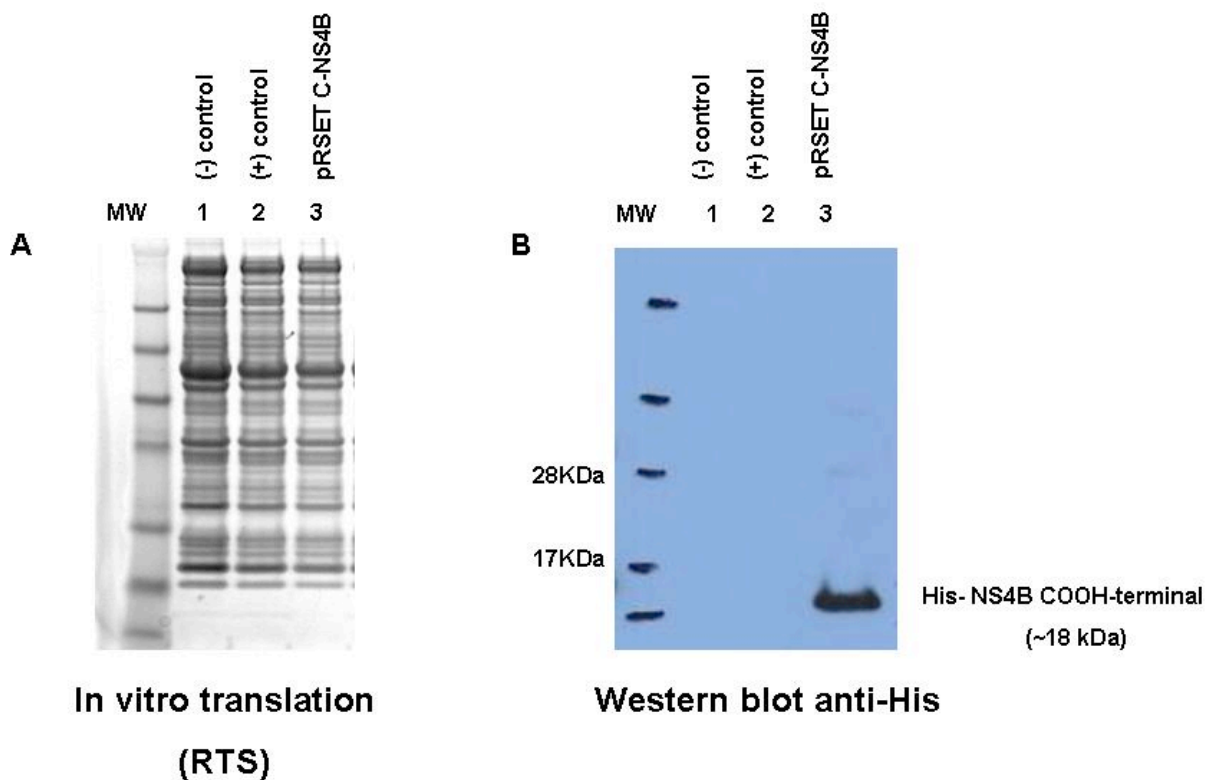


Figura 8. Espressione della proteina ricombinante His-NS4B COOH-terminale.

Il pannello A mostra una corsa elettroforetica eseguita su gel di poliacrilamide a gradiente 4-12% su cui sono stati caricati due diversi campioni ottenuti con il sistema di trascrizione in vitro RTS ed un controllo di reazione. Sulla corsia 1 è stata caricata la miscela di reazione senza vettore di espressione (controllo negativo), nella corsia 2 è stata caricata la miscela di reazione contenente un vettore fornito dalla ditta che codifica per una proteina fluorescente (GFP, controllo positivo) e nella corsia 3 è stata caricata la reazione contenente il vettore con l'insero codificante per l'NS4B COOH-terminale. Lo stesso gel è stato trasferito su filtro di nitrocellulosa ed analizzato con l'anticorpo anti-His (pannello B), nella corsia 3 è individuata la proteina ricombinante.

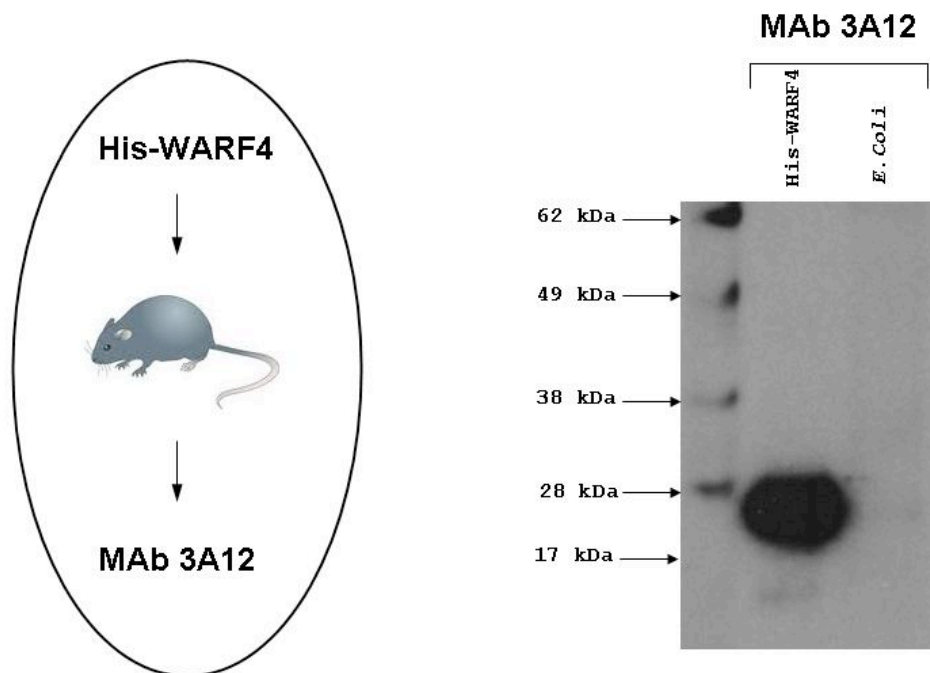


Figura 9. Produzione dell'anticorpo monoclonale MAb 3A12.

L'anticorpo monoclonale è stato preparato inducendo la formazione di anticorpi in topi balb utilizzando come immunogeno la proteina ricombinante His-WARF4.

Un primo controllo della reattività e specificità dell'anticorpo è stato eseguito analizzando in western blotting l'estratto crudo proteico di E.coli contenente il vettore pRSETB vuoto e l'estratto crudo di E coli trasformato con il vettore di espressione contenente l'insero codificante per WARF4. La figura mostra la reattività di MAb 3A12 con la proteina ricombinante e l'assenza di reattività aspecifica nella corsia adiacente.

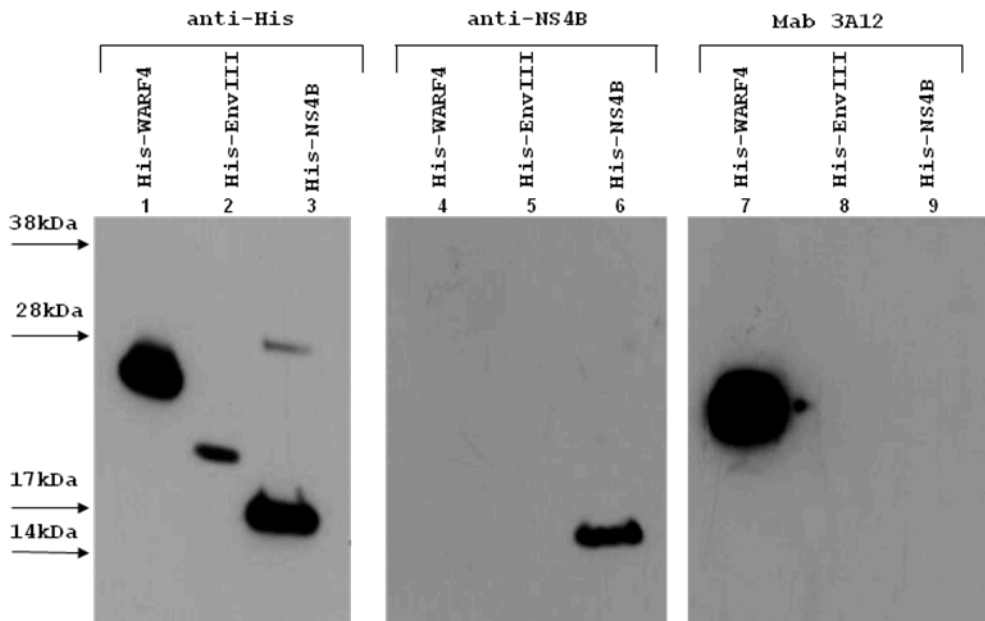
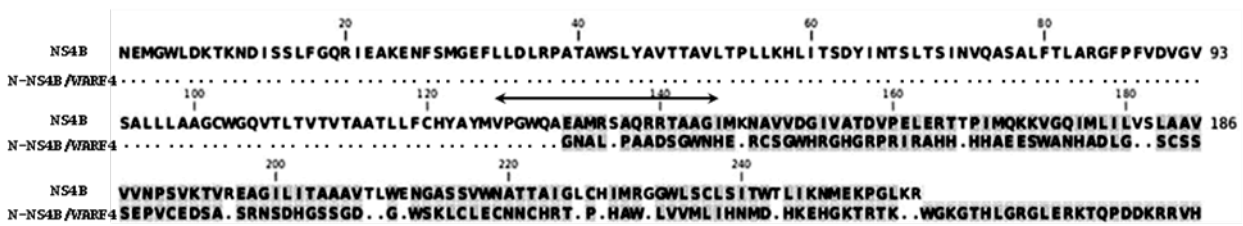


Figura 10. Analisi dell' allineamento aminoacidico delle sequenze proteiche di WARF4 e NS4B COOH-terminale ed analisi in western blot.

Nel pannello A è mostrato l'allineamento aminoacidico delle proteine NS4B e WARF4: le zone ombreggiate evidenziano le differenze aminoacidiche delle due proteine determinate dai diversi schemi di lettura. La freccia indica i 14 AA bersaglio dell'anticorpo policlonale commerciale anti- NS4B.

Il pannello B mostra un'analisi in western blotting eseguita sulle due proteine ricombinanti con tre differenti anticorpi: le prime tre corsie mostrano la reattività dell'anticorpo anti-His con entrambe le proteine ricombinanti ed una terza proteina di controllo (His-Env); sul secondo filtro l'anticorpo anti-NS4B non reagisce con His-WARF4 (corsia 4); sul terzo filtro l'anticorpo MAb 3A12 non reagisce con la proteina His-NS4B COOH-terminale (corsia 9).

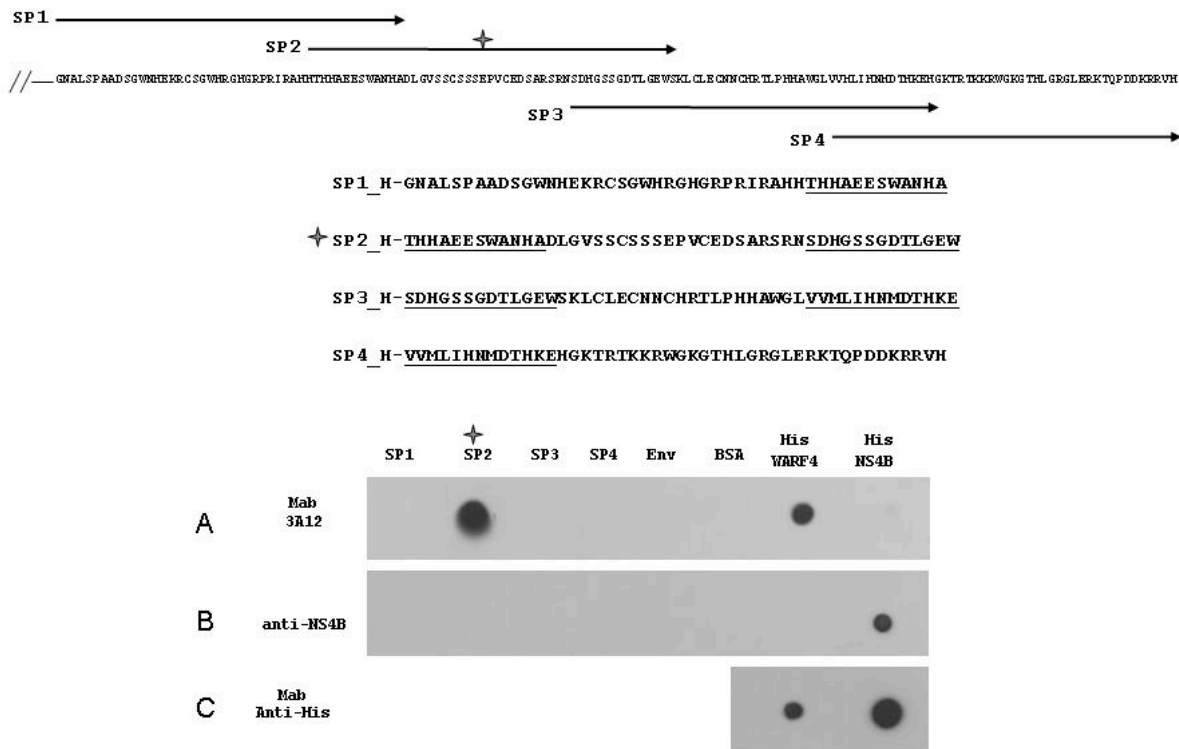


Figura 11. Identificazione della regione proteica riconosciuta da MAb3A12

Nella parte superiore della figura è mostrata una rappresentazione schematica dei quattro peptidi sintetici (SP1, SP2, SP3, SP4) che coprono l'intera sequenza aminoacidica di N-NS4B/WARF4. Le sequenze dei singoli peptidi sintetici sono mostrate al centro, gli aminoacidi in comune tra peptidi contigui sono sottolineati.

Come mostrato nella parte inferiore della figura i quattro peptidi sintetici (500 ng), due controlli negativi (His-Env e BSA) e le proteine ricombinanti His-WARF4 e His-NS4B COOH-terminale sono state analizzate in dot blot con l'anticorpo monoclonale MAb 3A12 (pannello A), con l'anticorpo commerciale anti-NS4B (pannello B). Nel pannello C le proteine ricombinanti sono state testate con l'anticorpo anti-His. Il simbolo indica il peptide SP2 contenete l'epitopo riconosciuto da MAb3A12.

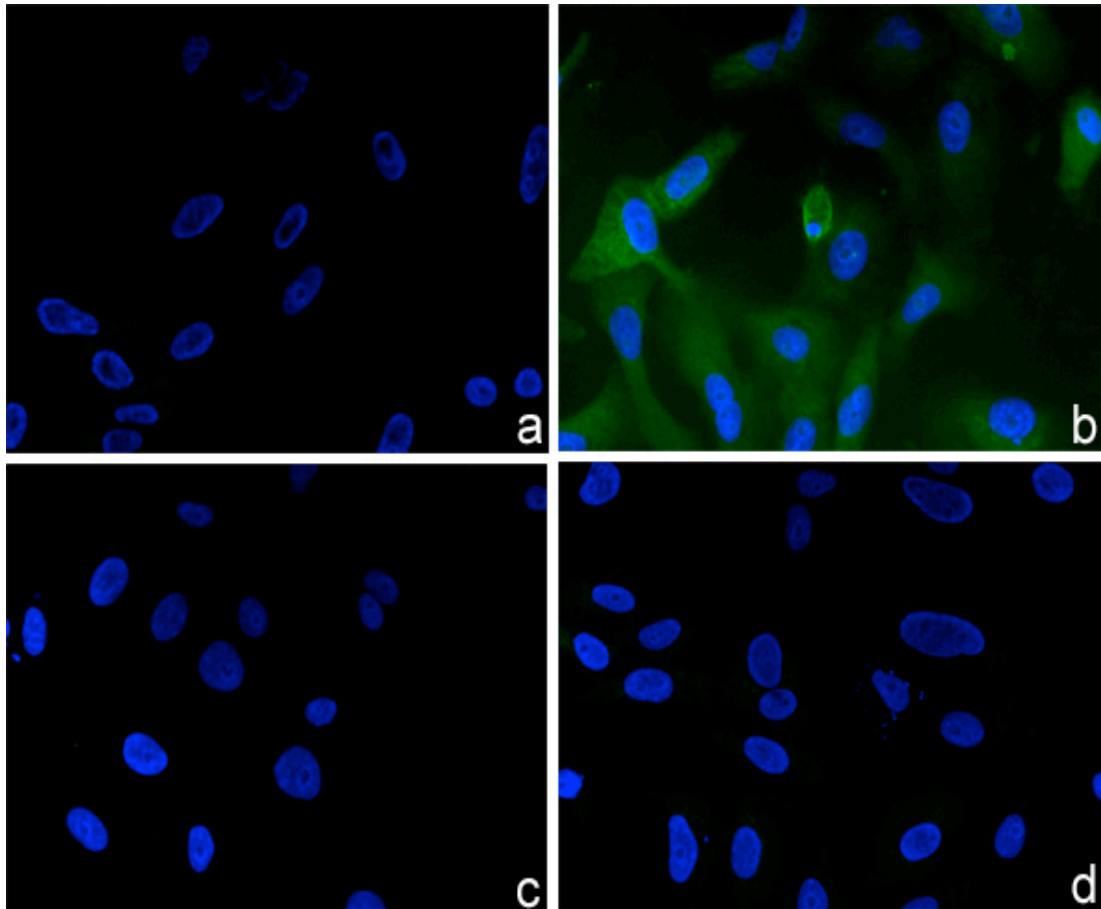


Figura 12. Espressione e localizzazione intracellulare di N-NS4B/WARF4 in cellule VERO infettate.

MAb 3A12 reagisce con il citoplasma delle cellule infettate (pannello b). Non si osserva reattività con le cellule non infettate (pannello d). L'anticorpo MOPC-21 è stato usato come controllo negativo con le cellule infettate (pannello a) e non infettate (pannello c).

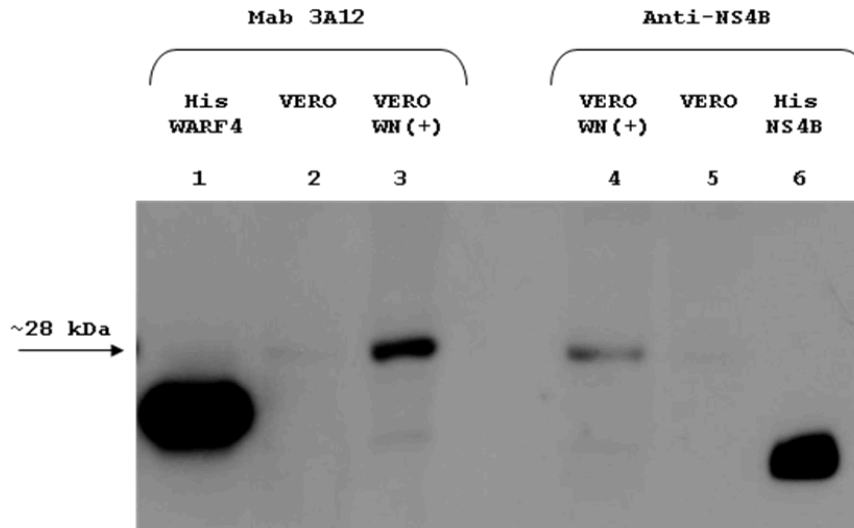


Figura 13. Reattività di MAb 3A12 con cellule VERO infettate con WNV linea I in western blot.

MAb 3A12 riconosce sul lisato di cellule VERO infettate con WNV linea I una proteina di apparente peso molecolare di circa 28 kDa (lane 3), mentre non mostra reattività con le cellule non infettate (lane 2). La proteina ricombinante His-WARF4 è stata usata come controllo positivo (lane 1). L'anticorpo commerciale anti-NS4B è stato usato per monitorare l'infezione delle cellule VERO e per comparare la migrazione su gel delle due proteine NS4B (lane 4) e N-NS4B/WARF4. La mobilità elettroforetica di N-NS4B/WARF4 (lane 3) risulta leggermente inferiore rispetto a quella dell' NS4B (lane 4). La proteina ricombinante His-NS4B COOH-terminale, usata come controllo positivo, è stata caricata con un ritardo di circa venti minuti (lane 6).

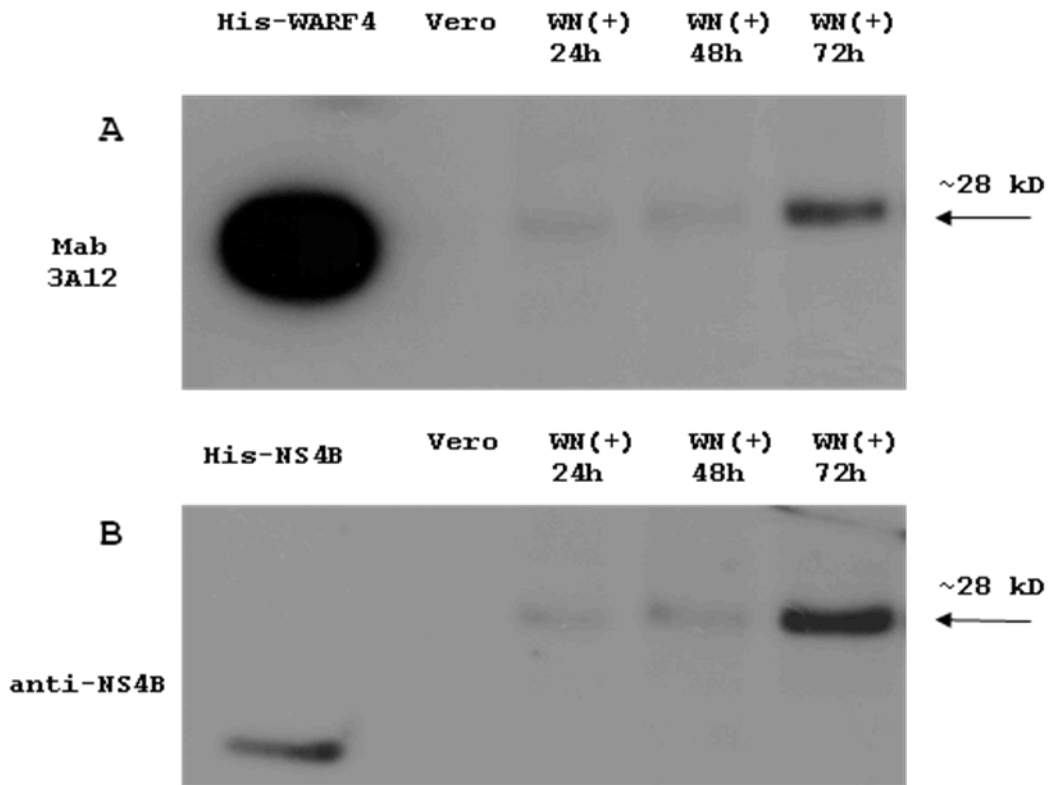


Figura 14. Analisi in western blot di cellule VERO infettate a tempi diversi.

L'espressione della proteina N-NS4B/WARF4 (pannello A) è stata valutata in western blot e comparata con quella della proteina virale NS4B (pannello B) dopo 24-72 ore dall'infezione. Entrambe le proteine mostrano una cinetica di espressione simile, presentando il massimo livello di espressione nella tarda fase dell'infezione. His-WARF4 (20 ng) e His-NS4B COOH-terminale (50 ng) sono state usate come controlli positivi.

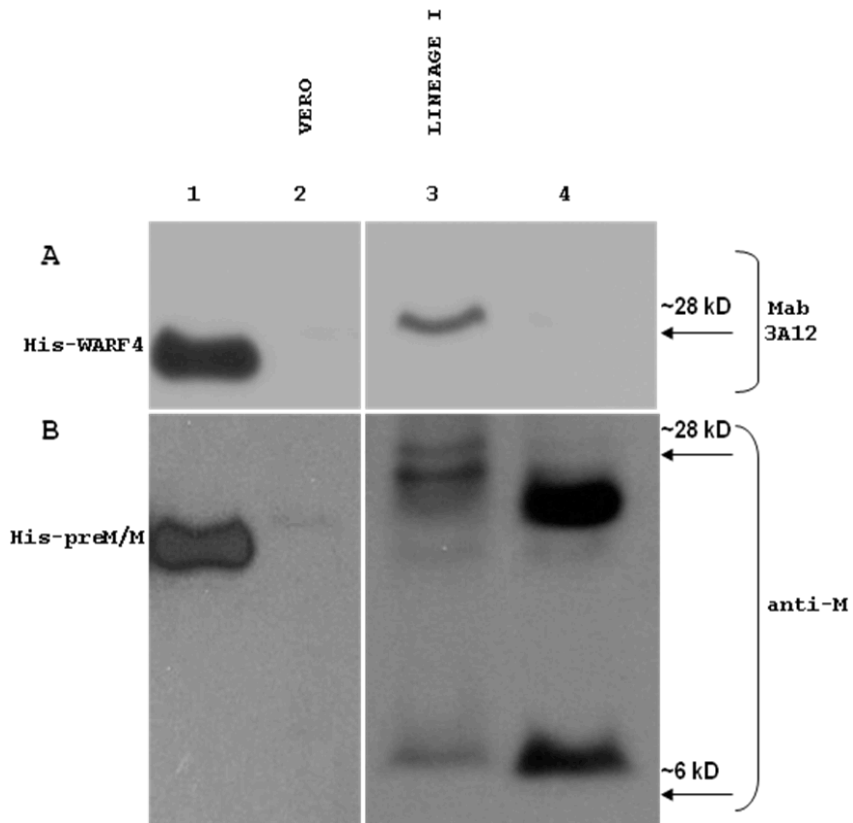


Figura 15. L'espressione della proteina N-NS4B/WARF4 è limitata alla linea virale I del WNV.

Il pannello A mostra la reattività del lisato cellulare proveniente dall'infezione con WNV linea I con l'anticorpo MAb 3A12 (lane 3), mentre l' anticorpo non reagisce con lisato da cellule infettate con WNV linea 2 (lane 4). Le cellule VERO non infettate sono state usate come controllo negativo (lane 2). Per monitorare l'infezione delle cellule VERO con entrambe le linee virali, le membrane sono state anche testate con un anticorpo commerciale anti-M (pannello B). La proteina M e la sua forma immatura sono state riconosciute dall' anticorpo in entrambe le linee virali (lane 3 e 4). Le proteine ricombinanti His-WARF4 e His-preM/M sono state usate come controlli positivi.

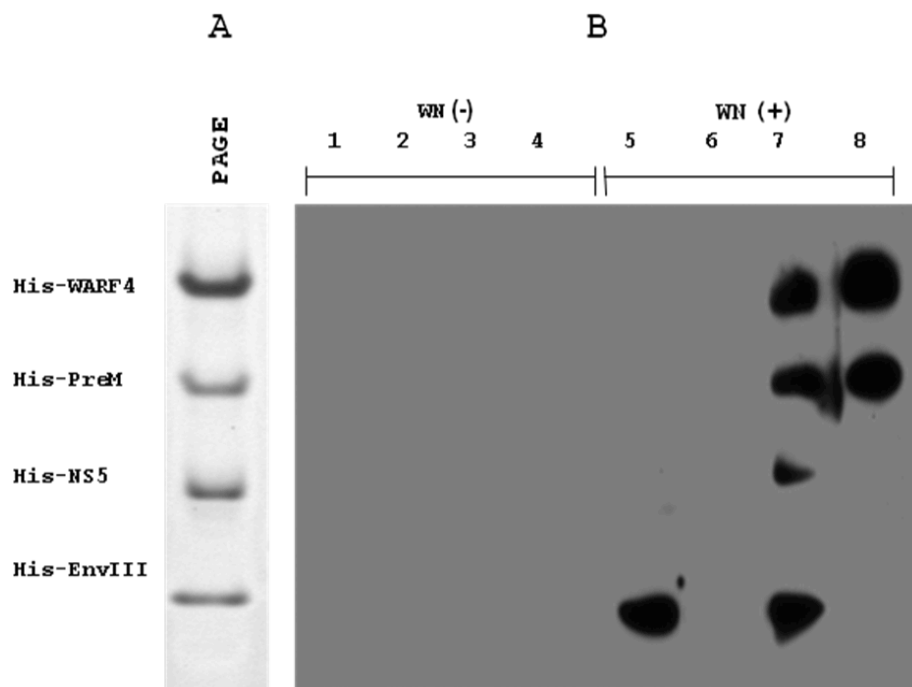


Figura 16. Sieri umani positivi al WNV riconoscono la proteina His-WARF4.

Otto sieri umani, quattro dei quali testati positivi in IFA per le IgG anti WNV sono stati analizzati in western blot per la presenza di anticorpi rivolti contro His-WARF4. I sieri sono stati testati anche con altre tre proteine WN ricombinanti: il dominio III dell'Envelope, un frammento della proteina preM/M e una porzione ammino terminale dell'NS5. Il pannello A mostra le quattro proteine ricombinanti colorate con il blu di Coomassie. Il pannello B mostra i risultati del western blot: i sieri umani negativi per la presenza di IgG anti WN (1-4) non reagiscono con nessun antigene ricombinante, mentre i sieri testati positivi al WN (5-8) mostrano differenti reattività con i quattro antigeni ricombinanti. Due di questi sieri (7-8) reagiscono con His-WARF4.

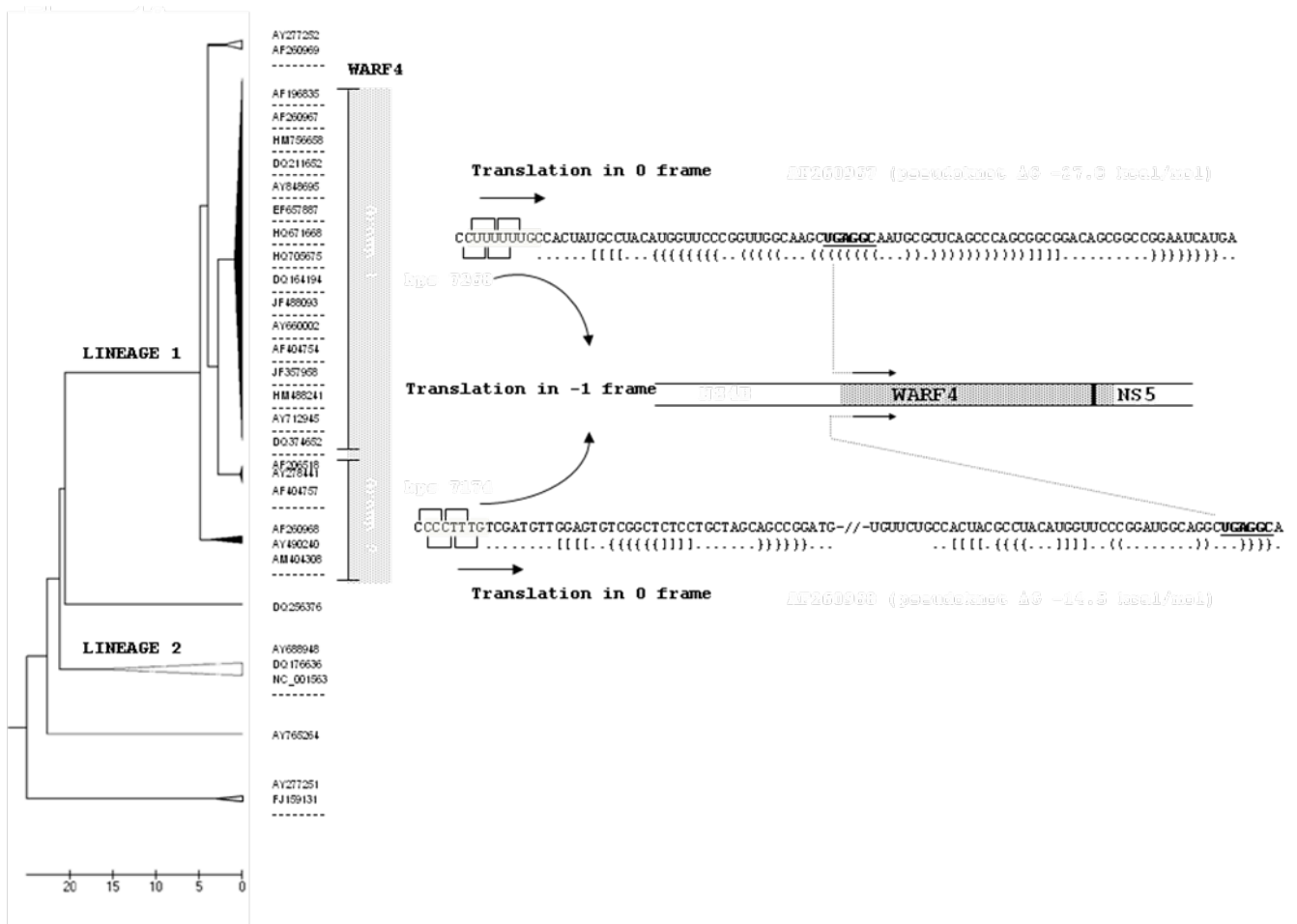
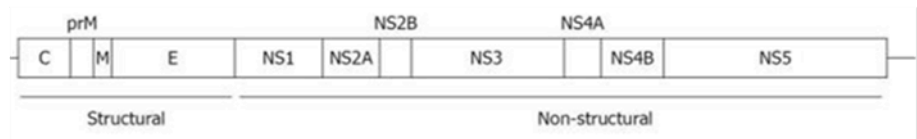


Figura 17. Analisi UPGMA dei genomi di WNV.
 L'immagine riassume i risultati delle analisi bioinformatiche. Sono mostrati alcuni ceppi di riferimento. L'allineamento delle sequenze individua W4R4 nel 98% dei ceppi appartenenti alla linea virale I. I genomi contenenti W4R4 (tratteggiati) possono essere ulteriormente separati in due gruppi, a seconda della sequenza che promuove lo spostamento del ribosoma nello schema di lettura -1. Il gruppo 1 presenta la slippery sequence UUUUUUG, mentre il gruppo 2 presenta la slippery sequence CCCUUUG/T. Sono mostrati anche le due sequenze pseudoknot con gli appaiamenti di basi previsti. Le slippery sequences sono colorate in grigio, mentre il codone di stop (UGA) e il primo codone (GGC) di W4R4 sono sottolineati.



Canonical translation



N-NS4B/WARF4 production



NS1' production

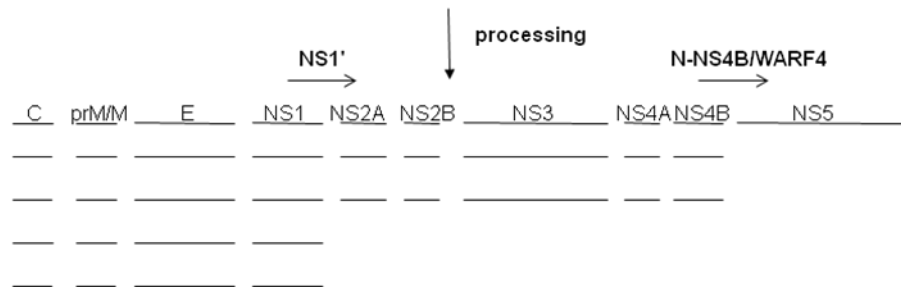


Figura 18. Ipotetico meccanismo di regolazione della traduzione.

Meccanismo di traduzione utilizzato dal WNV per la produzione delle proteine virali. La traduzione dei geni codificati da schemi di lettura alternativi (NS1' e WARF4) bloccherebbe la sintesi delle proteine non strutturali tradotte dai geni situati a valle. Ciò determinerebbe una maggior produzione delle proteine strutturali, coinvolte nell'assemblaggio delle particelle virali.

BIBLIOGRAFIA

Abbassy MM, Osman M, Marzouk AS. (1993). "West Nile (Flaviviridae:Flavivirus) in experimentally infected Argas (Acari:Argasidae)." *Am J Trop Med Hyg* 48(5): 726-37.

Alonso-Padilla J, Jimenez de Oya N, Blazquez AB, Loza-Rubio E, Escribano JM, Saiz JC, Escribano-Romero E,. (2010) "Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of West Nile virus infection based on a recombinant envelope protein produced in *Trichoplusia* larvae." *J Virol Methods*, 166:37-41.

Al-Shekhlee, A. and B. Katirji (2004). "Electrodiagnostic features of acute paralytic poliomyelitis associated with West Nile virus infection." *Muscle Nerve* 29(3): 376-80.

Autorino, G. L., A. Battisti, et al. (2002). "West Nile virus epidemic in horses, Tuscany region, Italy." *Emerg Infect Dis* 8(12): 1372-8.

Bakonyi, T.; Ferenczi, E.; Erdelyi, K.; Kutasi, O.; Csorgo, T.; Seidel, B.; Weissenböck, H.; Brugger, K.; Ban, E.; Nowotny, N. (2013) "Explosive spread of a neuroinvasive lineage 2 West Nile virus in Central Europe, 2008/2009." *Vet. Microbiol.*, 165, 61–70.

Bakonyi, T.; Hubalek, Z.; Rudolf, I.; Nowotny, N. (2005) "Novel flavivirus or new lineage of West Nile virus, central Europe." *Emerg. Infect. Dis.*, 11, 225–231.

Baril M, Dulude D, Gendron K, Lemay G, Brakier-Gingras L (2003) "Efficiency of a programmed -1 ribosomal frameshift in the different subtypes of the human immunodeficiency virus type 1 group M." *Rna*, 9:1246-1253.

Ballabh, P.; Braun, A.; Nedergaard, M. (2004) "The blood–brain barrier: An overview: Structure, regulation, and clinical implications." *Neurobiol. Dis.*, 16, 1–13.

Barton, G. M. and R. Medzhitov (2003). "Linking Toll-like receptors to IFN- α / β expression." *Nat Immunol* 4(5): 432-3.

Barzon L, Pacenti M, Franchin E, Lavezzo E, Masi G, Squarzon L, Pagni S, Toppo S, Russo F, Cattai M, Cusinato R, Palu G. (2013) "Whole genome sequencing and phylogenetic analysis of West Nile virus lineage 1 and lineage 2 from human cases of infection, Italy, August 2013." *Euro Surveill* 19;18(38). pii: 20591. Erratum in: *Euro Surveill*. 2013;18(40).

Barzon L, Pacenti M, Franchin E, Squarzon L, Lavezzo E, Cattai M, Cusinato R, Palu G. (2013) "The Complex Epidemiological Scenario of West Nile Virus in Italy." *Int J Environ Res Public Health*; 10(10): 4669–4689.

Beasley, D. W. and A. D. Barrett (2002). "Identification of neutralizing epitopes within structural domain III of the West Nile virus envelope protein." *J Virol* 76(24): 13097-100.

Beasley, D.W. (2011) "Vaccines and immunotherapeutics for the prevention and treatment of infections with West Nile virus." *Immunotherapy*, 3, 269–285.

- Beasley, D.W.C.; Li, L.; Suderman, M.T.; Barrett, A.D.T. (2002) Mouse neuroinvasive phenotype of West Nile virus strains varies depending upon virus genotype. *Virology*, 296, 17–23.
- Bei R, Moretti A, Visco V, Defilippi R, Tsang K, Frati L, Muraro R (1996) “Cell mediated cytotoxicity of human colon carcinoma cells by a monoclonal antibody (R4) recognizing the carcinoembryonic antigen (CEA) and CEA-related molecules.” *Int J Oncol.* 8:1127-1135.
- Biggerstaff BJ, Petersen LR. (2003) “Estimated risk of transmission of the West Nile virus through blood transfusion in the US, 2002.” *Transfusion*;43(8):1007–17.
- Bondre, V.P.; Jadi, R.S.; Mishra, A.C.; Yergolkar, P.N.; Arankalle, V.A. (2007) “West Nile virus isolates from India: Evidence for a distinct genetic lineage.” *J. Gen. Virol.*, 88, 875-884.
- Brierley, I., A. J. Jenner, and S. C. Inglis. (1992). “Mutational analysis of the “slippery-sequence” component of a coronavirus ribosomal frameshifting signal.” *J. Mol. Biol.* 227:463–479.
- Byrne SN, Halliday GM, Johnston LJ, King NJ. (2001). "Interleukin-1beta but not tumor necrosis factor is involved in West Nile virus-induced Langerhans cell migration from the skin in C57BL/6 mice." *J Invest Dermatol* 117(3): 702-9.
- Cairolì, O. (2005) “The West Nile virus and the dialysis/transplant patient.” *Nephrol News Issues*, 19, 73–75.
- Calzolari, M., Monaco, F., Montarsi, F., Bonilauri, P., Ravagnan, S., Bellini, R., Cattoli, G., Cordioli, P., Cazzin, S., Pinoni, C., Marini, V., Natalini, S., Goffredo, M., Angelini, P., Russo, F., Dottori, M., Capelli, G., Savini, G., (2013) “New incursions of West Nile virus lineage 2 in Italy in 2013: the value of the entomological surveillance as early warning system.” *Vet. Ital.* 49 (3), 315–319.
- Camenga, D. L., N. Nathanson, et al. (1974). "Cyclophosphamide-potentiated West Nile viral encephalitis: relative influence of cellular and humoral factors." *J Infect Dis* 130(6): 634-41.
- Cao, N.J.; Ranganathan, C.; Kupsky, W.J.; Li, J. (2005) “Recovery and prognosticators of paralysis in West Nile virus infection.” *J. Neurol Sci*, 236, 73–80.
- Carding, S. R. and P. J. Egan (2002). "Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity." *Nat Rev Immunol* 2(5): 336-45.
- Carroll, M. C. (2004). "The complement system in regulation of adaptive immunity." *Nat Immunol* 5(10): 981-6.
- Centers for Disease Control and Prevention. Intrauterine West Nile virus infection—New York, 2002. *JAMA* 2003;289(3):295–6.
- Chambers T.J., Diamond M.S. (2003) “Pathogenesis of flavivirus encephalitis.” *Adv. Virus Res.* 60, 273-342.
- Chesler, D. A., and C. S. Reiss (2002). "The role of IFN-g in immune responses to viral

infections of the central nervous system." *Cytokine Growth Factor Rev* 13: 441–454.

Chu, J. J. and M. L. Ng (2004). "Infectious entry of West Nile virus occurs through a clathrin-mediated endocytic pathway." *J Virol* 78(19): 10543-55.

Chung, K. M., G. E. Nybakken, et al. (2006). "Antibodies against West Nile Virus nonstructural protein NS1 prevent lethal infection through Fc gamma receptor-dependent and -independent mechanisms." *J Virol* 80(3): 1340-51.

Dauphin G, Zientara S,. (2007) " West Nile virus: recent trends in diagnosis and vaccine development." *Vaccine*, 25:5563-5576.

Debiasi, R.L.; Tyler, K.L. West Nile virus meningoencephalitis. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* 2006, 2, 264–275.

Del Giudice, P.; Schuffenecker, I.; Zeller, H.; Grelier, M.; Vandebos, F.; Dellamonica, P.; Counillon, E. "Skin manifestations of West Nile virus infection." *Dermatology* 2005, 211, 348–350.

Diamond, M. S., E. M. Sitati, et al. (2003). "A critical role for induced IgM in the protection against West Nile virus infection." *J Exp Med* 198(12): 1853-62.

Diamond MS, Pierson TC, Fremont DH (2008) "The structural immunology of antibody protection against West Nile virus." *Immunol Rev*, 225:212-225.

Duggal, N.K.; D'Anton, M.; Xiang, J.; Seiferth, R.; Day, J.; Nasci, R.; Brault, A.C. (2013) Sequence analyses of 2012 west nile virus isolates from Texas fail to associate viral genetic factors with outbreak magnitude. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 89, 205–210.

Dupuis AP 2nd, Marra PP, Kramer LD (2003). "Serologic evidence of West Nile virus
Dyer J, Chisenhall DM, Mores CN,. (2007) " A multiplexed TaqMan assay for the detection of arthropod-borne flaviviruses." *J Virol Methods*, 145:9-13.

Ebel GD, Carricaburu J, Young D, Bernard KA, Kramer LD. (2004). "Genetic and phenotypic variation of West Nile virus in New York, 2000-2003." *Am J Trop Med Hyg* 71(4): 493-500.

Elshuber, S., S. L. Allison, et al. (2003). "Cleavage of protein prM is necessary for infection of BHK-21 cells by tick-borne encephalitis virus." *J Gen Virol* 84(Pt 1): 183-91. *Proc Natl Acad Sci USA*;103(50):18879–80.

Engle, M.J.; Diamond, M.S. (2003) "Antibody prophylaxis and therapy against West Nile virus infection in wild-type and immunodeficient mice." *J. Virol.*, 77, 12941–12949.

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC).Reported cases of West Nile fever for the EU and neighbouring countries. Transmission season 2013 and previous transmission seasons; latest update: 22/08/2014.

Evans JD, Seeger C. (2007) "Differential effects of mutations in NS4B on West Nile virus replication and inhibition of interferon signaling." *J Virol*;81(21):11809–16.

Faggioni G, Ciammaruconi A, De Santis R, Pomponi A, Scicluna MT, Barbaro K, Masuelli L, Autorino G, Bei R, Lista F. (2009) "Evidence of a humoral response to a novel protein WARF4 embedded in the West Nile virus NS4B gene encoded by an alternative open reading frame." *Int J Mol Med*, 23:509-512.

Faggioni G, De Santis R, Pomponi A, Fantini M, Savini G, Monaco F, Polci A, Bei R, Lista F. (2014) "Rapid molecular detection and genotyping of West Nile Virus lineages 1 and 2 by real time PCR and melting curve analysis." *J Virol Methods*. Oct ;207:54-9.

Falconar, A. K. (1999). "Identification of an epitope on the dengue virus membrane (M) protein defined by cross-protective monoclonal antibodies: design of an improved epitope sequence based on common determinants present in both envelope (E and M) proteins." *Arch Virol* 144(12): 2313-30.

Fiala, M.; Looney, D.J.; Stins, M.; Way, D.D.; Zhang, L.; Gan, X.; Chiappelli, F.; Schweitzer, E.S.; Shapshak, P.; Weinand, M.; et al. (1997) "TNF-alpha opens a paracellular route for HIV-1 invasion across the blood-brain barrier." *Mol. Med.*, 3, 553–564.

Firth AE, Atkins JF (2009) "A conserved predicted pseudoknot in the NS2A encoding sequence of West Nile and Japanese encephalitis flaviviruses suggests NS19 may derive from ribosomal frameshifting." *Virol J* 6: 14.

Fredericksen, B. L. and M. Gale, Jr. (2006). "West Nile virus evades activation of interferon regulatory factor 3 through RIG-I-dependent and -independent pathways without antagonizing host defense signaling." *J Virol* 80(6): 2913-23.

Frost, M.J.; Zhang, J.; Edmonds, J.H.; Prow, N.A.; Gu, X.; Davis, R.; Hornitzky, C.; Arzey, K.E.; Finlaison, D.; Hick, P.; et al. (2011) "Characterization of virulent West Nile virus Kunjin strain, Australia." *Emerg. Infect. Dis.* 2012, 18, 792–80.

Garcia-Tapia, D.; Loiacono, C.M.; Kleiboeker, S.B. (2006) "Replication of West Nile virus in equine peripheral blood mononuclear cells." *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 110, 229–244.

Gea-Banacloche, J.; Johnson, R.T.; Bagic, A.; Butman, J.A.; Murray, P.R.; Agrawal, A.G. (2004) "West Nile virus: Pathogenesis and therapeutic options." *Ann. Intern. Med.*, 140, 545–553.

Giedroc DP, Theimer CA, Nixon PL, 2000 " Structure, stability and function of RNA pseudoknots involved in stimulating ribosomal frameshifting." *J Mol Biol*, 298:167-185.

Girard Y.A., Popov V., Wen J., Han V., Higgs S. (2005) "Ultrastructural study of West Nile virus pathogenesis in *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae)." *J. Med. Entomol.* 42, 429-444.

Gobbi F., Napoletano G., Piovesan C., Russo F., Angheben A., Rossanese A., Cattelan A.M., Gallo L., Valsecchi M., Piazza A., Venturi G. & Bisoffi Z.(2009)." Where is West Nile fever? Lessons learnt from recent human cases in northern Italy." *Euro Surveill*, 14 (10).

- Gollins S. W. and J. S. Porterfield (1985). "Flavivirus infection enhancement in macrophages: an electron microscopic study of viral cellular entry." *J Gen Virol* 66 (Pt 9): 1969-82.
- Guptill S.C., Julian K.G., Campbell G.L., Price S.D., Marfin A.A. (2003) " Early-season avian deaths from West Nile virus as warnings of human infection." *Emerg. Infect. Dis.* 9(4), 483-484.
- Haley, M.; Retter, A.S.; Fowler, D.; Gea-Banacloche, J.; O'Grady, N.P. (2003) "The role for intravenous immunoglobulin in the treatment of West Nile virus encephalitis." *Clin. Infect. Dis.*, 37, e88–e90.
- Hamdan, A.; Green, P.; Mendelson, E.; Kramer, M.R.; Pitlik, S.; Weinberger, M. (2002) "Possible benefit of intravenous immunoglobulin therapy in a lung transplant recipient with West Nile virus encephalitis." *Transpl. Infect. Dis.*, 4, 160–162.
- Hayes, C. G. T. P. M., editor. (1989). "West Nile fever. In *The arboviruses: epidemiology and ecology.*" CRC Press. Boca Raton, Florida, USA: . 59–88.
- Hayes E.B., Sejvar J.J., Zaki S.R., Lanciotti R.S., Bode A.V., Campbell G.L. (2005) Virology, pathology, and clinical manifestations of West Nile virus disease, *Emerg. Infect. Dis.* 11:1174–1179.
- Health Canada. West Nile virus. <http://www.hc-sc.gc.ca/English/westnile/>.
- Hiatt, B.; DesJardin, L.; Carter, T.; Gingrich, R.; Thompson, C.; de Magalhaes-Silverman, M. (2003) "A fatal case of West Nile virus infection in a bone marrow transplant recipient." *Clin Infect. Dis.* 37, e129–e131.
- Hinckley AF, O'Leary DR, Hayes EB. (2007) "Transmission of West Nile virus through human breast milk seems to be rare." *Pediatrics*;119(3):e666–71.
- Howard MT, Aggarwal G, Anderson CB, Khatri S, Flanigan KM, Atkins JF (2005) "Recoding elements located adjacent to a subset of eukaryal selenocysteine-specifying UGA codons." *Embo J*, 24:1596-1607.
- Huang, C.Y.; Silengo, S.J.; Whiteman, M.C.; Kinney, R.M. (2005) "Chimeric dengue 2 PDK-53/West Nile NY99 viruses retain the phenotypic attenuation markers of the candidate PDK-53 vaccine virus and protect mice against lethal challenge with West Nile virus." *J. Virol.*, 79, 7300–7310.
- Hunsperger, E.A.; Roehrig, J.T. (2006) "Temporal analyses of the neuropathogenesis of a West Nile virus infection in mice." *J. Neurovirol.*, 12, 129–139.
- Iwamoto M, et al. (2003) "Transmission of West Nile virus from an organ donor to four transplant recipients." *N Engl J Med*;348(22):2196–203.
- Iyer AV, Kousoulas KG (2013) "A review of vaccine approaches for West Nile virus." *Int J Environ Res Public Health.* Sep 10;10(9):4200-23.
- Jeha, L.E.; Sila, C.A.; Lederman, R.J.; Prayson, R.A.; Isada, C.M.; Gordon, S.M. (2003) "West Nile virus infection: A new acute paralytic illness." *Neurology*, 61, 55–59.

- Jerzak G, Bernard KA, Kramer LD, Ebel GD. (2005). "Genetic variation in West Nile virus from naturally infected mosquitoes and birds suggests quasispecies structure and strong purifying selection." *J Gen Virol* 86(Pt 8): 2175-83.
- Johnson, R.T.; Mims, C.A. (1968) " Pathogenesis of Viral infections of the nervous system." *New Engl. J. Med.*, 278, 84–92.
- Kanesa-Thanan, N.; Putnak, J.R.; Mangiafico, J.A.; Saluzzo, J.E.; Ludwig, G.V. (2002) "Short report: Absence of protective neutralizing antibodies to West Nile virus in subjects following vaccination with Japanese encephalitis or dengue vaccines." *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 66, 115–116.
- Keese, P. K. and A. Gibbs (1992). "Origins of genes: "big bang" or continuous creation?" *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(20): 9489-93.
- Kesson, A. M., R. V. Blanden, et al. (1987). "The primary in vivo murine cytotoxic T cell response to the flavivirus, West Nile." *J Gen Virol* 68 (Pt 7): 2001-6.
- Khairallah, M.; Ben Yahia, S.; Ladjimi, A.; Zeghidi, H.; Ben Romdhane, F.; Besbes, L.; Zaouali, S.; Messaoud, R. (2004) " Chorioretinal involvement in patients with West Nile virus infection." *Ophthalmology*, 111, 2065–2070.
- Klee, A.L.; Maidin, B.; Edwin, B.; Poshni, I.; Mostashari, F.; Fine, A.; Layton, M.; Nash, D. (2004) "Long-term prognosis for clinical West Nile virus infection." *Emerg. Infect. Dis.*, 10, 1405–1411.
- Klein, R. S., E. Lin, et al. (2005). "Neuronal CXCL10 directs CD8+ T-cell recruitment and control of West Nile virus encephalitis." *J Virol* 79(17): 11457-66.
- Komar N, Langevin S, Hinten S, Nemeth N, Edwards E, Hettler D, Davis B, Bowen R, Bunning M. (2003). "Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile virus." *Emerg Infect Dis* 9(3): 311-22.
- Komar O, Robbins MB, Klenk K, Blitvich BJ, Marlenee NL, Burkhalter KL, et al.(2003). "West Nile virus transmission in resident birds, Dominican Republic." *Emerg Infect Dis* 9(10): 1299-302.
- Komar, N. and G. G. Clark (2006). "West Nile virus activity in Latin America and the Caribbean." *Rev Panam Salud Publica* 19(2): 112-7.
- Kramer, L.D.; Li, J.; Shi, P.Y. (2007) "West Nile virus." *Lancet Neurol.*, 6, 171–181.
- Kramer-Hämmerle, S.; Rothenaigner, I.; Wolff, H.; Bell, J.E.; Brack-Werner, R. (2005) "Cells of the central nervous system as targets and reservoirs of the human immunodeficiency virus." *Virus Res.*, 111, 194–213.
- Kulkarni, A. B., A. Mullbacher, et al. (1991). "In vitro T-cell proliferative response to the flavivirus, west Nile." *Viral Immunol* 4(2): 73-82.

Lanciotti RS, Ebel GD, Deubel V, Kerst AJ, Murri S, Meyer R et al. (2002). "Complete genome sequences and phylogenetic analysis of West Nile virus strains isolated from the United States, Europe, and the Middle East." *Virology* 298(1): 96-105.

Lanciotti RS, Kerst AJ. (2001) "Nucleic acid sequence-based amplification assays for rapid detection of West Nile and St. Louis encephalitis viruses." *J Clin Microbiol*, 39:4506-4513.

Leis, A.A.; Stokic, D.S.; Webb, R.M.; Slavinski, S.A.; Fratkin, J. (2003) "Clinical spectrum of muscle weakness in human West Nile virus infection." *Muscle Nerve*, 28, 302–308.

Leung JY, et al. (2008). "Role of nonstructural protein NS2A in flavivirus assembly." *J Virol*;82(10):4731–41.

Liu, Y., N. King, et al. (1988). "West Nile virus infection modulates the expression of class I and class II MHC antigens on astrocytes in vitro." *Ann N Y Acad Sci* 540: 483-5.

LoGiudice, K., R. S. Ostfeld, et al. (2003). "The ecology of infectious disease: effects of host diversity and community composition on Lyme disease risk." *Proc Natl Acad Sci USA* 100(2): 567-71.

Loroño-Pino MA, Blitvich BJ, Farfán-Ale JA, Puerto FI, Blanco JM, Marlenee NL, Rosado-Paredes EP, et al. (2003). "Serologic evidence of West Nile virus infection in horses, Yucatan State, Mexico." *Emerg Infect Dis* 9(7): 857-9.

Lustig, S.; Olshevsky, U.; Ben-Nathan, D.; Lachmi, B.E.; Malkinson, M.; Kobiler, D.; Halevy, M. (2000) "A live attenuated West Nile virus strain as a potential veterinary vaccine." *Viral. Immunol.*, 13, 401–410.

Lvov, D.K.; Butenko, A.M.; Gromashevsky, V.L.; Kovtunov, A.I.; Prilipov, A.G.; Kinney, R.; Aristova, V.A.; Dzharkenov, A.F.; Samokhvalov, E.I.; Savage, H.M.; et al. (2004) "West Nile virus and other zoonotic viruses in Russia: Examples of emerging-reemerging situations." *Arch. Virol.Suppl.*, 18, 85–96.

Mackenzie, J. M. and E. G. Westaway (2001). "Assembly and maturation of the flavivirus Kunjin virus appear to occur in the rough endoplasmic reticulum and along the secretory pathway, respectively." *J Virol* 75(22): 10787-99.

Mason PW (1989) "Maturation of Japanese encephalitis virus glycoproteins produced by infected mammalian and mosquito cells." *Virology* 169: 354–364.

Marfin, A. A. and D. J. Gubler (2001). "West Nile encephalitis: an emerging disease in the United States." *Clin Infect Dis* 33(10): 1713-9.

May, F.J.; Davis, C.T.; Tesh, R.B.; Barrett, A.D. (2011) "Phylogeography of West Nile virus: From the cradle of evolution in Africa to Eurasia, Australia, and the Americas." *J. Virol.*, 85, 2964–2974.

Melian EB, Hinzman E, Nagasaki T, Firth AE, Wills NM, Nouwens AS, Blitvich BJ, Leung J, Funk A, Atkins JF, Hall R, Khromykh AA, (2010) " NS1' of flaviviruses in the Japanese

encephalitis virus serogroup is a product of ribosomal frameshifting and plays a role in viral neuroinvasiveness." *J Virol.* 84:1641-1647.

Melian EB, Hall-Mendelin S, Du F, Owens N, Bosco-Lauth AM, Nagasaki T, Rudd S, Brault AC, Bowen RA, Hall RA, van den Hurk AF, Khromykh AA. (2014) "Programmed ribosomal frameshift alters expression of west nile virus genes and facilitates virus replication in birds and mosquitoes." *PLoS Pathog.* Nov 6;10(11).

Modis Y, et al. (2004) "Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion." *Nature*;427(6972):313–9.

Monaco F, Lelli R, Teodori L, Pinoni C, Di Gennaro A, Polci A, Calistri P, Savini G. (2009)." Re-emergence of West Nile Virus in Italy. *Zoonoses Public Health.* 2010 Dec;57(7-8):476-486.

Monath TP, Cropp CB, Harrison AK. (1983). "Mode of entry of a neurotropic arbovirus into the central nervous system. Reinvestigation of an old controversy." *Lab Invest* 48(4): 399-410.

Monath, T. P. B. N. F. a. D. M. K., editors. Raven Press. and . (1990). " Flaviviruses. In *Virology.*" New York, New York, USA: 763–814.

Monath, T.P. (2001) "Prospects for development of a vaccine against the West Nile virus." *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2001, 951, 1–12.

Mouzakis, KD; Lang, AL; Vander Meulen, KA; Easterday, PD; Butcher, SE (2013). "HIV-1 frameshift efficiency is primarily determined by the stability of base pairs positioned at the mRNA entrance channel of the ribosome." *Nucleic Acids Research* 41 (3): 1901–13.

Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. (2005). A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol*;3(1):13–22.

Mukhopadhyay, S., B. S. Kim, et al. (2003). "Structure of West Nile virus." *Science* 302(5643): 248.

Nasci RS, Savage HM, White DJ, Miller JR, Cropp BC, Godsey MS, Kerst AJ, Bennett P, Gottfried K, Lanciotti RS. (2001). "West Nile virus in overwintering Culex mosquitoes, New York City, 2000." *Emerg Infect Dis* 7(4): 742-4.

Nathanson, N. (1998). "Emergence of new viral infections: implications for the blood supply." *Biologicals* 26(2): 77-84.

Naze F, Le Roux K, Schuffenecker I, Zeller H, Staikowsky F, Grivard P, Michault A, Laurent P: Simultaneous detection and quantitation of Chikungunya, dengue and West Nile viruses by multiplex RT-PCR assays and dengue virus typing using high resolution melting. *J Virol Methods* 2009, 162:1-7.

Nelson S, Jost CA, Xu Q, Ess J, Martin JE, Oliphant T, Whitehead SS, Durbin AP, Graham BS, Diamond MS, Pierson TC (2008) " Maturation of West Nile virus modulates sensitivity to antibody-mediated neutralization." *PLoS Pathog*, 4:e1000060.

- Ng, T.; Hathaway, D.; Jennings, N.; Champ, D.; Chiang, Y.W.; Chu, H.J. (2003) "Equine vaccine for West Nile virus." *Dev. Biol (Basel)*, 114, 221–227.
- Nusbaum, K.E.; Wright, J.C.; Johnston, W.B.; Allison, A.B.; Hilton, C.D.; Staggs, L.A.; Stallknecht, D.E.; Shelnutt, J.L. (. 2003) " Absence of humoral response in flamingos and red-tailed hawks to experimental vaccination with a killed West Nile virus vaccine." *Avian Dis*, 47, 750–752.
- O’Leary DR, et al. (2006) " Birth outcomes following West Nile Virus infection of pregnant women in the United States: 2003-2004." *Pediatrics*;117(3):e537–45.
- Papa A, Bakonyi T, Xanthopoulou K, Vázquez A, Tenorio A, Nowotny N. (2011) "Genetic characterization of West Nile virus lineage 2, Greece 2010." *Emerg Infect Dis.*;17(5):920–922.
- Pascarelli N, Rossini G, Velati C, Vocale C, Bedeschi E. (2014) "The experience of West Nile virus integrated surveillance system in the Emilia-Romagna region: five years of implementation, Italy, 2009 to 2013." *Euro Surveill.*;19(44).
- Perelman, A.; Stern, J. Acute pancreatitis in West Nile fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1974, 23, 1150–1152.
- Petersen, L. R. and A. A. Marfin (2002). "West Nile virus: a primer for the clinician." *Ann Intern Med* 137(3): 173-9.
- Petersen, L. R., A. A. Marfin, et al. (2003). "West Nile virus." *Jama* 290(4): 524-8.
- Pierson, T.C.; Diamond, M.S. (2013) " Flaviviruses." In *Fields Virology*, 6th ed.; Knipe, D.M., Howley, P.M., Eds.; Wolters Kluwer/Lippencott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, USA,; pp. 747–794.
- Pincus, S., P. W. Mason, et al. (1992). "Recombinant vaccinia virus producing the prM and E proteins of yellow fever virus protects mice from lethal yellow fever encephalitis." *Virology* 187(1): 290-7.
- Platanias, L. C. (2005). "Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling." *Nat. Rev. Immunol* 5: 375–386.
- Pletnev, A.G.; Swayne, D.E.; Speicher, J.; Rummyantsev, A.A.; Murphy, B.R. (2006) "Chimeric West Nile/dengue virus vaccine candidate: Preclinical evaluation in mice, geese and monkeys for safety and immunogenicity." *Vaccine*, 24, 6392–6404.
- Pradier, S.; Lecollinet, S.; Leblond, (2012) " A. West Nile virus epidemiology and factors triggering change in its distribution in Europe." *Rev. Sci. Tech.*, 31, 829–844.
- Price, W.H.; Thind, I.S. (1971) "Protection against West Nile virus induced by a previous injection with dengue virus." *Am. J. Epidemiol.*, 94, 596–607.
- ProMED-mail. (2006). " West Nile virus, equines –Argentina (03): OIE. " ProMED-mail 2006 27 Apr <http://www.promedmail.org>

Quirin R, Salas M, Zientara S, Zeller H, Labie J, Murri S, et al. (2004). "West Nile virus, Guadeloupe." *Emerg Infect Dis* 10(4): 706-8.

Ramanathan MP, Chambers JA, Pankhong P, Chattergoon M, Attatippaholkun W, Dang K, Shah N, Weiner DB. (2006). "Host cell killing by the West Nile Virus NS2B-NS3 proteolytic complex: NS3 alone is sufficient to recruit caspase-8-based apoptotic pathway." *Virology* 345(1): 56-72.

Ransohoff, R. M., T. Wei, et al. (2002). "Chemokine expression in the central nervous system of mice with a viral disease resembling multiple sclerosis: roles of CD4+ and CD8+ T cells and viral persistence." *J Virol* 76(5): 2217-24.

Rossini G, Cavrini F, Pierro A, Macini P, Finarelli A, Po C, Peroni G, Di Caro A, Capobianchi M, Nicoletti L, Landini M, Sambri V. (2008). "First human case of West Nile virus neuroinvasive infection in Italy, September 2008-case report." *Eur Surveill.* 13(41).

Sampson, B.A.; Ambrosi, C.; Charlot, A.; Reiber, K.; Veress, J.F.; Armbrustmacher, V. (2000) "The pathology of human West Nile virus infection." *Hum. Pathol.*, 31, 527–531.

Samuel, M. A. and M. S. Diamond (2005). "Alpha/beta interferon protects against lethal West Nile virus infection by restricting cellular tropism and enhancing neuronal survival." *J Virol* 79(21): 13350-61.

Samuel, M. A. and M. S. Diamond (2006). "Pathogenesis of West Nile Virus infection: a balance between virulence, innate and adaptive immunity, and viral evasion." *J Virol* 80(19): 9349-60.

Samuel, M.A.; Wang, H.; Siddharthan, V.; Morrey, J.D.; Diamond, M.S. (2007) "Axonal transport mediates West Nile virus entry into the central nervous system and induces acute flaccid paralysis." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 17140–17145.

Sanger, F., G. M. Air, et al. (1977). "Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA." *Nature* 265(5596): 687-95.

Savini G, Monaco F, Calistri P, Lelli R. (2008) "Phylogenetic analysis of West Nile virus isolated in Italy in 2008." *Eurosurveillance.*;27:13

Scherbik, S. V., J. M. Paranjape, et al. (2006). "RNase L plays a role in the antiviral response to West Nile virus." *J Virol* 80(6): 2987-99.

Schlesinger JJ. (2006). "Flavivirus nonstructural protein NS1: complementary surprises." Schroder, K., P. J. Hertzog, et al. (2004). "Interferon gamma: an overview of signals, mechanisms and functions." *J. Leukoc. Biol* 75: 163–189.

Sejvar, J.J.; Bode, A.V.; Marfin, A.A.; Campbell, G.L.; Ewing, D.; Mazowiecki, M.; Pavot, P.V.; Schmitt, J.; Pape, J.; Biggerstaff, B.J.; et al. (2005) "West Nile virus-associated flaccid paralysis." *Emerg. Infect. Dis.*, 11, 1021–1027.

Sejvar, J.J.; Marfin, A.A. (2006) "Manifestations of West Nile neuroinvasive disease." *Rev. Med. Virol.*, 16, 209–224.

- Shimoni, Z.; Niven, M.J.; Pitlick, S.; Bulvik, S. (2001) "Treatment of West Nile virus encephalitis with intravenous immunoglobulin." *Emerg. Infect. Dis.*, 7, 759.
- Shrestha, B., T. Wang, et al. (2006). "Gamma interferon plays a crucial early antiviral role in protection against West Nile virus infection." *J Virol* 80(11): 5338-48.
- Smith, R.D.; Konoplev, S.; DeCourten-Myers, G.; Brown, T. (2004) "West Nile virus encephalitis with myositis and orchitis." *Hum. Pathol.* 2004, 35, 254–258.
- Smithburn K.C., Hughs T.P., Burke A.W., Paul J.H. (1940)." A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda" *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 20:471–492.
- Sotelo E, Llorente F, Rebollo B, Camunas A, Venteo A, Gallardo C, Lubisi A, Rodriguez MJ, Sanz AJ, Figuerola J, Jimenez-Clavero MA,. (2011) " Development and evaluation of a new epitope-blocking ELISA for universal detection of antibodies to West Nile virus." *J Virol Methods*, 174:35-41.
- Southern, P. M., Jr., J. W. Smith, et al. (1969). "Clinical and laboratory features of epidemic St. Louis encephalitis." *Ann Intern Med* 71(4): 681-9.
- Swayne DE, Beck JR, Zaki S. (2000). "Pathogenicity of West Nile virus for turkeys." *Avian Dis* 44(4): 932-7.
- Tardei G, Ruta S, Chitu V, Rossi C, Tsai TF, Cernescu C,. (2000) "Evaluation of immunoglobulin M (IgM) and IgG enzyme immunoassays in serologic diagnosis of West Nile Virus infection." *J Clin Microbiol* 2000, 38:2232-2239.
- Tesh, R.B.; Travassos da Rosa, A.P.; Guzman, H.; Araujo, T.P.; Xiao, S.Y. Immunization with heterologous flaviviruses protective against fatal West Nile encephalitis. *Emerg. Infect. Dis.* 2002, 8, 245–251.
- Traore-Lamizana, M.; Fontenille, D.; Diallo, M.; Ba, Y.; Zeller, H.G.; Mondo, M.; Adam, F.; Thonon, J.; Maiga, A. (2001) "Arbovirus surveillance from 1990 to 1995 in the Barkedji area (Ferlo) of Senegal, a possible natural focus of Rift Valley fever virus." *J. Med. Entomol.*, 38, 480–492.
- Tsai TF, Popovici F, Cernescu C, Campbell GL, Nedelcu NI. (1998) "West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania." *Lancet*; 352: 767-71.
- Uchil PD, Kumar AV, Satchidanandam V, (2006) "Nuclear localization of flavivirus RNA synthesis in infected cells." *J Virol.* Jun;80(11):5451-64.
- Vargin, V. V. and B. F. Semenov (1986). "Changes of natural killer cell activity in different mouse lines by acute and asymptomatic flavivirus infections." *Acta Virol* 30(4): 303-8.
- Vazquez A, Sanchez-Seco MP, Ruiz S, et al. (2010) "Putative new lineage of West Nile virus, Spain." *Emerg Infect Dis.*;16(3):549–552.
- Venter, M.; Swanepoel, R. (2010) "West Nile virus lineage 2 as a cause of zoonotic neurological disease in humans and horses in southern Africa." *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 10,2 659–664

Verma, S.; Kumar, M.; Gurjav, U.; Lum, S.; Nerurkar, V.R. (2010) " Reversal of West Nile virus-induced blood–brain barrier disruption and tight junction proteins degradation by matrix metalloproteinases inhibitor." *Virology*, 397, 130–138.

Verma, S.; Lo, Y.; Chapagain, M.; Lum, S.; Kumar, M.; Gurjav, U.; Luo, H.; Nakatsuka, A.; Nerurkar, V.R. (2009) "West Nile virus infection modulates human brain microvascular endothelial cells tight junction proteins and cell adhesion molecules: Transmigration across the in vitro blood-brain barrier." *Virology*, 385, 425–433.

Walewski, J. L., T. R. Keller, et al. (2001). "Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame." *Rna* 7(5): 710-21.

Yamshchikov, G., V. Borisevich, et al. (2005). "The suitability of yellow fever and Japanese encephalitis vaccines for immunization against West Nile virus." *Vaccine* 23(39):4785-92.

Yang JS, Ramanathan MP, Muthumani K, Choo AY, Jin SH, Yu QC, Hwang DS, Choo DK, Lee MD, Dang K, Tang W, Kim JJ, Weiner DB. (2002). "Induction of inflammation by West Nile virus capsid through the caspase-9 apoptotic pathway." *Emerg Infect Dis* 8(12): 1379-84.

Yim R, Posfay-Barbe KM, Nolt D, Fatula G, Wald ER. (2004). "Spectrum of clinical manifestations of West Nile virus infection in children." *Pediatrics* 114(6): 1673-5.

Zehender, G.; Ebranati, E.; Bernini, F.; Lo Presti, A.; Rezza, G.; Delogu, M.; Galli, M.; Ciccozzi, M. (2011) "Phylogeography and epidemiological history of West Nile virus genotype 1a in Europe and the Mediterranean basin". *Infect. Genet. Evol.*, 11, 646–653.

ATTIVITA' SVOLTE NEL CORSO DEL DOTTORATO

ATTIVITA' LAVORATIVA (svolta presso il "Centro Studi e Ricerche di Sanità e Veterinaria dell'Esercito" di Roma):

- 2012: attività di ricerca finanziata da una borsa di studio dell'Università di Tor Vergata sul tema "Caratterizzazione molecolare degli Agenti B"
- 2013: attività di ricerca finanziata da una borsa di studio dell'Università di Tor Vergata sul tema "Caratterizzazione di nuovi anticorpi monoclonali diretti contro le tossine botuliniche".
- 2014: attività di ricerca finanziata dal Ministero della Difesa nell'ambito del progetto "Aptameri BW. Sensore per la determinazione delle spore di antrace."

PARTECIPAZIONE A SEMINARI E CONVEGNI:

- **NATO HFM RTG-230 2nd MEETING**
(Detection and identification methods for zoonotic and vector-borne agents.)
Roma 18-20 dicembre 2012
- " **Le offese biologiche alla luce delle nuove conoscenze sui genomi: dalla meta genomica all'era post-genomica**" - Centro Studi e Ricerche di Sanità e Veterinaria – Roma, 27 giugno 2013
- " **Nuovi orizzonti degli effetti biologici delle radiazioni ionizzanti**" – Centro Studi e Ricerche di sanità e Veterinaria – Roma 5 dicembre 2013
- **NATO HFM RTG-230 4th MEETING**
(Detection and identification methods for zoonotic and vector-borne agents.)
Roma 17-19 marzo 2014

PUBBLICAZIONI:

- Faggioni G, Pomponi A, De Santis R, Masuelli L, Ciammaruconi A, Monaco F, Di Gennaro A, Marzocchella L, Sambri V, Lelli R, Rezza G, Bei R, Lista F.
West Nile alternative open reading frame (N-NS4B/WARF4) is produced in infected West Nile Virus (WNV) cells and induces humoral response in WNV infected individuals.
Virol J. 2012 Nov 22;9:283. doi: 10.1186/1743-422X-9-283.

- Ciccozzi M, Lo Presti A, Cella E, Giovanetti M, Lai A, El-Sawaf G, Faggioni G, Vescio F, Al Ameri R, De Santis R, Helaly G, Pomponi A, Metwally D, Fantini M, Qadi H, Zehender G, Lista F, Rezza G.
Phylogeny of Dengue and Chikungunya viruses in Al Hudayda governorate, Yemen.
Infect Genet Evol. 2014 Oct;27:395-401

- Rezza G, El-Sawaf G, Faggioni G, Vescio F, Al Ameri R, De Santis R, Helaly G, Pomponi A, Metwally D, Fantini M, Qadi H, Ciccozzi M, Lista F.
Co-circulation of Dengue and Chikungunya Viruses, Al Hudaydah, Yemen, 2012.
Emerg Infect Dis. 2014 Aug;20(8):1351-4.

- Faggioni G, De Santis R, Pomponi A, Fantini M, Savini G, Monaco F, Polci A, Bei R, Lista F.
Rapid molecular detection and genotyping of West Nile Virus lineages 1 and 2 by real time PCR and melting curve analysis.
J Virol Methods. 2014 Oct ;207:54-9.