



UNIVERSITÀ DI PARMA

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

**DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE CHIRURGICHE E MICROBIOLOGIA APPLICATA
CICLO XXXI**

**L'INFEZIONE DA CITOMEGALOVIRUS UMANO
IN PARTICOLARI CATEGORIE DI SOGGETTI:
POSSIBILI FATTORI DI VIRULENZA E
RISPOSTE DELL'OSPITE**

Coordinatore:
Chiar.mo Prof. Francesco Ceccarelli

Tutore:
Chiar.ma Prof.ssa Maria Cristina Arcangeletti

Dottoranda: Dott.ssa Clara Maccari

Anni 2015/2016 – 2017/2018

INDICE

1. Riassunto	4
2. Introduzione	10
2.1 Citomegalovirus umano	10
2.1.1 Il virione di citomegalovirus	14
2.1.2 Il genoma di citomegalovirus	15
2.2 Infezione da citomegalovirus umano	17
2.2.1 Cellule permissive all'infezione da citomegalovirus	17
2.2.2 Infezione litica di citomegalovirus	18
2.2.2.1 Fasi del ciclo replicativo litico di citomegalovirus	18
2.2.2.2 Prodotti genici virali nell'ambito del ciclo replicativo litico	21
2.2.2.3 Le glicoproteine del pericapside di citomegalovirus quali fattori di virulenza	28
2.2.3 Infezione latente e riattivazione di citomegalovirus	30
2.2.3.1 Modelli <i>in vitro</i> per lo studio delle diverse interazioni citomegalovirus-cellula ospite	31
2.2.4 Effetti dell'infezione da citomegalovirus sul metabolismo della cellula ospite: alterazione del ciclo cellulare	32
2.2.5 Infezione da citomegalovirus e sorveglianza immunitaria dell'ospite	33
2.2.5.1 Strategie di evasione dalla risposta immunitaria attuate da citomegalovirus	33
2.2.5.2 Sottopopolazioni di linfociti T citomegalovirus-specifici	35
3. Obiettivi della ricerca	38
3.1 Validazione di un modello di infezione <i>in vitro</i> per lo studio della riattivazione di citomegalovirus	38
3.1.1 Premessa	38
3.1.2 Obiettivi	39
3.2 Ruolo dell'infezione da citomegalovirus in soggetti anziani con <i>ictus</i> ischemico	40
3.2.1 Premessa	40
3.2.2 Obiettivi	40
3.3 Ruolo dell'infezione da citomegalovirus in pazienti affetti da sclerosi sistemica	42

3.3.1 Premessa.....	42
3.3.2 Obiettivi.....	45
4. Materiali e metodi.....	46
4.1 Validazione di un modello di infezione <i>in vitro</i> per lo studio della riattivazione di citomegalovirus.....	46
4.1.1 Colture cellulari.....	46
4.1.2 Virus.....	47
4.1.3 Infezione virale dei modelli latente e riattivato.....	47
4.1.4 Analisi citofluorimetrica di monociti e macrofagi THP-1 non infettati.....	48
4.1.5 Analisi della progenie virale.....	48
4.1.6 Valutazione dell'infettività virale mediante titolazione della dose infettante il 50% delle colture cellulari (TCID ₅₀).....	50
4.1.7 Estrazione degli esosomi.....	50
4.1.8 Elettroforesi su gel di poliacrilamide ("Sodium Dodecyl Sulphate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis"; SDS-PAGE).....	51
4.1.9 Western blotting.....	52
4.2 Ruolo dell'infezione da citomegalovirus in soggetti anziani con <i>ictus</i> ischemico.....	53
4.2.1 Soggetti arruolati nello studio e raccolta dei campioni di sangue venoso periferico.....	53
4.2.2 Valutazione della risposta anticorpale nei confronti di citomegalovirus.....	54
4.2.3 Quantificazione del DNA di citomegalovirus mediante Real-Time PCR.....	54
4.2.4 Arricchimento e differenziamento di monociti.....	54
4.2.5 Ricerca di specifiche sequenze dei geni gN e gO di citomegalovirus mediante nested PCR.....	55
4.2.6 Polimorfismo di lunghezza dei frammenti di restrizione.....	56
4.3 Ruolo dell'infezione da citomegalovirus in pazienti affetti da sclerosi sistemica.....	57
4.3.1 Soggetti arruolati nello studio e raccolta dei campioni di sangue venoso periferico.....	57
4.3.2 Valutazione della risposta anticorpale nei confronti di citomegalovirus.....	58
4.3.3 Separazione dei linfomonociti e valutazione delle risposte linfocitarie T citomegalovirus-specifiche.....	59
4.3.4 Analisi citofluorimetrica.....	61
4.3.5 Analisi statistica.....	62

5. Risultati	63
5.1 Validazione di un modello di infezione <i>in vitro</i> per lo studio della riattivazione di citomegalovirus.....	63
5.1.1 Verifica dell'avvenuto differenziamento (indotto mediante esteri del forbolo) dei monociti THP-1 a macrofagi.....	63
5.1.2 Analisi della progenie virale derivata da cellule THP-1 utilizzate come modello di riattivazione.....	65
5.1.3 Analisi degli esosomi.....	70
5.2 Ruolo dell'infezione da citomegalovirus in soggetti anziani con <i>ictus</i> ischemico.....	72
5.2.1 Valutazione della risposta anticorpale nei confronti di citomegalovirus e quantificazione del DNA virale mediante Real-Time PCR.....	72
5.2.2 Genotipizzazione delle glicoproteine gN e gO del pericapside di citomegalovirus.....	74
5.3 Ruolo dell'infezione da citomegalovirus in pazienti affetti da sclerosi sistemica.....	76
5.3.1 Popolazione oggetto dello studio.....	76
5.3.2 Risposte linfocitarie T CD4+ e CD8+ totali.....	78
5.3.3 Risposte linfocitarie T CD4+ e CD8+ citomegalovirus -specifiche.....	80
5.3.3.1 Risposte cellulari T CD4+ e CD8+ virus-specifiche nei pazienti con sclerosi sistemica vs soggetti sani.....	80
5.3.3.2 Risposte cellulari T CD4+ vs risposte cellulari T CD8+ virus-specifiche nei pazienti con sclerosi sistemica.....	85
5.3.3.3 Risposte cellulari T CD8+ nei pazienti con sclerosi sistemica rispetto alla durata della malattia.....	86
5.3.3.4 Risposta linfocitaria T CD8+ citomegalovirus-specifica in relazione al "modified Rodnan skin score".....	87
6. Discussione e conclusioni	88
6.1 Validazione di un modello di infezione <i>in vitro</i> per lo studio della riattivazione di citomegalovirus.....	88
6.2 Ruolo dell'infezione da citomegalovirus in soggetti anziani con <i>ictus</i> ischemico.....	93
6.3 Ruolo dell'infezione da citomegalovirus in pazienti affetti da sclerosi sistemica.....	97
7. Referenze bibliografiche	103

1. RIASSUNTO

Le indagini svolte nel corso dei tre anni di Dottorato di Ricerca sono state rivolte allo studio di citomegalovirus umano (HCMV) e dei possibili fattori di virulenza e meccanismi molecolari che tale agente è in grado di mettere in atto e che lo rendono, in specifiche situazioni, di rilevante interesse medico.

Come gli altri membri della famiglia *Herpesviridae*, HCMV dopo l'infezione primaria persiste come virus latente, condizione da cui può estemporaneamente riattivarsi in maniera inapparente o, al contrario, con gravi conseguenze in categorie di individui con alterazioni della risposta immunitaria, a rischio di sviluppare patologie gravi e non di rado mortali.

Sulla base di tali premesse, i meccanismi che favoriscono la transizione dalla latenza alla riattivazione virale sono di particolare rilevanza ed il loro studio impegna, ancora oggi, numerosi gruppi di ricerca, non senza difficoltà. Infatti, è noto come le principali sedi di latenza di HCMV siano rappresentate dai monociti del sangue periferico e dai loro progenitori CD34+ del midollo osseo e che il differenziamento dei monociti a macrofagi *in vivo* costituisca un evento chiave legato alla riattivazione del virus. D'altra parte, gli studi *ex vivo* sono fortemente ostacolati dal fatto che il numero di cellule infettate e la quantità di DNA di HCMV reperibile nelle sedi naturali di latenza sono estremamente esigue.

In tale contesto, nel corso del primo anno di Dottorato, utilizzando una linea monocitaria/macrofagica umana (cellule THP-1), è stato messo a punto e validato un modello di infezione *in vitro* per lo studio della riattivazione di HCMV che, ricalcando quanto avviene *in vivo*, permettesse, al contempo, di fruire di un numero adeguato di

cellule infettate rispetto al sistema naturale. Tale studio è stato oggetto di pubblicazione su rivista internazionale (si veda *Nota 1*).

L'esperienza acquisita in tale ambito, così come nella ricerca di marcatori di virulenza di HCMV che differenziano i ceppi virali circolanti in natura, ha anche reso possibile il coinvolgimento attivo del gruppo di ricerca di Virologia dell'Università di Parma nel Programma Regione-Università (2014-2016) ammesso a finanziamento, dal titolo: "A tailored approach to the immune-monitoring and clinical management of viral and autoimmune diseases" ("Workpackage 4": "HCMV infection in the elderly"). Tale progetto è focalizzato sulla Medicina personalizzata e sulla correlata ricerca di marcatori prognostici di differenti quadri patologici; in particolare, al nostro gruppo di ricerca, in collaborazione con un secondo gruppo, è stato affidato lo studio sul ruolo di HCMV in soggetti anziani con *ictus* ischemico.

In tale categoria di individui, rappresentata da soggetti adulti per la quasi totalità positivi per anticorpi anti-HCMV, la riattivazione del virus endogeno rappresenta un evento temibile. In particolare, è stato evidenziato come, nei soggetti anziani, il mantenimento dell'equilibrio fra infezione latente da HCMV e risposta immunitaria antivirale comporti l'espansione di quest'ultima ed un riassetto del sistema immunitario; a tale riguardo, è stata dimostrata una correlazione tra il deterioramento delle condizioni di salute degli anziani e l'aumento in termini quantitativi della risposta immunitaria anti-HCMV. L'ipotesi emergente è che, sottesi a questo evento, vi possano essere episodi di riattivazione virale sistemica o localizzata.

In tale contesto, nel corso del secondo anno di Dottorato lo studio è stato focalizzato sugli aspetti sopra menzionati, prendendo in considerazione una coorte di soggetti anziani con *ictus* ischemico ricoverati presso l'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma. In primo luogo, è stato verificato lo stato immunitario di questi pazienti nei

confronti di HCMV ed è stata effettuata la ricerca del DNA di HCMV dal plasma degli stessi per la determinazione della viremia (possibile riattivazione di HCMV). I risultati emersi dalla determinazione degli anticorpi anti-HCMV, che hanno indicato una sieroprevalenza del 93%, sono in accordo con il fatto che la maggior parte degli individui contrae l'infezione primaria da HCMV durante l'infanzia o l'età adulta. Di conseguenza, come atteso, la quasi totalità dei soggetti inclusi in questo studio sono risultati potenzialmente a rischio di riattivazione virale. Per quanto riguarda la viremia, il basso numero di copie di DNA di HCMV, rilevato nell'11.7% dei pazienti sieropositivi per HCMV, suggerisce che in questa categoria di pazienti il virus possa sfuggire alla sorveglianza immunologica ed alternare stati di latenza con stati di replicazione, verosimilmente associata ad episodi di riattivazione virale localizzata.

Parallelamente, le competenze acquisite dallo studio svolto durante il primo anno di Dottorato (messa a punto di un sistema sperimentale di riattivazione virale) sono state applicate per conseguire il differenziamento dei monociti a macrofagi, ottenuti a partire dai campioni ematici dei soggetti con *ictus* ischemico considerati nello studio, al fine di agevolare il possibile rilevamento del DNA di HCMV anche allo stato latente. Tale fase si è rivelata di notevole utilità per permettere la successiva attuazione di indagini molecolari volte ad individuare differenti genotipi di HCMV relativi a specifiche glicoproteine del pericapside virale. Queste ultime sono prodotti di geni polimorfici e sono considerate potenziali marcatori di differenti gradi di virulenza dei ceppi virali circolanti. Attraverso amplificazione di specifici frammenti genici del DNA di HCMV e digestione con enzimi di restrizione, è stata effettuata l'identificazione delle diverse combinazioni genotipiche nell'ambito dei geni di HCMV che codificano per le glicoproteine N e O del pericapside virale, quali riconosciuti fattori di virulenza. I risultati ottenuti suggeriscono che gN3-gO1 e gN3-gO2

potrebbero essere le combinazioni genotipiche ricorrenti associate ad una positività per DNAemia virale in questa categoria di soggetti.

Nel corso del terzo anno di Dottorato, lo studio su HCMV è stato focalizzato su un'altra categoria di soggetti "a rischio", considerati nell'ambito di un Progetto di Rilevante Interesse Nazionale (PRIN) 2015, ammesso a finanziamento, dal titolo: "Impatto dell'infezione da virus a DNA sullo sviluppo di patologie autoimmuni: *focus* sulla sclerosi sistemica", che ha attivamente coinvolto il gruppo di ricerca di Virologia dell'Università di Parma.

A tale riguardo, HCMV è stato recentemente messo in relazione anche all'insorgenza di patologie autoimmuni ed è stato indicato, in particolare, tra i possibili fattori scatenanti la sclerosi sistemica (SSc), una malattia caratterizzata da danno endoteliale, fibrosi di cute ed organi interni ed anomalie immunitarie, sia umorali, sia cellulari. L'eziopatogenesi di tale malattia resta sconosciuta ed è verosimilmente multifattoriale; come per altre condizioni autoimmuni, si ipotizza il ruolo di fattori scatenanti tossici e/o infettivi su un "background" genetico predisponente, nell'ambito di un complesso processo "multi-step". Costituiscono ipotetici fattori scatenanti la SSc alcuni virus, accomunati dalla capacità di instaurare infezione latente/cronica e di infettare le tipologie cellulari coinvolte nella patogenesi della malattia, quali HCMV. L'esigenza dell'approfondimento di queste ricerche, volte ad appurare il ruolo patogenetico di HCMV nella SSc, è dettata da una serie di dati emersi da diversi studi. In particolare, è stato evidenziato un ruolo rilevante delle risposte linfocitarie T nella patogenesi della SSc, con possibile contributo delle stesse alla modulazione della fibrosi e al danno vascolare, anche se, ad oggi, la tipologia e la funzione di queste specifiche sottopopolazioni di linfociti T non sono ancora state caratterizzate in relazione alle diverse fasi della patologia. In particolare, i linfociti T CD8+

identificati nel sangue periferico di pazienti con SSc presentano un'espansione oligoclonale antigene-dipendente, la cui specificità tuttavia non è ancora nota. HCMV è stato descritto come uno degli agenti in grado di contribuire all'espansione di specifiche sottopopolazioni di linfociti T CD8+ con fenotipo della memoria ed effettore in relazione all'aumentare dell'età (fenomeno noto come "memory inflation").

Sulla base di queste considerazioni, è stato effettuato uno studio relativo al ruolo dell'infezione da HCMV in soggetti affetti da SSc, focalizzando l'attenzione sulla risposta immunitaria cellulo-mediata. Nello specifico, gli obiettivi dello studio hanno riguardato: (i) la valutazione quantitativa delle risposte dei linfociti T CD4+ e T CD8+ in seguito a stimolazione con antigeni immunodominanti di HCMV (in particolare pp65, IE1 e UL94) nei soggetti affetti da SSc a confronto con soggetti sani, (ii) la valutazione delle possibili differenze tra le risposte linfocitarie T CD4+ e le risposte linfocitarie T CD8+ HCMV-specifiche nei pazienti affetti da SSc e (iii) la valutazione delle possibili differenze delle risposte linfocitarie HCMV-specifiche in relazione alla durata della malattia e ai principali segni clinici riscontrati nei pazienti. A seguito dell'analisi statistica, applicata al fine di valutare la significatività delle differenze riscontrate, le risposte linfocitarie T CD8+ HCMV-specifiche sono risultate: (i) significativamente più elevate nei pazienti affetti da SSc rispetto ai soggetti sani, (ii) significativamente più elevate rispetto alle risposte linfocitarie T CD4+ HCMV-specifiche nei pazienti e (iii) connesse ad una maggiore durata della malattia e ad un peggioramento del modified Rodnan skin score (metodo standardizzato e validato per la valutazione della gravità della malattia in relazione all'entità della fibrosi in questi pazienti). I risultati ottenuti in questo studio rinforzano l'ipotesi di un coinvolgimento di HCMV nella patogenesi di questa malattia autoimmune. In particolare, cicli di riattivazione di HCMV più frequenti nei pazienti affetti da SSc

potrebbero spiegare l'incremento dei linfociti T CD8+ HCMV-specifici con fenotipo di memoria ed effettore; questo potrebbe contribuire all'aggravamento dei processi infiammatori caratteristici della SSc. Tale studio è stato oggetto di pubblicazione su rivista internazionale (si veda *Nota 2*).

Nota 1: Arcangeletti MC, Vasile Simone R, Rodighiero I, De Conto F, Medici MC, **Maccari C**, Chezzi C, Calderaro A. Human cytomegalovirus reactivation from latency: validation of a "switch" model *in vitro*. *Virology*. 2016;13(1):179.

Nota 2: Arcangeletti MC, **Maccari C**, Vescovini R, Volpi R, Giuggioli D, Sighinolfi G, De Conto F, Chezzi C, Calderaro A, Ferri C. A paradigmatic interplay between human cytomegalovirus and host immune system: possible involvement of viral antigen-driven CD8+ T cell responses in systemic sclerosis. *Viruses*. 2018;10(9). Pii:E508.

2. INTRODUZIONE

2.1 CITOMEGALOVIRUS UMANO

Citomegalovirus umano (HCMV), anche noto come herpesvirus umano 5 (HHV-5), è un virus ubiquitario membro della famiglia *Herpesviridae*, sottofamiglia *Betaherpesvirinae*.

L'infezione da HCMV è estremamente comune nella popolazione a livello mondiale (valori di sieroprevalenza compresi tra il 50% e l'85% nelle aree industrializzate ed oltre il 90% nei Paesi in via di sviluppo), con un aumento della sieropositività proporzionale all'età¹⁻⁸. Tale elevata diffusione di HCMV è supportata dal fatto che l'infezione decorre solitamente in modo asintomatico o paucisintomatico in soggetti immunocompetenti ed è seguita da una eliminazione prolungata del virus per mezzo di diversi fluidi corporei (saliva, urina, feci, lacrime, sangue, secrezioni cervicali, sperma) attraverso i quali può avvenire il contagio per contatto interumano. Oltre a questa via di trasmissione, l'infezione da HCMV può essere contratta per cause iatrogene (trasfusioni e trapianti di midollo osseo o d'organo solido) e per trasmissione verticale⁹⁻¹¹.

Analogamente ai membri della famiglia di appartenenza, a seguito dell'infezione primaria e delle possibili ricorrenze HCMV persiste nell'organismo infettato come virus latente; tuttavia, molteplici fattori possono indurre la riattivazione di HCMV, la quale, dipendentemente dallo stato immunitario dell'ospite, può essere clinicamente silente oppure sintomatica¹²⁻¹⁶.

Tale agente ha un rilevante impatto sulla salute umana e può causare gravi patologie con coinvolgimento di più organi in particolari categorie di individui. Una di tali

categorie è rappresentata dai neonati nati da madre con infezione (generalmente primaria) da HCMV, per i quali il possibile contagio intrauterino può costituire un'importante causa di difetti dello sviluppo psicomotorio, sequele neurosensoriali tardive oppure, nei casi più gravi, morte prenatale¹⁷⁻²³. A tale riguardo, dati recenti di letteratura sottolineano come il classico assioma incentrato sulla protezione esercitata dagli anticorpi materni anti-HCMV acquisiti in epoca preconcezionale, rispetto agli esiti dell'infezione congenita, non sia esaustivamente comprovato dai dati emersi da studi effettuati su coorti di donne in gravidanza. In tali studi, malgrado la presenza di immunità specifica per HCMV acquisita dalle donne prima della gravidanza, è stato riscontrato un alto tasso di infezioni congenite da HCMV^{11,24}. Le cause evocate sarebbero da ricercare, in particolare, nella capacità di tale agente virale di evadere le risposte specifiche dell'ospite ed al fatto che in natura esistono diversi ceppi circolanti di HCMV con differenti gradi di virulenza, che potrebbero re-infettare un soggetto e non essere controllati dalla risposta immunitaria specifica sviluppata nei confronti di un precedente ceppo virale^{11,24}.

L'infezione da HCMV può, inoltre, rendersi responsabile di quadri patologici gravi nei soggetti che presentano un sistema immunitario compromesso per cause naturali (e.g. soggetti anziani²⁵⁻³¹), iatrogene (e.g. soggetti sottoposti a trapianto di midollo osseo o d'organo solido³²⁻³⁹) o a seguito di infezione da parte di specifici agenti (e.g. individui con infezione da HIV³⁹⁻⁴⁸). In particolare, l'alterato stato immunitario in queste categorie di soggetti aumenta il rischio di contrarre un'infezione primaria o, più frequentemente, di sviluppare malattia da HCMV in seguito a riattivazione di un'infezione latente.

Nell'ambito delle categorie di soggetti sopramenzionate, è importante sottolineare che, recentemente, un numero crescente di dati di letteratura ha correlato l'infezione

da HCMV nei soggetti anziani e lo sviluppo di patologie croniche associate all'invecchiamento, fra cui diverse malattie cardiovascolari (ipertensione, aterosclerosi, infarto del miocardio, *ictus* ischemico)^{25-28,31,49,50}. Nello specifico, è stato evidenziato come, nei soggetti anziani, il mantenimento dell'equilibrio fra infezione latente da HCMV e risposta immunitaria antivirale comporti l'espansione dei meccanismi di controllo dell'infezione ed un riassetto del sistema immunitario; in tale contesto, è stata dimostrata una correlazione tra il deterioramento delle condizioni di salute degli anziani e l'aumento della risposta immunitaria anti-HCMV^{29,30,51}. L'ipotesi emergente è che, sottesi a questo evento, vi possano essere episodi di riattivazione virale sistemica o localizzata e/o che specifiche risposte immunitarie anti-HCMV possano essere correlate con diversi quadri clinici e complicanze²⁵.

Per quel che riguarda un'altra categoria di soggetti sopra citata, rappresentata dai soggetti sottoposti a trapianto di midollo osseo o d'organo solido, HCMV rappresenta la principale causa di morbilità e mortalità durante i primi sei mesi dopo il trapianto⁵². L'incidenza dell'infezione/riattivazione da HCMV dipende da vari fattori, come la presenza di risposta immunitaria specifica anti-HCMV del donatore e del ricevente, l'organo trapiantato, le strategie di prevenzione adottate e la necessaria somministrazione di farmaci immunosoppressivi; tale evento è spesso caratterizzato da febbre, leucopenia, trombocitopenia, con o senza disfunzione d'organo specifico. Tra i più rilevanti effetti diretti o indiretti dell'infezione da HCMV, si annoverano polmonite virale e rigetto dell'organo trapiantato, fino a morte^{16,53-60}.

Altri soggetti, tra i più esposti al rischio di riattivazione del virus latente, sono quelli con infezione da HIV, nei quali tale evento può rendersi causa di retiniti, ulcere esofagee e processi infiammatori intestinali⁶¹⁻⁶³.

Più recentemente, HCMV è stato messo in relazione all'insorgenza di ulteriori patologie, tra cui diversi tipi di tumore (e.g. tumore della mammella, tumore del colon-retto, glioblastoma) ⁶⁴⁻⁷¹, malattie degenerative, compreso l'Alzheimer ^{72,73} e malattie autoimmuni (e.g. sclerosi sistemica, artrite reumatoide, *lupus* eritematoso sistemico, diabete mellito di tipo 1) ⁷⁴⁻⁸¹. Per quanto attiene a quest'ultima categoria di soggetti, sono crescenti i dati a supporto di un ruolo di HCMV quale possibile fattore scatenante o comunque implicato nella eziopatogenesi di tali malattie autoimmuni, con particolare riguardo per la sclerosi sistemica (SSc), malattia caratterizzata da danno endoteliale, fibrosi di cute ed organi interni ed anomalie immunitarie, sia umorali, sia cellulari ^{77,79,82-84}.

Per comprendere i meccanismi sottesi allo sviluppo di quadri clinici potenzialmente così gravi, occorre sottolineare che l'esito dell'infezione da HCMV è il risultato di una serie di fattori, in parte legati all'ospite ed in parte al virus ⁸⁵. Tra i possibili fattori di virulenza e tropismo tissutale degli isolati clinici di HCMV sono ritenute determinanti la specificità genotipica e fenotipica del ceppo virale infettante ⁸⁶⁻⁹³.

Infine, è importante evidenziare che l'associazione tra HCMV e patologie così differenti tra loro è resa possibile dalla vasta tipologia di cellule suscettibili all'infezione *in vivo* (e.g. cellule epiteliali, fibroblastiche, stromali, neuronali, epatiche, muscolari lisce, endoteliali e diverse tipologie di cellule effettrici della risposta immune come cellule progenitrici della linea mieloide, cellule dendritiche, neutrofili, monociti e macrofagi) ^{79,94-100}. In particolare, il sistema monocita-macrofago costituisce la principale sede di latenza (monocita) ¹⁰¹⁻¹⁰³ ed il mezzo di disseminazione virale nell'organismo (macrofago tissutale) ^{12,13,104-107}.

2.1.1 Il virione di citomegalovirus

Il virione maturo di HCMV possiede una forma rotondeggiante e presenta un diametro compreso tra i 150-250 nm. Esso è composto da un nucleocapside a simmetria icosaedrica di circa 100 nm di diametro, costituito da 162 capsomeri prismatici (150 esameri più 12 pentameri), circondato da un involucro pericapsidico (“envelope”) ^{108,109}. Il pericapside è formato da un doppio strato fosfolipidico tipico delle membrane cellulari, su cui sono espressi diversi tipi di glicoproteine virus-specifiche, che costituiscono un importante bersaglio della risposta anticorpale e partecipano a diversi processi, tra cui la produzione di virioni infettanti, il legame virus-cellula e la diffusione del virus. Infine, tra il nucleocapside ed il pericapside si trova uno strato di materiale elettrondenso (fibroso e granulare) di natura proteica, denominato “tegumento” ¹¹⁰⁻¹¹² (Figura 1).

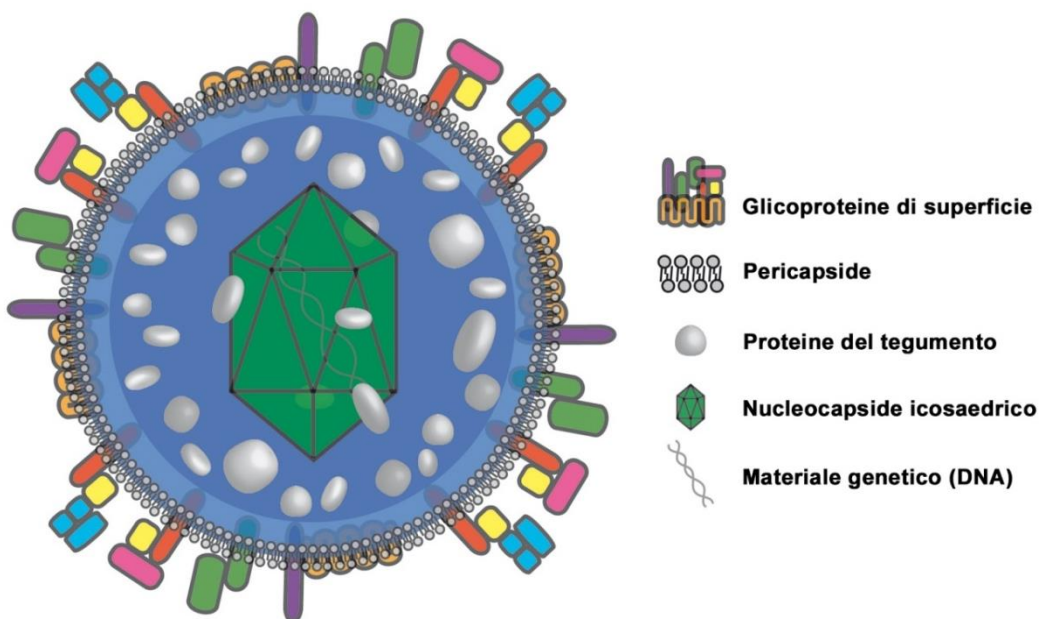


Figura 1. Rappresentazione schematica della struttura del virione di HCMV [immagine modificata da: “Gardner T, Tortorella D. Virion Glycoprotein-Mediated Immune Evasion by Human Cytomegalovirus: a Sticky Virus Makes a Slick Getaway. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2016;80(3):663–77”].

Oltre ai virioni maturi, le cellule in coltura infettate da HCMV generano altri due tipi di particelle virali difettive: i “Non Infectious Enveloped Particles” (NIEP) e i “Dense Bodies” (DB) ¹¹³⁻¹¹⁸. I NIEP sono provvisti di capsid, tegumento e pericapside virale, ma sono privi del DNA virale. Per quanto riguarda i DB, essi sono dotati di un pericapside analogo a quello del virione maturo, ma sono privi sia di genoma virale, sia di struttura capsidica interna. La quantità di queste diverse particelle di HCMV dipende dal ceppo virale infettante e dal numero di passaggi in coltura ^{117,119}.

2.1.2 Il genoma di citomegalovirus

Il genoma di HCMV consiste in una molecola di DNA lineare a doppia elica di lunghezza compresa tra 200 e 240 Kb e di peso molecolare pari a 150-155 x 10⁶ Dalton; tra i virus erpetici, le dimensioni del genoma di HCMV sono le maggiori e ne riflettono una maggiore complessità ^{115,120}. Il genoma è composto da due sequenze nucleotidiche di diversa lunghezza, denominate “Unique Long” (UL) e “Unique Short” (US), fiancheggiate da brevi sequenze di basi ripetute. Il genoma di HCMV può essere organizzato in quattro forme isomeriche a seguito dell’ inversione delle regioni UL e US; tale inversione è mediata da sequenze ripetute dirette (a, b, c), che si trovano alle estremità del genoma, da elementi ripetuti e invertiti (a’, b’, c’), localizzati a livello della giunzione UL-US, e dalla peculiare distribuzione della sequenza “a”, presente con orientamento invertito (a’) anche ad un’estremità del genoma (Figura 2). Infine, due segnali di regolazione in *cis*, *pac-1* e *pac-2*, contenuti all’interno della sequenza “a”, partecipano all’inversione genomica, al taglio e all’incapsidamento del genoma virale ^{115,119,121}.

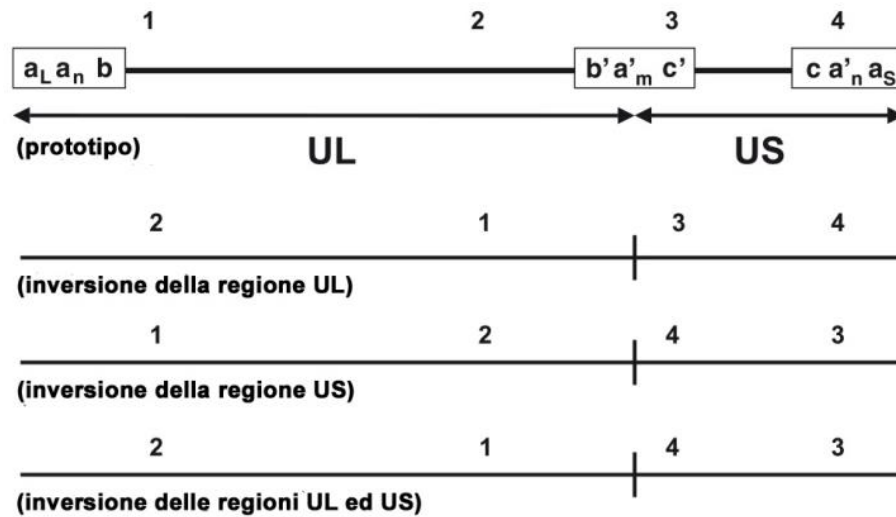


Figura 2. Rappresentazione schematica delle quattro forme isomeriche del genoma di HCMV [immagine modificata da: "Landolfo S. et al. The human cytomegalovirus. *Pharmacol Ther.* 2003;98(3):269–97"].

Il virione maturo di HCMV contiene anche due classi di molecole di RNA. Un tipo di RNA genera strutture ibride RNA-DNA all'interno dell'origine di replicazione litica, chiamata "oriLyt", la cui funzione potrebbe essere quella di facilitare la replicazione del DNA virale^{122,123}; la seconda tipologia di RNA viene "impacchettata" all'interno dei virioni infettanti e viene tradotta subito dopo l'ingresso del virus nella cellula ospite, consentendo l'espressione dei geni virali prima ancora che si attivi la trascrizione del genoma virale^{124–126}.

2.2 INFEZIONE DA CITOMEGALOVIRUS UMANO

2.2.1 Cellule permissive all'infezione da citomegalovirus

Come è noto, HCMV possiede un elevato tropismo per un ampio spettro di cellule *in vivo*, incluse le cellule parenchimali, quelle del tessuto connettivo e vari tipi di cellule ematopoietiche^{98,115,127-129}. Tuttavia, l'esito dell'infezione varia notevolmente in relazione alla tipologia cellulare coinvolta. In particolare, *in vivo*, tale agente è in grado di replicare in modo produttivo in fibroblasti e in cellule muscolari lisce con innesco e completamento del ciclo litico replicativo e conseguente produzione di progenie virale^{98,115,127-129}. Altre importanti tipologie cellulari suscettibili all'infezione da HCMV sono rappresentate dalle cellule endoteliali e dalle cellule epiteliali, le quali supportano livelli inferiori di replicazione, ma con una produzione persistente di particelle virali, facilitando in questo modo la diffusione del virus a livello sistemico^{98,115,127-129}. I monociti del sangue periferico e i loro progenitori CD34+ nel midollo osseo rappresentano, invece, le sedi di latenza di HCMV, nonché il principale mezzo di disseminazione virale a seguito del differenziamento a macrofagi o a cellule dendritiche^{12,13,101-105,130}.

Al contrario, *in vitro*, le uniche cellule in cui HCMV è in grado di replicare sono le cellule fibroblastoidi con corredo cromosomico diploide provenienti dalla specie ospite naturale *in vivo*, mentre cellule indifferenziate, trasformate o aneuploidi non sono suscettibili all'infezione^{127,131}. Nei fibroblasti, il ciclo di replicazione è lento (maggiore di 24 ore) e richiede un lungo periodo per indurre nelle cellule infettate un effetto citopatico con caratteristiche inclusioni nucleari e citoplasmatiche e morfologia allargata (citomegalia)^{115,127}.

2.2.2 Infezione litica di citomegalovirus

2.2.2.1 Fasi del ciclo replicativo litico di citomegalovirus

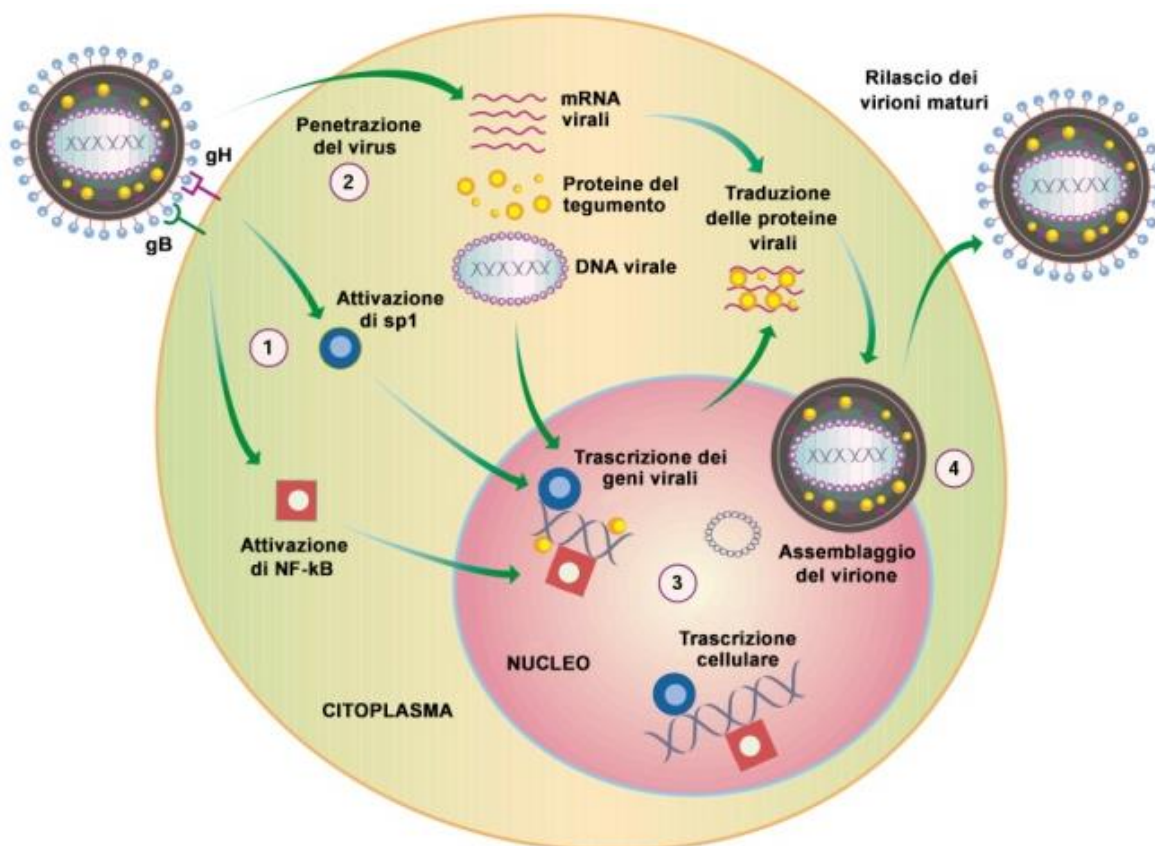


Figura 3. Rappresentazione schematica del ciclo replicativo litico virale di HCMV [immagine modificata da: “Huang E, Johnson R. Human cytomegalovirus – no longer just a DNA virus. *Nat Med.* 2000;6(8):863–4”].

Nonostante le conoscenze relative agli eventi iniziali del ciclo di replicazione di HCMV siano a tutt’oggi incomplete, è noto come il legame del virus alla superficie cellulare avvenga in modo rapido ed efficiente, sia in cellule permissive, sia in cellule non permissive. Ciò suggerisce una vasta distribuzione dei recettori cellulari riconosciuti da HCMV, che contribuisce all’ampio tropismo di tale agente; si ritiene, tuttavia, che dopo la fase di penetrazione possa avvenire un blocco

nell'espressione genica virale tale da rendere diverse tipologie di cellule non permissive alla replicazione di HCMV ¹³².

La penetrazione del virus è il risultato di una “cascata” di interazioni tra proteine virali e cellulari, che culmina nella fusione dell'involucro pericapsidico con la membrana plasmatica. Durante le prime interazioni virus-cellula (Figura 3 - ①), HCMV instaura un contatto con la superficie cellulare mediante un legame a bassa affinità tra la glicoproteina (g) “B” (gB) e i residui di eparan-solfato dei proteoglicani di membrana ⁸⁶⁻⁸⁸. Inoltre, un'altra glicoproteina virale, chiamata gN, è implicata sia nella fase di legame del virus alla cellula ospite, sia nella diffusione del virus nell'organismo ⁸⁹. Infine, si ritiene che le fasi conclusive della fusione dell'involucro virale con la membrana plasmatica richiedano un'ulteriore interazione tra il complesso gH-gL-gO di HCMV e recettori cellulari non ancora identificati ^{90,133}. Durante queste prime fasi, il legame delle glicoproteine virali di fusione con i rispettivi recettori cellulari innesca l'attivazione del “Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells” (NF-kB) e della “Stimulatory protein 1” (Sp1), fattori di trascrizione cellulari coinvolti in diversi processi, tra cui la regolazione della risposta immunitaria al fine di fronteggiare l'infezione ^{134,135}. Come già accennato, i recettori cellulari riconosciuti e legati dagli antirecettori virali di gB, gN e gH-gL-gO, sebbene abbondantemente espressi, sono scarsamente caratterizzati. In particolare, è stata dimostrata un'associazione delle glicoproteine gB e gH con le molecole chiamate “Toll-like receptor 2” (TLR2) e “Toll-like receptor 1” (TLR1), due recettori transmembrana la cui principale funzione è quella di mediare le fasi iniziali dell'immunità innata. In questo modo, viene attivata una cascata di eventi che culmina nell'attivazione del fattore di trascrizione NF-kB sopramenzionato e nella secrezione di citochine pro-infiammatorie ^{136,137}. Più

recentemente, anche TLR4 è stato indicato quale possibile molecola co-recettoriale in macrofagi ¹³⁸.

Dopo la fusione del pericapside con la membrana cellulare, avvengono l'adsorbimento e la penetrazione del virus nella cellula (Figura 3 - ②).

A questo punto, il nucleocapside, le proteine virali e gli mRNA virali vengono rilasciati nel citoplasma, dove questi ultimi vengono tradotti. Il nucleocapside virale viene quindi trasportato verso il nucleo, all'interno del quale viene rilasciato il genoma virale; qui il DNA virale circolarizza grazie alla presenza delle strutture palindromiche alle sue estremità e viene trascritto ad opera dell'enzima RNA polimerasi II cellulare e di altri fattori dell'apparato trascrizionale della cellula ospite (Figura 3 - ③) ^{119,139}. Sempre a livello del nucleo, il DNA virale viene replicato ed inserito nei capsidi preformati. La replicazione del DNA virale procede dall'origine di replicazione *ori_{Lyt}*, localizzata all'interno della regione UL, in modo bi-direzionale (modalità di replicazione "cerchio-rotante") ad opera della DNA polimerasi virus-specifica di tipo alfa ^{140,141}.

Successivamente, hanno inizio le fasi di assemblaggio del virione (Figura 3 - ④), durante le quali, per prima cosa, avviene la gemmazione delle particelle sub-virali attraverso la lamina interna della membrana nucleare, processo durante il quale le particelle acquisiscono alcune proteine del tegumento ed un pericapside provvisorio detto "primario" ^{142,143}. Il movimento intranucleare dei nucleocapsidi dipende dall'actina, mentre la gemmazione a livello della membrana nucleare interna è possibile grazie ad una parziale depolimerizzazione della lamina nucleare a seguito della fosforilazione delle proteine che la compongono ad opera di protein chinasi cellulari reclutate dal virus ^{144,145}. È importante evidenziare che i virioni dotati di pericapside primario differiscono notevolmente dalle particelle

mature, sia in termini di morfologia che di contenuto proteico, essendo privi di alcune delle principali proteine tegumentarie presenti in queste ultime.

Il passaggio successivo prevede che le particelle sub-virali accedano al citoplasma mediante la fusione del pericapside primario con la membrana nucleare esterna. A questo punto, i nucleocapsidi “nudi” sono in grado di raggiungere il reticolo endoplasmatico e l’apparato del Golgi, dove acquisiscono addizionali proteine del tegumento e un pericapside definitivo. Il risultato finale è la produzione di particelle virali mature contenute all’interno di vescicole di origine cellulare. Successivamente, tali vescicole vengono trasportate verso la membrana plasmatica, dalla quale i virioni vengono rilasciati per esocitosi ¹⁴⁶.

2.2.2.2 Prodotti genici virali nell’ambito del ciclo replicativo litico

Durante l’infezione produttiva, l’espressione del genoma virale avviene in modo sequenziale e temporalmente regolato; per tale ragione possono essere identificate tre classi di geni virali che codificano per le seguenti tre categorie di prodotti proteici: proteine precocissime (“Immediate Early”/IE), precoci (“Early”/E) e tardive (“Late”/L) (Figura 4).

La trascrizione dei geni di HCMV codificanti per proteine IE, E ed L avviene ad opera della RNA polimerasi II cellulare con l’intervento di altri fattori che fanno parte dell’apparato trascrizionale della cellula ospite, la cui attività può essere stimolata da transattivatori virali in grado di modulare l’espressione sia di geni virali, sia di geni cellulari.

In particolare, l’espressione dei geni IE avviene immediatamente dopo l’ingresso del virus nella cellula ospite ed è indipendente dall’espressione di altri geni virali.

L'espressione dei geni E dipende, invece, dall'espressione dei geni IE; allo stesso modo, la successiva espressione dei geni L è dipendente dai geni IE ed E ^{147,148}.

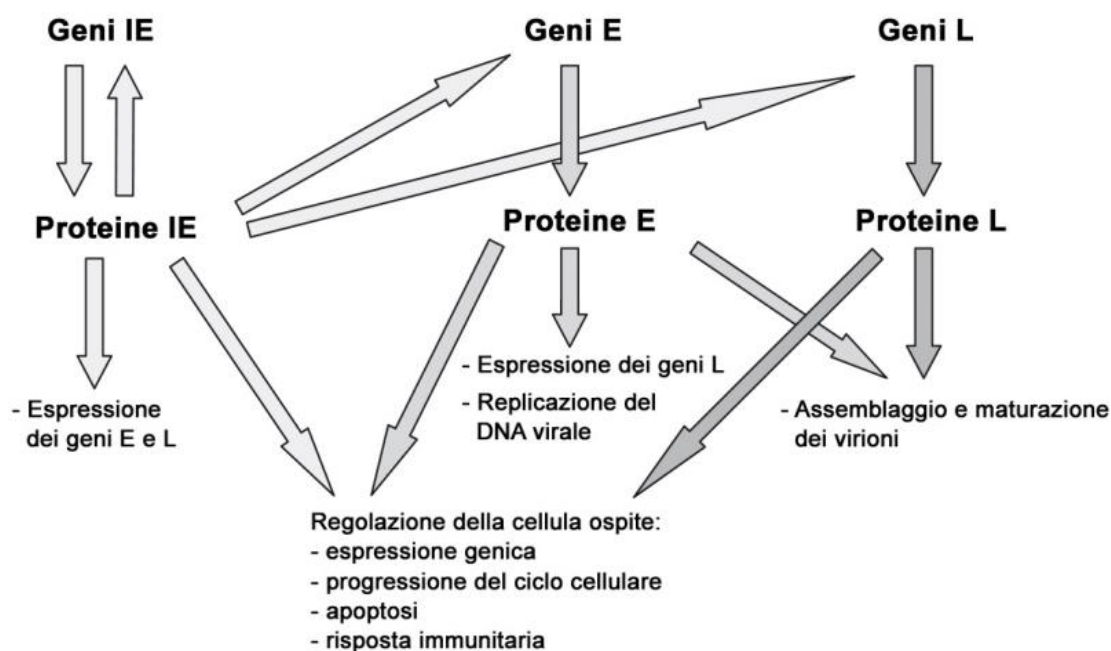


Figura 4. Rappresentazione schematica dell'espressione dei geni di HCMV e di alcune delle funzioni dei rispettivi prodotti genici durante l'infezione produttiva [immagine modificata da: "Landolfo S. et al. The human cytomegalovirus. *Pharmacol Ther.* 2003;98(3):269–97"].

- Le proteine precocissime ("immediate-early"/IE)

I geni IE includono due geni precocissimi maggiori ("Major Immediate-Early", MIE), chiamati UL122 e UL123, e geni ausiliari, quali UL36–UL38, UL115–UL119, IRS1/TRS1, e US3 ^{115,149,150}.

I geni UL122 e UL123 codificano, rispettivamente, per le proteine precocissime maggiori IE2 (anche nota come "IEp86" o "pp86") e IE1 (anche nota come "IEp72" o "pp72"), la cui espressione è regolata da un elemento modulatore ("enhancer"). Tale elemento "enhancer" è in grado di promuovere l'attività trascrizionale interagendo con diversi fattori trascrizionali cellulari, quali NF-κB, AP-1, Sp1 e CREB/ATF, attivati dall'infezione stessa ^{134,151}.

Le proteine IE2 ed IE1 condividono una breve sequenza aminoacidica codificata dai primi tre esoni dei rispettivi mRNA, mentre differiscono nella porzione codificata dagli esoni 4 e 5 ^{147,152}. In particolare, è stato attribuito un ruolo di spicco alla sequenza aminoacidica codificata dell'esone 3 nella regolazione della trascrizione, nell'espressione dei geni virali precoci e nella modulazione funzionale di proteine coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare chiamate "cicline" ^{153,154}.

IE1 è una fosfoproteina nucleare in grado di regolare in senso positivo l'espressione dei geni UL122, UL123 e US3 attivando i corrispondenti elementi "enhancer" ¹¹⁹. Inoltre, IE1 è coinvolta in numerosi processi cellulari, quali la progressione del ciclo cellulare e l'apoptosi, la regolazione genica di geni coinvolti nella risposta immunitaria e il processo di dispersione dei "Promyelocytic leukemia (PML) oncogenic domains" (PODs) e dei relativi "nuclear dots 10" (ND10) al fine di impedirne la loro nota attività antivirale ¹⁵⁵⁻¹⁵⁹.

Per quanto riguarda IE2, essa rappresenta la più importante fosfoproteina con funzioni regolatorie codificata dal virus ^{149,160-163}. Tale proteina innesca l'attivazione dei geni IE, E e L ed assicura che l'espressione degli stessi avvenga in modo sequenziale e temporalmente regolato durante l'infezione ^{139,164}. Inoltre, IE2 modula diversi altri processi cellulari, tra cui il controllo del ciclo cellulare e l'apoptosi ^{165,166}. Nello specifico, IE2 è in grado di bloccare le cellule in fase G1/S e di inibire la sintesi del DNA cellulare, condizioni queste che offrono al virus quantità adeguate dei fattori cellulari che esso utilizza per la propria replicazione, quali deossiribonucleotidi e fattori accessori alla replicazione del DNA ¹⁶⁵⁻¹⁶⁷.

Le funzioni degli altri geni IE sono eterogenee: le proteine codificate da TRS1/IRS1 ricoprono un ruolo essenziale per la replicazione del DNA virale^{168,169}, mentre i diversi prodotti di “splicing” codificati dal gene US3 contribuiscono, insieme a numerose altre strategie attuate da HCMV, all’evasione dalla risposta immunitaria¹⁷⁰⁻¹⁷³. Nello specifico, i prodotti del gene US3 sono glicoproteine integrali di membrana localizzate nel reticolo endoplasmatico, dove impediscono sia il trasporto intracellulare, sia la maturazione del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I (MHC-I)¹⁷⁰⁻¹⁷³.

- Le proteine precoci (“Early”/E)

Il gruppo dei geni precoci codifica per proteine non strutturali, tra cui diversi enzimi coinvolti nella replicazione del DNA virale e proteine che concorrono ad eludere i meccanismi di difesa del sistema immunitario dell’ospite¹⁷⁴.

In particolare, le proteine precoci codificate dai geni UL112/UL113 rivestono un ruolo fondamentale per la replicazione del DNA virale, contribuendo alla formazione dei centri di replicazione litica *oriLyt*^{175,176}.

Per quanto riguarda i geni precoci UL54 e UL44, essi codificano rispettivamente per la subunità catalitica e per il fattore di processività della polimerasi (proteina accessoria) della DNA polimerasi di HCMV^{177,178}.

Le proteine precoci codificate dai geni US2 e US11 mediano, invece, l’evasione del virus dal sistema immunitario, contribuendo alla degradazione delle catene pesanti delle molecole di MHC-I da parte dei proteasomi nel citoplasma¹⁷⁹⁻¹⁸².

Inoltre, mediante la modulazione dei recettori per le chemochine, anche le proteine codificate dai geni US27 e US28 contribuiscono all’evasione del virus dal sistema immunitario^{174,183}; in particolare, è stato descritto che la proteina

codificata da US28 presenta un'elevata omologia con il recettore per diverse chemochine che le consente di sequestrarle affinché il virus possa eludere la risposta cellulo-mediata da esse attivata ¹⁷⁴.

- Le proteine tardive ("Late"/L)

I geni tardivi vengono trascritti dopo la replicazione del DNA virale e codificano per proteine strutturali del capsido, del tegumento e del pericapsido ^{109,110}.

- *Proteine del capsido*

Il capsido di HCMV è composto da sette diverse proteine: "Major Capsid Protein" (MCP; UL86), "Minor Capsid Protein" (mCP; UL85), "Smallest Capsid Protein" (SCP; UL48/UL49), "minor Capsid Binding Protein" (mC-BP; UL46) e altre tre proteine che svolgono diverse funzioni nell'assemblaggio del capsido ¹⁸⁴⁻¹⁸⁸. Nell'ambito di queste ultime, la più rappresentata è la proteina "Assembly Protein" (AP) ^{189,190}. Per quanto riguarda, invece, la proteina MCP, essa è la più abbondante componente proteica del capsido (960 copie) e costituisce i pentoni e gli esoni dei capsomeri prismatici. Le proteine mCP (due copie) e mC-BP (una copia) formano dei "triplex" che si collocano tra i pentoni e gli esoni dei capsomeri. Infine, la proteina SCP è collocata a livello degli esoni del capsido ed è essenziale per l'assemblaggio dei virioni infettivi ^{108,191}.

- *Proteine del tegumento*

Le proteine del tegumento codificate dal genoma di HCMV sono almeno venticinque e vengono incorporate nelle particelle virali durante l'assemblaggio del virione ¹⁹²⁻¹⁹⁵. Tali proteine sono fosforilate e possono subire ulteriori modificazioni post-traduzionali il cui il significato rimane però sconosciuto ¹⁹⁶. La funzione della maggior parte di queste proteine è ignota; è stato, tuttavia,

ipotizzato che molte di esse siano coinvolte nella regolazione dell'espressione genica quali transattivi trascrizionali.

Le proteine che compongono il tegumento più rappresentate sono pp65 (ppUL83; "Lower Matrix Protein"; LMP), pp150 (ppUL32; "Basic Phosphoprotein"; BPP), pp28 (ppUL99), pp71 (ppUL82; "Upper Matrix Protein"; UMP) e ppUL48 ("huge tegument protein")¹¹⁷. In particolare, le due proteine del tegumento pp150 e pp65 costituiscono, nel loro insieme, circa il 35% dell'intera massa proteica del virione e vengono espresse abbondantemente durante la replicazione.

Già nell'ambito della prima ora di infezione, la proteina pp65 "parentale" viene rapidamente traslocata verso il nucleo grazie a due specifici segnali di localizzazione nucleare ("Nuclear Localization Signals"; NLS) collocati all'estremità carbossi-terminale della proteina^{197,198}. È stato dimostrato che la proteina pp65 manifesta un significativo accumulo a livello nucleolare visibile anche a tempi più tardivi, suggerendo una relazione funzionale tra la localizzazione di pp65 e lo svolgimento del ciclo litico di HCMV¹⁹⁹⁻²⁰¹. Oltre a possedere un putativo ruolo nella regolazione dell'espressione genica virale e della replicazione del virus, la proteina pp65 è anche in grado di modulare parzialmente l'espressione della citochina pro-infiammatoria interferone-beta (IFN-beta) e di alcune chemochine prodotte dalla cellula durante l'infezione²⁰²⁻²⁰⁴.

Per quanto riguarda la fosfoproteina del tegumento pp71, essa rappresenta un rilevante transattivatore trascrizionale in grado di indurre l'espressione dei geni IE1 e IE2²⁰⁵⁻²⁰⁷.

Infine, è importante segnalare la proteina del tegumento chiamata UL94, la quale viene espressa nelle fasi tardive dell'infezione e svolge un ruolo essenziale per la replicazione del virus e l'assemblaggio dei virioni²⁰⁸⁻²¹¹.

- Proteine del pericapside

Il pericapside virale è formato da un doppio strato fosfolipidico nel quale sono inseriti tre complessi glicoproteici ("glycoprotein complexes"; gC) virus-specifici. Il complesso glicoproteico I (gC-I) è formato da molecole omodimeriche di glicoproteina B (gB; proteina polimorfica) collegate da legami disolfuro^{212,213}; il complesso glicoproteico II (gC-II) è costituito dalle glicoproteine M (che rappresentano la sua parte maggiore) ed N (piccola proteina transmembrana altamente polimorfica)²¹⁴; infine, il complesso glicoproteico III (gC-III) è formato da tre glicoproteine: due di esse (gH e gL) sono proteine transmembrana, mentre gO è legata covalentemente a gH^{133,215,216}. I complessi gC-I, gC-II e gC-III svolgono funzioni di rilievo in diversi processi, inclusi l'ingresso del virus nella cellula ospite e l'evasione della risposta immunitaria dell'ospite in quanto siti di legame per gli anticorpi neutralizzanti. Infine, numerose altre proteine del pericapside virale presentano caratteristiche tipiche delle proteine transmembrinarie e sono verosimilmente coinvolte nelle fasi di legame e di ingresso del virus nella cellula ospite²¹⁷.

2.2.2.3 Le glicoproteine del pericapside di citomegalovirus quali fattori di virulenza

Come anticipato, l'esito dell'infezione da HCMV è il risultato di una serie di fattori, in parte legati all'ospite e in parte al virus ⁸⁵. Tra i possibili fattori di virulenza e tropismo tissutale sono state indicate specifiche glicoproteine del pericapside virale: gB ^{86-88,92}, gN ⁸⁹ e gO ⁹⁰. I geni che codificano per le suddette proteine (UL55, UL73 e UL74, rispettivamente) sono polimorfici, ossia presentano regioni ipervariabili (Figura 5). La variabilità di questi geni consente la distinzione in genotipi ^{89,91-93}. Sulla base di tali considerazioni e di evidenze di letteratura, è plausibile ritenere che i diversi prodotti genici che ne derivano possano modulare in maniera differente il tropismo tissutale e quello d'organo di HCMV e, di conseguenza, influenzare i possibili esiti dell'infezione ²¹⁸. Diversi gruppi di ricerca hanno condotto studi volti a verificare se il polimorfismo genetico nell'ambito delle glicoproteine B, N e O possa essere associato a quadri patologici di diversa severità in diverse categorie di soggetti, con risultati a volte contraddittori ^{33,219-221}. Inoltre, è ragionevole ritenere che il fenotipo ceppo-specifico possa essere determinato da loci polimorfici geneticamente associati funzionanti in sinergia. Infatti, è stato dimostrato che loci polimorfici adiacenti sul genoma virale possono essere funzionalmente legati determinando il fenotipo virale in cooperazione ^{218,222}, come si suppone succeda per quelli che codificano per gN e gO di HCMV.

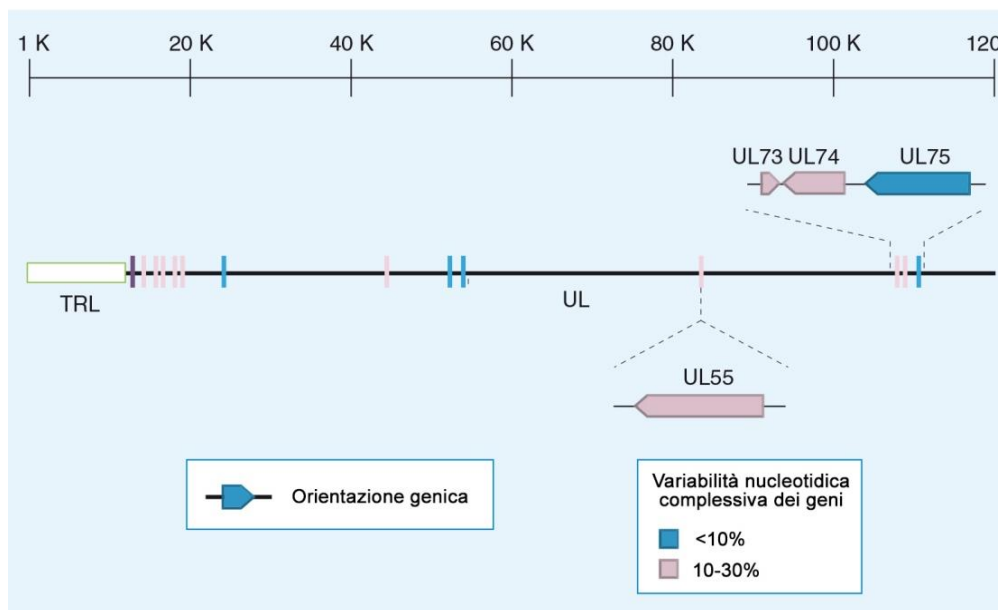


Figura 5. Geni polimorfici di HCMV. I geni UL55, UL73 e UL74 codificano rispettivamente per le glicoproteine B, N e O di HCMV [immagine modificata da: “Puchhammer-Stöckl E, Görzer I. Human cytomegalovirus: an enormous variety of strains and their possible clinical significance in the human host. *Futur Virol.* 2011;6(2):259–71”].

2.2.3 Infezione latente e riattivazione di citomegalovirus

HCMV, analogamente a tutti i virus erpetici, dopo l'infezione primaria e le possibili ricorrenze, solitamente asintomatiche in soggetti immunocompetenti, persiste in specifiche sedi anatomiche dell'organismo ospite in una condizione di latenza, dalla quale può sporadicamente riattivarsi. In particolare, durante l'infezione latente, il DNA di HCMV si trova nel nucleo delle cellule infettate in forma episomale²²³; in tali condizioni, non si verifica la produzione di progenie virale e l'espressione genica di HCMV è limitata ad un gruppo di trascritti, definiti genericamente come "trascritti associati alla latenza" ("Cytomegalovirus Latency Transcripts"; CLTs)²²⁴⁻²²⁸.

I monociti del sangue periferico e i loro progenitori CD34+ nel midollo osseo sono stati identificati quali sedi di latenza di HCMV, nonché principale mezzo di disseminazione virale a seguito di differenziamento a macrofagi o a cellule dendritiche^{101,229-234}. A tale riguardo, è stato dimostrato che proprio tale evento di differenziamento, *in vivo*, rappresenta l'evento chiave legato alla riattivazione del virus dalla latenza (Figura 6)^{12,13,106,107}.

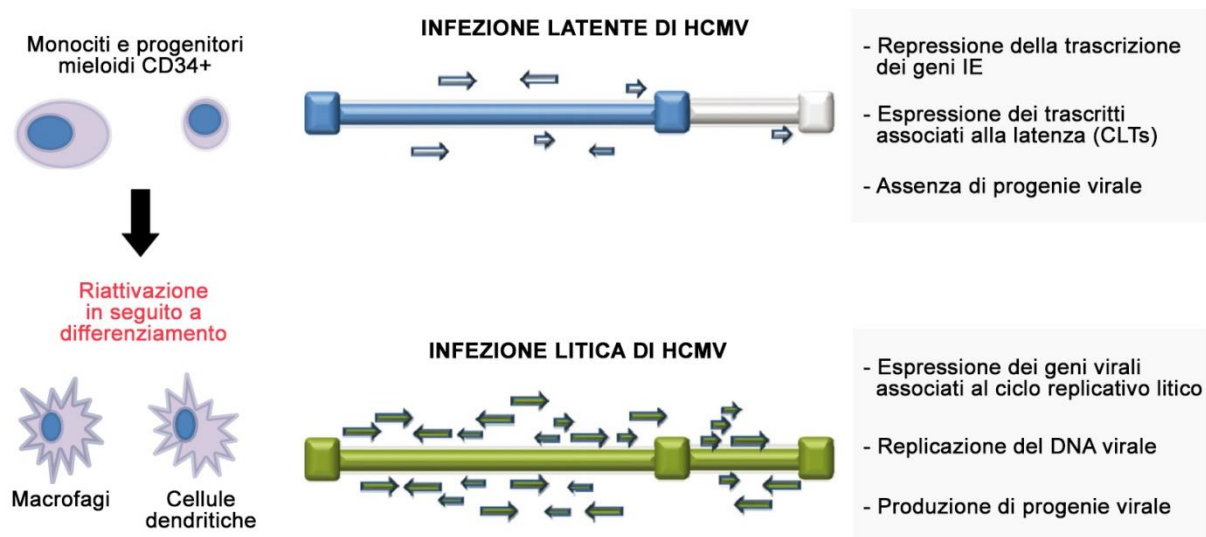


Figura 6. Infezione latente, riattivazione ed infezione litica di HCMV [immagine modificata da: "Wills M. et al. The immunology of human cytomegalovirus latency: could latent infection be cleared by novel immunotherapeutic strategies? *Cell Mol Immunol.* 2015;12:128-38"].

2.2.3.1 Modelli *in vitro* per lo studio delle diverse interazioni citomegalovirus-cellula ospite

Al di là del noto utilizzo di cellule fibroblastoidi con corredo cromosomico diploide provenienti dalla specie ospite naturale *in vivo* per lo studio *in vitro* dell'infezione produttiva da HCMV ^{115,127}, diversi gruppi di ricerca sono impegnati a studiare i possibili meccanismi che regolano il passaggio da uno stato di latenza ad uno stato riattivato di HCMV. Tuttavia, è importante sottolineare che gli studi sulla latenza di HCMV *ex vivo* sono notevolmente ostacolati dalla bassa frequenza di cellule mononucleate positive (solo circa lo 0.01%) e al loro basso contenuto di DNA di HCMV ^{13,226,235,236}. Pertanto, risulta evidente la necessità di approfondire questi studi utilizzando modelli monocitari umani *in vitro*, che ricalchino quanto avviene *in vivo*, garantendo, al contempo, un numero adeguato di cellule infettate rispetto al sistema naturale. A tale riguardo, le cellule leucemiche monocitiche umane THP-1 sono assimilabili per diverse caratteristiche al sistema naturale e, di conseguenza, vengono ampiamente utilizzate in questa tipologia di studi. Tali cellule, come i monociti del sangue periferico, non sono permissive all'infezione litica da HCMV, ma albergano il genoma virale nel nucleo; per questa ragione, le cellule THP-1 sono state largamente utilizzate come modello di infezione latente di HCMV ²³⁷⁻²⁴¹. Inoltre, i monociti THP-1 sono stati ampiamente sfruttati anche come sistema litico, inducendo il loro differenziamento a macrofagi mediante il trattamento con esteri del forbolo ^{104,138,238,242,243}. Un minor numero di studi ha, invece, affrontato l'utilizzo dei monociti THP-1 come modello di riattivazione, con presentazione di dati incompleti e non abbastanza dimostrativi della validità di tale modello ²⁴⁴⁻²⁴⁶.

2.2.4 Effetti dell'infezione da citomegalovirus sul metabolismo della cellula ospite: alterazione del ciclo cellulare

HCMV ha sviluppato numerose strategie al fine di regolare a proprio vantaggio il metabolismo della cellula ospite, incluse quelle volte all'alterazione del ciclo cellulare^{200,201}.

In particolare, dati precedentemente ottenuti dal nostro gruppo di ricerca hanno messo in luce che HCMV è in grado di alterare il ciclo cellulare in modelli sperimentali di infezione litica che ricalcano tipologie cellulari molto rilevanti *in vivo* per l'infezione di tale agente, quali macrofagi¹³⁸ e fibroblasti^{200,201}. Nello specifico, è stato dimostrato che HCMV, al fine di garantire un ambiente idoneo alla replicazione efficiente del DNA virale, spinge le cellule quiescenti (macrofagi THP-1) a rientrare nella fase S del ciclo cellulare^{200,201,247}. Per quanto riguarda il modello cellulare fibroblastico, rappresentato da fibroblasti di polmone embrionale umano MRC5, è stato dimostrato che HCMV è in grado di arrestare il ciclo cellulare in tarda fase G1 o a livello della transizione G1/S e, in questo modo, di inibire la sintesi del DNA cellulare²⁰¹; l'instaurarsi di tali condizioni è molto importante in quanto vengono rese disponibili per il virus quantità adeguate dei fattori cellulari che esso utilizza per la propria replicazione.

I dati ottenuti dal nostro gruppo di ricerca dimostrano l'intervento della fosfoproteina del tegumento pp65 (in seguito alla sua traslocazione nucleolare) nella summenzionata azione di HCMV sul ciclo cellulare^{200,201}. Inoltre, dati preliminari dello stesso gruppo depongono a favore dell'induzione virus-indotta di più elevati livelli di specifiche cicline, coinvolte nella regolazione della progressione del ciclo cellulare, e la concomitante inibizione di altre¹³⁸. Infine, tra i componenti cellulari che potrebbero giocare un ruolo di spicco nella regolazione del ciclo cellulare, occorre

annoverare i micro-RNA (miRNA). I miRNA sono piccole molecole di RNA non codificante che, attraverso il legame con regioni dell'RNA messaggero (mRNA) bersaglio, regolano negativamente l'espressione genica provocando la repressione delle corrispondenti proteine. A tale riguardo, dati preliminari del nostro gruppo di ricerca hanno evidenziato un possibile coinvolgimento dei miRNA chiamati 26a e 26b nella regolazione del ciclo cellulare virus-indotta, individuando in tale classe di molecole alcuni dei possibili fattori cellulari potenzialmente coinvolti anche nel processo di riattivazione del virus dalla latenza.

2.2.5 Infezione da citomegalovirus e sorveglianza immunitaria dell'ospite

È noto come l'infezione da HCMV eserciti un forte impatto sul sistema immunitario dell'ospite. In particolare, per coesistere con l'ospite, HCMV ha evoluto sofisticati sistemi finalizzati all'evasione dai meccanismi di riconoscimento ed eliminazione messi in atto dal sistema immunitario ²⁴⁸.

Un ulteriore aspetto importante è rappresentato dal fatto che la persistenza di HCMV come virus latente non corrisponde ad una condizione silente, ma costituisce piuttosto una fonte di stimolazione continua per il sistema immunitario, probabilmente a seguito di cicli di riattivazione subclinici, con rilevanti conseguenze per l'ospite ^{27,29,30,249-252}.

2.2.5.1 Strategie di evasione dalla risposta immunitaria attuate da citomegalovirus

HCMV attua diverse strategie per evadere dalla risposta immunitaria dell'ospite (Figura 7). Com'è noto, in risposta all'infezione ed al fine di bloccare la replicazione del genoma virale, le cellule infettate iniziano a produrre citochine

pro-infiammatorie, quali l'IFN-alfa, l'IFN-beta e l'IFN-gamma²⁵³⁻²⁵⁵. Le cellule infettate, inoltre, possono produrre chemochine, le quali richiamano verso il sito di infezione leucociti, macrofagi, cellule "Natural Killer" (NK) e linfociti T per la rimozione degli agenti virali²⁵⁶. A tale riguardo, diversi dati di letteratura hanno evidenziato che HCMV è in grado di modulare a proprio vantaggio l'espressione e le vie di trasduzione del segnale dell'IFN-alfa, dell'IFN-beta e dell'IFN-gamma²⁵⁷⁻²⁶⁰. Inoltre, è stato dimostrato che HCMV regola negativamente l'espressione di alcune chemochine, come quelle definite "Regulated upon Activation, Normal T Cell Expressed, and Secreted" (RANTES), dell'interleuchina-8 (IL-8), della "Monokine Induced by Interferon- γ " (MIG), della "Monocyte Chemotactic Protein 1" (MCP-1) e della "Macrophage Inflammatory Protein-1-alfa" (MIP-1-alfa)^{261,262}. A queste strategie va aggiunta l'azione svolta dalle proteine codificate dai geni UL16, UL18 e gpUL40 di HCMV, le quali consentono al virus di evitare il riconoscimento e l'eliminazione da parte delle cellule dell'immunità innata, quali le cellule NK²⁶³⁻²⁶⁹. Inoltre, HCMV è in grado di sfuggire al riconoscimento da parte delle cellule dendritiche, ossia le più importanti "Antigen Presenting Cells" (APC), cellule specializzate nel legarsi all'antigene e presentarlo, dopo elaborazione, ai linfociti T^{270,271}. Nello specifico, HCMV può mediare sia la riduzione dei livelli di espressione dei complessi MHC-I e MHC-II sulla superficie di tali cellule, sia la loro maturazione e migrazione in risposta alle diverse chemochine prodotte al fine di fronteggiare l'infezione²⁴⁸. Questi molteplici effetti sulle cellule dendritiche inducono il ritardo o la prevenzione nella produzione di cloni di cellule T HCMV-specifiche, sia CD8+ (linfociti T citotossici), sia CD4+ (linfociti T "helper")²⁷².

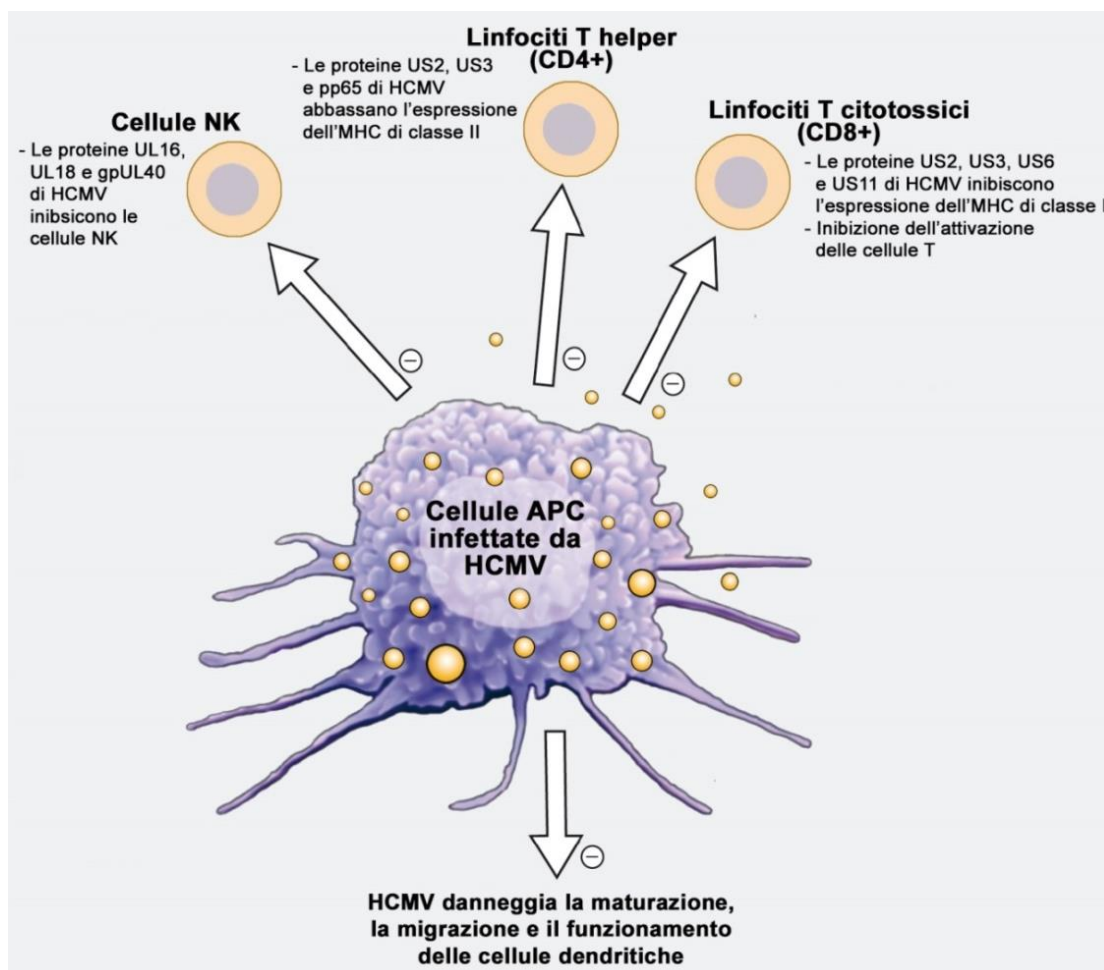


Figura 7. Principali strategie attuate da HCMV per evadere la risposta immunitaria dell'ospite [immagine modificata da: "Söderberg-Nauclér C. Does cytomegalovirus play a causative role in the development of various inflammatory diseases and cancer? J Intern Med. 2006;259(3):219–46"].

2.2.5.2 Sottopopolazioni di linfociti T citomegalovirus-specifici

È noto come il mantenimento dell'equilibrio fra infezione latente da HCMV e risposta immunitaria antivirale comporti l'espansione dei meccanismi di controllo dell'infezione ed un riassetto del sistema immunitario. A tale riguardo, i linfociti T HCMV-specifici costituiscono una rilevante porzione del compartimento della memoria^{273,274}. Come risaputo, dopo un'infezione acuta, i linfociti T di memoria rappresentano la popolazione cellulare dominante nel sangue e negli organi linfoidi secondari; in caso di infezioni successive, essi possono indurre in tempi

rapidi una potente risposta immunitaria differenziandosi in linfociti T effettori ^{275,276}. Nel caso di HCMV, diversi dati depongono a favore del fatto che l'infezione latente possa, invece, stimolare in modo persistente i linfociti T CD8+ con una conseguente permanenza nel sangue e nei tessuti di una cospicua quantità di cellule T CD8+ di memoria ma con fenotipo effettore, ossia già pronte a svolgere la loro azione senza bisogno di alcun ulteriore differenziamento ^{273,277,278}. In particolare, tali popolazioni cellulari HCMV-specifiche tendono ad espandersi con l'età, come suggerito da un aumento delle risposte T CD8+ anti-HCMV nei soggetti anziani ^{27,51,274,279-283}. È importante evidenziare che tale fenomeno, noto come "memory inflation", è una caratteristica distintiva dell'infezione da HCMV, poiché non è stato rilevato affatto o non in proporzioni paragonabili per altri membri della stessa famiglia ²⁸⁴. Nello specifico, l'ipotesi è quella di una progressiva espansione dei cloni linfocitari specifici per determinati epitopi immunodominanti di HCMV, con conseguente accumulo dei linfociti T CD8+ oligoclonali (Figura 8) ²⁸³; si tratta, in particolare, della fosfoproteina del tegumento pp65 e della proteina precocissima IE1 ^{273,285-291}. Al contrario, le cellule T CD4+ non sembrano andare incontro ad un'inflazione consistente ^{274,292,293}. Tale riassetto del sistema immunitario, conseguente all'espansione dei meccanismi di controllo dell'infezione latente da HCMV, è stato recentemente messo in relazione a diverse patologie, quali malattie cardiovascolari ^{25-28,31,49,50} e malattie autoimmuni ^{77,294,295}.

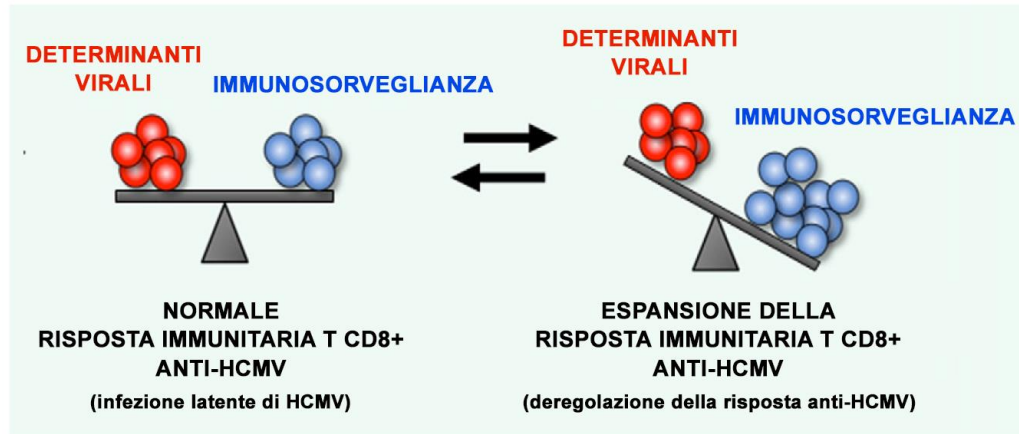


Figura 8. Deregolazione della risposta immunitaria anti-HCMV conseguente all'espansione di cloni linfocitari specifici per determinati epitopi immunodominanti di HCMV, con conseguente accumulo di linfociti T CD8+ oligoclonali [immagine modificata da: "Sansoni P. et al. New advances in CMV and immunosenescence. Exp Gerontol. 2014;55:54–62"].

3. OBIETTIVI DELLA RICERCA

3.1 VALIDAZIONE DI UN MODELLO DI INFEZIONE *IN VITRO* PER LO STUDIO DELLA RIATTIVAZIONE DI CITOMEGALOVIRUS

3.1.1 Premessa

Per specifiche categorie di soggetti, nell'ambito di individui adulti sieropositivi per HCMV, la riattivazione clinicamente manifesta del virus endogeno rappresenta l'evento più temibile per la conseguente disseminazione tissutale e patologia d'organo.

Diversi studi forniscono evidenze sul fatto che il differenziamento dei monociti a macrofagi *in vivo* rappresenti l'evento chiave associato alla riattivazione del virus dalla latenza. Allo stesso tempo gli studi *ex vivo* sono ostacolati dal fatto che il numero di cellule e la quantità di DNA di HCMV reperibile nelle sedi naturali di latenza sono estremamente esigue. In tale ottica, è sentita l'esigenza di mettere a punto modelli virus-cellula *in vitro*, che ricalchino quanto avviene *in vivo* e permettano lo studio della riattivazione di HCMV, garantendo, al contempo, un numero adeguato di cellule infettate rispetto al sistema naturale. Com'è noto, i monociti THP-1 non sono permissivi all'infezione litica di HCMV e sono stati in gran parte sfruttati come modello di latenza^{237,238,240}. Il differenziamento dei monociti THP-1 a macrofagi media il passaggio ad una fase post-mitotica e permette la replicazione produttiva di HCMV^{233,234}. A tale riguardo, i monociti THP-1 sono stati anche ampiamente utilizzati come sistema litico, inducendo il loro differenziamento a macrofagi prima dell'infezione^{237,238,296-298}. D'altra parte, un minor numero di studi ha affrontato

l'utilizzo dei monociti THP-1 come modello di riattivazione (inducendo il differenziamento a macrofagi dopo l'infezione); in quest'ultimo caso, i dati disponibili sono frammentari e non riguardano l'intero programma litico.

3.1.2 Obiettivi

Verrà eseguita una serie di esperimenti per la messa a punto e la validazione della linea cellulare THP-1 come modello di riattivazione, analizzando tutte le fasi del ciclo replicativo virale fino alla produzione di progenie.

In primo luogo, verrà effettuata una verifica dell'avvenuto differenziamento dei monociti THP-1 a macrofagi (indotto mediante esteri del forbolo), per accertare che le caratteristiche di queste cellule ricalchino quelle del modello naturale.

In secondo luogo, verrà verificato se l'utilizzo di uno stipte endoteliotropico di HCMV (TB40E), con tropismo molto più spiccato per cellule macrofagiche rispetto al ceppo di laboratorio Towne, frequentemente usato in tali tipologie di studi, possa rendere il modello sperimentale messo a punto molto più assimilabile a quello naturale.

In terzo luogo, verrà verificata l'assenza di esosomi nella sospensione virale corrispondente alla progenie derivata dal modello di riattivazione THP-1, che potrebbero falsare il risultato sull'emergenza di virioni progenie in quanto possibili veicoli di componenti virali nel sistema permissivo (fibroblasti MRC5) utilizzato per verificare la resa virale da cellule THP-1 riattivate.

3.2 RUOLO DELL'INFEZIONE DA CITOMEGALOVIRUS IN SOGGETTI ANZIANI CON ICTUS ISCHEMICO

3.2.1 Premessa

Recentemente, un numero crescente di dati di letteratura ha correlato l'infezione da HCMV e lo sviluppo di patologie croniche associate con l'invecchiamento²⁵⁻²⁷. In particolare, è stato evidenziato come, nei soggetti anziani, il mantenimento dell'equilibrio fra infezione latente o persistente da HCMV e risposta immunitaria antivirale comporti l'espansione dei meccanismi di controllo dell'infezione ed un riassetto del sistema immunitario ed è stata dimostrata una correlazione tra il deterioramento delle condizioni di salute degli anziani e l'aumento della risposta immunitaria anti-HCMV. L'ipotesi emergente è che, sottesi a questo evento, vi possano essere episodi di riattivazione virale sistemica o localizzata²⁵. Questa ipotesi merita di essere valutata in soggetti anziani in corso di patologia acuta come l'*ictus* ischemico.

3.2.2 Obiettivi

Considerate le premesse sopra citate, è sentita l'esigenza di identificare, in pazienti anziani con *ictus* ischemico, marcatori predittivi del rischio di complicanze, in particolare quelli relativi al rischio di riattivazione virale.

A tale scopo, in questo studio osservazionale prospettico, saranno effettuate ricerche mirate alla valutazione della risposta umorale nei confronti di HCMV ed al rilevamento del DNA virale da campioni di sangue periferico di tali soggetti. Inoltre, sulla base delle conoscenze acquisite dallo studio effettuato nel modello virus-cellula

in vitro e da esperimenti preliminari, verrà applicato un protocollo sperimentale per il possibile rilevamento di DNA di HCMV anche allo stato latente, finalizzato all'identificazione di possibili combinazioni genotipiche nell'ambito dei geni di HCMV che codificano per le glicoproteine N e O del pericapside virale quali noti fattori di virulenza.

3.3 RUOLO DELL'INFEZIONE DA CITOMEGALOVIRUS IN PAZIENTI AFFETTI DA SCLEROSI SISTEMICA

3.3.1 Premessa

La sclerosi sistemica (SSc), anche nota come sclerodermia, è una malattia caratterizzata da anomalie immunologiche, sia umorali, sia cellulari, danno endoteliale (apoptosi delle cellule endoteliali e vasculopatia) ed eccessiva deposizione extracellulare di collagene, con conseguente fibrosi di cute e organi interni ^{252,299–303}. L'eziopatogenesi di tale malattia resta ad oggi sconosciuta e si ritiene che sia multifattoriale. Come per altre condizioni autoimmuni, si ipotizza il ruolo di fattori scatenanti tossici e/o infettivi su un "background" genetico predisponente, nell'ambito di un complesso processo "multi-step" ^{252,299–303}.

In particolare, è stato evidenziato un ruolo rilevante delle risposte linfocitarie T nella patogenesi della SSc, con possibile contributo delle stesse alla modulazione della fibrosi e al danno vascolare ^{75,76,304–306}, anche se, ad oggi, la tipologia e la funzione di queste specifiche sottopopolazioni di cellule T non sono ancora state caratterizzate in relazione alle diverse fasi della patologia ³⁰⁶.

Inoltre, mentre diversi studi si sono concentrati sul coinvolgimento di linfociti T CD4+ nella fase infiammatoria e nella fibrosi tissutale ^{307–314}, sono pochi i lavori che si sono occupati di approfondire il ruolo delle cellule T CD8+. Studi recenti evidenziano la presenza predominante di infiltrati di cellule T CD8+ nella cute lesionata dei pazienti affetti da SSc già nelle prime fasi della malattia ³⁰⁰, mentre, viceversa, nella cute di soggetti sani è stato rilevato solo un numero esiguo delle suddette popolazioni linfocitarie ^{315,316}.

Altre osservazioni interessanti sono relative al fatto che le cellule T CD8+ identificate nel sangue periferico di pazienti con SSc presentano un'espansione oligoclonale antigene-dipendente, la cui specificità tuttavia non è ancora nota ^{304,317-319}.

Costituiscono ipotetici fattori scatenanti la SSc e/o favorenti l'esacerbazione della sintomatologia alcuni virus, accomunati dalle seguenti caratteristiche: capacità di instaurare infezione latente/cronica ^{75-77,304} e capacità di infettare le tipologie cellulari coinvolte nella patogenesi della SSc (monociti, cellule endoteliali e fibroblasti) ^{79,252}; tra gli agenti virali che rispondono a tali caratteristiche vi è HCMV.

In particolare, l'esigenza di svolgere ricerche volte ad appurare il ruolo patogenetico di HCMV nella SSc è dettata da una serie di dati emersi da diversi studi:

- HCMV è in grado di infettare fibroblasti e cellule endoteliali *in vivo* (ossia i bersagli cellulari principali nella SSc) e trascritti di HCMV sono stati rilevati in cellule endoteliali di una paziente che ha sviluppato la malattia dopo un'infezione recente da parte di questo agente virale ³²⁰;
- da sottolineare come l'apoptosi delle cellule endoteliali e l'iper-proliferazione di fibroblasti umani siano fenomeni rilevanti nella SSc ³²¹⁻³²⁵, necessariamente legate ad aberrazioni del normale svolgimento del ciclo cellulare. HCMV è in grado di alterare il normale svolgimento del ciclo cellulare in maniera diversa, dipendentemente dalla tipologia cellulare coinvolta ²⁰¹. In particolare, il nostro gruppo di ricerca ha descritto il coinvolgimento della proteina pp65 di HCMV nell'alterazione ciclo cellulare virus-indotta ^{138,200,201};
- sono stati rilevati livelli significativamente più elevati di anticorpi sierici anti-HCMV nei soggetti affetti da SSc rispetto a soggetti sani ^{74,76,83,326-328}, diretti contro antigeni immunodominanti quali pp65, la proteina IE1 e il prodotto del gene virale UL94 ^{79,83,327,329-331},

- è stato ipotizzato, evocando un meccanismo di mimetismo molecolare, un ruolo degli anticorpi diretti contro la proteina codificata dal gene UL94 di HCMV (tra quelli più frequentemente rilevati nel siero di pazienti con SSc) nel riconoscimento di recettori di membrana di fibroblasti e cellule endoteliali^{77,332}, contribuendo all'espressione di geni coinvolti in alcune delle alterazioni caratteristiche della SSc;
- HCMV è stato descritto come uno degli agenti in grado di contribuire all'espansione di specifiche sottopopolazioni di cellule T CD8+ in relazione all'aumentare dell'età^{27,249,251,274,292,293}, con particolare riguardo per le proteine immunodominanti di HCMV, quali la fosfoproteina del tegumento pp65 e la proteina precocissima IE1^{273,285-291}.

Sulla base di quanto sopra descritto, è plausibile ritenere che:

- l'infezione di fibroblasti e di cellule endoteliali da parte di HCMV possa contribuire, attraverso alterazione del ciclo cellulare, ad alcune presentazioni cliniche della SSc;
- anticorpi anti-specifiche componenti virali (in particolare, anti-pp65 o anti-IE1, oltre che anti-UL94), attraverso il riconoscimento di recettori di membrana, inducano un "signalling" cellulare che porti ad una deregolazione del ciclo cellulare e all'instaurarsi del fenotipo simil-sclerodermico;
- la risposta cellulo-mediata, attraverso l'attivazione di sottopopolazioni di linfociti T CD4+ e CD8+ circolanti osservata in caso di SSc^{74,76,333-340}, possa avvenire ad opera di antigeni di diversa natura, tra cui specifiche proteine di HCMV, quali potenziali candidati di rilievo⁷⁵.

3.3.2 Obiettivi

Verrà effettuato uno studio relativo al ruolo dell'infezione da HCMV in soggetti affetti da SSc, focalizzando l'attenzione sulla risposta immunitaria cellulo-mediata in questi pazienti. Nello specifico, gli obiettivi di questo studio osservazionale prospettico saranno quelli di effettuare (i) la valutazione quantitativa delle risposte dei linfociti T CD4+ e T CD8+ in seguito a stimolazione con antigeni immunodominanti di HCMV (in particolare pp65, IE1 e UL94) nei soggetti affetti da SSc a confronto con soggetti sani, (ii) la valutazione delle possibili differenze tra le risposte linfocitarie T CD4+ e le risposte linfocitarie T CD8+ HCMV-specifiche nei pazienti affetti da SSc e (iii) la valutazione delle possibili differenze delle risposte linfocitarie HCMV-specifiche in relazione alla durata della malattia e ai principali segni clinici riscontrati nei pazienti. Ai risultati ottenuti verrà successivamente applicata un'analisi statistica al fine di valutare la significatività delle differenze riscontrate.

4. MATERIALI E METODI

4.1 VALIDAZIONE DI UN MODELLO DI INFEZIONE *IN VITRO* PER LO STUDIO DELLA RIATTIVAZIONE DI CITOMEGALOVIRUS

4.1.1 Colture cellulari

Le cellule monocitarie THP-1 derivanti da leucemia umana acuta (Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna)³⁴¹, modello sperimentale utilizzato per lo studio in oggetto, sono state coltivate in sospensione in terreno "Roswell Park Memorial Institute 1640" (RPMI) (EuroClone), addizionato di siero fetale di vitello (FBS; 10%), sodio piruvato (1%), L-glutamina (1%), antibiotici (penicillina 100 unità/ml e streptomicina 100 µg/ml) (EuroClone) e beta-mercaptoetanololo (50 µM) (Sigma-Aldrich).

Per indurre il differenziamento cellulare (monociti THP-1 differenziati a macrofagi), aliquote a concentrazione nota di monociti THP-1 sono state trattate con 80 nM di 12-O-tetradecanoilforbolo-13-acetato (TPA) (Sigma-Aldrich) risospeso in dimetilsulfossido (DMSO) (Sigma-Aldrich), per 48 h.

I fibroblasti da polmone embrionale umano MRC5³⁴² sono stati coltivati in terreno "Minimum Essential Medium", modificato con sali di Earle (E-MEM) (EuroClone) ed addizionato di FBS (10%), sodio piruvato (1%), aminoacidi non essenziali (1%), L-glutamina (1%) ed antibiotici (penicillina 100 unità/ml e streptomicina 100 µg/ml).

4.1.2 Virus

I ceppi virali utilizzati per l'infezione sperimentale dei monociti THP-1 (modello di latenza), per l'infezione delle stesse cellule differenziate a macrofagi dopo l'infezione (modello di riattivazione) e per l'infezione delle stesse cellule differenziate a macrofagi e poi infettate (modello litico) sono:

- il ceppo endoteliotropico TB40E (gentilmente fornito dal Prof. Thomas Mertens - Università di Ulm, Germania) riprodotto in fibroblasti embrionali umani MRC5;
- il ceppo Towne (ATCC N. VR-977) riprodotto in fibroblasti embrionali umani MRC5.

Le riproduzioni virali sono state titolate sulla base della determinazione quantitativa dell'infettività come precedentemente descritto¹⁹⁹; il titolo virale è stato espresso in unità formanti placca [UFP]/ml.

4.1.3 Infezione virale dei modelli latente e riattivato

Aliquote a concentrazione nota di cellule THP-1 non differenziate (modello di latenza) sono state infettate con lo stipite TB40E di HCMV a molteplicità di infezione (MOI) decrescenti (0.5 – 0.25 – 0.125 UFP/cellula). Le sospensioni cellulari infettate sono state poste in piastre a 6 pozzetti a una concentrazione pari a 1.7×10^6 cellule/ml (circa 5×10^6 cellule per pozzetto), centrifugate per 45 minuti (min) a 700 x g e, successivamente, incubate a 37°C per 75 min. Al termine del periodo di adsorbimento (2 ore, h), le cellule sono state sottoposte a due lavaggi con RPMI privo di siero e incubate a 37°C per 30 h, 4, 6 e 7 giorni. Lo stesso protocollo sperimentale è stato applicato al modello di riattivazione, ad eccezione del fatto che dopo un giorno di incubazione i monociti THP-1 infettati sono stati differenziati a macrofagi aggiungendo TPA (80 nM) al terreno di coltura. Le cellule differenziate sono state poi incubate per i tempi prestabiliti.

Come per l'infezione delle cellule THP-1, anche per i fibroblasti MRC5 l'adsorbimento del virus è stato effettuato in centrifugazione a 700 x g per 45 min seguito da un incubazione di 15 min a 37°C; dopo l'adsorbimento, l'inoculo virale è stato rimosso e sostituito con E-MEM (10%).

4.1.4 Analisi citofluorimetrica di monociti e macrofagi THP-1 non infettati

Monociti THP-1 sono stati coltivati in piastre a 6 pozzetti alla concentrazione 1.7×10^6 cellule/ml e differenziati a macrofagi come descritto nel paragrafo “Colture cellulari” di questa stessa sezione. Al fine di valutare il grado di differenziamento, dopo 4 e 6 giorni i macrofagi THP-1 sono stati tripsinizzati e analizzati mediante citofluorimetria per la presenza dei marcatori di superficie di differenziamento cellulare CD11b e CD14. Aliquote da 0.5×10^6 cellule sono state messe a contatto con anticorpi monoclonali anti-CD11b e anti- CD14 (Becton Dickinson).

La fluorescenza aspecifica è stata valutata utilizzando un controllo isotipico. I dati ottenuti sono stati espressi sia come numero di cellule esprimenti i marcatori di differenziamento, sia come intensità di fluorescenza espressa sulla superficie delle cellule (“Mean Fluorescence Intensity”; MFI). Le analisi sono state effettuate utilizzando lo strumento EPICS® XL-MCL e Expo32ADC Software (Beckman Coulter).

4.1.5 Analisi della progenie virale

L'analisi della progenie virale derivata da cellule THP-1 infettate con il ceppo TB40E e con il ceppo Towne alle tre MOI considerate (0.5 – 0.25 – 0.125) e in seguito differenziate (modello di riattivazione) e mantenute in coltura per 7 giorni, è stata

eseguita utilizzando il sovranatante delle cellule infettate a ciascuna MOI, centrifugato a 13900 x g per 30 min a 4°C e poi ultracentrifugato a 60000 x g per 1 ora a 4°C. Il sedimento virale è stato utilizzato per l'infezione di fibroblasti MRC5 (modello permissivo per eccellenza *in vitro*). La stessa procedura è stata applicata anche al modello sperimentale di latenza come controllo negativo.

La presenza di progenie virale ed il titolo della stessa sono stati valutati dopo 24 h di infezione (per il rilevamento di IE) e dopo 48 h di infezione (per il rilevamento di pp65) mediante immunofluorescenza indiretta, utilizzando nel primo caso un anticorpo monoclonale (diluito 1:20 in tampone fosfato salino [PBS] 1X) diretto contro un epitopo comune alle proteine precocissime maggiori IE1 e IE2 di HCMV (Argène), nel secondo caso un anticorpo monoclonale purificato (diluito 1:20 in PBS 1X) (cloni 1C3 e AYM-1; Argène) diretto verso la fosfoproteina strutturale di matrice pp65.

Per l'immunoreazione, le cellule sono state incubate a 37°C per 1 h in camera umida. Dopo 4 lavaggi in PBS 1X, i preparati cellulari sono stati incubati a 37°C per 30 min in camera umida, con Ig anti-topo coniugate con isotiocianato di fluoresceina (FITC) (Argène) diluite 1:500 in 4',6-diamidin-2-fenilindolo (DAPI) (Sigma-Aldrich) e Blu di Evans (Sigma-Aldrich).

Al termine del periodo di incubazione i preparati sono stati lavati con PBS 1X, montati su vetrini portaoggetti con relativo liquido di montaggio e analizzati con microscopia a fluorescenza (Leica DMLB).

Per eseguire una valutazione quantitativa di fibroblasti MRC5 positivi per IE e pp65, sono stati contati dieci campi selezionati a caso per vetrino e il numero di cellule positive per IE o pp65 è stato espresso come valore medio percentuale rispetto al numero totale di cellule per campo (da 280 a 340 fibroblasti MRC5 totali).

4.1.6 Valutazione dell'infettività virale mediante titolazione della dose infettante il 50% delle colture cellulari (TCID₅₀)

Allo scopo di valutare l'infettività della progenie virale, sono state allestite in terreno E-MEM privo di FBS, 10 diluizioni seriali in base 10 a partire dai sovranatanti di cellule THP-1 infettate e poi differenziate (modello di riattivazione) a tutte le MOI considerate. Una volta allestite le diluizioni, è stata utilizzata una micropiastra a 96 pozzetti, nella quale per ciascuna diluizione sono stati distribuiti 100 µl per pozzetto (4 repliche per diluizione). Inoltre, nella piastra sono stati riservati due pozzetti per il controllo cellule, in cui venivano aliquotati 100 µl di E-MEM privo di siero, e due pozzetti per il controllo di infezione nei quali venivano dispensati 100 µl dei campioni (sovranatanti) non diluiti. Infine, ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 100 µl di sospensione cellulare di fibroblasti MRC5 (6×10^5 cellule/ml) allestita in terreno E-MEM integrato con FBS (5%) precedentemente scomplementato a 56°C per 30 min. La piastra è stata successivamente incubata a 37°C in termostato e osservata quotidianamente, per 5 – 6 giorni, al fine di osservare la presenza di effetto citopatico. I valori di TCID₅₀ sono stati calcolati utilizzando il metodo stabilito da Reed e Muench³⁴³ ed espressi come valori di TCID₅₀ per 0.1 ml.

4.1.7 Estrazione degli esosomi

I sovranatanti delle colture di macrofagi THP-1 derivati da monociti non infettati e di macrofagi THP-1 derivati da monociti (1.7×10^6 cellule/ml) infettati a MOI 0.5 con il ceppo virale TB40E (modello di riattivazione), sono stati sottoposti a centrifugazioni seriali al fine di effettuare l'estrazione degli esosomi: centrifugazione a 1000 x g per 10 min a 4°C per rimuovere le cellule in sospensione; centrifugazione a 10000 x g per 10 min a 4°C del sovranatante per rimuovere i detriti cellulari. A seguire, il

sovranatante derivante dall'ultima centrifugazione è stato sottoposto a ultracentrifugazione a 100000 x g per 90 min a 4°C per la raccolta degli esosomi nel sedimento³⁴⁴. I sedimenti derivanti dai modelli sperimentali considerati sono stati risospesi in PBS 1X e filtrati con un filtro da 0.2 micron. Infine, le sospensioni proteiche ottenute sono state sottoposte a quantificazione applicando il metodo Bradford³⁴⁵.

4.1.8 Elettroforesi su gel di poliacrilamide (“Sodium Dodecyl Sulphate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis”; SDS-PAGE)

L'elettroforesi è stata realizzata utilizzando il sistema Bio-Rad modello Mini-Protean III; questo tipo di elettroforesi sfrutta la combinazione di un gel in cui il campione si concentra (4% poliacrilamide: “stacking gel”) (Sigma-Aldrich) e di un gel a concentrazione di acrilamide utile all'analisi di interesse (nel caso specifico: 10% poliacrilamide: “running gel”), che consente la separazione delle proteine in base al loro peso molecolare.

La migrazione elettroforetica è stata effettuata a 100 Volts per 1 h in soluzione elettrolitica contenente 25 mM Tris, 192 mM glicina (pH 8.3) e sodio dodecilsolfato (SDS; 0.1%) (Sigma-Aldrich). In ogni pozzetto preformato nel gel di “stacking” sono state caricate quantità uguali di proteine (20 µg) per ciascun estratto, in un volume di 10 µl/pozzetto; uno di essi è stato utilizzato per caricare una miscela di proteine colorate a peso molecolare noto (“6.5-200 kDa Prestained Proteine Marker II”; Panreac AppliChem).

4.1.9 Western blotting

Una volta terminata la migrazione elettroforetica su gel, le proteine sono state trasferite elettroforeticamente (“elettroblotting”) su un supporto sintetico solido, costituito da una membrana di fluoruro di polivinilidene (“Immobilon-P PVDF membrane”; Millipore), mediante il sistema “Novex® Western Transfer Apparatus” (Invitrogen). L’elettroblotting è stato effettuato assemblando preventivamente i diversi componenti che poi sono stati immersi in tampone di trasferimento (12 mM Tris, 96 mM glicina, 20% metanolo, acqua Milli-Q) e trasferiti elettroforeticamente a basso voltaggio (20 Volts) per una notte a 4°C. Successivamente, la membrana è stata incubata in latte magro per 30 min in modo da impedire il legame aspecifico degli anticorpi alla superficie della membrana. Per l’analisi degli esosomi, la membrana è stata quindi incubata per 1 h e 30 min in agitazione, a temperatura ambiente con l’anticorpo monoclonale anti-Alix (diluito 1:500 in latte) (HansaBiomed); come controllo positivo è stato utilizzato uno standard di esosomi liofilizzati derivati dal mezzo di coltura di cellule COLO-1 (HansaBiomed).

Dopo incubazione con gli anticorpi primari, la membrana è stata lavata con PBS 1X integrato con 0.2% Tween20 (Sigma-Aldrich) e successivamente incubata (1 h in agitazione, a temperatura ambiente) con l’anticorpo secondario anti-topo (diluito 1:6000 in PBS 1X; Sigma-Aldrich) coniugato con fosfatasi alcalina (AP). Una volta terminato il periodo di incubazione, la membrana è stata lavata per 4 volte con PBS 1X e sottoposta all’immunorivelazione con il substrato dell’enzima fosfatasi alcalina (“BCIP/NBT-buffered”; Sigma-Aldrich).

4.2 RUOLO DELL'INFEZIONE DA CITOMEGALOVIRUS IN SOGGETTI ANZIANI CON *ICTUS* ISCHEMICO

4.2.1 Soggetti arruolati nello studio e raccolta dei campioni di sangue venoso periferico

Lo studio, di tipo osservazionale prospettico, ha previsto l'arruolamento di 105 soggetti anziani (intervallo di età: 65 – 99 anni) con *ictus* ischemico, come primo evento o recidiva di evento minore, ricoverati presso la "Stroke Unit" della Clinica Geriatrica dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma (AOU) di Parma o presso l'Unità Operativa (UO) di Neurologia dell'AOU di Parma. Il protocollo sperimentale è stato sottomesso e approvato dal Comitato Etico Unico di Parma (Codice identificativo del progetto: PRUa1RI-2012-006). I pazienti o i loro rappresentanti autorizzati sono stati informati sulle caratteristiche dello studio ed invitati a sottoscrivere il consenso.

In particolare, i pazienti sono stati sottoposti ad un prelievo di sangue venoso periferico addizionato di anticoagulante (acido etilendiamminotetraacetico; EDTA), eseguito dopo 10 ± 2 giorni dal ricovero, per analizzare i parametri virali di eventuale riattivazione (DNAemia da HCMV) e per la caratterizzazione genotipica delle glicoproteine gN e gO del pericapside di HCMV quali fattori di virulenza.

La valutazione dettagliata, a seguito della raccolta dei dati clinici dei pazienti, ha rivelato la non completa adesione ai criteri di inclusione previsti dallo studio per 6 pazienti che sono stati, pertanto, esclusi. Dei 99 pazienti studiati, 55 erano femmine (55.6%) e 44 maschi (44.4%), con una mediana di età di 78 anni ed un intervallo compreso tra 65 e 99 anni (limiti inferiore e superiore, rispettivamente, stabiliti dai criteri di inclusione).

4.2.2 Valutazione della risposta anticorpale nei confronti di citomegalovirus

Allo scopo di stabilire l'esposizione pregressa all'infezione da HCMV, mediante saggio immunoenzimatico è stata effettuata la determinazione di immunoglobuline (Ig) specifiche di classe G (IgG) dirette contro HCMV ("Liaison CMV IgG II", DiaSorin e Liaison XL instrument, DiaSorin) sui 99 campioni di plasma ottenuti da ciascun paziente entro 3 giorni dall'evento.

4.2.3 Quantificazione del DNA di citomegalovirus mediante Real-Time PCR

I campioni di plasma per i quali il dosaggio delle IgG è risultato positivo sono stati sottoposti ad estrazione del DNA totale mediante sistema automatizzato ("NucliSENS® EasyMAG®", bioMérieux) ed è stata determinata la quantità di DNA virale per mezzo di Real-Time PCR quantitativa ("CMV ELITE MGB® Kit", ELITechGroup), amplificando una specifica regione genica rappresentata dall'esone 4 del gene "immediate-early (IE) 1" di HCMV e lettura dei campioni con strumento ABI 7300 Real-Time PCR system (Applied BioSystem).

4.2.4 Arricchimento e differenziamento di monociti

Parallelamente, dai campioni di sangue venoso periferico è stato effettuato l'isolamento dei monociti ed il loro arricchimento.

I campioni sono stati sottoposti a estrazione di linfomonociti ("Peripheral Blood Mononucleated Cells", PBMCs) mediante separazione su gradiente di "Ficoll" (VWR International BPI). Al fine di ottenere un arricchimento di monociti, i PBMCs sono stati incubati a 37°C per 15 min in terreno RPMI in presenza di siero umano (20%) (Sigma-Aldrich). Successivamente, i monociti sono stati indotti al differenziamento a

macrofagi, ovvero cellule aderenti al substrato, mediante il fattore di crescita “Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor” (GM-CSF) (Sigma-Aldrich) e mantenuti a 37°C per 7 giorni in terreno RPMI al 10% di siero umano.

4.2.5 Ricerca di specifiche sequenze dei geni gN e gO di citomegalovirus mediante nested PCR

I macrofagi sono stati sottoposti ad estrazione del DNA (“QIAamp® DNA Mini Kit”, Qiagen), in seguito quantificato mediante spettrofotometro (NanoDrop). Infine, sono state eseguite le reazioni di amplificazione genica mediante nested PCR delle sequenze geniche di HCMV codificanti per gN (UL73) e gO (UL74). Una sequenza specifica dell’enzima cellulare costitutivo “glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase” (GAPDH) è stata utilizzata come controllo di estrazione, mentre il DNA dello stipite virale di riferimento Towne è stato impiegato come controllo di amplificazione genica.

I “primers” (Biosense) utilizzati per le reazioni di amplificazione sono riportati di seguito:

gN (UL73; amplificato atteso: ~400 bp) ³⁴⁶

gN-Forward (external): 5’-TCCCAGAATCGCTGAAAA-3’

gN-Reverse (external): 5’-CACCCACGTATGTAAACCTTAC-3’

gN-up (internal): 5’-TGGTGTGATGGAGTGGAAAC-3’

gN-low (internal): 5’-TAGCCTTTGGTGGTGGTTGC-3’

gO (UL74; amplificato atteso: ~372 bp) ²²²

gO-Forward (external): 5’-CAACGGTAGATGAGCAGCAA-3’

gO-Reverse (external): 5’-CATGGCGTTAACCAGGTAGAA-3’

gO-up (internal): 5’-CGACCAGAATCAGCAGTGAG-3’

gO-low (internal): 5’-TAGCCTTTGGTGGTGGTTGC-3’

GAPDH (amplificato atteso: ~242 bp)

GAPDH-Forward: 5'–AAGGCTGTGGGCAAGGTCAT–3'

GAPDH-Reverse: 5'–GAGGAGTGGGTGTCGCTGTT–3'

4.2.6 Polimorfismo di lunghezza dei frammenti di restrizione

I relativi prodotti di amplificazione sono stati sottoposti a digestione enzimatica con differenti combinazioni di enzimi di restrizione (“Restriction Fragment Length Polymorphism”; RFLP) al fine di rilevare i diversi genotipi. Gli enzimi di restrizione utilizzati secondo le indicazioni della ditta produttrice (Fermentas) sono di seguito riportati:

- *SacI* (*Streptomyces achromogenes*), *Scal* (*Streptomyces caespitosus*) e *SalI* (*Streptomyces albus* G.) per la digestione del gene gN;
- *HpaII* (*Haemophilus parainfluenzae*) per la digestione del gene gO.

I prodotti di digestione sono stati, infine, caricati su gel di agarosio al 2% in tampone Tris-acetato-EDTA (TAE) 1X (“Electrophoresis Buffer”; Thermo Scientific) addizionato di bromuro di etidio, sottoposti ad elettroforesi (100 Volts) e visualizzati mediante lo strumento GelDoc XR (BioRad) dotato di fotocamera digitale e software per l’acquisizione delle immagini.

4.3 RUOLO DELL'INFEZIONE DA CITOMEGALOVIRUS IN PAZIENTI AFFETTI DA SCLEROSI SISTEMICA

4.3.1 Soggetti arruolati nello studio e raccolta dei campioni di sangue venoso periferico

Questo studio osservazionale prospettico, distribuito complessivamente su 3 anni, prevede l'arruolamento di 50 pazienti affetti da SSc presso l'UO di Reumatologia dell'AOU Policlinico di Modena ed un numero equivalente di soggetti sani di controllo, paragonabili per età e genere. Il protocollo sperimentale è stato sottomesso e approvato dal Comitato Etico Locale e dal Comitato Etico "Area Vasta Emilia Nord" (Codice identificativo del progetto: 2742016). I soggetti arruolati sono stati informati sulle caratteristiche dello studio ed invitati a sottoscrivere il consenso.

Ad oggi sono stati arruolati 20 pazienti e 18 soggetti sani, i quali sono stati sottoposti, presso la UO dell'AOU Policlinico di Modena, rispettivamente, ad un prelievo di:

- sangue venoso periferico eparinato;
- sangue venoso periferico-EDTA;
- sangue venoso periferico senza anticoagulante.

Nell'ambito della stessa mattinata in cui è stato effettuato il prelievo ematico, i suddetti prelievi di sangue venoso periferico sono stati portati alla UO di Virologia dell'AOU di Parma per l'applicazione immediata del protocollo sperimentale stabilito e/o conservazione e congelamento a -80°C . In particolare, il campione di sangue venoso periferico eparinato è stato subito processato ed utilizzato per la valutazione delle risposte linfocitarie T HCMV-specifiche. Per quanto riguarda il campione di sangue venoso periferico-EDTA, una parte è stata suddivisa in aliquote e conservata a -80°C (sangue intero), mentre la rimanente parte è stata centrifugata a $1250 \times g$

per 15 min a temperatura ambiente ed il sovranatante (plasma) è stato suddiviso in aliquote e conservato a -80°C per la successiva ricerca del DNA di HCMV. Infine, il campione di sangue venoso periferico senza anticoagulante è stato sottoposto a centrifugazione a 1.250 x g per 15 min a temperatura ambiente ed il sovrinatante (siero) è stato suddiviso in aliquote e conservato a -80°C.

Tutti i pazienti inclusi nello studio hanno soddisfatto i criteri ACR/EULAR 2013 per la SSc e sono stati classificati in pazienti affetti da SSc con forma cutanea limitata o diffusa in base all'entità del coinvolgimento cutaneo ³⁴⁷. Le indagini clinico-epidemiologiche e di laboratorio, inclusa la determinazione del “modified Rodnan skin score” (mRSS) per la valutazione dell'entità della fibrosi cutanea ^{348,349} e del coinvolgimento degli organi interni, sono state eseguite secondo metodologie standardizzate ^{299,302}; in particolare, l'mRSS è stato esaminato in 17 siti mediante palpazione ed è stato clinicamente valutato su una scala di ispessimento cutaneo: 0 (normale), 1 (debole), 2 (intermedio) o 3 (severo). Le caratteristiche cliniche e sierologiche sono state accuratamente valutate ed estrapolate dalle cartelle cliniche dei pazienti. Infine, coerentemente con i dati riportati in letteratura, i pazienti affetti da SSc da un arco temporale superiore a 6 anni sono stati classificati come pazienti in stadio tardivo di malattia ^{300,306}.

4.3.2 Valutazione della risposta anticorpale nei confronti di citomegalovirus

Allo scopo di stabilire l'esposizione all'infezione da HCMV, i campioni di sangue periferico ottenuti dai pazienti e dai soggetti sani arruolati nello studio sono stati sottoposti a determinazione delle immunoglobuline (Ig) specifiche di classe G (IgG) e M (IgM) dirette contro HCMV mediante saggio immunoenzimatico (“Enzygnost Anti-CMV/IgG and IgM ELISA kit”; BEP® III System, Siemens).

4.3.3 Separazione dei linfomonociti e valutazione delle risposte linfocitarie T citomegalovirus-specifiche

I PBMCs sono stati ottenuti mediante centrifugazione del campione di sangue venoso periferico eparinato su gradiente di densità di “Ficoll”. Dopo un lavaggio con PBS 1X, i PBMCs sono stati risospesi in terreno completo, costituito da RPMI addizionato di FBS (10%) scomplementato, sodio piruvato (1%), L-glutamina (1%), antibiotici (penicillina 100 unità/ml e streptomina 100 µg/ml). Dopo aver contato i PBMCs vitali individuati mediante colorazione con Trypan Blu (Sigma-Aldrich) in camera di Burker, la sospensione cellulare è stata diluita fino ad ottenere una concentrazione pari a 5×10^6 cellule/ml.

Le risposte linfocitarie T anti-HCMV sono state valutate mediante prove funzionali, nelle quali i PBMCs sono stati immediatamente stimolati per 16 h con:

- enterotossina stafilococcica B da *Staphylococcus aureus* (SEB; controllo positivo) (Sigma-Aldrich);
- DMSO risospeso in RPMI (FBS 10%) (controllo negativo);
- 3 peptidi HCMV-specifici: prodotto del gene UL83 (pp65, proteina strutturale del tegumento); prodotto del gene UL123 (IE1, proteina precocissima maggiore) e prodotto del gene UL94 (“capsid-binding protein”) (“PepMix™”; JPT Peptide Technologies).

Per effettuare la stimolazione sono state allestite miscele di reagenti in 5 tubi, secondo lo schema riportato in Tabella 1. In particolare, a ciascun tubo sono state aggiunte quantità fisse di RPMI (FBS 10%), di inibitore del trasporto proteico “monensina” (“BD GolgiStop&trade”; BD Biosciences) ed, infine, i reagenti con funzione di stimolo specifico sopracitati, per un volume complessivo pari a 50 µl/tubo.

Tabella 1. Volumi dei reagenti necessari per effettuare la stimolazione dei linfociti T CD4+ e CD8+ mediante i peptidi pp65, IE1 e UL94 di HCMV.

Tubo	Mix (RPMI 10% + monensina)	Stimolo	Quantità di stimolo
1	48.5 µl + 0.5 µl	SEB (controllo positivo)	1 µl
2	43.5 µl + 0.5 µl	RPMI + DMSO (controllo negativo)	4 µl + 2 µl
3	43.5 µl + 0.5 µl	UL83 (pp65) (proteina del tegumento virale)	6 µl
4	43.5 µl + 0.5 µl	UL123 (IE1) (proteina precocissima maggiore 1)	6 µl
5	43.5 µl + 0.5 µl	UL94 ("capsid-binding protein")	6 µl

Successivamente, sono stati aggiunti ad ogni tubo 200 µl della sospensione di PBMCs, in modo da stimolare 1×10^6 cellule/tubo. I tubi sono stati sottoposti a miscelamento meccanico su vortex e riposti in incubatore a 37°C per 2 h. Allo scadere dell'incubazione, per trattenere le citochine all'interno della cellula, sono stati aggiunti a ciascun tubo 250 µl di terreno contenente l'inibitore del trasporto proteico "Brefeldina A" (BFA) (Sigma-Aldrich). I tubi sono stati, quindi, collocati nuovamente nell'incubatore per 14 ore.

Il mattino seguente, trascorse complessivamente 16 ore di stimolazione, è stata eseguita la colorazione di superficie (marcatori CD3+, CD4+ e CD8+) ed intracitoplasmatica (IFN-gamma) mediante reazione di immunofluorescenza. I tubi sono stati prelevati dall'incubatore e, dopo aver aggiunto a ciascun tubo 100 µl di

soluzione contenente EDTA (20 mM; Sigma-Aldrich), sono stati riposti nuovamente in incubatore a 37°C per 10 min. A ciascuno dei tubi sono stati aggiunti 2 ml di soluzione di lavaggio; i tubi sono stati centrifugati a 400 x g per 8 min a 4°C. Al termine della centrifugazione, dopo aver eliminato il sovrnatante, al sedimento di cellule sono stati aggiunti 5 µl/tubo di anticorpo monoclonale anti-CD4 coniugato con ficoeritrina (PE) (BD Biosciences), 5µl di anticorpo monoclonale anti-CD8 coniugato con allofococianina (APC) (BD Biosciences) e 5µl di anticorpo monoclonale anti-CD3, marcatore pan-leucocitario T (SK7) coniugato con peridinina clorofilla (PerCP) (BD Biosciences), ed i tubi sono stati incubati per 30 min a 4°C. Al termine dell'incubazione, in ciascun tubo è stato aggiunto 1 ml di lisante ("FACS Lysing Solution"; BD Biosciences) e, dopo un'incubazione al buio, a temperatura ambiente per 10 min, sono stati addizionati 2 ml di soluzione di lavaggio. Dopo aver centrifugato a 400 x g per 8 min a 4°C ed aver eliminato il sovrnatante, in ciascun tubo è stato aggiunto 1 ml di permeabilizzante ("BD FACS&trade, Permeabilizing Solution"; BD Biosciences) e, dopo un'incubazione al buio, a temperatura ambiente per 10 min, è stato ripetuto un lavaggio mediante apposito tampone e centrifugazione a 400 x g per 8 min a 4°C.

Infine, è stato aggiunto ad ogni tubo 1 µl di anticorpo anti-IFN-gamma coniugato a FITC (BD Biosciences) ed è stata effettuata un'incubazione al buio di 30 min a 4°C. Al termine, è stato eseguito un ultimo lavaggio e, dopo aver risospeso le cellule in 100 µl di PBS 1X, i campioni sono stati sottoposti ad analisi citofluorimetrica.

4.3.4 Analisi citofluorimetrica

I campioni sono stati acquisiti mediante il citofluorimetro FACSCalibur (BD Biosciences) e sono stati analizzati almeno 0.5×10^6 – 0.7×10^6 eventi/tubo

utilizzando il software CELLQuest (BD Biosciences). Innanzitutto, è stata generata una regione o “gate” elettronico, identificato tramite i parametri “forward angle” e “side scatter” (FSC-H e SSC-H), i quali suddividono rispettivamente le cellule in base alla dimensione e alla densità. Successivamente, le cellule T CD4+ e CD8+ sono state selezionate sul grafico dei linfociti CD3 vs CD4 o, in alternativa, sul grafico dei linfociti CD3 vs CD8. Infine, le risposte delle cellule T (IFN-gamma+) CD4+ o CD8+ sono state definite come la percentuale di eventi IFN-gamma+ nei campioni stimolati dopo la sottrazione della percentuale di eventi IFN-gamma+ nel corrispondente controllo negativo.

4.3.5 Analisi statistica

Le analisi statistiche sono state eseguite mediante GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc.). Il saggio di D'Agostino e Pearson è stato utilizzato per verificare la normalità dei campioni. Al fine di esaminare le relazioni tra le risposte delle cellule T in seguito a stimolazione HCMV-specifica e la durata della malattia o l'mRSS è stata calcolata la correlazione non parametrica (Spearman). Il saggio non parametrico di Mann-Whitney è stato utilizzato per confrontare i gruppi. I dati sono espressi come mediana ed interquartili. Un valore di probabilità di $p < 0.05$ è stato considerato significativo.

5. RISULTATI

5.1 VALIDAZIONE DI UN MODELLO DI INFEZIONE *IN VITRO* PER LO STUDIO DELLA RIATTIVAZIONE DI CITOMEGALOVIRUS

5.1.1 Verifica dell'avvenuto differenziamento (indotto mediante esteri del forbolo) dei monociti THP-1 a macrofagi

In primo luogo, mediante citofluorimetria, è stata analizzata l'espressione dei marcatori di differenziamento CD11b e CD14 in monociti THP-1 non infettati vs macrofagi THP-1 non infettati dopo 4 e 7 giorni di differenziamento con TPA (Figura 9).

Per quanto riguarda il marcatore CD14, i risultati hanno dimostrato che esso viene già altamente espresso in monociti THP-1 (Figura 9, pannello A). Tuttavia, la valutazione del valore di fluorescenza media (MFI), che riflette la concentrazione dei coniugati fluorescenti presenti sulla superficie cellulare, ha mostrato che l'intensità dell'espressione del recettore CD14 aumenta sulla superficie dei macrofagi THP-1 (Figura 9, pannello B). Per quanto riguarda il marcatore CD11b, è stato osservato che il numero di cellule che esprimono questo recettore è significativamente maggiore in macrofagi THP-1 (Figura 9, pannello A), mentre l'espressione della fluorescenza MFI è risultata piuttosto costante in entrambi i tipi cellulari (Figura 9, pannello B). Inoltre, al fine di valutare il tasso di differenziamento nel modello di riattivazione (considerando che il processo di differenziamento induce l'adesione cellulare al substrato), sono state contate le cellule aderenti in 20 campi selezionati in

modo casuale sia nel caso di monociti differenziati a macrofagi non infettati sia di monociti infettati latentemente e differenziati dopo l'infezione (modello di riattivazione). Le due condizioni hanno mostrato risultati paragonabili (94% di cellule aderenti in monociti THP-1 non infettati differenziati in macrofagi vs 85% di cellule aderenti nel modello di riattivazione).

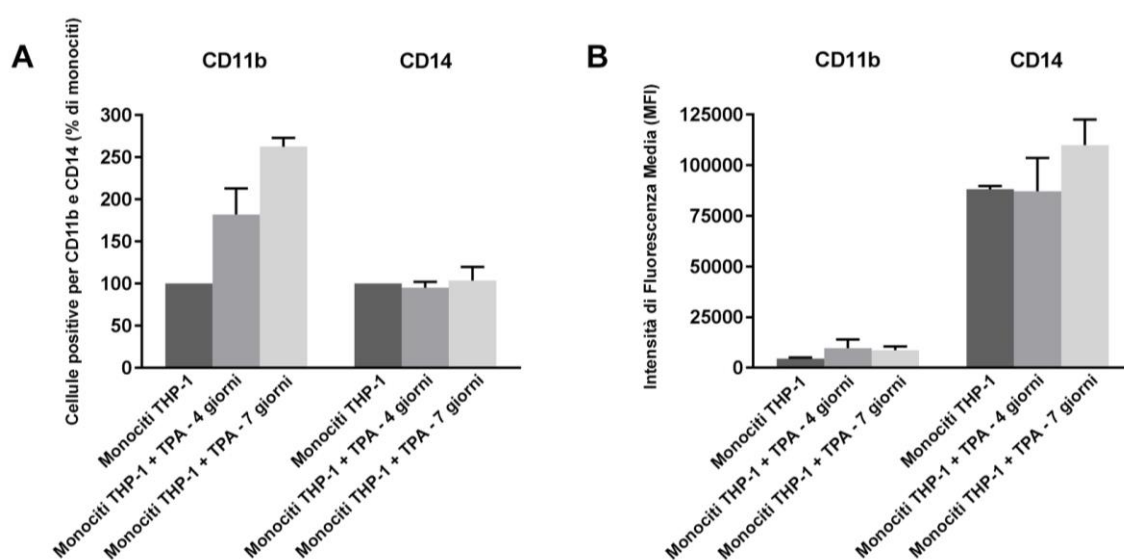


Figura 9. Caratterizzazione dei marcatori di differenziamento CD11b e CD14 mediante citofluorimetria a flusso nei monociti THP-1 non infettati e nei macrofagi THP-1 derivati da monociti. **(A)** Per la valutazione quantitativa delle cellule (monociti e macrofagi THP-1) esprimenti i marcatori di differenziamento CD11b e CD14, è stata eseguita una reazione di immunofluorescenza come descritto nella sezione “Materiali e metodi” a 4 e 6 giorni dopo il differenziamento mediante TPA. **(B)** Analisi dei valori medi di intensità di fluorescenza (MFI) dei marcatori CD11b e CD14 in monociti e macrofagi THP-1 non infettati a 4 e 6 giorni dopo il differenziamento mediante TPA. Ai valori di MFI totali sono stati sottratti i valori di MFI di cellule marcate con un anticorpo avente funzione di controllo isotipico (controllo negativo). I risultati sono stati espressi come percentuale di monociti THP-1 positivi per i marcatori CD11b e CD14, rispettivamente. Le analisi sono state effettuate selezionando le cellule vitali. Sono stati condotti due esperimenti indipendenti; le barre di errore nei grafici rappresentano le deviazioni standard. I valori sono stati elaborati mediante il software GraphPad Prism 7.0.

5.1.2 Analisi della progenie virale derivata da cellule THP-1 utilizzate come modello di riattivazione

Innanzitutto, al fine di verificare il completamento del ciclo replicativo del ceppo TB40E, è stata valutata la produzione di progenie virale nel modello di riattivazione a 7 giorni dall'infezione ("post infection", p.i.). La stessa procedura sperimentale è stata applicata anche al modello di latenza come controllo negativo; inoltre, l'efficienza della replicazione produttiva del ceppo TB40E in seguito a riattivazione è stata confrontata con quella ottenuta utilizzando il ceppo di laboratorio Towne (Figura 10 e Figura 11). A tale fine, il sovrinatante ottenuto dai modelli di latenza e riattivazione utilizzando gli stipiti virali TB40E o Towne dopo 7 giorni di infezione, è stato processato come indicato nella sezione "Materiali e Metodi" ed utilizzato per l'infezione di fibroblasti umani MRC5 (un modello cellulare altamente permissivo all'infezione litica di HCMV *in vitro*). Le cellule positive per le proteine precocissime maggiori IE1 e IE2 (IE) sono state identificate mediante immunofluorescenza e rivelazione degli antigeni IE di HCMV nei nuclei di fibroblasti MRC5 infettati, utilizzando anticorpi diretti contro un epitopo comune alle proteine virali sopramenzionate (Figura 10A: TB40E; Figura 10C: Towne; pannelli a, b, c e a', b', c': risultati per MOI 0.5, 0.25, 0.125, rispettivamente). La valutazione quantitativa dei fibroblasti infettati (positivi per IE) è mostrata in Figura 10B per il ceppo TB40E e in Figura 10D per il ceppo Towne. In modo analogo, mediante immunofluorescenza sono state determinate la presenza e la quantità dell'antigene virale tardivo pp65 in fibroblasti MRC5 dopo l'infezione con il sovrinatante derivato dai modelli di latenza e riattivazione TB40E o Towne (Figura 11A, B: TB40E; Figure 11D, 11E: Towne). La progenie virale derivata dal ceppo TB40E e quella ottenuta dal ceppo Towne in seguito a riattivazione sono state titolate utilizzando il saggio TCID₅₀, come descritto

nella sezione "Materiali e Metodi" (Figura 11C, Figura 11F per TB40E e Towne, rispettivamente). I risultati ottenuti dimostrano, per entrambi i virus, la presenza di una progenie virale infettante nel modello riattivazione e la sua assenza nel modello di latenza; l'efficienza di infezione del ceppo endoteliotropico TB40E è risultata essere superiore rispetto a quella del ceppo Towne.

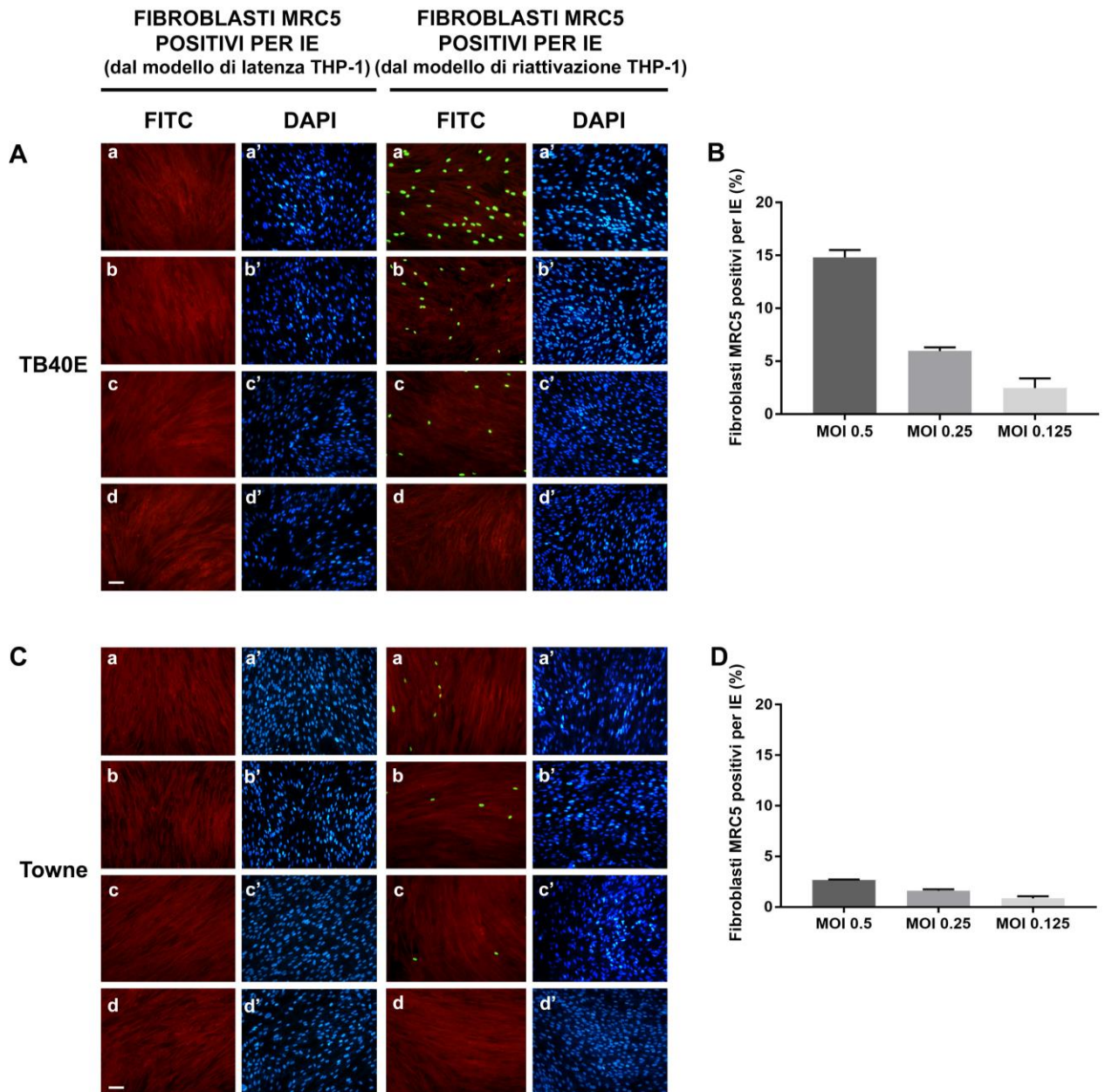


Figura 10. Analisi della progenie di HCMV derivata dai modelli di latenza e riattivazione THP-1: profilo di immunofluorescenza dell'antigene IE. (A) e (C): i fibroblasti MRC5 sono stati infettati

con il terreno di coltura derivato da monociti THP-1 ("MRC5 positive per IE dal modello di latenza THP-1") e THP-1 macrofagi ("MRC5 positive per IE dal modello di riattivazione THP-1"), che erano stati infettati con il ceppo TB40E (**A**) o con il ceppo Towne (**C**) di HCMV ad una MOI di 0.5 (pannelli a, a'), 0.25 (pannelli b, b') o 0.125 (pannelli c, c') per 7 giorni. A 24 h p.i., i fibroblasti MRC5 sono stati fissati e marcati con un anticorpo monoclonale specifico per l'epitopo comune codificato dall'esone 2 dei geni IE1 e IE2 di HCMV. L'immunoreazione è stata rivelata mediante un anticorpo anti-topo coniugato con FITC (pannelli a, b, c, d: FITC, nuclei verdi). Le cellule sono state colorate con il mezzo di contrasto blu di Evans (pannelli a, b, c, d: cellule rosse) e l'intercalante del DNA DAPI (pannelli a', b', c', d': nuclei blu). Pannelli d, d': cellule non infettate. Le immagini sono state acquisite per mezzo di un microscopio a fluorescenza convenzionale. Bar: 25 micron. (**B**) e (**D**): Valutazione quantitativa dei fibroblasti MRC5 positivi per IE infettati con il terreno di coltura derivato dai modelli di riattivazione TB40E (**B**) o Towne (**D**). I valori sono espressi come percentuale media di cellule positive per IE per campo (sono stati contati dieci campi scelti in modo casuale per vetrino) e provengono da due esperimenti indipendenti; le barre di errore indicano le deviazioni standard. I valori sono stati elaborati utilizzando il software GraphPad Prism 7.0.

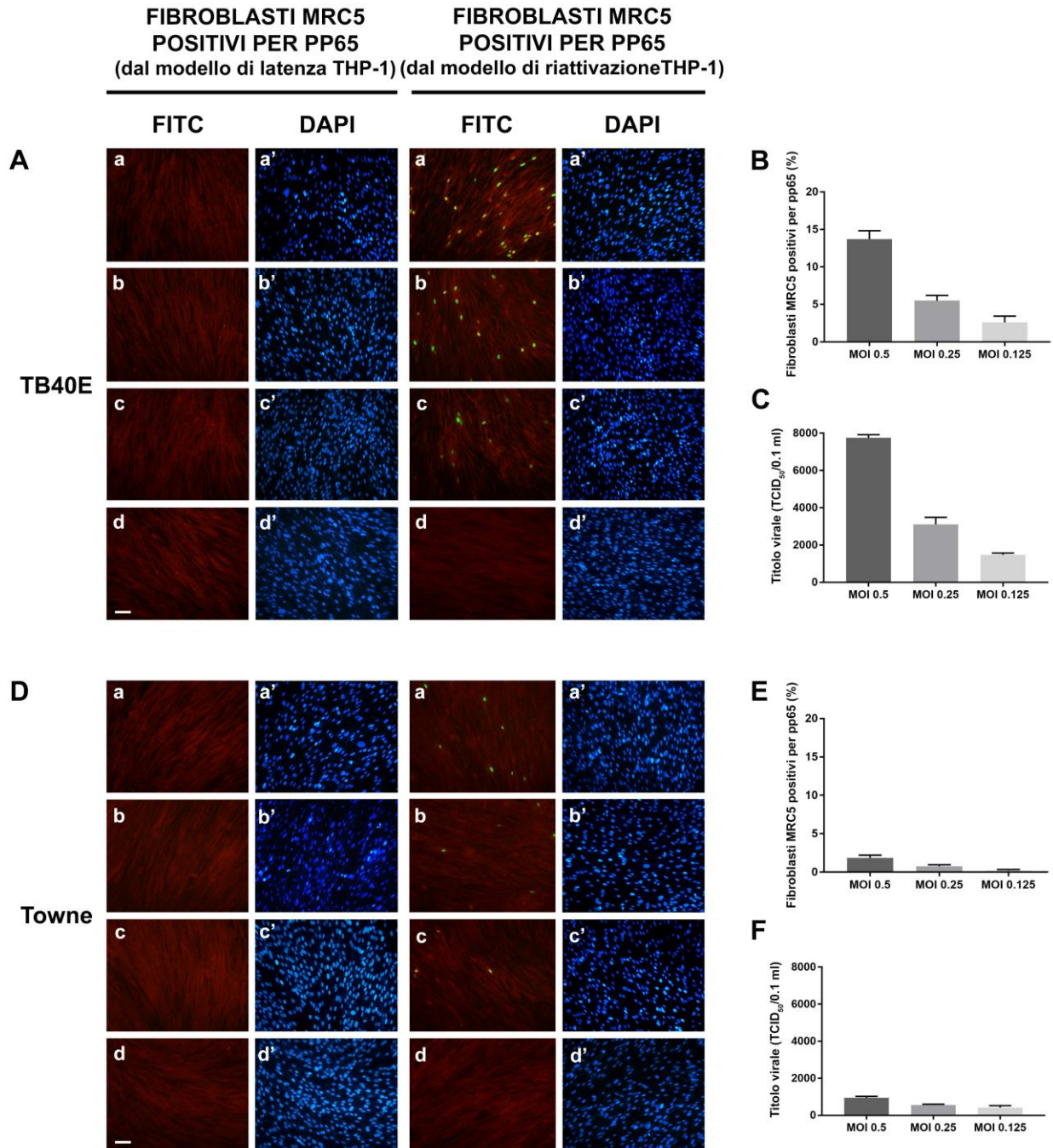


Figura 11. Analisi della progenie di HCMV derivata dai modelli di latenza e riattivazione THP-1: profilo di immunofluorescenza dell'antigene pp65 e titolazione della progenie virale. **(A)** e **(D)**: i fibroblasti MRC5 sono stati infettati con terreno di coltura derivato da monociti THP-1 ("MRC5 positive per pp65 dal modello di latenza THP-1") e macrofagi THP-1 ("MRC5 positive per pp65 dal modello di riattivazione THP-1") infettati con il ceppo TB40E **(A)** o con il ceppo Towne **(D)** di HCMV ad una MOI di 0.5 (pannelli a, a'), 0.25 (pannelli b, b') e 0.125 (pannelli c, c') per 7 giorni. A 48 h p.i., i fibroblasti MRC5 sono stati fissati e marcati con un anticorpo monoclonale che reagisce con la fosfoproteina di matrice virale pp65. L'immunoreazione è stata rivelata mediante un anticorpo anti-topo coniugato con FITC (pannelli a, b, c, d: FITC, nuclei verdi). Le cellule sono state colorate con il mezzo di contrasto blu di Evans (pannelli a, b, c, d: cellule rosse) e con l'intercalante del DNA DAPI (pannelli a', b', c', d': nuclei blu). Pannelli d, d': cellule

non infettate. Le immagini sono state acquisite per mezzo di un microscopio a fluorescenza convenzionale. Bar: 25 micron. **(B)** ed **(E)**: Valutazione quantitativa dei fibroblasti MRC5 positivi per pp65 infettati con il terreno di coltura derivato dai modelli di riattivazione TB40E **(B)** o Towne **(E)**. I valori sono espressi come percentuale media di cellule positive per pp65 per campo (sono stati contati dieci campi scelti in modo casuale per vetrino) e provengono da due esperimenti indipendenti; le barre di errore indicano le deviazioni standard. I valori sono stati elaborati utilizzando il software GraphPad Prism 7.0. **(C)** e **(F)**: La progenie virale derivata dai terreni di coltura dei modelli di riattivazione TB40E **(C)** o Towne **(F)** è stata valutata mediante il saggio TCID₅₀ come descritto nella sezione "Materiali e metodi". Sono stati condotti due esperimenti indipendenti; le barre di errore nei grafici rappresentano le deviazioni standard. I valori sono stati elaborati per mezzo del software GraphPad Prism 7.0.

5.1.3 Analisi degli esosomi

La presenza di esosomi è stata verificata mediante Western blotting attraverso l'utilizzo del marcatore esosomiale Alix. L'analisi è stata applicata ai sovranatanti di macrofagi THP-1 derivati da monociti non infettati e di macrofagi THP-1 derivati da monociti infettati per 7 giorni a MOI 0.5 con il ceppo virale TB40E (modello di riattivazione), entrambi trattati per l'estrazione degli esosomi (ultracentrifugazione a 100000 x g), a confronto con il sovranatante derivato dal modello di riattivazione ed utilizzato come inoculo virale (ultracentrifugazione a 60000 x g) per l'infezione di fibroblasti MRC5 (Figura 12). I risultati mostrano un chiaro segnale nel caso dei sovranatanti di macrofagi THP-1 derivati da monociti non infettati o infettati con il ceppo TB40E e sottoposti ad estrazione degli esosomi (Figura 12, colonne 2 e 3, rispettivamente), così come nel controllo positivo (Figura 12, colonna 4: esosomi derivati da cellule COLO-1). D'altra parte, nessun segnale è risultato presente nel caso del sovranatante derivato dal modello di riattivazione ed utilizzato come inoculo virale (Figura 12, colonna 1).

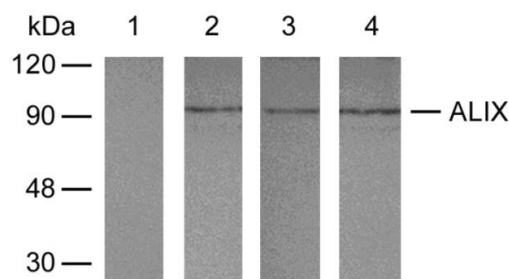


Figura 12. Analisi biochimica del marcatore esosomiale Alix mediante Western blotting. Colonna 1: frazione proteica ottenuta dal sovranatante di macrofagi THP-1 derivati da monociti infettati (7 giorni p.i.) con il ceppo virale TB40E (modello di riattivazione) ed utilizzato come inoculo virale (ultracentrifugazione a 60000 x g); colonna 2: frazione proteica ottenuta dal sovranatante di macrofagi THP-1 derivati da monociti non infettati sottoposto ad estrazione degli esosomi (ultracentrifugazione a 100000 x g); colonna 3: frazione proteica ottenuta dal sovranatante di macrofagi THP-1 derivati

da monociti infettati (7 giorni p.i.) con il ceppo virale TB40E (modello di riattivazione) sottoposto ad estrazione degli esosomi (ultracentrifugazione a 100000 x g); colonna 4: estratto purificato di esosomi derivato dal sovranatante di cellule COLO-1 (controllo positivo). I marcatori del peso molecolare sono indicati sulla sinistra della figura.

5.2 RUOLO DELL'INFEZIONE DA CITOMEGALOVIRUS IN SOGGETTI ANZIANI CON *ICTUS* ISCHEMICO

5.2.1 Valutazione della risposta anticorpale nei confronti di citomegalovirus e quantificazione del DNA virale mediante Real-Time PCR

La determinazione delle IgG anti-HCMV nei 99 campioni di sangue analizzati in questa categoria di soggetti ha rivelato che 92 erano positivi, mentre 7 campioni erano negativi. Questi risultati hanno rivelato che il 93% dei soggetti anziani colpiti da *ictus* ischemico inclusi in questo studio presentava positività per IgG, indice di un'infezione pregressa da HCMV.

I campioni saggiati per la presenza e la concentrazione del DNA virale sono stati complessivamente 77 su 92 per l'impossibilità di eseguire il prelievo dopo 10 ± 2 giorni dal ricovero in 14 pazienti (7 deceduti e 8 non raggiungibili). In 9 campioni (9/77; 11.7%) è stato rilevato il DNA di HCMV, mentre i rimanenti 68 sono risultati negativi. Il numero di copie genomiche/ml, riscontrato in tutti i campioni positivi, pur essendo superiore alla soglia di negatività, è risultato sempre dell'ordine di poche centinaia (Tabella 2).

Tabella 2. Rilevazione e quantificazione mediante Real-Time PCR del DNA di HCMV in soggetti anziani con *ictus* ischemico.

Campioni di sangue	Copie genomiche/ml	Ct (threshold cycle)
Campione n°006	231/ml	36.01
Campione n°029	<130/ml	37.51
Campione n°044	<130/ml	37.51
Campione n°046	200/ml	35.81
Campione n°054	<130/ml	37.35
Campione n°062	<130/ml	38.02
Campione n°065	<130/ml	37.7
Campione n° 098	<455/mL	38.6
Campione n° 105	<455/mL	39.33

5.2.2 Genotipizzazione delle glicoproteine gN e gO del pericapside di citomegalovirus

I genotipi delle glicoproteine N e O del pericapside virale si sono rivelati valutabili nel 77.7% dei campioni risultati positivi per DNAemia per HCMV in Real-Time PCR (Tabella 3). In particolare, il genotipo gN3, con le sue due varianti “a” e “b”, è risultato prevalere (57.1%) rispetto ai genotipi gN1 (28.6%) e gN4 (14.3%), mentre, per quanto riguarda gO, i genotipi ricorrenti sono stati gO1 (57.1%) e gO2 (42.9%) (Tabella 4, Figura 13).

Tabella 3. Caratterizzazione dei genotipi gN e gO nell’ambito dei campioni risultati positivi per DNAemia per HCMV.

Campioni di sangue	Genotipi gN	Genotipi gO
Campione n°006	gN3a	gO1
Campione n°029	gN4c	gO2
Campione n°044	Neg	Neg
Campione n°046	gN3b	gO2
Campione n°054	gN1	gO1
Campione n°062	gN1	gO1
Campione n°065	gN3b	gO2
Campione n° 098	gN3a	gO1
Campione n° 105	Neg	Neg

Tabella 4. Schema riassuntivo dei genotipi identificati mediante nested PCR ed analisi RFLP nei campioni di sangue positivi per DNAemia da HCMV.

Genotipi gN	Genotipi gO
4 gN3	4 gO1
2 gN1	3 gO2
1 gN4	

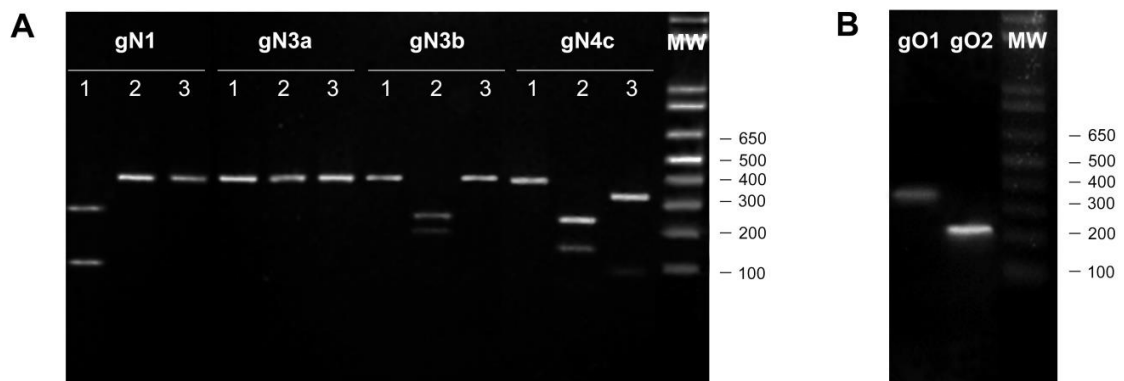


Figura 13. Profili RFLP degli amplificati di nested PCR delle sequenze dei geni codificanti per gN (**A**) e gO (**B**). Per gN gli enzimi di restrizione utilizzati sono indicati dai numeri "1, 2, 3" (1 = *SacI*; 2 = *Scal*; 3 = *SalI*), mentre per la caratterizzazione di gO è stata eseguita una singola digestione con l'enzima *HpaII*; MW: marcatori noti di peso molecolare.

5.3 RUOLO DELL'INFEZIONE DA CITOMEGALOVIRUS IN PAZIENTI AFFETTI DA SCLEROSI SISTEMICA

5.3.1 Popolazione oggetto dello studio

Le principali caratteristiche dei pazienti affetti da SSc e dei soggetti sani inclusi nello studio sono riportate in Tabella 5. In particolare, 4 pazienti sono risultati affetti da SSc con forma cutanea diffusa e 16 da SSc con forma cutanea limitata. L'mRSS dei pazienti nell'ambito della coorte considerata è risultato variare in un intervallo compreso tra 0 e 22 (mediana pari a 8). In 11 pazienti è stata osservata malattia polmonare interstiziale, rilevata per mezzo delle alterazioni radiologiche, spirometriche e mediante il saggio per la valutazione della capacità di diffusione alveolo-capillare con monossido di carbonio in respiro singolo (DLCO Sb%). Infine, il coinvolgimento del cuore e la disfunzione esofagea sono stati rilevati in 8 e 14 pazienti, rispettivamente.

La presenza di anticorpi diretti contro HCMV è stata saggiata nella popolazione inclusa nello studio in concomitanza con l'analisi delle risposte cellulari T; le analisi sierologiche hanno rivelato che 17/20 (85%) pazienti erano sieropositivi per HCMV (16/20 IgG positivi e IgM negativi, mentre 1/20 solo IgM positivo). Per quanto riguarda i soggetti sani, 15/18 (83%) sono risultati positivi per IgG anti-HCMV e negativi per IgM (Tabella 5).

Tabella 5. Principali caratteristiche della popolazione in studio.

	Pazienti SSc	Soggetti sani
Numero (n)	20	18
Età, anni		
Mediana [intervallo]	54 [37-73]	55 [39-62]
Genere, n (%)		
Maschio	4 (20)	2 (11)
Femmina	16 (80)	16 (89)
Sierologia per HCMV, n (%)		
IgG+IgM-	16 (80)	15 (83)
IgG-IgM-	3 (15)	3 (17)
IgG-IgM+	1 (5)	
Durata della malattia, anni		
Mediana [intervallo]	4 [1-19]	
Sottogruppi clinici, n (%)		
SSc cutanea diffusa	4 (20)	
SSc cutanea limitata	16 (80)	
Manifestazioni cliniche, n (%)		
Fenomeno di Raynaud	20 (100)	
Ulcere digitali	7 (35)	
Dita gonfie	10 (50)	
Cicatrici puntiformi sulle dita	7 (35)	
Teleangectasia	12 (60)	
Artralgia	11 (55)	
Malattia polmonare interstiziale	11 (55)	
Coinvolgimento del cuore	8 (40)	
Disfunzione esofagea	14 (70)	
FVC% ¹ , mediana [intervallo]	101 [86-130]	
FEV1% ² , mediana [intervallo]	103 [84-126]	
DLCO Sb% ³ , mediana [intervallo]	65 [31-94]	
modified Rodnan skin score		
Mediana [intervallo]	8 [0-22]	
Autoanticorpi, n (%)		
ANA-positivi ⁴	19 (95)	
ACA-positivi ⁵	8 (40)	
anti-SCI70-positivi	5 (25)	
Trattamento, n (%)		
Steroidi	2 (10)	
Prostanoidi	16 (80)	
Bosentan	5 (25)	
Calcio antagonisti	12 (60)	

¹ FVC=capacità vitale forzata ; ² FEV1=volume espiratorio forzato nel primo secondo;
³ DLCO Sb=capacità di diffusione alveolo-capillare con monossido di carbonio in respiro singolo;
⁴ ANA=anticorpi anti-nucleo; ⁵ ACA=anticorpi anti-centromero.

5.3.2 Risposte linfocitarie T CD4+ e CD8+ totali

Quale fase preliminare dello studio, i linfociti T del sangue periferico, in particolare le popolazioni cellulari T CD3+ (marcatore pan-leucocitario), CD4+ e CD8+ totali, ed il rapporto CD4:CD8 sono stati analizzati in pazienti affetti da SSc a confronto con soggetti sani. I risultati di tali esperimenti, che dimostrano l'assenza di differenze statisticamente significative tra i due gruppi, sono mostrati in Figura 14.

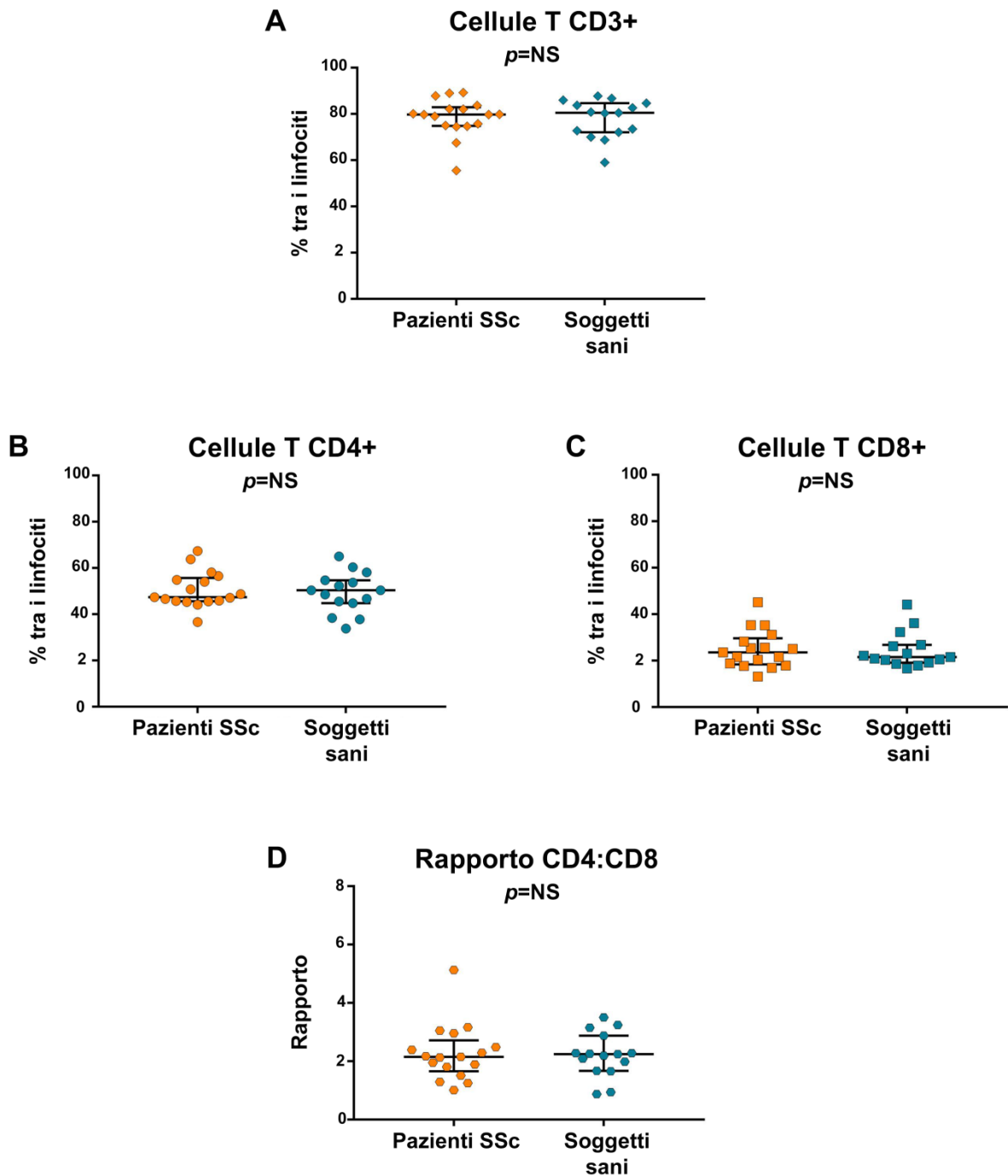


Figura 14. Analisi delle sottopopolazioni linfocitarie in pazienti affetti da SSc confrontate con le sottopopolazioni linfocitarie di soggetti sani: cellule T totali CD3+ (A), CD4+ (B), CD8+ (C) e rapporto CD4:CD8 (D). Per ciascun grafico a dispersione, vengono mostrati la mediana e gli interquartili. Il saggio non parametrico di Mann-Whitney è stato utilizzato per ricavare i valori p (NS=non significativo).

5.3.3 Risposte linfocitarie T CD4+ e CD8+ citomegalovirus-specifiche

Sulla base delle finalità principali dello studio, l'articolazione sperimentale è stata successivamente orientata a definire il possibile coinvolgimento di HCMV nella patogenesi della SSc attraverso l'analisi: 1) delle risposte cellulari T CD4+ e CD8+ virus-specifiche nella coorte di pazienti considerata rispetto a quelle di soggetti sani; 2) delle risposte linfocitarie T CD4+ HCMV-specifiche rispetto a quelle CD8+ nei pazienti con SSc; 3) delle risposte cellulari T CD4+ e CD8+ virus-specifiche rispetto alla durata della malattia e 4) rispetto a parametri clinici (mRSS).

5.3.3.1 Risposte cellulari T CD4+ e CD8+ virus-specifiche nei pazienti con sclerosi sistemica vs soggetti sani

Attraverso questa serie di esperimenti, i cui risultati sono stati analizzati mediante citofluorimetria a flusso, è stata valutata nei pazienti con SSc, a confronto con individui sani, la presenza di cellule T CD4+ e CD8+ circolanti e specifiche per gli antigeni immunodominanti di HCMV considerati (la fosfoproteina del tegumento pp65, la proteina precocissima maggiore IE1 e il prodotto del gene UL94).

La Figura 15 mostra la strategia di "gating" e i grafici rappresentativi delle risposte linfocitarie T HCMV-specifiche in un paziente con SSc (Figura 15A) rispetto ad un soggetto sano (Figura 15B). Le risposte (produzione di IFN-gamma) delle cellule T CD4+ (arancione) o CD8+ (blu) sono state definite come la percentuale di eventi IFN-gamma+ (mostrati nell'angolo superiore destro di ciascuna immagine) nei campioni stimolati con i peptidi pp65, IE1 e UL94 di HCMV, dopo la sottrazione della percentuale di eventi IFN-gamma+ nel corrispondente campione non stimolato. Come si può osservare (Figura 15A: "Paziente SSc"), le risposte delle cellule T CD8+ sono risultate più elevate per i peptidi virali pp65 e IE1 rispetto alle

risposte delle cellule T CD4+. D'altra parte, non sono state osservate differenze sostanziali nelle risposte delle cellule T CD4+ e CD8+ per il soggetto sano con percentuali di risposta HCMV-specifiche assenti o molto più basse rispetto a quelle del paziente (Figura 15B).

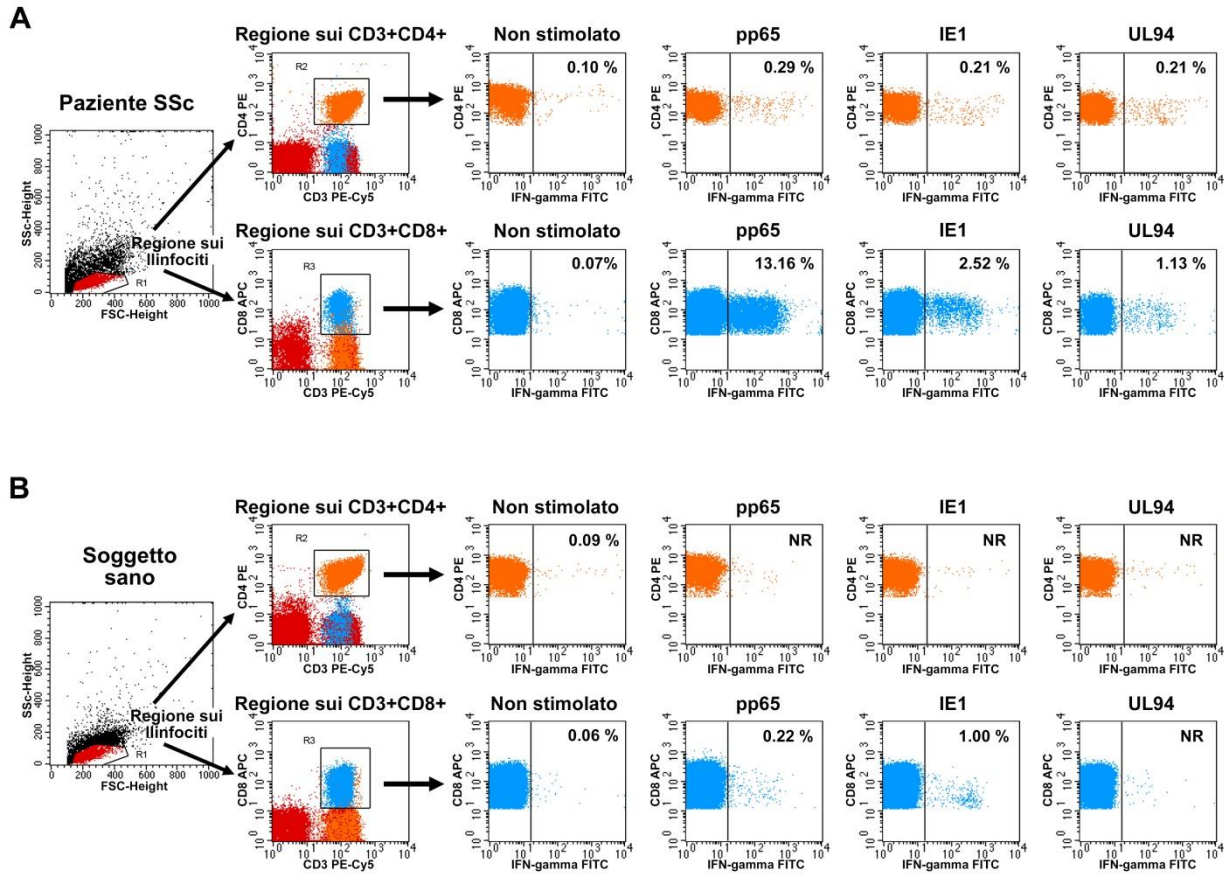


Figura 15. Diagrammi rappresentativi dell’analisi di citometria a flusso che mostrano le risposte HCMV-specifiche delle cellule T CD4+ e CD8+ in un paziente con SSc (**A**) e in un soggetto sano (**B**). I PBMCs sono stati stimolati per 16 ore con i peptidi pp65, IE1 e UL94 di HCMV e colorati come descritto nella sezione “Materiali e metodi”. I linfociti sono stati identificati mediante i profili caratteristici di “forward angle” (FSC-H) e di “side scatter” (SSC-H). Successivamente, le cellule T CD4+ e CD8+ sono state selezionate sul grafico dei linfociti T CD3+ (marcatore pan-leucocitario) vs CD4+ o, in alternativa, sul grafico dei linfociti CD3+ vs CD8+. Infine, le risposte delle cellule T IFN-gamma+ CD4+ o CD8+ sono state definite come la percentuale di eventi IFN-gamma+ nei campioni stimolati con i peptidi pp65, IE1 e UL94, dopo la sottrazione della percentuale di eventi IFN-gamma+ nel corrispondente campione non stimolato (NR=non rilevata [assenza di risposta HCMV-specifica]).

Come già accennato, tale tipologia di approccio sperimentale è stata applicata a tutti i pazienti con SSc e ai controlli sani sieropositivi per HCMV inclusi nello studio (Figura 16). A seguito dell'analisi statistica, le risposte linfocitarie T CD4+ HCMV-specifiche sono risultate essere paragonabili nei pazienti rispetto ai soggetti sani (mediane: 0.38% e 0.00%, rispettivamente; p =non significativo) (Figura 16A). Le risposte relative alle cellule T CD8+ hanno, invece, mostrato un diverso profilo nei due gruppi di soggetti considerati (Figura 16B). Infatti, esse sono risultate significativamente aumentate nei pazienti affetti da SSc rispetto a quelle osservate nei soggetti sani (mediane: 3.51% e 0.45%, rispettivamente; $p=0.004$).

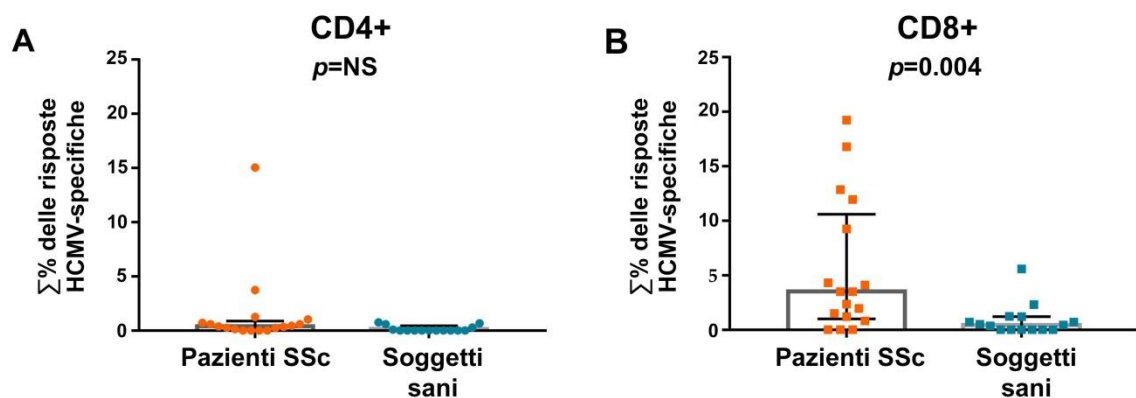


Figura 16. Risposte HCMV-specifiche totali (per i tre antigeni virali considerati) delle cellule T CD4+ (A) e CD8+ (B) nei pazienti affetti da SSc a confronto con quelle rilevate nei soggetti sani. Le risposte linfocitarie T HCMV-specifiche sono state esaminate misurando l'espressione intracellulare di IFN-gamma dopo stimolazione con pp65, IE1 e UL94. Le percentuali ($\Sigma\%$) riportate sono state ottenute sommando ogni singola percentuale di risposta a ciascun peptide virale utilizzato per la stimolazione. Per ciascun grafico a dispersione, vengono mostrati la mediana (colonna) e gli interquartili. Il saggio non parametrico di Mann-Whitney è stato utilizzato per ricavare i valori p (NS=non significativo).

Le percentuali delle risposte cellulari T CD4+ e CD8+ HCMV-specifiche totali ($\Sigma\%$) e quelle relative a ciascuno dei tre peptidi virali considerati (%) per ciascun paziente affetto da SSc arruolato nello studio e ciascun soggetto sano sono mostrate analiticamente nella Tabella 6. Come già accennato, nei pazienti con SSc, le risposte

cellulari T CD8+ complessive HCMV-specifiche sono risultate essere superiori rispetto a quelle delle cellule T CD4+ e dirette principalmente verso pp65 (4/12; pazienti 2, 6, 11 e 14), IE1 (6/12; pazienti 3, 7, 8, 10, 13 e 17) o entrambi (2/12; pazienti 9 e 15). Le percentuali totali delle risposte linfocitarie T CD8+ HCMV-specifiche sono risultate distribuite in un ampio intervallo, compreso tra lo 0.83% e il 19.23%, con una prevalenza di valori elevati (19.23%, 16.81%, 9.27%, 11.95%) e medi (4.33%, 4.12%, 3.51%). Infine, come atteso, in questo studio non sono state osservate risposte linfocitarie T HCMV-specifiche nei pazienti con SSc e nei soggetti sani sieronegativi per HCMV (dati non mostrati); essi sono stati esclusi dagli studi comparativi e dalle analisi statistiche.

Tabella 6. Risposte linfocitarie T CD4+ e CD8+ HCMV-specifiche in pazienti affetti da SSc e soggetti sani sieropositivi per HCMV.

Campioni di sangue	Risposte T CD4+ (%)				Risposte T CD8+ (%)			
	$\Sigma\%$ ¹	pp65	IE1	UL94	$\Sigma\%$	pp65	IE1	UL94
pz ² SSc 1	15.06	3.11	5.28	6.67	12.86	2.65	5.20	5.01
pz SSc 2	0.25	0.25	NR ³	NR	19.23	19.23	NR	NR
pz SSc 3	0.59	NR	NR	0.59	1.21	NR	1.21	NR
pz SSc 4	3.74	0.52	NR	3.22	3.52	0.74	NR	2.78
pz SSc 5	1.04	0.43	0.45	0.6	NR	NR	NR	NR
pz SSc 6	0.71	0.29	0.21	0.21	16.81	13.16	2.52	1.13
pz SSc 7	1.26	0.4	0.28	0.58	9.27	4.08	4.64	0.55
pz SSc 8	NR	NR	NR	NR	4.33	0.98	3.35	NR
pz SSc 9	0.38	NR	0.1	0.28	1.96	1.1	0.86	NR
pz SSc 10	NR	NR	NR	NR	11.95	1.05	10.9	NR
pz SSc 11	0.13	0.13	NR	NR	4.12	3.13	0.77	NR
pz SSc 12	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
pz SSc 13	0.44	0.44	NR	NR	2.37	0.42	1.95	NR
pz SSc 14	0.23	0.23	NR	NR	3.51	3.36	0.15	NR
pz SSc 15	0.35	NR	0.13	0.22	1.51	0.61	0.90	NR
pz SSc 16	0.6	0.28	0.32	NR	NR	NR	NR	NR
pz SSc 17	NR	NR	NR	NR	0.83	NR	0.19	0.64
Ss ⁴ 1	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Ss 2	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Ss 3	0.67	0.33	0.23	0.11	1.23	0.5	0.45	0.28
Ss 4	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Ss 5	0.60	NR	NR	0.60	0.71	0.71	NR	NR
Ss 6	NR	NR	NR	NR	5.60	5.60	NR	NR
Ss 7	0.77	0.56	0.08	0.13	0.72	0.72	NR	NR
Ss 8	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Ss 9	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Ss 10	NR	NR	NR	NR	1.22	0.22	1.00	NR
Ss 11	0.28	0.28	NR	NR	0.52	0.52	NR	NR
Ss 12	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Ss 13	0.09	0.09	NR	NR	2.32	NR	2.32	NR
Ss 14	NR	NR	NR	NR	0.45	0.45	NR	NR
Ss 15	NR	NR	NR	NR	0.37	0.11	0.26	NR

¹ $\Sigma\%$ =risposte totali HCMV-specifiche delle cellule T ottenute sommando le risposte percentuali individuali a ciascun peptide utilizzato per la stimolazione (pp65, IE1, UL94); ² pz=paziente; ³ NR=non rilevata (assenza di risposta HCMV-specifica); ⁴ Ss=soggetto sano.

5.3.3.3 Risposte cellulari T CD8+ nei pazienti con sclerosi sistemica rispetto alla durata della malattia

Le risposte linfocitarie T CD8+ HCMV-specifiche rilevate nei pazienti affetti da SSc sono state analizzate in relazione alla durata della malattia. Sulla base delle definizioni riportate in letteratura circa gli stadi della SSc (stadi più precoci fino a 6 anni dalla diagnosi clinica, stadi più tardivi oltre i 6 anni)^{300,306}, i pazienti inclusi nella coorte in esame sono stati divisi in due gruppi, desumendo dalle cartelle cliniche le informazioni utili al riguardo. I risultati ottenuti (Figura 18) hanno rivelato che, mentre per le risposte cellulari T CD4+ HCMV-specifiche non sono state trovate differenze significative in entrambi i gruppi di pazienti (durata della malattia: ≤ 6 anni e > 6 anni) (Figura 18A), i pazienti in stadio tardivo di malattia (> 6 anni) presentavano un aumento significativo delle risposte linfocitarie HCMV-specifiche delle cellule T CD8+ rispetto ai pazienti con una durata della malattia ≤ 6 anni (mediane: 9.27% e 1.73% , rispettivamente; $p=0.02$) (Figura 18B).

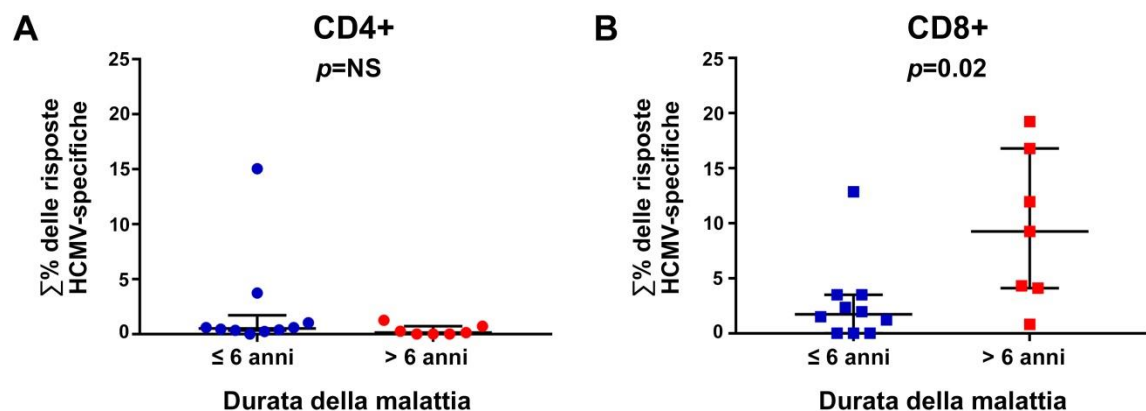


Figura 18. Relazione tra le risposte HCMV-specifiche totali delle cellule T CD4+ (A) o CD8+ (B) e la durata della malattia (≤ 6 anni e > 6 anni). Le percentuali ($\Sigma\%$) riportate sono state ottenute sommando le singole percentuali di risposta ad ogni peptide utilizzato per la stimolazione (pp65, IE1, UL94). Per ciascun grafico a dispersione, vengono mostrati la mediana e gli interquartili. Il saggio non parametrico di Mann-Whitney è stato utilizzato per ricavare i valori p (NS=non significativo).

5.3.3.4 Risposta linfocitaria T CD8+ citomegalovirus-specifica in relazione al “modified Rodnan skin score”

Le risposte linfocitarie T HCMV-specifiche rilevate nei pazienti con SSc sono state analizzate in relazione a un mRSS ≤ 8 o > 8 (valore scelto in quanto rappresenta la mediana nell’ambito della coorte di pazienti considerata; si veda Tabella 5); i risultati di tali indagini sono mostrati in Figura 19. Come si può osservare, i pazienti affetti da SSc con un mRSS superiore a 8 hanno mostrato un aumento significativo delle risposte linfocitarie T CD8+ HCMV-specifiche rispetto a quelli con un mRSS ≤ 8 (mediane: 9.27% e 1.73%, rispettivamente; $p=0.04$). Anche in questo caso, non sono state trovate differenze tra i sottogruppi di mRSS considerati in relazione alle risposte cellulari T CD4+ HCMV-specifiche (dati non mostrati). I valori di mRSS dei pazienti con SSc oggetto dello studio non sono risultati correlare con la durata della malattia (dati non mostrati).

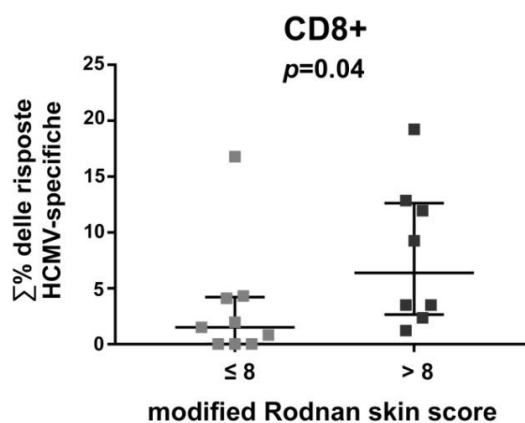


Figura 19. Relazione tra le risposte linfocitarie T CD8+ HCMV-specifiche totali (per i tre antigeni virali considerati) e il “modified Rodnan skin score” (≤ 8 e > 8). Le percentuali ($\Sigma\%$) riportate sono state ottenute sommando le singole percentuali di risposta a ciascun peptide virale utilizzato per la stimolazione (pp65, IE1, UL94). Per ciascun grafico a dispersione, vengono mostrati la mediana e gli interquartili. Il saggio non parametrico di Mann-Whitney è stato utilizzato per ricavare il valore p .

6. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

6.1 VALIDAZIONE DI UN MODELLO DI INFEZIONE *IN VITRO* PER LO STUDIO DELLA RIATTIVAZIONE DI CITOMEGALOVIRUS

Nonostante gli intensi studi, i meccanismi che controllano il passaggio dalla latenza alla riattivazione di HCMV, l'esito dell'infezione a seguito di riattivazione e la durata/gravità delle potenziali manifestazioni cliniche non sono ancora completamente noti. Tali meccanismi coinvolgono fattori dell'ospite (relativi alla risposta immunitaria, così come di altra natura) e determinanti virali, evidenziando la necessità di studi relativi alla regolazione dell'espressione genica virale e l'identificazione di potenziali marcatori di virulenza. Tuttavia, questi studi sono ostacolati sia dall'esiguo numero di monociti del sangue periferico che albergano il virus latente, sia dalla bassa quantità di DNA di HCMV presente nelle cellule infettate^{13,226,235,236,350}. Sulla base di queste considerazioni, è sentita l'esigenza di poter fruire di modelli virus-cellula *in vitro* che, ricalcando quanto avviene *in vivo*, garantiscano un quantitativo adeguato di cellule infettate e permettano lo studio della riattivazione di HCMV.

Com'è noto, i monociti umani THP-1 non sono permissivi all'infezione litica di HCMV²³⁸ e sono stati principalmente utilizzati come modello di latenza²³⁷⁻²⁴⁰. Il differenziamento dei monociti THP-1 a macrofagi media il passaggio ad una fase post-mitotica e permette la replicazione produttiva di HCMV^{233,234}. A tale riguardo, i monociti THP-1 sono stati anche ampiamente utilizzati come sistema litico, inducendo il loro differenziamento a macrofagi prima dell'infezione^{237,238,296-298}.

D'altra parte, un numero minore di studi ha affrontato l'utilizzo dei monociti THP-1 come modello di riattivazione, inducendo il differenziamento a macrofagi dopo l'infezione. Tuttavia, i dati disponibili relativamente all'utilizzo dei monociti THP-1 come modello di riattivazione sono incompleti e non riguardano l'intero programma litico. Queste lacune hanno fatto emergere diversi dubbi circa la possibilità di utilizzo dei monociti THP-1 come un vero e proprio modello di latenza-riattivazione di HCMV. In particolare, Shen e Collaboratori²⁴¹ hanno affermato che la linea cellulare THP-1 non dovrebbe essere considerata un vero modello di riattivazione poiché, fino ad ora, la produzione di progenie infettante in seguito a riattivazione non è stata chiaramente dimostrata. A tale riguardo, Yee e Collaboratori³⁵¹ hanno osservato che la produzione di una progenie virale infettante, nel caso di differenziamento indotto mediante estere del forbolo/idrocortisone di monociti THP-1 infettati latentemente, può essere dimostrata per mezzo di una co-coltivazione con fibroblasti umani. Tuttavia, occorre evidenziare che gli Autori hanno utilizzato il ceppo Towne di HCMV (ossia un ceppo riprodotto in laboratorio, adattato ai fibroblasti) per l'infezione di cellule THP-1 a MOI molto elevate e che queste condizioni sperimentali sono piuttosto lontane da quelle che si verificano *in vivo* (ceppi circolanti in grado di permanere come virus latenti nei monociti e infettare liticamente i macrofagi).

Sulla base di tali premesse, è stata effettuata una serie di esperimenti per la messa a punto e la validazione della linea cellulare THP-1 come modello di riattivazione, analizzando tutte le fasi del ciclo replicativo virale fino alla produzione di progenie.

Quale fase preliminare dello studio, al fine di accertare che le caratteristiche di queste cellule ricalchino quelle del modello naturale, sono stati analizzati, mediante citofluorimetria a flusso, i marcatori di differenziamento cellulari CD14 e CD11b in monociti e in macrofagi THP-1, con ottenimento di risultati che convalidano

l'avvenuto differenziamento, perfettamente in linea con quanto riportato in letteratura³⁵²⁻³⁵⁴. Inoltre, le cellule aderenti nel caso di monociti THP-1 non infettati differenziati in macrofagi e le cellule nel modello di riattivazione sono risultate paragonabili, dimostrando che l'infezione non influisce in modo significativo su tale processo. A tale riguardo, occorre evidenziare che, nel caso del modello di riattivazione, la procedura sperimentale necessaria per l'infezione delle cellule richiede una fase di centrifugazione compatibile con una perdita di cellule accettabile.

Successivamente, è stata analizzata la progenie virale derivata da cellule THP-1 utilizzate come modello di riattivazione. Nello specifico, l'efficienza della replicazione produttiva del ceppo TB40E di HCMV in seguito a riattivazione è stata confrontata con quella ottenuta con il ceppo di laboratorio Towne. A tale fine sono stati utilizzati i sovranatanti, derivati dai modelli di latenza e riattivazione per l'infezione di fibroblasti umani MRC5 (modello cellulare altamente permissivo all'infezione litica di HCMV *in vitro*). I risultati hanno dimostrato un'efficienza di riattivazione molto più elevata per quanto riguarda il ceppo endoteliotropico TB40E rispetto a quella osservata per il ceppo di laboratorio Towne, frequentemente utilizzato in queste tipologie di studi. Tali risultati indicano che l'utilizzo del ceppo TB40E, dotato di un maggiore tropismo per cellule macrofagiche rispetto al ceppo di laboratorio Towne, rende il modello messo a punto molto più assimilabile a quello naturale.

Quale fase successiva dello studio, è stata verificata l'assenza di esosomi nel sovranatante derivato dal modello di riattivazione THP-1 (ceppo TB40E) ed utilizzato come inoculo virale per la valutazione della progenie virale derivata da tale modello.

A questo riguardo, considerando il possibile ruolo degli esosomi come veicolo di scambio di componenti virali nel sistema permissivo (fibroblasti MRC5), essi potrebbero falsare la valutazione della produzione di progenie virale da cellule THP-1

come modello di riattivazione se questa fosse analizzata attraverso co-coltivazione con fibroblasti umani, metodo proposto, in particolare, da Yee e Collaboratori³⁵¹. In questo modo, il trasferimento di proteine virali o trascritti potrebbe effettivamente aumentare l'efficienza d'infezione virale nelle cellule riceventi, anche per mezzo di una via di infezione virale recettore/envelope indipendente^{355,356}. L'analisi di un marcatore esosomiale mediante Western blotting ha evidenziato l'assenza di esosomi nel sovranatante derivato dal modello di riattivazione (ceppo TB40E) ed utilizzato come inoculo virale; questi risultati escludono, quindi, il possibile trasferimento al modello permissivo MRC5 di componenti virali per mezzo di esosomi.

A completamento di questo studio, ulteriori esperimenti effettuati dal nostro stesso gruppo di ricerca hanno permesso di verificare che: (i) come atteso, l'efficienza della replicazione produttiva del ceppo TB40E in seguito a riattivazione risulta essere inferiore a quella ottenuta da macrofagi THP-1 utilizzati come modello di infezione litica o da fibroblasti MRC5 infettati con il ceppo TB40E; (ii) il DNA di HCMV (ceppo TB40E) nelle frazioni nucleari del modello di latenza e del modello di riattivazione fosse paragonabile a 30 h p.i., ossia un periodo di tempo sufficientemente breve per escludere che nel modello di riattivazione fosse già avvenuta la replicazione del DNA virale; (iii) vi fosse un reale aumento del DNA di HCMV nel modello di riattivazione a 7 giorni p.i., comprovato dall'efficienza paragonabile di traslocazione iniziale del DNA virale nei nuclei delle cellule in entrambi i modelli di infezione; (iiii) fosse stato attivato e completato il programma litico di HCMV nel modello di riattivazione dopo 7 giorni di infezione attraverso l'analisi dell'espressione dei trascritti virali rappresentativi delle fasi precocissima, precoce, precoce-tardiva e tardiva (IE1, DNA pol, pp65, pp150, rispettivamente).

In conclusione, gli esperimenti eseguiti in questo studio dimostrano per la prima volta che i monociti THP-1 rappresentano un valido modello per lo studio della latenza e della riattivazione di HCMV, ricalcando quanto avviene *in vivo* a seguito del differenziamento (indotto mediante esteri del forbolo) dei monociti a macrofagi, con innesco e completamento del ciclo litico e produzione di progenie virale. Questi risultati sono di particolare interesse in quanto indicano il possibile utilizzo della linea cellulare THP-1 per lo studio dei meccanismi che regolano il passaggio dalla latenza alla riattivazione di HCMV mediante una procedura sperimentale più agevole rispetto all'impiego del sistema naturale.

6.2 RUOLO DELL'INFEZIONE DA CITOMEGALOVIRUS IN SOGGETTI ANZIANI CON ICTUS ISCHEMICO

L'infezione da HCMV è, come noto, estremamente comune nella popolazione generale con un aumento della sieroprevalenza nella popolazione anziana¹⁻⁸. Come già evidenziato, tale agente virale, in seguito a riattivazione, può rendersi responsabile di gravi patologie in categorie di soggetti che presentano un alterato stato immunitario per diverse cause [cause naturali (e.g. soggetti anziani²⁵⁻³¹), iatrogene (e.g. soggetti sottoposti a trapianto di midollo osseo o d'organo³²⁻³⁹) o a seguito di infezione da parte di specifici agenti (e.g. individui con infezione da HIV³⁹⁻⁴⁸)]. In particolare, un numero crescente di dati di letteratura ha correlato l'infezione da HCMV e lo sviluppo di patologie croniche associate con l'invecchiamento²⁵⁻²⁷. Nello specifico, è stato dimostrato come, nei soggetti anziani, il mantenimento dell'equilibrio fra infezione latente o persistente da HCMV e risposta immunitaria antivirale comporti l'espansione dei meccanismi di controllo dell'infezione ed un riassetto del sistema immunitario ed è stata evidenziata una correlazione tra il deterioramento delle condizioni di salute degli anziani e l'aumento della risposta immunitaria anti-HCMV^{29,30,51}. L'ipotesi emergente è che, sotteso a questo evento, vi possano essere episodi di riattivazione virale sistemica o localizzata e/o che specifiche risposte immunitarie anti-HCMV possano essere correlate con diversi quadri clinici e complicanze²⁵.

In questo studio osservazionale prospettico, la riattivazione virale è stata valutata in una particolare categoria di soggetti, rappresentati da soggetti anziani in corso di patologia acuta come l'*ictus* ischemico.

In particolare, l'*ictus* ischemico rappresenta la terza causa di morte e costituisce una delle maggiori cause di invalidità e disabilità nei Paesi industrializzati, con un'incidenza in aumento in relazione all'età³⁵⁷. Nonostante molti fattori di rischio e prognostici siano noti, l'esordio e l'evoluzione di questa patologia possono essere condizionati anche da altri fattori ancora non completamente identificati^{31,358}.

Quale fase preliminare di questo progetto, è stato verificato lo stato immunitario nei confronti di HCMV dei soggetti anziani in corso di *ictus* ischemico arruolati nello studio. I dati ottenuti, che indicano una sieroprevalenza del 93% nella coorte di soggetti analizzata, sono in accordo con il fatto che la maggior parte degli individui (40-90%) contrae l'infezione primaria da HCMV durante l'infanzia o l'età adulta²⁻⁴. Di conseguenza, come atteso, la quasi totalità dei soggetti inclusi in questo studio sono risultati potenzialmente a rischio di riattivazione virale. Successivamente, per i campioni di siero risultati sieropositivi per HCMV è stata determinata la quantità di DNA virale per mezzo di Real-Time PCR quantitativa. A tale riguardo, il basso numero di copie di DNA di HCMV, rilevato nell'11.7% in questa categoria di pazienti, suggerisce che il virus possa sfuggire alla sorveglianza immunologica ed alternare stati di latenza con stati di replicazione virale. Tale scenario non è compatibile con l'ipotesi di riattivazione virale sistemica clinicamente conclamata, ma piuttosto con episodi di riattivazione virale localizzata, e non offre indicazioni per una eventuale terapia farmacologica antivirale.

La fase successiva dello studio è stata impegnata in una serie di esperimenti per la messa a punto e la standardizzazione delle analisi genotipiche previste. Innanzitutto, occorre considerare che, contrariamente alle infezioni in fase attiva, in cui è attesa un'elevata eliminazione del virus con le urine e, di conseguenza, un'alta probabilità di successo nell'isolamento del DNA virale, nel caso di tale categoria di soggetti anziani

è più probabile ipotizzare, in un cospicuo numero di casi, la presenza di virus latente con DNA virale presente in quantità esigua nei monociti, riconosciuti come una delle principali sedi di latenza di HCMV ³⁵⁹. Grazie alle conoscenze acquisite durante la messa a punto di un modello di infezione *in vitro* per lo studio della riattivazione di HCMV (si veda il precedente capitolo), nel tentativo di superare questo ostacolo ed al fine di aumentare la possibilità di reperimento del DNA virale, nel percorso sperimentale seguito i monociti sono stati differenziati a macrofagi. Come ampiamente discusso, tale evento di differenziamento è noto essere correlato alla riattivazione del virus con innesco dell'infezione litica, produzione di progenie virale e conseguente aumento della quantità di DNA di HCMV rispetto a quello reperibile all'interno dei monociti ¹³. In questo modo, è stato possibile, nell'ambito dei campioni positivi per DNAemia virale, isolare il DNA di HCMV ed eseguire l'amplificazione mediante nested PCR di specifici frammenti genici virali codificanti per le glicoproteine del pericapside virale gN e gO, indicate tra i possibili fattori di virulenza e tropismo tissutale ^{89,90}. In particolare, i geni che codificano per le suddette proteine sono polimorfici, ossia presentano regioni ipervariabili che consentono la distinzione in genotipi ^{89,91-93}. È plausibile ritenere che i diversi prodotti genici che ne derivano possano modulare in maniera differente il tropismo tissutale e quello d'organo di HCMV e, di conseguenza, influenzare i possibili esiti dell'infezione ²¹⁸. Inoltre, è stato dimostrato che *loci* polimorfici adiacenti sul genoma virale possono essere funzionalmente legati determinando il fenotipo virale in cooperazione ^{218,222}. Sulla base di queste considerazioni, è stata eseguita la caratterizzazione molecolare dei frammenti genici virali codificanti per gN e gO mediante digestione con enzimi di restrizione, permettendo di stabilirne i genotipi. I dati ottenuti suggeriscono che gN3-

gO1 e gN3-gO2 potrebbero essere le combinazioni genotipiche ricorrenti associate ad una positività per DNAemia virale in questa categoria di soggetti.

Inoltre, parallelamente a queste valutazioni, un secondo gruppo di ricerca incluso nello studio si è occupato, per la prima volta con un approccio molto esteso, della valutazione delle risposte linfocitarie T CD4+ e CD8+ HCMV-specifiche in questa categoria di pazienti. In particolare, la valutazione delle risposte linfocitarie HCMV-specifiche in questa categoria di pazienti è apparsa rilevante in quanto, in un precedente studio osservazionale prospettico in soggetti con *ictus* ischemico, è stato riportato un aumento del rischio di recidive e di mortalità in associazione con elevati livelli di linfociti T pro-infiammatori CD4+CD28-, i quali rappresentano una popolazione di linfociti che compare tipicamente a seguito di infezione da HCMV^{360,361}. L'analisi statistica di questi risultati, attualmente in fase di esecuzione, permetterà lo studio del potere predittivo delle risposte immunitarie HCMV-specifiche anche in relazione ai risultati ottenuti dal nostro gruppo di ricerca e agli esiti clinici nei pazienti con *ictus* ischemico.

6.3 RUOLO DELL'INFEZIONE DA CITOMEGALOVIRUS IN PAZIENTI AFFETTI DA SCLEROSI SISTEMICA

L'eziopatogenesi della SSc è a tutt'oggi sconosciuta ed è verosimilmente multifattoriale; come per altre condizioni autoimmuni, si ipotizza il ruolo di fattori scatenanti tossici e/o infettivi su un "background" genetico "predisponente", nell'ambito di un complesso processo "multi-step"⁷⁸. Costituiscono ipotetici fattori scatenanti la SSc alcuni virus in grado di instaurare un'infezione latente a seguito di un'infezione primaria, quali HCMV, il virus di Epstein-Barr (EBV), parvovirus B19^{362,363}. In particolare, è stato ipotizzato un possibile ruolo di HCMV nell'eziopatogenesi della SSc alla luce di numerose evidenze: (i) la capacità di tale agente virale di infettare le tipologie cellulari maggiormente coinvolte nella malattia (cellule endoteliali e fibroblasti)^{75-77,252,364}; (ii) la presenza di trascritti di HCMV nelle cellule endoteliali di una paziente che ha sviluppato la malattia dopo un'infezione recente da parte di HCMV³²⁰; (iii) la presenza di livelli di anticorpi sierici anti-HCMV significativamente più elevati nei pazienti affetti da SSc rispetto ai soggetti sani (in particolare diretti contro gli antigeni immunodominanti pp65, IE1 e UL94 di HCMV)^{77,82,84,365}; (iiii) il possibile ruolo degli anticorpi anti-UL94 nel riconoscimento di recettori di membrana di fibroblasti e cellule endoteliali per mezzo di un meccanismo di mimetismo molecolare^{82,329}. Inoltre, è molto importante sottolineare che l'infezione da HCMV esercita un forte impatto sul sistema immunitario dell'ospite. È noto, infatti, che la persistenza di HCMV come virus latente non corrisponde a una condizione silente, ma è piuttosto una fonte di stimolazione continua per il sistema immunitario, probabilmente a seguito di cicli di riattivazione subclinici^{27,29,30,249-252}. In particolare, diversi dati di letteratura depongono a favore del fatto che tali cicli di riattivazione

subclinica di HCMV possano stimolare in modo persistente i linfociti T CD8+ con accumulo di una cospicua quantità di cellule T CD8+ di memoria ma con fenotipo effetore, ossia già pronte a svolgere la loro azione senza bisogno di alcun ulteriore differenziamento ^{273,277,278}. Tali popolazioni linfocitarie T CD8+ HCMV-specifiche tendono ad espandersi con l'età, dando luogo ad un fenomeno caratteristico di questo virus e non rilevato in altri membri della stessa famiglia, noto come "memory inflation"; al contrario, le cellule T CD4+ non sembrano andare incontro ad un simile evento ^{274,292,293}. E' noto come questa espansione di cellule T CD8+ HCMV-specifiche possa contribuire allo sviluppo di patologie croniche infiammatorie e al deterioramento dello stato di salute nei soggetti anziani ^{27,249-252}.

Recentemente, Fuschiotti e Collaboratori hanno descritto un coinvolgimento delle risposte cellulari T CD8+ soprattutto (ma non solo) nelle prime fasi della SSc ³¹⁵. Gli Autori hanno osservato la presenza di cellule T CD8+ produttrici di IL-13 (citochina pro-infiammatoria) negli infiltrati mononucleari della cute di pazienti affetti da SSc e anche un numero elevato di cellule T CD8+ nel sangue; queste ultime sono caratterizzate da recettori per la localizzazione cutanea, noti come "skin-homing receptors", e sono state rilevate anche in stadi più tardivi della SSc ³¹⁵. Questi dati suggeriscono che le cellule T CD8+ rivestano un ruolo rilevante sia nelle fasi iniziali della malattia, sia nella sua progressione. Inoltre, in un recente lavoro, Fuschiotti ha dimostrato che i linfociti T CD8+ nel sangue periferico dei pazienti affetti da SSc presentano un'espansione oligoclonale antigene-dipendente, anche se la specificità dei possibili antigeni implicati non è ancora nota. Questo fenomeno è stato evidenziato, in particolare, in pazienti con SSc in fase attiva, suggerendone un probabile ruolo nella patogenesi della malattia ³⁰⁶.

Quale fase preliminare del nostro studio, è stata dimostrata l'assenza di differenze statisticamente significative tra i linfociti T CD3+ (marcatore pan-leucocitario), CD4+ e CD8+ totali del sangue periferico e tra il rapporto CD4:CD8 nei pazienti affetti da SSc a confronto con soggetti sani. Questo primo dato è importante in quanto il rilevamento quantitativamente paragonabile delle diverse popolazioni linfocitarie T totali permette di avvalorare differenze osservabili, nelle fasi seguenti dello studio, nelle risposte T specifiche per HCMV.

Successivamente, in accordo con le osservazioni di Fuschiotti e Collaboratori, i risultati emersi dal nostro studio hanno evidenziato un'espansione delle risposte linfocitarie T CD8+ ad opera di specifici antigeni di HCMV (in particolare pp65 e IE1) nel sangue di pazienti affetti da SSc; la loro entità è risultata significativamente maggiore rispetto a quella rilevata nei soggetti sani. In particolare, le risposte cellulari T HCMV-specifiche nei soggetti sani sieropositivi per HCMV che, come sopra descritto, sono risultate assenti o significativamente inferiori rispetto a quelle riscontrate nei pazienti con SSc, sono in accordo con i dati riportati in letteratura ³⁶⁶. Inoltre, nei pazienti con SSc le risposte cellulari T CD8+ specifiche per gli antigeni virali immunodominanti sopra citati sono risultate essere significativamente più elevate rispetto a quelle linfocitarie T CD4+. A tale riguardo, coerentemente con i nostri risultati, Cicin-Sain e Collaboratori ³³¹ hanno dimostrato che, nel modello murino di infezione da citomegalovirus, il fenomeno di "memory inflation" consiste in un'espansione delle cellule T CD8+ effettrici nei confronti di pochi antigeni virali immunodominanti (pp65 e IE1) a scapito di quelli subdominanti, piuttosto che in un aumento generale delle risposte cellulari T CD8+ dirette contro citomegalovirus.

D'altra parte, è doveroso segnalare che un recente lavoro svolto Janahi e Collaboratori ³⁶⁷ su due gruppi di pazienti affetti, rispettivamente, da *lupus*

eritematoso sistemico e da SSc fornisce, invece, dati a supporto di maggiori risposte linfocitarie T CD4+ HCMV-specifiche. A tale riguardo, è innanzitutto importante evidenziare le diversità del loro protocollo sperimentale rispetto a quello impiegato per questo studio: Janahi e Collaboratori hanno utilizzato un "pool" di antigeni di HCMV costituito da un intero lisato derivato da fibroblasti MRC5 infettati con HCMV e "purificato" mediante centrifugazione. Si può supporre che la suddetta sospensione sia stata arricchita con progenie virale, ma non si può escludere la presenza di componenti cellulari solubili residue. Inoltre, aspetto più rilevante, è stato dimostrato che quando le proteine o i lisati virali sono utilizzati come antigeni stimolanti, le risposte linfocitarie T CD4+ sono elevate, mentre il processo è generalmente inefficiente per la stimolazione delle cellule T CD8+ ³⁶⁸. Maecker e Collaboratori hanno dimostrato che l'utilizzo di antigeni costituiti da composti peptidici sovrapposti, in particolare peptidi composti da 15 amminoacidici con la sovrapposizione di 11 amminoacidi (come quelli utilizzati nel nostro studio), può essere invece adeguato per un rilevamento bilanciato delle risposte cellulari T CD4+ e CD8+ ³⁶⁸. Usando tali composti peptidici sovrapposti, il nostro studio si è poi concentrato sui specifici peptidi virali immunodominanti, in particolare pp65 e IE1 ^{330,331}. Un ulteriore aspetto differenziale rilevante è costituito dal fatto che la durata media della malattia della popolazione inclusa nello studio di Janahi e Collaboratori risulta essere inferiore a 6 anni (39 ± 18 mesi) ed è quindi coerente con stadi iniziali di SSc. Per quanto riguarda i nostri dati, invece, le risposte cellulari T CD8+ HCMV-specifiche non solo sono risultate significativamente più elevate rispetto a quelle CD4+ nei pazienti con SSc, ma sono anche risultate connesse alla durata della malattia. Nello specifico, mentre Janahi e Collaboratori hanno osservato una prevalenza di risposte cellulari T CD4+ HCMV-specifiche in pazienti con SSc in fasi più precoci della malattia, nel nostro

studio la prevalenza delle risposte cellulari T CD8+ HCMV-specifiche è risultata significativamente associata ad una maggiore durata della malattia.

Inoltre, i nostri risultati appaiono essere coerenti anche con i dati sierologici ottenuti per HCMV nella popolazione oggetto dello studio. Tra i 17 pazienti con SSc sieropositivi per HCMV, 16 sono risultati IgG-positivi/IgM-negativi, mentre 1 solo IgM-positivo. Questo potrebbe significare che, per la maggioranza dei pazienti considerati, lo stato sierologico è compatibile con un'infezione non recente di HCMV e, probabilmente, con un numero di riattivazioni virali subcliniche tale da supportare l'aumento delle popolazioni di linfociti T CD8+ HCMV-specifiche rispetto ai soggetti sani sieropositivi per HCMV. In particolare, una possibile frequenza più elevata di riattivazioni di HCMV nei pazienti affetti da SSc potrebbe essere connessa al possibile ruolo patogenetico di questo agente virale in considerazione dei seguenti aspetti: i) il danno endoteliale è una delle caratteristiche di questa malattia; ii) HCMV è in grado di infettare, tra l'altro, le cellule endoteliali ³⁶⁴; iii) a seguito dell'infezione, le cellule endoteliali subiscono rilevanti cambiamenti e aumentano l'espressione delle molecole di adesione ³⁶⁹; iii) è accertato che i monociti del sangue periferico rappresentano uno dei maggiori siti di latenza di HCMV e che la loro differenziazione in macrofagi può portare alla riattivazione virale ^{370,371}.

Sulla base di queste conoscenze, è plausibile ritenere che i monociti che albergano il virus latente possano essere indotti alla migrazione transendoteliale e alla differenziazione in macrofagi a seguito di una maggiore espressione di molecole di adesione da parte delle cellule endoteliali infettate da HCMV, innescando la riattivazione del virus e il danneggiamento dei tessuti vascolari vicini e distali, contribuendo in questo modo alla gravità del danno vascolare in caso di SSc ^{130,369}. In questo contesto, cicli di riattivazione di HCMV più frequenti nei pazienti affetti da

SSc potrebbero spiegare l'incremento delle cellule T CD8+ HCMV-specifiche e potrebbero contribuire a provocarne l'attivazione, aggravando i processi infiammatori a seguito dell'attività citolitica di queste ultime su cellule non infette ³⁷².

Alla luce di quanto descritto, il ruolo patogenetico di HCMV in caso di SSc potrebbe essere sia conseguente all'infezione diretta delle cellule caratteristiche di questa malattia autoimmune (in particolare, ma non solo, delle cellule endoteliali), sia ai più frequenti cicli di riattivazione di HCMV e l'annesso aumento delle cellule T CD8+ HCMV-specifiche.

Un'ulteriore importante risultato derivante dal nostro studio riguarda la relazione statisticamente significativa tra l'aumento delle risposte T CD8+ HCMV-specifiche e i valori più elevati di mRSS nella popolazione oggetto dello studio. Com'è noto, la misurazione dello spessore della cute mediante mRSS è una tecnica standardizzata utilizzata per la valutazione dell'attività e della gravità della malattia in soggetti affetti da SSc; il peggioramento del mRSS è associato a decorsi più gravi della malattia ³⁷³⁻³⁷⁶.

Infine, riguardo al trattamento farmacologico, la quasi totalità degli agenti terapeutici somministrati ai pazienti con SSc inclusi nel nostro studio non possiede alcun effetto diretto sul sistema immunitario; pertanto, è plausibile ritenere che essi non abbiano influito sui risultati ottenuti. Solo due pazienti sono stati trattati con steroidi; uno di essi è risultato essere sieronegativo per HCMV (e quindi escluso dall'analisi comparativa) e l'altro è stato trattato con dosaggi estremamente bassi di 6-metil-prednisolone.

In conclusione, i risultati ottenuti rinforzano l'ipotesi di un coinvolgimento di HCMV nella patogenesi di questa malattia autoimmune, con il possibile contributo di altri agenti infettivi, cofattori ambientali e/o genetici ^{299-302,362}.

7. REFERENZE BIBLIOGRAFICHE

1. Ho M. Epidemiology of cytomegalovirus infections. *Infect Dis*. 1990;12:S701–10.
2. Hecker M, Qiu D, Marquardt K, Bein G, Hackstein H. Continuous cytomegalovirus seroconversion in a large group of healthy blood donors. *Vox Sang*. 2004;86:41–4.
3. Staras S, Dollard S, Radford K, Flanders W, Pass R, Cannon M. Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the United States. *Clin Infect Dis*. 2006;43:1143–51.
4. Badami K, McQuilkan-Bickerstaffe S, Wells J, Parata M. Cytomegalovirus seroprevalence and “cytomegalovirus-safe” seropositive blood donors. *Epidemiol Infect*. 2009;137:1776–80.
5. Bate S, Dollard S, MJ C. Cytomegalovirus seroprevalence in the United States: the national health and nutrition examination surveys, 1988–2004. *Clin Infect Dis*. 2010;50(11):1439–47.
6. Cannon M, Schmid D, Hyde T. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Rev Med Virol*. 2010;(20):202–13.
7. Pawelec G, McElhaney J, Aiello A, Derhovanessian E. The impact of CMV infection on survival in older humans. *Curr Opin Immunol*. 2012;24:507–11.
8. Kumar A, Herbein G. Epigenetic regulation of human cytomegalovirus latency: an update. *Epigenomics*. 2014;6(5):533–46.
9. Griffiths P, Baraniak I, Reeves M. The pathogenesis of human cytomegalovirus. *J Pathol*. 2015;235(2):288–97.
10. Baraniak I, Reeves M, Griffiths P. Criteria to define interruption of transmission of human cytomegalovirus from organ donor to recipient. *Rev Med Virol*. 2017;[Epub ahead of print].
11. Britt W. Congenital Human Cytomegalovirus Infection and the Enigma of Maternal Immunity. *J Virol*. 2017;91(15).
12. Reeves M, MacAry P, Lehner P, Sissons J, Sinclair J. Latency, chromatin remodeling, and reactivation of human cytomegalovirus in the dendritic cells of healthy carriers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:4140–5.
13. Sinclair J, Sissons P. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J Gen Virol*. 2006;87(Pt 7):1763–79.
14. Sinclair J. Human cytomegalovirus: latency and reactivation in the myeloid lineage. *J Clin Virol*. 2008;41(3):180–5.
15. Noriega V, Redmann V, Gardner T, Tortorella D. Diverse immune evasion strategies by human cytomegalovirus. *Immunol Res*. 2012;54:140–51.
16. Styczynski J. Who Is the Patient at Risk of CMV Recurrence: A Review of the Current Scientific Evidence with a Focus on Hematopoietic Cell Transplantation. *Infect Dis Ther*. 2017:1–16.

17. Dollard S, Grosse S, Ross D. New estimates of the prevalence of neurological and sensory sequelae and mortality associated with congenital cytomegalovirus infection. *Rev Med Virol.* 2007;17:355–63.
18. Kenneson A, Cannon M. Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Rev Med Virol.* 2007;17(4):253–76.
19. Yan H, Koyano S, Inami Y, et al. Genetic linkage among human cytomegalovirus glycoprotein N (gN) and gO genes, with evidence for recombination from congenitally and post-natally infected Japanese infants. *J Gen Virol.* 2008;89:2275–9.
20. Manicklal S, Emery V, Lazzarotto T, Boppana S, Gupta R. The “silent” global burden of congenital cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26(1):86–102.
21. Nijman J, Mandemaker F, Verboon-Macielek M, et al. Genotype distribution, viral load and clinical characteristics of infants with postnatal or congenital cytomegalovirus infection. *PLoS One.* 2014;9:e108018.
22. Arcangeletti M, Vasile Simone R, Rodighiero I, et al. Combined genetic variants of human cytomegalovirus envelope glycoproteins as congenital infection markers. *Virology.* 2015;12:202.
23. Wang S, Wang T, Zhang W, et al. Cohort study on maternal cytomegalovirus seroprevalence and prevalence and clinical manifestations of congenital infection in China. *Med.* 2017;96(5):e6007.
24. Britt W. Maternal Immunity and the Natural History of Congenital Human Cytomegalovirus Infection. *Viruses.* 2018;10(8):405.
25. Vescovini R, Biasini C, Telera A, et al. Intense antiextracellular adaptive immune response to human cytomegalovirus in very old subjects with impaired health and cognitive and functional status. *J Immunol.* 2010;184(6):3242–9.
26. Pawelec G, Derhovanessian E. Role of CMV in senescence. *Virus Res.* 2011;157(2):175–9.
27. Sansoni P, Vescovini R, Fagnoni FF, Akabar A, Arens R, Chiu YL. New advances in CMV and immunosenescence. *Exp Gerontol.* 2014;55:54–62.
28. Isobe K, Nishio N, Hasegawa T. Immunological aspects of age-related diseases. *World J Biol Chem.* 2017;8(2):129–37.
29. Jackson S, Redeker A, Arens R, et al. CMV immune evasion and manipulation of the immune system with aging. *GeroScience.* 2017;39:273–91.
30. Souquette A, Frere J, Smithey M, Sauce D, Thomas P. A constant companion: immune recognition and response to cytomegalovirus with aging and implications for immune fitness. *GeroScience.* 2017;39:293–303.
31. Wang H, Peng G, Bai J, et al. Cytomegalovirus Infection and Relative Risk of Cardiovascular Disease (Ischemic Heart Disease, Stroke, and Cardiovascular Death): A Meta-Analysis of Prospective Studies Up to 2016. *J Am Heart Assoc.* 2017;6(7):1–10.
32. Kamar N, Mengelle C, Esposito L, et al. Predictive factors for cytomegalovirus reactivation in cytomegalovirus-seropositive kidney-transplant patients. *J Med Virol.* 2008;80(6):1012–7.

33. Nogueira E, Ozaki K, Tomiyama H, Câmara N, Granato C. Clinical correlations of human cytomegalovirus strains and viral load in kidney transplant recipients. *Int Immunopharmacol.* 2009;9(1):26–31.
34. Ramanan P, Razonable R. Cytomegalovirus infections in solid organ transplantation: a review. *Infect Chemother.* 2013;45(3):260–71.
35. Bhat V, Joshi A, Sarode R, Chavan P. Cytomegalovirus infection in the bone marrow transplant patient. *World J Transpl.* 2015;5(4):287–91.
36. Nagai S, Mangus R, Anderson E, et al. Cytomegalovirus infection after intestinal/multivisceral transplantation: a single-center experience with 210 cases. *Transplantation.* 2016;100(2):451–60.
37. Natori Y, Humar A, Husain S, et al. Recurrence of CMV infection and the effect of prolonged antivirals in organ transplant recipients. *Transplantation.* 2017;101(6):1449–54.
38. Selvey L, Lim W, Boan P, et al. Cytomegalovirus viraemia and mortality in renal transplant recipients in the era of antiviral prophylaxis. Lessons from the western Australian experience. *BMC Infect Dis.* 2017;17(1):501.
39. Waters S, Brook E, Lee S, Estiasari R, Ariyanto I, Price P. HIV patients, healthy aging and transplant recipients can reveal the hidden footprints of CMV. *Clin Immunol.* 2017;S1521-6616(17):30428.
40. Brantsaeter A, Holberg-Petersen M, Jeansson S, Goplen A, Bruun J. CMV quantitative PCR in the diagnosis of CMV disease in patients with HIV-infection – a retrospective autopsy based study. *BMC Infect Dis.* 2007;7(1):127.
41. Fielding K, Koba A, Grant A, et al. Cytomegalovirus Viremia as a Risk Factor for Mortality Prior to Antiretroviral Therapy among HIV-Infected Gold Miners in South Africa. *PLoS One.* 2011;6(10):e25571.
42. Durier N, Ananworanich J, Apornpong T, et al. Cytomegalovirus Viremia in Thai HIV-Infected Patients on Antiretroviral Therapy: Prevalence and Associated Mortality. *Clin Infect Dis.* 2013;57(1):147–55.
43. Ford N, Shubber Z, Saranchuk P, et al. Burden of HIV-Related Cytomegalovirus Retinitis in Resource-Limited Settings: A Systematic Review. *Clin Infect Dis.* 2013;57(9):1351–61.
44. Xiao J, Gao G, Li Y, et al. Spectrums of Opportunistic Infections and Malignancies in HIV-Infected Patients in Tertiary Care Hospital, China. *PLoS One.* 2013;8(10):e75915.
45. Chiotan C, Radu L, Serban R, Cornăcel C, Cioboata M, Anghel A. Cytomegalovirus retinitis in HIV/AIDS patients. *J Med Life.* 2014;7(2):237–40.
46. Luo B, Sun J, Cai R, et al. Spectrum of Opportunistic Infections and Risk Factors for In-Hospital Mortality of Admitted AIDS Patients in Shanghai. *Medicine (Baltimore).* 2016;95(21):e3802.
47. Reitter A, Buxmann H, Haberl A, et al. Incidence of CMV co-infection in HIV-positive women and their neonates in a tertiary referral centre: a cohort study. *Med Microbiol Immunol.* 2016;205(1):63–71.
48. Varo R, Buck W, Kazembe P, Phiri S, Andrianarimanana D, Weigel R. Seroprevalence of CMV, HSV-2 and HBV among HIV-Infected Malawian Children: A Cross-sectional

- Survey. *J Trop Pediatr.* 2016;62(3):220–6.
49. Yu H, Park S, Shin E, Lee W. T cell senescence and cardiovascular diseases. *Clin Exp Med.* 2016;16(3):257–63.
 50. Rezaee-Zavareh M, Tohidi M, Sabouri A, Ramezani-Binabaj M, Sadeghi-Ghahrodi M, Einollahi B. Infectious and coronary artery disease. *ARYA Atheroscler.* 2016;12(1):41–9.
 51. Tu W, Rao S. Mechanisms Underlying T Cell Immunosenescence: Aging and Cytomegalovirus Infection. *Front Microbiol.* 2016;7:2111.
 52. Fishman J, Emery V, Freeman R, et al. Cytomegalovirus in transplantation - challenging the status quo. *Clin Transpl.* 2007;21:149–58.
 53. Reed E, Bowden R, Dandliker P, Lilleby K, Meyers J. Treatment of cytomegalovirus pneumonia with ganciclovir and intravenous cytomegalovirus immunoglobulin in patients with bone marrow transplants. *Ann Intern Med.* 1988;109(10):783–8.
 54. Sagedal S, Nordal K, Hartmann A, et al. A prospective study of the natural course of cytomegalovirus infection and disease in renal allograft recipients. *Transplantation.* 2000;70(8):1166–74.
 55. Cordero E, Casasola C, Ecarma R, Danguilan R. Cytomegalovirus disease in kidney transplant recipients: incidence, clinical profile, and risk factors. *Transpl Proc.* 2012;44(3):694–700.
 56. Casquero S, Rangel D, Lage E, et al. Preemptive therapy in the prevention of cytomegalovirus disease in high- and low-risk heart transplant recipients. *Transpl Proc.* 2012;44(7):2113–4.
 57. Martín-Gandul C, Pérez-Romero P, Sánchez M, et al. Determination, validation and standardization of a CMV DNA cut-off value in plasma for preemptive treatment of CMV infection in solid organ transplant recipients at lower risk for CMV infection. *J Clin Virol.* 2013;56(1):13–8.
 58. Santos C, Brennan D, Fraser V, Olsen M. Delayed-onset cytomegalovirus disease coded during hospital readmission after kidney transplantation. *Transplantation.* 2014;98(2):187–94.
 59. Fernández-Ruiz M, Arias M, Campistol J, et al. Cytomegalovirus prevention strategies in seropositive kidney transplant recipients: an insight into current clinical practice. *Transpl Int.* 2015;28(9):1042–54.
 60. Kaminski H, Fishman J. The Cell Biology of Cytomegalovirus: Implications for Transplantation. *Am J Transpl.* 2016;16(8):2254–69.
 61. Gerna G, Sarasini A, Baldanti F, Percivalle E, Zella D, Revello M. Quantitative systemic and local evaluation of the antiviral effect of ganciclovir and foscarnet induction treatment on human cytomegalovirus gastrointestinal disease of patients with AIDS. Italian Foscarnet GID Study Group. *Antivir Res.* 1997;34(1):39–50.
 62. Martin B, Ricks M, Forman M, Jabs D. Change over time in incidence of ganciclovir resistance in patients with cytomegalovirus retinitis. *Clin Infect Dis.* 2007;44(7):1001–8.
 63. Slavov S, Vilar F, Wagatsuma V, et al. Late emergence of A594V and L595W mutations related to ganciclovir resistance in a patient with HCMV retinitis and long-

- term HIV progression. *Braz J Med Biol Res.* 2015;48(9):777–81.
64. Michaelis M, Doerr H, Cinatl J. The story of human cytomegalovirus and cancer: increasing evidence and open questions. *Neoplasia.* 2009;11(1):1–9.
 65. Soroceanu L, Cobbs C. Is HCMV a tumor promoter? *Virus Res.* 2011;157(2):193–203.
 66. Ranganathan P, Clark P, Kuo J, Salamat M, Kalejta R. Significant association of multiple human cytomegalovirus genomic Loci with glioblastoma multiforme samples. *J Virol.* 2012;86(2):854–64.
 67. Herbein G, Kumar A. The oncogenic potential of human cytomegalovirus and breast cancer. *Front Oncol.* 2014;4:230.
 68. Bai B, Wang X, Chen E, Zhu H. Human cytomegalovirus infection and colorectal cancer risk: a meta-analysis. *Oncotarget.* 2016;7(47):76735–42.
 69. Cui J, Wang Q, Wang H, Wang B, Li L. Protein and DNA evidences of HCMV infection in primary breast cancer tissues and metastatic sentinel lymph nodes. *Cancer Biomark.* 2017:1–12.
 70. Foster H, Ulasov I, Cobbs C. Human cytomegalovirus-mediated immunomodulation: Effects on glioblastoma progression. *Biochim Biophys Acta.* 2017;1868(1):273–6.
 71. Pasquereau S, Al Moussawi F, Karam W, Diab Assaf M, Kumar A, Herbein G. Cytomegalovirus, Macrophages and Breast Cancer. *Open Virol J.* 2017;11(1):15–27.
 72. Westman G, Berglund D, Widén J, et al. Increased Inflammatory Response in Cytomegalovirus Seropositive Patients with Alzheimer’s Disease. *PLoS One.* 2014;9(5):e96779.
 73. Barnes L, Capuano A, Aiello A, et al. Cytomegalovirus Infection and Risk of Alzheimer Disease in Older Black and White Individuals. *J Infect Dis.* 2015;211(2):230–7.
 74. Sakkas L, Platsoucas C. Is systemic sclerosis an antigendriven T cell disease? *Arthritis Rheum.* 2004;50:1721–33.
 75. Sakkas L. New developments in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Autoimmunity.* 2005;38:113–6.
 76. Grossman C, Dovrish Z, Shoenfeld Y, Amital H. Do infections facilitate the emergence of systemic sclerosis? *Autoimmun Rev.* 2011;10:244–7.
 77. Halenius A, Hengel H. Human cytomegalovirus and autoimmune disease. *Biomed Res Int.* 2014;472978:1–15.
 78. Ferri C, Sebastiani M, Lo Monaco A, et al. Systemic sclerosis evolution of disease pathomorphosis and survival. Our experience on Italian patients’ population and review of literature. *Autoimmun Rev.* 2014;13(10):1026–34.
 79. Dolcino M, Puccetti A, Barbieri A, et al. Infection and autoimmunity: role of human cytomegalovirus in autoimmune endothelial cell damage. *Lupus.* 2015;24(4-5):419–32.
 80. Komura T, Ohta H, Nakai R, et al. Cytomegalovirus Reactivation Induced Acute Hepatitis and Gastric Erosions in a Patient with Rheumatoid Arthritis under Treatment with an Anti-IL-6 Receptor Antibody, Tocilizumab. *Intern Med.* 2016;55(14):1923–7.
 81. Pera A, Broadley I, Davies K, Kern F. Cytomegalovirus as a Driver of Excess Cardiovascular Mortality in Rheumatoid Arthritis. *Circ Res.* 2017;120(2):274–7.

82. Lunardi C, Dolcino M, Peterlana D, et al. Antibodies against Human Cytomegalovirus in the Pathogenesis of Systemic Sclerosis: A Gene Array Approach. *PLoS Med.* 2006;3:94-1058.
83. Marou E, Liaskos C, Efthymiou G, et al. Increased immunoreactivity against human cytomegalovirus UL83 in systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol.* 2017;35 Suppl 1(4):31-4.
84. Marou E, Liaskos C, Simopoulou T, et al. Human cytomegalovirus (HCMV) UL44 and UL57 specific antibody responses in anti-HCMV-positive patients with systemic sclerosis. *Clin Rheumatol.* 2017;36(4):863-9.
85. Arav-Boger R, Battaglia C, Lazzarotto T, et al. Cytomegalovirus (CMV)-encoded UL144 (truncated tumor necrosis factor receptor) and outcome of congenital CMV infection. *J Infect Dis.* 2006;194:464-73.
86. Chou S, Dennison K. Analysis of interstrain variation in cytomegalovirus glycoprotein B sequences encoding neutralization-related epitopes. *J Infect Dis.* 1991;163:1229-34.
87. Kari B, Gehrz R. Structure, composition and heparin binding properties of a human cytomegalovirus glycoprotein complex designed gC-II. *J Gen Virol.* 1993;74:225-64.
88. Navarro D, Paz P, Tugizov S, Topp K, La Vail J, Pereira L. Glycoprotein B of human cytomegalovirus promotes virion penetration into cells, transmission of infection from cell to cell, and fusion of infected cells. *Virology.* 1993;197:143-58.
89. Pignatelli S, Dal Monte P, Landini M. gpUL73(gN) genomic variants of human cytomegalovirus (HCMV) isolates are clustered into four distinct genotypes. *J Gen Virol.* 2001;82:2777-84.
90. Paterson D, Dyer A, Milne R, Sevilla-Reyes E, Gompels U. A role for human cytomegalovirus glycoprotein O (gO) in cell fusion and a new hypervariable locus. *Virology.* 2002;293:281-94.
91. Rasmussen L, Geissler A, Cowan C, Chase A, Winters M. The genes encoding the gCIII complex of human cytomegalovirus exist in highly diverse combinations in clinical isolates. *J Virol.* 2002;76:10841-8.
92. Coaquette A, Bourgeois A, Dirand C, Varin A, Chen W, Herbein G. Mixed cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis.* 2004;39(2):155-61.
93. Puchhammer-Stöckl E, Görzer I. Human cytomegalovirus: an enormous variety of strains and their possible clinical significance in the human host. *Futur Virol.* 2011;6(2):259-71.
94. Sinzger C, Grefte A, Plachter B, Gouw A, The T, Jahn G. Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues. *J Gen Virol.* 1995;76(Pt 4):741-50.
95. Arrode G, Davrinche C. Dendritic cells and HCMV cross-presentation. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2003;(276):277-94.
96. Lunardi C, Bason C, Corrocher R, Puccetti A. Induction of endothelial cell damage by hCMV molecular mimicry. *Trends Immunol.* 2005;26(1):19-24.
97. Martin H, Mandron M, Davrinche C. Interplay between human cytomegalovirus and

- dendritic cells in T cell activation. *Med Microbiol Immunol*. 2008;197(2):179–84.
98. Sinzger C, Digel M, Jahn G. Cytomegalovirus cell tropism. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008;(325):63–83.
 99. Sacher T, Mohr C, Weyn A, Schlichting C, Koszinowski U, Ruzsics Z. The role of cell types in cytomegalovirus infection in vivo. *Eur J Cell Biol*. 2012;91(1):70–7.
 100. Hertel L. Human cytomegalovirus tropism for mucosal myeloid dendritic cells. *Rev Med Virol*. 2014;24(6):379–95.
 101. Taylor-Wiedeman J, Sissons J, Borysiewicz L, Sinclair J. Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. *J Gen Virol*. 1991;(Pt 9):2059–64.
 102. Streblow D, Nelson J. Models of HCMV latency and reactivation. *Trends Microbiol*. 2003;11(7):293–5.
 103. Khaiboullina S, Maciejewski J, Crapnell K, et al. Human cytomegalovirus persists in myeloid progenitors and is passed to the myeloid progeny in a latent form. *Br J Haematol*. 2004;126(3):410–7.
 104. Taylor-Wiedeman J, Sissons P, Sinclair J. Induction of endogenous human cytomegalovirus gene expression after differentiation of monocytes from healthy carriers. *J Virol*. 1994;68(3):1597–604.
 105. Söderberg-Nauclér C, Fish K, Nelson J. Reactivation of latent human cytomegalovirus by allogeneic stimulation of blood cells from healthy donors. *Cell*. 1997;91(1):119–26.
 106. Hengel H, Brune W, Koszinowski U. Immune evasion by cytomegalovirus survival strategies of a highly adapted opportunist. *Trends Microbiol*. 1998;6(5):190–7.
 107. Smith M, Bentz G, Alexander J, Yurochko A. Human cytomegalovirus induces monocyte differentiation and migration as a strategy for dissemination and persistence. *J Virol*. 2004;78(9):4444–53.
 108. Chen D, Jiang H, Lee M, Liu F, Zhou Z. Three-dimensional visualization of tegument/capsid interactions in the intact human cytomegalovirus. *Virology*. 1999;260(1):10–6.
 109. Britt W, Boppana S. Human cytomegalovirus virion proteins. *Hum Immunol*. 2004;65(5):395–402.
 110. Mocarski E, Shenk T, Pass R. Cytomegalovirus. In: *Fields Virology, 5th Ed. Knipe D and Howley P (Eds), Lippincott Williams and Wilkins*. Philadelphia; 2007:2701–72.
 111. Mocarski E. Human cytomegaloviruses: general features. In: *Encyclopedia of Virology*. Mahy BWJ, . Atlanta, GA: Elsevier; 2008:474–85.
 112. Gardner T, Tortorella D. Virion Glycoprotein-Mediated Immune Evasion by Human Cytomegalovirus: a Sticky Virus Makes a Slick Getaway. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2016;80(3):663–77.
 113. Irmiere A, Gibson W. Isolation and characterization of a noninfectious virion-like particle released from cells infected with human strains of cytomegalovirus. *Virology*. 1983;130(1):118–33.
 114. Pepperl S, Münster J, Mach M, Harris J, Plachter B. Dense bodies of human

- cytomegalovirus induce both humoral and cellular immune responses in the absence of viral gene expression. *J Virol.* 2000;74(13):6132–46.
115. Landolfo S, Gariglio M, Gribaudo G, Lembo D. The human cytomegalovirus. *Pharmacol Ther.* 2003;98(3):269–97.
 116. Schierling K, Buser C, Mertens T, Winkler M. Human cytomegalovirus tegument protein ppUL35 is important for viral replication and particle formation. *J Virol.* 2005;79(5):3084–96.
 117. Gibson W. Structure and formation of the cytomegalovirus virion. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008;325:187–204.
 118. Schneider-Ohrum K, Cayatte C, Liu Y, et al. Production of Cytomegalovirus Dense Bodies by Scalable Bioprocess Methods Maintains Immunogenicity and Improves Neutralizing Antibody Titers. *J Virol.* 2016;90(22):10133–44.
 119. Mocarski E, Courcelle C. Cytomegalovirus and their replication. In: Knipe D, Howley P, eds. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins; 2001:2629–73.
 120. Murphy E, Shenk T. Human cytomegalovirus genome. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008;325:1–19.
 121. McVoy M, Nixon D, Adler S, Mocarski E. Sequences within the herpesvirus-conserved pac1 and pac2 motifs are required for cleavage and packaging of the murine cytomegalovirus genome. *J Virol.* 1998;72(1):48-56.
 122. Prichard MN, Jairath S, Penfold ME, St Jeor S, Bohlman MC, Pari GS. Identification of persistent RNA-DNA hybrid structures within the origin of replication of human cytomegalovirus. *J Virol.* 1998;72(9):6997–7004.
 123. Xu Y, Cei S, Rodriguez Huete A, Colletti K, Pari G. Human cytomegalovirus DNA replication requires transcriptional activation via an IE2- and UL84-responsive bidirectional promoter element within oriLyt. *J Virol.* 2004;78(21):11664–77.
 124. Bresnahan W, Shenk T. A subset of viral transcripts packaged within human cytomegalovirus particles. *Science.* 2000;288(5475):2373–6.
 125. Huang E, Johnson R. Human cytomegalovirus – no longer just a DNA virus. *Nat Med.* 2000;6(8):863–4.
 126. Terhune S, Schröer J, Shenk T. RNAs are packaged into human cytomegalovirus virions in proportion to their intracellular concentration. *J Virol.* 2004;78(19):10390–8.
 127. Plachter B, Sinzger C, Jahn G. Cell types involved in replication and distribution of human cytomegalovirus. *Adv Virus Res.* 1996;46:195–261.
 128. Ryckman B, Jarvis M, Drummond D, Nelson J, Johnson D. Human cytomegalovirus entry into epithelial and endothelial cells depends on genes UL128 to UL150 and occurs by endocytosis and low-pH fusion. *J Virol.* 2006;80(2):710–22.
 129. Vanarsdall A, Johnson D. Human cytomegalovirus entry into cells. *Curr Opin Virol.* 2012;2(1):37–42.
 130. Smith M, Bentz G, Alexander J, Yurochko A. Human cytomegalovirus induces monocyte differentiation and migration as a strategy for dissemination and persistence. *J Virol.* 2004;78(9):4444-53.

131. Smith J. Human cytomegalovirus: demonstration of permissive epithelial cells and nonpermissive fibroblastic cells in a survey of human cell lines. *J Virol.* 1986;60(2):583–8.
132. Sinzger C, Kahl M, Laib K, et al. Tropism of human cytomegalovirus for endothelial cells is determined by a post-entry step dependent on efficient translocation to the nucleus. *J Gen Virol.* 2000;81(12):3021–35.
133. Theiler R, Compton T. Characterization of the Signal Peptide Processing and Membrane Association of Human Cytomegalovirus Glycoprotein O. *J Biol Chem.* 2001;276(42):39226–31.
134. Yurochko A, Mayo M, Poma E, Baldwin A, Huang E, Huang E. Induction of the transcription factor Sp1 during human cytomegalovirus infection mediates upregulation of the p65 and p105/p50 NF-kappaB promoters. *J Virol.* 1997;71(6):4638–48.
135. Hancock M, Nelson J. Modulation of the NFkb Signalling Pathway by Human Cytomegalovirus. *Virology.* 2017;1(1):Epub.
136. Boehme K, Guerrero M, Compton T. Human cytomegalovirus envelope glycoproteins B and H are necessary for TLR2 activation in permissive cells. *J Immunol.* 2006;177(10):7094–102.
137. Kropp K, Hsieh W, Isern E, et al. A Temporal Gate for Viral Enhancers to Co-opt Toll-Like-Receptor Transcriptional Activation Pathways upon Acute Infection. *PLoS Pathog.* 2015;11(4):e1004737.
138. Arcangeletti M, Germini D, Rodighiero I, et al. Toll-like receptor 4 is involved in the cell cycle modulation and required for effective human cytomegalovirus infection in THP-1 macrophages. *Virology.* 2013;440(1):19–30.
139. Fortunato E, Spector D. Regulation of human cytomegalovirus gene expression. *Adv Virus Res.* 1999;(54):61–128.
140. Zhu Y, Huang L, Anders D. Human cytomegalovirus oriLyt sequence requirements. *J Virol.* 1998;72(6):4989–96.
141. Kagele D, Rossetto C, Tarrant M, Pari G. Analysis of the interactions of viral and cellular factors with human cytomegalovirus lytic origin of replication, oriLyt. *Virology.* 2012;424(2):106–14.
142. Hennig T, O'Hare P. Viruses and the nuclear envelope. *Curr Opin Cell Biol.* 2015;34:113–21.
143. Sharma M, Kamil J, Coen D. Preparation of the Human Cytomegalovirus Nuclear Egress Complex and Associated Proteins. *Methods Enzymol.* 2016;569:517–26.
144. Muranyi W, Haas J, Wagner M, Krohne G, Koszinowski U. Cytomegalovirus recruitment of cellular kinases to dissolve the nuclear lamina. *Science.* 2002;297(5582):854–7.
145. Sharma M, Bender B, Kamil J, et al. Human cytomegalovirus UL97 phosphorylates the viral nuclear egress complex. *J Virol.* 2015;89(1):523–34.
146. Sanchez V, Spector D. CMV makes a timely exit. *Science.* 2002;297(5582):778–9.
147. Stinski M, Thomsen D, Stenberg R, Goldstein L. Organization and expression of the immediate early genes of human cytomegalovirus. *J Virol.* 1983;46(1):1–14.

148. Reeves M. Chromatin-mediated regulation of cytomegalovirus gene expression. *Virus Res.* 2011;157(2):134–43.
149. Petrik D, Schmitt K, Stinski M. Inhibition of Cellular DNA Synthesis by the Human Cytomegalovirus IE86 Protein Is Necessary for Efficient Virus Replication. *J Virol.* 2006;80(8):3872–83.
150. Cosme R, Yamamura Y, Tang Q. Roles of Polypyrimidine Tract Binding Proteins in Major Immediate-Early Gene Expression and Viral Replication of Human Cytomegalovirus. *J Virol.* 2009;83(7):2839–50.
151. Meier J, Stinski M. Regulation of human cytomegalovirus immediate-early gene expression. *Intervirology.* 1996;39(5-6):331–42.
152. Du G, Dutta N, Lashmit P, Stinski M. Alternative Splicing of the Human Cytomegalovirus Major Immediate-Early Genes Affects Infectious-Virus Replication and Control of Cellular Cyclin-Dependent Kinase. *J Virol.* 2011;85(2):804–17.
153. Messerle M, Bühler B, Keil G, Koszinowski U. Structural organization, expression, and functional characterization of the murine cytomegalovirus immediate-early gene 3. *J Virol.* 1992;66(1):27–36.
154. White E, Spector D. Exon 3 of the human cytomegalovirus major immediate-early region is required for efficient viral gene expression and for cellular cyclin modulation. *J Virol.* 2005;79(12):7438–52.
155. Zhu H, Shen Y, Shenk T. Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins block apoptosis. *J Virol.* 1995;69(12):7960–70.
156. Ahn J, Brignole E, Hayward G. Disruption of PML subnuclear domains by the acidic IE1 protein of human cytomegalovirus is mediated through interaction with PML and may modulate a RING finger-dependent cryptic transactivator function of PML. *Mol Cell Biol.* 1998;18(8):4899–913.
157. Castillo J, Kowalik T. Human cytomegalovirus immediate early proteins and cell growth control. *Gene.* 2002;290(1–2):19–34.
158. Juckem L, Boehme K, Feire A, Compton T. Differential initiation of innate immune responses induced by human cytomegalovirus entry into fibroblast cells. *J Immunol.* 2008;180(7):4965–77.
159. Paulus C, Nevels M. The human cytomegalovirus major immediate-early proteins as antagonists of intrinsic and innate antiviral host responses. *Viruses.* 2009;1(3):760–79.
160. Lukac D, Manuppello J, Alwine J. Transcriptional activation by the human cytomegalovirus immediate-early proteins: requirements for simple promoter structures and interactions with multiple components of the transcription complex. *J Virol.* 1994;68(8):5184–93.
161. Spector D. Activation and regulation of human cytomegalovirus early genes. *Intervirology.* 1996;39(5-6):361–77.
162. Stenberg R. The human cytomegalovirus major immediate-early gene. *Intervirology.* 1996;39(5-6):343–9.
163. Harris S, Bullock B, Westgard E, Zhu H, Stenberg R, Kerry J. Functional properties of the human cytomegalovirus IE86 protein required for transcriptional regulation and virus replication. *J Virol.* 2010;84(17):8839–48.

164. Stinski M, Petrik D. Functional roles of the human cytomegalovirus essential IE86 protein. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008;325:133–52.
165. Murphy EA, Streblow DN, Nelson JA, Stinski MF. The human cytomegalovirus IE86 protein can block cell cycle progression after inducing transition into the S phase of permissive cells. *J Virol*. 2000;74(15):7108–18.
166. Kalejta R, Shenk T. Manipulation of the cell cycle by human cytomegalovirus. *Front Biosci a J virtual Libr*. 2002;7:d295–306.
167. Fortunato E, McElroy A, Sanchez I, Spector D. Exploitation of cellular signaling and regulatory pathways by human cytomegalovirus. *Trends Microbiol*. 2000;8(3):111–9.
168. Marshall E, Bierle C, Brune W, Geballe A. Essential role for either TRS1 or IRS1 in human cytomegalovirus replication. *J Virol*. 2009;83(9):4112–4120.
169. Braggin J, Child S, Geballe A. Essential role of protein kinase R antagonism by TRS1 in human cytomegalovirus replication. *Virology*. 2016;489:75–85.
170. Jones T, Wiertz E, Sun L, Fish K, Nelson J, Ploegh H. Human cytomegalovirus US3 impairs transport and maturation of major histocompatibility complex class I heavy chains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(21):11327–33.
171. Misaghi S, Sun Z, Stern P, Gaudet R, Wagner G, Ploegh H. Structural and functional analysis of human cytomegalovirus US3 protein. *J Virol*. 2004;78(1):413–23.
172. Liu Z, Winkler M, Biegelke B. Human cytomegalovirus: host immune modulation by the viral US3 gene. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009;41(3):503–6.
173. Noriega V, Hesse J, Gardner T, Besold K, Plachter B, Tortorella D. Human cytomegalovirus US3 modulates destruction of MHC class I molecules. *Mol Immunol*. 2012;51(2):245–53.
174. White EA, Spector DH. Early viral gene expression and function. In: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, eds. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 2007.
175. Park M, Kim Y, Seo M, Lee J, Lee C, Ahn J. Interactions among four proteins encoded by the human cytomegalovirus UL112-113 region regulate their intranuclear targeting and the recruitment of UL44 to prereplication foci. *J Virol*. 2006;80(6):2718–27.
176. Schommartz T, Tang J, Brost R, Brune W. Differential Requirement of Human Cytomegalovirus UL112-113 Protein Isoforms for Viral Replication. *J Virol*. 2017;91(17).
177. Cihlar T, Fuller M, Cherrington J. Expression of the catalytic subunit (UL54) and the accessory protein (UL44) of human cytomegalovirus DNA polymerase in a coupled in vitro transcription/translation system. *Protein Expr Purif*. 1997;11(2):209–18.
178. Sinigalia E, Alvisi G, Segré C, et al. The human cytomegalovirus DNA polymerase processivity factor UL44 is modified by SUMO in a DNA-dependent manner. *PLoS One*. 2012;7(11):e49630.
179. Chevalier M, Daniels G, Johnson D. Binding of human cytomegalovirus US2 to major histocompatibility complex class I and II proteins is not sufficient for their degradation. *J Virol*. 2002;76(16):8265–75.
180. Chevalier M, Johnson D. Human cytomegalovirus US3 chimeras containing US2

- cytosolic residues acquire major histocompatibility class I and II protein degradation properties. *J Virol.* 2003;77(8):4731–8.
181. Barel M, Hassink G, van Voorden S, Wiertz E. Human cytomegalovirus-encoded US2 and US11 target unassembled MHC class I heavy chains for degradation. *Mol Immunol.* 2006;43(8):1258-1266.
 182. Hassink G, Barel M, Van Voorden S, Kikkert M, Wiertz E. Ubiquitination of MHC class I heavy chains is essential for dislocation by human cytomegalovirus-encoded US2 but not US11. *J Biol Chem.* 2006;281(40):30063–71.
 183. Arnolds K, Lares A, Spencer J. The US27 gene product of human cytomegalovirus enhances signaling of host chemokine receptor CXCR4. *Virology.* 2013;439(2):122-131.
 184. Irmiere A, Gibson W. Isolation of human cytomegalovirus intranuclear capsids, characterization of their protein constituents, and demonstration that the B-capsid assembly protein is also abundant in noninfectious enveloped particles. *J Virol.* 1985;56(1):277–83.
 185. Beaudet-Miller M, Zhang R, Durkin J, Gibson W, Kwong A, Hong Z. Virus-specific interaction between the human cytomegalovirus major capsid protein and the C terminus of the assembly protein precursor. *J Virol.* 1996;70(11):8081–8.
 186. Gibson W, Clopper K, Britt W, Baxter M. Human cytomegalovirus (HCMV) smallest capsid protein identified as product of short open reading frame located between HCMV UL48 and UL49. *J Virol.* 1996;70(8):5680–3.
 187. Borst E, Mathys S, Wagner M, Muranyi W, Messerle M. Genetic evidence of an essential role for cytomegalovirus small capsid protein in viral growth. *J Virol.* 2001;75(3):1450–8.
 188. Yu X, Jih J, Jiang J, Zhou Z. Atomic structure of the human cytomegalovirus capsid with its securing tegument layer of pp150. *Science.* 2017;356(6345):eaam6892.
 189. Gibson W, Marcy A, Comolli J, Lee J. Identification of precursor to cytomegalovirus capsid assembly protein and evidence that processing results in loss of its carboxy-terminal end. *J Virol.* 1990;64(3):1241–9.
 190. Plafker S, Gibson W. Cytomegalovirus assembly protein precursor and proteinase precursor contain two nuclear localization signals that mediate their own nuclear translocation and that of the major capsid protein. *J Virol.* 1998;72(10):7722–32.
 191. Trus B, Gibson W, Cheng N, Steven A. Capsid structure of simian cytomegalovirus from cryoelectron microscopy: evidence for tegument attachment sites. *J Virol.* 1999;73(3):2181–92.
 192. Baldick C, Shenk T. Proteins associated with purified human cytomegalovirus particles. *J Virol.* 1996;70(9):6097–105.
 193. Varnum S, Streblow D, Monroe M, et al. Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome. *J Virol.* 2004;78(20):10960-6.
 194. Kalejta R. Tegument proteins of human cytomegalovirus. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2008;72(2):249–65.
 195. Smith R, Kosuri S, Kerry J. Role of human cytomegalovirus tegument proteins in virion assembly. *Viruses.* 2014;6(2):582–605.

196. Shenk T, Stinski M. Human cytomegalovirus. In: *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 1st ed. Berlin: Springer; 2008.
197. Giesen K, Radsak K, Bogner E. The potential terminase subunit of human cytomegalovirus, pUL56, is translocated into the nucleus by its own nuclear localization signal and interacts with importin alpha. *J Gen Virol*. 2000;81(Pt 9):2231–44.
198. Nguyen N, Loveland A, Gibson W. Nuclear localization sequences in cytomegalovirus capsid assembly proteins (UL80 proteins) are required for virus production: inactivating NLS1, NLS2, or both affects replication to strikingly different extents. *J Virol*. 2008;82(11):5381–9.
199. Arcangeletti M, De Conto F, Ferraglia F, et al. Human cytomegalovirus proteins PP65 and IEP72 are targeted to distinct compartments in nuclei and nuclear matrices of infected human embryo fibroblasts. *J Cell Biochem*. 2003;90(5):1056–67.
200. Arcangeletti M, Rodighiero I, De Conto F, et al. Modulatory effect of rRNA synthesis and ppUL83 nucleolar compartmentalization on human cytomegalovirus gene expression in vitro. *J Cell Biochem*. 2009;108(2):415–23.
201. Arcangeletti M, Rodighiero I, Mirandola P, et al. Cell-cycle-dependent localization of human cytomegalovirus UL83 phosphoprotein in the nucleolus and modulation of viral gene expression in human embryo fibroblasts in vitro. *J Cell Biochem*. 2011;112(1):307–17.
202. Browne EP, Shenk T. Human cytomegalovirus UL83-coded pp65 virion protein inhibits antiviral gene expression in infected cells. *Proc Natl Acad Sci*. 2003;100(20):11439–44.
203. Abate D, Watanabe S, Mocarski E. Major human cytomegalovirus structural protein pp65 (ppUL83) prevents interferon response factor 3 activation in the interferon response. *J Virol*. 2004;78(20):10995–1006.
204. Biolatti M, Dell'Oste V, Pautasso S, et al. The Human Cytomegalovirus Tegument Protein pp65 (pUL83) Dampens Type I Interferon Production by Inactivating the DNA Sensor cGAS without Affecting STING. *J Virol*. 2017:JVI.01774–17.
205. Bresnahan W, Shenk T. UL82 virion protein activates expression of immediate early viral genes in human cytomegalovirus-infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(26):14506–11.
206. Schierling K, Stamminger T, Mertens T, Winkler M. Human cytomegalovirus tegument proteins ppUL82 (pp71) and ppUL35 interact and cooperatively activate the major immediate-early enhancer. *J Virol*. 2004;78(17):9512–23.
207. Hesse J, Reyda S, Tenzer S, et al. Human cytomegalovirus pp71 stimulates major histocompatibility complex class I presentation of IE1-derived peptides at immediate early times of infection. *J Virol*. 2013;87(9):5229–38.
208. Wing B, Lee G, Huang E. The human cytomegalovirus UL94 open reading frame encodes a conserved herpesvirus capsid/tegument-associated virion protein that is expressed with true late kinetics. *J Virol*. 1996;70(6):3339–45.
209. Liu Y, Zhang Z, Zhao X, et al. Human cytomegalovirus UL94 is a nucleocytoplasmic shuttling protein containing two NLSs and one NES. *Virus Res*. 2012;166(1-2):31–42.
210. Phillips S, Cygnar D, Thomas A, Bresnahan W. Interaction between the human

- cytomegalovirus tegument proteins UL94 and UL99 is essential for virus replication. *J Virol.* 2012;86(18):9995–10005.
211. Phillips S, Bresnahan W. The human cytomegalovirus (HCMV) tegument protein UL94 is essential for secondary envelopment of HCMV virions. *J Virol.* 2012;86(5):2523–32.
 212. Britt W. Neutralizing antibodies detect a disulfide-linked glycoprotein complex within the envelope of human cytomegalovirus. *Virology.* 1984;135(2):369–78.
 213. Britt W, Auger D. Synthesis and processing of the envelope gp55-116 complex of human cytomegalovirus. *J Virol.* 1986;58(1):185–91.
 214. Mach M, Kropff B, Kryzaniak M, Britt W. Complex formation by glycoproteins M and N of human cytomegalovirus: structural and functional aspects. *J Virol.* 2005;79(4):2160–70.
 215. Huber M, Compton T. Characterization of a novel third member of the human cytomegalovirus glycoprotein H-glycoprotein L complex. *J Virol.* 1997;71(7):5391–8.
 216. Li L, Nelson JA, Britt WJ. Glycoprotein H-related complexes of human cytomegalovirus: identification of a third protein in the gCIII complex. *J Virol.* 1997;71(4):3090–7.
 217. Lehner R, Meyer H, Mach M. Identification and characterization of a human cytomegalovirus gene coding for a membrane protein that is conserved among human herpesviruses. *J Virol.* 1989;63(9):3792–800.
 218. Mattick C, Dewin D, Polley S, et al. Linkage of human cytomegalovirus glycoprotein gO variant groups identified from worldwide clinical isolates with gN genotypes, implications for disease associations and evidence for N-terminal sites of positive selection. *Virology.* 2004;318:582–97.
 219. Carraro E, Granato C. Single human cytomegalovirus gB genotype shed in multiple sites at the time of diagnosis in renal transplant recipients. *J Med Virol.* 2003;70(2):240–3.
 220. Puchhammer-Stöckl E, Görzer I, Zoufaly A, et al. Emergence of multiple cytomegalovirus strains in blood and lung of lung transplant recipients. *Transplantation.* 2006;81(2):187–94.
 221. Lisboa L, Kumar D, Wilson L, Humar A. Clinical utility of cytomegalovirus cell-mediated immunity in transplant recipients with cytomegalovirus viremia. *Transplantation.* 2012;93(2):195–200.
 222. Bates M, Monze M, Bima H, Kapambwe M, Kasolo F, Gompels U. High human cytomegalovirus loads and diverse linked variable genotypes in both HIV-1 infected and exposed, but uninfected, children in Africa. *Virology.* 2008;382:28–36.
 223. Bolovan-Fritts C, Mocarski E, Wiedeman J. Peripheral blood CD14(+) cells from healthy subjects carry a circular conformation of latent cytomegalovirus genome. *Blood.* 1999;93(1):394–8.
 224. Kondo K, Kaneshima H, Mocarski E. Human cytomegalovirus latent infection of granulocyte-macrophage progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(25):11879–83.
 225. Hahn G, Jores R, Mocarski E. Cytomegalovirus remains latent in a common precursor of dendritic and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(7):3937–42.

226. Slobedman B, Mocarski E. Quantitative analysis of latent human cytomegalovirus. *J Virol.* 1999;73(6):4806–12.
227. Bego M, Maciejewski J, Khaiboullina S, Pari G, St Jeor S. Characterization of an antisense transcript spanning the UL81-82 locus of human cytomegalovirus. *J Virol.* 2005;79(17):11022–34.
228. Rossetto C, Tarrant-Elorza M, Pari G. Cis and trans acting factors involved in human cytomegalovirus experimental and natural latent infection of CD14+ monocytes and CD34+ cells. *PLoS Pathog.* 2013;9(5):e1003366.
229. Schrier R, Nelson J, Oldstone M. Detection of human cytomegalovirus in peripheral blood lymphocytes in a natural infection. *Science.* 1985;230(4729):1048–51.
230. Gnann J, Ahlmén J, Svalander C, et al. Inflammatory cells in transplanted kidneys are infected by human cytomegalovirus. *Am J Pathol.* 1988;132(2):239–48.
231. Stanier P, Kitchen A, Taylor D, Tyms A. Detection of human cytomegalovirus in peripheral mononuclear cells and urine samples using PCR. *Mol Cell Probes.* 1992;6(1):51–8.
232. Hendrix R, Wagenaar M, Slobbe R, Bruggeman C. Widespread presence of cytomegalovirus DNA in tissues of healthy trauma victims. *J Clin Pathol.* 1997;50(1):59–63.
233. Wills M, Poole E, Lau B, Krishna B, Sinclair J. The immunology of human cytomegalovirus latency: could latent infection be cleared by novel immunotherapeutic strategies? *Cell Mol Immunol.* 2015;12:128–38.
234. Collins-McMillen D, Buehler J, Peppenelli M, Goodrum F. Molecular Determinants and the Regulation of Human Cytomegalovirus Latency and Reactivation. *Viruses.* 2018;10(8).
235. Roback J, Hillyer C, Drew W, et al. Multicenter evaluation of PCR methods for detecting CMV DNA in blood donors. *Transfusion.* 2001;41(10):1249–57.
236. Roback J, Drew W, Laycock M, Todd D, Hillyer C, Busch M. CMV DNA is rarely detected in healthy blood donors using validated PCR assays. *Transfusion.* 2003;43(3):314–21.
237. Sinclair J, Baillie J, Bryant L, Taylor-Wiedeman J, Sissons J. Repression of human cytomegalovirus major immediate early gene expression in a monocytic cell line. *J Gen Virol.* 1992;73:433–5.
238. loudinkova E, Arcangeletti M, Rynditch A, et al. Control of human cytomegalovirus gene expression by differential histone modifications during lytic and latent infection of a monocytic cell line. *Gene.* 2006;384:120–8.
239. Saffert R, Kalejta R. Human cytomegalovirus gene expression is silenced by Daxx-mediated intrinsic immune defense in model latent infections established in vitro. *J Virol.* 2007;81(17):9109–20.
240. Abraham C, Kulesza C. Polycomb repressive complex 2 silences human cytomegalovirus transcription in quiescent infection models. *J Virol.* 2013;87:13193–205.
241. Shen Z, Pan X, Miao L, et al. Comprehensive analysis of human cytomegalovirus microRNA expression during lytic and quiescent infection. *PLoS One.*

- 2014;9(2):e88531.
242. Sanchez V, Dong J, Battley J, Jackson K, Dykes B. Human cytomegalovirus infection of THP-1 derived macrophages reveals strain-specific regulation of actin dynamics. *Virology*. 2012;433:64–72.
 243. Duan Y, Ye H, Zavala A, et al. Maintenance of large numbers of virus genomes in human cytomegalovirus-infected T98G glioblastoma cells. *J Virol*. 2014;88:3861–73.
 244. Lee C, Lee G, Chan Y, Chiou C, Ahn J, Hayward G. Factors affecting human cytomegalovirus gene expression in human monocyte cell lines. *Mol Cells*. 1999;9(1):37–44.
 245. Beisser P, Laurent L, Virelizier J, Michelson S. Human cytomegalovirus chemokine receptor gene US28 is transcribed in latently infected THP-1 monocytes. *J Virol*. 2001;75(13):5949–57.
 246. Wagenknecht N, Reuter N, Scherer M, Reichel A, Müller R, Stamminger T. Contribution of the Major ND10 Proteins PML, hDaxx and Sp100 to the Regulation of Human Cytomegalovirus Latency and Lytic Replication in the Monocytic Cell Line THP-1. *Viruses*. 2015;7(6):2884–907.
 247. Sinclair J, Baillie J, Bryant L, Caswell R. Human cytomegalovirus mediates cell cycle progression through G(1) into early S phase in terminally differentiated cells. *J Gen Virol*. 2000;81(Pt 6):1553-65.
 248. Söderberg-Nauclér C. Does cytomegalovirus play a causative role in the development of various inflammatory diseases and cancer? *J Intern Med*. 2006;259(3):219–46.
 249. Vescovini R, Biasini C, Fagnoni F, et al. Massive load of functional effector CD4+ and CD8+ T cells against cytomegalovirus in very old subjects. *J Immunol*. 2007;179(6):4283-91.
 250. La Rosa C, Diamond D. The immune response to human CMV. *Future Virol*. 2012;7(3):279-293.
 251. Vescovini R, Fagnoni FF, Telera AR, et al. Naïve and memory CD8 T cell pool homeostasis in advanced aging: impact of age and of antigen-specific responses to cytomegalovirus. *Age (Omaha)*. 2014;36(2):625-640.
 252. Asano Y. Systemic sclerosis. *J Dermatol*. 2018;45(2):128-138.
 253. Nakamura K, Eizuru Y, Minamishima Y. Effect of natural human interferon-beta on the replication of human cytomegalovirus. *J Med Virol*. 1988;26(4):363–73.
 254. Delannoy A, Hober D, Bouzidi A, Wattre P. Role of interferon alpha (IFN-alpha) and interferon gamma (IFN-gamma) in the control of the infection of monocyte-like cells with human cytomegalovirus (HCMV). *Microbiol Immunol*. 1999;43(12):1087–96.
 255. Sainz B, LaMarca H, Garry R, Morris C. Synergistic inhibition of human cytomegalovirus replication by interferon-alpha/beta and interferon-gamma. *Virol J*. 2005;2(1):14.
 256. Cheeran M, Hu S, Step M, et al. Cytomegalovirus induces cytokine and chemokine production differentially in microglia and astrocytes: Antiviral implications. *J Neurovirol*. 2001;7(2):135–47.
 257. Miller D, Zhang Y, Rahill B, Waldman W, Sedmak D. Human cytomegalovirus inhibits

- IFN-alpha-stimulated antiviral and immunoregulatory responses by blocking multiple levels of IFN-alpha signal transduction. *J Immunol.* 1999;162(10):6107–13.
258. Miller D, Zhang Y, Rahill B, et al. Human cytomegalovirus blocks interferon-gamma stimulated up-regulation of major histocompatibility complex class I expression and the class I antigen processing machinery. *Transplantation.* 2000;69(4):687–90.
259. Taylor R, Bresnahan W. Human cytomegalovirus immediate-early 2 gene expression blocks virus-induced beta interferon production. *J Virol.* 2005;79(6):3873–77.
260. Le V, Trilling M, Zimmermann A, Hengel H. Mouse cytomegalovirus inhibits beta interferon (IFN-beta) gene expression and controls activation pathways of the IFN-beta enhanceosome. *J Gen Virol.* 2008;89(5):1131–41.
261. Hirsch A, Shenk T. Human cytomegalovirus inhibits transcription of the CC chemokine MCP-1 gene. *J Virol.* 1999;73(1):404–10.
262. Taylor R, Bresnahan W. Human cytomegalovirus immediate-early 2 protein IE86 blocks virus-induced chemokine expression. *J Virol.* 2006;80(2):920–8.
263. Reyburn H, Mandelboim O, Valés-Gómez M, Davis D, Pazmany L, Strominger J. The class I MHC homologue of human cytomegalovirus inhibits attack by natural killer cells. *Nature.* 1997;386(6624):514–7.
264. Fletcher J, Prentice H, Grundy J. Natural killer cell lysis of cytomegalovirus (CMV)-infected cells correlates with virally induced changes in cell surface lymphocyte function-associated antigen-3 (LFA-3) expression and not with the CMV-induced down-regulation of cell surface class I HLA. *J Immunol.* 1998;161(5):2365–74.
265. Leong C, Chapman T, Bjorkman P, et al. Modulation of natural killer cell cytotoxicity in human cytomegalovirus infection: the role of endogenous class I major histocompatibility complex and a viral class I homolog. *J Exp Med.* 1998;187(10):1681–7.
266. Cerboni C, Mousavi-Jazi M, Linde A, et al. Human cytomegalovirus strain-dependent changes in NK cell recognition of infected fibroblasts. *J Immunol.* 2000;164(9):4775–82.
267. Tomasec P, Braud V, Rickards C, et al. Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40. *Science.* 2000;287(5455):1031.
268. Cerboni C, Mousavi-Jazi M, Wakiguchi H, Carbone E, Kärre K, Söderström K. Synergistic effect of IFN-gamma and human cytomegalovirus protein UL40 in the HLA-E-dependent protection from NK cell-mediated cytotoxicity. *Eur J Immunol.* 2001;31(10):2926–35.
269. Odeberg J, Browne H, Metkar S, et al. The human cytomegalovirus protein UL16 mediates increased resistance to natural killer cell cytotoxicity through resistance to cytolytic proteins. *J Virol.* 2003;77(8):4539–45.
270. Grigoleit U, Riegler S, Einsele H, et al. Human cytomegalovirus induces a direct inhibitory effect on antigen presentation by monocyte-derived immature dendritic cells. *Br J Haematol.* 2002;119(1):189–98.
271. Moutaftsi M, Mehl A, Borysiewicz L, Tabi Z. Human cytomegalovirus inhibits maturation and impairs function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood.* 2002;99(8):2913–21.

272. Vieira Braga F, Hertoghs K, van Lier R, van Gisbergen K. Molecular characterization of HCMV-specific immune responses: Parallels between CD8 + T cells, CD4 + T cells, and NK cells. *Eur J Immunol.* 2015;45(9):2433–45.
273. Moss P, Khan N. CD8+ T-cell immunity to cytomegalovirus. *Hum Immunol.* 2004;65(5):456–64.
274. Klenerman P, Oxenius A. T cell responses to cytomegalovirus. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(6):367–77.
275. Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature.* 1999;401(6754):708–712.
276. Cui W, Kaech S. Generation of effector CD8+ T cells and their conversion to memory T cells. *Immunol Rev.* 2010;236:151–66.
277. Schenkel J, Masopust D. Tissue-resident memory T cells. *Immunity.* 2014;41(6):886–97.
278. Thome J, Farber D. Emerging concepts in tissue-resident T cells: lessons from humans. *Trends Immunol.* 2015;36(7):428–35.
279. Looney R, Falsey A, Campbell D, et al. Role of cytomegalovirus in the T cell changes seen in elderly individuals. *Clin Immunol.* 1999;90(2):213–9.
280. Emery V. Cytomegalovirus and the aging population. *Drugs Aging.* 2001;18(12):927–33.
281. Strioga M, Pasukoniene V, Characiejus D. CD8+ CD28- and CD8+ CD57+ T cells and their role in health and disease. *Immunology.* 2011;134(1):17–32.
282. Wallace D, Masters J, De Lara C, et al. Human cytomegalovirus-specific CD8(+) T-cell expansions contain long-lived cells that retain functional capacity in both young and elderly subjects. *Immunology.* 2011;132(1):27–38.
283. Kim J, Kim A, Shin E. Cytomegalovirus Infection and Memory T Cell Inflation. *Immune Netw.* 2015;15(4):186–90.
284. Torti N, Oxenius A. T cell memory in the context of persistent herpes viral infections. *Viruses.* 2012;4(7):1116–1143.
285. McLaughlin-Taylor E, Pande H, Forman S, et al. Identification of the major late human cytomegalovirus matrix protein pp65 as a target antigen for CD8+ virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Med Virol.* 1994;43(1):103–10.
286. Kano Y, Shiohara T. Current understanding of cytomegalovirus infection in immunocompetent individuals. *J Dermatol Sci.* 2000;22(3):196–204.
287. Khan N, Cobbold M, Keenan R, Moss P. Comparative analysis of CD8+ T cell responses against human cytomegalovirus proteins pp65 and immediate early 1 shows similarities in precursor frequency, oligoclonality, and phenotype. *J Infect Dis.* 2002;185(8):1025–34.
288. Gibson L, Piccinini G, Lilleri D, et al. Human cytomegalovirus proteins pp65 and immediate early protein 1 are common targets for CD8+ T cell responses in children with congenital or postnatal human cytomegalovirus infection. *J Immunol.* 2004;172(4):2256–64.

289. Sylwester A, Mitchell B, Edgar J, et al. Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J Exp Med.* 2005;202(5):673–85.
290. Jackson S, Mason G, Okecha G, Sissons J, Wills M. Diverse specificities, phenotypes, and antiviral activities of cytomegalovirus-specific CD8+ T cells. *J Virol.* 2014;88(18):10894–908.
291. Malik A, Adland E, Laker L, et al. Immunodominant cytomegalovirus-specific CD8+ T-cell responses in sub-Saharan African populations. *PLoS One.* 2017;12(12):e0189612.
292. Snyder C. Buffered memory: a hypothesis for the maintenance of functional, virus-specific CD8(+) T cells during cytomegalovirus infection. *Immunol Res.* 2011;51(2-3):195-204.
293. Seckert C, Griebel M, Büttner J, et al. Viral latency drives ‘memory inflation’: a unifying hypothesis linking two hallmarks of cytomegalovirus infection. *Med Microbiol Immunol.* 2012;201(4):551-566.
294. Broadley I, Pera A, Morrow G, Davies K, Kern F. Expansions of Cytotoxic CD4+CD28- T Cells Drive Excess Cardiovascular Mortality in Rheumatoid Arthritis and Other Chronic Inflammatory Conditions and Are Triggered by CMV Infection. *Front Immunol.* 2017;8:195.
295. Fuschiotti P. Current perspectives on the role of CD8+ T cells in systemic sclerosis. *Immunol Lett.* 2017;S0165-2478(17):30331–40.
296. Meier J, Stinski M. Effect of a modulator deletion on transcription of the human cytomegalovirus major immediate-early genes in infected undifferentiated and differentiated cells. *J Virol.* 1997;71:1246–55.
297. Weinshenker B, Wilton S, Rice G. Phorbol ester-induced differentiation permits productive human cytomegalovirus infection in a monocytic cell line. *J Immunol.* 1988;140:1625–31.
298. Turtinen L, Seufzer B. Selective permissiveness of TPA differentiated THP-1 myelomonocytic cells for human cytomegalovirus strains AD169 and Towne. *Microb Pathog.* 1994;16:373–8.
299. Ferri C, Valentini G, Cozzi F, et al. Systemic sclerosis: demographic, clinical, and serologic features and survival in 1,012 Italian patients. *Medicine (Baltimore).* 2002;81(2):139-53.
300. Medsger T. Natural history of systemic sclerosis and the assessment of disease activity, severity, functional status, and psychologic well-being. *Rheum Dis Clin North Am.* 2003;29(2):255-273.
301. Gabrielli A, Avvedimento E, Krieg T. Scleroderma. *N Engl J Med.* 2009;360(19):1989-2003.
302. Ferri C, Sebastiani M, Lo Monaco A, et al. Systemic sclerosis evolution of disease pathomorphosis and survival. Our experience on Italian patients’ population and review of the literature. *Autoimmun Rev.* 2014;13(10):1026-1034.
303. Giuggioli D, Colaci M, Cocchiara E, Spinella A, Lumetti F, Ferri C. From Localized Scleroderma to Systemic Sclerosis: Coexistence or Possible Evolution. *Dermatol Res Pract.* 2018;2018:1-5.

304. Sakkas LI, Platsoucas CD. Is systemic sclerosis an antigen-driven T cell disease? *Arthritis Rheum.* 2004;50(6):1721-1733.
305. Abraham D, Krieg T, Distler J, Distler O. Overview of pathogenesis of systemic sclerosis. *Rheumatology.* 2006;48(suppl_3):iii3-iii7.
306. Fuschiotti P. Current perspectives on the role of CD8+ T cells in systemic sclerosis. *Immunol Lett.* 2018;195:55-60.
307. Fujii H, Hasegawa M, Takehara K, Mukaida N, Sato S. Abnormal expression of intracellular cytokines and chemokine receptors in peripheral blood T lymphocytes from patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol.* 2002;130(3):548-556.
308. Radstake T, van Bon L, Broen J, et al. The pronounced Th17 profile in systemic sclerosis (SSc) together with intracellular expression of TGF β and IFN γ distinguishes SSc phenotypes. *PLoS One.* 2009;4(6):e5903.
309. Baraut J, Michel L, Verrecchia F, Farge D. Relationship between cytokine profiles and clinical outcomes in patients with systemic sclerosis. *Autoimmun Rev.* 2010;10(2):65-73.
310. Fenoglio D, Battaglia F, Parodi A, et al. Alteration of Th17 and Treg cell subpopulations co-exist in patients affected with systemic sclerosis. *Clin Immunol.* 2011;139(3):249-257.
311. Truchetet M, Brembilla N, Montanari E, Allanore Y, Chizzolini C. Increased frequency of circulating Th22 in addition to Th17 and Th2 lymphocytes in systemic sclerosis: association with interstitial lung disease. *Arthritis Res Ther.* 2011;13(5):R166.
312. O'Reilly S, Huggle T, van Laar J. T cells in systemic sclerosis: a reappraisal. *Rheumatology.* 2012;51(9):1540-1549.
313. Brembilla N, Montanari E, Truchetet M, Raschi E, Meroni P, Chizzolini C. Th17 cells favor inflammatory responses while inhibiting type I collagen deposition by dermal fibroblasts: differential effects in healthy and systemic sclerosis fibroblasts. *Arthritis Res Ther.* 2013;15(5):R151.
314. Liu M, Wu W, Sun X, et al. New insights into CD4+ T cell abnormalities in systemic sclerosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2016;28:31-36.
315. Fuschiotti P, Larregina A, Ho J, Feghali-Bostwick C, Medsger T. Interleukin-13-producing CD8+ T cells mediate dermal fibrosis in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2013;65(1):236-246.
316. Li G, Larregina A, Domsic R, et al. Skin-resident effector memory CD8+CD28- T cells exhibit a profibrotic phenotype in patients with systemic sclerosis. *J Invest Dermatol.* 2017;137(5):1042-1050.
317. Gustafsson R, Tötterman T, Klareskog L, Hällgren R. Increase in activated T cells and reduction in suppressor inducer T cells in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 1990;49(1):40-5.
318. Lympany P, Southcott A, Welsh K, Black C, Boylston A, du Bois R. T-cell receptor gene usage in patients with fibrosing alveolitis and control subjects. *Eur J Clin Invest.* 1999;29(2):173-181.
319. Tiev K, Abriol J, Burland M, et al. T cell repertoire in patients with stable scleroderma. *Clin Exp Immunol.* 2005;139(2):348-354.

320. Ferri C, Cazzato M, Giuggioli D, Sebastiani M, Magro C. Systemic sclerosis following human cytomegalovirus infection. *Ann Rheum Dis.* 2002;61(10):937-8.
321. Jun J-B, Kuechle M, Harlan J, Elkon K. Fibroblast and endothelial apoptosis in systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol.* 2003;15(6):756-60.
322. Santiago B, Galindo M, Rivero M, Pablos J. Decreased susceptibility to Fas-induced apoptosis of systemic sclerosis dermal fibroblasts. *ARTHRITIS Rheum.* 2001;44:1667-76.
323. Usategui A, del Rey M, Pablos J. Fibroblast abnormalities in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Expert Rev Clin Immunol.* 2011;7(4):491-98.
324. Gilbane A, Denton C, Holmes A. Scleroderma pathogenesis: a pivotal role for fibroblasts as effector cells. *Arthritis Res Ther.* 2013;15(3):215.
325. Trojanowska M. Cellular and molecular aspects of vascular dysfunction in systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol.* 2010;6(8):1-19.
326. Pandey J, LeRoy E. Human cytomegalovirus and the vasculopathies of autoimmune diseases (especially scleroderma), allograft rejection and coronary restenosis. *Arthritis Rheum.* 1998;41:10-15.
327. Namboodiri A, Rocca K, Kuwana M, Pandey J. Antibodies to human cytomegalovirus protein UL83 in systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol.* 2006;24:176-78.
328. Pandey J. Immunoglobulin GM genes and IgG antibodies to cytomegalovirus in patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol.* 2004:S-35-S-37.
329. Lunardi C, Bason C, Navone R, et al. Systemic sclerosis immunoglobulin G autoantibodies bind the human cytomegalovirus late protein UL94 and induce apoptosis in human endothelial cells. *Nat Med.* 2000;6(10):1183-6.
330. Komatsu H, Sierro S, V Cuero A, Klenerman P. Population analysis of antiviral T cell responses using MHC class I-peptide tetramers. *Clin Exp Immunol.* 2003;134(1):9-12.
331. Cicin-Sain L, Brien J, Uhrlaub J, Drabig A, Marandu T, Nikolich-Zugich J. Cytomegalovirus Infection Impairs Immune Responses and Accentuates T-cell Pool Changes Observed in Mice with Aging. *PLoS Pathog.* 2012;8(8):e1002849.
332. Goulabchand R, Khellaf L, Forestier A, et al. Acute and regressive scleroderma concomitant to an acute CMV primary infection. *J Clin Virol.* 2014;61(4):604-7.
333. Gruschwitz M, Sepp N, Kofler H, Wick G. Expression of class II-MHC antigens in the dermis of patients with progressive systemic sclerosis. *Immunobiology.* 1991;182:234-55.
334. Gruschwitz M, von den Vieth G. Up-regulation of class II major histocompatibility complex and intercellular adhesion molecule 1 expression on scleroderma fibroblasts and endothelial cells by interferon- gamma and tumor necrosis factor alpha in the early disease stage. *Arthritis Rheum.* 1997;40:540-50.
335. Gruschwitz M, von den Driesch P, Kellner I, Hornstein O, Sterry W. Expression of adhesion proteins involved in cell-cell and cell-matrix interactions in the skin of patients with progressive systemic sclerosis. *J Am Acad Dermatol.* 1992;27:169-77.
336. Sollberg S, Peltonen J, Uitto J, Jimenez S. Elevated expression of beta 1 and beta 2 integrins, intercellular adhesion molecule 1, and endothelial leukocyte adhesion

- molecule 1 in the skin of patients with systemic sclerosis of recent onset. *Arthritis Rheum.* 1992;35:290–8.
337. Prescott R, Freemont A, Jones C, Hoyland J, Fielding P. Sequential dermal microvascular and perivascular changes in the development of scleroderma. *J Pathol.* 1992;166:255–63.
 338. Abraham D, Krieg T, Distler J, Distler O. Overview of pathogenesis of systemic sclerosis. *Rheumatology.* 2009;48:iii3–iii7.
 339. Kahaleh B. Immunologic aspects of scleroderma. *Curr Opin Rheumatol.* 1993;5:760–5.
 340. Fiocco U, Rosada M, Cozzi L. Early phenotypic activation of circulating helper memory T cells in scleroderma: correlation with disease activity. *Ann Rheum Dis.* 1993;52:272–7.
 341. Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer.* 1980;26(2):171–6.
 342. Jacobs J, Jones C, Baille J. Characteristics of a Human Diploid Cell Designated MRC-5. *Nature.* 1970;227:168–70.
 343. Davis B, Dulbecco R, Eisen H, Ginsberg H. *Microbiology. 4 Th Ed.* Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia; 1990.
 344. Holder B, Jones T, Sancho Shimizu V, et al. Macrophage Exosomes Induce Placental Inflammatory Cytokines: A Novel Mode of Maternal-Placental Messaging. *Traffic.* 2006;17:168–78.
 345. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248–54.
 346. Pignatelli S, Dal Monte P, Rossini G, et al. Latency-associated human cytomegalovirus glycoprotein N genotypes in monocytes from healthy blood donors. *Transfusion.* 2006;46(10):1754–62.
 347. van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American College of Rheumatology/European League against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 2013;65(11):2737–47.
 348. Clements P, Lachenbruch P, Siebold J, et al. Inter and intraobserver variability of total skin thickness score (modified Rodnan TSS) in systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 1995;22(7):1281–5.
 349. Khanna D, Furst D, Clements P, et al. Standardization of the modified Rodnan skin score for use in clinical trials of systemic sclerosis. *J Scleroderma Relat Disord.* 2017;2(1):11–18.
 350. Parry H, Zuo J, Frumento G, et al. Cytomegalovirus viral load within blood increases markedly in healthy people over the age of 70 years. *Immun Ageing.* 2016;13.
 351. Yee L, Lin P, Stinski M. Ectopic expression of HCMV IE72 and IE86 proteins is sufficient to induce early gene expression but not production of infectious virus in undifferentiated promonocytic THP-1 cells. *Virology.* 2007;363:174–88.
 352. Takashiba S, Van Dyke T, Amar S, Murayama Y, Soskolne A, Shapira L.

- Differentiation of monocytes to macrophages primes cells for lipopolysaccharide stimulation via accumulation of cytoplasmic nuclear factor kappaB. *Infect Immun.* 1999;67(11):5573-8.
353. Dumrese C, Slomianka L, Ziegler U, et al. The secreted Helicobacter cysteine-rich protein A causes adherence of human monocytes and differentiation into a macrophage-like phenotype. *FEBS Lett.* 2009;583(10):1637-1643.
 354. Maeß M, Wittig B, Cignarella A, Lorkowski S. Reduced PMA enhances the responsiveness of transfected THP-1 macrophages to polarizing stimuli. *J Immunol Methods.* 2014;402(1-2):76-81.
 355. Schorey J, Cheng Y, Singh P, Smith V. Exosomes and other extracellular vesicles in host pathogen interactions. *EMBO Rep.* 2015;16:24–43.
 356. Kalamvoki M, Deschamps T. Extracellular vesicles during Herpes Simplex Virus type 1 infection: an inquire. *Virol J.* 2016;13:63.
 357. Krishnamurthi R V, Feigin VL, Forouzanfar MH, et al. Global and regional burden of first-ever ischaemic and haemorrhagic stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet Glob Heal.* 2013;1:259–81.
 358. O'Donnell MJ, Chin SL, Rangarajan S, et al. Global and regional effects of potentially modifiable risk factors associated with acute stroke in 32 countries (INTERSTROKE): a case-control study. *Lancet.* 2016;388(10046):761–75.
 359. Hargett D, Shenk T. Experimental human cytomegalovirus latency in CD14+ monocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107(46):20039–44.
 360. Nadareishvili Z, LI H, Wright V, et al. Elevated pro-inflammatory CD4+CD28-lymphocytes and stroke recurrence and death. *Neurology.* 2004;63:1446–51.
 361. van Leeuwen E, Remmerswaal E, Vossen M, et al. Emergence of a CD4+CD28-granzyme B+, cytomegalovirus-specific T cell subset after recovery of primary cytomegalovirus infection. *J Immunol.* 2004;173:1834–41.
 362. Randone S, Guiducci S, Cerinic M. Systemic sclerosis and infections. *Autoimmun Rev.* 2008;8(1):36-40.
 363. Moroncini G, Mori S, Tonnini C, Gabrielli A. Role of viral infections in the etiopathogenesis of systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol.* 2013;31(2 Suppl 76):3–7.
 364. Sinzger C, Grefte A, Plachter B, Gouw A, The T, Jahn G. Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues. *J Gen Virol.* 1995;76(4):741-750.
 365. Arnson Y, Amital H, Guiducci S, et al. The role of infections in the immunopathogenesis of systemic sclerosis-evidence from serological studies. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1173(1):627-632.
 366. Slezak S, Bettinotti M, Selleri S, Adams S, Marincola F, Stroncek D. CMV pp65 and IE-1 T cell epitopes recognized by healthy subjects. *J Transl Med.* 2007;5(1):17.
 367. Janahi E, Das S, Bhattacharya S, et al. Cytomegalovirus aggravates the autoimmune phenomenon in systemic autoimmune diseases. *Microb Pathog.* 2018;120:132-139.
 368. Maecker H, Dunn H, Suni M, et al. Use of overlapping peptide mixtures as antigens for cytokine flow cytometry. *J Immunol Methods.* 2001;255(1-2):27-40.

369. Bentz G, Jarquin-Pardo M, Chan G, Smith M, Sinzger C, Yurochko A. Human cytomegalovirus (HCMV) infection of endothelial cells promotes naive monocyte extravasation and transfer of productive virus to enhance hematogenous dissemination of HCMV. *J Virol.* 2006;80(23):11539-55.
370. Sinclair J, Sissons P. Latent and persistent infections of monocytes and macrophages. *Intervirology.* 1996;39(5-6):293-301.
371. Arcangeletti M, Vasile Simone R, Rodighiero I, et al. Human cytomegalovirus reactivation from latency: validation of a “switch” model in vitro. *Viol J.* 2016;13(1):179.
372. Waldman W, Knight D, Adams P. Cytolytic activity against allogeneic human endothelia: resistance of cytomegalovirus-infected cells and virally activated lysis of uninfected cells. *Transplantation.* 1998;66(1):67-77.
373. Steen VD, Medsger T, Rodnan G. D-Penicillamine therapy in progressive systemic sclerosis (scleroderma): a retrospective analysis. *Ann Intern Med.* 1982;97(5):652-9.
374. Clements P, Hurwitz E, Wong W, et al. Skin thickness score as a predictor and correlate of outcome in systemic sclerosis: High-dose versus low-dose penicillamine trial. *Arthritis Rheum.* 2000;43(11):2445-2454.
375. Steen V, Medsger T. Improvement in skin thickening in systemic sclerosis associated with improved survival. *Arthritis Rheum.* 2001;44(12):2828-35.
376. Shand L, Lunt M, Nihtyanova S, et al. Relationship between change in skin score and disease outcome in diffuse cutaneous systemic sclerosis: Application of a latent linear trajectory model. *Arthritis Rheum.* 2007;56(7):2422-2431.